



**SÍNTESIS DE UN NUEVO INHIBIDOR DE LA ENZIMA
EPÓXIDO HIDROLASA SOLUBLE (SEH), DISEÑADO *In
silico* POR MEDIO DE QSAR Y MODELAMIENTO
MOLECULAR, COMO CANDIDATO TEÓRICO PARA EL
TRATAMIENTO DEL ALZHEIMER**

María Fernanda Salazar Romero, Juan Esteban Sánchez Correa

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica

Bogotá DC. – Abril, 2022



**SÍNTESIS DE UN NUEVO INHIBIDOR DE LA ENZIMA
EPÓXIDO HIDROLASA SOLUBLE (SEH), DISEÑADO *In
silico* POR MEDIO DE QSAR Y MODELAMIENTO
MOLECULAR, COMO CANDIDATO TEÓRICO PARA EL
TRATAMIENTO DEL ALZHEIMER**

María Fernanda Salazar Romero, Juan Esteban Sánchez Correa

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Químico Farmacéutico

Director(es): M.Sc Jhon Alex González Amaya,

Línea de investigación en Drug Discovery

Grupo de Investigación en Química Aplicada INQA

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica

Bogotá DC. – Abril, 2022.

Hoja de identificación

Título:	Síntesis de un nuevo inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa soluble (sEH), diseñado <i>In silico</i> por medio de QSAR y modelamiento molecular, como candidato teórico para el tratamiento del Alzheimer.
Grupo de investigación:	Grupo de Investigación en Química Aplicada INQA
Línea de Investigación:	Drug Discovery
Institución (es) Participante (s):	Universidad El Bosque
Tipo de Investigación:	Aplicada
Estudiantes:	Maria Fernanda Salazar Romero Juan Esteban Sánchez Correa
Director:	Jhon Alex González Amaya
Asesoría	Liliana Marcela Becerra Figueroa

Dedicatoria o lema

“A mi gato, por acompañarme incondicionalmente a hacer ciencia durante más de 15 meses”

-María.

“Aquel que posee mucha sabiduría y conocimiento es grandemente privilegiado, pero aquel que comparte su conocimiento a los demás sin envidia y con generosidad no solo es privilegiado con inteligencia, sino también con humanidad.”

-María.

“La ciencia para mí, es la octava bella arte”

-María.

“Debemos tener perseverancia y sobre todo confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado”

-Maria Skłodowska

Agradecimientos

“A todos los docentes que pasaron por mi camino y forjaron en mí todo el conocimiento que hoy hace este proyecto posible. A todos los profesores que me acompañaron en mi camino de aprendizaje de manera paciente y me enseñaron desde el corazón. A nuestro tutor, Jhon, por su extenso y continuo apoyo durante todo ese proceso, por compartirnos todo su conocimiento, no sólo por guiarnos y acompañarnos a desarrollar nuestra idea, sino además defenderla y hacer posible todo lo que ya logramos. A mi abuelita, por sus tazas de café y cobijas en las madrugadas de trabajo, a mi tía por su apoyo incondicional, a mis padres y mi abuelo por sus palabras de aliento y orgullo, a Cosmo por cuidarme y desvelarse conmigo una y otra vez hasta que me fuera a la cama. A Ronald Cardenas por compartirnos su valioso conocimiento sin ninguna obligación, que hizo posible muchos de los alcances de este trabajo, le agradezco su generosidad y paciencia. A la profesora Liliana, por su guía y enseñanza, y su disposición a contribuir al desarrollo del proyecto. A mi compañero de tesis, por ser siempre un gran apoyo y gran ancla, por ser una pieza fundamental en esto, por su paciencia, su entusiasmo, su trabajo en equipo, por brindarme calma y trazarme un rumbo. Y finalmente a Dios, por permitirme alcanzar lo que me propuse, por darme paciencia y sabiduría para desarrollar este gran reto, por nunca dejarme desfallecer y darme todos los privilegios necesarios para alcanzar todo lo que alcanzo hoy, y a mí, por el esfuerzo, por el trabajo duro, por nunca rendirme y entregarme a lo que amo.”

-María Fernanda.

"Agradezco a Dios porque ha sido mi guía en este camino. A todas las personas que nos acompañaron en este largo proceso, a mi familia que jamás dejaron de apoyarme y brindarme su mano en todo aquello que fuera posible. A nuestro tutor el cual siempre estuvo para nosotros, para guiarnos y respondernos cualquier duda, para comprendernos con nuestros tiempos y nuestras dificultades, trabajar de la mano del profesor Jhon Alex fue una de las mejores decisiones que pudimos tomar en estos años de carrera profesional. A la profesora Liliana por brindarnos su conocimiento sintético en este tipo de reacciones y por aconsejarnos en el desarrollo de nuestra ruta sintética. A todos los factores externos que me brindaron alegrías para salir adelante, a mi Chelsea FC y Millonarios FC que sin saberlo siempre alegraron mis tardes de trabajo y ponían una sonrisa en mi vida para continuar. Y finalmente a mi compañera de trabajo quien durante toda la carrera ha sido consejera, alegre, centrada y comprensiva para podernos entender perfectamente en el desarrollo de este trabajo de grado, sin ella nada de esto sería posible, no tengo palabras para agradecer su trabajo."

-Juan Esteban

Tabla de contenido

1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	2
3. Planteamiento del Problema.....	8
4. Pregunta de Investigación.....	9
5. Objetivos.....	9
5.1. Objetivo general del anteproyecto.....	9
5.2. Objetivos específicos.....	9
6. Metodología.....	10
6.1. Revisión bibliográfica.....	10
6.2. Cribado virtual.....	10
6.2.1. Basado en estructura.....	10
6.2.2. Basado en ligando.....	12
6.2.3. Planteamiento nuevas estructuras teóricas.....	13
6.2.4. Evaluación perfil toxicológico.....	14
6.2.5. Selección de la molécula más promisoría.....	14
6.3. Diseño de la síntesis.....	15
6.4. Desarrollo de la síntesis.....	15
6.5. Purificación del producto de síntesis.....	16
6.6. Resonancia magnética nuclear de protón.....	16
7. Resultados y análisis de resultados.....	
7.2. Cribado virtual.....	18
7.2.1. Basado en estructura.....	18
7.2.2. Basado en ligando.....	25
7.2.3. Planteamiento nuevas estructuras teóricas.....	27
7.2.4. Evaluación perfil toxicológico.....	33
7.2.5. Selección de la molécula más promisoría.....	33
7.3. Diseño de la síntesis.....	34
7.4. Desarrollo de la síntesis.....	38
7.5. Purificación del producto de síntesis.....	39
8. Conclusiones.....	40
9. Recomendaciones.....	41
10. Parte experimental.....	42
11. Referencias bibliográficas.....	46

Listado de tablas

		Pág.
Tabla 1	Resultados del acoplamiento molecular de los sustratos naturales, realizado en Autodock Vina	21
Tabla 2	Resultados del acoplamiento molecular de los inhibidores experimentales, realizado en Autodock Vina	22
Tabla 3	Resultados de acoplamiento molecular para moléculas diseñadas	30
Tabla 4	Predicción del IC ₅₀ de las nuevas moléculas planteadas, realizada por la red neuronal.	32
Tabla 5	Predicción del perfil toxicológico de las moléculas más promisorias candidatas a fármaco.	33

Listado de figuras

		Pág.
Figura 1	Ejemplo de mapa de color.	5
Figura 2	a) Sitio activo de la actividad hidrolasa de la enzima sEH, representado en color azul, visualizado en Autodock Tools. b) GridBox con coordenadas del sitio activo de la enzima tomada de Autodock Tools.	18
Figura 3	Estructuras ureicas extraídas de la literatura, con actividad enzimática inhibitoria experimental.	20
Figura 4	Ejemplo de optimización de la estructura 5,6-EET en el software Avogadro.	20
Figura 5	Ejemplo de resultado de proceso de clustering realizado para el sustrato natural 14-15 EET.	25
Figura 6	Mapa de color correlación Descriptor vs Descriptor modelado en MatLab.	26
Figura 7	a). Gráfica entrenamiento y validación de la Red Neuronal: valores experimentales vs valores predichos por la red, observando su coeficiente de determinación ajustado, obtenida de MatLab. b). Gráfica entrenamiento y validación de la Red Neuronal: valores experimentales vs valores predichos por la red, observando su coeficiente de determinación maximizado, obtenida de MatLab.	27
Figura 8	Estructuras teóricas planteadas como posibles nuevos inhibidores de la sEH, basadas en información de la literatura, modeladas en ChemDraw.	28
Figura 9	Estructuras teóricas planteadas como posibles nuevos inhibidores de la sEH, basadas en resultados computacionales generales, modeladas en ChemDraw.	29
Figura 10	Estructuras teóricas planteadas como posibles nuevos inhibidores de la sEH, basadas en mejores resultados computacionales, modeladas en ChemDraw.	30
Figura 11	Molécula 71 (1-(3,4-dihidroxifenetil)-3-fenilurea)	34
Figura 12	Reacción general de alquilación de la urea partiendo de alcoholes primarios o halogenuros de alquilo, planteada en ChemDraw.	35
Figura 13	Reacción general de obtención de urea monoalquilada partiendo de amina primaria y ácido carboxílico.	36
Figura 14	Reacción general de obtención de urea monoalquilada partiendo de amina primaria y carbamato	36

Figura 15	A). Reacción de transamidación de la urea catalizada por Hierro (III) b) Mecanismo de reacción de transamidación de la urea catalizada por Hierro (III)	37
Figura 16	Síntesis teórica diseñada para la obtención de la molécula 71 (1-(3,4-dihidroxifenetil)-3-fenilurea), modelada en ChemDraw.	38
Figura 17	a). Corrida cromatográfica en capa delgada después de la primera sustitución de la urea revelada en luz UV. b) Corrida cromatográfica en capa delgada después de la segunda sustitución de la urea revelada en luz UV. c) Corrida cromatográfica en capa delgada después de la segunda sustitución de la urea revelada con vainillina.	38
Figura 18	a). Corrida cromatográfica en capa delgada de los primeros 4 fragmentos separados revelada en luz UV b) Corrida cromatográfica en capa delgada de los segundos 4 fragmentos separados revelada en luz UV c) Corrida cromatográfica en capa delgada de los últimos 3 fragmentos separados revelada en luz UV d) Corrida cromatográfica en capa delgada de los primeros 8 fragmentos separados revelada en ninhidrina. e) Corrida cromatográfica en capa delgada de los primeros 8 fragmentos separados revelada en Yodo.	40
Figura 19	a) Espectro Infrarrojo de la anilina destilada tomado en el laboratorio. b) Espectro Infrarrojo de la anilina reportada en literatura. (SDBS, 2022)	43
Figura 20	a) Espectro Infrarrojo de la urea disuelta en tolueno tomado en el laboratorio. b) Espectro Infrarrojo de la urea reportada en literatura. (SDBS, 2022)	43
Figura 21	Resonancia magnética nuclear de protón del producto de síntesis (1-(3,4-dihidroxifenetil)-3-fenilurea) posterior a su purificación, utilizando DMSO deuterado como disolvente.	44
Figura 22	Simulación de resonancia magnética nuclear de protón de la 1-(3,4-dihidroxifenetil)-3-fenilurea, realizada en ChemDraw	45

Lista de Símbolos y abreviaturas

sEH: Epóxido hidrolasa soluble

QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship

EETs: Epoxieicosatrienoicos

DHETs: Dihidroxeicosatrienoicos

RMN: Resonancia magnética nuclear

DMSO: Dimetilsulfóxido

CDCl₃: Cloroformo deuterado

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

TLC: Cromatografía en capa delgada (Thin Layer Chromatography)

R²: Coeficiente de determinación

RMSD: Desviación cuadrática media (Root-mean square deviation)

IC₅₀: Concentración inhibitoria media máxima

TYR: Tirosina

VAL: Valina

ASP: Ácido aspártico

LEU: Leucina

MET: Metionina

PHE: Fenilalanina

TRP: Triptófano

HIS: Histidina

GLN: Glutamina

TPSA: Área superficial topológica (Topological Polar Surface Area)

AMR: Refractividad Molar

ALOGP²: Coeficiente de partición al cuadrado

Resumen

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por el deterioro de las distintas capacidades cognitivas de un individuo, y cuenta con una neuropatología poco descrita. Recientemente, estudios describieron la relación entre la formación de ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs) a cargo de la actividad enzimática de la epóxido hidrolasa soluble, y la inflamación neuronal que provoca la falla sináptica, la muerte neuronal, el estrés oxidativo y por tanto, el deterioro cognitivo: principal afección de la enfermedad del Alzheimer. El presente trabajo de investigación contemplado tiene como objetivo el diseño y síntesis de un nuevo inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa soluble basado químicamente en inhibidores con actividad experimental conocida (derivados de la urea), como una alternativa en el tratamiento de la enfermedad y sus principales síntomas. Esto mediante una metodología *In silico* realizando un cribado virtual basado en estructura y en ligando, utilizando softwares especializados que permiten realizar acoplamiento molecular de tipo enzima-sustrato arrojando valores de afinidad (Autodock Vina) y que permiten visualizar las interacciones de unión y su distancia (Pymol). Además, mediante QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships QSAR) y el uso de redes neuronales artificiales, se busca establecer la relación estructura-actividad de moléculas con actividad inhibitoria conocida, para obtener una predicción sobre la actividad inhibitoria de estructuras análogas propuestas, mediante un valor de IC_{50} . El uso de otros programas que permiten predecir el perfil toxicológico y fisicoquímico de la molécula diseñada como PreADMET también es contemplado e incluido. Finalmente, la síntesis de una de las moléculas diseñadas con actividad farmacológica más prometedora (mejor afinidad, mayores interacciones y menor IC_{50}), y un mejor perfil toxicológico, es planteada y realizada por medio de una transamidación ureica, partiendo de precursores sintéticos disponibles en el mercado como lo son la dopamina, fenilamina (anilina) y urea, obteniendo así como producto de síntesis y nuevo inhibidor sintético la 1-(3,4-dihroxifenetil)-3-fenilurea. Este producto es caracterizado por medio de resonancia magnética nuclear de protón (RMN H^1) en medio de DMSO como disolvente deuterado, obteniendo como resultado la identificación, caracterización y confirmación del producto obtenido en el laboratorio.

Palabras Clave:

Epóxido Hidrolasa Soluble, sEH, inhibidor, Alzheimer, urea, dopamina, QSAR, docking, red neuronal, transamidación.

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease characterized by the deterioration of the various cognitive abilities of an individual, and has a poorly described neuropathology. Recently, some studies have described the relationship between the formation of dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs) by soluble epoxide hydrolase enzymatic activity, and neuronal inflammation that causes synaptic failure, neuronal death, oxidative stress and therefore, cognitive impairment: the main condition of Alzheimer's disease. The present research work contemplates and aims at the design and synthesis of a new soluble epoxide hydrolase inhibitor chemically based on inhibitors with known experimental activity (urea derivatives), as an alternative in the treatment of the disease and its main symptoms. This by means of an *in silico* methodology performing a virtual screening based on structure and ligand, using specialized softwares that allow to perform molecular docking of enzyme-substrate type yielding affinity values (Autodock Vina) and that allow to visualize the binding interactions and their distance (Pymol). In addition, by means of QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships QSAR) and the use of artificial neural networks, we seek to establish the structure-activity relationship of molecules with known inhibitory activity, in order to obtain a prediction of the inhibitory activity of proposed analogous structures, by means of an IC_{50} value. The use of other programs that allow predicting the toxicological and physicochemical profile of the designed molecule as PreADMET is also contemplated and included. Finally, the synthesis of one of the designed molecules with more promising pharmacological activity (better affinity, higher interactions and lower IC_{50}), and a better toxicological profile, is proposed and carried out by means of ureic transamidation, starting from synthetic precursors available in the market such as dopamine, phenylamine (aniline) and urea, thus obtaining 1-(3,4-dihydroxyphenethyl)-3-phenylurea as a synthetic product and a new synthetic inhibitor. This product is characterized by means of proton nuclear magnetic resonance (H^1 NMR) in DMSO as deuterated solvent, obtaining as a result the identification, characterization and confirmation of the product obtained in the laboratory.

Keywords:

Soluble Epoxide Hydrolase, sEH, inhibitor, Alzheimer, Urea, dopamine, QSAR, docking, transamidation, neural network.

1. Introducción

El Alzheimer como problemática en salud afecta a un gran porcentaje de la población a nivel mundial con un rededor de 50 millones de personas (OMS, 2020), representando un gran foco de atención y priorización teniendo en cuenta que a día de hoy no cuenta con un tratamiento curativo conocido ni aprobado. Su principal sintomatología se basa en la pérdida de habilidades cognitivas como la memoria y el lenguaje, llegando en ocasiones más graves incluso a la dependencia total. Estudios recientes (Griñán-Ferré et al., 2020) han relacionado la formación de ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs), en la presentación de dichos síntomas y avance de la enfermedad. Estos poseen propiedades que favorecen la inflamación neuronal, el estrés oxidativo, la muerte celular y la vasoconstricción, causantes de los principales síntomas del Alzheimer. La formación de dichos ácidos está a cargo de la enzima epóxido hidrolasa soluble (sEH) quien hidroliza el grupo epóxido de los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y los convierte en los respectivos DHETs; por lo que dicha enzima se convierte en un blanco farmacológico. Evidenciada la necesidad de un nuevo inhibidor de la sEH, actualmente no disponible en el mercado, el modelamiento de nuevos fármacos de manera *In silico* resulta prometedor en cuanto a su eficiencia en el menor gasto de tiempo y recursos en investigación y desarrollo. En el presente trabajo se hace uso de distintas herramientas *In silico* que permiten plantear estructuras químicas de manera bi y tridimensional, para posteriormente evaluar el perfil de afinidad e interacción de dichas moléculas respecto a nuestra enzima de interés, así como la concentración mínima requerida para inhibir la mitad del proceso enzimático (IC_{50}), y algunas aproximaciones de la toxicidad de la molécula evaluada; lo que nos permite modelar y predecir el comportamiento de distintas moléculas estructuralmente basadas en inhibidores con actividad experimental conocida y estudiada frente a esta enzima, para que mediante un proceso de cribado se obtenga una nueva estructura que posea la capacidad inhibitoria frente a la sEH que pueda significar una nueva alternativa para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer. Dicha estructura seleccionada como la más promisoría, fue sintetizada de manera experimental, partiendo de un diseño sintético teórico el cual es planteado después de evaluar distintas rutas sintéticas, partiendo de precursores disponibles en el mercado, y procurando la vía más eficiente. La vía sintética más viable consiste en la disustitución de la urea, partiendo de aminas primarias alquiladas, haciendo uso de una catálisis heterogénea con sales de hierro (III), que se realizó de manera *one-pot* y además fue controlada por cromatografía en capa delgada (TLC). Finalmente, para la identificación y caracterización del producto de síntesis se realizan análisis con resonancia magnética nuclear de protón, lo que permite confirmar que la molécula obtenida corresponde a la modelada y dilucidar sus principales grupos funcionales.

