



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

ACERCAMIENTO VERDE A LA QUÍMICA DE LA PEREZONA

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA

M. en C. René Gerardo Escobedo González

Tutor: Dr. René Miranda Ruvalcaba

Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, UNAM

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, noviembre de 2018.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**ACERCAMIENTO VERDE A LA QUÍMICA DE LA PEREZONA**

**T E S I S**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. René Gerardo Escobedo González**

**Tutor: Dr. René Miranda Ruvalcaba**

**Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, UNAM**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, noviembre de 2018.

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. René Miranda Ruvalcaba en el Laboratorio de Estudios sobre Química Verde L-122 de la Sección de Química Orgánica del Departamento de Ciencias Químicas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México

## DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico en primer lugar a mi esposa Teresa Cordero y a mis hijos: Paloma Ximena, Sofía Valeria y Rodrigo Gabriel por todo su apoyo a lo largo de los cuatro años de la formación doctoral.

Dedico también este trabajo a mis padres y mis abuelos por el apoyo que me brindaron en sus respectivos momentos, que me permitieron llegar a la conclusión de estos estudios. Así mismo, brindo este trabajo a mis suegros Rosalio Cordero y Guadalupe Cisneros por estar al pendiente de mi familia en los cuatro años que estuve en el doctorado.

Finalmente dedico este trabajo a todas aquellas personas que han contribuido a mi formación profesional y que han compartido sus conocimientos y experiencias, en primer lugar, a aquellos que me apoyaron en la etapa doctoral, al Dr. René Miranda, la Dra. Inés Nicolás, el Dr. Julián Cruz y la Dra. Claudia Vargas. Adicionalmente, agradezco a los doctores Carlos Martínez y Perla García del cuerpo académico de materiales de la UACJ por abrirme las puertas de sus laboratorios. Asimismo, al Dr., Emilio Álvarez Parrilla y la Dra. Laura De la Rosa que desde la licenciatura me han brindado su apoyo. Además, quisiera ofrecer este trabajo a la memoria del Ing., Carlos Villar Nava porque gracias a él me encause en el área de las ciencias químicas. Por último, un agradecimiento y dedicatoria del presente a la Dra. Katya Carrasco y el Dr. Alejandro Martínez por haber creído en mi y haberme ayudado en la medida de lo posible.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado mediante las becas nacionales para estudios de doctorado, beca 249922.

Se agradece también al proyecto UNAM-PAPITT-IN221514-3 por el apoyo brindado para la realización de la parte experimental del presente trabajo de tesis doctoral. En relación con los estudios de carácter teórico se agradece a DGTIC-UNAM a través del proyecto LANDCAD-UNAM-DGTIC-165 por las horas de cómputo brindadas.

Se brinda un amplio agradecimiento al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma por permitirme desarrollar los estudios de Doctorado en dicho programa.

Al Dr. René Miranda Ruvalcaba se le extiende un amplio reconocimiento por su gran apoyo, la asesoría que me brindo, así como todos los conocimientos que compartió conmigo durante mi estancia en el programa de Doctorado.

Al Dr. Julián Cruz Olivares de la UAEMex se le agradece por el apoyo brindado para los estudios realizados en dióxido de carbono supercrítico.

A la Dra. María Inés Nicolás Vázquez de la FES Cuautitlán por su apoyo y los conocimientos compartidos para realizar los estudios de carácter teórico, se le agradece ampliamente.

A la Dra. Claudia Lucia Vargas Requena de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, se le agradece el permitirnos realizar con ella las pruebas de

citotoxicidad de los compuestos sintetizados, así como su asesoría en los estudios teóricos de interacción en las vías de apoptosis.

Al Dr. Juan Manuel Aceves Hernández por su apoyo en la caracterización fisicoquímica y los estudios de acoplamiento molecular.

Al Dr. Juan Nava Serrano del Instituto Politécnico Nacional, por su apoyo en la recolección de los especímenes de *Acourtia* empleados en el presente trabajo de tesis doctoral, muchas gracias.

Al Dr. Joel Omar Martínez por el apoyo en las etapas experimentales del presente trabajo.

Se agradece al Dr. Francisco Javier Pérez Flores y al M. en C. Vladimir Carranza Téllez, por su ayuda en la adquisición de los espectros de EMIE y HRMS.

Se agradece al técnico académico Draucin Jiménez por el apoyo brindado taller de soplado de vidrio, por el apoyo proporcionado en la adquisición y reparación del material de vidrio empleado durante la experimentación.

A los miembros del jurado, los doctores: Leovigildo Quijano, Rafael Castillo Bocanegra, José Guadalupe Trujillo Ferrara, David Morales Morales y José Alfredo Vázquez Martínez por las sugerencias y contribuciones realizadas a este trabajo.

# CONTENIDO

CAPÍTULO I: SINOPSIS .....	13
I.1 Resumen Gráfico .....	13
I.2. Resumen .....	14
I.3. Abstract .....	15
I.4. Introducción .....	16
CAPÍTULO II: GLOSARIO .....	23
II.1. Estructura de los productos obtenidos: .....	23
II.2. Acrónimos, abreviaciones y definiciones.....	24
II.3. Índice de Esquemas .....	29
II.4. Índice de Figuras .....	30
II.5. Índice de Tablas .....	34
II.6. Índice de Espectros .....	37
CAPÍTULO III: ANTECEDENTES .....	38
III.1. Química Verde como vía de contribución a la sostenibilidad .....	38
III.1.1 Principios de la Química Verde <sup>7,8</sup> . .....	40
III.1.2. Medios alternos para efectuar una reacción.....	42
III.1.3. Fuentes alternas para activar una reacción. ....	46
III.1.4. Catálisis .....	49
III.2. Productos naturales .....	52
III.2.1 Perezona .....	53
CAPÍTULO IV: FILOSOFÍA .....	59
IV.1. Planteamiento del problema .....	59
IV.2. Hipótesis .....	59
IV.3. Objetivos .....	60
IV.3.1. Objetivo general.....	60
IV.3.2. Objetivos particulares .....	60
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSION.....	62
V.1. Extracción verde de la perezona mediante el uso de fuentes alternas de activación y CO <sub>2</sub> supercrítico como disolvente .....	62
V.1.1. Extracción convencional de perezona. ....	63
V.1.2. Extracción de perezona mediante el uso de CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	64



V.1.3. Estudio comparativo de la extracción de perezona mediante el uso de fuentes alternas de activación. ....	74
V.2 Isomerización de la perezona mediante un acercamiento verde .....	83
V.2.1 Obtención convencional de la isoperezona.....	83
V.2.2 Obtención de la isoperezona mediante estrategias verdes.....	84
V.3. Caracterización fisicoquímica teórico-experimental de la perezona e isoperezona.....	88
V.3.1 Caracterización por difracción de rayos X de polvos. ....	88
V.3.2. Caracterización por análisis térmico de perezona e isoperezona. ....	90
V.3.3. Caracterización teórico-computacional de la perezona y su acción sobre la caspasa-3.....	92
V.4. Acercamiento verde para la producción de indolilquinonas derivadas de perezona e isoperezona.....	110
V.4.1. Producción verde de indolilquinonas.....	111
V.4.2. Evaluación citotóxica de las indolilquinonas sintetizadas.....	118
V.4.3. Estudio teórico- cuántico de las moléculas sintetizadas .....	121
V.4.4. Relación estructura-función de las indolilquinonas sintetizadas: estudios cuánticos computacionales, acoplamiento molecular y quimio-informático...	126
V.5. Acercamiento verde a la síntesis de derivados de perezona e isoperezona por oxidación del doble enlace C12-C13.....	149
V.5.1.a. Oxidaciones clásicas sobre el enlace C12-C13 de la perezona e isoperezona.....	150
V.5.1.b. Oxidaciones-verdes, para C12-C13 en perezona e isoperezona....	151
V.5.2. Caracterización espectroscópica de los productos de oxidación C12-C13. ....	156
V.5.3. Evaluación citotóxica de las moléculas objetivos.....	162
V.5.4. Estudio in silico de las moléculas 10-17.....	165
V.5.5. Relación estructura-función de los derivados por oxidación C12-C13 mediante estudios cuánticos computacionales, acoplamiento molecular y quimio informáticos.....	178
<b>CAPÍTULO VI: SECCIÓN EXPERIMENTAL .....</b>	<b>201</b>
VI.1. Materiales, equipos y reactivos.....	201
VI.1.1. Materiales y Reactivos .....	201
VI.1.2. Equipos .....	201
VI.2. Extracción de perezona .....	202
VI.2.1 Extracción convencional .....	202
VI.2.2 Extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico.....	203

VI.2.3 Extracción con fuentes no convencional .....	204
VI.2.4 Cuantificación de perezona en los extractos.....	205
VI.3. Isomerización de la perezona .....	205
VI.3.1. Isomerización por el método clásico .....	205
VI.3.2. Isomerización por activación con microondas.....	206
VI.3.3. Isomerización por activación triboquímica mediante molienda con esferas a alta velocidad. ....	206
VI.3.3. Isomerización mediante el uso de dióxido de carbono supercrítico. ..	206
VI.4. Caracterización fisicoquímica de la perezona e isoperezona .....	207
VI.4.1 Difracción de rayos X de polvos.....	207
VI.4.2 Calorimetría de barrido diferencial y análisis térmico-gravimétrico .....	207
VI.5. Obtención de indolilquinonas por métodos verdes .....	207
VI.5.1. Experimentos usando condiciones de activación térmica convencional .....	207
VI.5.1. Experimentos usando condiciones de activación no convencional ....	208
VI.6. Síntesis de moléculas por oxidación del enlace C12-C13 de la perezona e isoperezona.....	208
VI.6.1 obtención de epóxidos de perezona e isoperezona.....	208
VI.6.2 obtención de acetónidos de perezona e isoperezona.....	209
VI.6.3 obtención de dioles monoacetilados de perezona e isoperezona.....	209
VI.6.4 obtención de dioles de perezona e isoperezona.....	209
VI.7. Estudios de citotoxicidad.....	210
VI.7.1 Ensayo de citotoxicidad por la técnica del bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio (ensayo MTT).....	210
VI.7.2 Determinación de IC50 .....	211
VI.8. Estudios de química teórica computacional .....	211
VI.8.1 Estudios de química teórica computacional a nivel cuántico .....	211
VI.8.2 Estudios teóricos de acoplamiento molecular .....	212
VI.8.3 Estudios quimio-informáticos de las moléculas obtenidas .....	213
REFERENCIAS.....	215
CONCLUSIONES.....	247
VII.1. Conclusión general .....	247
VII.1. Conclusiones particulares .....	248
PERSPECTIVAS.....	250
APÉNDICE .....	252

A.I. Clasificación del espécimen de <i>Acourtia platyphylla</i> .....	253
A.II. Selección de espectros de los productos .....	255
A.III. Tablas de propiedades calculadas .....	281

## PRODUCCIÓN ACADÉMICA

Es importante destacar que con los resultados del presente trabajo de tesis se generaron los productos siguientes:

- **2014:** Presentación del trabajo: “**Aportaciones al estudio de la perezona y algunos de sus derivados**”, *XXIII Congreso Nacional de Educación Química Farmacéutica Biológica Y XIX Reunión Anual De Estudiantes De Farmacia* en la Universidad La Salle, en la Ciudad de México.
- **2015:** Presentación del trabajo: “**Solubilidad de la perezona en CO<sub>2</sub> supercrítico**” en el *XXX Congreso Nacional de Termodinámica* en Pachuca, Hidalgo del 7 al 11 de septiembre del 2015
- **2015:** En el *50° Congreso Mexicano de Química* celebrado del 7 al 10 de octubre en Querétaro se presentaron los trabajos:
  - “**Estudio teórico de la reactividad de nuevas moléculas derivadas de perezona e isoperezona como indicador de una posible actividad biológica**”
  - “**Caracterización espectroscópica teórico-experimental (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) de nuevos derivados de la perezona**”
  - “**Adiciones tipo Michael de índol a la perezona y otras quinonas-naturales, mediante el protocolo de la Química Verde; comparación de diversos métodos de obtención**”
- **2015:** Presentación del trabajo: “**Estudio computacional de indolilquinonas derivadas de la perezona y otras quinonas**” en la *XIV Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica* en Tonalá, Jalisco del 18 al 21 de noviembre del 2015
- **2016:** *51° Congreso Mexicano de Química* celebrado del 29 de septiembre al 1 de octubre en Pachuca, Hidalgo de los trabajos:
  - **Extracción de perezona de *Acourtia cordata*, empleando fuentes alternativas de activación**

- **Estudio comparativo de la extracción de perezona empleando diferentes fuentes de activación.**

En este mismo sentido, los resultados permitieron la generación de cuatro publicaciones en revistas internacionales e indizadas en *Journal Citation Reports*:

**2017: “*In silico* study of the pharmacologic properties and cytotoxicity pathways in cancer cells of various indolyquinone analogues of perezona”** Escobedo-González, R.; Vargas-Requena, C.L.; Moyers-Montoya, E.; Aceves-Hernández, J.M.; Nicolás-Vázquez, M.I.; Miranda-Ruvalcaba, R. *Molecules* **2017**, *22*, 1060.

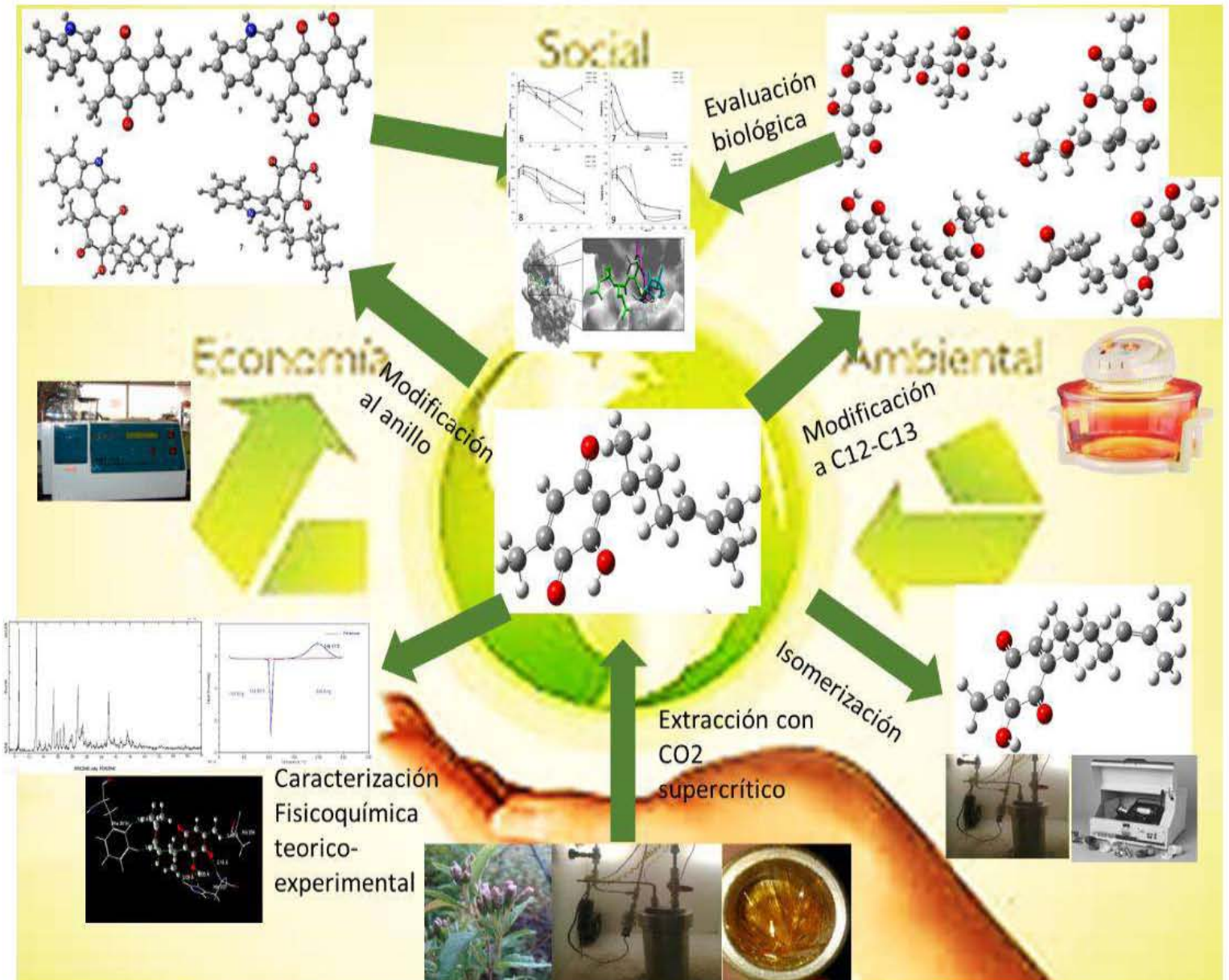
**2016: “Green production of indolyquinones, derivatives of perezona and related molecules, promising antineoplastic compounds”** Escobedo-González R., Pérez H., Nicolás-Vázquez M.I., Martínez J., Gómez G., Nava J., Carranza V., Vargas C., Miranda R. *Journal of Chemistry*, Volume 2016, **2016**, 1-10, doi: 10.1155/2016/3870529.

**2016: “Infrared irradiation: toward green chemistry, a review”** Escobedo R., Miranda R., Martínez J. *International Journal of Molecular Science*. *17*, **2016**, 453, 1-26. doi:10.3390/ijms1704453.

**2015: “Characterization and comparison of perezona with some analogues. Experimental and theoretical study”** Escobedo-González R., Bahena L., Arias Téllez J.L., Hinojosa Torrés J., Miranda Ruvalcaba R., Aceves Hernández J.M., *Journal of Molecular Structure*, 1097, **2015**, 98-105. doi: 10.1016/j.molstruc.2015.05.016.

# CAPÍTULO I: SINOPSIS

## I.1 Resumen Gráfico



## I.2. Resumen

En este trabajo se respondió al llamado de la UNESCO sobre el fortalecimiento de la educación para el desarrollo sostenible (EDS) y la necesidad de que las instituciones aborden este aspecto; lo anterior incidiendo en el protocolo de la Química Verde. En este sentido, esta tesis consistió en un acercamiento verde a la química de la perezona, primer metabolito aislado en el nuevo mundo, producto natural empleado como materia prima renovable y con amplia gama de efectos farmacológicos. En primera instancia, se realizó un estudio sistematizado de la solubilidad de la perezona en CO<sub>2</sub> supercrítico, posteriormente en relación a estos resultados se establecieron las condiciones adecuadas para la extracción de dicho compuesto, a partir del espécimen *Acourtia platyphylla* de forma complementaria, se compararon los resultados de esta extracción con los de estudios previos de nuestro grupo de trabajo generados mediante el uso de otras fuentes de activación alternas (irradiaciones electromagnéticas de microondas e infrarrojo, y ondas mecánicas como el ultrasonido) y al tratamiento térmico clásico-mantilla de calentamiento. Asimismo, dado el potencial farmacológico de la molécula objetivo y de su isómero (isoperezona), ambas fueron caracterizadas tanto mediante análisis fisicoquímicos como por estudios teóricos de acoplamiento molecular. Adicionalmente, se obtuvo isoperezona a partir de perezona, generando con ambos isómeros doce moléculas nuevas; todo lo anterior empleando recursos de la Química Verde, dando como resultado un conjunto de cuatro derivados indólicos, así como otro grupo de ocho derivados; modificando de forma oxidativa el doble enlace C12-C13 de cada isómero sesquiterpénico. Estos compuestos resultaron activos como agentes citotóxicos sobre células cancerosas. Finalmente, todos los productos nuevos fueron estudiados mediante metodologías de química cuántica-computacionales, quimio-informática y de acoplamiento molecular, siendo coherentes los resultados teóricos con los obtenidos experimentalmente.

### **I.3. Abstract**

This work is a response, to the UNESCO's request for the strengthening of education towards sustainable development (ESD) and the needs for institutions focused in this aspect; this requirement was covered throughout an appropriated incidence in the green chemistry protocol. In this sense, the thesis comprises a green approach to the chemistry of perezzone, the first secondary metabolite isolated in the new world, a natural product used as a renewable raw material and with a wide range of pharmacological effects. As a result, in a first instance the extraction of the title compound, from *Acourtia platyphylla*, was appropriately evaluated by the employment of the supercritical CO<sub>2</sub>; being important to highlight that an insightful study about its solubility is also offered; moreover, taking into account recent results, from our search group, a critical comparison with the develops obtained by means of alternative activating sources (infrared and microwave irradiations, in addition to ultrasound) *versus* the typical mantle heating, was performed. In addition, assuming the pharmacological potential of the target isomeric molecules, an important characterization of both by a set of physicochemical analysis and theoretical studies of molecular docking was also accomplished. Subsequently, the perezzone was transformed into isoperezzone employing green modes of reaction; it is also worth noting that these isomeric sesquiterpenes, in a next step, were used as substrates to generate twelve novel molecules, under the green chemistry protocol, thus: a set of four 3-indolyl derivatives, as well as, eight molecules achieved by oxidizing the double bond C12-C13 of perezzone and isoperezzone. In addition, the obtained products were evaluated as cytotoxic agents for cancer cells, all of them were active. Finally, the new compounds were studied using quantum-computational chemistry, chemio-informatics and molecular docking methodologies, the theoretical results were in agreement with those obtained experimentally.



#### **I.4. Introducción**

La Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, por sus siglas en inglés UNESCO, ha establecido el desarrollo sostenible como: “satisfacer las necesidades que se tienen en el presente efectuándose de manera que no se vean comprometidos los recursos para las generaciones futuras”, de tal modo, se ha considerado necesario aplicar y fortalecer una educación encaminada al desarrollo sostenible. Posteriormente, fue declarado por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) de 2005 a 2014, como la Década de la Educación para la Sostenibilidad, realizando en la ciudad de Nagoya Japón en noviembre de 2015 la Conferencia Mundial sobre Educación para el Desarrollo Sostenible (EDS), apremiando con esto, los esfuerzos encaminados a comprometer a las instituciones de educación superior, cuerpos académicos, de investigación y todo aquel organismo que se encargue de generar nuevo conocimiento a educar incidiendo en la sostenibilidad, exhortando a generar nuevo conocimiento transformativo, mediante el uso y promoción de la EDS.

Dentro de las contribuciones que se realizaron en la conferencia, la ciencia química a realizado diversos acercamientos y contribuciones que permiten que los profesionistas, docentes e investigadores de dicha área puedan desarrollar acciones atendiendo el Protocolo de Química Verde.

Para 1991, como consecuencia del programa de subvenciones a la investigación denominado “Rutas sintéticas alternativas para la prevención de la contaminación”, el cual proporciona apoyo por primera vez a proyectos de investigación sobre prevención de contaminación en síntesis química; en consecuencia, se establece a la Química Verde como una metodología cuyo principal objetivo es el diseño de productos y procesos que eliminen o minimicen la contaminación (prevenir el daño al entorno). e integrándolo a la Agencia de Protección Ambiental (EPA), en inglés conocida como Environmental Protection Agency.

Es importante señalar que la Química Verde se encuentra protocolizada mediante 12 principios, los cuales fueron propuestos en 1994 por P. Anastas y J.C.

Warner y dados a conocer de manera amplia en 1998; estos principios son los lineamientos para el desarrollo experimental dentro de la Química Verde, una química preventiva del daño al ambiente.

Por otro lado, los metabolitos secundarios, son compuestos aislados de diversos organismos de origen vegetal y especies pequeñas, que han formado parte de la medicina tradicional, siendo utilizados en tratamientos basados en la toma o aplicación de extractos naturales, algunos de ellos empleados en el desarrollo de una enorme variedad de fármacos. Muchas de estas moléculas han ganado importancia y popularidad en sus usos terapéuticos, por ser consideradas sustancias seguras, eficientes y con bajos costos, así como por la factibilidad de encontrar alternativas a la medicina convencional. En el caso particular de la medicina tradicional mexicana uno de los productos naturales de mucha importancia es la perezona (1).

La perezona, primer metabolito aislado en el nuevo mundo, es una quinona sesquiterpénica distribuida ampliamente en los especímenes vegetales del género *Acourtia* (anteriormente denominado *Perezia*), al respecto hay un importante registro de la raíz de especímenes del género "*perezia*" (en náhuatl pipitzahuac) en el códice Badiano de la Cruz con un gran número de propiedades farmacológicas: mencionándose laxante, analgésico, antipirético, astringente, catártico, cicatricial y regenerativo, así como diurético.

En relación con lo anteriormente comentado, en el presente trabajo, se ofrece una contribución a la química de la perezona, deseándose resaltar, valga lo reiterativo, que uno de nuestros intereses, como grupo de trabajo, conlleva la incidencia en la EDS.

En una primera etapa se fijó como objetivo el aislamiento de perezona de las raíces de un espécimen del género *Acourtia* mediante el uso de dióxido de carbono supercrítico; al respecto es muy importante resaltar que de manera previa fue necesario estudiar la solubilidad de la perezona "pura", en el fluido supercrítico, generándose los resultados siguientes: la determinación de las isotermas de solubilidad de la perezona en el dióxido de carbono supercrítico así como de las

condiciones óptimas de solubilidad (50°C, 1085 Bar). Concluido el estudio concerniente a la solubilidad de la perezona en CO<sub>2</sub>-supercrítico se procedió a evaluar la extracción de la molécula objetivo a partir del espécimen *Acourtia platyphylla*. La extracción de la perezona mediante CO<sub>2</sub>-supercrítico se realizó usando las condiciones óptimas previamente establecidas variando el tiempo de contacto entre el fluido supercrítico y el material vegetal, logrando un rendimiento de la extracción igual al método convencional a las 10 horas, siendo 1.818% de perezona por gramo de raíz, superándose este rendimiento a partir de las 12 horas de contacto y logrando un máximo a las 24 h de contacto de 2.495% para *A. platyphylla*, lo cual corresponde a 1.6 veces la cantidad de perezona obtenida por el método convencional, 1.653%, por gramo de raíz, valga lo reiterativo. se consideró pertinente incluir para una mejor panorámica de estudio-comparativo, “los resultados correspondientes a estudios previos de nuestro grupo de trabajo, trabajos de Tesis de Licenciatura donde el ponente de este trabajo actuó como co-asesor”; al respecto se presenta como apropiado este ejercicio porque es un punto relevante para la formación de un Doctorante, adquirir la capacidad de formar personal académico. Además, porque se presentan resultados complementarios con el tema objetivo de la investigación, así:

*“El uso de la irradiación con microondas como fuente de activación, llevo a la conclusión de que, con las condiciones de 100 W, 60 °C, 10 minutos se logra el mejor resultado, rendimiento del 2.995% por gramo de raíz, casi el doble de la cantidad obtenida por el método convencional. Respecto a la extracción promovida por irradiación con infrarrojo, 30 minutos en presencia de n-hexano como disolvente mostró el mejor resultado (6.27%) Con respecto al estudio para la extracción de la perezona por activación con el ultrasonido, presentó condiciones óptimas de extracción a 60 °C. y 1 hora de irradiación (6.62% de rendimiento por gramo de raíz) cuatro veces las cantidades obtenidas a partir del método convencional”.*

Los resultados permitieron concluir que el uso de la radiación infrarroja resultó el método de activación más selectivo y con mayor rendimiento.

Adicionalmente, el uso del CO<sub>2</sub>-supercrítico como disolvente permitió obtener un mayor rendimiento y selectividad hacia la perezona que el *n*-hexano.

Una vez concluidos los estudios de extracción de la perezona, se procedió a realizar tres series de transformaciones químicas con dicha materia prima, procurando incluir todas ellas en el Protocolo de la Química Verde: serie 1-isomerización, serie 2-varios indolil derivados, serie 3-varias oxidaciones en C12-C13.

En cuanto a la serie 1, se estudió la isomerización de la perezona mediante estrategias verdes, a fin de obtener la segunda materia prima de este trabajo, isoperezona (**2**). Al respecto, se sustituyó el método clásico de calentamiento a reflujo, por un método nuevo, el empleo de la molienda con esferas a alta velocidad, lográndose obtener el producto **2** con rendimientos equiparables al método convencional, pero resaltando una reducción considerable del tiempo de reacción. Adicionalmente, se realizaron pruebas de isomerización de la perezona empleando como disolvente de reacción el CO<sub>2</sub>-supercrítico, tomando en cuenta las condiciones de máxima solubilidad previamente obtenidas. Los resultados mostraron que a dichas condiciones el rendimiento fue del 10% después de 24 h de contacto.

Obtenidas la perezona e isoperezona fueron complementariamente caracterizadas mediante técnicas fisicoquímicas y de química teórica, tales como difracción de rayos X de polvo, calorimetría de barrido diferencial y análisis térmico gravimétrico. Así mismo se determinó, mediante un estudio de acoplamiento molecular, la interacción de ambas moléculas con la Caspasa-3, observándose mayor interacción entre la proteína y la perezona; concordando con los resultados experimentales que señalan un efecto citotóxico y apoptótico vía Caspasa dependiente e independiente de la perezona.

A su vez, teniendo como antecedente el efecto apoptótico de la perezona e isoperezona sobre células de cáncer y siendo conocido que los derivados indólicos, como las 3-indolilquinonas y los 3,3'-diindolilmetanos, presentan también efecto citotóxico se estableció como objetivo sintetizar las correspondientes

indolilquinonas derivadas de la perezona e isoperezona (segunda serie), mediante acercamientos verdes. La obtención de la 6-indolilperezona y la 3-indolilisoperezona (**6,7**) se llevó a cabo mediante una reacción entre las quinonas y el indol soportados en una arcilla, comercializada y de origen nacional conocida por sus siglas como Tonsil Acticil FF (TAFF); en ausencia de disolvente y siendo estudiada de manera comparativa la activación de la reacción mediante el uso de irradiación infrarroja, microonda, molienda con esferas de alta velocidad y la activación con mantilla de calentamiento. Los rendimientos más altos se lograron mediante la activación con microondas usando una temperatura de 100°C, 250W y un tiempo de irradiación de 10 minutos, teniendo valores de 79 y 35% para la perezona e isoperezona respectivamente. De manera complementaria, se realizó la síntesis de dos indolilquinonas (**8,9**) adicionales derivadas de las naftoquinonas menadiona y plumbagina (**3,4**) usando las mismas metodologías.

Así mismo, los compuestos **6-9** fueron evaluados como agentes citotóxicos sobre células de cáncer de mama. Los resultados mostraron que la 3-indolilisoperezona fue la molécula más activa, mientras que la menos activa resultó la 3-indolilmenadiona. Así mismo la morfología de las células tratadas indicaron una posible ruta apoptótica.

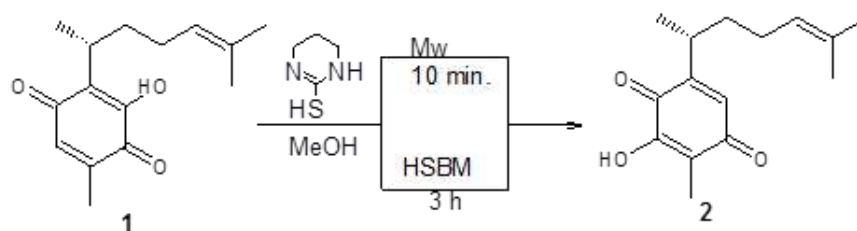
En forma complementaria y con la finalidad de entender las diferencias de actividad citotóxica entre **6-9**, se efectuó el correspondiente estudio teórico-computacional y de acoplamiento molecular sobre 10 diferentes proteínas que componen las cascadas de apoptosis dependiente e independiente de las caspasas, estos resultados concordaron ampliamente con los resultados experimentales y permitieron establecer un posible mecanismo de acción.

Los resultados de citotoxicidad de los productos **6-9**, además de los resultados previos de riesgo toxicológico señalan al doble enlace de la perezona e isoperezona con una alta probabilidad de generar efectos adversos a nivel biológico, se estableció como objetivo modificar el doble enlace C12-C13 de ambos sesquiterpenos, mediante la oxidación sobre dicho enlace (generándose la tercer serie), logrando obtener mediante un acercamiento verde los epóxidos

correspondientes (**10** y **11**), preparando *in situ* ácido peroxiacético por acción de la enzima Novozym® 435 en presencia de hidroperóxido de urea y acetato de etilo como disolvente. Dicho procedimiento mostró rendimientos del 80 y 60% respectivamente para la perezona e isoperezona.

Una vez concluida la etapa de la epoxidación verde, se efectuó la apertura de los epóxidos de las moléculas **10** y **11**, obteniéndose los correspondientes dioles mono acetilados (**14,15**), y acetónidos (**12,13**) al emplear la arcilla de naturaleza bentonita TAFF como catalizador además usando como disolventes de la reacción acetato de etilo y acetona de manera correspondiente. Finalmente es conveniente señalar que para la obtención de los dioles de la perezona e isoperezona esperados, se procedió a realizar la apertura de los epóxidos mediante la activación vía microondas (100°C, 250 W y 10 minutos) teniendo agua como disolvente, con lo que se obtuvieron los productos (**16,17**) en rendimientos del 80% en ambos casos.

Las moléculas sintetizadas, **10-17**, fueron también evaluadas como agentes citotóxicos en células de cáncer de mama humanas. Los resultados mostraron que en general, los epóxidos y los acetónidos presentaron mayor efecto de citotoxicidad, mientras que los dioles fueron los que menor acción exhibieron, siendo adecuado resaltar que todas las moléculas exhibieron efecto sobre la línea celular estudiada. Complementariamente es importante mencionar, que los estudios teóricos de la interacción de la caspasa-3 con los productos **10-17** concuerdan de manera significativa con los resultados experimentales.

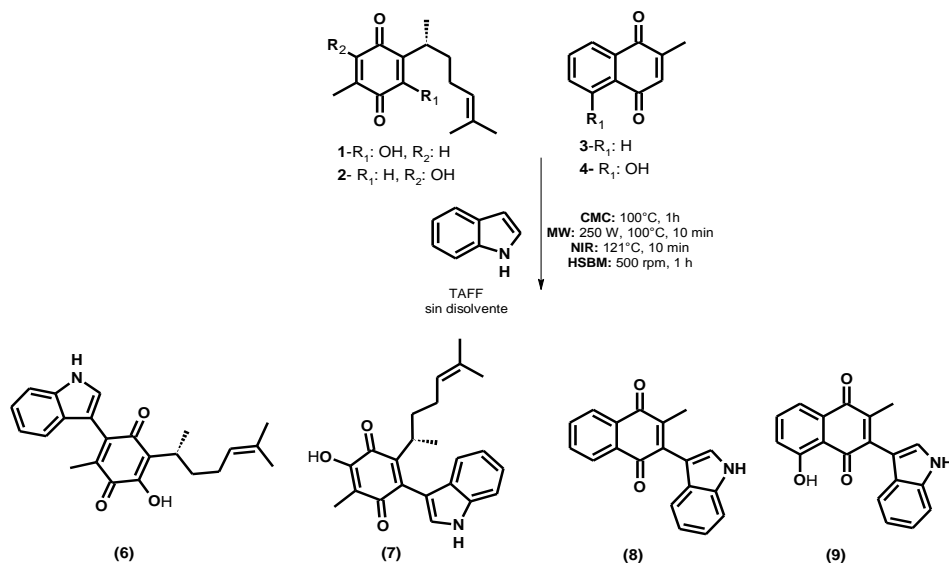


**Esquema general 1.** Isomerización verde de la perezona

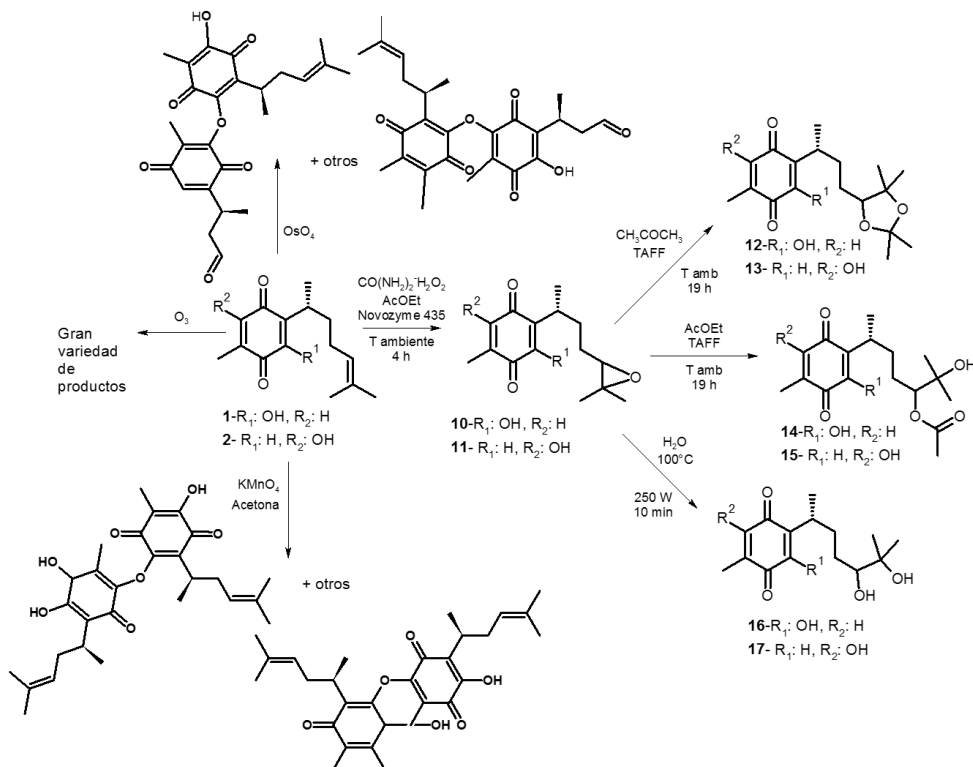
Es importante hacer de conocimiento, que también se realizó una evaluación de las oxidaciones en C12-C13 mediante el uso de condiciones clásicas, no propias

de la química, las cuales presentaron serios problemas, como la formación de múltiples productos y rendimientos pobres de reacción (máximo 5%).

Con respecto a todas las transformaciones químicas realizadas en este trabajo, se consideró pertinente, aquí en la Introducción, presentar un resumen esquemático de ellas, el cual corresponde a los **Esquemas generales 1-3**.



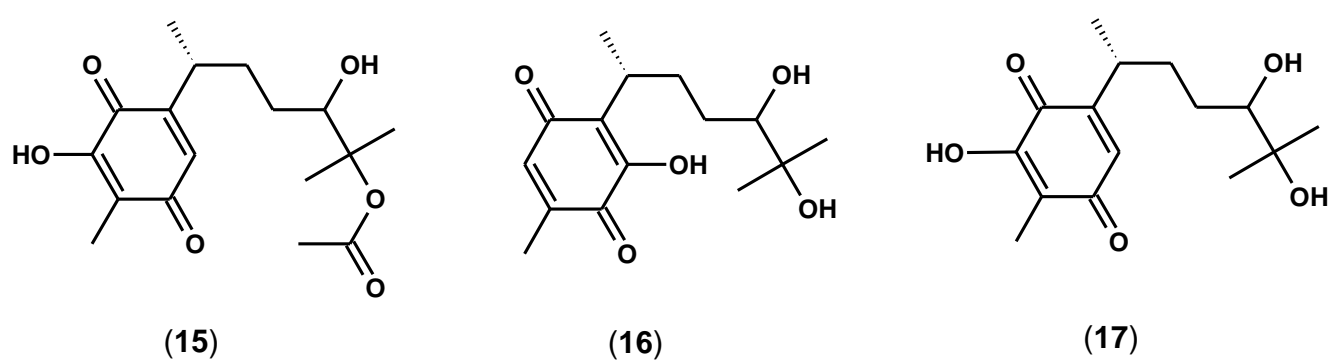
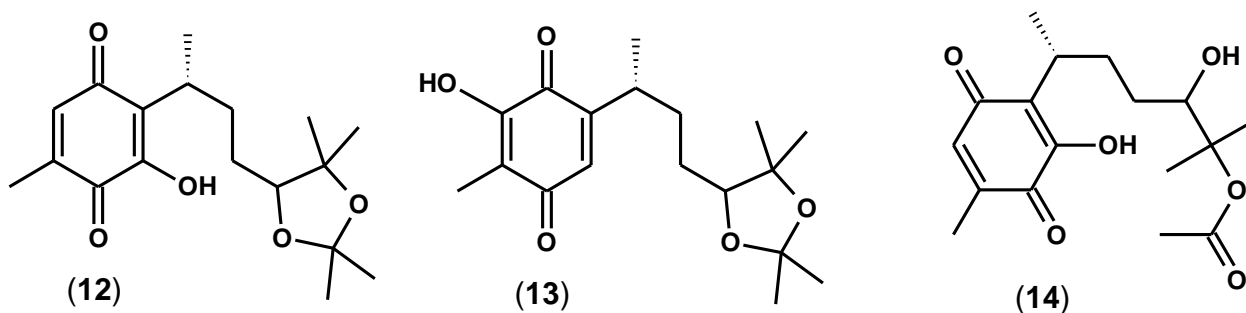
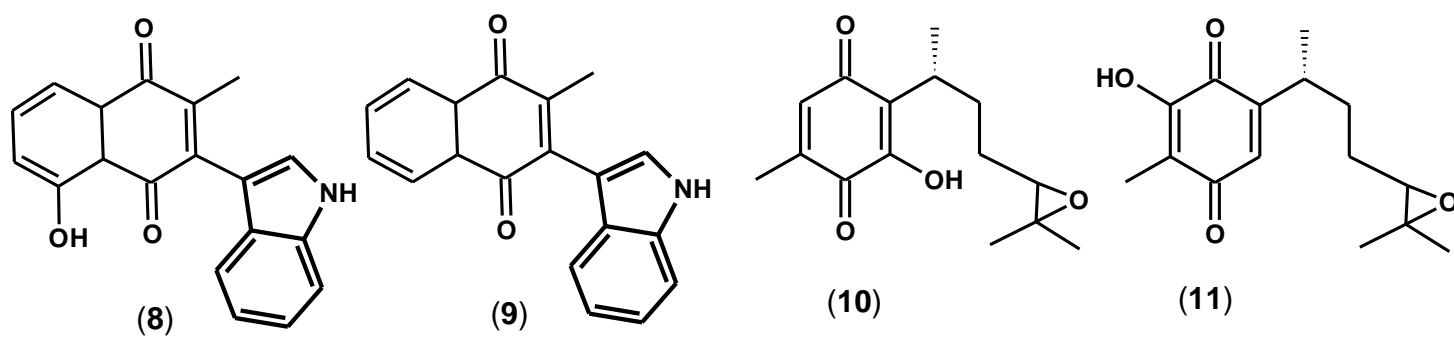
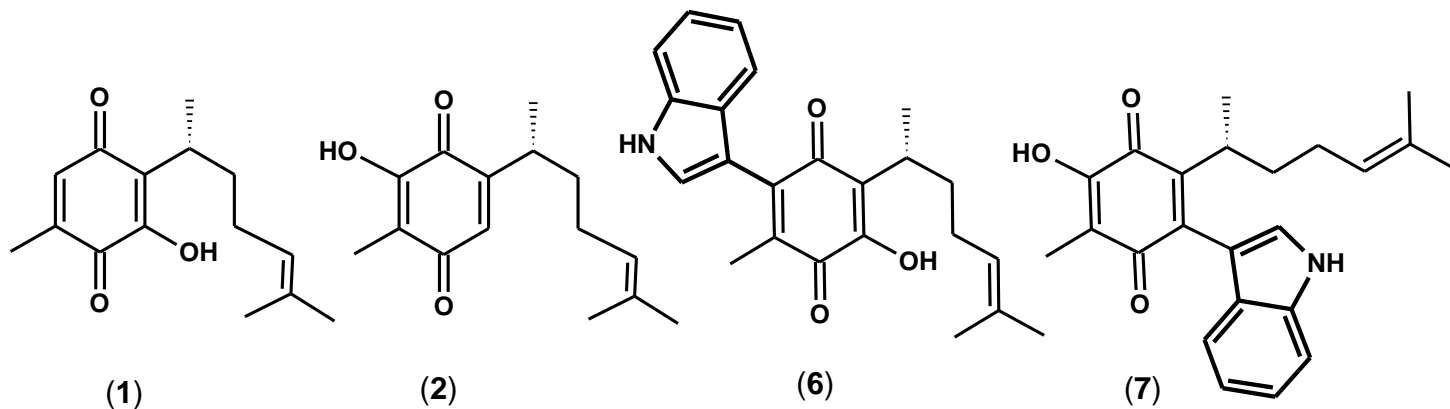
**Esquema general 2.** Metodología para la obtención de las indolilquinonas



**Esquema general 3.** Reacciones de oxidación efectuadas a 1 y 2.

## CAPÍTULO II: GLOSARIO

### II.1. Estructura de los productos obtenidos:





## II.2. Acrónimos, abreviaciones y definiciones

%ar	Abundancia relativa en porcentaje
°C	Grados Celsius
µg/mL	Microgramos por mililitros
µm	Micrómetro
Å	Armstrong
AADR	Promedio absoluto de las desviaciones standard relativas
ABC	Transportadores dependientes de ATP
AcOEt	Acetato de etilo
Ala	Alamina
Arg	Arginina
ATP	Trifosfato de adenosine
B3LYP	Funcional híbrido de Becke y Lee-Yang-Parr
Bar	Barómetro (unidad de presión )
BET	Isoterma Brunauer-Emmett'Teller
Caco-2	células monocapa de adenocarcinoma de colon humano
Cal	Calorías
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O.H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidroperóxido de urea
CO <sub>2</sub> SC	Dióxido de carbono supercrítico
CYP	Citocromo
Cys	Cisteína
D.S.	Desviación estándar
DSC	Calorimetría de barrido diferencial (differential scanning calorimetry)
E	Energía
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EPA	Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency)
EDS	Educación para el Desarrollo Sostenible (Education of Sustainable Development)

eV	Electrón voltio
FDA	Administración de Fármacos y Medicamentos (Food and Drugs Administration)
FIR	Infrarrojo lejano (far infrared)
FSC	Fluido supercrítico
g/cm <sup>3</sup>	Gramos por centímetro cubico
GAP	Diferencia energética entre los orbitales HOMO y LUMO
GHz	Giga Hertzio
GIAO	Metodología de la estimación invariable del orbital atómico
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
H	Horas
HBA	Aceptor de puente de hidrógeno (Hydrogen bond acceptor en inglés)
HBD	Donador de Puente de hidrógeno (Hydrogen Bond Donnor en inglés)
HCT-15	Línea celular de cáncer de colon
HI	Alta inhibición
His	Histidina
HOMO	Orbital molecular de alta energía ocupado (High occupied molecular orbital)
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HSBM	Molienda con esferas a alta velocidad (High speed ball milling)
Hz	Hertzio
I	Inhibidor
IC <sub>50</sub>	Concentración máxima inhibitoria del 50% de crecimiento
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
J	Joule
J/g	Joule por gramo
K	Kelvin

K-562	Línea celular de leucemia
Kcal	Kilocalorías
kHz	Kilo Hertzio
KJ	Kilo Joules
Log P	Logaritmo del cociente de reparto <i>n</i> -octanol/agua
Log S	Logaritmo de la solubilidad de una molécula en agua
LUMO	Orbital molecular de baja energía desocupado (Low unoccupied molecular orbital)
M	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
m <sup>2</sup> /g	Metro cuadrado por gramo
MASE	Extracción con disolvente asistida por microondas (microwave assisted solvent extraction)
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama humano
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertzio
min	Minutos
MIR	Infrarrojo medio (medium infrared)
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	milímetros
MW	Microondas
M <sup>+</sup>	Ion molecular
N	Modos normales
NI	No inhibidor
NIR	Infrarrojo cercano (near infrared)
NOR	Proporción de ocurrencia normalizados (normalized occurrence ration)
NS	No sustrato
Novozym® 435	Lipasa B de <i>Candida antartica</i>
ONU	Organización de las naciones unidas

OPPT	oficina de prevención de la contaminación y sustancias tóxicas (Office of Pollution Prevention and Toxics)
P	Probabilidad
P1	Presión inicial
P2	Presión final
Pc	Presión crítica
PC-3	Línea de cáncer de próstata
PDB	Base de datos de proteínas (Protein Data Bank)
pf	Punto de fusión
phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
r <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Desviación estándar media relativa (relative médium standard deviation)
rpm	revoluciones por minute
S	Sustrato
s	Señal simple
Ser	Serina
SKLU-1	Línea celular de cáncer de pulmón
T	Temperatura
T	Señal triple
TAFF	Tonsil Actisil FF
TFD	Teoría de funcionales de la densidad
ccf	Cromatografía de capa fina (Thin layer chromatography)
TMS	Tetrametil silano
TPSA	Área superficial polar total (Total polar surface area en inglés)
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina

UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (United Nations Education, Science and Culture Organization)
US	Ultrasonido
USAE	Extracción con disolvente asistida por ultrasonido (Ultrasound solvent assisted extraction)
W	Potencia en Watts
$\delta$	Desplazamiento químico
$\delta$	Flexión en el plano
$\gamma$	Flexión fuera del plano
$\nu$	Estiramiento
$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Número de onda
–	Negativo a la absorción

### II.3. Índice de Esquemas

<b>Esquema 1.</b> Estructuras de la perezona e isoperezona	53
<b>Esquema 2.</b> Estructuras de $\alpha$ -pipitzol y $\beta$ -piptzol.	54
<b>Esquema 3.</b> Dímero de la perezona.	55
<b>Esquema 4.</b> Reacción de isomerización de la perezona.	56
<b>Esquema 5.</b> Isomerización de la perezona mediante el método clásico	83
<b>Esquema 6.</b> Isomerización de la perezona mediante el uso de diversas fuentes de activación ( microondas y triboquímica).	84
<b>Esquema 7.</b> Método general para la obtención de las indolilquinonas.	112
<b>Esquema 8.</b> Reacciones de oxidación efectuadas en 1 y 2.	150
<b>Esquema 9.</b> Obtención de los epóxidos 10 y 11.	152
<b>Esquema 10.</b> Obtención de los acetónidos 12 y 13	153
<b>Esquema 11.</b> Obtención de los dioles monoacetilados 14 y 15.	154
<b>Esquema 12.</b> Apertura " <i>telescope</i> " de 6 y 7, una estrategia verde.	155
<b>Esquema 13.</b> Hidrólisis de los epóxidos promovida por microondas.	156

