



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

**INTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Análisis conformacional en un estudio QSAR de una serie de
tetrahydro-1- benzoazepinas activas contra *Trypanosoma cruzi*”**

Tesis

Que para obtener el título de:
Maestro en Ciencias Químicas

Presenta:
Jonahtan Lira Chávez

Asesor de tesis:
D.C. Químicas Luis Chacón García

Morelia, Michoacán agosto de 2013

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Diseño Molecular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. Luis Chacón García. La base de datos, así como la síntesis fue aportada por el laboratorio de Síntesis Orgánica de la facultad de Química de la Universidad de Santander (UIS) bajo la asesoría del D.C. Alirio Palma Rodríguez

Con apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (proyecto 2.18).

Índice

FIGURAS	I
TABLAS	II
RESUMEN	- 1 -
ABSTRACT.....	- 2 -
1.-INTRODUCCION.....	- 3 -
1.2.-GUSANOS HELMINTOS	- 3 -
1.3.- PROTOZOOS PARÁSITOS	- 4 -
1.3.1.- <i>Trypanozoma cruzi</i>	- 4 -
2.- ANTECEDENTES	- 6 -
2.1 QSAR.....	- 8 -
3.- OBJETIVO GENERAL	- 11 -
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	- 11 -
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 11 -
5- PARTE EXPERIMENTAL.....	- 34 -
5.1.- MODELADO MOLECULAR	- 34 -
5.2- ANÁLISIS CONFORMACIONAL	- 34 -
5.3.- ESTUDIOS QSAR	- 36 -
5.3.1 DESCRIPTORES MOLECULARES.....	- 36 -
5.3.2 MODELOS	- 37 -
5.4.- PARTE EXPERIMENTAL.....	- 44 -
5.4.1 PREPARACIÓN DE LA 2-ALILANILINA 45	- 44 -
5.4.2 PREPARACIÓN DE LAS 2-ALIL-N-BENCILANILINAS 46a,b	- 45 -
5.4.3 OXIDACIÓN DE LAS 2-ALIL-N-BENCILANILINAS 46a,b.....	- 46 -
5.4.4 APERTURA REDUCTIVA DE LOS 1,4-EPOXI-CICLOADUCTOS 47a,b ..	- 47 -
5.4.5 ACETILACIÓN DE LOS 4-HIDROXI-2,3,4,5-TETRAHIDRO-1(1H)- BENZOACEPINA 48a,b	- 48 -
Bibliografía	- 50 -

FIGURAS

Figura 1 Derivados de la 1,2-dihidro-7,8-dimetoxi-N-(p-tosil)-1-benzoazepina con actividad analgésica y anti-inflamatoria	- 6 -
Figura 2 1-Benzoazepinonas que actúan como inhibidoras del canal de sodio Nav1.7 y como antagonistas de los receptores de la dopamina	- 7 -
Figura 3 Inhibidores de la DHFR (34), Las 1,4-epoxitetrahidronafto[1,2-b]azepinas (35) y las 1,4-epoxitetrahidro-1-benzoazepinas (35)	- 8 -
Figura 4. Ecuación utilizada	- 10 -
Figura 5 Serie de compuestos con el grupo hidroxilo en Beta	- 12 -
Figura 6 Serie de compuestos con el grupo hidroxilo en Alfa.....	- 12 -
Figura 7 Análisis conformacional	- 13 -
Figura 8 Perfil energético del compuesto 1 conformero alfa . Se representa la Energía vs el ángulo diedro.	- 14 -
Figura 9 . Superposición de perfiles energéticos tanto de la conformación alfa	- 15 -
Figura 10 Superposición de perfiles energéticos tanto de la conformación beta.....	- 16 -
Figura 11 Primera restricción de los modelos tanto beta como alfa.	- 20 -
Figura 12 Segunda restricción de los modelos tanto beta como alfa.....	- 22 -
Figura 13 Tercera restricción de los modelos tanto beta como alfa	- 23 -
Figura 14 Serie de exploración para la capacidad predictiva.	- 26 -
Figura 15 Cuarta restricción de los modelos tanto beta como alfa	- 29 -
Figura 16 Compuestos propuestos y su actividad predicha	- 30 -
Figura 17 Ruta síntesis empleada para obtener los N,O-diacetil derivados de la cis-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzoazepina.	- 31 -
Figura 18 Alineamiento del ángulo diedro	- 34 -
Figura 19 Configuración de los cálculos	- 35 -
Figura 20 Cálculo de Descriptores Moleculares	- 36 -
Figura 21 Salvar de Descriptores Moleculares	- 37 -
Figura 22 Importar archivo paso 1	- 38 -
Figura 23 Importar archivo paso 2.....	- 39 -
Figura 24 Configuración de datos	- 40 -
Figura 25 Selección de modelos	- 41 -
Figura 26 Análisis y validación de modelos	- 43 -
Figura 27 Estructura general de las 2-Alil-N-bencilanilinas 46a,b.....	- 45 -
Figura 28 Estructura general de las 2-exo-aril-1,4-epoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1-benzoazepinas 47a,b.....	- 46 -
Figura 29 Estructura general de las cis-2-exo-aril-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoazepinas 48a,b	- 47 -
Figura 30 Estructura general de las cis-N,O-diacetil-2-exo-aril-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoazepinas 44a,b	- 48 -

TABLAS

Tabla 1 Resultados del estudio QSAR de la serie con ángulo 0° conformero alfa.....	- 18 -
Tabla 2 . Coeficiente de correlación de descriptores del modelo 43 de la serie con ángulo 0° conformero alfa.....	- 19 -
Tabla 3 Coeficiente de correlación de descriptores del modelo 2 de la serie con ángulo 0° conformero alfa.....	- 20 -
Tabla 4 Resultados parciales del estudio QSAR de la serie con ángulo 30° conformero alfa -	21 -
Tabla 5 Resultados parciales del estudio QSAR de la serie con ángulo 30° conformero alfa -	23 -
Tabla 6 Modelos que aún se conservan después de la tercera restricción para los conformeros alfa.....	- 24 -
Tabla 7 Modelos que aún se conservan después de la tercera restricción para los conformeros beta.....	- 25 -
Tabla 8 Resultados de la capacidad predictiva de los modelos correspondientes a la configuración alfa.	- 27 -
Tabla 9 Resultados de la capacidad predictiva de los modelos correspondientes a la configuración beta.....	- 28 -
Tabla 10 Modelos finales correspondientes al ángulo 90° del conformero beta.	- 29 -

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis muy compleja, que existe únicamente en el continente americano, En su cadena de transmisión interviene un gran número de reservorios vertebrados y de insectos triatomínicos (vectores) o mediante transfusiones de sangre todo esto hace imposible su erradicación, es provocada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Constituye una amenaza permanente para casi la cuarta parte de toda la población de América Latina, estimada en 28 millones de personas en el año 2006, las cuales se encuentran bajo riesgo de adquirir la infección.

Los únicos dos medicamentos disponibles Benznidazol y Nifurtimox que se encuentran en el mercado desde hace más de 40 años, son parcialmente eficaces, además de presentar serios efectos secundarios. De aquí la importancia de la realización de estudios que permitan encontrar opciones para el tratamiento de la enfermedad. Uno de estos estudios son los realizados a través de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*), se basan en encontrar correlaciones entre la estructura química de una serie de compuestos y su actividad biológica.

De manera simplificada, la técnica está basada en el uso de series de compuestos derivados de una estructura común, en los que se observan los cambios producidos en su actividad biológica en función de la presencia de sustituyentes diversos. A partir de estos datos, es posible calcular coeficientes aditivos de *novi* para cada sustituyente, con lo que es posible diseñar la mejor combinación de sustituyentes para alcanzar el óptimo de actividad. El presente proyecto comprende la realización de un estudio QSAR de una serie de compuestos activo contra *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease is a zoonosis very complex, which exists only in the Americas, in its chain of transmission involving large number of vertebrate reservoirs and triatomine bugs (vectors) or by blood transfusions all this makes it impossible to eradicate, is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. It constitutes a permanent threat to almost a quarter of the entire population of Latin America, estimated at 28 million people in 2006, which are at risk of acquiring infection.

The only two benzimidazole and nifurtimox drugs available that are in the market for over 40 years, are partially effective, besides presenting serious side effects. Hence the importance of conducting studies to find options for treatment of the disease. One of these studies are performed through QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) is finding correlations between the chemical structure of a number of compounds and their biological activity.

Simplified, the technique is based on the use of series of compounds derived from a common structure in the observed changes in biological activity based on the presence of different substituents. From these data, it is possible to calculate coefficients for each novo additives substituent, it is possible to design the best combination of substituents to achieve optimal activity. This project includes the completion of a QSAR study of a series of compounds active against *Trypanosoma cruzi*.

1.-INTRODUCCION

A lo largo de la historia los seres humanos han convivido con un gran número de parásitos. De estos parásitos, una pequeña parte es causa de algunas de las enfermedades más importantes del mundo. La mayoría de estas enfermedades ocurren principalmente en los trópicos. Hay, sin embargo, más en la historia de la parasitología que involucra las actividades humanas, como las grandes migraciones que inician con la aparición del Homo sapiens en algún momento, alrededor de 150 000 años atrás¹ y con las que se extiende casi en la totalidad de la tierra llevando parásitos con ellos y encontrando algunos nuevos en el camino. El desarrollo de los asentamientos y ciudades así como del comercio y la trata de esclavos que floreció durante tres siglos y medio alrededor del 1500, trajeron parásitos hasta entonces desconocidos para el nuevo mundo.² En tiempos más recientes la propagación del virus de la inmunodeficiencia humana VIH y la inmunodepresión asociada a este virus se ha traducido en la creación de una serie de nuevas infecciones parasitarias oportunistas.³ Todos estos factores son solo unos de los que han afectado la difusión y distribución actual de los parásitos en el mundo. El campo de la parasitología es tan vasto que no es posible abarcar el tema en su totalidad, por lo tanto solo se consideraran los aspectos más relevantes para el presente trabajo. Los parásitos se consideraran bajo dos títulos principales, los gusanos helmintos y protozoos.

1.2.-GUSANOS HELMINTOS

Los helmintos son gusanos multicelulares que parasitan diversas especies de animales y plantas. Anélidos (sanguijuelas), nematelmintos (gusanos redondos), y platelmintos (gusanos planos). Estos parásitos han colonizado más de un tercio de la población mundial. Los humanos y los gusanos helmintos han coexistido durante miles de años. Es interesante que se han identificado huevos de helmintos dentro de desechos humanos petrificados que datan de 10 000 años.⁴

Estos organismos se propagan a través del contacto con el suelo, agua o alimentos contaminados e incluso con la inhalación de polvo y manos sucias. Comer tierra es una práctica común entre los seres humanos y otros animales⁵, por lo que

tanto los adultos como los niños se encuentran expuestos, ya que además de bacterias el suelo también alberga formas inactivas de los paracitos helmínticos.

1.3.- PROTOZOOS PARÁSITOS

Debido a su tamaño no fue posible su reconocimiento, hasta la invención del microscopio y su uso por Antonie van Leeuwenhoek a finales del siglo XVII. El estudio de los protozoos parásitos sucedió dos siglos después, seguidos del descubrimiento de las bacterias y la promulgación de la teoría de los gérmenes de Pasteur y sus colegas a finales del siglo 19.⁶

Los parásitos protozoos son unos de los mayores contribuyentes a las enfermedades en el mundo.⁷ Esto incluye parásitos apicomplexa tales como *Plasmodium spp.* (malaria), *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis), *Cryptosporidium spp.* (criptosporidiosis diarreica) y *Babesia bovis* (babesiosis), así como los parásitos kinetoplastid un grupo de protistas flagelados como son *Trypanosoma spp.* (enfermedad del sueño, la enfermedad de Chagas) y *Leishmania spp.* (leishmaniasis). Estos parásitos son responsables de miles de millones de infecciones y cientos de miles de muertes cada año.^{7, 8}

1.3.1.- *Trypanozoma cruzi*.

Es conocido por ser el causante de la enfermedad de Chagas, una enfermedad crónica y discapacitante. Los primeros indicios de que la enfermedad de Chagas, es una enfermedad antigua en Sudamérica provienen del examen espontaneo de restos humanos momificados en Chile entre 470 a.C. y 600 d. C. que mostraron claros signos de los daños causados por la enfermedad.⁹ El uso de técnicas de biología molecular hizo posible la detección de *T. cruzi* sin necesidad de visualizar al parásito. ADN de *T. cruzi* fue encontrado en el corazón y esófago de cuerpos momificados en Perú y norte de Chile que datan de 2000 a. C. a 1400 d. C.¹⁰ La historia de *T. cruzi* y la enfermedad de Chagas comienza con una serie de descubrimientos por el científico brasileño Carlos Chagas entre 1907 y 1912. Chagas no solo descubrió el Tripanosoma y demostró su transmisión por las chinches sino también describió la enfermedad que ahora conmemora su nombre.

La primera observación de Chagas fue que las chinches que infestaban las casas, pobremente construidas, albergaban protozoos flagelados y que cuando estos fueron inyectados en monos y cerdos de guinea, el tripanosoma aparecía en sangre.^{11, 12} Chagas más tarde encontró los mismos tripanosomas en la sangre de niños que presentaban cuadro febril agudo y sospechó que las chinches también podían transmitir el parasito a los humanos, pero por la picadura del insecto.^{13, 14} Fue el parasitólogo Francés Emile Brumpt quien demostró que la trasmisión es por vía fecal.¹⁵ La conexión entre la infección con *T. Cruzi* y diversos signos de la enfermedad de chagas, como la distensión del colon y esófago e insuficiencia cardiaca, no se determino hasta el trabajo de Fritz Koberle en la década de los 60's.¹⁶

Este parasito es transmitido por los triatominos, un grupo de insectos también conocidos como chinches que son hematófagos. El parasito se localiza en el intestino del triatomino en su estado epimastigote donde se replica extracelularmente, al llegar al recto del insecto pasa a su estado no replicativo tripomastigote metacíclicos que es el estado infeccioso y es liberado en las heces del triatomino cuando se alimenta. El parasito entra al huésped al haber contacto de las heces con la herida por mordedura que se produce generalmente al frotarla. Una vez en el huésped pasa a su estado replicativo amastigote del cual cambia a su cuarto estadio hasta romper la celular tripomostigote que es su forma alargada y que le permite propagarse por el sistema circulatorio y linfático o ser absorbido por el insecto vector y completar su ciclo de vida.¹⁷

Se estima que ha infectado de 8 a 10 millones de personas, y hay cerca de 40 000 nuevos casos por año. La enfermedad de chagas representa un problema en salud pública importante, problema social y económico en América Latina donde cerca de 100 millones de personas están en riesgo.¹⁸ Además de la propagación vectorial, transplantes de órganos aumenta el riesgo de difusión en todo el mundo debido a los procesos migratorios como en EE.UU., donde se estima que 300 000 personas están infectadas.¹⁹

Por lo anterior, no queda duda que la tripanosomiasis es un problema de salud pública que merece ser atendido sobretodo en países en vías de desarrollo como es México. Desgraciadamente, no hay diversidad en fármacos que sean útiles

en la terapéutica de la enfermedad que permita solventar el problema. La urgencia de encontrar compuestos novedosos con actividad contra este parásito ha rebasado el crecimiento de la enfermedad. En el presente trabajo se describe un estudio de Relación Estructura Actividad Cuantitativa (QSAR) en una serie de compuestos, de tipo tetrahidro benzacepinas, que han demostrado actividad contra el parásito en cuestión. Dicho estudio permite proponer la conformación por la cual estos compuestos actúan sobre su diana molecular que hasta el momento es desconocida. Así mismo, se propone el diseño de nuevas estructuras análogas y se describe su síntesis química.

2.- ANTECEDENTES

Los heterociclos constituyen las unidades estructurales de numerosos productos naturales biológicamente activos y además han jugado un importante papel en el diseño de medicamentos. Por muchos años las 1-Benzoazepinas, que son heterociclos nitrogenados de siete eslabones benzo-fusionados, han sido ampliamente estudiadas debido, fundamentalmente, a sus promisorias y amplios margen de actividad fármaco-biológica, por lo que se han convertido en estructuras de interés en la química medicinal. Por ejemplo, las 1,2-dihidro-7,8-dimetoxi-5-(pirrolidinil-1/piperidinil-1/morfolinil-4)-*N*-(*p*-tosil)-1-(3*H*)-benzoazepinas (**31**) fueron sintetizadas para evaluar su actividad analgésica y anti-inflamatoria²⁰ (Figura 1).

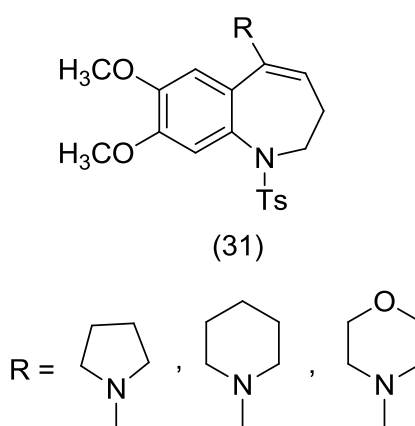


Figura 1 Derivados de la 1,2-dihidro-7,8-dimetoxi-*N*-(*p*-tosil)-1-benzoazepina con actividad analgésica y anti-inflamatoria

Entre las 1-benzoazepinas más estudiadas se encuentran las que poseen grupos carbonilo en las posiciones 2 y/o 5. Recientemente, se describieron las

nuevas 1-benzoazepin-2-onas (**32**) como potentes inhibidores del canal de sodio Nav1.7. Dicho canal, está implicado en la transmisión de las señales de dolor desde las neuronas nociceptivas periféricas. Los bloqueadores o inhibidores del canal de sodio Nav1.7 son, por lo tanto, de utilidad en el tratamiento de un número considerable de condiciones relacionadas con el dolor^{21, 22} (Figura 2).

