



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

**“Diseño y síntesis de derivados de 5,6-
dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolinas con potencial
actividad antituberculosis”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO INDUSTRIAL**

P R E S E N T A:

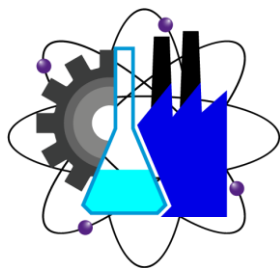
T.L.I.F. MAURICIO BAHENA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROBERTO MARTÍNEZ

Investigador SNI III del Instituto de Química de la UNAM

NOVIEMBRE, 2021





FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES y CACEI
Certificada en la norma ISO 9000:2008



FORMA T-4
NOMBRAMIENTO DE COMITÉ REVISOR

Cuernavaca, Mor., a 29 de octubre de 2021.

DRA. MARÍA GUADALUPE VALLADARES CISNEROS
DRA. MA. YOLANDA RÍOS GÓMEZ
DRA. VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS
DR. IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO
DRA. MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA
P R E S E N T E

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del **COMITÉ REVISOR** de la **TESIS** Titulada:

Diseño y síntesis de derivados de 5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolinas con potencial actividad antituberculosis.

Que presenta (el) o (la) **C. MAURICIO BAHENA GARCÍA**, del programa educativo de **QUÍMICO INDUSTRIAL**.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA

D I C T A M E N

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNANDEZ
DIRECTORA DE LA FCQeI
P R E S E N T E

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTAMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es: *Aprobatorio, se anexan firmas electrónicas*

VOTO	NOMBRE	FIRMA
	DRA. MARÍA GUADALUPE VALLADARES CISNEROS	
	DRA. MA. YOLANDA RÍOS GÓMEZ	
	DRA. VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS	
	DR. IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO	
	DRA. MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA	

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,
Tel. (777) 329 70,00, Ext. 7039/ fcqe@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VIRIDIANA AYDEE LEON HERNANDEZ | Fecha:2021-11-03 17:20:45 | Firmante
DYgHEEnHeLUkVDL+KzWggsDzbuFr6RLc3fGUZ2YizfaU0DItTAODE6aiub6RZX2uUnsWFAl+we4Gr3pv2t9XCNPWsPQAbilc+b21TURkyq/fnlcRq8JHdIJ6vmwToV6+RbrU6vEz
3XcY4vBk/ZCFJAik5HG7kh68rAx8lp5NA60y6zrlrJxlyvMY5iSopfrJAXEzHRrjO755bA1M76BSQ69igVrdAA3sX56FWg04bcC6WSUod6pzu4X3PGQ+5E4Bo6utd/Ymcs9Aqe4R7A
gLKloloZcsOoylyy9D8DBsNNTJrB7VHSqa2wj2869dU3V7rzgfr7jdykjb9lEhTSTw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



cJFqejXf4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kqRFpBH2U4WHVioOSEu143McHjrwLFX>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MA. YOLANDA RIOS GOMEZ | Fecha:2021-11-08 09:56:10 | Firmante

jTZJg6SVYJpH5s8SeyQbKbWHXTxwXbczVR7+9DXCB6q+MXe3a7o5WHSRB3o/5davXrr/I58E8nwWF5mvQHNVOrk8mr8qgrg1hkM6e6UMj5P4lBrzuloZ/cpziW7t3rmlV2UzW8U/obp+sAA6RCh1ijmmIPsfbu7lx/NOZHGVTBhRtZ6KIN7SBE4q+JCKwaTMAAJJRgOVXDE1KpU9XsJ04qYhPj0Sm4w/VK676tR7iSyBmjV9sEtmQy0EPvBRdr4cZ9+9j+Ogfgqmoyy5sGDDNA5j1Z4ViiYFQiifRKgfw+kelbPAn9SViVJ0p7pi9cPX6M9rjDgh9whr3EENQ==

MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA | Fecha:2021-11-08 11:02:41 | Firmante

ShgkGaW4NidAj0v0m9yXLoxDHVrclyXs2+PqKJIWU/7h6qP8E12y/4CFWp/LS7gsoEORA+YChY1WCGEuAsyMxfi6IXAN6gae0m7NwVCgkzIDahlVKkqyB51/UDomQKZXAHt+DYIPy2IRJ3xrzi+j+M1a99ecUJH0a1/DgJzupXrqQORmgCUR9JD1wVS1g9jqDV95+/Gx8c/7T4muJLH1FWsv6gbal.bahilArsDnLD+/g6N1u3q98ALQ6HQXSX6Hqz22KGWHloX1ghGBS+yOTC6RgMllqMzYr1r80bamuj8pBjdXr1fvdbsyL0sLyUFYzgnUX5ykajWGgtYsYpg==

IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO | Fecha:2021-11-08 13:24:58 | Firmante

QgPM98X2hGm7VmzZ/6G55C3RZFmMP1nV3SNE0tTKDK5dlrxZCs2cujp9zy1wybjfhNuFP7IITed3Yxxrt2iqADqLX+mJJfD5iL1WDH9mTC/76UPkBOAgzsMlnOnfO+sd1gcG9hh1xi00uda2MGeEXSAj/FCJJBzvqFW8X6a+qsdkfuPtVqmc/AP0bbQmUHTBTyyUdft4pl9DdQBmFICwEI40oL+y84il7X9NUgajr+xgMwIEFJrcpmM9ZT6I/7ZAcCn12nmV8qRppqQ4B9APP0aq7OZYyGyF+QtGj9DcTrgL+X+2VMU7jg3OY+OSaDVaSPH3njEnGTtq9gw==

VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS | Fecha:2021-11-08 13:26:28 | Firmante

BWqY35HLri4eU0YYGonAgN5OhClyrRS6s6Ns/RyJeNVG/Eb+z4ODt8KR0vhozYSI1GHaGHpMjAgKOCK2z3VfuDE95hXAMarxpsRj8M+5ZYyQnw9ikb0g0F5f8HJIDnppiDjXqrw5UodWOPsVt/m1L0rFHnsds8EKpudUp22bu.Jymqlgmys210BKtwwP6nULbd/hA6kk9g+/aXucMb/6llyeud0B0B+oGodoxyW1p3z9ajYSdNEFHqPuM9n00Lcnnr+JmNcGaQEnnXKYUjdC76zLszbWUOLVszymCTIFoOYHv23jGmnn8lpq7ndGTluW31PX9KHw047ls1w==

MARIA GUADALUPE VALLADARES CISNEROS | Fecha:2021-11-09 08:09:49 | Firmante

GDricqwkQ5o0ANfJUO9yAaxpKQhK64pb6lZ8oHJSP0HeJEZAuOiiYf+GYMAadLRhTztpb9hX0C1X070cTgubg5dU6UQgYoG9V/RKngbrchcflLHGmqyurr08BwfyKJHKHma2jIDQN+BFqadixZVZsEz/JHghk+qWw8m6MHv5vrjC5jNkw5hqoKaPOq3L7bv68wtErhu5qoH/rQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



PWKMEY3Q

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FJYUCx4HmkBi5TAoYqQVWSak2qc6Jq8>

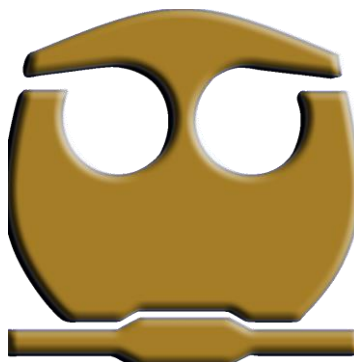


Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2-11 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección y asesoría del Dr. Roberto Martínez y como asesor técnico la Dra. Rosa María Chávez Santos. El estudio computacional fue realizado con la asesoría del Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz de la Facultad de Química de la UNAM.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en:

- Simposio interno del Instituto de Química de la UNAM, 2020.
- #LatinXChem Twitter Conference 2021 (poster)

AGRADECIMIENTOS

- A la **Universidad Autónoma del Estado de Morelos**, por ser mi segunda casa durante mi preparatoria y la licenciatura.
- A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por recibirme durante mi movilidad académica y permitirme realizar mi proyecto de tesis.
- Al **Dr. Roberto Martínez**, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por sus consejos y alentarme a ir más allá de mis límites.
- A **CONACYT** por la beca de ayudante de investigador SIN III (1088468), el financiamiento del proyecto 016584 (A1-S-16584) y a **DGAPA** por el financiamiento del proyecto **PAPIIT** (IN204619).
- A la **Academia Mexicana de Ciencias** por aceptarme en el programa de Verano de la Investigación Científica en el 2019 y 2020, y al **Instituto Pfizer** por ser uno de los patrocinadores para que pudiera comenzar mi proyecto.
- Al **Dr. Rodrigo Aguayo** por todo el apoyo, paciencia y la asesoría brindada durante la realización del estudio computacional.
- A la **Dr. Rosa M. Chávez Santos**, por ser mi asesora técnica y una buena amiga. Por su paciencia y transmitirme su conocimiento.
- Al **Dr. Rubén Omar Torres Ochoa**, por sus consejos para mejorar mi trabajo y estar pendiente de mi en el laboratorio.
- Al personal técnico del **Instituto de Química** por su apoyo en la realización de las técnicas de IR, RMN, EM. En especial a la **Dra. Celia Bustos, M.C. Elizabeth Huerta** y **Q. Ángeles Peña**.
- A la **Dra. Mayra Silva Miranda** y la **Dra. Clara I. Espitia Pinzón** del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por la realización de las pruebas de biológicas.
- Al **Dr. Noé Zúñiga Villarreal** y al **M.C. David Martínez Velázquez** por facilitarnos el uso de su equipo de infrarrojo. A la **Dra. Itzel Guerrero Ríos** por permitirnos el uso de su equipo de catálisis, y a la **Dra. Karla Patricia**

Salas Martin y el **M.C. Israel T. Pulido Díaz**, por la asesoría técnica para el uso del equipo.

- Al jurado revisor, por todas sus aportaciones que permiten que este trabajo sea de excelencia.
- **A mis padres Leonila y Antonio**, mis hermanas Rocío y Yaquelin. Por todo su apoyo incondicional y ser mi mayor inspiración para superarme siempre.
- A mis profesores, por inspirarme y compartirme su conocimiento, en especial a la **Dra. Valladares Cisneros**, por su paciencia y apoyarme siempre. Al maestro **Eduardo Humberto Robles Casolco**, quien siempre ha confiado en mí y me ha permitido crecer con la OSJUAEM.
- A mis compañeros del **laboratorio 2-11**, por hacer mi estancia más amena, en especial a **Gustavo Pretelín** por su apoyo y asesorarme cuando lo requería.
- A mi segunda familia, mis amigas **Ariel Trejo, Mariana Sedano y Angélica García**. Quienes son mi inspiración y me han enseñado que los límites no existen y que puedo volar tan alto como yo lo decida.
- A todos mis amigos desde la preparatoria y secundaria, aquellos que no me han soltado, apoyan e impulsan a ser mejor, en especial a **Brenda Yaneli, Rosa Cristela, Sandra Paola, Jorge Iván**. A mi grupo de amigos de la universidad, en especial a **Carlos Daniel, Manuel González, Diana Alondra, Luis Ángel, Mar Pacheco, Javier Ballesteros, Adbeely Betsua** y **Yael Saraí**.
- A **David del Ángel Martínez**, gracias por ser una luz en mi vida, por ser mi ángel de la guarda y estar siempre conmigo.

Dedicado a mi abuelo Gonzálo García, quien luchó contra
la tuberculosis hasta el final.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XVI

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Tuberculosis.....	4
2.1.1 Epidemiología.....	5
2.1.2 Fármacos de primera y segunda línea	6
2.1.3 Resistencia a fármacos	7
2.1.4 Blancos moleculares de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.2 Descubrimiento y desarrollo de fármacos	9
2.3 Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC)	10
2.3.1 Diseño basado en la estructura.....	11
2.3.1.1 Acoplamiento molecular automatizado (docking).....	13
2.3.1.2 Dinámica molecular	14
2.3.2 Diseño basado en el ligando.....	18
2.3.2.1 Similitud molecular	19
2.4 Propiedades que hacen a una molécula un buen fármaco.....	20
2.5 La enzima Pks13 como blanco molecular para el diseño de fármacos antituberculosis.....	21
2.6 Las 5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolinas (DHPIq).....	22
2.6.1 Síntesis de Pirroloisoquinolinas	24
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO GENERAL.....	26
5.1 Objetivos específicos.....	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Estudio computacional.....	27
6.1.1 Preparación de la macromolécula	28
6.1.2 Preparación de los ligandos.....	29
6.1.3 Acoplamiento molecular sitio-dirigido y semiflexible-flexible.....	30
6.1.4 Estudio de permeabilidad en membrana	30
6.1.4.1 PerMM.....	31
6.1.5 Análisis de consenso farmacológico.....	32

6.1.5.1	SwissADME.....	33
6.1.5.2	AdmetSAR 2.0	34
6.1.5.3	vNN-ADMET	35
6.1.6	Simulación de Dinámica Molecular	36
6.1.6.1	Preparación del sistema.....	36
6.1.6.2	Equilibrado.....	36
6.1.6.3	Producción.....	37
6.1.6.4	Cálculos de energía libre MM-PBSA	37
6.2	Retrosíntesis	38
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1	Parte computacional <i>a priori</i>	39
7.1.1	Acoplamiento molecular de los derivados propuestos	45
7.1.2	Estudio de permeabilidad en membrana	56
7.1.3	Análisis de consenso farmacológico.....	65
7.1.4	Dinámica molecular	68
7.1.4.1	Cálculo de la energía libre de unión.....	82
7.2	Síntesis química	85
8.	CONCLUSIONES.....	99
9.	PERSPECTIVAS.....	101
10.	REFERENCIAS	102
11.	ANEXOS.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los derivados de DHPIq evaluados contra Mtb.....	1
Figura 2. Éster de pirrolo[2,1-a]isoquinolina.....	2
Figura 3. Derivado de pirrolo[1,2-a]quinolina con potencial actividad antituberculosis contra la enzima DprE1 y Pks13.....	3
Figura 4. Fármacos de primera línea para el tratamiento de TB.....	6
Figura 5. Blancos moleculares de Mtb para moléculas con actividad antituberculosis.....	8
Figura 6. Incremento de la eficiencia en el descubrimiento y desarrollo de fármacos con las herramientas del DiFAC.....	10
Figura 7. Métodos en el diseño de fármacos basado en la estructura.....	12
Figura 8. Interacciones enlazantes y no enlazantes.....	15
Figura 9. Representación de las condiciones de límite periódico.....	16
Figura 10. Ejemplo del cálculo de similitud de dos moléculas basado en 3D shape methods.....	19
Figura 11. Incremento de la potencia y estabilidad metabólica de TAM 1	22
Figura 12. Estructura base de las pirrolo[2,1-a]isoquinolinas.....	22
Figura 13. Actividad biológica de derivados sintéticos representativos de las DHPIq.....	23
Figura 14. Diferentes metodologías sintéticas para la construcción de las DHPIq.....	24
Figura 15. Estudio computacional de los análogos propuestos de DHPIq.....	27
Figura 16. Enlaces flexibles (de color verde) de los residuos ASP1644, ASN1640 y GLN1633.....	28
Figura 17. Programa en línea PerMM para la predicción de la permeabilidad a través de la membrana.....	31
Figura 18. SwissADME para la predicción de propiedades ADME.....	33
Figura 19. AdmetSAR para la predicción de propiedades farmacológicas.....	34
Figura 20. vNN-ADMET para la predicción de propiedades ADMET.....	35
Figura 21. Acoplamiento molecular de a) TAM16 , b) 1A y c) 1B con la enzima PKS13... ..	40
Figura 22. Modelo de superposición rígido de TAM16 (café) y 1A (cian).....	42
Figura 23. Visualización de los resultados del acoplamiento molecular de los derivados de las DHPIq.....	50
Figura 24. Actividad biológica de los compuestos 12 y 18 contra Mtb.....	51
Figura 25. Visualización de los resultados del acoplamiento molecular de las formas A-D del compuesto 18	54
Figura 26. Visualización de los resultados del acoplamiento molecular de las formas A-D del compuesto 11	55
Figura 27. Recorrido de la molécula 1A a través de la membrana simulada.....	56
Figura 28. Acoplamientos de las moléculas evaluadas a 50 y 100 ns de simulación.....	74
Figura 29. Modelos en 2D del complejo ligando-proteína a los 100 ns de simulación.....	76
Figura 30. Molécula 17A en el sitio activo de la enzima Pks13 durante la simulación de dinámica molecular.....	77
Figura 31. Factores B calculados a partir del RMSF del esqueleto de Pks13.....	80
Figura 32. Factores B calculados a partir del RMSF de los ligandos.....	81

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de casos de tuberculosis en México desde el 2015 al 2020.	5
Gráfico 2. Abundancia de las microespecies del compuesto 18 con respecto al pH.	52
Gráfico 3. Perfil energético de los derivados de DHPIq (a-q) con respecto a la distancia del centro de la membrana simulada de DOPC.	62
Gráfico 4. Perfil energético de los análogos de DHPIq seleccionados con respecto a la distancia de la membrana simulada de DOPC.	64
Gráfico 5. RMSD del esqueleto de la enzima Pks13 en complejo con los ligandos A y TAM16	69
Gráfico 6. RMSD del esqueleto de la enzima Pks13 en complejo con los ligandos B y TAM16	69
Gráfico 7. RMSD de los ligandos A y TAM16 presentes en los complejos proteína-ligando.	70
Gráfico 8. RMSD de los ligandos A y TAM16 (sin considerar los átomos de hidrógeno) presentes en los complejos proteína-ligando.	70
Gráfico 9. RMSD de los ligandos B y TAM16 presentes en los complejos proteína-ligando.	71
Gráfico 10. RMSD de los ligandos B y TAM16 (sin considerar los átomos de hidrógeno) presentes en los complejos proteína-ligando.	71
Gráfico 11. RMSF del esqueleto de la enzima Pks13 en complejo con los ligandos A y TAM16	79
Gráfico 12. RMSF del esqueleto de la enzima Pks13 en complejo con los ligandos B y TAM16	79
Gráfico 13. Contribución por residuo a la energía de mecánica molecular en complejo con TAM16	83
Gráfico 14. Contribución por residuo a la energía de mecánica molecular en complejo con 1A	83

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Análisis retrosintético para la obtención de las DHPIq.	38
Esquema 2. Reacción de protección del m-hidroxibenzaldehído.	86
Esquema 3. Reacción de Horner-Wadsworth-Emmons.	87
Esquema 4. Reacción de metilación de TosMIC.	88
Esquema 5. Reacción de van Leusen para la síntesis de pirroles.	89
Esquema 6. Síntesis del agente alquilante C	90
Esquema 7. Reacción de alquilación de los pirroles.	91
Esquema 8. Reacción de ciclación intramolecular radicalaria para la obtención de los compuestos tricíclicos.	93
Esquema 9. Reacción de desprotección del compuesto bencilado.	95
Esquema 10. Reacción de desmetilación para la obtención del compuesto final 4A	96
Esquema 11. Reacción de desmetilación para la obtención de 17A	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del acoplamiento molecular con TAM16, 1A y 1B	41
Tabla 2. Resultados del acoplamiento molecular de los derivados propuestos de DHPIq con la enzima Pks13.....	45
Tabla 3. Resultados del acoplamiento de las formas A-D del compuesto 18	53
Tabla 4. Resultados del acoplamiento de las formas A-D del compuesto 11	55
Tabla 5. Energía libre de unión de los derivados de DHPIq en kcal/mol en una membrana simulada de DOPC.	63
Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos y predicción de la biodisponibilidad oral de los compuestos seleccionados.....	66
Tabla 7. Predicción de las propiedades farmacodinámicas de los compuestos seleccionados.	67
Tabla 8. Ocupancia de los residuos 1630-1645 con los derivados de DHPIq y TAM16	78
Tabla 9. Contribuciones energéticas a la energía libre de unión en Kcal/mol.	82
Tabla 10. Descomposición de la energía de van der Waals por residuo.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
CCF	Cromatografía en capa fina
CYP	Citocromos
DART	Análisis directo de tiempo real
DCM	Diclorometano
DHPIq	5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolinas
DIFAC	Diseño de Fármacos Asistido por Computadora
DLP	Peróxido de dilaurilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DOPC	Dioleoil-fosfatidilcolina
EM	Espectrometría de Masas
EtOH	Etanol
GROMACS	<i>GR</i> oningen Machine for Chemical Simulations
Hex	Hexano
IR	Infrarrojo
MeOH	Metanol
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MM-PBSA	Mecánica Molecular / Área Superficial Poisson-Boltzmann
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
PAINS	<i>Pan Assay Interference Structures</i>
Pd/C	Paladio sobre Carbono
P-gp	Glucoproteína P
<i>p</i>-TsCl	Cloruro de <i>p</i> -toluensulfonilo

QSAR	Análisis Cuantitativo de Estructura-Actividad
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media
RMSF	Fluctuación cuadrática media
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis multirresistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente resistente
TEA	Trietilamina
TosMIC	Isocianuro de <i>p</i> -toluensulfonilmetilo
TPSA	Superficie polar topológica
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana



RESUMEN

La tuberculosis es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Debido a la duración de la terapia para su tratamiento, los desafíos logísticos asociados y la toxicidad de los medicamentos administrados, surge la necesidad del descubrimiento de nuevos blancos moleculares para el diseño de compuestos que mejoren la actividad antituberculosis.

En el presente proyecto se diseñaron y evaluaron mediante métodos computacionales 17 derivados de 5,6-dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolinas a partir de modificaciones estructurales del *hit* experimental **1A**. Los compuestos **4**, **5** y **17** presentaron resultados significativos en el estudio de dinámica molecular que permiten proponer a la enzima Pks13 como un potencial blanco molecular para este tipo de compuestos. Se realizó la síntesis de aquellos compuestos que presentaron buenos resultados en el análisis de sus propiedades farmacológicas.

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the leading causes of death worldwide. Due to the duration of the therapy for its treatment, the associated logistical challenges, and the toxicity of the administered drugs, the need arises for the discovery of new molecular targets for the computational design of compounds that improve antituberculosis activity.

In the present project, 17 derivatives of 5,6-dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinolines were designed through computational methods from structural modifications of the experimental *hit* **1A**. Compounds **4**, **5** and **17** showed significant results in the molecular dynamics study that allow proposing the enzyme Pks13 as a potential molecular target for this kind of compounds. The synthesis of those compounds that showed the best results in the analysis of their pharmacological properties was carried out.



1. INTRODUCCIÓN

En nuestro grupo de investigación, se realizó la síntesis de derivados de 5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolinas (DHPIq), de los cuales seis fueron evaluados mediante un cribado fenotípico contra la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), cuyos resultados aún no son publicados (**Figura 1**). El compuesto con el grupo amino en la posición *meta* del fenilo, obtuvo el mejor resultado con una Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de 0.5 μM , por lo que éste fue identificado como un *hit* fenotípico (o *hit* experimental).

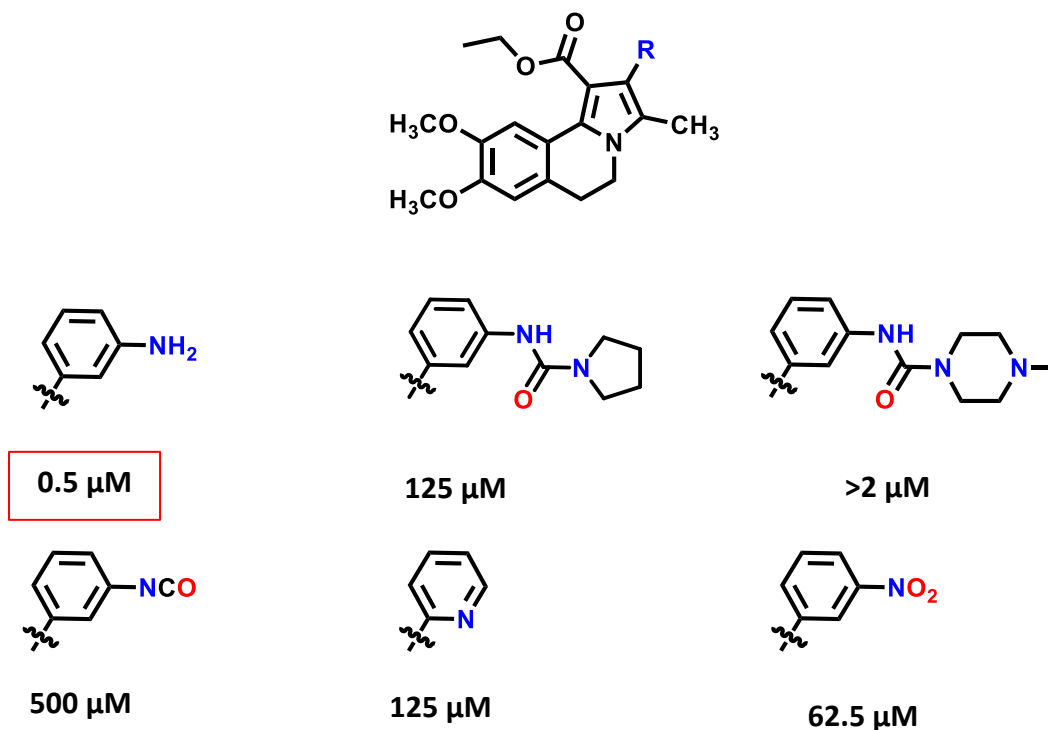


Figura 1. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los derivados de DHPIq evaluados contra *Mtb*.



A la fecha, hay pocos trabajos que informan que las DHPIq presentan actividad antituberculosis. En 2010, Muthusaravanan y colaboradores realizaron la síntesis de ésteres de pirroloisoquinolinas y evaluaron su actividad inhibitoria contra la cepa H37Rv de *Mtb*. Encontraron que el compuesto 2-(4-fluorofenil)pirrolo[2,1-a]isoquinolina-3-carboxilato de etilo presentó una MIC de 1.0 μM , el cual resultó ser 7.6 y 4.7 veces más potente que los fármacos etambutol y ciprofloxacina respectivamente, aunque menos potente que la rifampicina y la isoniazida (**Figura 2**). Sin embargo, al ser evaluado mediante un cribado fenotípico, se desconoce su blanco molecular.¹

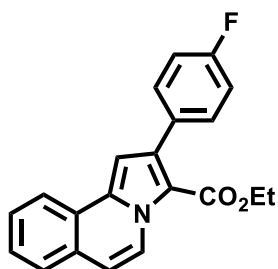


Figura 2. Éster de pirrolo[2,1-a]isoquinolina.

Recientemente en el 2020, Venugopala y colaboradores publicaron la síntesis, evaluación antimicrobacteriana y los estudios de acoplamiento molecular de derivados de pirrolo[1,2-a]quinolinas. Identificaron un posible blanco molecular mediante un estudio computacional de similitud por flexóforo, siendo las enzimas DprE1 y Pks13 aquellas macromoléculas que tuvieron mayor similitud de sus ligandos co-cristalizados con los compuestos sintetizados. El compuesto de la **Figura 3** mostró la actividad biológica más significativa con una MIC de 8 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa H37Rv (enzima Pks13) y de 16 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa MDR-TB (enzima DprE1).²

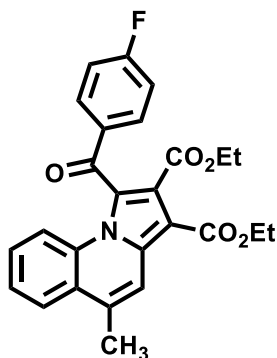
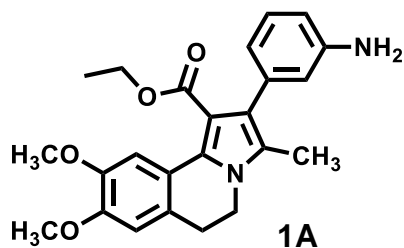


Figura 3. Derivado de pirrolo[1,2-a]quinolina con potencial actividad antituberculosis contra la enzima DprE1 y Pks13.

Debido a que la enzima Pks13 realiza sólo un ciclo de condensación entre dos sustratos inusualmente largos, además de su naturaleza altamente específica, ha despertado el interés como blanco molecular para el desarrollo de moléculas que se unan en el dominio tioesterasa e inhiban su actividad biológica para inhibir la biosíntesis de la pared celular de *Mtb*.^{3,4}

Bajo el principio de similitud-propiedad, el presente trabajo propone a la enzima Pks13 como un posible blanco molecular para el *hit* fenotípico identificado en nuestro grupo de trabajo (nombrado como **1A**). De esta manera, el *hit* fenotípico sirvió como modelo en el diseño de nuevos derivados a través de modificaciones estructurales, los cuales fueron evaluados mediante un estudio computacional de modelado molecular (*docking* y dinámica molecular). También se realizó un estudio quimioinformático que permitió seleccionar aquellas moléculas con los resultados más favorables para su síntesis, caracterización y evaluación biológica.





2. ANTECEDENTES

2.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), o también conocida como bacilo de Koch, que afecta principalmente a los pulmones u otros órganos del cuerpo humano como los ganglios linfáticos, pleura, tracto gastrointestinal, huesos, sistema nervioso central y sistema genitourinario.⁵ Esta bacteria se transmite a los pulmones a través de la inhalación de aerosoles que contienen al bacilo suspendido en el aire de la atmósfera, posteriormente es fagocitada por macrófagos que generan una respuesta proinflamatoria localizada en el cual se forma un granuloma o tubérculo. La contención del granuloma maduro puede fallar después de un cambio en el estado inmunológico del huésped debido a factores como la vejez, alcoholismo, tabaquismo, desnutrición o la coinfección con el VIH. Es entonces cuando se derraman los bacilos infecciosos en las vías respiratorias hasta alcanzar los capilares sanguíneos y la vía linfática.⁶

La pared celular de *Mtb* está compuesta por dos segmentos, la superior e inferior. Más allá de la membrana se encuentra el peptidoglicano en unión covalente con el arabinogalactano, que a su vez se une a los ácidos micólicos con su meromicolato largo y cadenas α cortas. La importancia de comprender la biosíntesis del complejo ácido micólico-peptidoglicano-arabinogalactano radica más en el contexto del desarrollo de nuevos fármacos contra la TB y menos en la definición de los factores bacterianos responsables del proceso de la enfermedad.⁷

La duración de la TB desde el inicio hasta la curación o la muerte es de aproximadamente 3 años.⁸ La única vacuna disponible para su prevención es la bacteria atenuada *M. bovis* Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), la cual es ampliamente utilizada para ayudar a prevenir formas severas de TB en niños, como la meningitis y miliar.



2.1.1 Epidemiología

La TB es la principal causa de muerte a nivel mundial por un agente infeccioso (por arriba del VIH/SIDA). Un tercio de la población mundial es infectada por *Mtb*, pero sólo un 5-10% desarrolla la enfermedad en algún momento de su vida. Globalmente, un estimado de 10 millones de personas enfermaron de TB en el año 2019.⁹

En México, en sólo cuatro años se registró un aumento del 159% en el número de casos de TB respiratoria en el periodo de 2015 a 2019, de acuerdo con los datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (**Gráfico 1**).¹⁰⁻¹³

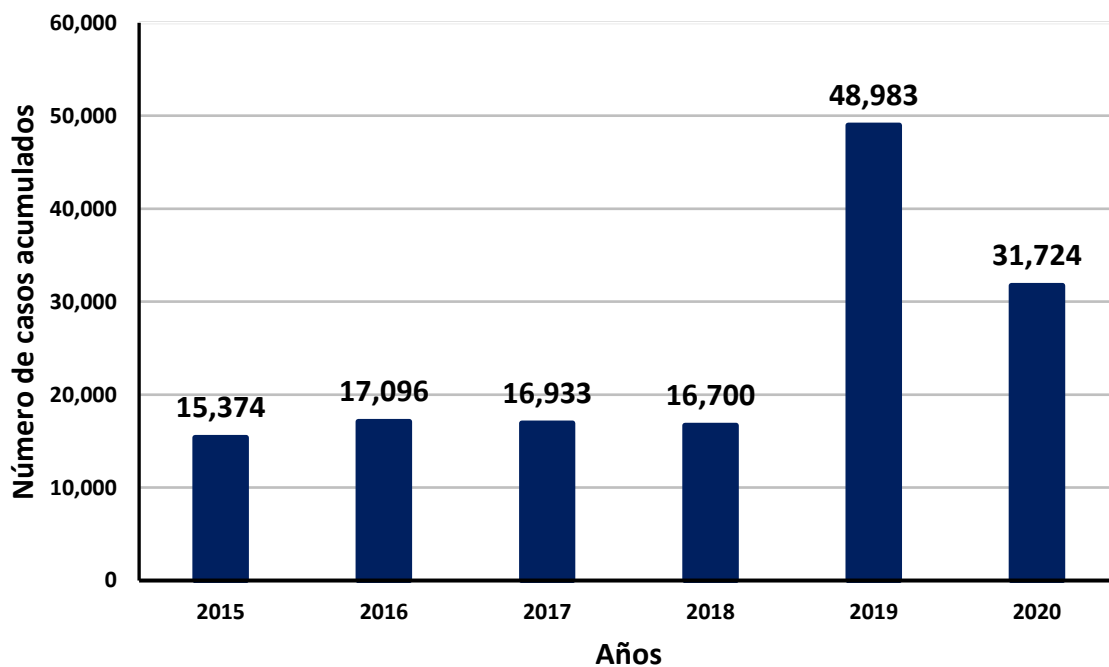


Gráfico 1. Número de casos de tuberculosis en México desde el 2015 al 2020.



2.1.2 Fármacos de primera y segunda línea

La TB es tratable y prevenible. Aproximadamente el 85% de las personas que desarrollan la enfermedad pueden ser tratados con éxito mediante la administración de fármacos de primera línea como isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante dos meses, seguido de una fase de continuación con rifampicina e isoniazida en un tiempo de cuatro meses (**Figura 4**).¹⁴

Se ha demostrado la necesidad de un tratamiento más duradero para prevenir la reactivación de la TB latente, en la cual se recomienda una monoterapia con isoniazida o rifampicina y la terapia combinada de isoniazida con rifampicina durante tres o cuatro meses.¹⁵

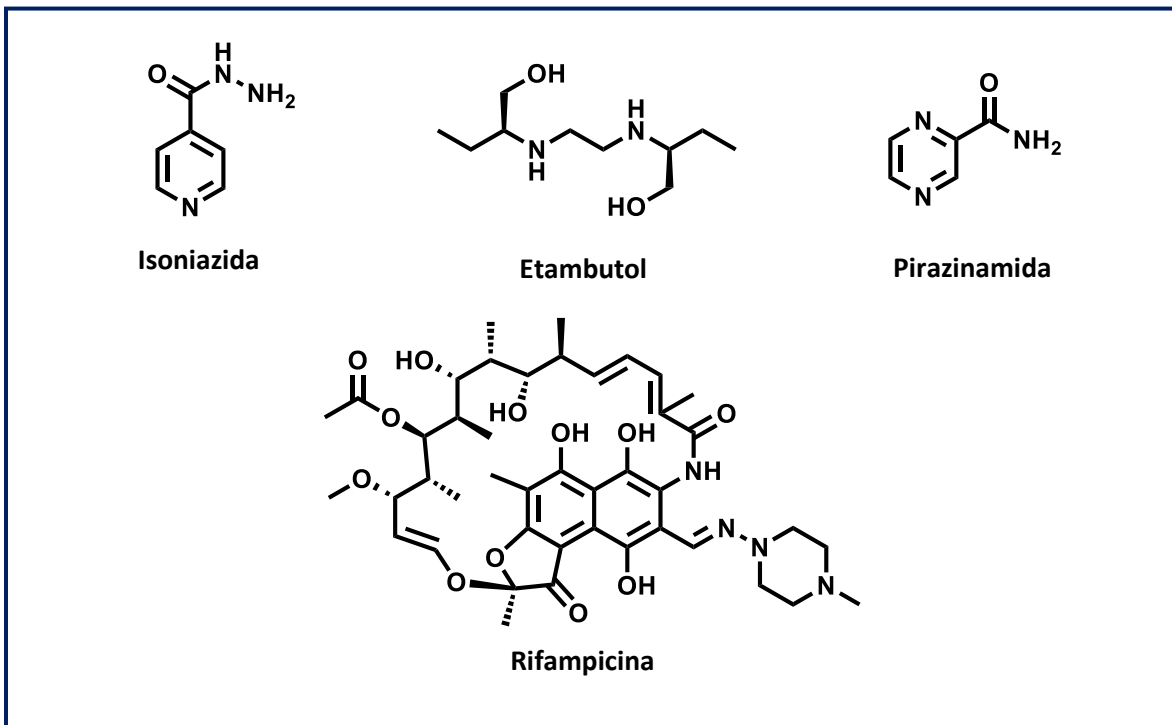


Figura 4. Fármacos de primera línea para el tratamiento de la TB.



Las interacciones farmacológicas u otros efectos adversos son causas de un tratamiento de primera línea incompleto¹⁶ que contribuye a la aparición de cepas de *Mtb* más resistentes que los fármacos de primera línea no pueden inactivar fácilmente, por lo que es necesario el uso de fármacos de segunda línea que son más tóxicos, caros, menos eficaces y poco disponibles.^{17,18}

2.1.3 Resistencia a fármacos

La aparición de cepas de *Mtb* resistentes a los principales fármacos disponibles para el tratamiento de la TB constituye un problema en el control de la enfermedad debido al aumento de casos de TB Multirresistente (TB-MDR), es decir, aquella que es causada por *Mtb* con resistencia *in vitro* a isoniazida y rifampicina. Por otra parte, la TB Extremadamente Resistente (TB-XDR) es aquella producida por una cepa de *Mtb* con resistencia demostrada por lo menos a isoniacida, rifampicina, una fluoroquinolona y un agente inyectable de segunda línea.⁹

Las mutaciones cromosomales y la resistencia intrínseca son las principales causas de la aparición de cepas de *Mtb* resistentes a fármacos. Los mecanismos de la resistencia intrínseca incluyen: la complejidad de la pared celular que restringe la entrada de moléculas hidrofílicas, sistemas de eflujo, la inactivación del fármaco o la modificación del blanco molecular. También existen otros factores clínicos, biológicos y microbiológicos, como los errores en la terapia del tratamiento y la compleja o pobre vascularización de los granulomas, lo que dificulta la distribución del fármaco hasta el bacilo.¹⁹

2.1.4 Blancos moleculares de *Mycobacterium tuberculosis*

El fármaco con actividad antituberculosa actúa como ligando al unirse en el centro activo de una macromolécula de *Mtb* (también llamado blanco molecular o *target*), e impide la unión de un ligando endógeno, de tal manera que se produce una modificación, activación o inhibición de la respuesta fisiológica de la macromolécula.

Gracias a décadas de esfuerzo en biología molecular para la secuenciación del genoma de la cepa H37Rv de *Mtb*, se han logrado avances importantes en la identificación de macromoléculas que intervienen en los procesos fisiológicos de *Mtb*.²⁰ Actualmente el desarrollo de fármacos con actividad antituberculosis está enfocado principalmente en la selección de un blanco molecular en específico para concentrar los esfuerzos en diseñar o seleccionar moléculas pequeñas que inhiban el crecimiento de *Mtb* (**Figura 5**).^{21,22}

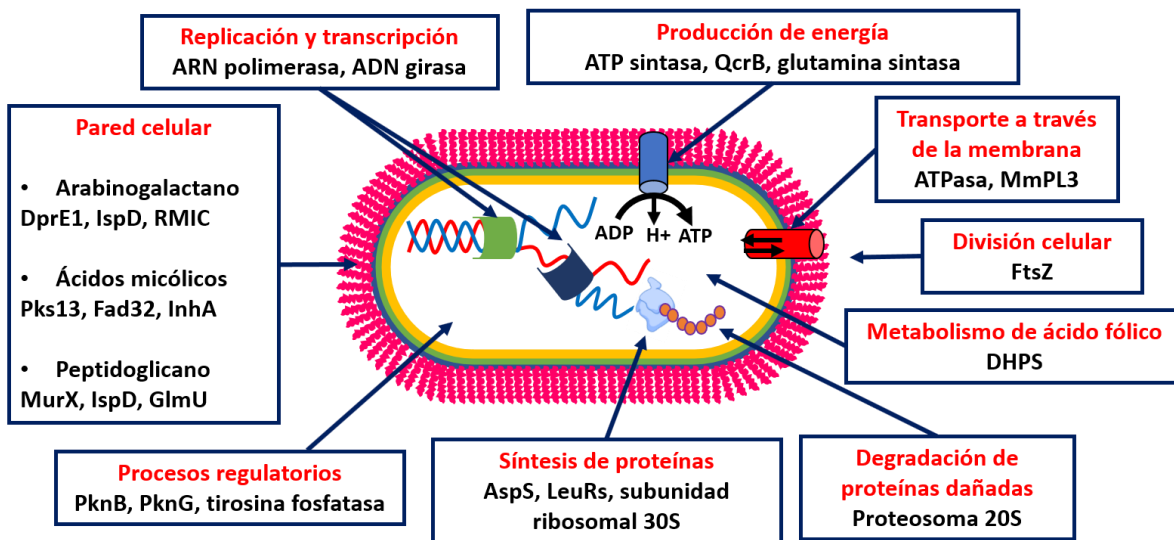


Figura 5. Blancos moleculares de *Mtb* para moléculas con actividad antituberculosis.



2.2 Descubrimiento y desarrollo de fármacos

El descubrimiento y desarrollo de fármacos es un proceso largo, costoso y multidisciplinario que consiste principalmente en tres etapas:

- I. Fase de descubrimiento: esta fase requiere de la investigación básica para identificar y validar un blanco molecular. También se identifica un *hit*, es decir, un compuesto primario activo con un comportamiento no promiscuo y que supere un cierto valor de actividad biológica (reproducibile) en un ensayo *in vitro* determinado. Después de evaluar la identidad y pureza del *hit*, se comprueba su actividad y se obtiene un *hit validado*.²³

- II. Fase de desarrollo: se evalúa la estabilidad química y la factibilidad sintética del *hit validado* para su posterior optimización, en el cual se busca incrementar su afinidad, selectividad y disminuir la toxicidad o las reacciones adversas. Se utilizan modelos *in vitro* e *in vivo* para evaluar las propiedades bio-fisicoquímicas y la estabilidad metabólica del compuesto durante la absorción, distribución, metabolismo y excreción (propiedades ADME). Una vez superados los requerimientos antes mencionados, se obtienen una o varias moléculas líderes o cabezas de serie (*lead*) que se evalúan en ensayos clínicos para finalmente obtener un medicamento.²⁴

- III. Fase de comercialización: el medicamento se aprueba y se comercializa. También entra en una fase de farmacovigilancia.²⁵



2.3 Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC)

El Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC) aplica procedimientos computacionales para buscar la relación entre la actividad biológica de un compuesto con su estructura química. Tiene como objetivo el diseño o la identificación de nuevos compuestos con efecto biológico en una categoría terapéutica deseada, además de priorizar y optimizar aquellos que sean candidatos para una posterior síntesis o evaluación biológica.²⁶ Su aplicación ha permitido disminuir el tiempo y el costo para el desarrollo de fármacos, además de ser un método amigable con el ambiente (**Figura 6**).²⁷

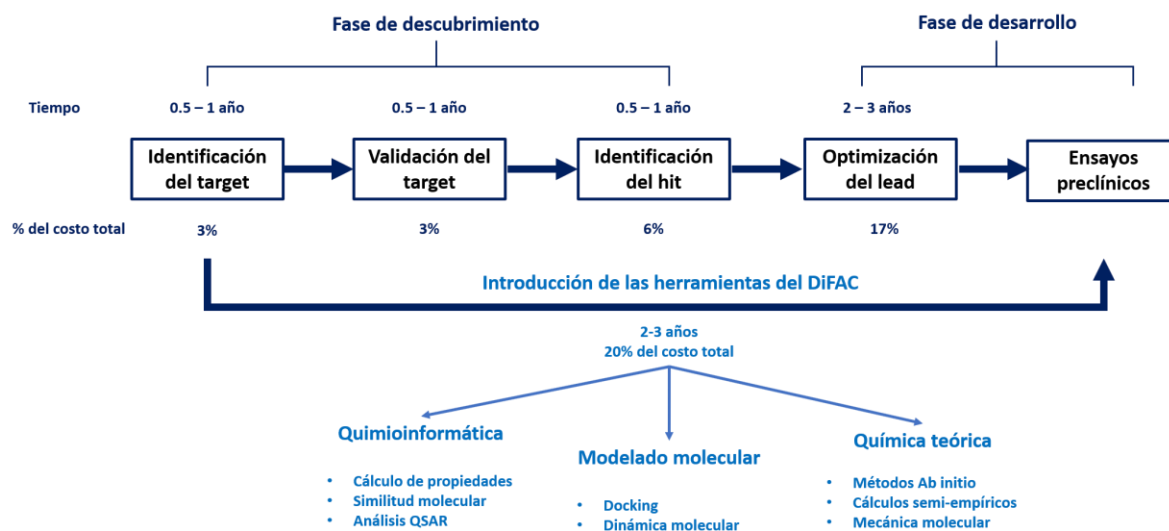


Figura 6. Incremento de la eficiencia en el descubrimiento y desarrollo de fármacos con las herramientas del DiFAC.



El uso de las estrategias del DiFAC dependerá de la información disponible de las estructuras del ligando y del blanco molecular, por lo que los métodos se agrupan en dos enfoques principales: el diseño basado en el ligando y el diseño basado en la estructura (de la macromolécula). Si se conocen ambas estructuras se puede realizar una combinación de métodos, cuando no se conoce ninguna se requiere generar la información de manera experimental.²⁸

2.3.1 Diseño basado en la estructura

El primer paso en el diseño racional de fármacos es identificar y validar un blanco molecular que será utilizado para un cribado de librerías de moléculas pequeñas. Para obtener la información de este blanco molecular se requiere de su extracción, purificación y la determinación de su estructura en 3D mediante técnicas espectroscópicas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), cristalografía de rayos X o microscopía crioelectrónica. También se pueden utilizar métodos *in silico* para predecir la estructura mediante modelado por homología, en el que se utiliza como base una proteína homóloga con más del 40% de similitud. Una vez determinada la estructura en 3D del blanco molecular, es necesario validar el modelo verificando las propiedades estereoquímicas.

El siguiente paso es la identificación del sitio activo, es decir, la cavidad en el que un ligando se une mediante interacciones energéticamente favorables con el blanco molecular.²⁹

Actualmente existen bases de datos utilizados como repositorios de información estructural de las macromoléculas. El más utilizado es *Protein Data Bank* (PDB) que recauda datos primarios como coordenadas atómicas, detalles de la resolución de las estructuras, secuencias de residuos, descripción, validación de las proteínas, etc.³⁰ Una vez obtenida la información de la estructura del blanco molecular, el diseño basado en la estructura integra diferentes métodos que se resumen en la **Figura 7** para la identificación o diseño de un *hit*.³¹⁻³³

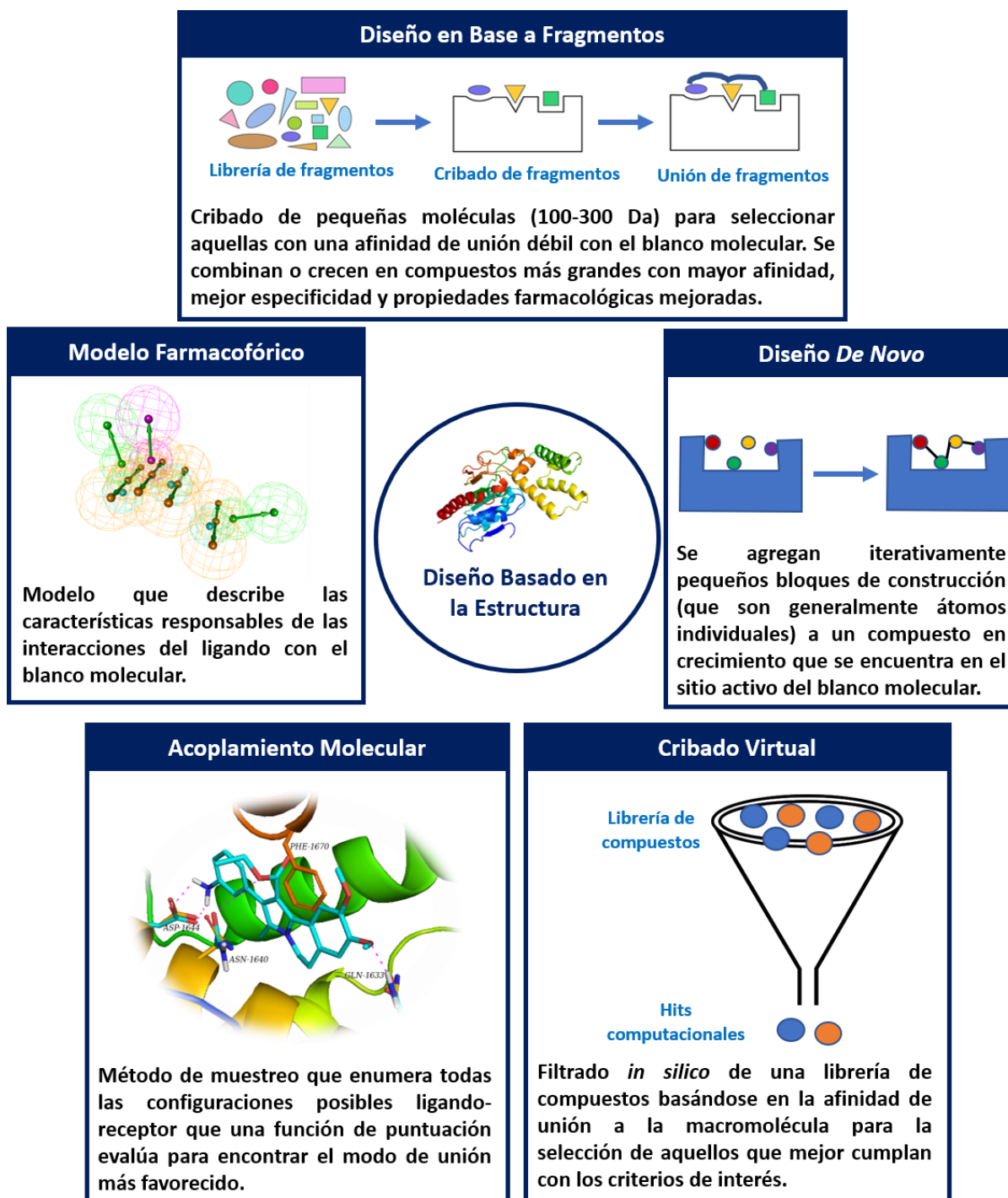


Figura 7. Métodos en el diseño de fármacos basado en la estructura.