## II.4. Índice de Figuras

Figura 1. Extracción mediante el método convencional. ....	63
Figura 2. Isotermas de solubilidad de la perezona. ....	65
Figura 3. Efecto de la presión a diferentes temperaturas sobre la solubilidad de perezona en CO <sub>2</sub> SC experimental y calculada con la ecuación de Chrastil modificada.....	70
Figura 4. Cinéticas de solubilidad de la perezona en CO <sub>2</sub> SC. ....	71
Figura 5. Extracción de perezona mediante el uso de dióxido de carbono supercrítico .....	72
Figura 6. Extracto de perezona, a partir de <i>A. platyphylla</i> con CO <sub>2</sub> SC. Los cristales amarillos corresponden al producto aislado. ....	73
Figura 7. Tratamientos empleados en la extracción de de perezona a partir <i>A. cordata</i> y <i>A. platyphylla</i> usando NIR. ....	75
Figura 8. Resultados de la extracción de la perezona promovida por microondas para las diferentes condiciones probadas. ....	77
Figura 9. Extracción promovida por tratamiento con ultrasonido para <i>A. cordata</i> y <i>A. platyphylla</i> .....	79
Figura 10. Patrón de difracción de rayos X de polvos para la perezona. ....	89
Figura 11. Patrón de difracción de rayos X de polvos para la isoperezona. ....	90
Figura 12. Análisis térmico gravimétrico de la perezona e isoperezona. ....	91
Figura 13. Análisis de calorimetría de barrido diferencial. ....	92
Figura 14. Estructuras optimizadas junto con su modelo 2D numerado de: a) perezona b) isoperezona. ....	93
Figura 15. Espectros infrarrojo-experimentales de: a) la perezona b) la isoperezona. ....	97
Figura 16. Subunidades monoméricas para la proteína (PDB 1pau).. ....	97
Figura 17. Estructura en el sitio activo de la proteína de los ligandos, perezona, isoperezona y horminona. ....	99
Figura 18. Conformaciones para la pose de mínima energía de la perezona (en blanco) y el ligando (en negro) valor de RMSD=1.32 Å. ....	101

Figura 19. Vista del acoplamiento al sitio activo de la caspasa-3 (código PDB 1PAU), en un complejo con los compuestos estudiados. ....	102
Figura 20. Vista del acoplamiento de los cuatro ligandos y los resultados <i>in silico</i> del sitio activo de la caspasa-3.....	103
Figura 21. Modelo de las moléculas estudiadas, representando de manera proporcional a la energía de interacción el tamaño de los átomos: a. timoquinona, b. perezona, c. isoperezona, d. horminona y e. el sitio activo de la caspasa 3. ...	104
Figura 22. Acoplamiento de 1 en el sitio activo de la caspasa 3 .....	105
Figura 23. Acoplamiento de 2 en el sitio activo de la caspasa 3. ....	106
Figura 24. Acoplamiento de la horminona en el sitio activo de la caspasa 3. ....	106
Figura 25. Vista de acoplamiento, timoquinona, 1, 2 y horminona respectivamente en el sitio activo de la caspasa.....	107
Figura 26. Gráficos de dosis-respuesta a 24, 48 y 72 h para las moléculas 6-9. ....	119
<b>Figura 27.</b> Efecto citotóxico de las indolilquinonas en células de cáncer de seno .....	120
Figura 28. Estructuras optimizadas de las indolilquinonas por B3LYP/6-311++G(d,p).....	121
Figura 29. Regresión lineal entre los valores experimentales y calculados con B3LYP/6-311++G (d,p): (a) desplazamiento químico de RMN <sup>1</sup> H; (b) desplazamiento químico de RMN <sup>13</sup> C para las indolilquinonas obtenidas en este trabajo. ....	125
Figura 30: Grafica de energía GAP (kcal/mol) para las moléculas objetivo .....	127
Figura 31. Orbital molecular HOMO de las indolilquinonas estudiadas.....	128
Figura 32. Orbitales moleculares LUMO para las moléculas de estudio. ....	128
Figura 33. Mapas de potencial electrostático molecular para los compuestos 6-9. ....	131
Figura 34. Vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis.....	133
Figura 35. Modelo de interacción de 7 con PARP-1, código PDB (1UKO).....	136
Figura 36. Modelo de interacción de 8 con p53.....	137
Figura 37. Modelo de interacción de 7 con Bim. ....	138
Figura 38. Modelo de interacción de 9 con TRIAL-2 (isoforma 4N90).....	139



Figura 39. Modelo de interacción de 7 con t-BID. ....	140
Figura 40. Predicción del metabolismo para: a) indolilperezona, b) indolilisoperezona.....	146
Figura 41. Predicción del metabolismo para: a) indolilplumbagina b) indolilmenadiona .....	148
Figura 42. Curvas dosis-respuesta para la citotoxicidad sobre células con cáncer de mama de los derivados C12-C13 de la perezona e isoperezona. ....	164
Figura 43. Geometrías optimizadas de las moléculas 10-13 con sus respectivos estereoisómeros en C-12. ....	166
Figura 44. Geometrías optimizadas de las moléculas 14-17 con sus respectivos estereoisómeros en C-12. ....	167
Figura 45. Regresión lineal entre los valores experimentales y calculados con B3LYP/6-311++G (d,p), desplazamiento químico de RMN <sup>1</sup> H. ....	174
Figura 46. Graficas de desplazamientos químico-teóricos contra experimentales para <sup>13</sup> C de las moléculas: a) derivados de la perezona; b) derivados de la isoperezona.....	177
Figura 47. Energía <i>GAP</i> en kcal/mol (a) y de los orbitales LUMO en electrón-volt (b) para las moléculas objetivo.....	179
Figura 48. Orbital molecular LUMO de las moléculas estudiadas. ....	181
Figura 49. Mapas de potencial electrostático molecular para los estereoisómeros con menor <i>E</i> <sub>LUMO</sub> de los compuestos 10-17. ....	183
Figura 50. Modelo de acoplamiento molecular de 13- <i>R</i> .....	189
Figura 51. Modelo de acoplamiento molecular de 10- <i>R</i> .....	190
Figura 52. Modelo de acoplamiento molecular de 12- <i>R</i> :.....	191
Figura 53. Modelo de acoplamiento molecular de 16- <i>R</i> .....	192
Figura 54. Modelo de acoplamiento molecular de 14- <i>R</i> .....	193
Figura 55. Modelo de acoplamiento molecular de 11- <i>R</i> . ....	194
Figura 56. Modelo de acoplamiento molecular de 17- <i>R</i> . ....	195
Figura 57. Sitios de reacción para el metabolismo primario de las moléculas 10-17. ....	198

Figura 58. Dispositivo construido con tubería de acero inoxidable para determinar la solubilidad de compuestos sólidos con dióxido de carbono supercrítico. ....	204
Figura 59. Resultados de la espectrometría de masas de alta resolución para 6 .....	263
Figura 60. Resultados de la espectrometría de masas de alta resolución para 10. ....	267
Figura 61. Resultados de espectrometría de masas de alta resolución para 14 . ....	274
Figura 62. Resultados de espectrometría de masas de alta resolución para 16. ....	278

## II.5. Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Solubilidad experimental y calculada con la ecuación de Chrastil .....	67
<b>Tabla 2.</b> Solubilidad experimental y calculada con la ecuación de Chrastil modificada .....	69
<b>Tabla 3.</b> Cuadro comparativo de los rendimientos y selectividades de los diferentes métodos de extracción analizados para la perezona .....	80
<b>Tabla 4.</b> Parámetros geométricos seleccionados de longitudes de enlace (Å), ángulos (°) y ángulos diedros (°) para la perezona, además de los valores experimentales reportados y los correspondiente en el cálculo de los valores de equilibrio con 6-311g(d,p).....	94
<b>Tabla 5.</b> Parámetros geométricos seleccionados de longitudes de enlace (Å), ángulos (°) y ángulos diedros (°) para 2, además de los valores experimentales reportados y los correspondiente en el cálculo de los valores de equilibrio con 6-311g(d,p).....	95
<b>Tabla 6.</b> Frecuencias teóricas y experimentales para los modos vibracionales de la perezona con sus correspondientes asignaciones.....	96
<b>Tabla 7.</b> Parámetros obtenidos (kcal/mol), a partir de acoplamiento molecular de los compuestos estudiados.....	100
<b>Tabla 8.</b> Parámetros de interacción con 1PAU-ligandos, RMSD y valores de MolScore para el proceso de acoplamiento.....	104
<b>Tabla 9.</b> Predicción de las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de la perezona e isoperezona para su potencial uso como fármaco. ....	108
<b>Tabla 10:</b> Producción de indolilquinonas usando activación térmica convencional, así como irradiaciones de microondas e infrarroja cercana. ....	113
<b>Tabla 11:</b> Rendimientos obtenidos en la producción de indolilquinonas activada por triboquímica.....	114
<b>Tabla 12:</b> Espectrometría de masas por impacto electrónico de alta y baja resolución para 6-9.....	116
<b>Tabla 13:</b> Desplazamientos químicos en ppm ( $\delta$ ) y multiplicidad (M) de las moléculas objetivo para resonancia de $^1\text{H}$ a 300 MHz .....	117

<b>Tabla 14:</b> Desplazamientos químicos de $^{13}\text{C}$ en ppm ( $\delta$ ) de las moléculas objetivo a 300 MHz.....	118
<b>Tabla 15:</b> Selección de longitudes de enlace calculados para 6 y 7(en Å) contrastados con los correspondientes enlaces en moléculas de referencia.....	122
<b>Tabla 16:</b> Selección de algunas longitudes de enlace teóricas y experimentales de 8 y 9 (en Å).....	124
<b>Tabla 17:</b> $E_{\text{HOMO}}$ y $E_{\text{LUMO}}$ de las moléculas de estudio.....	127
<b>Tabla 18:</b> Distribución de cargas de algunos átomos seleccionados.....	130
<b>Tabla 19:</b> Propiedades toxicológicas y fisicoquímicas determinadas con OSIRIS de 6-9.....	282
<b>Tabla 20:</b> Valores de energía de interacción entre el ligando y la proteína (score) y la raíz cuadrada de su desviación media estándar (RMS en Å).....	135
<b>Tabla 21:</b> Predicción de la absorción de las indolilquinonas 6-9 en diferentes modelos.....	143
<b>Tabla 22:</b> Resultados de la predicción del metabolismo.....	283
<b>Tabla 23:</b> EMIE y HRMS-IE, de los productos 10-17.....	157
<b>Tabla 24:</b> RMN protónica para 10 -17 ppm ( $\delta$ ), multiplicidad (M), integración y asignaciones de las moléculas objetivo para resonancia de $^1\text{H}$ .....	160
<b>Tabla 25:</b> Desplazamientos químicos de $^{13}\text{C}$ de los compuestos derivados de perezona e isoperezona por oxidación de los carbonos C12-C13.....	161
<b>Tabla 26:</b> Valores de $\text{IC}_{50}$ para las Moléculas derivadas de la oxidación C12-C13 de la perezona e isoperezona y sus.....	165
<b>Tabla 27:</b> Longitudes de enlace seleccionadas (en Armstrong) teóricas de los derivados de la perezona ( <b>10, 12, 14 y 16</b> ) contrastados con los valores experimentales de la perezona (1).....	169
<b>Tabla 28:</b> Longitudes de enlace (en Armstrong) teóricas de los derivados de la isoperezona (11,13,15 y 17) contrastados con los valores experimentales de la isoperezona (2).....	173
<b>Tabla 29:</b> Ecuaciones y coeficientes de regresión para los desplazamientos químico de protón para las moléculas objetivo.....	175

<b>Tabla 30:</b> Ecuaciones y coeficientes de regresión para los desplazamientos químico de $^{13}\text{C}$ para las moléculas objetivo .....	176
<b>Tabla 31:</b> Propiedades toxicológicas y fisicoquímicas determinadas con OSIRIS de 10-17 .....	185
<b>Tabla 32:</b> Valores de energía de interacción entre el ligando y la proteína (score). .....	189
<b>Tabla 33.</b> Predicción de la absorción de los derivados de la perezona en diferentes modelos.....	284
<b>Tabla 34.</b> Predicción de la absorción de los derivados de la isoperezona en diferentes modelos.....	285
<b>Tabla 35.</b> Resultados de la predicción del metabolismo para derivados de la perezona. ....	286
<b>Tabla 36.</b> Resultados de la predicción del metabolismo para derivados de la isoperezona.....	287

## II.6. Índice de Espectros

<b>Espectro 1.</b> EMIE de 1, potencial de ionización 70 eV.....	256
<b>Espectro 2.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) de 1, determinado a 300 MHz.....	257
<b>Espectro 3.</b> RMN <sup>13</sup> C(CDCl <sub>3</sub> ) de 1, determinado a 75 MHz. ....	258
<b>Espectro 4.</b> EMIE de 2, potencial de ionización 70 eV.....	259
<b>Espectro 5.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) de 2, determinado a 300 MHz.....	260
<b>Espectro 6.</b> RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) de 2, determinado a 75 MHz. ....	261
<b>Espectro 7.</b> EMIE de 6, potencial de ionización 70 eV.....	262
<b>Espectro 8.</b> RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) del <b>6</b> , determinado a 300 MHz. ....	264
<b>Espectro 9.</b> RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) de <b>6</b> , determinado a 75 MHz.....	265
<b>Espectro 10.</b> EMIE de 10, potencial de ionización 70 eV.....	266
<b>Espectro 11.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) de 10, determinado a 500 MHz.....	268
<b>Espectro 12.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) de 10, determinado a 125 MHz....	269
<b>Espectro 13.</b> Espectro EMIE de 12, potencial de ionización de 70eV.....	270
<b>Espectro 14.</b> Espectro RMN <sup>1</sup> H (acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de 12, determinado a 300 MHz ....	271
<b>Espectro 15.</b> Espectro RMN <sup>13</sup> C (acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de 12, determinado a 75 MHz. ....	272
<b>Espectro 16.</b> Espectro EMIE de 14, potencial de ionización de 70eV.....	273
<b>Espectro 17.</b> Espectro RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ), del 14, determinado a 300 MHz.....	275
<b>Espectro 18.</b> Espectro RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ), de 14, a 75 MHz.....	276
<b>Espectro 19.</b> EMIE de <b>17</b> , potencial de ionización de 70 eV.....	277
<b>Espectro 20.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) de 16, determinado a 500 MHz. ....	279
<b>Espectro 21.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) de 16, determinado a 125 MHz....	280

## CAPÍTULO III: ANTECEDENTES

### III.1. Química Verde como vía de contribución a la sostenibilidad

El desarrollo sostenible conlleva el “satisfacer las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades”<sup>1,2</sup>. Por lo cual las actividades humanas no deben sobrepasar las funciones ambientales ni generar deterioros en los ecosistemas.

En este sentido y bajo la conciencia de que las personas son fundamentales para el Desarrollo Sostenible (SD por sus siglas en inglés), la Organización de las Naciones Unidas (ONU) declaró el periodo de 2005 a 2014 como la Década de la Educación en el Desarrollo Sostenible (EDS por sus siglas), finalizando esta con la conferencia mundial sobre la misma organizada por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO por sus siglas en inglés) del 10 al 12 de Noviembre de 2014 en Nagoya, Japón, de dicha conferencia se generó una declaratoria en la que se señala la necesidad urgente de fortalecer y escalar la educación para el desarrollo sostenible, haciendo un llamado particular a los ministerios de educación a involucrarse con el EDS, así mismo a las instituciones de educación superior y a la comunidad científica a centrarse en la colaboración, generación de conocimiento transformativo, disseminación, utilización y promoción de la EDS<sup>2,3</sup>.

En el ámbito de la química, entre las consecuencias de la modificación selectiva y generación de moléculas nuevas, mediante las metodologías sintéticas convencionales en química orgánica, se encuentran el uso, generación y desecho de sustancias que no resulta amigables al medio ambiente así como el uso de fuentes de activación diferentes al calentamiento basado en la quema de combustibles fósiles<sup>4</sup>.

El antecedente más significativo en pro del establecimiento de legislaciones ambientales y agencias que regulen el uso de sustancias químicas en diversos países, fue la publicación del libro “*Primavera Silenciosa*” por Rachel Carson en 1962, texto que manifestó e hizo público los peligros asociados al uso de pesticidas

químicos, el cual basa su material en una exposición documentada y diligente de evidencias de una gran cantidad de efectos nocivos de los pesticidas al ambiente, y las afecciones a largo plazo en el ambiente y los seres humanos; que las plagas que pretendían contrarrestar, era un daño minúsculo de lo que se estaba provocando.

La publicación de Carson permitió comprobar la interrelación entre los diversos seres vivos del planeta y cómo la afección a los mismos termina provocando un daño directo a los seres humanos. Así mismo propició la reunión de investigadores y políticos de 30 países diferentes en la ciudad de Roma en 1968 con la finalidad de discutir los cambios ocurridos en el planeta a raíz de las actividades humanas<sup>5</sup>; estableciéndose además el Club de Roma.

En consecuencia, a partir de la década de los 60's se han desarrollado diversas medidas para la conservación del ambiente y el desarrollo de procesos que minimicen su impacto ambiental. Entre estas normativas destaca la ley de prevención de la contaminación promulgada en 1990, la cual busca prevenir la contaminación obligando la reducción en la generación de contaminantes por parte de las industrias, realizando cambios económicamente efectivos en su producción, operación y uso de materia prima.

Poco después de la aprobación de esta última ley, la oficina de prevención de la contaminación y sustancias tóxicas (OPPT) de la agencia de protección ambiental (EPA) empezó a buscar el desarrollo de nuevos productos y procesos, así como la mejora de aquellos ya existentes con la finalidad de minimizar el efecto nocivo a los seres vivos y al ambiente, poniendo en marcha para 1991 un programa de subvenciones a la investigación denominado: *“Rutas sintéticas alternativas para la prevención de la contaminación”*, proporcionando apoyo por primera vez para proyectos de investigación sobre prevención de contaminación en síntesis química<sup>6</sup>.

Así en 1991 nace y se integra a la EPA el concepto de la Química Verde (*“Green Chemistry”* por su vocablo en inglés) cuyo objetivo principal es el diseño de



productos y procesos que reduzcan o eliminen el uso y generación de sustancias nocivas para el ser humano y para el ambiente<sup>4</sup>.

La Química Verde (QV) consiste el empleo de rutas sintéticas alternativas, uso de condiciones de reacción no convencionales así como el diseño de sustancias químicas menos tóxicas que las disponibles actualmente o inherentemente más seguras respecto a su potencial de accidentes<sup>4,6</sup>. En este mismo sentido es importante señalar que la Química Verde se encuentra protocolizada a través de 12 principios que fueron presentados por P.T. Anastas y J.C.Warner en 1998<sup>7</sup>. Estos principios guían a los químicos hacia el desempeño de su rol único y trascendental en el logro del desarrollo sostenible<sup>8</sup>.

### ***III.1.1 Principios de la Química Verde<sup>7,8</sup>***

Los principios de la Química Verde se enuncian en forma breve, a continuación:

1. **Prevención de residuos:** es mejor prevenir la generación de un residuo, que tratarlo o eliminarlo después de haberlo generado. En consecuencia, el diseño de una reacción que no genera residuos es la reducción o eliminación de etapas de separación, tratamiento y disposición de sustancias peligrosas.
2. **Economía atómica:** los métodos de síntesis deberán diseñarse de tal manera que, se incorporen al máximo en el producto final todos los sustratos usados durante el proceso. Existen muchas formas para definir la eficiencia de una reacción química, como el rendimiento y la selectividad. Sin embargo, estas últimas no son de especial utilidad para determinar la cantidad de desecho en un proceso, para el análisis ambiental es necesario analizar cuantos átomos de los reactivos son incorporados a los productos.
3. **Síntesis químicas menos peligrosas:** los métodos de síntesis deberán ser diseñados para utilizar y generar sustancias que presenten baja o nula toxicidad, tanto para el ser humano como para el ambiente. Es necesario efectuar una evaluación para identificar los peligros asociados a las materias primas, los reactivos y los productos a obtener.

4. **Diseño de químicos seguros:** los productos químicos se diseñarán de manera que mantengan su eficacia y baja toxicidad. El diseño de químicos seguros es un proceso que requiere de un análisis de la estructura química a fin de identificar las partes responsables de las propiedades características del compuesto y aquellas que pueden generar problemas de toxicidad.

5. **Uso de disolventes seguros o sustancias auxiliares:** evitar el empleo de sustancias auxiliares como disolventes, reactivos de separación, etc., y en caso de que se empleen deberán ser lo más inocuos posible. Las sustancias auxiliares son usadas para promover las reacciones, pero no son incorporadas en el producto final, por lo tanto, terminan siendo parte de los residuos y muchas son peligrosas para el ambiente.

6. **Diseño de la eficiencia energética:** los requerimientos energéticos en un proceso químico se catalogan por su impacto económico y al ambiente, por lo tanto, se sugiere llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente. El diseño de las reacciones debe hacerse a medida que se reduzca la energía empleada en términos de energía mecánica, térmica u otra forma de energía y los impactos ambientales asociados al uso excesivo de energía.

7. **Uso de materias primas renovables:** la materia prima debe ser preferiblemente renovable en lugar de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable. La utilización de materias primas benignas y renovables es un componente necesario para hacer frente al agotamiento mundial de los recursos.

8. **Reducir derivados:** evitar el uso de grupos de bloqueo, de protección-desprotección o la modificación temporal de los procesos físicos/ químicos, su empleo requiere reactivos adicionales y generan residuos. Este tipo de transformaciones, sin embargo, requieren pasos adicionales con el consiguiente aumento de reactivos, desechos, tiempo y energía.

9. **Catálisis:** considerar el empleo de catalizadores. La catálisis ofrece ventajas sobre las reacciones estequiométricas en términos tanto de selectividad como de minimización de energía. Lo más selectivo posible y de preferencia de origen natural.

10. **Diseñar sustancias biodegradables:** los productos deberán ser diseñados de tal manera que al final de su vida útil no persistan en el ambiente. El diseño de productos químicos más seguros no puede limitarse a los peligros asociados a la fabricación y el uso de los productos, sino también a su eliminación y a su último ciclo de vida útil.

11. **Análisis en tiempo real para prevenir la contaminación:** las metodologías analíticas necesarias serán desarrolladas en el momento del proceso, lo que permitirá su seguimiento y control en tiempo real, previo a la formación de sustancias peligrosas.

12. **Químicos seguros para prevenir accidentes:** las sustancias y la forma de una sustancia usada en un proceso químico deberá ser elegida para reducir el riesgo de accidentes químicos incluyendo las emanaciones, explosiones e incendios.

La búsqueda del cumplimiento de los doce principios de la Química Verde ha permitido desarrollar diversas estrategias y modificaciones a la síntesis química. Por ejemplo, para el cumplimiento del *principio 5* se ha procedido al diseño de reacciones en disolventes considerados como verdes (agua, etanol, etc.), reacciones en ausencias de disolvente y el uso de los llamados disolventes neotéricos (fluidos supercríticos, líquidos iónicos y disolventes perfluorados). En el caso del *principio 6* se han empleado nuevas fuentes de activación diferentes al calentamiento convencional, tal como el uso de irradiación con infrarrojo, microondas, ultrasonido y activación por molienda. Finalmente, *el principio 9* ha propiciado el desarrollo de nuevos catalizadores más eficientes, así como el empleo de arcillas y enzimas para la modificación selectiva. Estos temas se desarrollarán con mayor profundidad en apartados posteriores.

### **III.1.2. Medios alternos para efectuar una reacción**

En años recientes se ha incrementado la preocupación por el empleo de disolventes y sus efectos ambientales, lo que ha llevado a una concientización y a la búsqueda constante de disolventes más seguros, efectuando sustituciones de disolventes dañinos por aquellos que son inocuos<sup>9</sup>. Por ejemplo, el empleo de hidrocarburos y disolventes clorados se ha reducido a favor de un incremento en el uso de alcoholes y sus derivados.

La selección de un disolvente apropiado, para su uso o sustitución por otro, es una etapa compleja en el que se deben considerar su seguridad, disposición o toxicidad. Además, debe asegurarse la eliminación total del disolvente en el producto final, por lo que su separación del compuesto deseado es fundamental<sup>10</sup>. Es importante considerar que la facilidad, el rendimiento y el costo energético del reciclado, así como si su procedencia es o no de una fuente renovable, siendo estos aspectos importantes para reflexionar desde la perspectiva de la Química Verde.

La Química Verde, con base a su protocolo ha propiciado el surgimiento de otras formas de trabajar experimentalmente, considerando el empleo de disolventes inocuos, alternativos y la ausencia de ellos, entre otras. A continuación, se proporciona un panorama general de estas tres formas de trabajar bajo el contexto de la Química Verde.

#### III.1.2.1. Disolventes inocuos

El término disolvente “verde” conlleva la reducción del impacto ambiental por el uso de los disolventes en la síntesis química, en este sentido, aquellos disolventes que presenten el mínimo de toxicidad y resulten más seguros pueden ser considerados por comparación como más verdes que otros y por lo tanto con mayor recomendación. Con base a lo anterior, es posible determinar que algunos disolventes convencionales cumplen con dichas características como es el caso del agua, alcoholes simples ( como metanol o etanol), hidrocarburos como el *n*-hexano, ésteres como el acetato de etilo son ambientalmente preferibles como disolvente que otros como el caso del dioxano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etc<sup>11,12</sup>. En el caso particular del agua, aunque es conocido su bajo impacto ambiental, el uso de este disolvente en procesos orgánicos ha estado limitado como consecuencia de la baja solubilidad de los reactivos en él. Sin embargo, en la actualidad se han desarrollado diversas estrategias para el uso del agua, en la cual destaca el uso de estructuras miméticas a las enzimas (tiamina, ciclodextrinas, etc.), reacciones “en agua” con los reactivos en suspensión, reacciones promovidas por uniones hidrofóbicas de moléculas pequeñas, etc<sup>12,13</sup>.

### III.1.2.2. Fluidos supercríticos

En la actualidad la búsqueda de disolventes que resulten “verdes” ha llevado a explorar diversas alternativas a los disolventes convencionales, generándose así procesos en disolventes denominados “neotéricos”, los cuales presentan propiedades similares a los convencionales sin los efectos tóxicos para los seres vivos y nocivos para el ambiente. Dentro de los disolventes neotéricos se encuentran<sup>9,10,14</sup>: los disolventes perfluorados, los líquidos iónicos y los fluidos supercríticos (FSC), temática que será abordada a continuación.

Los fluidos llevados a condiciones supercríticas son aquellos que se comprimen iniciando en su presión y temperatura crítica, y posteriormente son elevados a condiciones de presión y temperatura por arriba de los críticos. Los fluidos supercríticos no pueden ser licuados con incremento en la presión, sin embargo, pueden cambiar su densidad a un fluido continuo similar al estado líquido. En condiciones cercanas a los parámetros críticos, pequeños cambios de presión pueden generar grandes cambios en la densidad, además de que la difusividad de los fluidos supercríticos es mucho mayor que los disolventes líquidos, pudiendo ser fácilmente modificada. En este mismo sentido, la viscosidad que presentan estos últimos resulta menor que la presentada por los líquidos<sup>15</sup>.

Los procesos en condiciones supercríticas implican operaciones que se efectúan por encima del punto crítico del disolvente, similar a los desarrollados de manera clásica con la particularidad de utilizar como disolvente un FSC en lugar de un líquido. El proceso de extracción con fluidos supercríticos básicamente consiste de cuatro etapas<sup>16,17</sup>.

1. Etapa de presurización: se eleva la presión del gas a utilizar como disolvente a un valor  $P_1$  por encima de su presión crítica  $P_c$ ; esta operación se realiza por medio de un compresor o bomba.
2. Etapa de ajuste de temperatura: se remueve o adiciona energía térmica, ya sea con un intercambiador de calor, baños térmicos o resistencias eléctricas, para llevar el disolvente comprimido a la temperatura de extracción requerida, estado que está por encima de su temperatura crítica.

3. Etapa de contacto: se conduce el FSC a la celdilla de contacto donde se encuentra la muestra o materia prima que contiene el soluto de interés.

4. Etapa de separación: el gas se descomprime a una presión P2 inferior a la presión crítica, liberándose el soluto en un recipiente separador.

La ventaja mayor del uso de los fluidos supercríticos es su impacto menor en el ambiente. Es una tecnología limpia porque, al usar sustancias como el CO<sub>2</sub> o el agua, los residuos que se producen no son tóxicos y se reciclan fácilmente. La posibilidad de eliminar de forma rápida el exceso del fluido supercrítico por simple despresurización y recolección de las muestras concentradas es otra ventaja importante. Por ejemplo, en el caso del tratamiento de residuos, los fluidos supercríticos vienen a sustituir a la incineración, que debido a las altas temperaturas que requiere emite gran cantidad de sustancias tóxicas. Sin embargo, mediante el uso de fluidos supercríticos, se consiguen los mismos resultados y los residuos son tan sólo sustancias inorgánicas no contaminantes, como nitrógeno o dióxido de carbono.<sup>18</sup>

### III.1.2.3. Ausencia de disolvente

La remoción de los disolventes orgánicos de los procesos sintéticos es un paso importante hacia la generación de tecnologías químicas que resulten benignas. Los disolventes orgánicos se encuentran clasificados como tóxicos o como compuestos dañinos como consecuencia de las altas cantidades empleadas en la industria y las dificultades en su contención. Existen alternativas al uso de los disolventes convencionales, tal como se señaló anteriormente, sin embargo sigue implicando el empleo de sustancias auxiliares<sup>19,20</sup>.

La selección de reacciones en ausencia de disolvente o en disolventes específicos de naturaleza no-orgánica, dependerá de diferentes situaciones, incluyendo la selectividad, estereoquímica, rendimiento, desechos, viscosidad, la facilidad de reciclaje, el uso de la energía, facilidad de aislamiento de producto, las reacciones en competencia y el calor de la reacción<sup>21</sup>.

Las ventajas del uso de reacciones en ausencia de disolvente, en comparación con el uso de medios alternos y/ u orgánicos pueden incluir: la eliminación de la colecta del medio, su purificación y reúso; siendo importante destacar que los compuestos formados se encuentran lo suficientemente puros como para requerir purificaciones extensivas. Además de las características señaladas, las reacciones secuenciales se han llevado a cabo con rendimientos altos, siendo las reacciones realizadas bajo estas condiciones en ausencia de equipos especiales, en tiempos de reacción cortos y con uso de energía generalmente menor<sup>19,21,22</sup>.

Finalmente, entre las desventajas que presentan, se encuentra la formación de puntos de sobrecalentamiento y la posibilidad de proyecciones. Además de mejorar las condiciones de operación en base a los antiguos paradigmas, destacando el uso de un disolvente como agente de transferencia de calor o de disipación de este<sup>21</sup>.

### ***III.1.3. Fuentes alternas para activar una reacción.***

En atención al *principio 6* de la Química Verde, los químicos y en particular los químicos orgánicos se han dado a la tarea de generar y emplear métodos no convencionales para llevar a cabo reacciones; siendo uno de los casos principales el uso de las fuentes alternas de activación, las cuales pueden ser por irradiación electromagnética como son: las microondas y el infrarrojo, o por el uso de ondas mecánicas como son el ultrasonido y la triboquímica, para llevar a cabo una reacción química. Estas fuentes alternas presentan diversas ventajas como son que, en la mayoría de los casos no se requiere disolvente, también de que generalmente las condiciones de reacción son más suaves, además de acortarse el tiempo de reacción, realizar las reacciones de forma más limpia y por lo regular presentan rendimientos superiores al obtenido por la forma convencional de activación<sup>4,23,24</sup>. Estas debido a la procedencia de la energía pueden ser clasificados en dos grandes grupos: los que emplean ondas electromagnéticas y los que emplean ondas mecánicas. A continuación, se describirán algunas de ellas incluyendo su fundamento y aplicaciones.

Las irradiaciones infrarrojas y microondas implican ondas que se localizan en el espectro electromagnético, con energía menor a la de la radiación visible pero mayor a la de las radiofrecuencias. Este tipo de irradiaciones no necesita un medio físico para su transmisión por lo que pueden incidir directamente al seno de los reactivos.

La irradiación infrarroja, irradiación térmica o irradiación IR es una emisión que se localiza en el espectro electromagnético entre la radiación visible y la energía de microondas. cabe destacar que la región infrarroja en el espectro electromagnético se divide en tres zonas: Infrarrojo de onda corta, también conocido como infrarrojo "cercano" o "de alta intensidad" con intervalos de banda de 0,76 a 2  $\mu\text{m}$  (NIR por su acrónimo en inglés); Infrarrojo de onda media también conocido como infrarrojo de "medio" o "de intensidad media" con bandas de 2 a 4  $\mu\text{m}$  (MIR por su acrónimo en inglés); y finalmente, el infrarrojo de onda larga también conocido como infrarrojo de "baja intensidad" o "lejano" con bandas de 4 a 1000  $\mu\text{m}$  (FIR por su acrónimo en inglés). Además, la energía infrarroja se dispersa desde una lámpara y, en consecuencia, exponen las superficies de los reactivos, que fácilmente se absorben y se calientan. Por lo tanto, la eficacia de calentamiento está relacionada con la línea de luz entre el origen y el producto, en otras palabras, la radiación infrarroja es una forma directa de calentamiento. Esto, además de la promoción de los modos de vibración en una molécula, son las principales razones de la inherente alta eficiencia energética de los sistemas infrarrojos para activar una reacción o favorecer una extracción. Los emisores están específicamente diseñados para diferentes características de salida de energía<sup>6,25-28</sup>.

Por otro lado, las microondas son un tipo de irradiación electromagnética no ionizante, que causa movimiento molecular por migración de iones y rotación de dipolos; su intervalo de frecuencia es del orden de 300 a 30 GHz, lo cual, en términos de longitud de onda, corresponde a un intervalo de 1 cm a 1 m. El calentamiento rápido inducido por tal radiación evita condiciones desapacibles y la descomposición clásica de los reactivos, conduciendo a la formación de productos bajo condiciones de reacción suaves, aumentando así su rendimiento<sup>29,30</sup>.



En la activación con las microondas, cuando este tipo de irradiación incide sobre un cuerpo, la rotación de sus moléculas se ve afectada mientras que su estructura se mantiene inalterada. En contraste, un calentamiento convencional, por ejemplo mediante un baño de aceite, la energía térmica a través de las paredes del recipiente para finalmente llegar al disolvente y los reactivos. En contraste, cuando se emplea la irradiación con microondas, el acoplamiento de la componente eléctrica de la microonda con los momentos dipolares de la molécula para aumentar su rotación ocurre directamente en el interior del medio, que puede ser un alimento, una disolución acuosa así como un determinado medio de reacción<sup>31-33</sup>. Es decir, cuando las microondas inciden sobre un cuerpo afectan la rotación de sus moléculas; mientras que en un su estructura se mantiene inalterable.

En relación con la activación mediante radiación ultrasónica y activación triboquímica, estos métodos trabajan mediante el uso de ondas mecánicas, las cuales requieren de un medio para poderse efectuar, generalmente un disolvente o la matriz misma de los reactivos.

En el caso de la activación por ultrasonido es una técnica que utiliza ondas mecánicas en el rango de frecuencia ultrasónico, 20 a 100 kHz<sup>34-36</sup>. El fundamento de esta fuente alterna consiste en la producción de burbujas o cavidades en las que se encuentren confinados los reactivos; dichas cavidades modifican su tamaño mediante contracciones y expansiones conforme se mantiene la aplicación; lo que concluye con un fenómeno de implosión generando una alta presión de 1700 atm y temperaturas en el rango de 4500-5000 K, lo que permite la activación del proceso, así mismo es conocido que este proceso genera radicales libres a partir del disolvente mediante un proceso de sonólisis<sup>37</sup>. De manera complementaria, se conoce que la activación presentada mediante el ultrasonido ha demostrado no afectar la vía de reacción así como presentar velocidades de reacción equiparables o superiores a los mismos procesos sin irradiación<sup>37</sup>.

Finalmente, la triboquímica conlleva la activación de reactivos sólidos mediante un proceso de molienda. En este sentido, la molienda prolongada genera en las estructuras sólidas una reducción del tamaño de partícula con un incremento de la

superficie de contacto. así mismo, conlleva la formación de dislocaciones y defectos puntuales en las estructuras cristalinas, aunadas a transformaciones de fase en materiales polimórficos, situaciones que promueven la difusión de átomos así como flujos electrónicos que favorecen las reacciones químicas<sup>38</sup>. El aumento en la rapidez de la reacción presentada por este medio, fue originalmente atribuida a un efecto térmico generado por la fricción, sin embargo esto último no explicaba de manera satisfactoria el fenómeno; por lo cual se han desarrollado algunas teorías que explican la reactividad, señalando que a consecuencia de las colisiones durante la molienda se generan puntos calientes donde las partículas presentan energía vibracional elevada, dando como resultado la ruptura de enlaces<sup>39</sup>, flujo de electrones, generación de especies nucleofílicas y electrofílicas, promoviendo en consecuencia transformaciones químicas.

#### ***III.1.4. Catálisis***

El *principio 9* de la Química Verde establece la preferencia del uso de catalizadores sobre el de agentes estequiométricos.<sup>7,8,24,35</sup>. Al respecto, es importante resaltar que la catálisis es considerada como uno de los pilares fundamentales para la Química Verde, incidiendo en varios principios y ofreciendo múltiples beneficios como la reducción o eliminación de residuos peligrosos, bajos requerimientos energéticos para su actividad, incremento en la selectividad disminuyendo el uso de sustancias auxiliares para el aislamiento de los productos. Adicionalmente, existen catalizadores ambientalmente inocuos como son las arcillas, zeolitas y las enzimas<sup>40,41</sup>. En el presente trabajo se abordará a mayor profundidad el uso de arcillas bentónicas y enzimas como catalizadores verdes.

##### **III.1.4.1 Arcillas**

Las arcillas montmorilloníticas son minerales que se encuentran comúnmente en los suelos y sedimentos. Estos materiales suelen presentar estructuras dendríticas, en su composición son aluminosilicatos mezclados generalmente con cantidades definidas de cuarzo y arena entre otros. Adicionalmente, en su estructura

suelen presentar iones sodio, calcio, magnesio o la combinación de estos, las cuales definen algunas propiedades de estas. Además, son filosilicatos, es decir están formadas por la unión de capas tetraédricas y octaédricas<sup>42-44</sup>.

Entre las aplicaciones de las arcillas montmorilloníticas se encuentran su uso como agentes decolorantes y adsorbentes; sin embargo, también han sido ampliamente utilizadas como catalizadores heterogéneos para reacciones orgánicas. En diversos estudios se ha demostrado que presentan propiedades de ácido de Lewis-Brönsted, en específico las arcillas del tipo bentónicas comerciales, las cuales han mostrado considerables ventajas sobre los catalizadores heterogéneos comunes<sup>45</sup>.

El Tonsil Actisil FF (TAFF) es una arcilla bentónica comercial mexicana que está constituida principalmente por minerales montmorilloníticos; por lo general, el resto es una mezcla de cristobalita, cuarzo, feldspatos y algunos otros minerales; siendo un mineral accesible y económico. Dentro de las propiedades fisicoquímicas más relevantes de esta arcilla se encuentra, su valor promedio de área superficial específica de 198 m<sup>2</sup>/g, así como un volumen y diámetro de poro de 0.32 cm<sup>3</sup>/g y 77.8 Å respectivamente. Al respecto, estos valores son más grandes que en la mayoría de las bentonitas conocidas<sup>45</sup>, lo cual le brinda una buena superficie de contacto y selectividad potencial para interactuar con moléculas de tamaños menores e iguales a su diámetro de poro. En relación con su estabilidad térmica, se debe eliminar el agua adsorbida o intercalada a temperaturas de 81 a 110°C; mientras que el rango de temperatura para su acción catalítica tiene como límite superior los 850°C, temperatura a la cual se presenta la deshidratación estructural. En cuanto a la acidez total, (Lewis y Brönsted-Löwry), ésta disminuye conforme se incrementa la temperatura del sistema de la reacción<sup>42,46</sup>.

En relación al uso catalítico del TAFF, destacan reacciones de apertura de epóxidos<sup>47,48</sup>, oligomerización de epóxidos<sup>49</sup>, transesterificación<sup>50</sup>, oxidación de tioles<sup>46</sup>, síntesis de benciltoluenos<sup>45</sup>, síntesis de ésteres de Hantzsch, y Biginelli<sup>51</sup>, diindolilmetanos<sup>52-54</sup>, oxidación de ésteres de Hantzsch<sup>55</sup>. Así mismo, existen algunos trabajos relacionados con la condensación entre metilenos activos

(malonato de dietilo, malononitrilo, cianoacetamida, ácido cianoacético, ácido barbitúrico y 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona o ácido de Meldrum con aldehídos aromáticos<sup>28</sup>, entre otras.

#### III.1.4.2 Catálisis enzimática

El uso catalítico de las enzimas es una de las alternativas que se ofrecen dentro del protocolo de la Química Verde; estos catalizadores naturales generan un menor impacto ambiental como consecuencia de su carácter inocuo, por su uso en disolventes no dañinos como el agua, su mayor selectividad que reduce el número de subproductos generados, la disminución en el número de etapas sintéticas así como etapas de purificación<sup>24,41</sup>. Sin embargo, una de las limitantes que se presentan es su inestabilidad térmica, su incompatibilidad con algunos disolventes, así como sus costos. En este sentido la enzimología no acuosa tiene una potencial aplicación en síntesis química, farmacéutica e industria de fármacos, particularmente cuando los fármacos son poco solubles o estables en agua<sup>56</sup>. Las lipasas son enzimas que han sido ampliamente utilizadas como catalizadores en disolventes orgánicos, incluyendo reacciones de ésterificación, transesterificación, así como el uso de estas reacciones para la resolución de alcoholes<sup>57</sup>.

Una de las lipasas más versátiles usadas en procesos biocatalíticos es la Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB, EC 3.1.1.3). La forma comercial de esta enzima adsorbida en esferas de poliacrilato es llamada Novozym® 435 y ha sido ampliamente usada en numerosas reacciones sintéticas; ya que posee alta actividad, estabilidad y buen reciclaje. Las esferas tienen un tamaño de partícula promedio de 0.315-1.0 mm(>80%), una densidad en bulto de 0.65–0.8 g/cm<sup>3</sup>, alta área de superficie de 130 m<sup>2</sup>/g (BET), y una alta estabilidad térmica de –20 a 100 °C<sup>58,59</sup>.

La Novozym® 435 ha sido utilizada en una amplia gama de disolventes orgánicos y líquidos iónicos, así como en ausencia de disolventes. Entre las reacciones destacan: la resolución de alcoholes<sup>60</sup>, ésterificaciones y la transesterificación de productos naturales<sup>56,61–64</sup>; además de la acilación de

aminas<sup>65</sup> y epoxidación de dobles enlaces<sup>66,67</sup>. también se ha empleado en reacciones de oxidación tipo Baeyer-Villiger<sup>68</sup>.

### **III.2. Productos naturales**

El *principio 7* de la Química Verde resalta el uso de materias primas renovables sobre aquellas que resultan sintéticas. La mayor fuente de materia prima renovable en el planeta corresponde al material presente en los seres vivos. Esto incluye plantas, cultivos, residuos agrícolas, comida, etc. Ejemplos de estos materiales son la celulosa, lignina, suberina entre otros componentes de las plantas, así como algunos productos naturales<sup>69</sup>.

Los productos naturales comprenden un gran número de compuestos que son extraídos de especies vegetales, como de otros organismos pequeños. Estos compuestos son metabolitos secundarios que suelen presentar estructuras complejas y cuya función metabólica en los organismos de los que son obtenidos, en su gran mayoría, resulta desconocida<sup>70</sup>.

Muchos de estos productos han sido utilizados desde tiempos remotos como parte de la medicina tradicional, fundamentalmente en terapias y tratamientos basándose en el consumo y/o la aplicación de extractos<sup>71</sup>; además de su uso directo, estos productos han sido tomados de base para el desarrollo de una gran cantidad de fármacos, además de ser recopilados en librerías de química combinatoria con la intención de obtener una gran diversidad de productos y de efectos deseados<sup>72</sup>.

En una extensiva revisión de nuevos fármacos entre 1981 y 2006, Newman y Cragg encontraron que el 48% de 1,184 nuevas entidades químicas que fueron autorizadas por la Administración de Alimentos y medicinas de los Estados Unidos (FDA), el 5% correspondían a productos naturales, el 23% a derivados de ellos, y el 20% a compuestos miméticos a los naturales<sup>73</sup>.

En los últimos años, los productos naturales han ganado importancia y popularidad en sus usos terapéuticos, por ser considerados sustancias seguras,

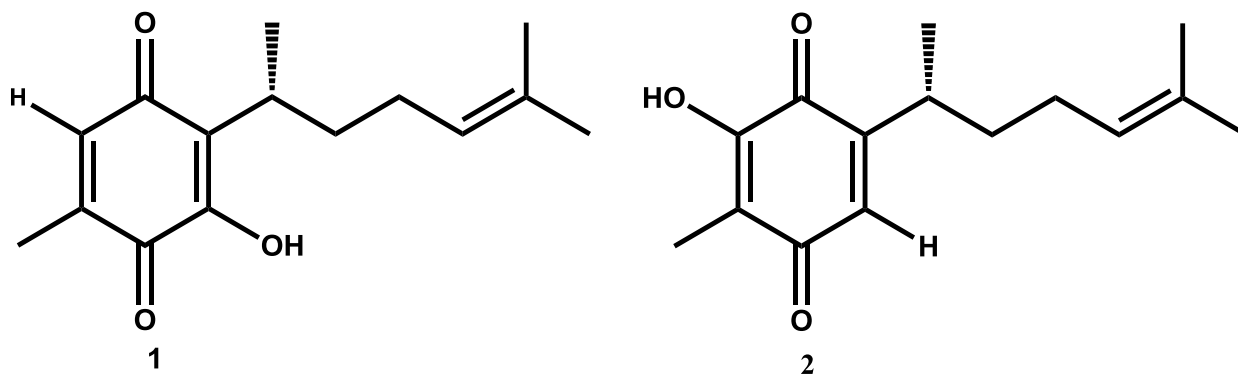
eficientes y con bajos costos<sup>72</sup>, así como por la posibilidad de encontrar alternativas a la medicina convencional para el alivio de malestares y que no presenten sus limitantes<sup>71</sup>.

Además de esto, se ha incrementado el uso de los productos naturales como agentes preventivos para diversos padecimientos, por ejemplo, en Estados Unidos en el 2007 se informó que el 18% de los adultos usaban suplementos alimenticios a base de esta clase de productos, con la finalidad de mejorar su estado de salud, conjuntamente a la prevención de otros padecimientos, aunado a cambios en hábitos alimenticios y de actividad física<sup>74,75</sup>.

Los productos naturales y sus derivados han impactado en varias áreas de la medicina permitiendo el desarrollo de terapias hepatoprotectivas<sup>72</sup>, gastrointestinales, hipertensión, fiebre crónica<sup>71</sup>, inmunológicas, anti-infecciosa<sup>75</sup>, así como antioncogénicas<sup>74</sup>. Entre los compuestos que han presentado actividades anti oncogénica se encuentran la perezona (**1**), su isómero la isoperezona (**2**)<sup>76</sup>, así como los derivados de las asterriquinonas, denominados también indolilquinonas.

### III.2.1 Perezona

La raíz del “pipitzahuac” forma parte de la medicina tradicional mexicana, siendo registrada en el código Badiano-de la Cruz con un gran número de propiedades farmacológicas, dentro de las que se encuentran su uso como laxante, analgésico, antipirético, astringente, catártico, cicatricial y regenerativo, así como diurético<sup>77</sup>.

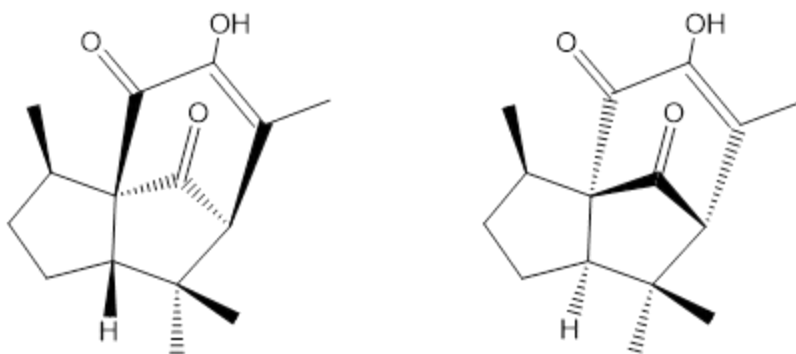


Esquema 1. Estructuras de la perezona e isoperezona

La perezona (*R*)-2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-3-hidroxi-5-metil-*p*-benzoquinona), también conocida como ácido pipitzaico, es una quinona sesquiterpénica abundante en la raíz del “pipitzahuac” (Esquema 1), así como en las raíces de otros miembros del género *Acourtia* (anteriormente *perezia*)<sup>78</sup>.

Esta molécula está reconocida como el primer metabolito secundario aislado en forma cristalina en el nuevo mundo por el Doctor Leopoldo Río de la Loza, quien señaló su aislamiento en 1852<sup>76</sup>. Por este hallazgo, Río de la Loza fue premiado, en 1856, con la medalla de la primera clase por la Sociedad Universal Protectora de las Artes Industriales de Londres<sup>79</sup>.

