

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**SÍNTESIS DE (2E)-3-(2-ANILIN-3-QUINOLINIL)-1-FENIL-2-PROPEN-1-ONAS
SUSTITUIDAS Y SU ESTUDIO MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR COMO
POSIBLES INHIBIDORES DEL DENGUE**

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela por el Br. José Leonardo
Carrero Osorio para optar al título de
Licenciado en Química

Caracas, Junio 2019

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**SÍNTESIS DE (2E)-3-(2-ANILIN-3-QUINOLINIL)-1-FENIL-2-PROPEN-1-ONAS
SUSTITUIDAS Y SU ESTUDIO MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR COMO
POSIBLES INHIBIDORES DEL DENGUE**

Presentado por:

Br. José L. Carrero O.

C.I. V-18.186.094

Tutores:

Dra. María L. Serrano

Dr. Gustavo Cabrera

Caracas, Junio 2019

Yo Profesor Gustavo Cabrera, Investigador del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora María Luisa Serrano Investigadora de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela,

Certificamos que, el presente trabajo especial de grado titulado:

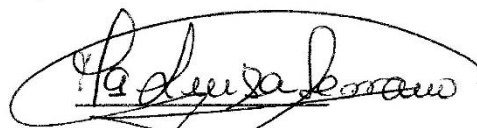
**“SÍNTESIS DE (2E)-3-(2-ANILIN-3-QUINOLINIL)-1-FENIL-2-PROPEN-1-ONAS
SUSTITUIDAS Y SU ESTUDIO MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR COMO
POSIBLES INHIBIDORES DEL DENGUE”**

Que presenta el Br. José Leonardo Carrero Osorio, para aspirar al título de Licenciado en Química, se realizó en el Laboratorio de síntesis del grupo de productos naturales de la Escuela de Química y en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2017 y 2018, con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Octubre de 2019



Dr. Gustavo Cabrera
Director
Facultad de Ciencias

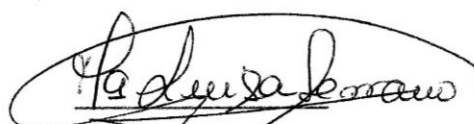


Dra. María Luisa Serrano
Director
Facultad de Farmacia

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "SÍNTESIS DE (2E)-3-(2-ANILIN-3-QUINOLINIL)-1-FENIL-2-PROPEN-1-ONAS SUSTITUIDAS Y SU ESTUDIO MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR COMO POSIBLES INHIBIDORES DEL DENGUE". Presentado por el Br. José L. Carrero O., certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



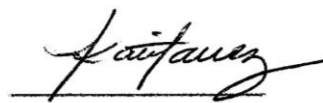
Dr. Gustavo Cabrera
Director
Facultad de Ciencias



Dra. Maria Luisa Serrano
Director
Facultad de Farmacia



Dr. Manuel Fermín
Jurado
Facultad de Ciencias



Dra. Katuska Chávez
Jurado
Facultad de Farmacia

A quienes creyeron en mí...

Agradecimientos

A la Universidad Central de Venezuela

A la Facultad de Ciencias

A mis tutores, al Dr. Gustavo Cabrera y a la Dra. María Luisa Serrano, por darme la oportunidad de desarrollar un proyecto como este. La experiencia fue sin igual y con un increíble aprendizaje. Gracias por su disposición en todo momento.

Muy por sobre todo, a Yuary Pino, no alcanzarían las páginas para agradecerte. No solo en el plano académico, sino en lo personal. Por enseñarme una verdadera amistad y por estar ahí a lo largo de estos años, en momentos en que más lo necesitaba. Mi eterna lealtad y agradecimiento. A ti dedico este proyecto.

A los que creyeron en mí, e incluso a quienes hicieron difícil el camino.

Resumen

En el presente trabajo se reporta la síntesis de una serie de compuestos quinolínicos, siguiendo una estrategia que consistió en la obtención de cinco diferentes 2-cloro-3-formilquinolinas mediante la reacción de Vilsmeier-Haack, seguida de la formación de una base de Schiff y sustitución del halógeno con *p*-toluidina, en un solo paso. Posteriormente, la hidrólisis de la mencionada base de Schiff y una condensación aldólica con acetofenona, permitió obtener las **(2E)-3-(2-anilin-3-quinolinil)-1-fenil-2-propen-1-onas** deseadas con buenos rendimientos. La ruta sintética empleada fue una modificación de la originalmente planteada, en la que se proponía la protección del grupo carbonilo formando un acetal, sustrato sobre el cual la sustitución del halógeno no fue posible. Los productos obtenidos fueron caracterizados mediante espectroscopia de infrarrojo y de UV-Visible.

Paralelamente, se realizó un estudio computacional de acoplamiento molecular, mejor conocido como *docking*, con la estructura de los productos finales así como con las bases de Schiff obtenidas en la ruta de síntesis empleada, seleccionando como blanco la proteasa NS2B/NS3 del virus del dengue (DENV). Los resultados obtenidos reflejaron el gran potencial de las bases de Schiff como inhibidores, con base en la alta afinidad e interacciones con el sitio de unión de la enzima. Por otra parte, las **(2E)-3-(2-anilin-3-quinolinil)-1-fenil-2-propen-1-onas** podrían no perfilarse como potentes inhibidores.

Palabras clave: quinolinas, 2-cloro-3-formilquinolinas, bases de Schiff, *docking*, acoplamiento molecular, proteasa NS2B/NS3, dengue.

Índice de figuras

Figura 1. Estructura básica de los virus.	3
Figura 2. Distribución global del dengue	6
Figura 3. Distribución epidemiológica del DENV en Venezuela.....	6
Figura 4. Estructura del virus del dengue.....	8
Figura 5. Poliproteína del DENV.....	9
Figura 6. Ciclo de vida del DENV.	10
Figura 7. Posibles blancos terapéuticos de un inhibidor del DENV.	11
Figura 8. Inhibidores de las proteínas estructurales E y C.....	12
Figura 9. Inhibidores de la proteasa NS2B/NS3 del DENV.....	14
Figura 10. Mecanismo de acción típico de un inhibidor competitivo.	16
Figura 11. Estructura terciaria de la proteína NS2B/NS3 del DENV.....	17
Figura 12. Conformación abierta y cerrada de la proteasa NS2B/NS3 del DENV. ...	18
Figura 13. Descripción del sitio activo de la proteasa NS2B/NS3 del DENV.....	19
Figura 14. Estructura y posiciones de la quinolina.....	20
Figura 15. Desplazamiento químico de protones de la quinolina.....	20
Figura 16. Análisis retrosintéticos de la quinolina.....	21
Figura 17. Ibuprofeno acoplado a la enzima COX-2.....	37
Figura 18. Modelos de interacción sustrato-enzima.	38
Figura 19. Esquema del diseño de fármacos mediante química computacional. ..	42
Figura 20. Pasos inherentes al acoplamiento molecular.....	44
Figura 21. Diagrama energético de los métodos de búsqueda conformacional. ...	46
Figura 22. Metodología del acoplamiento molecular.	51
Figura 23. Definición de la caja o área de búsqueda.	54
Figura 24. Metodología experimental del acoplamiento molecular.	73
Figura 25. Compuestos de la librería control.....	76
Figura 26. Espectro de Ir teórico y experimental QA4.	82

Figura 27. Espectro de UV-Vis de los compuestos QA 1-5.....	83
Figura 28. Espectro de IR teórico y experimental QS4.	90
Figura 29. Espectro UV-Vis QS 1-5.	91
Figura 30. Espectro de IR teórico y experimental QD4.	93
Figura 31. Espectro de UV-Vis QD 1-5.....	94
Figura 32. Espectro de IR teórico y experimental QC4.	96
Figura 33. Espectro de UV-Vis QC 1-5.....	97
Figura 34. Espectros de UV-Vis teóricos y experimentales Serie Q-1.....	97
Figura 35. Gráfico de Ramachandran para la proteína original y minimizada	100
Figura 36. Identificación del sitio de unión de la proteína.....	101
Figura 37. Propiedades fisicoquímicas del sitio de unión.....	102
Figura 38. Interacciones clave de los compuestos control más activos.	106
Figura 39. Acoplamiento de los compuestos sintetizados en el sitio de unión. ..	111
Figura 40. Interacciones entre QS1 y QC1 y el sitio de unión de la proteasa.....	112
Figura 41. Comparación entre las poses de QS 1-5.....	113

Índice de tablas

Tabla 1. Algoritmo en paquetes de software de acoplamiento molecular.	47
Tabla 2. Rendimientos de las acetanilidas Ac 1-5.....	66
Tabla 3. Rendimientos de las 2-cloro-3-formilquinolinas QA 1-5.....	67
Tabla 4. Rendimientos de los acetales QP 1-5.....	68
Tabla 5. Rendimientos de las bases de Schiff QS 1-5.....	70
Tabla 6. Rendimientos de las 2-anilino-3-formilquinolinas QD 1-5.....	71
Tabla 7. Rendimientos de las chalconas QC 1-5.	72
Tabla 8. Frecuencia de los principales modos vibracionales en QA 1-5.....	82
Tabla 9. Frecuencia de los principales modos vibracionales en QS 1-5.....	90
Tabla 10. Frecuencia de los principales modos vibracionales en QD 1-5.....	93
Tabla 11. Frecuencia de los principales modos vibracionales en QC 1-5.....	96
Tabla 12. Tamizado virtual de la librería control.....	105
Tabla 13. Tamizado virtual de la librería control y compuestos sintetizados.	110

Abreviaturas y acrónimos

DENV	Virus del dengue
K_i	Constante de inhibición enzimática
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
CE₅₀	Concentración efectiva media
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RV	Reactivo de Vilsmeier
RMSD	Desviación de la raíz cuadrática media
ccf	Cromatografía de capa fina
cc	Cromatografía por columna
IR	Infrarrojo
ATR	Attenuated total reflectance
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
Å	Angstroms
nm	Nanómetros
cm	Centímetros
DMF	N,N-dimetilformamida
THF	Tetrahidrofurano
Hex	Hexano
CHARMM	Chemistry at Harvard Molecular Mechanics
NAMD	Nanoscale Molecular Dynamics
DFT	Teoría del funcional de la densidad
B3LYP	Funcional híbrido de tres parámetros de Becke, Lee-Yang-Parr

Abreviaturas de aminoácidos

Código 1 letra	Código 3 letras	Aminoácido
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

Glosario de términos

Enzima: Catalizadores específicos y potentes que posibilitan la coexistencia de un elevado número de reacciones química dentro de la célula. En la mayoría de los casos son de naturaleza proteica.

Cofactor: Sustancia inorgánica u orgánica, cuya presencia es necesaria para la actividad de una enzima, pero que no sufre una alteración permanente en la reacción.

Sitio activo: Lugar de una molécula enzimática al que se une el sustrato y donde se facilita la reacción, a menudo es una hendidura, bolsillo o cavidad situado en la superficie de la enzima.

Receptor: Molécula a la cual se acopla un ligando. Generalmente una proteína u otra macromolécula.

Ligando: Molécula que se une al receptor en el acoplamiento.

Tamizado virtual: Búsqueda de estructuras más afines a un determinado receptor en un compendio o librería de moléculas.

Residuos catalíticos: Residuos que participan directamente en la formación y la ruptura de enlaces químicos del sustrato.

Sustrato: Sustancia sobre el que actúa una enzima de un modo específico.

CI₅₀: Concentración capaz de generar la inhibición de una o varias funciones biológicas, al 50% de los organismos usados en pruebas de laboratorio, bajo condiciones determinadas.

CE₅₀: Concentración de un agente tóxico a un organismo determinado que causa un efecto agudo al 50% de los organismos usados en pruebas de laboratorio.

RMSD: Medida de la distancia promedio entre átomos de moléculas superpuestas. Generalmente empleado para determinar cuantitativamente si dos orientaciones de una misma molécula son iguales.

CHARMM: Nombre de un campo de fuerzas y de un programa usado en la mecánica molecular. Las siglas son por Chemistry at Harvard macromolecular mechanics.

Índice

Agradecimientos	¡Error! Marcador no definido.
Resumen	vii
Índice de figuras	viii
Índice de tablas	x
Abreviaturas y acrónimos	xi
Abreviaturas de aminoácidos	xii
Glosario de términos	xiii
Índice	xv
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Dengue	4
2.1.1. Impacto Socioeconómico	5
2.1.2. Epidemiología	5
2.1.3. Transmisión del virus	7
2.1.4. Estructura y ciclo de vida del virus del Dengue	7
2.1.5. Inhibición del virus del dengue	10
2.1.5.1. Inhibición de las proteínas E y C	12
2.1.5.2. Inhibición de la proteasa NS2B/NS3	13
2.1.5.3. Estructura de la de la proteasa NS2B/NS3	16
2.2. Química de las Quinolinas	20
2.2.1. Síntesis de Quinolinas	21
2.2.1.1. Síntesis de Skraup	22
2.2.1.2. Síntesis de Friedlander	23
2.2.1.3. Síntesis de Combes	24
2.2.1.4. Síntesis de Conrad-Limpach-Knorr	25
2.2.1.5. Otras Síntesis	25
2.2.1.6. Síntesis de Vilsmeier-Haack	26

2.2.2.	Importancia de la síntesis de quinolinas	34
2.3.	Acoplamiento molecular.....	37
2.3.1.	Fisicoquímica de la interacción ligando-proteína.....	39
2.3.2.	Acoplamiento molecular y el descubrimiento de nuevos fármacos	41
2.3.3.	Objetivos del acoplamiento molecular	43
2.3.4.	Tipos de acoplamiento molecular	43
2.3.5.	Pasos del acoplamiento molecular	43
2.3.5.1.	Busqueda conformacional.	45
2.3.5.2.	Función de puntuación (scoring)	47
2.3.6.	Metodología del acoplamiento molecular.....	51
3.	Antecedentes	56
3.1.	Síntesis	56
3.2.	Actividad biológica y acoplamiento molecular.....	60
4.	Justificación.....	62
5.	Objetivos	63
5.1.	Objetivo general	63
5.2.	Objetivos específicos	63
6.	Metodología experimental.....	64
6.1.	Síntesis	64
6.2.	Acoplamiento molecular.....	73
7.	Resultados y discusión.....	79
7.1.	Síntesis	79
7.2.	Acoplamiento molecular.....	98
8.	Conclusiones	115
9.	Recomendaciones	117
10.	Referencias	118
11.	Anexos	126

1. Introducción

Las quinolinas son heterociclos de gran importancia, al encontrarse en numerosos compuestos de origen natural y sustancias farmacológicamente activas, destacando principalmente el uso de derivados de la quinina como potentes antimaláricos. Además, están presentes en colorantes, pesticidas y en una gran cantidad de fármacos como antifúngicos, antiinflamatorios, analgésicos y antibióticos, entre muchos otros. Entre los métodos más comunes para la obtención de quinolinas se encuentran las síntesis de Skraup, Combes, Conrad-Limpach-Knorr o, la reacción de Vilsmeier-Haack. La reacción de Vilsmeier-Haack es un método eficiente, económico y de condiciones suaves para la formilación de compuestos aromáticos y heteroaromáticos activados, tales como aminas y fenoles, aunque también puede emplearse para la síntesis de heterociclos como la quinolina. La acetanilida, por ejemplo, da lugar a las 2-cloro-3-formilquinolinas mediante una doble formilación de la cadena lateral, pudiendo llevar a cabo numerosas reacciones sobre las mismas dando lugar a la obtención, en algunos casos, de compuestos biológicamente activos.

El descubrimiento de compuestos con efectos terapéuticos, solía implicar la síntesis de una gran cantidad de moléculas y posterior ensayo biológico sobre todas ellas, en una suerte de ensayo y error. Sin embargo los avances computacionales y estudios teóricos, como el modelado molecular, han permitido darle un enfoque racional a este proceso, convirtiéndose en parte integral de la investigación industrial y académica dirigida al diseño y descubrimiento de nuevos fármacos. Entre las herramientas de modelado molecular se encuentra el *docking*, anglicismo traducido como acoplamiento molecular, el cual tiene como finalidad predecir la estructura de complejos formados entre dos o más moléculas, un receptor (proteína) y un ligando. Se fundamenta en la mecánica molecular y sus resultados se expresan en términos energéticos de afinidad así como la interacción con el sitio de unión.

La presente investigación tiene como objetivo sintetizar, mediante la reacción de Vilsmeier-Haack, una serie de 2-cloro-3-formilquinolinas como intermediarios clave para la obtención de compuestos que presentan cierta similaridad estructural con algunos inhibidores reportados para la proteasa del virus del dengue, pudiendo estudiar entonces los compuestos sintetizados mediante acoplamiento molecular (*docking* molecular) para poder predecir así su potencial como inhibidores de esta enzima.

2. Marco teórico

Los virus son abundantes, omnipresentes y juegan un papel importante en la salud y en la evolución de los organismos vivos. Hay especialistas que afirman que son microorganismos, otros sostienen que únicamente son moléculas y un tercer grupo que no se atreve a clasificarlo como uno u otro debido a las diversas características y comportamientos que poseen. Sin embargo, la concepción de la persona común es que se trata de peligrosos agentes de enfermedades infecciosas.^[1]

Los virus mucho más pequeños que las células, además de tener una estructura relativamente simple y estática, carecen de un sistema metabólico propio y dependen del huésped para poder sobrevivir y replicarse. Sus genomas codifican la información mínima para asegurar su replicación y empaquetamiento, la producción de proteínas virales y subvertir funciones celulares para permitir la producción de nuevas partículas de virus activas. La estructura de los virus más simples está compuesta por un genoma de ADN o ARN y una cubierta de proteínas llamada cápside compuesta por una serie de monómeros que protege y aísla el ácido nucleico. Esta estructura básica recibe el nombre de nucleocápside y son conocidos como virus desnudos, contrario a los virus envueltos que adicionalmente presentan una envoltura compuesta por una bicapa lipídica, sobre la que se insertan proteínas víricas.^[2]

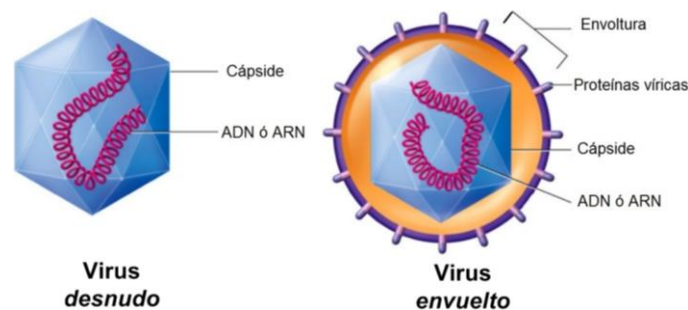


Figura 1. Estructura básica de los virus.

Estructura básica de los virus. En ambos casos, ya sean virus desnudos o envueltos, la estructura básica consiste en material genético protegido por una cápside

Los virus invaden células del huésped con el fin de sobrevivir y multiplicarse. Existen virus capaces de infectar células de bacterias y animales transmitiéndose de distintas maneras, entre ellas: el aire, agua, contacto físico, comida infectada o los que se transmiten por medio de artrópodos (arbovirus). Históricamente, las infecciones virales han sido devastadoras para la humanidad, la viruela por ejemplo fue la principal sospechosa de haber azotado al imperio romano. La gripe española, familia de la influenza o gripe común, que diezmó principalmente a Europa entre los años 1918 y 1919. El VIH por su parte empezó a esparcirse desde los años '80 y se estima que ha matado más de 30 millones de personas. En las zonas tropicales son más comunes virus como el dengue, chikungunya, fiebre amarilla, zika, etc., que tienen un gran potencial de infección por las condiciones socioeconómicas y climáticas afectando a millones de personas alrededor del mundo.^[3]

2.1. Dengue

El virus del dengue, también conocido por el acrónimo **DENV**, es el principio patogénico detrás de muchas condiciones médicas. La enfermedad más común causada por el virus es la fiebre del dengue (**FD**), caracterizada por fiebres altas y síntomas similares a la gripe común. Una fracción de los pacientes infectados por el dengue puede presentar una condición más seria, como lo son la fiebre hemorrágica del dengue (**FHD**) o el síndrome de shock por dengue (**SCD**), ambos potencialmente mortales debido a pérdidas de fluidos y otras complicaciones.^[4] Actualmente no existe tratamiento terapéutico para el virus del dengue,^{[5][6]} aunque en octubre de 2016 el grupo Sanofi desarrolló una vacuna aprobada en 10 países latinoamericanos y del sudeste asiático.^[7] La vacuna, a la fecha, aún causa controversia y se ha empleado bajo ciertas restricciones.^[8] En términos de la población en riesgo y las pérdidas económicas, el dengue prevalece como la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos.^[9]

2.1.1. Impacto Socioeconómico

El costo de la enfermedad a la sociedad es extremadamente elevado, desde pérdida de productividad general, los gastos relacionados a la atención médica, hasta los esfuerzos para prevenir la proliferación del vector, afectando particularmente a países en vías de desarrollo en los que el dengue es endémico. En la región del sudeste asiático se estima una inversión de \$950 millones anuales en tratamiento y control del vector; únicamente en Singapur se estima una inversión de \$1000 millones anuales. En el continente americano el impacto es aún mayor, estimándose una inversión de \$1000 a \$4000 millones anuales. Globalmente se estima una inversión de \$39000 millones anuales.^[10]

2.1.2. Epidemiología

El dengue es endémico en más de 100 países alrededor del mundo, presente en todos los continentes excepto en la región antártica. Se calcula que más de 290 millones de personas son infectadas con el virus cada año, de las cuales aproximadamente 100 millones desarrollan la enfermedad. Además, el 35% de la población mundial habita en zonas en el que el virus está presente. La Organización Mundial de la Salud estima que de las 100 millones de personas infectadas anualmente, alrededor la mitad son de la variación más peligrosa de la enfermedad (hemorrágico o shock) y aproximadamente 20.000 de estos casos terminan siendo letales, particularmente en niños.^{[9][10]} El continente americano ha sido una de las regiones más afectadas por el dengue y su variante más grave, el dengue hemorrágico. En la región se ha producido un incremento progresivo de casos de dengue durante las tres últimas décadas, habiéndose extendido la enfermedad a casi la totalidad de los países.^[11]

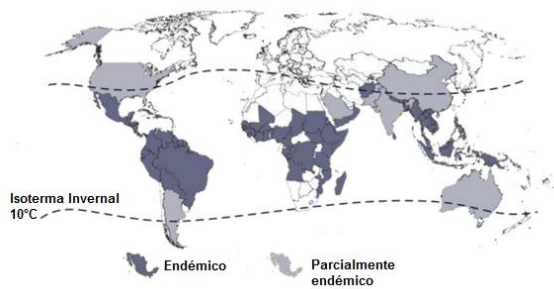


Figura 2. Distribución global del dengue

En Venezuela, según datos oficiales, se diagnosticaron 468 casos probables en la última semana del año 2014 de los cuales uno fue dengue grave. El acumulado del año fue de 87.529 casos de los que el 85,53% fueron dengue sin signos de alarma, 14,22% con signos de alarma y 0,25% de dengue grave. La tasa promedio nacional de incidencia acumulada fue de 286,16 casos por cada 100.000 habitantes. Siendo el virus de alta incidencia en estados como Amazonas, Delta Amacuro y Mérida.^[12] En 2014, Bolívar registraba epidemias de dengue y malaria. La situación permaneció hasta la semana 25 de 2015, pero en la semana 26 la entidad bajó a la zona de alarma, de acuerdo con los canales endémicos establecidos. Los casos acumulados hasta el 4 de julio de 2015 en Venezuela fueron de 13.831, de los cuales 1.047 se localizaron en Bolívar; mientras que en el mismo periodo del año anterior habían sido 27.957 casos en todo el país, 1.071 en Bolívar. Los estados con epidemia de dengue, para la semana 26, del 28 de junio al 4 de julio de 2015, son Amazonas y Cojedes, afectando particularmente a individuos menores de 19 años.^[13]



Figura 3. Distribución epidemiológica del DENV en Venezuela.

2.1.3. Transmisión del virus

El dengue es transmitido a través de un ciclo en el que el mosquito hembra de la especie *Aedes Aegypti* pica a un individuo con el virus, convirtiéndose en un vector e infectando a un nuevo individuo sano al picarlo. Cuatro días después de haber sido contagiado, el individuo desarrollará viremia, una condición en la que hay una alta concentración del patógeno en la sangre pudiendo durar de 5 a 12 días, aumentando considerablemente la infectividad. Los síntomas de la enfermedad generalmente aparecen a los 5 días de haber sido infectado.^[14]

2.1.4. Estructura y ciclo de vida del virus del Dengue

El virus del dengue (**DENV**) pertenece a la familia *Flaviviridae*, genero *Flavivirus* y comprende otros virus como el de la fiebre amarilla (**YFV**), el virus del Nilo Occidental (**WNV**), el virus de la encefalitis por garrapatas (**TBEV**) y el virus de la hepatitis C (**HCV**), estrechamente relacionado genéticamente con el **DENV**. Hasta ahora se han descrito en la literatura cuatro distintos serotipos, denominados **DENV1**, **DENV2**, **DENV3** y **DENV4**. Cada serotipo comparte alrededor de 65% del genoma, aunque en años recientes se ha sospechado del surgimiento de un quinto serotipo. Los cuatro serotipos circulan periódicamente en áreas endémicas e hiperendémicas y, todos causan la enfermedad conocida como dengue. Estructuralmente hablando, el **DENV** es un virus icosaedro de 50 nm aproximadamente, conformado por una membrana sobre la cual se insertan las proteínas de membrana (**M**) y de envoltura (**E**). El interior del virus contiene el complejo riboprotéico conformado por la proteína de la cápside (**C**) y, dentro de ésta, el genoma viral que consiste en una única hebra de ARN de sentido positivo.^[4]

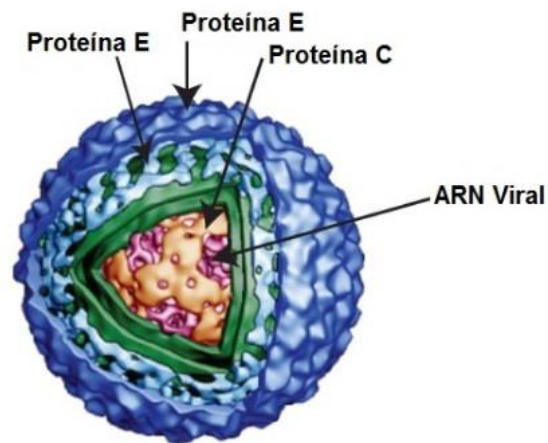


Figura 4. Estructura del virus del dengue.

Tres proteínas estructurales conforman el virus, la de envoltura (E) y membrana (M) se muestran en azul oscuro y azul claro respectivamente, ancladas a la membrana viral (en verde). La proteína de cápside C (amarillo) cubre el genoma viral (rosa).^[15]

El objetivo primario del **DENV** en humanos son las células dendríticas y otras células del sistema inmune. El ciclo de vida del virus se inicia con el acercamiento e interacción de la proteína viral de envoltura (**E**) con otras proteínas presentes en la superficie celular, induciendo la envoltura y posterior internalización del virus, en un proceso conocido como **endocitosis**. Una vez es internalizado, el pH ácido del endosoma desencadena un cambio conformacional en la proteína **E**, promoviendo la formación de unas puntas hidrofóbicas capaces de atravesar la membrana endosomática, perforándola y permitiendo que la nucleocápside (proteína **C** y ARN) sean liberados al citoplasma. Una vez allí el virus deshace la cápside y libera el ARN viral para comenzar el proceso de traducción y replicación del mismo. El ARN genómico viral es **traducido**, sintetizando la **poliproteína viral** conformada por las 3 proteínas estructurales: cápside (**C**), precursora de membrana (**prM**), membrana (**M**) y envoltura (**E**), llamadas así porque forman parte de la estructura final del virus, además de las 7 proteínas no estructurales (**NS**) encargadas de la replicación del genoma y el ensamblaje viral. ^{[16][17][18]}

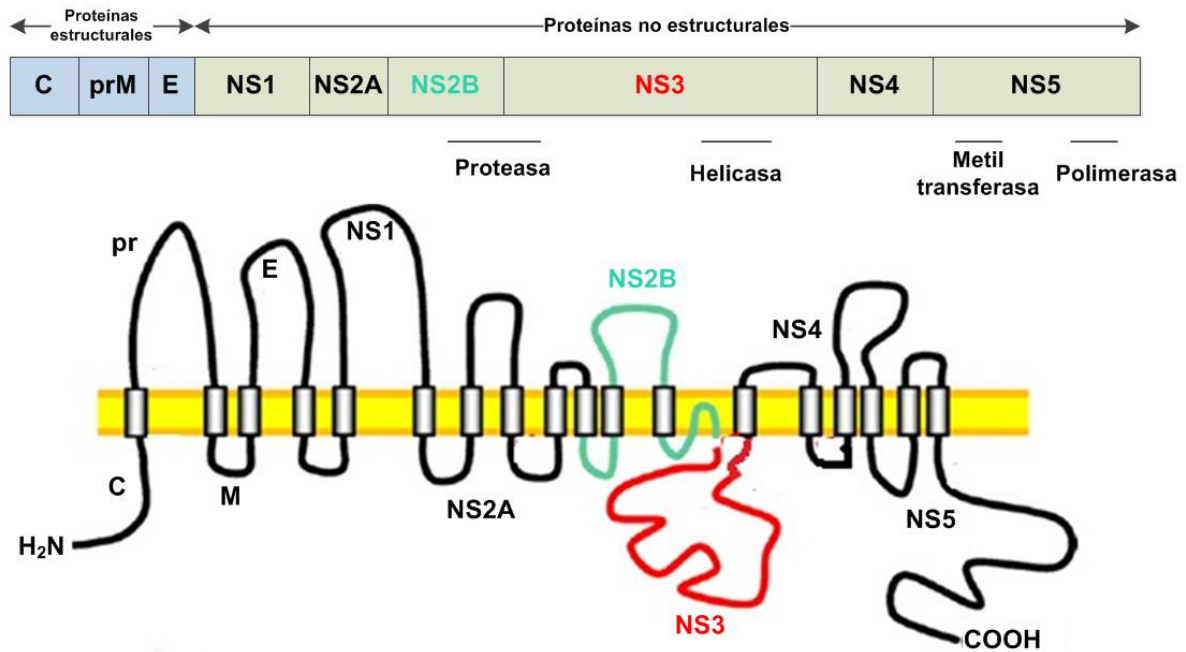


Figura 5. Poliproteína del DENV

Destacando algunas funciones de las proteínas no estructurales: NS2B/NS3 como proteasa, NS3 con un dominio helicasa, NS5 con dos dominios: metiltransferasa y polimerasa. Las proteínas estructurales, por su parte, formarán parte de las nuevas partículas de virus formadas.^[4]

El ARN viral es entonces replicado por esta poliproteína en un complejo proceso que consta de varias etapas, entre las que se encuentran involucradas funciones enzimáticas (proteasa, helicasa, metiltransferasa o polimerasa) de ciertos dominios del complejo de replicación (**Figura 5**), para luego pasar a la etapa de ensamblaje de nuevas partículas de virus. Esta etapa comienza con la formación de la nucleocápside gracias a la interacción del ARN genómico y la proteína **C** a la que luego se asocian las proteínas **prM/M** y **E** formando un virión inmaduro. La etapa de maduración termina una vez esta partícula atraviesa el aparato de Golgi, en donde se inducen distintos cambios conformacionales entre las proteínas hasta prácticamente obtener la estructura final del virus, que luego sale de la célula, adquiere su conformación final, infectando nuevas células y repitiéndose el ciclo (**Figura 6**).^[16]

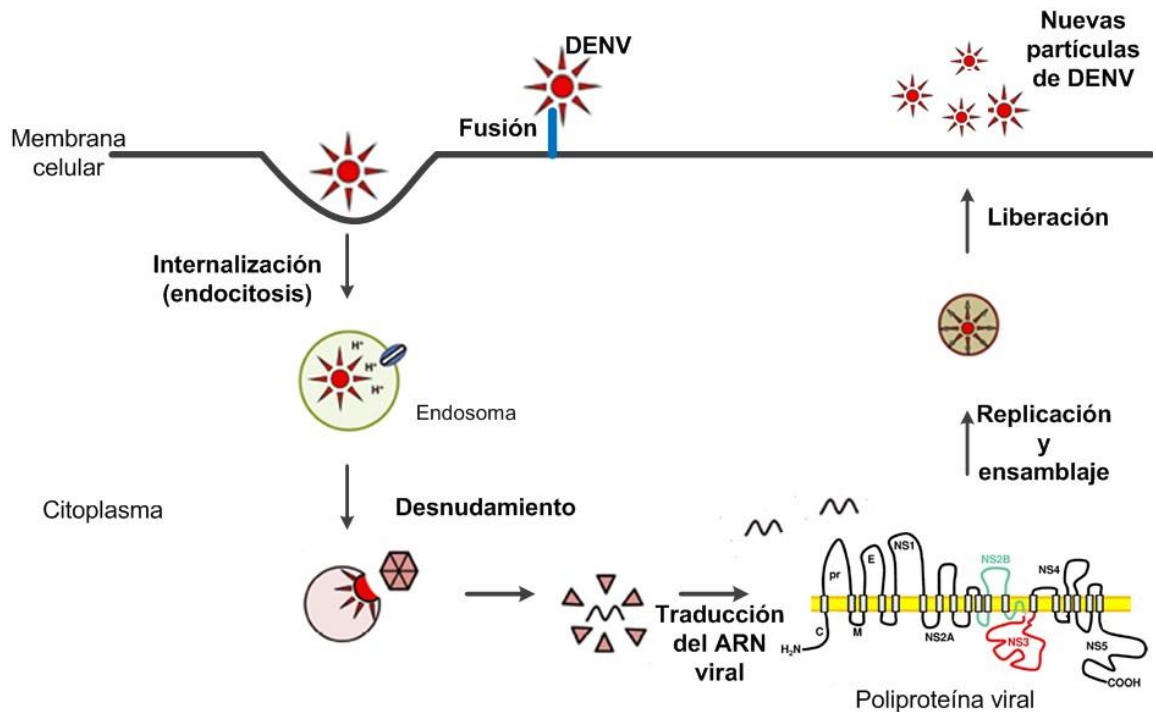


Figura 6. Ciclo de vida del DENV.

2.1.5. Inhibición del virus del dengue

La protección contra infecciones virales puede llevarse a cabo según dos métodos principales: la vacunación o el uso de fármacos. La vacunación funciona introduciendo al organismo un material que guarda una similitud molecular con algunos componentes del virus (fragmentos de virus o virus debilitados) pero sin la naturaleza infecciosa o los efectos tóxicos del mismo, dando la oportunidad de que el organismo reconozca la huella dactilar molecular del virus (antígenos) y el sistema inmune esté preparado para atacar el virus en caso de ser infectado.

Sin embargo, existen varios problemas con las vacunas, como un sistema inmune comprometido, la mutación de los virus, o la amplificación dependiente de anticuerpos, entre otros. Los fármacos antivirales en cambio, son útiles neutralizando el virus en

aquellos casos en donde no haya vacuna disponible, además de ser efectivos una vez la infección se encuentre activa. Los fármacos son, por lo general, moléculas pequeñas descubiertas principalmente mediante el estudio biológico del ciclo de vida del virus y/o distintos estudios de modelado molecular. La mayoría funciona interrumpiendo una etapa crítica en el ciclo de vida o la síntesis de ácidos nucleicos específicos para cada virus.^[3] Considerando las dificultades en el desarrollo de una vacuna efectiva y para poder tratar individuos ya infectados el enfoque farmacológico es el más atractivo para combatir el virus del dengue.^[4]

En el ciclo de vida del virus del dengue se ven involucrados diferentes procesos enzimáticos, algunos de ellos plenamente identificados como por ejemplo las actividades de proteasa, helicasa, metiltransferasa o polimerasa del complejo de replicación en la poliproteína (**Figura 5**), así como también pasos previos a la traducción del genoma viral (interacción entre la proteína viral de envoltura **E** y la superficie celular). Cada una de estas enzimas puede ser enfocada como blanco terapéutico de un potencial inhibidor (**Figura 7**), existiendo diferentes compuestos reportados para cada uno de ellos.

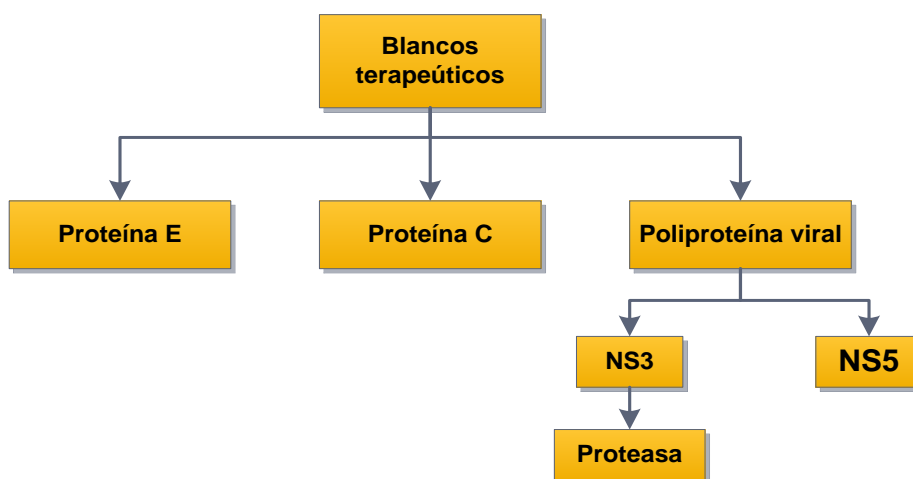


Figura 7. Posibles blancos terapéuticos de un inhibidor del DENV.

2.1.5.1. Inhibición de las proteínas E y C

La proteína **E** es la mediadora de la absorción, internalización y fusión del virus con las células huésped. Existen varios compuestos que han mostrado actividad inhibitoria sobre esta proteína como por ejemplo los péptidos **1** y **2** (**Figura 8**), cuyo mecanismo de acción consiste en inducir cambios estructurales sobre la superficie del virión para así de interferir con el proceso de unión a la superficie celular en el primer paso del ciclo de vida del **DENV**. En esta proteína hay también una cavidad hidrofóbica (cavidad β -OG) que ha demostrado ser un potencial sitio activo para la inhibición, habiendo compuestos no peptídicos como **3**, **4** y **5** con cierta actividad antiviral. Por último, se han estudiado posibles compuestos que actúen sobre el dominio III, responsable del contacto inicial y la acumulación de los virus en la superficie celular, tales como la suramina **6** o el curdlán **7**, análogo de la heparina.^{[18][19]} Por otro lado, la proteína estructural **C**, también destaca como un blanco prometedor para el desarrollo de antivirales como la molécula ST-148 (**8**) que afecta la distribución intracelular traducándose en una infectividad potencialmente menor, particularmente en el **DENV2**.^{[18][19]}

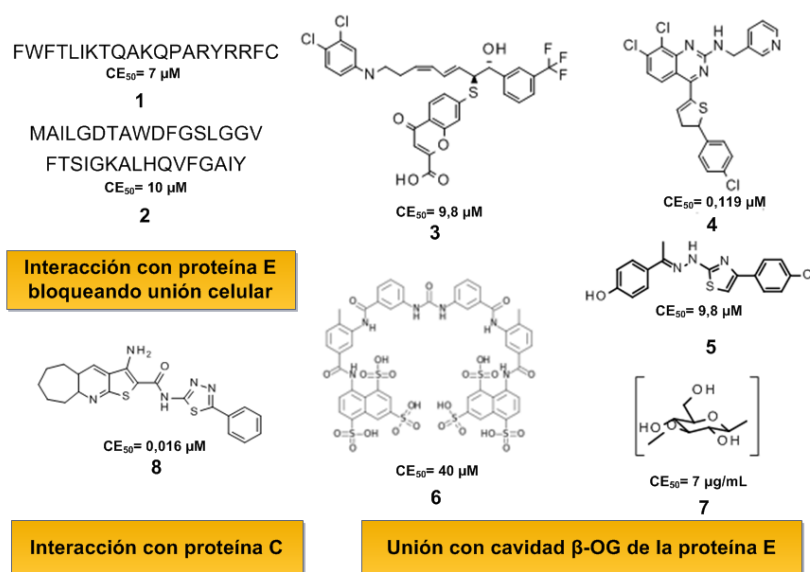


Figura 8. Inhibidores de las proteínas estructurales E y C.

2.1.5.2. Inhibición de la proteasa NS2B/NS3

Las proteasas son enzimas fundamentales en el control de una gran variedad de procesos fisiológicos. Su acción está regulada por inhibidores endógenos y son los responsables de la modulación de la reacción de diversas hormonas y neurotransmisores de naturaleza peptídica como resultado de la hidrólisis selectiva de ciertos fragmentos de su estructura. Durante los últimos años, el empleo de inhibidores de proteasas, tanto de origen natural como sintético, ha adquirido una enorme importancia desde un punto de vista terapéutico, evidenciado por el descubrimiento de inhibidores de la proteasa del **VIH**, el tratamiento más efectivo hasta la fecha contra este virus.^[20]

El blanco más atractivo para la inhibición del **DENV** es la proteasa NS2B/NS3, responsable del clivaje post-traducción de la poliproteína viral, esencial para la replicación del virus. Se trata del blanco terapéutico más estudiado para el desarrollo de potenciales agentes antivirales entre las proteínas no estructurales, además de tratarse de la mejor caracterizada junto con la proteína NS5, existiendo diferentes estructuras obtenidas por cristalografía de rayos-X, sumamente útiles en los estudios de modelado molecular orientados al descubrimiento de potenciales inhibidores.^[4]

Se han publicado un gran número de artículos sobre la caracterización y avances para el descubrimiento de un inhibidor de la proteasa NS2B/NS3 del **DENV** entre los que se puede hacer una clasificación general en cuanto a la estructura de estos compuestos: **inhibidores peptídicos, inhibidores derivados de péptidos** (peptidomiméticos) o **inhibidores no peptídicos**^[4], mostrados en la **figura 9**.

La aprotinina (**9**), un polipéptido compuesto por 58 aminoácidos con 3 puentes de disulfuro internos, tiene una alta afinidad a la proteasa del **DENV**. Debido a su disponibilidad es frecuentemente usado como un compuesto de referencia en ensayos, además de ser uno de los pocos inhibidores para los que una estructura co-cristalizada determinada por cristalografía de rayos X existe. Por su parte el aldehído peptídico Bz-

nKRR-H **10** con una constante de inhibición $k_i=5,8 \mu\text{M}$, tiene una estructura cristalina reportada con la proteasa, revelando el sitio activo de la misma, frecuentemente usada en los estudios de modelado molecular para el descubrimiento de nuevos inhibidores (código PDB: **3U11**). Los inhibidores derivados de péptidos que se han desarrollado y presentan cierta actividad incluyen el compuesto **11** ($k_i=0,14 \mu\text{M}$), o la 4-benciloxi-D-fenilglicina **12** con un $\text{CI}_{50}=0,347 \mu\text{M}$.^[19]

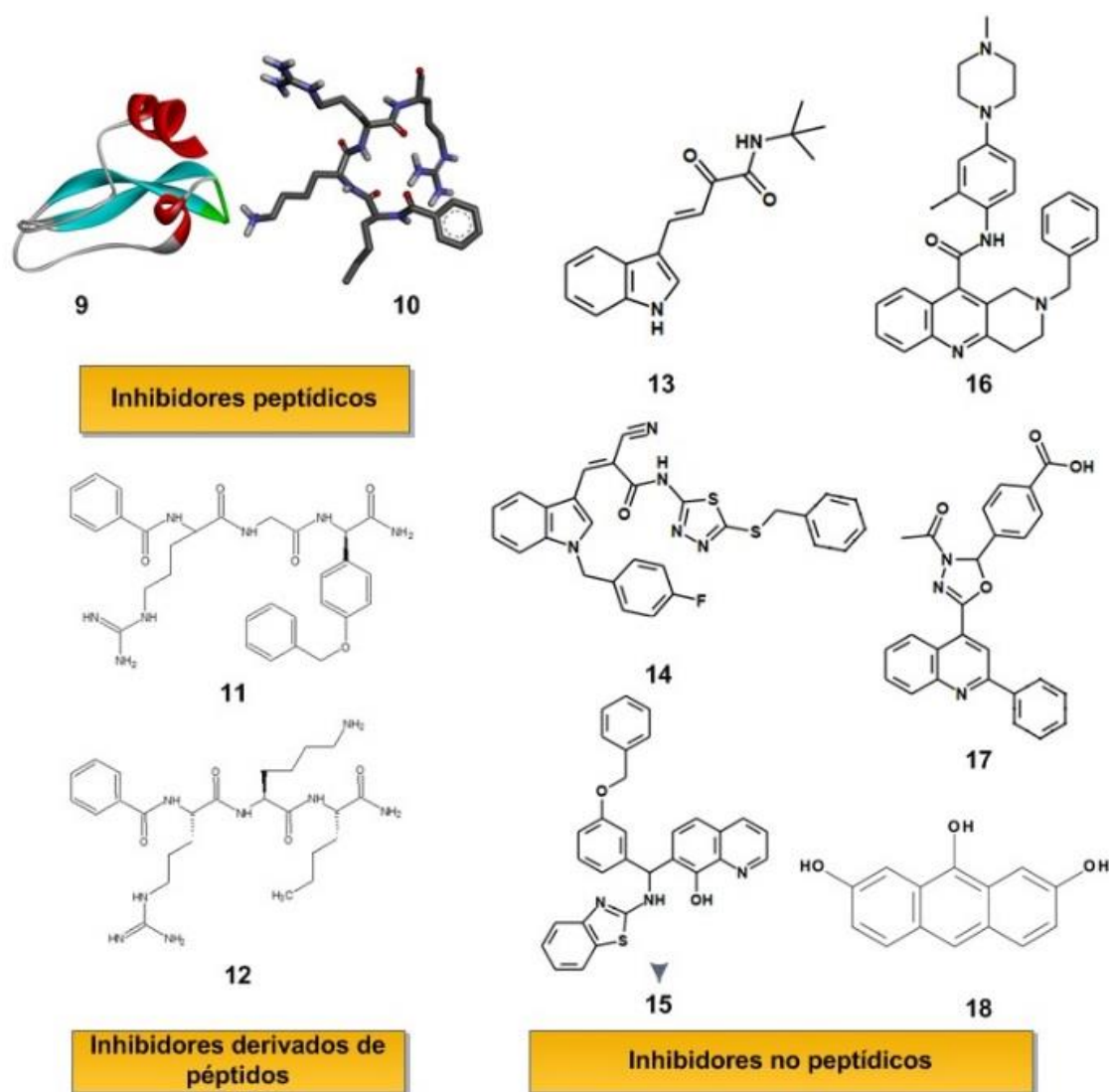


Figura 9. Inhibidores de la proteasa NS2B/NS3 del DENV.