2.3.1.1 Acoplamiento molecular automatizado (*docking*)

El acoplamiento molecular o *docking* es un método de muestreo que enumera todas las configuraciones posibles de la unión de un ligando con una macromolécula, cuya estructura es conocida o puede ser estimada. Una función de puntuación o *scoring* evalúa y cuantifica la fuerza de la interacción utilizando principios de mecánica molecular.

Se han desarrollado diversas metodologías de *docking*, que de manera general se engloban en tres niveles de aproximación dependiendo de los grados de libertad utilizados: *docking* rígido-rígido, rígido-flexible y semiflexible-flexible. Las interacciones consideradas en el estudio de la unión ligando-proteína son las de van der Waals (vdW), electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y contribuciones entrópicas.³⁴

El proceso de acoplamiento molecular consiste en una primera etapa de búsqueda que se explora el modo de unión del ligando a la macromolécula (*posing*), el cual está definido por sus variables de estado: posición, orientación, flexibilidad y conformación. Los métodos o algoritmos de búsqueda pueden ser estocásticos, sistemáticos o de simulación, y se encargan de explorar las variables de estado.³⁵ La segunda etapa consiste en la evaluación, donde una función de puntuación calcula la energía de afinidad o la energía libre de unión de los mínimos energéticos, que se refiere a la diferencia de energías libres entre las correspondientes al complejo ligando-proteína y la de sus respectivas especies aisladas con las que se encuentra en equilibrio:

$$\Delta G_{unión} = -RT \ln K$$

donde R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura y K es la constante de equilibrio.³⁶ Las funciones de puntuación deben distinguir los modos de unión verdaderos de todos los demás explorados y ser lo suficientemente



rápidos para su aplicación a un gran número de posibles soluciones, sin embargo, normalmente realizan un gran número de simplificaciones y suposiciones que permiten realizar una evaluación más eficiente pero a costa de la precisión. Las funciones de puntuación se clasifican en empíricos, basados en el conocimiento y basados en campos de fuerza.

En el protocolo de *docking* se deben tomar ciertas decisiones basadas en la cuantificación de la unión ligando-proteína para establecer un criterio de bondad de ajuste, con el objetivo de elegir la mejor solución como resultado final y, de esta manera, generar hipótesis cuya aplicación tiene que ser complementada con otros métodos computacionales y experimentales. Por lo que es importante resaltar que sólo los experimentos biofísicos o bioquímicos confirmarán la unión o la actividad biológica predicha con el acoplamiento molecular.³⁷

2.3.1.2 Dinámica molecular

La falta de una descripción adecuada de la verdadera dinámica de los sistemas biológicos es una de las mayores advertencias en los estudios de acoplamiento molecular, por lo que las simulaciones moleculares permiten explorar el complejo ligando-proteína con mayor detalle. Estos métodos describen la interacción y el movimiento de los átomos para obtener las posibles configuraciones de sistemas microscópicos con numerosos puntos de mínima energía a una determinada temperatura.

La dinámica molecular es uno de los métodos de simulación molecular que permiten generar una trayectoria de puntos que evolucionan con el tiempo siguiendo la segunda ecuación de Newton:

$$\frac{d^2\mathbf{y}}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_{X_i}}{m_i}$$



donde F_{xi} es la fuerza aplicada a la partícula i , en la dimensión x y el tiempo t , m_i es la masa de la partícula con una aceleración y .

El cálculo de las fuerzas que actúan sobre todas las partículas considera una configuración inicial, es decir, coordenadas y velocidades iniciales asignadas de forma aleatoria a partir de una distribución Maxwell-Boltzmann.

El cálculo de la energía total del sistema es la suma de la energía potencial y cinética. Para ello se utilizan modelos clásicos de potenciales de interacción (campos de fuerza), que consisten en conjuntos de ecuaciones con una colección de parámetros optimizados dependiendo del tipo de sistema en estudio y de las condiciones o propiedades específicas. Los campos de fuerza subdividen las funciones de potencial en interacciones enlazantes e interacciones no enlazantes. Los términos enlazantes incluyen contribuciones debidas a los enlaces covalentes, ángulos de valencia y ángulos torsionales. Los términos no enlazantes consideran un término de atracción-repulsión de tipo Lennard-Jones para las interacciones de vdW y un término Coulómbico para las interacciones entre cargas puntuales (**Figura 8**).

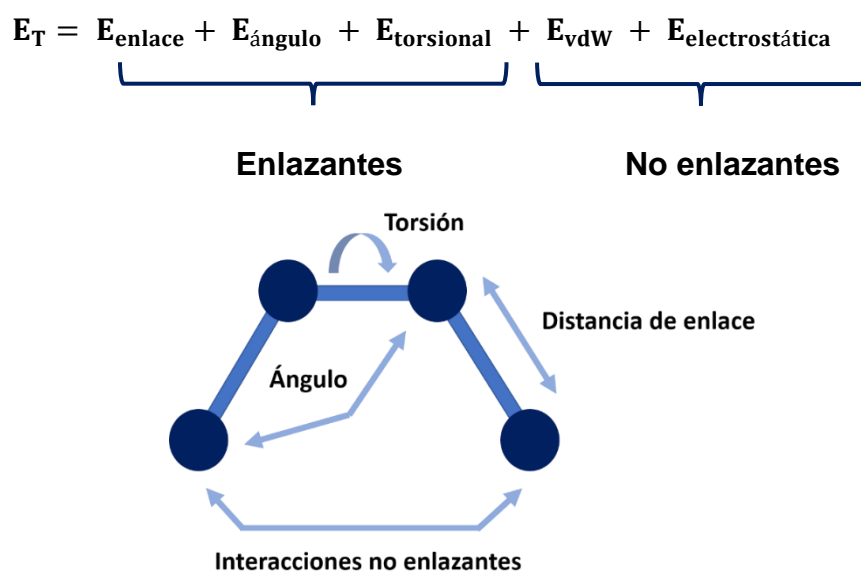


Figura 8. Interacciones enlazantes y no enlazantes consideradas en un campo de fuerza.



Entre los ejemplos de campos de fuerzas más utilizados en dinámica molecular se encuentran: AMBER, CHARMM, GROMOS y OPLS-AA.³⁸

Finalmente, se genera la evolución temporal del sistema mediante la aplicación de algoritmos de integración que resuelven numéricamente las ecuaciones de movimiento del sistema en estudio. Por lo tanto, se utilizan las posiciones y aceleraciones en el tiempo t de los átomos en una etapa previa para calcular nuevas posiciones, es decir, es un método determinista en el que la trayectoria de un punto permite predecir el estado del siguiente. La integración se repite N veces hasta obtener la evolución temporal del sistema biomolecular durante el tiempo total de simulación.³⁴

Para simular un sistema más realista, se requiere considerar las condiciones de límite periódico, de manera que el sistema en estudio se encuentra en una celda de simulación rodeada de “celdas imágenes” que son réplicas de sí misma. Cuando una partícula sale de la caja de simulación, otra partícula de la celda imagen se mueve para reemplazarla, por lo tanto, se mantiene constante el número de partículas y se permite simular un sistema infinito eliminando los efectos de superficie (**Figura 9**). Por otro lado, la convención de mínima imagen permite que cada átomo interactúe con el átomo o la imagen más cercana en la matriz periódica.³⁹

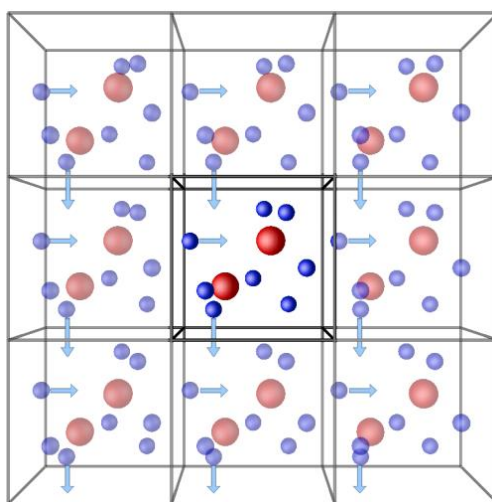


Figura 9. Representación de las condiciones de límite periódico.



El cálculo de Mecánica Molecular / Área Superficial Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) es uno de los métodos que combinan campos de fuerza y modelos de solvatación continua para el cálculo de la energía libre de unión del complejo (ΔG_C), a partir de la energía libre del ligando (ΔG_L) y la energía libre de la macromolécula (ΔG_P).

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta G_C - \Delta G_P - \Delta G_L$$

Cuando el sistema biomolecular se encuentra solvatado, la mayoría de las contribuciones energéticas provienen de las interacciones entre las moléculas del solvente causando fluctuaciones en la energía total. Por esta razón, el método MM-PBSA calcula la energía libre de cada sistema individual (ΔG) como la suma de la energía de Mecánica Molecular (ΔE_{MM}) en el vacío, el cual incluye términos de enlace (ΔG_{en}), interacciones electrostáticas (ΔG_{el}), y de van der Waals (ΔG_{vdW}). La energía libre de solvatación (ΔG_{solv}) toma en cuenta contribuciones polares (ΔG_{pol}) usando modelos implícitos de solvatación, y contribuciones no polares (ΔG_{np}), así como la entropía (S) a una temperatura determinada (T).^{40,41}

$$\Delta G = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - TS$$

$$\Delta G = \Delta G_{en} + \Delta G_{el} + \Delta G_{vdW} + \Delta G_{pol} + \Delta G_{np} - TS$$

Entre las aplicaciones de la dinámica molecular se encuentran los estudios estructurales y dinámicos que consideran la flexibilidad conformacional y la estabilidad del sistema, además de observar la respuesta a un cambio controlado (perturbaciones) o entender un proceso dinámico a través del tiempo.⁴² También orienta la optimización de las moléculas pequeñas y proporciona información sobre qué interacciones son estables en el tiempo y cuáles contribuyen a la unión con la macromolécula.⁴³



2.3.2 Diseño basado en el ligando

El diseño basado en el ligando incluye el uso de herramientas computacionales o experimentales para la identificación de los *hits* cuando no se dispone de la estructura del blanco molecular. Se basa en el principio de similitud-propiedad, con la suposición de que las moléculas similares (en términos de estructura, características farmacofóricas, campos moleculares, etc.) también exhiben un comportamiento similar, con excepción de los alcantilados de actividad (*activity cliffs*), en el que pequeños cambios estructurales en las moléculas generan diferencias importantes en sus propiedades como en la actividad biológica.⁴⁴

Entre las herramientas tradicionalmente utilizadas para la identificación de un *hit* se encuentra el Cribado Farmacológico de Alto Rendimiento (High-Throughput Screening o HTS), en el que librerías de compuestos o quimiotecas grandes son evaluadas de manera automatizada en un tiempo corto. Una alternativa teórica es el cribado virtual, en el cual el protocolo se configura como una serie de filtros sucesivos donde a medida que aumenta su complejidad, el número de moléculas seleccionadas disminuye al siguiente filtro.²⁴

Una vez que se conoce una colección de compuestos activos, se pueden generar modelos farmacofóricos o realizar un Análisis Cuantitativo de Estructura-Actividad (QSAR). El modelo farmacofórico describe las características estructurales del ligando que son responsables de las interacciones con su blanco molecular. También es posible identificar los rasgos haptofóricos, es decir, aquellos que ayudan en el reconocimiento del ligando pero que son prescindibles, ya que no confieren actividad a un compuesto. De esta manera, las características haptofóricas son las que se pueden modificar para optimizar una estructura.²⁶ Los modelos QSAR se basan en la asunción de que la estructura molecular contiene características responsables de sus propiedades físicas, químicas o biológicas, las cuales se relacionan con descriptores moleculares en una ecuación matemática para predecir la actividad biológica de aquellos compuestos diseñados que aún no son sintetizados o evaluados experimentalmente.⁴⁵

2.3.2.1 Similitud molecular

La búsqueda por similitud es un tipo particular de cribado virtual que se basa en el principio de similitud-propiedad, en el cual, las moléculas más similares presentarán una bioactividad similar a la estructura de referencia. Para medir cuantitativamente la similitud entre dos moléculas se requiere de dos componentes: una representación sistemática para caracterizar a las moléculas que se comparan y una métrica o coeficiente de similitud. Las huellas digitales moleculares (*fingerprints*) son vectores binarios que representan a las moléculas, donde cada posición contiene 0 o 1 para indicar la presencia o la ausencia de un descriptor.²⁶ Una de las métricas más utilizadas para determinar la similitud entre dos moléculas es el coeficiente de Tanimoto, que toma valores desde 0 (moléculas totalmente diferentes) a 1 (moléculas muy similares).⁴⁶

Los métodos en 2D para el cálculo de la similitud no toman en cuenta las alineaciones estructurales y no permiten el análisis de compuestos *scaffold hopping*. Por esta razón, se han desarrollado métodos en 3D basados en la “forma” de las moléculas (*3D shape methods*), que cuantifican la semejanza entre dos moléculas utilizando diferentes descriptores basados en la alineación libre (no superposición) y basados en la alineación o superposición de las moléculas (Figura 10).⁴⁷

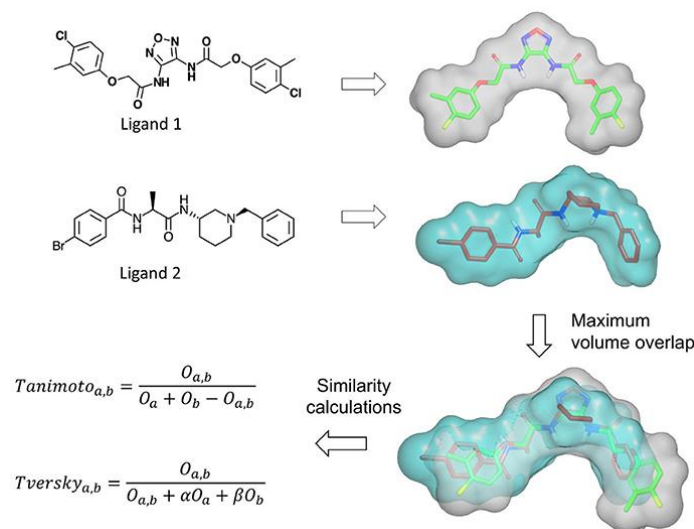


Figura 10. Ejemplo del cálculo de similitud de dos moléculas basado en *3D shape methods*.



2.4 Propiedades que hacen a una molécula un buen fármaco

El término *drug-likeness* se refiere a las características estructurales, fisicoquímicas, bioquímicas, farmacéuticas y de toxicidad para la selección de aquellos compuestos que tengan mayor probabilidad de éxito farmacocinético y de seguridad para ser candidatos a medicamentos. Las técnicas computacionales son una alternativa viable para determinar estas propiedades que sirven como filtro y priorizar aquellas moléculas que serán evaluadas en los experimentos *in vitro* e *in vivo*.⁴⁸

En el diseño de fármacos se debe encontrar el balance entre eficacia y biodisponibilidad, ya que si los compuestos son muy lipofílicos pueden ser eliminados por el hígado rápidamente. Por esta razón, el diseño basado en manipulaciones moleculares es un paso crucial en el proceso de optimización de un *hit*, los cuales se clasifican en:

- Simplificación de la estructura
- Asociación de moléculas
- Modificaciones sistemáticas:
 - Reemplazo bioisostérico
 - Isosterismo
 - Retroisosterismo
 - Homología
 - Vinilología
 - Extensión o contracción de cadenas
 - Introducción de grupos aromáticos
 - Apertura o cierre de anillos

Con el desarrollo de las técnicas computacionales también se ha reconocido la importancia de evaluar las propiedades farmacocinéticas y la toxicidad (ADMET) de los compuestos investigados en las primeras etapas del desarrollo de fármacos, ya que la deficiencia en estas dos propiedades son las principales causas de fracaso en las etapas de evaluación clínica.⁴⁹



2.5 La enzima Pks13 como blanco molecular para el diseño de fármacos antituberculosis

La enzima Pks13 juega un papel importante en el paso final de la biosíntesis de los ácidos micólicos que forman la pared celular de *Mtb*. Consiste en 5 dominios funcionales: ceto sintasa, aciltransferasa, tioesterasa y dos dominios de proteína portadora de acilos (*N*-ACP y *C*-ACP). La función de la enzima consiste en catalizar la condensación descarboxilativa de tipo Claisen de una molécula de 2-carboxi-acil-CoA (C₂₄-C₂₆) con una cadena de meromicolato (C₄₀-C₆₀).

En el dominio ceto sintasa ocurre la condensación entre el meromicoloilo y el 2-carboxi-acil-CoA para formar un α -alquil- β -cetotioéster, el cual se hidroliza en el dominio tioesterasa C-terminal y se libera el producto, que al reducirse forma los ácidos micólicos (ácidos grasos β -hidroxilados).^{50,51}

Aggarwal y colaboradores encontraron un compuesto derivado de benzofurano (**TAM1**) que mostró actividad biológica contra la enzima Pks13 de *Mtb* con una MIC = 2.3 μ M. Sin embargo, esta molécula no pudo ser usada en la evaluación *in vivo* debido a la presencia de un enlace éster lábil y a la baja estabilidad metabólica del grupo fenilo. A través de un diseño basado en la estructura, establecieron que el compuesto **TAM16** con un grupo fenol mejora la unión en el sitio tioesterasa y que el reemplazo del éster por una metil-amida mantuvo la inhibición de la enzima con una MIC = 0.09 μ M. La metil-piperidina no pudo ser reemplazada con otros grupos, pero se favoreció la actividad biológica con la eliminación del grupo metilo (**Figura 11**). El nuevo compuesto llamado **TAM16** mostró una eficacia *in vivo* igual a la isoniazida, pero con una frecuencia de resistencia 100 veces menor, tanto como monoterapia o en combinación con rifampicina. También mostró un excelente perfil farmacológico sin inhibición de las principales isoformas de los citocromos (CYP), sin embargo, presentó inhibición del canal hERG, el cual está relacionado con problemas de cardiotoxicidad.⁵²



Figura 11. Incremento de la potencia y estabilidad metabólica de **TAM 1**.

2.6 Las 5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolinas (DHPIq)

Son compuestos heterocíclicos resultado de la fusión de una isoquinolina y un pirrol, donde el nitrógeno se encuentra en la cabeza de puente (**Figura 12**).

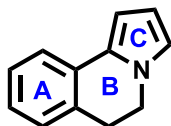


Figura 12. Estructura base de las 5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolinas.

Se encuentran como núcleo base en diversos alcaloides y metabolitos secundarios de algunas plantas y animales marinos invertebrados. En los últimos años, se ha descrito la síntesis de análogos de las DHPIq con el fin de mejorar su actividad biológica para el tratamiento de diferentes padecimientos (**Figura 13**).

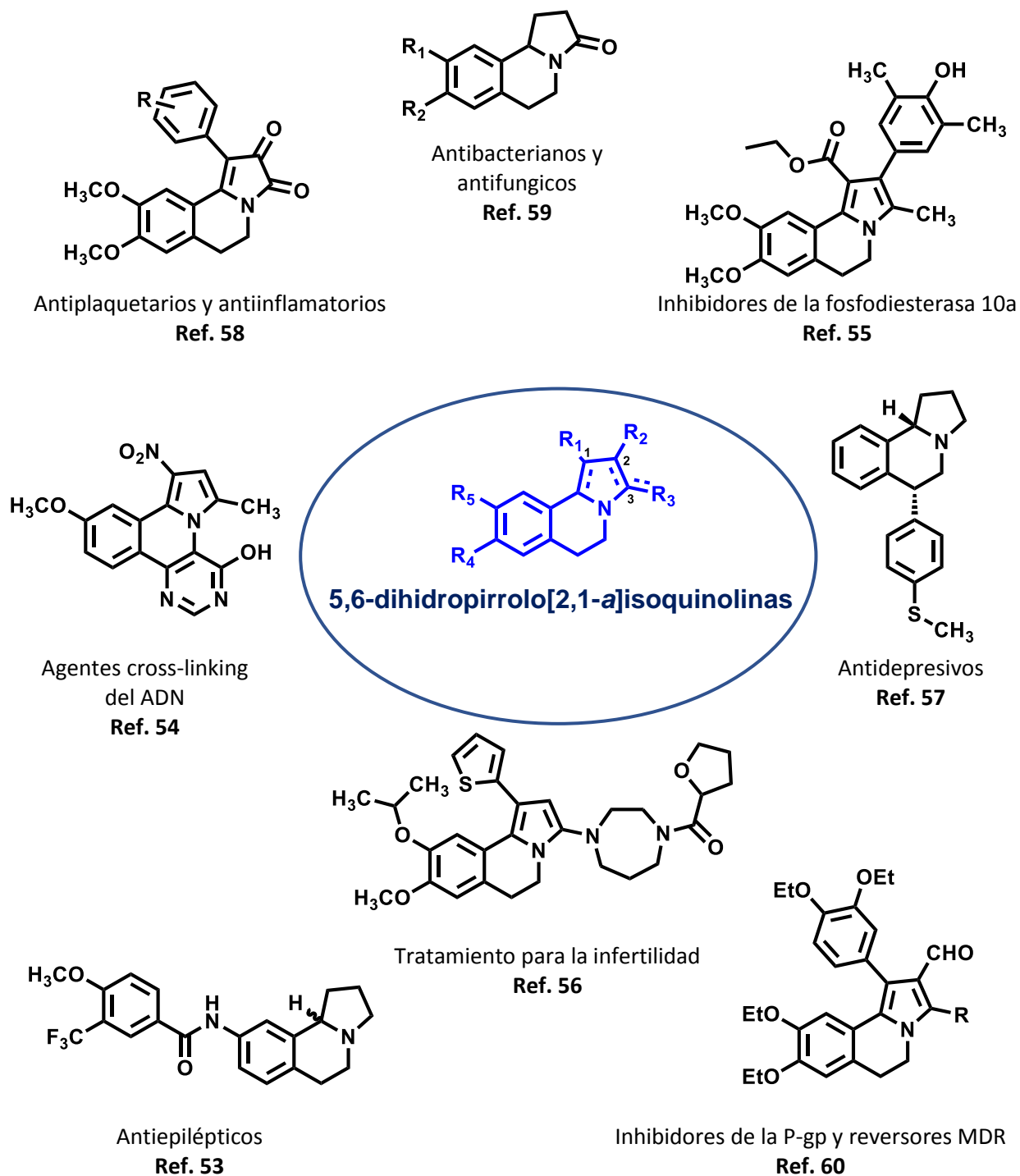


Figura 13. Actividad biológica de derivados sintéticos representativos de las DHPIq.

2.6.1 Síntesis de Pirroloisoquinolinas

Debido a la relevante actividad biológica de los compuestos que contienen un anillo de pirrolo[2,1-*a*]isoquinolina en su estructura, diferentes grupos de trabajo han centrado sus esfuerzos en desarrollar metodologías eficientes que permitan acceder a este tipo de compuestos. Entre las estrategias más utilizadas se encuentran las cicloadiciones [3+2] involucrando alquenos y alquinos deficientes de densidad electrónica,⁶¹ reacciones multicomponentes con nitroalquenos,⁶² reacciones catalizadas con hierro y oro,⁶³ catalizadas con ácido,⁶⁴ y más recientemente se han desarrollado metodologías que siguen los principios de la química verde utilizando fotocatalizadores como la clorofila-*a* y luz solar, entre otros ejemplos (**Figura 14**).⁶⁵

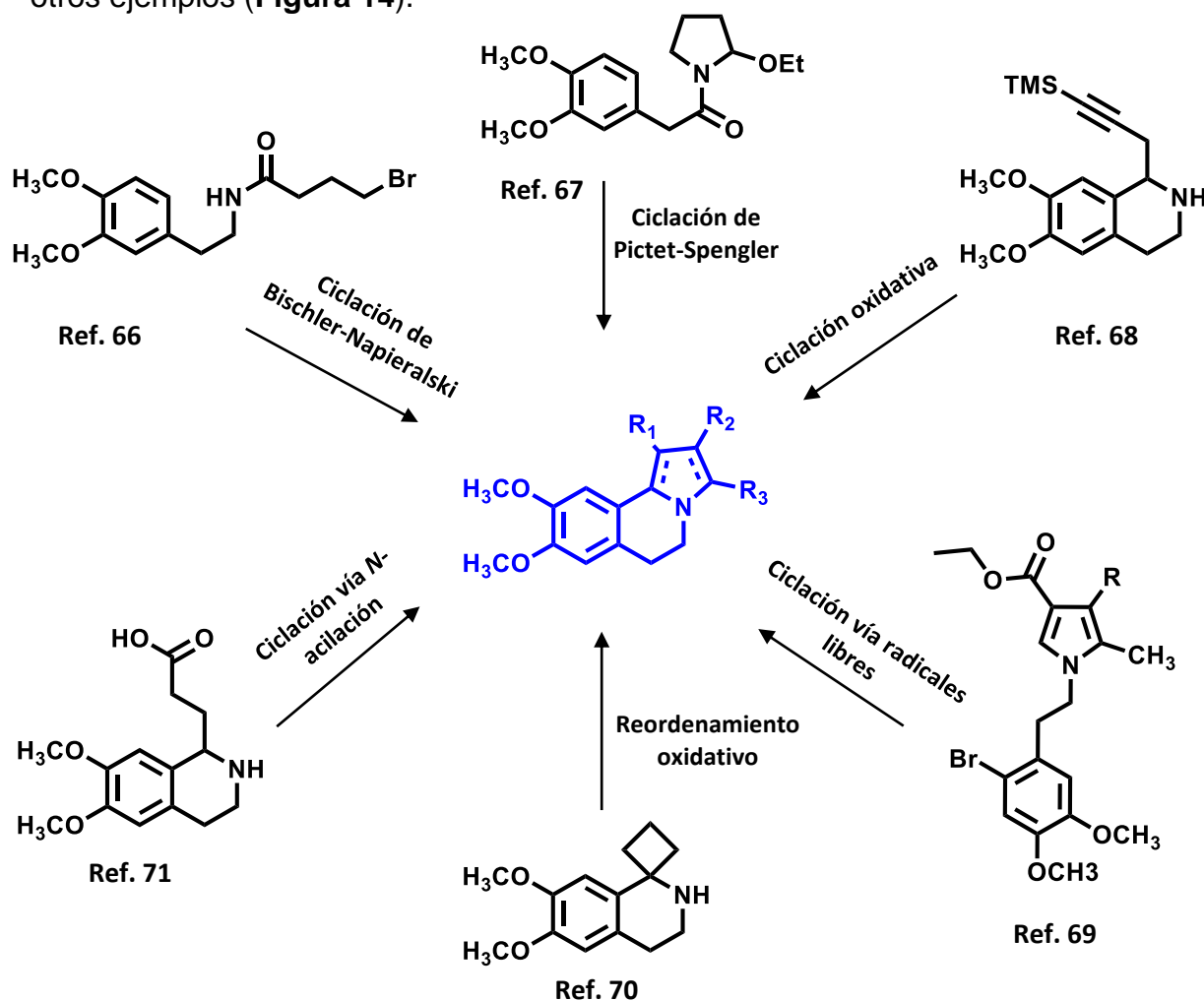


Figura 14. Diferentes metodologías sintéticas para la construcción de las DHPIq.



3. JUSTIFICACIÓN

La TB es la principal causa de muerte a nivel mundial ocasionada por un agente infeccioso, con un estimado de 10 millones de personas que enfermaron en el 2019 y 1.4 millones de defunciones en todo el mundo. A pesar de que se han logrado avances significativos para combatir la TB a nivel mundial, regional y nacional, ninguno de los objetivos está en camino de alcanzarse. La reducción del número de contagios en el periodo de 2015 a 2020 fue sólo del 9%, muy por debajo del objetivo planteado del 20% de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS). Actualmente, la pandemia de COVID-19 amenaza con revertir el poco progreso logrado en la reducción de la incidencia mundial de la enfermedad. Los modelos matemáticos indican que el número de personas contagiadas de TB puede crecer a más de un millón por año en el periodo de 2020 a 2025.⁹

El tratamiento farmacológico de primera y segunda línea contra TB, que mata las bacterias en crecimiento, no es suficiente para las bacterias inactivas, las cuales son metabólicamente silenciosas y persistentes dentro del huésped durante un tiempo largo. Además, debido a la duración de la terapia, los desafíos logísticos asociados, la aparición de cepas resistentes y la toxicidad o efectos adversos de los medicamentos disponibles actualmente, surge la necesidad del descubrimiento de nuevos blancos moleculares para el diseño y selección racional de compuestos que mejoren la actividad antituberculosis.

Con el presente trabajo se pretende contribuir al descubrimiento de moléculas más potentes, selectivas y de menor toxicidad que sean bioactivas contra *Mtb*, mediante el uso de herramientas quimioinformáticas y de modelado molecular que permitan seleccionar aquellas moléculas prioritarias para su síntesis y evaluación biológica, logrando una reducción en el tiempo y el costo que conlleva el descubrimiento y desarrollo tradicional de fármacos.



4. HIPÓTESIS

Mediante el uso de estrategias quimioinformáticas y de modelado molecular se pueden seleccionar derivados de 5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolinas diseñadas a partir de modificaciones estructurales del *hit* fenotípico **1A** que mostrarán afinidad a la enzima Pks13 en estudios *in silico* y una posible mejor actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*.

5. OBJETIVO GENERAL

Realizar la evaluación *in silico* de una serie de compuestos derivados de 5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolinas diseñadas a partir de modificaciones estructurales del *hit* fenotípico **1A** y seleccionar aquellos que sean potenciales agentes antituberculosis para su síntesis y caracterización.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar un modelo de superposición del *hit* fenotípico **1A** con la molécula **TAM16** para establecer una relación estructura-actividad y proponer una serie de compuestos diseñados a partir de modificaciones estructurales.
- Realizar un estudio de modelado molecular (acoplamiento molecular semiflexible-flexible y dinámica molecular) de los compuestos diseñados contra la enzima Pks13 como posible blanco molecular.
- Realizar el análisis de consenso farmacológico de los compuestos propuestos por medio de herramientas quimioinformáticas de uso libre.
- Sintetizar los compuestos seleccionados y realizar su caracterización mediante técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H y ^{13}C) y espectrométricas (EM).

6. METODOLOGÍA

6.1 Estudio computacional

Se realizó el acoplamiento molecular del *hit* fenotípico **1A** contra la enzima Pks13, los resultados fueron comparados con los obtenidos con el ligando **TAM16**. Posteriormente, se determinó el modelo de superposición rígido con la herramienta LS-align (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LS-align/>)⁷² de las estructuras obtenidas de los acoplamientos moleculares. Con base en la relación estructura-actividad observada, se diseñaron 17 moléculas para ser evaluadas por acoplamiento molecular, realizar la predicción de la permeabilidad a través de la membrana y el análisis de consenso farmacológico. Finalmente, se estudió la dinámica molecular de las moléculas con los resultados más favorables (**Figura 15**).

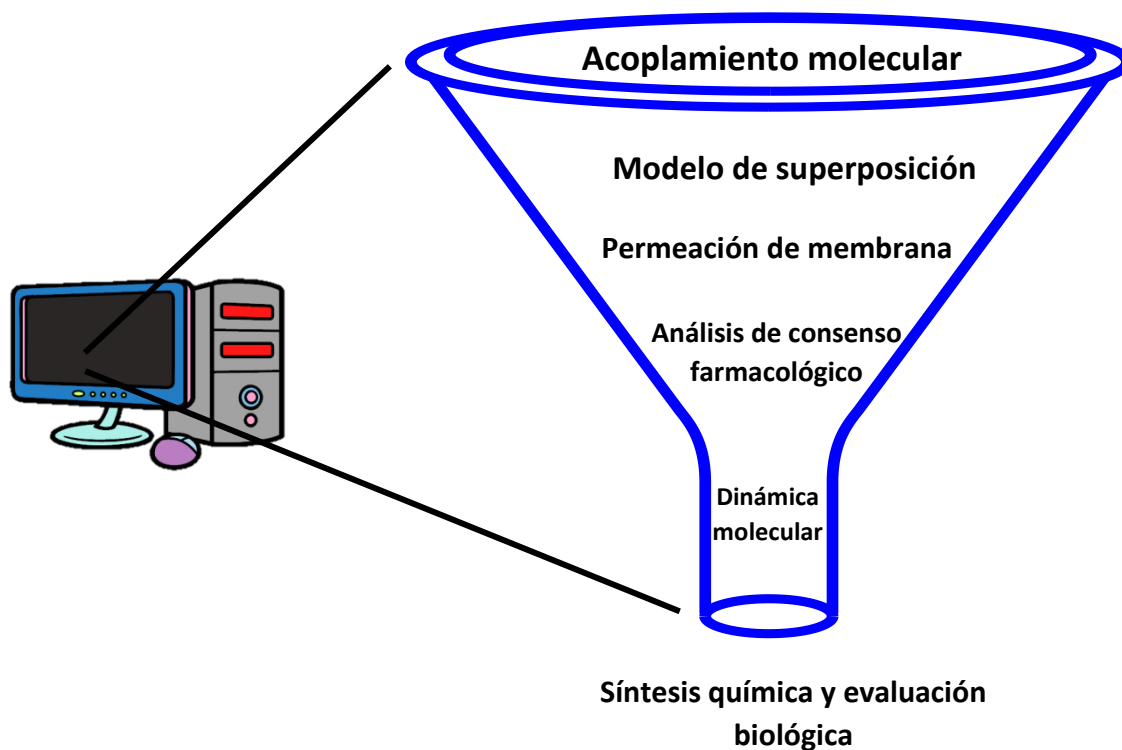


Figura 15. Estudio computacional de los análogos propuestos de DHPIq.



6.1.1 Preparación de la macromolécula

La estructura cristalográfica de la macromolécula Pks13 se obtuvo de *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>),³⁰ identificada con el PDB ID: 5V3Y.⁵² Fue procesada utilizando el programa PyMol para agregar átomos de hidrógeno faltantes, eliminar la cadena B, las moléculas de agua y las moléculas co-cristalizadas 5V8 y SO4. Una vez guardada en formato PDB, esta se utilizó como *template* en el servidor web SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)⁷³ para modelar por homología los residuos faltantes en la estructura, para este fin, se descargó la secuencia de aminoácidos en formato FASTA del servidor web Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)⁷⁴ donde la enzima se identificó como 16X8D2. Posteriormente, se calculó el estado de protonación de los aminoácidos titulables a un pH de 7.4 con el servidor H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/>).⁷⁵

Finalmente, se validó la geometría de la estructura con la herramienta MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).⁷⁶ Al obtener resultados favorables (ver **Anexo A**), la estructura de la enzima fue utilizada para el estudio de acoplamiento y dinámica molecular.

Con la interfaz gráfica AutoDockTools-1.5.6 (ADT) de AutoDock 4.2,⁷⁷ se agregaron cargas Gasteiger-Marsili a la macromolécula y se fusionaron los hidrógenos no polares. Se permitió libre giro a los enlaces entre el C α y C β del aminoácido ASP1644, y el enlace entre el carbono del carbonilo y el C α de los residuos ASN1640 y GLN1633 (**Figura 16**).

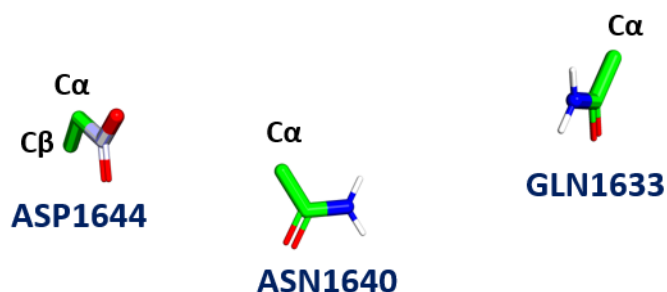


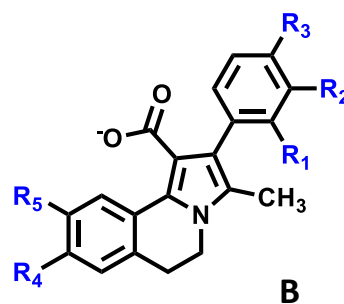
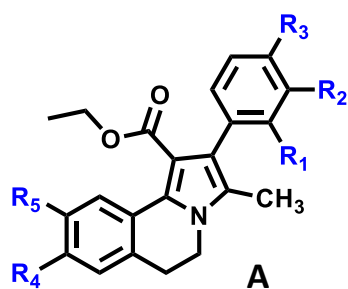
Figura 16. Enlaces flexibles (de color verde) de los residuos ASP1644, ASN1640 y GLN1633.

6.1.2 Preparación de los ligandos

La estructura de la molécula **TAM16** se obtuvo directamente de la estructura cristalográfica de la enzima Pks13 (ligando 5V8) sin otro tipo de procesamiento para ser utilizada en el estudio de acoplamiento molecular.

Los ligandos propuestos se construyeron utilizando la interfaz gráfica Gauss-View-5.0 del programa GAUSSIAN 09 y tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- La presencia de enzimas esterasas en *Mtb* que hidrolicen el grupo éster de las moléculas propuestas. Por lo que se construyeron los ligandos con el grupo éster (moléculas **A**) o con el ácido carboxílico resultante de su hidrólisis (moléculas **B**).
- Se consideró la construcción del ligando con el grupo carboxilato o del ácido carboxílico dependiendo del pK_a calculado con la herramienta Chemicalize (<https://chemicalize.com/welcome>).



Se optimizaron las geometrías de los ligandos con el método de mecánica molecular semiempírico AM1. Se detectaron automáticamente los centros de torsión y los enlaces rotables utilizando el programa ADT, de tal manera que los enlaces sencillos tuvieron libre giro en el estudio de acoplamiento molecular.



6.1.3 Acoplamiento molecular sitio-dirigido y semiflexible-flexible

La validación del método de acoplamiento molecular (*Re-Docking*) se realizó mediante el acoplamiento del ligando co-cristalizado **TAM16** con la macromolécula Pks13. Se seleccionó un tamaño de rejilla de búsqueda de 60x60x60 puntos con espacio de malla de 0.375 Å (generado con el programa auxiliar AutoGrid 4.2) y con centro en el sitio activo, tomando como referencia las coordenadas del ligando co-cristalizado en cada modelo. Se generaron 100 poses con el Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), seleccionando un tamaño de población de 150 estructuras y un número máximo de evaluaciones de 25×10^6 .

Una vez que se obtuvo una desviación cuadrática media (RMSD) de 0.86, se procedió con el estudio de acoplamiento molecular sitio-dirigido de las moléculas propuestas utilizando los parámetros planteados anteriormente.

6.1.4 Estudio de permeabilidad en membrana

La evaluación de la permeabilidad es uno de los pasos críticos para el desarrollo y selección de moléculas bioactivas como potenciales fármacos. Para entender la regulación o los mecanismos del transporte se requiere de una estimación detallada de las interacciones entre las moléculas permeantes y los lípidos de las membranas celulares.⁷⁸ Los estudios de Dinámica Molecular (MD) son una alternativa para entender, modelar y predecir los perfiles energéticos y describir las orientaciones óptimas de las moléculas en su paso a través de la membrana, pero con un costo computacional elevado y un tiempo de análisis corto comparado con el requerido para modelar completamente el proceso de permeación.⁷⁹

6.1.4.1 PerMM

PerMM es un servidor web público que implementa un método computacional físico basado en la teoría de solubilidad-difusión heterogénea y un modelo de solvente anisotrópico, con el fin de realizar un análisis cuantitativo rápido de la permeabilidad por difusión pasiva de moléculas neutras o iónicas con diferentes estructuras y tamaños a través de membranas implícitas (**Figura 17**). Este programa calcula las energías de afinidad (ΔG_{bind}), barreras energéticas, coeficientes de permeabilidad, además permite visualizar el perfil energético de transferencia o la vía de translocación de la molécula permeante.⁸⁰

En este trabajo se utilizó la herramienta PerMM como alternativa para evaluar el comportamiento de las moléculas propuestas durante su trayectoria a través de una membrana negra simulada de dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC). Se seleccionó el método de optimización “Drag” a una temperatura de 298 K, un pH de 7.4.

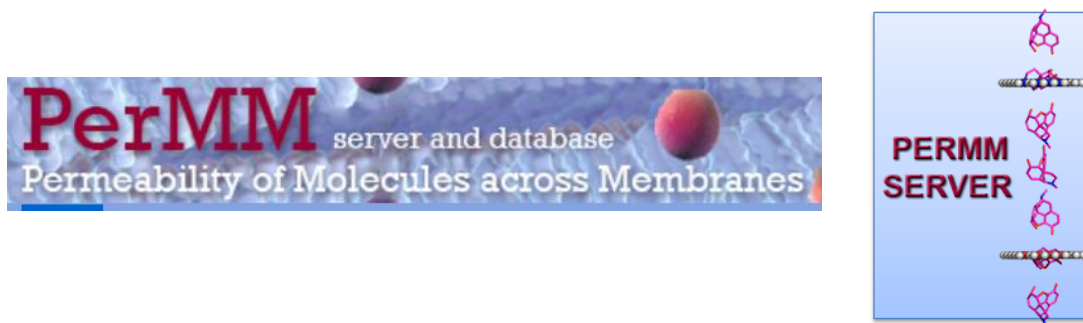


Figura 17. Programa en línea PerMM para la predicción de la permeabilidad a través de la membrana.



6.1.5 Análisis de consenso farmacológico

El uso de herramientas quimioinformáticas para la predicción de las propiedades ADMET es una alternativa válida a los ensayos experimentales, funciona como filtro en las primeras fases del desarrollo de fármacos y para orientar la selección de qué moléculas sintetizar y evaluar en ensayos *in vitro*. Los modelos detrás de los predictores deben ser lo más diversos posible para aumentar la precisión de la predicción a través del consenso.

En este trabajo se utilizaron cuatro herramientas quimioinformáticas como predictores para generar una estimación de consenso de las propiedades farmacológicas de las moléculas evaluadas: *drug-likeness*, lipofilicidad, farmacocinética y toxicidad. Se consideraron como resultados más representativos aquellos que coinciden en dos de tres modelos de predicción, lo que representa mayor probabilidad de éxito en el perfil farmacológico que considerar una sola predicción.

- **Drug-likeness:** se consideraron los criterios de Lipinski, Veber y Egan en la evaluación cualitativa, calculados con la herramienta SwissADME.
- **Lipofilicidad:** se utilizó como descriptor el coeficiente de partición entre *n*-octanol y agua ($\log P_{o/w}$) para la evaluación de la lipofilicidad, generado como la media aritmética de los modelos de predicción implementados en SwissADME ($\log P_{o/w}$ consenso).
- **Propiedades toxicológicas:** los compuestos propuestos se evaluaron en las herramientas SwissADME, AdmetSAR 2.0, vNN-ADMET, para determinar posibles inhibidores de la glucoproteína P (P-gp), así como de los citocromos (CYP) 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 y 3A4. También se evaluaron posibles inhibidores de canales hERG.

6.1.5.1 SwissADME

Es una herramienta de acceso libre que permite a los usuarios predecir descriptores fisicoquímicos y propiedades farmacocinéticas para una colección de hasta 10,000 moléculas. Se caracteriza por la facilidad en la interpretación de los resultados, además de proporcionar múltiples predicciones de una propiedad determinada para permitir una visión de consenso. Utiliza diferentes métodos de entrada y la posibilidad de mostrar, guardar y compartir resultados por molécula individual o mediante gráficos globales intuitivos e interactivos.

Utiliza modelos computacionales que son capaces de predecir si una molécula tiene más probabilidad de estar en una clase de comportamiento binario (por ejemplo, si es sustrato o no de P-gp), de tal manera sus descriptores fisicoquímicos se comparan con los de moléculas conocidas (**Figura 18**).⁸¹

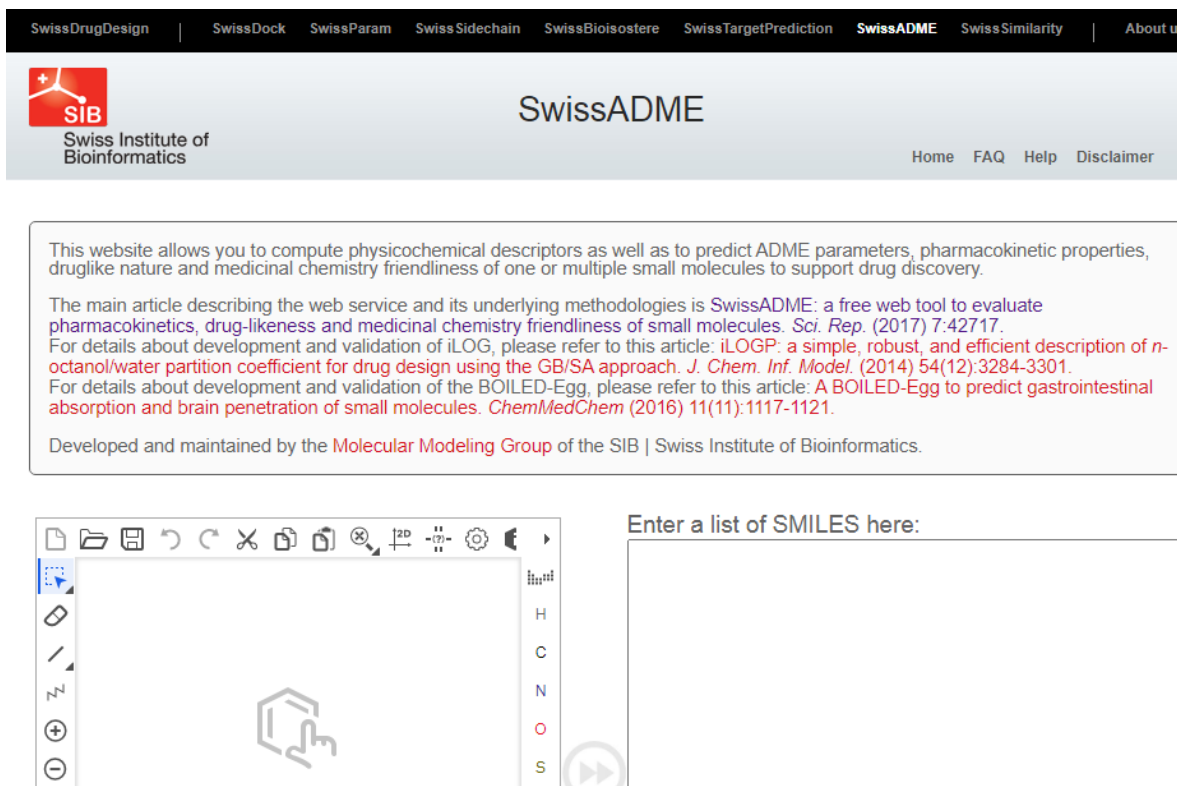


Figura 18. SwissADME para la predicción de propiedades ADME (<http://www.swissadme.ch/>).

6.1.5.2 AdmetSAR 2.0

Es una base de datos que recopila, selecciona y administra más de 210,000 datos de propiedades ADMET de más de 95,000 compuestos únicos de la literatura publicada, incluyendo fármacos en fase experimental y aprobados por la FDA, pesticidas, productos naturales y productos químicos industriales (**Figura 19**).