El mencionado compuesto, desde su descubrimiento hasta 1913, fue objeto de una gran cantidad de estudios enfocados principalmente en la elucidación estructural de la molécula. En 1884, Viginer efectuó algunos estudios con el fin de lograr una descripción más detallada de la perezona<sup>80</sup>, estudios que despertaron el interés de otros investigadores tales como Mylius<sup>81</sup>, Anschütz y Leather<sup>82</sup> para la preparación de nuevos derivados y con ello proponer la fórmula  $C_{15}H_{20}O_3$ . Remfry en 1930 confirmó la fórmula mínima determinada con anterioridad. Además, logró obtener por calentamiento de la perezona a 210°C un compuesto nuevo que poseía un grupo hidroxilo al que llamó pipitzol<sup>83</sup>(Esquema 2).

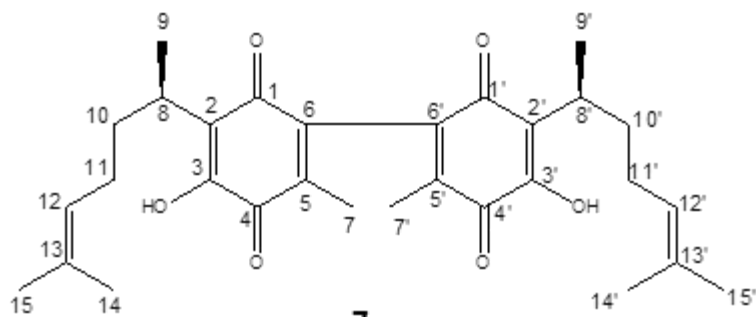


**Esquema 2.** Estructuras de  $\alpha$ -pipitzol y  $\beta$ -pipitzol.

En 1935 Kögl y Boer, propusieron una estructura aceptable para la perezona con base a los resultados obtenidos con anterioridad, en donde se propone que en el anillo

de la quinona el grupo hidroxilo se encuentra vecinal al grupo metilo. La conectividad correcta de la perezona fue determinada en el año 1965, mediante el uso de la resonancia magnética nuclear <sup>84</sup>.

Además, en ese mismo año Walls y colaboradores efectuaron la síntesis total de la perezona estableciendo así la estructura correcta, en donde las señales de los hidrógenos del grupo metilo en 2.05 ppm está acopada (d,  $J^3=1.8$  Hz) con el protón de la quinona en 6.45 ppm (q,  $J^3=1.8$  Hz)<sup>85</sup>.



**Esquema 3.** Dímero de la perezona.

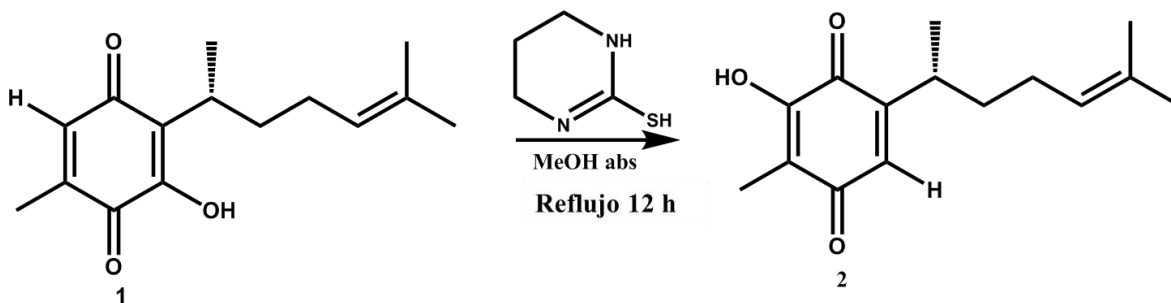
En años subsecuentes, entre la década de los 70s y 80s, se efectuaron diferentes contribuciones a la química de la perezona, basadas en gran medida en el aislamiento del metabolito de diferentes especies vegetales del género *Perezia* (*Acourtia*), entre otras especies<sup>86-91</sup>.

También, es adecuado mencionar, que en el año de 1981, Nathan y Cols.<sup>92</sup> llevaron a cabo la obtención de pipitzoles típicos de perezona, además de reportar como subproducto al dímero de la perezona (Esquema 3), el cual se encuentra unido por las posiciones C-6 y C-6'.

Entre otras contribuciones importantes que fueron realizadas en la década de 1980 se encuentra la síntesis selectiva de  $\beta$ -pipitzol mediante el tratamiento de perezona con ácidos de Lewis, tales como cloruro de aluminio y trifloruro de boro, junto con la determinación del mecanismo por el cual se efectúa dicha transformación<sup>86,92-94</sup>.



La estructura de la perezona propuesta por F. Walls y Cols. fue confirmada y complementada mediante estudios de difracción de rayos X de mono cristal en 1986, determinando los parámetros geométricos de la molécula, confirmando la configuración *R* del carbono 8 y determinando una estructura cristalina monoclinica, indicando la presencia de puentes de hidrógeno e interacciones  $\pi$ - $\pi$  intermolecular en el arreglo del cristal<sup>95</sup>.



**Esquema 4.** Reacción de isomerización de la perezona.

En 1994 se efectuó por primera vez la isomerización de la perezona a isoperezona (**2**), mediante una reacción de transposición del grupo hidroxilo de la quinona por tratamiento con el 3,4,5,6-tetrahidro-2-pirimidintiol en metanol absoluto, a reflujo, Esquema 4<sup>96</sup>. Un estudio detallado de esta reacción fue llevado a cabo en 1997 por Joseph-Nathan y Cols., donde fue posible identificar diferentes derivados de la perezona generados como subproductos de la reacción<sup>97</sup>.

En años recientes los estudios de las propiedades farmacológicas de la perezona han aumentado, adjudicándole a este compuesto y a su isómero algunas propiedades bastante interesantes, por ejemplo, Carabez y Sandoval en 1988, reportaron que la perezona es capaz de aumentar o disminuir, en función de la temperatura, el transporte de electrones a nivel mitocondrial<sup>98</sup>.

En 1995 García X y colaboradores, determinaron que la perezona es capaz de reducir el tono basal del musculo liso. Así mismo, puede bloquear la actividad contráctil inducida por la acetilcolina y los iones  $K^+$  y  $Ba^{+2}$ , lo que depende de la dosis administrada<sup>99</sup>.

En este mismo sentido, en el año de 1997, Alarcón y Cols. determinaron la acción anti hiperglucémica de la perezona, aislada de un extracto de *Acourtia thurberi*, sobre ratones y conejos hiperglucémicos<sup>100</sup>.

Téllez y Cols. en 1999, demostraron que la perezona tiene la capacidad de disminuir la arritmia cardiaca, así como controlar la presión sanguínea<sup>101</sup>. Por otro lado, en el 2001, el equipo de investigación de De la Peña determinó el efecto de agregación plaquetaria que presentan la perezona, pero que no presentan sus análogos: aminoperezona, isoperezona e isoaminoperezona. Esta diferencia fue atribuida, según los autores, a un impedimento estérico en las posiciones C6 o C3 en dichas moléculas respectivamente<sup>102</sup>.

En 2008 se determinó que tanto la perezona como la isoperezona poseen propiedades anti-alimentarias y tóxicas contra algunos insectos, tal es el caso del escarabajo de papa *Leptinotarsa decemlineata*, además de inhibir fuertemente al áfido *Myzus persicae*<sup>103</sup>.

En este mismo año, Martínez J. y colaboradores reportaron la síntesis verde de nuevos sulfuros de perezona e isoperezona empleando tres diferentes modos de activación, térmico convencional en contraste con irradiación infrarroja, así como microondas, en ausencia de disolvente. En este trabajo se obtuvieron rendimientos de bajo a moderado de los compuestos obtenidos<sup>104</sup>.

Una de las propiedades que se ha estudiado recientemente es su efecto citotóxico y antineoplásico. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Sánchez-Torres y colaboradores, en el cual se determinó dicho efecto, vía caspasa dependiente e independiente, sobre la línea celular humana K562, causante de la leucemia mieloide crónica; teniendo un mayor efecto la perezona, aunque las dos presentaron efecto dependiente de la concentración<sup>76</sup>.

Otro trabajo sobre esta misma línea fue, el realizado por Lozada y colaboradores en el 2012, en el cual se prepararon ocho aminoderivados de la perezona por adición nucleofílica con distintas aminas bioactivas. Dichos derivados fueron caracterizados y

se les determinó su efecto citotóxico en células tumorales de las línea PC-3, K-562, HCT-15 y SKLU-1 presentando en todos ellos efectos antioxidantes y citotóxicos<sup>78</sup>.

Finalmente, en el 2013 se describió la síntesis de un nuevo derivado de la perezona con propiedades de agente acomplejante de aniones, siendo evaluada en presencia de fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro de tetrabutilamonio, presentando comportamientos colorimétricos en presencia de sales inorgánicas<sup>105</sup>.

En perspectiva, es posible observar que la perezona e isoperezona son compuestos de interés científico, tanto por su química como por la diversidad de propiedades farmacológicas atribuidas a estas moléculas, resultando candidatas para su modificación, con la finalidad de generar nuevos derivados en los cuales se busque la potencialización de las propiedades farmacológicas.

La obtención de nuevas moléculas con propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes ha sido a lo largo de la historia uno de los principales objetivos de la Síntesis Orgánica; para lo cual se ha recurrido a la generación de constructos a través de la unión de fragmentos moleculares de compuestos de origen natural o sintético denominadas moléculas híbridas; esta clase de moléculas pueden presentar las propiedades moduladas o amplificadas de las especies químicas que las conforman<sup>106</sup>.

Con base en las características planteadas de las indolilquinonas, la perezona e isoperezona se ven sus potenciales aplicaciones individuales para terapia antineoplásica. Sin embargo, también resulta interesante analizar el posible efecto sinérgico que presentarían al encontrarse en común en diversas estructuras, ya sea en forma de un fragmento o en su totalidad, dando origen a productos híbridos.

## **CAPÍTULO IV: FILOSOFÍA**

### **IV.1. Planteamiento del problema**

El desarrollo mundial actual se ha centrado bajo la directriz del desarrollo sostenible, a fin de no comprometer los recursos de las generaciones futuras, pero satisfaciendo las necesidades presentadas en la época actual; en ese sentido, la UNESCO ha señalado una urgencia por fortalecer una educación encaminada al desarrollo sostenible a partir de los ramos académicos, industriales y de investigación. Una vía para lograr tanto el desarrollo sostenible como una educación centrada en este último, es la Química Verde, mediante la cual se impacta a los pilares ambientales y económicos de dicho desarrollo. En este sentido, es necesario implementar y adecuar los procesos actuales a un acercamiento verde, reduciendo la generación de residuos y que resulten factibles económicamente.

Estableciendo lo anterior y teniendo en cuenta que en el mundo uno de los principales problemas de salud es el cáncer, se hace preciso desarrollar nuevos compuestos con potencial anticarcinogénico pero que a su vez, su proceso de obtención no implique una grave afectación ambiental; asimismo, es importante resaltar que en México, dentro de su vasta medicina tradicional, se ha identificado a la perezona como un compuesto de propiedades farmacológicas interesantes, sobresaliendo su efecto citotóxico contra células cancerosas.

Por todo lo anteriormente comentado, se vuelve obligado recurrir al protocolo de la Química Verde, para lograr la obtención de moléculas derivadas y nuevas de la perezona.

### **IV.2. Hipótesis**

Recurriendo al protocolo de la Química Verde, por un lado se podrán establecer nuevas metodologías para la extracción e isomerización de la perezona, y , por otro lado de manera complementaria será factible la producción de nuevas moléculas híbridas de la perezona e isoperezona con el indol, mediante reacciones de adición tipo Michael, así como por una epoxidación-verde del enlace C12-C13

de los sustratos objetivos generar compuestos candidatos a presentar actividad biológica contra células cancerígenas; de esta manera se contribuirá a la educación en el desarrollo sostenible (EDS) mediante el empleo del protocolo de la Química Verde. Finalmente, la actividad farmacológica podrá ser correlacionada con parámetros de estructura-reactividad empleando métodos teóricos-computacionales.

### **IV.3. Objetivos**

#### ***IV.3.1. Objetivo general***

Estudiar la solubilidad y la extracción de perezona empleando métodos verdes, particularmente usando dióxido de carbono supercrítico; A su vez promover la formación de la isoperezona mediante recursos de la Química Verde, y así, emplear perezona e isoperezona como materias primas, para obtener un número amplio de derivados nuevos de ellas, esto último también mediante el protocolo de la Química Verde; asimismo, evaluar el efecto apoptótico de las moléculas obtenidas además de determinar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas mediante métodos teóricos-computacionales-químico-informáticos. Todo lo anterior, para contribuir al acervo de la química de la perezona y de la Química Verde, atendiendo al llamado de la UNESCO de educar en el Desarrollo Sostenible.

#### ***IV.3.2. Objetivos particulares***

- I. Aislar de un espécimen vegetal del género *Acourtia* a la perezona, materia prima renovable.
- II. Realizar un estudio profundo sobre la solubilidad de la perezona empleando CO<sub>2</sub> supercrítico.
- III. Acto seguido al objetivo anterior, efectuar a extracción de perezona empleando el dióxido de carbono supercrítico

- IV. Realizar un estudio comparativo de la extracción de perezona mediante activación con fuentes no convencionales de energía, empleando resultados previos de nuestro grupo de trabajo.
- V. Efectuar la isomerización de la perezona, a isoperezona con una estrategia verde, para obtener el sustrato **2**.
- VI. Caracterizar fisicoquímicamente la perezona e isoperezona mediante técnicas de difracción de rayos X de polvos, análisis térmico y metodologías teórico-computacional-químico informático.
- VII. Obtener derivados indólicos de la perezona e isoperezona por adición tipo Michael (**6** y **7**) mediante una estrategia verde, de manera complementaria generar las indolilquinonas de la plumbagina y la menadiona (**8** y **9**)
- VIII. Oxidar selectivamente el doble enlace en el carbono 12 y 13 de las moléculas **1** y **2** para obtener los epóxidos correspondientes **10** y **11**.
- IX. Realizar pruebas de apertura de los epóxidos (**10** y **11**) a fin de obtener los productos **12-15**.
- X. Generar los dioles **16** y **17** por apertura hidrolítica de **10** y **11**.
- XI. Determinar la actividad de los productos objetivos (**6-17**) como agentes promotores de la muerte celular programada.
- XII. Evaluar mediante un estudio teórico-computacional las moléculas anteriormente sintetizadas correlacionando los parámetros obtenidos con su actividad farmacológica.

## **CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSION**

### **V.1. Extracción verde de la perezona mediante el uso de fuentes alternas de activación y CO<sub>2</sub> supercrítico como disolvente**

La extracción es una etapa importante involucrada en la recuperación de componentes bioactivos a partir de materiales vegetales. Es bien conocido que existen diversos métodos disponibles para la extracción de compuestos metabólicos<sup>107</sup>, tales como: extracción con disolventes<sup>108</sup>, agua caliente presurizada<sup>109</sup>; asimismo, en vía de acelerar la extracción de componentes bioactivos de plantas, algunos acercamientos verdes han sido empleados, como es el uso de la extracción con disolvente asistida por ultrasonido (UASE por sus siglas en inglés)<sup>107,110,111</sup>, además de la extracción con disolvente asistida por microondas (MASE por sus siglas en inglés)<sup>112-115</sup>, las cuales han sido actualmente empleadas junto a las técnicas convencionales de extracción como son el macerado y la extracción con Soxhlet. Adicionalmente a lo anterior, el uso de la irradiación infrarroja en especial la FIR (irradiación infrarroja lejana) para la activación también ha sido empleada; lo que no descarta el uso de otras zonas del infrarrojo<sup>27</sup>. Finalmente, el dióxido de carbono supercrítico ha demostrado ser un disolvente verde con una gran cantidad de ventajas en el proceso de extracción, ya que se pueden modular sus propiedades con base en la presión y temperatura de este, así como la facilidad con la cual se elimina del extracto.

La fuente de activación así como las variaciones en el disolvente modifican las propiedades del extracto, variando el contenido y selectividad hacia ciertos metabolitos además del rendimiento del extracto, lo que resulta importante en el ramo de la Química Verde, ya que al desarrollar métodos más selectivos se reduce los desechos generados, adicionalmente el empleo de las fuentes alternas de activación puede impactar en la eficiencia energética reduciendo el consumo en comparación con el calentamiento convencional<sup>116</sup>.

La perezona como se señaló anteriormente es una molécula de interés por sus propiedades farmacológicas y sus potenciales usos; dicho metabolito ha sido

extraído mediante el uso de métodos convencionales como son el macerado<sup>86,87</sup> y extracción por reflujo mediante el uso de *n*-hexano como disolvente<sup>104</sup>; sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado ningún acercamiento verde a la extracción de dicha molécula. Así, en esta tesis se presenta un estudio profundo y sistematizado de la solubilidad de perezona en CO<sub>2</sub>SC; y, acto seguido se describe el estudio comparativo de la extracción de perezona mediante el uso de dióxido de carbono en condiciones supercríticas con otros *resultados de nuestro grupo de trabajo mediante el empleo de infrarrojo, ultrasonido, microondas*<sup>117,118</sup>.

### V.1.1. Extracción convencional de perezona.

Como se señaló en el apartado de metodología, se realizó la colecta de dos especímenes vegetales pertenecientes al género *Acourtia*, en distintas zonas de la sierra de Guadalupe, siendo identificados como *Acourtia platyphylla* y *Acourtia cordata*. A las raíces secas de dichos especímenes se les efectuó el procedimiento de extracción de perezona de acuerdo a la metodología previamente establecida<sup>86,87,90,93,104</sup>.

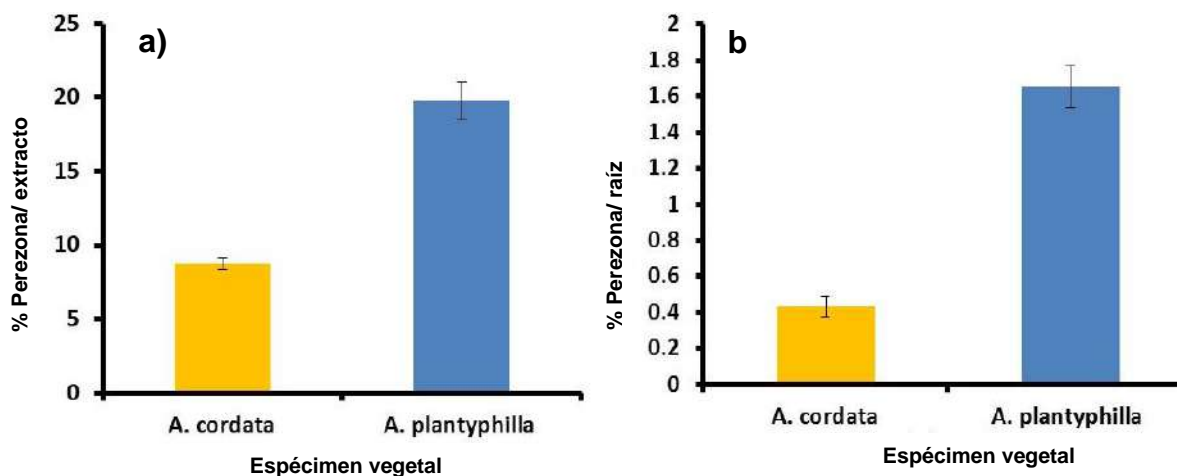


Figura 1. Extracción mediante el método convencional: a) Selectividad b) rendimiento del proceso.



El producto de la extracción previa cristalización, consistió en un sólido naranja cristalino, que fue identificado como perezona mediante comparación con una muestra auténtica, (*ccf* y *pf* de 102-103°C). Adicionalmente se complementó la identificación por medio de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono trece, así como por sus datos de espectrometría de masas (Espectros presentes en la sección de anexos-espectro I-3). Todos los datos se correlacionaron con los reportados en la literatura (*vide supra*).

Es conveniente resaltar que, se determinó comparativamente tanto el rendimiento en la raíz seca, así como la selectividad del método empleando como materias prima los especímenes *A. cordata* y *A. platyphylla* (Figura 1), complementándose la evaluación con los datos recientes también de nuestro grupo de trabajo<sup>117,118</sup>.

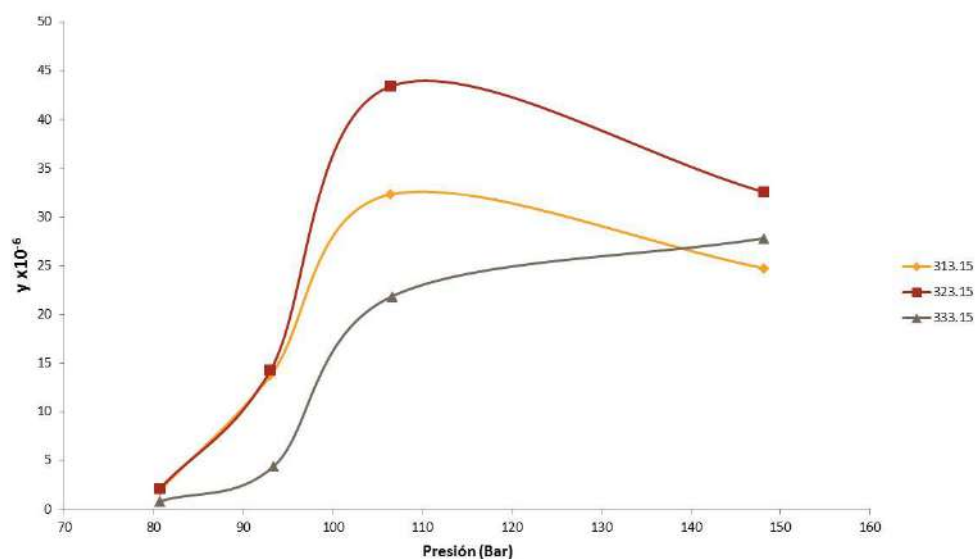
Los rendimientos de extracción mostraron un contenido menor de perezona en la muestra de *A. Cordata* (0.433%) recolectada, en comparación con el contenido mostrado por *A. platyphylla* (1.656%); siendo este último resultado un valor más acorde a los previamente reportados, en donde se establecen rendimientos que van desde el 1 hasta el 7% para la perezona<sup>86,87,90,93,104,119</sup>. Es conveniente señalar también que, la muestra de *A. cordata* recolectada exhibió además la presencia de ésteres de perezona e hidroxiperezona de manera abundante y que habían sido reportados previamente en diversos especímenes del género<sup>120-122</sup>, mientras que en el caso de *A. platyphylla* no se detectaron otros productos. Con base a la cantidad de perezona presente en los extractos se determinaron las correspondientes selectividades de 8.780 y 19.784% respectivamente para cada espécimen. Teniendo en consideración estos resultados se estableció que el primer objetivo fue cubierto satisfactoriamente.

### ***V.1.2. Extracción de perezona mediante el uso de CO<sub>2</sub> supercrítico.***

#### **V.1.2.1 Estudio de la solubilidad de la perezona en dióxido de carbono supercrítico**

En consideración al objetivo particular dos de la presente tesis, el cual plantea realizar la extracción de la perezona mediante el uso del dióxido de carbono

supercrítico como una alternativa verde a la extracción convencional empleando *n*-hexano como disolvente, fue necesario en primer lugar efectuar un análisis de la solubilidad de la perezona en el dióxido de carbono supercrítico para establecer las condiciones óptimas de solubilidad del compuesto puro, así como realizar los ajustes correspondientes para lograr obtener el metabolito a partir de la muestra vegetal. La evaluación de la solubilidad tomó como referencia los estudios reportados previamente para la *p*-benzoquinona<sup>123,124</sup>, considerada por su similitud con el compuesto de interés. Considerando estas metodologías se establecieron las presiones de 80, 93, 106 y 148 bar, así como el uso de temperaturas de 40, 50 y 60°C, condiciones de presión y temperatura superiores al punto crítico del dióxido de carbono. A partir de los datos de solubilidad fue posible establecer las isoterms para el proceso de disolución, mismos que son representadas en la Figura 2.



**Figura 2.** Isotherms de solubilidad de la perezona a 313.15, 323.15 y 333.15 K.

Los resultados de las isoterms de solubilidad, expresadas en fracción molar de perezona disuelta en el CO<sub>2</sub>, muestran que por arriba de 106 bars se presenta una zona de saturación en la cual a pesar de que se aumente la presión la solubilidad de la perezona no se ve aumentada.

En el caso de la temperatura de 40°C se logró una solubilidad máxima de  $1.936 \times 10^{-4}$  (masa de perezona/masa de CO<sub>2</sub>); mientras que a 50°C bajo esas mismas se logró una solubilidad de  $2.363 \times 10^{-4}$  (masa de perezona/masa de CO<sub>2</sub>). Los rangos de presión en los cuales se establece la zona de saturación, son coherentes con los establecidos para la *p*-benzoquinona y la 8,9-antraquinona las cuales de igual manera establecen una zona asintótica con respecto a la solubilidad por arriba de los 100 bars<sup>123,124</sup> con los correspondientes cambios de solubilidad a consecuencia de sus diferencias estructurales. Así mismo, se destaca que, al incrementar la temperatura a 60° C, la solubilidad del compuesto se ve disminuida, sin presentar una zona de saturación del sistema tan inminente como a las temperaturas previamente evaluadas. Este fenómeno de disminución de la solubilidad con el incremento de la temperatura también fue previamente reportado para la *p*-benzoquinona, observándose que a partir de 333 K conforme se aumenta la temperatura en sistemas que presentan también hidroquinona<sup>123</sup>

Una vez establecidas las isotermas de solubilidad y como complemento a los resultados obtenidos se llevó a cabo el modelado de los datos a fin de establecer los parámetros termodinámicos del proceso de disolución. La solubilidad de muchos compuestos en CO<sub>2</sub> supercrítico (CO<sub>2</sub>SC) puede modelarse con diferentes ecuaciones en función de la temperatura y de la presión. Estas variables tienen influencia principalmente sobre la densidad del fluido y por lo tanto sobre el poder extractivo del CO<sub>2</sub>SC<sup>17</sup>.

Debido a su simplicidad y fácil aplicación la ecuación de Chrastil es el modelo más ampliamente utilizado para correlacionar los datos de equilibrio de un sistema sólido-fluido. La ecuación de Chrastil fue modificada por Sun y Li<sup>125</sup> incorporando más parámetros como función de la solubilidad del fluido supercrítico. La ecuación de Chrastil modificada tiene un mayor intervalo de aplicaciones y está representada por:

$$\ln S = k' \ln d + a'/T + b \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$$k' = k_0 + k_1 d \quad \text{Ecuación 2}$$

$$a' = a_0 + a_1 d \quad \text{Ecuación 3}$$

En esta ecuación, la solubilidad ( $S$ ) es descrita en términos de la temperatura ( $T$ ), la densidad del fluido supercrítico ( $d$ ), el número ( $k$ ) de moléculas de disolvente que interactúan con una molécula de soluto, y de dos constantes ( $a$  y  $b$ ),  $a$  que depende de las energías de disolución y de vaporización del soluto, y  $b$  que depende de  $k$ .

**Tabla 1.** Solubilidad experimental y calculada con la ecuación de Chrastil

<b>P(bar)</b>	<b>T (K)</b>	<b>S<sup>exp</sup> (fr peso)</b>	<b>S<sup>cal</sup> (fr peso)</b>	<b>AARD (%)</b>
80.63	313.15	1.082E-05	1.529E-05	
93.03	313.15	7.736E-05	8.903E-05	
106.47	313.25	1.821E-04	1.506E-04	22.66
148.16	313.15	1.936E-04	2.262E-04	
80.63	323.15	1.175E-05	1.224E-05	
93.03	323.15	8.043E-05	3.010E-05	
106.47	323.15	2.447E-04	8.748E-05	35.50
148.16	323.15	2.363E-04	2.622E-04	
80.63	333.15	4.593E-06	1.290E-05	
93.38	333.15	2.478E-05	2.666E-05	
106.61	333.15	1.232E-04	5.542E-05	78.15
148.16	333.15	1.567E-04	2.652E-04	

Los datos experimentales de solubilidad de perezona en CO<sub>2</sub>SC, previamente mostrados, fueron modelados mediante el uso de la ecuación de Chrastil y Chrastil modificada, cuyos resultados son mostrados en las Tabla s 1 y 2.

El análisis de la correlación de los datos con la ecuación de Chrastil resultaron ser no satisfactorios al presentar un valor bajo de coeficiente de correlación ( $r^2=0.7695$ ). Así mismo se determinaron los valores del promedio absoluto de las desviaciones relativas (AADR%) entre los valores experimentales y calculados de la solubilidad observándose valores bastante elevados para los mismos que van desde el 22.6% hasta el 78. 15% para la temperatura más alta.

$$\ln S = (6.962 - 0.00777d)\ln d + \frac{(14.4245 - 1.044 \times 10^4 d)}{T} - 17.6974 \quad \text{Ecuación 4}$$

En forma adicional, los datos experimentales fueron evaluados a través de la ecuación de Chrastil modificada, resultando en un mejor ajuste así con una correlación cuyo coeficiente fue  $r^2=0.9055$ . Con base al modelado con la ecuación de Chrastil modificada de los datos experimentales de la solubilidad de perezona en CO<sub>2</sub>SC, fue posible obtener la ecuación que describe de manera satisfactoria la solubilidad para **1**, la cual está dada por la ecuación 4.

En la Tabla 2 se muestra los resultados de la solubilidad de perezona en CO<sub>2</sub>SC, tanto experimental como calculados con la ecuación modificada de Chrastil, en los resultados se puede observar que los valores del promedio absoluto de las desviaciones relativas son menores que los obtenidos con la ecuación de Chrastil, en particular a los 333 K, aun cuando los datos siguen presentando valores de AADR altos.

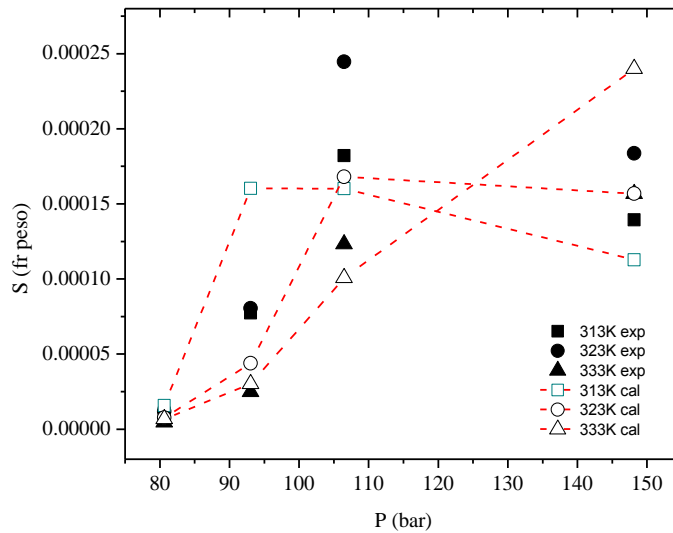
En la Figura 3 se muestra la influencia de la temperatura y la presión sobre la solubilidad de perezona en CO<sub>2</sub>SC con base al ajuste a la ecuación modificada de Chrastil, mostrando el aumento significativo de la solubilidad al aumentar la presión, como se había señalado anteriormente. En el caso de las temperaturas bajas (313 y 323 K) la solubilidad alcanza el equilibrio después de los 100 bar de

presión; mientras que a la temperatura más alta (333 K) la solubilidad se incrementa en todo el intervalo de presión estudiado.

**Tabla 2.** Solubilidad experimental y calculada con la ecuación de Chrastil modificada

<b>P(bar)</b>	<b>T (K)</b>	<b>S<sup>exp</sup> (fr peso)</b>	<b>S<sup>cal</sup> (fr peso)</b>	<b>AARD (%)</b>
80.63	313.15	1.082E-05	1.571E-05	
93.03	313.15	7.736E-05	1.603E-04	45.91
106.47	313.25	1.821E-04	1.601E-04	
148.16	313.15	1.394E-04	1.127E-04	
80.63	323.15	1.175E-05	7.619E-06	
93.03	323.15	8.043E-05	4.391E-05	31.60
106.47	323.15	2.447E-04	1.681E-04	
148.16	323.15	1.836E-04	1.569E-04	
80.63	333.15	4.593E-06	6.795E-06	
93.38	333.15	2.478E-05	3.007E-05	35.18
106.61	333.15	1.232E-04	1.007E-04	
148.16	333.15	1.567E-04	2.400E-04	

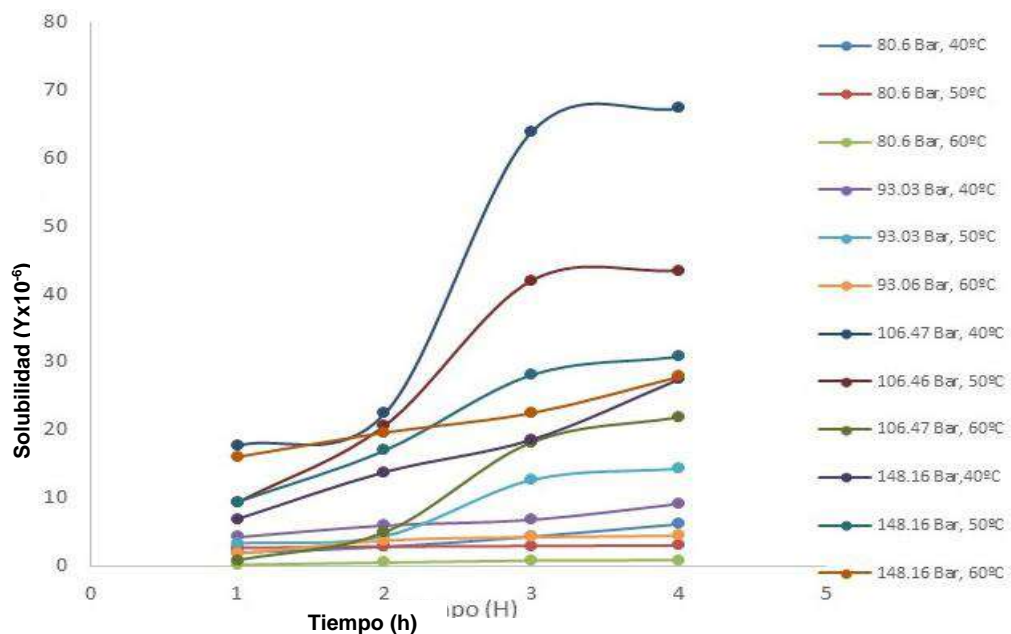
Con base al análisis de resultados anterior se puede establecer que la solubilidad máxima expresada en fracción peso de perzona en CO<sub>2</sub>SC fue de 2.45x10<sup>-4</sup>, en los intervalos de presión y de temperatura de 323.15 K y 106.47 bar. Considerando los parámetros estadísticos del promedio absoluto de las desviaciones relativas y de la correlación cuadrática, la ecuación de Chrastil modificada reproduce de mejor manera los resultados experimentales



**Figura 3.** Efecto de la presión a diferentes temperaturas sobre la solubilidad de perezona en  $\text{CO}_2\text{SC}$  experimental y calculada con la ecuación de Chrastil modificada

En relación al modelado de los resultados por la ecuación de Chrastil, se pudo apreciar que los valores del promedio absoluto de las desviaciones relativas fueron señalados como valores altos, aun encontrándose en los rangos presentados en algunas publicaciones, esta diferencia elevada ha sido atribuido por algunos autores al manejo que presenta el método de Chrastil en la solubilidad al ser propuesta en gramos por litros, que es una forma de concentración que varía con la temperatura, mientras que el uso de la fracción molar resulta un parámetro sin efecto de la temperatura<sup>126</sup>. Es importante indicar también que todos los métodos con funciones logarítmicas como es el caso de las ecuaciones de Chrastil, han reportado incidencias en las cuales se carece de relación lineal entre la solubilidad y la presión a condiciones isotérmicas, una relación no lineal entre solubilidad y la temperatura en procesos isobáricos; así como ciertas regiones de linealidad<sup>126,127</sup>. En este sentido para poder predecir en base a los modelos teóricos los resultados de solubilidad más precisos, es necesario que se busque analizar los datos experimentales de la perezona a la luz de otras propuestas que describan el comportamiento de solubilidad, cuestión que queda fuera de los alcances del presente trabajo.

Por otro lado, y continuando por la misma línea del estudio de la solubilidad de la perezona en fluidos supercríticos se empezó con el estudio cinético a fin de completar el estudio de la perezona en este disolvente neotérico. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.



**Figura 4.** Cinéticas de solubilidad de la perezona en CO<sub>2</sub>SC.

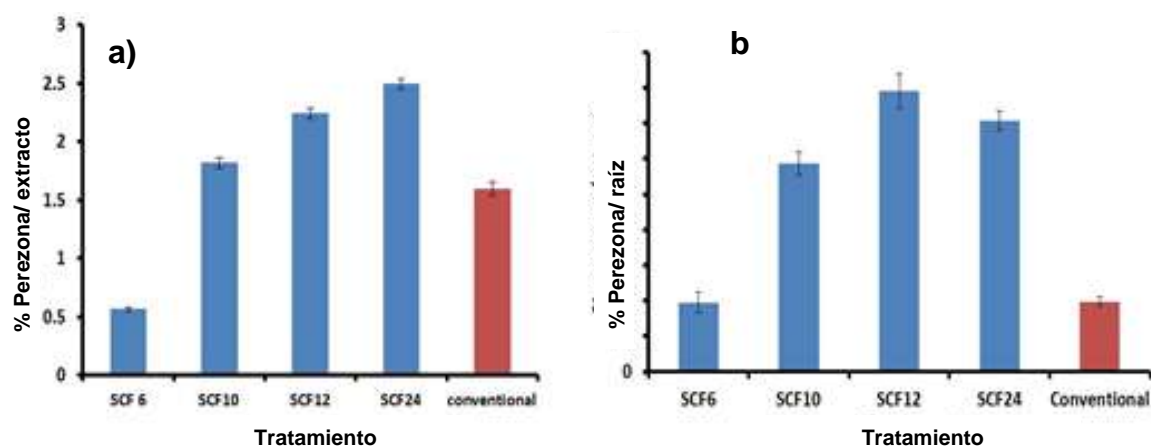
Los resultados refieren una tendencia asintótica, estableciendo de esta manera que al tiempo de 4 h ya se ha logrado el equilibrio de solubilidad de la perezona en el CO<sub>2</sub>SC por lo que el uso de este tiempo resulta adecuado en el momento de establecer las condiciones de solubilidad.

Es importante señalar que la buena solubilidad presentada por la perezona en el dióxido de carbono supercrítico es una consecuencia de la naturaleza no polar del fluido, así mismo este último puede cambiar a ligeramente polar debido a la existencia de un momento cuadrupolar. En este sentido el dióxido de carbono supercrítico ha sido considerado como un disolvente hidrofóbico con una polaridad equiparable a la del *n*-hexano<sup>128</sup>, siendo este último el disolvente ideal para la extracción de la perezona.



### V.1.2.2 Estudio de la extracción de la perezona en CO<sub>2</sub>SC

Una vez establecidas las condiciones de máxima solubilidad de la perezona en el fluido (106 Bar, 50°C) y determinando 4 h como un tiempo mínimo para el establecimiento del equilibrio, se procedió a realizar el estudio con el espécimen vegetal.



**Figura 5.** Extracción de perezona mediante el uso de dióxido de carbono supercrítico: **a)** rendimientos comparativos entre los tiempos de extracción con fluido supercrítico y el método convencional. **b)** Selectividad de la metodología de fluidos supercríticos para la perezona comparado con el método tradicional

Una muestra de raíz de *Acourtia platyphylla* colectada fue expuesta al fluido a las condiciones determinadas en el estudio anterior, con tiempos de contactos de 6, 10, 12 y 24 h (CO<sub>2</sub>SC1, CO<sub>2</sub>SC2, CO<sub>2</sub>SC3 y CO<sub>2</sub>SC4 respectivamente). El aumento en el tiempo mínimo de exposición de 4 a 6 h fue realizado considerando la penetración del fluido en el tejido, así como la complejidad estructural del mismo. Los resultados obtenidos de la extracción de *A. platyphylla* son mostrados en la Figura 5.

Los rendimientos de extracción muestran a un tiempo de contacto de 6 h (CO<sub>2</sub>SC1) una cantidad de perezona menor (0.567%) que el método convencional (1.600%); sin embargo cuando el tiempo de contacto se incrementa el rendimiento del producto mediante fluidos supercríticos resulta ser ligeramente mayor al obtenido por el método convencional (1.817), finalmente los tiempos de 12 y 24

horas de contacto generaron los mejores rendimientos (2.243 % y 2.495 % respectivamente) y superando el obtenido por el método convencional, así mismo se puede observar que entre estos tiempos el rendimiento resulta muy similar, indicando un comportamiento asintótico, por lo que se puede establecer que después de las 12 horas, el tiempo de contacto ya no tiene un efecto significativo sobre el aumento en el rendimiento.



**Figura 6.** Extracto de perezona, a partir de *A. platyphylla* con CO<sub>2</sub>SC. Los cristales amarillos corresponden al producto aislado.

Respecto a la selectividad de la extracción con fluido supercrítico, (Figura 5b) el tratamiento a 6 h resulto con un valor estadísticamente igual al método convencional; así mismo, un incremento en el tiempo de contacto acrecienta la selectividad del trabajo consiguiendo una selectividad de  $79.131 \pm 4.771$  % y disminuyendo a  $70.738 \pm 2.677$  % a las 24 h.

Los buenos resultados obtenidos con el CO<sub>2</sub>SC es consecuencia de la buena penetración del fluido supercrítico en materiales sólidos<sup>10</sup> y la naturaleza poco polar de la perezona<sup>121</sup>, condición previamente establecida para una buena extracción además de la similitud en polaridad del CO<sub>2</sub>SC y los disolventes como el *n*-hexano, usado como disolvente ideal para la perezona de manera clásica. La Figura 6 muestra la malla utilizada en la celdilla de contacto del equipo, en ella se puede apreciar grandes cantidades de producto cristalino adheridos a las paredes externas del mismo.

Es importante resaltar que este procedimiento incide en el *principio 5* de la Química Verde el cual exhorta a no usar disolventes o sustancias auxiliares, y que en caso de usarse sean lo más inocuo posibles. Esto último como resultado del carácter inofensivo del CO<sub>2</sub>SC al ambiente y los seres vivos. Otro aspecto por resaltar es, la obtención del producto cristalino con una alta pureza lo que reduce los procedimientos de purificación del compuesto; adicionalmente se utiliza una temperatura menor a la del método convencional.

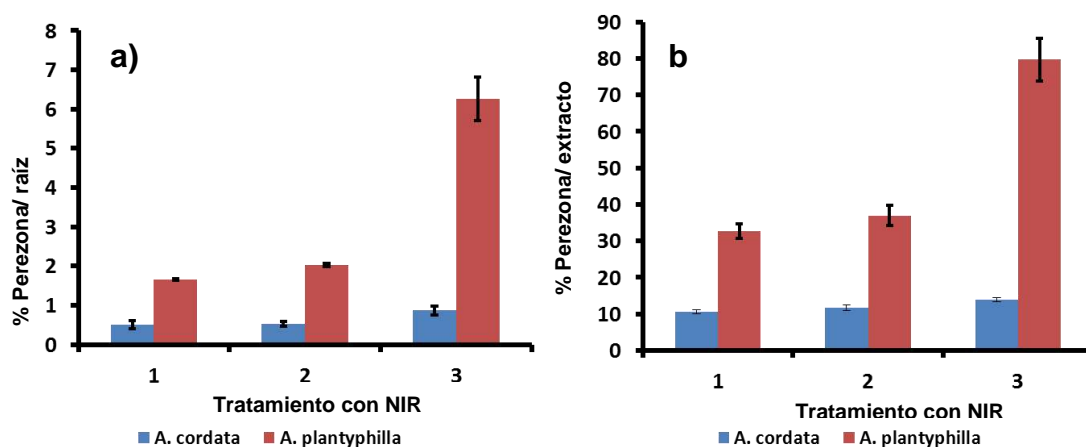
### ***V.1.3. Estudio comparativo de la extracción de perezona mediante el uso de fuentes alternas de activación.***

En forma complementaria al primer y segundo objetivo, los cuales consistían en la extracción de perezona por el método clásico y mediante el uso de un disolvente verde como es el dióxido de carbono supercrítico, se efectuó un estudio comparativo de la extracción de perezona mediante el uso de fuentes de activación no convencionales tales como: infrarrojo, microondas y ultrasonido, los cuales fueron contrastados con el método convencional para ambos espécimenes vegetales (*A. platyphylla* y *A. cordata*)<sup>117,118</sup>. Siendo cotejados los valores obtenidos en este trabajo con otros recientes del mismo grupo de trabajo (*vide supra*).

#### **V.1.3.1 Extracción promovida por irradiación con infrarrojo cercano.**

La extracción promovida por infrarrojo cercano fue realizada probando tres condiciones diferentes para ambas raíces; En primer lugar, la raíz seca fue expuesta 15 minutos, con la temperatura mínima permitida (121 °C) de irradiación infrarroja cercana (NIR por su acrónimo en inglés), seguido por la adición de *n*-hexano (30 mL) y una segunda irradiación en las mismas condiciones previamente señaladas (1). La segunda condición probada (2) implicó colocar la raíz en 30 mL de *n*-hexano e irradiarlos por un tiempo total de 15 minutos, considerando 5 min de irradiación seguido por 5 min de agitación. Las últimas condiciones (3) probadas, consistieron en una variación del procedimiento anterior, modificando el tiempo de irradiación; utilizando un tiempo de 30 minutos; considerando periodos de 5 minutos de

irradiación y a 5 minutos de agitación. Los rendimientos y los valores de selectividad obtenidos se muestran en la Figura 7.



**Figura 7.** Tratamientos empleados en la extracción de perezona a partir *A. cordata* y *A. platyphylla* usando NIR, 15 minutos sin disolvente, seguidos por 15 minutos con disolvente (1), 15 minutos con disolvente (2), a 30 minutos con disolvente (3). a) Rendimiento b) selectividad.

Considerando las primeras condiciones probadas, usando la raíz seca de *A. platyphylla*, mostraron que al realizarse la irradiación en seco y posteriormente con disolvente, el rendimiento promedio de la perezona fue de  $1.656 \pm 0.027$  %, este valor resultó estadísticamente igual al rendimiento obtenido con la extracción mediante el método convencional. La misma tendencia se observó en las raíces de *A. cordata*, que tuvo un rendimiento de  $0.500 \pm 0.100$  % siendo estadísticamente igual al método convencional. Además, teniendo en cuenta la selectividad definida anteriormente, el valor obtenido para la extracción asistida por infrarrojos de la perezona en *A. platyphylla*, fue de 32.745 % en comparación con los 19.784 % en condiciones convencionales, mientras que en *A. cordata* el valor encontrado fue de 11.65 % en contraste con el 8.78 % en el método convencional. Los anteriores resultados nos permiten destacar que a pesar de que en estas condiciones el rendimiento es estadísticamente igual al método convencional, las extracciones promovidas por infrarrojo presentaron mayor selectividad que las condiciones clásicas, lo que se puede traducir en una menor cantidad de otros metabolitos extraídos y una mejor y fácil purificación.

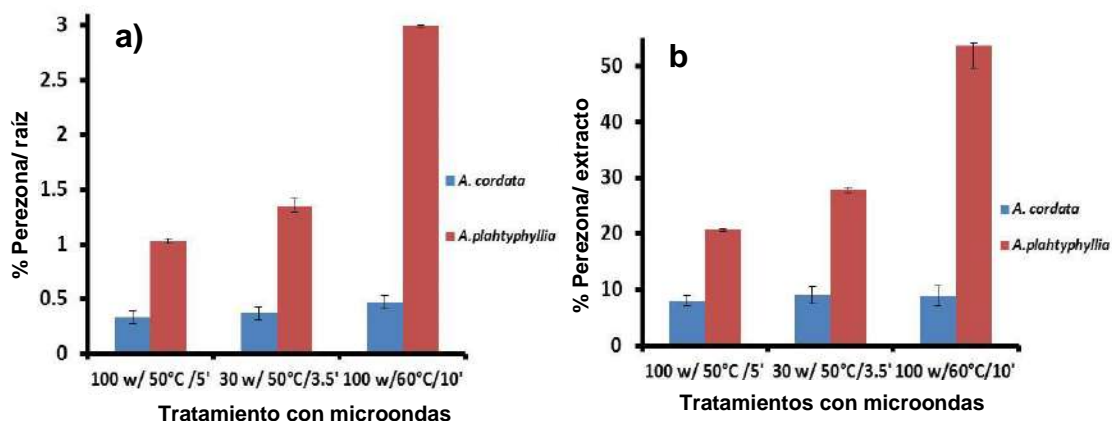
Las segundas condiciones evaluadas (**2**), 15 minutos de irradiación con infrarrojo cercano, estando la muestra en contacto con disolvente presentando un comportamiento similar; Los rendimientos de perezona mencionados para *A. cordata* no presentan diferencias significativas con el tratamiento 1 y las condiciones convencionales. Sin embargo, en *A. platyphylla* el rendimiento (2.036 %) mostró diferencia estadística con el tratamiento 1 (1.656%) y el proceso convencional (1.652 %). Con respecto a la selectividad, el tratamiento 1 y 2 no muestra diferencia significativa entre ellos, sin embargo, en comparación con el método convencional, la selectividad del tratamiento 2 es mayor.

Los cambios mayores en los rendimientos de la perezona fueron obtenidos bajo las condiciones **3**, mostrándose en ambas raíces un incremento en los valores de perezona. Los resultados en *A. cordata* muestran un rendimiento de extracción correspondiente al doble logrado con el método clásico (0,866 %), mientras que en caso de *A. platyphylla*, el porcentaje obtenido fue casi 4 veces (6.270 %) de la cantidad obtenida en el método clásico.

La diferencia entre los rendimientos térmicos convencionales y el proceso de extracción mediante activación con el infrarrojo se atribuye a que la energía infrarroja es fácil de absorber por las superficies de los productos teniendo como consecuencia el calentamiento de estos. En este sentido, la eficacia del calentamiento está relacionada con la distancia entre el origen de la irradiación y el producto; en otras palabras, la radiación de infrarrojos es una forma directa de calefacción. También es conveniente señalar, que la irradiación infrarroja promueve los modos vibracionales en una molécula, siendo estas las principales razones de la alta eficiencia energética inherente en los sistemas infrarrojos para activar una reacción o en favor de una extracción<sup>27,129</sup>. En este sentido, es importante puntualizar que los rendimientos obtenidos estadísticamente igual y superiores al método convencional se lograron en tiempos de extracción menores a los previamente establecidos y con una mayor selectividad en la perezona, cuestiones observadas en otros trabajos de extracción mediante el uso de dicho modo de activación.