2. Marco teórico

Alzheimer

La enfermedad del Alzheimer es un tipo de demencia caracterizada por un trastorno neurológico, que afecta funciones cognitivas de la vida diaria como el aprendizaje, la memoria, el razonamiento, el lenguaje, la orientación y la comprensión, y que presenta un carácter neurodegenerativo, es decir un daño neuronal gradualmente progresivo, que inicia su desarrollo comúnmente alrededor de los 65 años de edad (Silva et al., 2019; Apostolova, 2016). La enfermedad comprende tres etapas iniciales y el impacto que llegue a tener sobre el individuo depende de la rapidez de la neurodegeneración, el diagnóstico temprano y el inicio de la medicación. Existe una primera etapa temprana o inicial, donde se empiezan a presentar confusiones en la relación espacio y tiempo y ocasiones de olvido, pero no suele ser asociado al Alzheimer en la mayoría de los casos por la ligereza de los síntomas. No es hasta la segunda etapa, caracterizada por olvidos frecuentes, pérdida de la orientación y dificultad de comunicación, en donde se muestran síntomas más claros relacionados a la enfermedad y se puede establecer un diagnóstico y empezar terapia farmacológica. Finalmente, la etapa tardía es la etapa más grave del Alzheimer ya que se caracteriza por la pérdida de funciones físicas y mentales vitales ligadas al daño neuronal y, por tanto, la generación de codependencia e inactividad (World Health Organization, 2020).

Neuropatología

Los ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs) son ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) hidrolizados provenientes de la ruta del ácido araquidónico (Pérez et al., 1998) que tienen la función de activar la actividad inflamatoria (Caio et al., 2011), en respuesta a una cascada de citoquinas inflamatorias bien sea por lesiones, afecciones o situaciones de estrés, generalmente con el fin de generar respuestas neuronales nociceptivas de dolor. Estas citoquinas (TNF, IL-1 β y la IL-6) tras ser estimuladas (Caio et al., 2011), activan la Fosfolipasa A2, que es la responsable de hidrolizar el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos de membrana para obtener ácido araquidónico y activar su vía metabólica. El ácido araquidónico es convertido a EETs mediante enzimas de la familia de CYP450 (puntualmente CYP2C y CYP2J), y estos a su vez a los DHETs mediante la enzima epóxido hidrolasa soluble (sEH) (Pérez et al., 1998). Estos ácidos dihidroxieicosatrienoicos tienen alta actividad proinflamatoria, vasoconstrictora y pro estrés oxidativo, mientras que los EETs, por el contrario, poseen una actividad antiinflamatoria, vasodilatadora, neuroprotectora y antiagregante plaquetaria (Griñán-Ferré et al., 2020), al inhibir

principalmente quinasas pro inflamatorias como I κ B y TNF- α , por lo que recientemente ambos han estado en la mira de investigaciones como nuevas alternativas al tratamiento del Alzheimer.

La enzima epóxido hidrolasa soluble es una enzima citoplasmática bifuncional que tiene actividad fosfatasa y actividad hidrolasa, específicamente en su porción N-Terminal (AA 0-232) siendo fosfatasa y en la porción C-terminal (AA 232 - 549) con actividad hidrolasa (Newman et al., 2003). Su sitio activo está conformado por tres aminoácidos en triada siendo Tirosina 335, Tirosina 383 y Ácido Aspártico 466 (Tanaka et al., 2011), y tiene alta afinidad por sustancias lipofílicas debido a la naturaleza bioquímica de sus sustratos naturales, y su necesidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

Acoplamiento

molecular

Para el estudio de nuevos fármacos se suele usar una metodología *In silico*, como en este caso, para estudiar la inhibición de la sEH frente a moléculas propuestas de manera teórica. Para esto se realiza lo que se conoce como cribado virtual, del cual se pueden diferenciar el basado en estructura y basado en ligando. El cribado virtual basado en estructura contempla el acoplamiento molecular de manera virtual y predictiva, y la observación de las afinidades de interacción y las distancias de las mismas (Tam, 2013). Para la realización del cribado basado en estructura se cuenta con distintos softwares de modelamiento molecular que permiten la observación y modelación de estructuras químicas de manera tridimensional como lo son XDrawChem, BKChem, ChemDraw, Marvin y Avogadro, en donde algunos además de lo mencionado, permiten la optimización de la estructura someténdola a un campo de fuerza específico que semeja la realidad y minimiza la energía del compuesto. Existen diferentes campos de fuerza para ello que se acoplan y resultan más ideales según la naturaleza química del compuesto a trabajar, por ejemplo, el MMFF94s, que es un campo molecular de Merck, se utiliza para compuestos con amplia variedad de especies orgánicas, mientras que GAFF (AMBER) está optimizado para biomoléculas (Cornell, T et al, 2015). Además, para el acoplamiento molecular se cuenta con programas como Autodock Tools, que permite la preparación de las moléculas para el acoplamiento mediante una interfaz gráfica, como el alistamiento de archivos, visualización del sitio activo, elección del GridBox, entre otras, y Autodock Vina que permite simular el acoplamiento enzima-sustrato mediante el sometimiento a un campo de fuerza de mecánica molecular AMBER (Morris et al.; Tam, 2013), para predecir la afinidad de un sustrato por una enzima respecto a sus diferentes interacciones con el sitio de unión y sitios alostéricos mediante un proceso de búsqueda estocástica por algoritmos genéticos en donde evalúa de manera aleatoria y evolutiva las

diferentes conformaciones espaciales posibles y probables para la interacción entre moléculas (Doshi J, 2021); sin embargo para este proceso también existen otros software disponibles como Dock, Discovery y NovaDock que resultan en ventajas y desventajas respecto a su interfaz gráfica y tipo de acoplamiento que soportan. Existen distintos tipos de acoplamiento molecular según la información y estructuras que se dispongan; entre estos se encuentra el acoplamiento ciego o *blind docking*, en donde se evalúa una posible interacción con la totalidad de la superficie de una molécula proteica (que puede o no ser enzimática) puesto que no se tiene conocimiento de su sitio activo, suele ser más lento y menos preciso pero puede ayudar en la determinación del sitio activo, por otro lado, existe el acoplamiento dirigido o *targeted docking* en donde se conoce el sitio de unión de la proteína y la interacción se limita a ser estudiada en dicha región, lo cual lo hace más preciso y mucho más rápido (Doshi J, 2021). Adicionalmente, también existe una diferenciación de acuerdo al tipo de acoplamiento que puede ser proteína-proteína, proteína-ligando, proteína-péptido, o incluso proteína-ADN, y a la rigidez de las moléculas, pues estas pueden permanecer rígidas durante el acoplamiento o pueden flexibilizar su superficie para favorecer o no la interacción (Doshi J, 2021). De manera complementaria las distancias de interacción del sustrato con los aminoácidos del sitio de unión pueden ser medidas de manera aproximada por el software PyMol que arroja valores de distancia en Ångström y permite de esta manera establecer las interacciones realmente efectivas, con base en la teoría que explica las interacciones moleculares dependientes de la distancia entre los centros de moléculas interactuantes, las fuerzas de atracción y repulsión y la energía requerida para ello, explicado por el potencial de Lennard-Jones (Wang X, et al, 2019), el cual por ejemplo establece que la distancia efectiva para una interacción de tipo puente de hidrógeno debe ser menor a 4,0 Å (George A, 1997).

QSAR

Para el cribado virtual basado en ligando se hace uso desde modelos de regresión lineal simple, múltiple, mínimos cuadrados parciales, hasta redes neuronales artificiales, que predicen el comportamiento acerca de la relación estructura-actividad de moléculas dadas, respecto a descriptores de los compuestos. Un descriptor es un valor matemático que se asigna a cierta propiedad física o química de una estructura con el fin de reflejar cuantitativamente el posible comportamiento de dicha molécula (Kaufmann M, 2014), y este puede ser calculado mediante un software llamado PaDEL Descriptor, entre otros. Los descriptores que más se ajusten al perfil de una molécula pueden ser mencionados en literatura reportada o bien pueden ser determinados conociendo comportamientos experimentales de esta, y los más útiles en los procesos de QSAR

son aquellos que más arrojen información acerca de las propiedades del compuesto. Adicionalmente se debe tener en cuenta que los descriptores utilizados deben diferir entre sí respecto a la información brindada puesto que su similitud no permite realizar predicciones precisas acerca del posible comportamiento de una molécula ya que no se está generando información nueva y diferente que se pueda correlacionar. Para establecer los descriptores que más se puedan ajustar a un modelo se puede recurrir al uso de mapas de color realizados en softwares matemáticos como MatLab en donde se relacionan numéricamente todos los descriptores disponibles y conocidos de una serie de moléculas con actividad experimental conocida y se observa mediante colores cuales tienen una mayor relación matemática entre sí, siendo por ejemplo el rojo una alta correlación y el verde una baja (como se observa en la figura 1), para observar cuales de los descriptores tienen una más baja correlación entre sí.

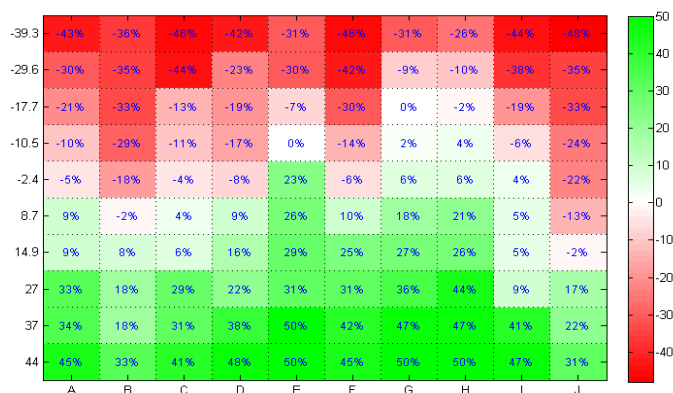


Figura 1. Ejemplo de mapa de color. (AnálisisWeb, 2012)

Una vez establecidos los descriptores a usar, la predicción mediante una red neuronal artificial se realiza con base en la correlación de Pearson y transmisión de la información de manera “neuronal” (I. Baskin & Varnek, 2013), y brinda información acerca de las especies químicas implicadas en la actividad inhibitoria y por tanto, la estructura molecular más ideal para la interacción con la enzima. Una red neuronal artificial es un modelo matemático computacional que simula el comportamiento de las neuronas en un cerebro humano, con el objetivo de desarrollar un sistema de aprendizaje e inteligencia de manera artificial (Wang SC, 2003). Están compuestas por una serie de nodos que simulan las neuronas, organizados en capas de entrada las cuales tienen contacto con información externa, capas intermedias u ocultas y capas de salida que brindan una nueva información al exterior, que permiten la transmisión de la información entre sí mediante conexiones, las cuales tienen relaciones y variables numéricas asociadas, llamadas pesos, que pueden ser manipuladas para modificar la información a transmitir según su influencia en la conexión, además de un sesgo o umbral que determina de manera matemática la decisión de propagación de información (Menacho C, 2013). El aprendizaje o entrenamiento de la red

consiste en calcular la combinación de variables de entrada que permitan modificar los pesos de conexión de manera que se logre la activación del umbral y por tanto la transmisión de la información, y dicho aprendizaje se puede medir en relación con el error de “predicción”, que se refiere a la discrepancia entre la información que propagó la red por su propio ajuste y aprendizaje frente a los valores conocidos suministrados en la capa de entrada, haciendo una comparación entre sí (Menacho C, 2013). Esta discrepancia se puede ver evidenciada en una gráfica que además de ilustrar la predicción de la red frente a los valores provisionados, permite calcular un coeficiente de determinación (R^2) indicador de la linealidad de los datos y por tanto coherencia en el entrenamiento y la predicción. Así pues, una vez una red neuronal es entrenada, esta puede repetir dicho proceso aprendido para calcular valores matemáticos nuevos basados en la información previamente suministrada, y por esto dicho proceso es aplicado en la predicción de la actividad de nuevas moléculas en estudio en QSAR. (Menacho C, 2013). Para esto entonces, en primer lugar, se realiza un entrenamiento de la red en donde esta se nutre con la información de base conocida (los descriptores de moléculas con actividad conocida y su IC_{50}), para que posteriormente realice una predicción tomando esta información como punto de referencia. En este punto lo que se busca es obtener un modelo matemático que sea lo más lineal posible (basado en el coeficiente de determinación) indicando mayor correlación de los datos y por tanto una mejor predicción futura, y que gaste el menor recurso tecnológico posible; para el caso de las redes neuronales a partir de $R^2=0,7$ se determina una buena linealidad (DLJ Alexander, 2015). Una vez se obtiene un modelo entrenado con una buena linealidad se puede realizar una predicción fiable de la actividad inhibitoria de moléculas “teóricas” con actividad desconocida modeladas virtualmente, con base en un valor de IC_{50} (A mayor IC_{50} menor actividad inhibitoria frente a la enzima en cuestión). Gracias a esta herramienta se pueden realizar predicciones de las actividades de diferentes moléculas que presentan una estructura similar a las demás usadas en la creación de los modelos QSAR. Adicionalmente, todo esto se puede complementar con el uso de otras herramientas virtuales como PreADMET, que logran predecir el perfil toxicológico de una molécula y así su viabilidad hacia candidato a fármaco, basados en la posible carcinogenicidad en ratones y ratas, así como la inhibición de genes que codifican funciones vitales, su posible resultado en el Test de Ames que evalúa el potencial mutagénico de los compuestos (Bruce N. et al, 1973), entre otras posibles variables toxicológicas.

Obtención de ureas sustituidas de manera sintética

Finalmente, para la síntesis de ureas sustituidas existen diversas rutas sintéticas que permiten su obtención, como lo pueden ser la *N*-alquilación de amidas, la alquilación por medio de sustitución nucleofílica con halogenuros de alquilo, la transamidación, entre otros. Sin embargo, como es bien

sabido, debido a la baja reactividad de las amidas, la velocidad de la reacción suele ser retardada, los rendimientos bajos y los resultados poco favorables, por lo que suelen requerir procesos de catálisis dentro de la síntesis que pueden o no estar descritos dentro de la literatura, o bien, pueden no reaccionar en absoluto. De manera complementaria, para la caracterización de estos compuestos existen diversas técnicas de elucidación como lo son la espectroscopia IR y de masas y la resonancia magnética nuclear. Esta se basa en la medición de la absorción de radiación electromagnética de los núcleos de los átomos involucrados en determinado compuesto al ser sometidos a un campo magnético externo, y su extrapolación en un espectro mediante la medición de la energía absorbida (Universidad De Antioquia, 2022). Para que dicha medición pueda ser posible se requiere tener en cuenta núcleos con un momento magnético distinto de cero, para que la emisión e intensidad de dicho campo magnético pueda ser medida y evaluada, como sucede en los núcleos de C^{13} , H^1 , F^{19} , N^{15} , que corresponden además a las técnicas más comunes de elucidación y caracterización (Joseph P, 1996). Esta es una técnica no destructiva y no invasiva, que es útil para conocer la naturaleza química de una sustancia problema, su composición y estructura aproximada, y para ella se utilizan siempre disolventes deuterados que permiten estabilizar el campo magnético y disminuir las interferencias de señales, como el DMSO o CDCl₃. La información que brinda es acerca de los átomos presentes en una estructura, mediante la interpretación de señales de proximidad entre átomos del mismo núcleo, que se presentan en forma de singletes o multipletes y que indican, según el ambiente químico en el que se encuentren, cuál es su frecuencia en ppm y a cuántos núcleos similares es cercano. La frecuencia suele ser característica y común para cierto tipo de grupos funcionales y especies químicas, y dependiendo del tipo de señal (singlete o multiplete) se conoce cuántos núcleos están cercanos a la ubicación espacial del núcleo emisor de la señal y adicionalmente cuantos núcleos más se encuentran en un ambiente químico similar (número de integración). Existen además variantes de la técnica tradicional dependiendo de si son homo o heteronucleares que consisten en la misma elucidación, pero de manera bidimensional, de tal forma que se observan dos ejes de frecuencia en lugar de uno. Las homonucleares corresponden a COSY, TOCSY, NOESY, mientras que las heteronucleares son HSQC, HMBC, HMQC, que permiten una identificación más sencilla y más precisa de un compuesto de interés.

3. Planteamiento del problema

El Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo que sufren alrededor de 50 millones de personas en el mundo (World Health Organization, 2020), y representa una de las enfermedades cerebrales más agresivas de las últimas décadas. Esta enfermedad genera en las personas que la padecen afecciones en actividades de la vida diaria, como la memoria, el aprendizaje, el lenguaje, y la razón, y en pacientes con deterioro más grave incluso genera dependencia física, desorientación, y pérdida irremediable de la memoria (World Health Organization, 2020). Las razones por las que esta enfermedad se presenta no son bien conocidas debido a que aún no se ha establecido una neuropatología exacta y comprobada, pero distintas revisiones realizadas por Lopez & DeKosky y Becerra & Pimienta sugieren que está relacionado con la degeneración granulovacuolar, la formación de ovillos neurofibrilares o de cuerpos de Hirano y de Lewy en el cerebro, estando todas relacionadas a la presencia de proteínas anómalas en diversas regiones cerebrales que terminan desencadenando una falla sináptica y por tanto daño neuronal. Estudios recientes (Griñán-Ferré et al., 2020) sugieren que la formación de ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs), parece promover la inflamación de células neuronales que puede llevar a falla sináptica y muerte neuronal, además de favorecer un estrés oxidativo que dificulta diversos procesos neuronales. Estos DHETs son biosintetizados a partir de ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) provenientes del ácido araquidónico, mediante una enzima bifuncional con actividad hidrolasa y fosfatasa, siendo específicamente la enzima epóxido hidrolasa soluble (sEH) citoplasmática. La inhibición de esta enzima presenta una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del Alzheimer, siendo que la disminución de la concentración de DHETs puede disminuir el deterioro neuronal y cognitivo que sufren los pacientes (Griñán-Ferré et al., 2020), haciendo que la enfermedad avance de manera más lenta e incluso detenga su evolución. Los fármacos actuales en el mercado para su tratamiento se limitan a mecanismos de acción antagónicos a receptores de neurotransmisores inhibitorios, o bien, a la inhibición de enzimas hidrolasas de neurotransmisores excitatorios. Sus efectos se reducen a la reducción de síntomas y no al retraso o detenimiento del deterioro cognitivo (Drug Bank, 2021; Huerta, 2018), por lo que un nuevo inhibidor de la sEH representaría un gran avance para el tratamiento del Alzheimer. Además, los inhibidores de la sEH experimentales que han sido probados en estudios clínicos presentan problemas en cuanto a su solubilidad, lipofilidad e incluso eficacia (Bhagwati & Siddiqi, 2020), lo que les descarta como candidatos a fármaco, por lo cual, se espera el planteamiento de un nuevo inhibidor de la sEH con una actividad calculada igual o mejor a los existentes, que represente una posible nueva alternativa para el tratamiento del Alzheimer.

4. Pregunta de investigación

¿Una nueva molécula derivada de la urea diseñada *In silico* presentará una igual o mayor actividad promisorio y afinidad a la epóxido hidrolasa soluble en comparación a las que se encuentran disponibles actualmente?

5. Objetivos

5.1 Objetivo general del Anteproyecto

- Sintetizar un nuevo inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa soluble (sEH), diseñado a partir de una metodología *In silico* por medio de la relación estructura-actividad (QSAR) y modelamiento molecular, con el fin de identificar un nuevo candidato teórico para el tratamiento del Alzheimer.

5.2 Objetivos específicos

- Diseñar un nuevo inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa soluble, mediante el uso de herramientas tecnológicas *In silico*, como acoplamiento molecular, QSAR y PreADMET, que represente una nueva alternativa para el tratamiento del Alzheimer.
- Diseñar la síntesis de una de las estructuras candidatas a fármaco, que pueda ser llevada a cabo de manera experimental.
- Sintetizar experimentalmente de manera eficaz la estructura candidata a fármaco con mejor perfil farmacológico.
- Caracterizar los productos de la síntesis por medio de espectroscopia de masas, espectroscopia infrarroja, y resonancia magnética nuclear.