La proteasa NS2B-NS3 es notablemente resistente a la inhibición por moléculas pequeñas. Sin embargo, se ha progresado mucho al respecto mediante el empleo de cribado de alto rendimiento o del tamizado virtual. Además, existe una diversidad estructural muy grande en los inhibidores no peptídicos, por lo que no es posible hacer una clasificación general, permitiendo una **libertad estructural** desde el punto de vista de investigación y desarrollo de posibles fármacos.

Por ejemplo, los indoles **13** y **14** (**Figura 9**) presentan afinidad moderada pero considerable actividad antiviral contra la proteasa NS3 del DENV2, de 39% de inhibición y un CI_{50} de 2,24 μ M respectivamente. Las 8-hidroxiquinolinas^[17] como **15** presentan buena afinidad con un valor de CI_{50} =0,91 μ M. Los derivados de quinolina **16** y **17** obtenidos mediante técnicas computacionales, muestran afinidad moderada pero una prometedora actividad *in vitro* con valores de actividad reportada en un CI_{50} de 5,0 μ M y 12,5 μ M respectivamente. No solo heterociclos con nitrógeno presentan actividad antiviral, sino también derivados de antraceno como **18**, entre varias otras moléculas.^[21]

Muchos fármacos actúan como inhibidores enzimáticos (**Figura 10**), es decir impiden que las enzimas actúen como catalizadores para las reacciones que naturalmente llevan a cabo. En este sentido, cualquiera de los inhibidores de la proteasa NS2B/NS3 descritos en el punto anterior se unen al sitio activo (zona de la enzima a la cual se une el sustrato y en donde se ubica la tríada catalítica) y evitan que lleve a cabo su función, interrumpiendo el ciclo de vida del virus y combatiendo la infección. Este tipo de inhibidores se conoce como inhibidores competitivos.^[3]

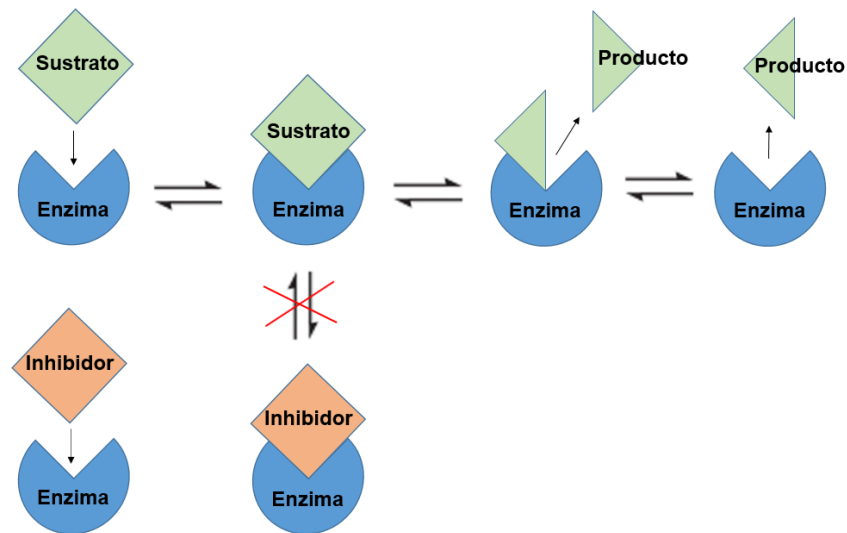


Figura 10. Mecanismo de acción típico de un inhibidor competitivo.

Para que un inhibidor competitivo sea efectivo debe interaccionar fuertemente con los residuos de aminoácidos dentro del sitio activo, pudiendo entonces diseñar moléculas que encajen en el mismo pero teniendo interacciones más eficientes que el sustrato natural, de tal manera que pueda impedir el funcionamiento normal de la misma. Con tal fin, se debe conocer muy la posición y la naturaleza de las regiones de enlace dentro del sitio de unión.^[3]

2.1.5.3. Estructura de la de la proteasa NS2B/NS3

El dominio proteasa del DENV se ubica sobre la proteína no estructural NS3, en su extremo N terminal, e interactúa con ciertas regiones de NS2B que contribuyen al reconocimiento del sustrato por parte de la enzima. Al igual que proteasas de otros *flavivirus* como el del Nilo occidental (WNV), la proteasa del DENV es una serínproteasa con una triada catalítica funcional conformada por los residuos de aminoácidos H51, D75 y S135. El mecanismo consiste esencialmente, en la transferencia del protón del grupo

hidroxilo del residuo de serina a la histidina, auxiliado por el residuo de aspartato, convirtiéndolo en un nucleófilo fuerte para el posterior clivaje de los enlaces peptídicos de ciertas regiones la poliproteína (sustrato natural de la enzima), esencial en el ciclo de vida del virus.^{[4][16][18]}

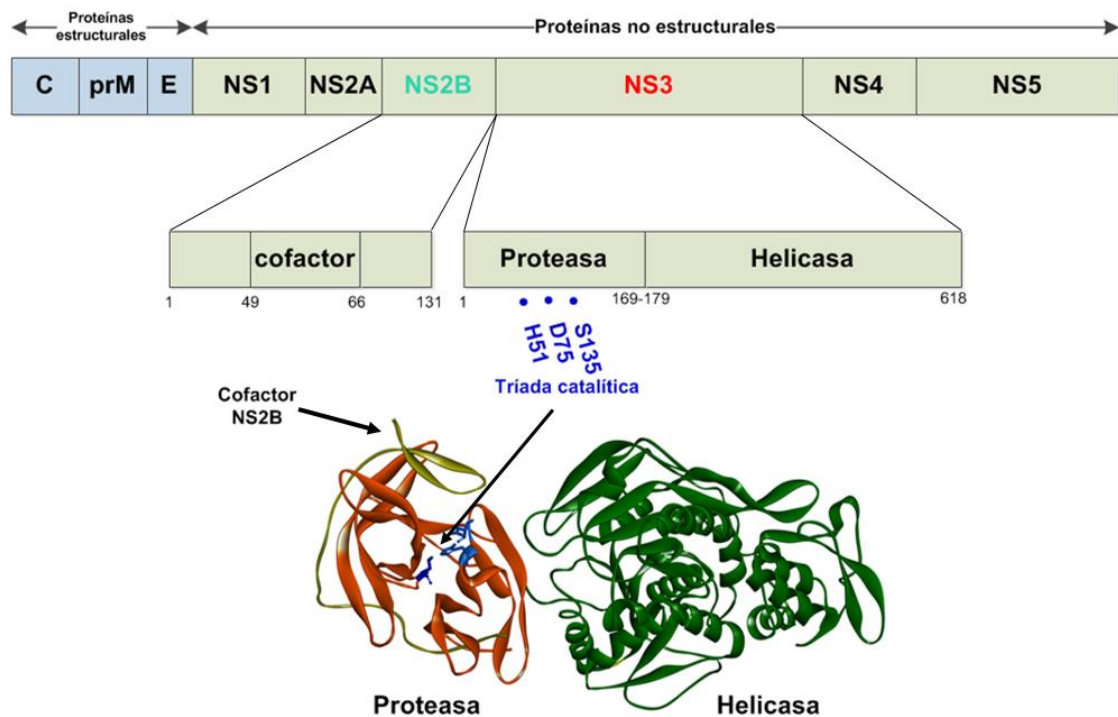


Figura 11. Estructura terciaria de la proteína NS2B/NS3 del DENV.

Se muestran los dominios proteasa (naranja) y helicasa (verde), el cofactor NS2B (amarillo) y la tríada catalítica (azul).^{[4][16][18]} PDB: 2VBC, 3U11

Existen dos conformaciones conocidas de la proteasa del DENV, comúnmente empleadas en los estudios de modelado molecular. En una de ellas, denominada conformación *cerrada*, el cofactor NS2B se encuentra plegado sobre el sitio activo catalítico de la enzima permitiendo la interacción con el ligando y definiendo la cavidad. Por otra parte, en la conformación *abierta*, dicho cofactor no presenta tal plegamiento.^[18]

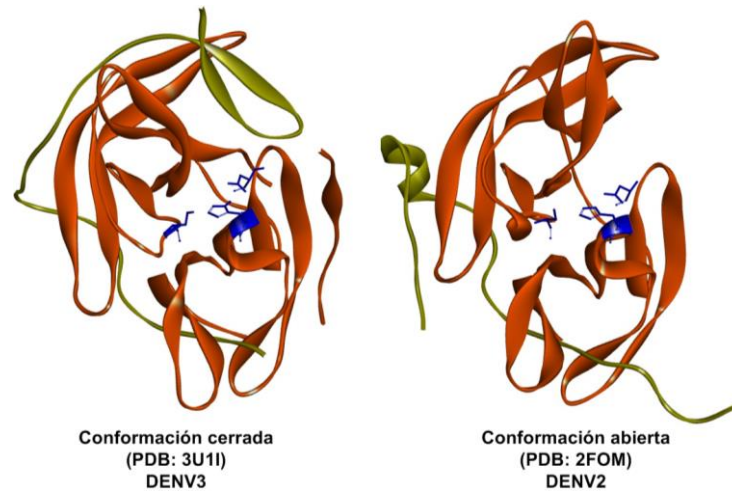


Figura 12. Conformación abierta y cerrada de la proteasa NS2B/NS3 del DENV.

El cofactor NS2B se muestra en amarillo, el dominio proteasa de NS3 en rojo y la tríada catalítica en azul.

La conformación cerrada suele ser interpretada como consecuencia de la unión del ligando o sustrato, promoviendo el plegamiento del cofactor desde la conformación abierta. Otros estudios, sin embargo, demuestran por RMN y otras técnicas espectroscópicas que la conformación predominante en solución es la cerrada, independientemente de si existe o no un ligando unido a ella, similar a otras proteasas como la del virus del nilo occidental (**WNV**), familia del **DENV**.^[18]

A partir de la estructura cristalina determinada por rayos X de la conformación cerrada, **código PDB:3U11**, co-cristalizada con un ligando peptídico, se ha logrado definir la topología del sitio activo. En este sentido, el mismo se divide en 4 diferentes subcavidades denominadas comúnmente S1, S2, S3 y S4 además de una S1' (**Figura 14**). S1 y S2 están bien definidas como cavidad, con algunos residuos de naturaleza polar, mientras que S4 es una región hidrofóbica superficial. En contraste con otras proteasas como la tripsina, la NS2B/NS3pro tiene un sitio activo muy superficial lo que conlleva a algunos autores a denominarlo como *región de unión* o *canales*.^[4]

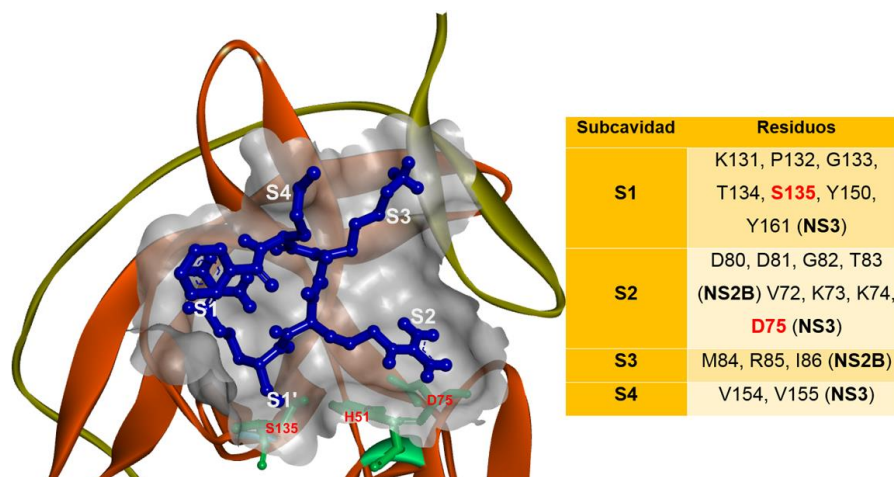


Figura 13. Descripción del sitio activo de la proteasa NS2B/NS3 del DENV.

En azul el ligando peptídico **10**, en amarillo la cadena **NS2B** y en naranja la cadena **NS3**.^{[4][18][19]}

Hasta ahora se han presentado diferentes compuestos no peptídicos con cierta actividad inhibitoria entre los que resaltan anillos aromáticos tipo antraceno, índoles y particularmente quinolinas (**15**, **16** y **17**) cuyo núcleo es de gran relevancia farmacológica, no solo para el **DENV** sino para un sinfín de afecciones, por lo que la síntesis de las mismas es de vital importancia en la búsqueda de un potencial fármaco.

2.2. Química de las Quinolinas

La quinolina (1-aza-naftaleno o benzo[b]piridina) es un compuesto heterocíclico aromático que contiene un átomo de nitrógeno. Tiene una fórmula molecular C_9H_7N , con un peso molecular de 129,16 g/mol. El coeficiente de repartición ($\log P$) es de 2,04 con un $pK_b=4,85$ y un $pK_a=9,5$. Es una base terciaria débil que puede formar sales con ácidos y exhibe un comportamiento similar a la piridina y el benceno. Se trata de un líquido incoloro con alto punto de ebullición con un olor dulzón, ligeramente soluble en agua, y soluble tanto en agua caliente como en solventes orgánicos. Participa en reacciones electrofílicas y nucleofílicas aromáticas.^[22]

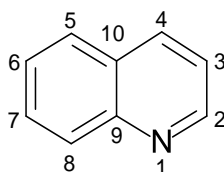


Figura 14. Estructura y posiciones de la quinolina.

La presencia de nitrógeno en la estructura ocasiona una distribución irregular de la densidad electrónica, lo que altera notablemente su reactividad y propiedades fisicoquímicas comparadas con el naftaleno. El nitrógeno, electronegativo, causa una polarización inducida a lo largo de los enlaces sigma de la estructura, afectando ligeramente la nube π y estabilizando las estructuras canónicas en donde el nitrógeno esté cargado negativamente. En consecuencia hay cargas parciales positivas ubicadas principalmente en las posiciones 2 y 4 evidenciado por los desplazamientos químicos:^{[22][23]}

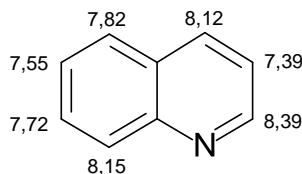


Figura 15. Desplazamiento químico de protones de la quinolina.

La quinolina, al igual a la piridina, sufre un conjunto de reacciones sencillas como por ejemplo donar el par de electrones libres sobre el átomo de nitrógeno a un electrófilo (comúnmente un protón) para dar lugar a las sales de quinolinio. Esta reacción ácido-base no destruye la aromaticidad del heterociclo ya que esta ocurre perpendicular a la nube π del mismo. Además, las sustituciones electrofílicas aromáticas ocurren principalmente en el anillo bencénico, en su posición más activada debido a la mayor presencia de densidad electrónica. Por su parte, las sustituciones nucleofílicas aromáticas ocurren principalmente en el anillo piridínico por su deficiencia electrónica.^[22]

2.2.1. Síntesis de Quinolinas

Las quinolinas pueden obtenerse mediante diversas rutas sintéticas, pudiéndose proponer diversos análisis retrosintéticos: ya sea considerando una desconexión C₂-N seguida de una desconexión C₄-C₅ o, considerando primero una desconexión C₂-N con posterior ruptura del enlace C₃-C₄. Entre estas dos opciones se encuentran englobadas las principales rutas sintéticas resumidas a continuación ^{[23] [24] [25]}

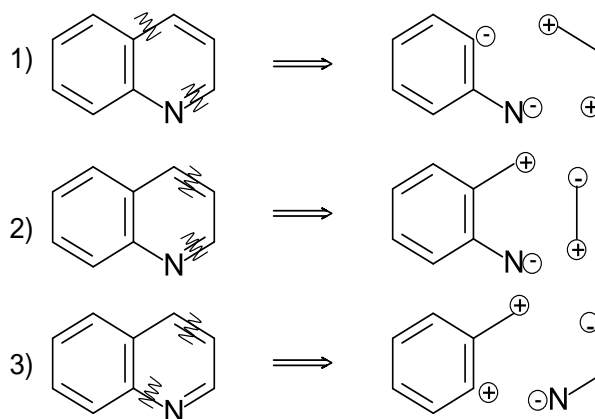


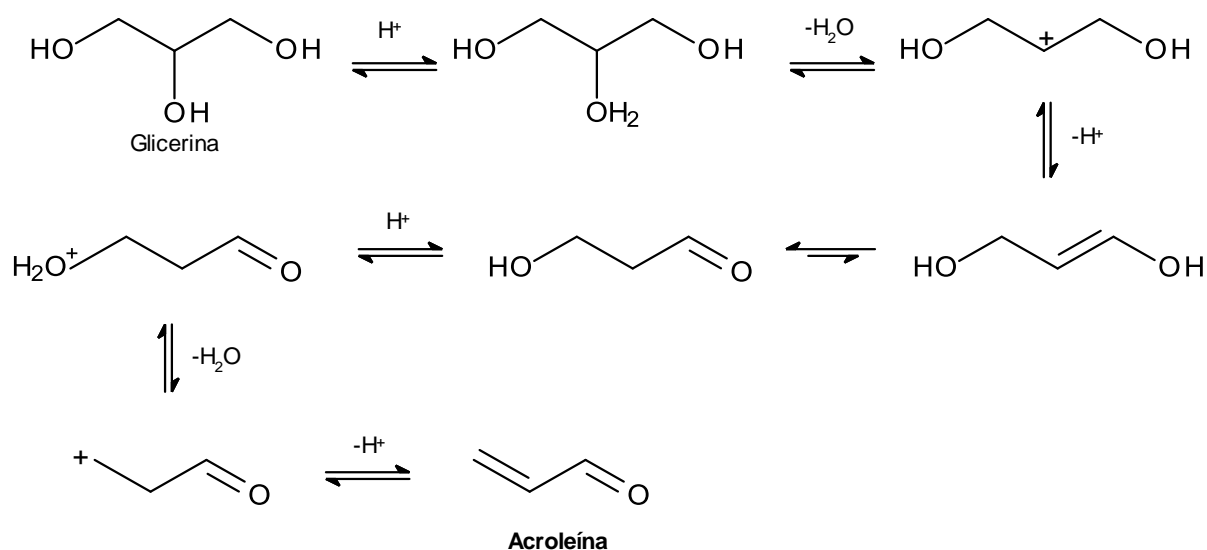
Figura 16. Análisis retrosintéticos de la quinolina.

El primer análisis retrosintético abarca las síntesis de Skraup, Combes, Conrad-Limpach-Knorr y Vilsmeier Haack. El segundo, por su parte, comprende la síntesis de Friendlander y por último, un enfoque un poco menos frecuente, las síntesis en donde no se parte de una amina aromática sino que el anillo bencénico sufre una S_NA por parte de una amina.

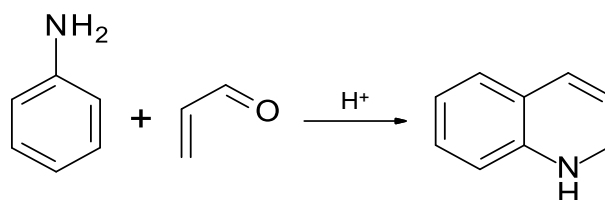
2.2.1.1. Síntesis de Skraup

La quinolina es obtenida cuando la anilina, ácido sulfúrico concentrado, glicerol y un agente oxidante moderado (como nitrobenzeno) son calentados juntos. La reacción procede vía deshidratación del glicerol para generar la acroleína, posterior ataque nucleofílico de la anilina y finalmente oxidado a la quinolina correspondiente. Es la mejor reacción para la síntesis de quinolinas no sustituidas.

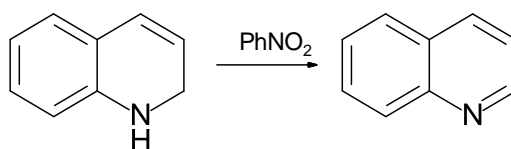
El glicerol sufre una doble deshidratación:



Entre la anilina y la acroleína se produce una adición de Michael, catalizada por el ácido, que conduce la 1,2-dihidroquinolina:



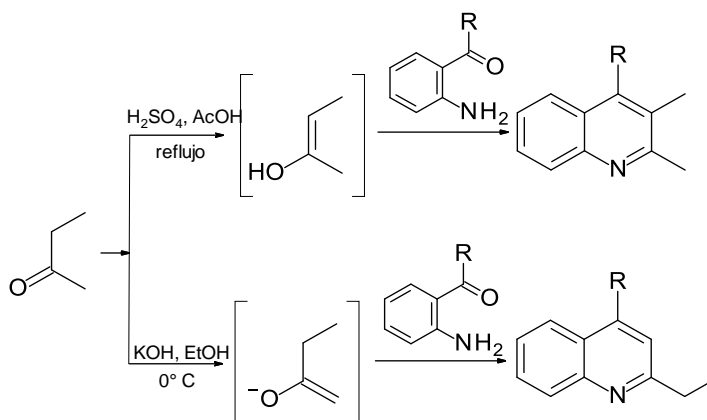
Finalmente, la 1,2-dihidroquinolina se oxida con el nitrobenceno a quinolina:



El uso de compuestos carbonílicos sustituidos corrobora el mecanismo por el que la reacción se lleva a cabo y no por adición directa al carbonilo. Por otra parte la reacción de Skraup es muy vigorosa por lo que la temperatura debe ser controlada. Tiene la desventaja de no poder emplearse sobre sustratos sensibles a ácidos, aun así es el mejor método para la síntesis de quinolinas no sustituidas en posiciones 2 y 3.

2.2.1.2. Síntesis de Friedlander

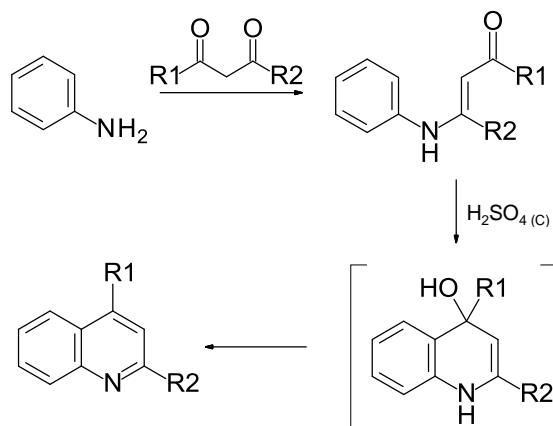
Las *o*-acilanilinas condensan con carbonilos enolizables a través de un proceso catalizado por ácido o base para formar las correspondientes quinolinas. El resultado de la condensación depende de la catálisis ácida o básica para generar el producto termodinámico o cinético respectivamente.



La reacción transcurre más rápidamente en medio básico a bajas temperaturas (control cinético), mediante la formación del enolato menos impedido estéricamente. Mientras que en medio ácido a altas temperaturas se favorece la formación del enol más estable (control termodinámico), es decir el más ramificado.

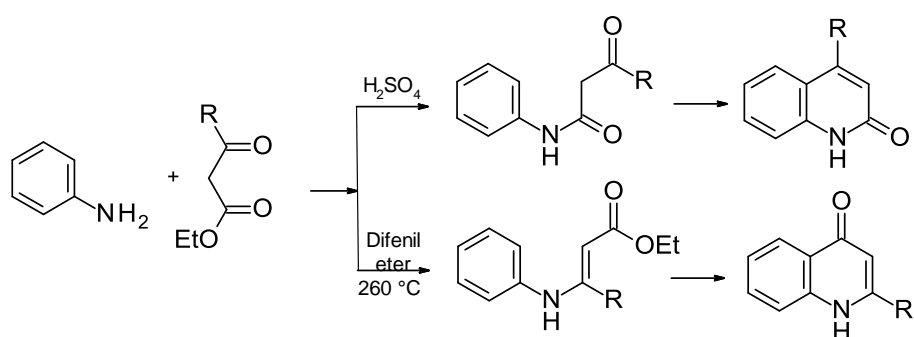
2.2.1.3. Síntesis de Combes

La condensación de compuestos 1,3 dielectrofilicos, como por ejemplo 1,3 dicarbonílicos, con una anilina da lugar a una β -aminoenona, que puede ser ciclada con ácido sulfúrico concentrado.



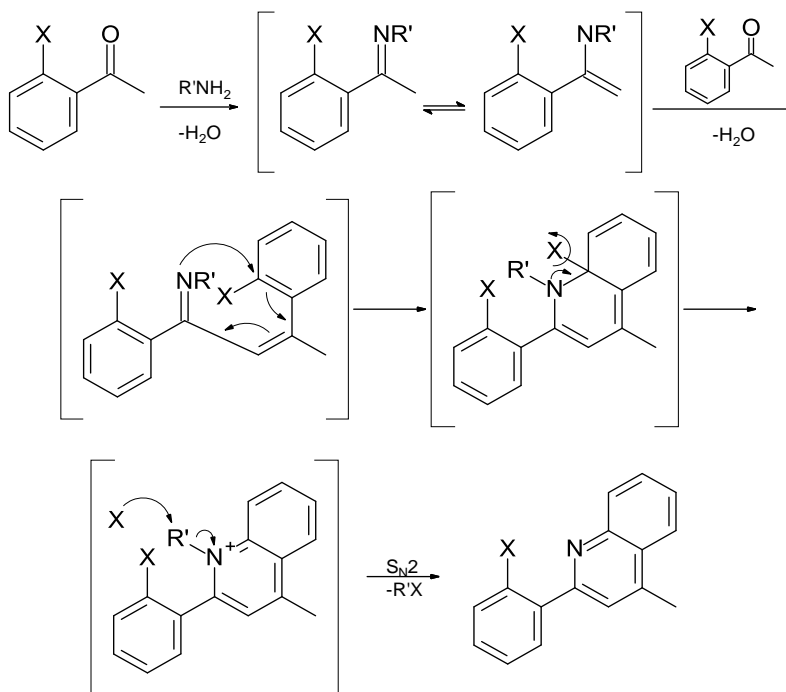
2.2.1.4. Síntesis de Conrad-Limpach-Knorr

Las anilinas y los cetoésteres condensan en presencia de ácidos fuertes para formar 2-quinolonas (Síntesis Knorr) vía las correspondientes β -cetoanilidas. Mientras que la reacción que involucra los ésteres β -anilinoacrilicos dan como producto las 4-quinolonas (Síntesis Conrad-Limpach)



2.2.1.5. Otras Síntesis

En las rutas principales de síntesis se parte de una amina aromática y se va construyendo el resto del anillo quinolínico progresivamente. Sin embargo, existe otro enfoque en donde se parte de un anillo bencénico y, mediante sustitución nucleofílica aromática y reacciones de ciclación se obtiene la quinolina correspondiente. Un ejemplo de esto es la síntesis reportada por Qi y col.^[26] en donde una quinolina sustituida es formada por la condensación y ciclación de dos moléculas de *o*-haloacetofenonas y una amina primaria.

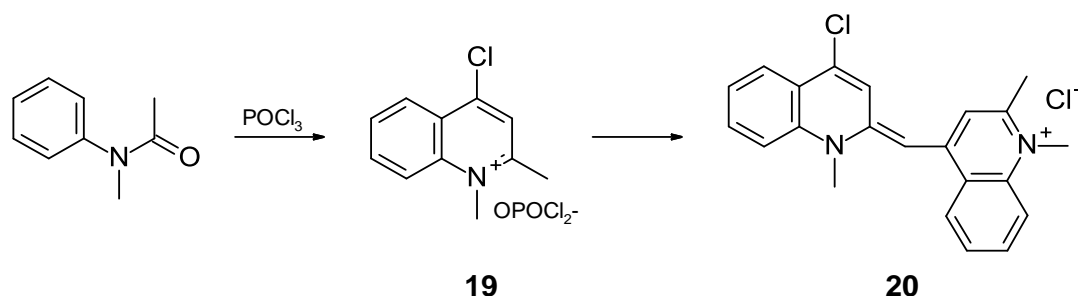


2.2.1.6. Síntesis de Vilsmeier-Haack

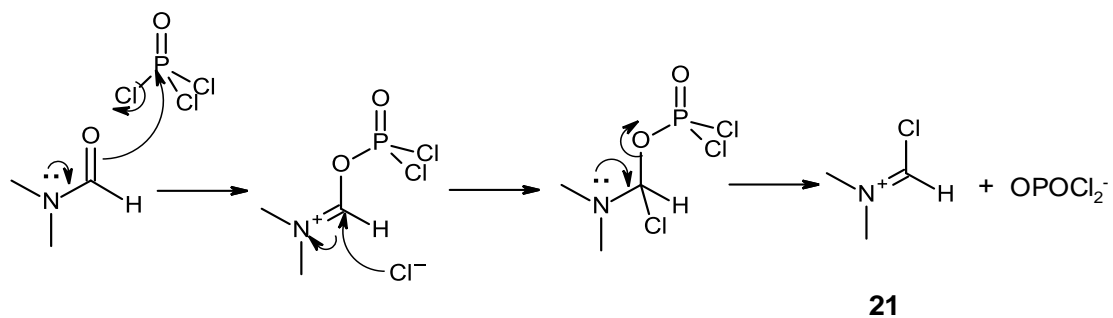
La reacción de Vilsmeier-Haack es un método eficiente, económico y de condiciones suaves para la formulación de compuestos aromáticos y heteroaromáticos activados como aminas o fenoles.^[27] Es empleada también como herramienta sintética para dar lugar a una gran variedad de heterociclos y puede ser empleada sobre compuestos alifáticos^[28], especialmente carbonilos^[29], obteniendo una serie de derivados muy versátiles. Es una reacción útil como agente activante de ácidos carboxílicos para dar ésteres, amidas y cloruros de ácido o sobre alcoholes para dar cloruros de alquilo, ésteres e imidas. Además la reacción ha sido ampliamente usada para muchas otras transformaciones químicas con otras clases de compuestos.^[30]

Su descubrimiento se remonta a 1896, cuando Friedel notó la formación de un colorante rojo al tratar N-metilacetanilida con oxiclorigo de foforo. Más tarde, en 1925,

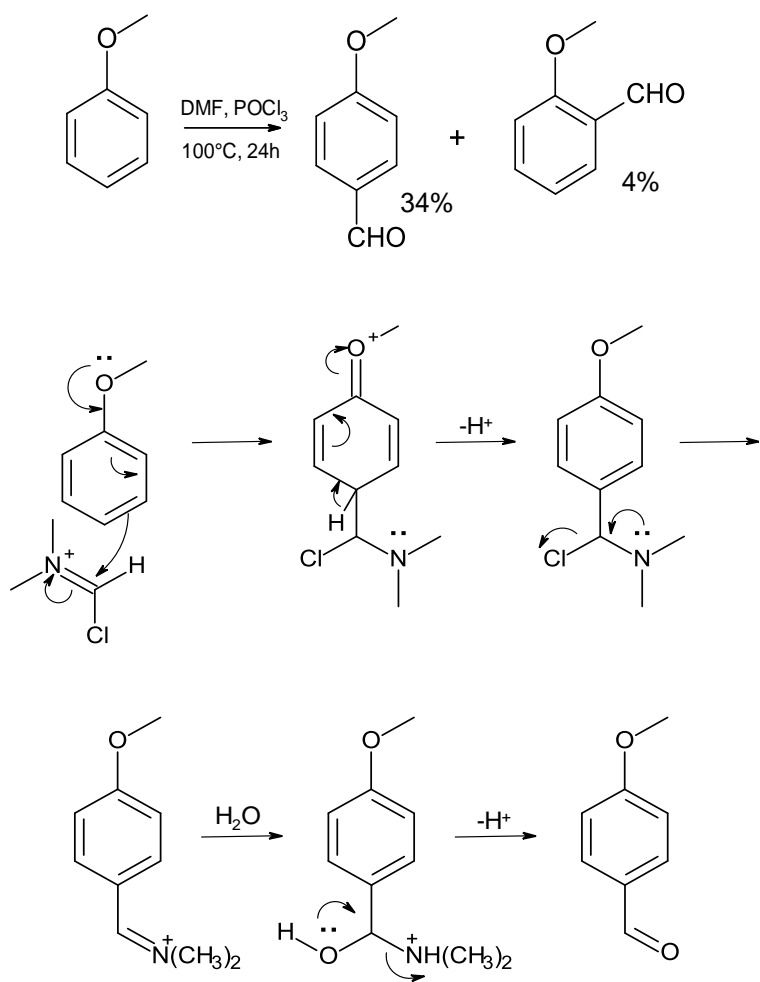
Fischer, Müller y Vilsmeier asignaron una estructura corregida a este colorante **20**, proveniente de la autocondensación de la sal de quinolinio **19**. Sin embargo no fue hasta dos años después en 1927 que A. Vilsmeier y A. Haack establecieron el mecanismo, en el que se percataron que una molécula de N-metilacetanilida había acetilado una segunda molécula, previo a la ciclación. Este paso llevó al descubrimiento de la formilación de Vilsmeier-Haack usando N-metilformanilida.^{[31][32]}



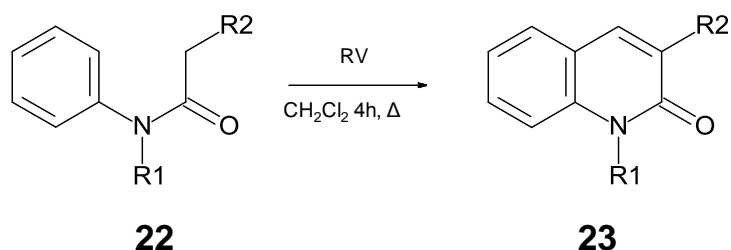
La reacción involucra el reactivo de Vilsmeier (RV), derivado de una amida terciaria y un cloruro de ácido (ocasionalmente un bromuro). Los más empleados son N,N-dimetilformamida (DMF) y oxiclorigeno de foforo, aunque también se han empleado exitosamente COCl_2 , SOCl_2 , ClOCl , CH_3COCl , ArCOCl , ArSO_2Cl , PCl_5 , $\text{Me}_2\text{NSO}_2\text{Cl}$ como clorigeno de ácido y N,N-dimetilacetamida, N-metilacetamida, N,N-dimetilbenzamida como amidas. Los solventes comúnmente usados son clorigeno, diclorometano, benceno, tolueno, 1,2-dicloroetano, etc. Normalmente la temperatura de reacción es llevada a temperatura ambiente o en su defecto a 60-80°C, aunque se han reportado temperaturas que van desde 0 hasta 120 °C. Los sustratos incluyen compuestos aromáticos o heteroaromáticos activados, alquenos (incluyendo enaminas y derivados de enol), metilcetonas o metilencetonas. El reactivo de Vilsmeier **21** ha demostrado tener la siguiente estructura y mecanismo de formación ^{[31][33]}:



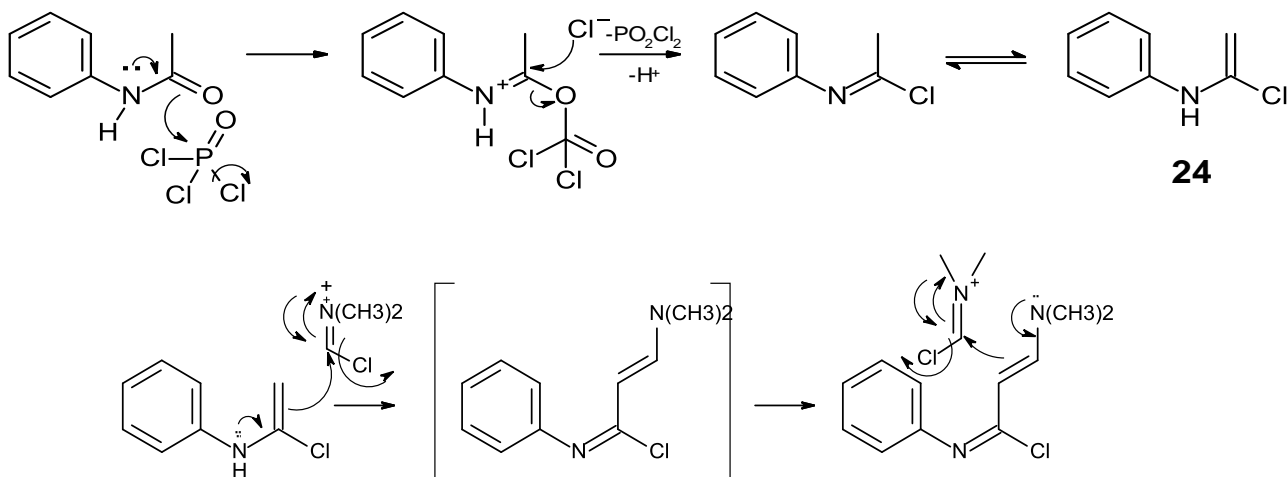
El mecanismo de formilación típico, sobre el anisol, mediante la reacción de Vilsmeier-Haack se muestra a continuación.^[34]

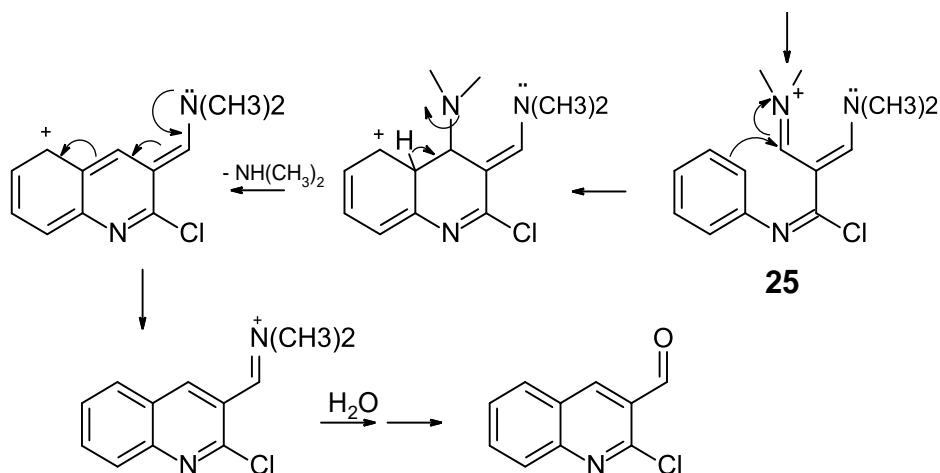


Probablemente la aplicación más importante de la reacción de Vilsmeier en la síntesis de compuestos heterocíclicos deriva de la reacción original de síntesis de quinolinas, prácticamente ignorada por casi 50 años. El sustrato original estudiado por Vilsmeier, anilidas N-sustituidas **22**, son compuestos muy reactivos para la formación de quinolinas. Tal sustrato al tratarlo con el RV da lugar a 2-quinolonas **23**.^[31]



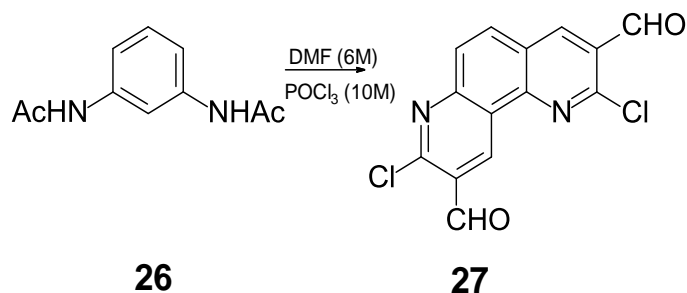
La reacción de acetanilidas con el RV es una ruta eficiente para la síntesis de 2-cloro-3-formilquinolinas mediante diformilación de la cadena lateral. La reacción involucra la conversión sucesiva de la acetanilida en un cloruro de imidoilo y luego en una N- α -clorovinilánilina **24**. Esta enamina es diformilada en su posición β y subsecuentemente ciclada a la quinolina correspondiente.^[31]





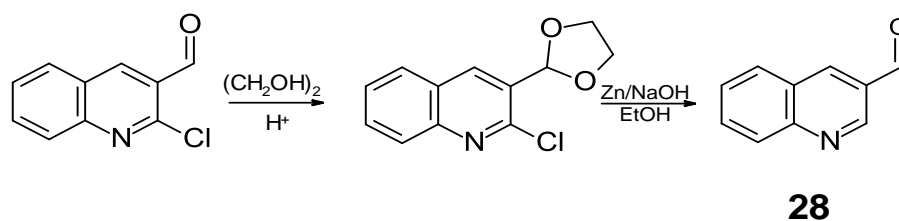
La ciclación de la cadena lateral del intermediario diformilado se ve favorecida cuando la acetanilida se encuentra sustituida con grupos dadores de electrones tales como *m*-metoxi, *m*-metil, 3,4-dimetoxi o 3,4,5-trimetoxi, casos en los que se obtienen altos rendimientos. Por el contrario, acetanilidas menos activadas ralentizan la formación de la quinolina correspondiente pudiendo aislar el intermediario diformilado **25** mientras en otros casos de alta desactivación la reacción no sigue su curso. Además, sustituyentes poco activantes como *m*-cloro, *m*-bromo, nitro, etc. reducen considerablemente los rendimientos.^[35]

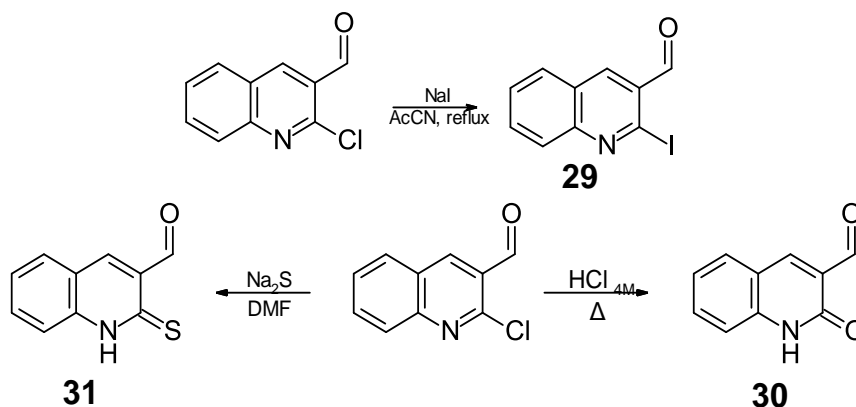
La reacción es estereoespecífica, en prácticamente ningún caso donde pueden proponerse dos ciclaciones se encontraron dos isómeros. Por ejemplo, la *m*-fenilendiamina **26** da como único producto la 1,5-fenantrolina **27** en rendimiento casi cuantitativo. Esto se atribuye a las condiciones electrofílicas, los requerimientos estéricos y la naturaleza dipolar de los intermediarios.^[35]



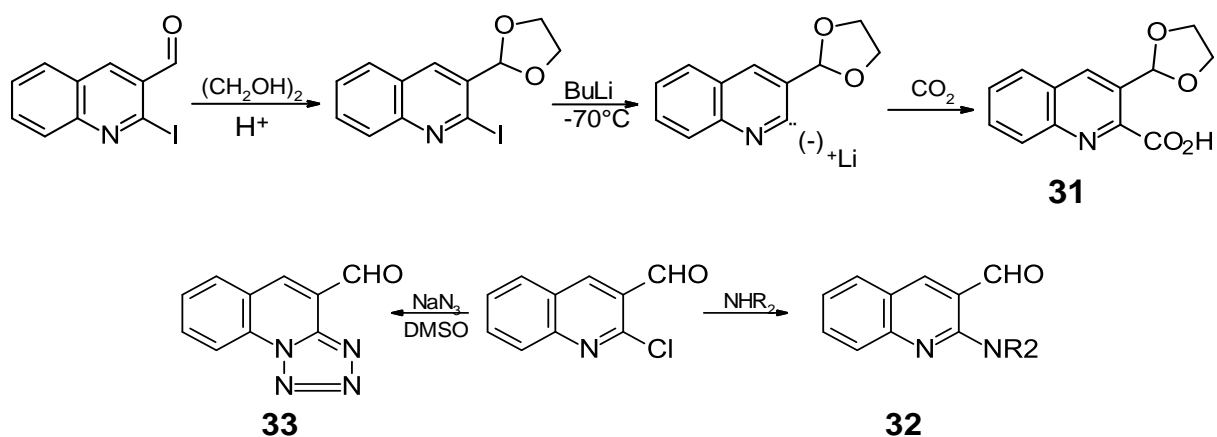
La relación molar de la reacción juega un papel crucial para la formación del producto deseado. Normalmente, para la formación del producto, se emplea una relación molar 1:3:7 (acetanilida:DMF:POCl₃), Sin embargo, al cambiarla por 1:1:3 solo se obtiene la 2-cloroquinolina correspondiente.^[36] La preparación del RV se realiza a 0-5°C y la temperatura de la reacción normalmente oscila entre 75-90°C por un tiempo variable de al menos 2 h hasta 16 h dependiendo de la sustitución del anillo.

Las 2-cloro-3-formilquinolinas son intermediarios muy versátiles desde el punto de vista sintético pudiendo realizar un gran número de transformaciones químicas^{[37][38]}: la reducción del cloro en posición 2 (**28**) es posible a través de varios métodos, como la reducción con Zinc e hidróxido de sodio etanólico previa protección del aldehído con un acetal. También es posible intercambiar el hidrógeno por yodo (**29**) mediante la acción de yoduro de sodio, en condiciones de reflujo, empleando acetonitrilo como solvente, así como la hidrólisis empleando HCl 4M en caliente para dar lugar a las 2 quinolonas (**30**). Se pueden obtener las correspondientes 2-tionas (**31**) al exponer la cloroquinolina a la acción de sulfuro de sodio en DMF.