### V.1.3.2 Extracción promovida por microondas.

La extracción de la perezona promovida por microondas se llevó a cabo variando la potencia, temperatura y tiempo de exposición. La evaluación inicial se efectuó usando microondas a 100 Watts, 50°C y 5 minutos de irradiación, usando *n-hexano* como disolvente. Los resultados muestran una diferencia significativa con respecto al método térmico convencional, obteniéndose un rendimiento de perezona menor al mencionado anteriormente (0,333 % con *A. cordata* y 1,027 % con *A. platyphylla*). Con base a estos resultados se procedió a realizar la extracción estudiando nuevas condiciones en la que se disminuyó la potencia de las microondas y el tiempo de exposición (30 W, 50 °C, 3,5 min) resultando en un rendimiento menor al convencional y que presentó de igual forma diferencia significativa (0,366 % con *A. cordata* y 1,353 % con *A. platyphylla*). Las comparaciones entre los tratamientos de extracción con microondas mostraron diferencias significativas para el caso de *A. platyphylla* y con *A. cordata* los valores fueron estadísticamente igual (Figura 8).



**Figura 8.** Resultados de la extracción de la perezona promovida por microondas para las diferentes condiciones probadas: a) rendimientos del producto b) valores de selectividad.

Por último, Se evaluaron como condiciones de extracción el uso de 100 W de potencia, 60 °C de temperatura y 10 minutos de exposición a las microondas. Los resultados indican un aumento en el rendimiento de la perezona; en el caso de *A. cordata* esta cantidad (0,467 %) fue estadísticamente igual al obtenido por el procedimiento convencional; Sin embargo, en el caso de *A. platyphylla* los valores

son mayores que en el procedimiento convencional (2.995 %). Con respecto a la selectividad de las microondas, las condiciones probadas para *A. cordata* mostraron valores estadísticamente igual a la metodología convencional (8.030, 9.039 y 8.910 % respectivamente). En este sentido, la selectividad con el otro espécimen vegetal aumentó con el cambio de las condiciones de manera significativa (Figura 8b).

La extracción asistida por microondas han sido ampliamente empleada en productos naturales<sup>112-114,130,131</sup>; sin embargo, esta metodología es altamente dependiente de la naturaleza del disolvente, siendo más eficiente un disolvente cuando presenta un mejor acoplamiento con las microondas provocando una mejor absorción de energía. Los disolventes con mayor interacción con las microondas son los polares<sup>29</sup>.

Así mismo, considerando que el *n*-hexano es un disolvente poco polar, este presenta menor interacción con las microondas, menor eficiencia y menor absorción de la energía. En este mismo sentido se puede señalar que, además, la perezona también es una molécula de baja polaridad por lo que su interacción con las microondas tampoco se vería altamente favorecida.

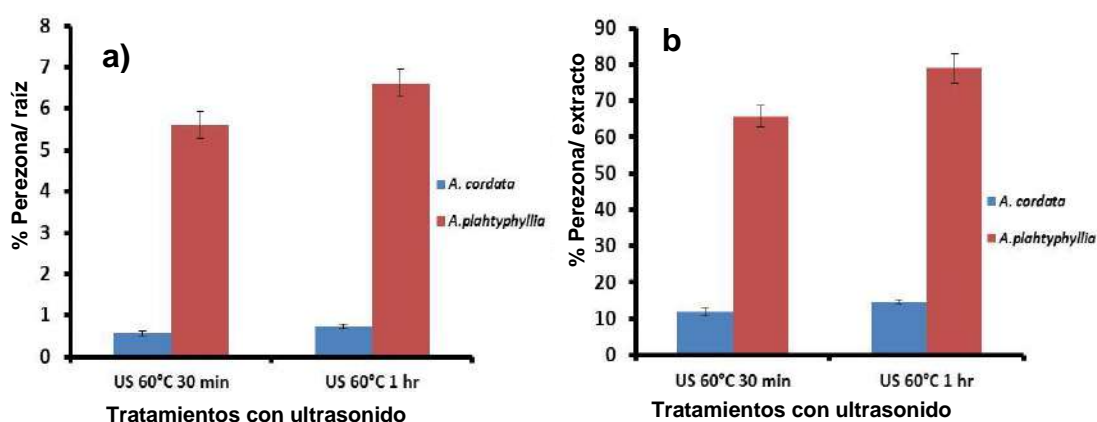
Este comportamiento se puede observar en los rendimientos menores o iguales al método convencional, y considerablemente más pequeños que la extracción asistida por infrarrojo a pesar de que ambas son ondas electromagnéticas.

#### V.1.3.3 Extracción promovida por ultrasonido.

El estudio de la extracción asistida por ultrasonido se realizó empleando una sola frecuencia y examinando la variación del tiempo de exposición, considerando 30 y 60 minutos con una temperatura constante de 60°C, siendo mostrados los resultados en la Figura 9.

La extracción asistida por ultrasonido durante 30 minutos para la raíz de *A. cordata* permitió obtener un rendimiento de 0.567 %, valor que resultó mayor significativamente a la cantidad obtenida del método convencional. Este comportamiento se observa también en las raíces de *A. platyphylla* (5.609 %) obteniéndose 3.5 veces más que con la activación convencional.

Con respecto a la selectividad bajo estas condiciones, en ambas raíces se observó un aumento (11.887 y 65.708 % respectivamente) en comparación con el proceso térmico clásico (8.784 y 19.784 %).



**Figura 9.** Extracción promovida por tratamiento con ultrasonido para *A. cordata* y *A. platyphylla*:  
**a)** US 60°C y 30 min, US 60°C y 60 min. **b)** Selectividad.

El aumento en el tiempo de ultrasonido de 30 a 60 minutos de tratamiento mejora el rendimiento de extracción, lográndose rendimientos de 0.733 y 6.623 % para *A. cordata* y *A. platyphylla* respectivamente.

Estos valores corresponden a cerca de 2 y 4 veces la cantidad obtenida en el procedimiento térmico convencional.

Respecto a la extracción asistida por ultrasonido es conveniente hacer notar que este tipo de onda mecánica genera un efecto de cavitación, interactuando con la estructura celular en diversos tejidos, produciendo la lisis de la membrana celular, la penetración del disolvente y la liberación del contenido intracelular<sup>110,111,132-134</sup>, mecanismo por el cual se incrementa la cantidad de producto natural obtenido.



**Tabla 3.** Cuadro comparativo de los rendimientos y selectividades de los diferentes métodos de extracción analizados para la perezona

Tratamiento	<i>A. platyphylla</i>				<i>A. Cordata</i>			
	Rendimiento (%)	D.S	Selectividad (%)	D.S	Rendimiento (%)	D.S	Selectividad (%)	D.S
Método convencional	1.653	0.119	19.784	1.272	0.433	0.058	8.784	0.399
Extracción asistida por infrarrojo								
NIR1	1.656	0.027	32.745	1.963	0.500	0.100	10.509	0.561
NIR2	2.036	0.043	36.932	2.788	0.533	0.058	11.658	0.740
NIR3	6.271	0.554	79.695	5.926	0.867	0.115	13.968	0.550
Extracción asistida por microondas								
MW1	1.027	0.026	20.895	0.456	0.333	0.058	8.030	0.919
MW2	1.353	0.065	27.858	0.519	0.367	0.058	9.039	1.514
MW3	2.996	0.008	53.683	3.994	0.467	0.058	8.910	1.816
Extracción asistida por ultrasonido								
US1	5.609	0.322	65.708	3.023	0.567	0.058	11.888	1.165
US2	6.623	0.322	78.895	4.126	0.733	0.058	14.695	0.476
Extracción con CO <sub>2</sub> SC a 50°C, 106.460 bar								
CO <sub>2</sub> SC1	0.564	0.018	19.507	2.986				
CO <sub>2</sub> SC2	1.818	0.045	58.676	3.186				
CO <sub>2</sub> SC3	2.243	0.046	79.131	4.771				
CO <sub>2</sub> SC4	2.495	0.043	70.738	2.677				

**NIR1:** raíz sin y con disolvente irradiada por 15 minutos con infrarrojo cercano. **NIR2:** raíz con disolvente e irradiada por 15 minutos con infrarrojo cercano. **NIR3:** raíz con disolvente e irradiada por 30 minutos con infrarrojo cercano. **MW1:** raíz con disolvente, irradiada con microondas a 30 W, 60°C y 3.5 minutos. **MW2:** raíz con disolvente, irradiada con microondas a 30 W, 50°C y 5 minutos. **MW3:** raíz con disolvente, irradiada con microondas a 100 W, 60°C y 10 minutos. **US1:** ultrasonido 60°C por 30 minutos. **US2:** ultrasonido a 60°C por 60 minutos. **CO<sub>2</sub>SC1:** dióxido de carbón supercrítico a 50°C, 106.460 bar con tiempo de exposición de 6 h. **CO<sub>2</sub>SC2:** dióxido de carbón supercrítico a 50°C y 106.460 bar con tiempo de exposición de 10h. **CO<sub>2</sub>SC3:** dióxido de carbón supercrítico a 50°C y 106.460 bar con tiempo de exposición de 12 h. **CO<sub>2</sub>SC4:** dióxido de carbón supercrítico a 50°C y 106.460 bar con tiempo de exposición de 24 h

Finalmente, respecto al estudio comparativo de los cinco métodos de extracción, cuyos resultados se muestran resumidos en la Tabla 3, resalta que entre la extracción promovida por radiación infrarroja por 30 minutos y la extracción mediante ultrasonido no existe diferencia significativa y que son los que presentan mayor rendimiento.

Adicionalmente es importante comentar que estos procedimientos inciden en *el principio 6* de la Química Verde que señala la necesidad de buscar la eficiencia energética en los procesos, considerando que estos procedimientos reducen significativamente el consumo al reducir los tiempos de activación (30,60 y 10 minutos) en comparación de las tres horas empleadas en el calentamiento mediante el uso de mantilla de calentamiento. Así mismo al incrementar la selectividad se reduce el número de subproductos y se incide en el *principio 1* que señala la reducción de residuos.

A manera de conclusión del presente apartado se puede señalar que se desarrolló un acercamiento verde a la extracción de la perezona “*comparando resultados de nuestro grupo de trabajo*”, considerando dos raíces del género *Acourtia*, en este sentido se establece que el uso de fuentes alternas de activación (al método clásico con mantilla de calentamiento) en lo general proceden con rendimientos superiores además en tiempos de activación mucho menores y con mayor selectividad; impactando de esta manera en *los principios de eficiencia en los requerimientos energéticos y disminución en la generación de residuos*. Adicionalmente es obligado resaltar que se determinaron las condiciones de máxima solubilidad de la perezona en dióxido de carbono supercrítico, impactando lo anterior en el principio de la Química Verde que hace referencia a *la búsqueda de procesos sin necesidad de disolvente o con disolventes inocuos* como es el CO<sub>2</sub> supercrítico. En resumen, estos resultados además permiten el cumplimiento de los objetivos particulares I-III de la presente tesis.

La serie de datos físicos y espectroscópicos que permiten identificar inequívocamente a la perezona son presentados en forma resumida a continuación:

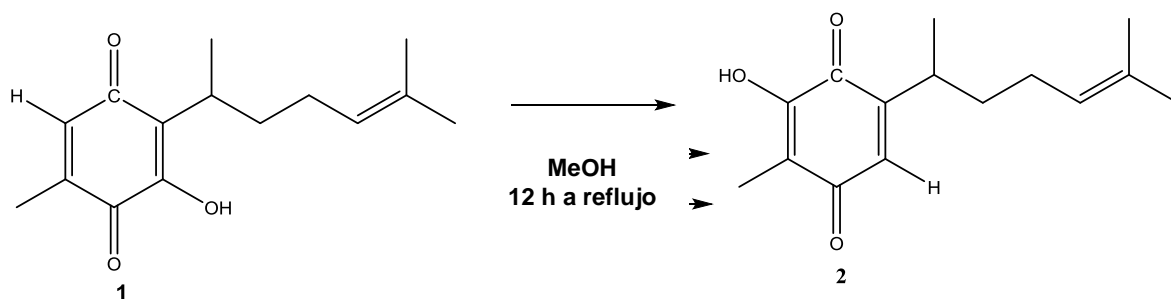
Perezona: (*R*)-2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-3-hidroxi-5-metil-*p*-benzoquinona (1).  
Sólido naranja; pf. 105–107°C. RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 7.08 (s, 1H, OH-3), 6.49 (s, 1H, H-6), 5.07(t, 1H, H-5), 3.06 (m, 1H, H-8), 2.06 (s, 3H, H-7), 1.921–1.728 (m, 4H, H-10,11), 1.64(s, 3H, H-14), 1.53 (s, 3H, H-15), 1.20 (d, 3H, H-9). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 187.3 (C-1), 184.2(C-4), 151.0 (C-3), 140.50 (C-5), 135.6 (C-6), 126.70 (C-13), 124.20 (C-2, C-12), 33.9 (C-10), 29.1 (C-8), 26.5 (C-11), 25.5 (C-14), 18.1 (C-9), 17.5 (C-15), 14.60 (C-7). EMIE (70 eV) *m/z* (% ar):249 (20%) [M+1]<sup>+</sup>, 248 (20%) M<sup>+</sup>, 231 (6) [M-17]<sup>+</sup>, 166 (100) [M-82]<sup>+</sup>.

## V.2 Isomerización de la perezona mediante un acercamiento verde

El cuarto objetivo propuesto en el presente trabajo consistió en llevar a cabo la isomerización de la perezona, a isoperezona mediante una estrategia acorde al protocolo de la Química Verde con la finalidad de obtener la segunda materia prima para la generación de nuevos derivados, además de sus interesantes propiedades farmacológicas. Por lo cual se realizó la isomerización mediante el método convencional, así como activar la reacción de manera comparativa mediante el uso de irradiación con microondas, activación mecanoquímica y usando CO<sub>2</sub> supercrítico.

### V.2.1 Obtención convencional de la isoperezona

La isomerización de la perezona fue efectuada considerando la metodología previamente informada en la literatura<sup>96</sup>, empleando un proceso en el cual se hace reaccionar la perezona con 3,4,5,6-tetrahidro-2-pirimidintiol en metanol absoluto y sometido a reflujo durante 12 h (Esquema 5); con este procedimiento se generó un aceite negro-rojizo del cual se extrajo la isoperezona usando *n*-hexano en frío. El producto obtenido fue un sólido cristalino de color amarillo-anaranjado con punto de fusión entre 105-107 °C<sup>96,104</sup> y un rendimiento del 45%.



Esquema 5. Isomerización de la perezona mediante el método clásico

La identificación del producto se realizó correlacionando los datos espectroscópicos comunes (RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, EMIE) con los previamente publicados para el producto<sup>96,97</sup>.

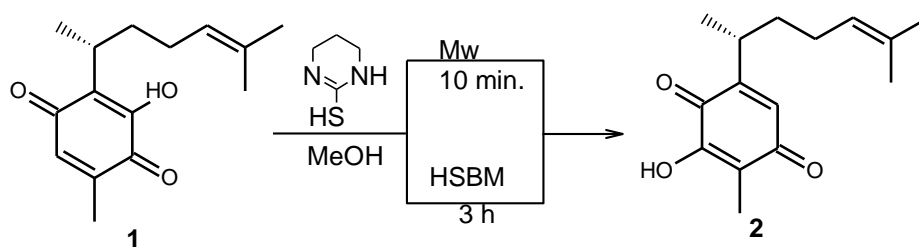
Es conveniente señalar que esta reacción presenta una gran sensibilidad a la humedad, dando variaciones significativas en el rendimiento bajo la presencia de agua, generalmente en decremento del mismo<sup>97</sup>.

### V.2.2 Obtención de la isoperezona mediante estrategias verdes

Para lograr la transformación de **1** a **2**, mediante recursos de la Química Verde, se contempló la incidencia en los *principios* 5 (uso de disolventes verdes) y 6 (uso eficiente la energía aplicada). En este sentido, la evaluación del *principio* 6 permitió proponer el uso de fuentes alternas de activación, en este caso microondas y triboquímica; mientras que para el *principio* 5 se consideró sustituir el metanol por un disolvente más verde como es el caso del CO<sub>2</sub> supercrítico.

La selección de la activación por microondas se realizó considerando el carácter polar del metanol, así como las trazas de agua que pudiese presentar. Como se señaló anteriormente en el presente trabajos, estos disolventes polares tienen la facilidad de acoplarse con las microondas y en consecuencia absorben la energía presente logrando elevadas temperaturas en cortos lapsos de tiempo<sup>32,135</sup>.

En este sentido se analizó la variación de la potencia y tiempo de exposición de la reacción a las microondas considerando la temperatura de reflujo del metanol. Las condiciones probadas fueron de 100,200, 250, 300 y 600 W. Además de variar los tiempos de reacción de 5-30 minutos.



**Esquema 6.** Isomerización de la perezona mediante el uso de diversas fuentes de activación (microondas y triboquímica).

Usando potencias de 100 a 300 W en tiempos menores o iguales a cinco minutos no fue posible detectar la formación del producto **2** por monitoreo mediante *ccf*, así mismo la aplicación de tiempos mayores de exposición mostraron formación del producto, resultando después del aislamiento rendimientos cercanos al 10% de **2**.

Finalmente se empleó una potencia de 600 W durante 10 minutos, efectuando la irradiación en periodos de 2 minutos. El resultado fue la obtención de **2** con valores de rendimiento oscilantes entre el 25 y 35%, consistentes con los rendimientos obtenidos mediante la metodología clásica, pero resaltando sobremanera una reducción en el tiempo de reacción de 12 h a 10 minutos (Esquema 6).

Los resultados moderados en la isomerización que se obtuvieron por la activación microondas al usar una potencia elevada de 600 W, pueden explicarse considerando los reportes previos de reacciones de adición tipo Michael con microondas en los cuales se observa un incremento del rendimiento conforme se incrementa la potencia, logrando los resultados óptimos a potencias de hasta 850 W<sup>136,137</sup>, al respecto el mecanismo de la reacción de isomerización ha sido previamente estudiado, y se han definido dentro de sus etapas elementales, que la etapa inicial corresponde a una reacción de adición tipo Michael. Así mismo se ha reportado que dentro de los efectos térmicos de las microondas se encuentran el sobrecalentamiento, el cual se presenta de manera significativa a potencias altas y promueven fácilmente los procesos de deshidratación. En este mismo sentido, una de las etapas claves del mecanismo de isomerización de la perezona es la ciclodeshidratación, por lo cual la potencia usada (600 W) estaría favoreciendo este proceso<sup>138,139</sup>.

Una vez lograda la isomerización promovida mediante las microondas se procedió a realizar la activación mediante el uso de triboquímica aplicando molienda con esferas a alta velocidad (High Speed Milling Ball, HSMB por sus siglas en inglés). Los resultados mostraron que el uso de velocidades para la molienda menores a 400 rpm durante periodos de una a tres horas no genera cantidades

detectables del producto **2**, al monitorearse el proceso mediante *ccf*. En el caso del uso de 400 rpm hasta el tiempo de tres horas fue posible detectar la presencia del producto, por lo que se continuó con el aumento en la velocidad hasta llegar a los 600 rpm. A esta última velocidad fue posible observar una cantidad significativa del producto mediante el monitoreo por *ccf* a partir de los tiempos de molienda de una hora, por lo que al realizar el aislamiento y purificación tal como se realiza en el método convencional se obtuvo un rendimiento del 25%. En consideración a los resultados obtenidos, se procedió a incrementar el tiempo de reacción a dos horas, observándose de igual manera un incremento en el rendimiento del producto **2** logrando un valor del 37% del producto, asemejando el rango obtenido para el microondas. Así mismo, se incrementó el rendimiento al incrementar el tipo de molienda a tres horas, consiguiendo rendimientos equiparables a los obtenidos en el método convencional (45-50%); el aumento en el tiempo de exposición a partir de las tres horas no generó cambios significativos en el rendimiento, por lo cual se consideró como tiempo óptimo las tres horas (Esquema 6). Con relación al producto, se obtuvieron cristales amarillos con un punto de fusión de 105-107°C correlacionando de manera satisfactoria con los datos espectroscópicos del producto puro. Los rendimientos de la reacción promovida por molienda fueron equiparables a los obtenidos por el método clásico, disminuyendo de manera significativa el tiempo de reacción al emplearse solo tres horas de molienda en contraste con las doce horas correspondientes al reflujo.

De manera complementaria a los resultados antes expuestos, se realizó una prueba de isomerización de la perezona usando CO<sub>2</sub> supercrítico en lugar de metanol como disolvente; para lo cual se utilizaron las condiciones de máxima solubilidad de la perezona señaladas anteriormente (50°C, 106 bar) y las mismas proporciones de los reactivos que la metodología original. Los reactivos se mantuvieron en contacto en un lapso de 24 h, resultando en un rendimiento de isomerización del 10%, el cual, si bien resulta un rendimiento bajo, establece como premisa que la reacción puede ser llevada a cabo en el CO<sub>2</sub> supercrítico. La explicación al bajo rendimiento puede estar ligado a dos factores, el primero es que la temperatura de máxima solubilidad de la perezona es menor a la cual se lleva a

cabo la reacción de manera convencional (60°C); por otro lado, las condiciones establecidas para el fluido brindan una polaridad similar a la del *n*-hexano<sup>15,128</sup>, disolvente en el cual el 2,3,4-tetrahidropirimidin-2-tiol no es muy soluble, por lo que este último estaría presentando una limitada solubilidad lo que estaría afectando al rendimiento del proceso.

En este sentido es importante resaltar que estos resultados podrían ser mejorados si se realizara el estudio de las isotermas de solubilidad para el 2,3,4-tetrahidropirimidin-2-tiol y se buscara las condiciones a las cuales tanto la perezona como el primero presentarían la solubilidad óptima y/o hacer uso de metanol como codisolvente<sup>140-142</sup>. Además, la reacción podría llevarse a cabo aumentando la temperatura, aun a costa de la disminución de solubilidad de la perezona. Así mismo es importante resaltar que estos resultados permiten también dar paso a estudios en los cuales se efectúen otras reacciones de la perezona en el fluido supercrítico.

Los datos físicos y espectroscópicos de la isoperezona, correlacionados con la literatura, se muestran a continuación:

Isoperezona (*R*)-2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-6-hidroxi-5-metil-*p*-benzoquinona) (**2**). Sólido Amarillo; pf 107–109°C. RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 7.09 (s, 1H, OH-6), 6.45 (s, 1H, H-6), 5.04(t, 1H, H-5), 2.90 (m, 1H, H-8), 1.94 (s, 3H, H-7), 1.921–1.728 (m, 4H, H-10,11), 1.66(s, 3H, H-14), 1.55 (s, 3H, H-15), 1.14(d, 3H, H-9). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 188.2 (C-1), 183.2(C-4), 151.4 (C-6), 149.6 (C-2), , 135.6 (C-3), 132.3 (C-13), 123.8 (C-12), 36.7 (C-10), 31.4 (C-8), 25.8 (C-11), 25.7 (C-14), 19.4 (C-9), 17.7 (C-15), 7.9 (C-7). EIMS (70 eV) *m/z* (% ar):249 (100%) [M+1]<sup>+</sup>, 248 (50%) M<sup>+</sup>, 231 (40) [M-17]<sup>+</sup>, 166 (27) [M-82]<sup>+</sup>.



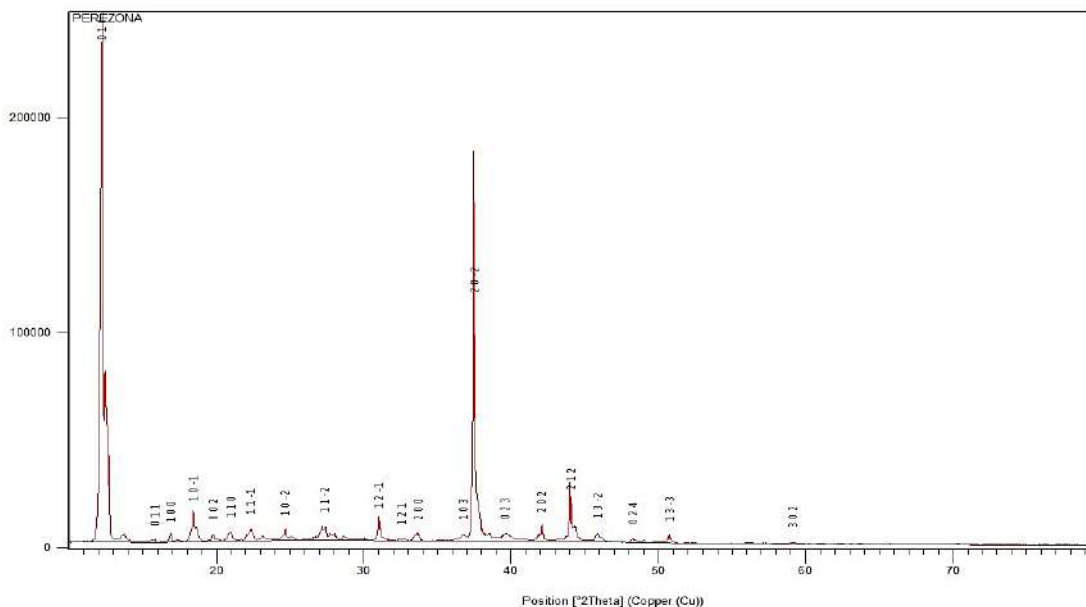
### **V.3. Caracterización fisicoquímica teórico-experimental de la perezona e isoperezona.**

La perezona y la isoperezona son sesquiterpenos que presentan una gran variedad de propiedades farmacológicas adscritas y comprobadas por la comunidad científica, entre ellas su acción contra células cancerosas, lo que las hace candidatas para su uso como fármaco. Lo anterior incitó a realizar la caracterización fisicoquímica a través de algunas técnicas importantes en la industria como son la difracción de rayos x de polvos, análisis térmico gravimétrico y calorimetría de barrido diferencial. Así mismo se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular de la perezona e isoperezona con la caspasa-3 a fin de entender más afondo su efecto anticancerígeno.

#### ***V.3.1 Caracterización por difracción de rayos X de polvos.***

El patrón de difracción de rayos X de polvos de la perezona es presentado en la Figura 10. El análisis del patrón reveló que este presenta el arreglo típico de picos correspondientes a una estructura monoclinica, resultado que es coherente con los reportes previamente establecidos para la perezona mediante la técnica de difracción de rayos x de monocristal, señalándose además en este último la pertenencia al grupo espacial  $p21^{95}$ . El patrón fue refinado mediante las herramientas del programa PANalytical X'pert pro y se realizó la determinación de los índices de Miller para los planos presentes, así como la determinación de los parámetros correspondientes a las cristalitas o microcristales del sólido analizado. En este sentido, los parámetros determinados para el sistema monoclinico fueron aristas con valores en Armstrongs de a,b y c de 5.36,7.04 y 9.08; Mientras que los ángulos  $\alpha,\beta,\gamma$  con valores correspondientes a 90.00,99.13 y 90.00°. En contraste con los parámetros determinados por la técnica de monocristal que establecen valores de a, b y c correspondientes 6.662, 7.343 y 14.537 C, con un ángulo  $\beta$  de 98.20°; así mismo el volumen de la cristalita fue determinado en 0.703.9 Å<sup>3</sup>, además de Z igual a 2 y una densidad de 1,17 kg/dm<sup>3</sup>. Es apropiado señalar que a pesar de que los datos del cristal varían considerablemente esto es justificable debido a la

información que se pierde al usarse la técnica de polvos o policristal, en comparación de la técnica de monocristal, siendo esta última la técnica ideal para la determinación de los parámetros de red<sup>143-145</sup>.

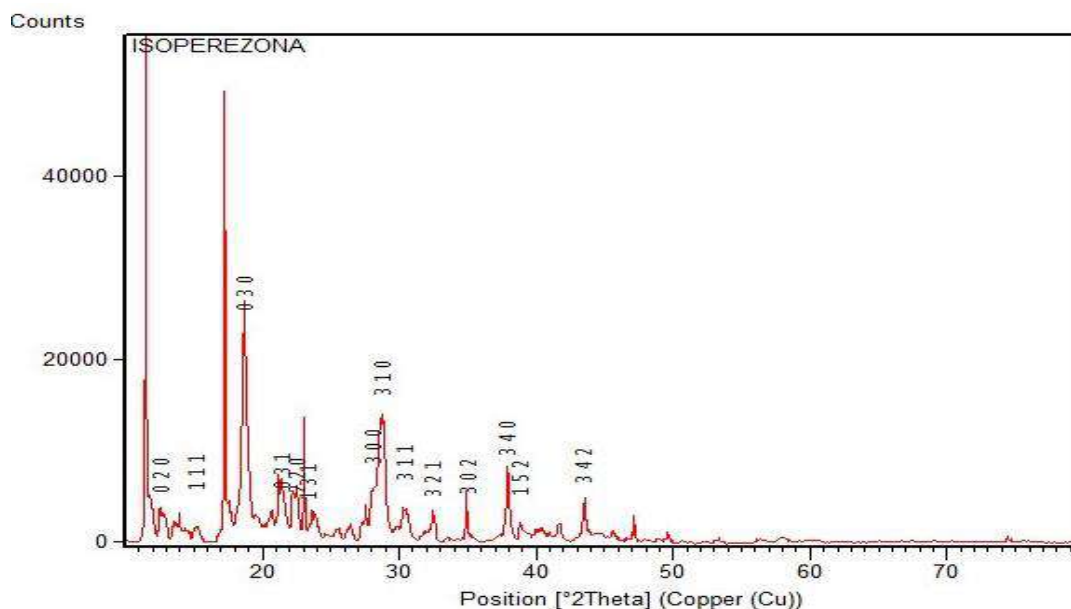


**Figura 10.** Patrón de difracción de rayos X de polvos para la perezona.

Un análisis similar fue efectuado para **2**, el cual se muestra en la Figura 11 presentando en base a su patrón un comportamiento correspondiente a una celda de tipo ortorrómbica, siendo también consistente con la determinación realizada por la técnica de monocristal<sup>146</sup>, la cual determinó en esta última un grupo espacial  $P2_12_12_1$ . En referencia a los parámetros de red e indexado, se estableció por refinado mediante el método de polvos valores de aristas correspondientes a: a, b y c de 9.55, 14.26 y 8.63 Å; mientras el monocristal obtuvieron valores de a = 6.271(6), b = 30.373(7), c = 7.257(1) Å, y Z = 4, presentando al igual que en el caso de **1** una discrepancia entre los datos como consecuencia de las diferencias entre ambas metodologías.

Los resultados, además, permitieron concluir que **1** y **2** bajo las condiciones de estudio no presentaron polimorfismos.

Una de las principales aplicaciones de los patrones de difracción de polvos de **1** y **2**, radica en el uso que se le puede dar para la identificación, caracterización y cuantificación de dichos compuestos a través de esta técnica, en especial para su posible uso farmacológico<sup>147</sup>.

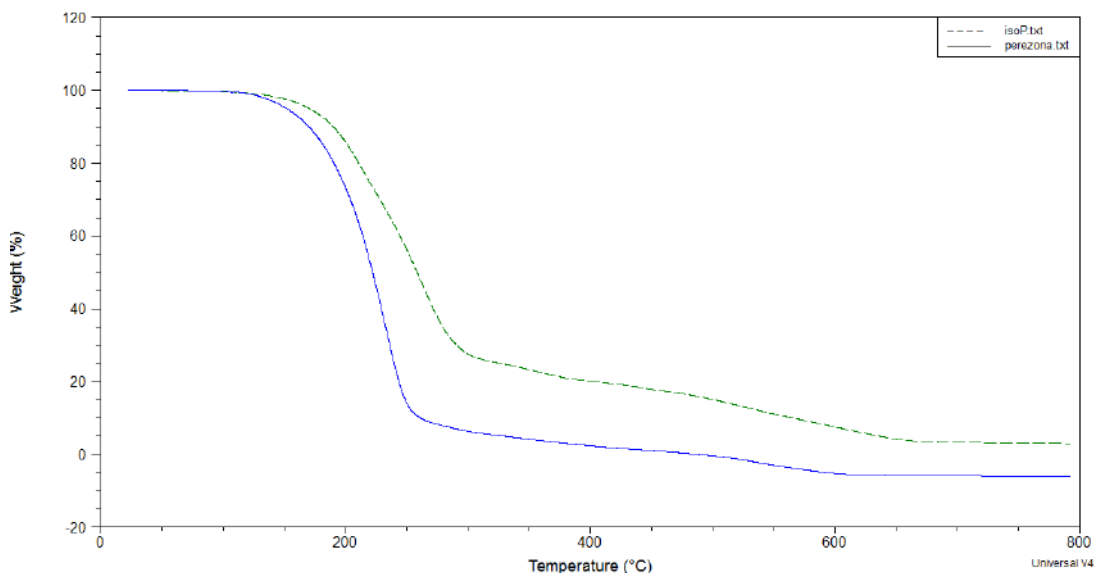


**Figura 11.** Patrón de difracción de rayos X de polvos para la isoperezona.

### ***V.3.2. Caracterización por análisis térmico de perezona e isoperezona.***

La caracterización fisicoquímica de los compuestos **1** y **2** continuó mediante la evaluación de su estabilidad térmica por análisis térmico gravimétrico (Figura 12). En el caso de **1**, la estabilidad térmica del compuesto se mantuvo por debajo de 130°C, posterior a dicha temperatura se inicia una pérdida de masa, disminuyendo su masa en un 87.96% al llegar a los 234°C. Por encima de esta temperatura se presenta una pérdida menor de masa, llegando a un 5% de la masa inicial al alcanzar los 246 °C. En el caso de la isoperezona, este compuesto presentó una mayor estabilidad térmica que la perezona, manteniéndose sin cambios en su masa por debajo de los 200°C, la degradación alcanza la disminución del 80% de la masa inicial a la temperatura de 300°C; después de esta reducción se presenta otra disminución finalizando alrededor de los 600°C. Un comportamiento similar a los observados para **1** ha sido reportado para la timoquinona, presentando una sola

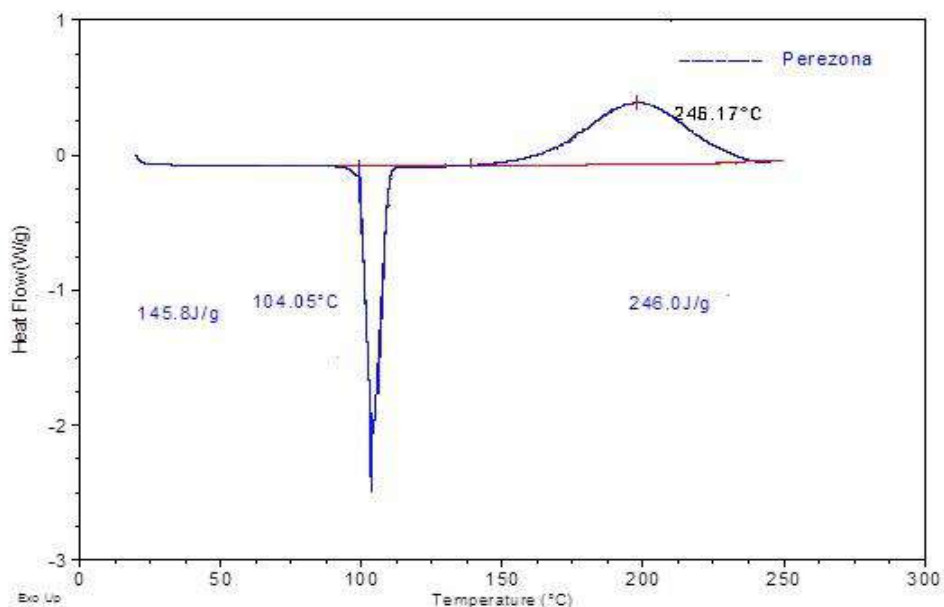
etapa de pérdida de masa significativa y en valores mayores a 130°C así como una temperatura final de 213°C; siendo atribuido esto a la similitud estructural entre ambas quinonas<sup>148</sup>.



**Figura 12.** Análisis térmico gravimétrico de la perezona e isoperezona.

El estudio de las propiedades térmicas continuó mediante la caracterización por calorimetría de barrido diferencial, el termograma de la perezona se muestra en la Figura 13. El gráfico nos señala un proceso endotérmico a 104.5°C y un proceso exotérmico a 246.17°C; siendo el primer paso asociado a la fusión de la perezona y presentando en consecuencia una entalpía de fusión de 36.02 kJ/mol; en este mismo sentido se asoció el proceso exotérmico con la descomposición de la perezona, además, esta temperatura es la misma a la cual se observa la caída de peso hasta un 5% del peso inicial en el análisis térmico gravimétrico del compuesto. La entalpía del proceso fue determinada presentando un valor de 61.08 KJ/mol.

El análisis térmico de la perezona es consistente con la premisa de que solo fuerzas débiles de van der Waals están presentes en esta molécula y la timoquinona sólida; Adicionalmente, no se observó cambio entálpico distinto a la transformación de fase, por lo que se concluye que solo existe un sistema cristalino en la muestra estudiada y confirma la ausencia de polimorfismos visto por el análisis de rayos x.



**Figura 13.** Análisis de calorimetría de barrido diferencial, DSC, donde se observa el punto de fusión de la perezona a 104.05 °C con una entalpía de fusión es 145,8 J/g, mientras que el segundo pico correspondiente a su descomposición con un máximo en 246.17 °C y un valor de 246.0 entalpía J/g.

En el caso de la isoperezona, la calorimetría mostró un proceso endotérmico asociado al proceso de fusión a una temperatura de 105°C, así mismo se presenta un segundo proceso exotérmico a 270°C y es atribuido a la descomposición térmica del compuesto; estos resultados son coherentes con el rango de punto de fusión registrados en la literatura y las observaciones realizadas en el análisis termo gravimétrico al señalar una caída cercana a los 300°C.

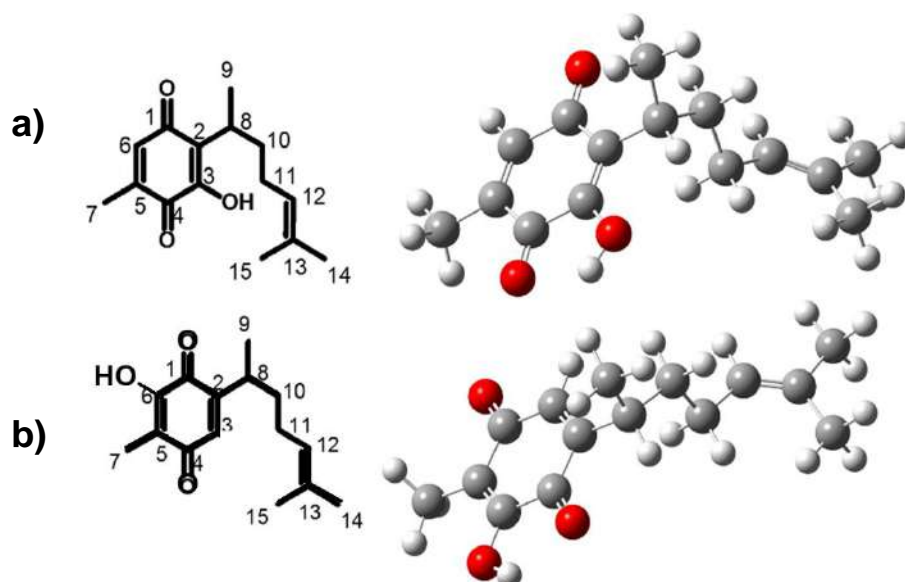
Al igual que en el caso de la perezona no se observó ningún otro cambio entálpico, estableciendo al igual que los resultados de los rayos x la presencia de una sola forma cristalina; considerando como una ventaja que ambos sesquiterpenos solo presenten una forma cristalina, lo que podría facilitar su uso en una forma farmacológica.

### ***V.3.3. Caracterización teórico-computacional de la perezona y su acción sobre la caspasa-3.***

### V.3.3.1. Estudio a nivel cuántico de la perezona e isoperezona

En forma complementaria, se realizó el estudio teórico-computacional a fin de analizar la acción de la perezona sobre las caspasas 3 y 7.

En una situación inicial se optimizó a las moléculas **1** y **2** mediante el uso de métodos cuánticos, empleando el programa Gaussian 09 y determinando los resultados a nivel de teoría de los funcionales de la densidad (TDF) con diferentes conjuntos base. En la Figura 14 se muestran las estructuras optimizadas.



**Figura 14.** Estructuras optimizadas junto con su modelo 2D numerado de: **a)** perezona **b)** isoperezona.

Con base a las estructuras optimizadas se determinaron los valores de equilibrio con el conjunto base 6-311 g(d,p), obteniéndose los parámetros geométricos de las moléculas, incluyendo distancias y ángulos de enlace para la perezona e isoperezona; Además, se realizó una comparación con el reporte experimental de la difracción de rayos-x de monocristal. Un conjunto de datos seleccionados para las distancias y los ángulos de las moléculas se presentan en las Tablas 4 y 5. La asignación de la posición de los átomos fue tomada de la Figura 14.

**Tabla 4.** Parámetros geométricos seleccionados de longitudes de enlace (Å), ángulos (°) y ángulos diedros (°) para la perezona, además de los valores experimentales reportados y los correspondiente en el cálculo de los valores de equilibrio con 6-311g(d,p).

<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(Å)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(Å)</u>	<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(Å)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(Å)</u>
O(1)-C(4)	1.23	1.23	O(2)-C(2)	1.35	1.39
C(1)-C(2)	1.50	1.49	C(1)-C(6)	1.47	1.48
C(3)-C(4)	1.47	1.49	C(3)-C(8)	1.50	1.53
C(5)-C(6)	1.33	1.34	C(6)-C(7)	1.51	1.50
C(8)-C(15)	1.52	1.54	C(9)-C(10)	1.51	1.53
O(3)-C(1)	1.22	1.22	C(4)-C(5)	1.47	1.48
C(2)-C(3)	1.33	1.34	C(8)-C(9)	1.54	1.54
C(10)-C(11)	1.51	1.51			
<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(Å)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(Å)</u>	<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(Å)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(Å)</u>
O(3)-C(1)-C(2)	119.20	119.3	C(4)-C(3)-C(8)	118.70	118.90
O(2)-C(2)-C(1)	115.00	114.80	C(10)-C(11)-C(12)	126.90	127.20
O(3)-C(1)-C(6)	122.67	122.00	C(13)-C(12)-C(14)	114.30	114.70
C(2)-C(3)-C(4)	116.30	116.6	O(1)-C(4)-C(5)	119.20	119.30
O(1)-C(4)-C(3)	120.20	120.40	C(3)-C(4)-C(5)	120.50	120.30
C(4)-C(5)-C(6)	123.20	123.40	C(1)-C(6)-C(5)	117.30	117.50
O(3)-C(1)-C(6)	122.67	122.00	C(1)-C(6)-C(7)	117.60	117.50
C(2)-C(1)-C(6)	118.50	118.60	C(3)-C(8)-C(9)	112.20	112.50
C(5)-C(6)-C(7)	124.60	124.80	C(3)-C(8)-C(15)	111.20	110.90
O(2)-C(2)-C(3)	121.20	121.40	C(8)-C(9)-C(10)	114.60	114.30
C(1)-C(2)-C(3)	123.40	123.60	C(9)-C(10)-C(11)	113.80	113.60
C(9)-C(8)-C(15)	111.70	111.90	C(11)-C(12)-C(13)	122.50	122.70
C(2)-C(3)-C(8)	124.70	124.50	C(11)-C(12)-C(14)	122.30	122.60
<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(Å)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(Å)</u>	<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(Å)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(Å)</u>
O(3)-C(1)-C(2)-O(2)	-0.10	-0.48	C(4)-C(3)-C(8)-C(15)	-114.70	-13.81
C(3)-C(8)-C(9)-C(10)	-116.40	-115.80	O(2)-C(2)-C(3)-C(8)	1.00	0.94
C(8)-C(3)-C(4)-O(1)	0.30	1.08	C(10)-C(11)-C(12)-C(14)	2.50	2.33
C(2)-C(3)-C(8)-C(15)	63.80	71.30	O(3)-C(1)-C(6)-C(7)	0.30	0.43
C(4)-C(3)-C(8)-C(15)	-14.70	-13.81	C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	179.90	174.60
O(3)-C(1)-C(6)-C(7)	0.30	0.43	C-C(10)(11)(12)-C-C(13)	176.00	178.39
O(2)-C(2)-C(3)-C(8)	1.00	0.94	C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	179.90	174.66

La comparación de los resultados obtenidos a nivel teórico exhibió una buena correlación entre los parámetros geométricos presentados de manera experimental, lo que nos indica que la geometría de la molécula modelada es coherente con la que presenta de forma natural.

En forma análoga se obtuvieron los parámetros geométricos para la isoperezona siendo contrastados de igual forma con los valores experimentales reportados en la literatura<sup>146</sup>. En relación a la comparación de los datos teóricos y experimentales, se observó al igual que en el caso de la perezona una buena correlación, permitiendo establecer su estructura optimizada también como base de los estudios de acoplamiento molecular.

**Tabla 5.** Parámetros geométricos seleccionados de longitudes de enlace (Å), ángulos (°) y ángulos diedros (°) para **2**, además de los valores experimentales reportados y los correspondiente en el cálculo de los valores de equilibrio con 6-311g(d,p).

<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(Å)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(Å)</u>	<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(Å)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(Å)</u>
C(1)-O(1)	1.24	1.225	C(4)-C(5)	1.43	1.476
C(1)-C(2)	1.45	1.487	C(5)-C(6)	1.39	1.352
C(2)-C(3)	1.35	1.343	C(6)-O(6)	1.25	1.345
C(3)-C(4)	1.49	1.49	C(6)-C(1)	1.43	1.495
C(4)-O(4)	1.18	1.22			

<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(°)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(°)</u>	<u>Enlace</u>	<u>Valor experimental</u> <u>(°)</u>	<u>Valor teórico</u> <u>(°)</u>
O(1)-C(1)-C(2)	120.7	123	C(4)-C(5)-C(6)	117.8	117.4
C(1)-C(2)-C(3)	117.3	116.9	C(5)-C(6)-O(6)	122.0	123.1
C(2)-C(3)-C(4)	123.3	123.6	O(4)-C(6)-C(1)	116.7	114.0
C(3)-C(4)-O(4)	116.2	119.1	O(6)-C(6)-C(1)	118.3	117.4
C(3)-C(4)-C(5)	119.2	119.6			

Adicionalmente, las estructuras optimizadas fueron empleadas para determinar las frecuencias de vibración para los enlaces y se realizó un comparativo teórico-experimental de los espectros infrarrojos para las moléculas de estudio. Los

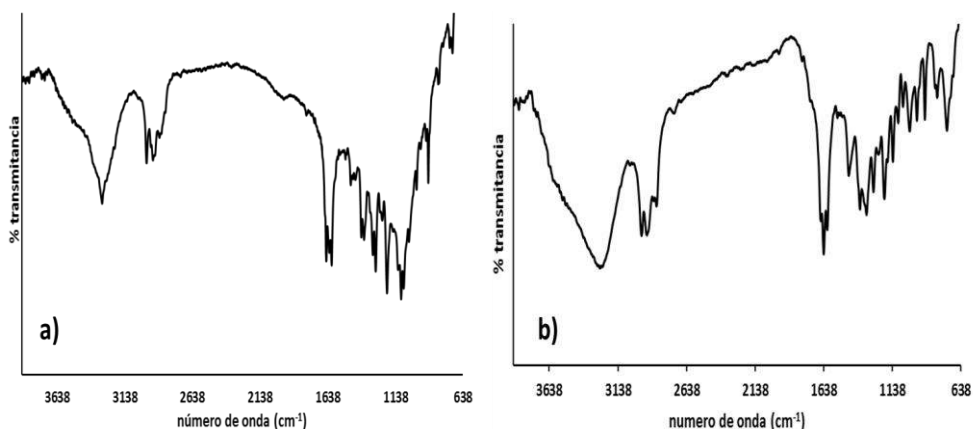


valores correspondientes a las bandas experimentales y calculadas, además de su correspondiente asignación se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Frecuencias teóricas y experimentales para los modos vibracionales de la perezona con sus correspondientes asignaciones.