La nueva versión utiliza 47 modelos de relación estructura-actividad (QSAR) y modelos de regresión para la predicción de las propiedades ADMET de nuevas moléculas, lo que facilita a los investigadores desarrollar modelos predictivos más útiles en el futuro. El servidor web muestra información general, propiedades fisicoquímicas y el perfil ADMET de las moléculas evaluadas.⁸²

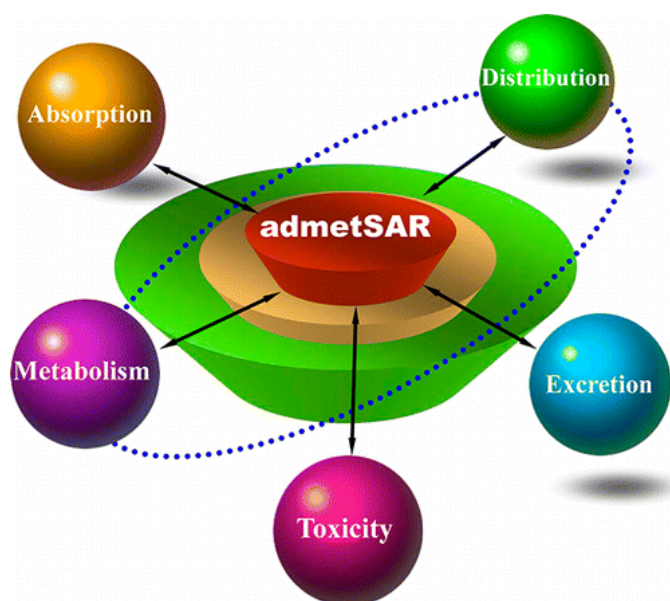


Figura 19. AdmetSAR para la predicción de propiedades farmacológicas (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSAR2>).



6.1.5.3 vNN-ADMET

Es una herramienta de acceso libre que utiliza 15 modelos de predicción contruidos con el método vNN (*Variable Nearest Neighbor*) para predecir propiedades ADMET. El método vNN tiene varias ventajas sobre los métodos *in silico* existentes, ya que calcula la distancia de similitud entre moléculas en términos de su estructura, y selecciona a los vecinos más cercanos que cumplen con una restricción de umbral de similitud mínima. Aunque el modelo se limita a utilizar moléculas que son similares a las moléculas de referencia, esto garantiza que las predicciones que genera sean confiables (**Figura 20**).

Los modelos que utiliza evalúan rápidamente algunas de las propiedades más importantes de los posibles candidatos a fármacos como su citotoxicidad, mutagenicidad, cardiotoxicidad, interacciones fármaco-fármaco, y la probabilidad de causar daño hepático inducido por fármacos.⁸³

The screenshot displays the vNN-ADMET web interface. At the top left, the logo 'vNN-ADMET' is visible, followed by a navigation menu with 'About' and 'Biotechnology HPC Software Applications Institute'. The main content area features a blue header with the text 'VARIABLE NEAREST NEIGHBOR ADMET'. Below this, a descriptive paragraph explains the platform's purpose: 'The vNN-ADMET webservice is a publicly available online platform to predict absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) properties and to build new models based on our variable nearest neighbor (vNN) methodology. We have developed 15 ADMET prediction models to quickly, and with high confidence assess some of the most important properties, such as cytotoxicity, mutagenicity, cardiotoxicity, drug-drug interactions, microsomal stability, and drug-induced liver injury.' A reference is provided: 'Reference: Schyman, P., R. Liu, V. Desai, and A. Wallqvist. vNN web server for ADMET predictions. *Frontiers in Pharmacology*. 2017 December 4; 8:889. [PDF]'. The interface is divided into two main sections. On the left is a 'Login' form with fields for 'Username' and 'Password', a 'Login' button, and links for 'Register' and 'Forgot password?'. On the right is a main menu with four options: 'Run ADMET Models', 'Build Classification Model', 'Build Regression Model', and 'Run Custom Model'. At the bottom, contact information is provided: 'Contact us: vnnadmet@bhsai.org'. A footer note states: 'This research was conducted in conjunction with the Telemedicine and Advanced Technology Research Center (TATRC) and US Army Medical Research and Development Command'.

Figura 20. vNN-ADMET para la predicción de propiedades ADMET (<https://vnnadmet.bhsai.org/vnnadmet/login.xhtml>).



6.1.6 Simulación de Dinámica Molecular

6.1.6.1 Preparación del sistema

Se seleccionó el mejor modelo de las moléculas evaluadas en el acoplamiento molecular contra la enzima Pks13, de tal manera que las coordenadas obtenidas fueron utilizadas para el estudio de dinámica molecular con el programa GROMACS 2020 (*GROningen Machine for Chemical Simulations*).⁸⁴

Se agregaron hidrógenos a los ligandos y a la macromolécula, posteriormente, se calcularon las cargas con el método AM1-BCC (ANTECHAMBER) haciendo uso del programa Chimera 1.13.1.⁸⁵ La parametrización de cada ligando se realizó con la herramienta ACPYPE (<https://www.bio2byte.be/acpype/>) para obtener la información de las topologías mediante la implementación del campo de fuerza de AMBER.⁸⁶

Se procedió a la solvatación del sistema con moléculas de agua utilizando el modelo TIP3P en una caja cúbica con 1.0 nm de distancia del borde de la caja y considerando condiciones de límite periódico. Posteriormente, se agregó el número adecuado de contraiones de Na⁺ y Cl⁻ a una concentración de 0.15 M para neutralizar el sistema.

6.1.6.2 Equilibrado

Se realizó la minimización de la energía del sistema con el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN y con el método de “descenso más pronunciado” (*steepest descent method*) hasta alcanzar una energía del sistema de 1000 kJ/mol. Posteriormente, se moduló la temperatura del ensamble NVT hasta alcanzar los 300 K con 5×10^6 ciclos, utilizando el termostato de reescalamiento de velocidades (*Berendsen* modificado), con un intervalo de 2 fs y un tiempo total de 10 ns



(procesos isotérmico-isocórico). De igual manera, se moduló la presión isotrópica del ensamble NPT a 1 bar haciendo uso del barostato Parrinello-Rahman, con un intervalo de 2 fs cada ciclo (proceso isotérmico-isobárico), con un tiempo total de 10 ns.

6.1.6.3 Producción

Se realizó la simulación con 50×10^6 ciclos, cada uno con un intervalo de 2 fs, es decir, con un tiempo total de simulación de 100 ns a una temperatura de 300 K y una presión constante. El cálculo de las cargas electrostáticas se realizó con el método de Partículas en Malla de Ewald (*Particle Mesh Ewald*, PME) y el cálculo de las interacciones de tipo Lennard-Jones con un radio de corte (cut-off) de 1.0 nm.

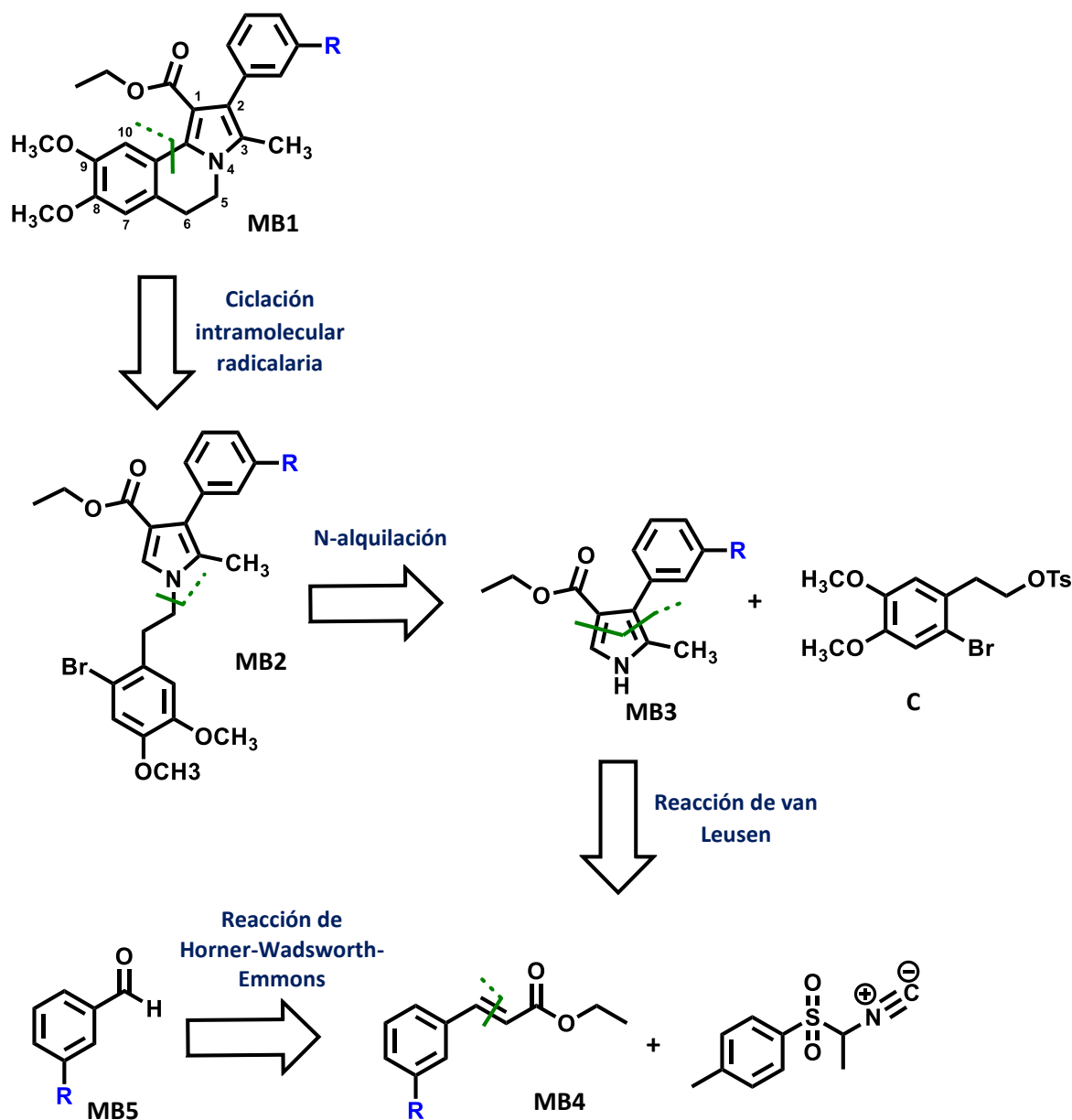
Se determinó la desviación cuadrática media (RMSD) y la fluctuación cuadrática media (RMSF) tanto de la proteína y del ligando, y la formación de puentes de hidrógeno con los residuos 1630 al 1645.

6.1.6.4 Cálculos de energía libre MM-PBSA

Se realizó el cálculo de la energía libre de unión de los complejos por medio del método Mecánica Molecular / Área de Superficie Poisson-Boltzmann (MM-PBSA).⁸⁷ Este se realizó con los archivos de las trayectorias obtenidas en la dinámica molecular, la topología, y el conjunto de átomos del complejo. Se determinó la energía de van der Waals, interacciones electrostáticas, contribuciones polares y no polares, y la energía de unión.

6.2 Retrosíntesis

Se obtuvieron los derivados de DHPIq mediante la ciclación radicalaria del anillo del pirrol trisustituido, el cual fue obtenido a través de una reacción de van Leusen entre los ésteres α,β -insaturados correspondientes y Me-TOSMIC (**Esquema 1**).

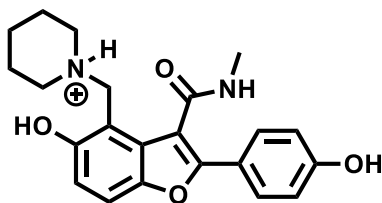


Esquema 1. Análisis retrosintético para la obtención de las DHPIq.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

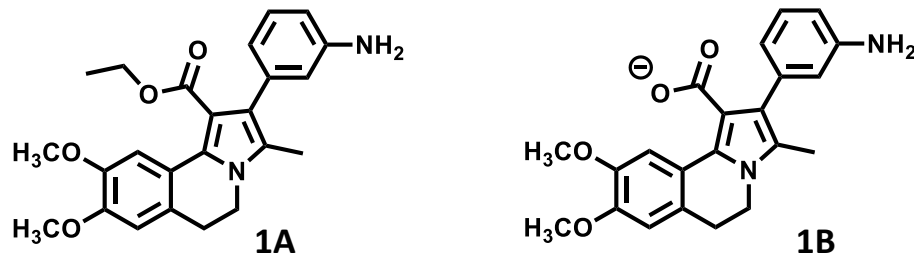
7.1 Parte computacional *a priori*

El resultado obtenido en la predicción del pK_a para el ligando **TAM16** fue de 9.71, obtenido con Chemicalize, el cual determina que el nitrógeno de la piperidina se encuentra protonado y con una carga de +1 a un pH de 7.4. También se determinó el estado de protonación al mismo pH de los residuos titulables de la enzima Pks13. El ácido aspártico 1644, el cual se encuentra en el sitio de unión y juega un papel importante para el reconocimiento del ligando, obtuvo un pK_a de 0.0, por lo cual, se encuentra en forma de aspartato y con una carga de -1 a un pH de 7.4.



TAM16

Del mismo modo, se calculó el estado de protonación del *hit* **1A** en la forma hidrolizada del grupo éster (**forma B**), por lo que el ácido carboxílico resultante se encontrará como carboxilato con carga negativa a un pH de 7.4.



En la validación del protocolo de *docking* con la enzima Pks13 y el ligando **TAM16**, se obtuvieron cuatro clústers, de los cuales el más poblado obtuvo un tamaño de 89 estructuras y un RMSD de 0.86 Å, por lo que el protocolo fue adecuado para aplicarlo en el acoplamiento molecular del *hit* **1A** y su forma **B** (**Figura 21**).

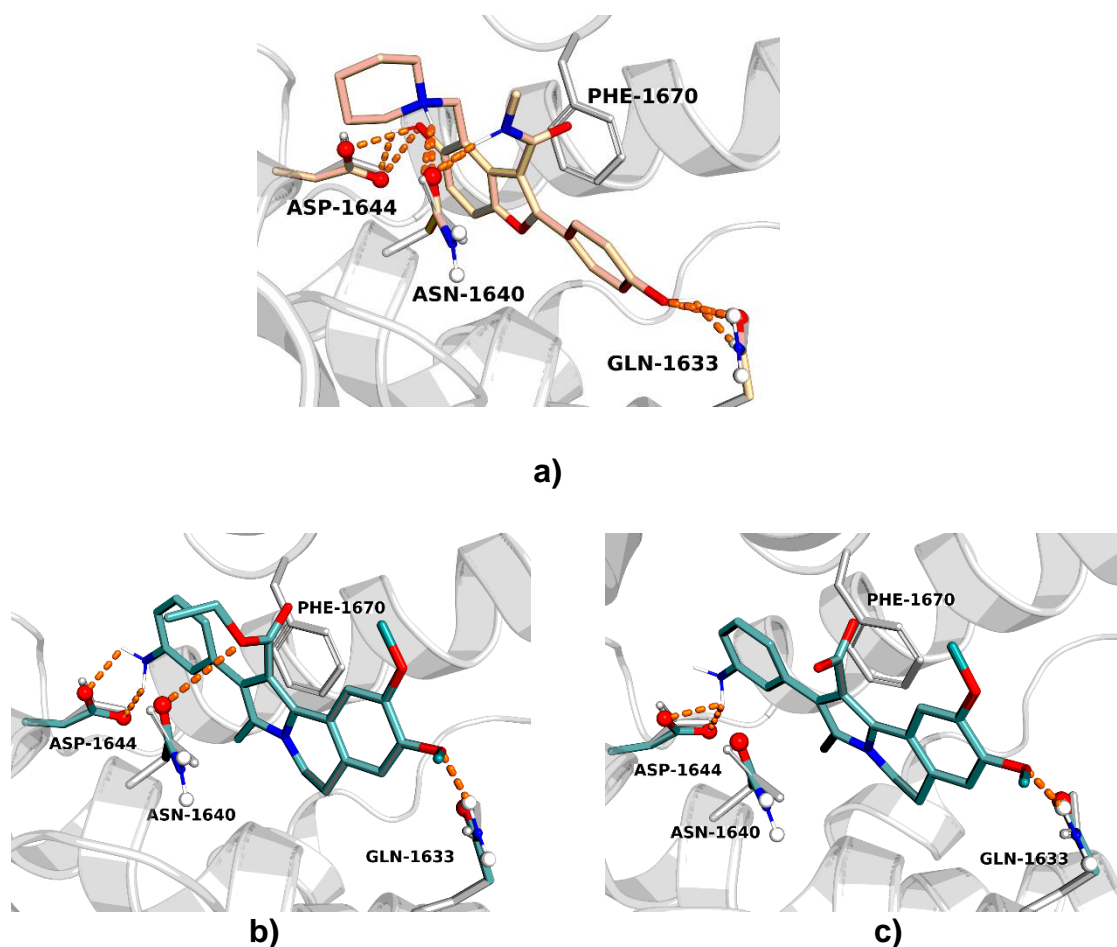


Figura 21. Acoplamiento molecular de a) **TAM16**, b) **1A** (*hit* fenotípico) y c) **1B** con la enzima PKS13.

Los tres ligandos evaluados reproducen las mismas interacciones en el sitio de unión tioestersada de la enzima Pks13. El nitrógeno de **TAM16**, al tener carga positiva, interactúa con el ASP1644 con carga negativa mediante interacciones electrostáticas. Este residuo también funciona como aceptor de puentes de hidrógeno con grupo hidroxilo de **TAM16**, y se observa esta misma tendencia con el grupo amino de los ligandos **1A** y **1B**.



El tricyclo de las DHPIq forma interacciones π con el anillo aromático de la PHE1670, del mismo modo como lo hace el anillo de benzofurano de **TAM16**. Los hidrógenos de la amida de los residuos GLN1633 y ASN1640 son grupos donadores de puentes de hidrógeno y el oxígeno del grupo carbonilo es un aceptor, por lo que el grupo carboxilato del ligando **1B** puede favorecer la interacción con el aminoácido ASN1640, permitiendo que el clúster sea más poblado a comparación de la molécula **1A** (Tabla 1).

Molécula	Tamaño del clúster	Scoring (Kcal/mol)
TAM16	89	-13.27
1A	34	-8.94
1B	61	-8.02

La función de puntuación o *scoring*, también conocido como energía de afinidad que utiliza el programa de acoplamiento molecular, no es suficientemente buena para la predicción de la afinidad o la actividad biológica aun siendo capaz de reproducir estructuras experimentales de forma precisa, debido al hecho de que sacrifica precisión en favor de la velocidad de cálculo. Por esta razón, la métrica de evaluación más significativa en este estudio para evaluar las variables de estado (*posing*) de los ligandos acoplados en la enzima Pks13 es el tamaño del clúster, es decir, la cantidad de confórmeros que se agrupan con un RMSD menor a 2.0 Å. Para el caso de la molécula **1B**, en el acoplamiento molecular existen 61 confórmeros similares, lo que incrementa la probabilidad de que entre esos confórmeros se encuentre la conformación activa que producirá una modificación o inhibición de la respuesta fisiológica de la macromolécula Pks13 en *Mtb*.

Se determinó un modelo de superposición de los confórmers **TAM16** y **1A** utilizando la herramienta LS-align con las estructuras obtenidas del acoplamiento molecular, se generó un alineamiento estructural rígido, de tal manera que se compararon las posiciones de los átomos de la probable conformación activa de ambos ligandos (**Figura 22**).

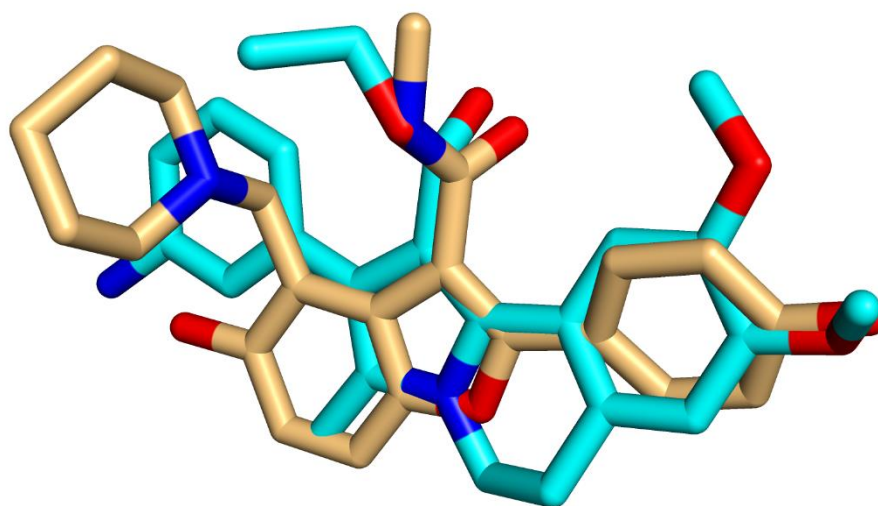
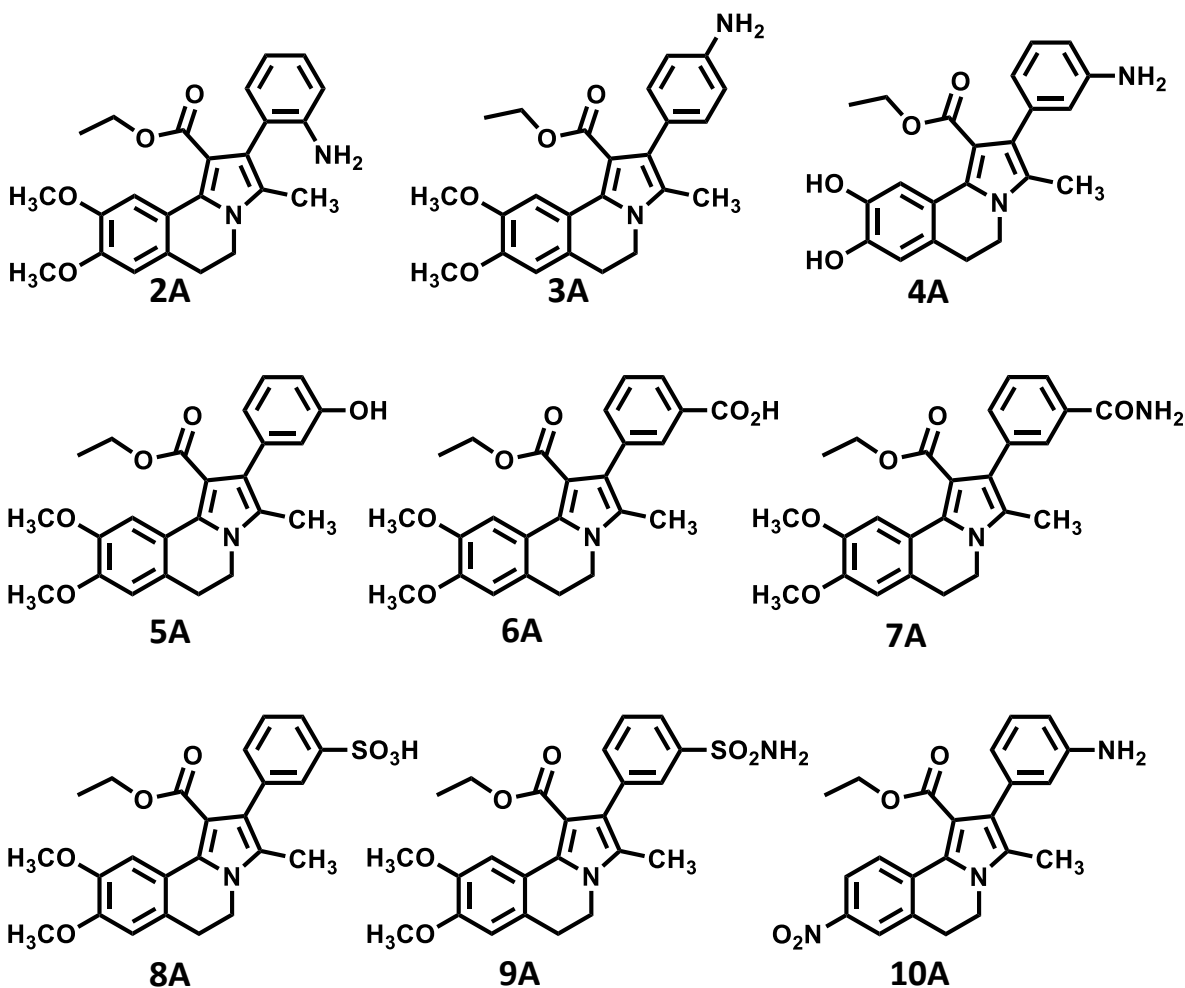


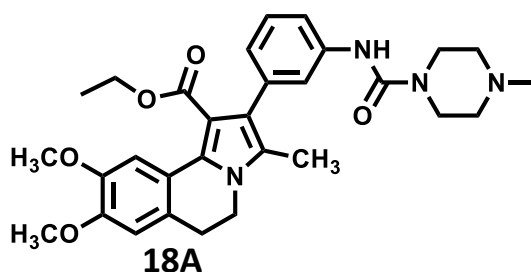
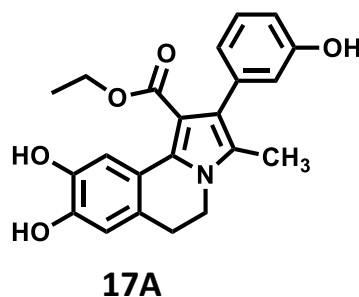
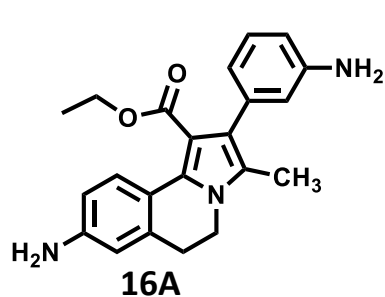
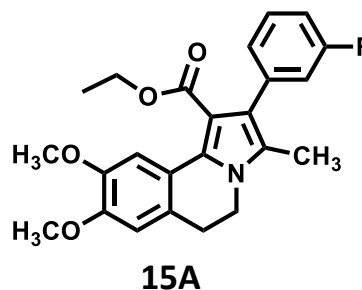
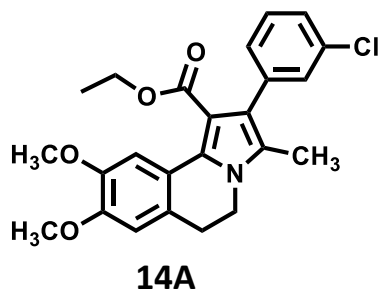
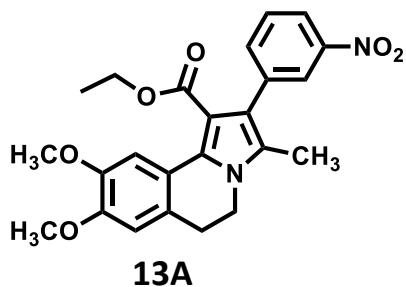
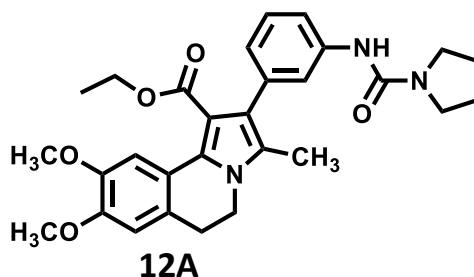
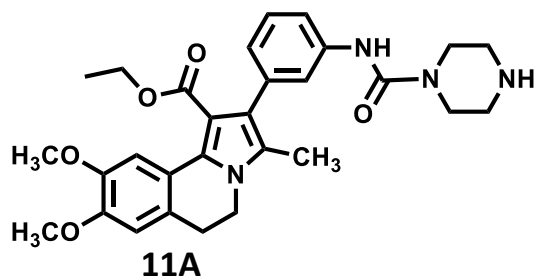
Figura 22. Modelo de superposición rígido de **TAM16** (café) y **1A** (cian).

Desde un punto de vista conformacional y basándose en el principio de similitud-propiedad, se determinó que los grupos funcionales de la molécula **TAM16** que son importantes para la interacción con la enzima Pks13, coinciden con los grupos funcionales del *hit* experimental **1A**. De manera que el grupo metoxilo de la posición 8 de la molécula **1A** mantiene la interacción con la enzima de la misma forma como lo hace el grupo hidroxilo del fenol en **TAM16**. El grupo amino de **1A** tiene la función tanto de aceptor como de donador de puentes de hidrógeno y mantiene cercanía con el grupo hidroxilo del anillo A de **TAM16** y con el nitrógeno de la piperidina.

Con base en los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular y en el modelo de superposición rígido, se diseñaron 17 compuestos (**2A-18A**) tomando en consideración la relación estructura-actividad establecida. Dado que el *hit* **1A**

contiene un grupo amino en la posición *meta* en el anillo del benceno, se decidió evaluar mediante acoplamiento molecular este grupo en las posiciones *orto* y *para*, por lo que se modelaron los compuestos **2A** y **3A** respectivamente. Los compuestos **4A** y **17A** contienen los grupos hidroxilo libres de las posiciones 8 y 9. Para la construcción de los compuestos **5A-9A** se consideró la presencia de grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno en la posición *meta* del anillo de benceno, también se decidió evaluar la presencia de halógenos como el cloro y el flúor (**14A** y **15A**, respectivamente) en la misma posición. Finalmente, se modelaron tres de los compuestos previamente evaluados en el cribado fenotípico contra *Mtb*, con el fin de explicar la diferencia en la actividad biológica observada cuando las DHP1q con derivados de urea contienen un anillo de pirrolidina (**12A**) o de piperazina (**18A**), además se consideró el grupo piperazina sin el metilo en el nitrógeno de la posición 4 (**11A**).





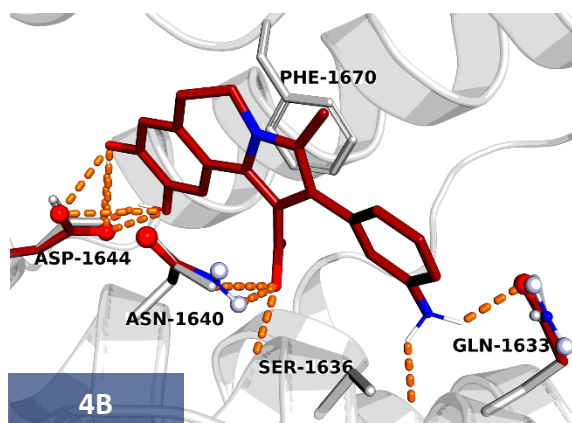
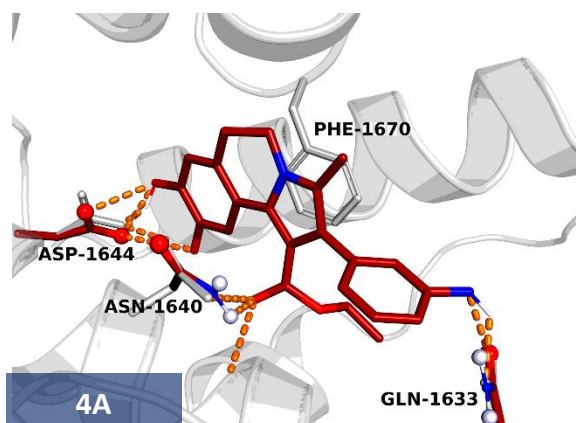
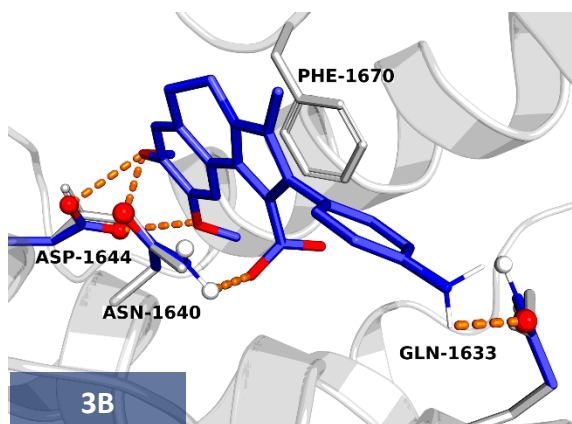
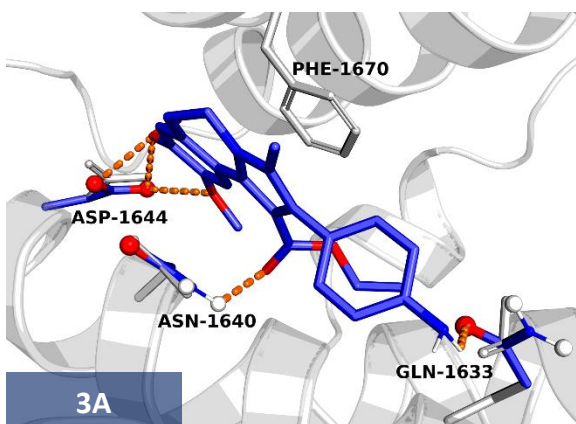
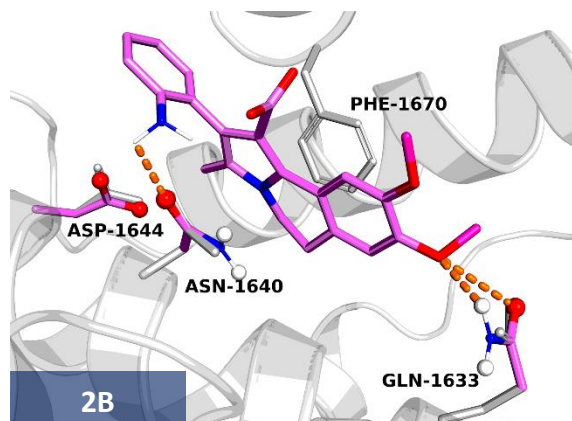
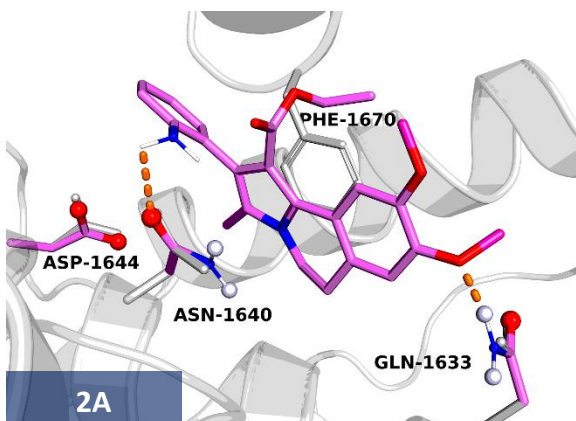
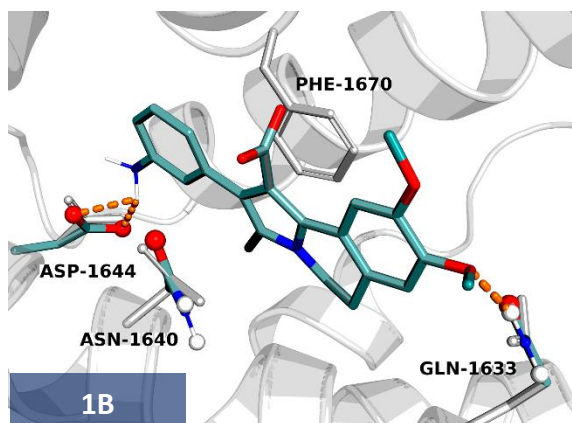
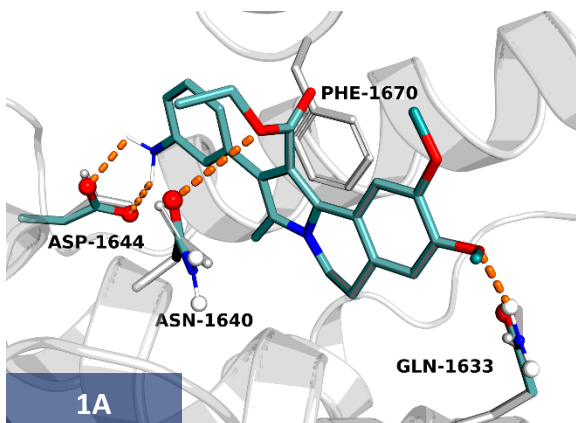
Se determinó el pK_a del ácido carboxílico (con la herramienta Chemicalize) de la posición *meta* del benceno en **6A** y el del ácido sulfónico de **8A**, siendo de 4.11 y de -1.79 respectivamente, lo que indica que a un pH de 7.4 ambos grupos se encontrarán en su forma desprotonada (ver **Anexo B**). Ambas moléculas fueron modeladas siguiendo esta consideración.

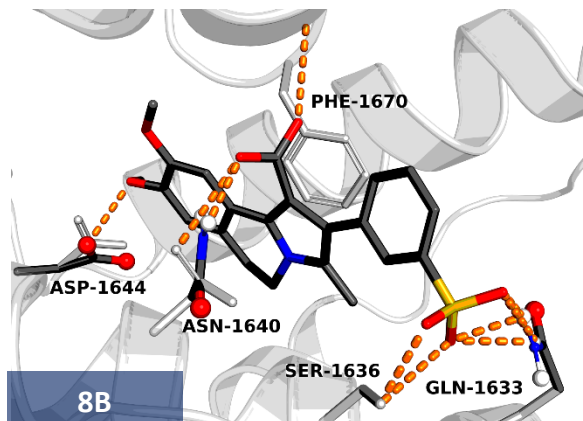
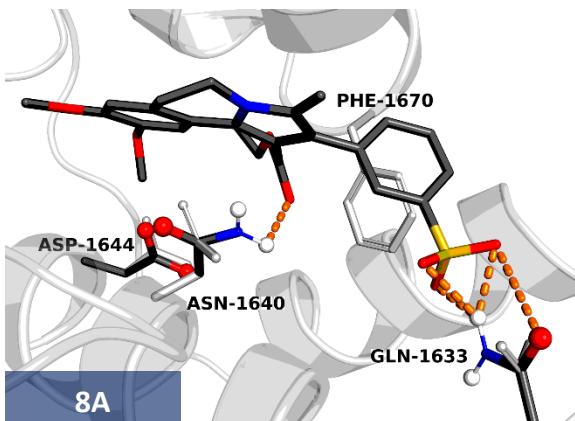
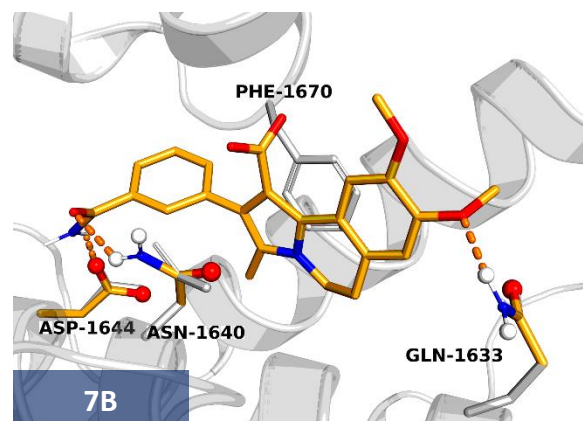
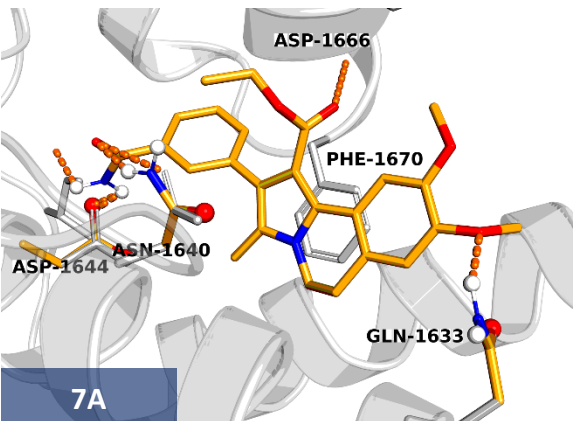
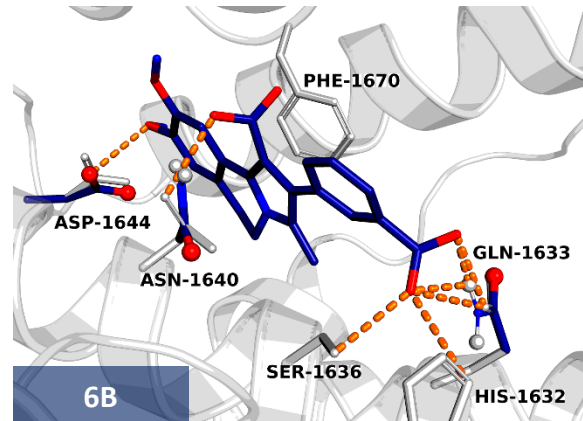
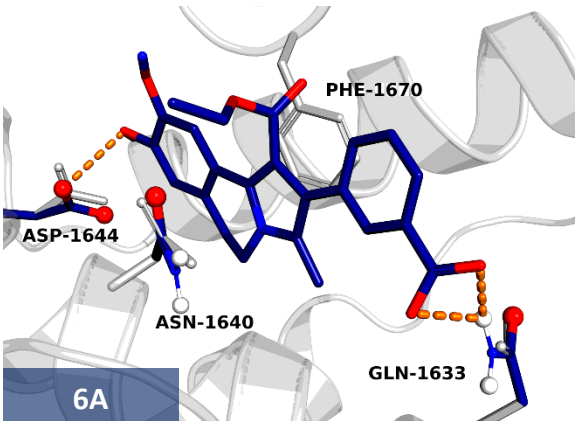
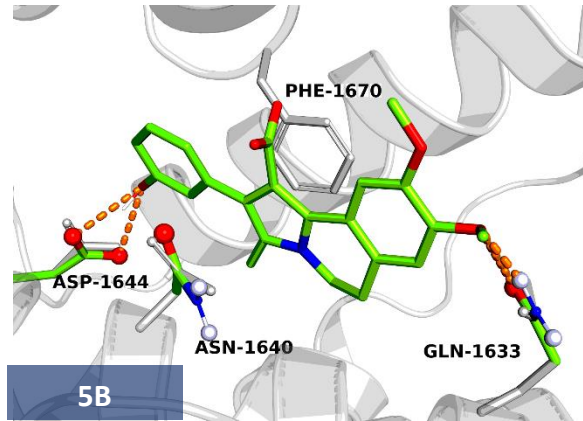
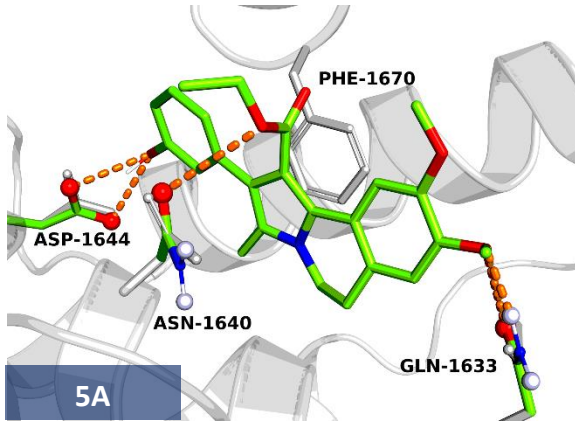


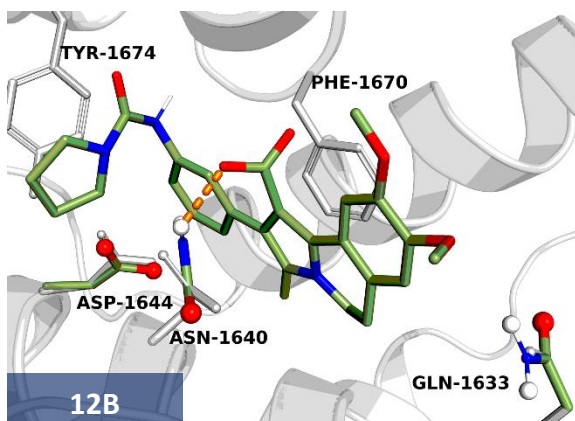
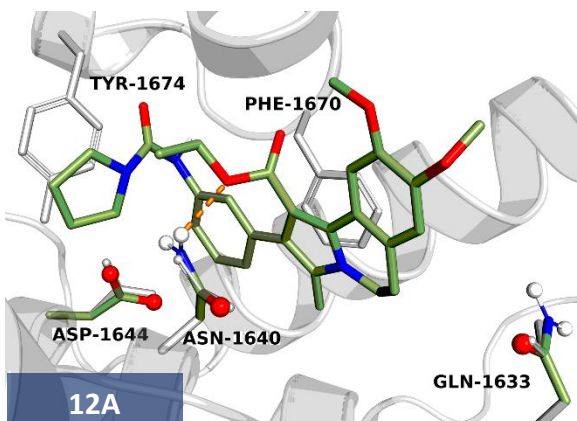
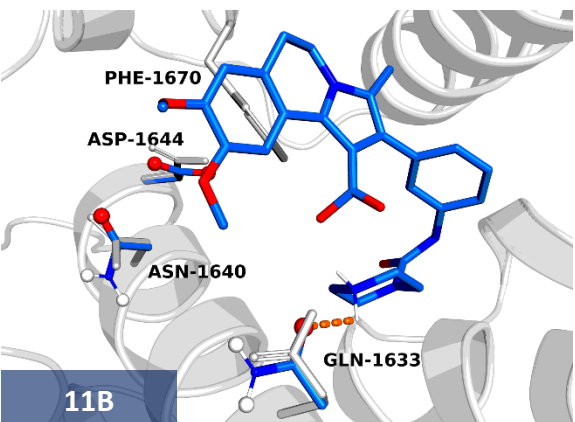
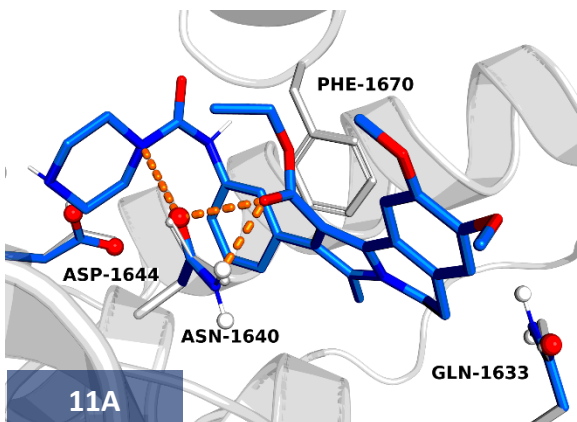
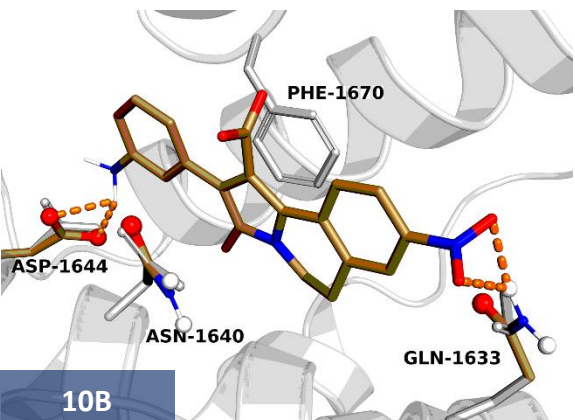
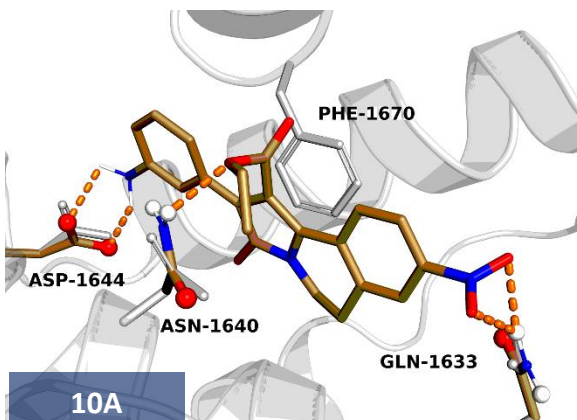
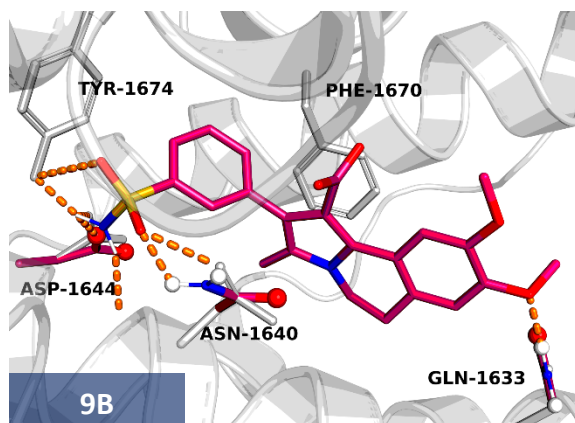
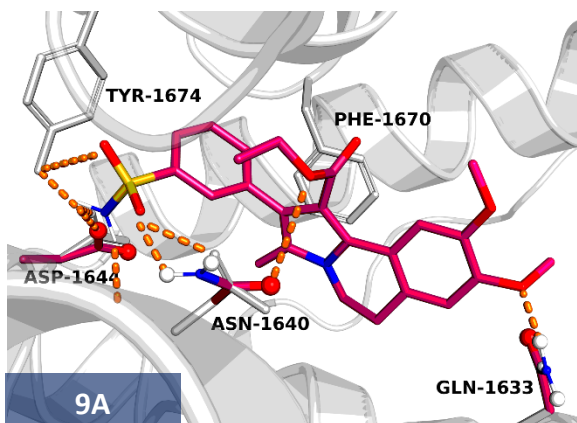
7.1.1 Acoplamiento molecular de los derivados propuestos