Se ha asumido desde hace mucho tiempo, que la dopamina está implicada en la fisiopatología de la esquizofrenia.²³ Con el propósito de ofrecer nuevas dianas para estudiar esta enfermedad degenerativa del sistema nervioso central, *Zhao* y colaboradores sintetizaron e identificaron una nueva serie de antagonistas de los receptores D2/D4 de la dopamina, las 5-(piperazinil-1)-1,2,6,7-tetrahidro-5*H*-azepino[3,2,1-*h*]indol-4-onas (**33**) (Figura 2).

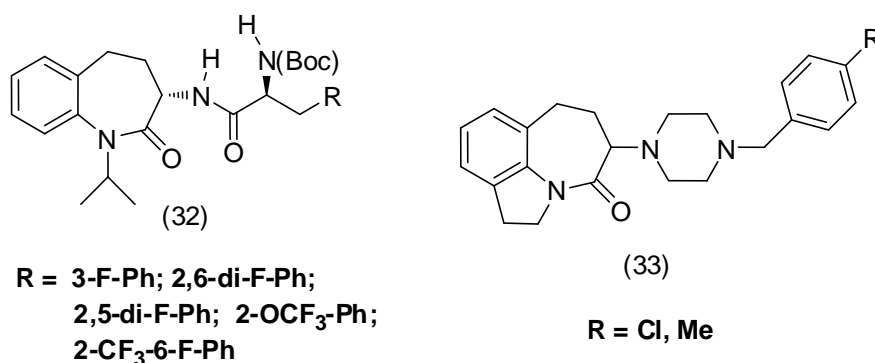


Figura 2 1-Benzoazepinonas que actúan como inhibidoras del canal de sodio Nav1.7 y como antagonistas de los receptores de la dopamina

En la búsqueda de alternativas terapéuticas para la enfermedad de Chagas causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, Gilbert y colaboradores²⁴ basados en resultados de docking, abordaron el estudio farmacológico de clorohidratos de los ya conocidos compuestos (**34**) (Figura 3), los cuales resultaron ser nuevos inhibidores de la enzima dihidrofolato-reductasa (en inglés, DHFR) de *Trypanosoma cruzi*. Este es uno de los pocos trabajos que dan cuenta de la importancia de ciertos derivados de la tetrahidro- 1-benzoazepina como promisorios agentes antiparasitarios.

Las 1,4-epoxitetrahidronafto[1,2-*b*]azepinas (**35**) (Figura 3) en ensayos biológicos *in vitro*, mostraron una significativa actividad antiparasitaria contra el *Trypanosoma cruzi* y la *Leishmania chagasi*.²⁵ Llama también la atención que este

mismo tipo de derivados en ensayos *in vivo* sobre ratones de experimentación, revelaron interesantes propiedades sobre el sistema nervioso central (ansiolítica, sedante y antipirética).²⁶ Análogos de (35) como las 1,4-epoxitetrahydro-1-benzoazepinas (36) (Figura 3), también fueron activos contra epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. chagasi* y contra la forma intracelular de *T. cruzi*, sin presentar toxicidad sobre células VERO.²⁷

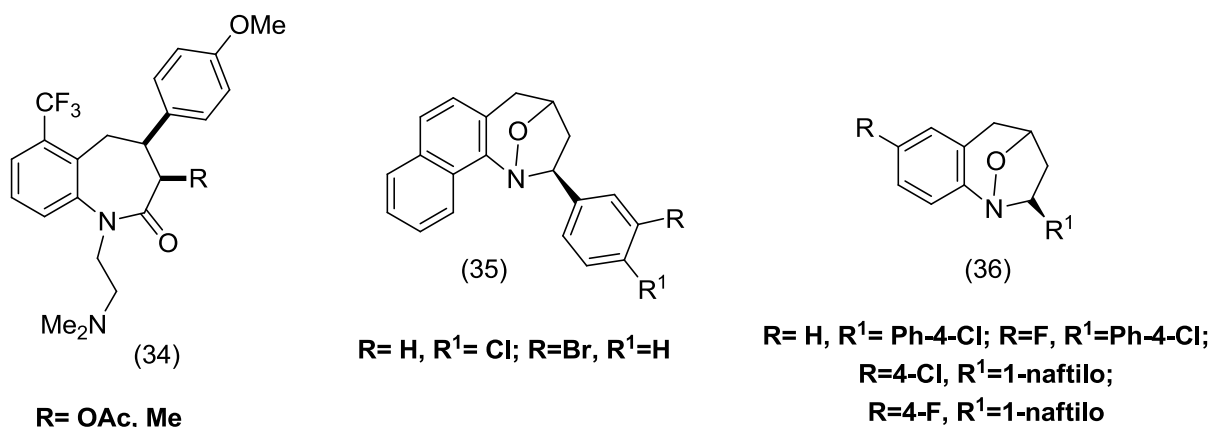


Figura 3 Inhibidores de la DHFR (34), Las 1,4-epoxitetrahidronafto[1,2-b]azepinas (35) y las 1,4-epoxitetrahydro-1-benzoazepinas (35)

2.1 QSAR

Muchos de los fármacos disponibles en la industria farmacéutica fueron caracterizados en su momento mediante técnicas de *screening* convencionales, proceso consistentes en evaluar en una batería lo más amplia posible de ensayos biológicos el mayor número posible de sustancias, tanto de origen natural como sintético, elegidas más o menos al azar. Con este procedimiento se consiguen identificar nuevas "cabezas de serie", o moléculas prototipo pertenecientes a una clase estructural determinada y con potencial en una área terapéutica concreta. Modificaciones químicas subsiguientes tienden a producir "análogos" de esas estructuras con una mayor actividad o una menor incidencia de efectos colaterales. Este método de descubrimiento de nuevos agentes con actividad biológica es interesante desde el punto de vista de que puede convertir a nuevas clases estructurales de compuestos en fármacos potenciales pero, al estar basado fundamentalmente en técnicas de ensayo y error, consume mucho tiempo y requiere

grandes recursos económicos. El porcentaje de éxitos, se ha estimado inferior a 1 por cada 10.000 compuestos sintetizados con un costo de \$600-800 millones de dolares.²⁸

Los primeros intentos dirigidos a incrementar la probabilidad de sintetizar un análogo activo o de encontrar una nueva cabeza de serie se basaron en encontrar correlaciones entre la estructura química de una serie de compuestos y su actividad biológica. De ahí surgieron las famosas siglas QSAR, acrónimo de “*Quantitative Structure-Activity Relationships*”, que es una palabra de uso corriente tanto en el proceso de diseño de nuevos fármacos como en la racionalización de las propiedades farmacológicas de una serie de sustancias. En la actualidad todas las compañías farmacéuticas y centros de investigación importantes hacen uso de alguna de estas tecnologías para optimizar la rentabilidad de sus síntesis y mejorar sus expectativas de dar con una nueva sustancia que pueda ser explotada comercialmente.²⁹

De manera simplificada, la técnica está basada en el uso de series de compuestos derivados de una estructura común, en los que se observan los cambios producidos en su actividad biológica en función de la presencia de sustituyentes diversos. A partir de estos datos, es posible calcular coeficientes aditivos de *novo* para cada sustituyente, con lo que es posible diseñar la mejor combinación de sustituyentes para alcanzar el óptimo de actividad.²⁹

La metodología QSAR sigue, independientemente del método que se utilice, pasos comunes. El punto de partida en todos los casos implica la existencia de un prototipo cabeza de serie, que se define como un producto que muestra actividad en relación con el objetivo terapéutico buscado. Este producto, generalmente es seleccionado debido a que tiene una actividad escasa, una toxicidad elevada, o características farmacocinéticas inadecuadas y se busca el mejoramiento en sus propiedades y obtener un fármaco con mayor potencial terapéutico.²⁹

Cuando se dispone de un prototipo, es preciso diseñar una serie de exploración, que está constituida por un conjunto de productos análogos del prototipo, que permitan el establecimiento de las primeras relaciones estructura-

actividad. Los miembros de la serie de exploración han de ser sintetizados y analizados en su actividad biológica.

Los miembros de la serie de exploración están constituidos por un núcleo común, y una serie de sustituyentes o fragmentos variables, que son característicos de cada producto de la serie. Dichos sustituyentes variables son identificados por descriptores, que serán utilizados como variables independientes (X_i) en el modelo. Los descriptores son binarios, indicando simplemente presencia o ausencia del fragmento, en los modelos de *novo*, y son mayoritariamente escalares, es decir con valores numéricos diversos, en los modelos paramétricos, por otra parte, los valores de actividad biológica, normalmente expresados en forma logarítmica, se utilizan como variable dependiente (A) en el modelo (Figura 4).

$$\text{Log } A = f_1(X_1) + f_2(X_2) + f_3(X_3) + \dots + f_n(X_n) + \text{cte}$$

Figura 4. Ecuación utilizada

Donde A es la actividad y $f_1(X_1)$, $f_2(X_2)$, $f_3(X_3)$,... $f_n(X_n)$ son las funciones de índice o los parámetros de los descriptores moleculares.

El modelo debe ser analizado estadísticamente, para evaluar su capacidad de predicción. Cuanta mayor calidad estadística tenga el modelo, tanto más fiables serán las predicciones de actividad obtenidas. La fase de optimización implica que una vez obtenido un modelo de buena calidad, es posible calcular los productos con actividad óptima dentro de la familia estudiada, que podrán ser obtenidos con un mínimo de esfuerzo experimental.²⁹

Hasta nuestro conocimiento, el QSAR, bidimensional que es el que hasta este punto se ha considerado, ha sido utilizado para predecir o explicar la actividad de series de compuestos en función de su estructura bidimensional pero no hay reporte en el que se describa la actividad en función de su conformación, para lo cual existen otras técnicas como Docking molecular.

3.- OBJETIVO GENERAL

Determinar si la conformación responsable de la actividad contra *Trypanosoma cruzi* de las benzoazepinas (1-15) puede determinarse a través de un estudio QSAR y utilizar dicha información para el diseño de nuevos compuestos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Llevar a cabo un análisis conformacional en cada una de las benzoazepinas **1-15**.
2. Llevar a cabo un estudio QSAR para cada una de las conformaciones estudiadas en el objetivo anterior
3. Validar las ecuaciones obtenidas a partir del estudio QSAR y correlacionar las mejores ecuaciones con la conformación obtenida.
4. Diseñar y sintetizar estructuras análogas novedosas a partir del estudio QSAR

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La serie de exploración utilizada, consta de 15 compuestos derivados de tetrahidro-1-benzoazepinas, que han presentado actividad inhibitoria del crecimiento en cultivos celulares de *Trypanosoma cruzi*. A dichos compuestos no se les conoce el mecanismo de acción por lo que son candidatos interesantes para realizar estudio QSAR y no de anclaje molecular o COMFA en donde se conocen las características tridimensionales del compuesto biológicamente activo así como la estructura de la diana molecular. Por su parte los compuestos fueron sintetizados sin considerar estereocontrol alguno por lo que se probaron mezclas racémicas. Con la finalidad de responder al objetivo acerca de si es posible correlacionar la conformación e incluso la estereoquímica responsable de la actividad fue necesario primero modelar cada uno de los compuestos en sus configuraciones *syn* y *anti*. El resultado fue de dos series de exploración: una serie constituida por aquellos compuestos que poseen el grupo hidroxilo en posición Beta (Figura 5), y otra que lo posee en posición Alfa (Figura 6)

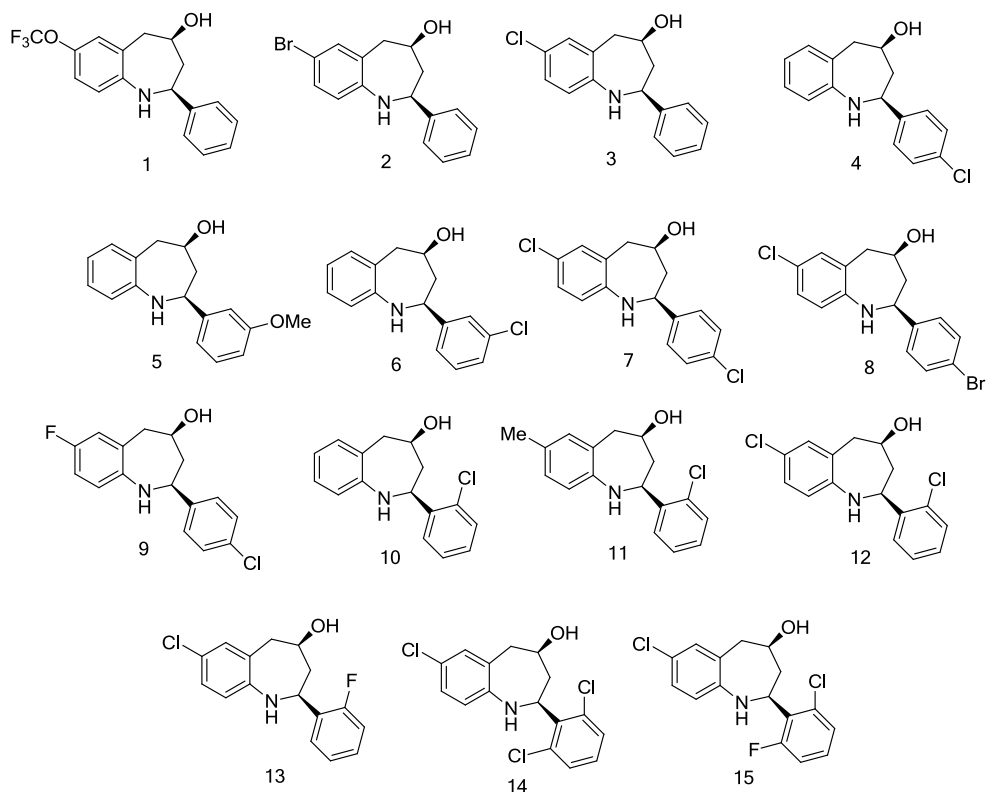


Figura 5 Serie de compuestos con el grupo hidroxilo en Beta

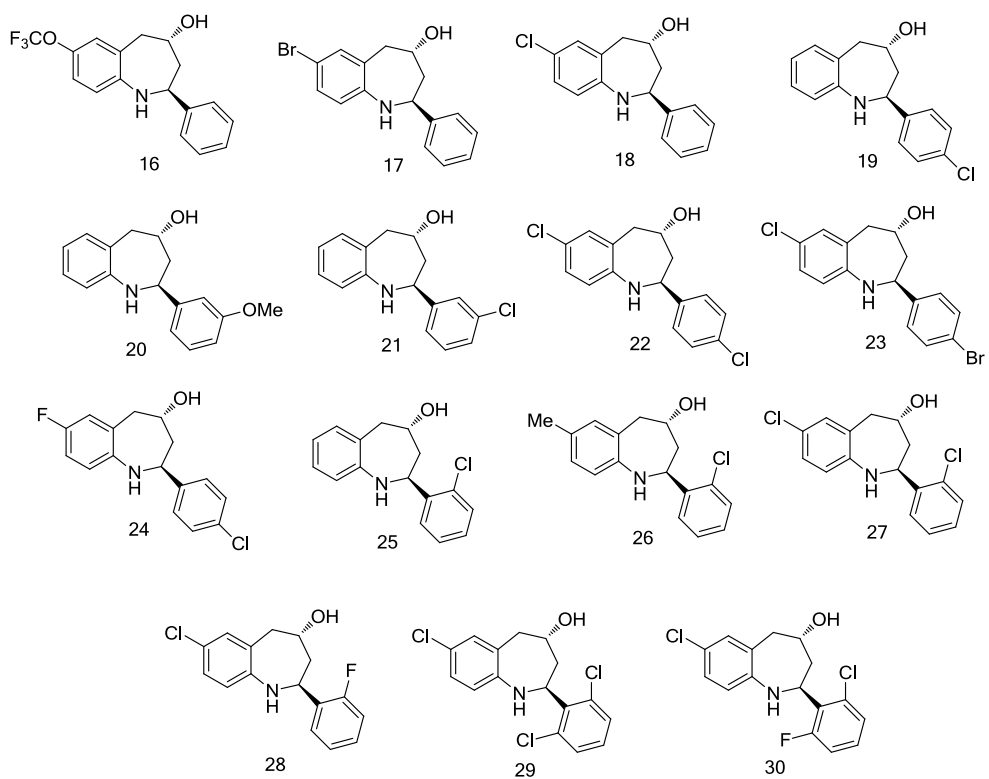


Figura 6 Serie de compuestos con el grupo hidroxilo en Alfa

Ambas series cumplen con los requisitos básicos para un adecuado estudio QSAR que son:

- Series análogas
- Que presenten mismo mecanismo de acción
- Sustituciones bioisostéricas predecibles
- Número de compuestos suficiente para el análisis estadístico

Así primeramente, a las dos series de compuestos, se les llevó a cabo un análisis conformacional donde el ángulo del grupo fenilo en posición alfa al amino, se modifica haciendo una torsión en el enlace. Esta torsión se realiza con un intervalo de 30° que es el estándar en análisis conformacional, iniciando con un ángulo diedro de 0° entre los átomos seleccionados (Figura 7). Por lo que el análisis se realizó a los ángulos 0° , 30° , 60° , 90° , 120° , 150° , 180° , 210° , 240° , 270° , 300° , 330° .