<b>N</b>	<b><math>\nu</math> (exp)/ cm<sup>-1</sup></b>	<b><math>\nu</math> (calc)/cm<sup>-1</sup></b>	<b>Asignaciones</b>
1	3304.6	3306.7	$\nu$ (OH) y anillo quinónico
2	2975.7	2986.6	$\nu$ (CH <sub>2</sub> ) alifáticos y $\nu$ (CH) alifáticos.
3	2974.5	2986.6	$\nu$ (CH <sub>2</sub> ) alifáticos y $\nu$ (CH) alifáticos.
4	2968	2986.6	$\nu$ (CH <sub>2</sub> ) alifáticos $\nu$ (CH) alifáticos.
5	1648.8	1776.27	$\nu$ (C=O) tensión del grupo carbonilo del anillo quinónico
6	1626.8	1632.62	$\delta$ (CH) alifáticos.
7	1608.8	1608.65	$\delta$ (CH) alifáticos, $\delta$ alifáticos (CH <sub>2</sub> )
8	1463.0	1467.74	$\delta$ (CH) alifáticos.
9	1389.5	1377.24	$\gamma$ (OH) anillo quinona
10	1369.2	1377.24	$\nu$ (CO), $\gamma$ (OH) anillo,
11	1305.2	1341.85	(CH)alifáticos, $\gamma$ (CH) anillo quinona
12	1283.3	1341.85	(CH)alifáticos, $\gamma$ (CH) anillo quinona
13	1199.5	1200.6	(CH)alifáticos, $\gamma$ (CH) anillo quinona
14	1094.5	1076.41	(CH)alifáticos, $\gamma$ (CH) anillo quinona
15	893.6	756.68	(CH)alifáticos, $\gamma$ (CH) anillo quinona
16	715.1	718.01	(CH)alifáticos, $\gamma$ (CH) anillo quinona

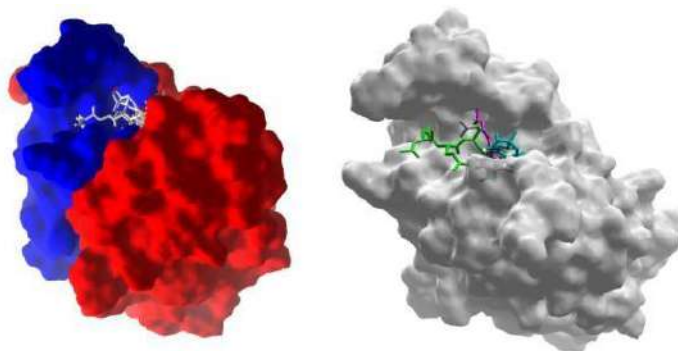
Los espectros correspondientes a **1** y **2** se presentan en la Figura 15. Las bandas correspondientes para las tensiones de los enlaces O-H y C-H, se encuentran en las zonas de 4000 a 2500 cm<sup>-1</sup> correspondientes al grupo hidroxilo y los enlaces correspondientes a la cadena hidrocarbonada lateral. Las bandas de los enlaces C=O y C=C, se encontraron en el intervalo de 1800 a 1500 cm<sup>-1</sup> y finalmente las bandas de C-C y C-O fueron presentados en el rango de 1550 a 500 cm<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 15.** Espectros infrarrojo-experimentales de: **a)** la perezona **b)** la isoperezona.

### V.3.3.2 Estudio de acoplamiento de la perezona e isoperezona con la caspasa-3

En reportes experimentales previos se ha establecido que la perezona e isoperezona son capaces de inducir la apoptosis mediante la activación de la ruta dependiente de las caspasas, por lo cual una vez que se obtuvieron las estructuras optimizadas, se procedió a analizar si las moléculas estudiadas así como dos quinonas de estructura análoga, la timoquinona y la horminona podían presentar interacción con la caspasa-3.



**Figura 16.** Subunidades monoméricas para la proteína (PDB 1pau). En rojo se muestra la subunidad A y la B en Azul. Además, se muestra el acoplamiento ciego para los ligandos.

Las caspasas forman una clase única de proteasas cisteína-aspartato específicas, definidas según su sustrato y funciones biológicas<sup>149,150</sup>.

La inhibición de las caspasas representa una vía muy prometedora para el tratamiento en numerosos padecimientos que involucran daño tisular y celular mediado por la apoptosis, como es el caso de algunas enfermedades agudas y crónicas<sup>151</sup>.

Muchos inhibidores potentes de caspasas han sido sintetizados en base a las estructuras de sustratos peptídicos.

Sin embargo, debido a su estructura peptídica la mayoría de estos inhibidores no poseen la suficiente permeabilidad celular para ser considerados como candidatos para el desarrollo de fármacos.

Catorce caspasas humanas son conocidas y demuestran una estricta especificidad para un residuo de ácido aspártico en la posición P1. En su sitio activo presentan un grupo tiol para segmentar el péptido o proteína objetivo exclusivamente en el extremo C-terminal de un residuo de ácido aspártico. Además, las caspasas son selectivas para residuos en las subunidades S4 y S10<sup>152-155</sup>.

Los inhibidores de la caspasa normalmente contienen un grupo electrófilo que reacciona con un residuo de cisteína nucleofílico en el sitio activo. El grupo electrofílico junto con una secuencia tetrapeptídica, producen potentes inhibidores.

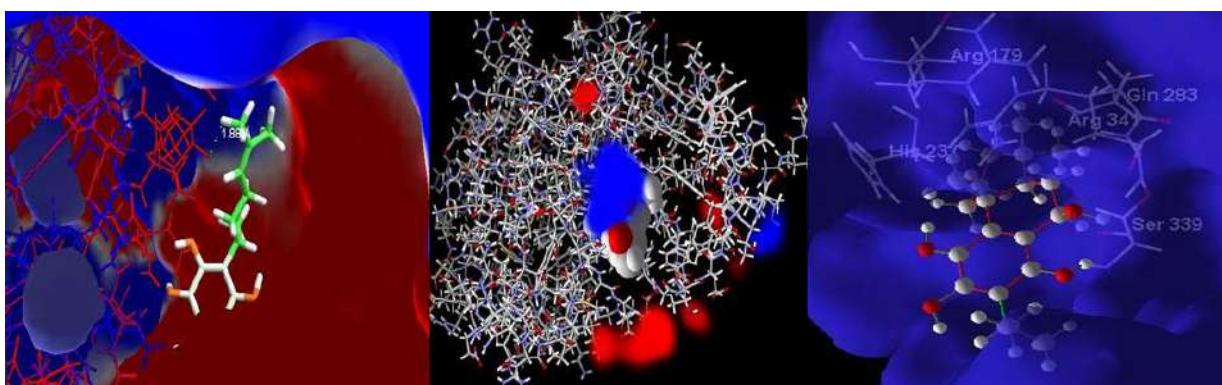
Recientemente, dos nuevas clases de azapéptidos han sido identificados como inhibidores específicos para las caspasas, dentro de los sitios electrofílicos se encuentran aceptores tipo Michael tal como las quinonas de estudio.

En este sentido, se realizó en primera instancia un cribado virtual de los compuestos estudiados (Figura 16).

Los resultados mostraron que los ligandos se unieron preferentemente al sitio catalítico cerca del residuo de cisteína, confirmando así que sin duda es el sitio más reactivo de la caspasa-3; así mismo se observó que las moléculas objetivo mostraron preferencia a un sitio en el centro de la interfaz de los dos dímeros que forman la caspasa-3.

Mediante el procedimiento de acoplamiento, las moléculas estudiadas fueron identificadas como inhibidoras de la caspasa-3, además de probadas y fue posible determinar la estructura de tres complejos. Estos últimos revelaron, además, que los inhibidores perezona, isoperezona y horminona ocupan sólo la subunidad S1 mientras timoquinona puede ocupar otros sitios.

En la Figura 17 se muestran las pruebas realizadas para el acoplamiento de la perezona, isoperezona y horminona con la caspasa-3 correlacionándose con la superficie de potencial electrostático.



**Figura 17.** Estructura en el sitio activo de la proteína de los ligandos, perezona, isoperezona y horminona.

Los resultados revelaron en todos los casos que las moléculas de estudio presentaron acoplamiento molecular con los residuos de la caspasa, adicionalmente, **1** mostró que la cadena lateral C9-C15 presentó una interacción de tipo hidrofóbica con una distancia de interacción de 1.88Å, en este mismo sentido se pudo observar resultados análogos con **2** y la timoquinona.

Sin embargo, en el caso de la horminona, a consecuencia del tamaño de su estructura presentó una mayor dificultad para que esta molécula se posicionara en el límite de los dos monómeros que forman la caspasa-3, y sólo la sección hidrofóbica fue capaz de interactuar con los residuos de Arg179 e Hist237.

La estimación de los valores de acoplamiento (MolDock score) para las quinonas estudiadas, mediante el algoritmo del software utilizado, se muestran en

la Tabla 7. Estos resultados son relevantes, ya que permiten tener conocimiento sobre las interacciones que son importantes para la actividad inhibitoria. El comparativo de los resultados permite además establecer características estructurales importantes para el acoplamiento molecular de cada inhibidor con la Caspasa-3.

**Tabla 7.** Parámetros obtenidos (kcal/mol), a partir de acoplamiento molecular de los compuestos estudiados.

<b>Propiedades</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Timoquinona</b>	<b>Horminona</b>
Valores de acoplamiento (MolDock)	-90.66	-87.45	-64.88	-74.85
eficiencia de la unión	-5.04	-4.86	-5.41	-3.12
Puentes de hidrógeno (no direccionables)	-15.50	-17.14	-8.89	-18.56
Puente de hidrógeno (direccionables)	-6.99	-8.84	-4.19	-13.33
Total de puentes de hidrógeno	-22.48	-25.98	-13.08	-31.89
Efecto de estérico	-120.28	-107.15	-80.44	-81.47
Las interacciones proteína-ligando	-101.63	-105.90	-71.21	-96.60

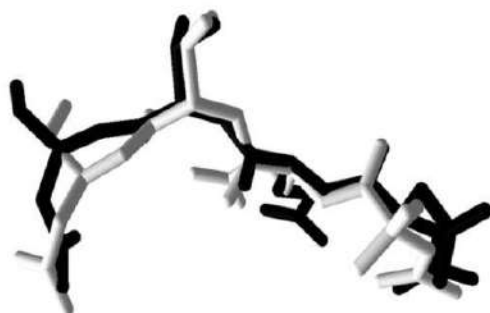
Los valores presentados en la Tabla 7, corresponden a las conformaciones de mejor acoplamiento con la proteína y muestran que **1** fue el ligando que mayor energía de interacción presentó, teniendo esta un valor de -90.66 kcal/mol, seguido por **2** (-87.45 kcal/mol) y finalmente el compuesto con menor energía fue la timoquinona con -64.88 kcal/mol.

En relación a los valores de energía de acoplamiento para **1** y **2**, es conveniente señalar que presentan una tendencia similar a la observada de manera

experimental en su efecto sobre la activación de las caspasas, siendo **1** más activa que **2**<sup>76</sup>.

Es importante señalar que, para **1**, la molécula con mejor energía de interacción, el ligando y la pose de menor energía coinciden prácticamente en todos los átomos, viéndose esto reflejado en un valor más bajo y mejor de la desviación estándar media relativa (RMSD por sus siglas en inglés) (Figura 18).

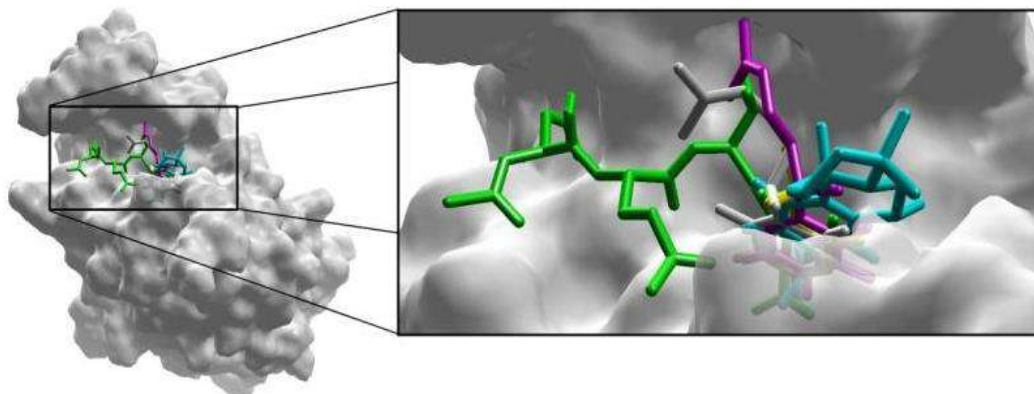
En referencia al modo de acoplamiento de las moléculas objetivo, el análisis fue realizado por ajuste de las poses de menor energía dentro del sitio activo de la caspasa-3 (Figura 19). En este sentido, fue posible observar que todas las moléculas presentaron una interacción directamente entre el anillo quinónico y el sitio activo, así mismo se observó que las cadenas laterales de la perezona e isoperezona mostraron más de una forma de interacción con la caspasa-3. La estructura de la proteína (PDB 1pau) y las moléculas de estudio fue superpuesta para realizar una comparación entre ellas.



**Figura 18.** Conformaciones para la pose de mínima energía de la perezona (en blanco) y el ligando (en negro) valor de RMSD=1.32 Å.

La evaluación de los resultados permite observar que a consecuencia de las similitudes estructurales todos los ligandos presentan uniones en común entre la proteína y sus anillos quinónicos, aunado a las interacciones con la cadena lateral en posición 2; estas semejanzas dan como consecuencia una vía de interacción similar con el sitio de la caspasa-3<sup>156,157</sup>. También, permite establecer que las

diferencias entre ellas resultaron determinantes en el acoplamiento, lo cual se ve reflejado en las variaciones en los valores del MolDock y el resto de los parámetros de interacción.

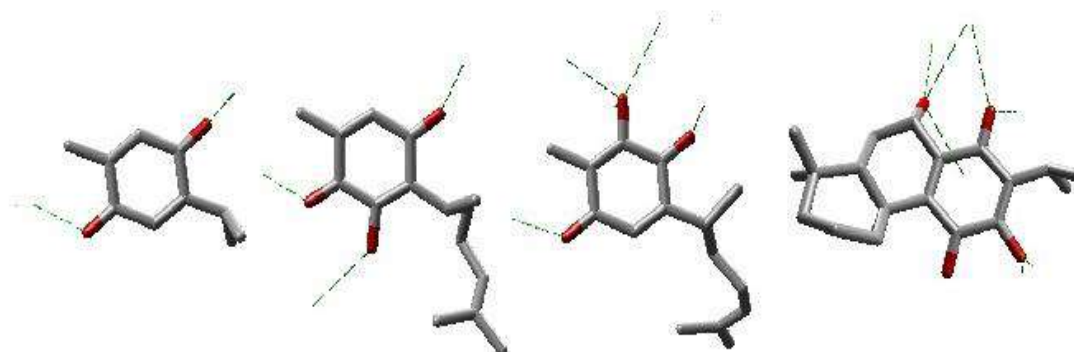
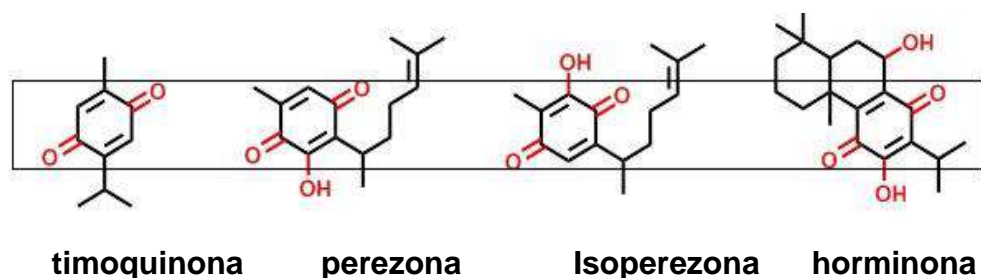


**Figura 19.** Vista del acoplamiento al sitio activo de la caspasa-3 (código PDB 1PAU), en un complejo con los compuestos estudiados: perezona (verde), isoperezona (gris), timoquinona (azul) y horminona (rojo), respectivamente.

El reconocimiento molecular entre las quinonas con la caspasa se presenta principalmente por puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígenos de los grupos carbonilo como aceptores de hidrógeno, mientras que aquellas estructuras que tienen grupos hidroxilo (**1**, **2** y horminona) actúan como donantes de hidrógeno, con los residuos de aminoácidos más cercanos (Figura 20).

Los resultados del acoplamiento molecular permitieron establecer un modelo de unión entre las quinonas de estudio y la caspasa. El modelo consta de un grupo aceptor de hidrógenos y un grupo donante de hidrógenos (HBA y HBD respectivamente por sus siglas en inglés) para establecer enlaces puente de hidrógeno con la proteína; además, es necesaria la presencia de dos grupos con carácter hidrofóbico (HY).

Considerando las interacciones entre las moléculas de estudio y los residuos de la caspasa-3, el análisis mostró que Cys 285, Hys237 y Ala 284 presentaron los valores más altos para las energías de interacción; mientras que los de menor energía fueron los residuos de Arg 179 Trp 340 y Tyr 338.



**Figura 20.** Vista del acoplamiento de los cuatro ligandos y los resultados *in silico* del sitio activo de la caspasa-3. Los puentes de hidrógeno se muestran con líneas punteadas en el ligando.

Los parámetros de interacción de los cuatro residuos más cercanos de la proteína 1PAU y cada ligando se muestran en la Tabla 8.

Cabe destacar, que los tres primeros ligandos interactúan con los mismos residuos, aunque a diferentes distancias y por supuesto con átomos diferentes de los residuos.

Las interacciones más fuertes por parte de los ligandos con el receptor se presentaron con 12 residuos de aminoácidos en el sitio activo de la caspasa-3: Cys 285, Arg 179, Ser236, Hist 237, Gly, Gln 238 283, Ala 284, 338, ser 339 Tyr, Trp 340, 341 y Phe 381. Las interacciones antes señaladas presentaron mayor fortaleza con los átomos de los anillos quinoidales, ya que dicha región de las moléculas es la que se incrusta en el sitio activo de la proteína. Lo anterior es esquematizado en la Figura 21, en donde los átomos con mayor energía de interacción son representados con mayor tamaño, cuestión realizada también para los átomos de la caspasa-3 (PBD 1PAU).

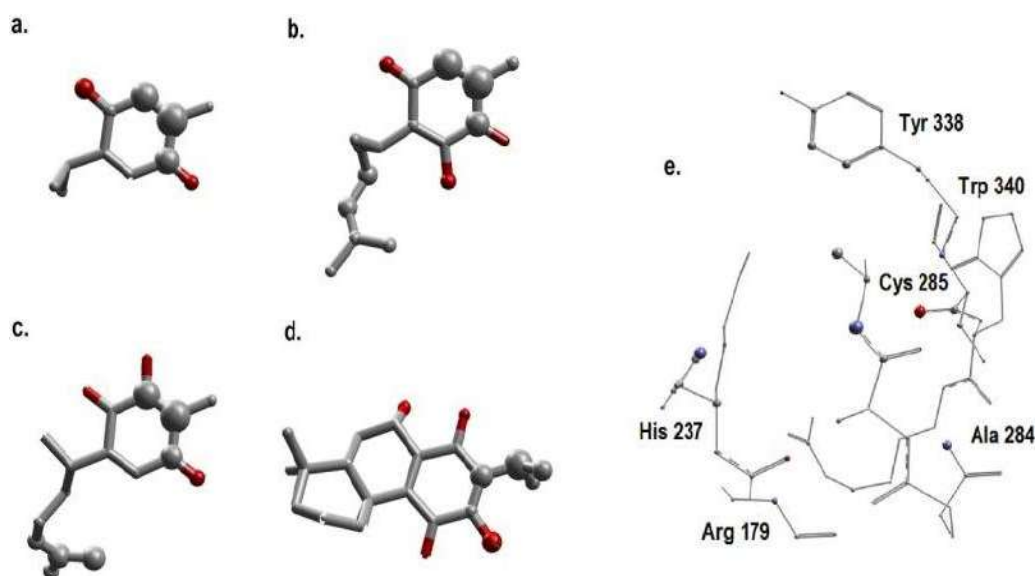


**Tabla 8.** Parámetros de interacción con 1PAU-ligandos, RMSD y valores de MolScore para el proceso de acoplamiento.

Complejo 1pau- Ligando	MolScore (- kJ/mol)	RMS D (Å)	Distancias de interacción residuo-ligando					
			Cys284	Hys237	Ala284	Arg179	Phe381	Arg341
Perezona	178.3	0.84	1.92 Å	2,05 Å.	1.10 Å	N. A	1.5 Å	N. A
Isoperezona	118.2	1.28	2.72 Å	2,35 Å.	2,49 Å.	1,29 Å.	N.A.	N.A.
Timoquinona	97.3	1.83	3.87 Å	2,29 Å.	1,90 Å.	2,17 Å.	N.A.	N.A.
Horminona	122.4	1.95	2.41 Å	2,09 Å.	N.A.	1.95 Å	N.A.	1.30 Å

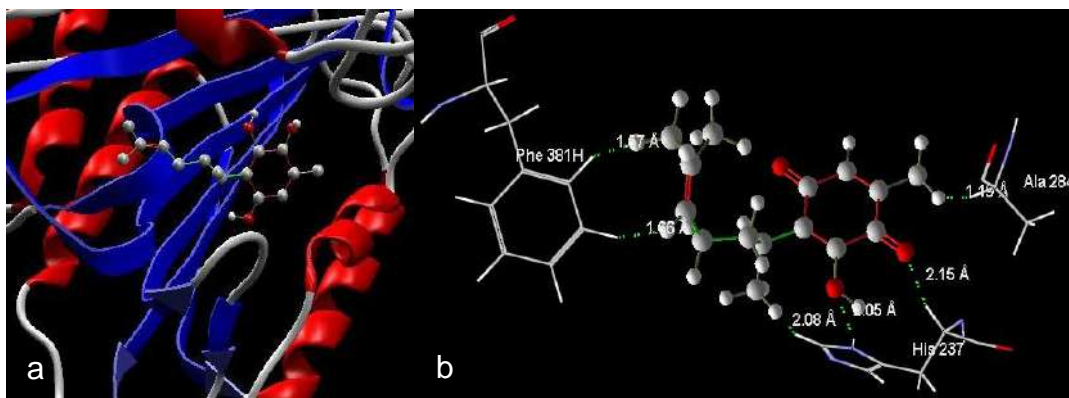
N.A = no aplica

La molécula **1** presenta dos puentes de hidrógeno importantes con el residuo Cys285, uno entre el grupo carbonilo de la quinona con el grupo amino del residuo ( $C=O \cdots H-N$  1.92 Å), mostrado en la Figura 21, y un segundo puente establecido por el grupo amino de la cadena lateral de la Hys237 con el grupo hidroxilo ( $N-H \cdots OH$  2.05 Å); adicionalmente a este puente de hidrógeno, se presenta otro entre el grupo carbonilo y el amino ( $C=O \cdots H-N$  2.15 Å).



**Figura 21.** Modelo de las moléculas estudiadas, representando de manera proporcional a la energía de interacción el tamaño de los átomos: **a.** timoquinona, **b.** perezona, **c.** isoperezona, **d.** horminona y **e.** el sitio activo de la caspasa 3.

Otras interacciones que resultan cruciales (Figura 22) entre el ligando y el receptor son los formados entre el anillo aromático de la Phe381 con la cadena alquílica lateral de las quinonas, específicamente con la región del doble enlace mediante interacciones tipo Vander Waals (1.5 Å). Una segunda interacción de este tipo se presenta entre el residuo de Ala 284 y el grupo metilo en posición 5 del anillo quinónico (1.19 Å).

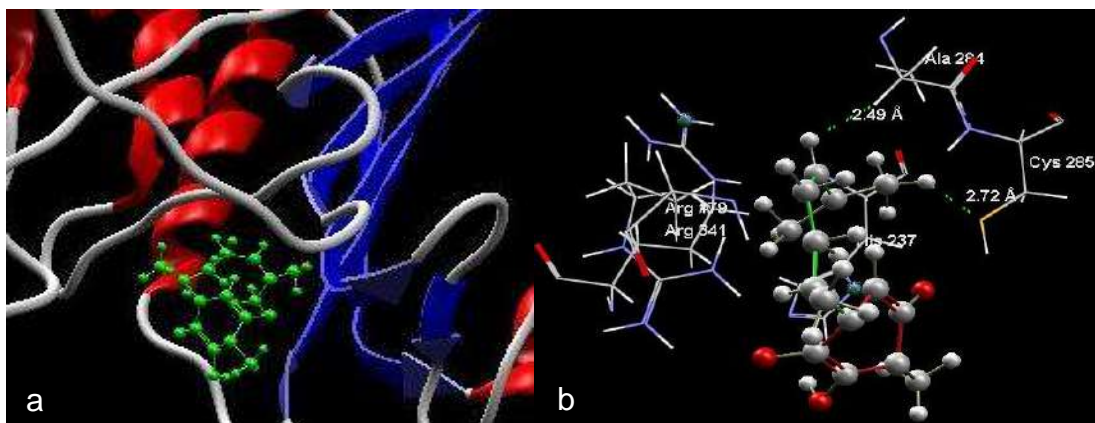


**Figura 22.** Acoplamiento de **1** en el sitio activo de la caspasa 3: **a)** **1** en la estructura secundaria de la proteína. **b)** Complejo de 1PAU-perezona mostrando los residuos y las distancias en la que interaccionan.

El nombre de caspasas es derivado de los residuos de aminoácidos Cisteína que son altamente reactivos y que presentan efecto catalítico sobre sus vecinos, teniendo posibles efectos alostéricos. En este sentido, **2** mostró una interacción con el residuo Cys285 tal como se observa en la Figura 23; la cual se presentó a una distancia de 2.72 Å. Este valor lo que indica una interacción débil a consecuencia de la separación de los grupos. Adicionalmente, se atribuyó a este tipo de unión, los bajos niveles de apoptosis publicados en contraste con los observados para **1**.

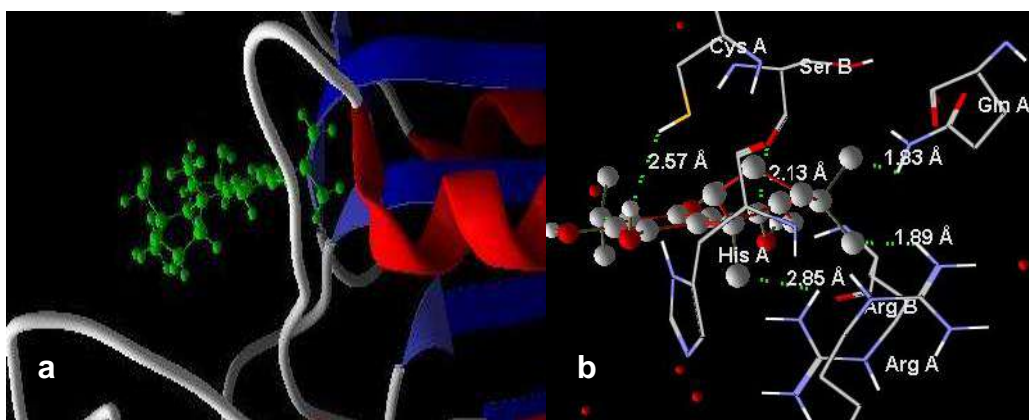
En relación con la zona en la cual se efectúa el acoplamiento de **2**, los resultados establecieron que esta molécula se localiza preferentemente en medio de las dos unidades monoméricas que constituyen a la proteína activa. Así mismo cabe señalar que dado que el tamaño estructural de **1** y **2** es igual, es fácil establecer las similitudes en las propiedades biológicas, ocupando ambas estructuras la misma

cavidad en conformaciones parecidas (Figura 23 a). Sin embargo podemos ver que las interacciones que presentan ambas son diferentes, exhibiendo en el caso de **2** solo una interacción fuerte con los residuos del sitio activo, mientras que la perezona presenta cuatro (Figura 23 b).



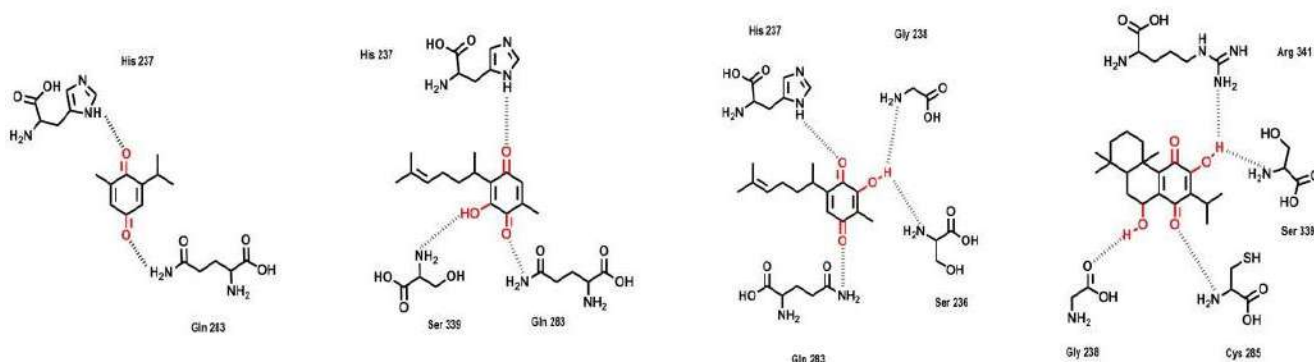
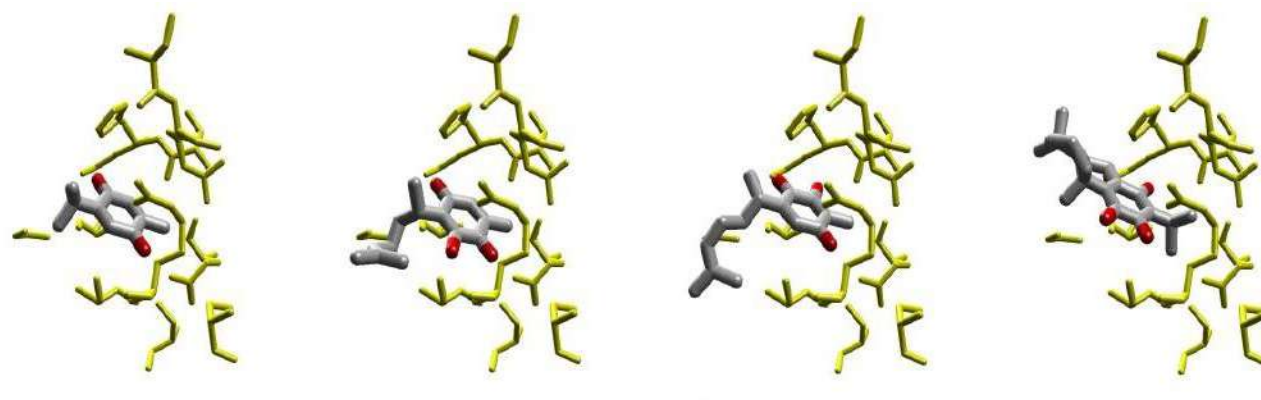
**Figura 23.** Acoplamiento de **2** en el sitio activo de la caspasa 3: **a)** **2** en la estructura secundaria de la proteína. **b)** Complejo de 1 PAU-isoperezona mostrando los residuos y las distancias en la que interactúan.

La interacción de la horminona con las caspasas resultó diferente a los establecidos para **1**, **2** y la timoquinona.



**Figura 24.** Acoplamiento de la horminona en el sitio activo de la caspasa 3: **a)** horminona en la estructura secundaria de la proteína. **b)** Complejo de 1 PAU-horminona mostrando los residuos y las distancias en la que interactúan.

En este sentido, el efecto estérico a consecuencia de los tres anillos condensados es mayor, generando que la parte quinónica del compuesto se encuentre prácticamente fuera de la estructura proteica (Figura 24 a), presentando un menor efecto de interacciones electrostáticas por parte de la estructura proteica y estableciendo interacciones más del tipo hidrofóbicas con algunos de los residuos de la proteína (Figura 24 b).



**Figura 25.** Vista de acoplamiento, timoquinona, **1**, **2** y horminona respectivamente en el sitio activo de la caspasa. El grupo isopropilo de la horminona no permite la entrada total al sitio activo, a pesar de que existe una interacción con cys285

La consecuencia de estos cambios producidos por el efecto estérico es una menor energía de interacción comparada con las otras dos quinonas.

Finalmente, a manera de resumen, en la Figura 25 se presentan los modelos de acoplamiento por superposición de las estructuras cristalinas de los ligantes (átomos de carbono en gris) y la correspondiente estructura del sitio activo de la caspasa-3 en verde; así mismo se marcan las interacciones presentadas por los

compuestos de interés con los residuos de aminoácidos en un modelo bidimensional.

### V.3.3.3 Predicciones quimio-informáticas

Otros resultados complementarios son la evaluación quimio-informática de las propiedades físicas y riesgos toxicológicos de **1** y **2** por su potencial uso como fármacos antioncogénicos; dichas predicciones fueron realizadas mediante el programa OSIRIS “property explorer” y se resumen en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Predicción de las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de la perezona e isoperezona para su potencial uso como fármaco.

		<i>perezona</i>	<i>isoperezona</i>
<b>Propiedades fisicoquímicas</b>	<b>Peso molecular</b>	248.321	248.321
	<b><i>cLogP</i></b>	3.3095	3.3095
	<b><i>Log S</i></b>	-2.583	-2.583
	<b>superficie polar total</b>	203.25	203.25
<b>Riesgos toxicológicos</b>	<b>Druglikeness</b>	-3.6979	-1.7708
	<b>Mutagénico</b>	N	N
	<b>Tumorigénico</b>	N	N
	<b>Efectos reproductivos</b>	N	N
	<b>Irritantes</b>	H	H

N= sin riesgo, M= riesgo medio, H= riesgo alto.

Las propiedades fisicoquímicas de la perezona e isoperezona que se estimaron fueron *cLogP*, el logaritmo del coeficiente de partición entre *n*-octanol y agua, es una propiedad que describe el carácter hidrofóbico de la molécula. Los valores para esta propiedad se encontraron de 3.03 para ambos compuestos estudiados (<5)<sup>158,159</sup>. En este sentido, los valores de la perezona e isoperezona son menores que 5, lo que indica una probabilidad razonable de ser bien absorbidas<sup>160,161</sup>. La solubilidad del fármaco (expresada como *Log S*) permite la también descripción del proceso de absorción. La mala solubilidad conduce a una mala absorción y biodisponibilidad<sup>158,159,161,162</sup>. Los fármacos comerciales presentan valores de *Log S* mayores a -4. Al respecto, también se observa que las moléculas **1** y **2** muestran valores dentro de ese rango; indicando que estos compuestos

pueden poseer una adecuada absorción, movimiento en el torrente sanguíneo y eliminación por el tracto urinario. En relación al peso molecular, ambos compuestos tienen valores mayores de 160 y menores de 500 Da, resultado que es adecuado para un potencial fármaco según la regla de cinco de Lipinski<sup>162</sup>. Además, otro buen descriptor de la absorción es el área superficial polar total (TPSA por su acrónimo en inglés), que incluye la absorción intestinal, la biodisponibilidad, la permeabilidad de Caco-2 y la penetración de la barrera hematoencefálica<sup>163</sup>. Presentando estas moléculas valores que pueden ser equiparables con la de otros fármacos.

En relación con los riesgos toxicológicos, las moléculas solo presentaron una alta probabilidad de ser agentes irritantes para el organismo. En este sentido, la herramienta quimio-informática también indica las zonas de posible efecto, siendo en este caso señalado el doble enlace C12-C13 de ambas moléculas como las responsables de dicho efecto.

Esta última información nos permite establecer como blanco de modificación preferente el doble enlace carbono-carbono presente en la cadena lateral, a fin de buscar nuevos derivados con efecto farmacológico.

#### **V.4. Acercamiento verde para la producción de indolilquinonas derivadas de perezona e isoperezona.**

En años recientes, la prevención del cáncer por medio de productos naturales ha recibido una considerable atención, por consiguiente, la química de metabolitos secundarios es una fuente poderosa de nuevos candidatos a fármacos. Entre los productos naturales y sus derivados usados para este fin, destaca el uso de algunas quinonas y otros derivados como los diindolilmetanos, empleados principalmente como agentes quimioprotectores y terapéuticos contra el cáncer, los cuales ya se encuentran de forma comercial como suplementos alimenticios<sup>73,75</sup>.

Al respecto, el fragmento indolilquinona está presente en muchos productos naturales con acciones biológicas interesantes, tales como acción mimética a insulina, acción antiviral además de efecto citotóxico sobre microorganismos y células cancerosas<sup>164,165</sup>; por consiguiente, los usos prometedores de las indolilquinonas han llamado la atención para la síntesis de nuevas moléculas de esta clase, principalmente bajo un acercamiento verde. El modo más común para la preparación de 3-indolilquinonas es el acoplamiento directo de indol con algunas quinonas en presencia de un catalizador (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AcOH, Bi(OTf)<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>, InBr<sub>3</sub>) en presencia de un disolvente, usando una mantilla de calentamiento en orden de activar la reacción<sup>166</sup>.

En el contexto del presente trabajo, es importante señalar que dentro de los intereses principales se encuentra la implementación de estrategias sintéticas verdes, para producir moléculas-híbridas nuevas, que proporcionen una sinergia o modificación de la actividad farmacológica de compuestos simples conocidos; lo anterior, usando fuentes no convencionales de activación. Además, se busca particularmente que los procesos se lleven a cabo en ausencia de disolvente o usando disolventes inocuos<sup>25,167-170</sup>, empleando también el uso de catalizadores – verdes, como las arcillas bentónicas, destacando el Tonsil Actisil FF (TAFF)<sup>45</sup>.

Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, en este apartado se presenta en primer lugar una contribución verde para la producción de cuatro

candidatos a fármacos, los indol-3-il derivados de: la perezona (1), isoperezona (2), y de manera complementaria a la menadiona (3), y la plumbagina (4).

Para lo anterior se realizó una evaluación comparativa de las condiciones de activación: mantilla de calentamiento, irradiaciones con microondas e infrarrojo cercano, aunado a procedimientos mecánicos como es la molienda con esferas a alta velocidad, todo ellos en ausencia de disolvente y usando TAFF como catalizador.

La segunda aportación que se ofrece corresponde a la evaluación del efecto citotóxico de las moléculas sintetizadas (6-9) sobre células de cáncer de seno, siendo este estudio parte del cumplimiento del objetivo particular número 7.

A su vez, en tercera instancia se muestran los resultados de la caracterización teórico-computacional mediante métodos cuánticos de cada uno de los productos. Así como un estudio *in silico* de las vías de citotoxicidad de estos compuestos nuevos.

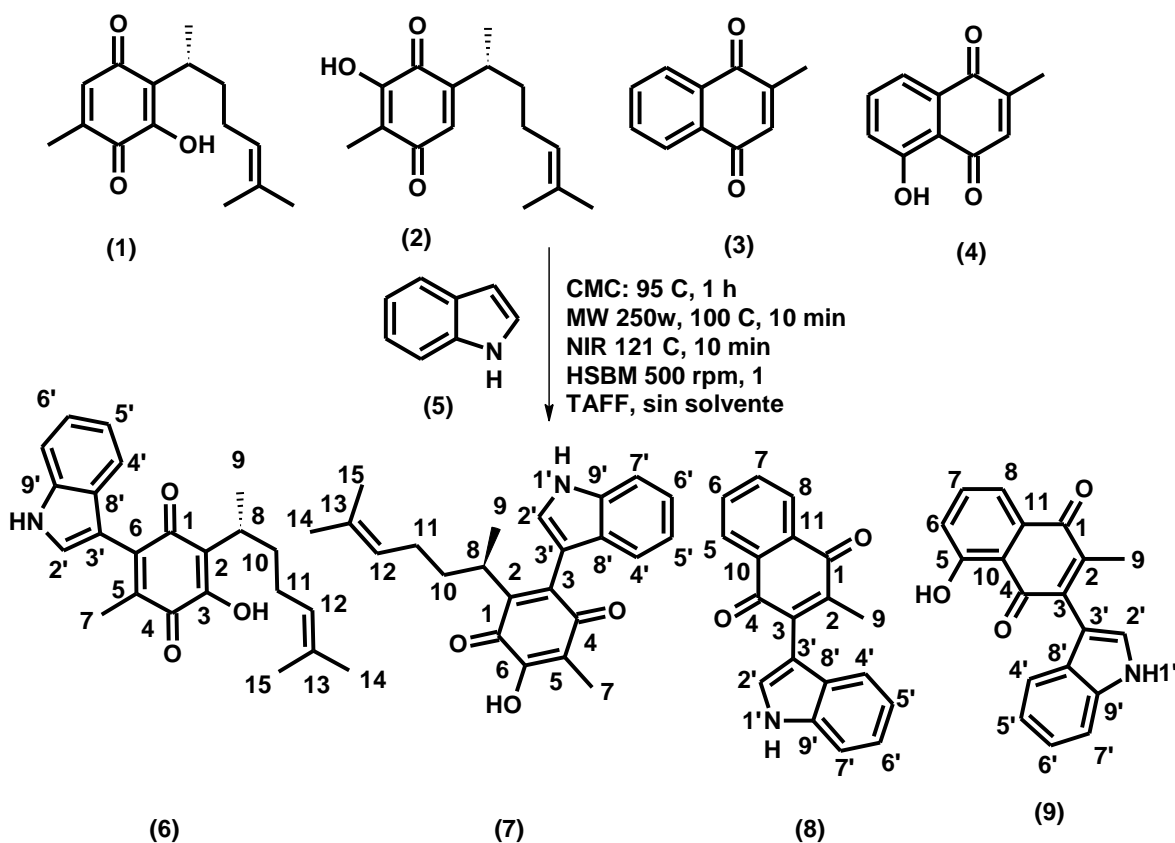
#### **V.4.1. Producción verde de indolilquinonas**

##### V.4.1.1 Estudio comparativo en la formación de las indolilquinonas

En el Esquema 7, se muestran resumidamente las reacciones que fueron llevadas a cabo, entre las quinonas 1 – 4 como sustratos e indol (5) como reactivo, en ausencia de disolvente y con TAFF como catalizador. Las transformaciones se realizaron como se indica comparando cuatro modos de activación: el clásico calentamiento con mantilla y los no muy comunes microondas, infrarrojo y molienda con esferas de alta velocidad, obteniéndose 6-9; resultados compilados en la Tabla 10.

En conclusión, se establece que, se generaron favorablemente cuatro moléculas nuevas (6-9) mediante una estrategia verde, que implica la activación-comparativa de cuatro fuentes de activación (NIR, MW, HSBM, CMC) en ausencia de disolvente, empleando un catalizador eco-amigable (TAFF). Es importante resaltar que las fuentes alternas de activación resultaron más eficaces que la activación clásica mediante CMC.





**Esquema 7.** Método general para la obtención de las indolilquinonas.

Al respecto, como anteriormente se indicó, en la Tabla 10 se muestran los resultados que contemplan, variaciones en la temperatura y la potencia de los diversos métodos de promoción de las reacciones. Es importante señalar que las condiciones de reacción como temperatura, tiempo y potencia fueron los que generaron una variación significativa en los rendimientos de la reacción. El tratamiento con CMC mostró que, al incrementarse la temperatura, también se favorecen los rendimientos, éstos, sin embargo, se mantienen en lo general en niveles bajos (0 a 45%). Estos bajos rendimientos pueden ser explicados teniendo en cuenta el mecanismo de conducción típico de la activación con CMC, el cual no es favorecido por la ausencia de disolvente, además porque el reactivo y los sustratos pueden estar soportados en la arcilla, dicho en otras palabras, una conducción poco eficiente. Para la activación de las reacciones mediante el uso de irradiación electromagnética tanto por microondas como por irradiación infrarroja,

los resultados son indicativos de que una potencia de 250 W, por un lapso de 10 minutos para las microondas permite los mejores rendimientos para este método; mientras que, en el caso del infrarrojo, un tiempo de 10 minutos, a una temperatura de 250°F (121°C) se logran los mejores rendimientos. Sin embargo, se debe mencionar que al incrementar la temperatura hay reducción del rendimiento y un número mayor de subproductos.

**Tabla 10:** Producción de indolilquinonas usando activación térmica convencional, así como irradiaciones de microondas e infrarrojo cercana.

Producto	Rendimientos (%)									
	Térmico (1 hr)			MW (10 min)				NIR(10 min)		
	T.A	50°	80°	100 w	150 w	250 w	250°F	350°F	450°F	500°F
<b>6</b>	0.0%	5.0%	24.0%	5.0%	34.5%	79.0%	62.0%	35.0%	22.0%	12.0%
<b>7</b>	0.0%	5.0%	12.0%	5.0%	12.0%	35.0%	31.0%	20.5%	15.0%	7.0%
<b>8</b>	12.0%	17.0%	46.0%	28.0%	33.0%	42.0%	51.0%	40.4%	33.0%	37.0%
<b>9</b>	0.0%	10.0%	25.0%	10.0%	18.0%	37.0%	64.0%	53.3%	10.0%	10.0%

En la Tabla 10 se observa también, que, para estos modos de activación, los compuestos presentaron un rendimiento moderado, en el rango de 40 a 80%, siendo superiores al calentamiento convencional. Otro aspecto que resaltar es la efectividad de las microondas en la activación de las benzoquinonas (perezona e isoperezona), lográndose los rendimientos más elevados (79 y 35% respectivamente) en contraste con las naftoquinonas; mientras que el uso de la irradiación infrarroja resultó más efectivo en el caso de las naftoquinonas (menadiona y plumbagina), resultando en los rendimientos más altos para esta forma de activación (51 y 64% respectivamente). Estos incrementos en rendimiento con respecto al CMC y la diferencia entre NIR y MW podrían asociarse a la naturaleza de la activación, así como la de las moléculas, las cuales al ser irradiaciones de tipo electromagnéticas no requieren de medio para ser transmitidas, incidiendo directamente en las materias primas y activándolas.

**Tabla 11:** Rendimientos obtenidos en la producción de indolilquinonas activada por triboquímica

Producto	Triboquímica SD (1 hr)				
	100 rpm	200 rpm	300 rpm	400 rpm	500 rpm
<b>6</b>	0.0%	14.0%	12.0%	20.0%	24.0%
<b>7</b>	0.0%	7.0%	15.0%	18.0%	18.0%
<b>8</b>	10.0%	9.2%	20.0%	15.0%	30.0%
<b>9</b>	0.0%	10.0%	17.0%	25.0%	35.0%

SD= Sin disolvente

Con respecto a la obtención de las indolilquinonas mediada por molienda con esferas de alta velocidad (Tabla 11) se dieron rendimientos bajos, encontrándose los mejores rendimientos en el orden del 20 al 35%. Así mismo, los rendimientos mostraron una dependencia hacia la velocidad de la molienda donde los valores más elevados se lograron al emplear 500 rpm por un lapso de una hora; además de observarse que al incrementar el tiempo de molienda el rendimiento no mostraba cambios significativos.

Los bajos rendimientos obtenidos mediante la activación de carácter triboquímico pueden estar relacionados con la dependencia de esta fuente a la dureza de los reactivos empleados, y cuyo valor tiene un efecto exponencial sobre la velocidad de reacción; considerando la energía de transferencia electrónica del HOMO del nucleófilo al LUMO del electrófilo<sup>171</sup>. Además, se sugiere que para los procesos gobernados por ácidos y bases blandas se utilicen sistemas de fricción reducida empleando agentes lubricantes<sup>171</sup>. En el caso del sistema estudiado, el indol y la quinona estarían comportándose como reactivos blandos<sup>172,173</sup>; sin embargo a fin de reproducir las condiciones empleadas con los otros métodos no se utilizó ningún agente lubricante, lo que estaría afectando directamente en el rendimiento.

En relación al mecanismo de la reacción, la ruta debe ocurrir por una adición clásica tipo Michael por parte del indol a los correspondientes sustratos quinónicos, dicha adición es asistida por una interacción del oxígeno del grupo carbonilo con los sitios ácidos de Lewis del TAFF, seguido por una oxidación *in situ*, produciendo **6-9**

en rendimientos moderados y tiempos cortos; adicionalmente se puede establecer que los rendimientos bajos que presenta la molécula **7** son consecuencia del efecto estérico generado por la cadena lateral de **2** sobre la posición C3, lo que complica el ataque por parte del indol.

Es apropiado resaltar que **6**, **7** y **9** son moléculas nuevas, y de acuerdo con lo reportado **8** ha sido previamente producidos por activación con CMC y US, en la presencia de disolventes con el empleo de un catalizador no inocuo<sup>166,174,175</sup>. Además, la revisión de literatura mostró que este es al parecer el primer reporte de la producción verde de indolilquinonas usando MW, NIR y HSBM como modo de activación sin un disolvente y en presencia de un catalizador natural eco-amigable.

#### V.4.1.2. Caracterización espectroscópica de los productos sintetizados.

Para la atribución estructural de las moléculas sintetizadas **6-9**, teniendo en cuenta que tres son nuevas, se les realizó la correspondiente caracterización espectroscópica. Los resultados obtenidos para la espectrometría de masas de baja y alta resolución son resumidos en la Tabla 12.

La espectrometría de masas de baja resolución permitió determinar la presencia del producto, considerándose la presencia, en todos los casos, del ion molecular en abundancias superiores al 25%; así mismo se observó que el patrón de fragmentación fue coherente con el esqueleto base de las indolilquinonas. En el caso de la indolilquinona generada a partir de la perezona, el pico base fue asociado al catión radical producto de la fragmentación de la cadena lateral de la perezona (a partir de C10 a C15); para la indolilquinona generada por la isoperezona su pico base fue atribuido al catión radical generado por la pérdida de un grupo carbonilo del anillo de la quinona, el grupo hidroxilo y parte de la cadena hidrocarbonada (de C12 a C15). La fragmentación de las naftoquinonas reveló que para la indolilplumbagina el pico base corresponde al ion molecular; mientras que para la indolilmenadiona perdería 17 unidades.

**Tabla 12:** Espectrometría de masas por impacto electrónico de alta y baja resolución para **6-9**.

Compuesto	Espectrometría de masas						
	Baja resolución			Alta resolución			
	M <sup>+</sup> m/z(% ar)	Pico base m/z (100%)	Otros fragmentos m/z	Composición elemental	Masa Calculada (Da)	Masa encontrada (Da)	error (ppm)
6	363(67)	281[M-82] <sup>++</sup>	348 (6) [M-15] <sup>+</sup> , 334 (7) [M-29] <sup>+</sup> , 252(10) [M-11] <sup>++</sup> , 246 (6) [M-112] <sup>++</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	363.1834	363.1816	-5
7	363 (25)	261[M-102] <sup>++</sup>	348 (2) [M-15] <sup>+</sup> , 279 (28) [M-84] <sup>++</sup> , 149 (90) [M-214] <sup>++</sup> , 167 (60) [M-196] <sup>++</sup> , 269 (12) [M-18] <sup>++</sup> , 258 (8) [M-29] <sup>+</sup> , 246(45) [M-41] <sup>++</sup> , 244(32) [M-43] <sup>++</sup> , 286(42) [M-17] <sup>++</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	363.1834	363.1829	-1.5
8	287(30)	270[M-17] <sup>++</sup>	258 (8) [M-29] <sup>+</sup> , 246(45) [M-41] <sup>++</sup> , 244(32) [M-43] <sup>++</sup> , 286(42) [M-17] <sup>++</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	287.0946	287.0974	9.8
9	303(100)	303 M <sup>++</sup>	149(38) [M-154] <sup>+</sup> , 57(78) [M-246] <sup>++</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	303.0895	303.0873	-7.4

A su vez, confirmada la presencia de los compuestos deseados, las masas exactas de los iones moleculares fueron adquiridas mediante alta resolución para validar los iones moleculares correspondientes, mediante sus datos de composición elemental; adicionalmente, las masas exactas calculadas y obtenidas experimentalmente presentaron un error de menos de 10 ppm en todos los casos, confirmándose la estructura de las moléculas.