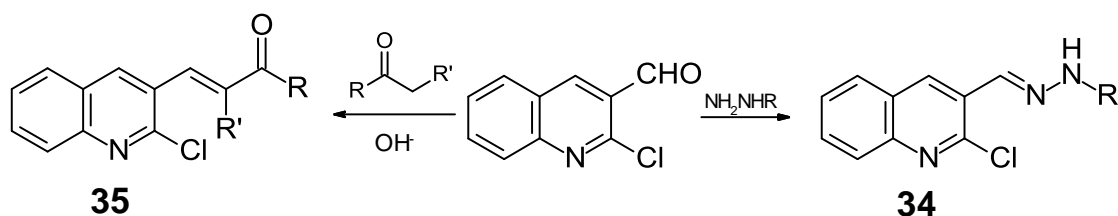




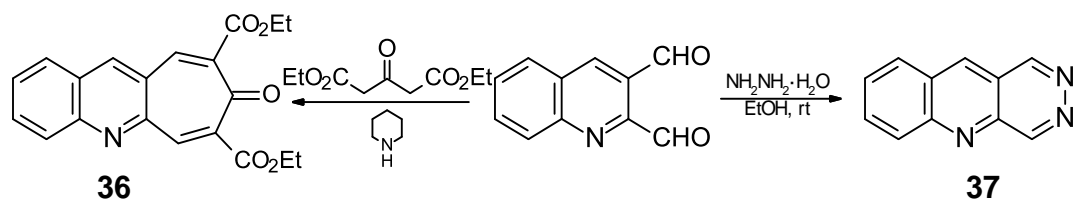
Los grupos funcionales en la posición 2 del anillo quinolínico que se pueden obtener a través del derivado de litio son variados. El acetal correspondiente de la 2-yodo-3-formilquinolina intercambia su halógeno por el metal de Bu-Li a -70°C . Posteriormente la reacción con agua, CO_2 o dimetilformamida permite obtener las quinolinas sustituidas en posición 2 por grupos H, ácido carboxílico **31** y formilo. Otra sustitución frecuente en la posición 2 es por diferentes aminas, especialmente secundarias **32** ya que las primarias tienden a reaccionar con el grupo formil de la posición 3, entre estas aminas se encuentran piperidina, morfolina o similares. Por otro lado, el tratamiento con azida de sodio en dimetilsulfoxido da lugar a la tetrazoloquinolina **33**.



Las aminas primarias como la hidrazina y N,N-dimetilhidrazina reaccionan con el aldehído de la 3-formilquinolina para formar las hidrazonas correspondientes (**34**). Además, se han reportado condensaciones del grupo aldehído en posición 3 con ácido cianoacético, cianoacetato de etilo y ácido malónico que proceden normalmente dando los productos de condensación **35**.

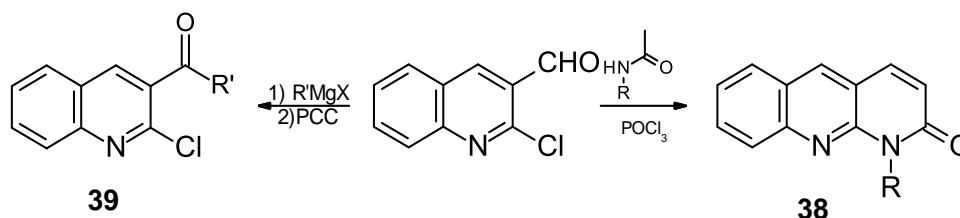


La formación de un nuevo ciclo en las posiciones 2 y 3 de la quinolina es otra aplicación importante. Nucleófilos nitrogenados bidentados no dan lugar a nuevos ciclos, sin embargo nucleófilos tipo sulfuro, como el 2-sulfanilacetato de metilo, atacan preferiblemente la posición 2 pudiendo ciclar posteriormente mediante una condensación, con el aldehído de la posición 3. Por otra parte, intercambiando el grupo 2-cloro por un aldehído se puede proceder a una doble condensación con acetona dicarboxilato de etilo para generar la quinolintropona **36** o una condensación con hidracina para dar la piridazinoquinolina **37**.



La formación de las piridoquinolinas es otra ciclación muy versátil, sintetizadas a partir de las 2-cloro-3-formilquinolinas expuestas a una solución de una amida secundaria, como por ejemplo acetanilida, en POCl_3 obteniendo el producto deseado **38** en rendimientos aceptables.^[39] Por último, la reacción con un reactivo de Grignard y las

formilquinolinas con posterior oxidación con PCC del alcohol secundario generado permite obtener 3-ceto-2-cloroquinolinas **39** en altos rendimientos.^[38]



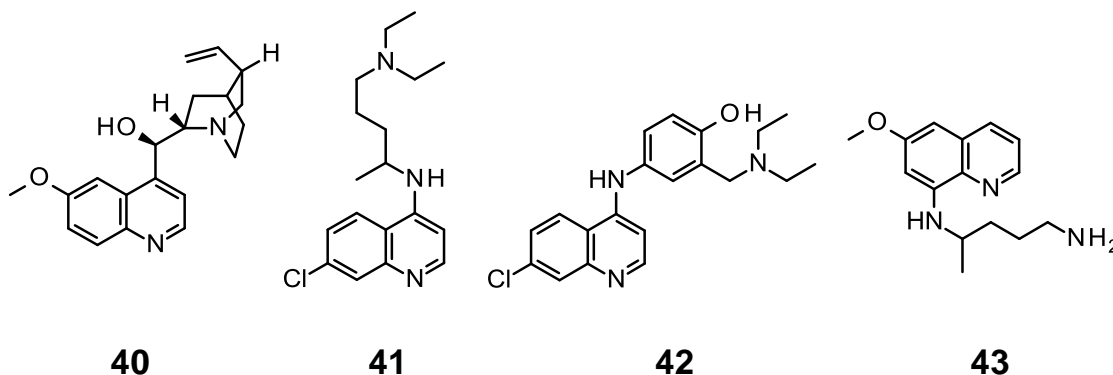
La reacción de Vilsmeier-Haack no se limita a la ciclación para la formación de quinolinas, se han empleado también otros sustratos aromáticos como por ejemplo acetamidotiofenos para dar lugar a tienopiridinas con un mecanismo de formación muy similar.^[37] Por otra parte, también se ha empleado la RV para la formación de formilpirazoles^[41] o imidazolonas^[42] entre otros.

2.2.2. Importancia de la síntesis de quinolinas

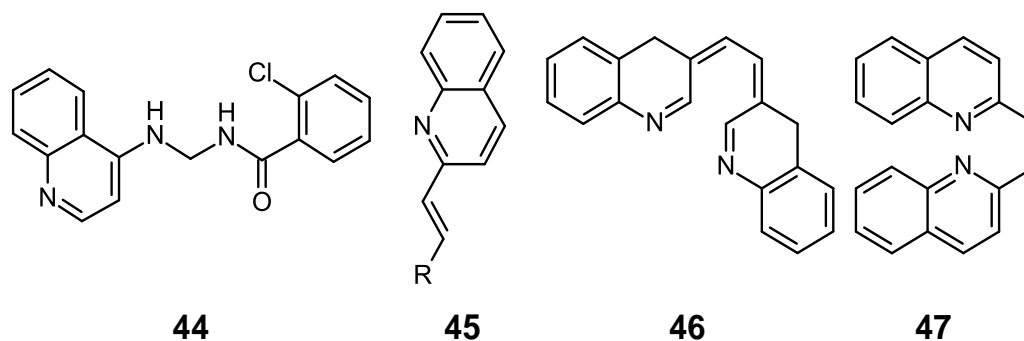
La quinolina fue extraída por primera vez del alquitrán en 1834 por Friedlieb Ferdinand Runge. Es principalmente usada como material de partida, o bloque de construcción, para otros compuestos. Por ejemplo, la 8-hidroxiquinolina es un agente quelante y precursor para pesticidas mientras que la 2 y la 4-alquilquinolinas son precursores de colorantes. El núcleo quinolínico se encuentra frecuentemente en muchos compuestos naturales (alcaloides de cinchona) y sustancias farmacológicamente activas. Las quinolinas han sido efectivas como antimaláricos, anti-bacterial, antifúngico, antihelmíntico, anticonvulsionante, antiinflamatorio, analgésico y antibiótico.^{[22][24]}

La principal aplicación del anillo quinolínico es como un potente antimalárico, más específicamente compuestos derivados de la quinina **40**, uno de los más antiguos antimaláricos aislado por primera vez hacia finales de 1600 de la corteza del árbol de cinchona. Otro de estos compuestos es la cloroquina **41**, sintetizada en 1934 y

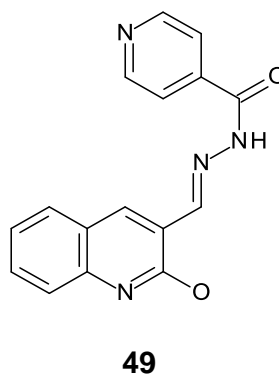
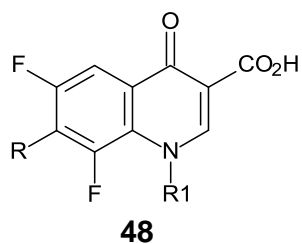
ampliamente usada a partir de 1940. El éxito de este compuesto llevo a una infinidad de derivados de este tipo llevando a otros como la amodiaquina **42**, primaquina **43**, entre otros. [43]



La actividad antiviral en compuestos quinolínicos abarca compuestos como la anilindoquinolina **44** con actividad *in vitro* contra el virus de encefalitis japonesa.[44] Otras como las quinolinas mono y polisustituidas **45-47** han demostrado tener actividad contra el VIH-1.[45]



Las quinolonas feniloxi, fenoxi, feniltio y benciloxi **48** sustituidas han demostrado tener una actividad antibacteriana considerable[46]. Así como también las hidrazonas de las 3-formilquinolinas **49** con una actividad moderada *in vitro*. [47]



La mayoría de los procesos biológicos dependen de las interacciones de los receptores moleculares y sus ligandos, por lo que el reconocimiento molecular juega un papel clave en los eventos biomoleculares tales como: interacciones enzima-substrato, proteína-inhibidor y ácido nucleico-inhibidor. Una metodología comúnmente empleada para estudiar estas interacciones es mediante métodos computacionales, como el acoplamiento molecular o *docking*.^[48]

2.3. Acoplamiento molecular

El *docking* molecular, anglicismo que puede traducirse como **acoplamiento molecular**, es un procedimiento de la química *in silico*, fundamentado en la mecánica molecular, utilizado para predecir la estructura de complejos ligando-receptor, siendo el receptor una **proteína** u oligómero y el **ligando** una molécula pequeña, un péptido o incluso otra proteína. Desde los primeros algoritmos desarrollados en los años '80, el acoplamiento molecular se ha convertido en una herramienta esencial en el descubrimiento de fármacos, incluyendo aplicaciones en relaciones estructura-actividad (**SAR** por sus siglas en inglés), optimización de compuestos líder, encontrar compuestos líder mediante tamizado virtual, etc. Además es uno de los métodos más frecuentemente usados en el diseño de fármacos basados en estructura del receptor (**SSBD** por sus siglas en inglés), permitiendo el diseño de ligandos que contienen las características estructurales y electrostáticas necesarias para la eficiente modulación del receptor, causando la interferencia de ciertos procesos celulares produciendo el efecto farmacológico deseado.^{[49][50][51]}

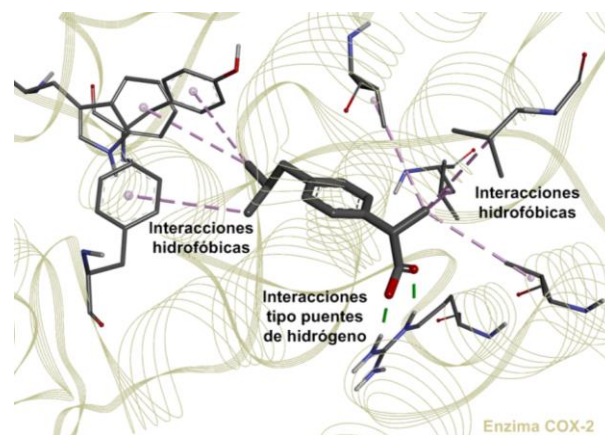


Figura 17. Ibuprofeno acoplado a la enzima COX-2.

Se muestran las interacciones con algunos residuos de aminoácidos de la proteína (líneas punteadas)

Estas interacciones son las que hacen posible la unión.^{PDB: 4PH9}

La interacción **ligando-proteína** (enzima) puede representarse mediante el modelo **llave-cerradura**, propuesto en 1894 por Emil Fischer, basado en la complementariedad de forma. Esta simple analogía representa a la proteína como una cerradura, mientras que el ligando, molécula o inhibidor como una llave. En tal sistema, es requerimiento que la *llave* encaje apropiadamente en la *cerradura* para que pueda haber una señal bioquímica: las *llaves* muy pequeñas, muy grandes o incorrectamente orientadas no encajaran y por ende no habrá respuesta biológica. Sin embargo, las enzimas tienen flexibilidad conformacional y, con base en esto, Daniel Koshland en 1958, propuso que las enzimas son modificadas luego de su interacción con el sustrato, en lo que se conoce como el modelo de **encaje inducido**. La química computacional ha tomado estas ideas básicas para modelar las interacciones ligando-proteína y, en el acoplamiento molecular, el enfoque que prevalece es el de llave-cerradura por su simplicidad y lo robusto del método, en detrimento del modelo de encaje inducido por su alta complejidad.^[52]

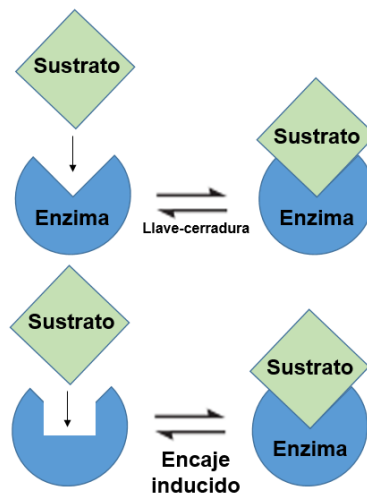
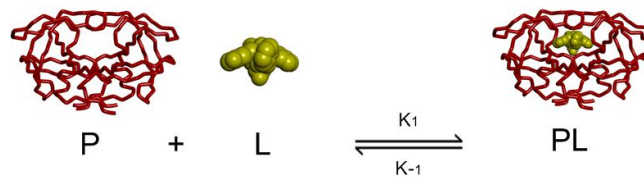


Figura 18. Modelos de interacción sustrato-enzima.

2.3.1. Fisicoquímica de la interacción ligando-proteína

- **Cinética**

La cinética de la unión ligando-proteína describe el proceso detrás de la asociación entre ambos, enfocado en la rapidez con la que ocurre el mismo. La ecuación que describe la unión, en solución, puede ser descrita como:



Ecuación 1

En la **Ecuación 1** se representan la proteína **P** y el ligando **L**. las constantes K_1 y K_{-1} son las constantes de la reacción directa e inversa, respectivamente. En equilibrio la velocidad de ambas reacciones es la misma, por lo tanto se puede expresar como:

$$v = K_1[P][L] = K_{-1}[PL]$$

Ecuación 2

La constante de formación del complejo, K_b , la relación entre las constantes de velocidad, puede entonces ser definida como:

$$K_b = \frac{K_1}{K_{-1}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d}$$

Ecuación 3

En donde K_d es la constante de disociación. Esta ecuación expresa la velocidad o la tasa de formación del complejo en relación a las constantes de la reacción directa e inversa.^[53]

- **Termodinámica**

En un sistema conformado por el soluto (ligando y proteína) y el solvente (agua o medio acuoso) existen interacciones muy complejas e intercambio de calor entre las sustancias involucradas, regidas por las leyes de la termodinámica. La magnitud más importante en este caso es la **energía libre de Gibbs**, que no es más que el potencial termodinámico que da la condición de equilibrio y de espontaneidad para una reacción química a presión y temperatura constantes, cuantificando de algún modo el resultado de todas esas complejas interacciones y definiendo un sentido de la reacción, ya sea a favor o en contra de la formación del complejo ligando-proteína. Análogamente a cualquier proceso espontáneo, la unión entre el ligando y el receptor solo ocurre cuando el cambio de energía libre (ΔG) es negativo, si el sistema está en equilibrio. Además, dado que la asociación del complejo ligando-proteína viene determinada por la magnitud de un ΔG negativo, puede considerarse que la energía libre de Gibbs determina la estabilidad de un complejo dado o, desde otro punto de vista, la afinidad de un ligando por un receptor.^[53]

La energía libre de Gibbs está relacionada con la constante cinética de formación K_b mediante la ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_b$$

Ecuación 4

En donde R es la constante universal de gases y T la temperatura, en condiciones estándar. Es evidente que mientras mayor sea la constante de formación K_b , más negativa es la energía libre, indicando que los parámetros cinéticos determinan la termodinámica del proceso: la estabilidad del complejo y la afinidad del ligando por la proteína.^[53]

Otra magnitud de gran importancia en la interacción ligando-receptor es la **entropía** (ΔS). La entropía es una medida de que tan equitativamente la energía es distribuida por

todo el sistema, frecuentemente interpretada como que tan *desordenado* se encuentran los átomos o moléculas de un sistema. Contrario a la energía libre, valores más positivos representan cambios de entropía favorables. El cambio total de entropía asociado con la formación del complejo proteína-ligando, puede ser expresado como la contribución de tres términos diferentes: ^[53]

$$\Delta S = \Delta S_{\text{solv}} + \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{\text{r/t}}$$

Ecuación 5

En donde ΔS_{solv} representa el cambio de entropía proveniente principalmente del solvente liberado cuando ocurre la unión en el sitio activo de la proteína. ΔS_{conf} por su parte, representa el cambio de entropía debido a los cambios conformacionales de ambas moléculas cuando ocurre la unión, pudiendo contribuir de manera positiva o negativa a la entropía del sistema. Por último, $\Delta S_{\text{r/t}}$ representa la pérdida de grados de libertad rotacionales y traslacionales luego de la formación del complejo ya que al reducir el número de partículas en solución, contribuye negativamente a la entropía total. Generalmente, las reacciones de formación del complejo ligando-proteína tendrían que superar las inevitables pérdidas entrópicas por los términos conformacionales y rotacionales/traslacionales a través de un muy positivo cambio de entropía debido a la solvatación, si la unión ha de ocurrir. ^[53]

2.3.2. Acoplamiento molecular y el descubrimiento de nuevos fármacos

Las investigaciones en la industria farmacéutica han implementado progresivamente el uso de métodos de la química medicinal moderna, especialmente métodos computacionales. El campo ha avanzado paralelamente a los métodos de espectroscopia biomolecular como cristalografía por rayos-X o RMN, permitiendo la resolución 3D de un gran número de proteínas, otorgando información estructural vital sobre los blancos

terapéuticos de diferentes fármacos, pudiendo aplicar el modelado molecular para simular las interacciones ligando-proteína. De allí nacen los métodos del diseño de fármacos basado en la estructura del receptor (**SBDD** por sus siglas en inglés), en donde la estructura del receptor (**proteína**), es conocida. El acoplamiento molecular es de los métodos más empleados dentro de los **SBDD**, mediante el cual se pueden jerarquizar librerías de moléculas pequeñas y se discriminan en base a su afinidad (**tamizado virtual**), pudiendo potencialmente predecir su actividad biológica.^[51]

El diseño de fármacos mediante el uso de estas técnicas consiste esencialmente en un proceso cíclico que empieza por conocer la estructura de una **proteína** y realizar estudios *in silico*, incluyendo acoplamiento molecular, que conlleven a la identificación de **ligandos** con potencial biológico, los cuales son sintetizados y evaluados según sus propiedades, como potencia afinidad y eficacia mediante diversas plataformas experimentales. Suponiendo que se encuentre una molécula activa las estructuras 3D del complejo ligando-proteína pueden ser resueltas y estudiadas según sus diferentes interacciones que conforman el proceso de reconocimiento molecular, pudiendo modificar parámetros estructurales que se traduzcan en una actividad biológica mejorada.^[51]

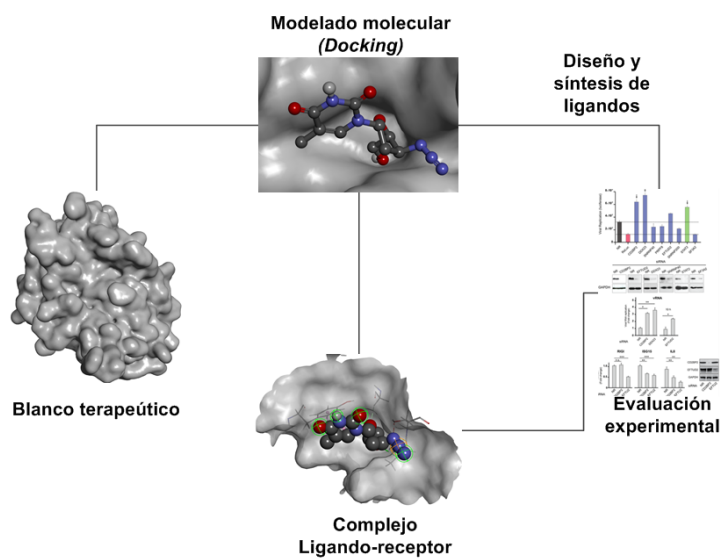


Figura 19. Esquema del diseño de fármacos mediante química computacional.

2.3.3. Objetivos del acoplamiento molecular

Dado un sistema ligando-proteína, el acoplamiento molecular tiene dos objetivos principales: ^[54]

- Predecir el modo de unión (**pose**) más favorable entre el ligando y la proteína.
- Determinar la energía de unión (**afinidad**) entre el ligando y la proteína.

Con base en estos objetivos, el acoplamiento molecular también puede ser empleado para hacer el **tamizado virtual** de una *librería* o una colección grande de moléculas contra una proteína determinada e identificar los ligandos potencialmente activos, basado en estos dos criterios.

2.3.4. Tipos de acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular puede clasificarse de acuerdo a la flexibilidad que se le asigne tanto al ligando como al receptor, existiendo entonces tres tipos: ^[54]

- **Rígido:** Tanto el receptor como el ligando son considerados partículas rígidas.
- **Ligando flexible:** El receptor es considerado un cuerpo rígido y el ligando como flexible. Este es el tipo de acoplamiento comúnmente empleado.
- **Flexible:** Tanto el receptor como el ligando son tratados como particular flexibles.

2.3.5. Pasos del acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular involucra dos tareas interrelacionadas: la **búsqueda de la conformación** y orientación del ligando (pose) dentro del sitio activo de una proteína determinada, y la **función de puntuación** o *scoring*, diseñada para predecir la afinidad a

través de la evaluación energética de las poses obtenidas. En la búsqueda de la pose, el acoplamiento ha de ser capaz de evaluar las diferentes conformaciones geométricas del ligando dentro del sitio activo de la proteína, para ello se evalúa la función potencial de las fuerzas enlazantes intramoleculares obteniendo un número de conformaciones de mínima energía, traduciéndose en distintas poses en las que es posible que el ligando se encuentre unido. Es entonces cuando entra en juego la función de puntuación, evaluando las energías asociadas a cada una de las poses obtenidas a través de la función potencial generalmente de fuerzas no enlazantes (van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones electrónicas aromáticas, par iónico intermolecular), obteniendo diferentes valores energéticos y escogiendo el menor de ellos como el más favorable.^{[55][56]}

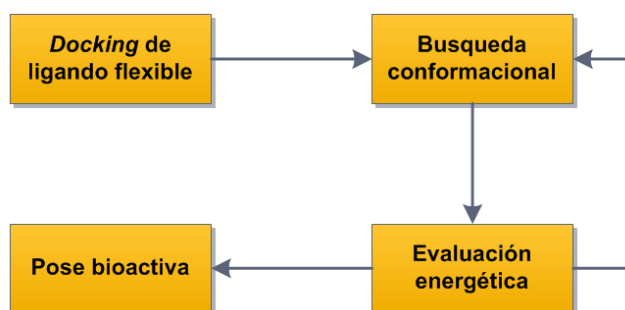


Figura 20. Pasos inherentes al acoplamiento molecular.

Existen diferentes programas de acoplamiento molecular cuya diferencia radica, principalmente, en los algoritmos que emplean para resolver las funciones potencial de los dos pasos mencionados en el punto anterior, es decir la búsqueda conformacional así como la función de puntuación. De entre todo el software disponible, **AutoDock** es el programa más usado, presente en más del 30% de las publicaciones relacionadas al tema.^[57]

2.3.5.1. Búsqueda conformacional.

El algoritmo de búsqueda conformacional explora todas las conformaciones y orientaciones posibles del ligando unido a la proteína. En esta etapa, los parámetros estructurales del ligando, tales como los grados de libertad torsionales, rotacionales y traslacionales son modificados. Los algoritmos de búsqueda se clasifican en dos categorías principales: **sistemáticos** y **estocásticos**. El método sistemático promueve ligeras variaciones en los parámetros estructurales, cambiando gradualmente la conformación de los ligandos. El algoritmo determina la energía del espacio conformacional y, después de numerosos ciclos de búsqueda y evaluación, converge a una solución de mínima energía correspondiente al modo de unión más probable. Aunque el método sistemático es efectivo explorando el espacio conformacional, puede converger a un mínimo local de energía en vez de a uno global, inconveniente que puede sortearse realizando diferentes búsquedas desde, por ejemplo, distintas conformaciones. El método estocástico, por su parte, realiza cambios aleatorios en la conformación del ligando evaluándolos mediante funciones predefinidas y tiene la ventaja de tener mayor probabilidad de encontrar el mínimo de energía global, además de ser menos exigente en cuanto a recursos computacionales.^[51]

Existen tres tipos de métodos de búsqueda sistemáticos: **exhaustivos**, **construcción por incremento** y **ensamble conformacional**. El método exhaustivo consiste en rotar sistemáticamente todos los enlaces flexibles del ligando en un intervalo dado filtrando los resultados a través de restricciones geométricas y químicas. En el método de fragmentación el ligando es sometido a una fragmentación en diferentes partes rígidas pudiendo hacer el acoplamiento de un fragmento a la vez (o en algunos casos de todos) en el sitio activo de la proteína y luego enlazándolos covalentemente. Por último en los métodos de conjunto conformacional, un conjunto de conformaciones preestablecidas del ligando son pre-generadas y se les hace un acoplamiento rígido para luego ser discriminadas de acuerdo a su energía.^[58]

Los algoritmos estocásticos de búsqueda conformacional, en cambio, muestrean el espacio conformacional realizando cambios aleatorios a un ligando o a una población de ligandos. Los cambios son, en cada paso, aceptados o rechazados basado en una función de probabilidad predefinida.^[59] Con esto, el algoritmo genera un dominio más amplio de conformaciones y evita que la solución sea un mínimo local incrementando considerablemente la probabilidad de encontrar el mínimo global.

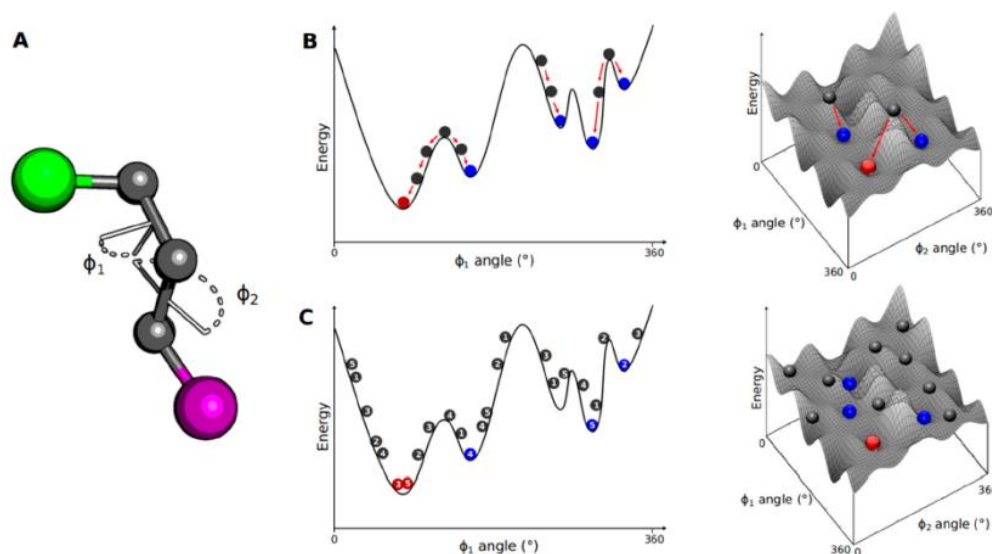


Figura 21. Diagrama energético de los métodos de búsqueda conformacional.

(A) ϕ grados de libertad (B) Método Sistemático (C) Método estocástico

Dos populares enfoques del algoritmo estocástico de búsqueda conformacional, también llamado aleatorio, son el Montecarlo y el algoritmo genético. En el enfoque Montecarlo se genera una configuración inicial que consiste en una conformación aleatoria traslacional, rotacional y conformacional, se le asigna una energía determinada. Luego se genera una nueva configuración y se le determina su energía y se usa un criterio para determinar si se mantiene o se descarta. En el algoritmo genético se busca imitar el proceso evolutivo por medio de la manipulación de una base de datos de estructuras llamadas cromosomas (vectores con datos conformacionales), seleccionando las

características favorables y transmitiéndolas a una nueva generación de “cromosomas” que codifica una conformación del complejo proteína-ligando.^[51]

Independientemente del tipo de búsqueda, cualquier algoritmo de búsqueda conformacional debe ser capaz de explorar un amplio rango energético en un tiempo computacional razonable. Idealmente un set modesto de moléculas debería llevar unos minutos de cálculo.^[51] En la tabla 1 se presentan los algoritmos usados por distintos paquetes de software comúnmente usados

Sistemático	Estocástico
FRED	AutoDock (genético)
DOCK	Gold
GLIDE	Molegro Virtual Docker
FlexX	PLANTS

Tabla 1. Algoritmo de búsqueda en paquetes de software de acoplamiento molecular.

2.3.5.2. Función de puntuación (*scoring*)

La función de puntuación o *scoring* toma una pose determinada, calculada por el algoritmo de búsqueda, y devuelve un valor numérico indicando la probabilidad de que la misma represente una interacción de unión favorable. La función estima la energía de unión de los complejos ligando-proteína, considerando los fenómenos fisicoquímicos más importantes involucrados, que incluyen las interacciones inter e intramoleculares, la desolvatación y los efectos entrópicos por lo que mientras más parámetros se tomen en cuenta, mayor la exactitud del cálculo, aunque a un gran costo computacional. La variación de energía debido a la formación del complejo viene dada por la constante de formación K_b (ecuación 3) y la energía libre de Gibbs ΔG (ecuación 4).^{[51][59][60]}

Suele ser el cuello de botella del acoplamiento molecular, pues debería ser capaz de diferenciar los ligandos activos de los no activos, identificar la pose correcta y estimar la energía de unión, a pesar de que las funciones implementadas tienden a simplificar o a

ignorar términos tales como entropía o hidrofobicidad. Un gran número de funciones de puntuación han sido desarrolladas en las últimas décadas y pueden ser agrupadas en tres categorías básicas de acuerdo a sus métodos de derivación: **funciones basadas en campos de fuerza, funciones empíricas o funciones basadas en conocimiento previo.**^{[55][58]}

- **Funciones basadas en campos de fuerza**

Están basadas en la energía de unión del ligando expresada en la suma de términos interacciones individuales tales como fuerzas de van der Waals (vdW), fuerzas electrostáticas (q), puentes de hidrógeno (H) y fuerzas torsionales o de estiramiento/flexión, entre otras, empleando un conjunto de parámetros de campos de fuerza de la mecánica molecular. Las interacciones entre proteína y ligando son generalmente descritas matemáticamente como:^[61]

$$E_{vdW} + E_H + E_q = \sum_P \sum_L \left[\left(\frac{A_{ij}}{d_{ij}^a} + \frac{B_{ij}}{d_{ij}^b} \right) + E(t) + \left(\frac{C_{ij}}{d_{ij}^{12}} + \frac{D_{ij}}{d_{ij}^{10}} \right) + 332.0 \frac{q_i q_j}{\epsilon(d_{ij}) d_{ij}} \right]$$

Ecuación 6

Esta ecuación en particular es la usada por **AutoDock**. Para dos átomos i y j , A y B son los parámetros de van der Waals según el tipo de átomo. d_{ij} es la distancia interatómica, q_i y q_j las cargas parciales. $\epsilon(d_{ij})$ es la función dieléctrica dependiente de la distancia. El término **E(t)** es un factor de corrección angular. La función es aplicada tanto intra como intermolecularmente, sumando ambas contribuciones.^[61]

- **Funciones empíricas**

En este tipo de funciones, la energía de unión de un complejo ligando-proteína es calculada como la suma de los términos energéticos **empíricos**, derivados de complejos

conocidos y caracterizados, tales como fuerza de van der Waals, cargas electrostáticas, puentes de hidrogeno, términos de solvatación, términos entrópicos, hidrofóbicos, etc.

Este tipo de funciones se expresa generalmente de la forma:

$$\Delta G = \sum_i W_i \Delta G_i$$

Ecuación 7

Donde ΔG_i representa los términos energéticos empíricos individuales y los correspondientes coeficientes W_i son determinados reproduciendo los datos de afinidad de unión de un conjunto de complejos ligando-proteína con estructuras tridimensionales conocidas empleando mínimos cuadrados. La simplicidad de los términos lo hace mucho más eficiente que la función de campos de fuerza, sin embargo, la aplicabilidad genera depende de las estructuras de las cuales se obtienen los coeficientes empíricos. Sin embargo con el notable aumento de estructuras cristalinas de diferentes complejos ligando-proteína con afinidades conocidas, una función empírica general puede ser desarrollada ensayando miles de complejos.^[62]

- **Funciones basadas en conocimiento previo**

Los parámetros potenciales de las funciones de puntuación basadas en conocimiento emplean energías potenciales extraídas de complejos ligando-receptor conocidos para obtener una función general. Estos potenciales son construidos teniendo en cuenta la frecuencia con la cual dos átomos se encuentran dentro de una distancia determinada en el conjunto de datos estructurales. Los diferentes tipos de interacción observados en el conjunto de datos son clasificados y ponderados de acuerdo a la frecuencia con la que ocurren, siendo el score final una suma de las interacciones individuales. El principio detrás de este tipo de función de score es la fuerza potencial media, definida por la relación inversa de Boltzman.^[62]

Este tipo de funciones se expresa generalmente de la forma:

$$\omega(r) = -\kappa_B T \ln\left(\frac{\rho(r)}{\rho^*(r)}\right)$$

Ecuación 8

Donde κ_b es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta del sistema, $\rho(r)$ es el número de densidad del par de átomos proteína-ligando a una distancia r en el conjunto de datos estructurales y $\rho^*(r)$ es la densidad del par cuando sus interacciones son nulas. Después de que los parámetros potenciales $\omega(r)$ son derivados, la energía de unión del ligando para un complejo dado es simplemente la suma de los términos de las interacciones para todo el complejo ligando-proteína.

Comparados a las otras dos funciones, las basadas en conocimiento ofrecen una buena relación entre velocidad y precisión, principalmente porque los potenciales en la **ecuación 7** son obtenidas de un gran número de estructuras en vez de tratar de reproducir afinidades conocidas mediante encaje. Su característica de sumas la hace tan rápida como la función empírica.^[62]

La mayoría de los programas para acoplamiento molecular son capaces de predecir exitosamente la conformación del ligando dentro de un sitio activo, pudiéndose confirmar comparando la pose obtenida con la correspondiente data cristalográfica. Sin embargo no todos son capaces de reproducir, sin grandes diferencias, la afinidad, debido a los factores entrópicos o de solvatación que algunas funciones no consideran. En este sentido, sabe resaltar que funciones basadas en campos de fuerza son usadas por programas como DOCK y Mollegro, además de **AutoDock**. Este último, en su versión **AutoDock Vina**, incorpora una función de puntuación híbrida entre basadas en campos de fuerza y empírica.^[51]

2.3.6. Metodología del acoplamiento molecular

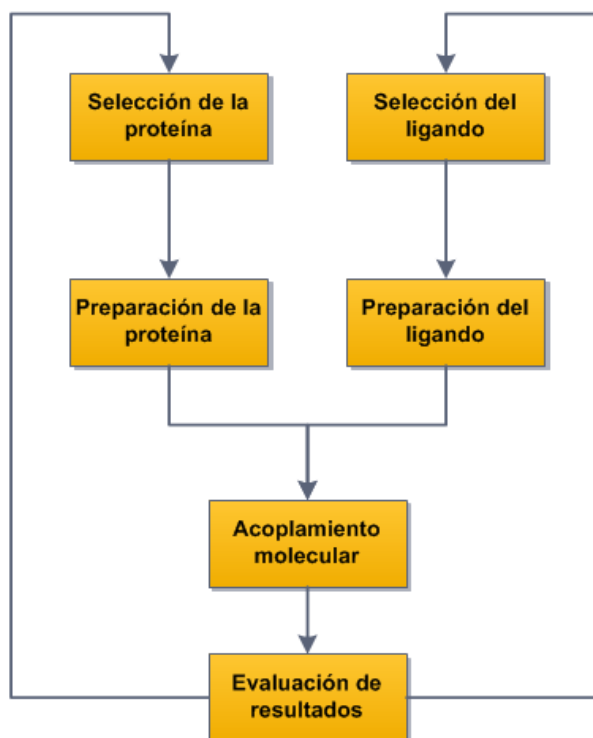


Figura 22. Metodología del acoplamiento molecular.

En la **figura 22** se muestra un esquema de los pasos típicos, comunes a todos los protocolos de acoplamiento molecular. En primera instancia, luego de la selección de un blanco terapéutico (proteína) y un ligando acorde a datos de actividad biológica u otros parámetros, es necesaria la obtención de las estructuras tridimensionales de ambos. Luego estos archivos son **preparados** de acuerdo a los requerimientos del método de acoplamiento en específico a usar, seguido del acoplamiento. Luego de esto, los resultados deben ser analizados seleccionando las **poses** con la mejor **afinidad**.^[50]

- **Selección y preparación de la proteína**

La selección de la proteína empieza por la escogencia de un proceso biológico determinado que tenga un blanco terapéutico conocido y a su vez, una proteína involucrada en este proceso. Sin embargo, resulta indispensable que para la proteína seleccionada exista una estructura determinada experimentalmente, ya sea por cristalografía de rayos-X o RMN, de tal manera de obtener un archivo de coordenadas 3D que describa adecuadamente la posición relativa de todos los átomos que la componen. Tales archivos suelen estar disponibles en bases de datos en línea, como por ejemplo **RSCB Protein Data Bank**. En caso de no existir la estructura, podría también construirse, basándose en otras proteínas similares o *plantillas*, en un proceso que se conoce como *modelado por homología*.^[50]

Para la preparación de la proteína es preferible partir de estructuras que tengan una resolución mejor que 2.5 Å, ya que a mayor valor, mayor es la incertidumbre de la posición relativa de los átomos que conforman la estructura y menos confiables serán los resultados. Se continúa con la revisión de la secuencia de aminoácidos de la proteína, particularmente en el sitio activo, asegurándose que no falten residuos y, si es el caso, se añaden los necesarios manualmente. Como último paso de la preparación, se empieza por remover moléculas de agua, heteroátomos no pertenecientes ni al ligando ni a la proteína y la adición de hidrógenos y cargas para luego minimizarla. En este proceso se pretende optimizar la estructura con los hidrógenos y cargas añadidas, ausentes en las estructuras determinadas por cristalografía de rayos-X. Una vez terminado este paso, la proteína esta lista para el acoplamiento molecular.^[50]

En cuanto al software para llevar a cabo la preparación, depende del programa de acoplamiento molecular a emplear. En el caso de **AutoDock** suele usarse su interfaz gráfica auxiliar, **AutoDock Tools**.^[50]

- **Selección y preparación del ligando**

El tipo de ligandos seleccionados para el acoplamiento molecular depende mucho del objetivo del estudio a realizar: descubrimiento de compuestos *líder*, peso molecular, superficie polar, solubilidad, disponibilidad comercial, etc. En este sentido, para la búsqueda y optimización de compuestos líder se aplican filtros como actividad biológica, similaridad estructural, farmacóforos, viabilidad sintética y propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) en un determinado conjunto de moléculas (**librería**) a estudiar.^[50]

En cuanto a la preparación del ligando, el archivo de coordenadas 3D puede ser obtenido en distintas bases de datos en línea, como **ZINC**. Adicionalmente, los ligandos a estudiar pueden ser construidos mediante diferentes programas como por ejemplo **BioviaDraw**, e igual que la proteína necesita ser optimizado, previa adición de cargas, e hidrógenos polares. **AutoDock** permite realizar este proceso a través de una interfaz gráfica. Finalizada la preparación es salvado en un formato adecuado y está listo para el acoplamiento.^[50]

- **Acoplamiento molecular y análisis de resultados**

El acoplamiento molecular suele hacerse sobre una parte de la proteína en específico, en la mayoría de los casos sobre el sitio activo. Esta selección se realiza para no trabajar con la superficie total de la misma, acortando el tiempo de máquina necesario para finalizar los cálculos. En este proceso se define el espacio de búsqueda, delimitando un espacio cúbico conocido como **caja**, alrededor de un sitio de interés de un determinado sitio de unión (por ejemplo residuos clave en la actividad catalítica de una enzima) haciéndola tan pequeña como sea posible pero incluyendo todos los residuos que conforman el sitio activo para garantizar los mejores resultados.^[63]

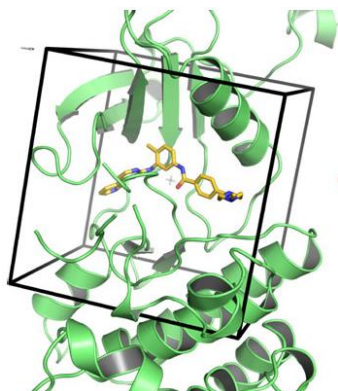


Figura 23. Definición de la caja o área de búsqueda.

Una vez definida la **caja** se lleva a cabo el acoplamiento molecular, que no es más que aplicar, mediante un programa como **AutoDock**, los algoritmos de búsqueda conformacional y la función de puntuación sobre los ligandos seleccionados, obteniendo una serie de **poses** y una energía de unión (**afinidad**) asociada. Es necesario hacer varias corridas del acoplamiento cuando se trabaja con métodos estocásticos, al menos 50 veces o hasta encontrar una clara tendencia en las poses obtenidas. La similitud entre las poses suele ser juzgada mediante el **RMSD**, que cuantifica la distancia entre los átomos del mismo tipo, agrupando las poses obtenidas en *clusters* con un **RMSD < 2 Å**. Si todas las poses son asignadas a un mismo grupo de conformación o *cluster*, indica que los parámetros del acoplamiento fueron bien planteados, de lo contrario habría que repetir el procedimiento con parámetros más exhaustivos de búsqueda.^[50]

La validación de los parámetros escogidos para el acoplamiento suele basarse en dos criterios principales:

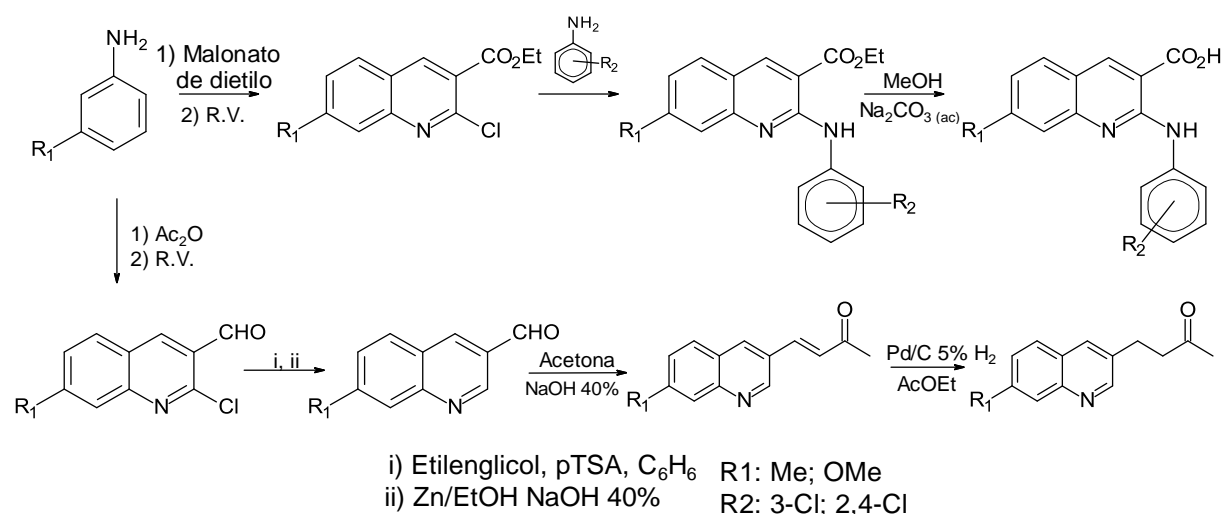
- La **reproducción** de la pose reportada para el ligando.
- La calidad de la **jerarquización** de un conjunto de moléculas con afinidad reportada.

Para el primer criterio se determina el **RMSD** entre las poses obtenidas por el procedimiento y la reportada por la data cristalográfica. Si es menor de 2 Å se considera exitosa, pues se considera que no hay diferencias significativas entre las poses. Para el segundo, en caso de no existir un complejo de estructura conocida, se escoge una serie de ligandos con valores de constantes de inhibición (**K_i**) u otro dato de actividad biológica relacionada, como por ejemplo **CI₅₀**. Si el acoplamiento las jerarquiza de manera similar a los valores reportados se considera válido el método. Una vez validado, pueden entonces compararse los resultados obtenidos, basándose en las afinidades calculadas e interacciones con algunos residuos de la cavidad o sitio activo, entre las moléculas a estudiar y las de referencia.^[50]

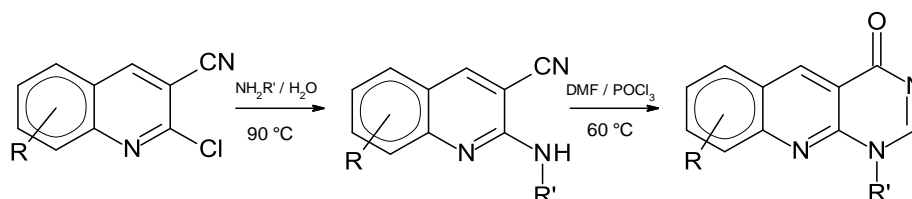
3. Antecedentes

3.1. Síntesis

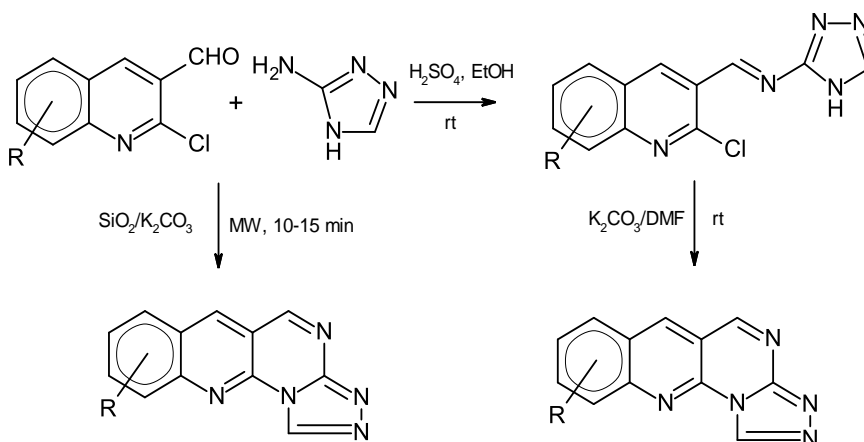
En 1988 Serrano, M.L.^[64] sintetizó dos series de compuestos quinolínicos. Una primera serie involucra la síntesis de 3-carboetoxi-2-cloroquinolinas como intermediarios clave, sobre los que una posterior sustitución del halógeno por anilinas generó los compuestos deseados. La segunda serie, por su parte, involucra la síntesis de 2-cloro-3-formilquinolinas como intermediarios clave sobre los que se redujo el halógeno previa generación del acetal correspondiente, para luego obtener las 4-(3-quinolin)-butan-2-onas. Los compuestos fueron probados como agentes antiinflamatorios.