6. Metodología

Para llevar a cabo el cumplimiento de **todos los objetivos** se propone la siguiente metodología de revisión bibliográfica:

6.1. Revisión bibliográfica: se planteó una revisión bibliográfica con una metodología de búsqueda en diferentes bases de datos, estableciendo las palabras claves de búsqueda y los criterios de exclusión, y la selección de diferentes artículos, revisiones, y tesis profesionales y doctorales, con base a criterios de selección propuestos que permitan el desarrollo del objetivo en cuestión. Para la revisión bibliográfica también se aceptó información proveniente de libros, documentos oficiales, patentes, enciclopedias y páginas web. De esta revisión bibliográfica se seleccionaron y extrajeron las moléculas a utilizar en el cribado virtual respecto a los siguientes criterios de búsqueda: año 2016 en adelante, Español e Inglés, bases de datos: Redalyc, ScienceDirect, Scielo, y PubMed, y los siguientes criterios de selección: estudios experimentales *In vitro* e *In vivo* (No calculado), derivados de urea, y IC₅₀ reportado.

Fuentes de la información utilizadas:

- Primarias: Libros, artículos científicos primarios, tesis profesionales, tesis doctorales, revistas científicas, documentos oficiales de instituciones relacionadas a la ciencia y salud, patentes, informes, boletines y fichas técnicas.
- Secundarias: Artículos científicos de revisión.

Para llevar a cabo el cumplimiento del **primer objetivo** “**Diseñar un nuevo inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa soluble, mediante el uso de herramientas tecnológicas *In silico*, como acoplamiento molecular, QSAR y PreADMET, que represente una nueva alternativa para el tratamiento del Alzheimer**” se llevó a cabo un proceso de cribado virtual descrito por la siguiente metodología:

6.2. Cribado virtual:

6.2.1. Basado en estructura:

6.2.1.1. Elección del software a utilizar: Para el proceso de acoplamiento molecular se determinó el uso de Autodock Tools y Autodock Vina, puesto que además de ser un software gratuito, es ideal para la simulación de acoplamientos de tipo proteína-ligando, como el que se plantea realizar, y no exige un gran rendimiento computacional por lo cual no requiere una inversión adicional. Adicionalmente Autodock Tools representa la ventaja de utilizar una interfaz gráfica para el procesamiento de los archivos de las moléculas, sin necesidad de utilizar códigos y funciones en símbolo del sistema para su preparación, lo cual se traduce en facilidad de manejo para nosotros y mayor rapidez en el proceso.

6.2.1.2. Elección y preparación de la macromolécula: Se seleccionó y descargó la macromolécula de la base de datos Protein Data Bank, en formato pdb, en este caso, la enzima epóxido hidrolasa soluble humana en complejo con un inhibidor sintético, que corresponde al código 3ANS. Como criterio de selección se verificó que la molécula cuente con la porción C-Terminal correspondiente a la actividad hidrolasa, para poder ubicar así su sitio activo. Posteriormente por medio de la búsqueda literaria y lectura del código del archivo pdb se determinaron los aminoácidos presentes en el sitio de unión y sus coordenadas, las cuales permitieron ubicar el grid box en Autodock Tools a la hora de la realización del acoplamiento molecular, que corresponde a la ubicación espacial en las coordenadas del programa en donde se encuentran los aminoácidos del sitio activo de la enzima y se realiza la interacción, de manera que se realizó así un *targeted docking* que resulta más rápido y más preciso.

6.2.1.3. Selección de los inhibidores experimentales: La selección de inhibidores con actividad experimental conocida se realizó por medio de una búsqueda en la literatura como se nombra en el numeral 1, siguiendo los siguientes criterios de exclusión:

- Moléculas con un núcleo ureico (Ureas mono y disustituidas)
- Estudios realizados los últimos 5 años (desde 2016).
- Estudios experimentales no calculados.

6.2.1.4. Modelamiento molecular: En primer lugar, se realizó un modelamiento molecular de los sustratos naturales e inhibidores con actividad experimental conocida mediante los software ChemDraw (v. 2017) y Avogadro (v. 1,2,0), en este último realizando una optimización estructural de la molécula con el campo de fuerza MMFF94s. Finalmente se descargaron las moléculas en formato pdb y se pasaron a formato pdbqt utilizando la herramienta Autodock Tools (v 1.5.6) . Esta herramienta lo que nos permite es guardar en un mismo archivo (con formato pdbqt) la enzima y su correspondiente sustrato antes de realizar el acoplamiento, para llevar a cabo el acoplamiento molecular con dicha información y el formato que soporta Vina.

6.2.1.5. Acoplamiento molecular: Se guardó la macromolécula, esta misma en unión con el inhibidor (antes del acoplamiento) y los parámetros de trabajo (Coordenadas de Grid Box, número de posiciones espaciales y semilla de inicio) en una carpeta específica para cada proceso de acoplamiento. Posteriormente realizó el acoplamiento molecular por medio de Autodock Vina (v 1.5.6), Cygwin64 (v. 3.3.4) y símbolo del sistema de Windows 10, para de esta manera establecer valores específicos de afinidad y sus distancias de interacción las cuales serán evaluadas por medio de Pymol (v. 2.0). Vina reporta por medio de símbolo del sistema los valores de afinidad (kcal/mol) obtenidos al someter la molécula a su campo de fuerza, dependiendo de la ubicación espacial en la que el ligando se acopla finalmente. Se reportan 7 resultados por defecto,

incluyendo valores de desviación cuadrática media (RMSD) así como su modo ideal. Se esperaban acoplamientos según lo reportado en la literatura, y se determinaron como predicciones certeras los resultados con valores de RMSD inferiores a 2 y con una distancia de interacción inferior a 5 Å según lo reportado en la literatura (George A, 1997). Esta distancia se estableció por medio del software Pymol, el cual por medio de una interfaz gráfica permite evaluar la distancia existente entre los átomos acoplados tanto del sustrato como de los aminoácidos del sitio activo, para verificar si realmente existe una interacción posiblemente efectiva.

6.2.1.6. *Proceso de Clustering:* Este procedimiento se realizó con ayuda de Cygwin64, que es una herramienta que permite emular el símbolo del sistema del sistema operativo de Linux en computadoras con sistema Windows, esto con el fin de utilizar comandos que no son soportados en Windows o que resultan más sencillos en Linux. Este programa se utilizó, puesto que Autodock Vina permite realizar varios acoplamiento en simultáneo o en paralelo bajo la configuración de códigos en símbolo del sistema para sistema operativo Linux, por lo que se pueden realizar varios acoplamientos seguidos sin la necesidad de programarse de manera manual uno a uno. En este paso lo que se realizó fue preparar una carpeta con los archivos de las moléculas a acoplar de la misma manera que en el inciso 2.1.5, pero en este punto se prepararon tantos archivos como acoplamientos necesarios a realizar y se ubicaron todos en la misma carpeta, para que al momento de indicar los comandos a Cygwin64 este pueda realizar el número de acoplamiento establecido bajo los parámetros indicados. La única diferencia es el número de veces que se realiza el mismo acoplamiento. Esto con el fin de evidenciar cual es la variabilidad de los datos en el proceso de repetición, en cuanto a resultados de afinidad, de conformación espacial y de desviación cuadrática media, para así buscar la manera de estandarizar el procedimiento y asegurar su repetibilidad y por tanto confiabilidad.

6.2.2. *Basado en ligando:*

6.2.2.1. *Selección de método a usar para la predicción:* Se planteó utilizar una red neuronal artificial facilitada por el grupo de investigación, puesto que en comparación con las demás técnicas disponibles esta ofrece una mayor exactitud en la predicción y una mayor fiabilidad de los resultados (Morales, J. 2018) (Guevara, J. et al, 2022). Esto debido a la robustez de su arquitectura y a toda la formulación matemática que viene detrás que permite evaluar y reducir el error de manera más precisa y obtener una predicción más certera.

6.2.2.2. *Selección de descriptores:* se realizó una selección de los descriptores a usar mediante una revisión en la literatura y selecciones experimentales mediante correlación entre descriptores con mapas de color. Esto con el fin de seleccionar tres descriptores (de acuerdo al número de inhibidores que vamos a trabajar = 15) que tengan poca correlación entre sí (0 - 0,4)

(Montaño J, 2002) y que además tengan una buena relación respecto al IC_{50} , que nos permitan obtener un modelo lineal (R^2 mayor a 0,7) para la predicción de la actividad de nuevas estructuras. En este punto también se realizaron distintos ensayos, con los descriptores con mayor potencial, para observar qué combinación nos permite obtener un modelo más lineal y por tanto más preciso en su predicción.

6.2.2.3. Entrenamiento Red Neuronal: Una vez establecidos los descriptores a utilizar se llevó a cabo el entrenamiento de la red neuronal artificial, primeramente, observando la variación de la linealidad que presenta según el número de nodos a utilizar correspondientes a las neuronas artificiales de la red. A mayor número de nodos es más tardado el proceso, pero en algunas ocasiones se obtienen mejores resultados, puesto que se hace más robusto el procesamiento de la información y por tanto el aprendizaje. Se utilizó como entrada los descriptores de las quince moléculas a trabajar y su correspondiente IC_{50} . Se compararon los resultados obtenidos en diferentes pruebas con número de nodos crecientes y se estableció el valor a utilizar para el entrenamiento de la red. Una vez entrenada la red se obtuvo una gráfica lineal en donde para dicho modelo se esperó obtener un R^2 con valores entre 0,7-1,0, que representara una buena correlación de los datos, lo cual indica un buen aprendizaje en la transmisión de la información y por tanto una mayor veracidad de la predicción a obtener de la actividad inhibitoria de las nuevas moléculas.

Para llevar a cabo el cumplimiento del **primer objetivo “Diseñar un nuevo inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa soluble, mediante el uso de herramientas tecnológicas *In silico*, como acoplamiento molecular, QSAR y PreADMET, que represente una nueva alternativa para el tratamiento del Alzheimer”** y como punto de partida para el desarrollo del **segundo objetivo “Diseñar la síntesis de una de las estructuras candidatas a fármaco, que pueda ser llevada a cabo de manera experimental.”** se propusieron ciertos planteamientos estructurales descritos por la siguiente metodología:

6.2.3. Planteamiento nuevas estructuras teóricas: con base en la información obtenida respecto a los descriptores más relevantes para la actividad inhibitoria, y las especies químicas con mayor afinidad de interacción en el acoplamiento, se realizaron derivatizaciones teóricas de las estructuras inhibitorias experimentales con mejor perfil de afinidad e interacción obtenido en el acoplamiento molecular, teniendo como objetivo el mejoramiento del acople entre la molécula, y la enzima epóxido hidrolasa soluble. Adicionalmente también se plantearon estructuras nuevas partiendo del núcleo ureico y tomando en cuenta las especies químicas y grupos funcionales que según literatura, acoplamiento y QSAR resultan más relevantes en su actividad, y adicionalmente teniendo en cuenta precursores disponibles de fácil acceso.

6.2.3.1. *Basado en estructura:* A estos planteamientos nuevamente se les realizó el acoplamiento mediante Autodock Vina de la misma manera descrita en el punto 2.1.5, para comparar los valores de afinidad e interacciones y en procesos de selección y descarte obtener una molécula que presente mejor inhibición que las experimentales y que las demás calculadas por nosotros.

6.2.3.2. *Basado en ligando:* Posteriormente se realizó la predicción del valor de IC₅₀ usando la red neuronal artificial previamente entrenada, después de calcular los valores de los tres descriptores elegidos para las nuevas moléculas propuestas, observando si los nuevos planteamientos representaban mejoría respecto a los existentes en cuanto a menor IC₅₀ y por tanto si eran viables como una nueva alternativa, realizando el mismo proceso de filtrado que en el paso anterior.

*Esta sección (6.2 y variantes) puede ser repetida cuantas veces sea necesario, puesto que los resultados de los nuevos acoplamientos y predicción de actividad, pueden nuevamente ser modificados estructuralmente y evaluados en busca de obtener un resultado más prometedor. De la misma manera se aclara que este procedimiento puede o no ser realizado en la secuencia que se establece, variando qué proceso se realiza primero o en simultáneo, puesto que son estudios complementarios y no necesariamente dependientes entre sí.

6.2.4. *Evaluación perfil toxicológico:* Como parte final del proceso de cribado virtual, se llevaron las moléculas elegidas como más prometedoras al programa PreADMET que permitió la predicción del perfil toxicológico y fisicoquímico, y se observó el potencial mutagénico predicho según la composición química, la probabilidad de inhibición de genes que codifican para proteínas vitales y la posible actividad cancerígena en ratas y ratones, para de esta manera elegir el candidato que tenga un perfil toxicológico igual o mejor a las moléculas evaluadas experimentalmente con mejor actividad inhibitoria.

6.2.5. *Selección de la molécula más promisoría:* Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio computacional realizado, y los datos recopilados, se seleccionó una de las moléculas de entre las preseleccionadas que presentó un mejor perfil en afinidad, IC₅₀ y toxicológico, que puede representar un nuevo candidato a fármaco y una nueva alternativa al tratamiento del Alzheimer. Para la elección de la molécula también se tuvo en cuenta su facilidad de síntesis respecto a precursores sintéticos disponibles.

Para llevar a cabo el cumplimiento del **segundo objetivo** “**Diseñar la síntesis de una de las estructuras candidatas a fármaco, que pueda ser llevada a cabo de manera experimental.**” y **tercer objetivo** “**Sintetizar experimentalmente de manera eficaz la estructura candidata a**

fármaco con mejor perfil farmacológico.” se realizó un diseño y desarrollo de síntesis descrito por la siguiente metodología:

6.3. Diseño de la síntesis: Se procedió al planteamiento de la síntesis de la molécula más promisoría, teniendo en cuenta la mejor ruta sintética para la sustitución de ureas a llevar a cabo, la cual dependerá del tipo de modificaciones estructurales propuestas y el número de pasos que se requieran. Principalmente, se propuso el uso de la transamidación para la sustitución de ureas de manera simétrica y asimétrica, que presenta reactivos de partida de fácil acceso, así como el uso de condiciones y catalizadores con los que se cuenta en el laboratorio y de igual manera se pueden obtener fácilmente. Como reactivos de partida se establecieron la urea, aminas sustituidas con los radicales de interés, nitrato férrico como catalizador, y tolueno y reflujo como condiciones de reacción (Becerra L, et al. 2014). El diseño de síntesis se puede modificar según las necesidades al tiempo en que se va realizando la misma.

6.4. Desarrollo de la síntesis: La síntesis se desarrolló en el laboratorio según lo planteado, se inició con el cálculo de cantidades de reactivos de partida, solvente y catalizador para obtener una cantidad de producto total de 0,500 g esto por medio de un cálculo estequiométrico en una relación de 1 equivalente de producto, 1 equivalente de urea (0,222 g) y 1,3 equivalentes de anilina (0,444 g). Inicialmente se realizó un proceso de destilación de la anilina existente en el laboratorio, puesto que esta tiene una tendencia a producir productos de su oxidación y se requiere que esté pura, en este proceso se realizó una destilación simple a presión reducida controlando la temperatura del sistema para evitar que se elevara por encima de la temperatura de ebullición de la anilina y así garantizar que las impurezas de la misma no llegaran al producto final de destilación. Una vez obtenida la anilina se procedió a añadir la cantidad de urea calculada disuelta en tolueno, en un matraz de fondo redondo, y el correspondiente catalizador (5% mol=0,077g). Todo esto es llevado a una temperatura de 90 °C en una plancha de calentamiento, en condiciones de reflujo y agitación y es dejado para su reacción durante 4 horas (Becerra L, et al. 2014). Una vez transcurrido este tiempo se procedió a realizar un seguimiento cromatográfico de la reacción por medio de una cromatografía en capa delgada usando una placa de sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de acetato de etilo 4:1 hexano como fase móvil (Becerra L, et al. 2014), con cuatro puntos sembrados en ella correspondientes a urea solvatada en tolueno, anilina, producto de reacción, y mezcla de los tres anteriores. La corrida cromatográfica fue llevada a luz ultravioleta para observar su resultado, y se analiza de manera especulativa si se concretó la reacción obteniendo el producto deseado, o es necesario alargar el tiempo de reacción. En este punto se debe haber logrado la primera sustitución de la urea de manera asimétrica, por lo que se procedió a realizar su segunda sustitución de la misma manera

anteriormente descrita, sin antes aislar el primer producto de reacción o cambiar el recipiente, puesto que esta reacción se puede realizar *one-pot* al ser todo mediado por las cantidades y el catalizador (Becerra L, et al. 2014). Por esto, se procedió a añadir el siguiente reactivo correspondiente a dopamina, nuevamente catalizador (5 % adicional en moles), y bajo las mismas condiciones esperar el tiempo de reacción, el cual fue prolongado debido a la necesidad de garantizar una sustitución adecuada y así mismo tener certeza de que la reacción haya terminado, finalmente se realizó un nuevo seguimiento cromatográfico en capa delgada y se observó de la misma manera que en la primera sustitución la formación del producto de reacción según la corrida de los compuestos en la placa.

6.5. Purificación del producto de síntesis: En primer lugar se realizó la filtración del producto de reacción obtenido para evitar la inclusión de residuos de catalizador u otro producto sólido en el proceso de separación, dicha filtración se realizó en caliente, repetidas veces y lavando con pequeñas porciones de solvente acetato de etilo para poder garantizar que todos los productos se mantuvieran en la fase líquida y los residuos de catalizador se quedaran en el filtro de algodón, o en su defecto en el balón donde se realizó la reacción inicial. Al producto filtrado se le realizó una cromatografía en columna para lograr la separación del producto de reacción del resto de componentes de la mezcla presente en el matraz redondo, para esto se usó como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil acetato de etilo, se empaquetó la columna perfectamente, se insertó el producto a separar y se inició el paso de solvente con ayuda de una bomba manual en búsqueda de aumentar la presión de la columna y agilizar el proceso. Los productos de la separación fueron almacenados tomando fragmentos de 1 mL de cada porción que iba quedando como producto de la purificación, para posteriormente con ellos realizar una siembra en placa de sílica gel y realizar una nueva cromatografía en capa delgada, en este punto se sembraron los 12 fragmentos en 4 placas diferentes y se realizó la comparación de la corrida cromatográfica para así verificar en qué fragmentos se encontró nuestro producto y asegurar la presencia del mismo luego de la separación. Una vez la cromatografía fue realizada y se colectaron las fracciones donde se suponía se encontraba el producto (Según las placas de cromatografía previas) y fueron almacenadas en un frasco ámbar debidamente rotulado, que permanece en el laboratorio de la Universidad El Bosque.

Para llevar a cabo el cumplimiento del **cuarto objetivo “Caracterizar los productos de la síntesis por medio de espectroscopia de masas, espectroscopia infrarroja, y resonancia magnética nuclear.”** se llevó a cabo la caracterización de productos de síntesis descrito por la siguiente metodología.