La caracterización de **6-9** se complementó mediante los espectros correspondientes a la resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, datos resumidos en las Tablas 13 y 14 respectivamente. En relación con la resonancia magnética de hidrógeno, es importante señalar, que en los productos se observa la falta de la señal asignada para H-3 en el anillo del indol; además de la ausencia de las señales H-3 de los anillos de quinona para las moléculas de isoperezona, menadiona, plumbagina, y la señal de H-6 para el anillo de la perezona; además, la señal del protón unido al nitrógeno en la estructura del indol, a δ 7.81 ppm en la materia prima, fue desplazada para **6-9** a campos bajos de 8.4 a 8.9 ppm, siendo esto resultado

inequívocamente de la desprotección generada por el alto grado de conjugación en la estructura indólico-quinónico de los productos.

**Tabla 13:** Desplazamientos químicos en ppm ( $\delta$ ) y multiplicidad (M) de las moléculas objetivo para resonancia de  $^1\text{H}$  a 300 MHz

$\delta$ (ppm), M					
$^1\text{H}$	6	7	$^1\text{H}$	8	9
1'	8.904, b	8.476, b	1'	8.800, b	8.6, b
OH	8.25, b	8.100, s	OH	-----	12.25, s
2'	7.162, d	6.797, s	2'	7.430, s	7.414, s
4'	7.297, d	7.350, d	4'	7.319, d	7.300, d
5', 6	7.225-7.162, m	7.26-7.128, m	5', 6	7.220-7.104, m	7.260-7.190, m
7'	7.430, d	7.424, d	7'	7.456, d	7.450, m
2	2.324, s	4.108, s	5,8	8.220-8.120, m	-----
7	2.181, s	1.988, s	6,7	7.800-7.740, m	7.200, d
8	3.220-3.100, m	2.810-2.920, m	7	-----	7.600-7.520, m
9	1.263, d	1.260, d	8	---	7.709, d
10	1.853-1.770, m	1.742-1.627, m	9	2.213, s	2.196, s
12	5.104, b	4.83, b			
14	1.645, s	1.497, s			
15	1.548, s	1.430, s			

La caracterización estructural de **6-9** se dio por concluyó mediante la determinación de los desplazamientos químicos para resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ . Resaltando que las señales de C-3 y C-2 para el indol, en una región de 102.22 ppm y 111.10 ppm, fueron desplazadas a campos bajos, 107.9-108.9 y 122.3-128.2 ppm respectivamente. Estas variaciones en los desplazamientos químicos fueron atribuidas a un efecto de desprotección generado por la unión del indol con la quinona.

**Tabla 14:** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  en ppm ( $\delta$ ) de las moléculas objetivo a 300 MHz.

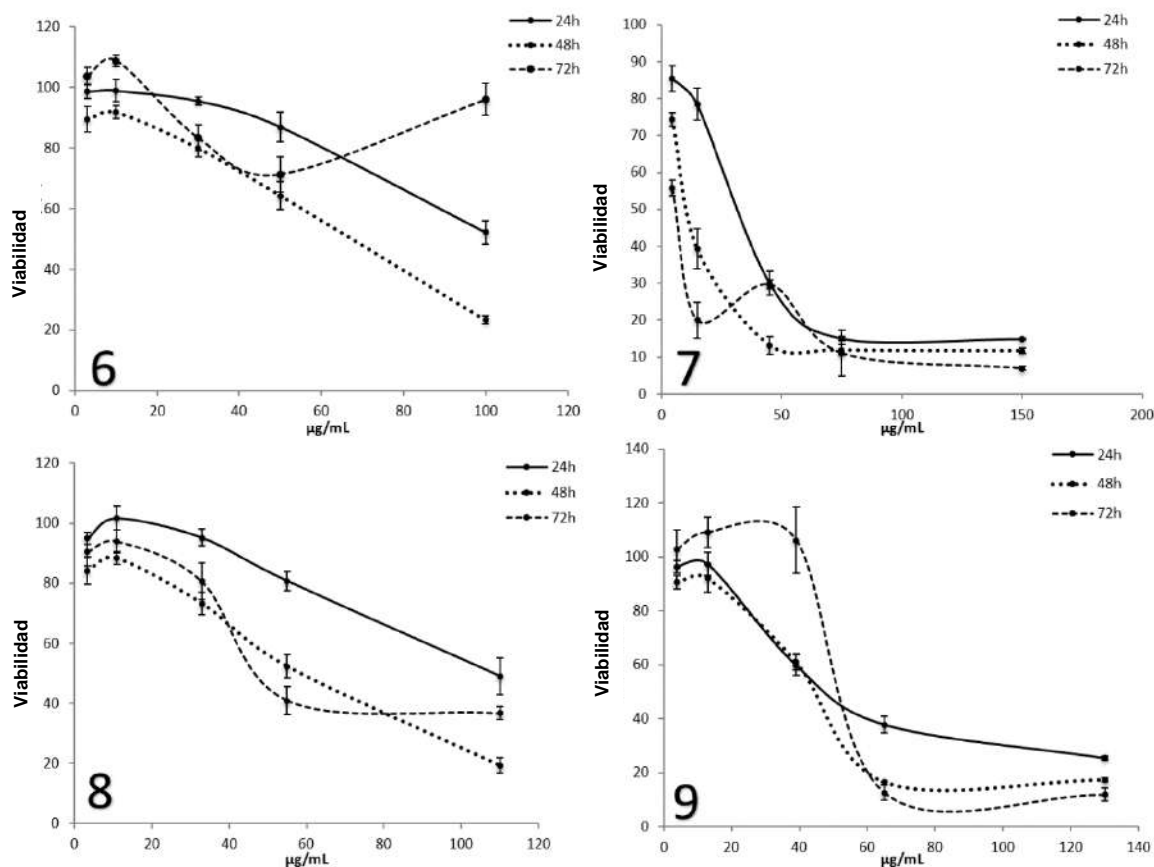
13 C	$\delta$ (ppm)			
	6	7	8	9
C-1	187.00	188.00	186.00	185.00
C-2	124.20	149.60	143.30	145.05
C-3	151.10	128.20	140.40	140.10
C-4	184.70	183.70	184.80	189.87
C-5	140.30	116.50	126.70	161.50
C-6	135.90	151.40	133.40	123.90
C-7	14.60	11.12	133.50	135.70
C-8	30.10	30.36	126.20	118.90
C-9	18.70	23.01	15.80	15.90
C-10	34.50	38.70	132.52	135.50
C-11	27.00	29.00	132.48	15.90
C-12	124.90	123.80	-	-
C-13	126.70	132.30	-	-
C-14	25.90	23.98	-	-
C-15	17.90	14.09	-	-
C-2'	128.20	122.80	122.30	126.90
C-3'	108.90	105.60	108.30	107.90
C-4'	120.80	120.40	111.70	120.30
C-5'	120.90	120.90	120.30	120.70
C-6'	122.70	122.60	120.40	122.70
C-7'	111.90	114.10	111.60	111.70
C-8'	131.60	130.90	127.20	126.50
C-9'	135.20	135.70	135.80	136.10

#### ***V.4.2. Evaluación citotóxica de las indolilquinonas sintetizadas***

La citotoxicidad de las Indolilquinonas fue evaluada en células humanas de cáncer de seno MDA-MB-231 usando el ensayo MTT, empleando como control células de fibroblastos normales. Las moléculas de estudio (6-9) fueron trabajadas en concentraciones dentro del rango de 0 a 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Como puede ser visto (Figura 26), una disminución en las células viables es percibida desde las 24 h de incubación para todas las moléculas estudiadas, es conveniente resaltar que, en el caso de **7**, el efecto citotóxico inicia a concentraciones bajas (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); por otro lado, para el resto de las moléculas la disminución de la viabilidad comenzó a concentraciones mayores de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El mismo comportamiento fue exhibido a 48 h con la viabilidad de las células cancerosas ya en un rango de 10 al 20 % cuando fueron usadas las concentraciones más altas 100, 150, 110 y 130  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para 6-9 respectivamente. Los resultados después de 72 h mostraron en 7 y 9 un comportamiento similar al de las 48 h, Sin embargo 6 y 8 incrementaron la viabilidad celular a altas concentraciones.



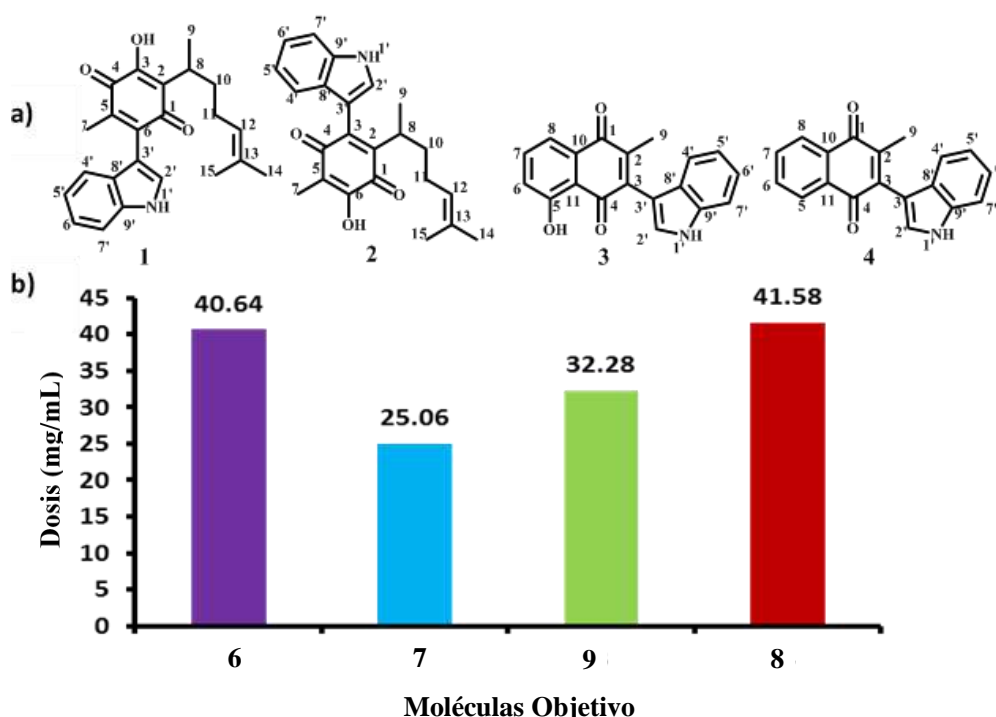
**Figura 26.** Gráficos de dosis-respuesta a 24, 48 y 72 h para las moléculas 6-9.

Los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron obtenidos por extrapolación a partir de los gráficos de dosis-respuesta (Figura 26). Los resultados de la viabilidad en células de cáncer de seno contra las cuatro moléculas probadas muestran a 7 como la molécula más activa con un valor de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



Adicionalmente, los datos de IC<sub>50</sub> para **6**, **8** y **9** fueron 40.6, 41.6 y 32.3 µg/mL respectivamente (Figura 27). Estas concentraciones fueron probadas además en células humanas de fibroblastos dérmicos sanas.

Con estos resultados es importante señalar que solo **9** causó un efecto citotóxico con un 15% de mortalidad en las células anteriormente señaladas; por otro lado, **6-8** en lugar de promover la muerte celular causan proliferación en los fibroblastos.



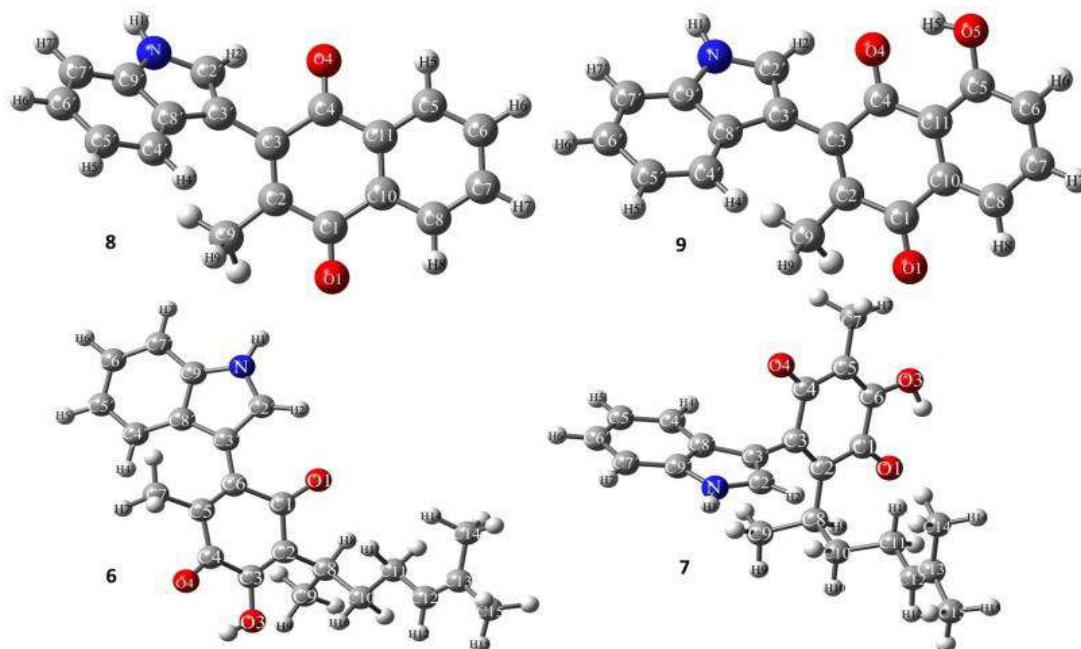
**Figura 27.** Efecto citotóxico de las indoliquinonas en células de cáncer de seno: (a) estructuras de las moléculas con sus correspondientes asignaciones de posiciones atómicas (**6**, **7**, **8**, **9**). (b) Histograma de los correspondientes valores de IC<sub>50</sub>.

Resulta interesante que las moléculas **6-9** no presentaran efecto significativo sobre células humanas sanas. Por lo cual se considera como una perspectiva a futuro realizar un estudio más afondo, pues estaríamos hablando de un posible tratamiento contra cáncer en el cual las células sanas no fuesen afectadas; realizando las correspondientes determinaciones de la concentración media efectiva y el índice de selectividad.

### V.4.3. Estudio teórico- cuántico de las moléculas sintetizadas

#### V.4.3.1. Optimización, determinación de parámetros geométricos y espectroscópicos.

Las moléculas **6-9** fueron también estudiadas por métodos de la química computacional. En el proceso de optimización se realizó la distribución de conformeros para cada molécula objetivo. Posteriormente, se efectuó la selección de la conformación más estable para cada caso. Adicionalmente, los conformeros seleccionados fueron apropiadamente optimizadas por TFD empleando el funcional B3LYP y el conjunto base 6-311++G(d,p). Las estructuras obtenidas en fase gas son ilustradas en la Figura 28.



**Figura 28.** Estructuras optimizadas de las indolilquinonas por B3LYP/6-311++G(d,p).

Dado que para las moléculas objetivo no fue posible determinarles sus patrones de rayos X de monocristal experimentales, y considerando la importancia de la estructura en la actividad biológica, los valores calculados para las moléculas obtenidas fueron comparadas con los parámetros experimentales de las quinonas

originales<sup>95,146,176,177</sup> y de un derivado indólico similar, presente en la literatura, el 2-etil-5-(indol-3-il)oxazol<sup>178</sup>. Las longitudes de enlace calculadas para **6-9**, obtenidas a partir de las estructuras optimizadas fueron resumidas y son mostrados en las Tablas 15 y 16.

**Tabla 15.** Selección de longitudes de enlace calculados para **6** y **7** (en Å) contrastados con los correspondientes enlaces en moléculas de referencia.

Enlace	6		7	
	Longitud teórica	Longitud experimental	Longitud teórica	Longitud experimental
<b>C1-O1</b>	1.223	1.226 <sup>a</sup>	1.228	1.240 <sup>c</sup>
<b>C1-C2</b>	1.480	1.469 <sup>a</sup>	1.489	1.450 <sup>c</sup>
<b>C2-C3</b>	1.351	1.334 <sup>a</sup>	1.359	1.350 <sup>c</sup>
<b>C3-C4</b>	1.494	1.498 <sup>a</sup>	1.523	1.490 <sup>c</sup>
<b>C1-C6</b>	1.527	1.469 <sup>a</sup>	1.491	1.430 <sup>c</sup>
<b>C3/C6-O</b>	1.343	1.347 <sup>a</sup>	1.340	1.250 <sup>c</sup>
<b>C4-O4</b>	1.231	1.220 <sup>a</sup>	1.221	1.180 <sup>c</sup>
<b>C2-C8</b>	1.518	1.499 <sup>a</sup>	1.527	1.500 <sup>c</sup>
<b>C4-C5</b>	1.467	1.472 <sup>a</sup>	1.474	1.430 <sup>c</sup>
<b>C5-C7</b>	1.503	1.507 <sup>a</sup>	1.499	1.580 <sup>c</sup>
<b>C=O...H</b>	1.965	2.340 <sup>a</sup>	1.985	2.650 <sup>c</sup>
<b>C5-C6</b>	1.362	1.332 <sup>a</sup>	1.348	1.390 <sup>c</sup>
<b>C6/C3-C3'</b>	1.461	1.448 <sup>b</sup>	1.475	1.448 <sup>b</sup>
<b>C2'-C3'</b>	1.382	1.375 <sup>b</sup>	1.373	1.375 <sup>b</sup>
<b>C2'-N</b>	1.368	1.363 <sup>b</sup>	1.377	1.363 <sup>b</sup>
<b>C8'-N</b>	1.389	1.370 <sup>b</sup>	1.382	1.370 <sup>b</sup>

a = obtenido de Soriano y Cols., 1986; b= obtenido de Noltemeyer y Cols., 1982; c= obtenido de Enríquez y Cols., 1992.

La Tabla 15 muestra las longitudes de enlace de **6** y **7**, siendo agrupadas por la semejanza estructural entre ambas moléculas. En el caso de **6** comparado con el anillo quinónico de la perezona, los valores estimados son muy similares. Sin embargo, en el caso del enlace C1-C6 es más largo en **6** en comparación con el de la perezona. Además, el enlace de hidrógeno presente entre el grupo hidroxilo O3-H y el oxígeno O4 del grupo carbonilo disminuye su distancia, lo que es un indicio

de un enlace más fuerte (puente de hidrógeno intramolecular); las distancias  $O3 \cdots O4$  y  $H3 \cdots O4$  son 2.583 y 1.965 Å además el ángulo  $O3 \cdots H3 \cdots O4$  de 118.839°, estos datos concuerdan con los de Soriano y Cols<sup>95</sup>. Considerando la estructura del indolilo, los valores fueron comparados con los datos experimentales de la difracción de rayos X para el 2-etil-5-(indol-3-il)oxazol<sup>178</sup> como referencia. En relación al fragmento indolilo en la molécula **6** sus enlaces resultaron ligeramente más largos que los presentados en la molécula de referencia.

En el caso de los valores calculados de **7** comparados con la isoperezona muestran una tendencia similar en el anillo quinónico, sin embargo, los enlaces C3-C4 y C1-C6 son más largos que los datos experimentales. En este mismo sentido, el enlace de hidrógeno intramolecular es más corto indicando un incremento en la fuerza de este enlace. Respecto al fragmento indolilo en **7**, los valores estimados tuvieron buena concordancia con los valores experimentales considerando las diferencias estructurales entre **7** y el 2-etil-5-(indol-3-il)oxazol.

En la Tabla 16, se presentan de forma resumida algunos de los valores de longitud de enlace teóricos para **8** y **9** contrastados con los valores obtenidos por rayos X para **3** y **4**; así como el fragmento indolilo fue comparado con el 2-etil-5-(indol-3-il)oxazol. La longitud calculada para el enlace C3-C4 de **8** y **9** fue mayor que los presentados por sus correspondientes materias primas (**3** y **4**); Mientras que el enlace de hidrógeno de la molécula **9** fue más corto que el presentado por **4**, siguiendo la misma tendencia de las indolilquinonas anteriormente analizadas (**6** y **7**). El resto de los valores teóricos fueron coherentes y cercanos a los valores experimentales, siendo apropiados con el nivel de teoría usado.

El incremento en la longitud de los enlaces C1-C6 (para **6** y **7**) y C3-C4 (para **7**, **8** y **9**) para sus anillos quinónicos, y el acortamiento del puente de hidrógeno intramolecular (**6**, **7** y **9**) pueden ser explicados por el efecto resonante promovido por la adición de la estructura indólica. Los electrones del sistema aromático del fragmento indolilo pueden producir una mayor localización electrónica en el oxígeno del grupo carbonilo ( $C4=O4$  en **6** y  $C1=O1$  in **7,8** and **9**) a diferencia con **1-4** en las cuales los dobles enlaces del anillo de la quinona pueden ser deslocalizados en

ambos grupos carbonilos. La consecuencia de este efecto en **6-9** es una mayor carga negativa en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo previamente señalado y por lo tanto una mayor fuerza atractiva hacia el hidrógeno, además de una menor deslocalización electrónica de los enlaces C1-C6 y C3-C4, provocando que este enlace se alargue.

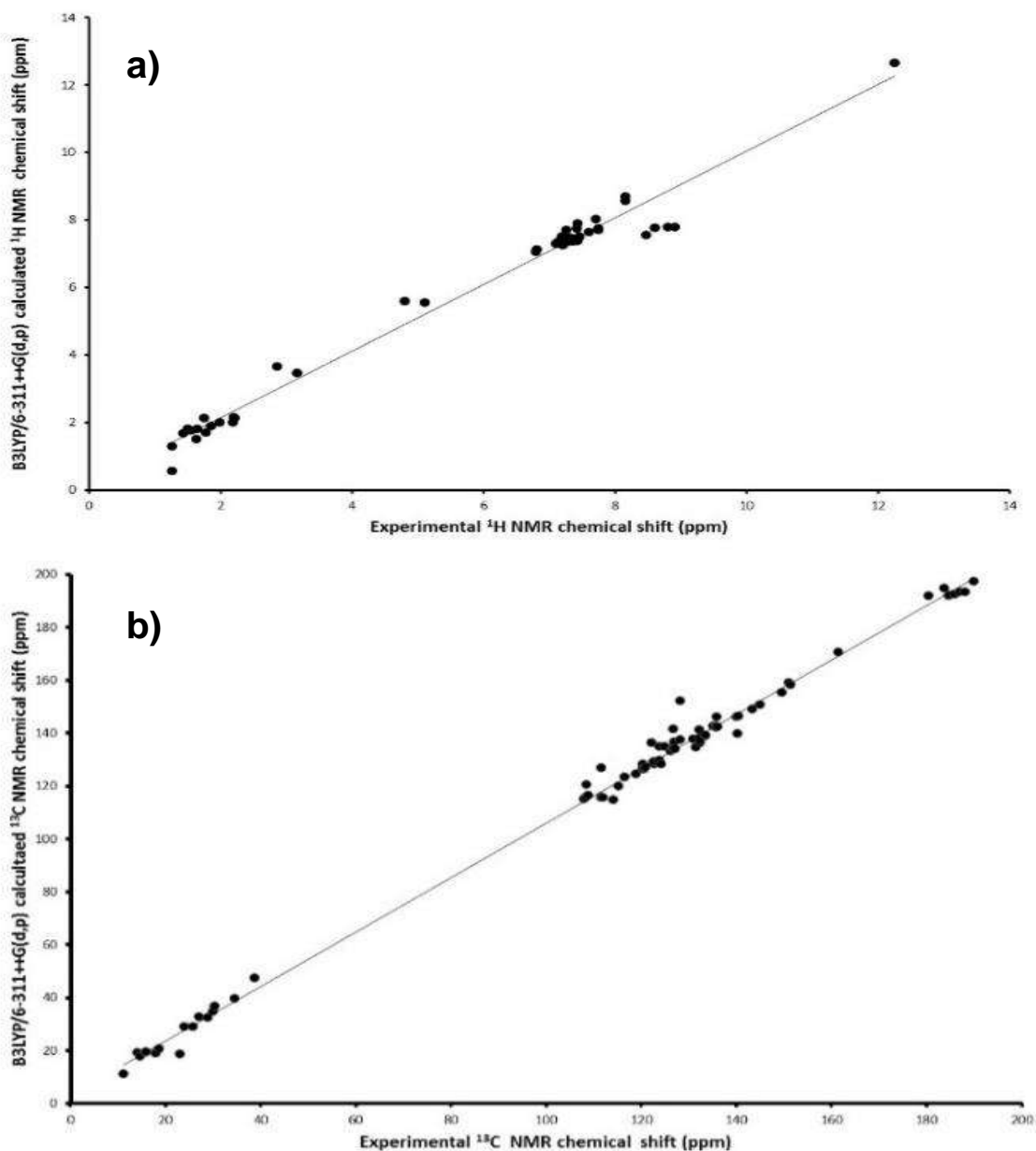
**Tabla 16.** Selección de algunas longitudes de enlace teóricas y experimentales de **8 y 9** (en Å).

Enlace	8		9	
	Longitud teórica	Longitud experimental	Longitud teórica	Longitud experimental
C1=O1	1.223	1.229 <sup>a</sup>	1.223	1.228 <sup>c</sup>
C1-C2	1.494	1.453 <sup>a</sup>	1.491	1.451 <sup>c</sup>
C2-C3	1.363	1.366 <sup>a</sup>	1.365	1.306 <sup>c</sup>
C3-C4	1.503	1.484 <sup>a</sup>	1.498	1.470 <sup>c</sup>
C3-C3'	1.471	1.448 <sup>a</sup>	1.467	1.448 <sup>c</sup>
C4=O4	1.219	1.231 <sup>a</sup>	1.240	1.229 <sup>c</sup>
C2-C11	1.503	1.491 <sup>a</sup>	1.501	1.525 <sup>c</sup>
C4-C10	1.492	1.467 <sup>a</sup>	1.465	1.460 <sup>c</sup>
C10-C5	1.397	1.392 <sup>a</sup>	1.415	1.460 <sup>c</sup>
C10-C9	1.400	1.401 <sup>a</sup>	1.405	1.386 <sup>c</sup>
C5-C6	1.391	1.398 <sup>a</sup>	1.384	1.318 <sup>c</sup>
C6-C7	1.398	1.387 <sup>a</sup>	1.400	1.405 <sup>c</sup>
C7-C8	1.391	1.389 <sup>a</sup>	1.387	1.400 <sup>c</sup>
C8-C9	1.397	1.398 <sup>a</sup>	1.410	1.364 <sup>c</sup>
C9-C1	1.488	1.479 <sup>a</sup>	1.49	1.492 <sup>c</sup>
C5-HO5	-----	-----	1.339	1.320 <sup>c</sup>
C=O—H	-----	-----	1.696	1.870 <sup>c</sup>
C2'-C3'	1.376	1.375 <sup>b</sup>	1.379	1.375 <sup>b</sup>
C2'-N	1.374	1.363 <sup>b</sup>	1.370	1.363 <sup>b</sup>
C8'-N	1.383	1.370 <sup>b</sup>	1.383	1.370 <sup>b</sup>

a = obtenido de Nowell and Atfield, 2004; b= obtenido de Noltemeyer y Cols., 1982; c= obtenido de Vijayalakshmi y Cols., 1982.

V.4.3.2 Determinación teórica de los desplazamientos químicos de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para las moléculas objetivo.

Los correspondientes valores experimentales de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron correlacionados con los valores calculados por TFD con el funcional B3LYP, usando el conjunto base 6-311++G(d,p) y el método GIAO.



**Figura 29.** Regresión lineal entre los valores experimentales y calculados con B3LYP/6-311++G(d,p) : **(a)** desplazamiento químico de RMN  $^1\text{H}$ ; **(b)** desplazamiento químico de RMN  $^{13}\text{C}$  para las indolilquinonas obtenidas en este trabajo.

Los desplazamientos químicos de RMN  $^1\text{H}$  calculados por GIAO fueron graficados contra los datos experimentales obtenidos para las indolilquinonas, Figura 29.

El análisis de regresión lineal del conjunto de datos de desplazamiento químico de RMN $^1\text{H}$  (Figura 29(a)), proporcionó los siguientes resultados: un coeficiente de regresión de 0.9806 con una desviación estándar de 0.3930 ppm, la ecuación que describe la recta es  $\delta\text{T} = 0.9875\delta\text{ex} + 0.1661$  ppm, donde  $\delta\text{T}$  es el desplazamiento químico estimado en base al valor experimental  $\delta\text{ex}$ , la pendiente y el intercepto tienen una desviación standard de 0.0196 y 0.1261 respectivamente.

El mismo análisis fue hecho para los valores teóricos y experimentales de desplazamiento químico para RMN $^{13}\text{C}$ , la correspondiente gráfica es mostrada en la Figura 29(b); en este sentido, el análisis de regresión lineal para los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  dieron un coeficiente de regresión de 0.9955 y una desviación estándar de 3.35 ppm, la ecuación que describe la tendencia es  $\delta\text{T} = 1.0297\delta\text{ex} + 3.138$  ppm, la pendiente y el intercepto mostraron una desviación standard de 0.0076 y 0.937 respectivamente.

En otras palabras, los valores de coeficiente de regresión en ambos análisis reflejan una buena descripción de los desplazamientos químicos experimentales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  por el método, nivel de teoría y conjunto base seleccionados.

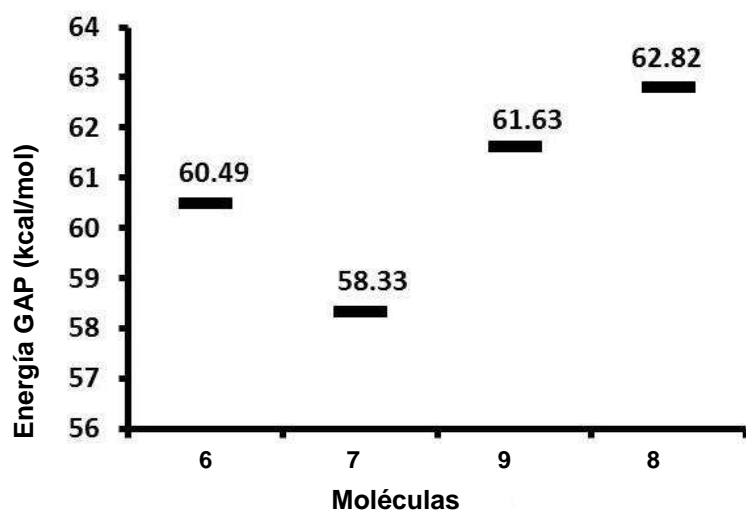
#### ***V.4.4. Relación estructura-función de las indolilquinonas sintetizadas: estudios cuánticos computacionales, acoplamiento molecular y quimio-informático.***

##### ***V.4.4.1. Análisis de los orbitales moleculares***

En la Figura 30 se muestran los valores de diferencia energética entre los orbitales frontera (GAP) calculados ( $E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$ ) para las moléculas sintetizadas. Estos valores muestran que la molécula menos reactiva corresponde a **8**, con un  $\Delta E_{\text{GAP}} = 62.82$  kcal/mol, es decir, de los compuestos estudiados es el más estable. Siendo atribuida la alta estabilidad de **8** a su estructura mayoritariamente aromática.

En este mismo sentido, la molécula más reactiva fue la 3-indolilisoperezona,  $\Delta E_{GAP} = 58.33$  kcal/mol.

Respecto a los resultados antes mencionados, el compuesto más citotóxico ( $IC_{50} = 25.06$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) fue **7**, correspondiente a la molécula con menor diferencia energética ( $\Delta E_{GAP} = 58.33$  kcal / mol) y gran reactividad. Mientras tanto, el compuesto menos citotóxico ( $IC_{50} = 41.58$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fue **8**, el cual tiene la más baja reactividad y el mayor valor de  $E_{GAP}$  ( $E_{GAP} = 62.83$  kcal / mol); estos resultados son indicativos de una posible correlación entre la estabilidad de la molécula y la citotoxicidad en las células de cáncer de mama.



**Tabla 17.**  $E_{HOMO}$  y  $E_{LUMO}$  de las moléculas de estudio.

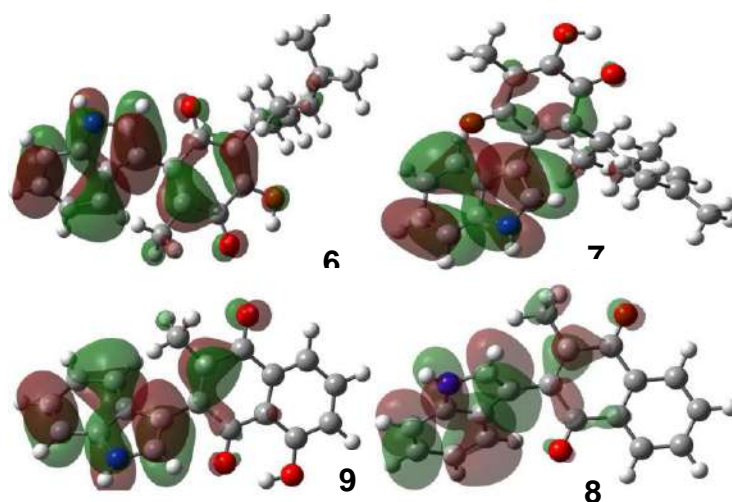
Molécula	Energía (eV)	
	HOMO	LUMO
<b>6</b>	-5,986	-3,374
<b>7</b>	-5,959	-3,428
<b>8</b>	-5,905	-3,184
<b>9</b>	-6,013	-3,347

**Figura 30:** Grafica de energía GAP (kcal/mol) para las moléculas objetivo

Algunos parámetros adicionales que describen la reactividad son las energías de los orbitales HOMO y LUMO, para lo cual es conveniente señalar que el valor de  $E_{HOMO}$  se asocia regularmente con la capacidad de donación de electrones, un valor más alto de  $E_{HOMO}$  es indicativo de la mayor facilidad de donar electrones a un orbital no ocupado. En contraste, un valor bajo de  $E_{LUMO}$  está relacionado con la capacidad de la molécula para aceptar electrones. En este sentido se determinaron estos parámetros químicos cuánticos correspondientes a los compuestos de interés, valores que se resumen en la Tabla 17. Como puede verse, a partir de estos cálculos, las  $E_{HOMO}$  de **6,7** y **9** fueron mayores que la de **8** (-

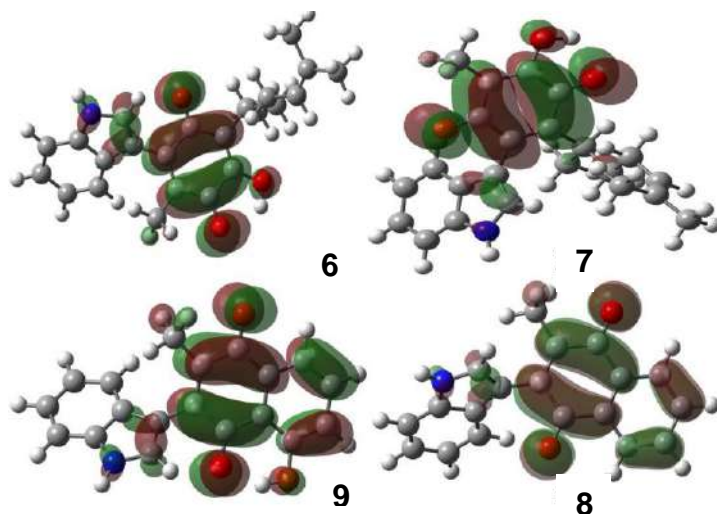


5.905 eV), lo que sugiere que la presencia de un grupo hidroxilo podría reforzar la interacción entre el ligando y el sitio receptor particular; además, la energía del orbital LUMO muestra la misma tendencia que la presentada por los valores de  $E_{GAP}$ . En otras palabras, **7** tiene la mayor capacidad de aceptar los electrones y **8** es el menos reactivo, estos datos son coherentes con los resultados experimentales de citotoxicidad previamente señalados.



**Figura 31.** Orbital molecular HOMO de las indoliquinonas estudiadas.

Las superficies de densidad electrónica para los orbitales moleculares frontera de los compuestos objetivo se muestran en las Figuras 31 y 32.



**Figura 32.** Orbitales moleculares LUMO para las moléculas de estudio.

En todos los casos, los orbitales HOMO se localizaron tanto en la región del fragmento indólico, y parcialmente en los dobles enlaces conjugados en la estructura quinónica; estas regiones con electrones- $\pi$  están disponibles para realizar ataques electrofílicos, en otras palabras, estos sustratos actúan como nucleófilos.

Con respecto a los orbitales LUMO, se ubicaron alrededor del anillo de la quinona; situación atribuida tanto a los efectos de sustracción de carácter inductivos como de resonancia del grupo carbonílico conjugado, que permite ataques de carácter nucleofílico, en otras palabras, el sustrato actúa como electrófilo.

#### V.4.4.2 Cargas atómicas

En la Tabla 18 se muestran los valores de carga de los átomos en las moléculas diana. Como se mencionó anteriormente, las moléculas estudiadas presentaron citotoxicidad sobre células cancerosas; efecto producido por la interacción correspondiente de **7-9** con los sitios receptores, principalmente por interacciones no covalentes entre el ligando y algunos residuos de aminoácidos del receptor proteico. En este sentido, se determinó la población natural de cargas para identificar posibles sitios de interacción de las moléculas sintetizadas con los residuos de las proteínas involucradas en la citotoxicidad.

Los resultados muestran que el átomo con mayor carga negativa fue el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, explicando la mayor actividad citotóxica de **6,7** y **9**, así como el fuerte enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo hidroxilo y el grupo carbonilo adyacente ( $\text{OH} \cdots \text{O} = \text{C}$ ).

Por otro lado, la molécula **8**, que no tiene un grupo hidroxilo, el carbono C9 presentó el valor de carga negativa más grande, atribuida al grupo metilo enlazado al anillo quinónico. Este mismo átomo, presentó corresponde al segundo átomo en orden de carga negativa en el resto de las moléculas (correspondiendo este átomo a las posiciones C9 en **9**, C7 en **6** y C2 en **7**). Este valor de carga negativa en dichos átomos de carbono puede ser explicado convenientemente por el efecto resonante generado por la estructura indólica.

**Tabla 18.** Distribución de cargas de algunos átomos seleccionados

Átomos	Carga (e-)			
	Moléculas			
	6	7	8	9
<b>C1</b>	0.527	0.460	0.511	0.506
<b>C2</b>	-0.130	-0.644	-0.025	-0.022
<b>C3</b>	0.302	0.221	-0.063	-0.063
<b>C6/C10</b>	-0.036	0.275	-0.106	-0.082
<b>C4</b>	0.471	0.124	0.535	0.545
<b>C5</b>	-0.069	-0.151	-0.140	0.380
<b>C7/C9*</b>	-0.606	-0.596	-0.611	-0.612
<b>C3'</b>	-0.145	-0.408	-0.126	-0.145
<b>C2'</b>	0.087	-0.032	0.029	0.077
<b>H2'</b>	0.220	0.208	0.208	0.216
<b>N</b>	-0.530	-0.543	-0.535	-0.533
<b>H1'</b>	0.405	0.402	0.403	0.404
<b>O1</b>	-0.546	-0.578	-0.544	-0.543
<b>O4</b>	-0.574	-0.527	-0.527	-0.605
<b>O5/O3/O6**</b>	-0.658	-0.664	-	-0.666
<b>H5/H3/H6</b>	0.493	0.492	0.230	0.503

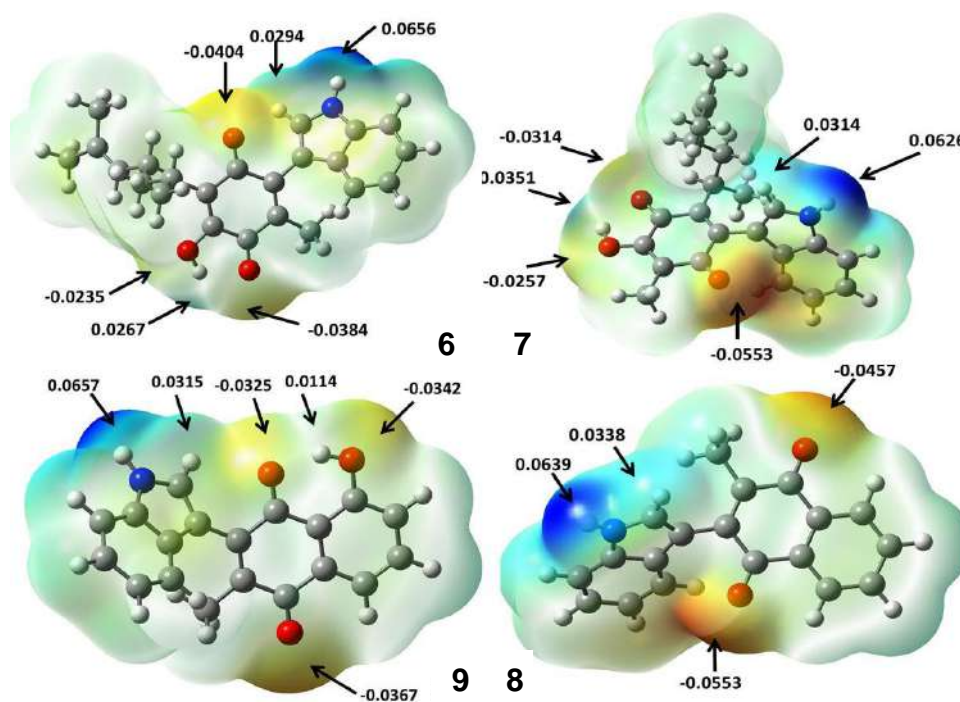
\*El grupo metilo unido al anillo de la quinona en 6 y 7 es asignado a la posición C7, mientras en 8 y 9 la asignación es C9. \*\* El oxígeno asignado corresponde al oxígeno en los grupos hidroxilos: O5 en 9, O3 en 6 y O6 para 7.

En relación con los sitios con alta carga positiva, estos se localizan en los átomos de carbono del grupo carbonilo cercanos al sistema indólico pero que no se ven afectados fuertemente por su efecto de resonancia y, además, no se ven afectados por el puente de hidrógeno intramolecular con el grupo hidroxilo. Complementariamente, los segundos átomos en orden para la carga positiva corresponden a los hidrógenos presentes en los grupos hidroxilo, además, los siguientes átomos en órdenes respectivos de carga positiva pertenecen a los átomos de hidrógeno unidos al átomo de nitrógeno en el fragmento indolilo.

Es conveniente destacar que estos hidrógenos podrían estar involucrados en los enlaces de hidrógeno con los sitios receptores de las proteínas.

#### V.4.4.3. Mapas de potencial electrostático molecular

El potencial electrostático molecular es una propiedad utilizada tanto para predecir apropiadamente la reactividad molecular y para realizar estudios biológicos de compuestos de interés<sup>179</sup>; En otros trabajos, se contempla como un indicador de las regiones de reactividad para una molécula diana, por lo tanto, se han empleado para estudiar las interacciones entre donador de electrones y aceptores de electrones; por ejemplo, un fármaco y los residuos de aminoácidos del receptor celular<sup>180</sup>.



**Figura 33.** Mapas de potencial electrostático molecular para los compuestos 6-9.

Por lo tanto, fue calculada esta propiedad para en las cuatro moléculas objetivo usando el nivel de teoría B3LYP / 6-311 ++ G (d, p), encontrándose los valores en un rango de color de +6.6 E-2 (azul profundo) a -6.6 E-2 (rojo profundo). Los mapas correspondientes se muestran en la Figura 33, representándose en color rojo los sitios nucleófilos, en color azul los sitios electrófilos y los valores del potencial se indican en los sitios de densidad de electrones más altos. Se puede ver que las distribuciones observadas evidencian, en todos los casos, una mayor

densidad electrónica localizada sobre el átomo de oxígeno de los grupos carbonílicos (rango de valores de -0.0314 a -0.0553), y una menor distribución en el oxígeno del grupo hidroxilo (valores potenciales entre - 0.0235 y -0.0342); observándose que esta disminución del potencial electrostático es consecuencia del enlace de hidrógeno intramolecular.

Referente a las deficiencias electrónicas, estas se encontraron en H-1' en la mayoría de las moléculas objetivo, el átomo de hidrógeno unido al nitrógeno en el residuo de indolilo. Es conveniente resaltar también, la presencia de otra deficiencia de densidad electrónica en H-2', esto además del hidrógeno del grupo hidroxilo, disminuyendo en ese orden los valores.

En consecuencia, es importante destacar que estos átomos podrían participar en interacciones no covalentes con algunos residuos en los receptores.

#### V.4.4.4. Predicción de propiedades toxicológicas y fisicoquímica

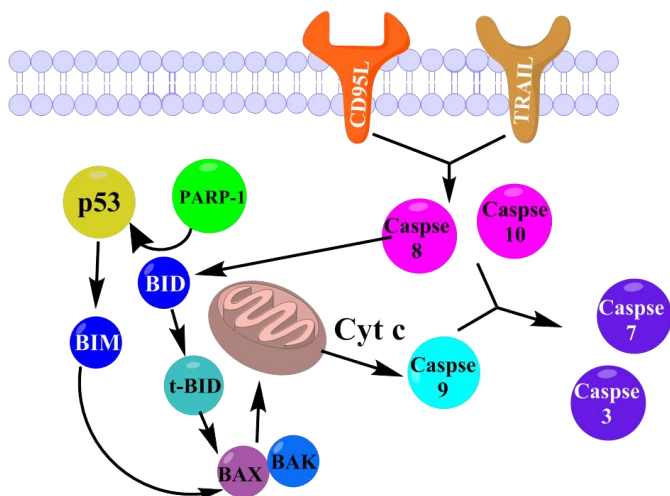
Las indolilquinonas sintetizadas presentaron un efecto citotóxico en células de cáncer de mama humano, lo que les brinda cierto potencial para su uso como fármaco; por ende se realizaron las predicciones de su riesgo toxicológico y de algunas propiedades fisicoquímicas que resultan significativa para su posible empleo futuro como fármaco. Dichas predicciones se realizaron utilizando OSIRIS-Property-Explorer<sup>160</sup>, los resultados correspondientes se resumen en la Tabla 19 presente en los anexos de este documento..

El predictor del riesgo de toxicidad muestra que los compuestos con menos probabilidad de efectos indeseables son **8** y **9**, que no presentan problemas de mutagenicidad, tumorigenicidad, efectos irritantes o reproductivos; en comparación con **6** y **7** que presentan alto riesgo de efecto irritante. Estos resultados indicaron que el riesgo se debe a la presencia de la cadena alifática, lo que explica por qué los compuestos **8** y **9** no presentan este efecto.

El puntaje de fármaco o Drug Score por su nombre en inglés (DS) es la combinación de la similitud de la molécula de estudio con un fármaco, *cLogP*, *Log S*, peso molecular y riesgos de toxicidad en un valor práctico que podría usarse para juzgar el potencial del compuesto para calificar como medicamento<sup>181</sup>. Al respecto, **9** presentó el mejor puntaje como fármaco mientras que **6** y **7** el valor menor. El menor puntaje del fármaco pronosticado para **6** y **7** fue a consecuencia de la alta probabilidad de efecto irritante en estas moléculas; sin embargo, **6** y **7** presentaron los mejores parámetros en la predicción de propiedades fisicoquímicas para el consumo como medicamento.

#### V4.4.5 Estudio de acoplamiento molecular en la vía de apoptosis

El estudio de citotoxicidad de las indolilquinonas obtenidas mostró que estas moléculas generan un efecto sobre células cancerosas; adicionalmente la morfología de las células tratadas con dichos compuestos presentó las características típicas de un proceso de apoptosis. También es conveniente resaltar que en trabajos reportados anteriormente, se muestra que la perezona y la isoperezona<sup>76</sup>, plumbagina<sup>182,183</sup> y algunas indolilquinonas<sup>184,185</sup> activan la vía de la apoptosis. Además, dichos resultados han sido adecuadamente complementados mediante los correspondientes estudios de acoplamiento molecular de la plumbagina<sup>182,186</sup> y el presentado previamente en este trabajo para la perezona e isoperezona<sup>187</sup> con proteínas implicadas en la apoptosis. En este sentido, se realizó el estudio de acoplamiento molecular de los compuestos sintetizados con proteínas participantes en la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis<sup>188-190</sup>.



**Figura 34.** Vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis. Las proteínas probadas en el proceso de acoplamiento molecular con las moléculas estudiadas son representadas en la imagen.

#### V.4.4.6. Consideraciones sobre la ruta intrínseca

Los modos de activación considerados para la vía intrínseca fueron en primer lugar la interacción de las indolilquinonas con la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP-1), que activan p53 y promueve la acción de la proteína BIM en la mitocondria. El estrés mitocondrial provoca la liberación del citocromo C y la conversión de la procaspasa 9 en caspasa 9 y, finalmente, la activación de las caspasas 3 y 7. Además, también se probó la interacción entre los ligandos **6-9** con las proteínas p53 y BIM.

Por otro lado, cuando el ligando activa la ruta apoptótica intrínseca sin interactuar con p53 se denomina ruta p53 independiente.

En el presente estudio se consideró la ruta independiente de p53, contemplando la interacción entre las moléculas diana directamente con la proteína BIM.

#### V.4.4.7. Consideraciones de la vía extrínseca

También se estudió la vía extrínseca de la interacción de los compuestos de interés con los receptores de membrana CD95L y TRAIL (Figura 34). Después de la interacción con los receptores, estos activan las caspasas 8 y 10.