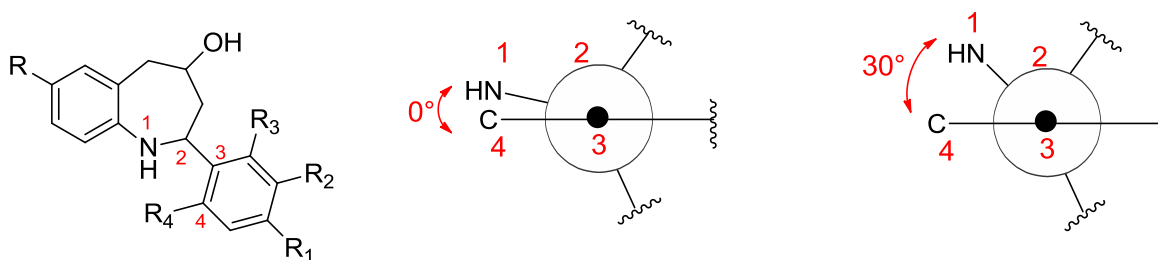


Figura 7 Análisis conformacional

Con el análisis conformacional, se generaron sub-series de exploración para cada ángulo analizado a su vez para ambas series. Por lo que se creó un total de 24 series de exploración 12 series obtenidas con el grupo hidroxilo en posición alfa y 12 series con el hidroxilo en posición beta.

En la Figura 8 se ilustra el perfil de energía obtenido para el compuesto 1 del conformero alfa.

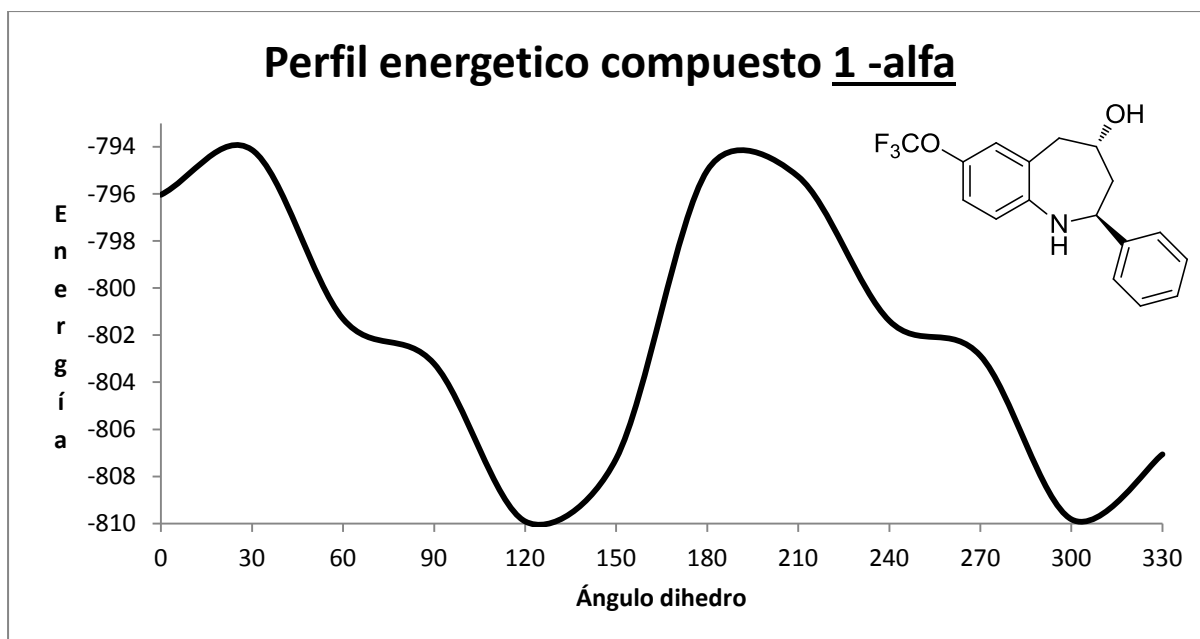


Figura 8 Perfil energético del compuesto 1 conformero alfa . Se representa la Energía vs el ángulo diedro.

El perfil energético de la Figura 8 muestra en que ángulos la molécula se encuentra con mayor tensión y por lo tanto con mayor energía así como la simetría que se puede observar al ir rotando el grupo fenilo. En este caso se espera un perfil energético simétrico pues el grupo fenilo no está sustituido en las posiciones *orto* ni *para*.

En la figura 9 y 10 se puede observar una superposición de los perfiles energéticos de todos los compuestos pertenecientes a los conformeros de los compuestos alfa y beta, se puede apreciar que para ambos casos los perfiles siguen la misma tendencia energética. Esto hace suponer que todas ellas tienen un comportamiento conformacional similar al estar en contacto con la diana objetivo de los parásitos.

Superposición de perfiles energéticos correspondientes a conformerón en beta

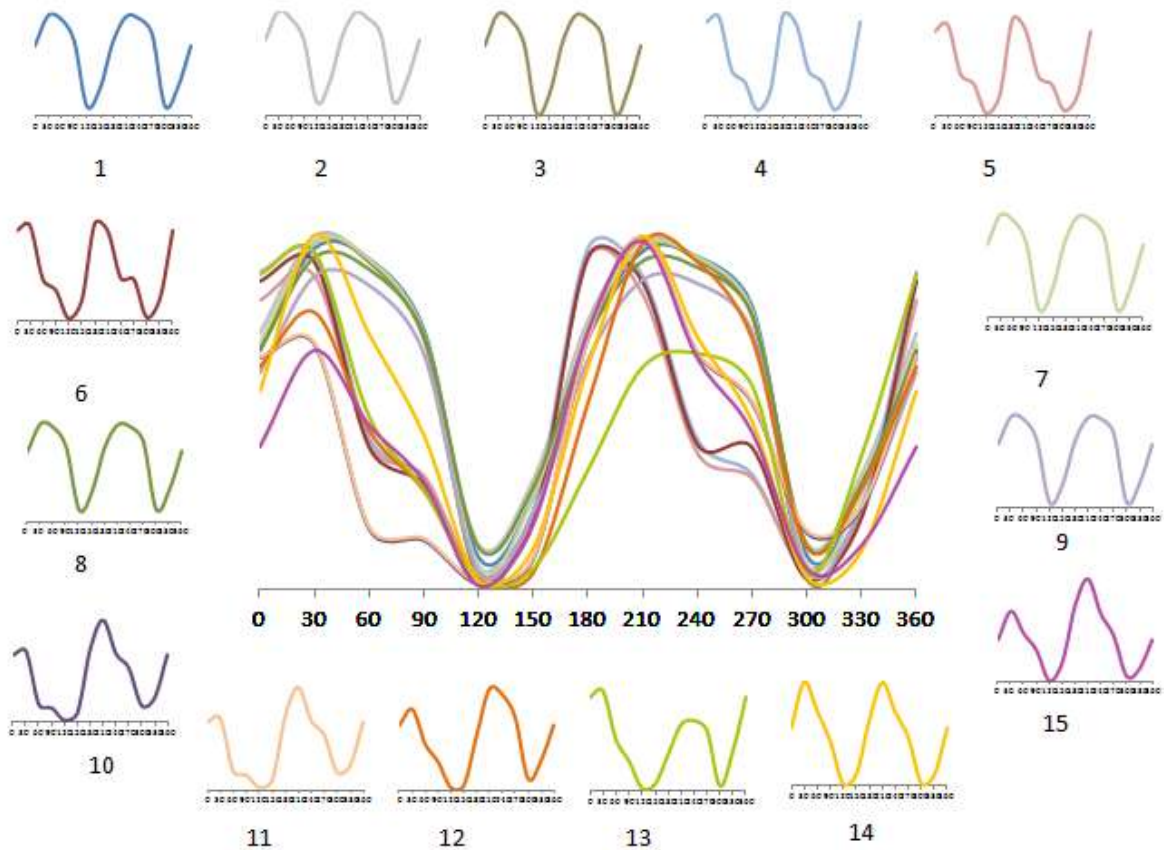


Figura 9 . Superposición de perfiles energéticos tanto de la conformación alfa

Superposición de perfiles energéticos correspondientes a conformerón en alfa

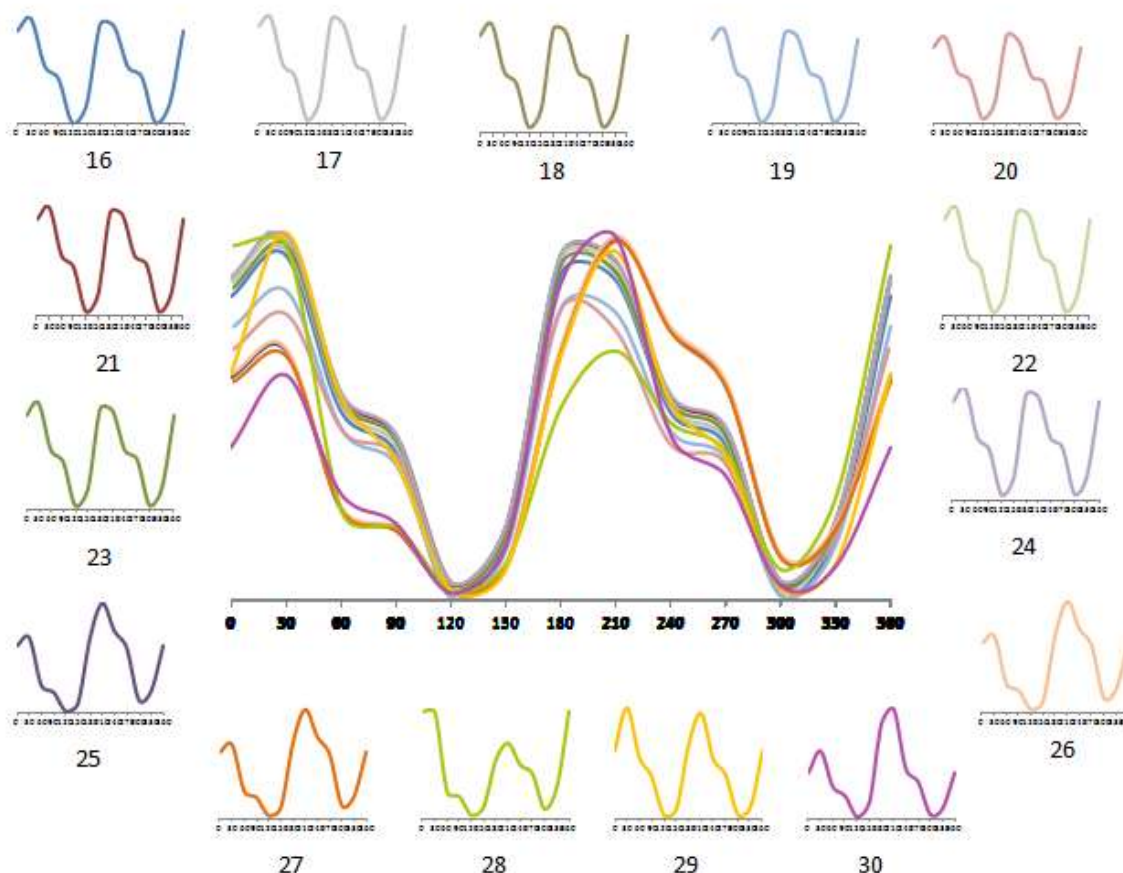


Figura 10 Superposición de perfiles energéticos tanto de la conformación beta

Las 24 series de exploración fueron entonces sometidas a estudios QSAR utilizando métodos estadísticos de regresión lineal múltiple así como sus respectivas restricciones y métodos de validación. Aunque en un estudio QSAR se puede encontrar un número grande de soluciones, es justamente mediante estos métodos de validación estadística, en donde se considera el número de variables, desviación estandar, F, etc., la que permite obtener soluciones importantes que expliquen la actividad y la correlacionen a las propiedades moleculares de la serie de compuestos a explorar. En la actualidad es posible contar con miles de propiedades moleculares para una sola molécula y realizar un análisis de regresion lineal múltiple con todas ellas resultaria prácticamente prohibitivo. Por lo anterior se hace uso de los algoritmos genéticos (AG) los cuales se basan en una técnica de muestreo aleatorio para encontrar una solución sub-óptima. Los algoritmos genéticos han sido ampliamente utilizados en problemas de alta dimensionalidad. Estos funcionan con

operadores llamados selección, mutación y cruce, que inician con la entrada de cromosomas como padres, en este caso son representados por las variables o descriptores moleculares. Los algoritmos generan la población de la muestra con cierto número de subconjuntos formados por características o variables, seleccionando al azar de entre el conjunto de datos. La "bondad" de cada subconjunto de características o variables se evalúa en función de su "fitness". La serie de subconjunto de características que satisfacen el criterio del "fitness" se puede encontrar usando un esquema iterativo. Para cada iteración, el "fitness" de cada subconjunto de características se calcula. El subconjunto de características o variables es elegido para cruce y mutación basado en la mayor probabilidad, de seleccionar el subconjunto de características con un mejor "fitness", y viceversa. Una nueva descendencia (subconjunto de características) se genera al hacer el cruce entre dos subconjunto de características o variables seleccionadas. Después se realiza un cruce, se emplea mutación. La mutación realiza cambios al azar de la nueva descendencia con el fin de prevenir que se caiga en soluciones de un óptimo local. Si el "fitness" del subconjunto de características está satisfecho o cerca de un óptimo se consigue un subconjunto de características, y se genera una nueva población. El cálculo se termina hasta que un subconjunto de características o variables sea óptimo o se acerqué a serlo.

El resultado del estudio QSAR por algoritmos genéticos para cada serie arroja 50 modelos que caben como mejores de acuerdo a las restricciones estadísticas dadas. En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos para el mismo compuesto **1-alfa**.

Tabla 1 Resultados del estudio QSAR de la serie con ángulo 0° conformero alfa

Modelos correspondientes al ángulo diedro 0° de los conformeros Alfa							
ID	Size	Models	R2	Q2	Q2boot	Kx	
1	4	IDDE Mor02p HATS5m Inflamm-50	93.64	88.91	80.12	43.96	
2	4	IDDE RDF075p Gm HATS5m	92.85	88.4	0	30.6	
3	4	D/D IDDE Mor02p HATS5m	92.26	87.89	0	32.99	
4	4	IDDE ESpm02x Mor02p HATS5m	92.3	87.89	70.09	37.97	
5	4	HyDp IDDE Mor02p HATS5m	92.21	87.69	65.15	32.8	
6	4	IDDE ESpm02r Mor02p HATS5m	92.24	87.66	65.9	37.24	
7	4	MWC01 IDDE Mor02p HATS5m	92.22	87.62	67.77	35.94	
8	4	SRW02 IDDE Mor02p HATS5m	92.22	87.62	67.62	35.94	
9	4	nBO IDDE Mor02p HATS5m	92.22	87.62	66.92	35.94	
10	4	nSK IDDE Mor02p HATS5m	92.22	87.62	66.96	35.94	
11	4	SRW01 IDDE Mor02p HATS5m	92.22	87.62	68.5	35.94	
12	4	SCBO IDDE Mor02p HATS5m	92.22	87.62	68.03	35.94	
13	4	TWC IDDE Mor02p HATS5m	92.22	87.6	67.17	37.66	
14	4	IDDE ESpm14u Mor02p HATS5m	92.25	87.58	67.8	42.47	
15	4	IDDE ESpm15u Mor02p HATS5m	92.24	87.52	67.1	42.87	
16	4	GGI4 ADDD RTv+ Br-094	92.29	87.5	43.96	42.21	
17	4	GGI4 ADDD R1v+ Br-094	92.29	87.5	16.46	42.21	
18	4	IDDE ESpm01x Mor02p HATS5m	92.2	87.49	65.86	36.36	
19	4	MWC05 IDDE Mor02p HATS5m	92.15	87.23	64.64	43.9	
20	4	IDDE RDF065e Mor02p HATS5m	92.59	87.14	73.25	34.97	
21	4	PHI IDDE Mor02p HATS5m	92.32	87.09	70.8	41.9	
22	4	X1 IDDE Mor02p HATS5m	92.11	87.08	65.23	35.58	
23	4	IDDE IVDM Mor02p HATS5m	92.11	87.07	65.88	35.46	
24	4	piPC10 IDDE Mor02p HATS5m	92.1	86.92	67.76	42.48	
25	4	BEHp5 GGI4 RTv+ Br-094	91.63	86.79	72.89	37.54	
26	4	BEHp5 GGI4 R1v+ Br-094	91.63	86.79	69.75	37.54	
27	4	IDDE Mor02p E2s HATS5m	92.42	86.79	70.5	51.93	
28	4	S2K IDDE Mor02p HATS5m	92.17	86.75	68.18	38.6	
29	4	IDDE Mor02p Gm HATS5m	92.79	86.68	75	49.03	
30	4	IDDE RDF065v Mor02p HATS5m	92.3	86.6	71.34	37.59	
31	4	IDDE GGI4 Mor02p HATS5m	92.24	86.52	67.08	40.72	
32	4	RDCHI IDDE Mor02p HATS5m	92.01	86.35	47.22	34.23	
33	4	Pol IDDE Mor02p HATS5m	91.88	86.18	65.9	47.03	
34	4	IDDE RDF045m Mor02p HATS5m	92.98	85.96	73.99	55.14	
35	4	IDDE RDF065u Mor02p HATS5m	92.4	85.88	72.93	40.17	
36	4	GGI4 G2u R1v+ Br-094	93	85.88	80.73	38.5	
37	4	GGI4 G2u RTv+ Br-094	93	85.88	80.8	38.5	
38	4	IDDE Mor11m Mor02p HATS5m	93.24	85.87	76.53	49.55	
39	4	IDDE Mor02p L2e HATS5m	92.04	85.85	61.13	42.38	
40	4	EEig05d ADDD RTv+ Br-094	90.75	85.81	0	34.93	
41	4	EEig05d ADDD R1v+ Br-094	90.75	85.81	0	34.93	
42	4	IDDE AT5m Mor02p HATS5m	91.78	85.4	68.41	54.03	

43	4	IDDE Mor02p HATS5m R1v+	91.71	85.31	70.77	44.47
44	3	IDDE Mor02p HATS5m	90.43	83.78	77.25	49.01
45	4	IDDE ATS2m Mor02p HATS5m	91.24	82.01	68.74	46.75
46	3	IDDE Gm HATS5m	88.61	79.79	77.27	33.52
47	4	IDDE Mor02p HATS5m RTp	90.44	78.82	68.33	53.67
48	4	IDDE ESpm01x Gm HATS5m	88.73	77.55	0	25.72
49	4	S2K IDDE Gm HATS5m	89.26	77.21	0	27.05
50	3	REIG R1v+ Br-094	84.69	76.79	72.36	48.85

Para llevar a cabo de manera adecuada el estudio QSAR fue necesario analizar detalladamente los mejores 50 modelos obtenidos para cada una de las 24 series. Así, se obtuvieron un total de 1200 modelos, (dada la magnitud de la información los resultados se anexan al final del manuscrito). En esta primera etapa no es posible relacionar la conformación con la actividad dado que en cada una de las 24 series hay modelos estadísticamente significativos. Por este motivo fue importante incrementar las restricciones estadísticas que permitieran, de manera mas rigurosa, discriminar modelos que no sean útiles

Así, la primera restricción usada fue la correlación entre los descriptores moléculares involucrados en cada uno de los modelos (Tabla 2). Es sabido que descriptores correlacionados en un mismo modelo de regresión dan lugar a ambigüedad y esta debe ser una restricción común en este tipo de estudios. La correlación se mide con un valor 1 a 0, siendo 1 una correlación perfecta significando que ambas propiedades son idénticas. En el caso contrario si el valor es de 0 no existe ninguna relación y las variables son totalmente independientes. En este estudio se consideró como restricción la correlación entre estas variables o descriptores con valores de 0.5 o menos.