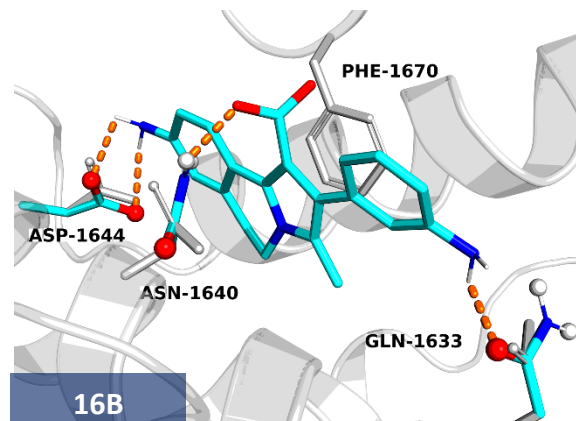
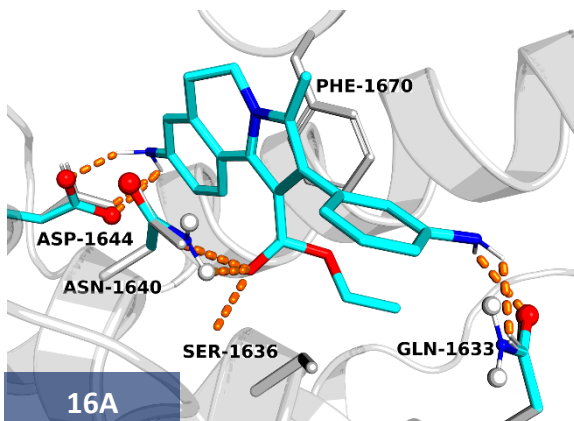
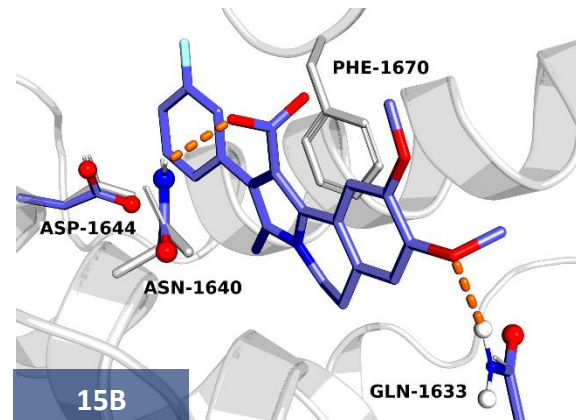
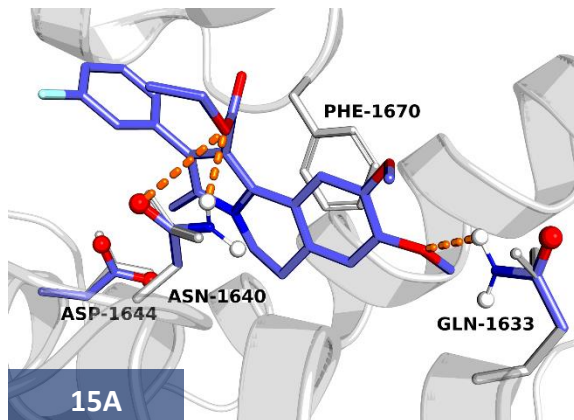
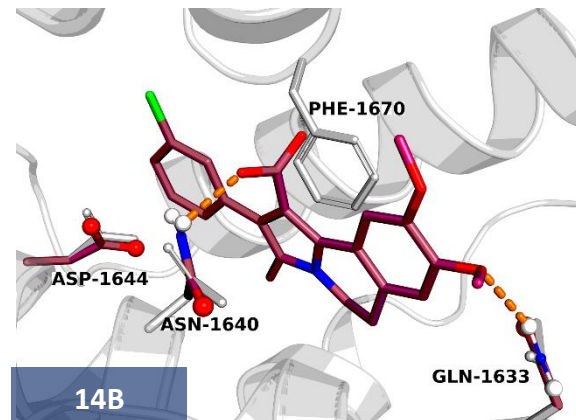
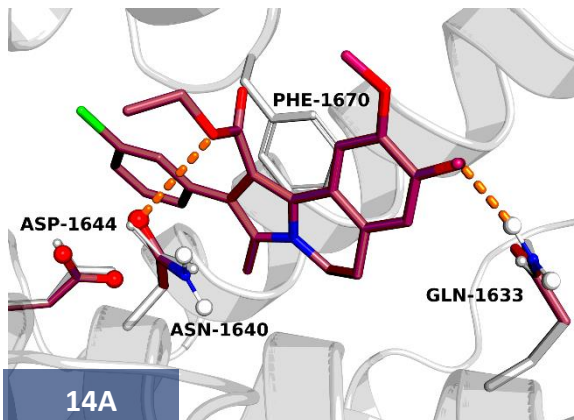
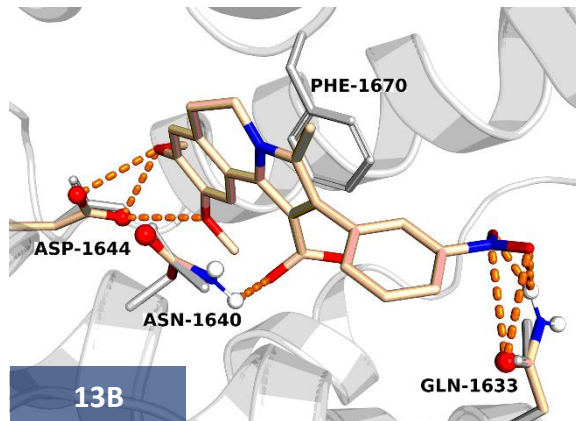
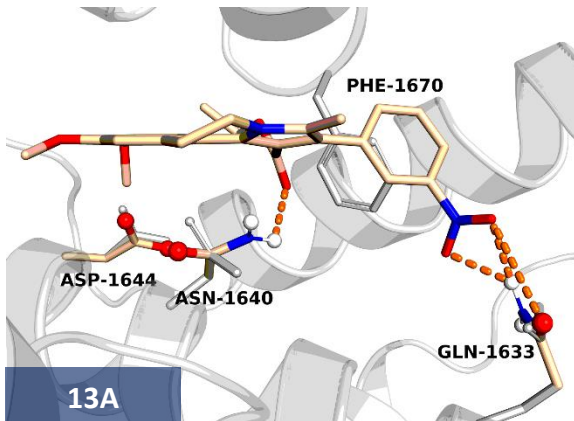
En la **Tabla 2** se muestra el tamaño del clúster generado (de 100 conformeros) de los derivados de DHPIq propuestos y el *scoring* obtenido en el acoplamiento molecular con la enzima Pks13, donde los resultados se comparan con el obtenido del *hit* experimental **1A**. El clúster de las moléculas **B** fue considerablemente más poblado, donde la presencia del grupo carboxilato permite que los conformeros generados con el algoritmo Lamarckiano sean más similares en su *posing* y se agrupen con base en su RMSD (**Figura 23**).

Molécula	Tamaño de clúster (A)	Scoring (kcal/mol)	Tamaño de clúster (B)	Scoring (kcal/mol)
1 (hit)	34	-8.94	61	-8.02
2	13	-7.78	20	-6.90
3	21	-8.42	39	-7.36
4	50	-10.24	77	-9.49
5	39	-8.47	59	-7.50
6	16	-8.19	34	-7.64
7	18	-9.08	27	-8.06
8	20	-8.58	26	-8.12
9	19	-10.29	27	-9.33
10	78	-9.54	92	-8.54
11	12	-9.53	29	-6.60
12	18	-8.99	36	-8.77
13	17	-8.07	27	-7.25
14	25	-8.00	52	-7.56
15	21	-8.68	33	-7.00
16	69	-10.14	54	-9.27
17	47	-9.84	90	-9.21
18	12	-10.70	21	-9.58









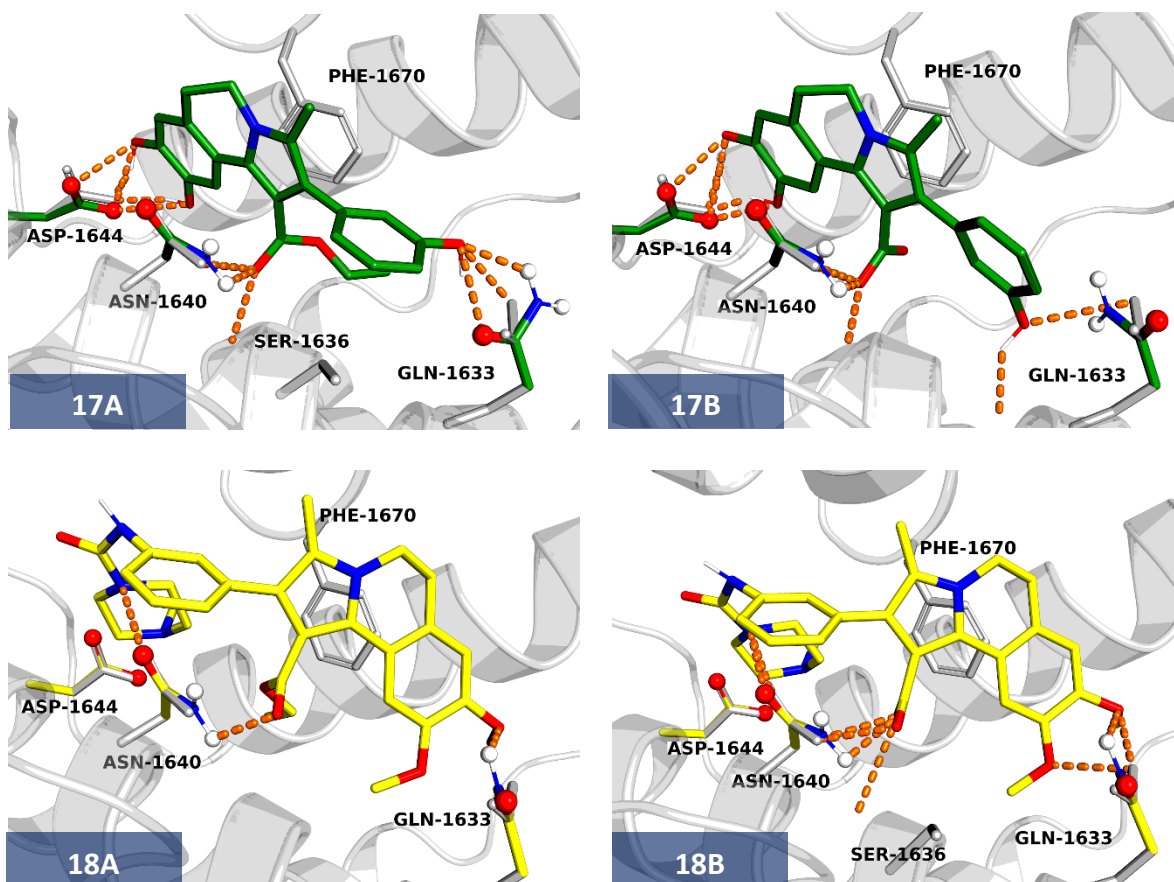


Figura 23. Visualización de los resultados del acoplamiento molecular de los derivados de las DHPIq (1-18 A y B).

La posición *meta* del grupo amino en la molécula **1** permite un acoplamiento favorable a la enzima Pks13, de tal manera que en su forma **A** y **B** se mantiene la interacción con el aminoácido ASP1644. Sin embargo, cuando el amino se encuentra en la posición *orto* (**2**), la interacción se favorece con la ASN1640 pero con un tamaño de clúster menor y un *scoring* considerablemente mayor. Cuando se evalúa el grupo amino en la posición *para* (**3**), se genera la inversión de la molécula en el sitio activo, ya que el amino forma puentes de hidrógeno con la GLN1633 y los metoxilos interaccionan con el ASP1644.

También se observa la inversión de la molécula cuando los metoxilos de las posiciones 8 y 9 son reemplazados por grupos hidroxilo, ya que se favorece la formación de puentes de hidrógeno de estos con el carboxilato del ASP1644, generando un *posing* muy similar en las formas **A** y **B**. Esto se observa en los compuestos **4** y **17**, donde este último contiene un grupo hidroxilo en la posición *meta* del benceno.

Si en la posición *meta* del benceno se consideran grupos funcionales cargados negativamente como el carboxilato de **6A** y el sulfonato de **8A**, la molécula se invierte, de manera que el ASP1644 genera repulsión a estos grupos funcionales por su carga negativa. Sucede lo mismo con la presencia de un grupo nitró (**10A**) debido a la distribución de carga negativa entre sus átomos de oxígeno.

En el cribado fenotípico realizado previamente, la molécula **12** que es un derivado de urea con un anillo de pirrolidina y la molécula **18** con una piperazina *N*-metilada, obtuvieron una MIC de $>500 \mu\text{M}$ y $62.5 \mu\text{M}$ respectivamente (**Figura 24**). Para estudiar su posible modo de unión a la enzima Pks13, primero se determinó el pK_a de la amina terciaria del compuesto **18**, el cual fue de 7.0. La curva de titulación muestra dos microespecies predominantes (2 y 3) a un pH de 7.4 (**Gráfico 2**), por lo que se decidió modelar ambas estructuras.

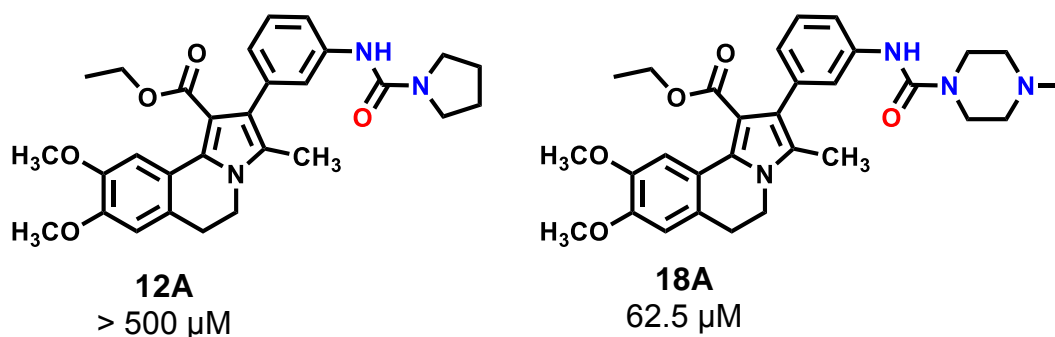


Figura 24. Actividad biológica de los compuestos **12A** y **18A** contra *Mtb*.

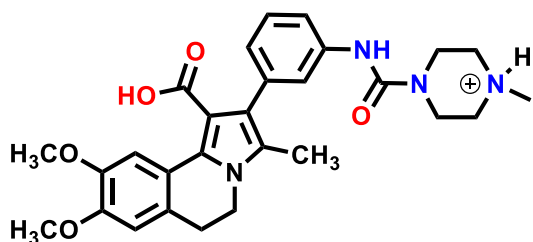
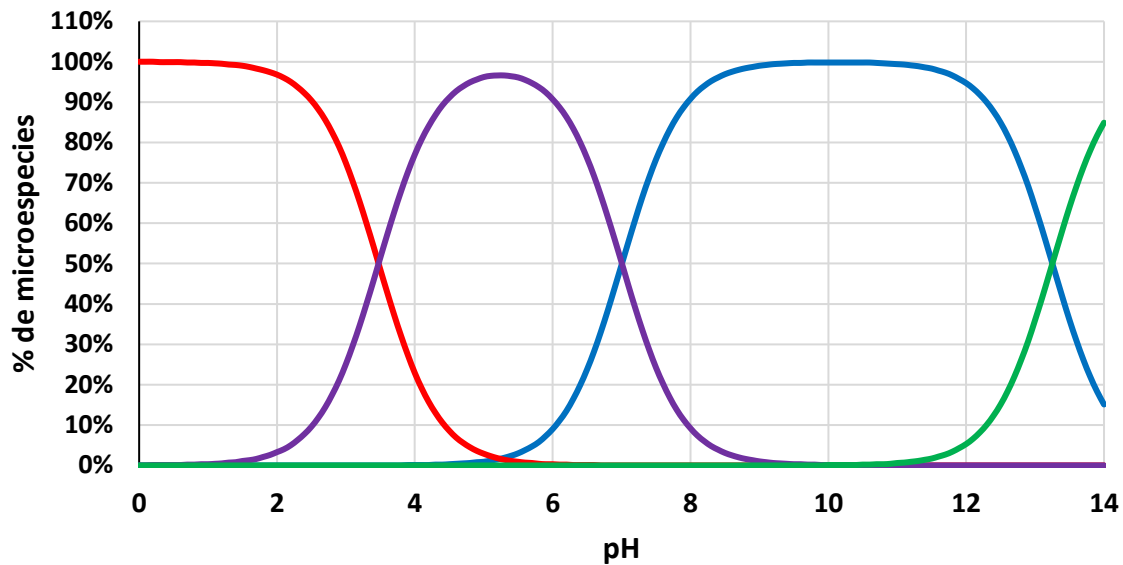
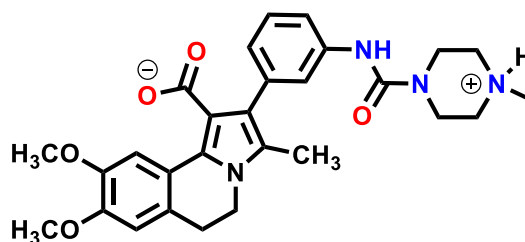
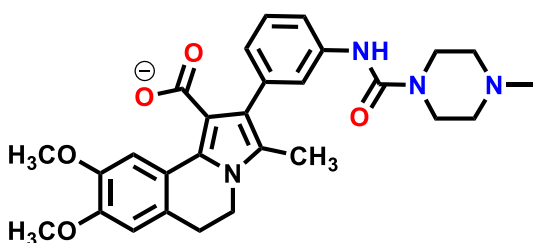
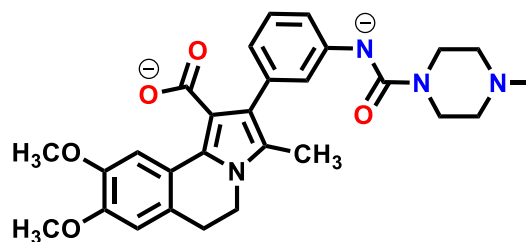

Microespecie 1

Microespecie 2

Microespecie 3

Microespecie 4

Gráfico 2. Abundancia de las microespecies del compuesto **18** dependiente del pH.

Adicionalmente se construyeron los compuestos **18C** y **18D**, posteriormente se evaluó su acoplamiento molecular con la enzima Pks13 (**Tabla 3**).

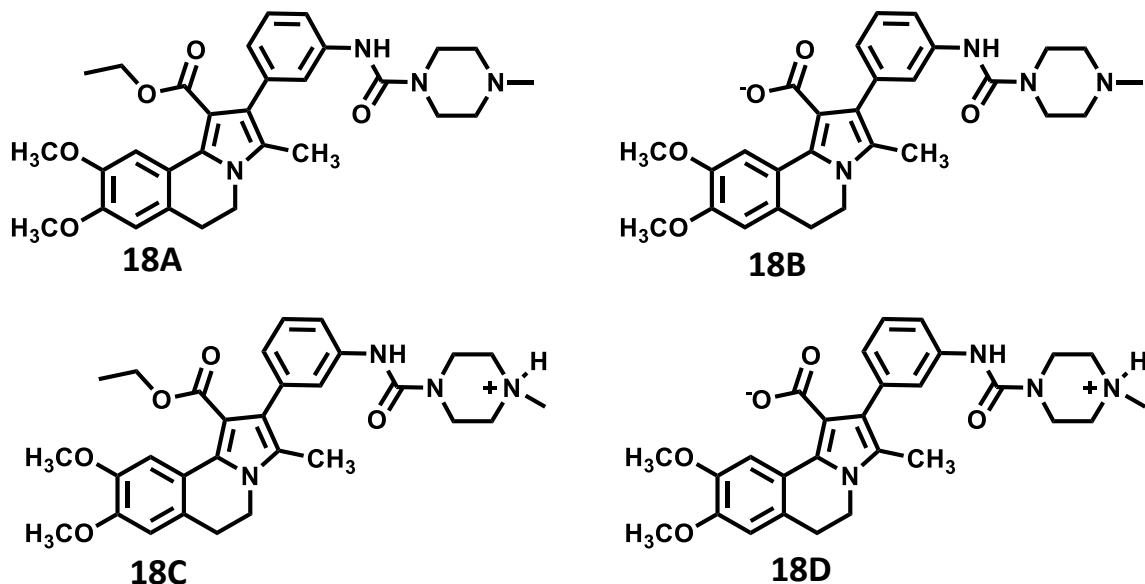


Tabla 3. Resultados del acoplamiento de las formas **A-D** del compuesto **18**.

Molécula	Tamaño del clúster	Scoring (kcal/mol)
18A	12	-10.70
18B	21	-9.58
18C	20	-9.23
18D	34	-6.54

La forma **18D** obtuvo un clúster más poblado que el resto, pero con un *scoring* mayor que **18A**. Con base en el *posing* observado de **18D**, la carga positiva de la amina terciaria puede ser atraída por la carga negativa del carboxilato, forzando a la molécula a plegarse entre sí e impedir una interacción favorable con los residuos importantes para el reconocimiento del ligando (**Figura 25**).

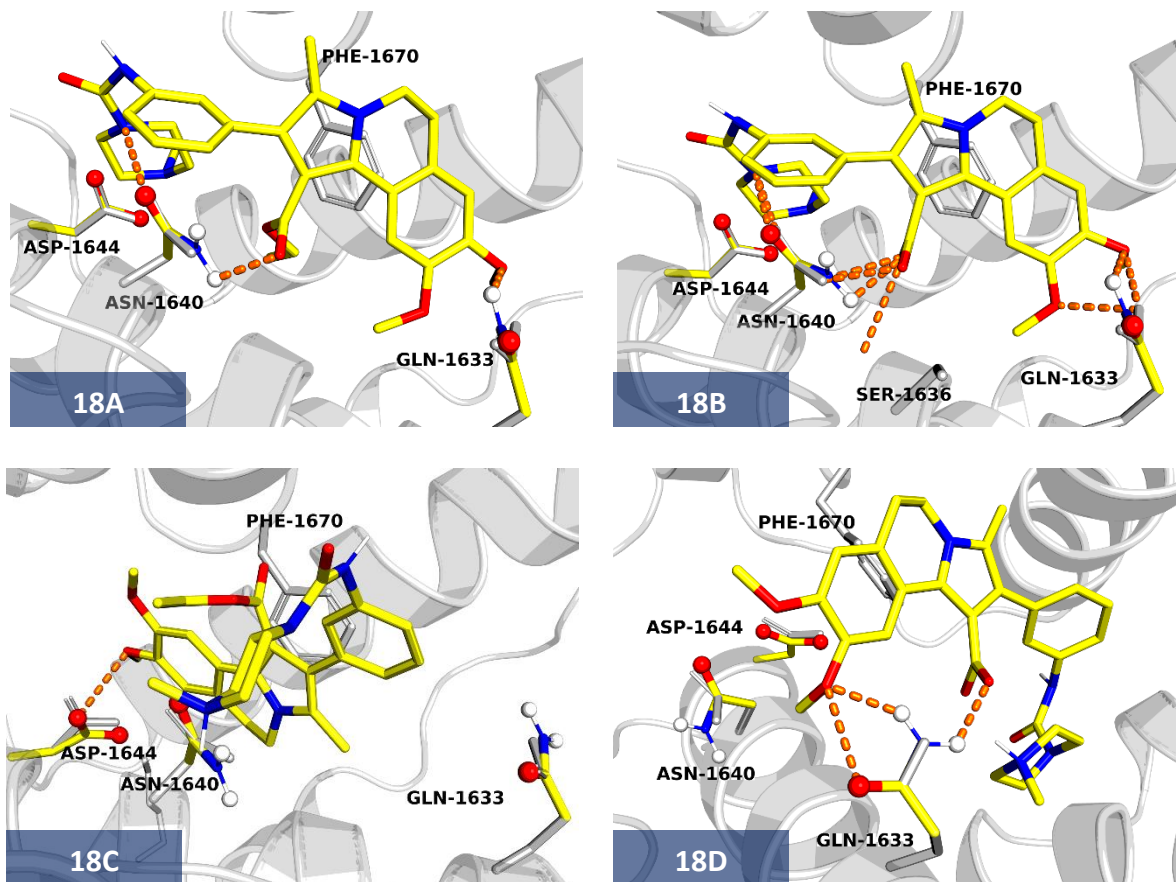


Figura 25. Visualización de los resultados del acoplamiento molecular de las formas **A-D** del compuesto **18**.

El nitrógeno de la pirrolidina en el compuesto **12** no puede formar puentes de hidrógeno con el ASP1644 ni con la GLN1633, debido a la poca disponibilidad del par de electrones libre del nitrógeno, siendo este deslocalizado en el grupo carbonilo. A pesar de que la amina terciaria protonada en el compuesto **18** puede generar mejores interacciones en el sitio activo a comparación del compuesto **12**, su acoplamiento a la enzima Pks13 no se favorece lo suficiente debido a posibles atracciones electrostáticas intermoleculares. Esto permite explicar la diferencia en la actividad biológica entre ambos compuestos. El efecto no cambia si la amina de la piperazina no se encuentra metilada, ya que el compuesto **11** presenta el mismo resultado que el compuesto **18** en el estudio de acoplamiento molecular (**Figura 26 y Tabla 4**).

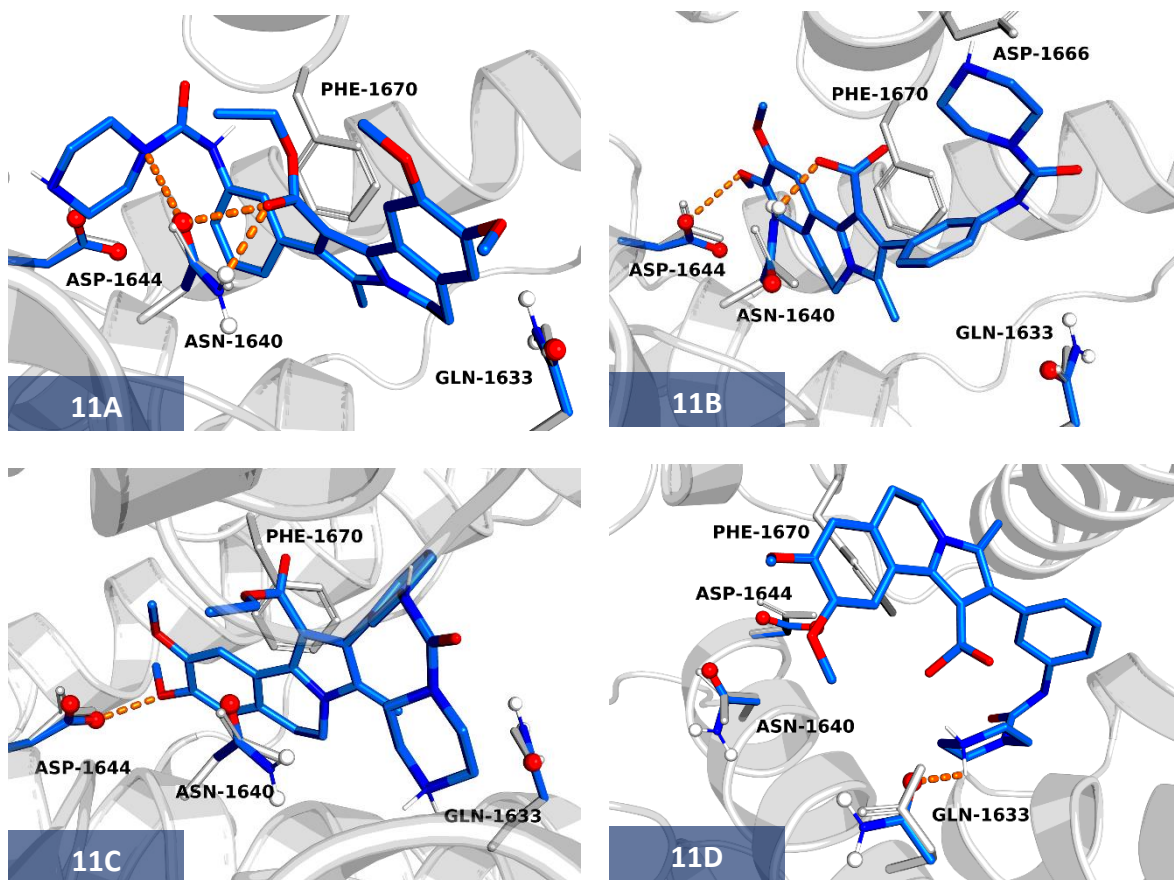


Figura 26. Visualización de los resultados del acoplamiento molecular de las formas A-D del compuesto 11.

Tabla 4. Resultados del acoplamiento de las formas A-D del compuesto 11.		
Molécula	Tamaño del clúster	Scoring (kcal/mol)
11A	12	-9.53
11B	19	-8.63
11C	18	-9.04
11D	29	-6.60

7.1.2 Estudio de permeabilidad en membrana

Con la herramienta PerMM se simuló una membrana negra (BLM, *Black Lipid Membrane*) como modelo de bicapa lipídica formada de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) a un pH de 7.4 y una temperatura de 298 K. Ambas capas de fosfolípidos tienen una separación de 30 Å entre sí. Se simuló la trayectoria de los derivados de DHPIq a través de la membrana, lo que permitió calcular sus energías libres de unión con respecto a la distancia en ángstroms del centro de la membrana (**Figura 27**).

En todas las moléculas se observa la misma tendencia en su perfil energético. Cuando la distancia de la molécula en estudio es cero, es decir, se encuentra en el centro de la membrana, aumenta su energía libre considerablemente debido a la región altamente hidrofóbica. En una distancia aproximada de 15 Å la energía es más baja debido a la interacción de la región hidrofílica de los fosfolípidos con las moléculas. Los compuestos con carga negativa (formas **B**, **C** y **D**) tienen una energía libre de unión más elevada en el centro de la membrana en comparación con las moléculas neutras (formas **A**). Sin embargo, la diferencia energética no es significativa a una distancia de 15 Å, lo que permite inferir que ambas formas (**A** y **B**) tienen la misma probabilidad y facilidad de atravesar la membrana (**Gráfico 3**).

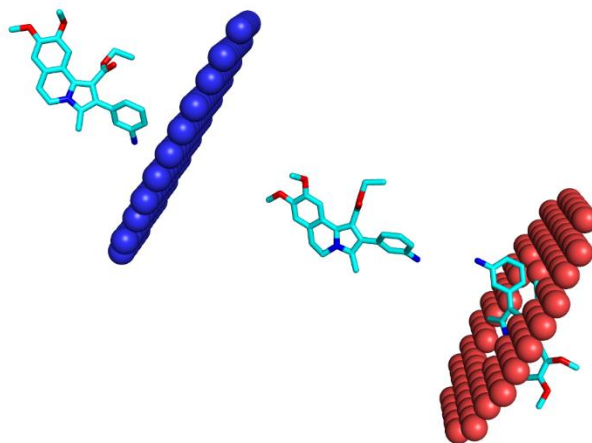
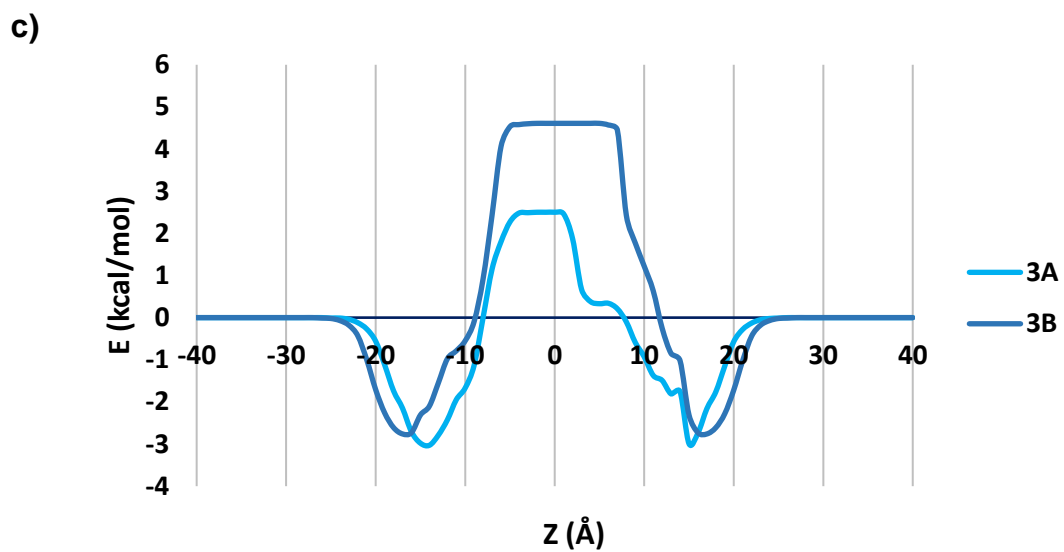
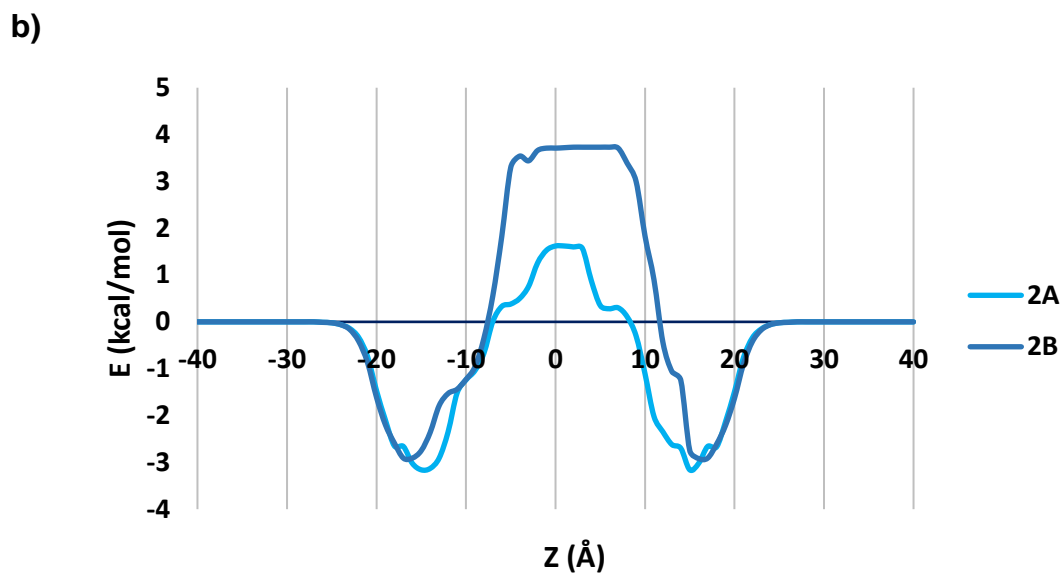
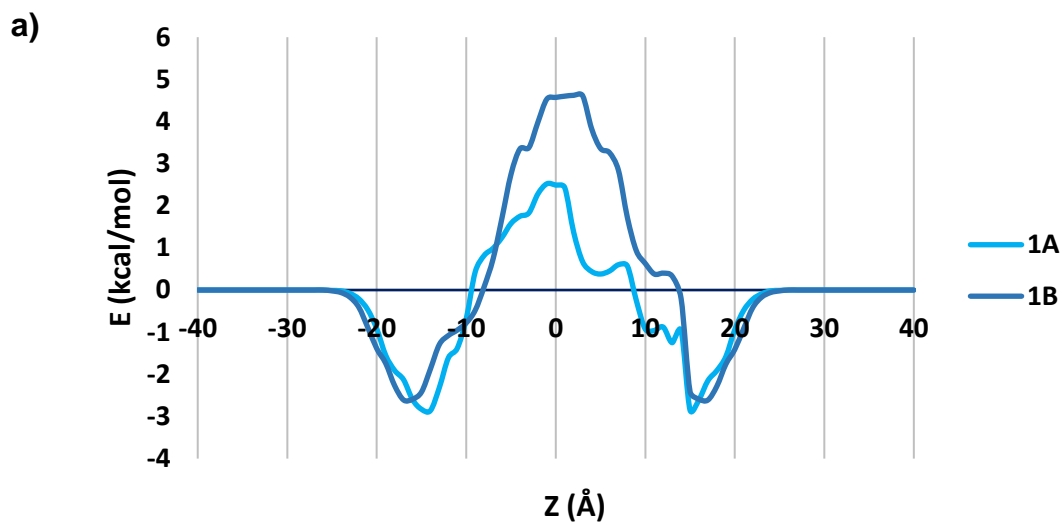
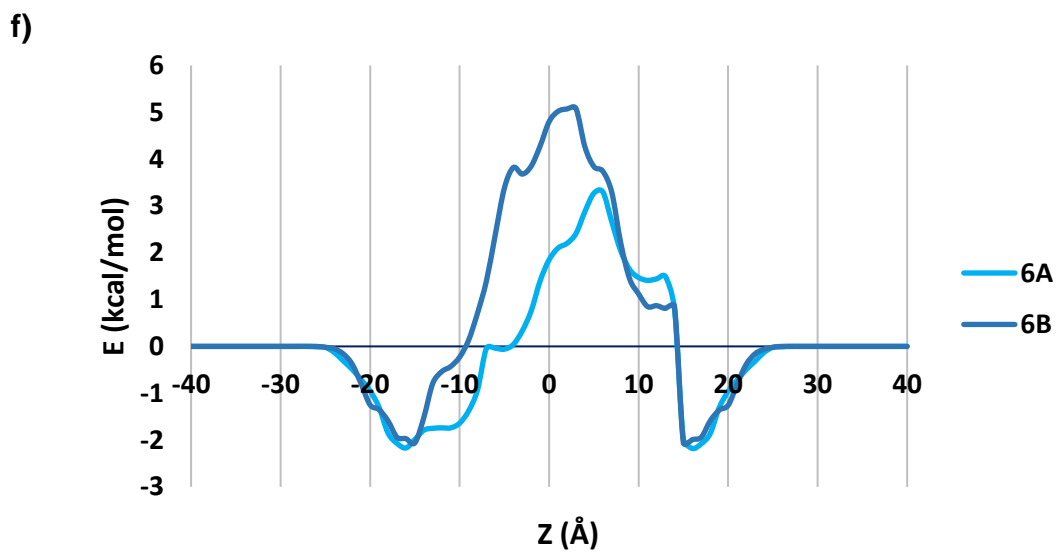
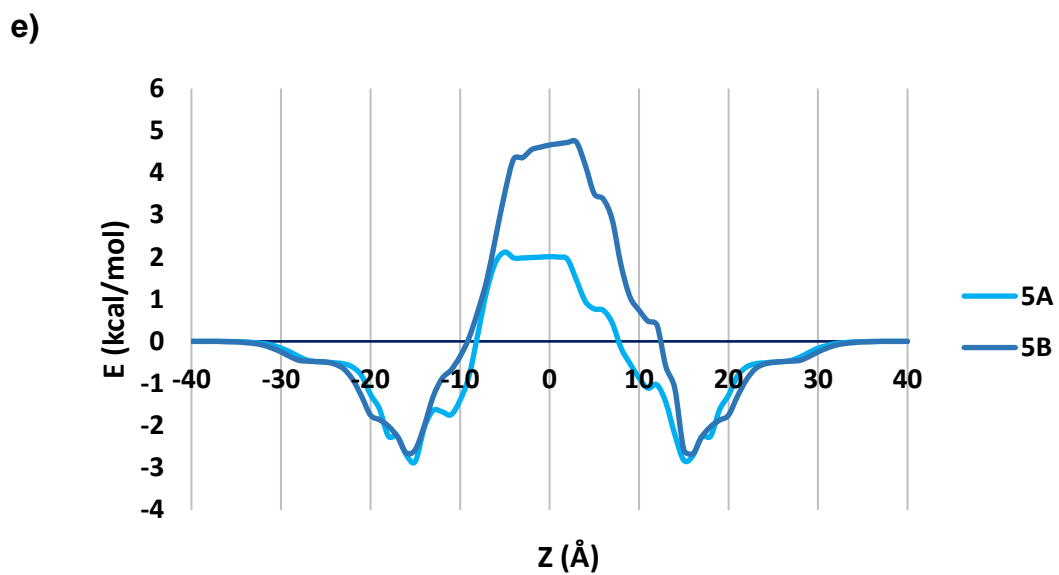
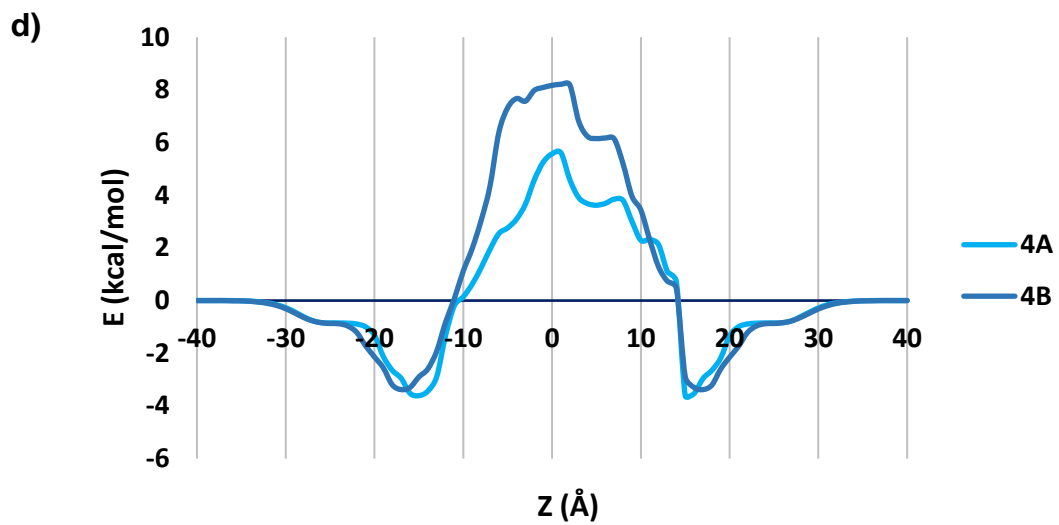


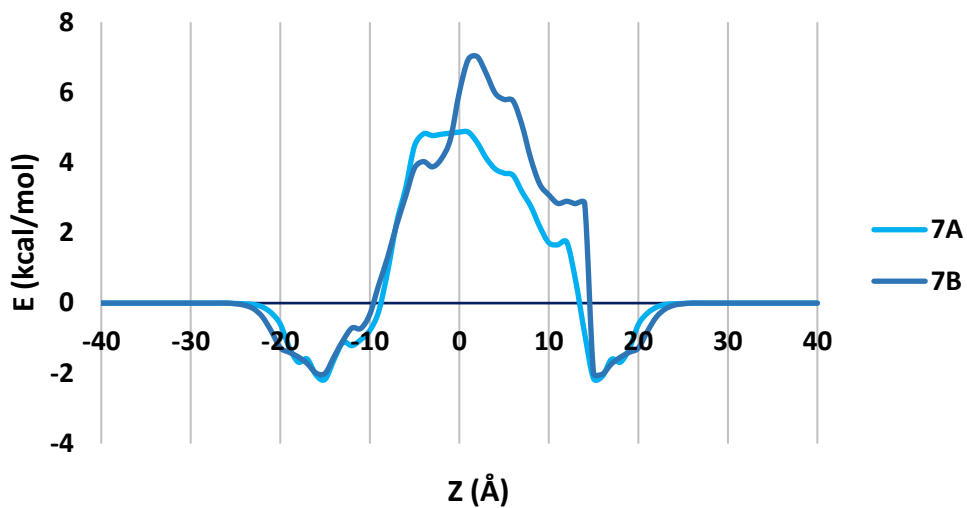
Figura 27. Recorrido de la molécula **1A** a través de la membrana simulada.