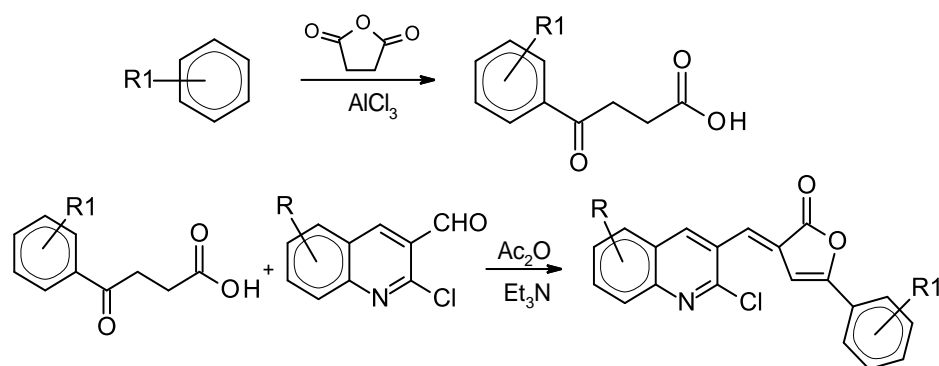
En 2012 Singh, R. y col.^[65] sintetizaron una serie de pirimido[4,5-*b*]carbonitrilos a partir de 2-cloroquinolin-3-carbonitrilos mediante un paso de aminación y posterior ciclación con buenos rendimientos. La aminación en agua procede rápidamente mediante simple sustitución nucleofílica aromática mientras que la ciclación de este compuesto se lleva a cabo mediante la reacción de Vilsmeier a bajas temperaturas en excelentes rendimientos.



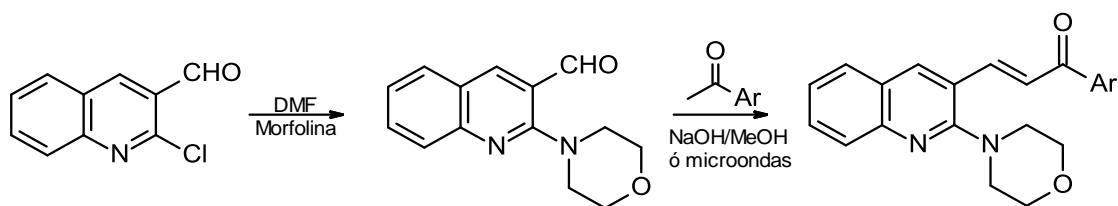
En 2011 Joshi, R. y col.^[66] sintetizaron una serie de [1,2,4]-triazolo-[1',2':1,2]-pirimido-[6,5-*b*]-quinolinas sustituidas en un solo paso con el uso de un catalizador de $\text{SiO}_2/\text{K}_2\text{CO}_3$ bajo radiación microondas y libre de solvente, contrario al método convencional que involucra solventes y catalizadores ácidos o básicos. Los compuestos sintetizados fueron probados para actividad antibacterial exhibiendo buenos resultados comparados a fármacos de control.



En 2011 Alam, M. y col.^[67] sintetizaron una serie de 5-aryl-3-[(2-cloroquinolin-3-il)metilén]furan-2(3*H*)-onas. El ácido 3-benzoil-propionico requerido fue sintetizado mediante acilación Friedel-Crafts de diferentes bencenos sustituidos con anhídrido succínico en presencia de AlCl_3 para posteriormente hacer una condensación con diferentes 2-cloro-3-formilquinolinas en presencia de anhídrido acético y trietilamina. Algunos de estos compuestos presentaron actividades antiinflamatorias y antibacteriales considerables.

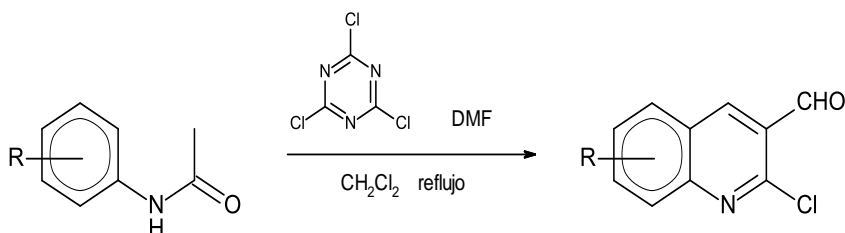


En 2013 Subhashini y col.^[68] sintetizaron una serie de 2-morfolin-3-quinolinil-chalconas a partir de la condensación de 2-morfolinoquinolin-3-carbalehdidos con diferentes acetofenonas sustituidas, para dar los productos deseados identificados por **IR**, **RMN** y **MS**. Se realizó en condiciones normales (medio básico, condensación aldólica) y asistida por microondas siendo evaluadas para su actividad antibacterial.

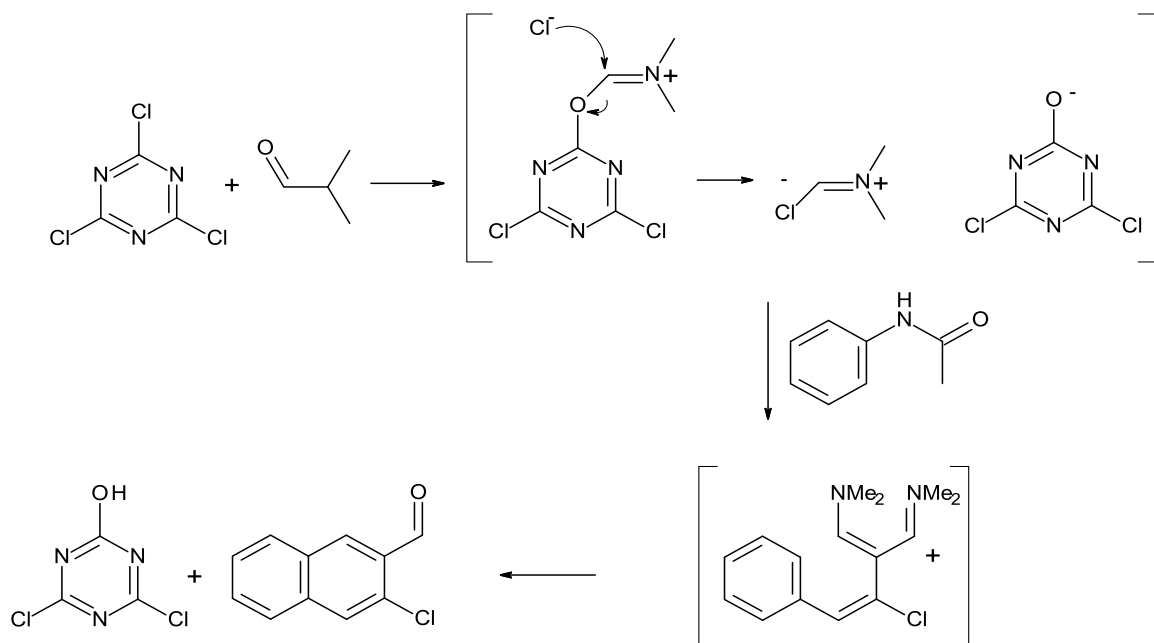


Ar: Fenil, 4-clorofenil, tiofenil, 4-metoxifenil, 4-nitrofenil, etc.

En 2015 Venkanna y col.^[69] sintetizaron una serie de 2-cloro-3-formilquinolinas mediante una reacción del tipo Vilsmeier-Haack empleando un aducto TCTA (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina)-DMF como RV sobre acetanilidas sustituidas en lugar del tradicional POCl_3/DMF , observándose altos rendimientos (>80%) independientemente del sustituyente.

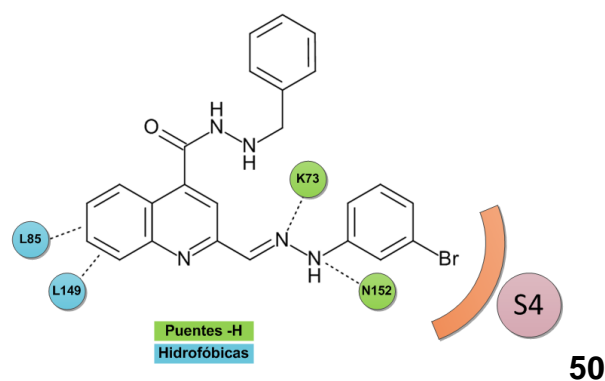


El mecanismo propuesto es el siguiente:

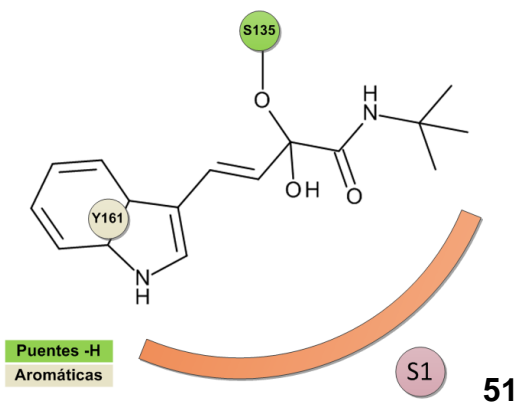


3.2. Actividad biológica y acoplamiento molecular

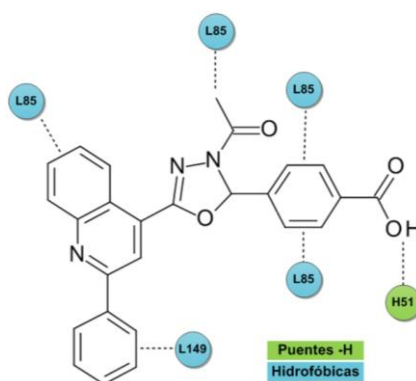
En 2012, Deng, J. y col.^[70] luego de hacer un tamizado virtual de una librería de compuestos consiguieron 3 moléculas biológicamente activas contra la proteasa NS2B-NS3 del DENV. Escogieron uno de ellos como compuesto líder y construyeron una nueva librería con compuestos estructuralmente similares. Como resultado se obtuvo el compuesto **50** entre los más afines, ensayos de actividad biológica contra la proteasa revelan un $CI_{50}=9,45 \mu M$. Adicionalmente estudios de acoplamiento molecular revelan las principales interacciones con la proteína. [PDB: **2FOM (DENV2)**; Software: **DOCK**]



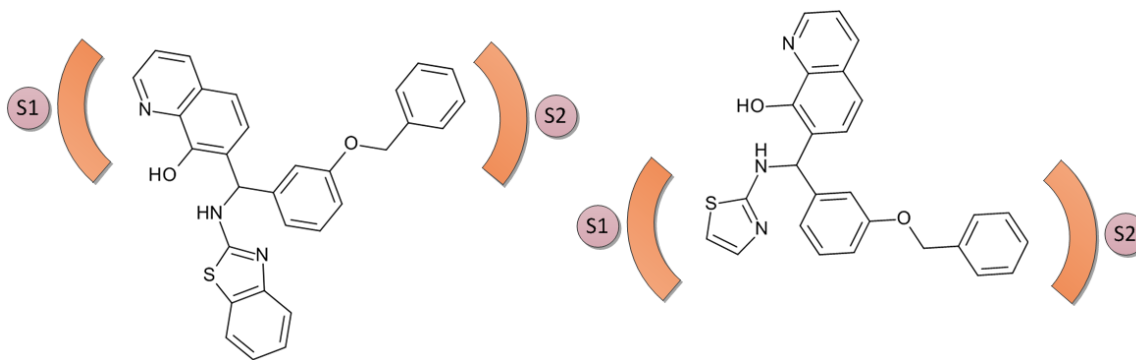
En 2011 Steuer y col.^[71] sintetizaron una serie de α -cetoamidas β,γ -insaturadas sustituidas fueron sintetizadas y evaluadas *in vitro*. Los estudios de *docking* de uno de los compuestos más activos (**51**) revelaron un enlace covalente reversible con el residuo S135 formando un hemicetal. [Proteína modelada por homología; Software: **GOLD**]



En 2013 Nguyen y col.^[72] identificaron, mediante **tamizado virtual**, una serie de inhibidores de la proteasa del DENV4. A un grupo de estas moléculas, se les hizo estudios de inhibición *in vitro*, resaltando entre los más potentes la quinolina **52** con un **CI₅₀**=12,5 μ M. Un estudio detallado del acoplamiento molecular de este compuesto reveló las principales interacciones con la proteína. [PDB: **2VBC (DENV4)**; Software: **AutoDock 3**]

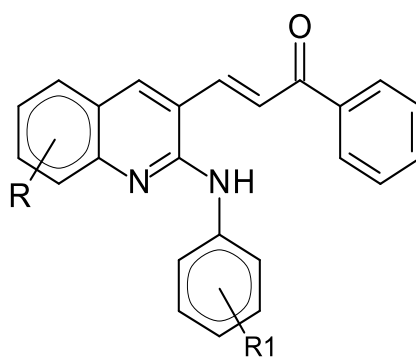
**52**

En 2013 Lai y col.^[73] analizaron, *in vitro*, una serie de 8-hidroxiquinolinas, contra la proteasa del **DENV2**. De entre ellas, las quinolinas **53** y **54** destacan con un **CI₅₀** de 0,91 μ M y 2,93 μ M respectivamente. Un estudio de acoplamiento molecular revela las principales interacciones, destacando la ocupación de las subcavidades S1 y S2 para ambos compuestos. [PDB: **3U1I (DENV3)**; Software: **Molegro Virtual Docker**]

**53****54**

4. Justificación

Con base en que las quinolinas son un núcleo fundamental en la química medicinal, además de la recurrente presencia de este heterociclo en compuestos con actividad inhibitoria contra el virus del dengue (**DENV**) y siguiendo algunos patrones de sustitución de estos compuestos por inspección visual, además de su aparente viabilidad sintética, se propone la síntesis del siguiente compuesto:



R: 6-Me; 6-OMe; -H
R1: 4-Me

(2E)-3-(2-anilin-3-quinolinil)-1-fenil-2-propen-1-ona

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Sintetizar una serie de (2*E*)-3-(2-anilin-3-quinolinil)-1-fenil-2-propen-1-onas, empleando como intermediarios clave 2-cloro-3-formilquinolinas sintetizadas mediante la reacción de Vilsmeier-Haack sobre 3 acetanilidas sustituidas, para luego predecir su potencial como inhibidores de la proteasa NS2B/NS3 del **DENV** mediante un estudio de acoplamiento molecular o *docking*.

5.2. Objetivos específicos

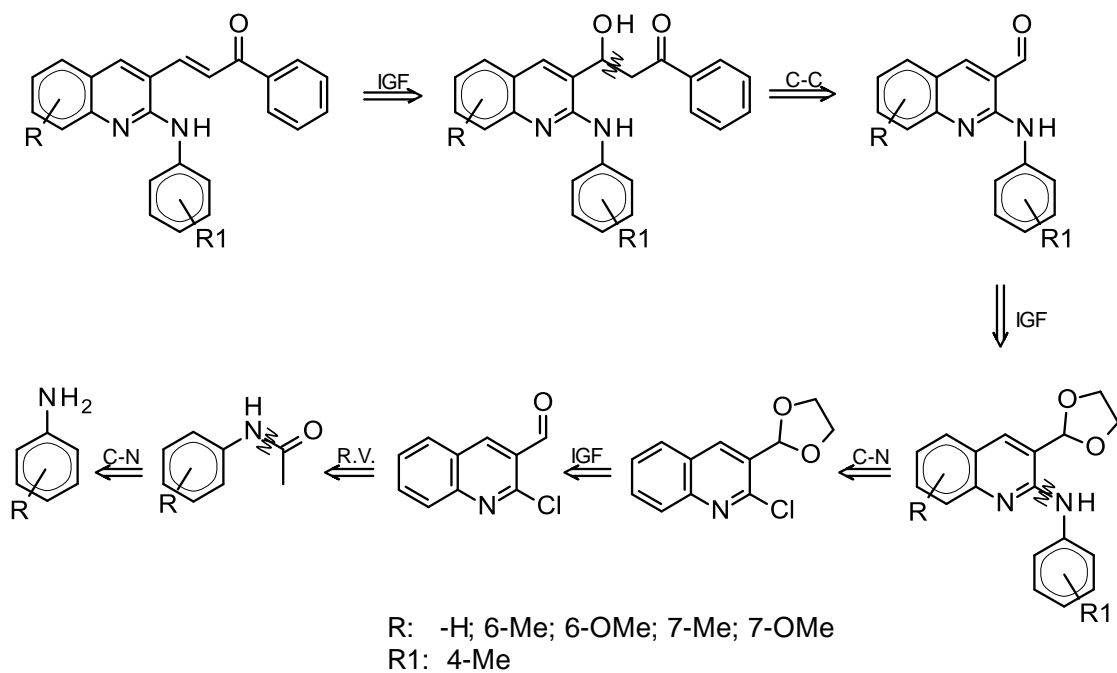
- Sintetizar tres acetanilidas sustituidas (3-metoxi, 4-metil y 3-metilacetanilida) mediante la acetilación de las anilinas correspondientes.
- Sintetizar las 2-cloro-3-formilquinolinas sustituidas mediante la reacción de Vilsmeier sobre las acetanilidas obtenidas en el punto anterior.
- Proteger el aldehído en la posición 3 de las quinolinas sintetizadas previamente.
- Sustituir el cloro de la posición 2 de las quinolinas obtenidas por *p*-toluidina.
- Desproteger el carbonilo de la posición 3 de las quinolinas sintetizadas en el paso anterior.
- Condensar una metilcetona aromática (acetofenona) con el aldehído desprotegido previamente.
- Caracterizar mediante métodos espectroscópicos los productos obtenidos.
- Llevar a cabo el acoplamiento molecular de un complejo ligando-proteína de estructura conocida, obteniendo valores de referencia.
- Realizar el acoplamiento molecular de los compuestos sintetizados definiendo como receptor la proteasa NS2B-NS3 del DENV y estimar su potencial como inhibidor.

6. Metodología experimental

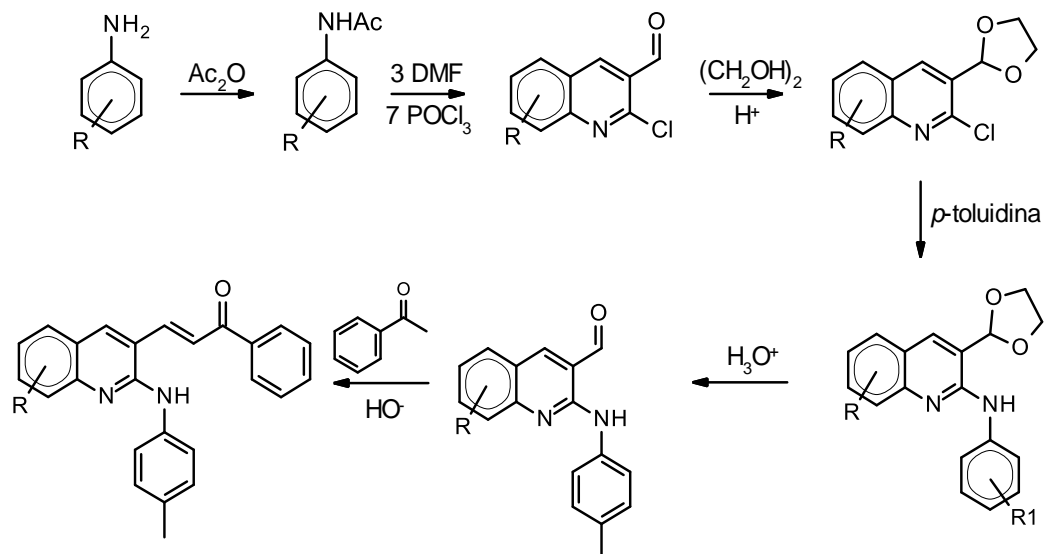
6.1. Síntesis

- Los solventes empleados fueron estilados previo a su uso.
- El oxiclورو de fosforo POCl_3 fue destilado a presión reducida y por fraccionamiento según la metodología reportada.^[74]
- Las anilinas líquidas fueron destiladas a presión reducida, las anilinas sólidas fueron empleadas sin purificación previa.
- Los puntos de fusión fueron determinados en un fusiómetro Sybron-Thermolyne y no fueron corregidos.
- Los espectros **IR** fueron registrados en un espectrómetro Nicolet iS5 operado en transformada de Fourier, empleando un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) o en pastillas de KBr.
- Los espectros de absorción **UV-Vis** fueron registrados en un espectrofotómetro doble haz Perkin-Elmer Lambda 25, empleando diclorometano como solvente para las muestras.
- Para la cromatografía de capa fina (**ccf**) se utilizó como adsorbente sílica gel Merck DC-60F54, capa de 0,2 mm de espesor en placas de aluminio, reveladas bajo una lámpara UV de onda corta.
- Para la cromatografía por columna (**cc**) se utilizó como soporte sílica-gel de Aldrich, 60 Å, con un área de superficie de 500 m²/g y un volumen de 0,75 cm³/g (70-230 MESH ASTM).

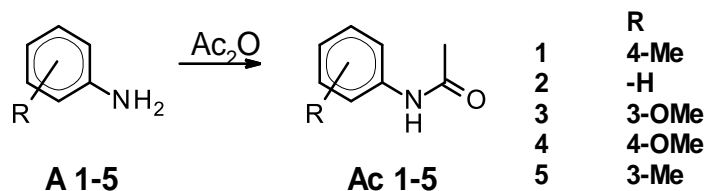
Se propuso el siguiente análisis retrosintético:



Y se propuso la siguiente ruta sintética:



- **Síntesis de acetanilidas sustituidas. [Ac]**



a) En solución acuosa.

A una suspensión acuosa de **A2** y **A3** (1eq) se le agregó HCl(c) gota a gota y bajo agitación constante hasta lograr su completa disolución. Se añadió carbón activado y se calentó a 40° C, se filtró e inmediatamente se le agregaron 1,5 eq. de anhídrido acético, seguido de bicarbonato de sodio sólido hasta no observar más efervescencia. El sólido obtenido se filtró, se lavó con agua y se recristalizó en agua o agua/etanol. En el caso de **A1** (*p*-toluidina) se partió de un equivalente de su clorhidrato, siguiendo el mismo procedimiento anterior exceptuando el paso de acidificar la suspensión acuosa.

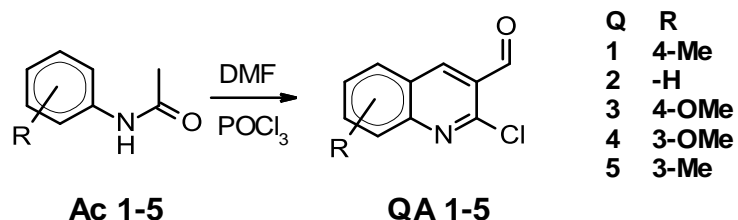
b) Catalizada por ácido sulfúrico en ausencia de agua.

En una fiola se agregó 1 eq. de **A4** y **A5**, 1,2 eq. de anhídrido acético y una o dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. La solución se calentó, bajo agitación constante, aproximadamente a 60° C por 10 min. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió sobre hielo. El sólido obtenido se filtró, se lavó con agua y se recristalizó en agua/etanol.

A	A (g)	Ac (g)	Rend. (%)	P.F. exp. (°C)	P.F. lit. (°C)
1*	5,43324	5,20508	92	146-148	147
2	5,87875	7,25362	85	112-114	114
3	3,52863	3,14925	67	80	81
4	4,67234	5,35032	85	128-130	130
5	9,65254	7,52718	56	67	65

Tabla 2. Rendimientos de las acetanilidas Ac 1-5.

- Síntesis de 2-cloro-3-formilquinolinas. QA 1-5

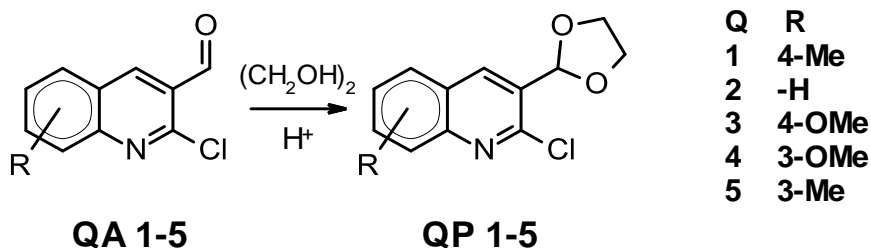


Siguiendo el procedimiento reportado por Meth-Cohn^[32], 3 eq. de **DMF** fueron enfriados a 0-5°C en un balón de 3 bocas, equipado con un sistema de reflujo y un tubo desecador. Se añadieron 7 eq. de **POCl₃** recién destilado, gota a gota y bajo agitación magnética. Finalizada la adición se agregó, en una sola porción, 1 eq. de la acetanilida correspondiente **Ac 1-5** y luego de 5 min., la mezcla fue calentada a 75-80°C durante 8-12 h hasta que la reacción finalizara, según lo indicado por ccf. La mezcla de reacción se vertió cuidadosamente sobre aproximadamente 100 mL de hielo y se agitó por media hora. El sólido obtenido se filtró, se lavó con abundante agua y se recristalizó en acetato de etilo.

R	Ac (g)	DMF (mL)	POCl ₃ (mL)	Producto QA (g)	Rend. (%)	P.F. exp. (°C)	P.F. lit. ^[31] (°C)
1	9,55543	15,0	42,0	3,97403	55	124-126	124-125
2	8,07994	13,9	40,0	3,50791	34	148-150	148 -149
3	6,85082	8,9	27,8	2,65011	63	144-146	145,5-146,5
4	8,17652	11,5	46,0	5,16349	72	188-190	197-198
5	8,87546	13,8	39,0	4,83486	47	150-151	144,5-145,5

Tabla 3. Rendimientos de las 2-cloro-3-formilquinolinas QA 1-5.

- Síntesis de 3-(1,3-dioxolan-2-yl)-2-cloroquinolinas. QP 1-5

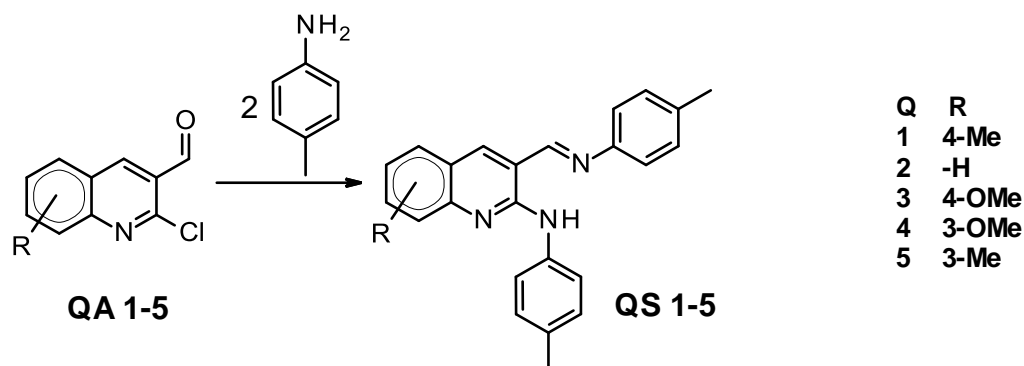


Siguiendo un procedimiento similar al reportado^[75], las correspondientes 2-cloro-3-formilquinolinas (1eq.) **QA 1-5** fueron suspendidas en tolueno, se añadieron 3 eq. de etilenglicol y un cristal de ácido *p*-toluensulfónico. La mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo de 6 a 12 h empleando una trampa Dean-Stark. Una vez la reacción finalizó, indicado por ccf, la mezcla se lavó con una solución saturada de NaHCO₃(ac) y luego con una solución saturada de NaCl(ac). La fase orgánica se separó, se secó con sulfato de magnesio anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El sólido obtenido se recrystalizó en CHCl₃/Hex.

R	QA (g)	QP (g)	Rend. (%)	P.F. exp. (°C)	P.F. lit. (°C) ^[75]
1	1,43862	1,23010	51	46-48	42-44
2	2,10154	1,80690	47	50-52	46-48
3	1,80782	1,50700	55	86-87	82-84
4	1,12979	0,74798	44	118-122	124-126
5	1,48485	1,70430	69	54-56	58-60

Tabla 4. Rendimientos de los acetales QP 1-5.

- Síntesis de 2-anilín-3-bencilidenoquinolinas sustituidas [QS]

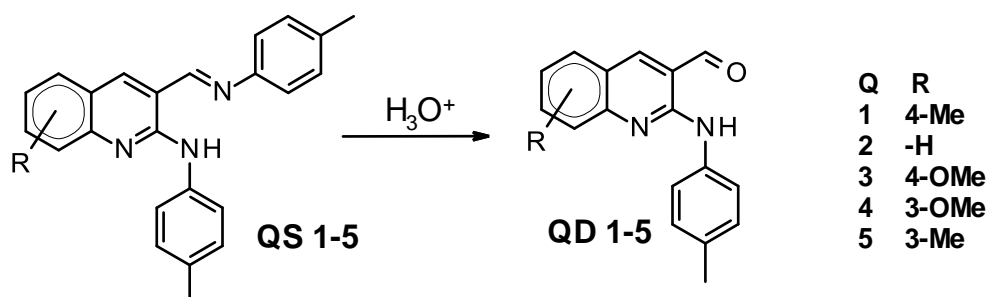


Un equivalente de la 2-cloro-3-formilquinolina correspondiente **QA 1-5** y 3 eq. de *p*-toluidina se calentaron a temperatura de reflujo usando tolueno como solvente. Tras 16 h de reacción la mezcla se lavó con agua, se separó la capa orgánica, se secó con sulfato de sodio y se evaporó el tolueno. Se purificó mediante **cc** empleando una mezcla CHCl₃:Hex (1:2) como eluente obteniendo sólidos cristalinos amarillo brillante.

R	QA (g)	<i>p</i> -toluidina (g)	QS (g)	Rend. (%)	P.F. exp. (°C)	P.F. lit. (°C)
1	0,52438	0,82825	0,38884	42	189-192	-
2	0,41226	0,69140	0,31968	42	158-159	-
3	0,62511	0,90522	0,17073	16	176-180	-
4	0,56040	0,81160	0,58692	61	194-196	-
5	0,52423	0,82065	0,28523	31	198-202	-

Tabla 5. Rendimientos de las bases de Schiff QS 1-5.

- Síntesis 2-anilino-3-formilquinolinas sustituidas. QD 1-5

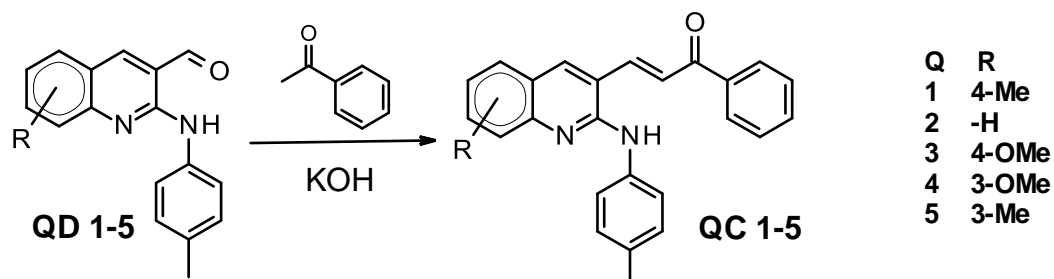


A un equivalente de las bases de Schiff **QS 1-5**, se le agregó la cantidad mínima necesaria de THF para lograr su completa disolución, seguido de 2 volúmenes de una solución de HCl_(ac) al 10%. La solución se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se agregó agua y se neutralizó la solución con NaOH_(ac) al 10%. El sólido obtenido se filtró y se recrystalizó en una mezcla etanol/agua.

R	QS (g)	QD (g)	Rend. (%)	P.F. exp. (°C)	P.F. lit. (°C)
1	0,34020	0,20715	81	156-158	-
2	0,29865	0,09560	43	98-100	-
3	0,15640	0,11167	93	195-196	-
4	0,58692	0,41416	92	133-135	-
5	0,28043	0,18523	87	147-149	-

Tabla 6. Rendimientos de las 2-anilino-3-formilquinolinas QD 1-5.

- Síntesis de (2E)-3-(2-anilin-3-quinolinil)-1-fenil-2-propen-1-onas. [QC 1-5]



Siguiendo un procedimiento similar al reportado^[76], cantidades equimolares de los aldehídos **QD 1-5** y de acetofenona junto con 1,4 eq. de hidróxido de potasio, se colocaron en un mortero y se molieron por 15 minutos hasta obtener una mezcla líquida homogénea, para luego dejar reposar durante unos instantes. Una vez la mezcla solidificó, se continuó con el molido por 15 minutos adicionales. El sólido obtenido fue lavado con abundante agua y se purificó por cpc empleando como eluyente una mezcla AcOEt:Hex (1:4) obteniendo un sólido de color fucsia-rojizo.

R	QD (g)	QC (g)	Rend. (%)	P.F. exp. (°C)	P.F. lit. (°C)
1	0,10190	0,02235	16	162-164	-
2	0,05426	0,01258	17	150-153	-
3	0,08932	0,00867	7	170-172	-
4	0,09026	0,01946	16	155-156	-
5	0,28043	0,08523	22	188-190	-

Tabla 7. Rendimientos de las chalconas QC 1-5.

6.2. Acoplamiento molecular

Software:

VegaZZ 3.1.1.42

AutoDock Vina (interfaz de VegaZZ)

Fpocket (interfaz de VegaZZ)

BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2017

BIOVIA Draw 2018

Hardware:

PC Intel®Xeon de 8 núcleos. 2,00 Ghz y 12 GB de RAM en Windows 7 64-bit

PC Intel®Pentium DualCore. 2.66GHz y 3,1GB de RAM en Windows 7 32-bit

Metodología empleada

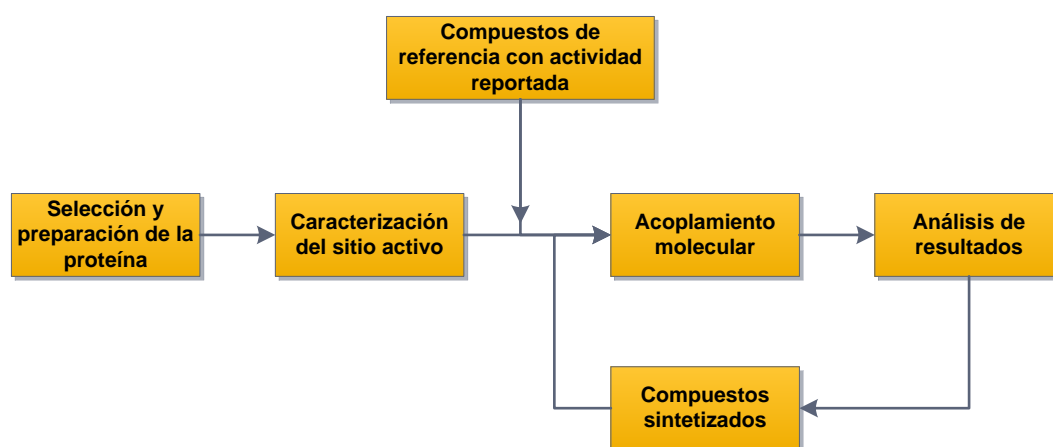


Figura 24. Metodología experimental del acoplamiento molecular.

- **Selección de la proteína.**

Para el estudio de acoplamiento molecular, se seleccionó la conformación **cerrada** de la proteasa NS2B/NS3 del DENV, cuya estructura 3D determinada por cristalografía de rayos-X se encuentra disponible en **RSCB ProteinDataBank**, código **PDB: 3U1I**.

- **Preparación de la proteína.**

El archivo de coordenadas de la proteína fue descargado en formato .pdb del RSCB ProteinDataBank (código **PDB: 3U1I**) y preparado con la interfaz de **VegaZZ** en donde se normalizaron las coordenadas. Se escogió uno de los monómeros de la proteína en donde solo se tomaron en cuenta la cadena **NS2B** (cadena **A** del .pdb), la cadena **NS3** (cadena **B** del .pdb), y el **ligando** cocrystalizado (cadena **F** del .pdb), eliminando las demás del archivo. Se removieron las moléculas de agua y sulfato, se añadieron los hidrógenos faltantes ajustando el pH a 7,4 (en el que se consideran las cadenas laterales de los residuos de Arg, Lys, Glu y Asp ionizadas mientras la de His como neutra) a la vez que se asignaron las cargas parciales tipo Gagsteiger para luego ser minimizada (10000 pasos de gradientes de minimización conjugados) a través de NAMD empleando un campo de fuerzas CHARMM y fijando las coordenadas del esqueleto o *backbone* de la proteína, con el propósito de conservar el plegamiento nativo de la misma. El archivo obtenido, previa remoción del ligando cocrystalizado, fue salvado en formato **.pdbqt** en el que solo se consideran los hidrógenos polares de la estructura. Este archivo es el que sería usado como receptor para pasos posteriores del acoplamiento molecular. La validación de la proteína minimizada se hizo mediante gráfico de Ramachandran antes y después de la minimización comparando los residuos presentes en zonas permitidas.

- **Identificación y caracterización del sitio de unión de la proteína.**

Empleando **Fpocket** a través de la interfaz de **VegaZZ**, se calcularon las cavidades presentes en la proteína, su volumen estimado y los residuos contenidos en las misma, definiendo como sitio activo la cavidad que contiene la tríada catalítica (H51, D75, S135). Luego, con la ayuda de **BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2017**, se calcularon sus propiedades fisicoquímicas en la forma de superficies hidrofóbicas, cargas parciales, y aceptores/dadores de electrones a fin de estudiar las posibles interacciones con un ligando.

- **Preparación de las librerías de compuestos a estudiar.**

- **Librería control**

Se seleccionaron un conjunto de 16 moléculas, mostradas en la **figura 24**, que incluían compuestos reportados en la literatura consultada como **inhibidores activos e inactivos** contra la **proteasa** del DENV, considerando como activos aquellos con valores de **CI₅₀ < 15 μM**.

Para algunos de los compuestos, los archivos de coordenadas correspondientes fueron descargados de **NCBI PubChemDatabase** en formato .sdf mientras que para los ligandos restantes dicho archivo fue construido con **BIOVIA Draw 2018**. Posteriormente todas las estructuras fueron compiladas en un mismo archivo (formato .sdf) empleando **BIOVIA Discovery Studio 2017** y llamado **Librería control**.

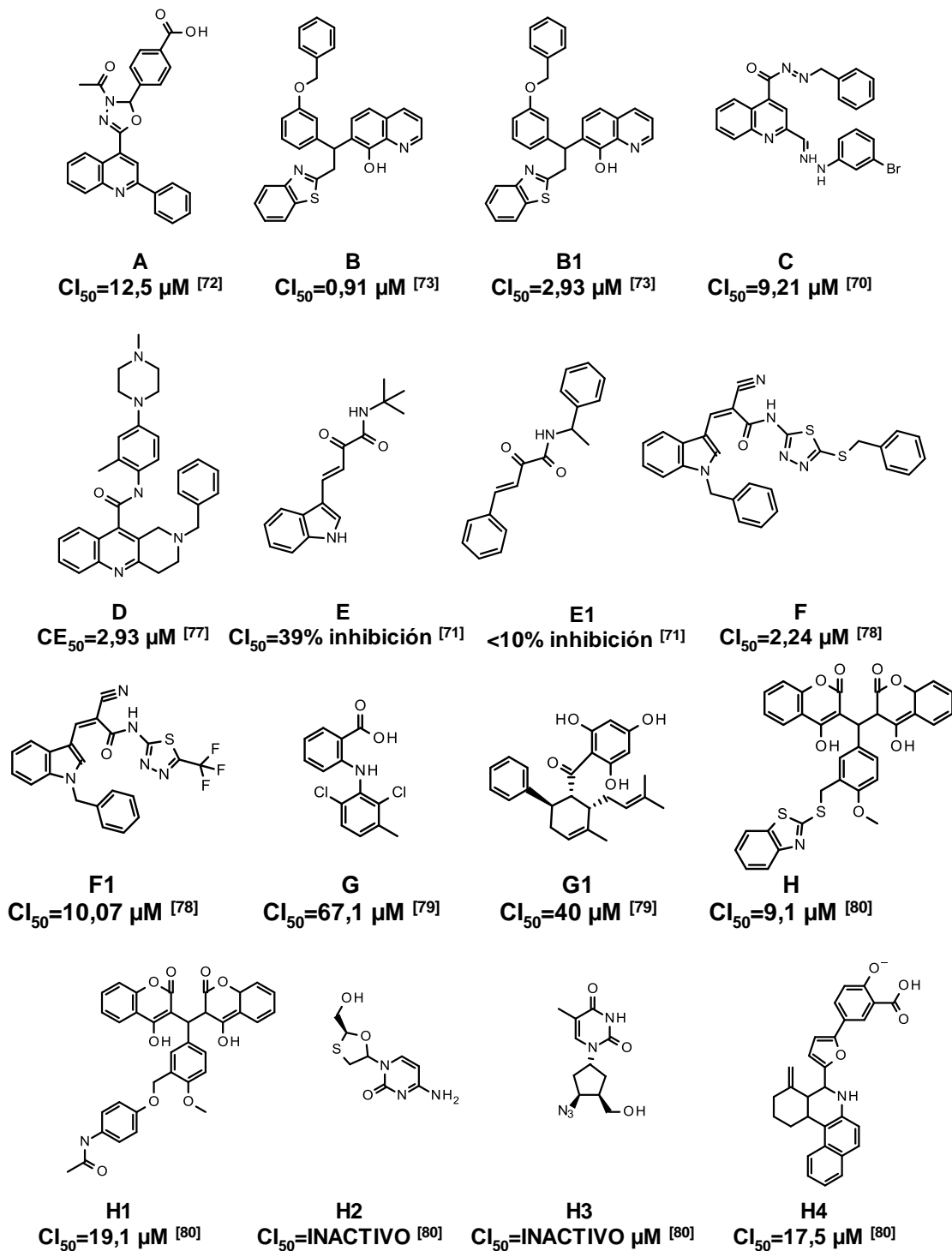


Figura 25. Compuestos de la librería control.

- **Librería control y compuestos sintetizados.**

Las chalconas sintetizadas **QC 1-5**, además de las bases de Schiff **QS 1-5**, fueron construidas mediante la metodología descrita en el punto anterior para luego incorporarlas a la **Librería control** y salvarla en formato .sdf de tal manera de tener en una misma librería los compuestos de referencia junto con los sintetizados, llamada **Librería control y compuestos sintetizados**.

- **Acoplamiento molecular**

Para el procedimiento del acoplamiento molecular, se empleó **AutoDock Vina** a través de la interfaz de **VegaZZ**. La rigidez de la proteína fue mantenida durante todo el proceso mientras se permitió la flexibilidad de los ligandos. Para definir la **caja** (espacio de búsqueda), sobre el archivo .pdbqt de la proteína previamente preparada, se seleccionaron los residuos ubicados en un radio de 8 Å alrededor del ligando cocrystalizado con la enzima, correspondiente a una caja de 25,46 x 28,15 x 33,41 Å centrada en las coordenadas $x=-9,03$ $y=8,67$ $z=-16,77$. Se definió el parámetro de exhaustividad de búsqueda en 8 y 1 modo de unión por ligando.

Se realizaron 30 corridas por cada una de las librerías construidas. El análisis de los resultados se realizó en forma de agrupaciones de conformaciones (*clusters*) de las poses obtenidas por cada ligando, considerando un **RMSD < 2 Å**. Los *cluster* de las poses de mayor ocurrencia y más favorables energéticamente para cada compuesto fueron evaluadas usando **BIOVIA Discovery Studio 2017** a fin de obtener un valor de afinidad y una pose asociada.

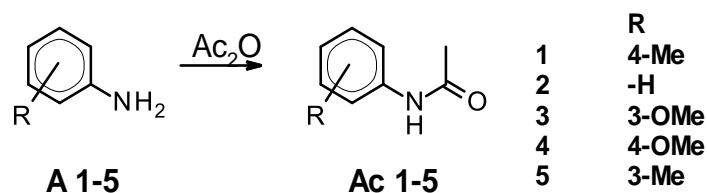
La validación del protocolo empleado se realizó contrastando datos de actividad biológica con los valores de afinidad obtenidos del tamizado virtual de la **Librería control**, obteniendo una correlación entre ambos, además de determinar las interacciones con los residuos del sitio activo, definiendo las características comunes a los mejores (y peores) inhibidores. Esto con el fin de comparar los resultados del acoplamiento de la **Librería control y compuestos sintetizados**, poder evaluar la pose y la afinidad de los compuestos sintetizados con respecto a los compuestos control y poder estimar su potencial como inhibidor.

7. Resultados y discusión

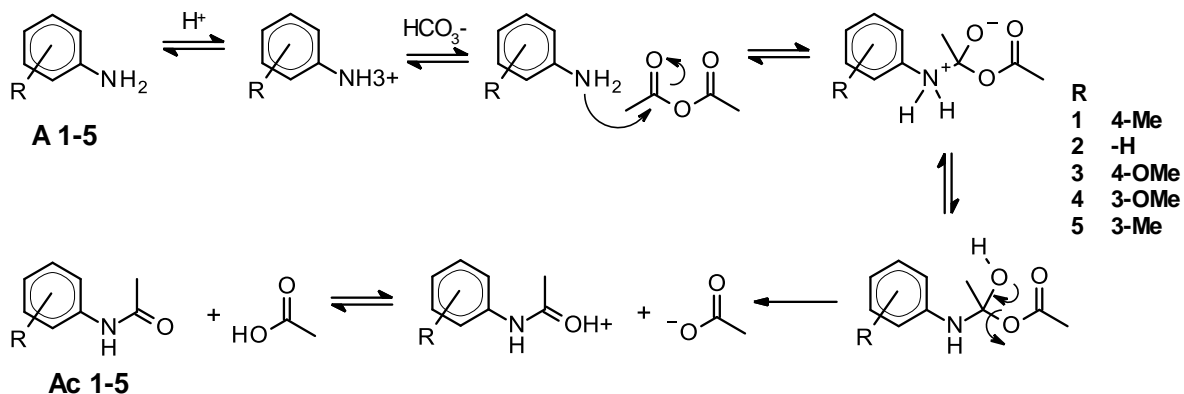
7.1. Síntesis

La síntesis de 2-cloro-3-formilquinolinas mediante la reacción de Vilsmeier-Haack empieza a partir de la síntesis de acetanilidas sustituidas. Para el presente trabajo se partieron de 5 anilinas distintas (anilina, *p*-toluidina, *p*-anisidina, *m*-anisidina y *m*-toluidina).