6.6. Resonancia Magnética Nuclear de Protón (¹H): Una vez obtenidas las fracciones donde

se supone se encuentra el producto, estas fueron traspasadas a un balón de fondo plano de 100 mL, el cual fue llevado al rotaevaporador para concentrar la muestra y eliminar la mayor cantidad de solvente posible que pueda interferir con la caracterización. Después de esto, el balón fue debidamente rotulado con el nombre de los estudiantes y de la muestra y la fecha del día de realización, para posteriormente ser llevado al laboratorio de análisis de resonancia magnética nuclear ubicada en la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá. Allí el producto fue disuelto en un disolvente deuterado adecuado de acuerdo a la naturaleza de la muestra, en este caso dimetilsulfóxido (DMSO) y fue sometido al campo magnético correspondiente en el equipo de resonancia magnética nuclear para protón, un espectrometro Bruker III HD Ascend 400MHz. El equipo procesó la muestra y arrojó un espectro de resonancia que es enviado al encargado del grupo de investigación, junto con la respectiva muestra, y este fue posteriormente enviado a los estudiantes, los cuales, mediante un programa de lectura, predicción y simulación de espectroscopia llamado MestreNova reproducen los resultados enviados por el laboratorio de la Universidad Nacional se procede a realizar el proceso de análisis e identificación de picos, señales y frecuencia correspondientes a los diferentes integrantes de la muestra. En este punto se realizó una comparación con la literatura para verificar cuales desplazamientos son propios de las especies químicas involucradas y de los productos de reacción, así como también se realizó el comparativo con los espectros de RMN ^1H de la literatura de los reactivos de partida y solventes involucrados, para identificar y descartar picos principales y esclarecer cuales picos corresponden al producto de reacción y verificar si este fue obtenido de manera satisfactoria. En este punto se evaluó que el tipo de señal (singlete o multiplete) y su integración, corresponda a los hidrógenos presentes en el producto deseado, y coincida con los espectros obtenidos de la literatura, así como su desplazamiento en ppm e intensidad de la señal. Una vez este análisis fue realizado se marcan los picos con su correspondiente fuente de señal y se señalan las señales principales del producto de interés confirmando así su obtención.

7. Resultados y análisis de resultados

Se logró el cumplimiento del primer objetivo “Diseñar un nuevo inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa soluble, mediante el uso de herramientas tecnológicas *In silico*, como acoplamiento molecular, QSAR y PreADMET, que represente una nueva alternativa para el tratamiento del Alzheimer” mediante un proceso de cribado virtual obteniendo los siguientes resultados:

7.2. Cribado virtual

7.2.1. Basado en estructura

7.2.1.1. Elección y preparación de la macromolécula:

Después de la descarga de la enzima y la revisión en la literatura, se identificaron los tres aminoácidos del sitio activo de la enzima correspondientes a Tirosina 383, Ácido Aspártico 466 y Tirosina 335. La enzima fue observada bajo WordPad, un procesador de textos de Windows 10 para conocer las coordenadas numéricas de los aminoácidos y así poder ubicarlas en el gridbox en Autodock Tools. Una vez en la interfaz de Autodock Tools, en el gridbox se introdujo como coordenada el promedio de las coordenadas en x, y, z de cada uno de los aminoácidos en cuestión obteniendo lo observado en la Figura 2b. De esta manera se identificó entonces el sitio activo de la enzima para proceder con el proceso de acoplamiento (ver figura 2a).

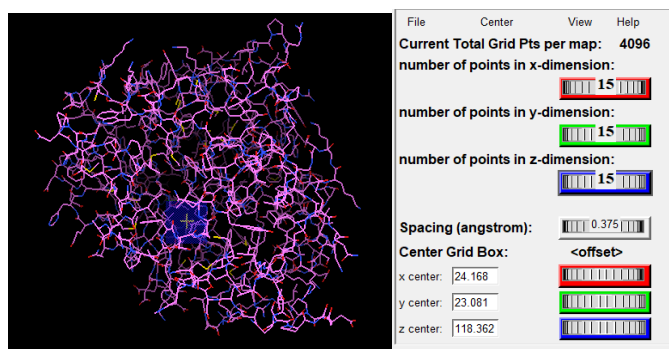


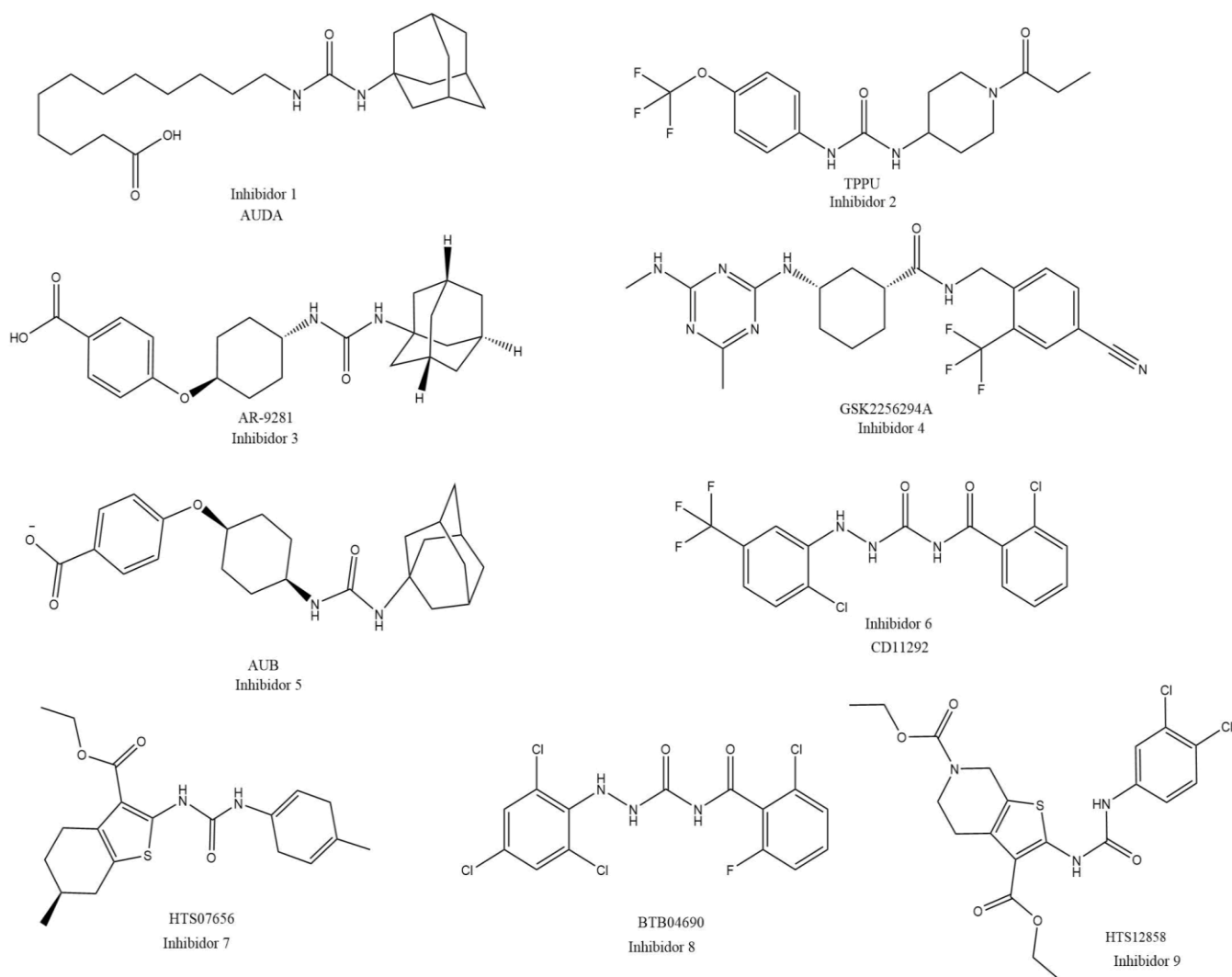
Figura 2. a) Sitio activo de la actividad hidrolasa de la enzima sEH, representado en color azul, visualizado en Autodock Tools. **b)** GridBox con coordenadas del sitio activo de la enzima tomada de Autodock Tools.

7.2.1.2. Selección de los Inhibidores experimentales:

Después de la extracción de moléculas realizada en la revisión bibliográfica inicial se obtuvieron un total de 19 moléculas con actividad enzimática inhibitoria experimental conocida y estudiada, con IC₅₀ reportado y con núcleo ureico, las cuales son mostradas en la figura 3.

7.2.1.3. Modelamiento molecular:

Del software ChemDraw se obtuvieron todas las moléculas dibujadas de manera bidimensional en archivo .mol. Posteriormente en Avogadro se utilizó un campo de fuerza MMFF94S para la optimización de las moléculas. De esta optimización se obtuvo una carpeta con 19 moléculas en formato .pdb listas para ser acopladas, más 4 sustratos naturales. Finalmente antes del acoplamiento, se prepararon todas estas moléculas en unión con la enzima en formato pdbqt con ayuda de Autodock Tools obteniendo una carpeta con todas las moléculas a acoplar en formato .pdbqt más la enzima en cuestión en el mismo formato y un archivo de texto con los parámetros a utilizar, los cuales fueron las coordenadas expuestas en el gridbox (ver figura 2b), el nombre de la proteína y el nombre del ligando, el número de resultados a arrojar y la semilla de inicio.



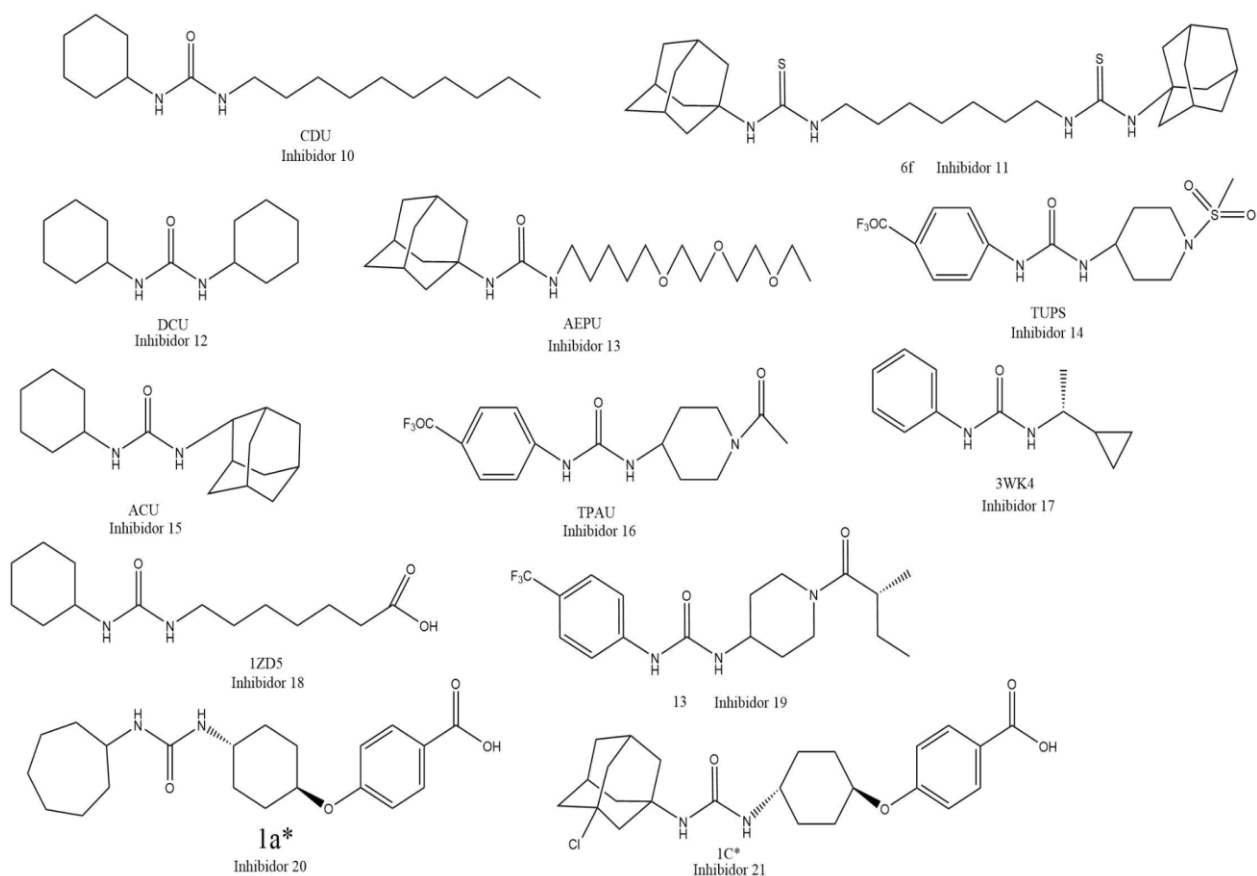


Figura 3. Estructuras ureicas extraídas de la literatura, con actividad enzimática inhibitoria experimental.

7.2.1.4. Acoplamiento molecular:

7.2.1.4.1 Sustratos naturales:

En primer lugar, se realiza un acoplamiento molecular en Vina de los sustratos naturales de la enzima tomados de la literatura, diseñados en ChemDraw y optimizados en Avogadro para tener información de referencia acerca de los valores de afinidad que resulta Vina. De entre los valores arrojados por Vina se tomó la posición espacial con menor RMSD y mayor afinidad, siempre respetando una desviación inferior a 2 por lo planteado en metodología. Adicionalmente se eligió la mejor conformación espacial respecto a energías de afinidad e interacciones de entre los resultados obtenidos. La distancia de interacción se observó en Pymol como se establece en la metodología y se muestra en la figura 4. Los resultados se muestran en la tabla 1.

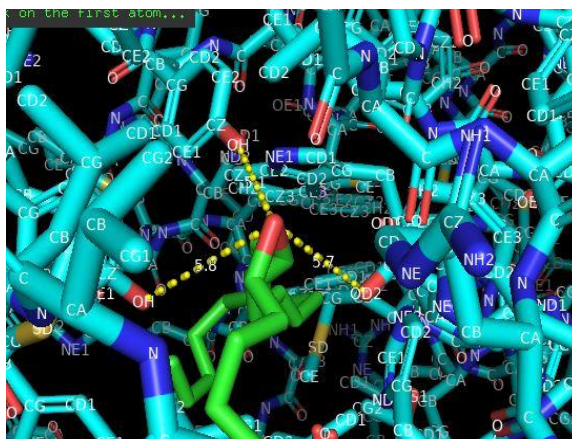


Figura 4. Ejemplo de interacciones con los aminoácidos del sitio activo y distancia entre especies interactuantes observada en Pymol.

Tabla 1. Resultados del acoplamiento molecular de los sustratos naturales, realizado en Autodock Vina.

SUSTRATOS NATURALES	NÚMERO DE INTERACCIONES	INTERACCIONES	DISTANCIA INTERACCIÓN (TYR383, ASP335, TYR 466) (Å)	AFINIDAD DE INTERACCIÓN (kcal/mol)
14.15 ETT	9	ASP335 , TRP336, TYR383 LEU408 MET 419 TYR466 VAL498 HIS524 TRP525	4,1 - 3,1 - 3,1	-7,2
5-6 ETT	9	TRP336, TYR383 , LEU408, MET 419, PHE 497, VAL498, LEU499 HIS524, TRP525	5,8 - 5,7 - 5,1	-7,0
11-12 ETT	9	ASP335 , TRP336, MET 339, TYR383 , LEU408, MET 419, ASP 496, VAL498, HIS524	3,6 - 5,3 - 4,6	-7,2
8-9 ETT	8	PHE 267, TYR383 LEU408 MET 419, VAL498, LEU499 HIS524 TRP525	6,8 - 7,8 - 5,4	-7,1

Los resultados del acoplamiento molecular de los sustratos naturales nos sirven como punto de partida para realizar en análisis posterior de los inhibidores experimentales y las nuevas moléculas a trabajar, puesto que existen pocos estudios de acoplamiento molecular relacionados con este tipo de moléculas los cuales tomar de referencia para los valores esperados. Aquí se pueden encontrar afinidades de interacción con una energía entre -7,0 y -7,2 kcal/mol siendo la menor afinidad la correspondiente a 11-12-EET y por lo consiguiente la molécula que tiene mayor probabilidad de interacción. Los resultados de interacción arrojados por el aplicativo AutoDock

muestran 8-9 aminoácidos involucrados y sólo en uno de los sustratos naturales se encuentra interacción los tres aminoácidos del sitio activo catalítico de la enzima, sin embargo, al realizar la revisión de las distancias de afinidad en ángstrom se encuentran sólo algunas distancias de interacción efectiva menores a 4Å especialmente en los sustratos 14-15 y 11-12 EET.

Estos resultados de los sustratos naturales nos dejan dos puntos claves como partida para la creación de nuevas moléculas: para poder realizar una inhibición competitiva se debe dar una afinidad de interacción inferior a -7,2 kcal/mol y a su vez nos indica que podemos esperar distancias de interacción efectiva superiores a 4Å con respecto a los tres aminoácidos del sitio activo catalítico de la enzima, puesto que la interacción con los sustratos naturales se calcula en distancias cercanas a 5 Å.

7.2.1.4.2. Inhibidores experimentales:

Para la interpretación de resultados de Vina con los inhibidores experimentales se tuvo las mismas consideraciones que para los sustratos naturales en cuanto a conformaciones espaciales y RMSD, obteniendo los resultados observados en la tabla 2, se debe aclarar que no se realizó cribado virtual a algunos de los inhibidores debido a que actúan como outliers por su alto valor de IC₅₀

Los resultados obtenidos con los inhibidores experimentales extraídos de la literatura nos sirven como punto de partida para buscar una nueva molécula que pueda llegar a ser competitiva con aquellas que ya se encuentran en la literatura, siendo que aquí se encuentran energías de afinidad de interacción entre -7,4 y -10,7 kcal/mol por lo cual se puede deducir que todos poseen una afinidad superior a la enzima con respecto a los sustratos naturales, además las energías de afinidad promedio son de -8,7 kcal/mol lo cual indica que un nuevo inhibidor diseñado que pueda encontrarse en un rango superior actuará de manera competitiva con la media encontrada en la literatura previamente.

Tabla 2. Resultados del acoplamiento molecular de los inhibidores experimentales, realizado en Autodock Vina.