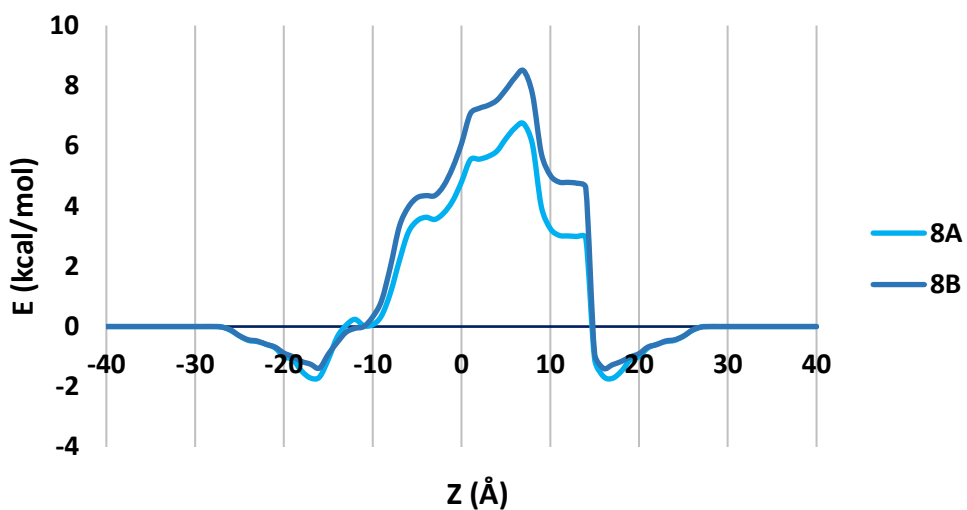




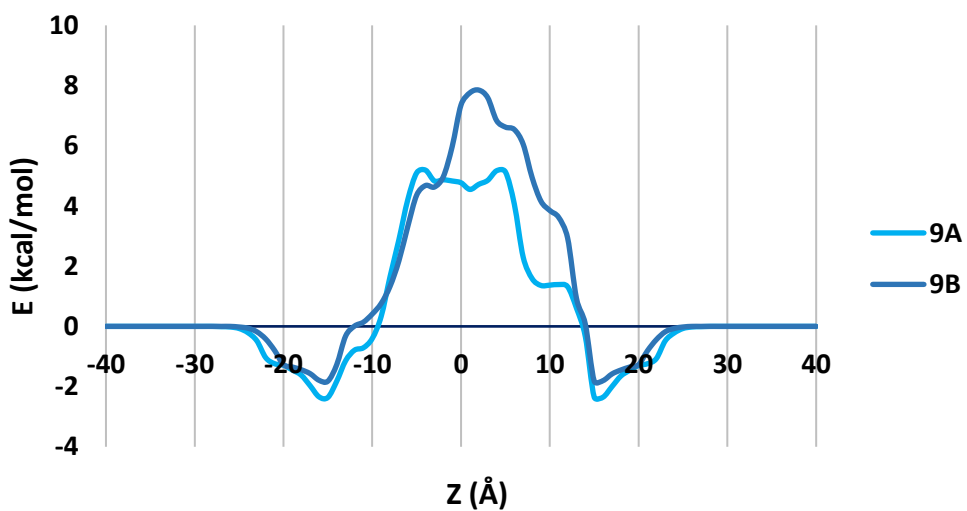
g)

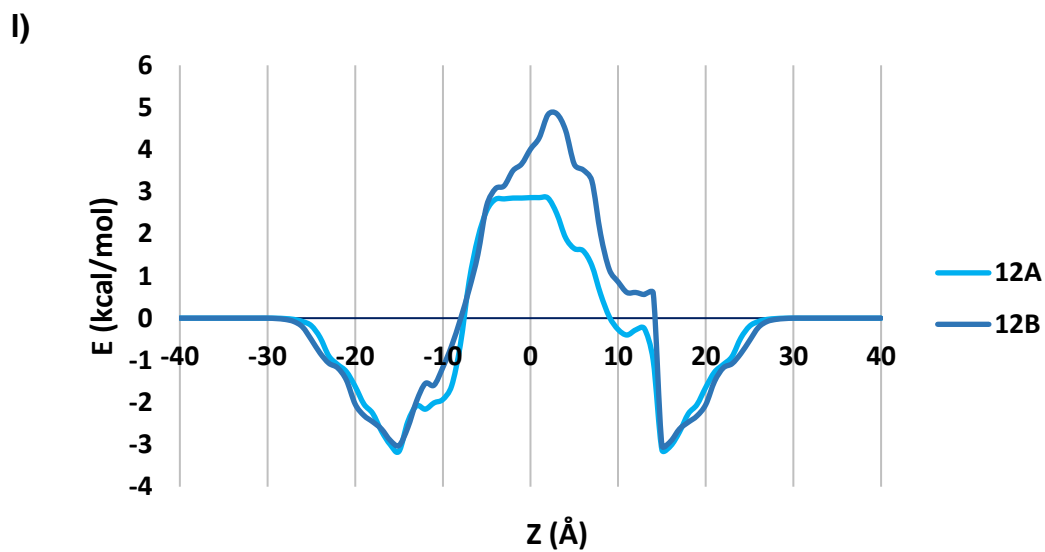
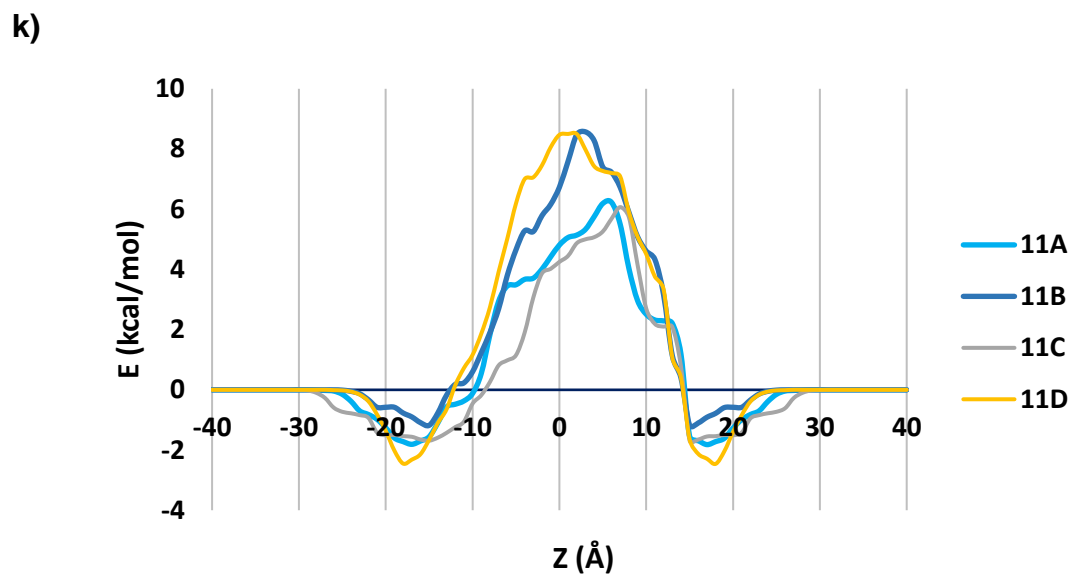
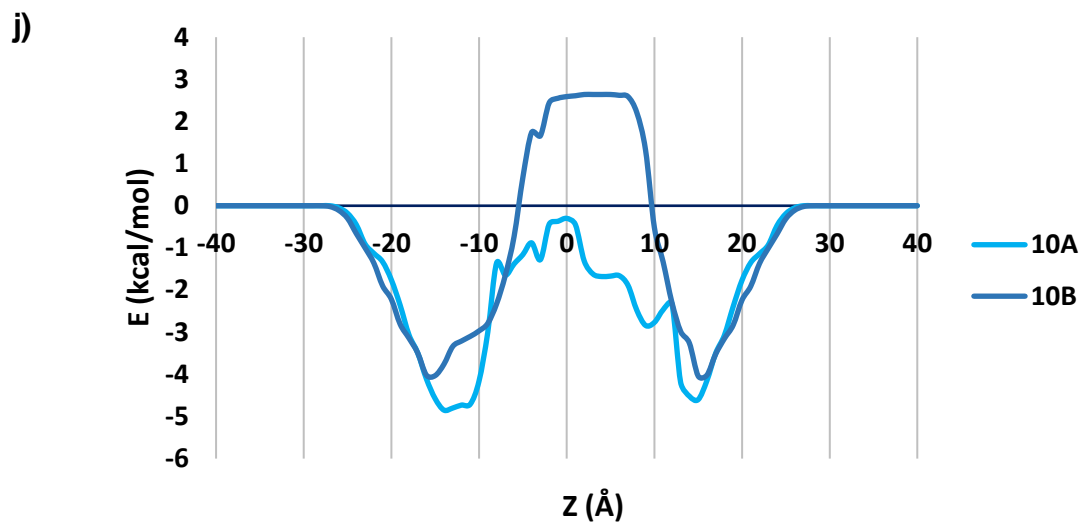


h)



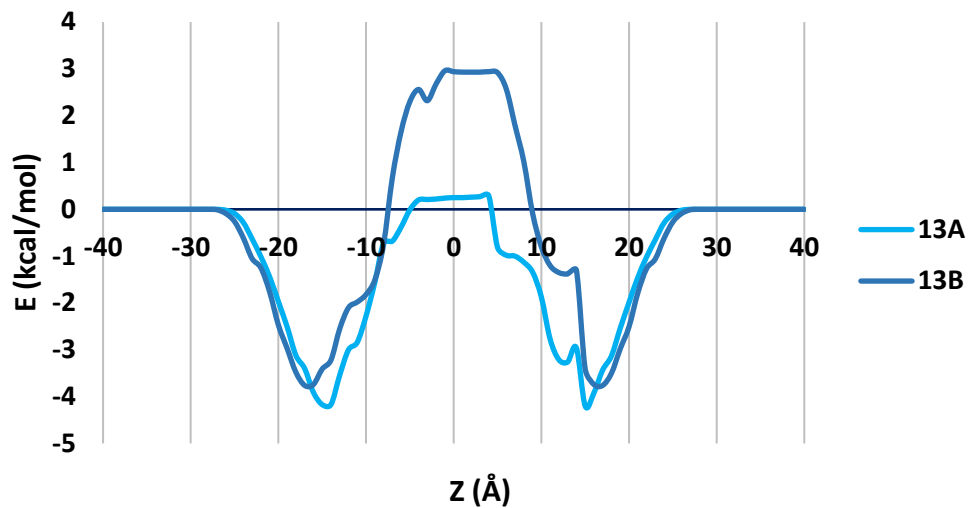
i)



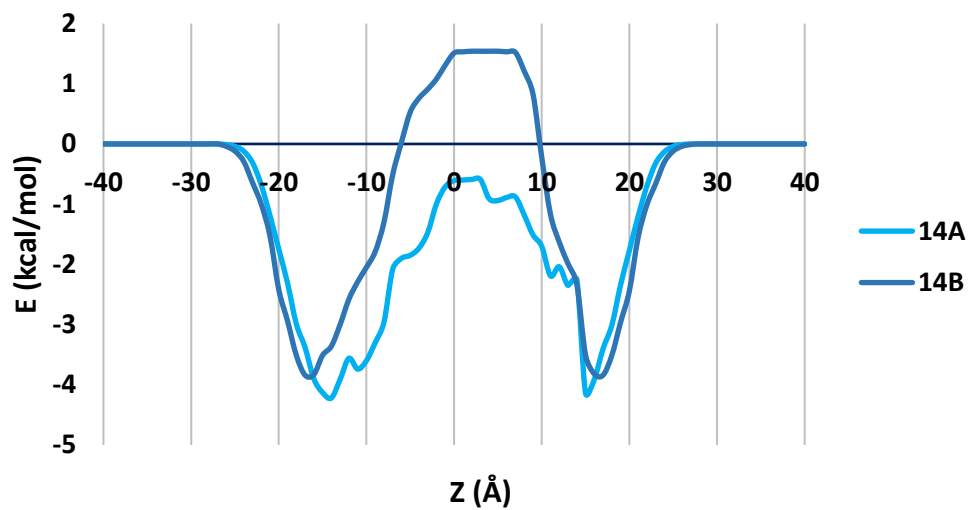




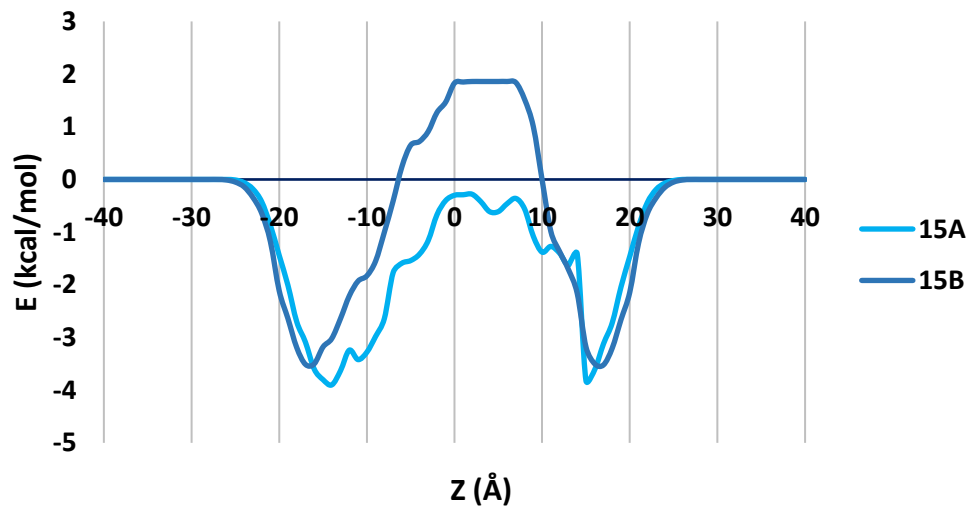
m)



n)



ñ)



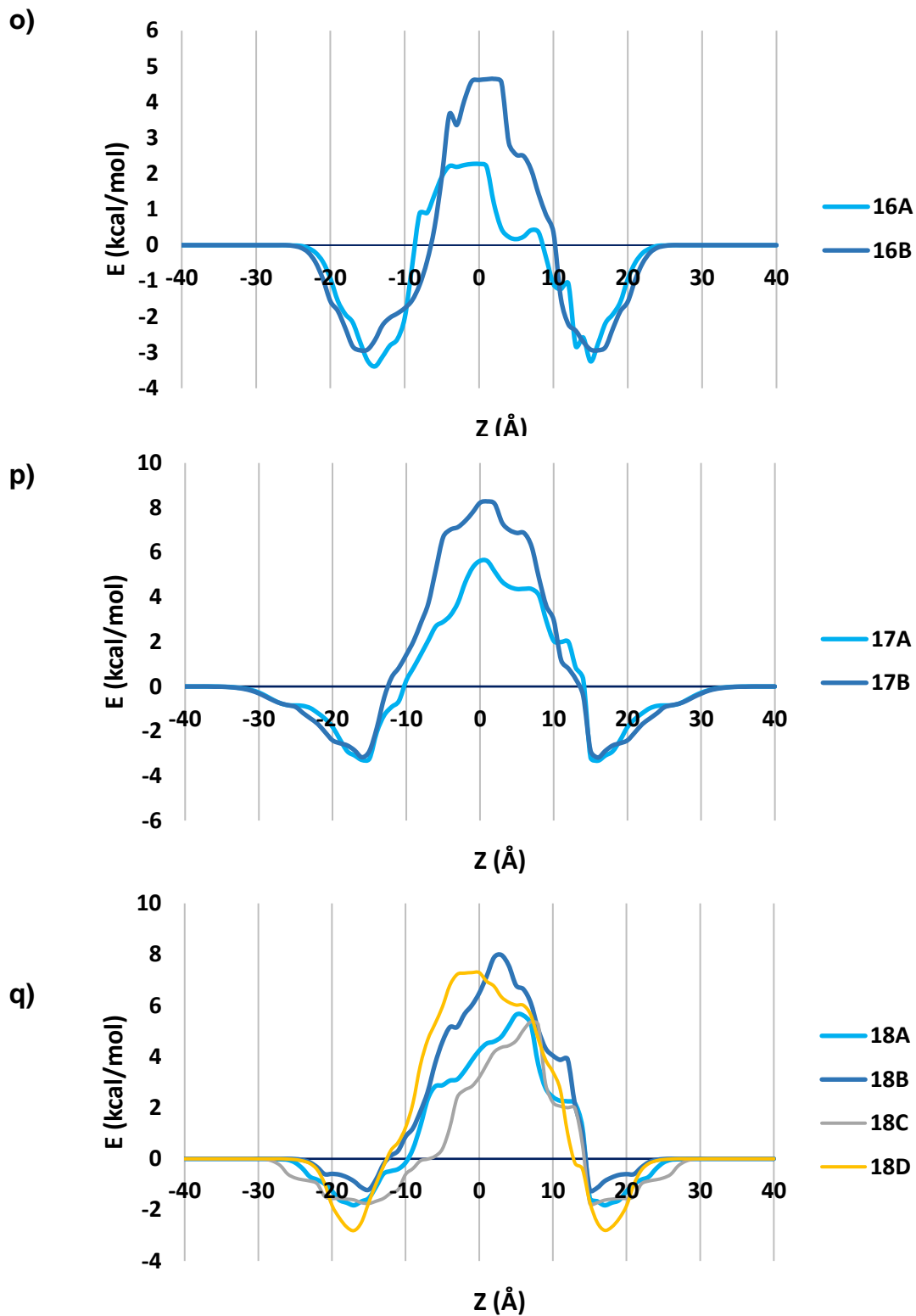


Gráfico 3. Perfil energético de los derivados de DHPIq (a-q) con respecto a la distancia del centro de la membrana simulada de DOPC.



La **Tabla 5** muestra las energías libres de unión más bajas de los derivados de DHPIq en su recorrido a través de la membrana simulada, las cuales son muy similares con respecto a **TAM16**. Los compuestos **1, 4, 5, 10, 16** y **17**, los cuales obtuvieron los mejores resultados en el acoplamiento molecular, presentan un mejor perfil energético en sus formas **A** y **B** en comparación con **TAM16 (Gráfico 4)**.

Tabla 5. Energía libre de unión de los derivados de DHPIq en kcal/mol en una membrana simulada de DOPC.

Molécula	A	B	C	D
1	-2.93	-2.64	-	-
2	-3.28	-2.93	-	-
3	-3.08	-2.77	-	-
4	-3.71	-3.38	-	-
5	-3.06	-2.74	-	-
6	-2.19	-2.17	-	-
7	-2.32	-2.1	-	-
8	-1.74	-1.38	-	-
9	-2.38	-1.94	-	-
10	-5.11	-4.06	-	-
11	-1.82	-1.28	-1.71	-2.5
12	-3.25	-3.12	-	-
13	-4.27	-3.77	-	-
14	-4.25	-3.86	-	-
15	-3.93	-3.53	-	-
16	-3.50	-3.03	-	-
17	-3.44	-3.21	-	-
18	-1.82	-1.31	-1.77	-2.81
TAM16	-3.84			

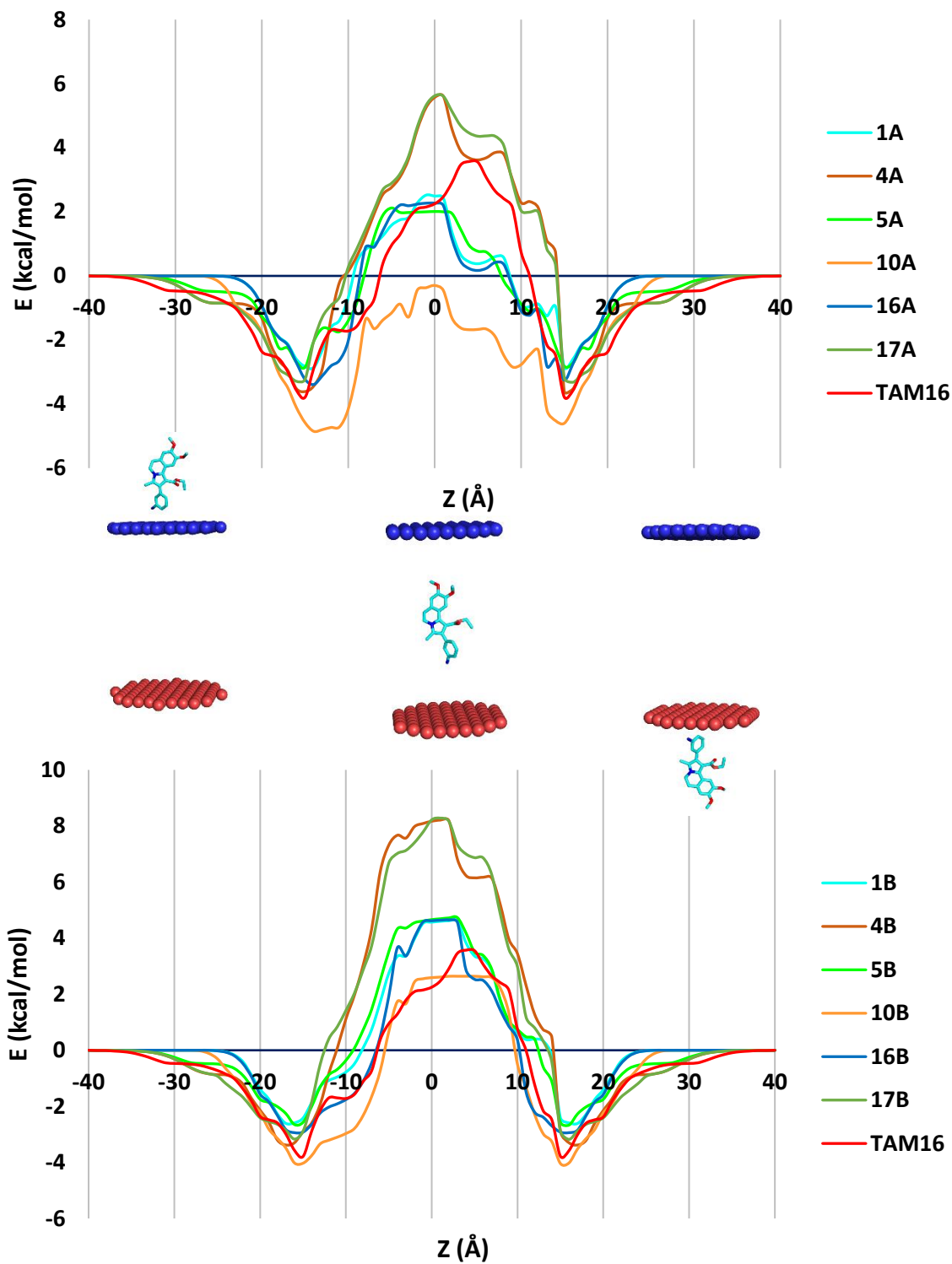


Gráfico 4. Perfil energético de los análogos de DHPIq seleccionados con respecto a la distancia de la membrana simulada de DOPC.



7.1.3 Análisis de consenso farmacológico

Existen diversas métricas y descriptores moleculares que se han desarrollado para perfilar a los compuestos y seleccionar aquellos con buenas propiedades farmacocinéticas. El más utilizado son las reglas empíricas de Lipinski que se basan en el estudio de las propiedades fisicoquímicas de fármacos que se absorben por vía oral. Una buena biodisponibilidad oral está relacionada con la capacidad de disolución en el tracto gastrointestinal, permeabilidad a través de la membrana y el metabolismo intestinal o hepático de primer paso. Establece que los fármacos tendrán buena absorción y biodisponibilidad si cumplen con los siguientes criterios:

- Masa molar ≤ 500 g/mol
- Log P o lipofilicidad ≤ 5
- Número de donadores de puentes de hidrógeno ≤ 5
- Número de aceptores de puentes de hidrógeno ≤ 10

Las reglas de Lipinski son utilizadas como una guía (predictor cualitativo) en lugar de ser utilizados como criterios absolutos para identificar compuestos con biodisponibilidad oral y absorción intestinal pasiva.⁸⁸

Por otra parte, Veber determinó que la lipofilicidad y la masa molar como descriptores no ofrecen información sobre las propiedades específicas de la estructura que influyen en la biodisponibilidad oral. Aquellos compuestos que tengan ≤ 10 enlaces rotables y un área de superficie polar topológica (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$ (o que la suma del número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno sea ≤ 12) tendrán una alta probabilidad entre el 20 y 40% de tener una biodisponibilidad oral en rata, por lo que Veber estableció que el efecto de la rigidez molecular es independiente de la masa molar.⁸⁹ Egan determinó la necesidad de que los compuestos tengan un TPSA $\leq 131.6 \text{ \AA}^2$ y un log P ≤ 5.88 para una predicción exitosa de la absorción intestinal pasiva con una probabilidad de entre 74-92%.⁹⁰



La **Tabla 6** muestra los parámetros fisicoquímicos calculados con SwissADME de las DHPIq con los mejores resultados obtenidos en el acoplamiento molecular y en el estudio de permeabilidad a través de la membrana. Todos los compuestos cumplen con los criterios de Lipinski, Veber y Egan, con un coeficiente de partición (Log P) mayor que el obtenido con molécula **TAM16**. Estos resultados permiten determinar una mayor probabilidad de absorción por vía oral y confirman una mejor permeabilidad a través de la membrana. A pesar de que el programa señala el anillo de catecol de los compuestos **4** y **17** como probables falsos positivos o PAINS (*Pan Assay Interference Structures*), el compuesto **TAM16** también cuenta con un posible falso positivo que se atribuye al anillo de benceno del benzofurano, identificado como *mannich_A*.

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos y predicción de la biodisponibilidad oral de los compuestos seleccionados.

Molécula	MM (g/mol)	TPSA (Å ²)	Log P	Lipinski	Veber	Egan	PAINS
1A	406.47	75.71	3.73	SÍ	SÍ	SÍ	0
1B	377.41	89.54	2.77	SÍ	SÍ	SÍ	0
4A	378.42	97.71	3.02	SÍ	SÍ	SÍ	1
4B	349.36	111.54	2.13	SÍ	SÍ	SÍ	1
5A	407.46	69.92	3.87	SÍ	SÍ	SÍ	0
5B	378.40	83.75	2.96	SÍ	SÍ	SÍ	0
10A	391.42	103.07	3.03	SÍ	SÍ	SÍ	0
10B	362.36	116.90	2.1	SÍ	SÍ	SÍ	0
16A	361.44	83.27	3.24	SÍ	SÍ	SÍ	0
16B	332.38	97.10	2.3	SÍ	SÍ	SÍ	0
17A	379.41	91.92	3.17	SÍ	SÍ	SÍ	1
17B	350.34	105.75	2.23	SÍ	SÍ	SÍ	1
TAM16	381.44	87.14	1.91	SÍ	SÍ	SÍ	1

MM= masa molar



La glucoproteína P (P-gp) es una bomba de eflujo que forma parte de los mecanismos de resistencia bacteriana de *Mtb*. La mayoría de las DHPIq evaluadas presentan un resultado similar al obtenido para la molécula **TAM16**, donde se determinó que son posibles sustratos y no inhibidores de P-gp. Todos los compuestos tienen baja probabilidad de ser inhibidores de las principales isoformas del citocromo P450 (CYP), es decir, tienen baja probabilidad de causar efectos adversos por interacciones fármaco-fármaco, además de no ser inhibidores de los canales hERG, lo cual está relacionado con problemas de cardiotoxicidad (**Tabla 7**).

Tabla 7. Predicción de las propiedades toxicológicas de los compuestos seleccionados.

Molécula	P-gp		Inhibidor de CYP					hERG inh
	Sustrato	Inhibidor	1A2	2C19	2C9	2D6	3A4	
1A	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO
1B	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	N/A
4A	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO
4B	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO
5A	NO	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	NO
5B	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
10A	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	NO
10B	SÍ	NO	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO
16A	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO	NO	SÍ	NO
16B	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO
17A	SÍ	NO	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	NO
17B	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO
TAM16	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO



7.1.4 Dinámica molecular

Se realizó el estudio de dinámica molecular de los complejos ligando-proteína con las moléculas **1**, **4**, **5** y **17**, considerando sus formas **A** y **B**. Con el fin de confirmar la estabilidad dinámica de los modelos generados con la enzima Pks13, primero se estudió el complejo con **TAM16**, el cual sirvió como un estudio de validación del protocolo propuesto.

La molécula **TAM16** permitió que el esqueleto de la enzima mantuviera un RMSD menor a 3 Å y que fuera constante a través del tiempo de simulación (**Gráficos 5** y **6**). Esto se confirma con la variación del RMSD del ligando (**Gráficos 7** y **8**) el cual fue de aproximadamente de 2 Å, ya que la molécula no se desplazó del sitio activo y conservó su conformación inicial.

Con base en los resultados que se presentan en el **Gráfico 5**, la molécula **17A** generó el cambio conformacional más notable en el esqueleto de la enzima, con un RMSD arriba de los 3 Å. Sin embargo, la molécula **17B** (sin el grupo éster) presentó un RMSD muy similar al resto de los ligandos que también se encuentran en su forma **B** (**Gráfico 6**). Cuando el grupo carboxilato está presente en la molécula, no hay una diferencia significativa en la variación del RMSD del esqueleto de la proteína con respecto al calculado con la molécula **TAM16**.

A pesar de que la molécula **17A** incrementó el RMSD del esqueleto de la proteína, fue la molécula con la mayor estabilidad conformacional a través del tiempo. Su RMSD fue muy similar cuando se calculó sin considerar el movimiento de los átomos de hidrógeno (**Gráfico 8**). En cambio, la molécula **1A** (*hit* experimental) presentó saltos conformacionales notables a los 35 y los 85 ns, pero la estabilidad también mejoró cuando se encuentra en su forma **B** (**Gráficos 9** y **10**).

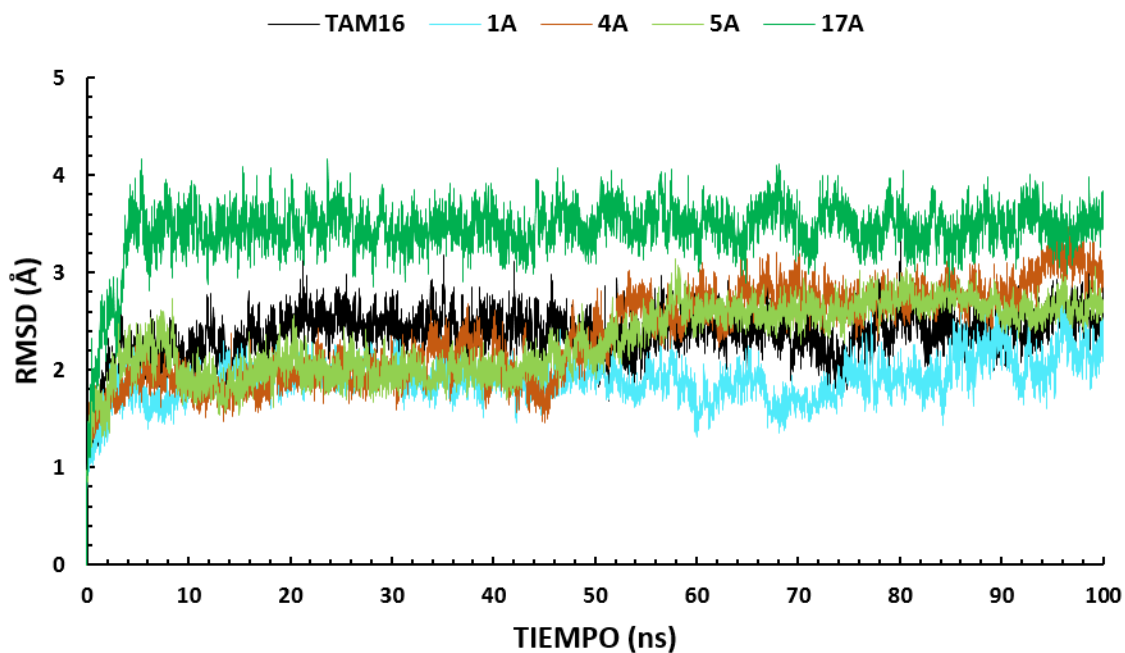


Gráfico 5. RMSD del esqueleto de la enzima Pks13 en complejo con los ligandos A y TAM16.

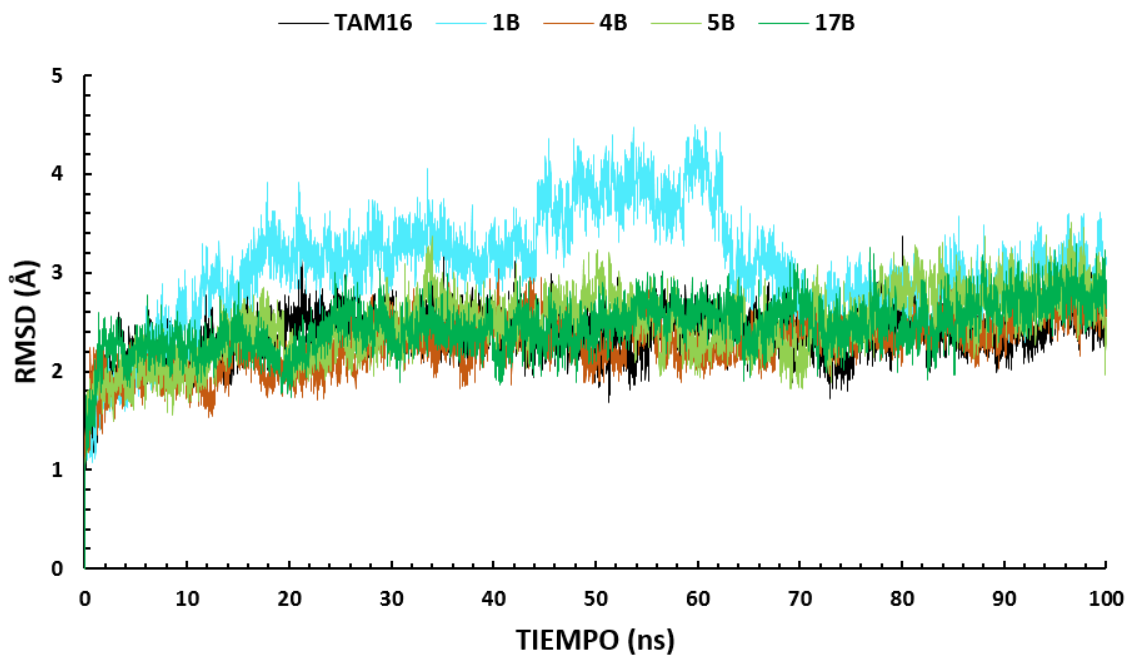


Gráfico 6. RMSD del esqueleto de la enzima Pks13 en complejo con los ligandos B y TAM16.

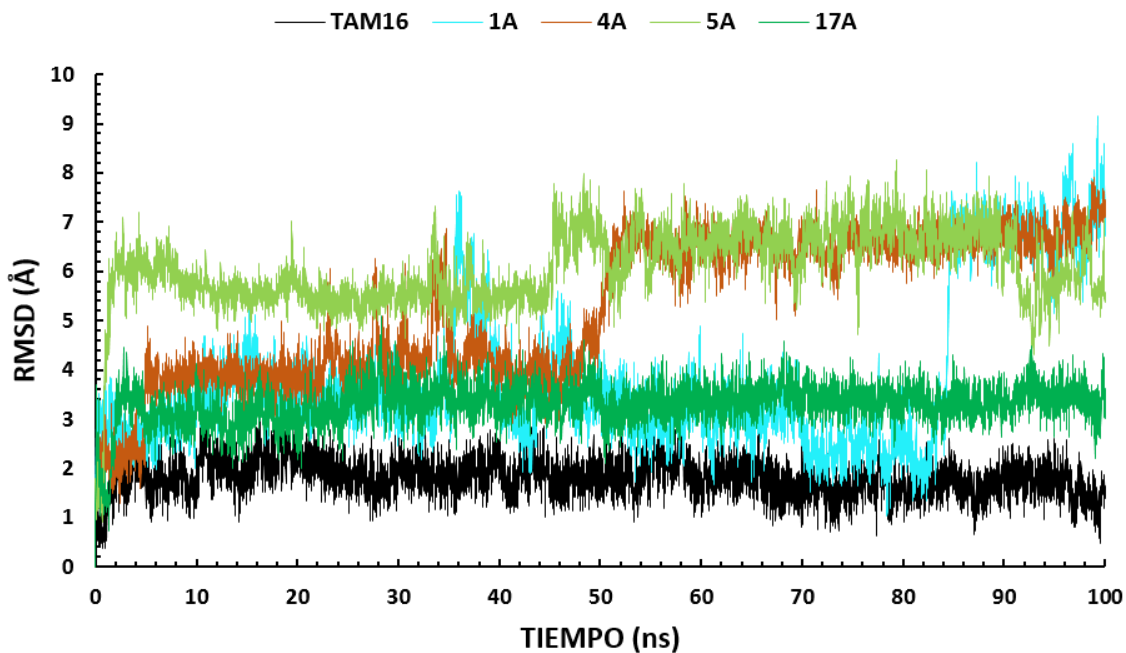


Gráfico 7. RMSD de los ligandos **A** y **TAM16** presentes en los complejos proteína-ligando.

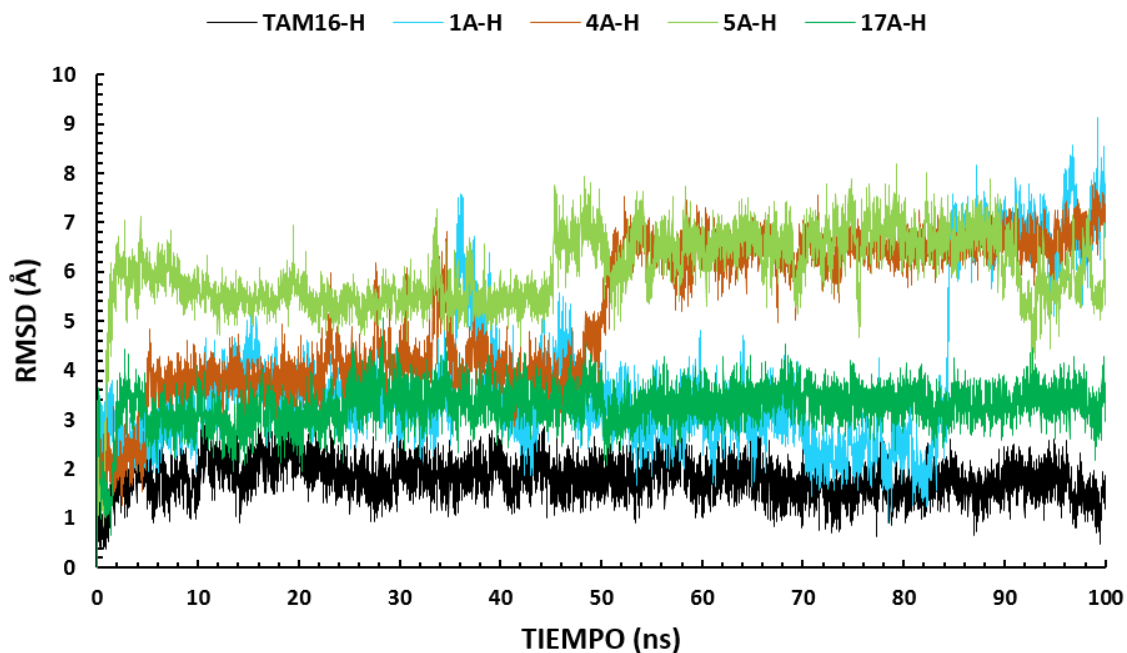


Gráfico 8. RMSD de los ligandos **A** y **TAM16** (sin considerar los átomos de hidrógeno) presentes en los complejos proteína-ligando.

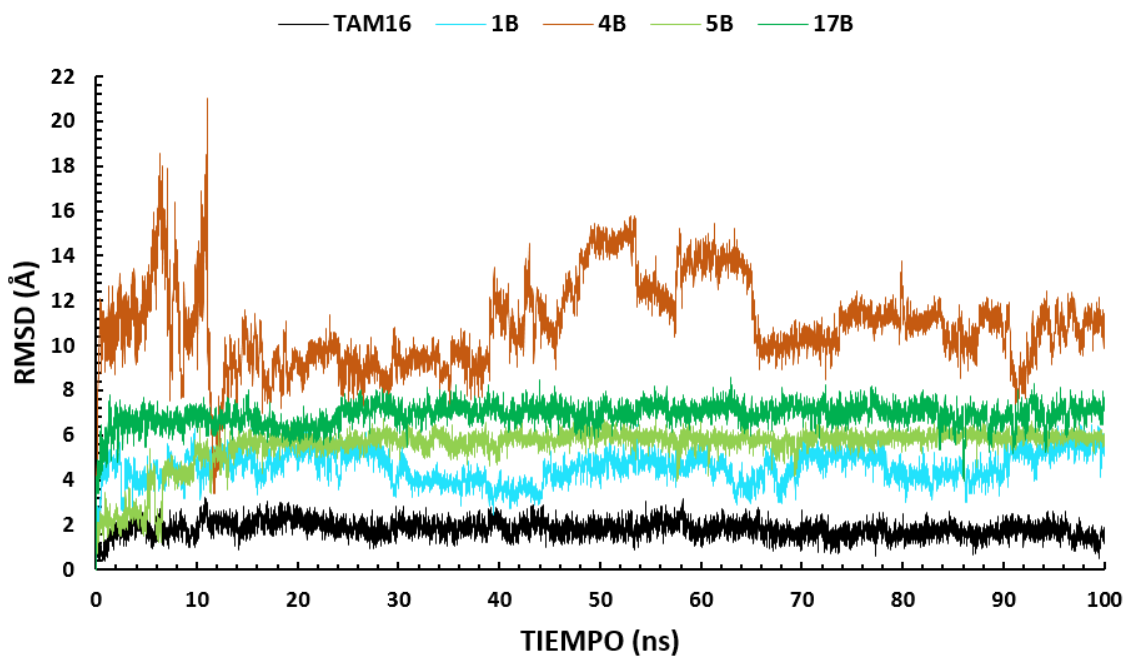


Gráfico 9. RMSD de los ligandos **B** y **TAM16** presentes en los complejos proteína-ligando.

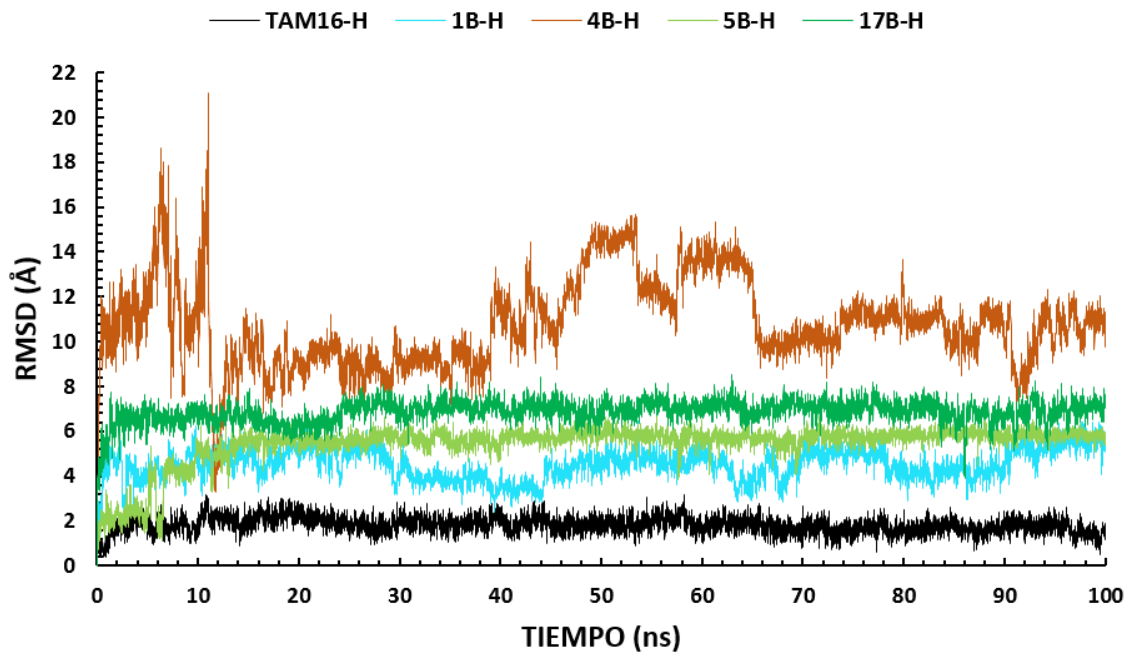
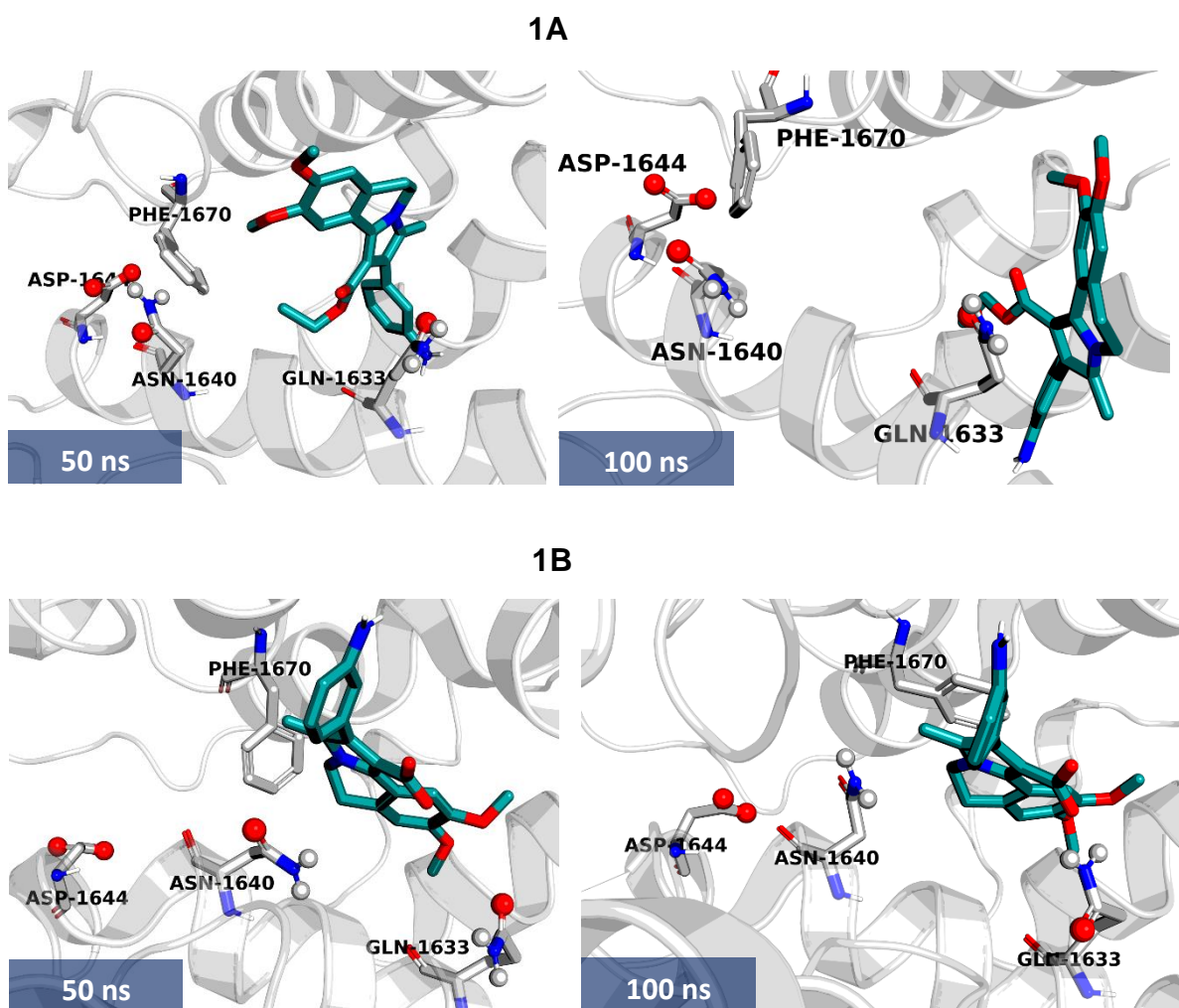


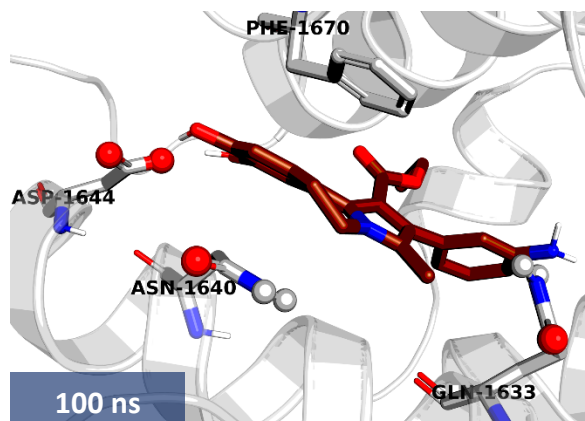
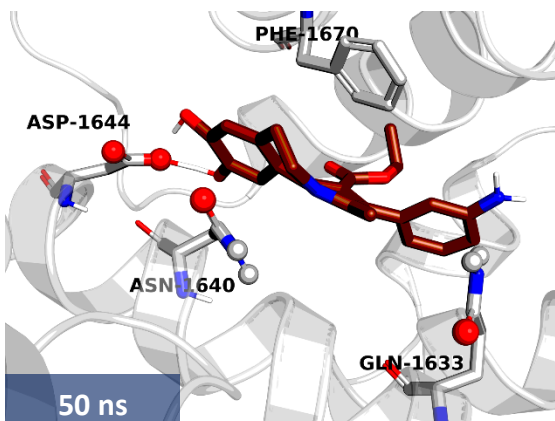
Gráfico 10. RMSD de los ligandos **B** y **TAM16** (sin considerar los átomos de hidrógeno) presentes en los complejos proteína-ligando.

El valor de RMSD de la molécula **4B** fue inestable a través del tiempo debido a su desplazamiento del sitio original, ya que a los 100 ns de simulación la molécula se encuentra en los límites del sitio activo. Por otra parte, **4A** permaneció en el sitio activo a pesar de presentar un cambio conformacional alrededor de los 50 ns.

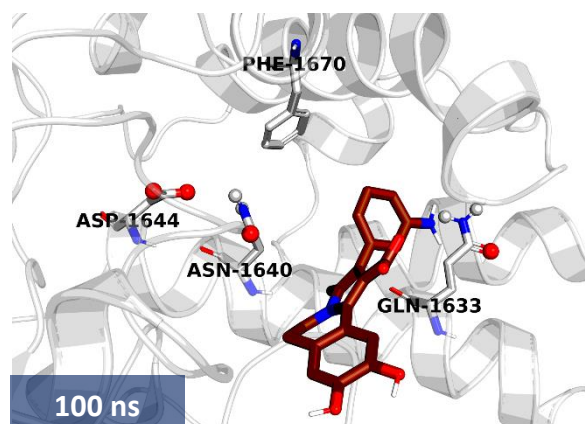
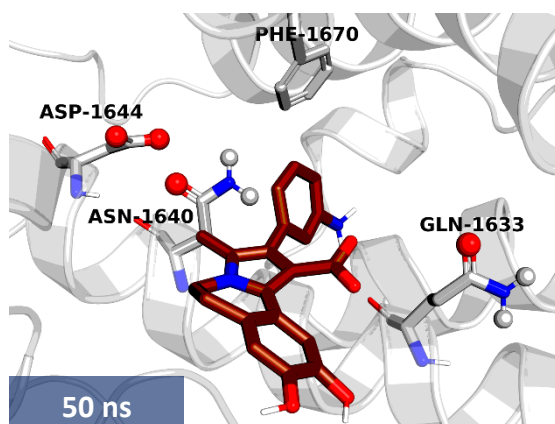
La molécula **17A** se mantuvo en el sitio activo, y a diferencia del resto de las moléculas evaluadas, esta conserva las interacciones con los mismos residuos hasta los 100 ns de simulación. Sin embargo, su forma **B** también se desplaza del sitio original debido a repulsiones electrostáticas con el ASP144 (**Figura 28**).