Tabla 2 . Coeficiente de correlación de descriptores del modelo 43 de la serie con ángulo 0° conformero alfa

Coeficiente de correlación

Descriptores	IDDE	Mor02p	HATS5m	R1v+
IDDE	1			
Mor02p	0.06	1		
HATS5m	0.13	0.63	1	
R1v+	0.11	0.05	0.38	1

En la tabla 1 podemos observar como existe una correlación mayor a 0.5 entre los descriptores “Mor02p” y “HATS5m” por lo que este modelo fue descartado.

En la tabla 3 se observa cómo no existe correlación entre los descriptores, siendo esto lo buscado para considerar un modelo como aceptable.

Tabla 3 Coeficiente de correlación de descriptores del modelo 2 de la serie con ángulo 0° conformero alfa

Coeficiente de correlación

Descriptores	IDDE	RDF075p	Gm	HATS5m
IDDE	1			
RDF075p	0.08	1		
Gm	0.04	0.02	1	
HATS5m	0.13	0.00	0.19	1

De igual forma, se evaluó la correlación entre descriptores moleculares de los 1200 modelos obtenidos de los 24 estudios QSAR realizados. El resultado de descartar aquellos modelos que presentaran, entre sus descriptores, una correlación mayor a 0.5 fue la conservación de únicamente 683 modelos de los cuales fueron 294 alfa y 388 beta (Figura 11).

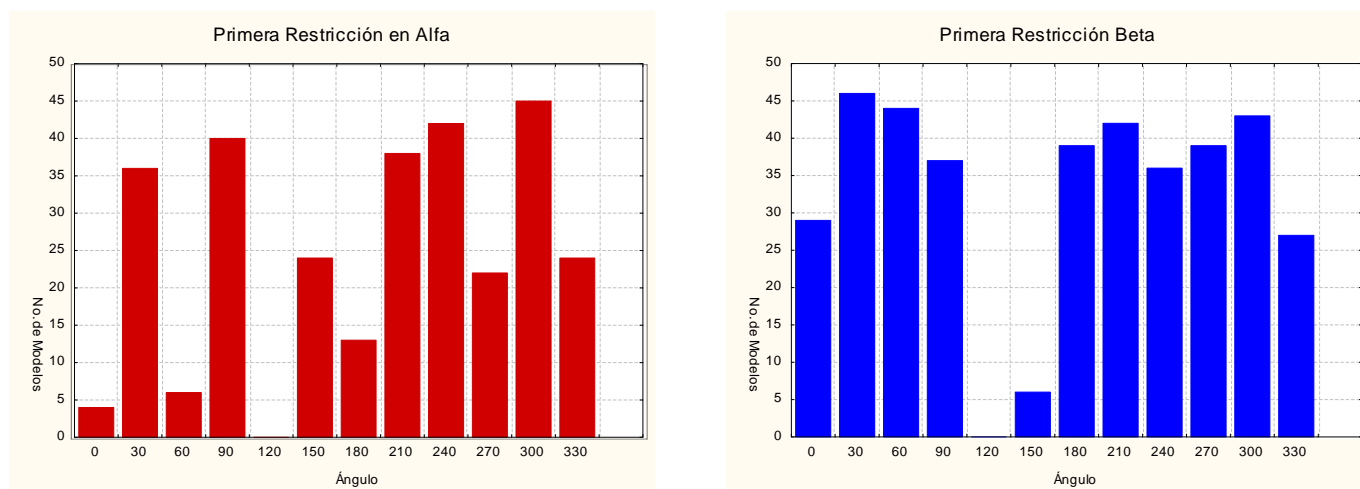


Figura 11 Primera restricción de los modelos tanto beta como alfa.

Se aprecia que realizada esta primera restricción la cantidad de modelos disminuye y elimina en su totalidad a los relacionados con un ángulo de 120°.

Se considero como segunda restricción los parámetros estadísticos son Kx y Q²Boot. La Q²Boot es un factor de predicción que utiliza una técnica de remuestreo estadístico para simular que la muestra con la que se trabaja es la población completa y así tener una aproximación más precisa. Kx es el coeficiente total de correlación y evalúa la relación que existe entre las variables o descriptores. Haciendo uso de estos valores estadísticos se analizaron los 683 modelos restantes. Los valores considerados mínimos para la sobrevivencia de los modelos fueron para Q²boot valores iguales o mayores a 50, valor que es considerado como un factor de predicción mínimo aceptable. En el caso Kx se considera que un valor menor a 50 es el adecuado ya que un valor superior a este se considera que la relación entre descriptores es demasiado alta.

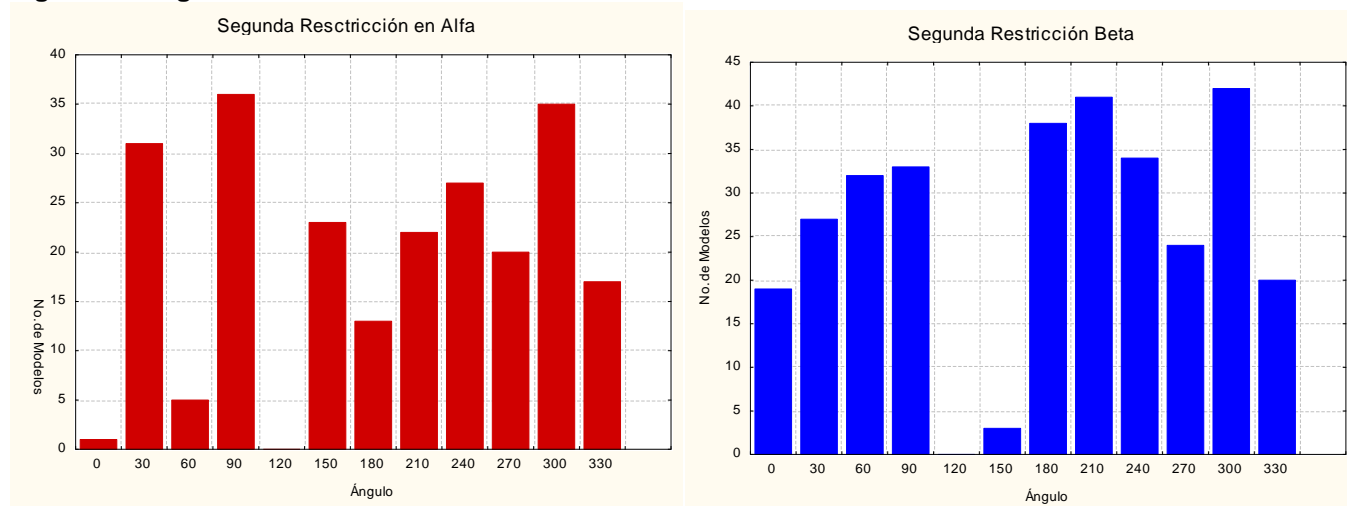
En la tabla 4 se muestra una tabla parcial de modelos donde es posible apreciar ambos casos donde el valor de Q²boot está por debajo del aceptable siendo los modelos 42 y 45 descartados. En el caso de Kx en el modelo 47 se aprecia que no cumple con el requisito por lo que de igual forma fue descartado.

Tabla 4 Resultados parciales del estudio QSAR de la serie con ángulo 30° conformero alfa

Modelos correspondientes al ángulo diedro 30° de los conformeros Alfa							
ID	Size	Modelos	R2	Q2	Q2boot	Kx	
38	4	SRW01 IDDE QYYm R3p+	93.61	86.67	66.64	34.81	
39	4	MWC01 IDDE QYYm R3p+	93.61	86.67	55.77	34.81	
40	4	nSK IDDE QYYm R3p+	93.61	86.67	69.18	34.81	
41	4	SRW02 IDDE QYYm R3p+	93.61	86.67	70.66	34.81	
42	4	Pol IDDE ATS7e R3p+	91.14	85.94	34.15	36.82	
43	4	ATS7e QYYm ISH R3p+	94.04	84.66	76.52	36.5	
44	3	X4 IDDE R3p+	90.19	81.47	78.78	24.67	
45	4	IDDE ATS5m ATS6e R3p+	88.17	80.63	48.19	38.55	
46	3	piID IDDE R3p+	87.89	79.8	73.81	35.62	
47	3	ATS6e ISH R3p+	89.45	79.52	77.32	50.08	

Al considerar esta segunda restricción, se conservaron 543 modelos, 230 alfa y 313 beta (Figura 12).

Figura 12 Segunda restricción de los modelos tanto beta como alfa



Aunque hubo una disminución del número de modelos, aun no se muestra ninguna tendencia clara, aunque si es apreciable que el comportamiento de la serie de compuestos alfa muestra una tendencia diferente con respecto a los compuestos beta. La diferencia mas importante está en el comportamiento de los confórmeros a 0 y 150 grados cuya sobrevivencia de modelos en terminos numéricos es opuesta en ambos casos.

La tercera restricción fue considerar el número de variables o descriptores incluidos en los modelos. Aunque el número de variables utilizadas en modelos QSAR ha estado sujeta a discusión, si ha quedado claro que entre menos variables mejor el modelo. Esto atiende al principio de Ockham que establece que en condiciones de igualdad, al haber varias explicaciones la respuesta más sencilla es la más probable aunque no necesariamente la verdadera. Aunque este principio, también llamado de parsimonia, no es un principio irrefutable ni meramente científico, si representa una guía en la búsqueda de modelos teóricos. En QSAR, un modelo con pocos descriptores explica más fácilmente el fenómeno de la actividad que un modelo con demasiadas variables. Así mismo una gran cantidad de variables puede invalidar al modelo estadísticamente. De esta forma, se consideró rescatar únicamente modelos con tres variables considerando el principio de un máximo de 3 descriptores por cada cinco compuestos analizados que de manera

convencional aplica a este tipo de estudios. En la tabla 5, para el caso del estudio de confórmeros con ángulo de 30 que se ha venido tomando como referencia, los modelos de 38 al 43 poseen una cantidad superior a los 3 descriptores moleculares por lo que son descartados.

Tabla 5 Resultados parciales del estudio QSAR de la serie con ángulo 30° conformero alfa

Modelos correspondientes al ángulo diedro 30° de los confórmeros Alfa							
ID	Size	Modelos	R2	Q2	Q2boot	Kx	
38	4	SRW01 IDDE QYYm R3p+	93.61	86.67	66.64	34.81	
39	4	MWC01 IDDE QYYm R3p+	93.61	86.67	55.77	34.81	
40	4	nSK IDDE QYYm R3p+	93.61	86.67	69.18	34.81	
41	4	SRW02 IDDE QYYm R3p+	93.61	86.67	70.66	34.81	
43	4	ATS7e QYYm ISH R3p+	94.04	84.66	76.52	36.5	
44	3	X4 IDDE R3p+	90.19	81.47	78.78	24.67	
46	3	piID IDDE R3p+	87.89	79.8	73.81	35.62	

Con esta restricción se conservan únicamente 50 modelos en total: 26 alfa y 24 beta, es decir una reducción importante en cantidad pero además se aprecia que varios confórmeros no sobreviven y que donde más se conservan es en los compuestos alfa de los cuales los ángulos 240° y 300° tienen la mayor cantidad mientras que en los beta son los ángulos 90° y 270° (Figura 13).

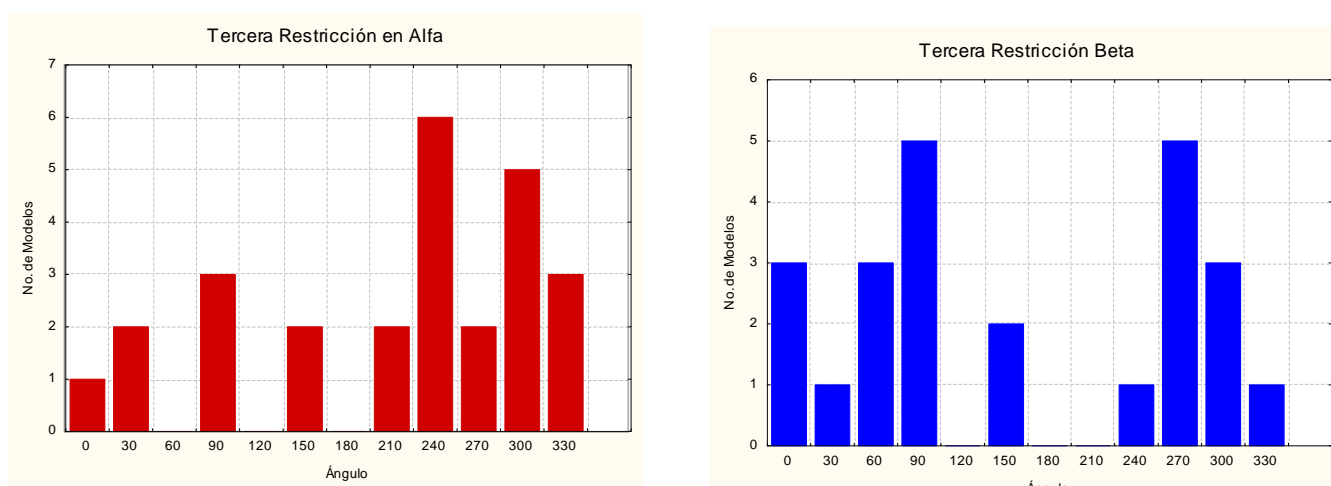


Figura 13 Tercera restricción de los modelos tanto beta como alfa

Los modelos restantes y sus parámetros estadísticos más importantes los podemos apreciar en las siguientes tablas.

Tabla 6 Modelos que aún se conservan después de la tercera restricción para los conformeros alfa.

MODELOS ALFA

Ángulo	Modelo	No. de Descriptores	Descriptores			R2	Q2	Q2boot
0	0-46	3	IDDE	Gm	HATS5m	88.61	79.79	77.27
30	30-44	3	X4	IDDE	R3p+	90.19	81.47	78.78
	30-46	3	piID	IDDE	R3p+	87.89	79.8	73.81
60	-	-	-	-	-	-	-	-
90	90-44	3	RDF045e	RDF075p	Mor06v	92.05	84.63	83.01
	90-45	3	RDF045e	RDF075p	Mor06p	90.69	83.16	78.71
	90-50	3	RDF075v	RDF045e	Mor06v	90.16	81.91	78.88
120	-	-	-	-	-	-	-	-
150	150-42	3	GATS6m	Mor06u	G3e	87.05	78.76	75.27
	150-45	3	G1p	Gs	R5m	81.77	74.94	59.51
180	-	-	-	-	-	-	-	-
210	210-47	3	Mor03u	G1m	R1p+	86.61	80.11	70.67
	210-48	3	Mor03u	G1m	RTp+	86.61	80.11	71.98
	240-44	3	ATS5m	GATS6m	G1u	85.77	78.24	70.7
240	240-45	3	IDDE	HATS1u	HATS5m	83.27	75.73	66.89
	240-46	3	IDDE	GATS6m	HATS5m	83.99	75.21	67.57
	240-47	3	IDDE	ESpm01x	R3p+	84.29	75.12	65.12
	240-48	3	IDDE	ATS5m	R3p+	82.53	74.77	63.71
	240-49	3	IDDE	ESpm02x	R3p+	83.38	74.59	62.93
	270-49	3	GATS6m	EEig05d	Mor32m	85.08	76.63	68.48
270	270-50	3	ATS5m	G3m	R4v+	88.22	76.03	74.04
	300-42	3	GGI4	RDF080v	R5m+	85.36	80.49	75.91
	300-44	3	piPC10	RDF080v	R5m+	85.4	77.74	73.69
	300-45	2	GGI4	R5m+	-	70.14	57.31	55.01
300	300-46	2	ATS3m	GATS6m	-	70.55	56.29	52.45
	300-47	2	ATS6m	GATS6m	-	69.19	55.87	52.78
	330-45	3	GATS6m	EEig05d	G1m	87.94	77.84	70.67
330	330-46	3	GGI4	G1p	Km	87.88	77.78	74
	330-47	3	DP03	RDF035p	G1p	87.65	77.68	62.41

Tabla 7 Modelos que aún se conservan después de la tercera restricción para los conformeros beta.