INHIBIDORES	NÚMERO DE INTERACCIONES	INTERACCIONES	DISTANCIA INTERACCIÓN (TYR383, ASP335, TYR 466) (Å)	AFINIDAD DE INTERACCIÓN (kCal/mol)
AUDA Inhibidor 1	11	TRP336, ASP335 , TYR 466 , TRP525, HIS524, LEU499, VAL498, GLN384, TYR 383 , MET419, MET503	4,9/6,7/3,4	-7,5

TPPU Inhibidor 2	7	TRP336, PHE 381, GLN 384, TYR 466 , MET 419, LEU499, TYR 383 ,	3,9/4,6/3,6	-8,9
AR9281 Inhibidor 3	11	PHE 267, TRP336, ASP335 , GLN 384, LEU 408 , HIS524, LEU 499, VAL498 , TYR 383 , MET419, TRP 525	7,6/6,6/6,9	-8,8
AUB Inhibidor 5	7	MET419, LEU499, TYR383 , TYR466 , TRP525, TRP336, SER374	3,6/3,8/4,7	-10,7
CD11292 Inhibidor 6	10	ASP335 , HIS524, TRP336, TYR466 , TYR383 , PHE381, VAL496, LEU499, MET419, PHE267	5,8/3,1/2,4	-7.4
HTS07656 Inhibidor 7	13	PHE387, TYR383 , TYR466 , ASP335 , TRP336, PHE267, LEU406, LEU428, MET419, VAL498, HIS524, LEU499, MET419	5,7/3,1/2,6	-7,9
BTB04690 Inhibidor 8	9	PHE381, SER374, ILE375, MET469, TRP336, MET339, ASP335 , PRO361, LEU499	8,7/6,7/8,6	-7,7
CDU Inhibidor 10	11	PHE 267, TRP336, ASP335 , MET 339, THR360, LEU 408 , HIS524, LEU 428, VAL498 , TYR 383 , MET419,	6,4/7,0/4,2	-7,5
6f Inhibidor 11	8	TYR383 , TRP336, ASP335 , TRP525, HIS524, LEU499, PHE381, MET419	5,8/4,7/4,3	-9,0
DCU Inhibidor 12	11	PHE 267, TRP336, ASP335 , MET 339, THR360, LEU 408 , HIS524, LEU 428, VAL498 , TYR 383 , MET419,	6,5/6,5/3,8	-7,4
TUPS Inhibidor 14	6	TRP336, TYR 466 , VAL 498, LEU499, TYR 383 , TRP 525	3,7/3,8/5,1	-8,8
TPAU Inhibidor 16	8	PHE 267, TRP336, ASP335 , MET 339, TYR 466 , HIS524, LEU408, TYR 383 ,	3,2/3,1/4,7	-9,2
13 Inhibidor 19	10	TRP336, ASP335 , TYR 466 , LEU 408 , HIS524, LEU499, VAL498, LEU 417 , TYR 383 , MET419,	4,3/4,9/3,9	-9,3
1a Inhibidor 20	10	PHE 267, ASP335 , TYR 466 , GLN 384, SER 374, HIS524, LEU 499, VAL498 , TYR 383 , MET419	4,5/4,5/5,0	-9,9
1C Inhibidor 21	13	PHE387, TYR383 , TYR466 , ASP335 , TRP336, PHE381, PRO 371, GLN384, MET419, VAL498, HIS524, LEU499, TRP525	5,5/2,9/2,5	-9.9

Al evaluar las interacciones efectivas en AutoDock nos encontramos que la mayoría de los inhibidores presentan interacciones con al menos dos aminoácidos del sitio activo catalítico de la enzima a excepción del inhibidor BTB04690, lo cual indica que se debe proponer un inhibidor que

contenga al menos dos interacciones con los aminoácidos del sitio activo, preferiblemente los tres. Al evaluar las distancias de interacción con Pymol se encuentran resultados entre los rangos de 2,1 a 8,7 Å siendo este mismo rango el punto de partida para evaluar la distancia efectiva de los nuevos inhibidores a desarrollar, tomando como referencia también las distancias observadas para los sustratos naturales.

Adicionalmente, los resultados obtenidos en energía de afinidad e interacciones nos permiten observar que las especies que brindan una mejor interacción con la enzima, son las presentes en inhibidores como 1a, 1c y AUB, las cuales tienen en común contener grupos voluminosos como el adamantano, grupos aromáticos y especies dadoras yceptoras de puentes de hidrógeno, lo cual también se toma como punto de referencia para el planteamiento de nuevas moléculas que deseosamente obtengan una actividad similar. Esto cobra sentido al observar que la literatura menciona que la enzima tiene preferencia por grupos mayormente lipófilos y que la interacción con los aminoácidos del sitio activo de la enzima se realiza mediante puentes de hidrógeno (Tanaka et al., 2011).

7.2.1.4.3. Proceso de Clustering:

Este proceso se realizó después de descubrir una variación en los valores de afinidad con respecto a la repetición del acoplamiento y el punto de inicio del inhibidor enzimático (semilla aleatoria inicial), puesto que, cuando se realiza el acoplamiento sin especificar la semilla o punto de inicio, Vina asigna un valor aleatorio para este haciendo que al variar las coordenadas en donde inicia el recorrido del inhibidor hasta el sitio activo de la enzima, varíe la energía necesaria para realizar el proceso de inhibición, lo cual es una de las desventajas del acoplamiento rígido que nos brinda Autodock Vina, en donde tanto la proteína como el ligando no modifican su posición favoreciendo la interacción, sino por el contrario permanecen inmóviles hasta que esta ocurra. Decidimos entonces realizar una serie de acoplamientos del mismo ligando con una semilla aleatoria (30 veces) y posteriormente se realizó el mismo número de acoplamientos (30) utilizando la semilla obtenida para la menor energía de afinidad en el anterior proceso de 30 acoplamientos con semilla aleatoria. Este proceso se realizó como prueba con dos sustratos naturales (14-15 EET y 5,6 EET) y un inhibidor experimental obteniendo los mismos resultados para las tres pruebas, como se muestra el ejemplo de la figura 5. En este punto también se evidenció que al poner como parámetro sólo un resultado a arrojar, Vina toma por defecto el resultado con menor RMSD el cual siempre corresponde a la misma configuración espacial. Se encontró además que, al establecer la misma semilla para el proceso de acoplamiento, y no una aleatoria, los resultados de los 30 acoplamientos realizados mostraron exactamente la misma energía de afinidad, con el mismo RMSD y la misma conformación estructural, logrando así tener

datos repetibles. Se determinó entonces que la mejor forma de realizar el acoplamiento molecular es con una semilla preestablecida para así evitar variaciones en la energía de afinidad como se puede observar en las figuras 5, en donde se evidencia que al realizar el acoplamiento con una semilla aleatoria los datos varían en rangos mínimos, sin embargo, al estandarizar el dato se da un resultado constante. Cabe aclarar que este proceso se realizó de manera simultánea a la realización del acoplamiento en símbolo del sistema de Windows, por lo que, al descubrir la manera de estandarizar el resultado y asegurar su repetibilidad este proceso fue aplicado para todos los inhibidores experimentales obteniendo los resultados mostrados en la tabla 2, es decir, se realizó el acoplamiento 30 veces, se tomó la semilla del menor valor de afinidad obtenido y con esta se repitió el proceso en símbolo del sistema de Windows observando el mismo valor de afinidad. Para la siguiente figura 5, en el eje X se observa el número de acoplamientos realizados y en el eje Y se observa la energía de afinidad obtenida en Vina en kcal/mol, además del lado izquierdo se observa la repetición del acoplamiento con semilla aleatoria, y del lado derecho la repetición con una semilla específica.

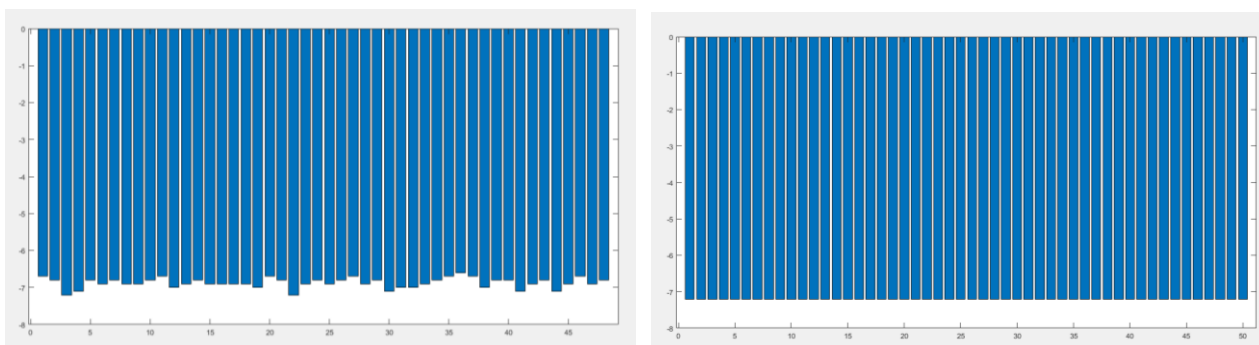


Figura 5. Ejemplo de resultado de proceso de clustering realizado para el sustrato natural 14-15 EET.

7.2.2. Basado en ligando

7.2.2.1. Selección de descriptores:

Para este proceso se realizó la búsqueda en la literatura como se menciona en la metodología, además de la realización de los mapas de color que nos permitieron identificar con mayor claridad cuales descriptores podrían llegar a resultar más útiles en el proceso de descripción de actividad inhibitoria enzimática y, por tanto, planteamiento del modelo para su predicción. Después de analizar el mapa de color (ver figura 6), y de distintas pruebas asociadas a la combinación idónea de descriptores se llegó a la elección de Topological Polar Surface Area (TPSA) o área superficial polar topológica, Refractividad Molar (AMR) y Coeficiente de Partición ($ALogP^2$) como descriptores ideales para la descripción de la actividad inhibitoria mayoría de moléculas a utilizar en el modelo. Esto, debido a que, según lo observado en los mapas de color, dichos descriptores

tienen una baja colinealidad entre sí (inferiores a 0,4) (Montaño, J. 2002) y, concordando con lo establecido en bibliografía, el coeficiente de reparto de una molécula es importante para su actividad frente a la sEH puesto que esta maneja un rango de lipofilidad para establecer una interacción (Tanaka et al., 2011). Además, el TPSA y la AMR también se relacionan en el sentido de la polaridad de la molécula y también su permeabilidad, factores importantes a tener en cuenta debido a la naturaleza lipófila de la enzima y su ubicación en el cuerpo humano (principalmente cerebral), así como la facilidad para formar puentes de hidrógeno e interacciones con los demás aminoácidos del sitio alostérico de la enzima. En este punto también se tuvo en cuenta que estudios relacionados con el modelamiento QSAR de la inhibición de la sEH con urea describen que los descriptores más significativos son los relacionados con las áreas superficiales y las polarizabilidades atómicas dentro de la molécula, relacionado principalmente con la deseada formación de interacciones de puentes de hidrógeno (Nathan R, 2012).

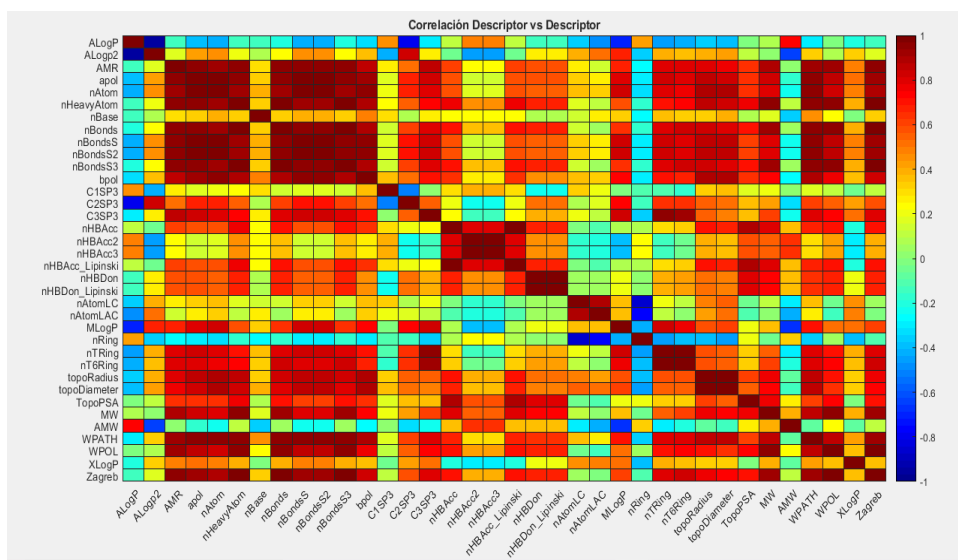


Figura 6. Mapa de color correlación Descriptor vs Descriptor modelado en MatLab.

7.2.2.2. Entrenamiento Red Neuronal:

Una vez elegidos los descriptores a utilizar se procedió al entrenamiento de la red neuronal en donde se evaluaron diferentes números de nodos a utilizar para observar el comportamiento de la red. Observando que, al usar mayor cantidad de nodos, no sólo es más tardado el proceso sino además aumenta el error de transmisión de la información y por tanto disminuirá la exactitud de la futura predicción, a excepción de números de nodos muy altos, en donde también se corre el riesgo de que se esté sobreajustando el modelo. Sin embargo, la diferencia entre 1000 ($R^2=0,9331$) y 2000 ($R^2=0,9333$) nodos es mínima, mientras que el proceso de entrenamiento tarda en promedio unas 3 horas más para 2000 nodos, por lo que se decide tomar como número de nodos para el modelo el valor de 1000 debido a que no hay diferencia significativa.

Después de establecer el número de nodos se realizó el entrenamiento de la red y se estableció el modelo a usar para la predicción en donde se observa un R^2 ajustado de 0,858 (ver figura 7a), el cual cumple con lo establecido en la metodología, y satisface en cuanto a la linealidad requerida para una futura predicción exacta y confiable. Se prefiere el uso del coeficiente ajustado por encima del máximo puesto que este último tiene una mayor probabilidad de presentar sesgo de linealidad, pues tiende a aumentar el valor del coeficiente a medida que aumentan las variables, mientras que el ajustado corrige este tipo de estimaciones y muestra un valor un poco más acertado (Martínez, E. 2005). Se observa gracias a la gráfica que arroja MatLab que los valores predichos por la red son muy cercanos a los teóricos en su gran mayoría y por tanto tiene sentido que el coeficiente de determinación de un valor cercano a 1. De esta manera se evidencia entonces un buen aprendizaje y validación de la red neuronal, una buena correlación entre los datos involucrados y una predicción futura confiable y robusta.

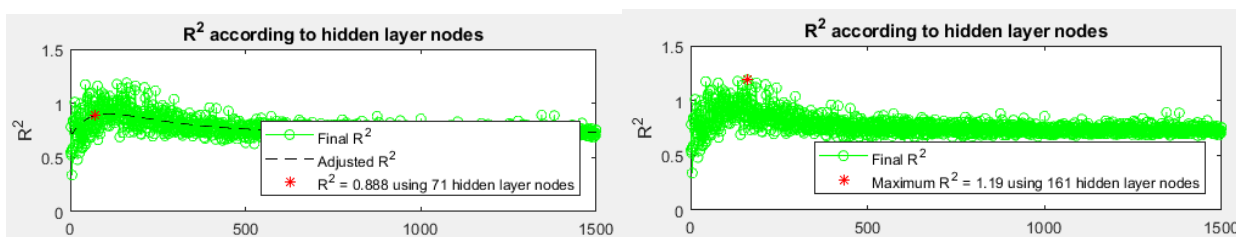


Figura 7a). Gráfica entrenamiento y validación de la Red Neuronal: valores experimentales vs valores predichos por la red, observando su coeficiente de determinación ajustado, obtenida de MatLab. **b).** Gráfica entrenamiento y validación de la Red Neuronal: valores experimentales vs valores predichos por la red, observando su coeficiente de determinación maximizado, obtenida de MatLab.

7.2.3. Planteamiento nuevas estructuras teóricas:

Con base en lo encontrado en el acoplamiento molecular, en lo reportado en literatura y los descriptores escogidos se plantearon nuevas estructuras con núcleo ureico, con las especies químicas más relevantes para la actividad inhibitoria de la enzima sEH. De primera mano se plantearon estructuras con grupos aromáticos y voluminosos, correspondientes a las moléculas 1-34 (figura 8), basadas principalmente en los inhibidores experimentales tomados de la literatura y distintas sustituciones posibles con neurotransmisores y aminoácidos disponibles en el mercado.

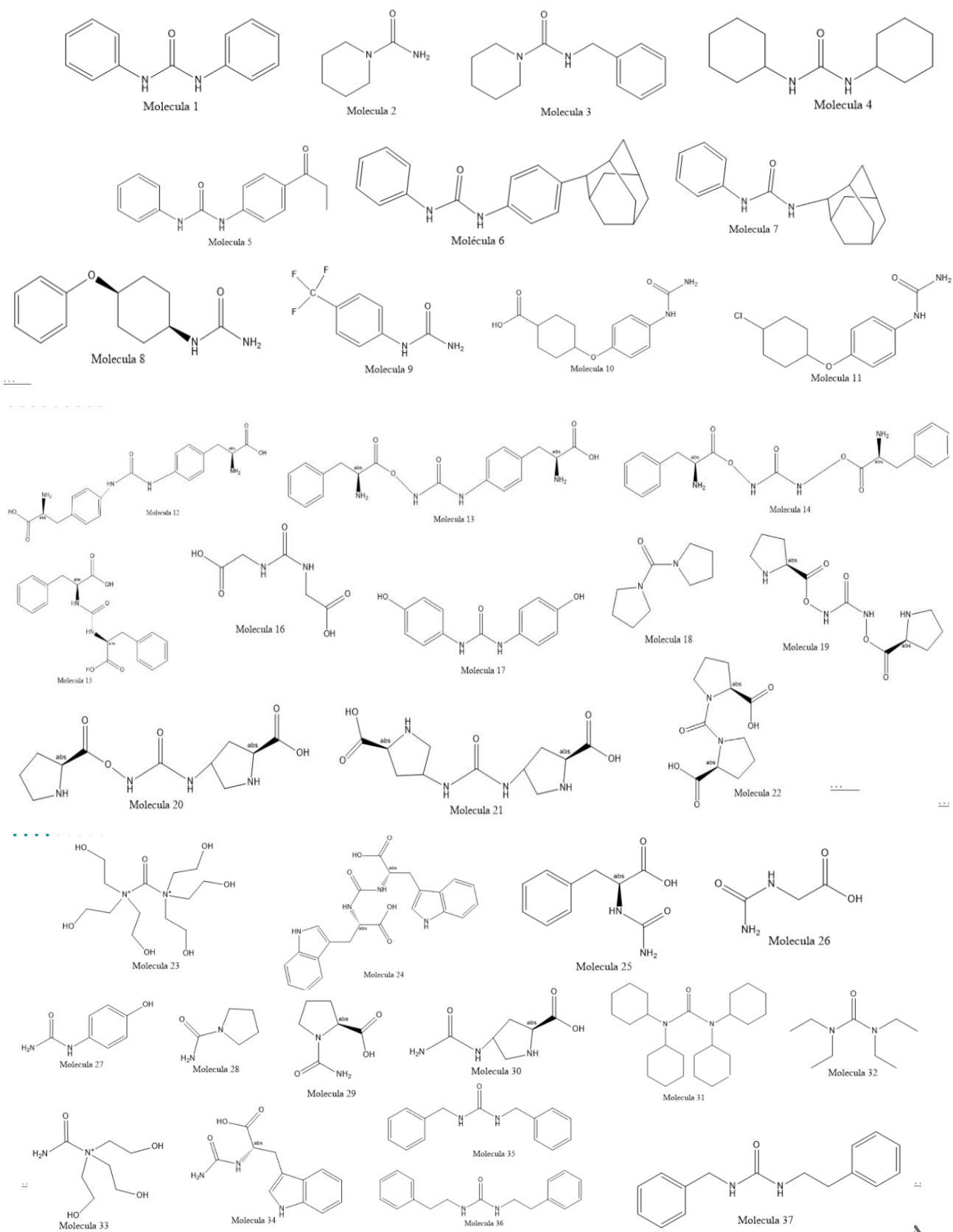


Figura 8. Estructuras teóricas planteadas como posibles nuevos inhibidores de la sEH, basadas

en información de la literatura, modeladas en ChemDraw.

Una vez se descubrió que a mayor polaridad de la molécula se presentaba una menor afinidad frente a la enzima se prosiguió a intentar proponer estructuras mayormente apolares, con cadenas carbonadas alifáticas más largas como se muestra en las moléculas 35-73 (figuras 9 y 10). Se descubrió a su vez que las moléculas derivadas del adamantano en su estructura presentaban mayores afinidades a las demás, pero resultaban en IC₅₀ bastante elevados, y que las moléculas con mayores cadenas alifáticas solían disminuir la concentración requerida.