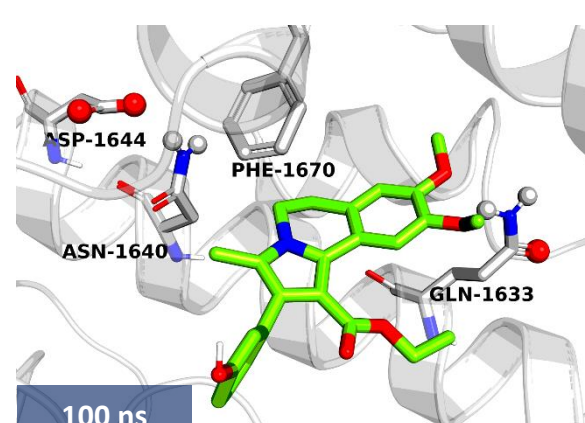
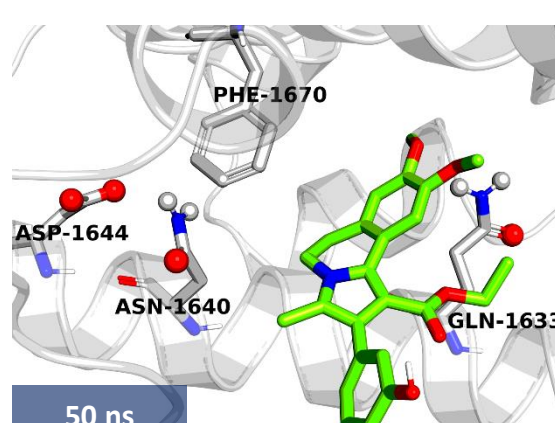
4A



4B



5A



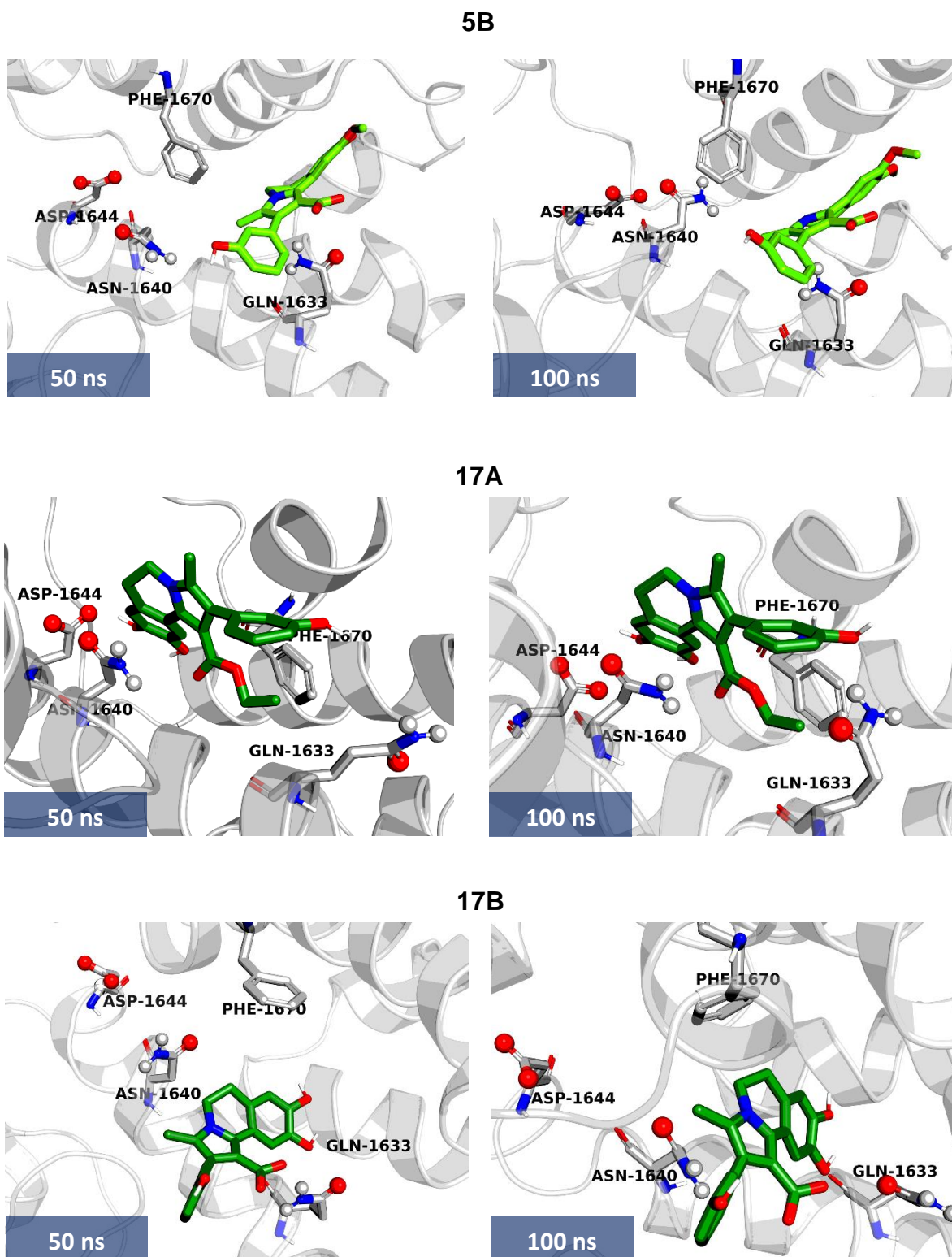
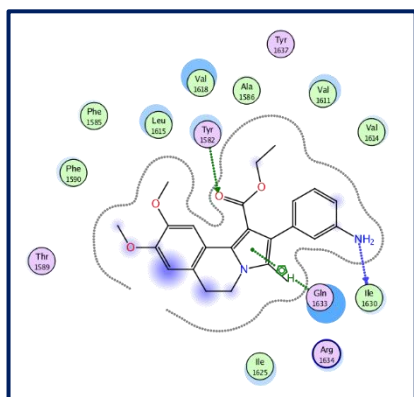


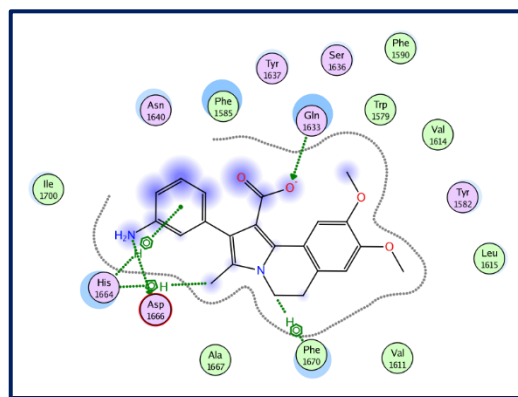
Figura 28. Acoplamiento de las moléculas evaluadas (1, 4, 5 y 17 en sus formas A y B) a 50 y 100 ns de simulación.



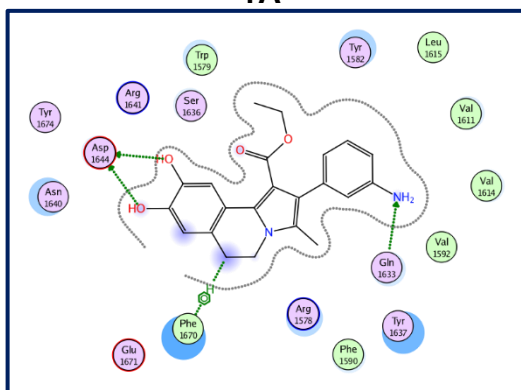
Los grupos hidroxilo de **4A** mantienen las interacciones como donadores de puentes de hidrógeno con el ASP1644, el grupo amino con la GLN1633 y el anillo de isoquinolina con la PHE1670, de la misma manera que se observó en el acoplamiento molecular. El resto de las moléculas presentaron diferencias importantes en cuanto a las interacciones establecidas con los residuos que se encuentran en el sitio activo (**Figura 29**).



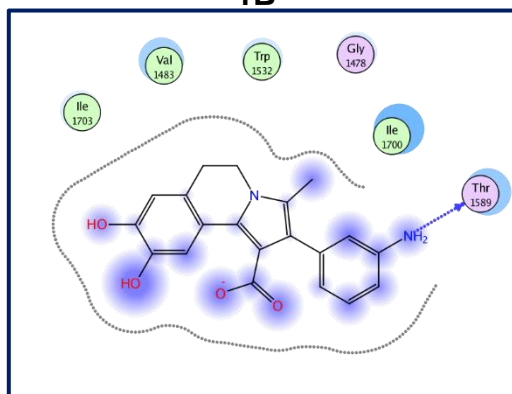
1A



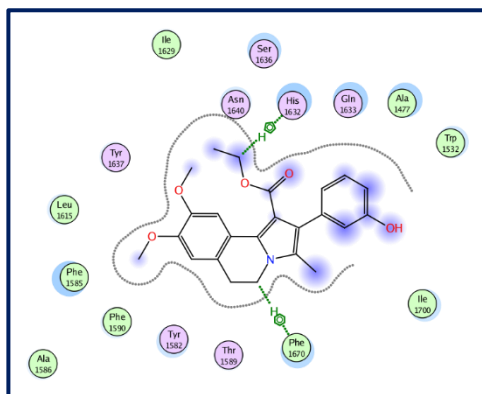
1B



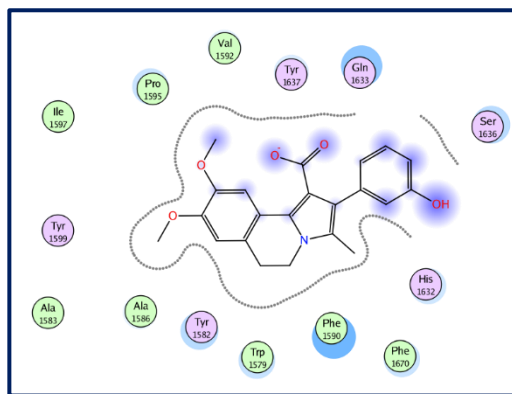
4A



4B



5A



5B

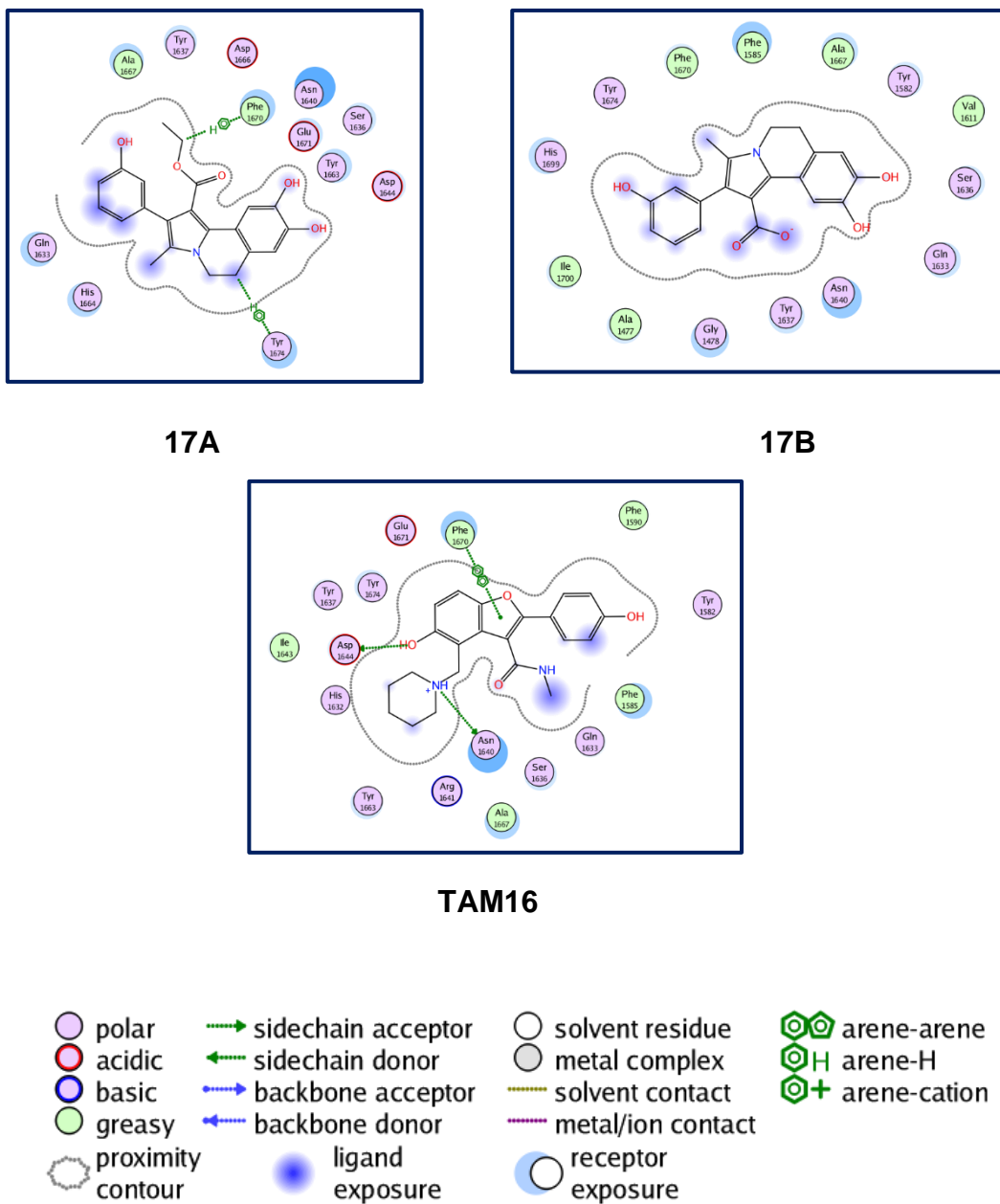


Figura 29. Modelos en 2D del complejo ligando-proteína a los 100 ns de simulación (generados con el programa MOE).

Todos los ligandos presentan interacciones con los residuos más importantes para el reconocimiento y el acoplamiento de estos a la enzima Pks13 (ASP1644, GLN1633, ASN1640 y PHE1670). Sin embargo, entre los residuos que también

interaccionan con los ligandos diseñados son: TYR1582, ASP1666, THR1589, HIS1632.

Se determinó el factor de ocupación de los residuos 1630-1640, es decir, el porcentaje del tiempo de simulación en el que un puente de hidrógeno se forma con el ligando. Las moléculas **4A** y **17A** son aquellas que presentaron el mayor factor de ocupación con los residuos que también interaccionan con **TAM16**, como es el caso de ASP1644 y GLN1633. Estas dos moléculas permanecen en el sitio de unión durante la simulación molecular, sus interacciones con los residuos no permiten que las moléculas de agua entren a la cavidad y el ligando se desplace hasta salir del sitio activo (**Figura 30**).

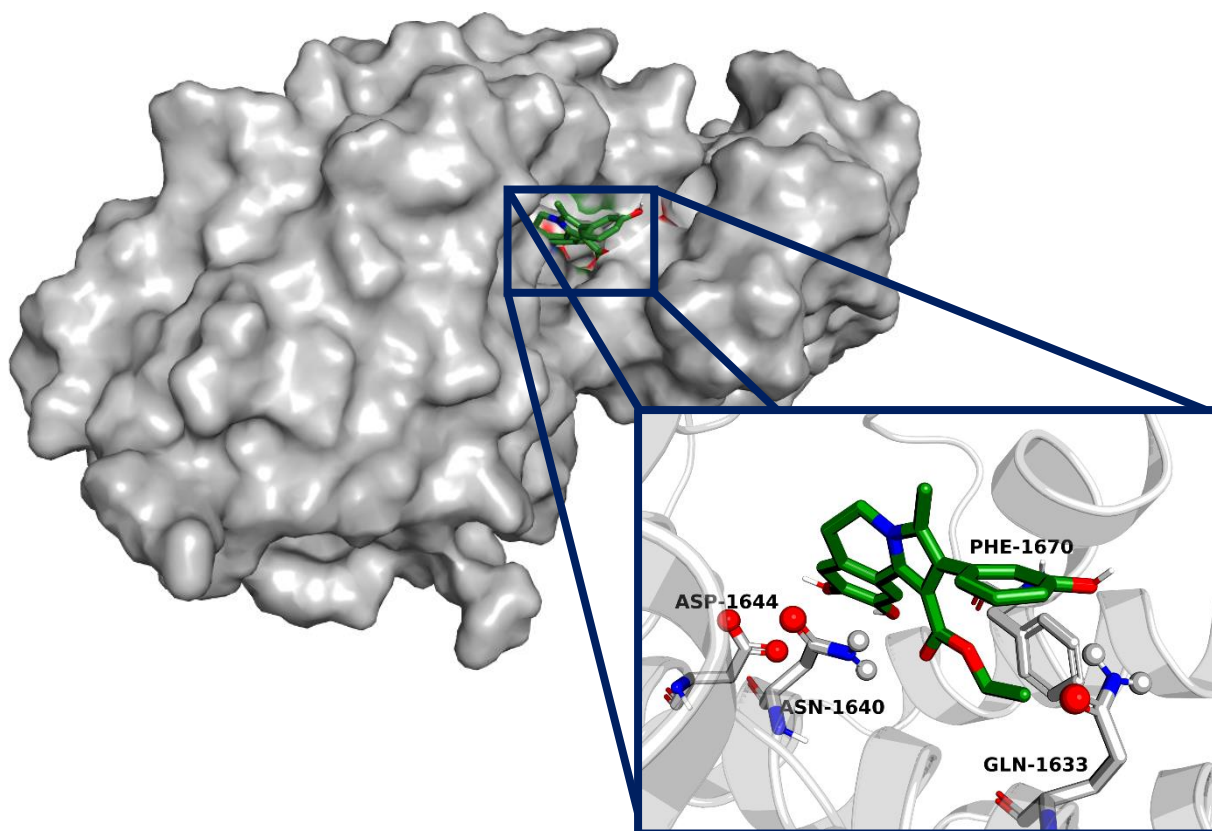


Figura 30. Molécula **17A** en el sitio activo de la enzima Pks13 durante la simulación de dinámica molecular.



El resto de las moléculas tienden a formar puentes de hidrógeno con el residuo GLN1633, el cual presentó un factor de ocupación alto en comparación con la molécula **TAM16** (Tabla 8).

Tabla 8. Factor de ocupación de los residuos 1630-1645 con los derivados de DHPIq y **TAM16**.

Residuo	TAM16	1A	1B	4A	4B	5A	5B	17A	17B
1630	0%	17%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1631	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1632	0%	0%	0%	0%	9%	3%	0%	0%	41%
1633	17%	21%	41%	44%	18%	63%	42%	12%	78%
1634	0%	8%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1635	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1636	0%	0%	0%	0%	14%	0%	0%	0%	1%
1637	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1638	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1639	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1640	94%	0%	1%	1%	2%	0%	0%	30%	0%
1641	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	11%	0%
1642	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1643	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1644	100%	0%	0%	98%	0%	0%	0%	83%	0%
1645	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

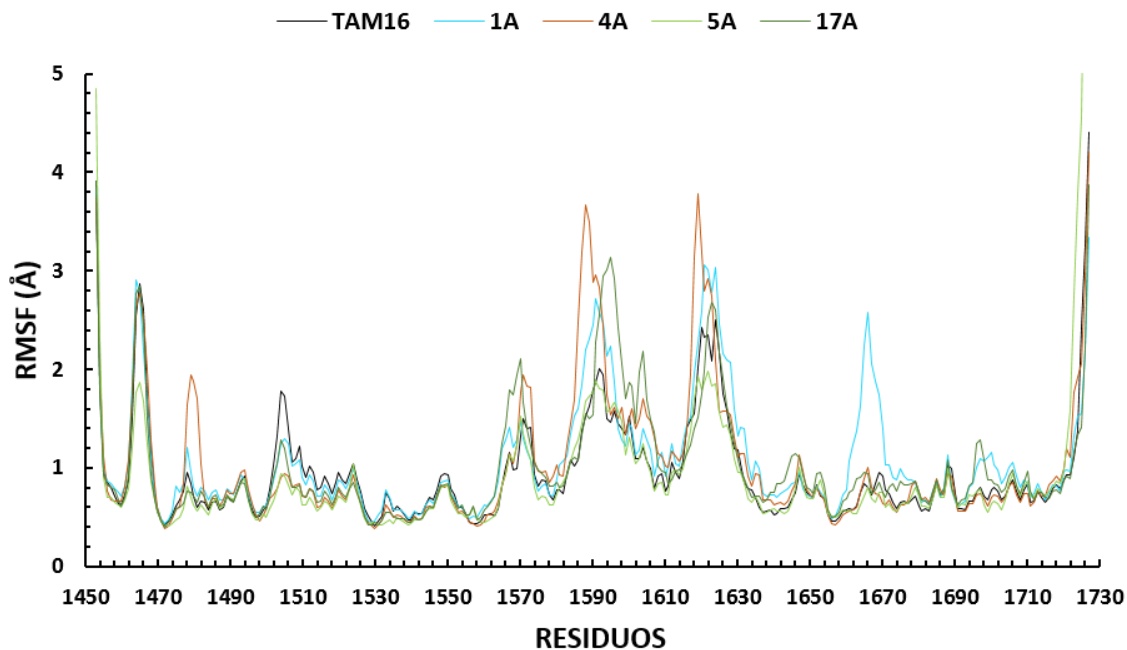


Gráfico 11. RMSF del esqueleto de la enzima Pks13 en complejo con los ligandos **A** y **TAM16**.

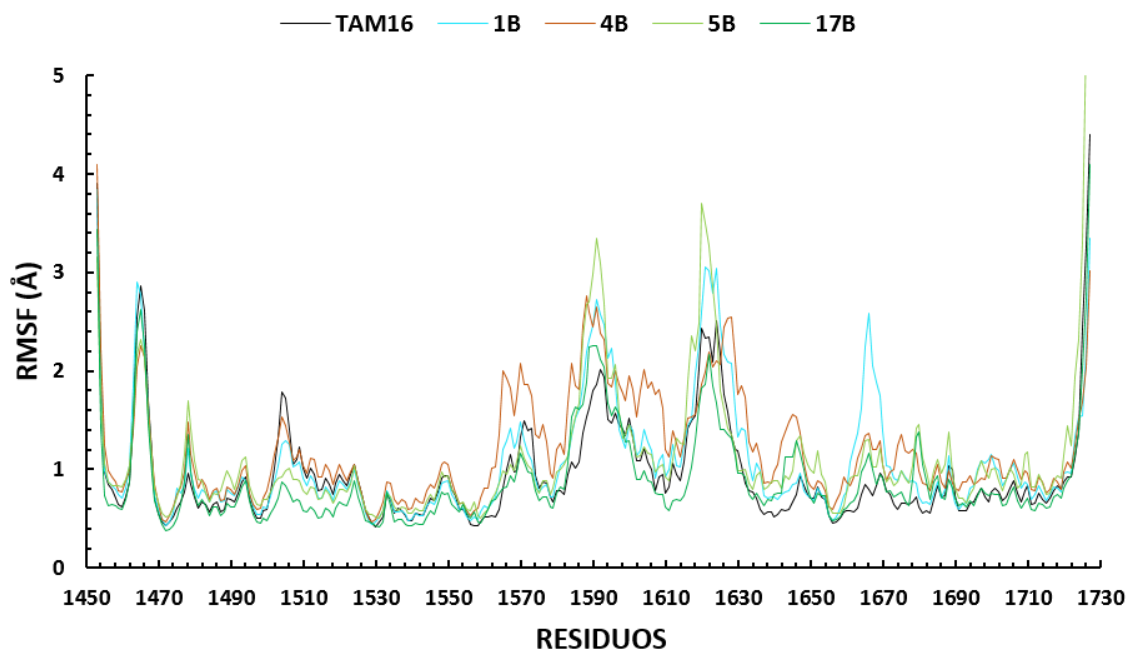


Gráfico 12. RMSF del esqueleto de la enzima Pks13 en complejo con los ligandos **B** y **TAM16**.

Los **Gráficos 11** y **12** presentan la desviación promedio de los residuos de Pks13, donde se muestran las porciones de la enzima que fluctúan con respecto a su posición original durante la simulación de dinámica molecular. Con la presencia del inhibidor **TAM16**, la libertad de movimiento fue menor con respecto al resto de las moléculas evaluadas. Sin embargo, cuando se compara el RMSF obtenido con las moléculas diseñadas y el del *hit* experimental **1A**, se observa que la libertad de movimiento es considerablemente menor con la molécula **17A**. La **Figura 31** muestra el factor B (también conocido como factor térmico) de la enzima Pks13, donde se muestran las regiones proteicas cuya movilidad aumentó o disminuyó debido a cambios estructurales durante la dinámica molecular. El sitio tioesterasa (señalado con un recuadro color rojo) presenta menos fluctuaciones cuando se forma el complejo ligando-proteína con **17A**, es decir, tiene un factor B más bajo que el obtenido con el *hit* experimental **1A**.

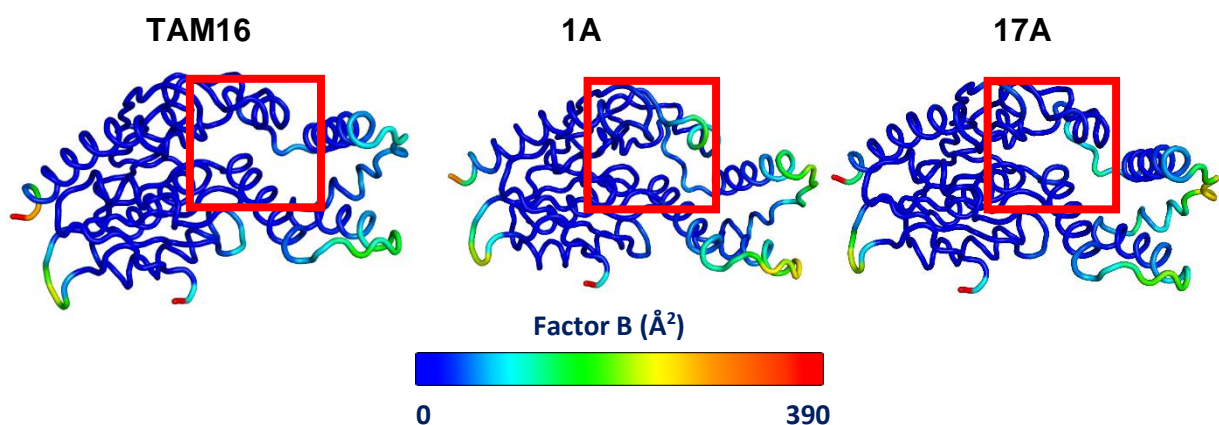


Figura 31. Factores B calculados a partir del RMSF del esqueleto de Pks13.

Se calculó el RMSF y se determinó el factor B de los ligandos para estudiar la movilidad de sus átomos durante la dinámica molecular. Los resultados obtenidos muestran que el metilo que pertenece al grupo éster de la posición 1 y los metilos de los metoxilos de las posiciones 8 y 9 no juegan un papel importante para la interacción con la enzima Pks13, ya que su movilidad es alta y puede ser causa de las fluctuaciones en el RMSD del complejo ligando-proteína (**Figura 32**).

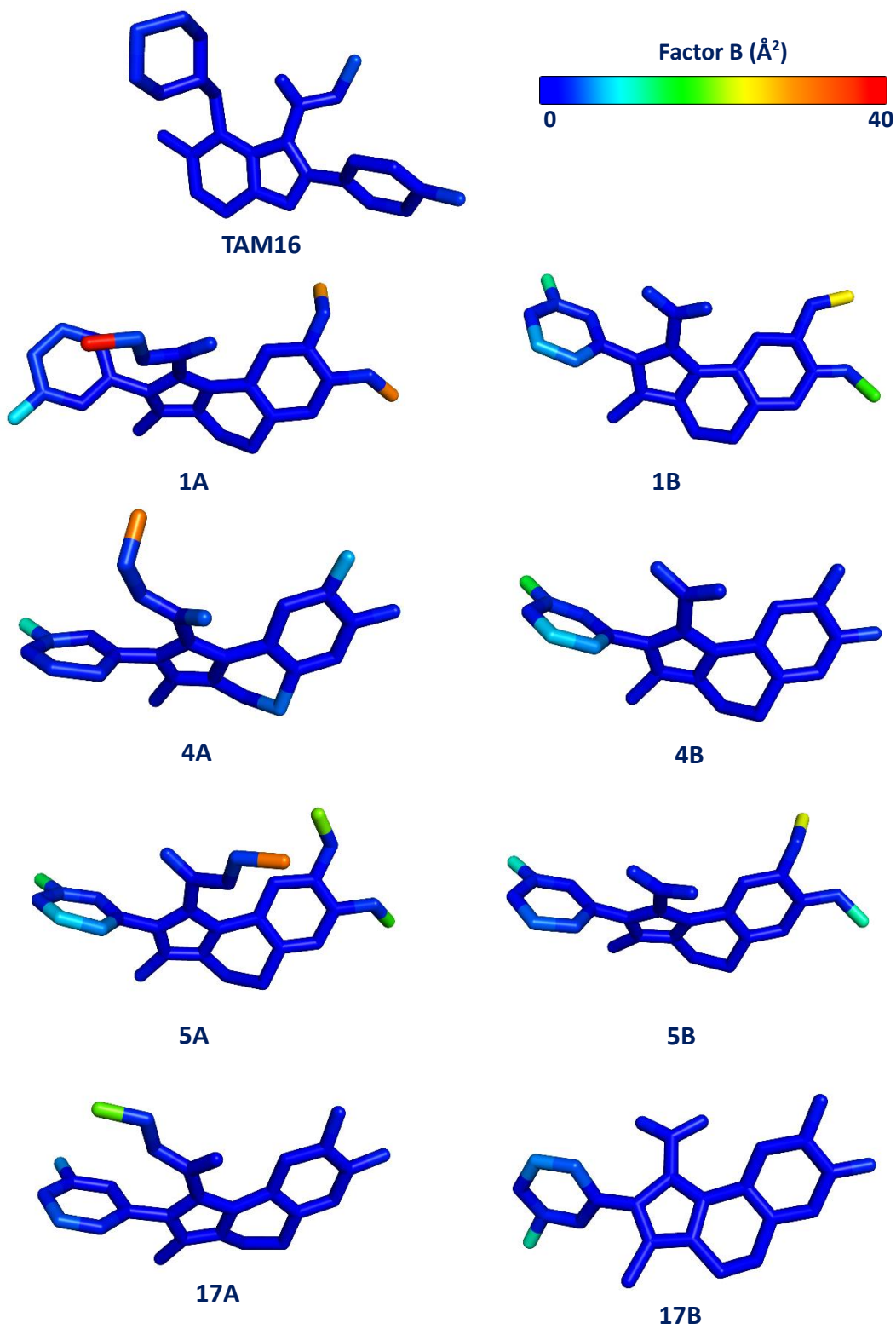


Figura 32. Factores B calculados a partir del RMSF de los ligandos.



7.1.4.1 Cálculo de la energía libre de unión

La **Tabla 9** muestra las contribuciones energéticas a la energía libre de unión de los ligandos evaluados calculada mediante el método de MM-PBSA. No se consideraron las moléculas **TAM16**, **1B**, **4B**, **5B** y **17B** debido a la sobreestimación de las cargas electrostáticas del ligando.

Molécula	ΔE_{vdW}	ΔE_{ele}	ΔG_{pol}	ΔG_{npol}	$\Delta G_{unión}$
1A	-47.21	-8.29	26.17	-5.15	-34.48
4A	-51.17	-26.32	45.92	-4.96	-36.53
5A	-45.64	-7.13	26.69	-4.74	-30.81
17A	-45.13	-14.69	38.73	-4.74	-25.83

La molécula **4A** presenta una energía de unión ($\Delta G_{unión}$) más baja en comparación con el *hit* experimental **1A**. Este resultado muestra que el reemplazo de los grupos metoxilo por hidroxilos en las posiciones 8 y 9 en la molécula que contiene el grupo amino en la posición *meta* del fenilo, mejora la afinidad a la enzima Pks13. Por otro lado, la energía de unión es mayor cuando el grupo amino es reemplazado por un hidroxilo y la energía electrostática (ΔE_{ele}) se ve favorecida cuando la molécula contiene tres grupos hidroxilo. Para todos los complejos se observa que la mayor contribución a la unión del ligando al sitio activo de la enzima Pks13 se debe a las interacciones de van der Waals (ΔE_{vdW}), cuya diferencia en energía entre las moléculas evaluadas no es mayor a -2.08 Kcal/mol.

Las interacciones no polares (ΔG_{npol}) son poco representativas debido a una baja área superficial accesible al solvente de las moléculas cuando se unen al sitio activo, ya que su modo de unión no permite que estén expuestas al solvente. Las contribuciones polares (ΔG_{pol}) no son favorables para la unión de los ligandos a la enzima.



Se estudió la contribución de la energía de mecánica molecular (ΔE_{MM}) por residuo, la cual considera la energía de no enlace como la suma de la ΔE_{vdW} y la ΔE_{ele} . Se excluyeron los residuos con carga como el ASP, GLU, LYS y ARG. El **Gráfico 13** muestra que los residuos ASN1640, PHE1670, TYR1637 son los más importantes para el acoplamiento de la molécula **TAM16**.

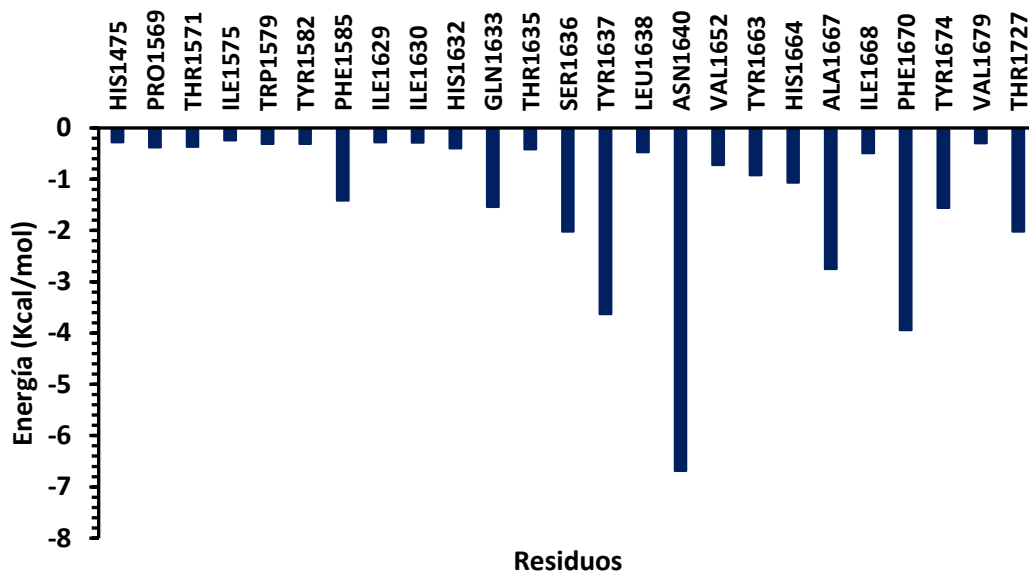


Gráfico 13. Contribución por residuo a la ΔE_{MM} en el complejo con **TAM16**.

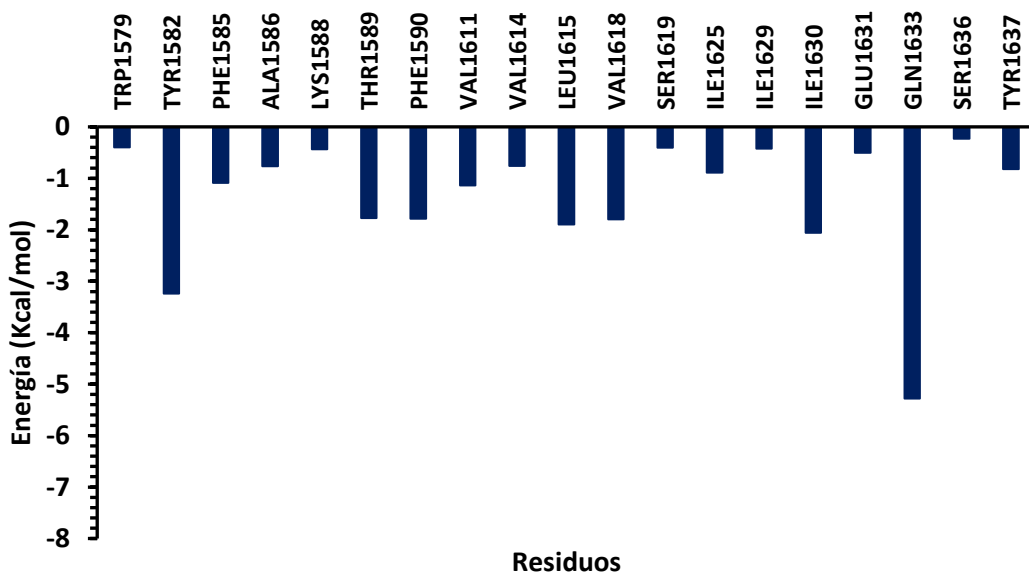


Gráfico 14. Contribución por residuo a la ΔE_{MM} en el complejo con **1A**.



En el caso de la molécula **1A**, el residuo que contribuye con la ΔE_{MM} más favorable es la GLN1633, el cual es uno de los residuos más importantes para el reconocimiento del ligando y su acoplamiento a la enzima Pks13 (**Gráfico 14**).

La **Tabla 10** muestra la contribución energética por residuo a la ΔE_{MM} para la unión de los ligandos evaluados, confirmando que el residuo GLN1633 es el más importante para la interacción de la enzima con los derivados de DHPIq, contribuyendo con energías por debajo de -1.4 Kcal/mol. El residuo ASN1640 presentó mejores interacciones con los ligandos diseñados **4**, **5** y **17** en comparación con el *hit* experimental **1**, siendo el más favorable la molécula **17A**. Se ha comprobado que la interacción de los inhibidores con este residuo favorece las interacciones del tipo π -stacking con la PHE1670 para una mejor estabilización de la hélice $\alpha 8$ de la enzima Pks13.⁵²

Tabla 10. Descomposición de la ΔE_{MM} por residuo (Kcal/mol).								
Residuo/ Molécula	1A	1B	4A	4B	5A	5B	17A	17B
TYR1582	-3.24	-2.92	-2.30	0.07	-1.73	-1.76	-0.06	-1.77
ILE1630	-2.06	0.29	-0.01	0.11	-0.08	0.33	-0.03	0.33
GLN1633	-5.28	-3.25	-3.16	-0.05	-4.65	-1.18	-1.46	-0.78
SER1636	-0.23	-1.00	-1.06	-0.09	-2.74	-2.13	-1.36	-1.40
TYR1637	-0.82	-1.01	-4.57	0.02	-1.73	-1.36	-2.16	-1.99
ASN1640	-0.08	-1.60	-2.52	-0.14	-0.75	-0.73	-4.57	-2.80
ALA1667	-0.02	-1.19	0.06	-0.19	-1.22	0.09	-1.69	-1.11
PHE1670	-0.01	-3.35	-3.79	-0.18	-1.93	-1.07	-2.79	-1.92
THR1727	0.01	1.77	-0.01	1.97	0.00	1.64	-0.03	0.17



7.2 Síntesis química

Con base en los resultados obtenidos en el estudio computacional, los compuestos **4A**, **5A** y **17A** fueron seleccionados para su síntesis y su posterior evaluación biológica.

Todos los reactivos que fueron utilizados en el desarrollo de la ruta sintética fueron adquiridos comercialmente en Sigma-Aldrich.

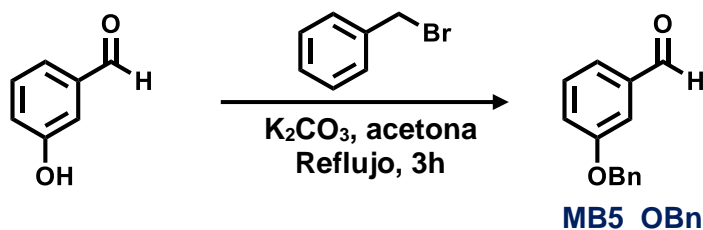
Los disolventes utilizados fueron previamente destilados. El diclorometano (DCM) fue secado con hidruro de calcio, el tolueno con sodio metálico y como indicador benzofenona, el dimetilsulfóxido (DMSO) con sulfato de magnesio a presión reducida.

El monitoreo de las reacciones se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) con placas Alugram Sil G/UV254. Se visualizaron en lámpara de UV de onda corta y onda larga, o con reveladores químicos (*p*-anisaldehído, vainillina, yodo, permanganato de potasio y sulfato cérico amoniacal). Los crudos de reacción y productos se secaron con Na₂SO₄. La purificación de los productos se realizó con cromatografía en columna, utilizando silica gel 60 (230– 400 mallas ASTM) de Macherey-Nagel GmbH & Co.

Los puntos de fusión se determinaron utilizando capilares abiertos en un equipo Mel-Temp II y un termómetro de mercurio Lauka358 (-10 a 400°C).

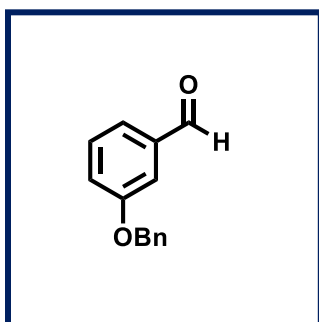
Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H de los productos finales se obtuvieron en los espectrómetros Avance 400 MHz Bruker y Fourier 300 MHz Bruker en cloroformo deuterado (CDCl₃) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆). Los espectros de RMN de ¹³C se obtuvieron a 76 MHz en los mismos equipos. Los espectros de masas se obtuvieron en el espectrómetro JEOL The AccuTOF: JMS-T100LC con la técnica de análisis directo de tiempo real (DART+). Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrómetro FT-IR Bruker ALPHA con la técnica de ATR.

- Protección del *m*-hidroxibenzaldehído



Esquema 2. Reacción de protección del *m*-hidroxibenzaldehído.

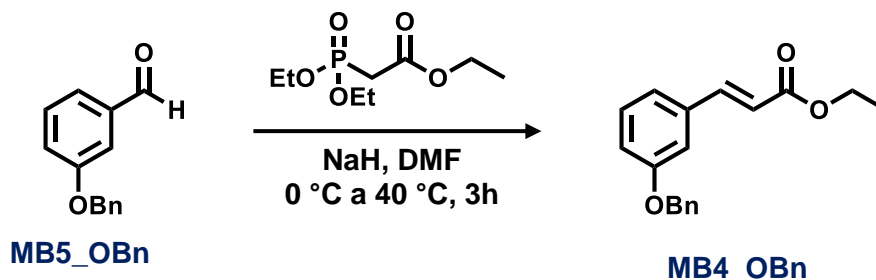
Se disolvió 8.3 mmol de la materia prima en 15 ml de acetona, se agregó 1.5 equivalentes de carbonato de potasio y se mantuvo en agitación durante 15 minutos. Se agregó 1.0 equivalentes de bromuro de bencilo, la mezcla de reacción se llevó a reflujo constante durante 3 horas. Una vez terminada la reacción, el precipitado obtenido se filtró realizando lavados con agua fría. No fue necesario purificar el producto obtenido.



3-(benziloxi)benzaldehído (MB5_OBn).

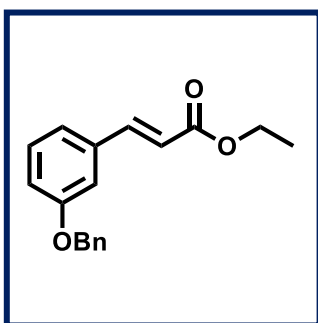
Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 85%, con un punto de fusión 56-58 °C, el cual coincide con el descrito en la literatura.⁹¹ CCF (Hex/AcOEt, 8:2 v/v): R_f 0.57.

- Obtención de los ésteres α,β -insaturados



Esquema 3. Reacción de Horner-Wadsworth-Emmons para la obtención de los ésteres α,β -insaturados.

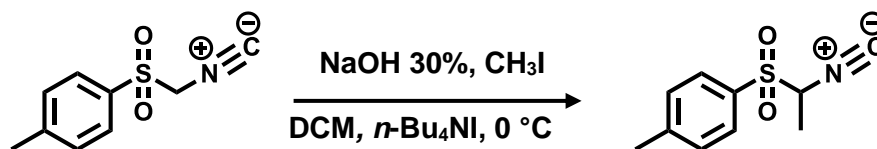
Se pesó 1.5 equivalentes de NaH y se agregó 40 ml de DMF anhidro. Se llevó a un baño frío a 0 °C y se agregó 0.8 equivalentes de fosfonoacetato de trietilo, se mantuvo en agitación durante 40 minutos en atmósfera inerte con nitrógeno. En un segundo matraz se disolvió 1.0 equivalentes de la materia prima **MB5_OBn** en 15 ml de DMF anhidro, con ayuda de una cánula se traspasó al matraz que contiene el NaH y se bajó la temperatura hasta -40 °C. Se dejó reaccionar durante 3.5 h, posteriormente se agregó 30 ml de solución saturada de NH_4Cl . Se realizaron extracciones con AcOEt y lavados con agua. El producto se purificó en cromatografía en columna con un sistema Hex/AcOEt 8:2.



(E)-3-(3-(benziloxi)fenil)acrilato de etilo (MB4_OBn).

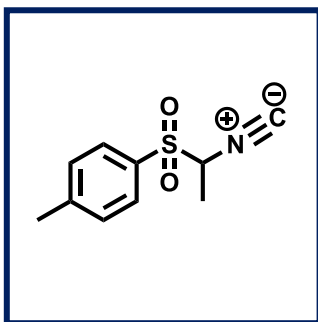
Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 52.8%, con un punto de fusión de 39-40 °C, el cual coincide con el descrito en la literatura.⁹² CCF (Hex/AcOEt, 8:2 v/v): R_f 0.6.

- **Metilación de TosMIC**



Esquema 4. Reacción de metilación de **TosMIC**.

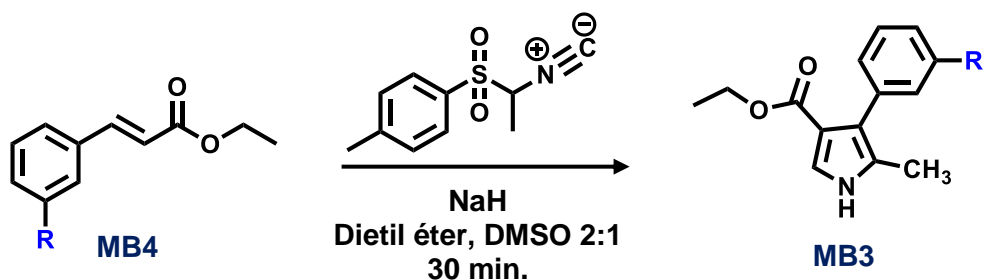
Se disolvió 10.2 mmol de isocianuro de *p*-toluensulfonilmetilo (TosMIC) en 20 ml de DCM junto con 0.2 equivalentes de *n*-Bu₃SnH. Se añadió 10 ml de solución de NaOH al 30% y se dejó en agitación durante 40 minutos. Posteriormente, se agregó 1.5 equivalentes de CH₃I y se permitió reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Se repitió el proceso dos veces más. Finalmente, se agregó 10 ml de agua destilada y se realizaron extracciones con DCM. El producto se purificó con una columna de cromatografía comenzando con un sistema de elución Hex/AcOEt 9:1 hasta llegar a 7:3. El producto obtenido se secó en vacío durante dos horas y se conservó en refrigeración a 0 °C.



1-(1-isocianoetililsulfonil)-4-metilbenceno (Me-TosMIC).

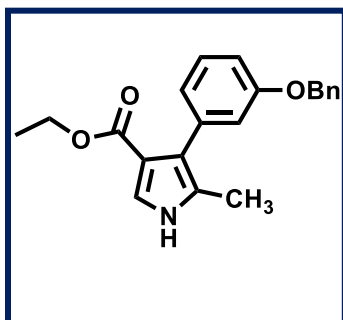
Se obtuvo un aceite café con un rendimiento del 79.4%, cuyas características físicas coinciden con el descrito en la literatura.⁶⁹ CCF (Hex/AcOEt, 8:2 v/v): R_f 0.35.

- Síntesis general de los pirroles



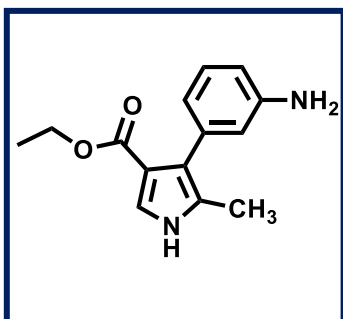
Esquema 5. Reacción de van Leusen para la síntesis de pirroles.

Se colocaron 2.2 equivalentes de NaH en 6 ml de dietil éter anhidro en un baño de hielo con sal. En un matraz diferente se pesó 1.0 equivalentes del éster α,β -insaturado (**MB4**) junto con 1.3 equivalentes de Me-TosMIC, se disolvió con 10 ml de una mezcla de dietil éter/DMSO 2:1. La mezcla se traspasó al matraz que contenía el NaH con ayuda de una cánula de dos entradas. Se retiró el baño de hielo y se permitió reaccionar en atmósfera inerte durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 10 ml de agua y se realizaron extracciones con AcOEt. El producto fue purificado en columna de cromatografía con una fase móvil Hex/AcOEt 7:3.