MODELOS BETA

Ángulo	Modelo	No. De Descriptores	Descriptores			R2	Q2	Q2boot
0	0-43	3	G1m	L3p	R7p+	93.7	89.48	88.05
	0-45	3	H3D	RDF055m	G1m	92.93	88.97	58.69
	0-46	3	ADDD	RDF055m	G1m	92.74	88.92	51.72
30	30-43	3	Mor13e	G2u	G1e	86.59	80.77	72.26
60	60-42	3	MATS2v	G1m	HATS5m	87	78.18	74.21
	60-43	3	BELv1	BEHp5	G1m	86.94	77.56	73.08
	60-44	3	ATS6e	Mor06u	R3p+	83.28	76.37	56.75
90	90-28	3	RDF040m	RDF075m	RDF065p	93.81	88.35	84.88
	90-43	3	RDF065p	Mor13u	Mor16m	91.34	86.45	81.25
	90-46	3	RDF075m	RDF040v	RDF065p	92.11	83.7	81.42
	90-48	3	RDF040m	RDF075m	RDF065v	91.81	81.27	75.26
	90-50	3	RDF075m	RDF040e	RDF065p	87.8	72.78	68.82
120	-	-	-	-	-	-	-	
150	150-47	2	BEHv7	Vm	-	73.92	62.95	57.49
	150-48	2	CIC5	ATS5m	-	68.44	53.4	53.48
180	-	-	-	-	-	-	-	
210	-	-	-	-	-	-	-	
240	240-45	3	Mor01v	G2v	HATS6u	92.83	88.89	78.57
270	270-43	3	GATS6m	GATS2p	EEig05d	84.56	74.08	66.32
	270-44	3	GATS6m	EEig05d	BEHm2	84.01	74.03	67.99
	270-45	3	piPC09	GATS6m	R3p+	81.05	72.62	63
	270-46	3	GATS6m	EEig05d	R3p+	81.77	71.7	54.28
	270-50	3	GATS6m	ESpm03r	BEHm2	80.02	68.96	55.26
300	300-16	3	GGI4	PJI3	G1m	92.1	86.24	83.57
	300-47	3	GATS6m	GATS2p	EEig05d	84.56	74.08	66.35
	300-48	3	GATS6m	EEig05d	BEHm2	84.01	74.03	63.32
330	330-45	2	ATS5m	PJI3	-	73.86	62.98	63.34

Aunque se aprecia cierta tendencia de sobrevivencia para ciertos isómero, aun no es posible explicar que conformero explica la actividad, por lo que se usó una última restricción que consistió en la capacidad predictiva. Cabe señalar que esta restricción es bastante estricta pues considera predecir la actividad de compuestos no incluidos en el estudio pero que, o bien se conoce su actividad o bien se puede probar y corroborarse. Usualmente se considera como una validación externa y prueba fehaciente de que el o los modelos propuestos son útiles. Para este caso, el resultado sería determinante pues de no existir capacidad predictiva en

ninguno de los modelos sobrevivientes el estudio podría caer. Los compuestos utilizados para este fin se muestran en la Figura 14.

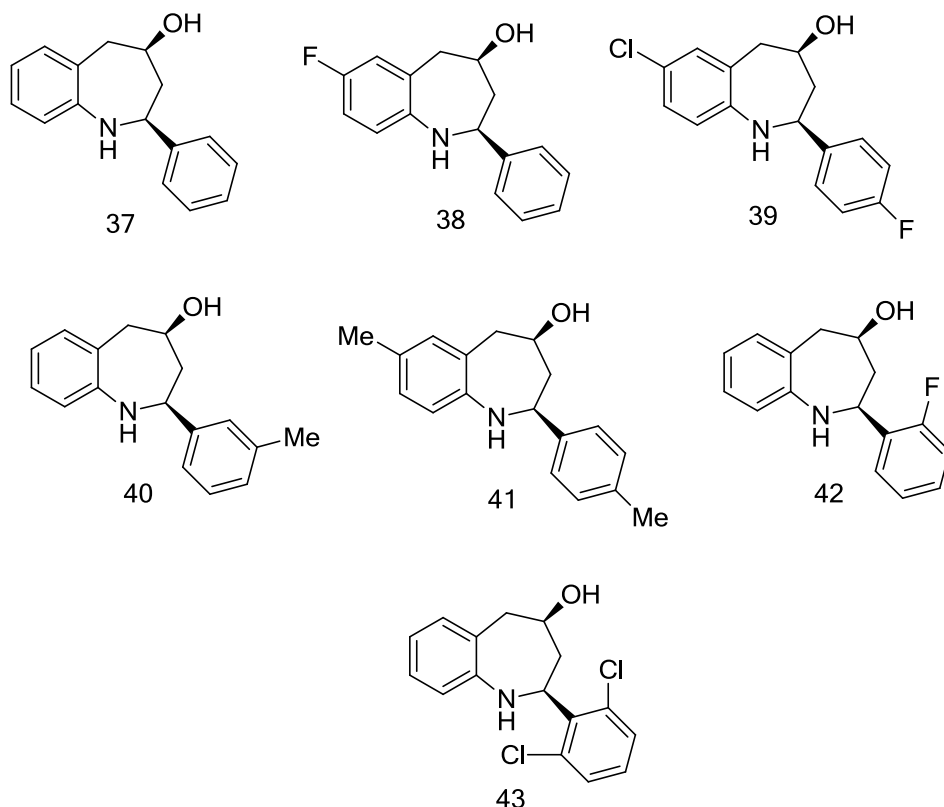


Figura 14 Serie de exploración para la capacidad predictiva.

La estrategia fue obtener la actividad teórica de cada compuesto y el resultado incluirlo en cada uno de los modelos obteniendo una serie de compuestos con mayor número de variables independientes. A estas nuevas series se les aplicó un análisis de regresión lineal y se obtuvo el coeficiente de correlación que indica la asociación lineal entre la actividad experimental y la predicha, esta función estadística se considera aceptable a partir de un valor 0.75. Igualmente se uso el valor de s (desviación estándar) que es una medida de dispersión que mide cuanto se separan los datos en medias distancias con respecto a su media aritmética. En las tablas 8 y 9 se resumen los resultados.

Tabla 8 Resultados de la capacidad predictiva de los modelos correspondientes a la configuración alfa.

Capacidad predictiva de los modelos correspondientes al conformero alfa							
Ángulo	Modelo	No. de Descriptores	Descriptores			R ²	s
0	0-46	3	IDDE	Gm	HATS5m	0.58	0.31
30	30-44	3	X4	IDDE	R3p+	0.31	0.31
	30-46	3	piID	IDDE	R3p+	0.48	0.32
90	90-44	3	RDF045e	RDF075p	Mor06v	0.10	0.76
	90-45	3	RDF045e	RDF075p	Mor06p	0.12	0.74
	90-50	3	RDF075v	RDF045e	Mor06v	0.09	0.76
150	150-42	3	GATS6m	Mor06u	G3e	0.28	0.32
	150-45	3	G1p	Gs	R5m	0.42	2.98
210	210-47	3	Mor03u	G1m	R1p+	0.17	0.52
	210-48	3	Mor03u	G1m	RTp+	0.17	0.52
240	240-44	3	ATS5m	GATS6m	G1u	0.11	0.29
	240-45	3	IDDE	HATS1u	HATS5m	0.00	0.4
	240-46	3	IDDE	GATS6m	HATS5m	0.50	0.29
	240-47	3	IDDE	ESpm01x	R3p+	0.20	0.33
	240-48	3	IDDE	ATS5m	R3p+	0.14	0.33
	240-49	3	IDDE	ESpm02x	R3p+	0.17	0.32
270	270-49	3	GATS6m	EEig05d	Mor32m	0.37	0.31
	270-50	3	ATS5m	G3m	R4v+	0.04	0.38
300	300-42	3	GGI4	RDF080v	R5m+	0.01	0.38
	300-44	3	piPC10	RDF080v	R5m+	0.01	0.4
	300-45	2	GGI4	R5m+	-	0.05	0.32
	300-46	2	ATS3m	GATS6m	-	0.00	0.28
330	300-47	2	ATS6m	GATS6m	-	0.01	0.28
	330-45	3	GATS6m	EEig05d	G1m	0.22	0.28
	330-46	3	GGI4	G1p	Km	0.17	0.33
	330-47	3	DP03	RDF035p	G1p	0.15	0.76

Tabla 9 Resultados de la capacidad predictiva de los modelos correspondientes a la configuración beta.

Capacidad predictiva de los modelos correspondientes al conformeros beta								
Ángulo	Modelo	No. De Descriptores	Descriptores			R ²	s	
0	0-43	3	G1m	L3p	R7p+	0.00	0.69	
	0-45	3	H3D	RDF055m	G1m	0.02	0.4	
	0-46	3	ADDD	RDF055m	G1m	0.04	0.39	
30	30-43	3	Mor13e	G2u	G1e	0.01	0.41	
60	60-42	3	MATS2v	G1m	HATS5m	0.00	0.34	
	60-43	3	BELv1	BEHp5	G1m	0.01	0.34	
	60-44	3	ATS6e	Mor06u	R3p+	0.00	0.34	
90	90-28	3	RDF040m	RDF075m	RDF065p	0.64	0.31	
	90-43	3	RDF065p	Mor13u	Mor16m	0.81	0.38	
	90-46	3	RDF075m	RDF040v	RDF065p	0.66	0.32	
	90-48	3	RDF040m	RDF075m	RDF065v	0.52	0.31	
	90-50	3	RDF075m	RDF040e	RDF065p	0.80	0.32	
150	150-47	2	BEHv7	Vm	-	0.39	0.34	
	150-48	2	CIC5	ATS5m	-	0.30	0.32	
240	240-45	3	Mor01v	G2v	HATS6u	0.01	0.5	
270	270-43	3	GATS6m	GATS2p	EEig05d	0.23	0.32	
	270-44	3	GATS6m	EEig05d	BEHm2	0.40	0.29	
	270-45	3	piPC09	GATS6m	R3p+	0.01	0.31	
	270-46	3	GATS6m	EEig05d	R3p+	0.09	0.3	
	270-50	3	GATS6m	ESpm03r	BEHm2	0.40	0.29	
300	300-16	3	GGI4	PJI3	G1m	0.12	0.38	
	300-47	3	GATS6m	GATS2p	EEig05d	0.23	0.32	
	300-48	3	GATS6m	EEig05d	BEHm2	0.40	0.29	
330	330-45	2	ATS5m	PJI3	-	0.06	0.33	

El resultado de modelos sobrevivientes después de aplicar la restricción predictiva se aprecia en la Figura 15. En el caso de los modelos de los compuestos beta cumplen sobreviven los modelos 50 y 43 y se observa que se encuentran en el ángulo 90°.

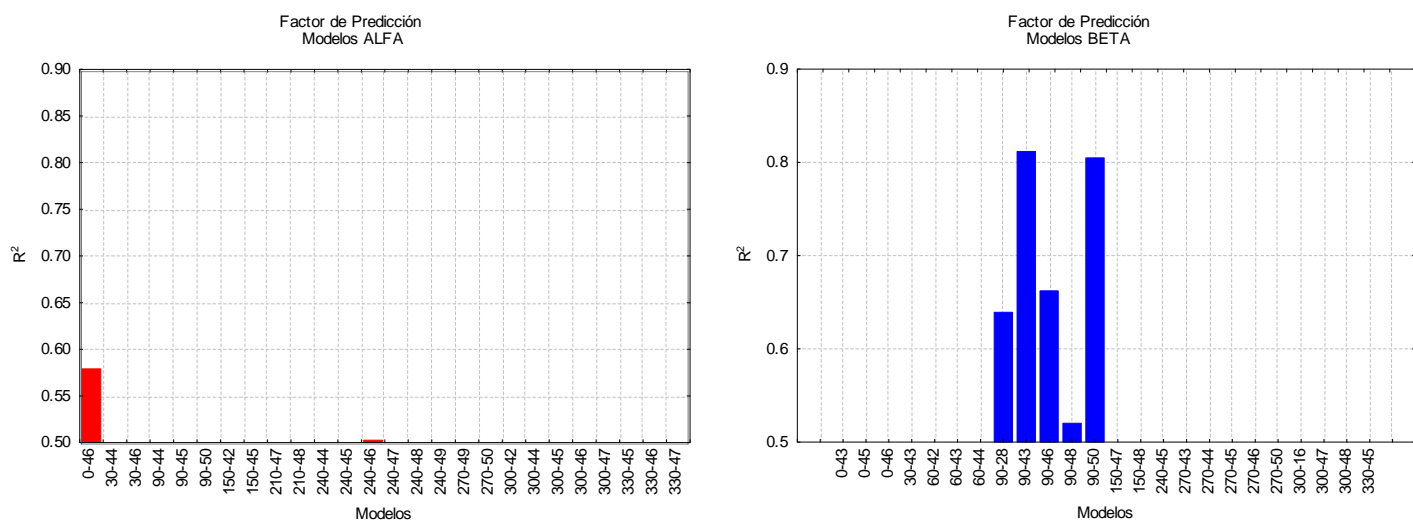


Figura 15 Cuarta restricción de los modelos tanto beta como alfa

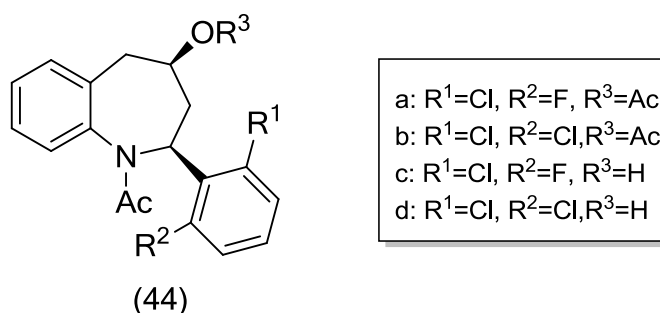
En este punto cabe mencionar que de acuerdo a todo el proceso estadístico la configuración y conformación activa teórica corresponde a la configuración beta y a una conformación de 90°. Esta suposición está fundamentada, claro está en un método específico de QSAR y considerando 1600 descriptores moleculares para cada compuesto.

Los descriptores que explican la actividad se resumen en la Tabla 10 y se aprecia que corresponden al grupo de descriptores Rándicos y Mor, los cuales son a su vez tridimensionales, lo que le da coherencia al resultado.

Tabla 10 Modelos finales correspondientes al ángulo 90° del conformero beta.

Ángulo	Modelo	No. De Descriptores	Descriptores	R ²	Q ²	Q ² boot
90	90-28	3	RDF040m RDF075m RDF065p	93.81	88.35	84.88
	90-43	3	RDF065p Mor13u Mor16m	91.34	86.45	81.25
	90-46	3	RDF075m RDF040v RDF065p	92.11	83.7	81.42
	90-48	3	RDF040m RDF075m RDF065v	91.81	81.27	75.26
	90-50	3	RDF075m RDF040e RDF065p	87.8	72.78	68.82

Debido a que, en principio, la conformación activa es en un ángulo diedro de 90 se propone entonces la obtención de compuestos sustituidos en el grupo amino que fueren, mediante impedimento estérico, la conformación adecuada. La propuesta sintética inmediata es acetilación del amino. Un primer reto, es la quimioselectividad pues en la estructura hay dos posibilidades de reacción nucleofílica y que claramente presentarán competencia entre sí: el grupo amino y el alcohol. Sin embargo, no sería problema la obtención de ambos compuestos pues serían útiles desde el punto de vista del rastreo o screenig. Independientemente de lo anterior se aplicaron los modelos QSAR para predecir la actividad en ambos casos (Figura 16).



Moléculas Propuestas por estudio QSAR

Modelo/Compuesto	Actividad calculada IC ₅₀			
	44a (ángulo 62.56°)	44b (ángulo 67.51°)	44c (ángulo 64.21°)	44d (ángulo 62.63°)
90-28	3.02	5.14	8.34	9.21
90-43	9.19	43.3	22.2	48.89
90-46	2.01	2.74	7.67	4.97
90-48	3.63	5.22	9.21	8.31
90-50	1.37	1.62	7.52	4.28

Figura 16 Compuestos propuestos y su actividad predicha

Como se parecía en la tabla anterior los compuestos presentarían actividad teóricamente y por lo tanto se consideró importante sintetizarlos. La estrategia de síntesis seleccionada, fue entonces, la reportada por el mismo grupo de Alirio Palma, ampliando la ruta con la respectiva acetilación (figura 17).

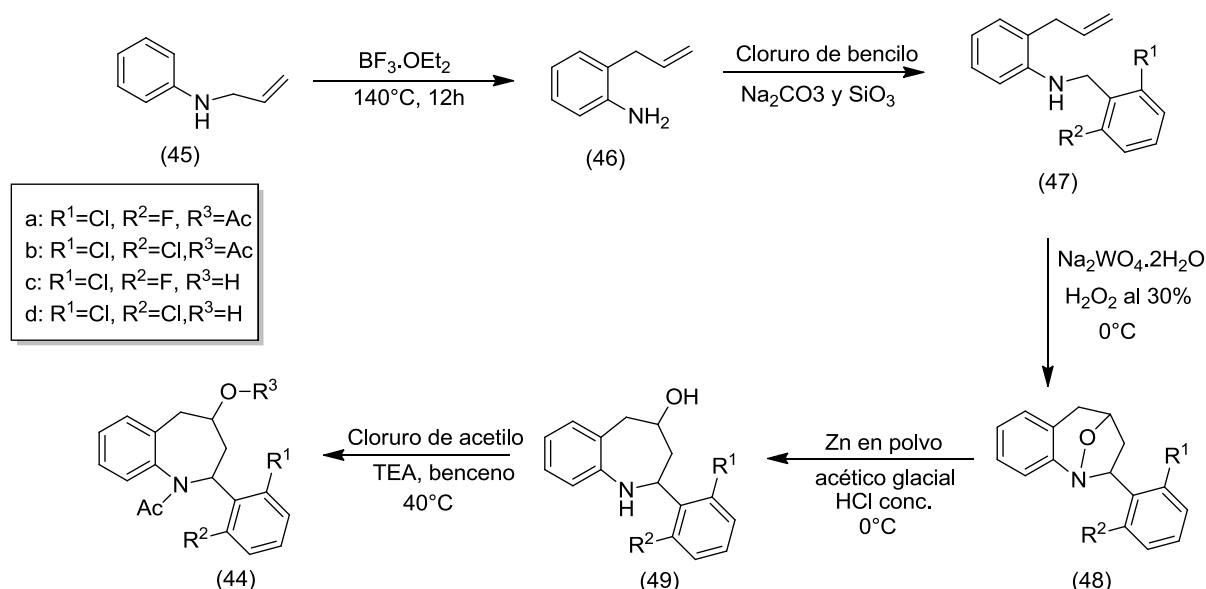


Figura 17 Ruta síntesis empleada para obtener los N,O-diacetil derivados de la cis-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzoacepina.