- **Síntesis de acetanilidas sustituidas. [Ac 1-5]**



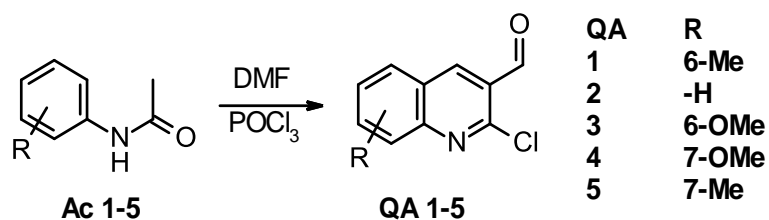
La reacción de acetilación de aminas aromáticas es un método ampliamente usado para la protección de dichos sustratos existiendo diferentes métodos para lograrlo. Uno de los más sencillos a nivel experimental y que conlleva a mayores rendimientos es el de la protección en medio acuoso, aprovechando que las aminas son de naturaleza básica, se puede acidificar el medio y convertirlas en su ácido conjugado, soluble en agua. La especie protonada no tiene carácter nucleofílico por lo que al agregar el anhídrido acético no hay reacción alguna, sin embargo al agregar NaHCO_3 , base débil, se promueve la liberación de la amina libre reaccionando inmediatamente con el anhídrido acético formando el producto deseado, insoluble en agua.



Cabe destacar que la reacción es más eficiente con los sustratos sustituidos con grupos dadores de densidad electrónica en las posiciones *orto* y *para* del anillo aromático, sustituciones que se traducen en una mayor basicidad y nucleofilicidad de la anilina correspondiente. El método usado fue preferido sobre el convencional de calentar a temperatura de reflujo la anilina en anhídrido acético, porque el mismo puede conllevar a la formación del producto doblemente acetilado, además de ser mucho más sencillo experimentalmente y conllevar a rendimientos, en algunos casos, casi cuantitativos.

En este paso de la síntesis, la identificación se llevó a cabo por la comparación del punto de fusión obtenido con el reportado en la literatura, siendo un procedimiento estándar para la preparación de derivados e identificación de anilinas. En todos los productos sintetizados se obtuvo un punto de fusión casi idéntico al reportado, siendo criterio de identificación suficiente para proceder con el siguiente paso.

- **Síntesis de 2-cloro-3-formilquinolinas sustituidas. [QA 1-5]**



Los rendimientos obtenidos fueron de 55%, 34%, 63%, 72% y 47% para las quinolinas **QA1**, **QA2**, **QA3**, **QA4** y **QA5** respectivamente, siendo menores a los valores reportados de al menos 70%. La disminución en el rendimiento es atribuible principalmente a la diferencia en las condiciones de reacción (ausencia de atmósfera inerte y/o a la no tan alta eficiencia del tubo con desecante), ya que el reactivo de Vilsmeier y el oxiclورو de fósforo son sensibles a la humedad. Sin embargo, la tendencia en el rendimiento sigue lo esperado: las quinolinas con grupos dadores de electrones en el anillo bencénico son las que se obtienen con mayor rendimiento, particularmente las sustituidas con grupos metoxi (**QA3** y **QA4**), excelentes dadores de electrones por resonancia.

La identificación de los compuestos **QA 1-5** fue posible gracias a la comparación entre los puntos de fusión obtenidos experimentalmente y los reportados, pudiendo observar una correlación muy buena sin existir diferencias significativas entre ambos valores (**Tabla 2**). Por otra parte, los datos espectroscópicos corroboran la obtención las quinolinas. Los espectros de **IR** muestran señales similares en todos los compuestos sintetizados, observándose señales comunes a todos ellos, resumidos en la **tabla 8**. Destaca la presencia de una banda intensa ubicada entre 1690 cm^{-1} - 1682 cm^{-1} asignada al estiramiento del enlace **C=O** junto con la señal entre 2881 cm^{-1} - 2830 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace **C-H** (Fermi), señales características del grupo **aldehído**. Se observan también, las bandas características de las vibraciones esqueléticas de la quinolina a 1499 cm^{-1} - 1488 cm^{-1} y 1627 cm^{-1} - 1615 cm^{-1} , atribuibles al estiramiento del enlace **C=C** del anillo heteroaromático, así como del enlace **C=N** a 1585 cm^{-1} - 1568 cm^{-1} . La presencia de una banda ubicada a 1057 cm^{-1} - 1044 cm^{-1} es atribuible al estiramiento del enlace **C_{Ar}-Cl**. Las quinolinas con sustitución en el anillo bencénico presentan bandas adicionales, por ejemplo **QA3** y **QA4** presentan dos bandas típicas de éteres aromáticos, una en 1029 cm^{-1} - 1019 cm^{-1} atribuibles al estiramiento **C-O-C simétrico** de baja intensidad y otra en 1247 cm^{-1} - 1230 cm^{-1} , que absorbe fuertemente, atribuible al

estiramiento **C-O-C asimétrico**. Por su parte los espectros de **QA1** y **QA5**, cuyo sustituyente es el grupo metilo, presentan una mayor complejidad a 812 cm^{-1} - 817 cm^{-1} atribuibles a la flexión fuera del plano del enlace **C-H** del grupo metilo.

QA	$\nu(\text{C=O})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C(O)-H})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C=C})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C=N})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{Cl})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C-O-C})$ (cm^{-1})
1	1692	2876	1499; 1622	1580	1057	-
2	1686	2872	1490; 1615	1568	1044	-
3	1682	2830	1498; 1617	1577	1055	1029; 1230
4	1690	2881	1491; 1620	1585	1048	1019; 1247
5	1688	2869	1488; 1627	1579	1049	-

Tabla 8. Frecuencia de los principales modos vibracionales en QA 1-5.

Adicionalmente se modeló el espectro teórico de **QA4** mediante **DFT** empleando un nivel de teoría **B3LYP** y una base de cálculo **6-311++G(d,p)** usando el programa **Gaussian09** siguiendo la metodología reportada para compuestos similares^{[81][82]}. Esto con el fin de comparar los espectros experimentales con los teóricos, observándose una muy buena correlación entre las frecuencias de los principales modos vibracionales. Esta correlación permite tener una referencia con los espectros de IR de los siguientes pasos de la síntesis, no reportados en la literatura.

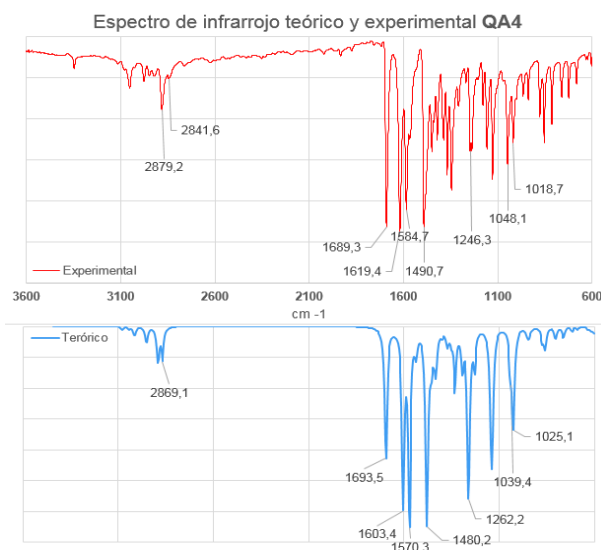


Figura 26. Espectro de Ir teórico y experimental QA4.

Los espectros de **UV-Vis** son muy similares entre todas las 2-cloro-3-formilquinolinas sintetizadas **QA 1-5 (figura 27)**, caracterizándose por un espectro sencillo y de bandas simétricas, en el que destacan dos máximos de absorción. La banda de mayor intensidad se ubica entre 249 nm - 262 nm, según el patrón de sustitución, atribuible a una transición del tipo $\pi-\pi^*$ del heterociclo, asociado al cromóforo carbonílico. Por su parte, la banda de baja intensidad ubicada entre 310 nm - 350 nm es atribuible a una transición prohibida del tipo $n-\pi^*$.

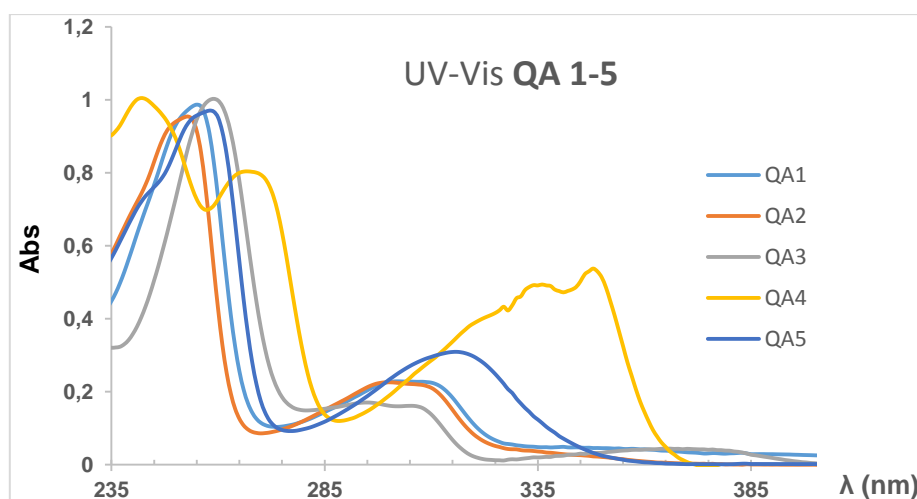
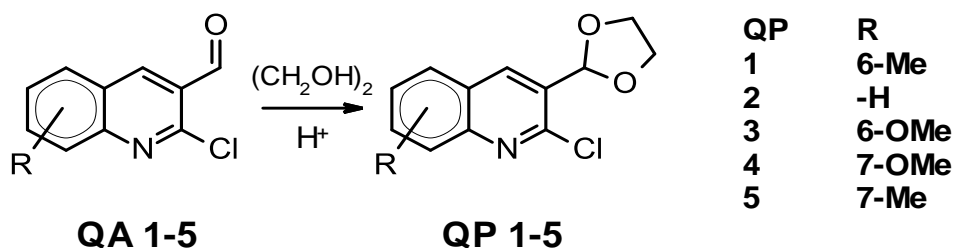


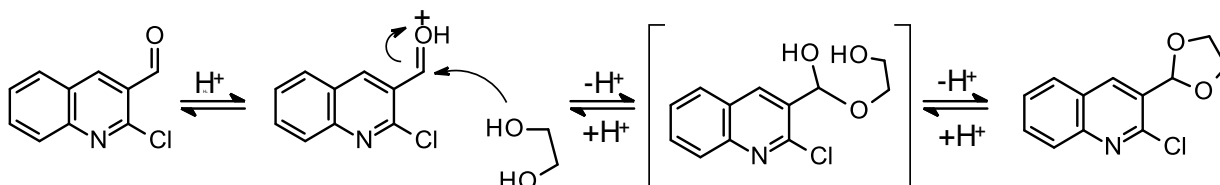
Figura 27. Espectro de UV-Vis de los compuestos QA 1-5.

- Síntesis de 2-cloro-3-(1,3-dioxolan-2-yl)-quinolinas sustituidas [QP 1-5].



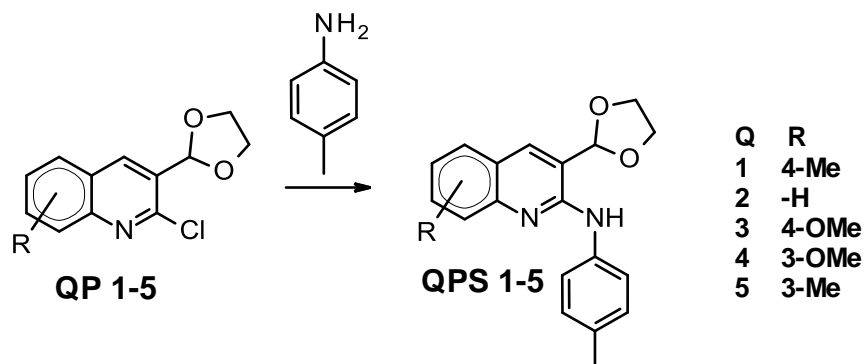
La protección del aldehído de las 2-cloro-3-formilquinolinas **QA 1-5** se realizó con etilenglicol, catalizado por ácido *p*-toluensulfónico y asistido por una trampa Dean-Stark para la remoción constante de agua. Este procedimiento ha sido reportado^[75] para los mismos sustratos obteniendo las 2-cloro-3-(1,3-dioxolan-2-yl)-quinolinas **QP 1-5** en buenos rendimientos. La literatura consultada reporta rendimientos cercanos a los cuantitativos, la disminución en el rendimiento obtenido puede atribuirse a la baja eficiencia en la remoción de agua del medio de reacción y a unas pérdidas menores en la purificación.

El mecanismo propuesto para la formación del acetal se muestra a continuación:

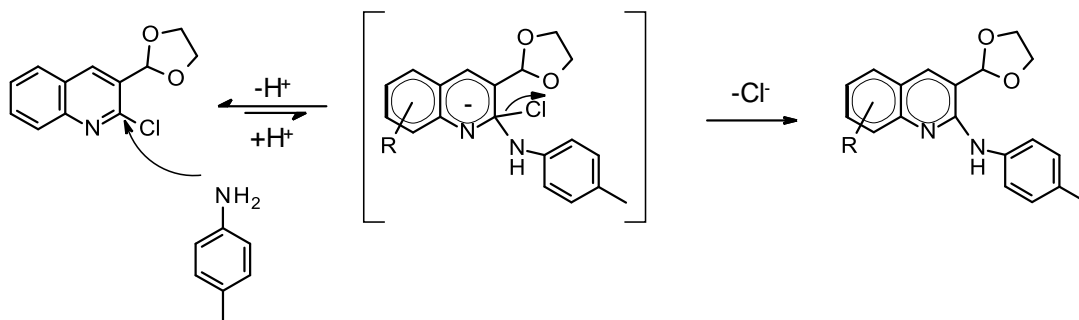


Aunque los puntos de fusión y la pureza del producto obtenido (verificado por ccf) fueron criterios que se consideraron suficientes para la identificación del producto también se tomó un espectro **IR** del compuesto **QP3**, resaltando principalmente la ausencia de la absorción característica del estiramiento **C=O** carbonilo presente en el material de partida **QA3** ($1682,2\text{ cm}^{-1}$), sumado a la aparición de bandas en 1347 cm^{-1} , $1107,2\text{ cm}^{-1}$ y $947,4\text{ cm}^{-1}$ características de los acetales cíclicos asignables al estiramiento asimétrico y simétrico del enlace **C-O-C** del éter cíclico y la flexión del enlace **C-H** de la corta cadena alifática, respectivamente. La presencia de las bandas correspondientes al anillo quinolínico y al grupo metoxi confirma el éxito de la protección sin modificar el resto del heterociclo.

• Síntesis de 2-anilin-3-(1,3-dioxolan-2-il)-quinolinas sustituidas. [QPS 1-5]



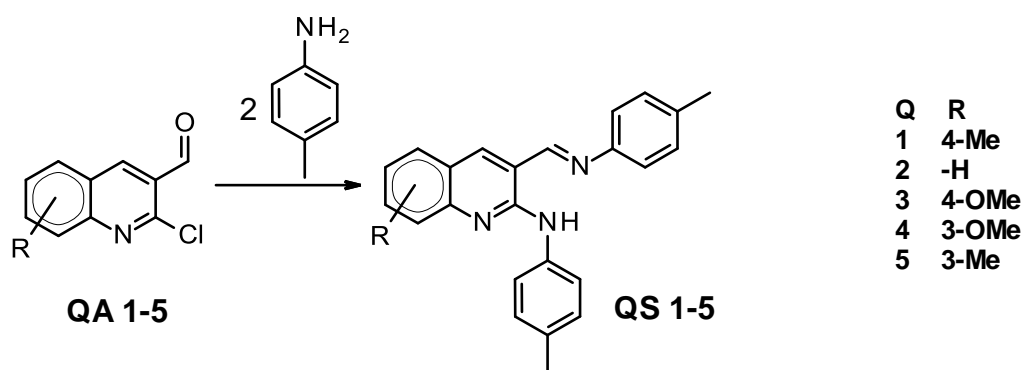
En este paso se intentó sustituir el cloro en la posición 2 de los acetales **QP 1-5** por *p*-toluidina, mediante una reacción de sustitución nucleofílica aromática. Se intentó llevar a cabo dicha sustitución en distintos solventes de diversa polaridad (etanol, DMF, etilenglicol y tolueno), variando los tiempos de reacción desde 5 h hasta 16 h sin éxito alguno, según lo indicado por ccf. Cabe destacar la inestabilidad de los acetales **QP 1-5**, ya que al almacenarlos durante unos días se regeneraban las 2-cloro-3-formilquinolinas correspondientes **QA 1-5**, pudiendo suponer que la humedad ambiental era suficiente para hidrolizar parcialmente el grupo protector, factor que dificultaba seguir la síntesis propuesta inicialmente. El mecanismo propuesto para la reacción de sustitución planteada se muestra a continuación:



Si bien están reportadas sustituciones similares empleando nucleófilos como tiofenoles, hidracinas, aminas primarias alifáticas de manera exitosa, también es cierto que dichos nucleófilos son mucho mejores que la *p*-toluidina, una amina aromática

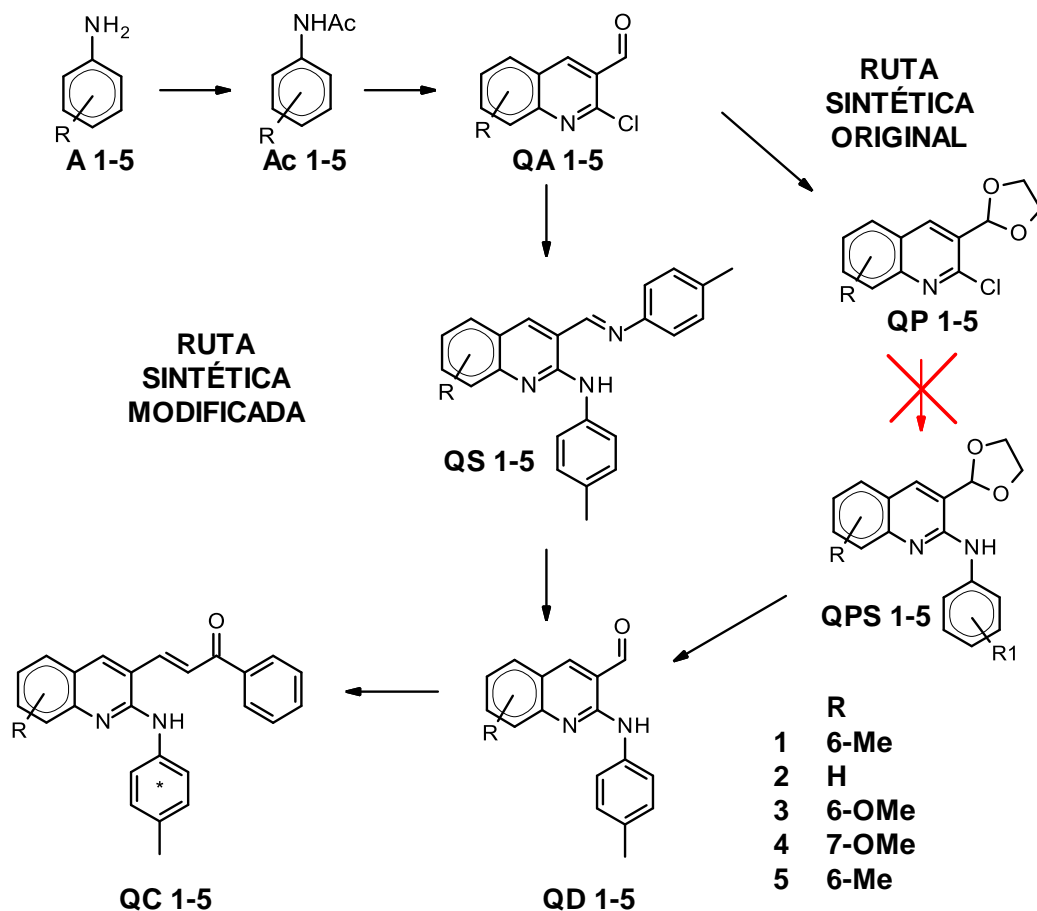
primaria débilmente nucleofílica comparada con estos sustratos. Además, mecanísticamente, el paso lento de una reacción de sustitución nucleofílica aromática tipo adición-eliminación, suele ser el ataque nucleofílico al carbono ipso del anillo aromático, a la vez que se forma una carga negativa deslocalizada sobre el mismo. El ataque se ve favorecido cuando existen grupos atractores en el anillo aromático, particularmente en la posición orto o para a dicho carbono. En este caso, las quinolinas empleadas carecen de grupos atractores de electrones, por lo que el ataque de la amina estaría más desfavorecida aún, justificando que la sustitución no se lleve a cabo.

- **Síntesis de 2-anilin-3-bencilidenimino-quinolinas sustituidas. [QS 1-5]**



Considerando que no fue posible seguir con la ruta originalmente propuesta debido a que el paso de sustitución del acetal no fue exitoso, se propuso una ruta alternativa sin alterar el principio con el cual se concibió. Inicialmente, se planteó proteger el carbonilo con una función acetal para evitar la reacción colateral, es decir, la formación de una base de Schiff en la posición 3 de **QA**. Sin embargo, las bases de Schiff son reversibles en cada paso de su formación, pudiendo entonces proponer una modificación en la ruta sintética: permitir la formación de la base de Schiff, la posterior sustitución del halógeno,

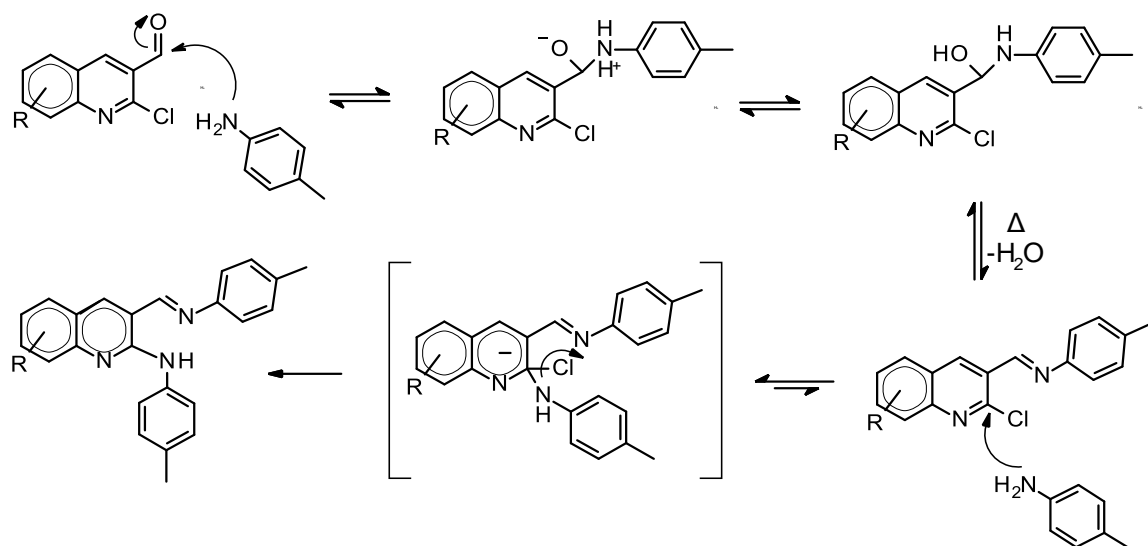
para luego en un paso subsecuente hidrolizar la imina formada y retomar la ruta original, tal y como se muestra a continuación:



Para llevar a cabo tal funcionalización, estudiando la estequiometría de la reacción, harían falta dos equivalentes de *p*-toluidina. Cada equivalente sustituyendo las posiciones 2 y 3 de **QA** y un equivalente adicional para garantizar un medio básico, a fin de mantener el carácter nucleofílico de la amina. Tanto para la formación de la base de Schiff como para la sustitución del cloro se necesita esencialmente un solvente con una polaridad moderada, ambos compuestos y calentar a temperatura de reflujo, por lo que se escogió el tolueno, capaz de llevar a altas temperaturas la mezcla de reacción considerando que

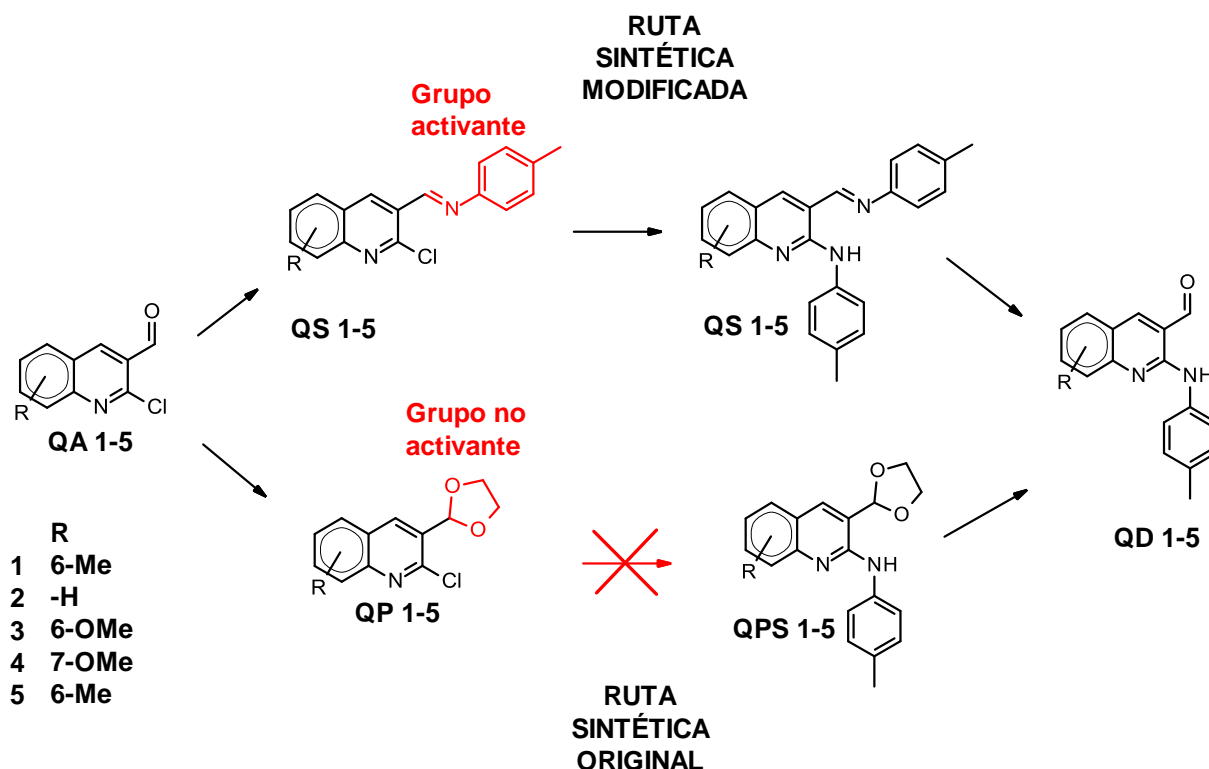
la *p*-toluidina demostró no ser un nucleófilo tan fuerte y favoreciendo más aún la formación de la base de Schiff.

Al seguir la reacción por ccf, se observó la formación de un primer producto, instantes después de haber preparado la mezcla de reacción. Luego, al transcurrir unas horas a temperatura de reflujo, se observaba la formación de segundo producto a la vez que se observaba la desaparición del material de partida y del primer producto formado. Se propuso entonces, que el primer producto, de rápida formación, era la base de Schiff aún sin sustituir la posición 2 ya que la formación de la imina tiende a llevarse a cabo más fácilmente en comparación a una sustitución nucleofílica aromática. Por otra parte al aumentar la temperatura y transcurrir el tiempo de reacción, la sustitución de la posición 2 se estaría llevando a cabo. El mecanismo propuesto para este paso se muestra a continuación:



A diferencia de la sustitución sobre **QP** de la ruta de síntesis original, en donde la densidad electrónica en el anillo piridínico de la quinolina carecía de grupos atractores de electrones que pudieran activar el anillo para una S_NAr, la presencia del grupo azometino (-C=N-) de la base d Schiff en posición orto actúa como atractor de electrones, activando

el anillo y permitiendo la sustitución. Es por ello que mediante esta ruta se sustituye fácilmente el cloro de la posición 2 de la quinolina.



La caracterización de los compuestos **QS 1-5** fue posible gracias a los espectros de **IR** en los que se observa un espectro con señales comunes a todos ellos (**tabla 9**). En los espectros es evidente la desaparición de la banda de absorción típica del grupo carbonilo presente en **QA 1-5**, a la vez que se observa la aparición de una banda intensa entre 1629 cm^{-1} - 1604 cm^{-1} atribuible al estiramiento del enlace **C=N** del grupo imino formado. Además, una banda de baja intensidad a 3259 cm^{-1} - 3276 cm^{-1} atribuible al estiramiento del enlace **N-H** y otra de mediana intensidad que absorbe a 1375 cm^{-1} - 1358 cm^{-1} atribuible al estiramiento del enlace **C-N** confirma la formación de la amina secundaria, junto a la desaparición de la absorción del enlace **C_{Ar}-Cl**, previamente ubicado en 1057 cm^{-1} - 1044 cm^{-1} .

QS	ν (N-H) (cm^{-1})	ν (C=N) (base Schiff) (cm^{-1})	ν (C-N) (cm^{-1})	ν (C _{Ar} -Cl) (cm^{-1})	ν (C-O-C) (cm^{-1})
1	3274	1623	1361	-	-
2	3259	1610	1358	-	-
3	3271	1629	1368	-	1029; 1230
4	3268	1604	1375	-	1019; 1247
5	3276	1616	1636	-	-

Tabla 9. Frecuencia de los principales modos vibracionales en QS 1-5.

La frecuencia de los principales modos vibracionales mencionados anteriormente, en el espectro teórico de IR de **QS4** calculado mediante la metodología descrita para **QA4**, coincide razonablemente bien con los experimentales, sugiriendo que el espectro corresponde efectivamente a la base de Schiff propuesta, ofreciendo una prueba más del éxito del paso de síntesis.

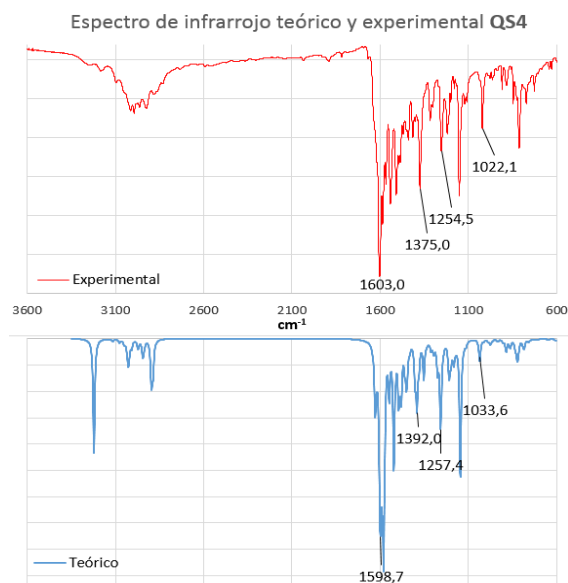


Figura 28. Espectro de IR teórico y experimental QS4.

En los espectros de UV-Vis de **QS 1-5** se puede observar un desplazamiento batocrómico del máximo de mayor absorción (310 nm – 330 nm) con respecto al máximo de absorción de las 2-cloro-3-formilquinolinas **QA 1-5**, atribuible a la transición $\pi\text{-}\pi^*$ del sistema conjugado, consistente con la mayor deslocalización electrónica. Resalta la poca simetría y la presencia de hombros o *shoulders* en este máximo, sugiriendo la sustitución de las posiciones 2 y 3, observando las numerosas transiciones electrónicas que se dan en este rango energético. La transición ubicada entre 415 nm y 450 nm es atribuible a la transición prohibida del tipo $n\text{-}\pi^*$ del sistema conjugado.

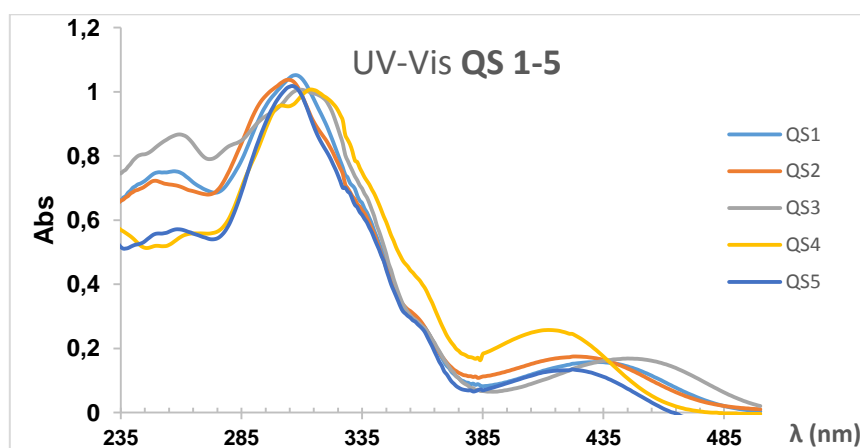
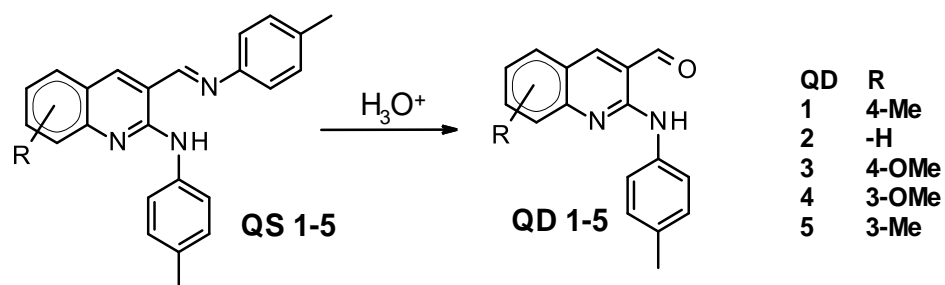
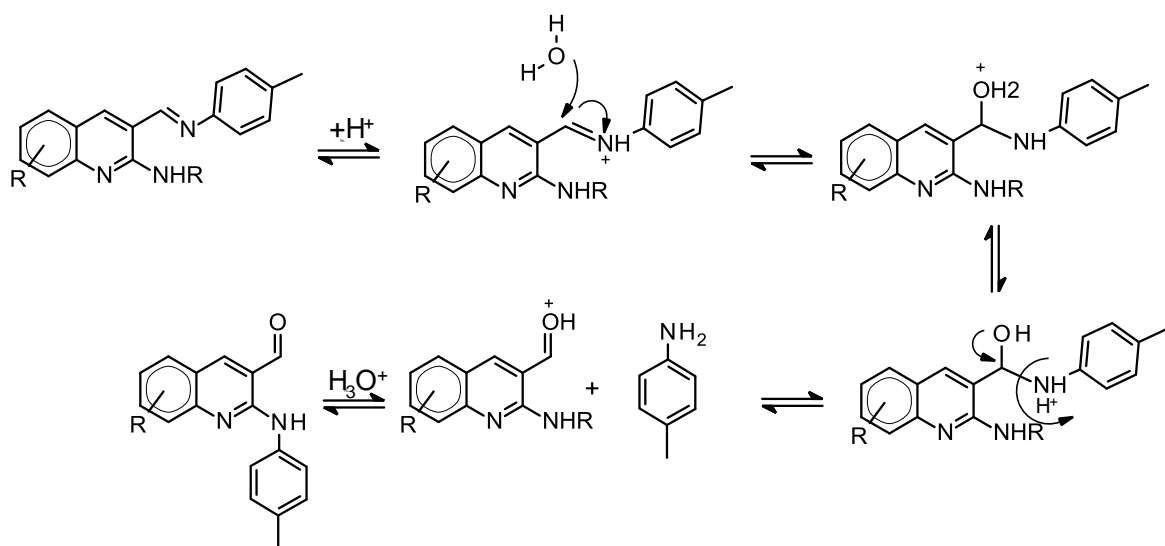


Figura 29. Espectro UV-Vis QS 1-5.

- **Síntesis de 2-anilín-3-formilquinolinas sustituidas. [QD 1-5]**



Siguiendo con la ruta alternativa propuesta se regeneró el carbonilo mediante una hidrólisis ácida. El único grupo afectado es la base de Schiff en la posición 3, ya que el grupo amino en la posición 2 no es desplazable por un mal nucleófilo como el agua, menos aún en medio ácido. Como producto de la reacción se obtuvo un nuevo compuesto no observado antes por ccf. El mecanismo propuesto de hidrólisis es el siguiente:



El espectro de **IR** de los compuestos **QD 1-5** presenta señales comunes a todos ellos (**tabla 10**) y se caracterizan por la reaparición de la banda típica de absorción del estiramiento del enlace **C=O** del grupo carbonilo, entre 1672 cm^{-1} - 1665 cm^{-1} , según la quinolina sintetizada, desplazado aproximadamente -20 cm^{-1} con respecto a **QA 1-5** debido al efecto dador de densidad electrónica del grupo anilino en la posición 2. El éxito de la hidrólisis sin alterar la sustitución en dicha posición, se confirma con la presencia de las mismas señales de la amina, atribuibles al estiramiento de los enlaces **N-H** (3296 cm^{-1} - 3267 cm^{-1}) y **C-N** (1361 cm^{-1} - 1354 cm^{-1}) y del enlace las bandas de absorción de los anillos aromáticos (1400 cm^{-1} y 1600 cm^{-1}).

QD	ν (C=O) (cm^{-1})	ν (N-H) (cm^{-1})	ν (C-N) (cm^{-1})	ν (C-O-C) (cm^{-1})
1	1672	3267	1354	-
2	1665	3304	1358	-
3	1670	3290	1357	1025; 1210
4	1667	3296	1361	1022; 1254
5	1616	3293	1357	-

Tabla 10. Frecuencia de los principales modos vibracionales en QD 1-5.

Los espectros calculados y experimentales IR para **QD4** (7-metoxi) tienen una muy buena correspondencia en las bandas observadas, pudiendo correlacionar el espectro experimental obtenido con los cambios estructurales asignados.

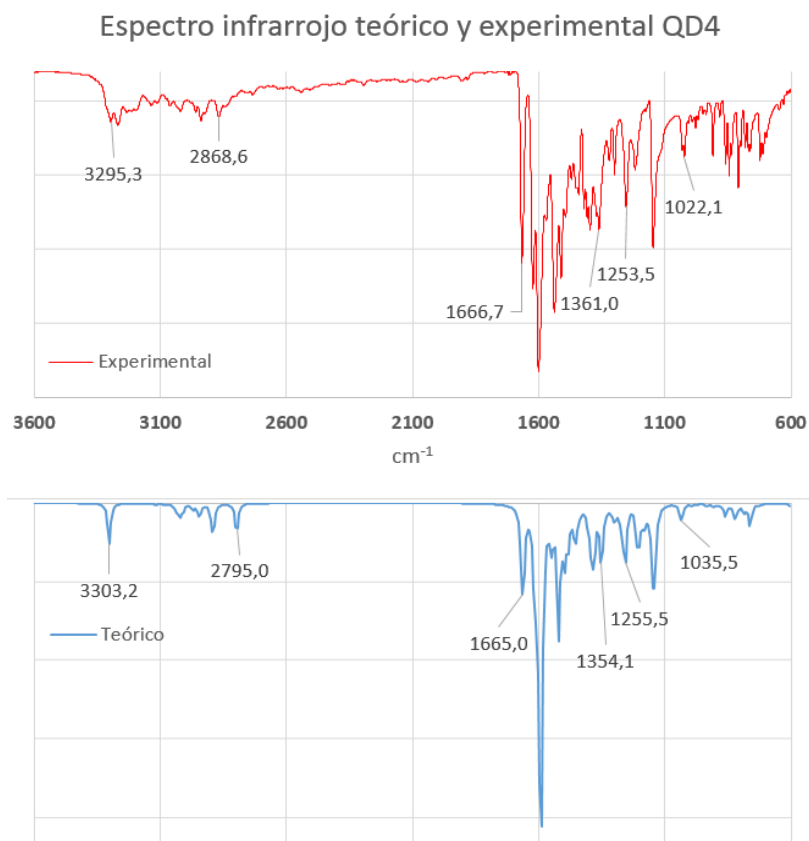


Figura 30. Espectro de IR teórico y experimental QD4.

En los espectros de UV-Vis destaca la reaparición de la absorción intensa y definida entre 240-250 nm teniendo prácticamente la misma forma que en **QA**, por lo que es atribuible a la transición π - π^* del anillo quinolínico, en presencia del grupo carbonilo. Adicionalmente se observa otro máximo entre 292-312 nm atribuible a la transición π - π^* del anillo aromático de la *p*-toluidina en posición 2. Cabe destacar que a diferencia del espectro de UV-Vis de **QS** este luce mucho más simétrico y definido por la presencia de los dos cromóforos mencionados, mientras que la sustitución de **QS** daba lugar a numerosas transiciones secundarias. Adicionalmente una banda de baja intensidad entre 400-450 nm es atribuible a la transición prohibida del tipo n - π^* .

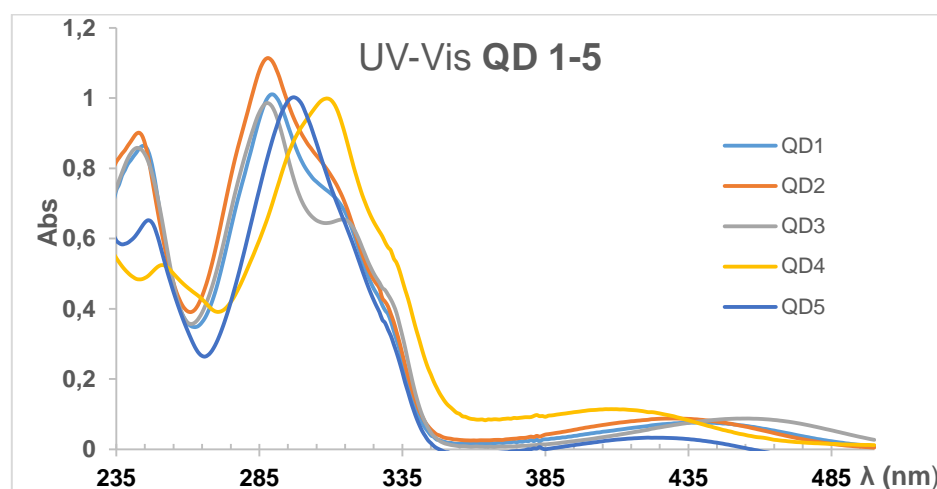
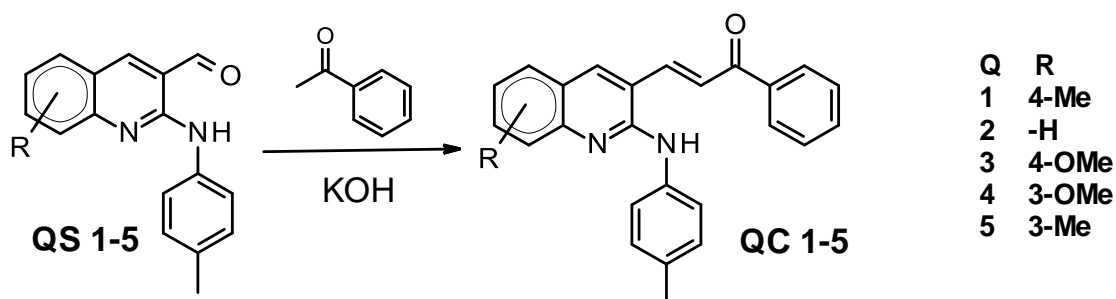
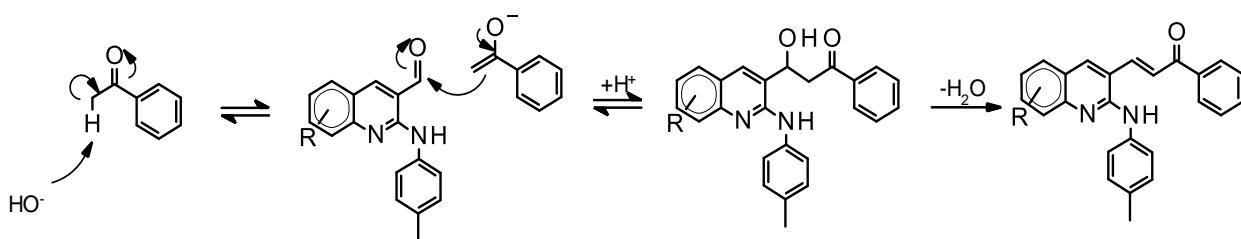


Figura 31. Espectro de UV-Vis QD 1-5.

- Síntesis de (*E*)-3-(2-anilin-3-quinolinil)-1-fenil-2-propen-1-onas. [QC 1-5]



Para el último paso de la síntesis se planteó una condensación aldólica convencional. Existen varios métodos reportados incluyendo el convencional de usar un solvente como etanol y cantidades equimolares de acetofenona y **QA2** catalizado por NaOH acuoso.^[79] Dado que se trata del mismo tipo de sustrato se intentó seguir este procedimiento, sin embargo al seguir la reacción por ccf se observaba la formación de una considerable cantidad de productos colaterales. Por ello se investigó sobre otros métodos y se optó por una reacción libre de solventes obteniendo un único producto según lo observado por ccf. El mecanismo propuesto se muestra a continuación:



Cabe resaltar los bajos rendimientos que se obtuvieron de las chalconas deseadas, debido a la presencia del grupo anilino en posición 2 de la quinolina, un gran dador de densidad electrónica por resonancia que le resta carácter electrofílico al carbono carbonílico, además de las reacciones colaterales esperadas en una condensación aldólica, como Cannizzaro.