14-(3-(benziloxy)fenil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de etilo (MB3_OBn**).**

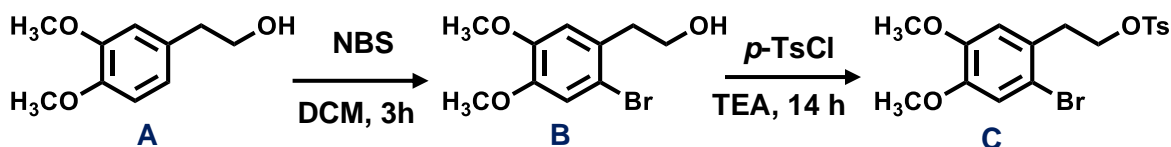
Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 60.7%, con un punto de fusión de 94-96 °C, el cual coincide con el descrito en la literatura.⁹³ CCF (Hex/AcOEt, 7:3 v/v): R_f 0.32.



4-(3-aminofenil)-5-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de etilo (MB3_NH2).

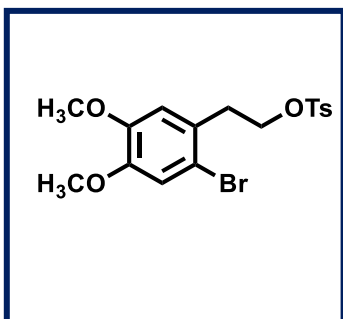
Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 95%, con un punto de fusión de 47-48 °C, el cual coincide con el descrito en la literatura.⁹³ CCF (Hex/AcOEt, 1:1 v/v): R_f 0.25.

- **Síntesis del agente alquilante**



Esquema 6. Síntesis del agente alquilante **C**.

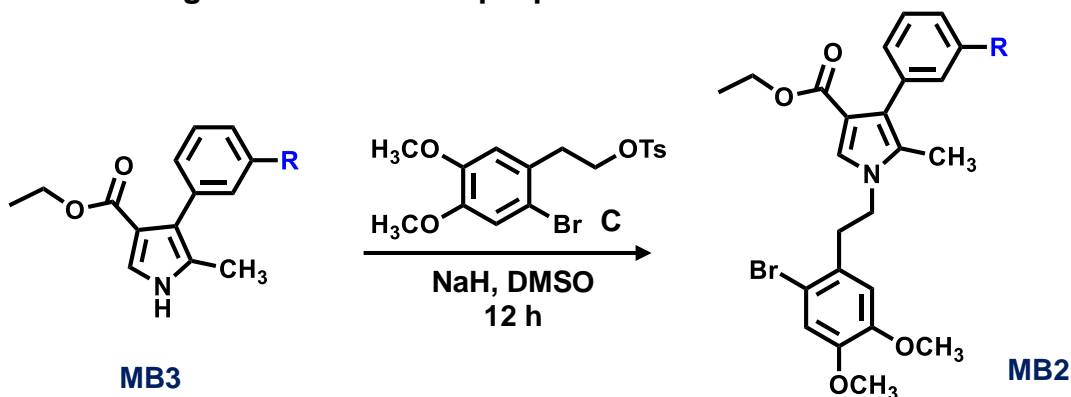
Se disolvió 16.5 mmol de la materia prima **A** en 50 ml de DCM anhidro, se agregaron 1.4 equivalentes de *N*-bromosuccinimida (NBS). Se permitió reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente, en agitación y atmósfera inerte de nitrógeno. La reacción se monitoreó con CCF con un sistema de elución Hex/AcOEt 6:4, el producto **B** tiene un R_f de 0.42 similar a la materia prima, pero no revela con *p*-anisaldehído. Posteriormente, se agregó 1.3 equivalentes de cloruro de *p*-toluensulfonilo (*p*-TsCl) disuelto previamente en 50 ml de DCM. Se agregaron 9 ml de trietilamina (TEA). Se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se eliminó el DCM en el rotavaporador, posteriormente se agregó agua y se realizaron extracciones con AcOEt. El producto revela de color amarillo utilizando como revelador el yodo. Finalmente, se purificó el producto en cromatografía en columna con un sistema de elución de Hex/AcOEt/TEA 76:19:5.



4-metilbencenosulfonato de 2-bromo-4,5-dimetoxifeniletilo (C).

Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 56.8%, con un punto de fusión de 66-68 °C, el cual coincide con el descrito en la literatura.⁶⁹ CCF (Hex/AcOEt, 6:4 v/v): R_f 0.42.

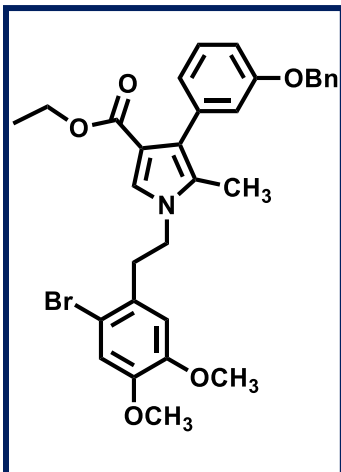
• **Síntesis general de los *N*-alquil pirroles**



Esquema 7. Reacción de alquilación de los pirroles.

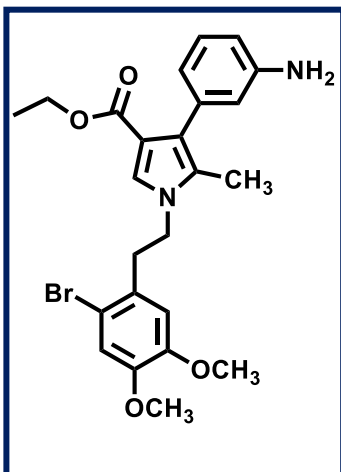
Se disolvió 1.5 mmol del pirrol (**MB3**) en 8 ml de DMSO anhidro y se agregó 3.0 equivalentes de NaH. Se mantuvo en agitación durante 2 h a temperatura ambiente y en atmósfera inerte de nitrógeno. Posteriormente, se agregó 1.5 equivalentes del agente alquilante **C** y después de 1 h se agregó 1.0 equivalentes más del alquilante y se dejó en agitación toda la noche. El producto tiene el mismo R_f que el alquilante (Hex/AcOEt, 6:4 v/v): R_f 0.42, pero este último no revela con *p*-anisaldehído.

Finalmente, se agregó agua destilada y se realizaron extracciones con AcOEt.



4-[3-(benziloxi)fenil]-1-(2-bromo-4,5-dimetoxifenil)etil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de etilo (MB2_OBn).

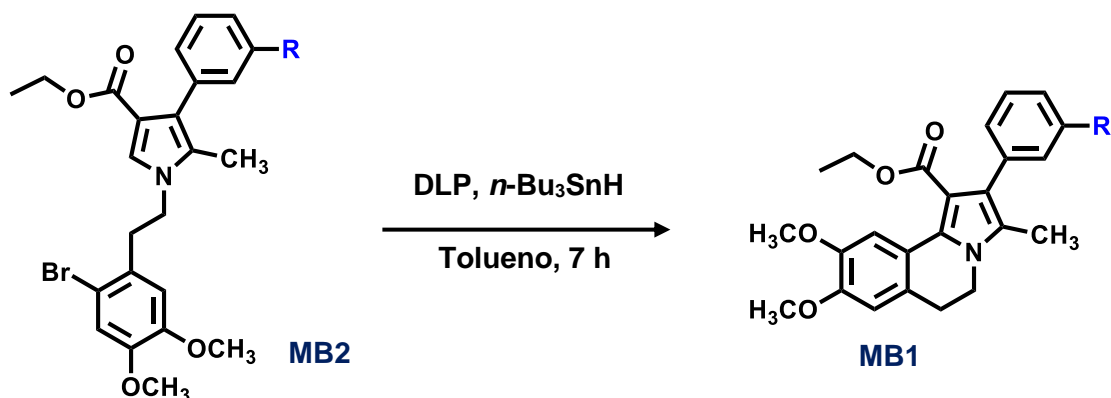
Se obtuvo un aceite amarillo viscoso con un rendimiento del 91.38%, cuyas características físicas coinciden con el descrito en la literatura.⁹³ CCF (Hex/AcOEt, 8:42v/v): R_f 0.2.



4-(3-aminofenil)-1-(2-bromo-4,5-dimetoxifenil)etil-5-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de etilo (MB2_NH2).

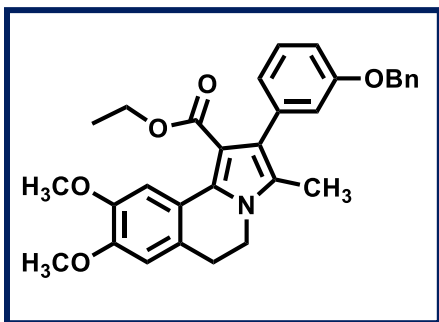
Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 75.19%, con un punto de fusión de 47-64 °C, el cual coincide con el descrito en la literatura.⁹³ CCF (Hex/AcOEt/TEA, 50:45:5 v/v): R_f 0.45.

- Procedimiento general para la ciclación intramolecular radicalaria



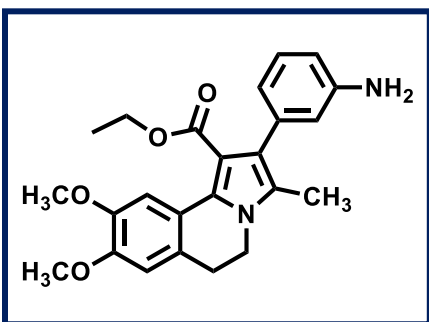
Esquema 8. Reacción de ciclación intramolecular radicalaria para la obtención de los compuestos tricíclicos.

Se pesó 1.29 mmol del *N*-alquilpirrol (**MB2**) y se disolvió en 20 ml de tolueno anhidro, se procedió a desoxigenar la mezcla burbujeando con nitrógeno durante media hora. Se calentó hasta reflujo constante y se agregó 0.5 equivalentes de peróxido de dilaurilo (DLP) cada media hora durante 7 horas. Durante ese tiempo, también se añade gota a gota 3.5 equivalentes de hidruro de tributilestaño *n*-Bu₃SnH en 5 ml de tolueno con una bomba de adición. La reacción se monitorea por CCF con un sistema Hex/AcOEt 6:4 y el producto revela con *p*-anisaldehído de color amarillo. Una vez concluida la reacción, se elimina el tolueno en el rotavaporador y se realizan extracciones con acetonitrilo y hexano para eliminar los residuos de DLP y de los subproductos menos polares. Se obtuvo un aceite café que se purificó por cromatografía en columna con un sistema Hex/AcOEt/TEA 50:45:5.



2-(3-(benziloxy)fenil)-8,9-dimetoxi-3-metil-5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolina-1-carboxilato de etilo (MB1_OBn).

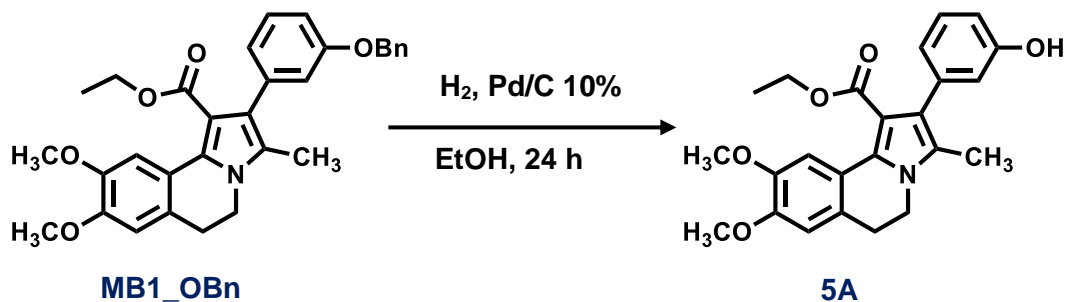
Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 22.6%, con un punto de fusión de 66-68 °C, el cual coincide con el descrito en la literatura.⁹³ CCF (Hex/AcOEt, 6:4 v/v): R_f 0.42.



2-(3-aminofenil)-8,9-dimetoxi-3-metil-5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolina-1-carboxilato de etilo (1A).

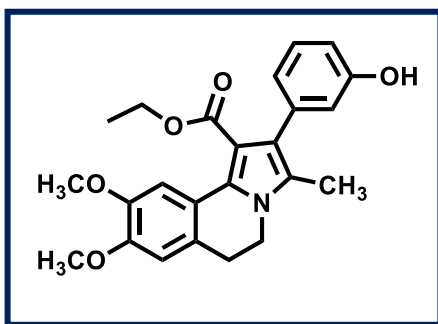
Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 52%, con un punto de fusión de 166-168 °C, el cual coincide con el descrito en la literatura.⁹³ CCF (Hex/AcOEt, 6:4 v/v): R_f 0.32.

- Obtención del compuesto 5A



Esquema 9. Reacción de desprotección del compuesto bencilado.

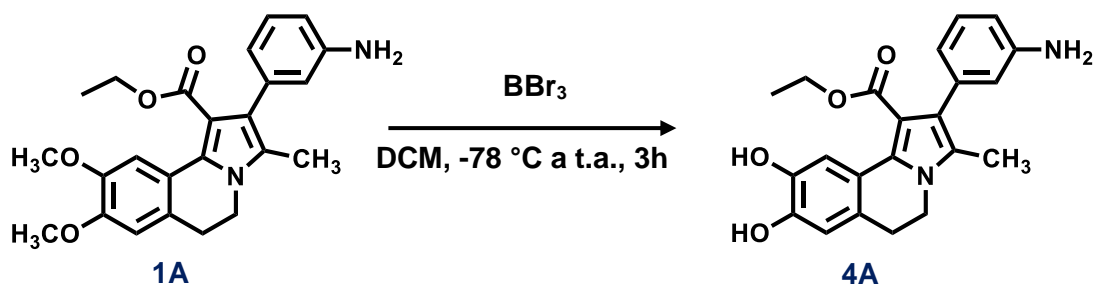
Se disolvieron 0.3 mmol de la materia prima **MB1_OBn** en 5 ml de etanol absoluto (EtOH) y se colocó 0.2 equivalentes de Pd/C al 10%. La mezcla se colocó en un reactor de hidrogenólisis, se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y a una presión constante de 200 *psi* durante 24 h. Una vez concluido el tiempo de reacción, se filtró la mezcla sobre celita y el filtrado se concentró en el rotavaporador.



8,9-dimetoxi-2-(3-hidroxifenil)-3-metil-5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolina-1-carboxilato de etilo (5A).

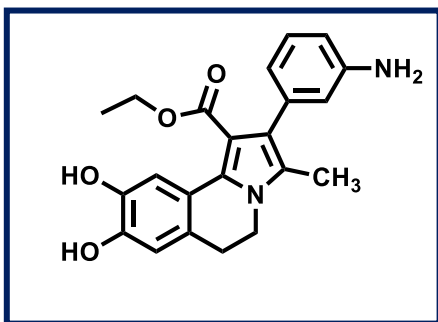
Se obtuvo un aceite amarillo con un rendimiento del 85%, cuyas características coinciden con las descritas en la literatura.⁹³ CCF (Hex/AcOEt, 6:4 v/v): R_f 0.42.

- **Reacción de desmetilación para la obtención 4A**



Esquema 10. Reacción de desmetilación para la obtención del compuesto final **4A**.

Se disolvieron 0.1 mmol de la materia prima **1A** en 6 ml de DCM anhidro, se agitó en un baño frío a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera inerte de nitrógeno. Con ayuda de una cánula y una jeringa, se colocó 5.0 equivalentes de BBr_3 . Se agitó durante 15 minutos y se retiró el baño frío, se permitió reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se monitoreó con CCF con un sistema DCM/MeOH 95:5 y el producto revela con un color azul con yodo. Al finalizar la reacción, se agregó MeOH y se concentró en el rotavaporador, se repitió el proceso cinco veces más hasta que dejó de observarse desprendimiento de gases. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna con un sistema de elución de DCM/MeOH 95:5.

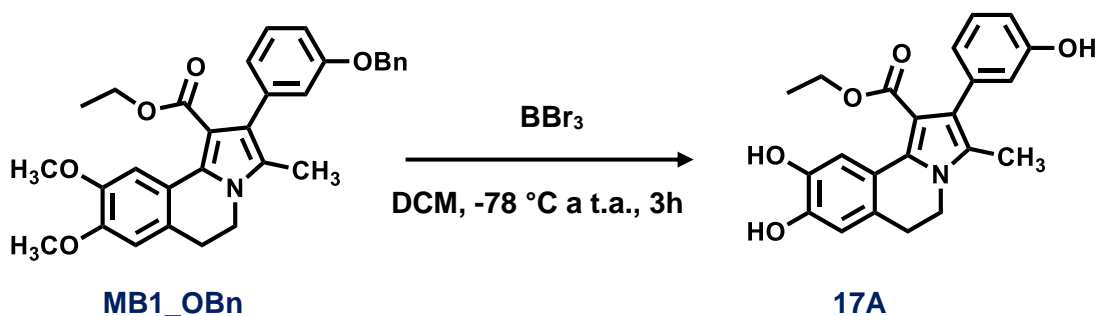


2-(3-aminofenil)-8,9-dihidroxi-3-metil-5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolina-1-carboxilato de etilo (4A).

Sólido color naranja con rendimiento del 17.2%, p.f. $180\text{-}182\text{ }^\circ\text{C}$. CCF (DCM/MeOH, 95:5 v/v): R_f 0.4.

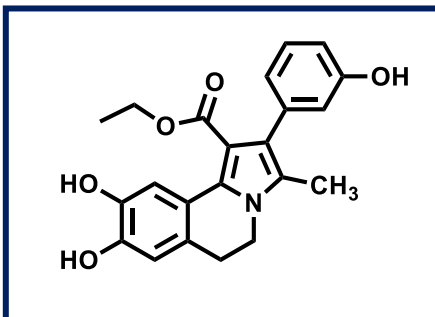
RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ0.98 (t, 3H, *J*=7.2 Hz), 2.30 (s, 3H), 2.87 (t, 2H, *J*=6.7 Hz), 3.84 (t, 2H, *J*=6.7 Hz), 4.01 (q, 2H, *J*=7.2 Hz), 6.44-6.33 (m, 3H), 6.53 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.89 (s, 1H).

- **Reacción de desmetilación para la obtención 17A**



Esquema 11. Reacción de desmetilación para la obtención de **17A**.

Se disolvieron 1.4 mmol de la materia prima **MB1_OBn** en 3 ml de DCM anhidro, se agitó en un baño frío a -78 °C en atmósfera inerte de nitrógeno. Con ayuda de una cánula y una jeringa, se colocó 5.0 equivalentes de BBr₃. Se agitó durante 15 minutos y se retiró el baño frío, se permitió reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas, la solución cambió de color amarillo a color rojo. La reacción se monitoreó con CCF utilizando un sistema DCM/Acetona 7:3, el producto revela con un color rojo con el revelador químico vainillina. Al finalizar la reacción, se agregó MeOH y se concentró en el rotavaporador, se repitió el proceso cinco veces más hasta que deja de observarse desprendimiento de gases. El crudo de reacción se observa como sólido color rojo intenso, el cual fue purificado por cromatografía en columna con un sistema de elución de DCM/Acetona 9:1.



8,9-dihidroxi-2-(3-hidroxifenil)-3-metil-5,6-dihidropirrolo[2,1-a]isoquinolina-1-carboxilato de etilo (5A).

Sólido color rojo con rendimiento del 28%, con un punto de fusión de 188-190 °C. CCF (DCM/Acetona, 7:3 v/v): R_f 0.35.

RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1.18 (t, 3H, $J=7.10$ Hz), 2.32 (s, 3H), 2.90 (t, 2H, $J=6.8$ Hz), 3.86 (t, 2H, $J=6.89$ Hz), 4.01 (q, 2H, $J=7.10$ Hz), 6.45 (dd, 1H, $J=8.1$, 2.2 Hz), 6.67 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.93 (s, 1H). **RMN-¹³C** (76 MHz, DMSO-d₆) δ 10.41, 18.85, 26.90, 36.59, 107.14, 111.12, 113.39, 114.54, 117.60, 118.22, 123.07, 123.66, 124.82, 125.44, 131.06, 142.01, 143.79, 146.31, 150.52, 162.03.



8. CONCLUSIONES

- Los resultados del estudio de acoplamiento molecular y el modelo de superposición rígido entre la molécula **TAM16** y el *hit* experimental **1A** permitieron evidenciar la similitud en el modo de unión a la enzima Pks13. Los compuestos diseñados a partir del *hit* experimental mostraron interacciones con los residuos involucrados en el reconocimiento del ligando: ASP1640, ASN1644, GLN1633 y PHE1670.
- Los derivados de DHPIq con un grupo donador de puentes de hidrógeno en la posición *meta* del fenilo mostraron mayor afinidad al sitio activo de la enzima, debido a una interacción más efectiva con el ASP1640 o la GLN1633.
- El pK_a de los ligandos evaluados jugó un papel importante en el modo de unión a la enzima. Aquellos que tienen carga positiva y un grupo carboxilato con carga negativa tienden a presentar conformaciones con menor área superficial y generan interacciones menos efectivas.
- Los compuestos diseñados en su forma de carboxilato (**B**) presentaron un clúster más poblado que aquellos que contienen el grupo éster (**A**), por lo que muestran mayor estabilidad conformacional. Esto se confirmó en el análisis de la simulación de dinámica molecular, donde el metilo del grupo éster muestra los valores más altos de RMSF en todos los compuestos evaluados.
- Los compuestos **1**, **4**, **5** y **17**, tanto en su forma **A** y **B**, mostraron ser líderes computacionales seguros al presentar buenos resultados en sus propiedades farmacológico en el análisis de consenso y en el estudio de permeabilidad a través de la membrana.
- A pesar de que los compuestos en su forma **B** presentaron mejor estabilidad conformacional, en el estudio de dinámica molecular tienden a desplazarse del sitio activo debido a repulsiones electrostáticas con el ASP1640 con carga negativa.



- El residuo GLN1633 presentó un factor de ocupación más alto con los ligandos diseñados en comparación con el *hit* experimental.
- La evaluación de la contribución energética a la energía libre de unión mostró que las interacciones de van der Waals son las responsables de la unión de las DHPIq al sitio activo de la enzima Pks13.
- Se realizó la síntesis de los compuestos **1A**, **4A**, **5A** y **17A** con rendimientos de moderados a buenos.



9. PERSPECTIVAS

- Realizar la evaluación biológica de los derivados de DHPIq diseñados y sintetizados contra *Mtb* H37Rv.
- Emplear los resultados del trabajo computacional para el diseño y optimización de nuevos derivados de DHPIq.
- Realizar el análisis quimioinformático y de modelado molecular de nuevos derivados de DHPIq en el que se reemplace el grupo éster por un grupo funcional que disminuya la libertad conformacional y sea menos propenso a la hidrólisis por esterasas.



10. REFERENCIAS

- (1) Muthusaravanan, S.; Perumal, S.; Yogeeswari, P.; Sriram, D. Facile Three-Component Domino Reactions in the Regioselective Synthesis and Antimycobacterial Evaluation of Novel Indolizines and Pyrrolo[2,1-a]Isoquinolines. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (49), 6439–6443. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.09.128>.
- (2) Venugopala, K. N.; Uppar, V.; Chandrashekarappa, S.; Abdallah, H. H.; Pillay, M.; Deb, P. K.; Morsy, M. A.; Aldhubiab, B. E.; Attimarad, M.; Nair, A. B.; Sreeharsha, N.; Tratrat, C.; Jaber, A. Y.; Venugopala, R.; Mailavaram, R. P.; Al-Jaidi, B. A.; Kandeel, M.; Haroun, M.; Padmashali, B. Cytotoxicity and Antimycobacterial Properties of Pyrrolo[1,2-a]Quinoline Derivatives: Molecular Target Identification and Molecular Docking Studies. *Antibiotics* **2020**, *9* (5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050233>.
- (3) Gavalda, S.; Bardou, F.; Laval, F.; Bon, C.; Malaga, W.; Chalut, C.; Guilhot, C.; Mourey, L.; Daffé, M.; Quémard, A. The Polyketide Synthase Pks13 Catalyzes a Novel Mechanism of Lipid Transfer in Mycobacteria. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (12), 1660–1669. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.10.011>.
- (4) Bergeret, F.; Gavalda, S.; Chalut, C.; Malaga, W.; Quémard, A.; Pedelacq, J.; Daffé, M.; Guilhot, C.; Mourey, L.; Bon, C. Biochemical and Structural Study of the Atypical Acyltransferase Domain from the Mycobacterial Polyketide. **2012**, *287* (40), 33675–33690. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325639>.
- (5) Peirse, M.; Houston, A. Extrapulmonary Tuberculosis. *Medicine (United Kingdom)*. Elsevier Ltd December 1, **2017**, pp 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.09.008>.
- (6) Russell, D. G. Mycobacterium Tuberculosis: Here Today, and Here Tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2* (August), 1–9.



- (7) Brennan, P. J. Structure, Function, and Biogenesis of the Cell Wall of Mycobacterium Tuberculosis. *Tuberculosis* **2003**, *83* (1–3), 91–97. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00089-6).
- (8) Tiemersma, E. W.; van der Werf, M. J.; Borgdorff, M. W.; Williams, B. G.; Nagelkerke, N. J. D. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. *PLoS ONE*. *PLoS One* **2011**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017601>.
- (9) Organization, W. H. *Global Tuberculosis Report 2020*; Geneva, Switzerland, **2020**.
- (10) Secretaría de Salud (México). Boletín Con Información Del SINAVE Por Semana Epidemiológica Samana 52 2015. **2015**, *32* (52), 63.
- (11) Dirección General de Epidemiología. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. *Boletín epidemiológico* **2017**, *34* (52), 63.
- (12) Dirección General de Epidemiología. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. *Boletín epidemiológico* **2018**, *35* (52), 61.
- (13) Dirección General de Epidemiología. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. *Boletín epidemiológico* **2020**, *37* (53), 67.
- (14) Organization, W. H. *Consolidated Guidelines on Tuberculosis Treatment*, **2019**.
- (15) Zenner, D.; Beer, N.; Harris, R. J.; Lipman, M. C.; Stagg, H. R.; Van Der Werf, M. J. Treatment of Latent Tuberculosis Infection: An Updated Network Meta-Analysis. *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians August 15, **2017**, pp 248–255. <https://doi.org/10.7326/M17-0609>.
- (16) Arbex, M. A.; Varella, M. de C. L.; de Siqueira, H. R.; de Mello, F. A. F.



- Antituberculosis Drugs: Drug Interactions, Adverse Effects, and Use in Special Situations. Part 2: Second-Line Drugs. *J. Bras. Pneumol.* **2010**, 36 (5), 641–656. <https://doi.org/10.1590/s1806-37132010000500017>.
- (17) Nath, H.; Ryoo, S. First- and Second-Line Drugs and Drug Resistance. In *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*; InTech, Ed.; Rijeka, Croatia, **2013**; pp 163–180. <https://doi.org/10.5772/54960>.
- (18) Dr Mayara Lisboa Soares de Bastos, Dr Gregory J Fox, Ms Rebecca Harris, Dr Anneke Hesselning, Dr Faiz Khan, D. M. K. WHO Treatment Guidelines for Drug- Resistant Tuberculosis 2016. *World Heal. Organ.* **2016**, No. October.
- (19) Iacobino, A.; Fattorini, L.; Giannoni, F. Drug-Resistant Tuberculosis 2020: Where We Stand. *Appl. Sci.* **2020**, 10 (6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/app10062153>.
- (20) Choorakottayil Pushkaran, A.; Biswas, R.; Gopi Mohan, C.; Pushkaran Á R Biswas Á C G Mohan, A. C.; D-Alanine D-Glu, D.-A.; L-Alanine, L.-A.; L-Lysine, L.-L. Impact of Target-Based Drug Design in Anti-Bacterial Drug Discovery for the Treatment of Tuberculosis. *Challenges Adv. Comput. Chem. Phys.* **2019**, 27, 307–346. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05282-9_10.
- (21) Bhat, Z. S.; Rather, M. A.; Maqbool, M.; Lah, H. U.; Yousuf, S. K.; Ahmad, Z. Cell Wall: A Versatile Fountain of Drug Targets in Mycobacterium Tuberculosis. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 95 (July), 1520–1534. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.036>.
- (22) Bhat, Z. S.; Rather, M. A.; Maqbool, M.; Ahmad, Z. Drug Targets Exploited in Mycobacterium Tuberculosis: Pitfalls and Promises on the Horizon. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, 103 (November 2017), 1733–1747. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.176>.
- (23) Buckle, D. R.; Erhardt, P. W.; Ganellin, C. R.; Kobayashi, T.; Perun, T. J.; Proudfoot, J.; Senn-Bilfinger, J. *Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry Part II (IUPAC Recommendations 2013)*, 1st ed.; Elsevier Inc.,



- 2013**; Vol. 48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417150-3.00024-7>.
- (24) Bleicher, K. H.; Böhm, H. J.; Müller, K.; Alanine, A. I. Hit and Lead Generation: Beyond High-Throughput Screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2 (5), 369–378. <https://doi.org/10.1038/nrd1086>.
- (25) López-López, E.; Barrientos-Salcedo, C.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L. In Silico Tools to Study Molecular Targets of Neglected Diseases: Inhibition of TcSir2rp3, an Epigenetic Enzyme of *Trypanosoma Cruzi*. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2020**, 122, 203–229. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2020.04.001>.
- (26) Prieto-Martínez, F.; Medina-Franco, J. Computer-Aided Drug Design: When Informatics, Chemistry and Art Meets. *TIP. Rev. Espec. en ciencias químico-biológicas* **2018**, 21 (2), 124–134. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.6>.
- (27) Chatterjee, A. *Computational Methods and Tools for Sustainable and Green Approaches in Drug Discovery*; Elsevier Inc., **2020**. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817592-7.00027-7>.
- (28) López Vallejo, F.; Medina Franco, J. L.; Castillo, R. Diseño de Fármacos Asistido Por Computadora. *Educ. Química* **2006**, 17 (4), 452. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2006.4.66027>.
- (29) Batool, M.; Ahmad, B.; Choi, S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112783>.
- (30) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press January 1, **2000**, pp 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- (31) Song, C. M.; Lim, S. J.; Tong, J. C. Recent Advances in Computer-Aided Drug Design. *Brief. Bioinform.* **2009**, 10 (5), 579–591.



- <https://doi.org/10.1093/bib/bbp023>.
- (32) Loving, K.; Alberts, I.; Sherman, W. Computational Approaches for Fragment-Based and De Novo Design. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (1), 14–32. <https://doi.org/10.2174/156802610790232305>.
- (33) Sliwoski, G.; Lowe, E. W. Computational Fragment-Based Drug Design. *Silico Drug Discov. Des.* **2013**, 22–32. <https://doi.org/10.4155/EBO.13.335>.
- (34) Abascal, F.; Aguirre, J.; Andrés-León, E.; Bajic, D.; Baú, D.; Bueren-Calabuñg, J.A.; Cortés-Cabrera, A.; Dotu, I.; Fernández, J.M.; Santos, H. G. D.; García-Jiménez, B.; Guantes, R.; Irisarri, I.; Jiménez-Lozano, N.; Klett, J.; Méndez, A.; Morreale, A.; Pascual-García, A.; Perona, A.; Sebastian, A.; Stich, M.; Tarazona, S.; Yruela, I.; Zardoya, R. *Bioinformática Con Ñ*; CreateSpace, Ed.; **2014**; Vol. 1.
- (35) Sérgio, F. S.; Alexandrino Fernandes, P.; Joao Ramos, M. Protein–Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. *PROTEINS Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, *65* (Wiley InterScience), 15–26. <https://doi.org/10.1002/prot>.
- (36) Garrett, M.; Lim-Wilby, M. Molecular Docking. In *Methods in Molecular Biology*; Andreas, K., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **2006**; Vol. 443, pp 365–382. https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_3820.
- (37) Prieto-Martínez, F. D.; Arciniega, M.; Medina-Franco, J. L. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* **2018**, *21*, 65–87. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>.
- (38) Guvench, O.; MacKerell, A. D. Comparison of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *443*, 63–88. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_4.
- (39) Kumar, H.; Maiti, P. K. Introduction to Molecular Dynamics Simulation; **2011**; Vol. 23, pp 161–197. https://doi.org/10.1007/978-93-86279-50-7_6.



- (40) Genheden, S.; Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10* (5), 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>.
- (41) Salo-Ahen, O. M. H.; Alanko, I.; Bhadane, R.; Bonvin, A. M. J. J.; Honorato, R. V.; Hossain, S.; Juffer, A. H.; Kabedev, A.; Lahtela-Kakkonen, M.; Larsen, A. S.; Lescrinier, E.; Marimuthu, P.; Mirza, M. U.; Mustafa, G.; Nunes-Alves, A.; Pantsar, T.; Saadabadi, A.; Singaravelu, K.; Vanmeert, M. Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. *Processes* **2020**, *9* (71), 1–60. <https://doi.org/10.3390/pr9010071>.
- (42) Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **2018**, *99* (6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>.
- (43) Caflisch, A. Protein Structure-Based Drug Design: From Docking to Molecular Dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2018**, *48*, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.010>.
- (44) Banegas-Luna, A. J.; Cerón-Carrasco, J. P.; Pérez-Sánchez, H. A Review of Ligand-Based Virtual Screening Web Tools and Screening Algorithms in Large Molecular Databases in the Age of Big Data. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (22), 2641–2658. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0076>.
- (45) Todeschini, R.; Consonni, V.; Ballabio, D.; Grisoni, F. Chemometrics for QSAR Modeling. In *Comprehensive Chemometrics*; Elsevier, **2020**; pp 599–634. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14703-1>.
- (46) Ertl, P.; Schuffenhauer, A.; Renner, S. Similarity Searching Using 2D Structural Fingerprints. In *Chemoinformatics and Computational Chemical Biology*; Bajorath, J., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, **2011**; Vol. 672, pp 133–158. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-839-3>.
- (47) Kumar, A.; Zhang, K. Y. J. Advances in the Development of Shape Similarity



- Methods and Their Application in Drug Discovery. *Front. Chem.* **2018**, *6* (JUL), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00315>.
- (48) Agoni, C.; Olotu, F. A.; Ramharack, P.; Soliman, M. E. Druggability and Drug-Likeness Concepts in Drug Design: Are Biomodelling and Predictive Tools Having Their Say? *J. Mol. Model.* **2020**, *26* (6). <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04385-6>.
- (49) Young, D. C. *Computational Drug Design*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470451854>.
- (50) Portevin, D.; De Sousa-D'Auria, C.; Houssin, C.; Grimaldi, C.; Chami, M.; Daffé, M.; Guilhot, C. A Polyketide Synthase Catalyzes the Last Condensation Step of Mycolic Acid Biosynthesis in Mycobacteria and Related Organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (1), 314–319. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305439101>.
- (51) Gavalda, S.; Léger, M.; van der Rest, B.; Stella, A.; Bardou, F.; Montrozier, H.; Chalut, C.; Burlet-Schiltz, O.; Marrakchi, H.; Daffé, M.; Quémard, A. The Pks13/FadD32 Crosstalk for the Biosynthesis of Mycolic Acids in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (29), 19255–19264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.006940>.
- (52) Aggarwal, A.; Parai, M. K.; Shetty, N.; Wallis, D.; Woolhiser, L.; Hastings, C.; Dutta, N. K.; Galaviz, S.; Dhakal, R. C.; Shrestha, R.; Wakabayashi, S.; Walpole, C.; Matthews, D.; Floyd, D.; Scullion, P.; Riley, J.; Epemolu, O.; Norval, S.; Snavely, T.; Robertson, G. T.; Rubin, E. J.; Ioerger, T. R.; Sirgel, F. A.; van der Merwe, R.; van Helden, P. D.; Keller, P.; Böttger, E. C.; Karakousis, P. C.; Lenaerts, A. J.; Sacchettini, J. C. Development of a Novel Lead That Targets M. Tuberculosis Polyketide Synthase 13. *Cell* **2017**, *170* (2), 249-259.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.025>.
- (53) Coulton, S.; Novelli, R.; Porter, Roderick Alan. Thompson, M.; Ward, R. W. Preparation of Pyrido[2,1-a]isoquinolines and Pyrrolo[2,1-a]isoquinolines as Anticonvulsants. WO2000008020A2, **2000**.



- (54) Montalbano, A.; Diana, P.; Barraja, P.; Lauria, A.; Cirrincione, G.; Dattolo, G.; Almerico, A. M. Pyrimido[5,4-c]Pyrrolo[2,1-a]Isoquinoline: A New Potential DNA-Interactive Ring System. *Arkivoc* **2003**, 2002 (11), 264–273. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0003.b24>.
- (55) Niewohner, U.; Bauser, M.; Erguden, J.-K.; Flubacher, D.; Naab, P.; Repp, T.-O.; Stoltefuss, J.; Burkhardt, N.; Sewing, A.; Schauer, M.; Weber, O.; Schlemmer, K.-H.; Boyer, J., S.; Miglares, M. 3-Substituted Pyrrolo[2,1-a]Isoquinoline Derivatives. WO2003014 117A1, **2003**.
- (56) Van Rijn, R. D.; Loozen, H. J. J.; Timmers, C. M.; Van Der Veen, L. A.; Karstens, W. F. J. Preparation of (Dihydro)Pyrrolo[2,1-a]Isoquinolines as FSH Receptor Agonists for Treating Infertility. WO 2009098283 A1 20090813, 2009.
- (57) Maryanoff, B. E.; Vaught, J. L.; Shank, R. P.; McComsey, D. F.; Costanzo, M. J.; Nortey, S. O. Pyrroloisoquinoline Antidepressants. 3. A Focus on Serotonin. *J. Med. Chem.* **1990**, 33 (10), 2793–2797. <https://doi.org/10.1021/jm00172a018>.
- (58) Wu, C. C.; Wang, W. Y.; Kuo, R. Y.; Chang, F. R.; Wu, Y. C. Antiplatelet Effects of KW-7, a New Inhibitor of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 483 (2–3), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.10.046>.
- (59) Moreno, L.; Párraga, J.; Galán, A.; Cabedo, N.; Primo, J.; Cortes, D. Synthesis of New Antimicrobial Pyrrolo[2,1-a]Isoquinolin-3-Ones. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, 20 (22), 6589–6597. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.033>.
- (60) Nevskaya, A. A.; Matveeva, M. D.; Borisova, T. N.; Niso, M.; Colabufo, N. A.; Boccarelli, A.; Purgatorio, R.; de Candia, M.; Cellamare, S.; Voskressensky, L. G.; Altomare, C. D. A New Class of 1-Aryl-5,6-Dihydropyrrolo[2,1-a]Isoquinoline Derivatives as Reversers of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance in Tumor Cells. *ChemMedChem* **2018**, 13 (15), 1588–



1596. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800177>.
- (61) Dumitrascu, F.; Georgescu, E.; Georgescu, F.; Popa, M. M.; Dumitrescu, D. Synthesis of Pyrrolo[2,1-a]isoquinolines by Multicomponent 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Molecules* **2013**, *18* (3), 2635–2645. <https://doi.org/10.3390/molecules18032635>.
- (62) Meyer, H.; Enamnen, M. Von; Meyer, H.; Pharma, C. L.; Ag, D. B. Pyrrole Durch Cyclisierende Michael-Addition von Enaminen. **1981**, 1534–1544.
- (63) Sarkar, S.; Bera, K.; Maiti, S.; Biswas, S.; Jana, U. Three-Component Coupling Synthesis of Diversely Substituted n-Aryl Pyrroles Catalyzed by Iron(III) Chloride. *Synth. Commun.* **2013**, *43* (11), 1563–1570. <https://doi.org/10.1080/00397911.2011.650273>.
- (64) Ghandi, M.; Khodadadi, M.; Abbasi, A. A Combined Multicomponent-Acid Catalyzed Cyclization Reaction as an Efficient Route to Novel Tricyclic Pyrrolo[2,1-a]isoquinoline Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **2021**, *58* (2), 478–487. <https://doi.org/10.1002/jhet.4185>.
- (65) Koohgard, M.; Hosseini-Sarvari, M. Chlorophyll-Catalyzed Tandem Oxidation/[3+2] Cycloaddition Reactions toward the Construction of Pyrrolo[2,1-a]isoquinolines under Visible Light. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2021**, *404*, 112877. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112877>.
- (66) Child, R.; Pyman, F. L. 1- ω -Halogenoalkylisoquinolines and Their Derivatives. *J. Chem. Soc.* **1931**, No. 36, 36–49. <https://doi.org/10.1039/JR9310000036>.
- (67) King, F. D. A Facile Three-Step Synthesis of (\pm)-Crispine A via an Acyliminium Ion Cyclisation. *Tetrahedron* **2007**, *63* (9), 2053–2056. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.12.041>.
- (68) Knölker, H.-J.; Agarwal, S. Total Synthesis of the Antitumor Active Pyrrolo[2,1-a]isoquinoline Alkaloid (\pm)-Crispine A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (7), 1173–1175. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.12.066>.



- (69) Reyes-Gutiérrez, P. E.; Camacho, J. R.; Ramírez-Apan, M. T.; Osornio, Y. M.; Martínez, R. Synthesis of 5,6-Dihydropyrrolo[2,1-a]isoquinolines Featuring an Intramolecular Radical-Oxidative Cyclization of Polysubstituted Pyrroles, and Evaluation of Their Cytotoxic Activity. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (19), 4374. <https://doi.org/10.1039/c004399k>.
- (70) Murai, K.; Matsuura, K.; Aoyama, H.; Fujioka, H. Oxidative Rearrangement via in Situ Generated N-Chloroamine: Synthesis of Fused Tetrahydroisoquinolines. *Org. Lett.* **2016**, *18* (6), 1314–1317. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b00233>.
- (71) Orito, K.; Matsuzaki, T.; Suginome, H.; Rodrigo, R. Studies on Friedel-Crafts Acylation of N-Acetylhomoveratrylamine and Preparation of 1-Substituted 3,4-Dihydro-6,7-Dimethoxyisoquinolines. *Heterocycles* **1988**, *27* (10), 2403–2412. <https://doi.org/10.3987/COM-88-4647>.
- (72) Hu, J.; Liu, Z.; Yu, D. J.; Zhang, Y. LS-Align: An Atom-Level, Flexible Ligand Structural Alignment Algorithm for High-Throughput Virtual Screening. *Bioinformatics* **2018**, *34* (13), 2209–2218. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty081>.
- (73) Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY427>.
- (74) Consortium, T. U.; Bateman, A.; Martin, M.-J.; Orchard, S.; Magrane, M.; Agivetova, R.; Ahmad, S.; Alpi, E.; Bowler-Barnett, E. H.; Britto, R.; Bursteinas, B.; Bye-A-Jee, H.; Coetzee, R.; Cukura, A.; Da Silva, A.; Denny, P.; Dogan, T.; Ebenezer, T.; Fan, J.; Castro, L. G.; Garmiri, P.; Georghiou, G.; Gonzales, L.; Hatton-Ellis, E.; Hussein, A.; Ignatchenko, A.; Insana, G.; Ishtiaq, R.; Jokinen, P.; Joshi, V.; Jyothi, D.; Lock, A.; Lopez, R.; Luciani, A.; Luo, J.; Lussi, Y.; MacDougall, A.; Madeira, F.; Mahmoudy, M.; Menchi, M.;



- Mishra, A.; Moulang, K.; Nightingale, A.; Oliveira, C. S.; Pundir, S.; Qi, G.; Raj, S.; Rice, D.; Lopez, M. R.; Saidi, R.; Sampson, J.; Sawford, T.; Speretta, E.; Turner, E.; Tyagi, N.; Vasudev, P.; Volynkin, V.; Warner, K.; Watkins, X.; Zaru, R.; Zellner, H.; Bridge, A.; Poux, S.; Redaschi, N.; Aimo, L.; Argoud-Puy, G.; Auchincloss, A.; Axelsen, K.; Bansal, P.; Baratin, D.; Blatter, M.-C.; Bolleman, J.; Boutet, E.; Breuza, L.; Casals-Casas, C.; de Castro, E.; Echioukh, K. C.; Coudert, E.; Cuche, B.; Doche, M.; Dornevil, D.; Estreicher, A.; Famiglietti, M. L.; Feuermann, M.; Gasteiger, E.; Gehant, S.; Gerritsen, V.; Gos, A.; Gruaz-Gumowski, N.; Hinz, U.; Hulo, C.; Hyka-Nouspikel, N.; Jungo, F.; Keller, G.; Kerhornou, A.; Lara, V.; Le Mercier, P.; Lieberherr, D.; Lombardot, T.; Martin, X.; Masson, P.; Morgat, A.; Neto, T. B.; Paesano, S.; Pedruzzi, I.; Pilbout, S.; Pourcel, L.; Pozzato, M.; Pruess, M.; Rivoire, C.; Sigrist, C.; Sonesson, K.; Stutz, A.; Sundaram, S.; Tognolli, M.; Verbregue, L.; Wu, C. H.; Arighi, C. N.; Arminski, L.; Chen, C.; Chen, Y.; Garavelli, J. S.; Huang, H.; Laiho, K.; McGarvey, P.; Natale, D. A.; Ross, K.; Vinayaka, C. R.; Wang, Q.; Wang, Y.; Yeh, L.-S.; Zhang, J.; Ruch, P.; Teodoro, D. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1100>.
- (75) Anandakrishnan, R.; Aguilar, B.; Onufriev, A. V. H++ 3.0: Automating PK Prediction and the Preparation of Biomolecular Structures for Atomistic Molecular Modeling and Simulations. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (W1), W537–W541. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS375>.
- (76) Williams, C.J.; Headd, J.J.; Moriarty, N.W.; Prisant, M.G.; Videau, L.L.; Deis, L.N., Deedy, D.A.; Hintze, B.J.; Chen, V. B.; Jain, S.; Lewis, S. M.; Richardson, J.; Richardson, D.C.. MolProbity: More and Better Reference Data for Improved All-Atom Structure Validation. *Protein Sci.* **2018**, *27* (1), 293–315. <https://doi.org/10.1002/PRO.3330>.
- (77) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16),



2785. <https://doi.org/10.1002/JCC.21256>.
- (78) Andrade, C. H.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, E. I.; Hopfinger, A. J. Molecules 4D-QSAR: Perspectives in Drug Design. *Molecules* **2010**, *15*, 3281–3294. <https://doi.org/10.3390/molecules15053281>.
- (79) Shinoda, W. Permeability across Lipid Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2016**, *1858* (10), 2254–2265. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.032>.
- (80) Lomize, A. L.; Hage, J. M.; Schnitzer, K.; Golobokov, K.; Lafaive, M. B.; Forsyth, A. C.; Pogozheva, I. D. PerMM: A Web Tool and Database for Analysis of Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59* (7), 3094–3099. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00225>.
- (81) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- (82) Yang, H.; Lou, C.; Sun, L.; Li, J.; Cai, Y.; Wang, Z.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. AdmetSAR 2.0: Web-Service for Prediction and Optimization of Chemical ADMET Properties. *Bioinformatics* **2019**, *35* (6), 1067–1069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>.
- (83) Schyman, P.; Liu, R.; Desai, V.; Wallqvist, A. VNN Web Server for ADMET Predictions. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8* (DEC), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00889>.
- (84) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/J.SOFTX.2015.06.001>.
- (85) Pettersen, E.; Goddard, T.; Huang, D.; Conrad, C.; Gregory, S.; Greenblatt,



- D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/JCC.20084>.
- (86) Sousa da Silva, A. W.; Vranken, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser InterfacE. *BMC Res. Notes* **2012**, *5* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367>.
- (87) Kumari, R.; Kumar, R.; Lynn, A. G-Mmpbsa -A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (7), 1951–1962. <https://doi.org/10.1021/ci500020m>.
- (88) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (SUPPL.), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- (89) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- (90) Egan, W. J.; Merz, K. M.; Baldwin, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (21), 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>.
- (91) Nagasawa, S.; Fujiki, S.; Sasano, Y.; Iwabuchi, Y. Chromium–Salen Complex / Nitroxyl Radical Cooperative Catalysis: A New Combination for Aerobic Intramolecular Dearomative Coupling of Phenols. **2020**. <https://doi.org/10.26434/CHEMRXIV.12924005.V1>.
- (92) Amer El-Batta; Changchun Jiang; Wen Zhao; Robert Anness; Andrew L. Cooksy, and; Bergdahl*, M. Wittig Reactions in Water Media Employing Stabilized Ylides with Aldehydes. Synthesis of α,β -Unsaturated Esters from Mixing Aldehydes, α -Bromoesters, and Ph₃P in Aqueous NaHCO₃. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (14), 5244–5259. <https://doi.org/10.1021/JO070665K>.

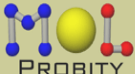


-
- (93) Chávez-Santos, R. M.; Reyes-Gutiérrez, P. E.; Torres-Ochoa, R. O.; Ramírez-Apan, M. T.; Martínez, R. 5,6-Dihydropyrrolo[2,1-a]isoquinolines As Alternative of New Drugs With Cytotoxic Activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, *65* (10), 973–981. <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00409>.