Acto seguido, estas enzimas pueden activar las caspasas 7 y 3, o estimulan la conversión de BID en t-BID y esta molécula interactúa con BAX o BAK y produce estrés mitocondrial. En este sentido también se estudiaron las interacciones de las indolilquinonas con t-BID, BAX y BAK. Los resultados del estudio de acoplamiento molecular con las proteínas mencionadas se resumen en la Tabla 20.

**Tabla 19.** Valores de energía de interacción entre el ligando y la proteína (score) y la raíz cuadrada de su desviación media estándar (RMS en Å).

Proteína (PDB)	Moléculas estudiadas							
	6		7		8		9	
	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD
PARP-1 (1UKO)	-144.263	22.569	-136.380	0.702	-102.680	0.254	-103.384	0.117
p53 (2OCJ)	-115.059	5.92	-102.806	2.274	-97.960	0.212	-107.622	1.975
BID(2BID)	-157.069	0.654	-133.750	52.699	-137.550	0.16	-141.290	0.082
BIM (4YK9)	-126.480	6.99	-141.566	0.837	-100.855	0.142	-99.742	2.744
CD95L (4MSV)	-99.340	0.6789	-132.437	0.457	-105.411	0.127	-102.592	0.17
TRAIL-R2 (4I9X)	-126.081	1.342	-137.349	16.801	-101.083	7.82	-101.123	6.465
(4N90)	-140.412	1.6765	-132.437	136.013	-122.564	31.917	-121.757	0.136
t-BID (2M51)	N. A	N. A	-1790.830	0.454	-1556.770	0.389	-1552.800	0.073
BAX (1FI6)	-140.360	9.819	-138.366	0.884	-126.530	0.072	-130.975	0.08
BAK (2IMT)	-116.520	0.3111	-135.800	0.868	-95.060	2.179	-121.235	0.146

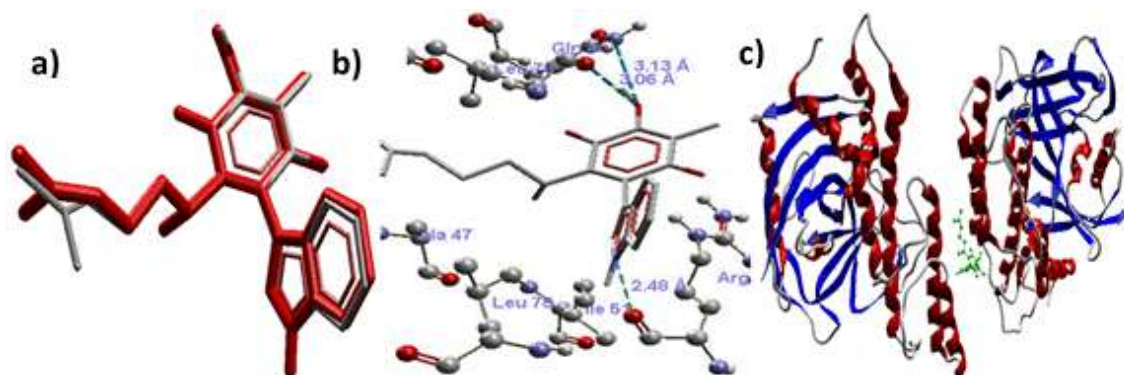
N. A= No presentó acoplamiento

#### V.4.4.8. Resultados del estudio de acoplamiento de la ruta intrínseca

Teniendo en cuenta la vía intrínseca, las moléculas **6-9** deben penetrar la membrana celular y actuar en el citosol. Los compuestos **6** y **7** presentan la mejor predicción para la penetración de membrana, considerando el cálculo de  $cLogP$  mencionado anteriormente (4.46 para ambos); Mientras tanto, **8** y **9** tendrían menor penetración y menor actividad en esta ruta ( $cLogP = 3.17$  y  $2.81$  respectivamente). En este sentido, la primera interacción sería con PARP-1, que no presenta acoplamiento con **6**, lo anterior se determina por concordancia con el valor de RMSD para esta molécula (RMSD = 22.569). Las otras tres moléculas tienen interacciones con el PARP-1; siendo la más fuerte con **7** (score = -136.380), seguido de **9** (score= -103.384) y finalmente **8** (score = -102.680). En este primer paso, el orden de la interacción está de acuerdo con los valores experimentales, ya que la molécula **7**



es la más activa y **8** es la menos activa además de presentar la menor permeabilidad predicha.



**Figura 35.** Modelo de interacción de **7** con PARP-1, código PDB (1UKO). **a)** **7** y la pose (gris) en superposición con el ligando (rojo). **b)** Interacción del compuesto **7** y PARP-1, tres enlaces H con los residuos de la proteína. **c)** Estructura secundaria, ligando (verde) en el medio de la proteína de dos isómeros.

El modelo de la interacción de **7** con los residuos de aminoácidos de PARP-1 se muestra en la Figura 35. La unión de **7** con la proteína es mediante tres puentes de hidrógeno (enlaces H), dos de estos enlaces entre el grupo hidroxilo de isoperezona con los residuos Gln44 y Leu78, el tercero entre el H-1' en el grupo indolilo y el residuo Arg74.

El primer enlace de hidrógeno en el grupo hidroxilo presenta una distancia de 3.13 Å, donde el grupo amida del residuo de glutamina es el donante y el oxígeno (átomo con la mayor carga negativa en el ligando) del grupo hidroxilo es el aceptor.

El segundo enlace de hidrógeno está entre el grupo hidroxilo de **7** como donante, mientras que el grupo carbonilo de la leucina es el aceptor y la distancia entre los átomos fue de 3.04 Å, siendo más fuerte que la interacción previamente mencionada.

Finalmente, el enlace de hidrógeno más fuerte está entre el grupo amino del indolilo como donante, que corresponde a la superficie con alta deficiencia de densidad electrónica (en el MEP) y el carbonilo del Arg46 con una distancia de 2.48 Å (Figura 35b).

La superposición del ligando (rojo) y la pose (gris) se muestra en la Figura 35a, con pequeñas diferencias en la conformación de la cadena alifática.

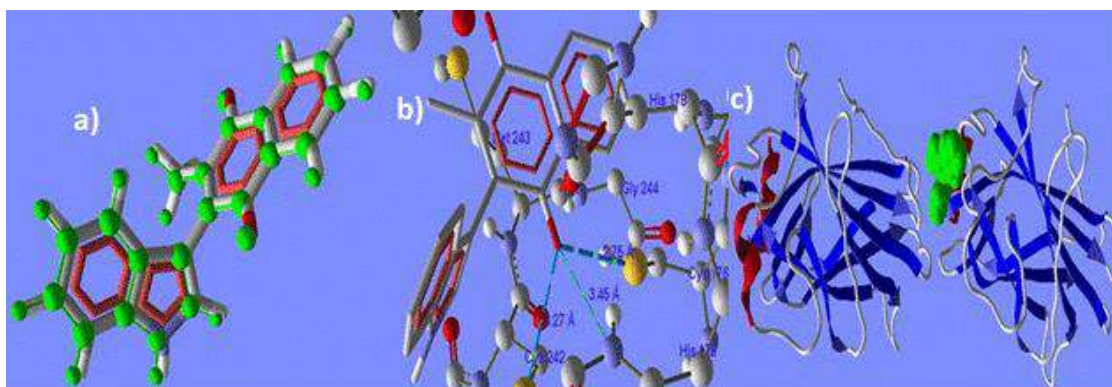
Además, los enlaces de hidrógeno y la disposición de **7** en la estructura secundaria de la proteína (1UKO) están expuestos en las Figuras 35b y 35c, respectivamente.

Por otro lado, la interacción de **9** con PARP-1 se forma solo con un puente de hidrógeno.

Este enlace se forma entre el grupo carbonilo del residuo Arg74 como aceptor y el hidrógeno del grupo hidroxilo del ligando (con alta carga positiva), además la longitud del enlace es 3.08Å, lo que indica un puente de hidrógeno fuerte y una energía de enlace de -2.5 au, que es el valor máximo para este tipo de enlaces, en el software Molegro.

Finalmente, el acoplamiento de **8** no presenta puentes de hidrógeno con PARP-1, razón por la cual el valor de energía de interacción fue la más baja de los cuatro ligandos.

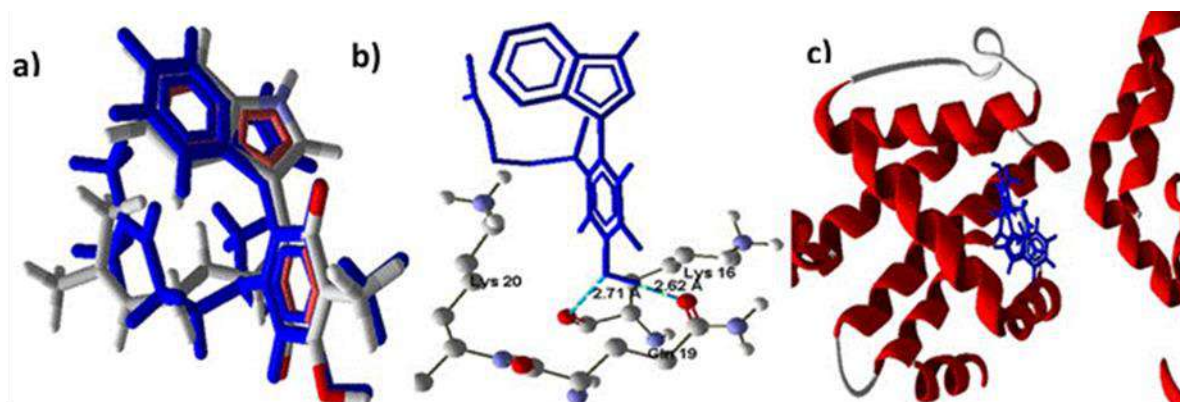
La función de PARP-1 es activar otra proteína, p53, que no presenta interacción con las moléculas **6,7 y 9**. La molécula **8** muestra valores que indicaron una interacción (score = -97.960). Este resultado indica la posibilidad de que **8** pueda activar la ruta intrínseca a través de p53.



**Figura 36.** Modelo de interacción de **8** con p53. **a)** la superposición del ligando **8** (rojo) y la postura (gris). **b)** complejo de interacción entre **8** y p53 (PDB 2OCJ), tres puentes de hidrógeno con residuos de la proteína. **c)** Estructura cuaternaria, ligando (verde) en el medio de los dos monómeros.

El acoplamiento de **8** con p53 mostró excelente superposición entre la pose y la conformación del ligando (Figura 36a). Además, se encontraron tres puentes de hidrógeno (Figura 36b), estos enlaces se encuentran entre el átomo de oxígeno (O4) del grupo carbonilo del ligando (mayor densidad electrónica en el MEP) y los residuos Cys176, Cys242 y Hys179 siendo el enlace más fuerte con Cys176 (2.51 Å y energía de enlace de -1.72 au).

Las siguientes proteínas en la cascada son los miembros de la familia llamada "BH3-only" como Bim. Esta proteína se activa en la vía intrínseca dependiente e independiente de p53. Los resultados muestran que existe interacción con los ligandos **7** y **8**, siendo **7** mayor que **8** (score de -141.566 y -100.855, respectivamente). Estos resultados continúan presentando congruencia con los experimentales, señalando que **8** tiene la menor energía de interacción con las proteínas involucradas y en consecuencia una menor citotoxicidad.



**Figura 37.** Modelo de interacción de **7** con Bim. **a)** pobre superposición del ligando (azul) y la pose (rojo). **b)** complejo formado por **7** y Bim, dos puentes de hidrógeno con residuos de proteína. **c)** Estructura cuaternaria, ligando (azul) en el medio de los dos monómeros.

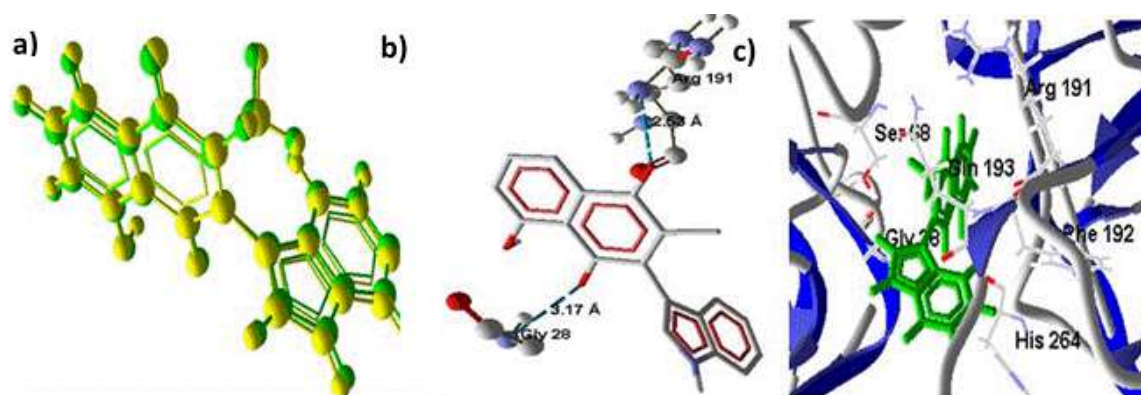
Además, los compuestos **7** y **9** no mostraron acoplamiento molecular alguno con esta proteína (valores RMSD de 6.99 y 2.744, respectivamente). El modelo de interacción de **7** (molécula de alta citotoxicidad) con la proteína Bim (Figura 37) se presentó con dos puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de **7** y los residuos Lys16 y Gln19 con distancias de 2.67 Å y 2.71 Å respectivamente.

Esta proteína es importante porque la vía intrínseca podría iniciarse en este punto, en forma independiente a p53. Además, la ruta podría activarse por los cuatro ligandos.

#### V.4.4.9 Estudio de activación de la vía extrínseca

La vía extrínseca (Figura 34) se analizó mediante la interacción de las moléculas objetivo con los receptores de membrana como CD95L (4MSV) y TRAIL-R2 en dos isoformas (4I9X y 4N90). En cuanto a CD95L, las moléculas **6-9** tienen resultados que muestran acoplamiento con estas proteínas, y mostraron la mejor interacción con **7** (score = -132.437) seguido de **8** (score= -105.411) y la interacción menor con **6** (score = -99.340). Respecto a las isoformas TRAIL-R2, la proteína 4I9X muestra acoplamiento solo con **6** (Puntuación = -126.081 y RMSD = 1.342). Sin embargo, la proteína 4N90 interactúa con **6** (Puntuación = -140.412 y RMSD = 1.677) y **9** (Puntuación = - 121.757 y RMSD = 0.136).

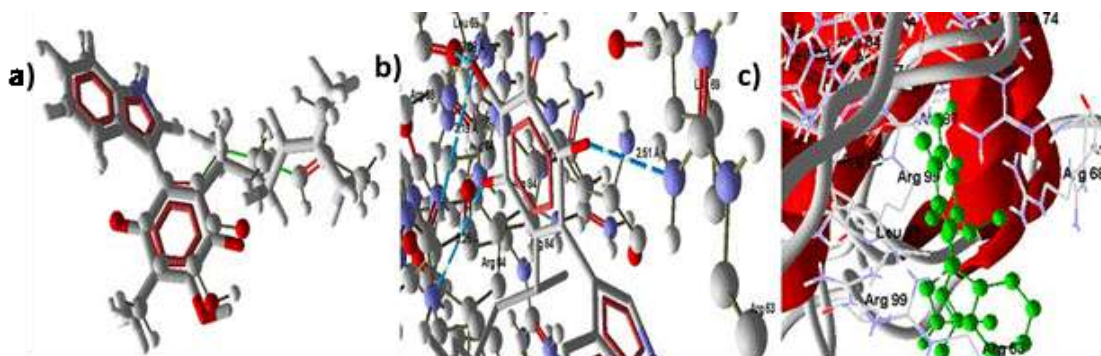
La molécula **9** forma dos enlaces de hidrógeno, el primero entre el Arg191 como donante y el átomo de oxígeno (O1) del grupo carbonilo del ligante fue el aceptor, mientras tanto se presentó un segundo enlace entre el residuo de glicina28 como donante y el átomo de oxígeno (O4) como aceptor (Figura 38).



**Figura 38.** Modelo de interacción de **9** con TRAIL-2 (isoforma 4N90). **a)** superposición del ligando (verde) y la pose (amarillo). **b)** Interacción de **9** y complejo TRAIL-2, tres enlaces H con residuos de la proteína. **c)** Estructura terciaria, ligando (verde) en medio de las dos proteínas isoméricas.

Estas observaciones están de acuerdo con los resultados de los cálculos cuánticos, ya que los aceptores del hidrógeno son los dos átomos con mayor carga negativa y densidad electrónica. Un modelo de la interacción de **8** (score = -141.290) con 4N90 se muestra en la Figura 38.

La activación de estos receptores de membrana cambia las procaspasas 8 y 10 a caspasas, lo que podría activar las caspasas 3 y 7. Estas proteínas promueven la conversión de Bid a t-Bid. El resultado indicó acoplamiento molecular de **6**, **8** y **9** con la proteína Bid, donde **6** tuvo el mejor score de -157.069 y exhibió cuatro puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo de quinona como donante. Los aceptores en los enlaces de hidrógeno son: a) el grupo amino del residuo His91 (2.77Å, energía de -1.33 au), b) el átomo de oxígeno del residuo ser119 (3.175Å, energía -2.157 au), c) el grupo amina de residuo Asp4 (3.023Å, -2.5 au) y finalmente el grupo NH de Met3 (2.732Å, -2.07 au). En este sentido, el ligando **9** muestra la interacción más baja. La unión de las moléculas con Bid podría inhibir la interacción proteína-proteína que es un proceso esencial para su función en la vía apoptótica<sup>190</sup>. Este efecto se observa con calestrol, molécula con una región similar a la presentada por las moléculas de estudio<sup>191</sup>, en este caso la actividad de la caspasa 8 sobre Bid en la ruta extrínseca puede inhibirse. Este efecto puede explicar la diferencia de citotoxicidad entre **7** (RMSD de 52.699) y el resto de las indolilquinonas evaluadas; adicionalmente, la menor citotoxicidad de **6** puede considerarse como resultado de la alta interacción con esta proteína (score = -157.069).



**Figura 39.** Modelo de interacción de **7** con t-BID. a) la superposición del ligando **7** (rojo) y su pose (gris) en el complejo con t-BID. b) complejo de interacción de **7** y t-BID, se muestran tres puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo y los residuos de la proteína. c) Estructura secundaria de la proteína y la presencia del ligando (verde) en el centro de esta.

Las moléculas **7-9** muestran una interacción con la proteína t-Bid, siendo la más fuerte con **7** (score = -1790.830). La unión de **7** con t-Bid se establece mediante cinco enlaces de hidrógeno (Figura 39), tres de ellos con el átomo de oxígeno (O4) como aceptor (alta región de densidad electrónica en el MEP) y los residuos Glu59 en tres de las cadenas isoméricas de la proteína como donantes. Además, se forman dos enlaces más con el grupo indolilo teniendo al N-H como donante (alta deficiencia de densidad electrónica en el valor MEP) con los dos residuos Glu54 de las cadenas isómeras como aceptores. La siguiente molécula en orden de afinidad con esta proteína fue el ligando **8** (score = -1556.770), mientras que el ligando **3** tiene los valores de energía de interacción más bajos.

Finalmente, la activación de t-Bid provoca la interacción con BAX (1FI6) y / o BAK (2IMT) que estimulan la liberación del citocromo c. En este punto, las moléculas sintetizadas **7-9** interactúan con BAX en orden de fortaleza, **7**(score= -138.366) tiene la interacción más grande, seguida de **9** (score= -130.975). Se propuso la interacción de **7** con esta proteína mediante la formación de tres enlaces de hidrógeno con Asp2 (3.15 Å, energía del enlace H = -2.27 au), Arg9 (3.09 Å, energía del enlace H = -2.5 au) y Met1 (3.24 Å, energía del enlace H = -0.98 au). En el caso del acoplamiento molecular con BAK, **7** también presenta la interacción más fuerte (score = -135.800) seguido de **9** (score = -121.235) y por último **6** (score = -116.52). La molécula **8** no mostró acoplamiento con esta proteína (valor RMSD de 2.179).

#### V.4.4.10. Propuestas de vías de apoptosis

Teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente, las vías propuestas fueron:

a) La molécula **7** actúa activando la vía dependiente de p53, considerando la interacción con PARP-1; esta proteína tiene una importante contribución en procesos biológicos como la transcripción y la regulación del ciclo celular, la respuesta al daño del ADN, la apoptosis y la preservación de la integridad del genoma<sup>192</sup>. Esta activación induce a las proteínas proapoptóticas BIM, que estimulan a las proteínas BAX / BAK, generando estrés mitocondrial y promoviendo

la vía apoptótica intrínseca. Además, la vía intrínseca independiente de p53 podría activarse como consecuencia de la interacción de **7** con la proteína BIM. El ligando **7** tiene la mayor permeabilidad predicha de las moléculas sintetizadas, aunque las vías de apoptosis extrínsecas también pueden iniciarse mediante el reconocimiento con el receptor de muerte FasL (CD95L) conduciendo a la muerte celular mediada por la caspasa 8. La alta citotoxicidad en las células de cáncer de mama puede atribuirse a la activación por las dos vías y las altas interacciones con las proteínas implicadas en estas rutas.

b) La siguiente molécula en orden de actividad citotóxica fue **9**, este compuesto también puede activar la vía intrínseca (dependiente e independiente de p53) y extrínseca mediante reconocimiento con CD95 y receptor de membrana TRAIL (receptores FasL). Sin embargo, esta molécula mostró una menor permeabilidad predicha, considerando como la vía más probable la extrínseca. Además, tiene la menor probabilidad de inhibir la interacción del BID con la caspasa 8. Adicionalmente, **9** presentó una interacción moderada con el resto de las proteínas estudiadas.

c) La molécula **6** puede interactuar con los receptores FasL (CD95L y TRAIL-R2), sin embargo, presentó un elevado valor de permeabilidad predicho y mostró alta afinidad con la proteína BID, esta molécula puede inhibir la interacción entre la caspasa 8 y el BID logrando suprimir la vía apoptótica extrínseca. Dado que no tiene una conformación de acoplamiento molecular con PARP-1, la vía potencial dentro de la célula es la activación de las proteínas t-Bid y BAK, considerando la afinidad moderada en comparación con las otras indolilquinonas sintetizadas.

d) Finalmente, la ruta propuesta para **8** es la activación de la vía intrínseca (dependiente e independiente de p53) y extrínseca para el reconocimiento de CD95L; sin embargo, la menor actividad citotóxica es consecuencia de la menor afinidad con las proteínas implicadas en la apoptosis, además de la baja reactividad de esta molécula.

#### V.4.4.11. Predicción de propiedades farmacológicas y metabólicas

Algunos resultados complementarios e interesantes, considerando el uso potencial de las moléculas estudiadas como fármaco, son la predicción de sus propiedades de absorción, metabólicas y de excreción de las moléculas estudiadas en humanos. En este sentido se estudió el comportamiento en diferentes modelos de absorción y modelos de excreción utilizando la metodología ADMETSAR, siendo los resultados mostrados en la Tabla 21.

**Tabla 20.** Predicción de la absorción de las indolilquinonas **6-9** en diferentes modelos.

Modelo de absorción	Moléculas evaluadas							
	6		7		8		9	
	Resultado	P	Resultado	P	Resultado	P	Resultado	P
<b>Barrera hematoencefálica</b>	BBB+	0.650	BBB+	0.556	BBB+	0.872	BBB-	0.570
<b>Absorción intestinal humana</b>	HIA+	1	HIA+	1	HIA+	1	HIA+	1
<b>Permeabilidad Caco-2</b>	Caco2+	0.500	Caco2+	0.507	Caco2+	0.646	Caco2+	0.527
<b>Sustrato de la glicoproteína P</b>	S	0.722	S	0.692	NS	0.511	S	0.620
<b>Inhibidor de la glicoproteína P</b>	I	0.536	I	0.604	I	0.742	NI	0.818
	I	0.946	I	0.946	NI	0.711	NI	0.897
<b>Transportador renal de cationes orgánicos</b>	NI	0.769	NI	0.793	NI	0.746	NI	0.897

**6:** indolilperezona, **7:** indolilisoperezona, **8:** indolilmenadiona, **9:** indolilplumbagina. + = positivo a la absorción, - = negativo a la absorción, S = sustrato, I = inhibidor, NI = no inhibidor NS = no sustrato, P = probabilidad.

Las predicciones propuestas para **6-9** revelan absorción intestinal humana con un valor de probabilidad de 1 en cada caso. Con respecto a la barrera hematoencefálica, los compuestos **6-8** muestran valores de probabilidad de absorción, siendo el ligando con mayor probabilidad **8** (0.872). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos con OSIRIS, que indicaron la menor solubilidad en agua de **8**(valor *Log S* de -4.46) en comparación con las otras moléculas analizadas;



Además, **8** es el compuesto menos polar, ya que la estructura no contiene grupos hidroxilo. Un modelo considerado como el "estándar de oro" para la permeabilidad del fármaco es el cultivo de células monocapa de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) y es usado ampliamente en el descubrimiento de fármacos y ha sido recomendado por la FDA <sup>193-195</sup>, en este sentido, la predicción para las moléculas objetivo muestra permeabilidad en todos los casos.

Con respecto a las glicoproteínas P, esta molécula es uno de los mayores transportadores ABC, distribuidas en varios tejidos e involucradas en la eliminación de xenotoxinas contra gradientes de concentración pronunciados; lo anterior a expensas de la hidrólisis de ATP. Además, las glicoproteínas P juegan un papel importante en el transporte de pequeñas moléculas en áreas vitales. Asimismo, esta proteína está presente en las células cancerosas de resistencia a múltiples fármacos y su inhibición puede usarse para superar este tipo de resistencia<sup>196,197</sup>. En este sentido, las moléculas **6,7** y **9** mostraron la posibilidad de ser un buen sustrato cuando se usan con esas proteínas.

En relación con el ligando **8**, que no resultó ser sustrato, su biodisponibilidad puede ser menor en comparación con las otras moléculas estudiadas, lo que limita su actividad biológica y es coherente con los resultados experimentales. El comportamiento como no sustrato de **8** está relacionado con el cumplimiento de la "Regla de cuatro", que señala que compuestos con menos de 400 Da de peso molecular, no más de cuatro átomos de nitrógeno y / u oxígeno y una base con pKa menor a 8 resultará ser un no-sustrato<sup>198</sup>. La predicción del carácter inhibitorio de las indolilquinonas **6-9** sobre la P-glicoproteína I y II indicó que **6** y **7** son inhibidores de estas proteínas, mientras que **8** solo actúan como inhibidor en la glicoproteína I. En el caso de **9** no presentó carácter inhibitorio en las glicoproteínas P. Finalmente, ninguna de las moléculas presentó efecto inhibitorio sobre el transportador de catión orgánico renal.

Otros resultados interesantes fueron la predicción del metabolismo de las indolilquinonas utilizando la metodología de Admetsat y metaprint2D-react (Tabla

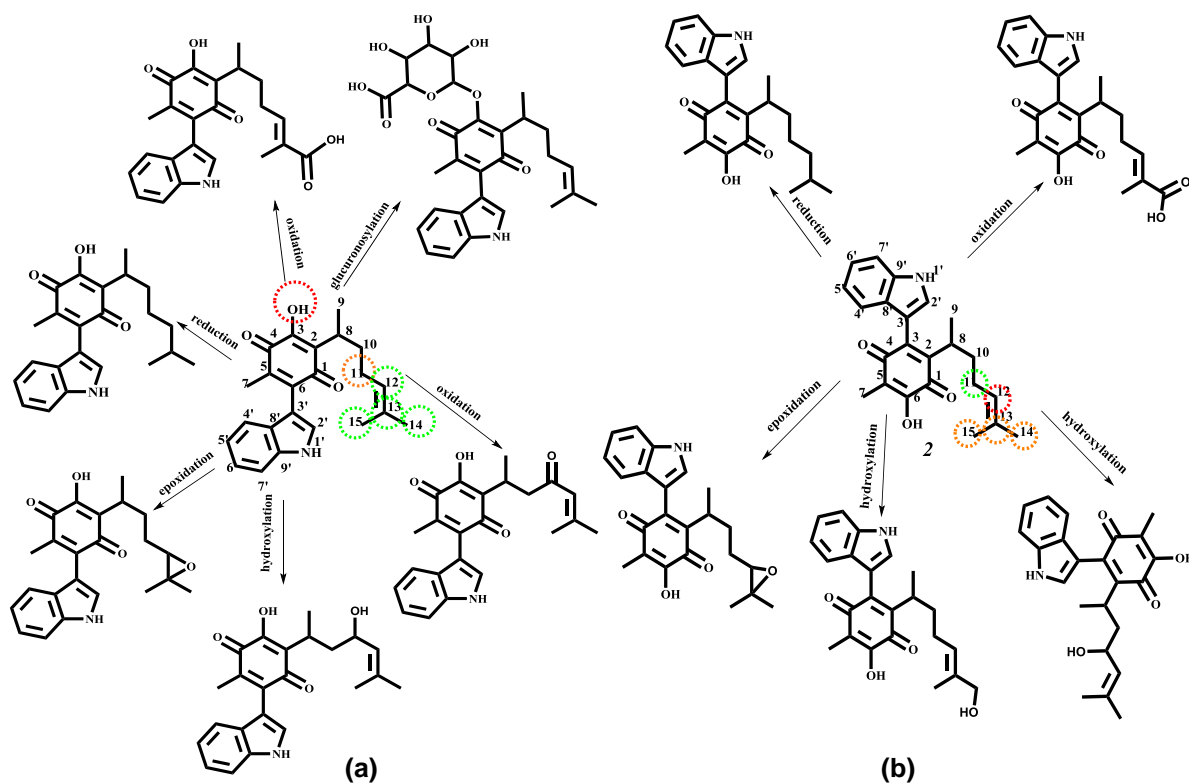
22 presente en el área de anexos ). En primer lugar, se evaluó el comportamiento como sustrato o inhibidor de las moléculas sintetizadas en las isoformas más importantes de los citocromos P450, participantes del metabolismo de fármacos terapéuticos. Durante la biotransformación de los fármacos, las moléculas se descomponen y / o los convierten en moléculas más solubles, que desempeñan un papel importante en la acción farmacocinética y terapéutica de los fármacos.

La evaluación de las moléculas objetivo como sustratos de CYP (citocromo P450 por su abreviación en inglés), muestra que **6-9** actúan como no sustratos de las isoformas 2C9 y 2D6 del citocromo P450. Los resultados obtenidos para estos citocromos se pueden explicar considerando la estructura que presentan generalmente sus sustratos; en el caso de los sustratos CYP2C9 poseen propiedades débilmente ácidas y múltiples anillos aromáticos<sup>199</sup>. Las moléculas **6**, **7** y **9** presentan un grupo hidroxilo débilmente ácido, sin embargo, no presentan múltiples anillos aromáticos, mientras que **8** no presentan ninguna de las dos características. Considerando al CYP 2D6, la característica principal de sus sustratos es la presencia de un átomo de nitrógeno básico colocado a 5 Å o 7 Å del sitio de oxidación<sup>200,201</sup>. Las estructuras de **6-9** tiene un átomo de nitrógeno en el fragmento indolilo; sin embargo, el par electrónico no compartido no está disponible por efecto de resonancia, también la distancia entre el nitrógeno y el grupo aromático en **8** y **9** o el enlace doble C14-C15 en **6** y **7** se colocan a una distancia diferente de 5 Å o 7 Å, según los resultados del estudio cuántico. La predicción del comportamiento del sustrato en el CYP3A4 indicó que solo **6** y **7** podrían ser sustratos, ya que estas moléculas cumplen la característica del modelo de farmacóforo para este citocromo. Las moléculas **6** y **7** presentan, considerando el MEP y la carga, dos aceptores de enlace de hidrógeno (O1 y O4), un donador de enlace de hidrógeno (OH-3, OH-6 o NH) y una región hidrófoba (cadena alifática para C8 a C15), (*vide supra*). Además, una propiedad metabólica importante a considerar es la capacidad de estos compuestos para inhibir las isoformas de CYP, que es un efecto secundario adverso.

La predicción del efecto del ligando en CYP1A2 muestra el efecto inhibitorio de **6-9**, este resultado podría explicarse considerando la similitud entre los sustratos (compuestos heterocíclicos polares y arilaminas) del citocromo 1A2<sup>202,203</sup> con el motivo indolilo de las moléculas estudiadas. Otra isoforma de CYP inhibida con **6-9** es la CYP2C9, de acuerdo con el resultado obtenido en el comportamiento del sustrato. De la misma manera, **8 y 9** muestran un efecto inhibitorio sobre CYP2C19. Por otro lado, los compuestos **6-9** no mostraron efecto inhibitorio sobre CYP2D6 y CYP3A4.

#### V.4.12. Metabolismo de las indolilquinonas 6-9 de las Fases I y II humanas

Finalmente, se realizó el estudio de la posible forma de degradación de **6-9** en el metabolismo de la fase I y II, utilizando el programa metaprint2D<sup>194,204</sup>. Los resultados se muestran en la Figura 40 para **6 y 7**. Mientras tanto, la ruta del metabolismo **8 y 9** se muestra en la Figura 41. La molécula **8** corresponde al compuesto menos reactivo, y esto se refleja en el número de metabolitos predichos.



**Figura 40.** Predicción del metabolismo para: **a)** indolilperezona, **b)** indolisoperezona.

El color que resalta a un átomo indica su proporción de ocurrencia normalizada (NOR por sus siglas en inglés), Figuras 40 y 41.

Una NOR alta indica un sitio o metabolito reportado con mayor frecuencia en la base de datos de metabolitos del programa.

El color rojo indica valores altos de NOR (de 0.66 a 1), el color naranja designa valores entre 0.33 y 0.66, el color verde indica un rango de valores NOR de 0.15 a 0.33, color blanco, valores de rango de 0.00 a 0.15 y el gris denota falta de datos.

El NOR alto en **6** se muestra en el grupo hidroxilo, lo que indica una posible glucoronidación que aumenta la solubilidad y la excreción del compuesto.

El compuesto **7** revela metabolitos similares en comparación con **6**. Sin embargo, la glucoronidación y la oxidación a la cetona en C-11 no se muestran. En cambio, se predice la hidroxilación alílica en C14 o C15.

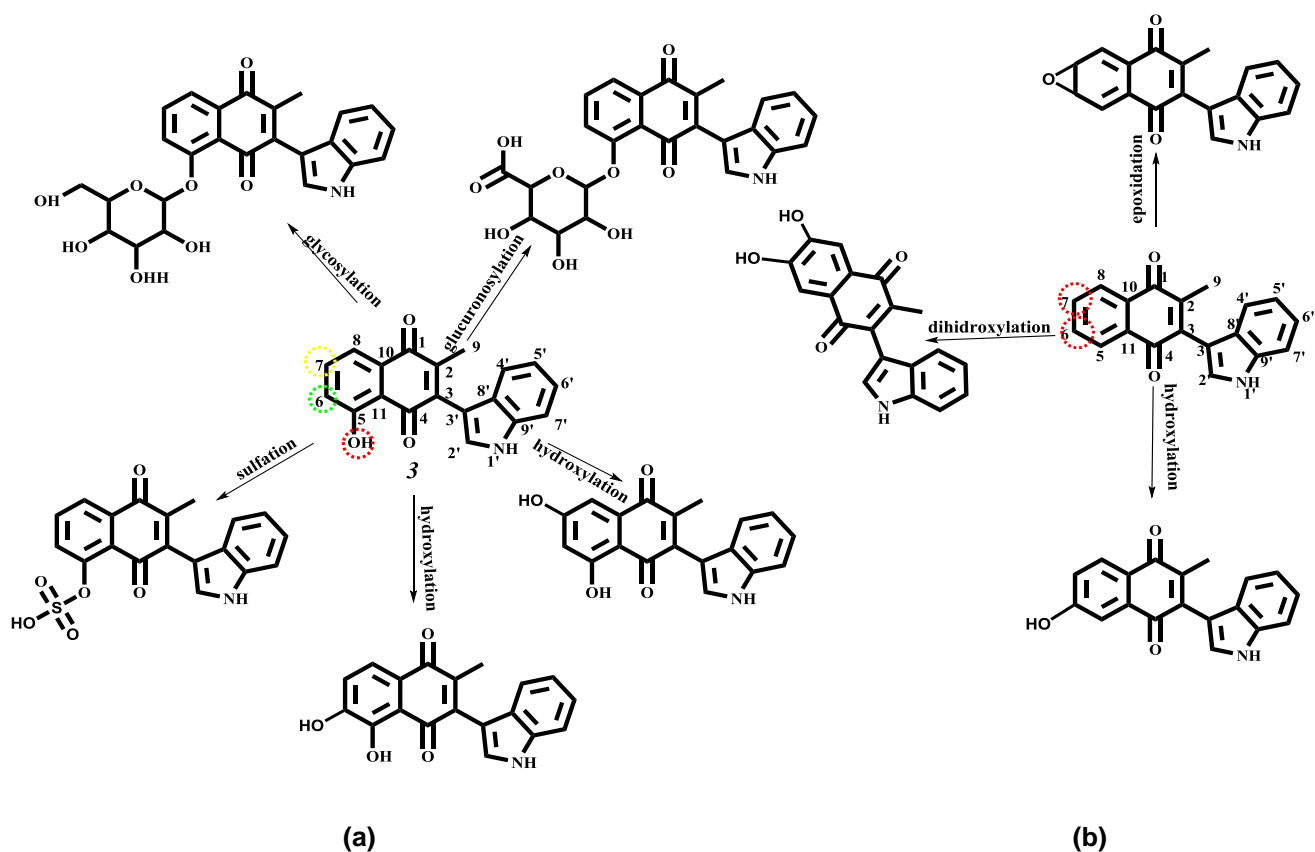
La posición C-11, presenta el siguiente valor NOR, donde se propone una hidroxilación y oxidación sobre este carbono, produciendo alcohol alílico o cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

Además, la transformación del doble enlace y la oxidación de los carbonos C14-C15 tiene el valor NOR más bajo.

Los posibles metabolitos producidos son el epóxido en C12-C13, la reducción de C12-13 y la oxidación a ácido carboxílico en C14-C15.

Con respecto al metabolismo **8** y **9**, dado que el primero tiene un grupo hidroxilo (el grupo con alto valor NOR), esta molécula puede conjugarse con ácido glucorónico o algunos glucósidos para aumentar la solubilidad y la excreción del compuesto; también se predice la sulfatación del hidroxilo. La reacción del metabolismo en los sistemas aromáticos de **8** y **9** es la hidroxilación produciendo

los compuestos dihidroxilados; adicionalmente en **8** se propone un epóxido en C6-C7.



**Figura 41.** Predicción del metabolismo para: a) indolilplumbagina b) indolilmenadiona

Los presentes resultados mostrados permiten además cumplir con el objetivo VI del presente trabajo, en relación con la síntesis de derivados indólicos de la perezona e isoperezona por una estrategia verde; así mismo se contribuye al objetivo XI mediante el estudio teórico-computacional realizado.

## **V.5. Acercamiento verde a la síntesis de derivados de perezona e isoperezona por oxidación del doble enlace C12-C13.**

La perezona y la isoperezona son moléculas de interés sintético debido a sus propiedades farmacológicas y su posible uso para la generación de moléculas biológicamente activas.

Tal como se señaló en el apartado **V.3**, la perezona presenta acoplamiento con las caspasas, moléculas encargadas de la muerte celular programada.

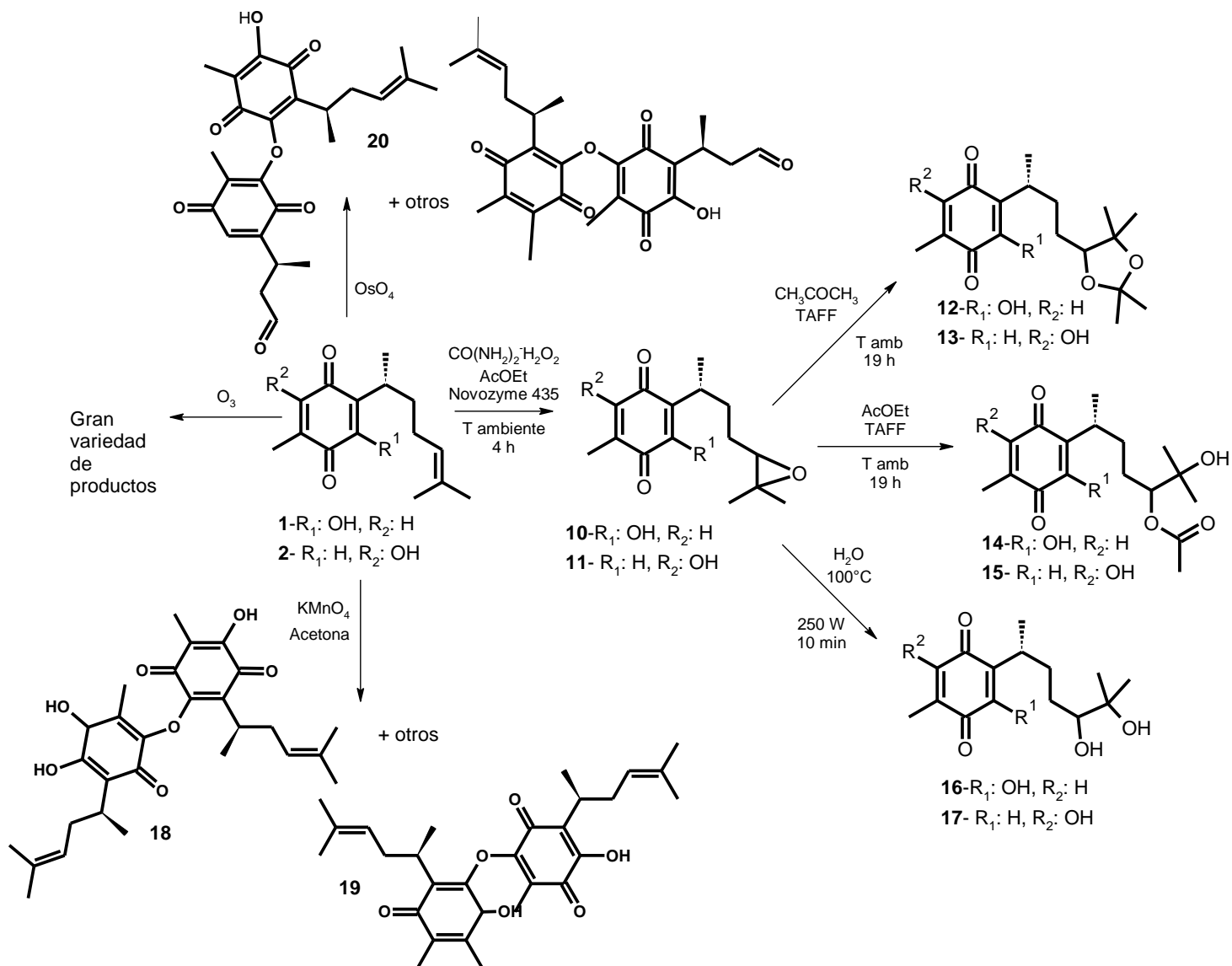
Así mismo los estudios quimio-informáticos señalaron que las quinonas **1** y **2** presentan solamente riesgo toxicológico a generar irritación, la cual se atribuye a la presencia del doble enlace en C12-C13. Este indicador, permite establecer como blanco para modificación dicho doble enlace.

Consecuentemente, en esta parte de la tesis se describen una gama amplia de resultados inherentes a la oxidación del doble enlace C-C presente en **1** y **2**, los cuales implican: reacciones oxidativas, la caracterización por sus propiedades física, espectroscópica, fisicoquímica y mediante estudios computacionales de los productos obtenidos; además de sus correspondientes estudios apoptóticos con una explicación adecuada de su actividad mediante análisis propios de la química computacional.

Se hace obligado y apropiado mencionar, que esta parte del trabajo de tesis se planteó como objetivo principal para que los productos formados (derivados en C12-C13) establezcan una mayor interacción con los residuos en las caspasas y en consecuencia se pueda incrementar en las moléculas originales el efecto citotóxico en células de cáncer.

La serie de reacciones realizadas, se presentan de manera resumida en el Esquema 8; al respecto de lo anterior, las discusiones correspondientes se presentan divididas en dos bloques generales: **V.5.1.a** y **V.5.1.b**, involucrando

condiciones de química clásica (café) y las otras en el contexto del Protocolo de la Química Verde, de manera respectiva.



Esquema 8. Reacciones de oxidación efectuadas en 1 y 2.

### V.5.1.a. Oxidaciones clásicas sobre el enlace C12-C13 de la perezona e isoperezona

Inicialmente se abordó un estudio para llevar a cabo la oxidación, del doble enlace objetivo, con agentes oxidantes convencionales, pretendiéndose generar el

correspondiente diol de perezona e isoperezona: empleo de  $\text{KMnO}_4$  con diferentes condiciones de reacción según lo reportado en la literatura<sup>205-210</sup>.

En general las reacciones solo permitieron la generación de los productos (**18 y 19**) con rendimientos muy bajos, máximo 5 %. Asimismo, se realizaron algunas pruebas de oxidación con  $\text{OsO}_4$ , para la formación de los dioles, pero, los resultados no fueron los deseados (**20**), solo trazas de los productos de oxidación<sup>211-214</sup>.

Sin embargo, es importante hacer de conocimiento que no se profundizó en reacciones de este tipo, por implicar reactivos tóxicos y dañinos al ambiente, pero sobre todo porque el objetivo-global-general de esta tesis, señala el empleo de condiciones dentro del contexto de la química verde.

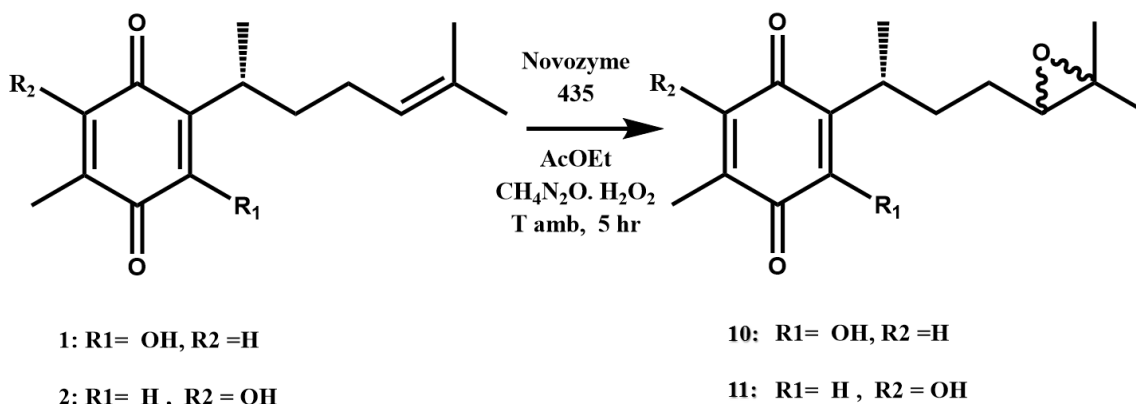
Por otro lado, es conveniente resaltar que también se realizaron múltiples intentos de oxidación del doble enlace mediante ozonólisis, para generar grupo carbonilo de aldehído, mediante el cual se podrían promover una gama amplia de moléculas híbridas; desafortunadamente los resultados fueron desastrosos, un número muy amplio de productos visualizados por *ccf*.

#### ***V.5.1.b. Oxidaciones-verdes, para C12-C13 en perezona e isoperezona***

Recurriendo a la filosofía de la Química Verde, se planteó y procedió llevar a cabo la oxidación del doble enlace en C12-C13, empleando para tal efecto reacciones más amigables con el ambiente.

Así, en primera instancia, se procedió a obtener el epóxido de **1** y **2** mediante una reacción biocatalizada, utilizando como agente a la lipasa *B de Cándida antártica* (Novozyme® 435)<sup>66,67,215-217</sup>, Esquema 9. Al respecto se generó el compuesto **10**, el cual se obtiene como un sólido amorfo de color amarillo con un punto de fusión de 78-80 °C, con un rendimiento del 85.50%; a su vez, el producto **11** se formó como un sólido de color amarillo amorfo, con punto de fusión de 84-86 °C y con un rendimiento de 65.36 %.





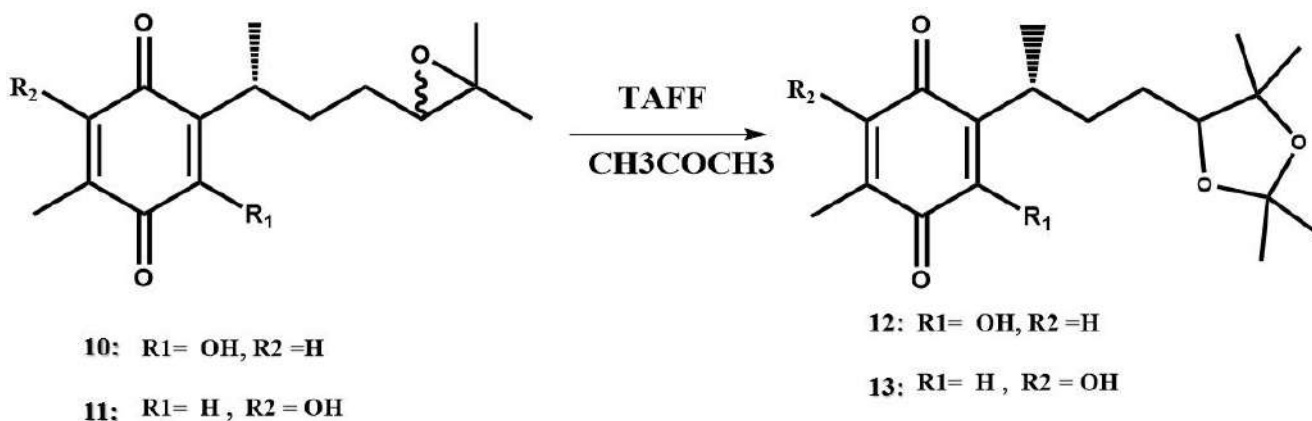
**Esquema 9.** Obtención de los epóxidos **10** y **11**.