La identificación de los compuestos **QC 1-5** fue posible a través de sus datos espectroscópicos mostrando señales comunes a todos ellos (**tabla 11**). El espectro de **IR** muestra un aparente solapamiento de las señales de anillos quinolínicos y bencénicos entre 1455 cm⁻¹ -1600 cm⁻¹ debido a la presencia de ambos sustituyentes aromáticos y las vibración del enlace **C=C** olefínico. La señal en 1448 cm⁻¹-1454 cm⁻¹ es atribuible a la flexión en el plano del enlace **C-H** olefínico. Además, se observa una fuerte absorción ubicada entre 1672 cm⁻¹-1680 cm⁻¹ atribuible al estiramiento **C=O** del grupo carbonilo, desplazada alrededor con respecto a los compuestos precursores **QD 1-5**, al tratarse de

la arilcetona α,β -insaturada. Por último una banda de mediana intensidad a cm^{-1} es atribuible al estiramiento del enlace **N-H** de la amina secundaria

QC	$\nu(\text{C=O})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{N-H})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C=C-H})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C-O-C})$ (cm^{-1})
1	1677	3320	1448	-
2	1680	3340	1448	-
3	1670	3345	1454	1025; 1210
4	1676	3345	1450	1038; 1220
5	1679	3346	1450	-

Tabla 11. Frecuencia de los principales modos vibracionales en QC 1-5

El espectro teórico calculado se corresponde bastante bien con el experimental, observándose valores similares para los modos vibracionales mencionados en el punto anterior, sugiriendo la correcta elucidación del espectro experimental y el éxito de la condensación.

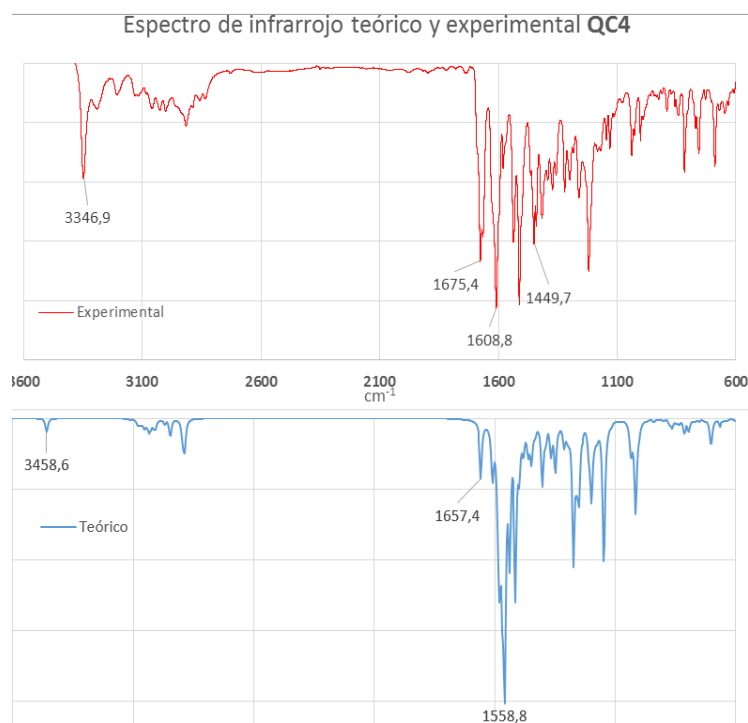


Figura 32. Espectro de IR teórico y experimental QC4.

En el espectro de UV-Vis se observa la ya característica absorción de la transición $\pi-\pi^*$, con máximo en 240-250 nm del cromóforo carbonílico y una banda secundaria entre 275-290 nm atribuible al anillo bencénico incorporado a la molécula. Se observa además una absorción de baja intensidad entre 350-370 nm atribuible a la transición prohibida del tipo $n-\pi^*$.

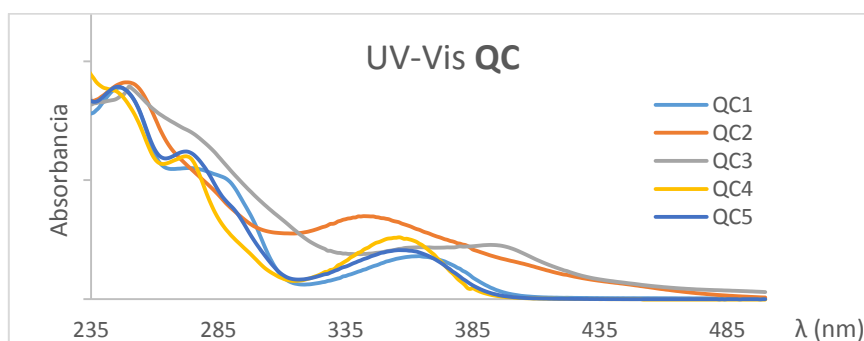


Figura 33. Espectro de UV-Vis QC 1-5.

Al igual que se modelaron los espectros teóricos de infrarrojo, se obtuvieron los espectros de **UV-Vis** teóricos de los compuestos pertenecientes a la serie **Q1** (grupo metilo en posición 6 de la quinolina), empleando **TD-DFT** con un nivel de teoría **B3LYP** y una base de cálculo **6-311G++(d,p)** en fase gas. Comparando los espectros de UV-Vis experimentales de los compuestos obtenidos a lo largo de la ruta sintética modificada (**QA1-QS1-QD1-QP1**) con los espectros teóricos corregidos, se observa una correlación bastante buena entre ambos. En este sentido, se pueden visualizar el mismo tipo de desplazamiento y número de máximos en cada espectro (**figura 34**) sugiriendo la correcta asignación de los productos propuestos.

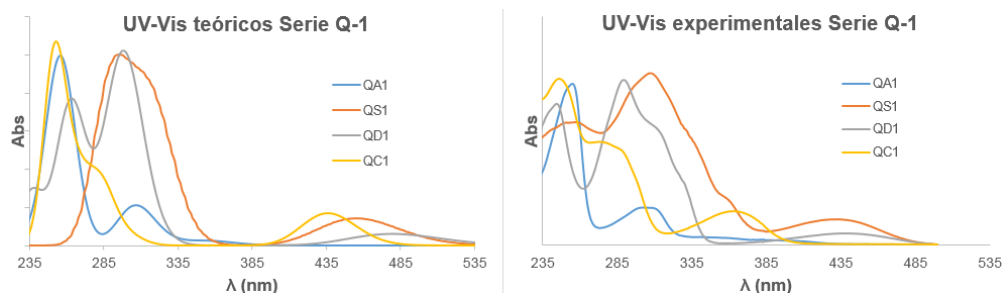


Figura 34. Espectros de UV-Vis teóricos y experimentales Serie Q-1.

7.2. Acoplamiento molecular

- **Selección de la proteína.**

Tal y como se expuso en el marco teórico del presente trabajo, existen esencialmente dos conformaciones de la proteasa NS2B/NS3 del DENV, una conformación **abierta** en la que el cofactor NS2B no se encuentra plegado sobre el sitio activo, y la conformación **cerrada** en donde el mismo se encuentra plegado sobre el sitio activo definiendo el sitio de unión. Existe cierto debate sobre cual conformación de la proteasa del DENV es la adecuada para los estudios de modelado molecular, dando pie a que muchos autores usen la conformación abierta, argumentando que el ligando es el que induce al plegamiento del cofactor NS2B.^[4] Sin embargo, estudios más recientes, han determinado a través de RMN, que la conformación cerrada es la predominante en solución, independientemente de si hay o no un ligando unido a ella, además de que la conformación activa conocida (la conformación que conlleva a la actividad enzimática) para proteasas de la misma familia del DENV, como por ejemplo la del virus del Nilo occidental (**WNV**).^[80]

Hay muy pocas estructuras determinadas a través de cristalografía de rayos-X o RMN de la proteasa del DENV, lo que dificulta más aún la selección adecuada. Sin embargo en la base de datos **NCBI PubChemDatabase**, se encuentran depositadas la proteína con el código **2FOM**, correspondiente a la conformación abierta con una resolución de 1,5 Å y del serotipo DENV2, así como otra estructura con el código **3U1I**, correspondiente a la conformación cerrada con una resolución de 2,5 Å, del serotipo DENV3. La primera carece de ligando cocrystalizado, mientras que la segunda tiene cocrystalizado un ligando péptido de cadena corta. **Se decidió elegir la conformación cerrada** para el estudio a realizar, no solo porque está reportada como la predominante en solución (su entorno natural) sino que al tener un ligando cocrystalizado los residuos dentro del sitio de unión ya están orientados para interactuar con un potencial ligando. Además el ligando cocrystalizado, si bien es peptídico y con poca o nula similaridad

estructural con los compuestos a estudiar, interacciona con todas las subcavidades del sitio, definiendo mejor la orientación de todos los residuos hacia una potencial interacción. La mejor estructura con la conformación cerrada, depositada en el **NCBI PubChemDatabase** u otra base de datos, hasta la fecha, tiene el código PDB **3U1I**. Cabe resaltar que esta estructura tiene menor resolución que la de conformación abierta (código PDB: **2FOM**), pero se prefirió una conformación correcta en detrimento de una mejor resolución para el estudio de acoplamiento molecular.

- **Preparación de la proteína.**

Para la preparación de la proteína, se descargó el archivo de coordenadas de la proteasa NS2B/NS3 del DENV con el código PDB **3U1I** en formato .pdb. En este archivo, tal y como se obtienen las estructuras de las proteínas cristalizadas determinadas por cristalografía de rayos-X, se tiene la posición relativa de los átomos *pesados* que la conforman, excluyendo los hidrógenos. Es por ello que es necesario agregar los hidrógenos así como asignar las cargas parciales correspondientes a los heteroátomos presentes. Sin embargo al agregar los hidrógenos es necesario optimizar (minimizar energéticamente) la estructura resultante, de tal manera de re-orientar los residuos una vez añadidas las cargas y los hidrógenos. Dicha minimización sin embargo, debe hacerse fijando las coordenadas del esqueleto de la proteína para garantizar que no se hayan modificado las posiciones relativas de la estructura terciaria de la misma, pues la estructura original fue obtenida experimentalmente y ha de ser mantenida como referencia para la validación de la preparación. Dicha validación suele hacerse mediante un gráfico Ramachandran.

El archivo obtenido tras la minimización del archivo de coordenadas original de la proteína NS2B/NS3 (código PDB: **3U1I**) fue validado mediante la evaluación de la calidad estereoquímica y del entorno de los aminoácidos. Para ello, empleando **VegaZZ**, se generó el diagrama de Ramachandran (**figura 35**) antes y después de la minimización.

La figura indica la posición de los aminoácidos, en donde el 61,84 % están en la región "favorecida" (zonas rojas) y el 77,29% en la "permitida" (zonas verdes) corroborando la validez de la estructura. Es de notar que los gráficos son idénticos, lo que quiere decir que no se alteró el plegamiento nativo de la estructura terciaria de la proteína, validando entonces la estructura para su uso en el acoplamiento molecular.

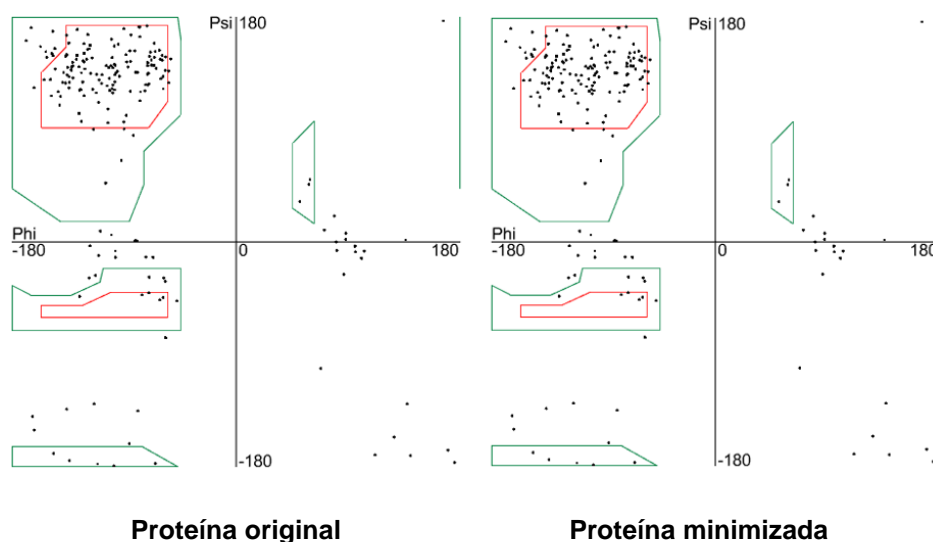


Figura 35. Gráfico de Ramachandran para la proteína original y minimizada

- **Identificación y caracterización del sitio de unión de la proteína.**

En la literatura está plenamente identificada la ubicación y los residuos que conforman el sitio de unión de la proteasa del DENV (**figura 14**) sin embargo, es imprescindible calcular computacionalmente, sobre la proteína preparada en el paso anterior, el sitio de unión y propiedades fisicoquímicas que ayuden a definir la *caja* o espacio de búsqueda que se realizara en el acoplamiento molecular, además de determinar las propiedades fisicoquímicas que definan las regiones de unión y aminoácidos catalíticos esenciales para la interacción con el ligando.

Para este fin se empleó el software **FPocket** disponible en la interfaz de **VegaZZ**, el cual calcula las cavidades presentes en la proteína creando esferas sobre la superficie

de la misma, definiendo una cavidad como un cúmulo de esferas aglomeradas en un espacio a una distancia determinada. El programa calculó numerosas cavidades a lo largo de la superficie de la proteína, definiendo como sitio de unión y de interés, la cavidad donde se encuentra la tríada catalítica (H51, D75, S135).

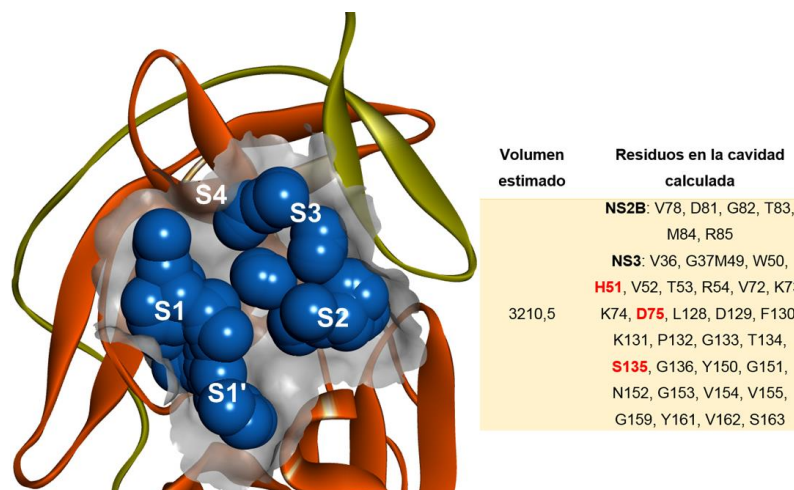


Figura 36. Identificación del sitio de unión de la proteína.

En la **figura 36** se muestran los resultados obtenidos del cálculo de la cavidad del sitio de unión. En el mismo se aprecia la forma espacial del sitio, además de los aminoácidos que lo conforman. Estos resultados se corresponden con los aminoácidos reportados del sitio (**figura 14**), por lo que se pudo obtener un archivo con la superficie de unión, sumamente importante para definir el área de búsqueda, o *caja*, en el acoplamiento molecular.

La caracterización del sitio de unión es otro factor clave en el estudio previo al acoplamiento, pudiendo ubicar las potenciales interacciones con un ligando. Los resultados obtenidos de esta caracterización son mostrados sobre la superficie de unión calculada en el paso anterior.

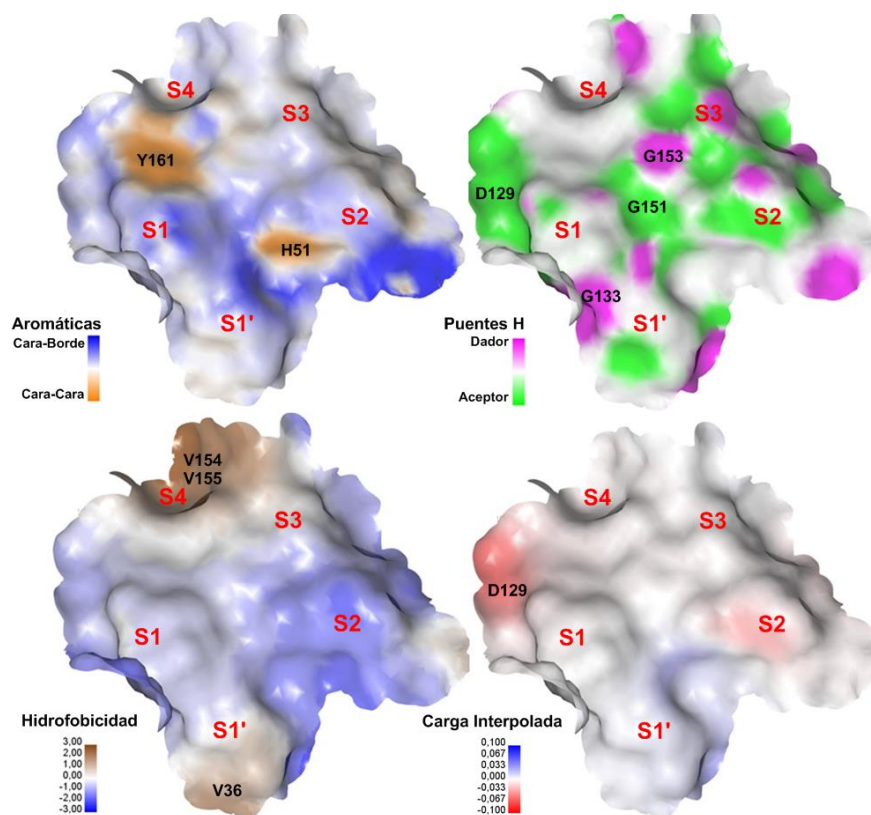


Figura 37. *Propiedades fisicoquímicas del sitio de unión.*

En la **figura 37** se describen las distintas propiedades fisicoquímicas del sitio de unión de la proteína NS2B/NS3 del DENV. Entre todas ellas destacan las potenciales interacciones aromáticas cara-cara del residuo **Y161** con un ligando, al igual que con el residuo **H51**, parte de la tríada catalítica. Además puede haber interacciones tipo puente de hidrógeno a través de los residuos **D129** y **G151** como aceptor y los residuos **G133** y **G153** como dador. Destaca también una región hidrofóbica a través de los residuos **V154** Y **V155**, pertenecientes a la subcavidad S4, al igual que el residuo **V36**, en la subcavidad S1'. Por último, cabe destacar la carga parcial negativa sobre el residuo **D129**, ubicado en S1. Estas, y otras interacciones, pueden llevarse a cabo cuando un ligando interactúa con el sitio de unión. La importancia de esta caracterización radica en determinar las principales interacciones de los ligandos a estudiar a fin de hallar cuales son clave para una respuesta biológica como inhibidor.

- **Acoplamiento molecular de la librería control.**

Con el fin de predecir adecuadamente la potencial afinidad de los compuestos sintetizados se realizó el acoplamiento molecular sobre inhibidores reportados de la proteasa NS2B/NS3 del DENV. Este procedimiento cumple dos funciones: validar los parámetros empleados en el acoplamiento molecular a través de la obtención de una correlación directa entre los valores de afinidad y la actividad biológica, así como también determinar las interacciones claves con el sitio de unión que se traducen en dicha actividad.

Los compuestos seleccionados (**figura 25**) guardan cierta similaridad estructural, mediante inspección visual, con respecto a las chalconas sintetizadas **QC 1-5** de tal manera que pudieran adoptar poses similares en el acoplamiento molecular y poder discernir la afinidad y las interacciones que definen a un inhibidor activo. En este sentido, los compuestos **A, B, B1, C, D** comparten en común un núcleo quinolínico: **A** con un sustituyente arilo en posición 2, **B** y **B1** son 8-hidroxiquinolinas sustituidas en el anillo bencénico, **C** contiene grupos aromáticos en las posiciones 2 y 4 enlazadas con grupos azo y **D** sustituido con un grupo aromático en posición 4. Además, se incluyeron otros heterociclos nitrogenados como los indoles **E, E1, F, F1** sustituidos en las posiciones 1 y 3 que espacialmente comparten una ramificación similar a las quinolinas sintetizadas así como también compuestos inactivos como inhibidores que pudiesen servir como control negativo del estudio por ser compuestos inactivos como inhibidores.

Los resultados del acoplamiento molecular de la librería control (tamizado virtual) se muestran en la **tabla 8**. En general se puede observar un comportamiento acorde a lo esperado, es decir, los compuestos más activos presentan mejores valores de afinidad (ΔG más negativo) mientras los menos activos tienen menor afinidad (ΔG más positivo).

Esta primera inspección de los resultados valida el procedimiento empleado al encontrar una correlación cualitativa entre afinidad obtenida y valores de actividad biológica.

Los compuestos más activos (menor IC_{50}) como **B**, **D**, **F** o **H** tienen en común la ocupación de las subcavidades S1 y S2 del sitio de unión así como las interacciones tipo puente de hidrógeno con los residuos G151 ó G153, así como también la interacción tipo π - π con el residuo Y161. Por su parte, compuestos como **B1** que estructuralmente solo se distingue de **B** por una ramificación de una cadena más pequeña pierde interacción con S2 lo que justificaría su pérdida de actividad inhibitoria o mayor IC_{50} . Algo similar ocurre con **F1**, muy similar a **F** estructuralmente pero de cadena más corta que, a pesar de ocupar las mismas subcavidades S1 y S2 tiene menor actividad por la aparente. Se puede concluir entonces, que **las interacciones claves que hacen de un compuesto un inhibidor activo, es la ocupación de las subcavidades S1 y S2 presentando interacciones tipo puente de hidrógeno con los residuos G151 ó G153 y de tipo aromática con el residuo Y161**, siendo las demás interacciones complementarias. Además, **energéticamente, un inhibidor posee valores de afinidad menores a -7,8 Kcal/mol**, aproximadamente.

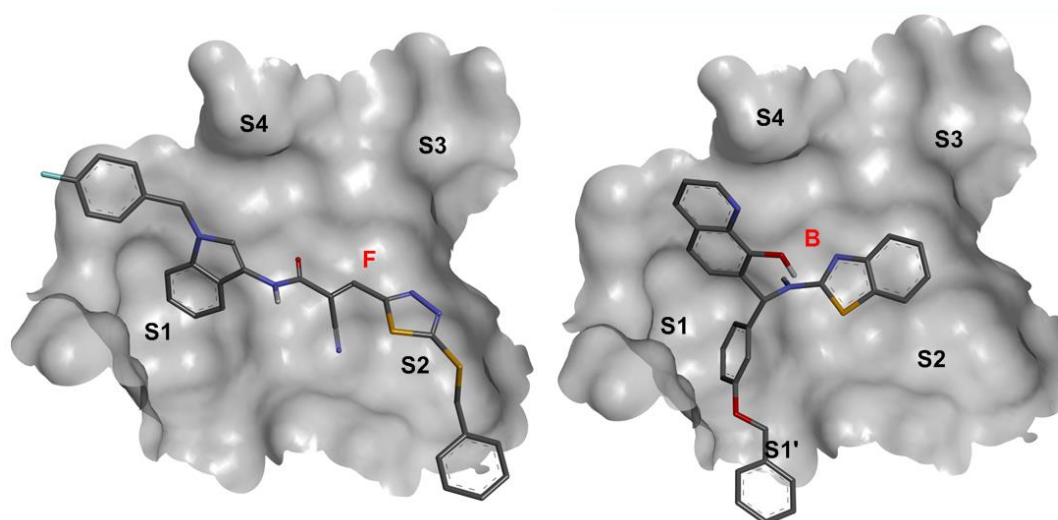


Figura 38. Acoplamiento de los compuestos control B y F en el sitio de unión.

Ligando	Energía de unión (ΔG)	Cl ₅₀ (μM)	RMSD (Å)	Sub-cavidades	Inter. puente H	Inter. pi-pi
H4	-9,6	14,90	0,1367	S1,S2, S3, S4	G153, T134, S135	-
D	-9	5,0 (EC ₅₀)	0,0672	S1, S2, S3, S4	G153, V155	H51, Y161
B	-8,9	0,91	0,1145	S1, S2	G151	H51, Y161
A	-8,8	12,50	0,2478	S1, S2, S4	G82, T83, N152	Y161
F	-8,8	2,24	1,1156	S1, S2	G153	Y161
H	-8,5	9,10	0,2667	S1, S1' S2	G153	H51, Y161
B1	-8,4	2,93	0,2893	S1, S1', S4	G133, G151, G153, Y161	Y161
F1	-8,4	10,07	0,2183	S1, S2	G153	H51, Y161
H1	-8,3	19,90	0,2816	S1, S2	-	H51
C	-7,8	9,21	0,1931	S1, S2	D75, G133	H51, Y161
E	-7,3	39% inhib.	0,3179	S1, S1'	D129, G133, T134, S135, G151	Y161
E1	-7,3	<10% inhib.	0,4343	S1,S1'	G133, T134, S135	Y161
H3	-7	Inactivo	1,0073	S1	G133, S135	Y161
G	-6,8	<15% inhib.	0,3894	S1	T134	Y161
G1	-6,8	40,02	0,3868	S1, S4	K131	Y161
H2	-5,8	Inactivo	3,1995 (3 clusters)	S1	F130, K131, G153, T134	-

Tabla 12. Tamizado virtual de la librería control.

Las interacciones clave resaltadas anteriormente explican porque **H4**, el más afín de todos los compuestos tiene una actividad reportada tan baja: la ausencia de la interacción aromática con el residuo Y161 a pesar de la correcta orientación del ligando en el sitio de unión. Los compuestos *control negativo* tienen en común que no ocupan S1 y S2 simultáneamente sino solo S1 además de interactuar con los residuos clave para las interacciones tipo puente de hidrógeno y aromáticas.

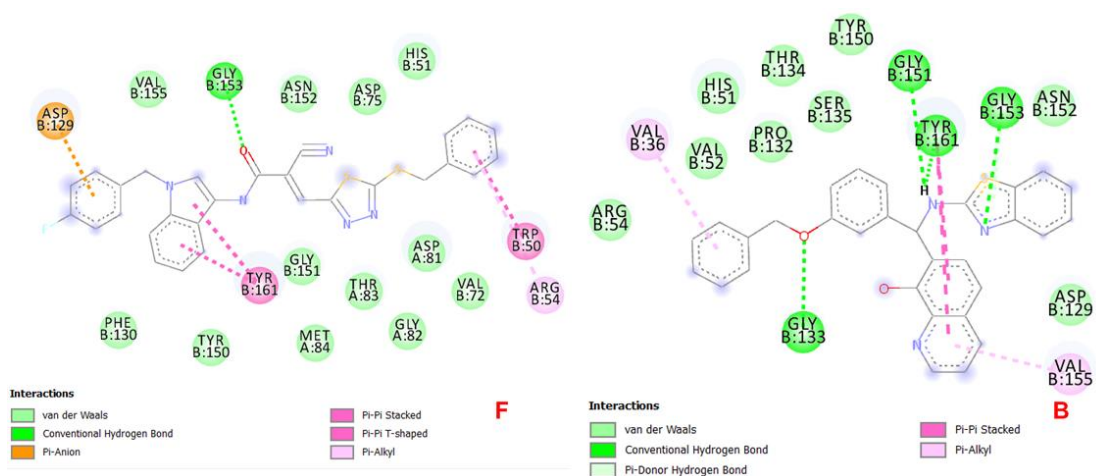


Figura 39. Interacciones de los complejos formados.

- **Acoplamiento molecular de la librería control y compuest**

Yo Profesor Gustavo Cabrera, Investigador del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora María Luisa Serrano Investigadora de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela,

Certificamos que, el presente trabajo especial de grado titulado:

**“SÍNTESIS DE (2E)-3-(2-ANILIN-3-QUINOLINIL)-1-FENIL-2-PROPEN-1-ONAS
SUSTITUIDAS Y SU ESTUDIO MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR COMO
POSIBLES INHIBIDORES DEL DENGUE”**

Que presenta el Br. José Leonardo Carrero Osorio, para aspirar al título de Licenciado en Química, se realizó en el Laboratorio de síntesis del grupo de productos naturales de la Escuela de Química y en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2017 y 2018, con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Octubre de 2019

Dr. Gustavo Cabrera
Tutor
Facultad de Ciencias

Dra. María Luisa Serrano
Tutor
Facultad de Farmacia

os sintetizados.

El estudio de acoplamiento molecular estaba inicialmente solo planteado para la serie **QC**, sin embargo los compuestos **QS**, obtenidos mediante la modificación de la ruta sintética planteada originalmente, fueron incluidos por su similaridad estructural con los inhibidores más activos entre los controles seleccionados en el punto anterior, al presentar ramificaciones en las posiciones 2 y 3 del núcleo quinolínico y poseer un anillo aromático al final de cada cadena.

Al evaluar los compuestos sintetizados **QC 1-5** y **QS 1-5** junto con la librería control se observó como la mayoría se ubicaba en la zona de los compuestos activos (**tabla 9**), presentando buenos valores de afinidad. El compuesto **QS1** es el más afín de todos los sintetizados, con un valor de $\Delta G = -8.5$ Kcal/mol casi al tope de la tabla de jerarquización energética, seguido de **QS5** con una energía de afinidad de -8.3 Kcal/mol, ambos con sustituyentes metilo en el anillo bencénico de la quinolina. Los compuestos menos afines de los sintetizados son precisamente los de esta serie, **QS3** y **QS4**, ambos con sustituyentes metoxi, con valores de afinidad de -8.0 Kcal/mol y -7.9 Kcal/mol respectivamente.

Por su parte, las chalconas **QC 1-5** presentaron valores de afinidad muy similares entre sí, ubicados entre -8.1 Kcal/mol y -8.3 Kcal/mol, siendo menos afines que **QS1** y **QS5** pero más que el par **QS3** y **QS4**. Se puede decir entonces que, en lo que respecta a afinidad, ambas series de compuestos, **QS** y **QC**, cumplen energéticamente el requisito para potencialmente ser inhibidores de la proteasa, según lo determinado en el tamizado virtual de la librería control.

Ligando	ΔG (Kcal/mol)	CI ₅₀ (μM)
H4	-9,6	14,90
D	-9	5,0 (EC ₅₀)
B	-8,9	0,91
A	-8,8	12,50
F	-8,8	2,24
QS1	-8,5	-
H	-8,5	9,10
B1	-8,4	2,93
QS5	-8,4	-
F1	-8,4	10,07
QC3	-8,3	-
QC1	-8,3	-
H1	-8,3	19,90
QS2	-8,2	-
QC4	-8,1	-
QC1	-8,1	-
QC2	-8,1	-
QS3	-8,0	-
QS4	-7,9	-
C	-7,8	9,21
E	-7,3	39% inhib.
E1	-7,3	<10% inhib.
H3	-7	Inactivo
G	-6,8	<15% inhib.
G1	-6,8	40,02
H2	-5,8	Inactivo

Tabla 13. Tamizado virtual de la librería control y compuestos sintetizados.

Al estudiar las interacciones de los complejos ligando-proteína obtenidos por el acoplamiento molecular, se encontró que tanto los compuestos **QS 1-5** como **QC 1-5**

ocupan las subcavidades S1 y S2, previamente descritas como sitios de reconocimiento clave para una respuesta biológica.

La pose para cada serie es la misma, es decir, por ejemplo, para la serie **QS** el núcleo quinolínico se encuentra en la subcavidad S1, el sustituyente anilino hacia la subcavidad S1' y el anillo aromático de la base de Schiff hacia S2, tal y como se muestra en la **figura 38**. Lo mismo ocurre con la serie **QC**, solo que el grupo anilino ocupa S1, el núcleo quinolínico S2 y el carbonilo conjugado de la chalcona se orienta hacia S1'. Adicionalmente se encontró que la reproducibilidad de las poses es excelente, lo que sugiere una alta afinidad por el sitio de unión.

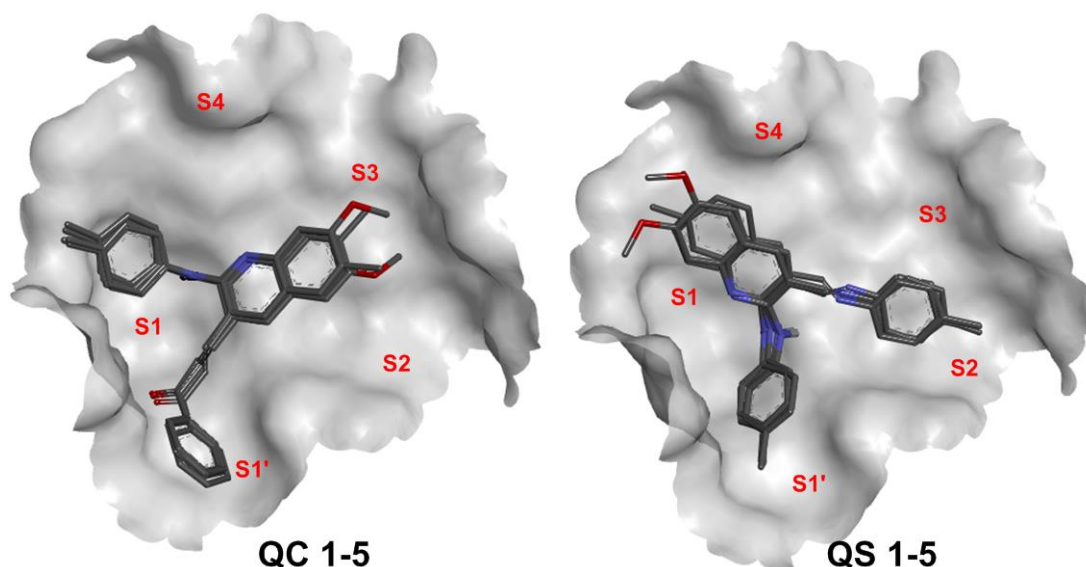


Figura 40. Acoplamiento de los compuestos sintetizados en el sitio de unión.

Las interacciones de los ligandos de la serie **QC** y **QS** con el sitio de unión difieren bastante, tal y como se ilustra en la **figura 39**. En este sentido, **QC1** presenta puentes de hidrógeno entre los residuos G133, T134 y S135 y el oxígeno del carbonilo presente en la chalcona, así como interacciones hidrofóbicas con P132 y anión-pi con D129, ninguna de las cuales está presente en los compuestos control activos. **QS1** por su parte presenta

un apilamiento aromático cara-cara entre el anillo quinolínico y el residuo Y161 además de un puente de hidrógeno con el residuo G151 y el hidrógeno unido al nitrógeno del grupo anilino, interacciones clave definidas para los compuestos control más activos.

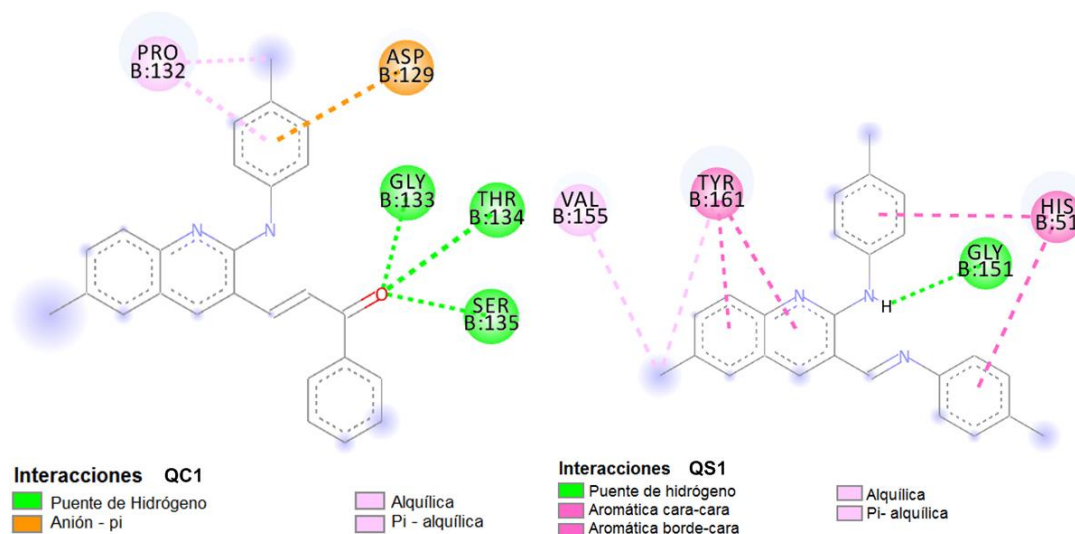


Figura 41. Interacciones entre QS1 y QC1 y el sitio de unión de la proteasa.

Según lo determinado con el tamizado virtual de la librería control, un buen inhibidor tiende a tener una afinidad mayor a -8.0 Kcal/mol como resultado del acoplamiento molecular, sumado a la interacción con los residuos de las subcavidades S1 y S2, además de una interacción del tipo aromático de apilamiento cara-cara con el residuo Y161 y un puente de hidrógeno con el residuo G151 o con G153. De las dos series de compuestos estudiados, ambos cumplen los requerimientos de afinidad y ocupación de las cavidades primordiales para una actividad biológica. Sin embargo la serie de compuestos **QS** se perfila como un potencial inhibidor de la proteasa en detrimento de **QC**, pues la estructura de los mismos y su pose permiten las interacciones que se traducen en un potencial de actividad biológica.

Los sustituyentes de la serie **QS** son de suma importancia en el aumento o disminución de la afinidad y por ende de su potencial como inhibidores. En la **tabla 9** se

puede observar como los compuestos más activos de esta serie son **QS1** y **QS5** respectivamente, ambos con sustituyentes metilo en posiciones 6 y 7 de la quinolina, respectivamente. Al estudiar las interacciones se puede observar como **QS1** orienta el grupo metilo hacia la subcavidad S4, específicamente hacia el residuo V155 (**figura 41**), región netamente hidrofóbica lo que crea una interacción favorable. **QS5** y **QS2** no tienen esta interacción lo que justifica su menor ΔG .

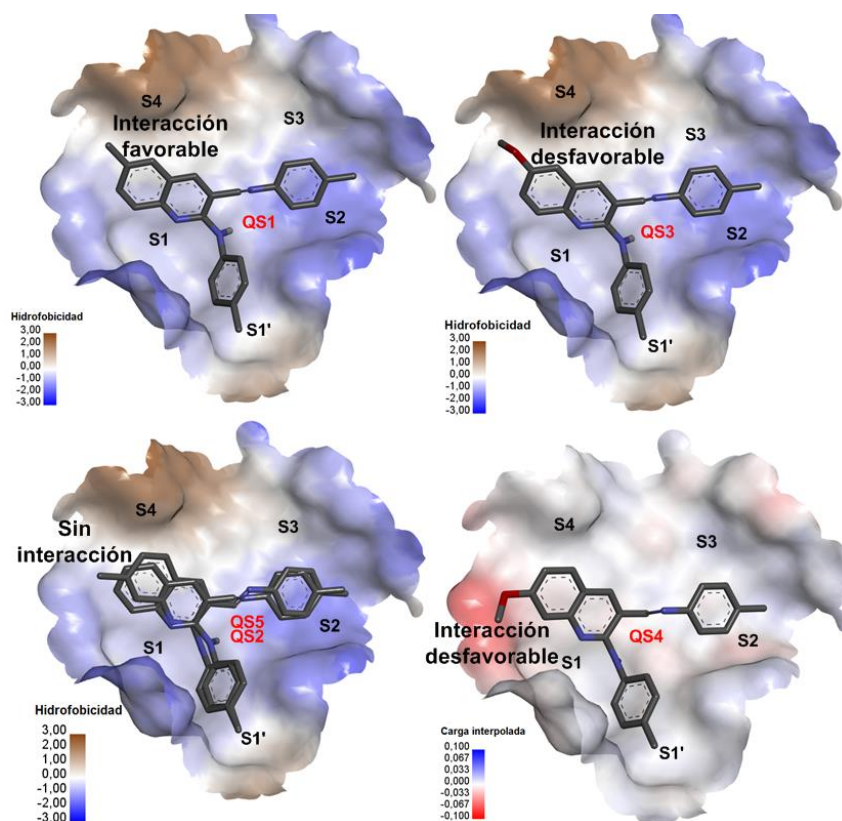


Figura 42. Comparación entre las poses de QS 1-5.

Los menos activos de todos los compuestos sintetizados son precisamente **QS3** y **QS4**, ambos con sustituyentes metoxi en posiciones 6 y 7 respectivamente. La gran diferencia en afinidad se debe a que, en el caso de **QS3**, el grupo metoxi, con densidad de carga negativa debido al oxígeno, está orientado hacia S4 que es una región hidrofóbica, creando una repulsión y una disminución en la afinidad. En **QS4**, por su parte,

dicho grupo está orientado hacia una zona con carga parcial negativa debido a la presencia del residuo de aspartato D129, originando también una repulsión electrostática, traduciéndose en menor afinidad.

En el estudio de acoplamiento o *docking* molecular realizado tuvo como resultado que las chalconas sintetizadas podrían no ser tan buenos inhibidores de la proteasa del DENV. Las bases de Schiff sintetizadas, en cambio, se perfilan como buenos inhibidores planteando un enfoque poco común en las investigaciones: los derivados de las 2-cloro-3-formilquinolinas así como la sustitución en el anillo bencénico de las quinolinas, por lo que la presente investigación podría representar un aporte a la búsqueda de nuevos y potentes inhibidores contra del DENV.

8. Conclusiones

- Se obtuvo por primera vez una serie de cinco (2*E*)-3-(2-anilin-3-quinolinil)-1-fenil-2-propen-1-onas sustituidas a través de un esquema de síntesis de cinco pasos, que involucra la formación de una base de Schiff como intermediario.
- No es posible la sustitución nucleofílica aromática sobre las 2-anilin-3-(1,3-dioxolan-2-il)-quinolinas empleando *p*-toluidina, por lo que se incorporó la formación de bases de Schiff en la ruta sintética.
- Se sintetizó una serie de acetanilidas sustituidas con rendimientos desde 56% hasta 92%.
- Se sintetizó una serie de 2-cloro-3-formilquinolinas sustituidas mediante la reacción de Vilsmeier-Haack con rendimientos de 34% a 72%.
- Se obtuvo una serie de 2-anilin-3-bencilidenimino-quinolinas sustituidas, en el tercer paso de la síntesis, con rendimientos que oscilaban entre 16% y 61%.
- Se obtuvieron los productos de hidrólisis de las bases de Schiff con rendimientos que iban de 43% a 93%.
- En el último paso de síntesis, se obtuvo una serie de (2*E*)-3-(2-anilin-3-quinolinil)-1-fenil-2-propen-1-onas sustituidas con rendimientos entre 7% y 22%.
- El protocolo del acoplamiento molecular consistió en determinar la afinidad de un compendio de 16 moléculas reportadas en la literatura como inhibidores de la proteasa NS2B/NS3 del DENV, principalmente con núcleos quinolínicos o indólicos, obteniendo, en general, que los compuestos más afines son los más activos.
- Los compuestos de referencia más activos ocupan las subcavidades S1 y S2 del sitio activo de la proteasa, presentan interacción con los residuos Y161 y G151/G153, además de una afinidad mayor a -7.9 Kcal/mol.

- Las (2*E*)-3-(2-anilin-3-quinolinil)-1-fenil-2-propen-1-onas sustituidas podrían no perfilarse como potentes inhibidores de la proteasa del DENV, muestran una afinidad moderada pero no presentan las interacciones clave.
- Las 2-anilin-3-bencilidenimino-quinolinas sustituidas cumplen las características de afinidad e interacción definidas para los compuestos control más activos, son candidatas a potentes inhibidores de la proteasa NS2B/NS3.
- Los sustituyentes en el anillo bencénico de las 2-anilin-3-bencilidenimino-quinolinas modifican la afinidad por la proteasa NS2B/NS3.
- La afinidad de las 2-anilin-3-bencilidenimino-quinolinas por la proteasa del DENV, aumenta cuando existe interacción con la subcavidad S4, favorecida con el grupo metilo en posición 6 de la quinolina.
- La afinidad de las 2-anilin-3-bencilidenimino-quinolinas por la proteasa del DENV disminuye al sustituir el anillo bencénico con grupos metoxi.

9. Recomendaciones

- Caracterizar los compuestos sintetizados por espectroscopia de RMN y masas.
- Sintetizar quinolinas con sustituyentes alquílicos, como t-butil, en posición 6.
- Estudiar mediante acoplamiento molecular la relación entre la afinidad y otros sustituyentes en el anillo bencénico de la quinolina.
- Calcular las propiedades ADMET de los compuestos sintetizados.
- Realizar ensayos biológicos contra el DENV de los compuestos sintetizados.