11. ANEXOS

ANEXO A

Validación de la geometría de la enzima Pks13 con la herramienta MolProbity.



Analysis output: geometry for pks13_clean.pdb



Duke Biochemistry
Duke University School of Medicine

Summary statistics

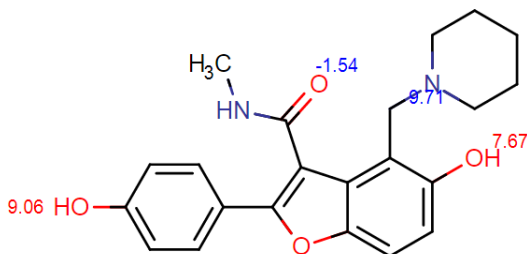
Protein Geometry	Poor rotamers	1	0.45%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	218	98.20%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	268	98.17%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	0.90 ± 0.47		Goal: abs(Z score) < 2
	C β deviations >0.25Å	1	0.40%	Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 2211	0.00%	Goal: 0%
	Bad angles:	12 / 3003	0.40%	Goal: <0.1%
	Peptide Omegas	Cis Prolines:	2 / 17	11.76%
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	1	0.4%	Goal: <1.0%
	CA Geometry outliers	0	0.00%	Goal: <0.5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0/320		

In the two column results, the left column gives the raw count, right column gives the percentage.

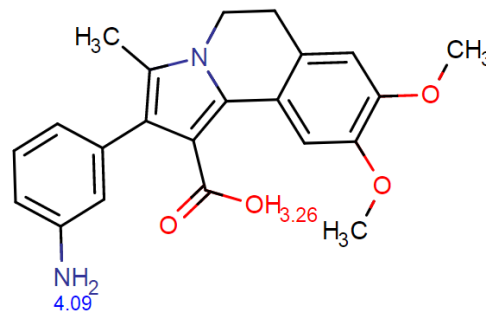
Key to table colors and cutoffs here: [?](#)

ANEXO B

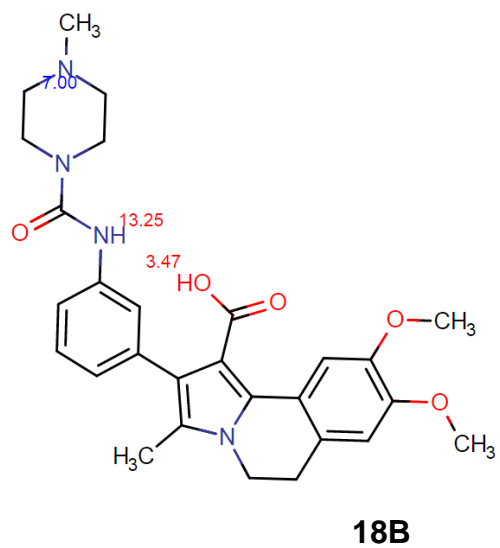
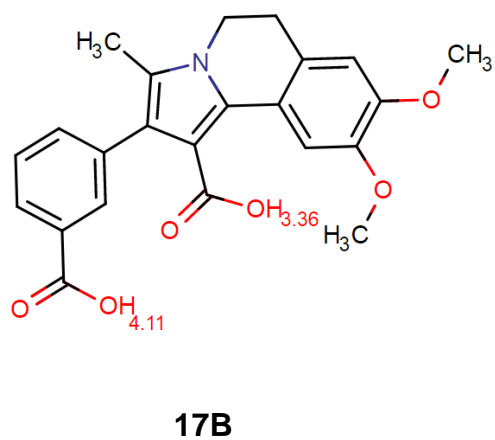
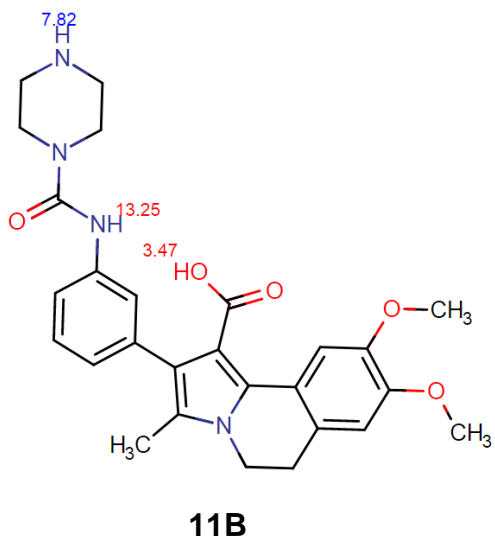
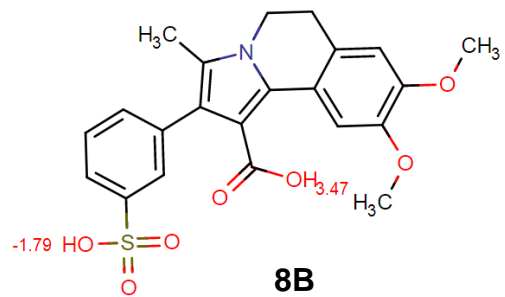
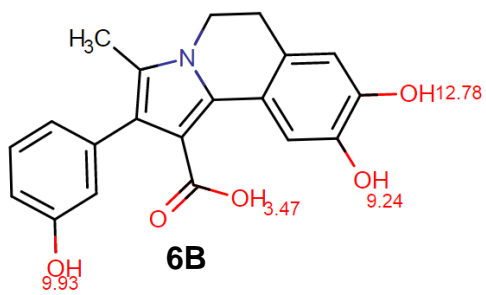
Predicción del pK_a de los ligandos evaluados en el acoplamiento molecular, utilizando la herramienta Chemicalize.



TAM16

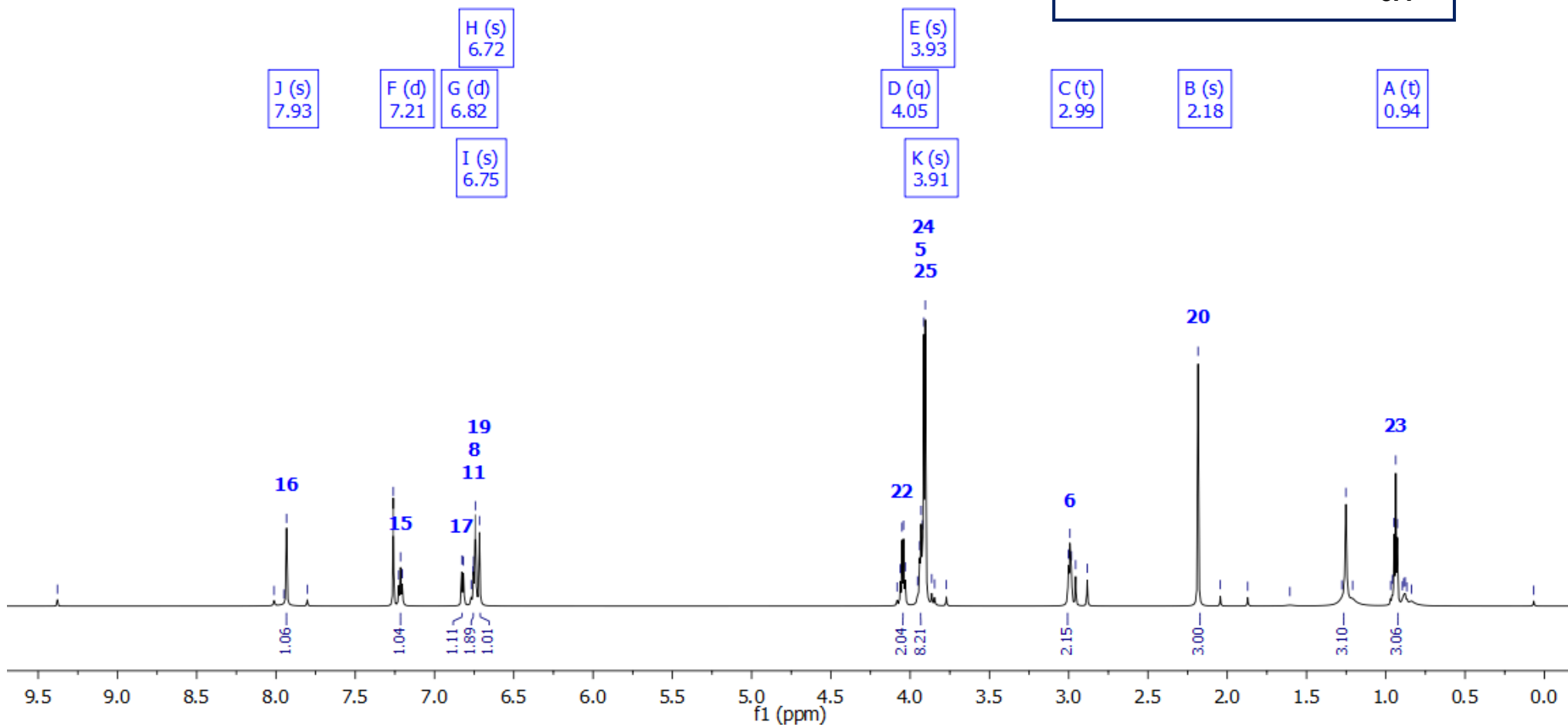
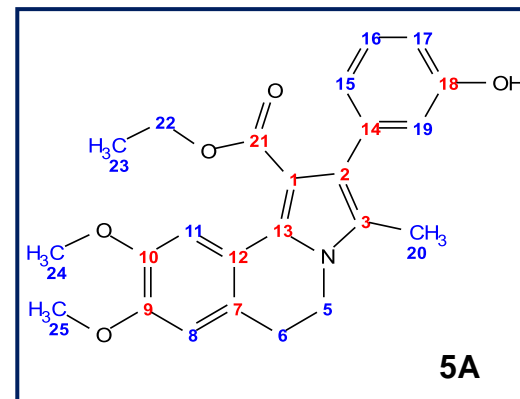


1B

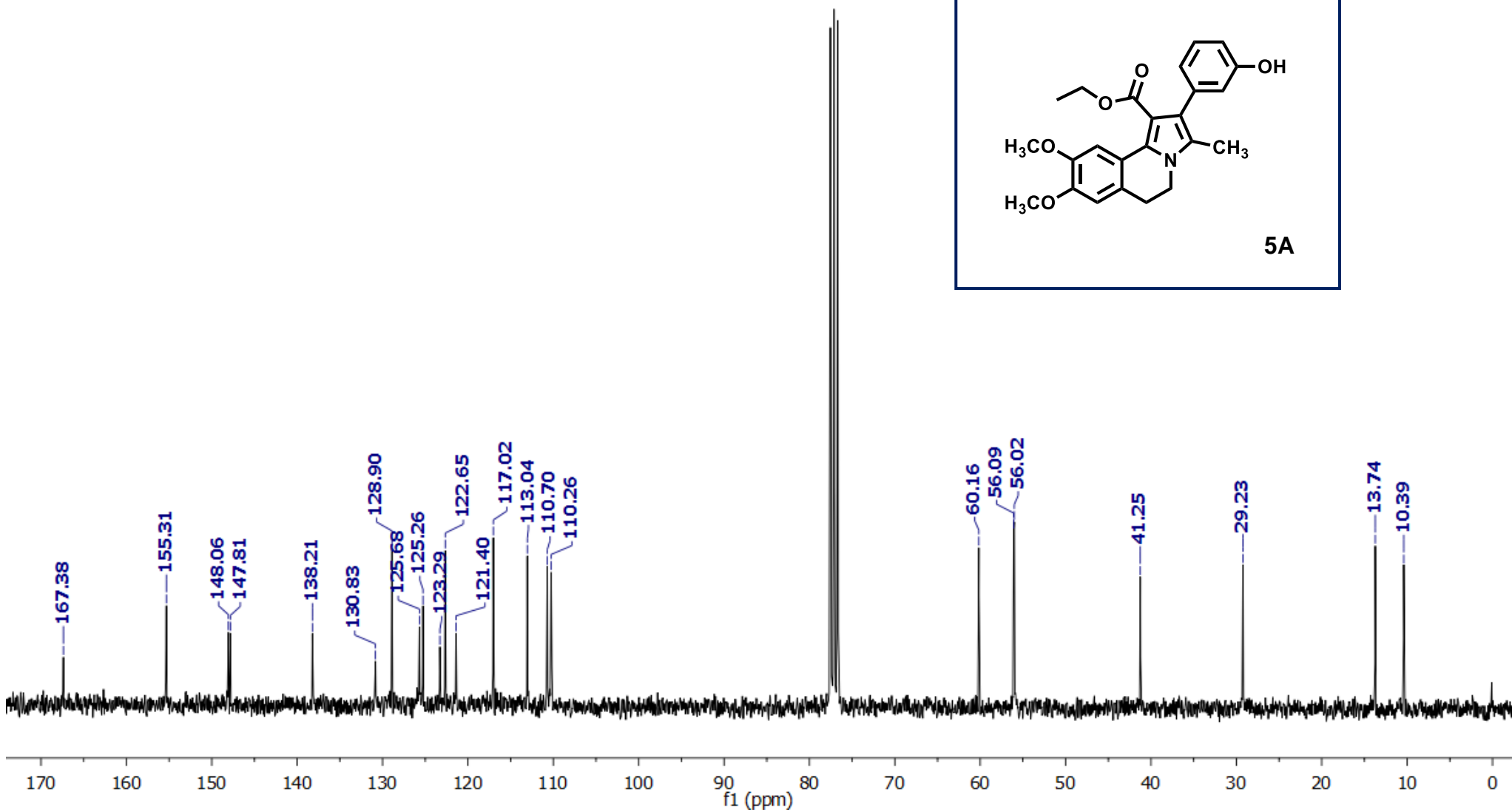
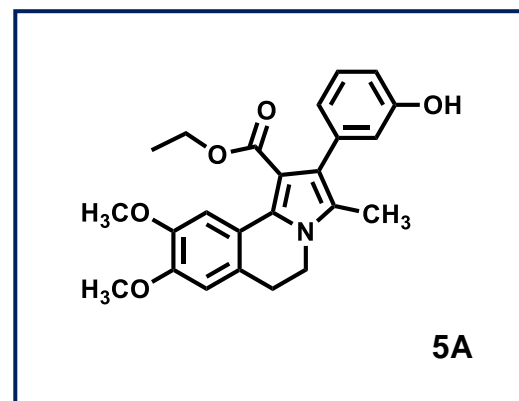


ANEXO C

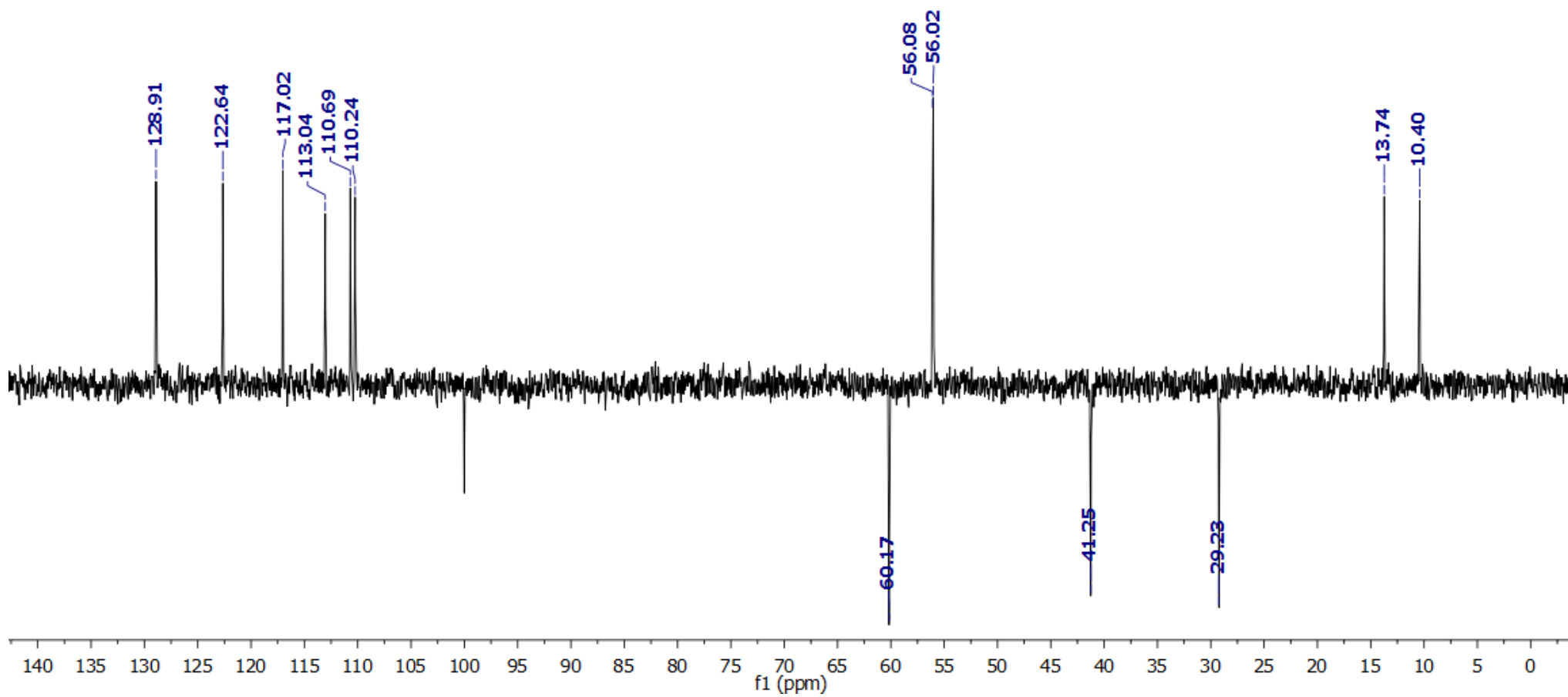
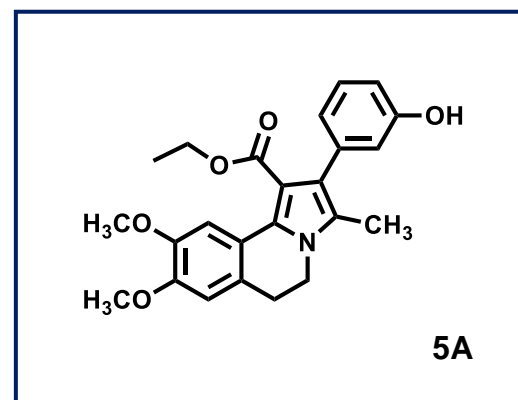
¹H NMR (700 MHz, Chloroform-d) δ 7.93 (s, 1H), 7.21 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.75 (s, 2H), 6.72 (s, 1H), 4.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.91 (s, 7H), 2.99 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 0.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

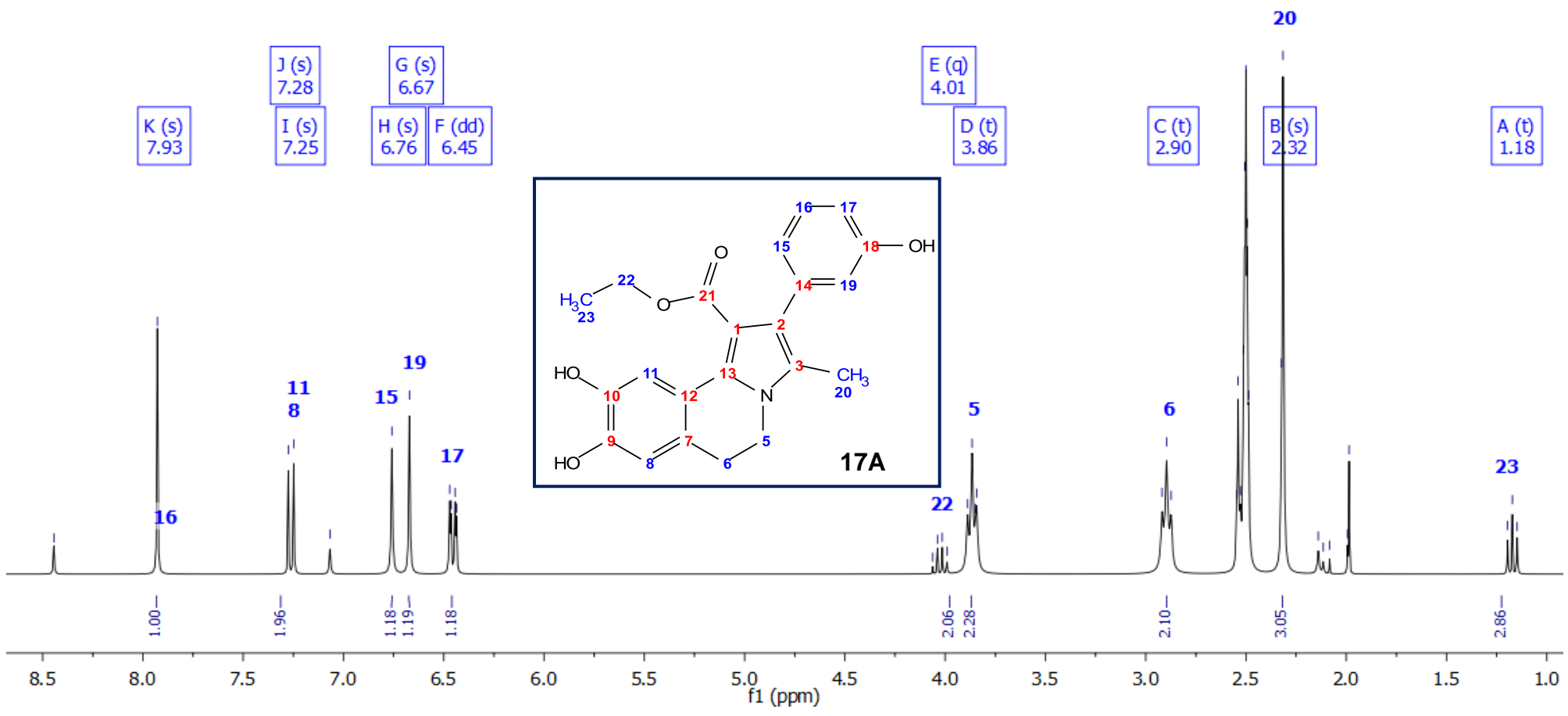
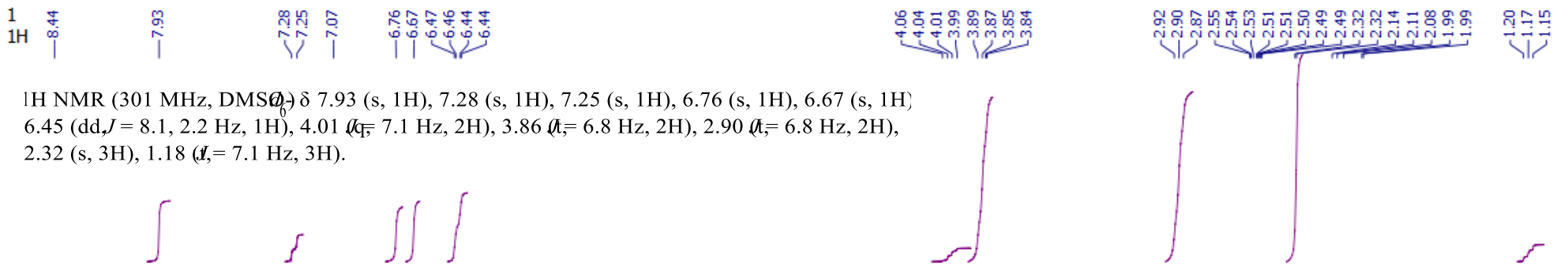


^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ 167.38, 155.31, 148.06, 147.81, 138.21, 130.83, 128.90, 125.68, 125.26, 123.29, 122.65, 121.40, 117.02, 113.04, 110.70, 110.26, 60.16, 56.09, 56.02, 41.25, 29.23, 13.74, 10.39.



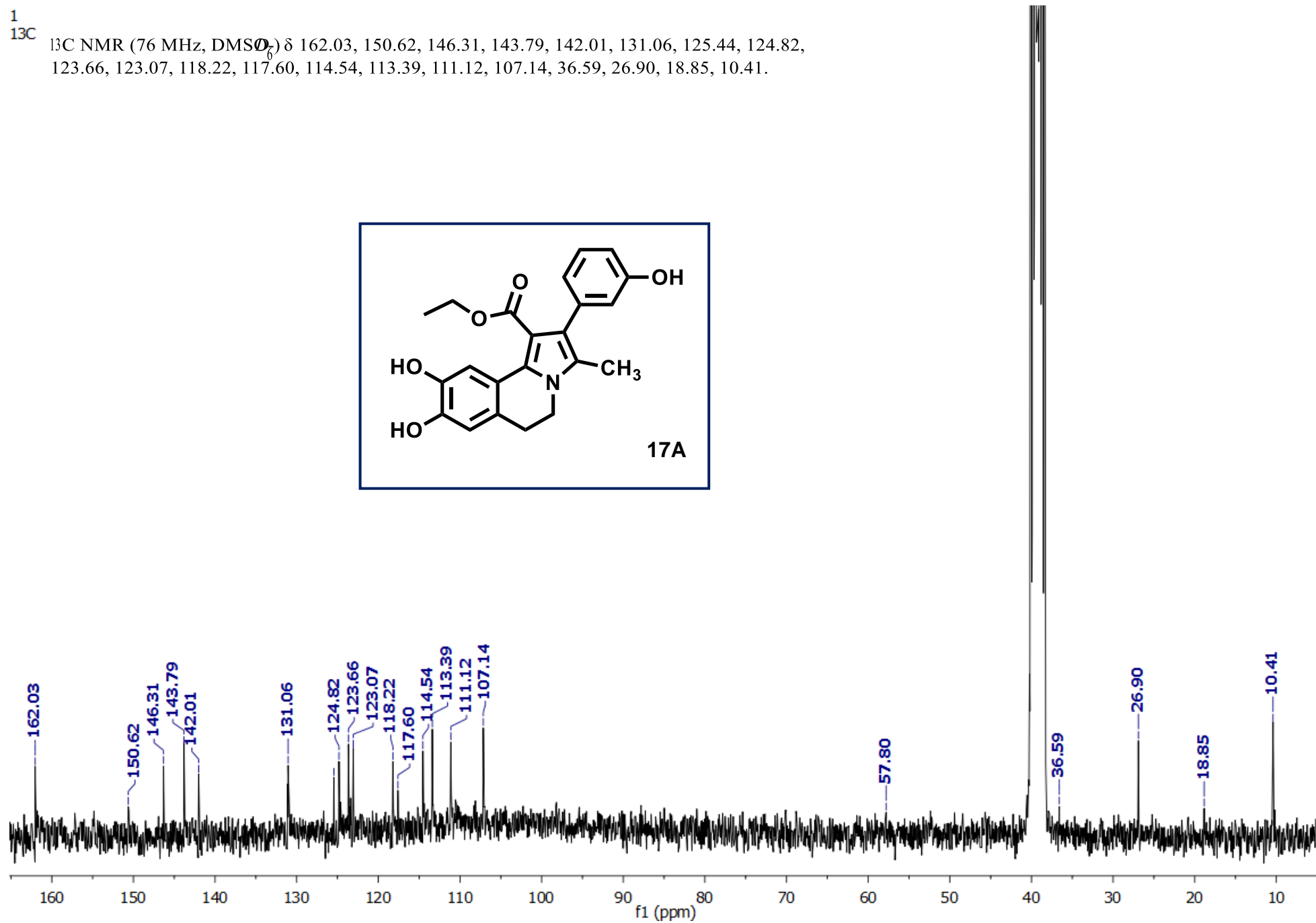
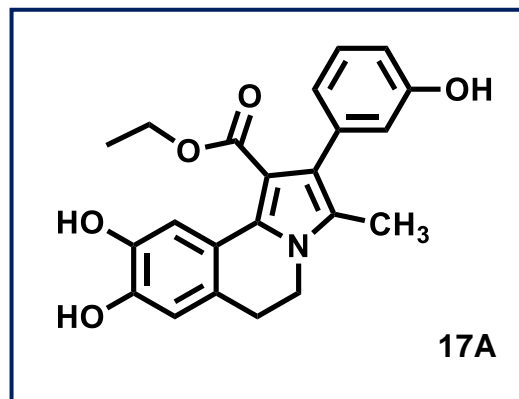
^{13}C NMR (76 MHz, CHLOROFORM- d_3) δ 128.91, 122.64, 117.02, 113.04, 110.69, 110.24, 60.17, 56.02, 41.25, 29.23, 13.74, 10.40.



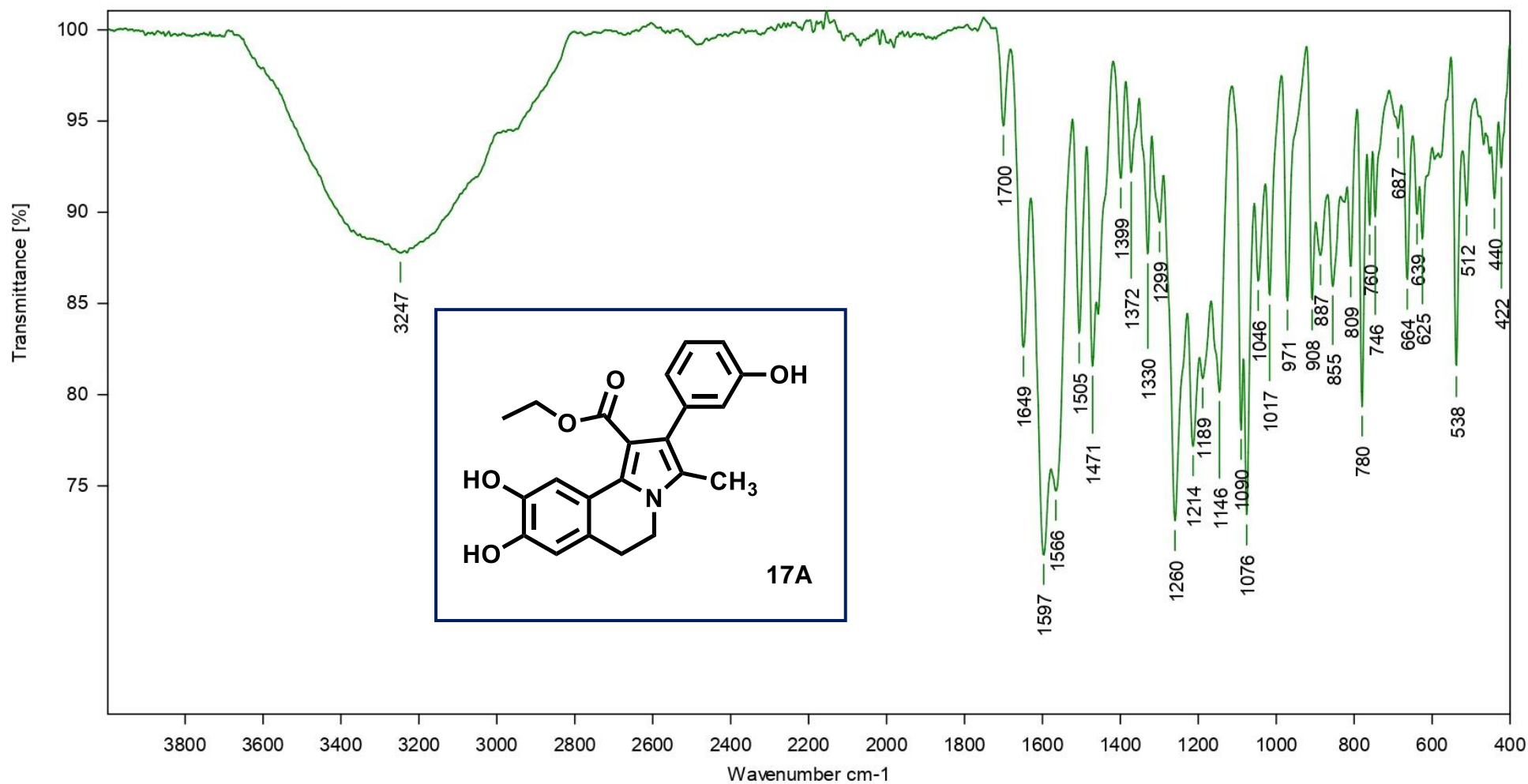


¹³C

¹³C NMR (76 MHz, DMSO-d₆) δ 162.03, 150.62, 146.31, 143.79, 142.01, 131.06, 125.44, 124.82, 123.66, 123.07, 118.22, 117.60, 114.54, 113.39, 111.12, 107.14, 36.59, 26.90, 18.85, 10.41.



GP-403



Experiment default.xpm

Operator Name Administrator

Instrument Type Alpha

Resolution 4

Path of File C:\INSTITUTO\Roberto Martinez

Date of Measurement 30/09/2021

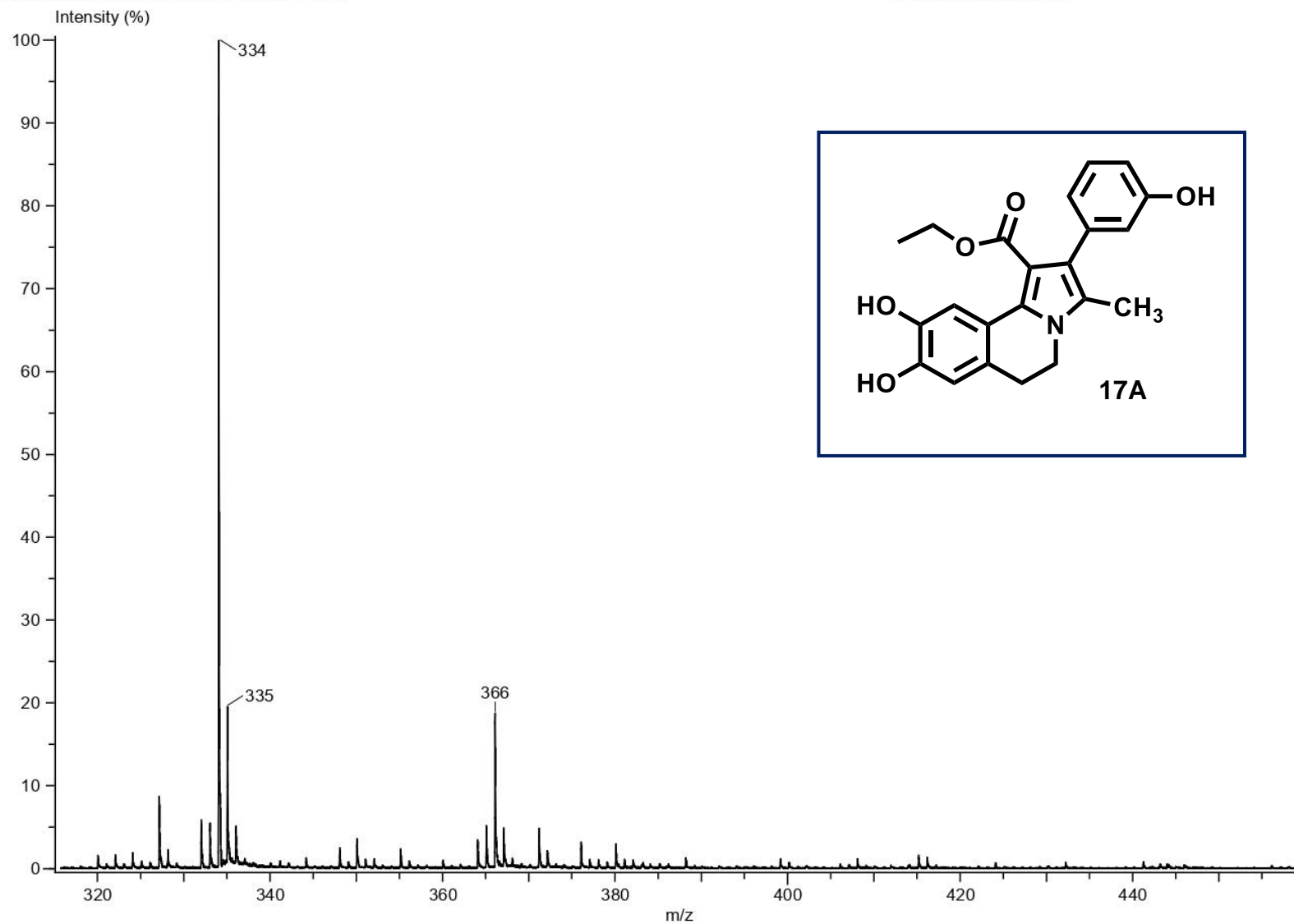
Sample Form ATR

Sample Scans 24

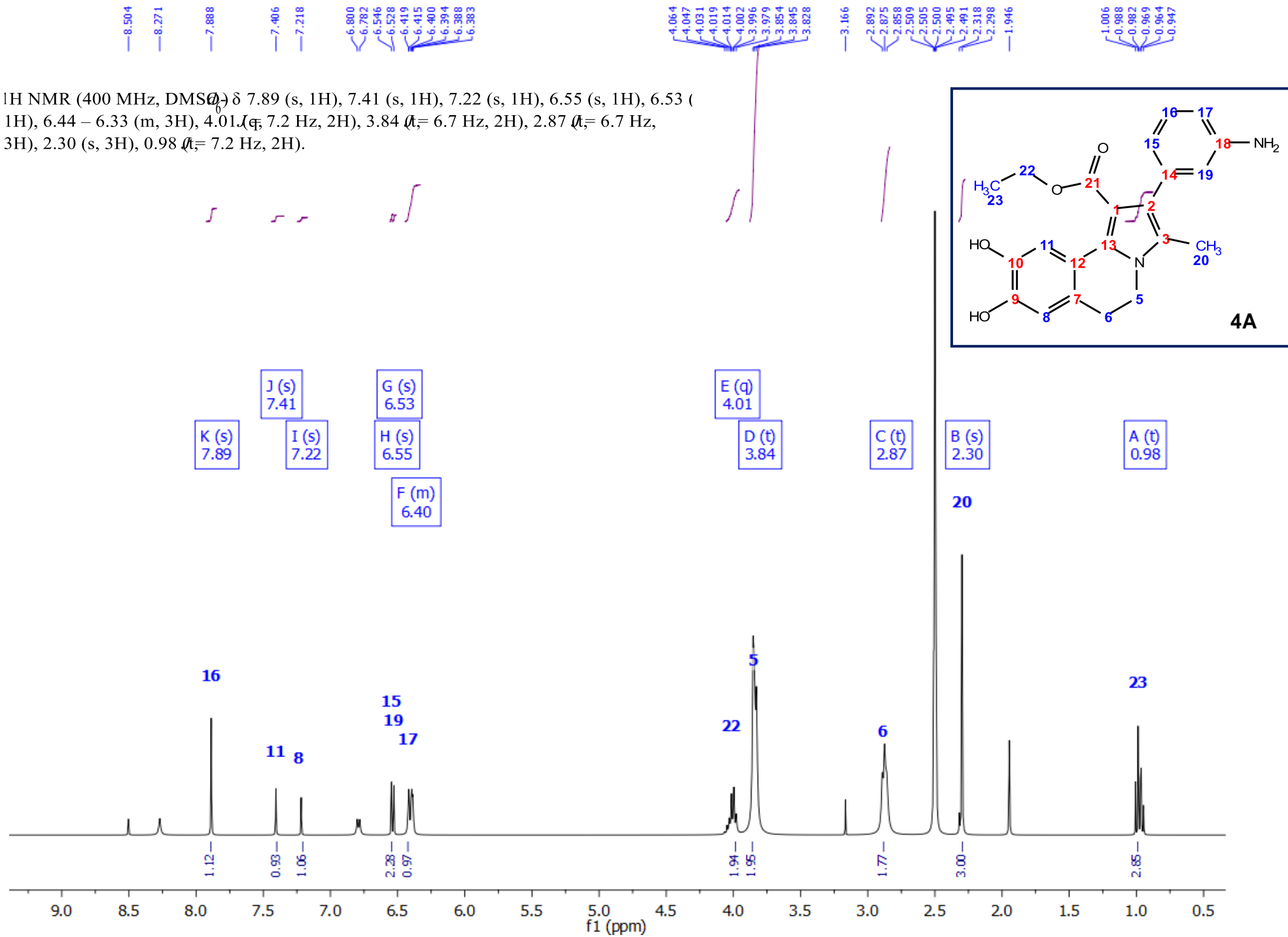
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Acq. Data Name: 1223 17AMBG
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:2.2)
Dr Martinez Roberto / Operador: Carmen Garcia

Experiment Date/Time: 10/4/2021 11:29:54 AM
Instrument : JEOL The AccuTOF : JMS-T100LC
Ionization Mode: DART+



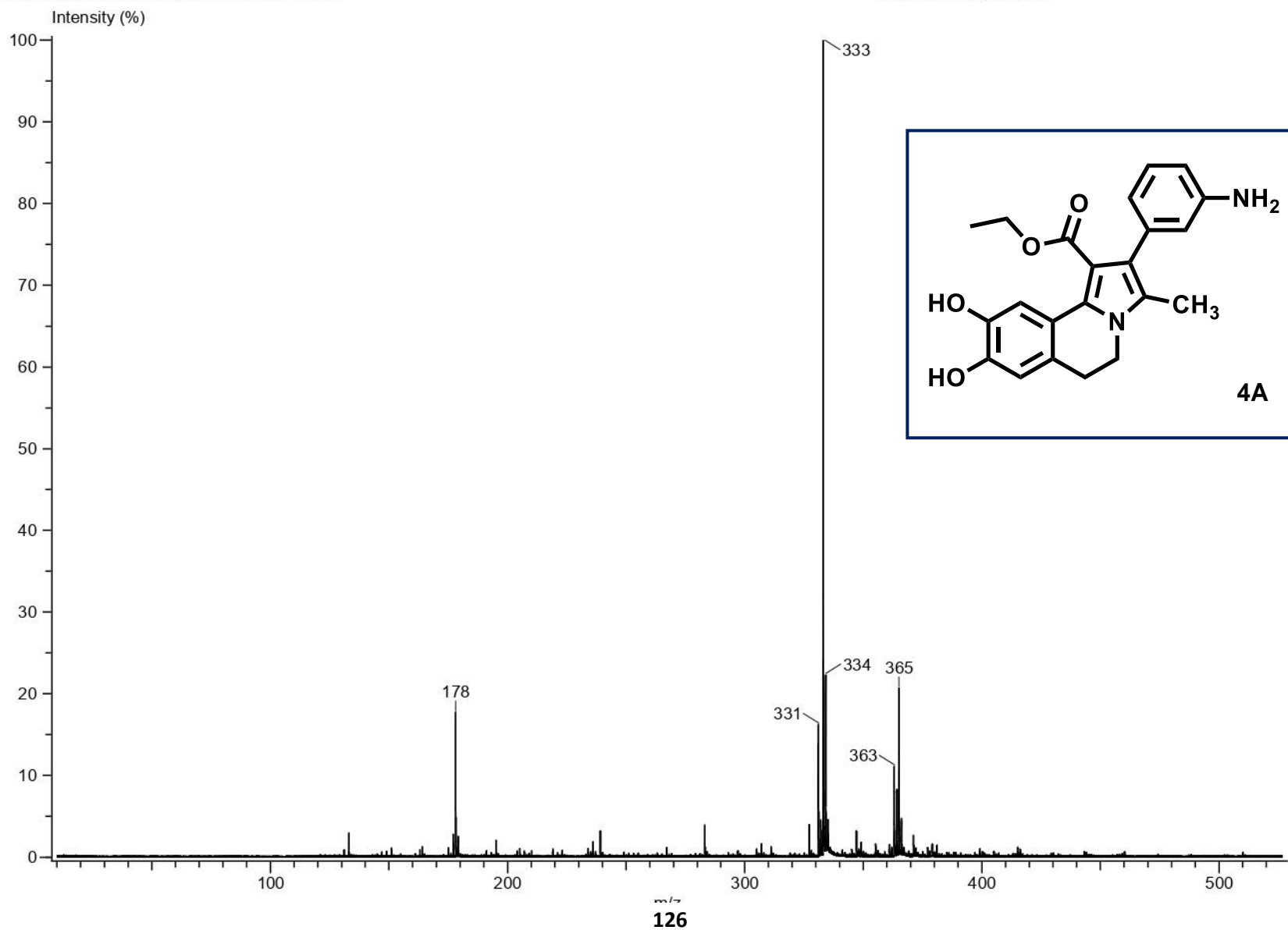
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.89 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.53 (1H), 6.44 – 6.33 (m, 3H), 4.01 (q, *J*_H = 7.2 Hz, 2H), 3.84 (t, *J*_H = 6.7 Hz, 2H), 2.87 (t, *J*_H = 6.7 Hz, 3H), 2.30 (s, 3H), 0.98 (t, *J*_H = 7.2 Hz, 2H).



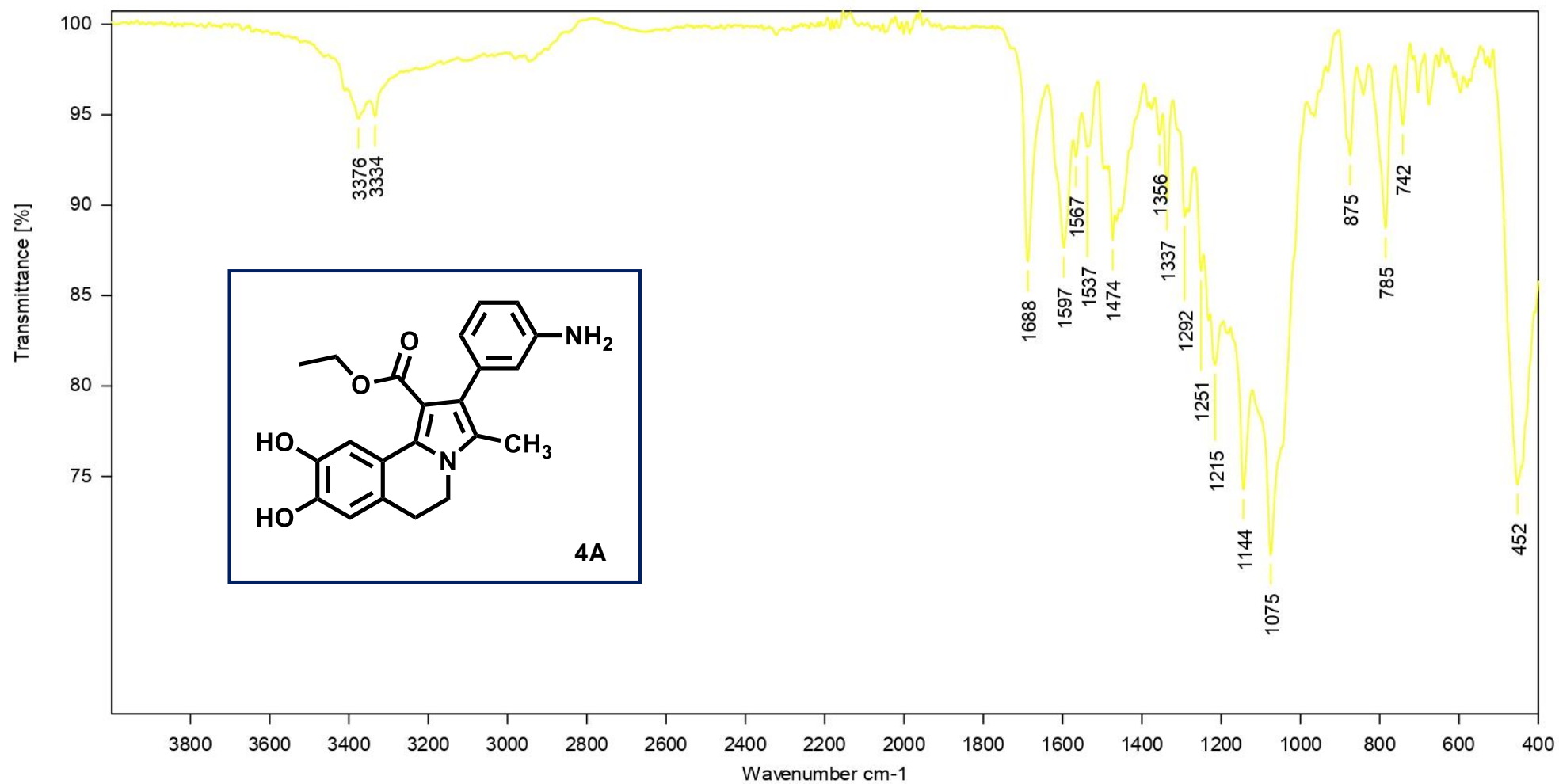
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Acq. Data Name: 1224 4AMBG
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:1..1)
Dr Martinez Roberto / Operador: Carmen Garcia

Experiment Date/Time: 10/4/2021 11:33:31 AM
Instrument : JEOL The AccuTOF : JMS-T100LC
Ionization Mode: DART+



4A-MBG



Experiment default.xpm

Operator Name Administrator

Instrument Type Alpha

Resolution 4

Path of File C:\INSTITUTO\Roberto Martinez

Date of Measurement 30/09/2021

Sample Form ATR

Sample Scans 24