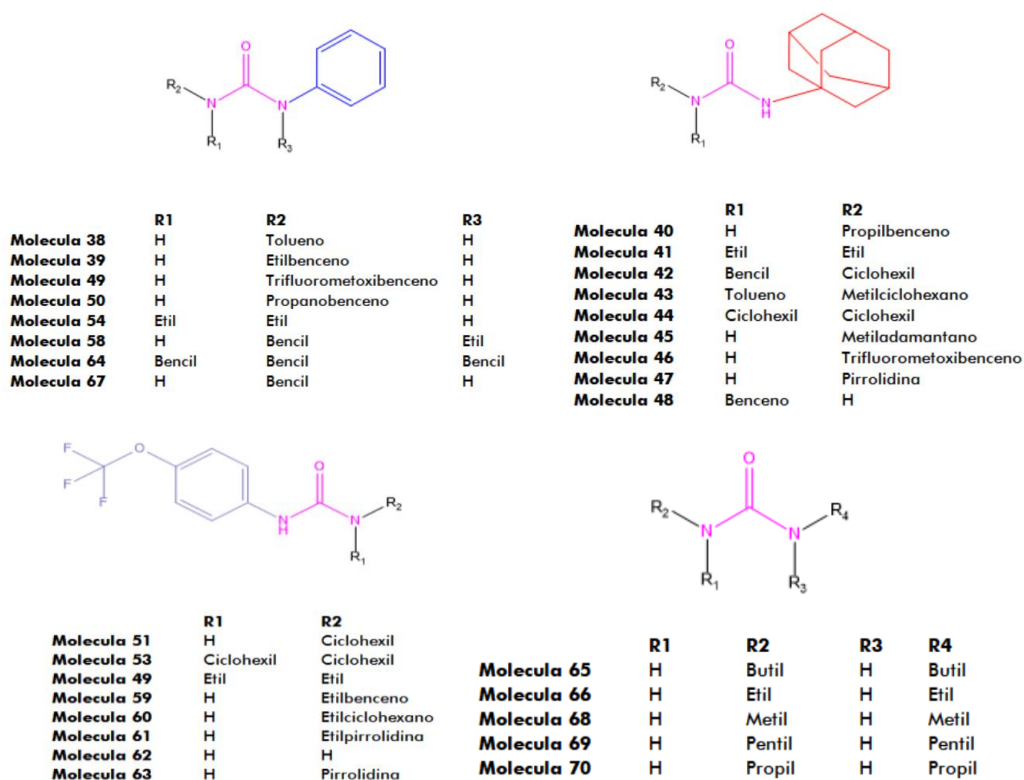


Figura 9. Estructuras teóricas planteadas como posibles nuevos inhibidores de la sEH, basadas en resultados computacionales generales, modeladas en ChemDraw.

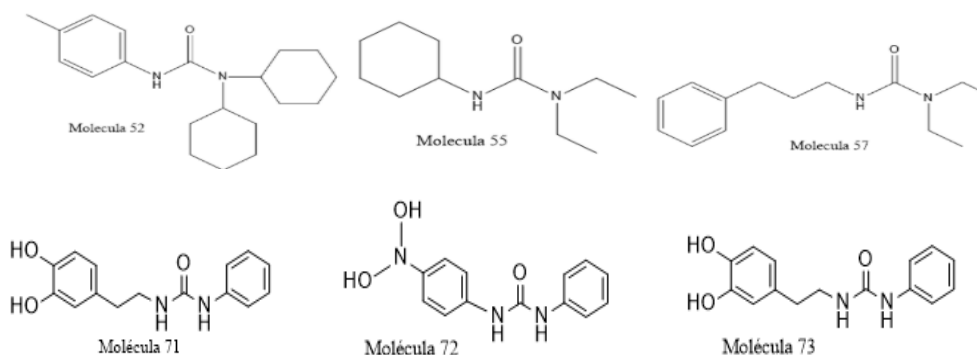


Figura 10. Estructuras teóricas planteadas como posibles nuevos inhibidores de la sEH, basadas en mejores resultados computacionales, modeladas en ChemDraw.

7.2.3.1. Basado en estructura.

Tabla 3. Mejores 10 resultados de acoplamiento molecular para moléculas diseñadas.

MOLÉCULA	NÚMERO DE INTERACCIONES	INTERACCIONES	DISTANCIA INTERACCIÓN (TYR383, ASP335, TYR 466) (Å)	AFINIDAD DE INTERACCIÓN (kCal/mol)
36	9	ASP335, TYR 383 , LEU 417, MET 419, TYR466 , PHE 497, VAL 498, HIS 524, TRP 525	3,2/3,1/4,7	-9,2
35	7	PHE 267, ASP335 , TRP336, PHE 387, LEU 408, TYR 466 , TRP 525	3,3/3,1/4,2	-9,6
37	7	PHE 267, ASP335 , TRP336, MET339, PHE387, LEU408, TYR 466 ,	4,4/5,7/5,4	-9,7
38	4	ASP335 , TRP336, TYR383 , TYR 466 ,	4,9/4,1/5,6	-9,6
39	7	PHE 267, ASP335 , TRP336, TYR 383 , TYR484, LEU408, TYR 466 , TRP525	3,3/3,3/4,2	-9,8
40	8	ASP335 , TRP336, TYR484, MET 419, TYR 466 , VAL 498, HIS 524, TRP525	3,2/5,8/5,7	-8,5
48	7	TYR383 , LEU 408, MET 419, PHE 497, VAL 498, HIS 524, TRP 525	7,8/3,7/4,3	-8,7
67	9	PRO 268, PHE 267, ASP 335 , TYR383 , LEU 408, MET 419, VAL 498, HIS 524, TRP 525	6,8/6,3/8,0	-9
71	10	ASP 335 , TRP336, MET 339, PHE 267, TYR383 , PHE 387, MET 419, LEU 428, TYR 466 , TRP525	3,6/5,1/4,1	-9,4
72	6	TYR 383 , LEU 417, MET 419, TYR466 , PHE 497, HIS 524	4,6/5,8/3,6	-9,4
73	8	ASP 335 , TYR383 , MET 419, TYR 466 , PHE 497 VAL 498, HIS 524, TRP 525	3,4/5,1/3,3	-9,5

Los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular oscilan entre -3,4 y -9,8 kcal/mol (Se

aclara que en la tabla 3 solo se muestran los 10 mejores resultados de las moléculas diseñadas (los cuales son los más relevantes en este estudio) lo cual nos indica una gran diferencia entre los tipos de molécula evaluados, a su vez se encuentra un número de interacciones entre 4 y 12, sin indicar una relación directa entre la cantidad de interacciones con la energía de afinidad, esto evaluado debido a que el que más interacciones tiene es el que tiene mayor energía de afinidad y de igual manera candidatos con una alta energía de afinidad presentan una gran cantidad de interacciones. Con respecto a la distancia de interacción efectiva se encuentra que no presenta una relación directa con la energía de afinidad ni con la cantidad de interacciones, sin embargo las moléculas con una menor energía de afinidad se encuentran con valores entre 3 y 5 Å lo cual puede indicar distancias de interacción efectiva. Estos resultados de acoplamiento molecular nos permiten preseleccionar 9 moléculas las cuales tienen una energía de afinidad menor a -8,7 kcal/mol, el cual es el valor de afinidad promedio de las moléculas inhibitoras experimentales evaluadas anteriormente, además estas moléculas poseen una energía de afinidad considerablemente menor en comparación con la mayoría de inhibidores experimentales. No se lograron obtener resultados mejores a -10,7 kcal/mol el cual es el inhibidor experimental AUB que presenta la menor energía de afinidad entre los inhibidores experimentales, sin embargo, respecto al resto de inhibidores que presentan una buena afinidad como el 1c, 1a y 13, se lograron moléculas nuevas con afinidad similar como la 35, 37, 38, 39 y 71, y con la ventaja de presentar un menor IC₅₀ calculado (ver 7.2.3.2). Finalmente, se debe aclarar que no se incluyen los acoplamientos a todos los 73 inhibidores planteados debido a que en este proceso se descubrió que ciertas moléculas presentaban un mal perfil de IC₅₀, por lo cual se decidió descartar automáticamente en el screening molecular realizado para llegar al mejor candidato.

7.2.3.2. Basado en ligando:

En cuanto a la predicción del IC₅₀ en nanomolar, se observó que para las moléculas planteadas a partir de algunos neurotransmisores y aminoácidos comerciales se presentó un IC₅₀ poco favorable (40-50 nM) con algunas bajas excepciones, como se observa en la tabla 4. Mientras que para las moléculas planteadas con grupos voluminosos y aromáticos y presencia de cadenas alifáticas se observó una reducción considerable del valor de IC₅₀, obteniendo valores entre 0-5 nM incluso. La molécula con la actividad predicha más baja fue la número 71, que observando el perfil de acoplamiento presentó también una buena afinidad frente a la enzima y un buen número de interacciones. De esta misma forma también se preseleccionaron las moléculas que de acuerdo a lo obtenido en acoplamiento y en congruencia con buena afinidad y buen IC₅₀ pudieran representar una nueva alternativa para la inhibición de la enzima, como lo fueron las moléculas 71, 39, y 35. De igual manera se observa que la molécula 71 tiene un menor IC₅₀ que varios de

los mejores inhibidores experimentales como 1a, 6f y TPAU.

Tabla 4. Predicción de IC_{50} de las nuevas moléculas planteadas, realizada por la red neuronal.

Molécula	Predicción (nM)	Molécula	Predicción (nM)	Molécula	Predicción (nM)	Molécula	Predicción (nM)
Molécula 1	30,5	Molécula 19	45,9	Molécula 37	15,1	Molécula 55	15,6
Molécula 2	43,9	Molécula 20	46,0	Molécula 38	20,8	Molécula 56	17,5
Molécula 3	13,0	Molécula 21	46,1	Molécula 39	8,2	Molécula 57	9,1
Molécula 4	48,6	Molécula 22	45,8	Molécula 40	8,6	Molécula 58	7,6
Molécula 5	26,8	Molécula 23	45,3	Molécula 41	8,5	Molécula 59	17,2
Molécula 6	8,4	Molécula 24	44,6	Molécula 42	7,9	Molécula 60	17,8
Molécula 7	14,9	Molécula 25	46,0	Molécula 43	6,1	Molécula 61	19,4
Molécula 8	44,7	Molécula 26	47,2	Molécula 44	7,9	Molécula 62	44,4
Molécula 9	38,2	Molécula 27	46,3	Molécula 45	7,9	Molécula 63	32,9
Molécula 10	45,5	Molécula 28	45,3	Molécula 46	13,5	Molécula 64	7,2
Molécula 11	34,6	Molécula 29	46,4	Molécula 47	14,7	Molécula 65	24,4
Molécula 12	45,6	Molécula 30	46,6	Molécula 48	14,1	Molécula 66	36,3
Molécula 13	45,4	Molécula 31	17,2	Molécula 49	22,2	Molécula 67	30,5
Molécula 14	45,3	Molécula 32	9,4	Molécula 50	17,4	Molécula 68	45,5
Molécula 15	44,3	Molécula 33	46,2	Molécula 51	22,2	Molécula 69	22,0
Molécula 16	46,8	Molécula 34	45,7	Molécula 52	8,6	Molécula 70	28,3
Molécula 17	45,3	Molécula 35	6,1	Molécula 53	10,8	Molécula 71	2,2
Molécula 18	12,6	Molécula 36	14,1	Molécula 54	15,6	Molécula 72	9,4

						Molécula 73	10,5
--	--	--	--	--	--	----------------	------

7.2.4. Evaluación perfil toxicológico:

Tabla 5. Predicción del perfil toxicológico de las moléculas más promisorias, candidatas a nuevo fármaco.

	Ames_test	Carcino_Mouse	Carcino_rat	hERG_inh
71	Mutagen	negative	negative	Medium-risk
72	Mutagen	negative	Positive	Medium-risk
39	Mutagen	Positive	negative	Medium-risk
73	Mutagen	Positive	negative	Medium-risk
AUB	Non mutagen	Negative	Negative	Low-Risk
1a	Mutagen	Negative	Negative	Low-Risk

Posterior al análisis de la metodología de cribado virtual basado en estructura y ligando las mejores moléculas preseleccionadas según su afinidad e IC₅₀ fueron evaluadas por medio de preADMET para determinar su potencial toxicológico, la comparación realizada nos arrojó que ninguna de las moléculas evaluadas presenta un mejor perfil toxicológico que los dos inhibidores experimentales a superar debido a su gran afinidad de interacción e IC₅₀, como se puede observar en la tabla 5.

Entre las moléculas diseñadas se encuentra que todas poseen potencial mutagénico predicho, a su vez todos tienen una probabilidad media de inhibición de genes que codifican para proteínas vitales (hERG_inh), además dos de ellas poseen actividad cancerígena en ratones y una de ellas en ratas. Sin embargo, la mejor opción en cuanto a perfil toxicológico es la molécula 71 puesto que presenta el potencial menos riesgoso y podría llegar a ser evaluado de manera *In vitro*.

7.2.5. Selección de la molécula más promisoría:

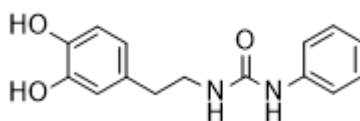


Figura 11. Molécula 71 (1-(3,4-dihidroxifenetil)-3-fenilurea)

Luego de un análisis teniendo en cuenta los resultados de acoplamiento, QSAR, perfil toxicológico y precursores de síntesis se eligió la molécula 71 (figura 11) a sintetizar como la mejor candidato a fármaco, ya que esta presenta una afinidad de interacción de -9,4 kcal/mol, la cual se encuentra en un rango superior al promedio de afinidades de los inhibidores experimentales, a su vez realiza — interacciones y posee unas distancias de interacción de — con respecto a los tres aminoácidos

del sitio activo catalítico de la enzima. Adicionalmente, en el estudio QSAR de su IC_{50} nos encontramos con un valor de 2,5 nM el cual es el menor entre todas las moléculas planteadas teóricamente y al mismo tiempo se encuentra en el rango de valores IC_{50} de los inhibidores experimentales más prometedores, este dato nos indica una menor concentración que todas las moléculas evaluadas para realizar la inhibición en un 50 % de la enzima epóxido hidrolasa soluble. Al evaluar el perfil toxicológico se encuentra que es la molécula con mejor perfil toxicológico en relación con las otras 3 preseleccionadas según acoplamiento y QSAR, siendo esta la única que presenta un perfil carcinogénico negativo en ratas y ratones a pesar de poseer un potencial mutagénico y una probabilidad media de inhibición de genes que codifican para proteínas vitales, como se puede observar en el numeral 7.2.4, sin embargo al realizar la comparación de toxicidad con los dos mejores inhibidores experimentales nos encontramos un perfil toxicológico inferior debido a la presencia de probabilidad baja de inhibición de genes que codifican para proteínas vitales y en el caso de AUB un perfil no mutagénico. Finalmente teniendo en cuenta los precursores de síntesis encontramos que esta molécula se sintetizaría en presencia de dopamina, anilina y urea, los tres reactivos de fácil acceso en el laboratorio de la Universidad El Bosque, en comparación con las otras moléculas seleccionadas que requerían de reactivos como la p-nitroanilina o 2-feniletilamina de mayor dificultad de obtención, lo cual también fue un criterio clave de selección para la molécula a sintetizar.

Para llevar a cabo el cumplimiento del **segundo objetivo** “**Diseñar la síntesis de una de las estructuras candidatas a fármaco, que pueda ser llevada a cabo de manera experimental.**” y **tercer objetivo** “**Sintetizar experimentalmente de manera eficaz la estructura candidata a fármaco con mejor perfil farmacológico.**” se realizó un diseño y desarrollo de síntesis obteniendo los siguientes resultados:

7.3. Diseño de la síntesis:

Para este punto se inició evaluando las distintas posibles rutas sintéticas y sus principales ventajas y limitantes para ser escogidas como la síntesis de predilección para la obtención de nuestro compuesto de interés. Lo más importante a tener en cuenta fue la poca reactividad de las amidas gracias a su buena estabilidad electrónica, lo que hace las opciones un poco limitadas, y además la necesidad de obtener una síntesis en el menor número de pasos posibles, ahorrando recursos y tiempo. La obtención de ureas sustituidas partiendo de haluros de alquilo presenta un mecanismo de reacción poco complejo, siendo una adición nucleofílica con ataque nucleofílico por parte del nitrógeno ureico hacia el carbono del haluro (Thornton, M. R. 1998), el cual contiene el radical de unión de interés. Este proceso permitiría la unión de un alquilo deseado al núcleo ureico, pero es posible que el producto obtenido sea una urea monosustituida debido a que la

urea se torna menos reactiva y es menos probable que la adición suceda del otro lado (ver figura 12). En este punto también es importante resaltar que el haluro de alquilo debe contener un halógeno poco reactivo para que la adición pueda suceder debido a que la electronegatividad del nitrógeno ureico sea mayor, como por ejemplo el bromo y el yodo (Thornton, M. R. 1998). De otro lado la alquilación de las ureas con alcoholes es otro mecanismo que permite obtener ureas sustituidas, con un mecanismo de reacción similar al mencionado anteriormente, con una adición nucleofílica, pero que debe ser mediada con carbonato de potasio para evitar la sustitución nucleofílica por parte del oxígeno, además de que debe ser llevada a altas temperaturas (Thornton, M. R. 1998). El problema de estos mecanismos de reacción es que presentan tiempos de reacción muy largos, que llegan a ser incluso superiores a 15 horas, debido a la baja reactividad de las amidias, y que sumado a las altas temperaturas resulta poco productivo y eficiente. Adicionalmente, es posible que el número de pasos pueda llegar a extenderse debido a otras especies susceptibles a reaccionar presentes en la estructura, por lo que habría que utilizar grupos protectores que no sólo aumentan los recursos a utilizar sino además posiblemente disminuyen el rendimiento y aumentan el tiempo de obtención.

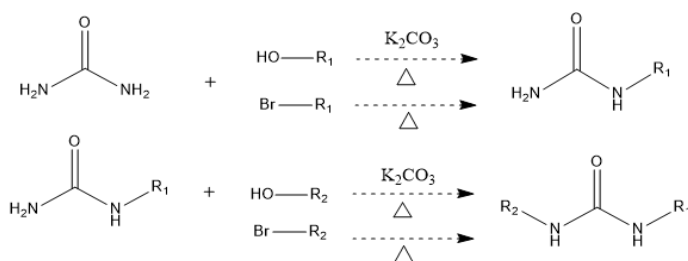


Figura 12. *Reacción general de alquilación de la urea partiendo de alcoholes primarios o halogenuros de alquilo, planteada en ChemDraw.*

De otra parte, también es posible obtener ureas sustituidas partiendo de ácido carboxílico o ésteres en su forma de carbamato, adicionando aminas primarias sustituidas con el radical de interés y en condiciones de calentamiento y reflujo, como se observa en la figura 13 y 14. Estas reacciones son sencillas y fácilmente realizables, con reactivos de partida de fácil acceso y condiciones muy favorables, sin embargo, poseen la gran desventaja de limitarse a la obtención de ureas monosustituidas, lo cual no es aplicable a nuestra molécula diseñada, por lo cual, para su doble sustitución se tendría que partir de reactivos que contengan la especie química reaccionante en ambos enlaces con el grupo carbonilo, como carbonatos orgánicos y el ácido carbónico que se encuentra en estado gaseoso lo cual dificulta en exceso las condiciones de reacción, en temas de presión, temperatura y rendimiento. Adicionalmente no se garantiza la segunda sustitución ya que varía la electronegatividad de las especies involucradas, y puede reaccionar con otras especies presentes como lo ya mencionado anteriormente.