El primer paso del esquema sintético (Figura 17) consistió en la obtención de la orto-alilamina (46) a partir de de N-alililina (45), mediante una transposición amino-Claisen que está catalogada como una transposición sigmatrópica. Esta transposición es poco atractiva debido, principalmente, a las altas temperaturas de reacción necesarias (200-350 °C) Estas condiciones drásticas hacen que dichas aminas sufran descomposición térmica y reacciones colaterales. Por eso, la presencia de ácidos de Lewis o próticos (como HCl, H₂SO₄), promueven las transposiciones a temperaturas más moderadas. El complejo trifluoruro de boro dietil éter (BF₃·Et₂O) ha demostrado ser un eficiente catalizador para los reordenamientos amino-Claisen de diferentes N-alilaminas (45) aromáticas a las correspondientes 2-alilaminas (46) .

La N-alilnilina (**45**) se sometió a una transposición amino-*Claisen*, utilizando el BF₃·Et₂O y calentando la masa a 140° durante 12h, de esta manera se obtuvo orto-alilnilina (**46**) con un rendimiento de 33%

Obtenida la orto-alilnilina(**46**) se procede con el esquema haciendo una N-alquilación, realizada a cabo con agentes de bencilación, que fueron los cloruros de 6-cloro-2-fluorobencilo y 6,2-diclorobencilo, los cuales se hicieron reaccionar en fase solida sobre silica gel (SO₂) en presencia de Na₂CO₃ a temperatura ambiente con rendimientos entre 33.8-58%

Obtenidas las 2-Alil-N-bencilanilinas (**47**), el esquema sintético podemos apreciar que el paso siguiente será la oxidación o ciclo adición intramolecular 1,3-dipolar de éstas. Las 2-Alil-N-bencilanilinas (**47**) cumplen con los requerimientos estructurales necesarios para ser transformados en las nuevas 1,4-epoxitetrahydro-1-benzoazepinas. Poseen un grupo amino que puede ser fácilmente oxidado a su correspondiente nitrona y, además, un fragmento olefínico que puede actuar como un dipolarófilo y reaccionar con la nitrona en un proceso concertado conocido como cicloadición intramolecular 1,3-dipolar.

Una vez obtenidas las 2-Alil-N-bencilanilinas (**47**) se sometieron a un proceso de oxidación selectiva con peróxido de hidrógeno en la presencia de tungstato de sodio. En estas condiciones se generaron *in situ* las correspondientes nitronas, las cuales, después de ser eliminado el exceso de agente oxidante y el disolvente, se calentaron en un disolvente apropiado para inducir térmicamente la cicloadición 1,3-dipolar. Así se obtuvieron los cicloaductos o 2-*exo-aril-1,4-epoxi-2,3,4,5-tetrahydro-1-benzoacepinas* (**48**) con un rendimiento de 8.5-40.7%

El penúltimo paso es la apertura reductiva del enlace cabeza de puente -N-O- para la obtención de los compuestos *cis-2-*exo-aril-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahydro-1(1H)-benzoacepinas** (**49**). Dicha apertura se realizó utilizando como sistema de reducción, zinc en polvo en ácido acético glacial y ácido clorhídrico. De esta manera, se lograron transformar los cicloaductos, en sus correspondientes aminoalcoholes, con rendimientos de 70-97.7%

La acetilación de la *cis-2-exo-aril-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoacepinas (49)* se llevo a cabo con cloruro de acetilo con un equivalencia 1:3.5 respectivamente, esto debido a que se buscaba la acetilación tanto del grupo hidroxilo como de la amina, aun con el exceso de del cloruro de acetilo y llevándolo a calentamiento no se logro la completa acetilación de estos dos grupos, produciéndose un porcentaje considerable de *N-acetil-2-(6'-Cloro-2'-fluorofenil)-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoacepina **44c*** en un (26.9%) y *N-acetil-2-(6',2'-Diclorofenil)-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoacepina **44d*** en un (38.2%) . Este producto secundario no es indeseable ya que los estudios QSAR realizados (Figura ζ) con el objetivo de proponer las moléculas estos estaban considerados y aun que su actividad es un poco inferior, son de consideración.

El compuesto **44a** correspondiente a una doble acetilación presento señales en ^1H características a los grupos metilos (^1H NMR δ : 1.99 (s, $-\text{CH}_3$), 1.82 (s, $-\text{CH}_3$)) y en ^{13}C se puede apreciar las señales no solo de los metilos, también las señales pertenecientes a los carbonilos (^{13}C NMR δ : 171.4 (O=C), 170.3 (O=C), 23.4 ($-\text{CH}_3$), 21.2 ($-\text{CH}_3$)), lo que nos indica la presencia de ambos acetilos en la molécula algo que en el correspondiente subproducto **44c** el cual solo posee un juego de estas señales en ^1H (^1H NMR δ : 1.81 (s, $-\text{CH}_3$)) y ^{13}C (^{13}C NMR δ : 171.5 (O=C), 23.4 ($-\text{CH}_3$)) lo que indica que solo posee un acetilo.

De esta misma manera sucede para las molécula **44b** que posee en ^1H las señales de los metilos (^1H NMR δ : 2.0 (s, $-\text{CH}_3$), 1.86 (s, $-\text{CH}_3$)) y en ^{13}C las señales de los metilos y los carbonilos (^{13}C NMR δ : 172.1 (O=C), 170.4 (O=C), 23.7 ($-\text{CH}_3$), 21.2 ($-\text{CH}_3$)), para el subproducto **44d** sucede el mismo caso que para **44c**, ya que solo presenta un juego de señales en ^1H (^1H NMR δ : 1.85 (s, $-\text{CH}_3$)) y ^{13}C (^{13}C NMR δ : 172.2 (O=C), 23.7 ($-\text{CH}_3$)).

Con esto se determina la obtención tanto de los di-acetilados como los mono-acetilados.

5- PARTE EXPERIMENTAL

5.1.- MODELADO MOLECULAR

El Modelado molecular implica métodos teóricos y técnicas computacionales para imitar el comportamiento de una o varias moléculas. Para el presente trabajo se utilizó, el software Spartan '08 versión 1.2.0, utilizado para el modelado y análisis conformacional. Al realizar el modelado se tomaron datos estructurales de rayos X sobre las moléculas publicados en la literatura.

5.2- ANÁLISIS CONFORMACIONAL

Una vez modeladas las estructuras de las moléculas (1-30) en el software Spartan '08 se alineo el ángulo diedro a 0° grados como se muestra en la Figura 10 para lograr esto en Spartan, menú “Geometry” la opción “Measure Dihedral” después de seleccionar la opción, se procede a seleccionar los átomos numerados en la figura 18 con lo cual aparece un cuadro texto en la parte inferior derecha de Spartan etiqueta como “Dihedral (átomos seleccionados)” donde nos permitirá colocar el ángulo diedro deseado justo aquí colocaremos un ángulo de 0° realizado el cambio de ángulo se fija esté. Así conseguimos evitar que al hacer los cálculos cambie el ángulo.

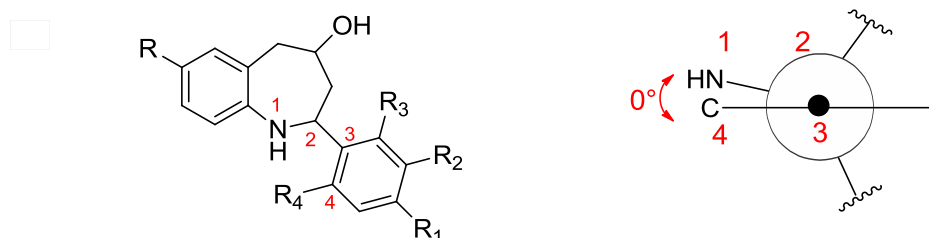


Figura 18 Alineamiento del ángulo diedro

Para conseguir fijarlo vamos al menú “Geometry” la opción “Constrain Dihedral” y proseguimos a seleccionar los mismos átomos que en el cambio de

ángulo y de igual forma aparecerá un cuadro de texto en la parte inferior derecha con la etiqueta “*Constrain (átomos seleccionados)*”, justo al cuadro texto se selecciono el icono con candado y en el cuadro de texto se muestra el ángulo al que se aseguro.

Ya aseguro se habrá de minimizar la energía para lo cual en el menú “*Build*” la opción “*Minimize*” una vez hecho no dirigimos al menú “*Setup*” la opción “*Calculations...*” y seleccionamos las siguiente configuración en la sección de “*Calculate*” en la primera opción “*Energy*” en la segunda “*Ground*” tercera “*Semi-Empirical*” y cuarta “*AM1*” (Figura 19), nos dirigimos al botón “*Submit*”. Terminados los cálculos vamos al menú “*Display*” en la opción “*Output*” donde nos muestra todos los resultados de los cálculos dentro de la cual se encentra la energía dato requerido para realizar el perfil de energía.

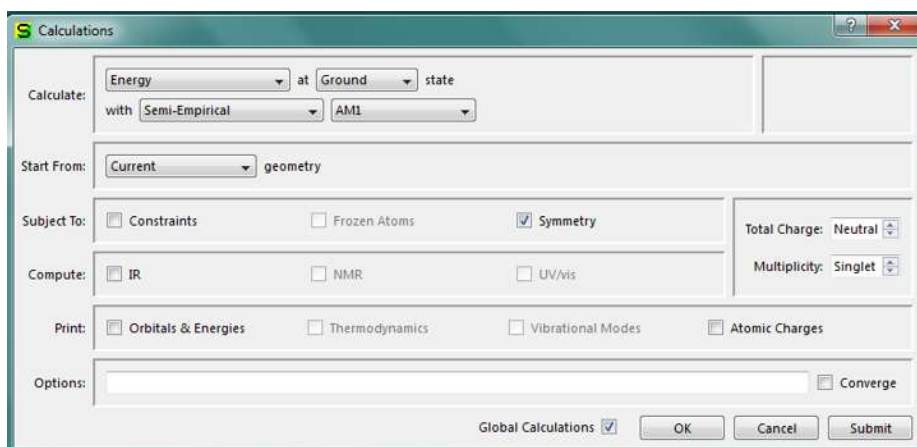


Figura 19 Configuración de los cálculos

Finalizando nos dirigimos al menú “*Geometry*” la opción “*Constrain Dihedral*” y proseguimos a seleccionar de nuevo los mismos átomos y selecciono el icono con candado con el cual se libera el ángulo y permite cambiarlo. Para finalizar guardamos la molécula en un archivo con extensión MOL2 para la compatibilidad con los posteriores software a utilizar.

Este proceso se repitió de igual manera para cada uno de los ángulos desde el ya descrito con un ángulo diedro de 0° como con los ángulos diedro de 30°, 60°, 90°, 120°, 150°, 180°, 210°, 240°, 270°, 300° y 330°.

5.3.- ESTUDIOS QSAR

Terminado el análisis conformacional, los archivos de cada uno de los compuestos son ordenados para obtener series del mismo ángulo, de los cuales se obtendrán los descriptores para posteriormente obtener los modelos de predicción mediante algoritmos genéticos.

5.3.1 DESCRIPTORES MOLECULARES

La obtención de los descriptores moleculares se realizara mediante el software Dragon versión 5.3 que es capaz de calcular 1664 descriptores moleculares divididos en 20 familias. Para realizar los cálculos de los descriptores moleculares una vez abierto el software nos dirigimos a la opción *“Calculate descriptors”* (Figura 20) donde seleccionamos la serie correspondiente.

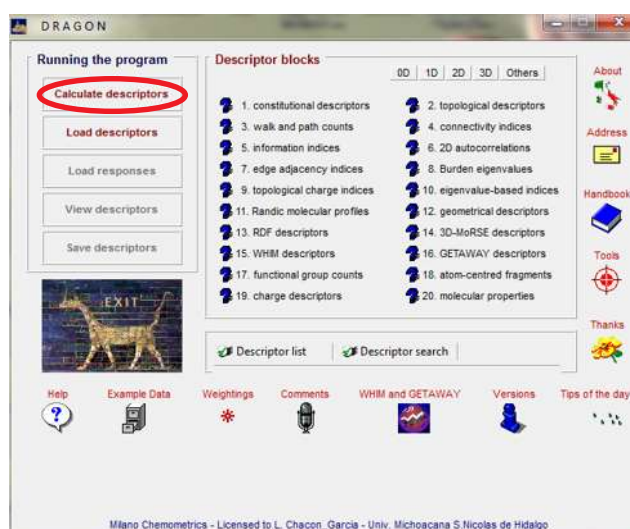


Figura 20 Cálculo de Descriptores Moleculares

Después dirigimos al botón *“OK”* lo cual nos abrirá una segunda ventana donde nos da la opción de elegir las familias de descriptores moléculas que se desean calcular, en esta ocasión se dejaron seleccionadas todas las familias y se presiona el botón *“RUN”* con lo que se calcularan los descriptores y una vez ha terminado el cálculo nos mostrara un mensaje con el numero de moléculas y

descriptores calculados, presionamos el botón “Continue...” Con lo que nos regresa a la pantalla principal del software donde en esta ocasión iremos a la opción de “Save Descriptors” (Figura 21)

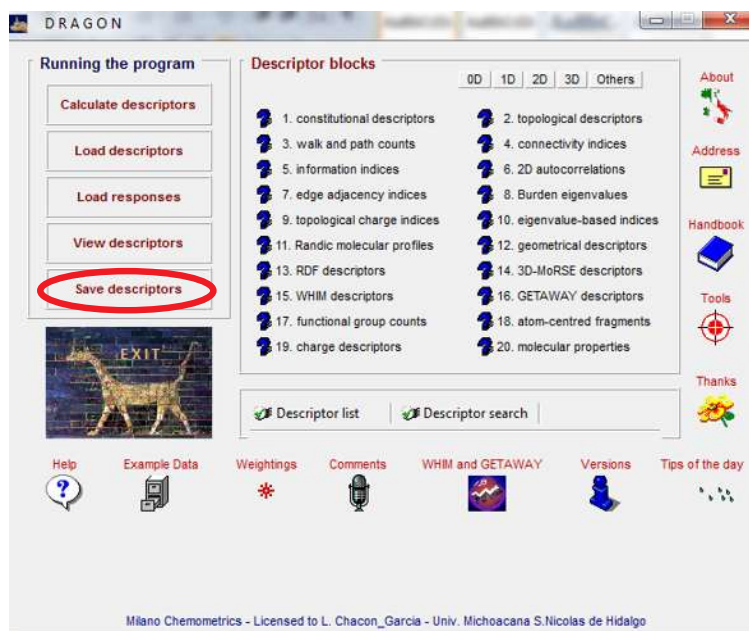


Figura 21 Salvar de Descriptores Moleculares

Nos abrirá una nueva ventana donde elegiremos las familias de descriptores a guardar, en este caso serán todas las familias, con lo que vamos al botón “Save” y elegimos donde guardar el archivo.

Este procedimiento será el mismo para cada serie de compuestos obtenidos del análisis conformacional, que corresponderán a los ángulos del mismo.

5.3.2 MODELOS

Los modelos son obtenidos mediante el software MobyDigs Academic versión 1.0 que funciona con base en algoritmos genéticos. Este software nos permitirá obtener los modelos. Para lo cual antes de iniciar habremos de modificar el archivo obtenido de Dragona al cual le agregaremos una columna más, correspondiente a la

actividad de cada una de los compuestos, esto se realiza de mejor manera copiando la información del archivo a una hoja de cálculo y agregando la columna que para fácil identificación llamaremos “Actividad” cuidando dar la actividad que le corresponda a cada molécula, una vez agregada copiamos la información y reemplazamos por la original guardando cambios.

Una vez abierto el software habrá que importar los descriptores que se calcularon en software Dragon. Para esto vamos al menú “File” a la opción “Import” donde deberemos seleccionar el archivo donde guardamos los descriptores, una vez seleccionado se abrirá una pantalla donde del proceso de importación como se muestra en la Figura 22 donde la opciones en “Tab” debe estar marcada en la sección de “Delimiter” y también marcada la opción de “Use multiple delimiter as one” para delimitar los datos tomados del archivo, presionamos el icono con la flecha verde.

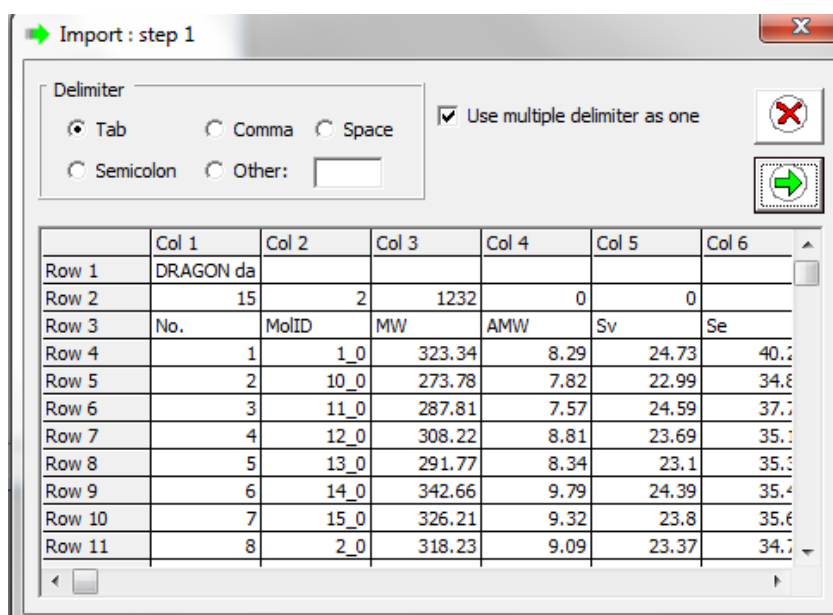


Figura 22 Importar archivo paso 1

Con lo que nos mandara al siguiente pasó de la importación donde podremos elegir a partir de que columna y fila se encuentran los datos interés (Figura 23). Por lo general siempre son la columna 2 y la fila 3, terminado el ajuste presionamos la flecha verde con lo que nos mostrara un mensaje para guardar el proyecto con lo que aceptamos y guardamos el correspondiente archivo, y mostrara una ventana

con los datos obtenidos que al cerrarla nos deja con la pantalla principal del programa que ya contiene una sub venta correspondiente al nuevo proyecto creado.