10. Referencias

- [1] Lwoff, A. (1957). **The concept of virus**. J. gen. Microbiol. 17, 239-253
- [2] Carter, G.R.; Wise, D.J. (2004) **A concise review in Veterinary Virology**. IVIS. New York. USA
- [3] Patrick, G.L. (2013). **An introduction to medicinal chemistry**. 5^{ta} edición. Oxford University Press. UK. 468-471
- [4] Nitsche, C.; Holloway, S.; Schirmeister, T. (2014) **Biochemistry and Medicinal Chemistry of the Dengue Virus Protease**. Chem. Rev. 114. 22
- [5] Zuo, Z.; Liew, O.W.; Chen. G. (2009) **Mechanism of NS2B-Mediated Activation of NS3pro in Dengue Virus: Molecular Dynamics Simulations and Bioassays**. Journal of Virology. 83 (2) 1060-1070
- [6] Bäck, A.T.; Lundkvist, A. (2013) **Dengue viruses - An overview**. Infection Ecology and Epidemiology. 3: 19839
- [7] Sanofi Pasteur (2016) **First dengue vaccine approved in more than 10 countries** [Comunicado de prensa] disponible en <https://www.sanofipasteur.com/en/media-room/press-releases/> Consultado en Septiembre 2018
- [8] Soucheray, S. (2017) **Sanofi restricts dengue vaccine but downplays antibody enhancement**. [Artículo de prensa] Disponible en <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/12/sanofi-restricts-dengue-vaccine-downplays-antibody-enhancement> Consultado en Octubre 2018
- [9] Murray, N.; Quam, M.; Wilder-Smith, A. (2013) **Epidemiology of dengue: past, present and future prospects**. Clinical Epidemiology. 5. 299-309
- [10] Fredericks, A. C.; Fernandez-Sesma, A. (2014) **The Burden of Dengue and Chikungunya Worldwide: Implications for the Southern United States and California**. Annals of Global Health. 80. 466-470
- [11] Kouri, G. (2006) **El dengue, un problema creciente de salud en las Américas**. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 19(3). 143-145
- [12] Boletín epidemiológico. Semana 53. 2014-2015. MPPS

- [13] Faoro, O. (2016). **Reaparece boletín epidemiológico de MinSalud tras más de un año de oscurantismo sanitario.** [Artículo de prensa]. Disponible en: <http://www.correodelcaroni.com/index.php/mas/salud/item/42290-reaparece-boletin-epidemiologico-de-minsalud-tras-mas-de-un-ano-de-oscurantismo-sanitario> [Consultado 1 Sep. 2016].
- [14] Whitehead, S.S.; Blaney, J.E.; Durbin, A.P. (2007) **Prospects for a dengue virus vaccine.** *Nature Reviews Microbiology.* 5 (1). 518-528.
- [15] Cabezas, C. (2005) **Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control.** *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.* 22. 3. 212-228
- [16] Velandia, M.L.; Castellanos, J.E. (2011) **Virus del dengue: estructura y ciclo viral.** *Infectio.* 15(1). 33-43
- [17] Tuiskunen Bäck, A.; Lundkvist, A. (2013) **Dengue viruses – an overview.** *Infection Ecology and Epidemiology.* 3. 19839.
- [18] Lim, S.P; Wang. Q.; Noble, C; (2013) **Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects.** *Antiviral Research.* 100. 500-519
- [19] Benham, M.; Nitsche, C.; (2016) **The medicinal Chemistry of Dengue Virus.** *J. Med Chem.* 59(12). 5622-5649
- [20] Delgado, A.; Minguillón, C; Joglar, J. (2003) **Introducción a la Química Terapéutica.** 2^{da} edición. Díaz de Santos. España. Pág. 411
- [21] Tomlinson, S.M.; Watowich, S.J. (2011) **Anthracene-based inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease.** *Antiviral Research.* 89. 127-135
- [22] Alajarín, R. and Burgos, C. (2011) **Six-Membered Heterocycles: Quinoline and Isoquinoline, in Modern Heterocyclic Chemistry** (eds J. Alvarez-Builla, J. J. Vaquero and J. Barluenga), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. Capítulo 17. 1527-1570
- [23] Prestch, E. Bühlmann, P. Badertscher; M. (2009) **Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data.** Springer. 4ta edición. Alemania. Pag. 193. Cap. 5
- [24] Marella, A.; Tanwar, O.P.; Rikta, S. (2012) **Quinoline: A versatile heterocycle.** *Saudi Pharmaceutical Journal.* 21. 1-12

- [25] Pandeya, S.N.; Tyagi, A. (2011) **Synthetic Approaches for quinolone and isoquinoline.** Int J Pharm Pharm Sci. 3 (3) 53-61
- [26] Qi, C.; Zheng, Q.; Hua, R. (2009) **A domino three-component condensation of *ortho*-haloacetophenones with urea or amines: a novel one-pot synthesis of halogen-substituted quinolines.** Tetrahedron.65 (7) 1316-1320
- [27] Smith, M.B.; March, J. (2007). **March's advanced organic chemistry. Reactions, mechanism and structure.** John Wiley & Sons. 6ta edición. USA. Pág 724. Parte II. Capítulo 11.
- [28] Thomas, A.D.; Josemin, C.V. Asokan. (2004) **Vilsmeier-Haack reactions of carbonyl compounds; synthesis of substituted pyrones and pyridines.** Tetrahedron. 60. 5069–5076
- [29] Jones, G.; Stanforth, S. P. (2004). **The Vilsmeier Reaction of Non-Aromatic Compounds.** Organic Reactions. 56:2:355–686
- [30] Beniwal, M. Jain, N. (2015) **Review article on Vilsmeier Haack reaction and its applications.** European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 3 (2).1340-1374
- [31] Meth-Cohn, O.; Tarnowski, B. (1982) **Cyclizations under Vilsmeier conditions.** Advances in heterocyclic chemistry. 31. 207-236
- [32] Meth-Cohn, O.; Narine, B.; Tarnowski, B. (1981) **A versatile new synthesis of quinolones and related fused pyridines. Part 5. The synthesis of 2-chloroquinoline-3-carbaldehydes.** JCS Perkin I. 1520-1530
- [33] Rajput, A.P.; Girase, P.D.; (2012) **Review article on Vilsmeier- Haack reaction.** 3 (1). 25-43
- [34] Lie, J.J.; (2006) **Name Reactions. A collection of detailed mechanisms and synthetic applications.** Springer Berlin Heidelberg. Pag 558-559
- [35] Meth-Cohn, O.; Narine, B.; Tarnowski, B. (1979) **A versatile new synthesis of quinolones and related fused pyridines. Part II.** Tetrahedron Letters. 33. 3111-3114
- [36] Meth-Cohn, O.; Narine, B.; Tarnowski, B. (1978) **A versatile new synthesis of quinolones and related fused pyridines. Thienopyridines and related fused pyridines.** Tetrahedron Letters. 23. 2045-2048

- [37] Meth-Cohn, O.; Narine, B.; Tarnowski, B. (1981) **A versatile new synthesis of quinolones and related fused pyridines. Part 7. The conversion of acetamidothiophens into thienopyridines.** JCS Perkin I. 1531-1536
- [38] Meth-Cohn, O.; Narine, B.; Tarnowski, B. (1981) **A versatile new synthesis of quinolones and related fused pyridines. Part 9. Synthetic applications of the 2-chloroquinoline-3-carbaldehydes.** JCS Perkin I. 2509-2517
- [39] Meth-Cohn, O.; Tarnowski, B. (1980) **A versatile new synthesis of quinolones and related fused pyridines. Part IV. A simple route to pyrido[2,3-b]quinolin-2-ones from anilides.** Tetrahedron Letters. 21 (28). 3721-3722
- [40] Hayes, R.; Meth-Cohn, O. (1982) **A versatile new synthesis of quinolones and related fused pyridines: Part 10. Routes to quinolones with fused azacycles.** Tetrahedron Letters. 23(15). 1613-1616
- [41] Rajput, A.P.; Rajput, S.S.; (2011) **A novel method for the synthesis of formyl pyrazoles using Vilsmeier-Haack reaction.** Int J Pharm Pharm Sci. 3 (4). 346-351
- [42] Thomas, A.D.; Josemin, C.V. Asokan. (2004) **Vilsmeier-Haack reactions of carbonyl compounds; synthesis of substituted pyrones and pyridines.** Tetrahedron. 60. 5069–5076
- [43] O'Neill, P.M.; Barton, V.E.; Ward, S.A. **4-Aminoquinolines: Chloroquine, Amodiaquine and Next-Generation Analogues, in Treatment and Prevention of Malaria.** (eds. Staines, H.M.; Krishna, S. Springer. UK. Pags 19-23. Cap. 2
- [44] Ghosh, J.; Swarup, V; Saxena, A. (2008) **Therapeutic effect of a novel anilidoquinoline derivate, 2-(2-methylquinoline-4-ylamino)-N-(2-chlorophenyl)-acetamide, in Japanese encephalitis: correlation with in vitro neuroprotection.** Int. J. Antimicrob Agents. 32. 349-354
- [45] Fakhfakh, M.A.; Fournet, A.; (2003) **Synthesis and biological evaluation of substituted quinolones: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections.** Bioorg Med Chem. 11. 5013-5023
- [46] Ma, X.; Zhou, W.; Brun, R. (2009) **Synthesis, in vitro antitrypanosomal and antibacterial activity of phenoxy, phenylthio or benziloxy substitutes quinolones.** Bioorg Med Chem Lett. 19. 986-989

- [47] Enamula, S.; Shaikh, N.; Ahmed, K. (2014) ***In vitro* study of synthesized 3-quinolinecarbaledyhe trough Vilsmeier Haack cyclisation of N-arylacetamide and their hydrazones.** IJPRS. 3 (3). 26-32
- [48] Botta; M.; Corelli, F.; Manetti, F. (2002) **Molecular modeling as a powerful technique for understanding small-large molecules interactions.** Il Farmaco. 57. 153-165
- [49] Teodoro M., Phillips G., Kavraki L. (2001) **Molecular Docking: A Problem With Thousands Of Degrees Of Freedom.** International Conference on Robotics and Automation.
- [50] Morris, Garrett M.; Lim-Wilby, Marguerita. (2008) **Molecular docking.** Methods in Molecular Biology. 443:365-382
- [51] Ferreira, L.G.; dos Santos, R.N.; (2015) **Molecular docking and structure-based drug design strategies.** Molecules. 20. 13384-13421
- [52] Tripathi, A.; Bankaitis, V.A. (2017) **Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock.** J. Mol. Med. Clin. Appl. 2(1)
- [53] Du, X.; Li, Y.; Xia, Y. (2016) **Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanism, Models and Methods.** Int. J. Mol. Sci. 17. 144
- [54] Monika, G.; Punam, G.: (2010) **An overview on molecular docking.** Int.J Drug Dev. & Res. 2(1). 219-231
- [55] Mahajan, A.; Gill, N.S. Arora, R. (2014) **A review on molecular docking.** International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research. 4(2). 64-70
- [56] Pyrkov, T.V. Chugunov, A.O.; (2009) **Complementarity of Hydrophobic/Hydrophilic Properties In Protein—Ligand Complexes: A New Tool to Improve Docking Results.** Biophysics and the Challenges of Emerging Threats.(pp. 21-41)
- [57] Yuriev, E.; Ramsland, P.A. (2013) **Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review.** J. Mol. Recognit. 26. 215-239
- [58] Mahajan, A.; Gill, N.S. Arora, R. (2014) **A review on molecular docking.** International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research. 4(2). 64-70
- [59] S.F. Sousa; Ribeiro, A.J.M.; Coimbra, J.T.S. (2013) **Protein-Ligand docking in the new millenium – A retrospective of 10 years in the field.** Current Medicinal Chemistry. 20. 2296-2314.

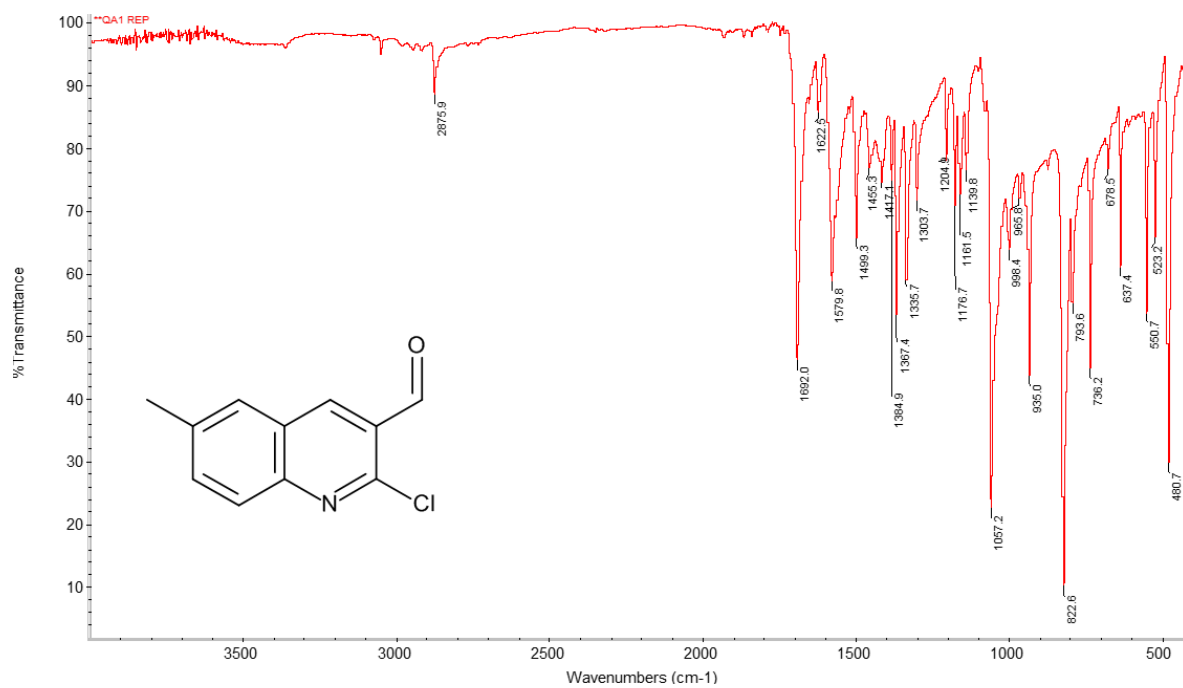
- [60] Jain, A.N. (2006) **Scoring functions for protein-ligand docking**. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7. 407–420
- [61] Kitchen, B.D.; Decornez, H.; Furr, J.R. (2004) **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications**. *Nature*. 3. 935-949 (Material suplementario)
- [62] Huang, S.Y.; Zou, X. (2010) **Advances and challenges in protein-ligand docking**. *Int. J. Mol. Sci.* 2010. 11. 3016-3034
- [63] Seeliger, D.; de Groot, B.L. (2010) **Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina**. *J. Comput Aided Mol Des.* 24. 417-422
- [64] Serrano, M.L. (1988) **Síntesis de quinolinas con posible actividad antiinflamatoria y analgésicas**. Facultad de Farmacia. UCV.
- [65] Singh, R.M.; (2012) **An alternative synthesis of pyrimido [4,5-b]quinolone-4-ones via metal free amination in water and Vilsmeier-Haack cyclization**. *Tetrahedron*. 68. 10318-10325.
- [66] Joshi, R.S.; Mandhane, P.G.; Chate, A.V. (2010) **One pot synthesis of substituted [1,2,4]-triazolo [1'.2':1,2] pyrimido [6,5-b]-quinoline and its antibacterial activity**. *Bull Korean Chem Soc.* 31 (8). 2341-2344
- [67] Alam, M.M.; Sarkar, D.P.; (2011) **Synthesis of quinolone-attached furan-2(3H)-ones having anti-inflammatory and antibacterial properties with reduced gastro-intestinal toxicity and lipid peroxidation**. *J. Serb. Chem Soc.* 76(12). 1617-1626
- [68] Subhashini, N.J.P.; Amanaganti, J.; (2013) **Microwave assisted synthesis and antibacterial studies of (E)-3-(2-morpholinoquinolin-3-yl)-1-aryl- prop-2-en-1-ones**. *Journal of chemical and pharmaceutical research.* 5(1). 140-147
- [69] Venkanna, P. Rajanna, K.C.; **2,4,6-trichloro-1,3,5, triazine and N-N'-dimethylformamide as an effective Vilsmeier-Haack reagent for the synthesis of 2-chloro-3-formylquinolines from acetanilides**. *Tetrahedron Letters.* (2015)
- [70] Deng, J.; Li, N.; Liu, H. (2012) **Discovery of Novel Small Molecule Inhibitors of Dengue Viral NS2BNS3 Protease Using Virtual Screening and Scaffold Hopping**. *J. Med. Chem.* 55. 6278–6293
- [71] Steuer, C.; Gege, C.; Fischl, W. (2011) **Synthesis and biological evaluation of α -ketoamides as inhibitors of the Dengue virus protease with antiviral activity in cell culture**. *Bioorg. Med. Chem.* 19. 4067-4074

- [72] Nguyen, T.; Sun Lee; Hsi-Kai Wang. (2013) **In Vitro Evaluation of Novel Inhibitors against the NS2B-NS3 Protease of Dengue Fever Virus Type 4.** *Molecules*, 18, 15600-15612
- [73] Lai, H.; Prasad, S.; (2013) **Characterization of 8-hydroxyquinoline derivates containing aminobenzothiazole as inhibitors of dengue virus type 2 protease *in vitro*.** *Antiviral Research*.
- [74] Amarego, W.L.F.; Perrin, D.D. (1996) **Purification of Laboratory Chemicals.** Butterworth-Heinemann. 4ta edición. UK. Pág. 411
- [75] Afghan, A; Baradarani, M.M; (2009) **Efficient synthesis of 1,3-unsubstitued 1-*H*-pyrazolo[3,4-*b*]quinolines.** *Arkivoc.* (ii) 20-30
- [76] Rateb, N.M.; Zohdi, H.F.; (2009) **Atom-efficient solvent-free, green synthesis of chalcones by grinding.** *Synthetic Communications*. 39. 2789-2794
- [77] Li, L.; Basavannacharya, C.; **Structure-guided discovery of a novel non-peptide inhibitor of dengue virus NS2B-NS3 protease.** *Chem. Biol. Drug. Des.* 86 (3) 255-264
- [78] Liu, H.; Wu, R.; Sun, Y. (2014) **Identification of novel thiadiazoozcrylamide analogues as inhibitors of dengue-2 virus NS2B/NS3 protease.** *Bioorg. Med. Chem.* 22 (22). 6344-6352
- [79] Rufaidah, O.; Othman, R. (2017) **Molecular docking studies of selected medicinal drugs as dengue-2 virus protease inhibitors.** *Sains Malaysiana*. 46(10). 1865-1875
- [80] Cabarcas-Montalvo, M.; Maldonado Rojas, W. (2016) **Discovery of antiviral molecules for dengue: In silico search and biological evaluation.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. 110. 87-97
- [81] Kumru, M. (2013) **Vibrational spectra of quinoline-4-carbaldehyde: Combined experimental and theoretical studies.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 113. 72-79
- [82] Kumru, M. (2016) **Combined experimental and quantum chemical studies on spectroscopic (FTIR, FT-Raman, UV-Vis, and NMR) and structural characteristics of quinoline-5-carboxaldehyde.** *Journal of Molecular Structure*. 1125. 302-309
- [83] Bindu, P.J; Mahadevan, K.M.; (2014) **Synthesis, DNA binding, docking and photocleavage studies of quinolinyl chalcones.** *Med. Chem. Commun.* 11 (5) 1708-1717

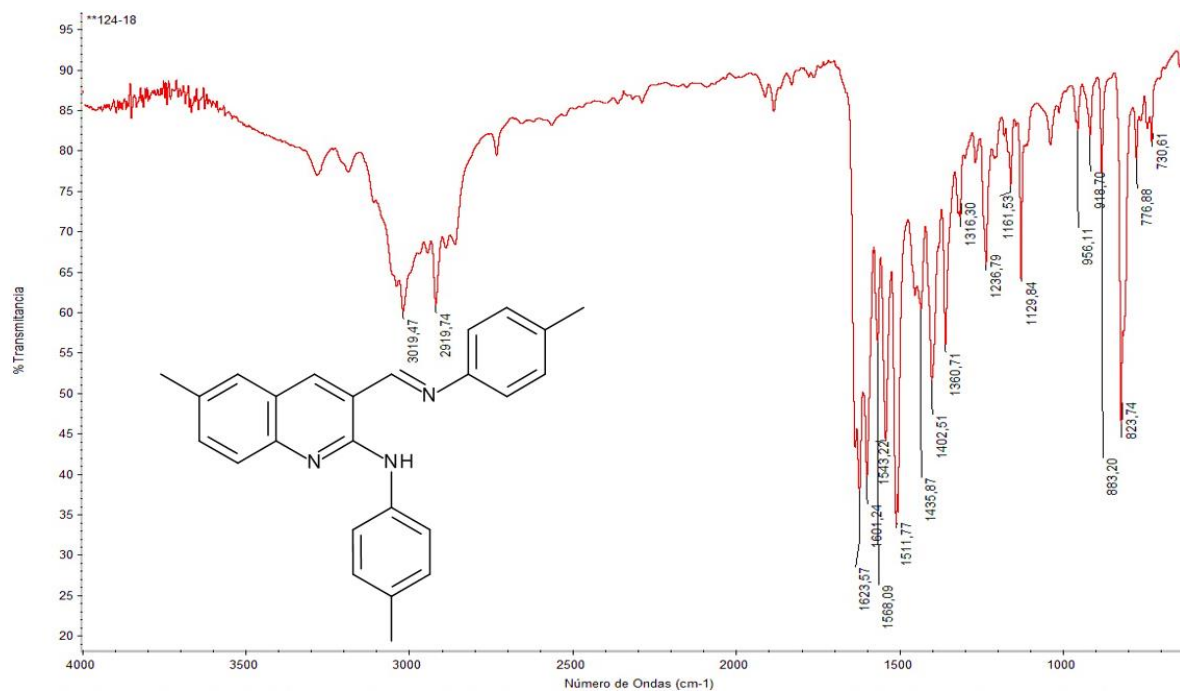
- [84] Noble, C.G.; She, C.C.; Chao, A.T.; (2012) **Ligand-bound structures of the dengue virus protease reveal the active site conformation.** *J. Virol.* 86 (1) 438-446

11. Anexos

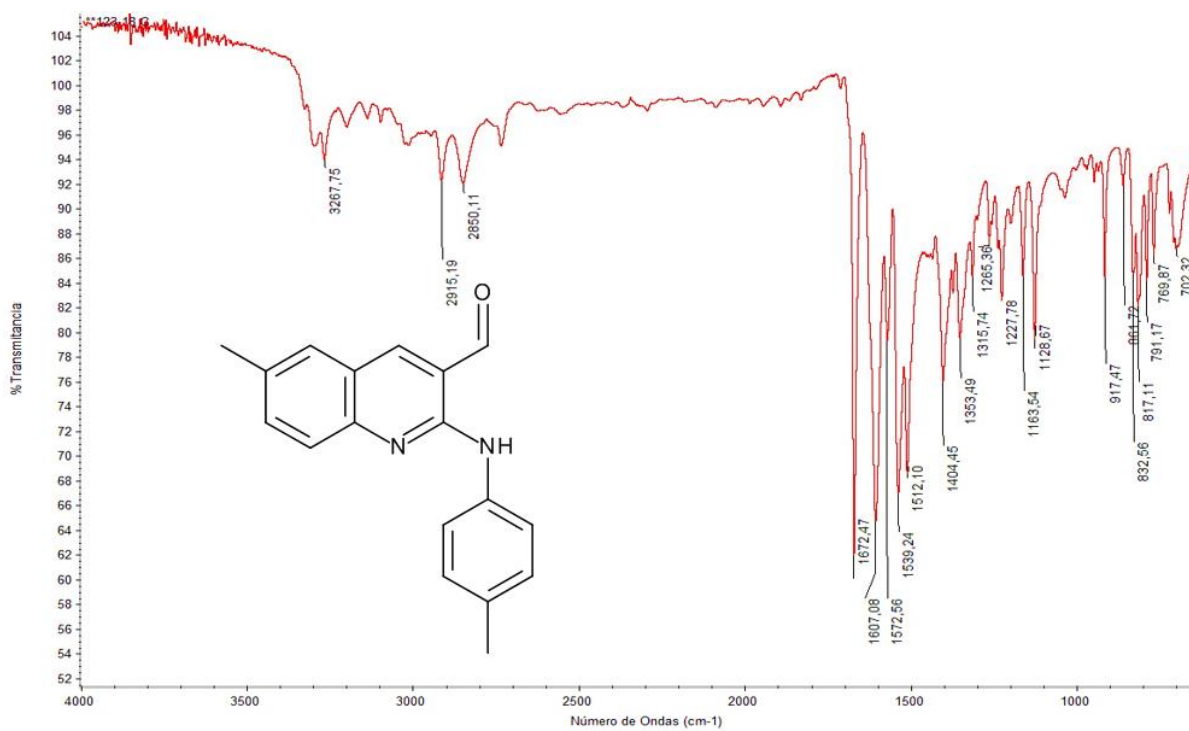
ESPECTROS DE INFRARROJO



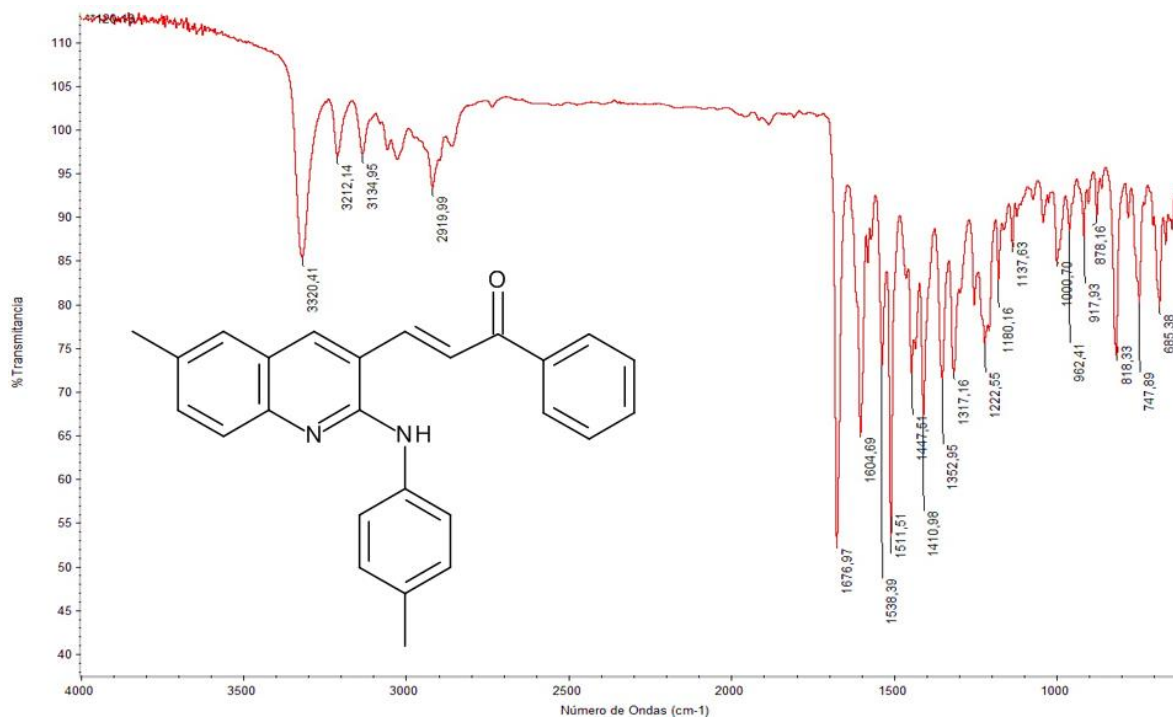
Espectro Infrarrojo de QA1 (Pastilla KBr)



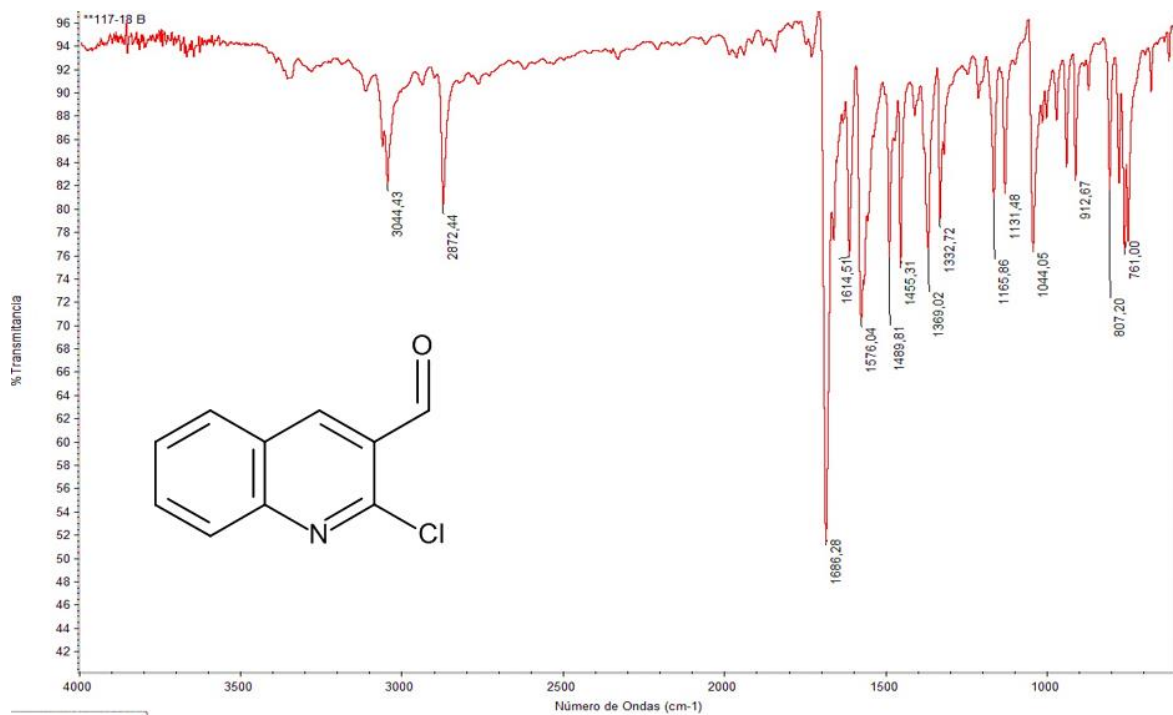
Espectro Infrarrojo de QS1 (ATR)



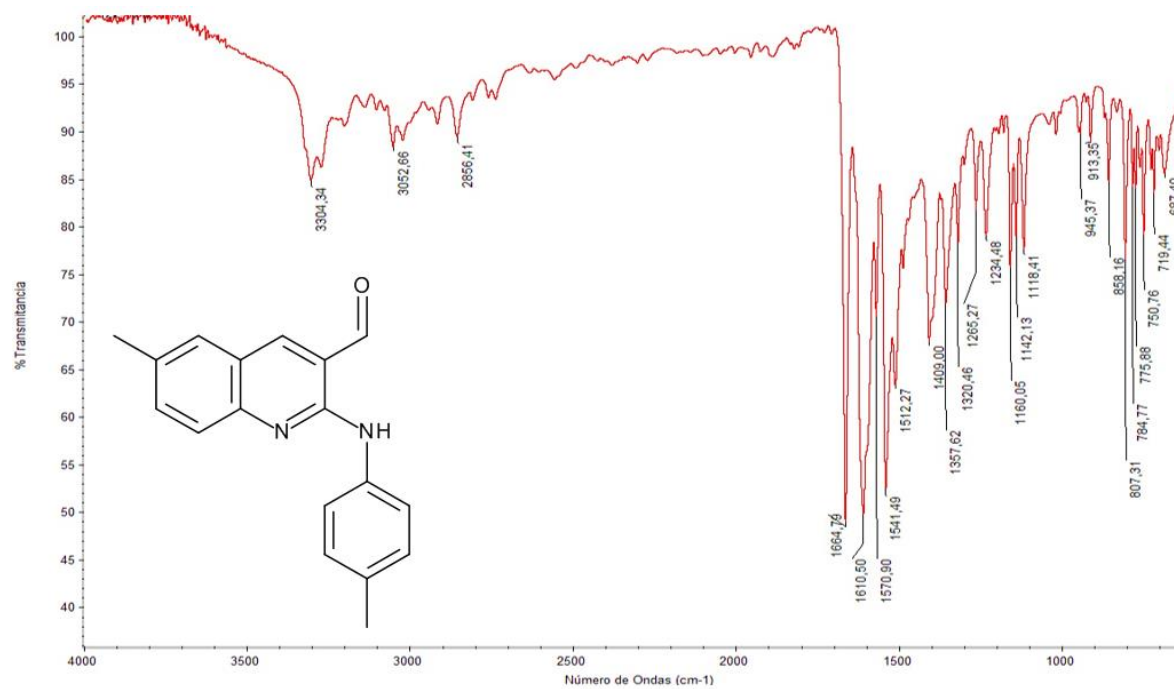
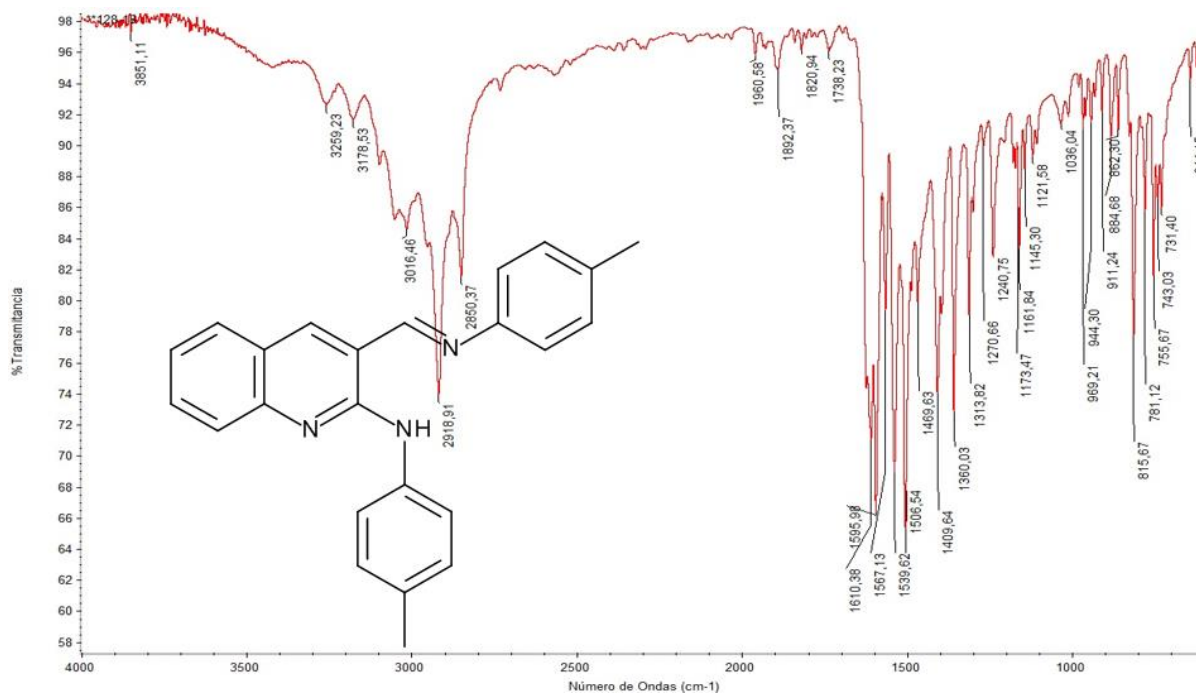
Espectro Infrarrojo de QD1 (ATR)

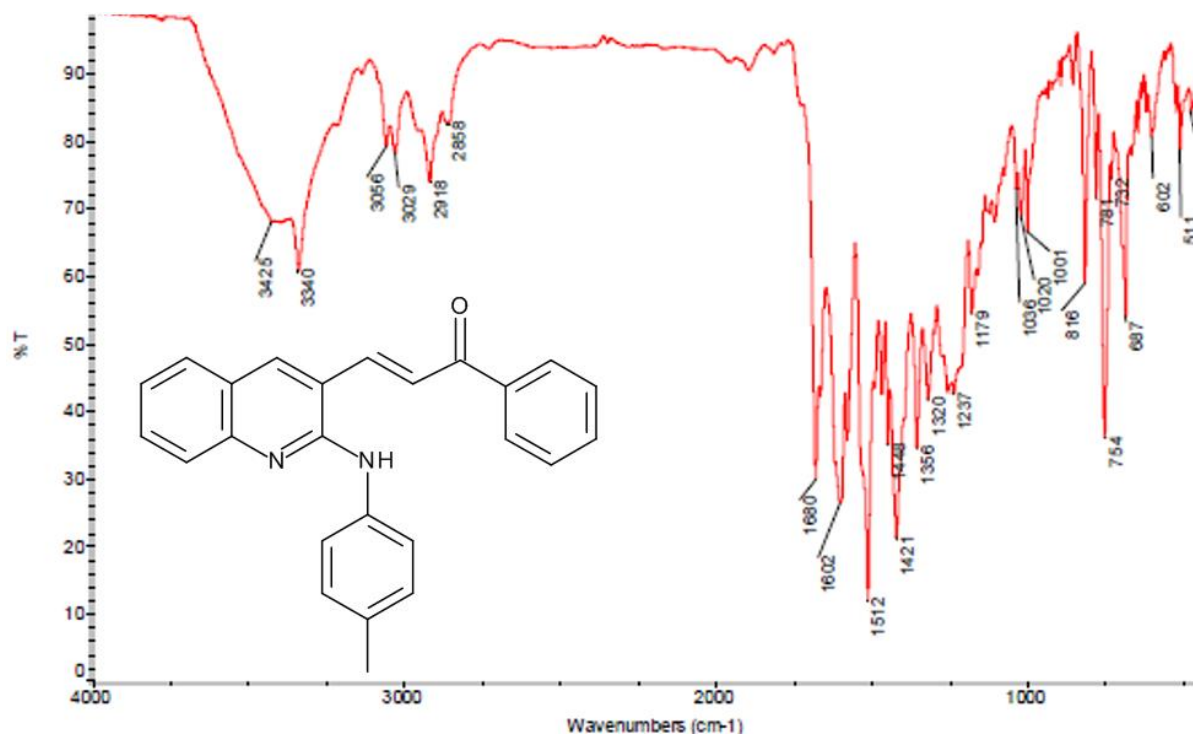


Espectro Infrarrojo de QC1 (ATR)

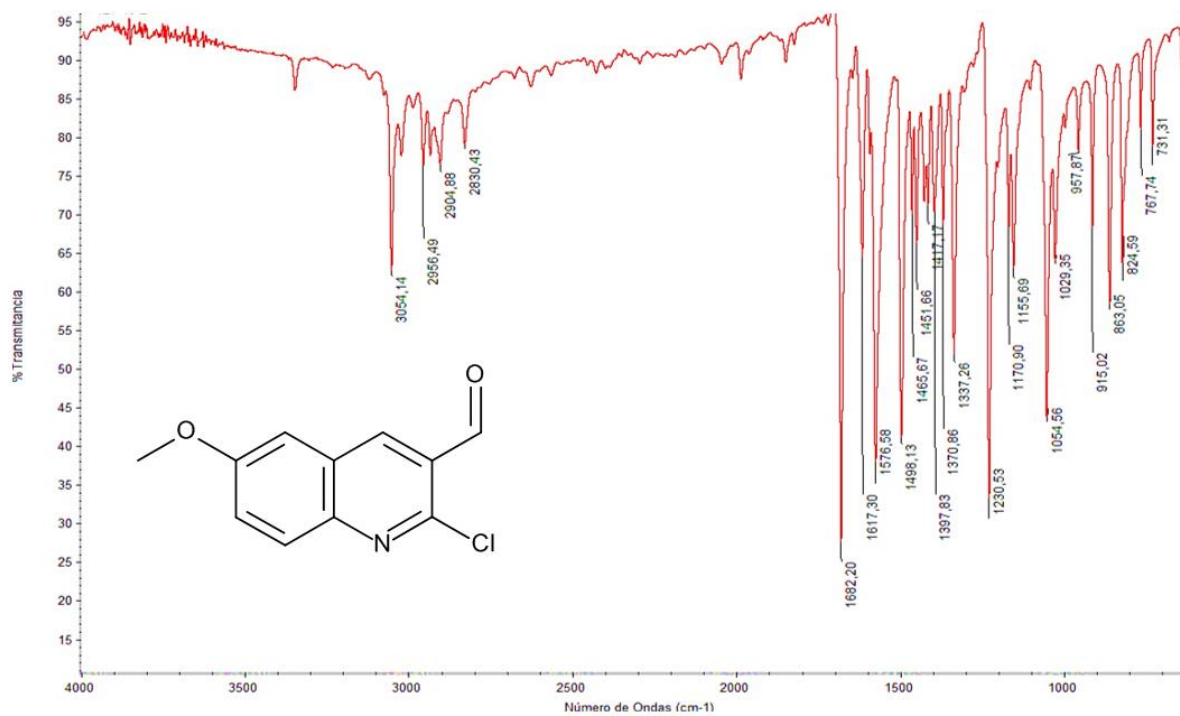


Espectro Infrarrojo de QA2 (ATR)

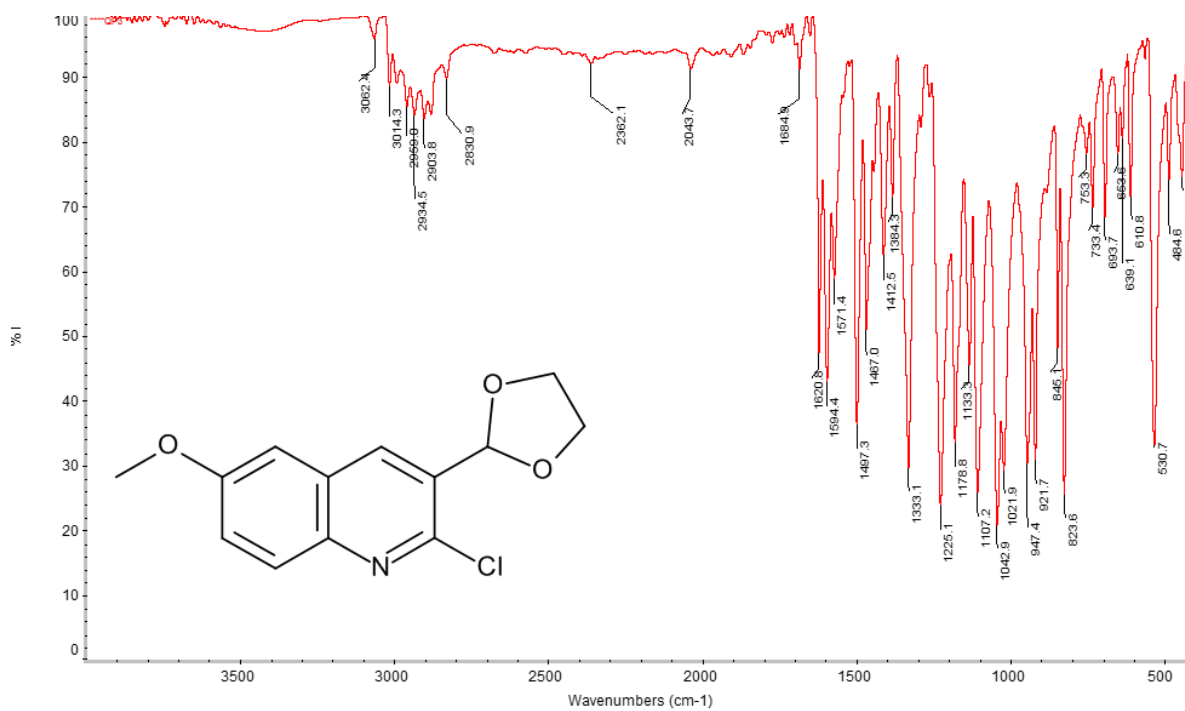




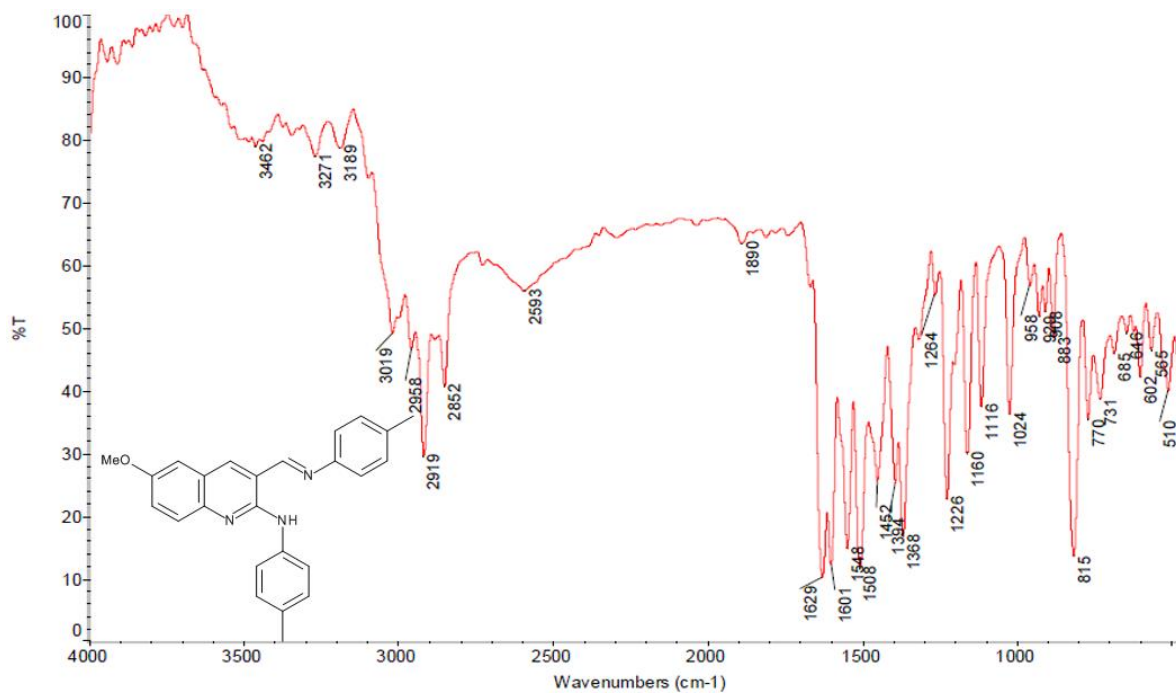
Espectro Infrarrojo de QC2 (Pastilla KBr)



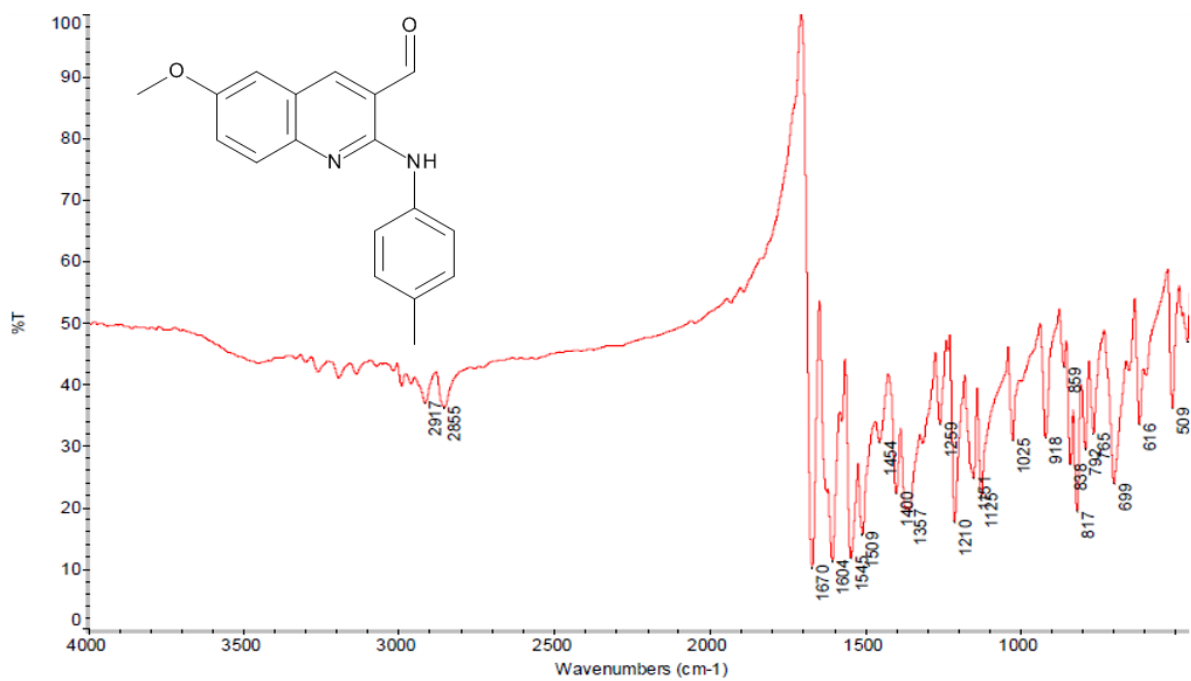
Espectro Infrarrojo de QA3 (ATR)