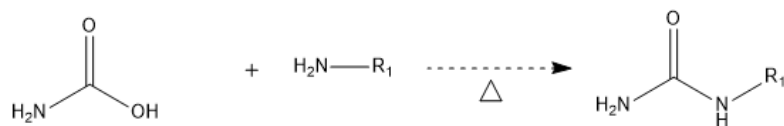


Figura 13. Reacción general de obtención de urea monoalquilada partiendo de amina primaria y ácido carboxílico.

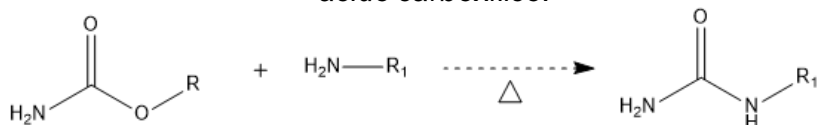


Figura 14. Reacción general de obtención de urea monoalquilada partiendo de amina primaria y carbamato.

Por su parte, la transamidación de las ureas permite obtener ureas sustituidas simétrica o asimétricamente con buen rendimiento y con uso de reactivos de fácil acceso, además de agilidad en su proceso de síntesis, pues consiste en pasos simples y relativamente cortos, respondiendo a nuestras necesidades. Su mecanismo es un poco más complejo, pero más específico, como se observa en la figura 15a y b, y consiste en la sustitución de la urea mediante la reacción con aminas primarias o secundarias que contengan los grupos alquilo de interés, catalizada de manera heterogénea mediante sales de hierro(III) no hidratadas y en condiciones de calentamiento y reflujo (Becerra L, et al. 2014).

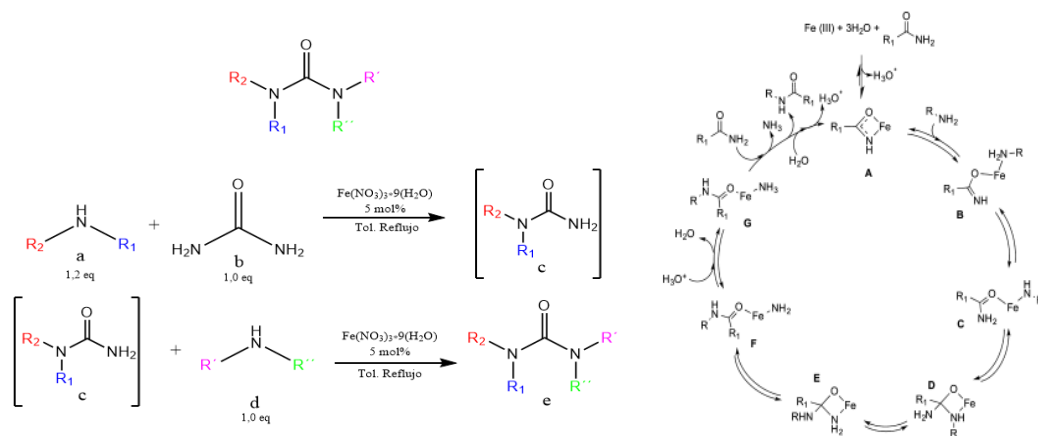


Figura 15a). Reacción de transamidación de la urea catalizada por Hierro (III) **b)** Mecanismo de reacción de transamidación de la urea catalizada por Hierro (III)

Esta vía sintética resulta más prometedora al momento de evaluar principalmente los tiempos de reacción puesto que son relativamente cortos si tenemos en cuenta la baja reactividad de los nitrógenos ureicos, y presenta la ventaja de contar con reactivos existentes en el laboratorio y de fácil acceso. Adicionalmente su bajo número de pasos es un principal atractivo teniendo en cuenta que la molécula diseñada es un potencial fármaco comercial y puede llegar a requerir ser sintetizado a nivel industrial.

Lo que sucede en esta transamidación es que el hierro(III) media la unión de las aminas al carbonilo ureico y su posterior isomerización, como se observa en la figura 15b, para realizar el proceso de transamidación y obtener ureas sustituidas de la manera que se requiera. El proceso inicia cuando el hierro se une al oxígeno presente en el carbonilo de la urea y a su vez al nitrógeno de la amina presente en la urea, esto debido a la diferencia de electronegatividades de las especies involucradas, permitiendo la formación de un enlace coordinado entre el hierro y la urea. Sin embargo, cuando se adiciona la amina a reaccionar, el hierro prioriza su unión con el nitrógeno de esta puesto que la diferencia de electronegatividad es aún mayor, y procede a favorecer el enlace del nitrógeno de la amina al carbono del carbonilo ureico que se encuentra parcialmente positivo (Becerra L, et al. 2014). En este punto ocurre la isomerización involucrando las aminas, en donde se permite que la amina con el alquilo de interés a sustituir forme un enlace con el carbono ureico y de esta manera se sustituya la primera amina de la urea. Después de esto el enlace con el hierro se rompe, quedando únicamente su unión con el oxígeno ureico, el cual, mediante la adición de iones hidronio provenientes del catalizador hidratado, se rompe posteriormente al formar un enlace con la molécula de amonio recién formada que es más estable y le permite liberarse del producto de síntesis (Becerra L, et al. 2014). Este proceso se realiza nuevamente, con el mismo mecanismo de reacción para la alquilación de la otra amida ureica.

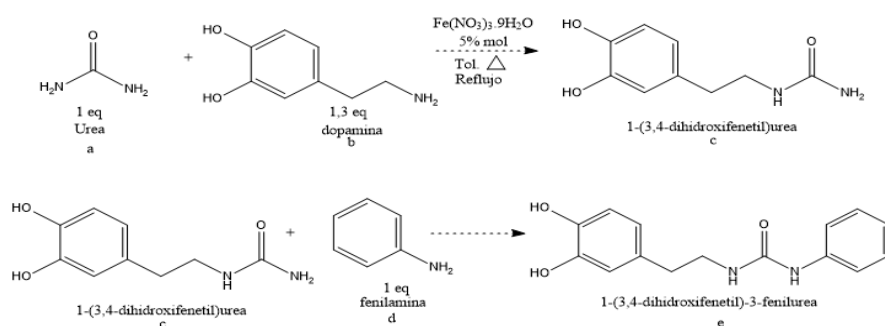


Figura 16. Síntesis teórica diseñada para la obtención de la molécula 71 (1-(3,4-dihidroxi fenetil)-3-fenilurea), modelada en ChemDraw.

Esta reacción comúnmente se realiza y controla de manera *One-pot*, lo cual significa que una reacción puede ser llevada a cabo inmediatamente es terminada la anterior sin necesidad de aislar el producto, purificar o cambiar de recipiente, y se puede dar seguimiento a ella mediante cromatografía en capa delgada, con una mezcla de solventes mayormente apolares como fase móvil, verificando la completa formación de los productos al comparar los R_f con un los del estándar de compuesto puro y observar ausencia de reactivos de partida en la corrida cromatográfica. Para el diseño entonces, con base en la transamidación ureica se partió de la molécula a sintetizar y en un análisis retrosintético se plantearon los precursores necesarios para la realización de la síntesis tomando como ruta sintética la transamidación de la urea. En este

punto se eligió a la dopamina y la anilina como precursores ideales, y al nitrato férrico como sal de hierro ideal para el proceso de catálisis heterogénea, adicionalmente se plantearon como condiciones de reacción las propuestas en la metodología, en cuanto a temperatura, solventes, condiciones de reflujo y material de laboratorio a utilizar.

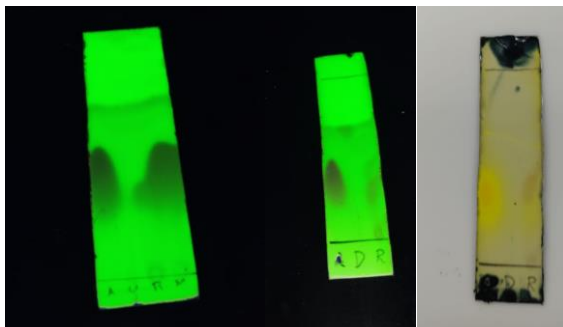


Figura 17a). *Corrida cromatográfica en capa delgada después de la primera sustitución de la urea revelada en luz UV. b) Corrida cromatográfica en capa delgada después de la segunda sustitución de la urea revelada en luz UV. c) Corrida cromatográfica en capa delgada después de la segunda sustitución de la urea revelada con vainillina.*

7.4. Desarrollo de la síntesis:

Se obtuvo como principal resultado de la síntesis un producto sólido color marrón presuntamente correspondiente a la molécula 71. La primera reacción tardó un total de 4 horas, mientras que la segunda se dejó reaccionar por poco más de 8 horas, sin ningún contratiempo. Para este punto se realizaron distintas corridas cromatográficas en diferentes puntos de la síntesis para analizar la formación de nuestro producto de interés y el avance de la reacción. En primer lugar, se realizó una primera corrida cromatográfica al momento de finalizar la primera reacción en donde se sembraron los reactivos de partida (urea y anilina), el producto de reacción y finalmente una mezcla de los tres involucrados, y al observar en luz ultravioleta se obtuvo lo observado en la figura 17a. En esta parte se puede observar que los puntos de corrida correspondientes a anilina no se encuentran presentes en el producto de reacción, pero sí en la mezcla, lo cual es indicador de que la anilina adicionada ya reaccionó con la urea y por tanto no queda reactivo en el recipiente de reacción. Se prosigue entonces con el proceso de síntesis, y después del tiempo estipulado se realiza una nueva corrida cromatográfica con los mismos parámetros anteriores, obteniendo lo observado en la figura 17b, en donde se analiza que las manchas correspondientes a reactivo de partida no están presentes en el producto de reacción, además de que los factores de retardo de los puntos principales difieren, principalmente con la anilina que es el reactivo más visible, además de que, esta nueva corrida presenta en la sección del producto de reacción una nueva mancha en la parte superior que no se reflejó en la anterior corrida, puesto que la urea estaba únicamente monosustituída, lo que se puede observar mejor en la figura 17c, lo que confirmaría la formación de una urea disustituída de manera asimétrica al finalizar la reacción.

Posterior al siguiente proceso de purificación se determinó que se obtuvieron 52,9 mg de producto lo cual corresponde a un 10,6 % de rendimiento de reacción.

7.5. Purificación del producto de síntesis:

Para el proceso de purificación también se realizaron corridas cromatográficas cada 1 mL de producto de separación obtenido, con el fin de asegurar que se estén separando los productos de manera adecuada, además de identificar el fragmento en donde se obtiene el producto de interés. Como se puede observar en la figura 18a, en las fracciones 3,4, e incluso 5 se observan manchas similares a la obtenida por el producto de síntesis en la cromatografía anterior, observada en la figura 18b, por lo que se identifica que en estas porciones de separación se encuentra el producto de interés de manera más pura. En el fragmento 6 se observa la mancha inferior pero no superior lo que puede indicar la presencia de urea monosustituida que está siendo separada del producto de reacción, y en el resto de mililitros no se presentan manchas correspondientes a producto de reacción. Es posible que como se observa en la figura 18d los fragmentos 5 y 6 corresponden a presencia de anilina puesto a su similitud con la mancha de anilina en la figura 18a y 18b. Una vez extraída y recolectada de la columna cromatográfica la porción que contiene el producto de interés según lo analizado en las corridas en capa delgada, la muestra fue rotaevaporada para eliminar la mayor parte de solvente orgánico obteniendo una pequeña cantidad de producto sólido de color amarillo claro en las paredes del recipiente, que fue almacenado en un balón y debidamente rotulado.

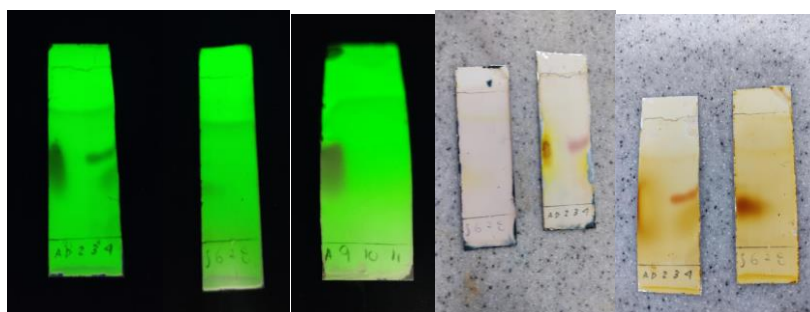


Figura 18a). Corrida cromatográfica en capa delgada de los primeros 4 fragmentos separados revelada en luz UV **b)** Corrida cromatográfica en capa delgada de los segundos 4 fragmentos separados revelada en luz UV **c)** Corrida cromatográfica en capa delgada de los últimos 3 fragmentos separados revelada en luz UV **d)** Corrida cromatográfica en capa delgada de los primeros 8 fragmentos separados revelada en ninhidrina **e)** Corrida cromatográfica en capa delgada de los primeros 8 fragmentos separados revelada en Yodo.

Para llevar a cabo el cumplimiento del **cuarto objetivo** “**Caracterizar los productos de la síntesis por medio de espectroscopia de masas, espectroscopia infrarroja, y resonancia magnética nuclear.**” Se llevó a cabo la caracterización de productos de síntesis y reactivos obteniendo los resultados mostrados en la sección “10. Parte experimental”.

8. Conclusiones

El acoplamiento molecular posee diversas variantes que pueden ayudar a robustecer los resultados, siendo la aplicación de clustering y la estandarización de una semilla de inicio las más efectivas en búsqueda de mantener constante los valores de afinidad y contribuir a la repetibilidad del dato. A su vez al asociar sus resultados a la metodología QSAR nos permite realizar una evaluación complementaria a través de una predicción del comportamiento de la molécula y de la concentración necesaria para inhibir el proceso biológico en cuestión a un 50 % lo que permite un diseño con un enfoque más específico y más acertado al obtener más información sobre sus especies involucradas en su actividad.

El Topological Polar Surface Area (TPSA) o área superficial polar topológica, la refractividad Molar (AMR) y Coeficiente de Partición (ALogP²) poseen una relación directa con la actividad inhibitoria de las moléculas estudiadas y brindan información acerca de la naturaleza química de los principales inhibidores, así como las principales características de las especies químicas involucradas, por lo que son de gran ayuda en el proceso de diseño *In silico*.

El modelo obtenido tiene un R² ajustado alto de 0,858 y una baja colinealidad entre los descriptores lo cual nos indica que estos no están relacionados directamente entre sí y por lo tanto describen factores independientes de la molécula, por lo que también se concluye que mediante el uso de redes neuronales artificiales se puede obtener una predicción confiable y lo más exacta posible.

Se encontró que los grupos donores y aceptores de puentes de hidrógeno tienen una alta influencia en la inhibición enzimática puesto que presentaron los mejores resultados en la predicción computacional. Además, la asociación entre acoplamiento molecular y QSAR nos permitió la validación de que la presencia de grupos aromáticos y ciclos voluminosos favorecen la energía de afinidad y disminuyen los valores de IC₅₀. De manera consiguiente se encontró que la molécula con mejor perfil es la número 71 ((1-(3,4-dihidroxifenetil)-3-fenilurea).

Finalmente, se concluye que se realizó una síntesis exitosa obteniendo como producto (1-(3,4-dihidroxifenetil)-3-fenilurea) confirmado mediante resonancia magnética nuclear, por lo que se determina que esta ruta sintética es útil para la obtención de ureas disustituidas de manera asimétrica, *sin* embargo se debe mejorar el proceso de purificación ya que es evidente la presencia de solvente en la muestra final, así como otros residuos del proceso de síntesis. Adicionalmente es importante recalcar la utilidad de la cromatografía en capa delgada en el seguimiento de la reacción y la identificación de la formación de distintos productos de síntesis y por tanto, agotamiento de reactivos de partida.

9. Recomendaciones

Para futuros trabajos de investigación relacionados al cribado virtual y síntesis orgánica recomendamos continuar trabajando de la mano del clustering el cual facilitará los procesos de acoplamiento molecular y permitirá una mayor agilidad a la hora de encontrar valores de afinidad en una gran cantidad de moléculas, así como también disminuirá el error asociado a la aleatoriedad del dato. A su vez es importante tener en cuenta que la utilización de una red neuronal entrenada y validada previamente como la utilizada en este trabajo es de gran ayuda para la estandarización de la metodología QSAR y la confiabilidad de los resultados que esta arroja.

En materia de síntesis se recomienda perfeccionar la técnica de purificación de forma que se pueda garantizar que los productos de síntesis sean obtenidos de manera eficaz y evitar la pérdida de producto en el proceso, se propone realizar un filtro de celita que permita filtrar de manera eficiente el catalizador utilizado en la reacción, así como también evaluar disminuir la polaridad de la fase móvil en el proceso de separación para asegurar la salida del producto de la columna cromatográfica, o bien, evaluar dentro de la serie eluotrópica cuál es la polaridad ideal para este tipo de separación. A su vez en búsqueda de mejorar el proceso se recomienda alargar los tiempos de reacción para garantizar, junto al seguimiento cromatográfico, la reacción completa de los reactivos.

En el proceso de caracterización se recomienda complementar la identificación del compuesto con otros métodos de elucidación como la espectroscopia infrarroja y de masas, para una caracterización más precisa y también validar el proceso de síntesis. Para este punto también se recomienda evitar al máximo la presencia de solventes en la muestra, para facilitar el proceso de elucidación.

10. PARTE EXPERIMENTAL

Inicialmente se realizó una caracterización de la anilina como reactivo de partida, puesto que la que se tenía en el laboratorio se encontraba de manera impura, por lo que fue necesario destilar su fracción pura. De esta forma se tomó un espectro infrarrojo antes, mostrado en la figura 19a y después de la destilación y este último fue comparado con la literatura (ver figura 19b) para confirmar la obtención de anilina pura y así asegurar un proceso de síntesis eficaz.

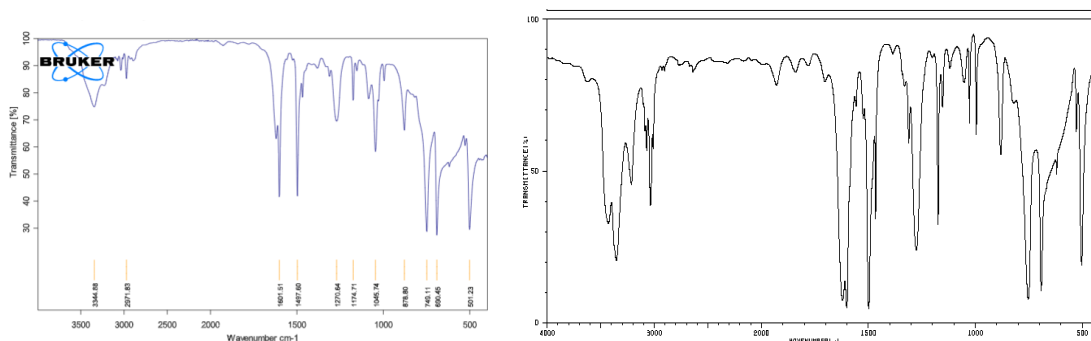


Figura 19. a) Espectro Infrarrojo de la anilina destilada tomado en el laboratorio. **b)** Espectro Infrarrojo de la anilina reportada en literatura. (SDBS, 2022)

De esta manera se observa entonces la presencia de los principales picos característicos de los grupos funcionales y especies químicas de la anilina siendo el principal el presente en 3500cm^{-1} correspondiente al $-\text{NH}_2$, concordando con el obtenido de la literatura, además de los picos correspondientes a la absorción de su estructura aromática, siendo estos los presentes entre 680 y 880 y 1475 y 1600cm^{-1} .