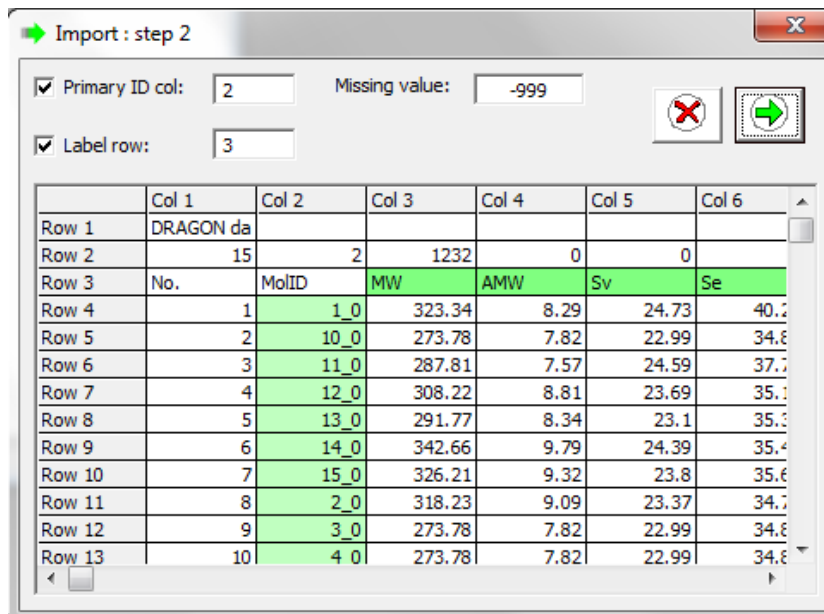


Figura 23 Importar archivo paso 2

A continuación nos dirigimos al menú *“Workset”* donde seleccionamos la opción *“Data setup”* lo cual nos abrirá una venta donde elegiremos el número de de descriptores por población para esto dividimos el número total de descriptores en 10 partes ya que el software no permite más de 10 poblaciones. Inicimos seleccionando los descriptores deseados que se encuentran en la pestaña *“Variables”* visible en la parte izquierda de la Figura 24 una vez seleccionados la cantidad presionamos el botón *“Set X in Pop 1”* con lo cual se agregaran a la población que podemos apreciar en la parte central de la venta en la sección *“Populations”* como se aprecia en figura 23, procedemos a agregar una población más con ayuda del botón *“Add new pop”* lo que creara otra población que esta seleccionada por defecto así que seleccionamos de nuevo los cantidad de descriptores y repetimos el procedimiento hasta asignar todos los descriptores. La última población tendrá una variación en la cantidad de descriptores.

Tener cuidado de no seleccionar la variable titulada *“Actividad”* que corresponde a la columna agregada. Esta será asignada en la sección derecha de la

venta llamada “No response selected” como se puede apreciar en la Figura 24 donde usaremos el botón “Set Y response” con lo que se asigna la actividad que será transformada y vamos a la opción “Y transform” y seleccionamos “-Log(1/Y)” que se la forma en que se maneja la actividad. Para finalizar presionamos el botón con la paloma verde.

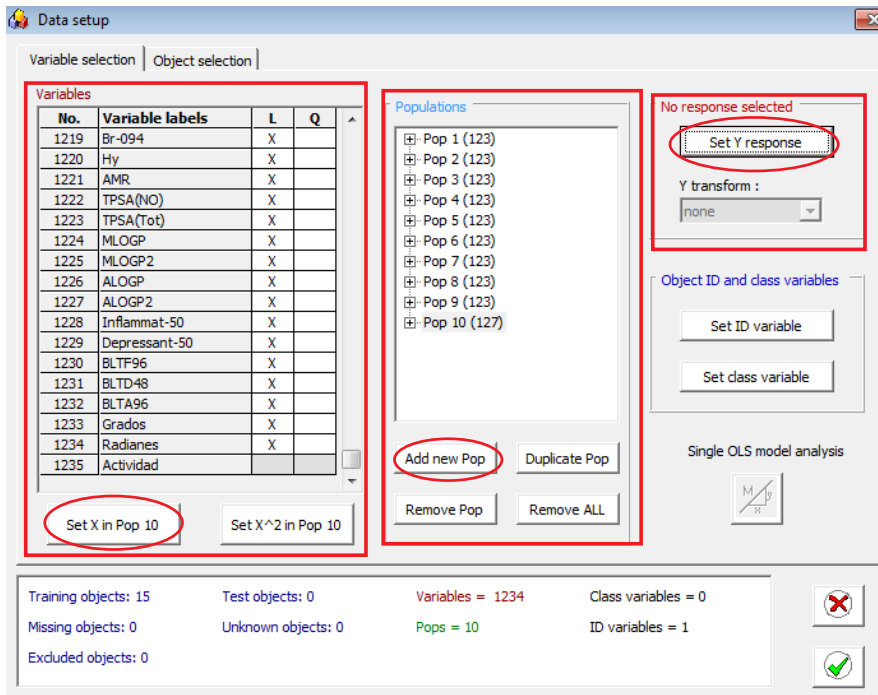


Figura 24 Configuración de datos

Con esto se cierra esta ventana y nos deja en la principal en la cual nos dirigimos al menú “Analysis” de ahí a “Genetic Algorithm” y por último la opción “New evolution” con lo que se abre una venta que nos muestra varios campos con datos por predeterminados por lo que editaremos los siguientes campos: “Population size” cambiaremos el valor a 100, “Reproduction / mutation trade-off (T)” donde cambiaremos el valor a 0.8. Realizados estos cambios vamos al botón en la parte inferior “Evolution Options” que nos abrirá una nueva ventana con opciones para configurar de igual modo serán editadas, en este caso solo modificaremos la opción “Increase maximum allowed variables every” a un valor de 50000 iter.

Para finalizar este presionamos el botón con la flecha verde con lo que se inicia la búsqueda de los modelos. Lo cual no hay que descuidar ya que se pueden

inactivar si esto llegara a pasar nos dirigimos a la columna “Active” y habrá que hacer un clic sobre la celda donde dice “no” hasta que cambie.

Esperaremos hasta que los modelos sean estables, esto quiere decir que no allá cambios al menos en los primeros 50 modelos. Para esto nos dirigimos a la pestaña “View POP individuals” donde podemos observar cada población de manera individual. Cuando se alcanza esta estabilidad proseguimos el botón con la flecha verde. Se cerrara esta ventana y abrirá una nueva donde seleccionaremos el numero de modelos que deseamos guardar de cada población seleccionando la opción “Best 10 models each POP containg any variable” como se observa en la Figura 25. Para finalizar con este paso simplemente presionamos el botón con la flecha verde con lo que se abrirá una venta dándonos información, es cerrada y procedemos a guardar los modelos obtenidos, vamos a menú “File” y escogemos la opción “Save reduce data” guardamos este archivo, cerramos el software. Nos dirigimos a la ubicación del archivo lo abrimos.

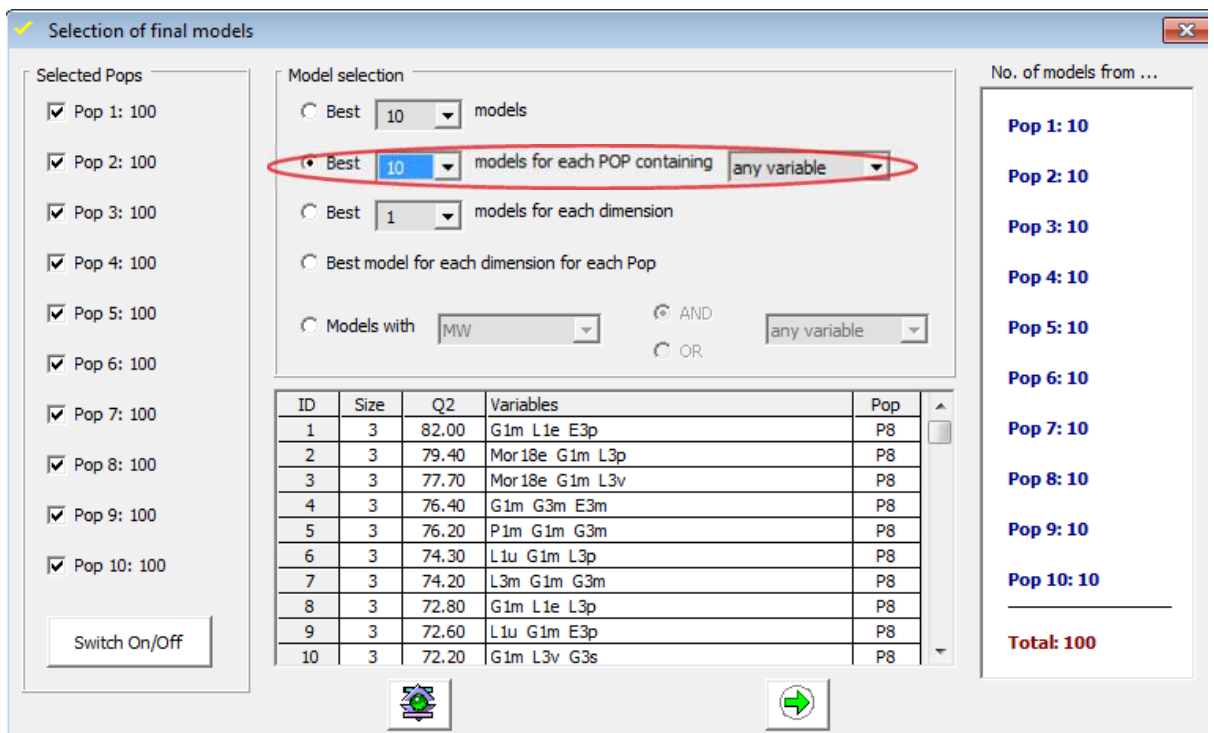


Figura 25 Selección de modelos

Nos abrirá la pantalla principal del software MobyDigs, donde nos dirigimos al menú *“Workset”* donde seleccionamos la opción *“Data setup”* abrirá una venta donde elegiremos los descriptores para una sola población por lo que seleccionaremos todos los descriptores en *“Variables”* una vez seleccionados la cantidad presionamos el botón *“Set X in Pop 1”* se agregaran a la población que podemos apreciar en la parte central de la venta en la sección *“Populations”*. Tener cuidado nuevamente de no seleccionar la variable titulada *“Actividad”* como ya se explico anterior mente. Esta será asignada en la sección derecha de la venta llamada *“No response selected”* donde usaremos el botón *“Set Y response”* con lo que se asigna la actividad que será transformada y vamos a la opción *“Y transform”* y seleccionamos *“-Log(1/Y)”* que se la forma en que se maneja la actividad. Para finalizar presionamos el botón con la paloma verde.

Nos deja en la ventana principal en la cual nos dirigimos al menú *“Analysis”* de ahí a *“Genetic Algorithm”* y por último la opción *“New evolution”* con lo que se abre una venta que nos muestra varios campos con datos por predeterminados por lo que editaremos los mismos campos que en la ocasión anterior: *“Population size”* cambiándolo a 100, *“Reproduction / mutation trade-off (T)”* lo cambiaremos a 0.8. Realizados estos cambios vamos al botón en la parte inferior *“Evolution Options”* que nos abrirá una nueva ventana con opciones para configurar de igual modo serán editadas, en este caso solo modificaremos la opción *“Increase maximum allowed variables every”* a un valor de 50000 iter.

Para finalizar este presionamos el botón con la flecha verde con lo que se inicia la búsqueda de los modelos. Lo cual no hay que descuidar ya que se pueden inactivar si esto llegara a pasar nos dirigimos a la columna *“Active”* y habrá que hacer un clic sobre la celda donde dice *“no”* hasta que cambie.

Esperaremos hasta que los modelos sean estables, esto quiere decir que no allá cambios al menos en los primeros 50 modelos. Para esto nos dirigimos a la pestaña *“View POP individuals”* donde podemos observar la población. Cuando se alcanza esta estabilidad proseguimos el botón con la flecha verde. Se cerrara esta ventana y abrirá una nueva donde seleccionaremos el numero de modelos que deseamos guardar de cada población seleccionando la opción *“Best 50 models”*

containing any variable”. Para finalizar con este paso simplemente presionamos el botón con la flecha verde con lo que se abrirá una venta dándonos información, es cerrada.

Procedemos hacer el análisis y validación menú “Analysis” y escogemos la opción “Model analysis and validation” lo que abrirá una nueva ventana que nos permite visualizar los datos estadísticos así como calcular otros que son necesarios como se puede observar en la Figura 25, para lo cual en la opción llamada “bootstrap” en la parte inferior de la ventana cambiamos el valor de 5000 a 6000 esto para hacer más riguroso el examen de los datos estadísticos una configurado procedemos al botón “Start bootstrap validation” con lo que se calcula la Q^2_{boot} ahora modificamos el valor de “Y scrambling iter” también en la parte inferior de la ventana a 400 y oprimimos el botón “Start y scrambling” con esto tenemos los datos estadísticos de los modelos los cuales guardaremos en un archivo por lo que oprimimos el botón el parte inferior izquierda con forma de disquete como se observa en la figura 26 lo que abrirá una nueva venta donde escogemos el nombre del archivo y de nuevo presionamos el icono de disquete con lo que seleccionamos la ubicación del archivo.

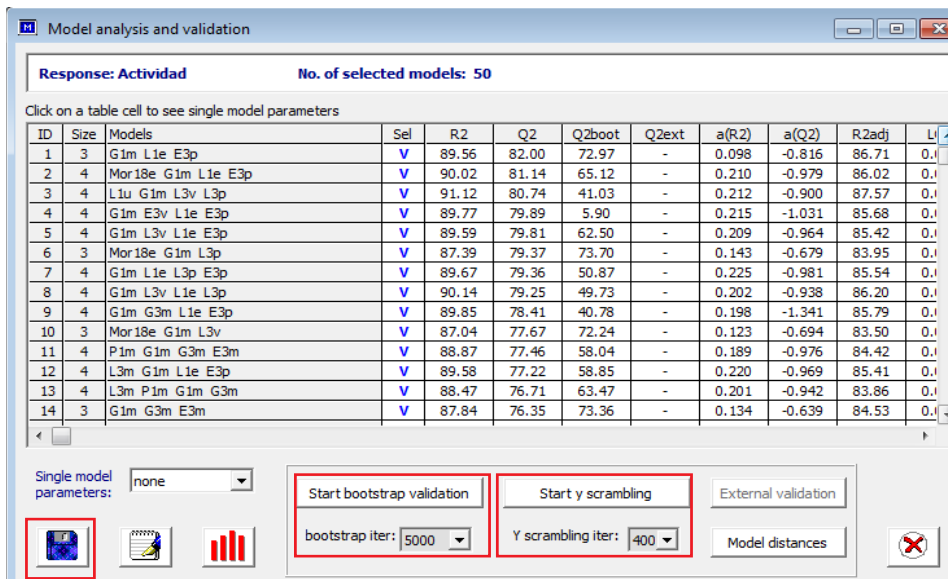


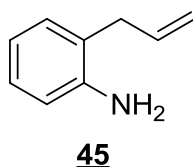
Figura 26 Análisis y validación de modelos

Para finalizar pasamos los modelos a una hoja de cálculo realizaremos regresiones lineales a cada modelo así como la correlación entre los descriptores de cada uno.

5.4.- PARTE EXPERIMENTAL

5.4.1 PREPARACIÓN DE LA 2-ALILANILINA 45

Figura 26. Estructura de las 2-alilanilina 1



Metodología

En los tubos del reactor se depositó la N-alilanilina 9.627g (72.28 mmol), la N-alilanilina se dividió de tal forma que en cada tubo del reactor quedara alrededor de 1g, donde se colocó el $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 12.819g (90.35 mol) en proporción molar: 1:1.25 amina:ácido; la mezcla se calentó a 140°C durante 12 h. Transcurrido el tiempo, la mezcla se llevó a temperatura ambiente, se trató con una solución saturada de Na_2CO_3 hasta neutralizar, luego se extrajo con cloroformo (3 X 50 ml). El extracto orgánico fue secado sobre Na_2SO_4 anhidro, el solvente se destiló a presión reducida y el residuo que quedó se purificó por cromatografía en columna sobre sílica gel, utilizando n-heptano hasta obtener la correspondiente 2-alilanalina 3.175g (33%)

5.4.2 PREPARACIÓN DE LAS 2-ALIL-N-BENCILANILINAS 46a,b

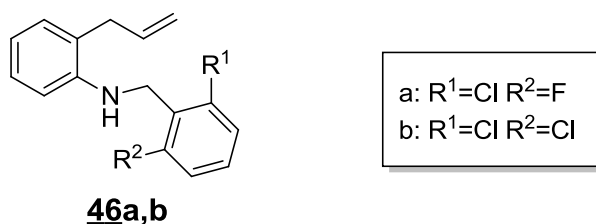


Figura 27 Estructura general de las 2-Alil-N-bencilanilinas 46a,b

Metodología

En un balón de fondo redondo de 250 mL se colocó la 2-alilanilina, Na_2CO_3 y SiO_2 neutro, se mezcló de forma vigorosa y se agregó lentamente un derivado del cloruro de bencilo 2,6-dihalógeno sustituido a temperatura ambiente, el avance de la reacción se monitoreó por TLC. Finalizada la reacción, la mezcla fue lavada con 150 mL de cloroformo y filtrada en un embudo Büchner, el solvente fue destilado y el crudo purificado por cromatografía en columna sobre sílica gel, utilizando como eluyente n-heptano.