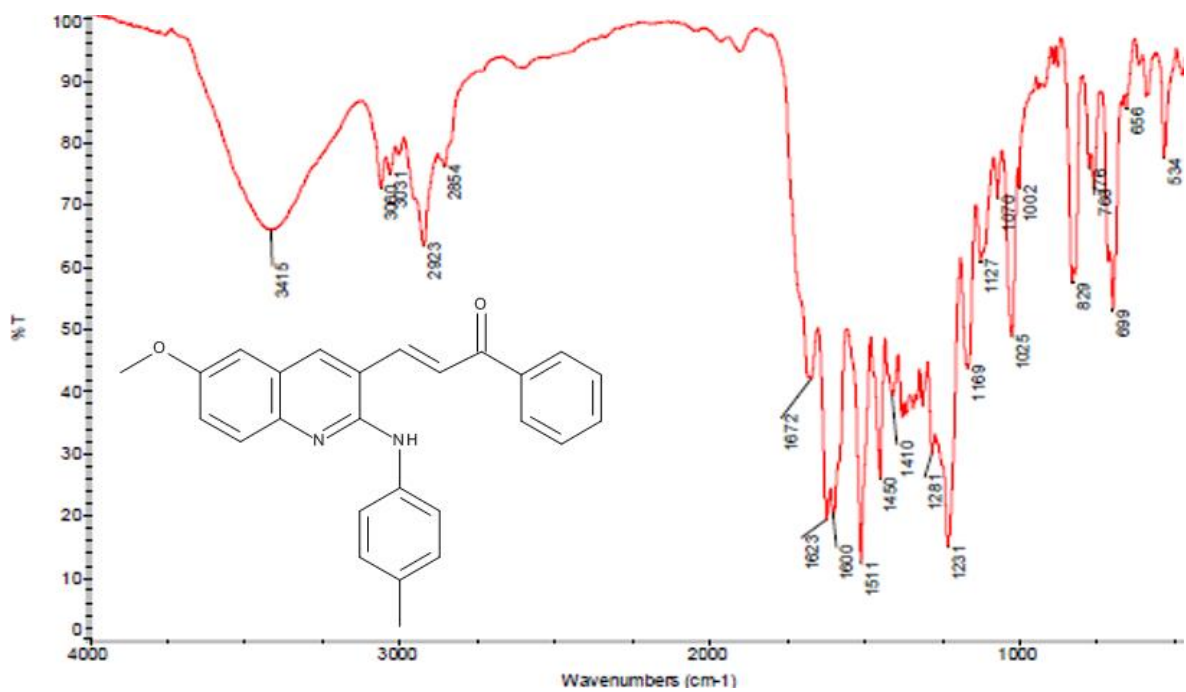
Espectro Infrarrojo de QP3 (Pastilla KBr)



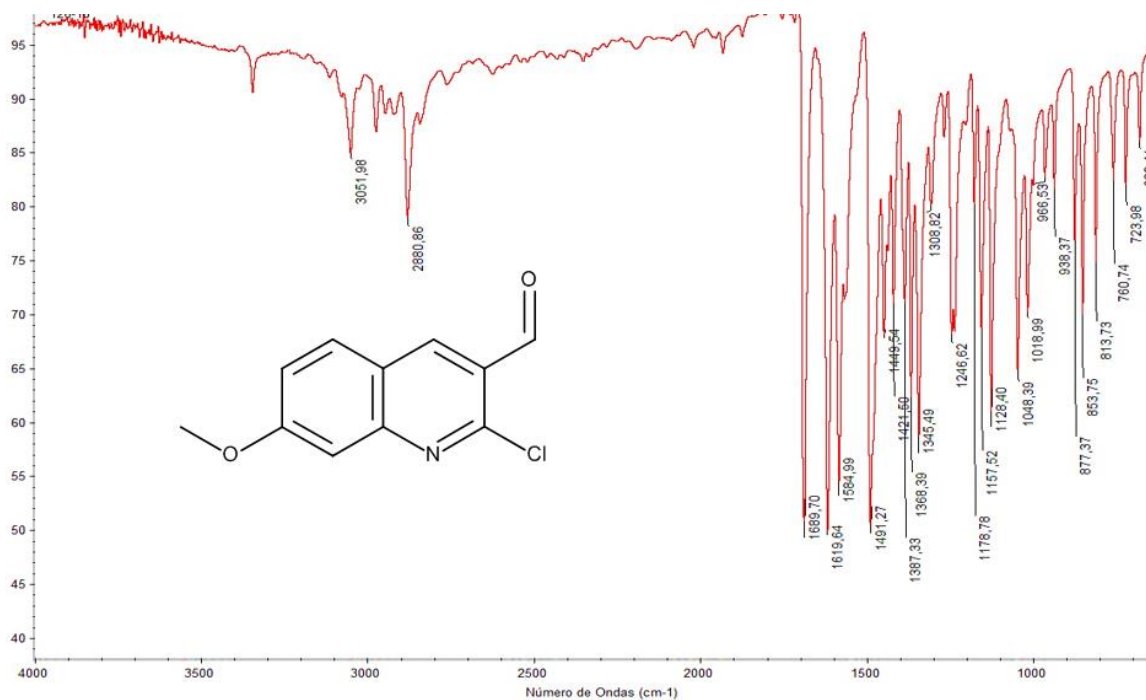
Espectro Infrarrojo de QS3 (Pastilla KBr)



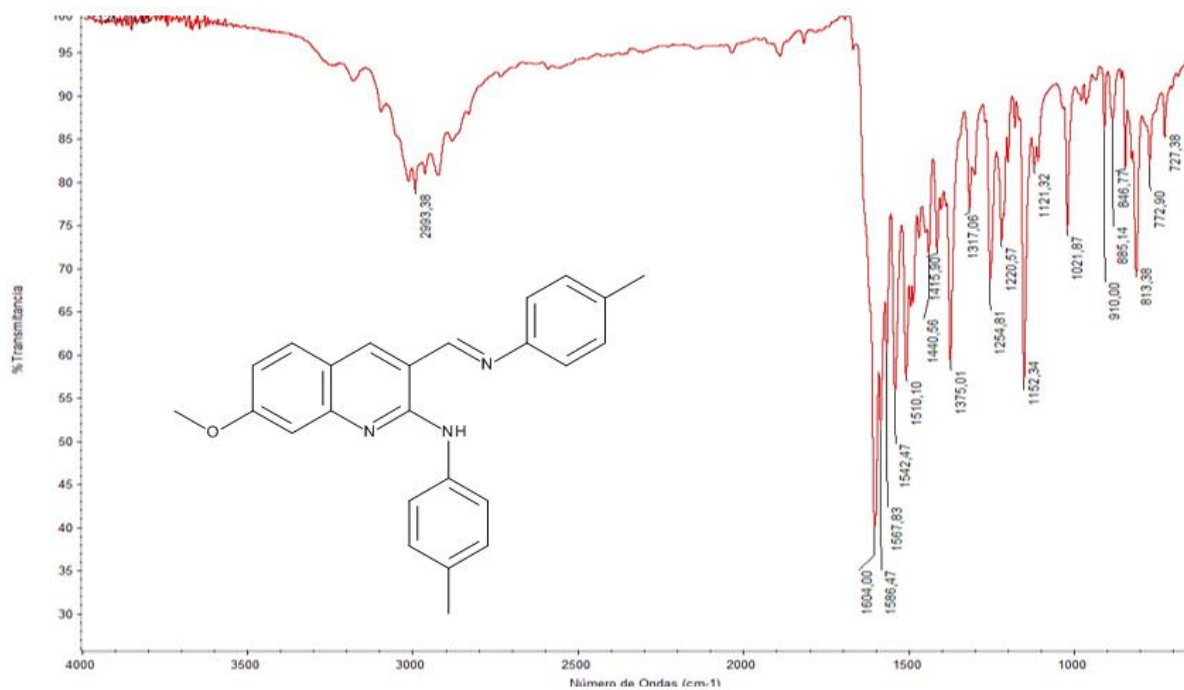
Espectro Infrarrojo de QD3 (Pastilla KBr)



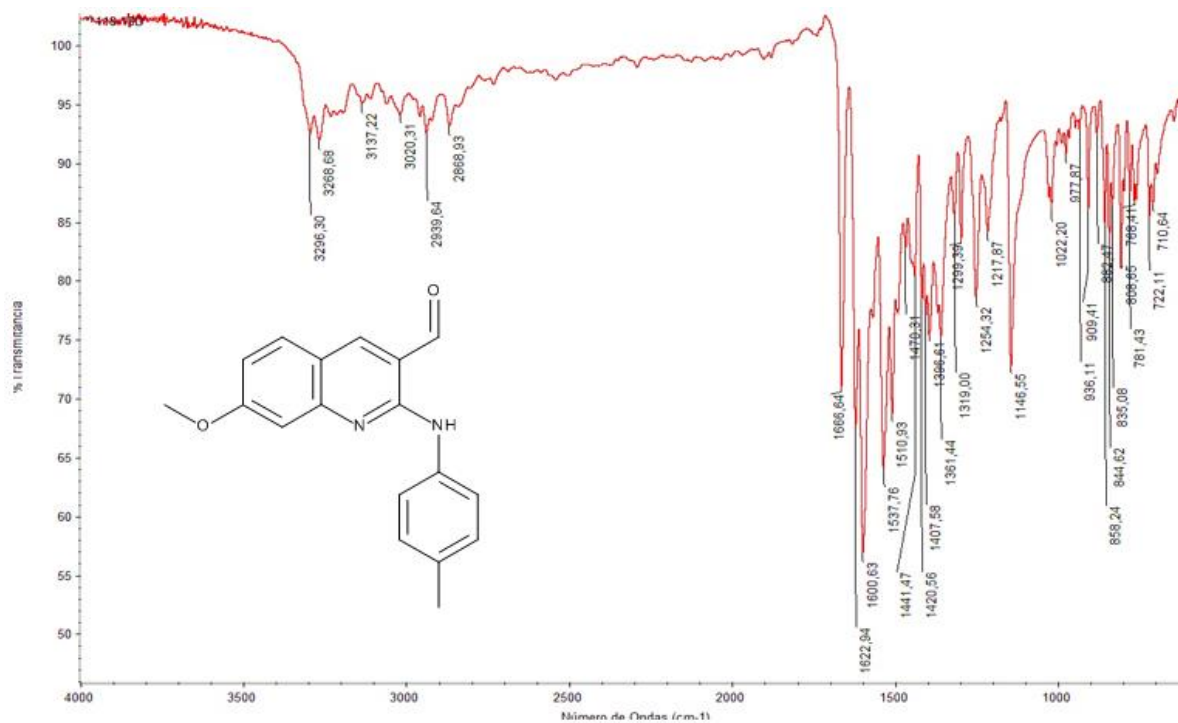
Espectro Infrarrojo de QC3 (Pastilla KBr)



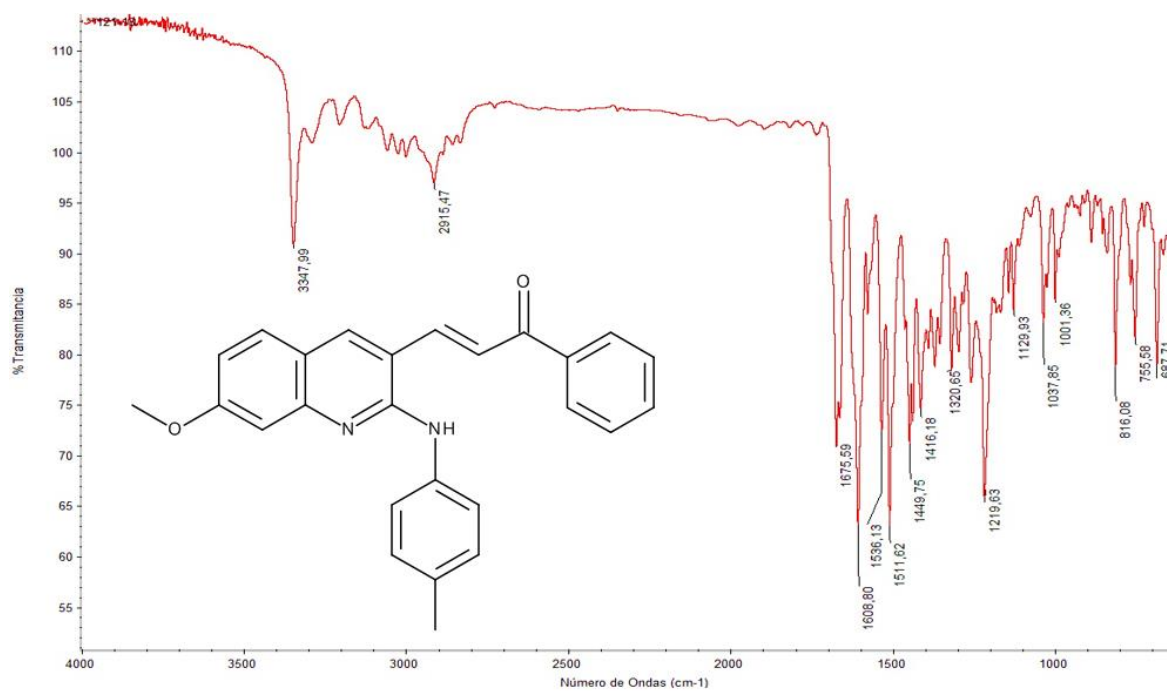
Espectro Infrarrojo de QA4 (ATR)



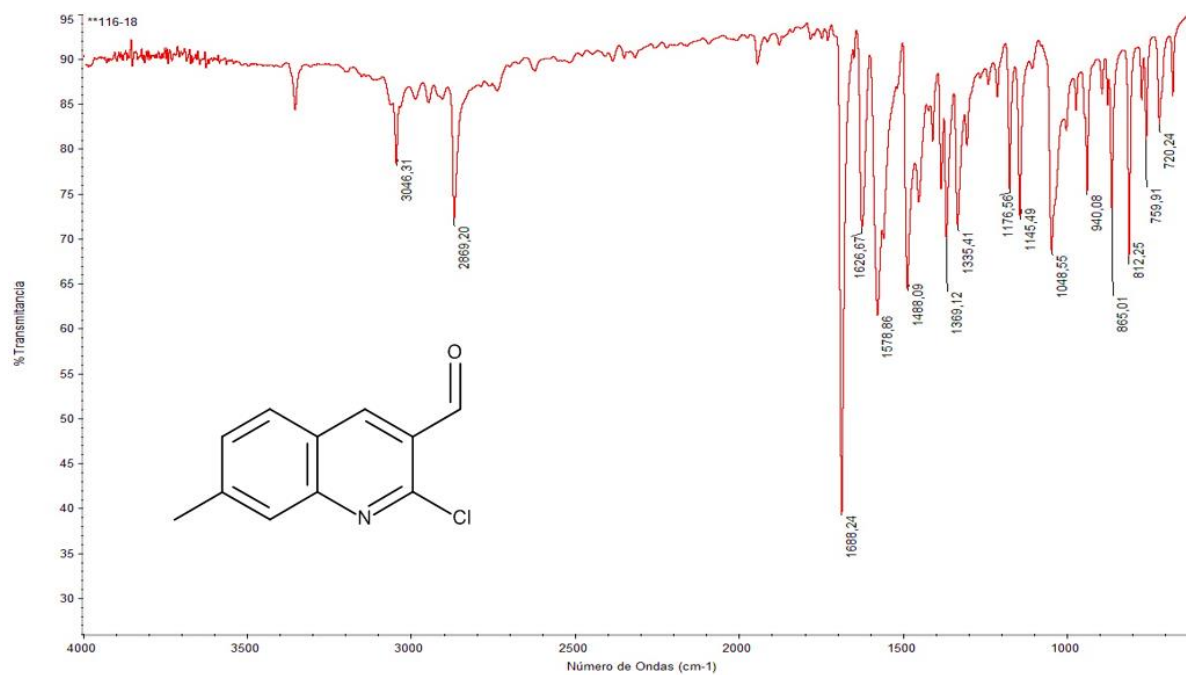
Espectro Infrarrojo de QS4 (ATR)



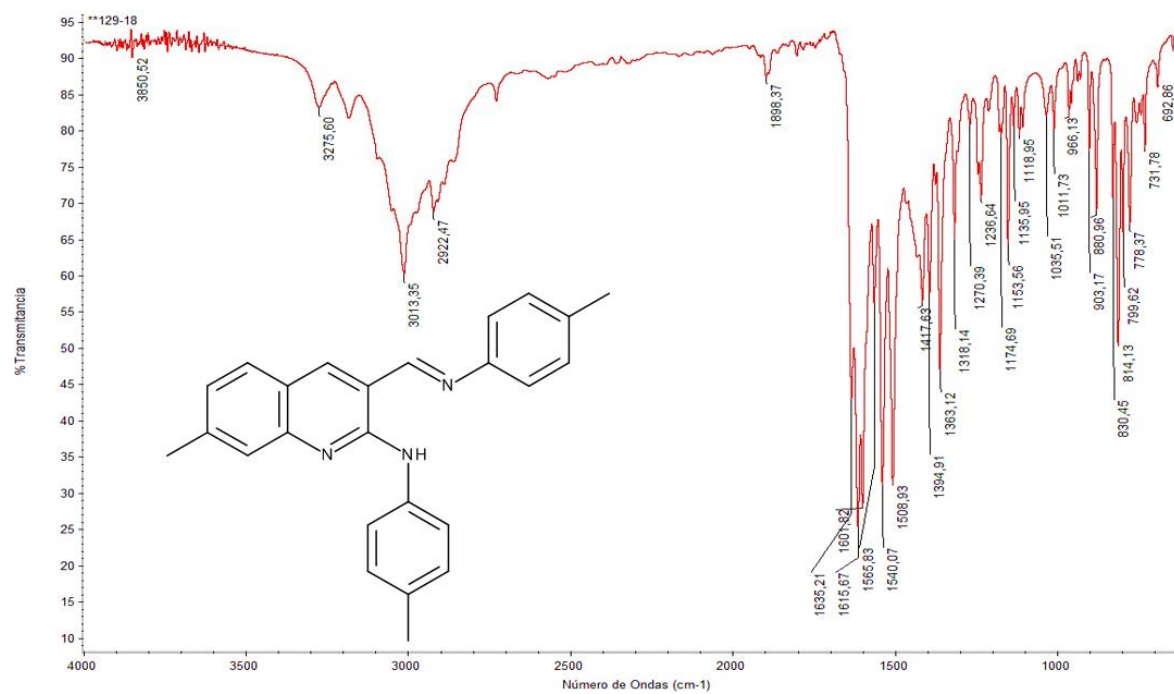
Espectro Infrarrojo de QD4 (ATR)



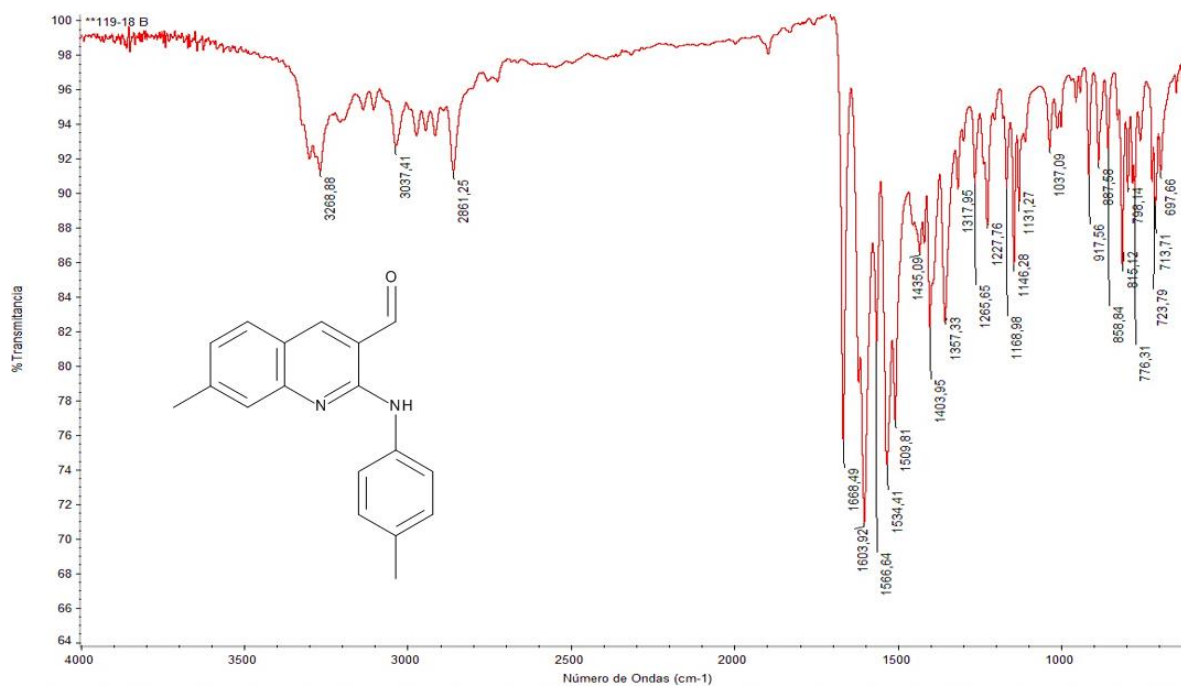
Espectro Infrarrojo de QC4 (ATR)



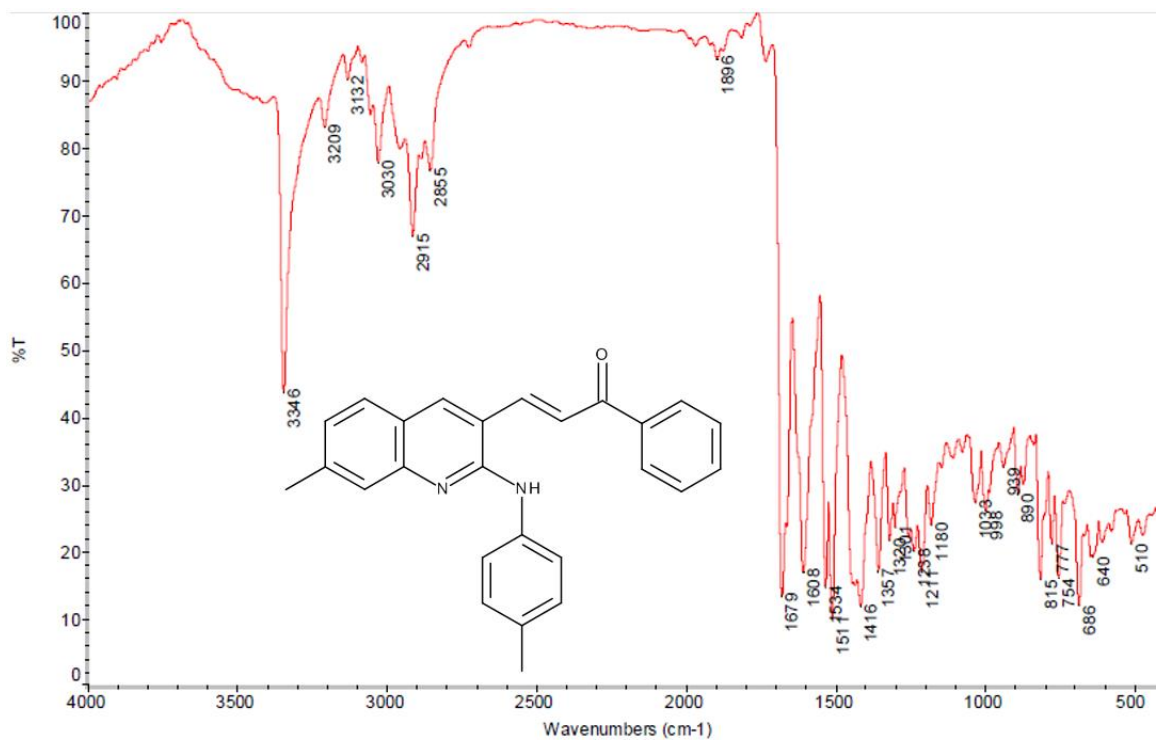
Espectro Infrarrojo de QA5 (ATR)



Espectro Infrarrojo de QS5 (ATR)



Espectro Infrarrojo de QD5 (ATR)



Espectro Infrarrojo de QC5 (Pastilla KBr)

ANEXO II. Resultados del tamizado virtual de la librería control

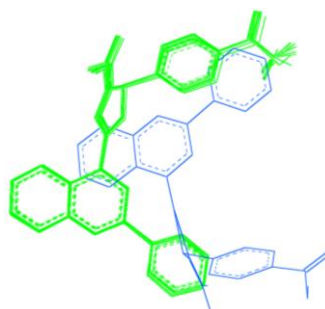
Corrida1		Corrida 2		Corrida3		Corrida4		Corrida5		Corrida6		Corrida7		Corrida8		Corrida9		Corrida10	
ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp
-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4	
-9 D		-8,9 D		-8,9 D		-8,9 D		-8,9 D		-8,9 D		-8,9 D		-8,9 D		-8,9 D		-8,9 D	
-8,8 A		-8,9 B		-8,9 B		-8,8 A		-8,8 B		-8,9 B		-8,9 B		-8,8 A		-8,9 B		-8,8 A	
-8,7 F		-8,7 F		-8,7 F		-8,7 F		-8,8 A		-8,8 F		-8,7 F		-8,7 F		-8,8 A		-8,5 H	
-8,7 B		-8,7 A		-8,7 A		-8,7 B		-8,7 F		-8,8 A		-8,7 A		-8,5 H		-8,7 F		-8,5 F	
-8,5 H		-8,5 H		-8,5 H		-8,5 H		-8,5 H		-8,5 H		-8,5 H		-8,4 F1		-8,5 H		-8,4 F1	
-8,4 F1		-8,5 B1		-8,4 F1		-8,4 F1		-8,4 F1		-8,4 F1		-8,4 F1		-8,4 B1		-8,4 F1		-8,4 B1	
-8,4 B1		-8,4 F1		-8,4 B1		-8,4 B1		-8,3 H1		-8,4 B1		-8,4 B1		-8,4 B		-8,4 B1		-8,3 H1	
-8,3 H1		-8,2 H1		-8,3 H1		-8,3 H1		-8,3 B1		-8,3 H1		-8,2 H1		-8,2 H1		-8,2 H1		-8,3 B	
-8 C		-8 C		-8 C		-7,9 C		-8 C		-8,1 C		-8 C		-8,1 C		-7,9 C		-8 C	
-7,4 E		-7,4 E		-7,4 E		-7,4 E		-7,4 E		-7,4 E		-7,4 E		-7,3 E1		-7,3 E		-7,4 E	
-7,1 E1		-7 E1		-7,2 E1		-7,3 E1		-7,2 E1		-7,2 E1		-7,2 E1		-7,2 E		-7 H3		-7,1 H3	
-6,9 H3		-6,9 H3		-7 H3		-6,9 H3		-7 H3		-6,9 H3		-7 H3		-7,1 H3		-6,8 G1		-7,1 E1	
-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G		-6,8 G1	
-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,7 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 E1		-6,8 G	
-5,8 H2		-5,8 H2		-5,9 H2		-5,9 H2		-5,9 H2		-5,8 H2		-5,8 H2		-5,8 H2		-5,8 H2		-5,8 H2	

Corrida11		Corrida12		Corrida13		Corrida14		Corrida15		Corrida16		Corrida17		Corrida18		Corrida19		Corrida20	
ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Comp
-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4		-9,6 H4	
-8,8 D		-8,9 D		-8,9 D		-8,9 D		-9 D		-9 D		-8,9 D		-8,9 D		-9 D		-9 D	
-8,8 A		-8,8 F		-8,8 A		-8,8 F		-8,8 F		-8,7 F		-8,8 F		-8,9 B		-8,7 F		-8,8 A	
-8,7 F		-8,8 A		-8,7 F		-8,8 A		-8,8 A		-8,7 B		-8,8 A		-8,8 F		-8,7 A		-8,7 F	
-8,5 H		-8,5 H		-8,5 H		-8,5 H		-8,5 H		-8,7 A		-8,5 H		-8,8 A		-8,5 H		-8,6 H	
-8,4 F1		-8,5 B		-8,4 F1		-8,4 F1		-8,4 F1		-8,5 H		-8,4 F1		-8,6 H		-8,4 F1		-8,5 B1	
-8,4 B		-8,4 F1		-8,4 B1		-8,4 B1		-8,4 B1		-8,5 B1		-8,4 B1		-8,4 F1		-8,4 B1		-8,4 F1	
-8,3 H1		-8,4 B1		-8,3 H1		-8,4 B		-8,3 H1		-8,4 F1		-8,3 H1		-8,4 B1		-8,3 H1		-8,3 H1	
-8,3 B1		-8,3 H1		-8,2 B		-8,2 H1		-8,3 B		-8,3 H1		-8,3 B		-8,3 H1		-8,2 B		-8,3 B	
-7,9 C		-7,8 C		-7,9 C		-7,8 C		-7,8 C		-7,9 C		-8 C		-8 C		-8 C		-8,1 C	
-7,4 E		-7,4 E		-7,4 E		-7,4 E		-7,3 E1		-7,4 E		-7,4 E		-7,4 E		-7,3 E		-7,3 E	
-7,1 E1		-7,1 E1		-7,3 E1		-7,2 E1		-7,3 E		-7,2 E1		-7,2 E1		-7,2 E1		-7,1 E1		-7,1 E1	
-6,9 H3		-7 H3		-7 H3		-6,9 H3		-7 H3		-6,9 H3		-7 H3		-6,9 H3		-7 H3		-7 H3	
-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1		-6,8 G1	
-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G		-6,8 G	
-5,8 H2		-5,8 H2		-5,9 H2		-5,8 H2		-5,8 H2		-5,8 H2		-5,8 H2		-5,9 H2		-5,8 H2		-5,9 H2	

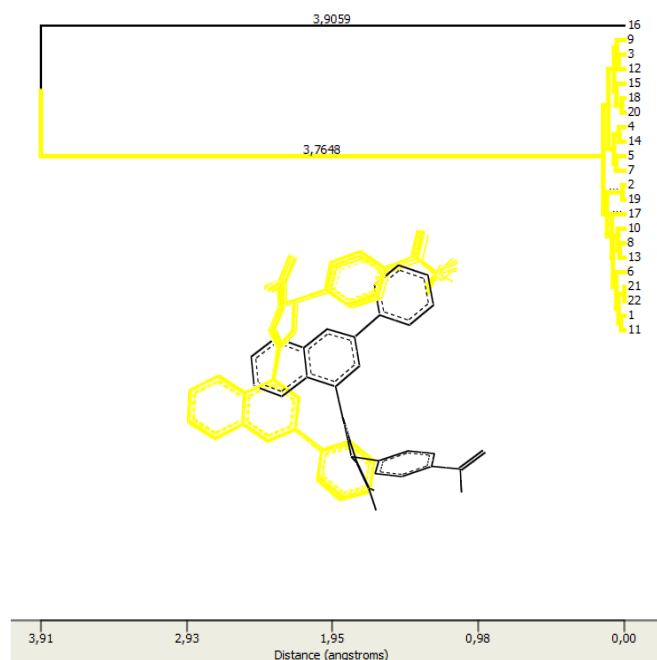
Para determinar pose y energía “promedio” de todas las corridas (valores en la tabla 8):

Compuesto A

Se superpusieron las poses por cada corrida:



Con **BIOVIA Discovery Studio 2017** se calculó el RMSD de todas las poses obtenidas:



Las poses en amarillo son las que están separadas por un RMSD menor a 2 Å. La pose en negro tiene un RMSD mayor a 2 Å. Se considera entonces el *cluster* con el mayor porcentaje de poses dentro del mismo (amarillo) y se toma la media aritmética de las afinidades para estas poses.

ANEXO III. Resultados del tamizado virtual de la librería control y compuestos sintetizados.

Corrida1	Corrida 2	Corrida3	Corrida4	Corrida5	Corrida6	Corrida7	Corrida8	Corrida9	Corrida10
ΔG Lig.	ΔG Comp	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.
-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,4 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4
-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,8 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D
-8,8 F	-8,9 B	-8,7 F	-8,8 B	-8,8 A	-8,8 A	-8,8 B	-8,8 A	-8,9 B	-8,7 F
-8,8 A	-8,8 F	-8,6 A	-8,8 A	-8,7 F	-8,7 F	-8,8 A	-8,7 F	-8,8 F	-8,7 A
-8,5 QS1	-8,8 A	-8,5 QS1	-8,7 F	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,7 F	-8,5 QS1	-8,8 A	-8,5 QS1
-8,5 H	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,6 H	-8,5 H
-8,4 F1	-8,5 H	-8,4 F1	-8,5 H	-8,4 QS5	-8,4 QC1	-8,5 H	-8,4 F1	-8,5 QS1	-8,4 QC1
-8,4 B1	-8,4 QS5	-8,4 B1	-8,4 QS5	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,4 B1	-8,4 F1	-8,4 F1
-8,4 B	-8,4 F1	-8,3 QS5	-8,4 F1	-8,4 B1	-8,3 QS5	-8,3 QS5	-8,4 B	-8,3 QS5	-8,4 B1
-8,3 QS5	-8,3 QC5	-8,3 QC1	-8,4 B1	-8,4 B	-8,3 QC3	-8,3 QC1	-8,3 QS5	-8,3 QC1	-8,3 QS5
-8,3 QC1	-8,3 QC1	-8,3 B	-8,3 QC3	-8,3 QC1	-8,3 B1	-8,3 H1	-8,3 QC3	-8,3 H1	-8,3 H1
-8,2 QS2	-8,3 H1	-8,2 QS2	-8,3 QC1	-8,3 H1	-8,3 B	-8,2 QS2	-8,3 QC1	-8,3 B1	-8,2 QS2
-8,2 QC5	-8,3 B1	-8,2 QC5	-8,3 H1	-8,2 QC5	-8,2 QS2	-8,2 QC5	-8,3 H1	-8,2 QS2	-8,2 QC5
-8,2 QC3	-8,2 QS2	-8,2 QC3	-8,2 QS2	-8,2 QC3	-8,2 QC5	-8,2 QC3	-8,2 QS2	-8,2 QC5	-8,2 QC3
-8,2 H1	-8,1 QS3	-8,2 H1	-8,2 QC5	-8,2 QC2	-8,2 QC2	-8,2 B1	-8,2 QC5	-8,2 QC3	-8,2 B
-8,1 QC4	-8,1 QC4	-8,1 QC4	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,2 H1	-8,1 QS3	-8,1 QC4	-8,1 QS3	-8,1 QS3
-8,1 QC2	-8,1 QC3	-8 QS3	-8,1 QC4	-8,1 QS2	-8,1 QS3	-8,1 QC2	-8,1 QC2	-8 QC4	-8,1 QC4
-8 QS4	-8 C	-7,9 QS4	-8 C	-8 QC4	-8 QC4	-8 QS4	-8 QS3	-7,9 QS4	-8,1 C
-8 QS3	-7,9 QS4	-7,8 C	-7,9 QS4	-8 C	-8 C	-8 QC4	-8 C	-7,8 C	-7,8 QS4
-8 C	-7,3 E1	-7,5 QC2	-7,4 E	-7,9 QS4	-7,9 QS4	-8 C	-7,9 QS4	-7,2 E	-7,4 E
-7,4 E	-7,3 E	-7,4 E	-7,2 E1	-7,4 E	-7,4 E	-7,4 E	-7,4 E	-7,1 H3	-7,1 QC2
-7,2 E1	-7,1 H3	-7,2 E1	-7,1 H3	-7,3 E1	-7 H3	-7,2 E1	-7,3 E1	-7,1 E1	-7,1 E1
-7 H3	-7 QC2	-6,9 H3	-7 QC2	-7 H3	-7 E1	-7 H3	-7,1 H3	-7 QC2	-7 H3
-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1
-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,6 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G
-5,8 H2	-5,9 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,9 H2	-5,9 H2	-5,8 H2	-5,9 H2	-5,8 H2	-5,8 H2

Corrida11	Corrida12	Corrida13	Corrida14	Corrida15	Corrida16	Corrida17	Corrida18	Corrida19	Corrida20
ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.	ΔG Lig.
-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4
-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-9 D	-9 D	-8,9 D
-8,9 A	-8,8 A	-8,9 B	-8,8 A	-8,8 A	-8,7 A	-8,8 A	-8,9 B	-8,8 A	-8,9 B
-8,7 F	-8,6 H	-8,8 F	-8,6 F	-8,6 F	-8,6 F	-8,7 F	-8,8 A	-8,7 F	-8,8 A
-8,7 B	-8,6 F	-8,8 A	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,7 F	-8,5 QS1	-8,6 F
-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,5 QS1
-8,5 H	-8,5 B	-8,5 H	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,5 B1	-8,4 QS5	-8,5 H	-8,4 QS5	-8,5 H
-8,4 F1	-8,4 QS5	-8,4 F1	-8,4 QC1	-8,4 QC1	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,4 QS5	-8,4 F1	-8,5 B1
-8,3 QS5	-8,4 F1	-8,4 B1	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,3 QS5	-8,4 B1	-8,4 F1	-8,3 QC1	-8,4 QS5
-8,3 QC3	-8,4 B1	-8,3 QS5	-8,4 B1	-8,4 B1	-8,3 QC1	-8,3 QC1	-8,3 QC1	-8,3 H1	-8,4 QC1
-8,3 QC1	-8,3 QC1	-8,3 QC1	-8,4 B	-8,4 B	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 B1	-8,4 F1
-8,3 B1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,2 QS2	-8,3 B	-8,3 B1	-8,2 QS2	-8,3 H1
-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QC5	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QC5	-8,2 QS2
-8,2 QC5	-8,2 QC5	-8,2 QC5	-8,2 QC5	-8,2 QC5	-8,2 QC2	-8,2 QC5	-8,2 QC5	-8,2 QC2	-8,2 QC5
-8,2 H1	-8,2 QC3	-8,2 QC3	-8,1 QC3	-8,1 QC3	-8,2 B	-8,2 QC3	-8,2 QC3	-8,2 B	-8,2 QC3
-8,1 QC4	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QC2	-8,1 QC2	-8,1 QS3	-8,1 QC4	-8,1 QC4	-8,1 QS3	-8,1 QS3
-8,1 QC2	-8 QC4	-8,1 QC4	-8 QS3	-8 QS3	-8,1 QC4	-8,1 QC2	-8 QS3	-8,1 QC4	-8,1 QC4
-8 QS3	-8 C	-8,1 C	-8 QC4	-8 QC4	-8,1 QC3	-8 QS3	-7,8 QS4	-8,1 QC3	-8,1 QC2
-8 C	-7,9 QS4	-8 QS4	-8 C	-8 C	-8 C	-8 C	-7,8 C	-8 QS4	-8 C
-7,9 QS4	-7,3 E	-7,4 E	-7,9 QS4	-7,9 QS4	-7,9 QS4	-7,8 QS4	-7,4 E	-8 C	-7,8 QS4
-7,4 E	-7 QC2	-7,2 E1	-7,4 E	-7,4 E	-7,4 E	-7,4 E	-7,2 E1	-7,4 E	-7,5 E
-7,1 E1	-7 H3	-7 QC2	-7,2 E1	-7,2 E1	-7,2 E1	-7 H3	-7 QC2	-7 H3	-7,3 E1
-6,9 H3	-6,9 E1	-7 H3	-6,9 H3	-6,9 H3	-6,9 H3	-7 E1	-7 H3	-6,9 E1	-7,1 H3
-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1
-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G
-5,9 H2	-5,8 H2	-5,9 H2	-5,9 H2	-5,9 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,9 H2	-5,8 H2

Corrida21		Corrida22		Corrida23		Corrida24		Corrida25		Corrida26		Corrida27		Corrida28		Corrida29		Corrida30	
ΔG	Comp	ΔG	Comp	ΔG	Lig.	ΔG	Lig.	ΔG	Lig.	ΔG	Lig.	ΔG	Lig.	ΔG	Lig.	ΔG	Lig.	ΔG	Lig.
-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,4 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,5 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4	-9,6 H4
-8,8 D	-9 D	-8,9 D	-9 D	-8,9 D	-9 D	-8,9 D	-9 D	-8,9 D	-9 D	-9 B	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D	-8,9 D
-8,8 A	-8,8 A	-8,8 F	-9 B	-8,8 F	-9 B	-8,8 F	-9 B	-8,8 F	-9 B	-8,8 F	-8,9 D	-8,8 A	-8,9 A	-8,7 F	-8,9 B	-8,9 B	-8,9 B	-8,9 B	-8,9 B
-8,7 F	-8,7 F	-8,8 A	-8,8 A	-8,8 A	-8,8 A	-8,8 A	-8,8 A	-8,8 D	-8,7 A	-8,6 F	-8,8 F	-8,8 F	-8,8 F	-8,7 A	-8,8 A	-8,8 A	-8,8 A	-8,8 A	-8,8 A
-8,5 QS1	-8,6 B	-8,5 QS1	-8,6 F	-8,6 F	-8,8 A	-8,6 F	-8,8 A	-8,6 F	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,5 QS1	-8,5 QS1
-8,5 H	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 QS1	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,4 QS1	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H
-8,4 QS5	-8,5 H	-8,5 B1	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,5 H	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 F1	-8,5 F	-8,5 F	-8,5 F	-8,5 F	-8,5 F
-8,4 F1	-8,5 B1	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 QS5	-8,4 QC1	-8,4 H1	-8,4 H1	-8,4 H1	-8,4 B1	-8,5 B1	-8,5 B1	-8,5 B1	-8,5 B1	-8,5 B1
-8,4 B1	-8,4 QS5	-8,4 F1	-8,4 QC1	-8,4 F1	-8,4 QC1	-8,4 F1	-8,4 QC1	-8,4 F1	-8,4 QC1	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,3 QS5	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,4 F1	-8,4 F1
-8,3 QC3	-8,4 F1	-8,3 QC3	-8,4 F1	-8,4 B1	-8,4 B1	-8,4 B1	-8,4 B1	-8,4 B1	-8,4 B1	-8,4 F1	-8,4 B1	-8,4 B1	-8,4 B1	-8,3 QC1	-8,3 QS5	-8,3 QS5	-8,3 QS5	-8,3 QS5	-8,3 QS5
-8,3 QC1	-8,3 QC1	-8,3 QC1	-8,4 B1	-8,3 QC1	-8,4 B1	-8,3 QC1	-8,4 B1	-8,3 QC1	-8,4 B1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 QC5	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 H1
-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 H1	-8,3 QC3	-8,3 H1	-8,3 QC3	-8,3 H1	-8,3 QC3	-8,3 H1	-8,3 QC3	-8,3 H1	-8,3 B	-8,3 B	-8,3 B	-8,3 QC3	-8,3 B	-8,3 B	-8,3 B	-8,3 B	-8,3 B
-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,3 B	-8,3 H1	-8,2 QS2	-8,3 H1	-8,2 QS2	-8,3 H1	-8,2 QS2	-8,3 H1	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2
-8,2 B	-8,2 QS5	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2	-8,2 QS2
-8,1 QS3	-8,2 QS3	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS5	-8,2 QS3	-8,2 QS3	-8,2 QS3	-8,2 QS3	-8,1 QS3	-8,2 QS3	-8,2 QS3	-8,2 QS3	-8,2 QS3	-8,2 QS3
-8,1 QC4	-8 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,2 QC2	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QC4	-8,2 QC2	-8,2 QC2	-8,2 QC2	-8,2 QC2	-8,2 QC2
-8,1 QC2	-8 QC4	-8,1 QC4	-8,1 QC2	-8,1 QC2	-7,9 QS4	-8,1 QC2	-7,9 QS4	-8,1 QC2	-7,9 QS4	-8,1 QS3	-8,1 QC4	-8,1 QC4	-8,1 QC4	-8,1 C	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3	-8,1 QS3
-8,1 C	-7,9 QS4	-8,1 C	-8,1 C	-8,1 C	-7,9 QS3	-8,1 C	-7,9 QS3	-8,1 C	-7,9 QS3	-8,1 QC4	-8,1 QC2	-8,1 QC2	-8,1 QC2	-8 QS4	-8,1 QC4	-8,1 QC4	-8,1 QC4	-8,1 QC4	-8,1 QC4
-8 QC5	-7,9 C	-8 QS4	-8 QC4	-8 QC4	-7,9 C	-8 QC4	-7,9 C	-8 QC4	-7,9 C	-8,1 C	-8 C	-8 C	-8 C	-7,4 E	-8,1 C	-8,1 C	-8,1 C	-8,1 C	-8,1 C
-7,8 QS4	-7,3 E	-7,4 E	-7,8 QS4	-7,5 QC2	-8 QS4	-7,9 QS4	-7,2 QC1	-8 QS4	-7,9 QS4	-7,2 QC1	-8 QS4	-7,9 QS4	-7,2 QC1	-8 QS4	-7,9 QS4	-7,9 QS4	-7,9 QS4	-7,9 QS4	-7,9 QS4
-7,4 E	-7,2 E1	-7 QC2	-7,3 E	-7,3 E	-7,3 E	-7,3 E	-7,3 E	-7,3 E	-7,3 E	-7,4 E	-7,4 E	-7,4 E	-7,4 E	-7,2 E1	-7,4 E	-7,4 E	-7,4 E	-7,4 E	-7,4 E
-7,2 E1	-7 QC2	-7 E1	-7,1 E1	-7,2 E1	-7,3 E1	-7,3 E1	-7,3 E1	-7,3 E1	-7,3 E1	-7,3 E1	-7,3 E1	-7,3 E1	-7,3 E1	-7,1 QC2	-7,2 E1	-7,2 E1	-7,2 E1	-7,2 E1	-7,2 E1
-7 H3	-7 H3	-6,9 H3	-7 H3	-6,9 H3	-7 H3	-6,9 H3	-7 H3	-6,9 H3	-7 H3	-6,9 H3	-7 H3	-7 H3	-7 H3	-7 H3	-7 H3	-7 H3	-7 H3	-7 H3	-7 H3
-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1	-6,8 G1
-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G	-6,8 G
-5,8 H2	-5,9 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,8 H2	-5,9 H2	-5,8 H2	-5,9 H2	-5,9 H2	-5,9 H2	-5,9 H2	-5,9 H2