Adicionalmente también se tomó el espectro para la urea como reactivo de partida, para la confirmación de su presencia y pureza respecto a la almacenada en el laboratorio (ver figura 20a) y se comparó con lo observado en literatura (ver figura 20b). Para la urea se encontró la presencia de los picos principales correspondientes a $-\text{NH}_2$ ubicados en la región cercana a 3500cm^{-1} , siendo dos picos delgados y alargados presentes en ambos espectros. Además, también se encontró el pico correspondiente al grupo carbonilo presente en 1680cm^{-1} debido a la formación de las amidas, el cual también concuerda con lo encontrado en la bibliografía. De esta manera se confirma entonces la presencia de los reactivos de partida de manera pura para asegurar un correcto proceso de síntesis.

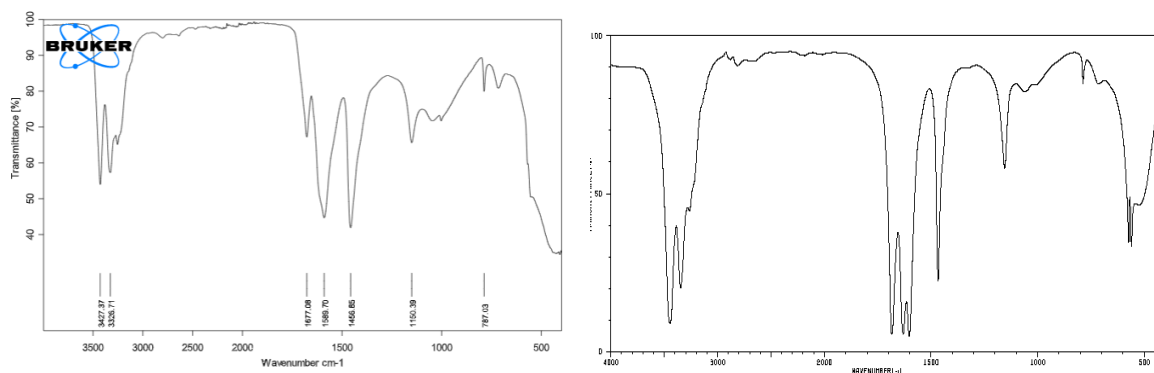


Figura 20. a) Espectro Infrarrojo de la urea disuelta en tolueno tomado en el laboratorio. **b)** Espectro Infrarrojo de la urea reportada en literatura. (SDBS, 2022)

Una vez realizada la síntesis y purificado el producto de reacción, este es llevado a resonancia magnética nuclear en donde se obtiene el espectro que se muestra a continuación.

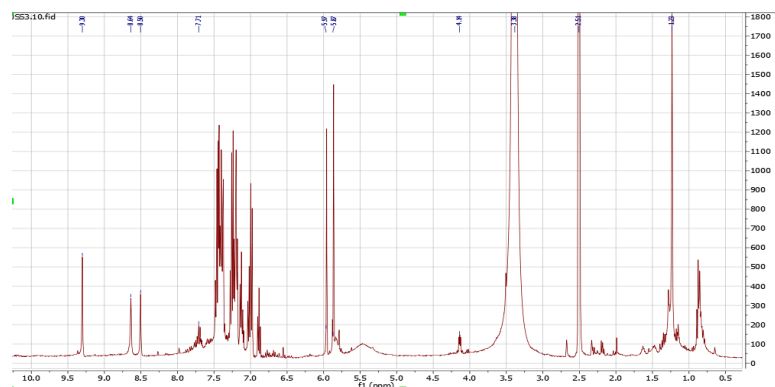


Figura 21. Resonancia magnética nuclear de protón del producto de síntesis (1-(3,4-dihidroxifenetil)-3-fenilurea) posterior a su purificación, utilizando DMSO deuterado como disolvente.

En primer lugar se realizó la comparación de los desplazamientos obtenidos en el espectro para el producto de síntesis y los teóricos existentes en bases de datos para los reactivos de partida utilizados y los diferentes solventes. Primeramente se encontró según la literatura revisada (SDBS, 2022) que los desplazamientos característicos de la urea (5,41 ppm) no se encuentran presentes en el espectro, por lo que se asume su correcta disustitución causando el cambio de ambiente químico de los protones ureicos, y por tanto cambiando su desplazamiento como se describe en Becerra, L. et al. Adicionalmente, se revisaron los desplazamientos correspondientes a la dopamina, siendo que esta no presenta picos referentes a los hidroxilos en la región cercana a nueve, mientras que, como es observado en la simulación y mencionado en estudios similares (Becerra L, et al. 2014) los hidroxilos presentes en el producto de síntesis sí presentan un pico característico, por lo que se establece que la molécula de dopamina reaccionó para formar un producto, conservando los desplazamientos de los hidrógenos que no varían su ambiente

químico. De la misma manera para la anilina observamos que el pico correspondiente a su grupo amina sufrió un cambio de desplazamiento debido a la formación de una urea disustituida que cambió su ambiente químico, el cual según lo planteado teóricamente coincide con la literatura y lo simulado, mientras que sus picos característicos de regiones aromáticas se mantienen en la zona cercana a 7ppm.

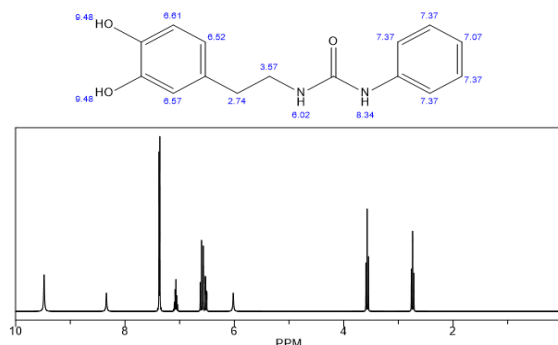


Figura 22. Simulación de resonancia magnética nuclear de protón de la 1-(3,4-dihidroxifenil)-3-fenilurea, realizada en ChemDraw.

Adicionalmente observando la simulación realizada, de primera mano se observa en el espectro experimental los picos correspondientes a los disolventes utilizados en el proceso de síntesis y también los requeridos para el análisis del equipo, siendo el más presente el DMSO que presenta un desplazamiento en 2,54ppm, y el acetato de etilo, utilizado en su purificación, que presenta un desplazamiento en 1,18ppm, 2,0ppm y 4,13ppm, no presentes en la simulación del compuesto de interés, mientras que sí en los consultados en la literatura de dichas sustancias como estándares (SDBS, 2022). Ahora bien, según los estudios realizados por Becerra, L. et al., el desplazamiento correspondiente al nitrógeno ureico gráficamente en la parte derecha, unido a la sustitución correspondiente a la anilina, está presente en 8,66 ppm, coincidiendo con el obtenido de manera experimental como se observa en la figura 21, correspondiente a un singlete que integra para un sólo protón, lo que también es similar a lo simulado en ChemDraw correspondiente a un desplazamiento de 8,34. De otra parte observamos la presencia del desplazamiento correspondiente a los protones de los grupos hidroxilo provenientes de la dopamina, ubicados geográficamente en la parte izquierda de la molécula, presente en 9,30 ppm como un singlete que integra para 2 protones, que coincide de manera similar con el desplazamiento observado en la simulación realizada. También podemos observar presente el multiplete en 3,37 ppm correspondiente al -CH₂ de la cadena alifática proveniente de la dopamina, así como un singlete presente en 5,90 ppm correspondiente a la otra amina perteneciente a la urea, lo cual también coincide con la simulación y con lo obtenido en los estudios similares (Becerra L, et al. 2014). Finalmente, observamos en la región aromática desplazamientos en

forma de multipletes correspondientes a las dos estructuras aromáticas que posee la molécula, presentando desplazamientos mayormente en la región entre 6,6 y 7,3ppm, también coincidentes con lo esperado en la simulación. De esta forma se identificaron todos los picos presentes en el espectro obtenido, ubicando principalmente los correspondientes al producto de interés y confirmando así su formación con la síntesis propuesta y desarrollada, así como también la presencia de impurezas provenientes principalmente de disolvente y residuos de reacción, debido a la necesidad de mejora y validación del proceso de purificación.

11. Referencias bibliográficas

- Alexander, D. L. J., Tropsha, A., & Winkler, D. A. (2015). Beware of R2: Simple, unambiguous assessment of the prediction accuracy of QSAR and QSPR models American Chemical Society (ACS). doi:10.1021/acs.jcim.5b00206
- Ames, B. N., Gurney, E. G., Miller, J. A., & Bartsch, H. (1972). Carcinogens as frameshift mutagens: Metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 69(11), 3128-3132. doi:10.1073/pnas.69.11.3128
- An, G., Lee, K. S. S., Yang, J., & Hammock, B. D. (2020). *Target-Mediated drug Disposition—A class effect of soluble epoxide hydrolase inhibitors* Wiley. doi:10.1002/jcph.1763.
- Análisis web (2012) Heat map 2. Retrieved from <http://analisis-web.es/wp-content/uploads/2012/01/heatmap2.png>
- Apostolova, L. G. (2016). Alzheimer disease. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology. Lippincott Williams and Wilkins*, doi:10.1212/CON.0000000000000307
- Becerra, L., & Pimienta, H. (2009). Apoptosis neuronal: la diversidad de señales y de tipos celulares. *Colombia Médica*, 40(1) Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28340116>
- Becerra, L., Ojeda, A., Gamba, D., (2014) Transamidation of Carboxamides Catalyzed by Fe(III) and Water. Laboratory of Organic Synthesis, Bio and Organocatalysis, Chemistry Department, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. *The Journal of Organic Chemistry JOC* 2014, 79, 4544–4552. doi: dx.doi.org/10.1021/jo500562w
- Bhagwati, S., & Siddiqi, M. I. (2020). Identification of potential soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitors by ligand-based pharmacophore model and biological evaluation. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 38(16), 4956-4966. doi:10.1080/07391102.2019.1691659
- Burmistrov, V., Morisseau, C., D'yachenko, V., Karlov, D., Butov, G. M., & Hammock, B. D. (2020). Imidazolidine-2,4,5- and pirimidine-2,4,6-triones – new primary pharmacophore for soluble epoxide hydrolase inhibitors with enhanced water solubility. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(3), 126908. doi:10.1016/j.bmcl.2019.126908
- Burmistrov, V., Morisseau, C., Pitushkin, D., Karlov, D., Fayzullin, R. R., Butov, G. M., & Hammock, B. D. (2018). Adamantyl thioureas as soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(13), 2302-2313. doi:10.1016/j.bmcl.2018.05.024
- Caio, M., Barros De Oliveira, Rioko, K., Sakata, Tsa, Machado Issy, A., Salomão, R. (2011). *Rev bras anesthesiol cytokines and pain*. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21474032/>
- Center for Computational Structural Biology (2018) Autodock Vina Manual. Retrieved from <https://vina.scripps.edu/manual/>
- Cornell, T. Hutchisson. G (2015) Avogadro's Manual. Retrieved from <https://avogadro.cc/docs/>
- Chiyo, N., Ishii, T., Hourai, S., & Yanagi, K. (2011). RCSB PDB - 3ANS: Human soluble epoxide hydrolase in complex with a synthetic inhibitor. Protein Data Bank. Retrieved from <https://www.rcsb.org/structure/3ANS>
- Das Mahapatra, A., Choubey, R., & Datta, B. (2020). *Small molecule soluble epoxide hydrolase inhibitors in multitarget and combination therapies for inflammation and cancer* MDPI AG. doi:10.3390/molecules25235488
- Díaz Díaz, D., Munuera, L., & Finn, M. G. Hacia la búsqueda de nuevos electrófilos: formamidinas de urea.106(2) Retrieved from <http://hdl.handle.net/10261/47866>
- Diciembre, B. D. C., Por, E., Álzate, C., Cesar, J., Cárdenas, M., , M., . . . Alberto, S. *Boletines poblacionales 1 : Personas adultas mayores de 60 años oficina de promoción social ministerio de salud y protección social I-2020*. Retrieved from

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/PS/280920-boletines-poblacionales-adulto-mayorl-2020.pdf>

- Doshi, J. (2021) Webinar - Introduction to Molecular Docking. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=NLrjHq89fYM>
- Drug Bank. (2021). Drug bank. Retrieved from <https://go.drugbank.com/drugs>
- Griñán-Ferré, C., Codony, S., Pujol, E., Yang, J., Leiva, R., Escolano, C., . . . Galdeano, C. (2020). Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase as a new therapy for alzheimer's disease. *Springer*, Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00854-1>
- Grupo Gestión Integrada para la Salud Mental. (2017). *Boletín de salud mental demencia.* (). Bogotá, Colombia. Retrieved from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENT/Boletin-demencia-salud-mental.pdf>
- Hornak, J. P. (2020). The Basics of MRI. The Basics of MRI. Retrieved from <https://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/inside.htm>
- Huerta, E. (2018). Tratamientos para el alzheimer: ¿cuán efectivos son? Retrieved from <https://www.aarp.org/espanol/salud/salud-cerebral/info-2018/efectividad-tratamientos-alzheimer-elmer-huerta.html>
- I. Baskin, I., & Varnek, A. (2013). Building a chemical space based on fragment descriptors. *Advances in combinatorial chemistry & high throughput screening* (pp. 36-59) BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. doi:10.2174/9781608057450113010005 Retrieved from <http://www.eurkaselect.com/openurl/content.php?genre=book&isbn=9781608057450&spage=36>
- Jeffrey, George A. (1997) An introduction to hydrogen bonding, Oxford University Press.
- Lopez, O., & DeKosky, S. (2003). Neuropatología de la enfermedad de alzheimer y del deterioro cognitivo leve. *Rev Neurol* 2003;37 (02), , 155-163. Retrieved from doi: 10.33588/rn.3702.2002441
- Mahlooji, I., Shokri, M., Manoochehri, R., Mahboubi-Rabbani, M., Rezaee, E., & Tabatabai, S. A. (2020). Discovery of phthalimide derivatives as novel inhibitors of a soluble epoxide hydrolase. *Archiv Der Pharmazie (Weinheim)*, 353(8), 2000052-n/a. doi:10.1002/ardp.202000052
- Martínez, E. (2005) Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Real Centro Universitario «Escorial-María Cristina» San Lorenzo del Escorial. Anuario Jurídico y Económico Escurialense*, X X X V I I I (2005) 315-332 / I S S N:11 3 3 - 3 6 7 7
- McElroy, N. R., Jurs, P. C., Morisseau, C., & Hammock, B. D. (2003). QSAR and classification of murine and human soluble epoxide hydrolase inhibition by urea-like compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(6), 1066-1080. doi:10.1021/jm020269o
- MedChemExpress (2021) GSK2256294A (Synonyms: GSK 2256294). Spain. Retrieved from: <https://www.medchemexpress.com/GSK2256294A.html>
- Menacho Chiok, C. H. (2014). Modelos de regresión lineal con redes neuronales. *Anales Científicos*, 75(2), 253. doi:10.21704/ac.v75i2.961
- Montañó, J. (2002) Redes neuronales artificiales aplicadas al análisis de datos. Universitat de les illes balears. Facultat de Psicologia, Palma de Mallorca, España.
- Morales, J. (2020). Llevar un modo de vida sano ayuda a reducir el riesgo de padecer demencia. Retrieved from https://www.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=3185:llevar-un-modo-de-vida-sano-ayuda-a-reducir-el-riesgo-de-padecer-demencia&Itemid=562
- Morales, J. (2019) Modelamiento In silico de nuevos antagonistas del receptor de la angiotensina II (ARA-II) como potenciales fármacos teóricos para el tratamiento de la hipertensión. Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Pique, M. E., Lindy, W. &, Lindstrom, &, Huey, R., . . .

Autodocktools. *User guide AutoDock version 4.2 updated for version 4.2.6 automated docking of flexible ligands to flexible receptors*

- Newman, J. W., Morisseau, C., Harris, T. R., & Hammock, B. D. (2003). The soluble epoxide hydrolase encoded by EPXH2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 100(4), 1558-1563. doi:10.1073/pnas.0437724100
- Pérez Ruiz, A. O., Cartaya Padrón, L., Valencia Fernández, V., Sanjurjo Gámez, V., & Ilisástigui Ortueta, T. (1998). Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Revista Cubana De Estomatología*, 35(2), 56-61. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75071998000200004&lng=en&tlng=en
- Shen, H. C. (2010). Soluble epoxide hydrolase inhibitors: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(7), 941-956. doi:10.1517/13543776.2010.484804
- Silva, M. V. F., Loures, Cristina de Mello Gomide, Alves, L. C. V., de Souza, L. C., Borges, K. B. G., & Carvalho, M. d. G. (2019). Alzheimer's disease: Risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 33. doi:10.1186/s12929-019-0524-y
- Spectral Database for Organic Compounds SDBS (2022) Spectral Database for Organic Compounds. Retrieved from https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi
- Statistics.com; third edition of data mining for business analytics published. Computers, Networks & Communications. Jun 09, 2016:342. Retrieved from: <https://search.proquest.com/docview/1793365617>.
- Tam, J. (2013). *Learning analytics applied to education inteligencia y analítica aplicada en educación (spanish title of the conference made in spanish)* Unpublished. doi:10.13140/rg.2.1.3619.8488
- Tanaka, D., Tsuda, Y., Shiyama, T., Nishimura, T., Chiyo, N., Tominaga, Y., . . . Kusunose, N. (2011). A practical use of ligand efficiency indices out of the fragment-based approach: Ligand efficiency-guided lead identification of soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(3), 851-857. doi:10.1021/jm101273e
- Thornton, M. R. (1998). *Química Organica (5.a ed.)*. ADDISON WESLEY LONGMAN/PEARSON. Retrieved from <https://www.rachidscience.com/2020/06/libro-quimica-organica-edicion-5ta.html>
- Universidad De Antioquia. (SF). Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, RMN. Universidad De Antioquia. https://www.udea.edu.co/wps/portal/udea/web/generales/interna!/ut/p/z0/fY49D4lwEib_igyMphUM4kiIMSMmhjoYo62ahV60Bbiz7fixOJ2T-79loxUhGmY1B2cQg2t55ol13SfR5tsS8vjqchpluTZYXe-IFEakYKw_wKfoJ7DwDLCOGon345UPRoH7SgkhBTskh7Yyd-t9CSt81u4CngcNLEOaQsNGnBoFNqVXCI9M-BFZuRuNLN_LtFK4BeE_wEHgXZhXZtOk_7F6g85IPxK/
- Wang, S. (2003). *Interdisciplinary Computing in Java Programming: 743 (Softcover Reprint of the Original 1st 2003 ed.)*. Springer. Retrieved from https://www.abebooks.com/9781461350460/Interdisciplinary-Computing-Java-Programming-Springer-1461350468/plp?cm_sp=plped-_1-_image
- Wang, X., Ramírez-Hinestrosa, S., Dobnikar, J., Frenkel, D., , W., & , P. (2019). The lennard-jones potential: When (not) to use it. † doi:10.1039/cXCP00000x/
- World Health Organization. (2020). Dementia. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Wu, Q., Cai, H., Song, J., & Chang, Q. (2017). The effects of sEH inhibitor on depression-like behavior and neurogenesis in male mice. *Journal of Neuroscience Research*, 95(12), 2483-2492. doi:10.1002/jnr.24080