2-Alil-N-(6'-cloro-2'-fluorofenil)anilina 46a. De 2.527g (18.97 mmol) de 45, 3.401g (18.97 mmol) de cloruro de 6-cloro-2-fluorobencilo, 2.01g (18.97 mmol) de Na_2CO_3 y 5g SiO_2 , después del correspondiente tratamiento, se obtuvo 1.764g (33.8%) del correspondiente 2a

2-Alil-N-(6',2'-diclorofenil)anilina 46b. De 1.541g (11.56 mmol) de 45, 2.26g (11.56 mmol) de cloruro de 6,2-diclorobencilo, 1.23g (11.56 mmol) de Na_2CO_3 y 5g SiO_2 , después del correspondiente tratamiento, se obtuvo 1.959g (58%) del correspondiente 46b

5.4.3 OXIDACIÓN DE LAS 2-ALIL-N-BENCILANILINAS 46a,b

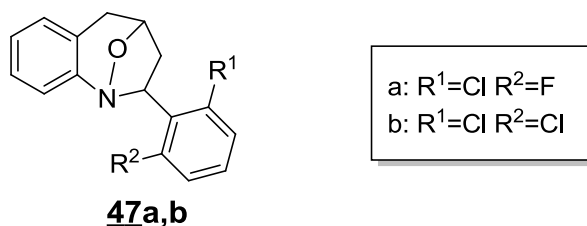


Figura 28 Estructura general de las 2-exo-aril-1,4-epoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1-benzoacepinas 47a,b

Metodología

En un balón de fondo redondo de 100 mL se deposita cantidades catalíticas de Na₂WO₄·2H₂O y H₂O₂ al 30% donde se adiciona gota a gota la 2-alil-N-bencilanilina disuelta en metanol-nitrometano con agitación vigorosa a 0 °C; después de la adición se dejó en agitación vigorosa a temperatura ambiente hasta que el producto de partida se consumió. Concluida la reacción, la mezcla fue vertida sobre agua y luego se realizó una extracción con acetato de etilo (2 X 50 mL); la fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y el solvente destilado a presión reducida. EL crudo de reacción fue disuelto en 20 mL de acetato de etilo y la solución calentada a 50-70 °C durante 10-24 h, después de las cuales el solvente fue destilado a presión reducida, y el residuo orgánico purificado por cromatografía en columna sobre sílica gel (n-heptano/acetato de etilo, 80:1, 50:1), para obtener los correspondientes productos de cicloadición.

2-exo-(6'-Cloro-2'-fluorofenil)-1,4-epoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1-benzoacepina 47a. De 1.764g (6.402 mmol) de 46a, 1.94 mL (1.92 mmol) de H₂O₂ (30%), 0.211 g (0.64mmol) de Na₂WO₄ en 20 mL de metanol y después de 127 h de agitación a temperatura ambiente, se obtuvo un residuo orgánico resinoso que fue disuelto en acetato de etilo y calentado durante 24 h a 50°C. Después de la purificación se obtuvo 0.158g (8.5%) de un sólido blanco del correspondiente 47a

2-exo-(6',2'-Diclorofenil)-1,4-epoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1-benzoacepina 47b. De 1.959 g (6.7 mmol) de 46b, 3.05 mL (30.19 mmol) de H₂O₂ (30%), 0.221g (0.67 mmol) de Na₂WO₄ en 20 mL de metanol, 24 mL de acetona, 2 mL de nitrometano y después de 76 h de agitación a temperatura ambiente, se obtuvo un residuo

orgánico resinoso que fue disuelto en acetato de etilo y calentado durante 10 h a 70°C. Después de la purificación se obtuvo 0.834g (40.7%) de un sólido blanco del correspondiente **47b**

5.4.4 APERTURA REDUCTIVA DE LOS 1,4-EPOXI-CICLOADUCTOS **47a,b**

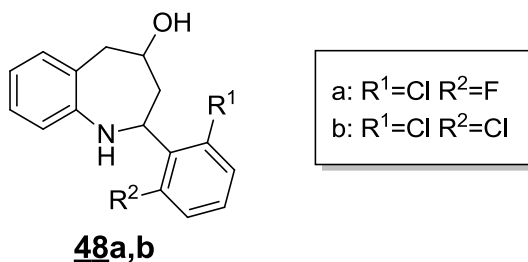


Figura 29 Estructura general de las *cis*-2-*exo*-aril-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoacepinas **48a,b**

Metodología

En un balón de fondo redondo de 100 mL se colocó el correspondiente cicloaducto disuelto en metanol-diclorometano, se adicionó el cinc en polvo e inmediatamente se agregó el ácido acético glacial seguido del ácido clorhídrico a 0°C, la mezcla se dejó reaccionar hasta que se consumiera el producto de partida, al terminar la reacción se trató con NH₄OH hasta un pH 7-8 y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL); el extracto fue secado sobre Na₂SO₄ anhidro. El solvente fue destilado a presión reducida y el residuo orgánico purificado por cromatografía en columna sobre sílica gel (n-heptano/acetato de etilo 20:1, 10:1, 5:1, 2:1), para obtener los correspondientes amino-alcoholes.

***cis*-2-(6'-Cloro-2'-fluorofenil)-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoacepina **48a**.** De .118g (0.4 mmol) del **47a**, g (mmol) de cinc en polvo en una mezcla de 30 mL metanol, 0.326mL (5.7 mmol) de ácido acético glacial y 0.472mL (5.7 mmol) de ácido clorhídrico al 37%, y después de 30 min en agitación se obtuvo .082g (70%) de un sólido marrón pálido del correspondiente **48a**

***cis*-2-(6',2'-Diclorofenil)-4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoacepina **48b**.** De 0.6g (1.96 mmol) del **47b**, 0.532g (8.15 mmol) de cinc en polvo en una mezcla 50 mL metanol, 18 mL de diclorometano, 1.57mL (27.4 mmol) de ácido acético glacial y 2.27mL (27.4mmol) de ácido clorhídrico al 37%, y después de 30

min en agitación se obtuvo .59g (97.7%) de un sólido marrón pálido del correspondiente **48b**

5.4.5 ACETILACIÓN DE LOS 4-HIDROXI-2,3,4,5-TETRAHIDRO-1(1H)-BENZOACEPINA **48a,b**

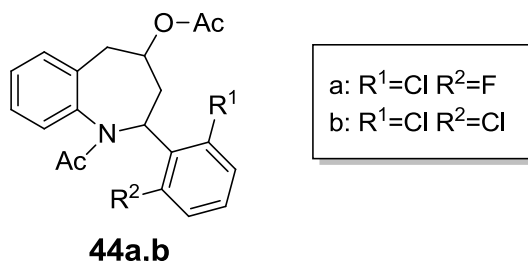


Figura 30 Estructura general de las cis-N,O-diacetil-2-exo-aryl-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoacepinas **44a,b**

Metodología

En un balón de fondo redondo de 100 mL de tres bocas conectado a un condensador, se colocó el correspondiente amino-alcohol disuelto en benceno bajo atmósfera inerte, se adicionó trietilamina después de la cual se agregó lentamente el cloruro de acetilo disuelto en 1 mL de benceno, la mezcla se calentó a 40°C la reacción se monitorió por TLC al terminar la reacción se trató con NH₄OH hasta un pH 7-8 y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL); el extracto fue secado sobre Na₂SO₄ anhidro. El solvente fue destilado a presión reducida y el residuo orgánico purificado por cromatografía en columna sobre sílica gel (n-heptano/acetato de etilo 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), para obtener los correspondientes compuestos acetilados.

N,O-diacetil-2-(6'-Cloro-2'-fluorofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoacepina 44a. De 0.091g (0.312mmol) de **48a**, en una mezcla de 0.13mL (0.936mmol) de trietilamina, 0.077mL (1.09 mmol) de cloruro de acetilo y 10mL de benceno, bajo atmósfera inerte y después de 8h en agitación y calentamiento se obtuvo 0.047g (40.1%) de un sólido blanco correspondiente **44a**. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.40 (td, J= 7.4, 1.6 Hz, 8-H), 7.35 (td, J= 7.4, 1.6 Hz, 7-H), 7.32 (dd, J= 7.4, 1.6 Hz, 9-H), 7.25 (dd, J= 7.6, 1.6 Hz, 6-H) 7.20-7.17 (m, 3'-H), 7.12 (td, J= 8.2, 5.8 Hz, 4'-H), 6.9 (ddd, J= 10.5, 8.2, 1.2 Hz, 5'-H), 5.76 (dt, J= 13.2, 2 Hz, 2-H), 5.31-5.26 (m, 4-H), 3.06 (dd, J= 14.8, 5.4 Hz, 5-H_{ax}), 2.81(d a., J= 14.8 Hz, 5-H_{eq}), 2.06 (dd a., J= 13.6, 6.0 Hz, 3-H_{eq}), 1.99 (s, -CH₃), 1.83 (td, J=13.6, 10.4 Hz, 3-H_{ax}), 1.82 (s, -CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ: 171.4 (O=C-N), 170.3 (O=C-O), 161.0 (d,

J= 249.5 Hz, 2'-C), 139.4 (9_a-C), 134.4 (d, J= 7.5 Hz, 6'-C), 133.6 (5_a-C), 130.4 (d, J= 7.1 Hz, 9-C), 129.9 (6-C), 128.5 (d, J= 9.7 Hz, 3'-C), 128.2 (d, J= 16.6 Hz, 1'-C), 128.2 (7-C), 127.7 (8-C), 125.7 (d, J= 3.1 Hz, 4'-C), 114.8 (d, J= 22.8 Hz, 5'-C), 69.3 (4-C), 52.9 (2-C), 35.8 (5-C), 32.1 (3-C), 21.2 (-CH₃), 23.4 (-CH₃).

N,O-diacetil-2-(6',2'-Diclorofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1(1H)-benzoacepina

44b. De 0.15g (0.487mmol) de **48b**, en una mezcla de 0.203 mL (1.461mmol) de trietilamina, 0.133mL(1.705mmol) de cloruro de acetilo y 10mL de benceno, bajo atmosfera inerte y después de 19h en agitación y calentamiento se obtuvo 0.085g (44.6%) de un sólido blanco correspondiente a **44b**. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.47 (dd, J= 8.0, 1.2 Hz, 9-H), 7.38 (td, J= 7.6, 1.6 Hz, 8-H), 7.37 (dd, J= 7.6, 2.0 Hz, 3'-H), 7.33 (td, J= 7.4, 1.4 Hz, 7-H), 7.23 (dd, J= 7.6, 1.6 Hz, 6-H), 7.20 (s ancho, 5'-H), 7.07 (t, J= 8.0 Hz, 4'-H), 5.92 (dd, J= 12.8, 1.2 Hz, 2-H) 5.3 (dddd, J= 10.0, 6.4, 5.0, 1.2 Hz, 4-H), 3.06 (dd, J= 14.8, 5.0 Hz, 5-H_{ax}), 2.82 (d ancho, J= 14.8 Hz, 5-H_{eq}), 2.16 (ddd, J= 14.6, 12.8, 10.0 Hz, 3-H_{ax}), 2.04- 1.0 (m, 3-H_{eq}), 2.0 (s, -CH₃), 1.86 (s, -CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 172.1 (O=C-N), 170.4 (O=C-O), 139.8 (9_a-C), 137.7 (1'-C), 136.0 (2'-C), 133.5 (5_a-C), 132.4 (6'-C), 131.6 (9-C), 130.1 (6-C), 129.6 (5'-C), 128.7 (3'-C) 128.3 (4'-C), 127.8 (5-C), 127.3 (8-C), 69.8 (4-C), 55.7 (2-C), 35.8 (5-C), 30.9 (3-C), 23.7 (-CH₃), 21.2 (-CH₃).

Bibliografía

1. **Tishkoff, S. A., A. J. Pakstis, M. Stoneking, J. R. Kidd, G. Destro-Bisol, A. Sanjantila, R. B. Lu, A. S. Deinard, G. Sirugo, T. Jenkins, K. K. Kidd, and A. G. Clark.** 2001. Short tandem-repeat polymorphism/alu haplotype variation at the PLAT locus: implications for modern human origins. *Am. J. Hum. Genet.* **67**:901–925.
2. **Desportes, I., Y. Le Charpentier, A. Galian, F. Bernard, B. Cochand-Priollet, A. Lavergne, P. Ravisse and R. Modigliani.** 1985. Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n.sp. in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.* **23**:250–254.
3. **Ambroise-Thomas, P.** 2001. Parasitic diseases and immunodeficiencies. *Parasitology* **122**(Suppl.):s65–s71.
4. **Goncalves ML, Araujo A, Ferreira LF** (2003) Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**(suppl 1):103–118
5. **Callahan GN** (2003) Eating dirt. *Emerg Infect Dis* **9**(8):1016–1021
6. **F. E. G. Cox** (2002) *History of Human Parasitology*. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**(4):595.
7. **Wiser MF** (2011) *Protozoa and Human disease*. New York: Garland Science. 218 p.
8. **Prole DL, Taylor CW** (2011) Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites. *PLoS One* **6**(10): e26218.
9. **Rothammer, F., M. Allison, L. Núñez, V. Standen, and B. Arriaza.** 1985. Chagas disease in pre-Colombian South America. *Am. J. Phys. Anthropol.* **68**:355–356.
10. **Guhl, F., C. Jaramillo, R. Yockteng, G. A. Vallejo, and F. Cardenas-Arroyo.** 1997. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. *Lancet* **349**:1370.
11. **Chagas, C.** 1909. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre e morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp. agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1**:159–218.
12. **Kean, B. H., K. E. Mott, and A. J. Russell (ed.).** 1978. *Tropical medicine and parasitology: classic investigations*. Cornell University Press, Ithaca, N.Y.
13. **Chagas, C.** 1911. Nova entidade morbida do homem. Rezumo geral de estudos etiologicos e clinicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **3**:276–294.

14. **Chagas, C.** 1912. Sobre un trypanosomo do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pela *Triatoma geniculata* Latr. 1811. Possibilidade do ser o tatu um depositario do Trypanosoma cruzi no mundo exterior. Bras. Med. **26**:305–306.

15. **Brumpt, E.** 1912. Le *Trypanosoma cruzi* e´ volue´ chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularis*, *Cimex boueti*, *Ornithodoros moubata*. Cycle e´volutif de ce parasite. Bull. Soc. Pathol. Exot. **5**:360–367.

16. **Koberle, F.** 1968. Chagas' disease and Chagas' disease syndrome: the pathology of American trypanosomiasis. Adv. Parasitol. **6**:63–116.

17. **Todd A Minning, D Brent Weatherly, James Atwood III, Ron Orlando and Rick L Tarleton** (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics **10**:370

18. **Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA** (2010) Chagas disease. Lancet **375**: 1388–1402.

19. **Bern C, Montgomery SP** (2009) An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. Clin Infect Dis **49**: e52–54.

20. **Nagarapu, L. and Rao, N. V.** (2002) *Ind. J. Chem. Sect. B*, **41**, 1086.

21. **Hoyt, S. B.; London, C.; Gorin, D.; Wyvratt, M.; Fisher, M. H.; Abbadie, C.; Felix, J. P.; Garcia, M. L.; Li, X.; Lyons, K.; McGowan, E.; MacIntyre, E.; Martin, W.; Priest, B. T.; Ritter, A.; Smith, M.; Warren, V.; Williams, B.; Kaczorowski, G. J. and Parsons, W. H.** (2007), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 4630.

22. **Williams, B. S.; Felix, J. P.; Priest, B. T.; Brochu, R. M.; Dai, K.; Hoyt, S. B.; London, C.; Tang, Y. S.; Duffy, J. L.; Parsons, W. H.; Kaczorowski, G. J. and Garcia, M. L.** (2007) *Biochemistry*, **46**, 14693.

23. **Zhao, H.; Zhang, X.; Hodgetts, K.; Thurkauf, A.; Hammer, J.; Chandrasekhar, J.; Kieltyka, A.; Brodbeck, R.; Rachwal, A.; Primus, R. and Manly, C.** (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 701.

24. **Zuccotto, F.; Zvelebil, M.; Brun, R.; Chowdhury, S. F.; Di Lucrezia, R.; Leal, I.; Maes, L.; Ruiz-Perez, L. M.; Pacanowska, D. G. and Gilbert, I. H.** (2001) *Eur. J. Med. Chem.*, **36**, 395.

25. **Barsky, L. I. and Bencze, W. L.** (1971) *J. Med. Chem.*, **1971**, **14**, 40. ?

26. **Yepes Pérez, A. F.** *Estudio del potencial sintético de las β -alil- α -naftilamina N-sustituidas y las N-(2-alilbencilsustituido)anilinas en la construcción de los sistemas heterocíclicos de la nafto[1,2-b]azepina y la dibenzo[b,e]azepina.* Bucaramanga, **2007**. Tesis de maestría. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Laboratorio de Síntesis Orgánica.
27. **Escobar, P.; Leal, S. M.; Coronado, C. A.; Gómez, S. L. and Palma, A.** XI Congreso nacional de farmacología y terapéutica. I Congreso internacional de farmacología. Bucaramanga, **2007**.
28. **M. Pastor; J. Alvarez Builla;** *Técnicas QSAR en el diseño de fármacos;* Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia; Monografía I. Diseño de medicamentos.