La lipasa Novozym® 435 es la enzima inmovilizada más popular que se emplea en el ámbito sintético para efectuar reacciones de peroxidación<sup>56,57,60,66,218–220</sup>, esto como resultado de su estabilidad en una amplia gama de disolventes orgánicos, además de la variedad de ácidos carboxílicos y ésteres sobre los cuales puede actuar.

El mecanismo de acción del enzima ha sido descrito como una perhidrólisis del acetato de etilo en presencia de hidroperóxido de urea, a fin de generar *in situ* el ácido peroxiacético.

Una vez que se ha generado el ácido peroxicarboxílico, este reacciona con el doble enlace de los compuestos **1** y **2** mediante un mecanismo típico de cicloadición, en el cual se observa una adición *syn* del oxígeno del ácido peroxicarboxílico al doble enlace, este hecho se basa en la epoxidación de alquenos aislados por peroxiácidos, reacción de Prilezhaev<sup>221</sup>; esta implica un proceso concertado en donde generalmente se obtienen mezclas racémicas.

La reacción toma lugar en el átomo de oxígeno terminal del peroxiácido, en donde el HOMO  $\pi$  de la olefina se acerca al LUMO  $\sigma^*$  del enlace O-O en un ángulo de  $180^\circ$  generando un estado de transición conocido como mariposa<sup>222,223</sup>; finalizando en la formación de los compuestos **10** y **11** respectivamente.



**Esquema 10.** Obtención de los acetónidos **12** y **13**

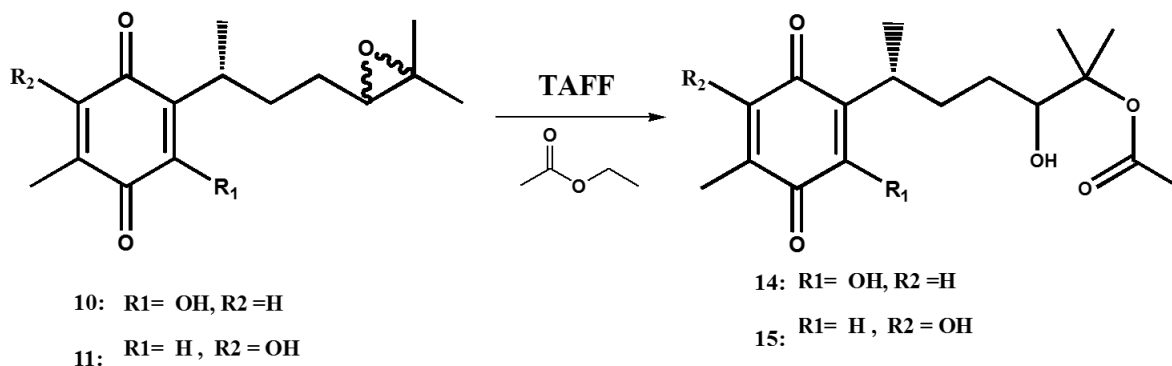
En seguimiento al objetivo establecido de generar los dioles correspondientes, se buscó llevar a cabo la apertura de los epóxidos mediante una estrategia verde, para lo cual se recurrió a probar el uso de una arcilla bentónica como catalizador, según es reportado en la literatura<sup>45,224</sup>.

Con base a lo antes dicho, se hicieron reaccionar catalíticamente los epóxidos obtenidos con TAFF, una arcilla bentónica, usando como disolvente acetona, resultando mediante esta estrategia los correspondientes acetónidos, según se muestra en el Esquema 10; al respecto, **12** se obtuvo como un sólido amorfo de color amarillo con un punto de fusión de 74-75 °C y un rendimiento del 50.19%, mientras que **13** se presenta como un sólido de color amarillo amorfo con un punto de fusión de 102-103°C y un rendimiento de 77.43%.

La producción de los acetónidos en lugar de los dioles puede ser explicado considerando el efecto catalítico que tiene la arcilla. Según la literatura, la apertura del anillo del epóxido se debe a una interacción entre el oxígeno como base de Lewis y los sitios ácidos de Lewis o de Brønsted-Lowry de la arcilla, para posteriormente sufrir un ataque tipo SN1 por parte del agua retenida en la arcilla y generar el diol<sup>47,224</sup>.

Sin embargo, dado que el disolvente empleado también puede interactuar con la arcilla bentónica por reacción ácido-base de Lewis entre el oxígeno del grupo carbonilo de la acetona y los sitios aluminio-silicato, activando el grupo carbonilo. En

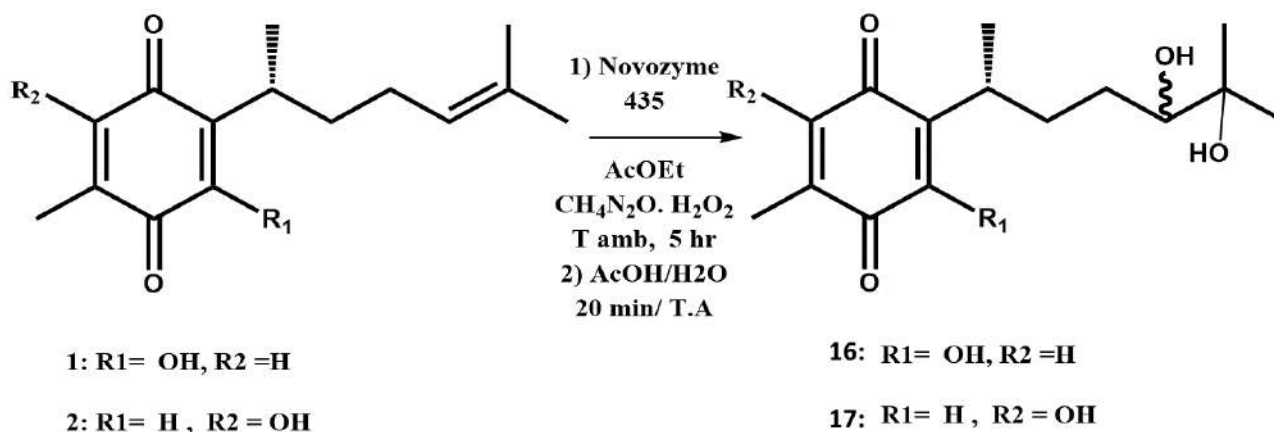
este sentido, también es conocido que los dioles en presencia de compuestos carbonílicos, catalizados por ácidos de Brønsted-Lowry o de Lewis pueden sufrir una reacción de condensación generando acetónidos, vía el disolvente<sup>43,225–227</sup>.



**Esquema 11.** Obtención de los dioles monoacetilados **14** y **15**.

Por otro lado, para evitar la formación de los acetónidos y generar el diol correspondiente, se probó llevar a cabo la reacción de apertura del epóxido empleando TAFF, como catalizador y realizando un cambio de disolvente, utilizando en esta ocasión acetato de etilo anhidro, en mínima cantidad, según el **Esquema 11**.

Es adecuado mencionar que el proceso de obtención del diol ocurre de la misma forma como se desarrolló en la reacción anterior; sin embargo, al igual que con la acetona no se obtuvieron los dioles, en esta ocasión solo un grupo hidroxilo se encuentra libre y el otro presentó una reacción de transésterificación con el AcOEt, lo cual es posible explicar mediante la actividad que presenta la arcilla bentónica como ácido de Brønsted-Lowry<sup>228,229</sup> favoreciendo un proceso de SN<sub>2</sub>T (sustitución nucleofílica con intermediario tetraédrico);<sup>230,231</sup> generando como productos los dioles mono-acetilados en rendimientos bajos, **14** resulto ser un aceite de color rojo, que se obtuvo con un rendimiento del 34.65 % y **15** el cual es un sólido de color amarillo amorfo con un punto de fusión de 110-112 °C y un rendimiento de 28.01%.



**Esquema 12.** Apertura “*telescope*” de **6** y **7**, una estrategia verde.

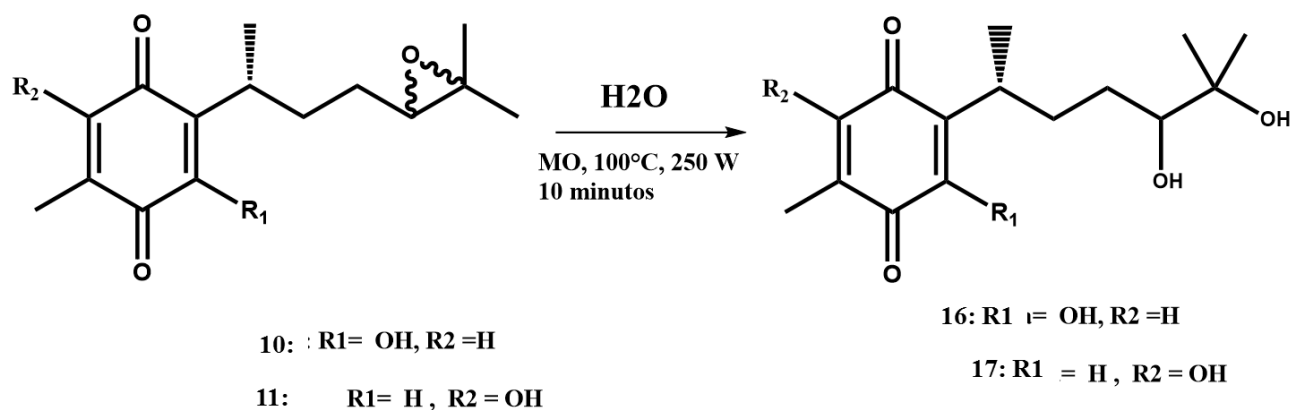
Las estrategias antes comentadas permitieron, como ya se mencionó, el origen de cuatro compuestos nuevos; estos, sin embargo, no son los originalmente deseados, redirigiéndose la estrategia hacia una hidrólisis “*telescope*” Esquema 12.

La reacción anterior dio como resultado los dioles **16** y **17**; el primero es un aceite morado, mientras el segundo es un sólido amorfo de color amarillo, presentando un punto de fusión de 112-114°C, ambos con rendimientos del orden de 50%.

La caracterización de los productos se efectuó en primer término usando espectrometría de masas, tanto por impacto electrónico y alta resolución, complementándose mediante resonancia magnética nuclear protón.

Teniendo en cuenta que a pesar de haberse logrado el objetivo de la síntesis de los dioles de los sustratos **1** y **2**, a partir de los epóxidos mediante una estrategia de hidrólisis ácida usando agua-ácido acético, esta estrategia presentaba rendimientos moderados y problemáticas durante la purificación, por la presencia de residuos de ácido acético. Por lo cual, buscando mejorar su rendimiento, se probaron algunas estrategias nuevas para su transformación tal y como se describe en el Esquema 13.

La segunda estrategia consistió en el uso de agua destilada y la activación mediante microondas a 100°C y 250 W por 10 minutos, siendo estas últimas las condiciones con mejores rendimientos. Se observó además que el aumentar el tiempo de explosión no variaba de manera significativa los rendimientos. Dicho proceso conlleva una hidrólisis no catalizada y que permitió la obtención de los productos en rendimientos del 80% en ambos casos.



**Esquema 13.** Hidrólisis de los epóxidos promovida por microondas.

### V.5.2. Caracterización espectroscópica de los productos de oxidación C12-C13.

Las moléculas sintetizadas **10-17**, son compuestos nuevos por lo cual fue necesario realizar una adecuada caracterización estructural mediante técnicas espectroscópicas. Al respecto es importante comentar que, los datos obtenidos a partir de las propiedades físicas y espectroscópicas para las moléculas de estudio fueron debidamente correlacionados con **1** y **2**<sup>85,96,232</sup>.

La caracterización se efectuó primeramente mediante la obtención de los respectivos espectros de masas adquiridos a baja resolución mediante ionización por impacto electrónico (IE); y una vez confirmada la presencia de los iones moleculares esperados ( $M^+$ ) se consideró pertinente obtener los mismos datos, pero por ionización electrónica con alta resolución (HRMS-EI), y de esta forma obtener su composición elemental.

Tabla 21: EMIE y HRMS-IE, de los productos 10-17

Molécula	Espectrometría de masas						
	Baja resolución			Alta resolución			
	Ion molecular <i>m/z</i> (% ar)	Pico base <i>m/z</i> (100%) [Asign.]	Otros fragmentos <i>m/z</i> (% ar) [Asign.]	Compos. Elemental	Masa calculada (Da)	Masa encontrada (Da)	error (ppm)
10	264(12)	167(100) [M-97] <sup>+</sup>	206(80) [M-58] <sup>+</sup> , 191(57)[M-19] <sup>+</sup> , 177(58)[M-87] <sup>+</sup> , 166(35)[M-98] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264.1364	264.1355	-2.9
11	264(20)	167(100) [M-97] <sup>+</sup>	247(19) [M-17] <sup>+</sup> , 193(17) [M-71] <sup>+</sup> , 138(8) [M-126] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264.1362	264.1371	+3.7
12	322 (n.o)	307(100) [M-15] <sup>+</sup>	265(80) [M-57] <sup>+</sup> , 247(58) [M-75] <sup>+</sup> , 206(75) [M-116] <sup>+</sup> , 177(66) [M-145] <sup>+</sup> , 167(58) [M-155] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> O <sub>5</sub>	307.1539	307.1545	-2.0
13	322 (n.o)	307(100) [M-15] <sup>+</sup>	265(41) [M-57] <sup>+</sup> , 247(6) [M-75] <sup>+</sup> , 206(32) [M-116] <sup>+</sup> , 194(66) [M-131] <sup>+</sup> , 167(27) [M-155] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> O <sub>5</sub>	307.1545	307.1545	-2.0
14	324(1)	224(100) [M-100] <sup>+</sup>	309(2) [M-15] <sup>+</sup> , 296(4) [M-28] <sup>+</sup> , 278(8) [M-46] <sup>+</sup> , 264(7) [M-60] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	324.1573	324.1601	+8.8

Tabla 23: Continuación...

Espectrometría de masas							
Molécula	Baja resolución			Alta resolución			
	Ion molecular <i>m/z</i> (% ar)	Pico base <i>m/z</i> (100%) [Asign.]	Otros fragmentos <i>m/z</i> (% ar) [Asign.]	Compos. Elemental	Masa calculada (Da)	Masa encontrada (Da)	error (ppm)
15	324(1)	224(100) [M-100] <sup>+•</sup>	306(26) [M-18] <sup>+•</sup> , 264(30) [M-60] <sup>+•</sup> , 236(5)[M-28] <sup>+•</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	324.1573	324.1601	+6.3
16	282(3)	167(100) [M-115] <sup>+</sup>	264(7) [M-18] <sup>+•</sup> , 224(12) [M-58] <sup>+•</sup> , 206(10)[M-76] <sup>+•</sup> ,185 (28) [M-97] <sup>+</sup> , 166 (15) [M-116] <sup>+•</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	282.1467	282.1472	+1.6
17	282 (5)	167(100) [M-115] <sup>+</sup>	264(10) [M-18] <sup>+•</sup> , 224(22) [M-58] <sup>+•</sup> , 206(13) [M-76] <sup>+•</sup> ,193 (17) [M-89] <sup>+</sup> , 166 (20) [M-116] <sup>+•</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	282.1467	282.1444	-8.2

Los resultados adquiridos por espectrometría de masas se encuentran resumidos en la Tabla 23. Respecto a la molécula **10**, se presenta en el espectro de IE, el pico relación *m/z* 264(12)M<sup>+•</sup> el cual se confirmó por sus datos de HRMS-EI: calculado 264.1356 Da, experimental 264.1362 Da datos consistentes para C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>, también es posible apreciar el ion *m/z* 206(80)[M-58]<sup>+•</sup> que se propone para el fragmento resultante de la pérdida de CO y dos metilos ( una molécula de

acetona) y finalmente resulta apropiado mencionar que los iones-fragmentos  $m/z$  191(57)[M-19]<sup>+</sup>,  $m/z$  177(58)[M-87]<sup>+</sup>, el pico base  $m/z$  167(100)[M-97]<sup>+</sup> y por último el fragmento de relación  $m/z$  166(35)[M-98]<sup>+</sup> son consistentes con huellas-másicas de perezona en acuerdo a la literatura<sup>233</sup>.

En el caso de **11**, en el espectro de masas se presenta su M<sup>+</sup> en  $m/z$  264(20) corroborado mediante alta resolución: calculado 264.1356 Da/experimental 264.1362 Da, información congruente para C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>, complementariamente se observan picos en congruencia con la estructura esperada:  $m/z$  247(19)[M-17]<sup>+</sup> que corresponde a la pérdida del grupo OH; asimismo  $m/z$  193(17)[M-71]<sup>+</sup> que corresponde a la pérdida del fragmento C<sub>4</sub>H<sub>7</sub> de la cadena lateral; finalmente, los iones  $m/z$  167(99)[M-97]<sup>+</sup> y  $m/z$  138(8)[M-126]<sup>+</sup>, huellas-másicas de la isoperezona<sup>233</sup>.

Acto seguido a la caracterización por espectrometría de masas, se presentan como ejemplos de discusión dos casos de moléculas, sobre la caracterización mediante RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C; asimismo los datos totales se presentan de manera resumida en las Tabla 24 respectivamente para los productos relacionados con las oxidaciones en C12-C13.

En relación con la resonancia magnética de hidrógeno, los epóxidos **10** y **11** mostraron un cambio significativo para el desplazamiento químico de H-12 con respecto a **1** y **2**, señal originalmente a campo más bajo ≈5 ppm, hacia campo más alto ≈2.70 ppm, región correspondiente a los hidrógenos de carbonos unidos a oxígenos de éter. El resto de las multiplicidades y de los desplazamientos químicos se mantuvieron en el mismo rango que las quinonas **1** y **2**.

En el caso de los acetónidos **12** y **13**, H-12 se desplaza a campo más bajo, 3.6 ppm, en comparación a sus epóxidos predecesores (**10** y **11**), 2.7 ppm, a consecuencia de un mayor efecto de desprotección por la presencia de dos oxígenos, uno en C-12 y otro en C-13, presentándose como señal triple; así mismo dos señales aparecen a campo alto, 1.30- 1.24 ppm, en ambos acetónidos, las cuales son atribuidas a los grupos metilos de los acetónidos formados.



**Tabla 22.** RMN protónica para **10-17** ppm ( $\delta$ ), multiplicidad (M), integración y asignaciones de las moléculas objetivo para resonancia de  $^1\text{H}$

$\delta$ (ppm), M				
$^1\text{H}$	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>16</b>
<b>6</b>	6.5, s,1H	6.47,s,1H	6.48, s,1H	6.49,s,1H
<b>7</b>	2.047,s, 3H	2.1,s,3H	2.06,s,3H	2.10,s,3H
<b>8</b>	3.10,m,1H	3.09,m,1H	3.05, m,1H	3.07,m,1H
<b>9</b>	1.30, d, 3H	0.96,d,3H	1.20, d, 3H	1.13,s, 3H
<b>10</b>	1.50, m,2H			
<b>11</b>	1.8, dd, 2H	1.49-1.32, m,4H	1.98-1.34, m,4H	1.5-2.0, m, 4H
<b>12</b>	2.71, t, 1H	3.64,t, 1H	4.8,dd,1H	3.40,dd,1H
<b>14</b>	1.24.s, 3H	1.22,s,3H		1.16,s,3H
<b>15</b>	1.21, s, 3H	1.21,s,3H	1.15,s,6H	1.22,s,3H
<b>OH 3</b>	7.25, b,	3.17, b	7.20, b	6.75, b
<b>17</b>	----	1.27-1.26, s, 6H	2.10,s,3H	----
<b>18</b>	-----		----	-----
<b>OH12</b>			7.20, b	
<b>OH13</b>				7.25, b

$\delta$ (ppm), M,				
$^1\text{H}$	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	6.47,s,1H	6.46,s,1H	6.43, s, 1H	6.48,s,1H
<b>7</b>	1.94,s,3H	1.84,s,3H	1.94, s, 3H	1.9,s,3H
<b>8</b>	2.96, m, 1H	2.94,m,1H	2.89,m, 1H	2.92,m,1H
<b>9</b>	1.16,d,3H	1.16, d, 3H	1.13,d,3H	1.17,d,3H
<b>10</b>		1.50,m,2H		
<b>11</b>	1.75-1.50, m,4H	1.70,m,2H	1.70-1.40, m,4H	1.7-1.40, m,4H
<b>12</b>	2.70,dd,1H	3.66,t,1H	4.80,dd,1H	3.40,dd,1H
<b>14</b>	1.24,s,3H	1.17,s, 3H		1.21,s,3H
<b>15</b>	1.30,s,3H	1.00, s, 3H	1.17,s, 6H	1.23,s, 3H
<b>OH 6</b>	7.18,b	2.1, b	7.02, b	7.2,b
<b>17</b>	----	1.30,s,3H	2.12,s, 3H	----
<b>18</b>	---	1.24,s, 3H	-----	---
<b>OH12</b>	----		7.02, b	
<b>OH13</b>	----		-----	7.5, b

En el caso de la resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , los datos correspondientes a los productos **10-17**, son resumidos en la Tabla 25.

**Tabla 23.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos derivados de perezona e isoperezona por oxidación de los carbonos C12-C13.

$^{13}\text{C}$	Derivados de perezona				Derivados de isoperezona			
	10	12	14	16	11	13	15	17
$\delta(\text{ppm})$								
1	187.37	188.10	187.30	184.24	188.01	188.40	188.00	188.30
2	122.10	124.10	123.90	124.14	149.07	150.10	149.00	117.10
3	151.24	153.80	151.20	151.09	133.16	133.30	133.20	133.10
4	184.23	185.20	184.20	187.77	183.13	184.10	183.10	183.40
5	140.76	141.90	140.70	140.90	116.89	116.80	116.90	149.35
6	135.82	135.80	135.70	135.59	151.46	154.10	151.40	151.70
7	14.74	14.70	14.70	14.03	7.84	7.80	7.80	7.87
8	29.54	30.50	29.10	29.69	31.6	32.50	31.60	28.90
9	18.67	23.20	18.20	22.97	19.11	23.20	18.70	19.62
10	30.74	31.90	30.40	30.99	32.32	33.60	32.00	31.23
11	27.63	28.50	27.90	28.70	29.68	27.40	27.10	26.46
12	64.32	84.10	79.70	78.66	63.91	83.90	79.20	77.50
13	58.39	80.50	72.30	77.34	58.31	80.50	72.30	72.50
14	24.88	27.20	26.50	26.33	24.78	26.40	26.50	23.29
15	24.87	26.50	24.90	18.23	24.78	19.70	25.20	18.80
16	-	106.70	171.20	-	-	106.80	171.10	-
17	-	28.80	21.00	-	-	28.90	21.00	-
18	-	28.80	-	-	-	27.10	-	-

En el caso de las moléculas **10** y **11**, se aprecian diferencias significativas en los desplazamientos correspondientes a C-12 y C13, las cuales se desplazan a campo más alto en comparación con **1** y **2**, pasando de la zona de los dobles enlaces C-C, a la región de los carbonos base de oxígeno.

En este sentido los desplazamientos de C-12 para dichas moléculas resultaron en 61.50 y 56.40 ppm respectivamente. Este cambio es atribuido al efecto protector de los pares no compartidos del oxígeno presente en el epóxido.

Un efecto similar es observado en la posición C-13 de las moléculas señaladas, mostrándose los desplazamientos en 58.39 y 58.31 respectivamente

para **10** y **11**, observándose la señal a campo más alto que C-12 a consecuencia de los grupos metilos unidos a él.

En relación con el resto de las señales, como fue esperado, presentaron sólo pequeñas variaciones con respecto a las materias primas (**1** y **2**).

En los espectros de carbono trece, para los acetónidos **12** y **13**, se observa la presencia de tres señales adicionales a las presentadas por **1** y **2**. Además, igual que en los epóxidos **10** y **11**, las señales de C-12 y C-13 se desplazaron a campo más alto; pero con un cambio menor que en los epóxidos.

En relación con las señales de C-12, las moléculas **12** y **13** exhibieron valores de 84.10 y 80.50 pm para la primera, mientras que para la segunda fueron de 83.90 y 80.50 ppm; Estas señales también se encontraron a campo más alto que los presentados por **1** y **2**; así mismo es necesario comentar en comparación con estas mismas señales en **10** y **11** los valores se desplazaron a campo más bajo.

Las variaciones en los desplazamientos son consecuencia del cambio del doble enlace carbono-carbono hacia átomos de carbono  $sp^3$  y bases de oxígeno; así mismo la diferencia con respecto a los epóxidos correspondientes es producto de la presencia de un átomo de oxígeno unido a C-12 y otro a C-13, lo que genera un mayor efecto de desprotección que el experimentado en las mismas posiciones para **10** y **11**.

Considerando las señales adicionales en **12**, se aprecia a 106.7 una señal asignada a C-16, también se puede observar con relación a las señales para los carbonos atribuidos como C-17 y C-18 una señal a 28.80 ppm consecuencia de la equivalencia de ambos grupos metilos. En el caso de **13** los valores de C-16, C-17 y C-18 fueron: 106.8, 28.80 y 27.10 respectivamente.

### ***V.5.3. Evaluación citotóxica de las moléculas objetivos***

Los productos **10-17** fueron sintetizados con el objetivo de mejorar las propiedades farmacológicas de la perezona e isoperezona<sup>76</sup>, principalmente su actividad citotóxicas sobre células de cáncer. En este sentido, se realizó su

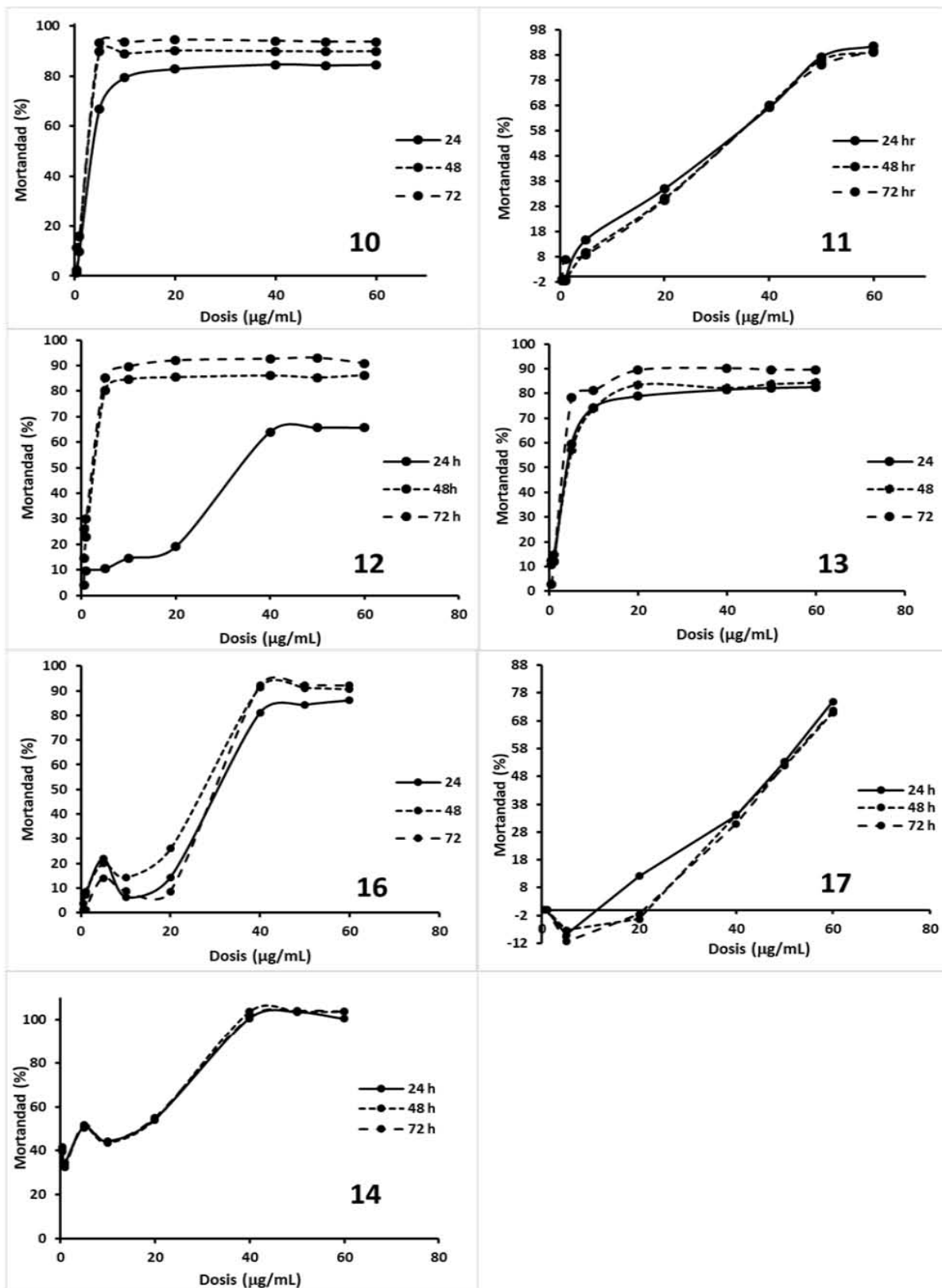
evaluación citotóxica mediante el ensayo MTT, empleando células de cáncer de mama MDA-MB-231 y fibroblastos normales como control.

Es importante señalar que, la evaluación del efecto citotóxico fue realizada para las moléculas anteriormente señaladas, exceptuando la molécula **15**, cuya solubilidad se encontró altamente limitada. En la Figura 42 se muestran, de forma resumida, los respectivos resultados.

Al respecto se observa, como tendencia, que los derivados de la perezona resultaron con mayor actividad que los correspondientes a la isoperezona; en lo particular la mayor actividad fue dada por el epóxido de perezona (5  $\mu\text{g/mL}$  mortandad del 90%), con una  $\text{IC}_{50}$  de 2.57  $\mu\text{g/mL}$ . En el caso del epóxido de la isoperezona se observa una disminución sustancial en la actividad, requiriéndose cerca de 50  $\mu\text{g/mL}$  para una disminución del 90%, obteniéndose un  $\text{IC}_{50}$  de 30.2  $\mu\text{g/mL}$ .

En relación con los acetónidos de perezona e isoperezona, estos fueron quienes presentaron el orden de actividad inmediato inferior. a su vez, entre los dos acetónidos, el de isoperezona mostró mayor actividad, siendo esta comparable con la del epóxido de perezona, presentando un  $\text{IC}_{50}$  de 2.74  $\mu\text{g/mL}$ , el cetal de la perezona mostró un  $\text{IC}_{50}$  de 24.12  $\mu\text{g/mL}$ .

Respecto al estudio de los dioles, el de perezona exhibió mayor actividad que el de isoperezona requiriéndose 30 y 60  $\mu\text{g/mL}$ , y valores  $\text{IC}_{50}$  de 28.35 y 39.41  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A su vez, el diol monoacetilado de la perezona ostentó una  $\text{IC}_{50}$  de 33.22  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados de la concentración media inhibitoria descritos anteriormente son resumidos en la Tabla 26.



**Figura 42.** Curvas dosis-respuesta para la citotoxicidad sobre células con cáncer de mama de los derivados C12-C13 de la perezona e isoperezona.

El mecanismo seguido por los compuestos de estudio para su citotoxicidad, según los resultados de la morfología celular es sugerido vía apoptosis, surgiendo la necesidad de seguir ahondando en el estudio para elucidar su ruta de acción. Por lo cual se realizó un estudio teórico-computacional-quimioinformático de las moléculas a fin de explicar las relaciones estructura-propiedad de estas, dicho estudio se describe en el siguiente apartado.

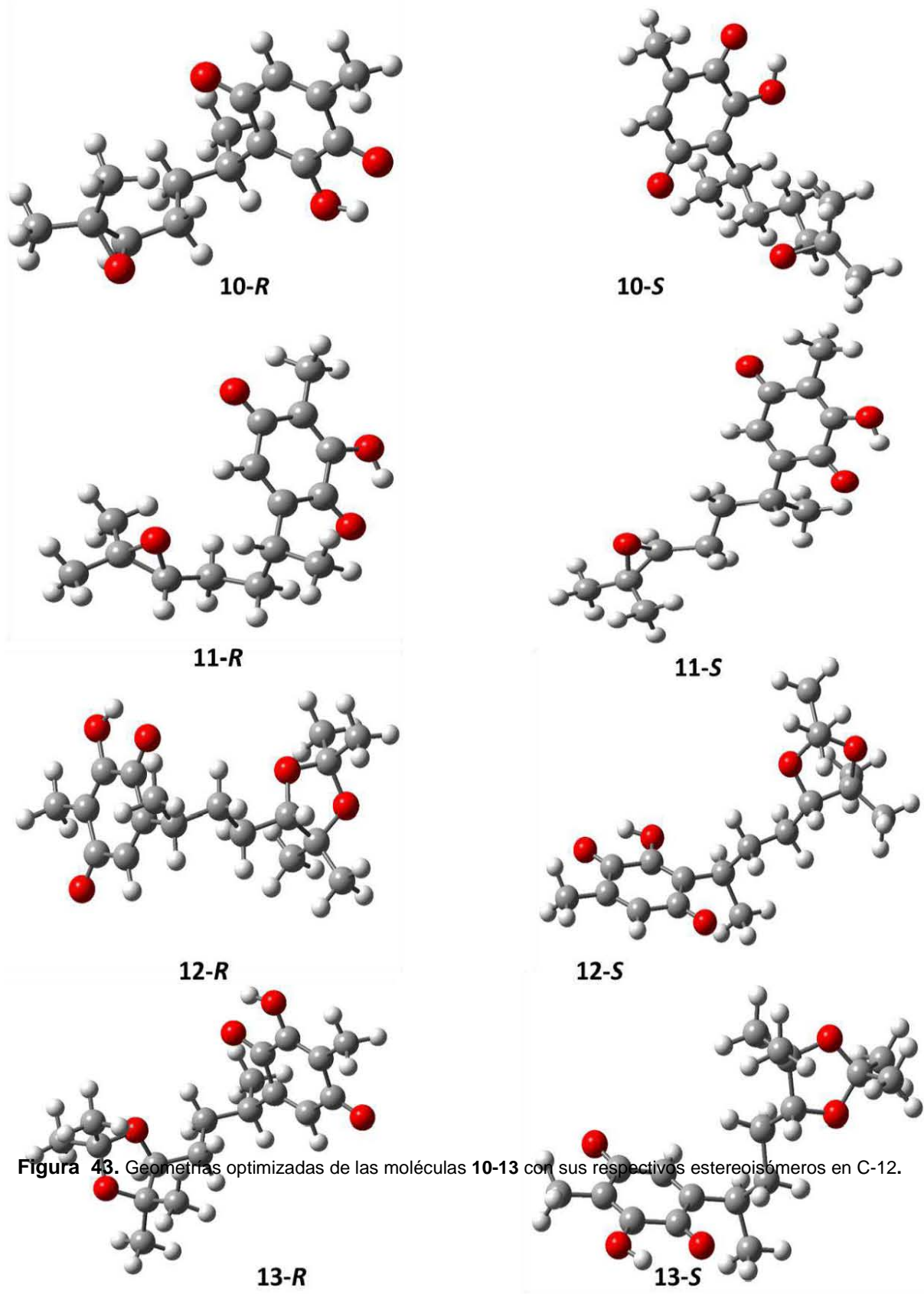
**Tabla 24.** Valores de IC<sub>50</sub> para las Moléculas derivadas de la oxidación C12-C13 de la perezona e isoperezona y sus.

<b>Molécula</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>
Epóxido perezona	2.54±0.2
Epóxido Isoperezona	30.2±8.4
Acetónido de la perezona	24.12±4.75
Acetónido de la Isoperezona	2.72±0.47
Diol monoacetilado de la perezona	33.22±1.93
Diol de la perezona	28.35±5.4
Diol de la isoperezona	39.41±1.73

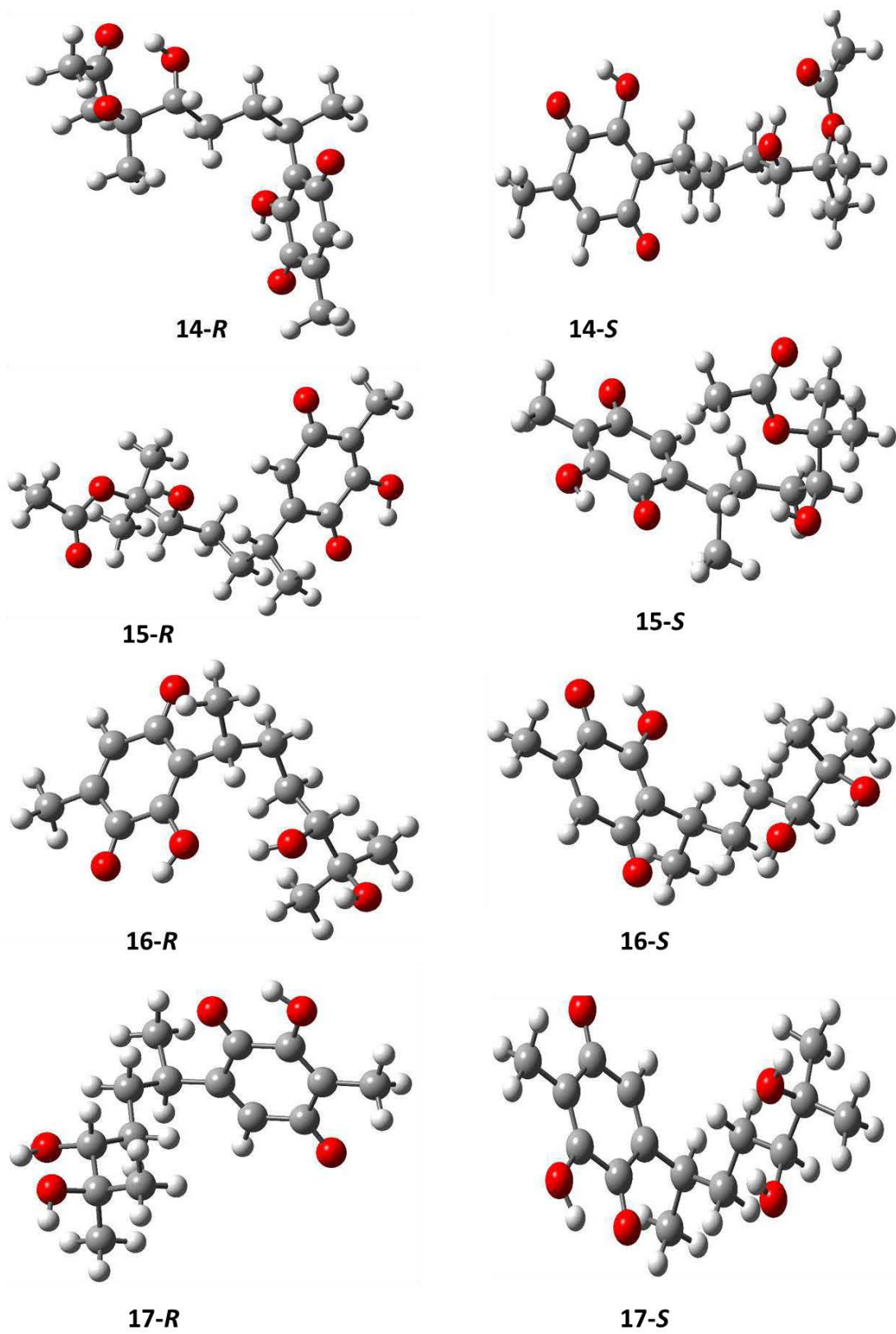
#### **V.5.4. Estudio *in silico* de las moléculas 10-17.**

##### V.5.4.1. Determinación de parámetros geométricos y espectroscópicos.

Para la optimización de las moléculas objetivo se realizó primeramente una distribución de conformeros de cada una de ellas y en consecuencia la selección del más estable. Adicionalmente, las geometrías seleccionadas fueron apropiadamente optimizadas por TFD empleando el funcional B3LYP y el conjunto base 6-311++G(d,p). Las estructuras obtenidas en fase gas son ilustradas en las Figuras 43-44. En este sentido, dado que la transformación del enlace C12-C13 da como consecuencia la generación de un centro quiral en C12, la optimización de las moléculas fue realizado para ambos estereoisómeros (*R* y *S*) en dicho carbono.



**Figura 43.** Geometrías optimizadas de las moléculas 10-13 con sus respectivos estereoisómeros en C-12.



**Figura 44.** Geometrías optimizadas de las moléculas 14-17 con sus respectivos estereoisómeros en C-12.



En las estructuras optimizadas se puede observar la presencia de la interacción puente de hidrógeno intermolecular por parte del hidroxilo en posición 3 o 6 con el grupo carbonilo adyacente. Así mismo resulta importante señalar que en el caso de las moléculas **14** y **16** se observan la generación de puentes de hidrógeno adicionales; por ejemplo, en el caso de **14** se establece uno entre el grupo hidroxilo en posición C-12 y el grupo carbonilo del éster en ambos estereoisómeros; presentándose con una mayor fortaleza en el estereoisómero *R*; para la molécula **16** el isómero *R* de igual manera establece dos puentes de hidrógeno adicionales; uno entre OH-12 con OH-3 y el segundo entre OH-13 y OH-12; mientras que el isómero *S* solo forma este último.

La relevancia de estos puentes radica en que explican porque **14** y **16** se presentan como aceites y no como sólidos amorfos; situación observada para los mismos derivados de la isoperezona, donde **15** no presenta dichas interacciones en ninguno de sus estereoisómeros, mientras que en **17** solo en el estereoisómero *R* se presenta el puente OH12---OH13. En el caso particular de **16**, se puede considerar que la forma *R* es la que presentaría mayor probabilidad de ser obtenida como producto; dado que una de las interacciones que rigen la estructura cristalina de la perezona<sup>95</sup> son los puentes de hidrógeno intermoleculares a través de OH-3; siendo estas reducidas en **16-R** por la interacción intermolecular.

Otro aspecto geométrico importante y que puede ser relacionado con sus propiedades físicas, es que las estructuras **10-13**, en C12-C13 presentan sistemas cíclicos de 3 y 5 átomos, las cuales presentan impedimento de rotación en torno a dicho enlace y que facilitarían el empaquetamiento en el estado sólido.

Los parámetros geométricos de **10-17**, con sus correspondientes estereoisómeros, fueron calculados a partir de las estructuras optimizadas y sus datos resumidos en las Tablas 27 y 28. Dado que a las moléculas objetivo no fue posible determinarles sus patrones de rayos X de monocristal experimentales, y considerando la importancia de la estructura en la actividad biológica, los valores calculados para las moléculas obtenidas fueron comparadas con los parámetros experimentales de las quinonas originales<sup>95,146</sup>. Así mismo se realizó una búsqueda

bibliográfica a fin de encontrar regiones análogas a las presentadas en C12-C13 para otras moléculas y poder comparar sus valores<sup>234-237</sup>.

**Tabla 25.** Longitudes de enlace seleccionadas (en Armstrong) teóricas de los derivados de la perezona (**10, 12, 14 y 16**) contrastados con los valores experimentales de la perezona (1)

Enlace	1 <sup>a</sup>	10-R	10-S	12-R	12-S	14-R	14-S	16-R	16-S
C1=O	1.226	1.225467	1.224151	1.225108	1.225115	1.224908	1.225166	1.223462	1.225564
C1-C2	1.469	1.479211	1.48094	1.479852	1.479519	1.480184	1.479487	1.484788	1.479567
C2-C3	1.334	1.354775	1.35444	1.354975	1.354681	1.355092	1.354736	1.352786	1.354454
C3-C4	1.498	1.496811	1.496153	1.496167	1.495763	1.495612	1.49541	1.493681	1.497063
C4-C5	1.472	1.481524	1.480915	1.481312	1.481601	1.481448	1.481598	1.480772	1.481186
C4=O	1.220	1.22448	1.225184	1.224928	1.22492	1.225222	1.225006	1.225067	1.224509
C5-C6	1.332	1.34166	1.341753	1.341641	1.341655	1.34153	1.341554	1.342001	1.341791
C6-C1	1.469	1.492407	1.492378	1.479852	1.492441	1.492947	1.492393	1.491865	1.49185
C5-C7	1.507	1.498154	1.498444	1.498338	1.498303	1.498397	1.498355	1.498054	1.498201
C6/C3-O	1.347	1.34375	1.34533	1.34455	1.344557	1.345305	1.344611	1.353082	1.343988
C2-C8	1.499	1.517459	1.517299	1.517455	1.516453	1.517456	1.516378	1.517625	1.51737
C8-C9	1.523	1.542609	1.542455	1.542768	1.542623	1.542947	1.542978	1.54195	1.51737
C8-C10	1.535	1.54632	1.546953	1.546025	1.548629	1.546237	1.548508	1.550846	1.547192
C10-C11	1.509	1.535144	1.535717	1.533734	1.534627	1.535018	1.533876	1.540959	1.534326
C11-C12	1.512	1.510194	1.509573	1.520584	1.521245	1.564683	1.539084	1.5324	1.532005
C12-C13	1.312	1.477988	1.477029	1.547512	1.54767	1.564683	1.560484	1.55702	1.549562
C12-O		1.43941	1.441942	1.430679	1.430312	1.416893	1.419158	1.43828	1.44267
C13-O		1.44767	1.446073	1.446498	1.446586	1.499992	1.491112	1.435479	1.436665
C13-C14		1.514277	1.514689	1.533017	1.52571	1.52686	1.528728	1.5364	1.535967
C13-C15		1.512854	1.513325	1.525843	1.53288	1.529406	1.530609	1.528899	1.528494
C=O.....H	2.340	2.01075	2.0068	2.00913	2.01094	2.00841	2.01151	1.9935	2.00887
C17-O12		-----	-----	1.42848	1.42858	-----	-----	-----	-----
C17-O13		-----	-----	1.4383	1.438178	1.33598	1.33701	-----	-----
C18-C17		-----	-----	1.52905	1.52908	1.50889	1.50841	-----	-----
C19-C17		-----	-----	1.52312	1.52315	-----	-----	-----	-----
C17=O		-----	-----	-----	-----	1.21548	1.21507	-----	-----
C17=O—H		-----	-----	-----	-----	1.81674	1.89706	-----	-----
OH12--OH13		-----	-----	-----	-----	-----	-----	2.10963	2.14084
OH--OH3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	2.08323	-----

a = obtenido de Soriano *et al*, 1986.

En la Tabla 27 se muestran resumidamente las longitudes de enlace de las moléculas **10**, **12**, **14** y **16**, todas ellas derivadas de **1**, con quien son comparadas estructuralmente; así mismo se incluyen los datos para sus correspondientes estereoisómeros en posición C12.

En el caso de todas las moléculas comparadas en la Tabla 27, con el anillo quinónico de la perezona, los valores calculados son muy similares, a pesar de encontrarse ligeramente sobre estimados con respecto a los valores en el anillo, considerando que en estos casos no se presenta modificación alguna; también se puede señalar que, entre todos los derivados las longitudes en el anillo de la quinona no presentaron cambios significativos. Además, el enlace de hidrógeno presente entre el grupo hidroxilo O3-H y el oxígeno O4 del grupo carbonilo disminuye su distancia, señalando un enlace más fuerte (puente de hidrógeno intramolecular); las distancias H3...O4 oscilan entre los 2.00 Å, siendo en general estos datos de longitud de enlace coherentes con los reportados por Soriano y cols.<sup>95</sup>.

Adicionalmente, las cadenas laterales de C8 a C11, mostraron alta similitud estructural con **1**; sin embargo en el enlace C12-C13 donde se realizaron las modificaciones se presentó un incremento sustancial de la longitud de enlace que no puede ser atribuido al método teórico, sino al cambio de hibridación, de sp<sup>2</sup> a sp<sup>3</sup>; siendo menor en **10**; estos parámetros obtenidos se contrastaron con los obtenidos por Sankar y colaboradores<sup>235</sup>, quienes reportan las distancias experimentales obtenidas por difracción de rayos X de un epóxido derivado del 5-fluoro-2-nitrobenzaldehído. En este caso, el enlace C-C del anillo del epóxido presentaron una longitud de enlace de 1.474 Å, siendo muy similares a los obtenidos para **10** por métodos teóricos (para el isómero *R* su valor fue de 1.477988 Å, mientras que el isómero *S* es 1.477029 Å). En el caso de los enlaces C-O del epóxido de 5-fluoro-2-nitrobenzaldehído las distancias experimentales de O12-C13 resultaron ser 1.4353 Å y para O12-C11 de 1.4393 Å; mientras que, para los isómeros de **10**, en C12-O fueron 1.43941 y 1.441942 Å; así para C13-O los valores fueron 1.44767 y 1.446073 para los isómeros *R* y *S* respectivamente. Lo anterior

demuestra una buena correlación entre los valores teóricos y experimentales para el epóxido.

Por otra parte, para el análisis de la estructura de **12**, los parámetros de longitud de enlace fueron cotejados contra el cetal pentaeritrol<sup>236</sup> de la ciclohexanona, en donde se observó que los enlaces C-O en la región del cetal presentaron valores de 1.430 y 1.425 valores que resultan similares a los presentados para C12-O y C13-O (1.430679 Å y 1.446498 Å para *R* así como 1.430312 y 1.446586 Å para *S*); adicionalmente con respecto al enlace de los dos oxígenos al carbono del acetónido O-C-O, se observan distancias en comparación con las piranosas (1.417 y 1.409 Å)<sup>238</sup> se encuentran en el mismo rango de las obtenidas por lo métodos teóricos (1.42848 y 1.4383 Å para *R*, mientras que 1.42858 y 1.438178 Å para *S*).

En el caso del diol monoacetilado **14**, la región del éster formada en C13 y del alcohol en C12 fueron contrastados con los parámetros reportados en la literatura por Allen y colaboradores<sup>238</sup>, en donde para un alcohol secundario se reporta una distancia de 1.432 Å, los cuales en se encuentran en concordancia con los valores obtenidos experimentalmente para C12-O los cuales son de 1.416893 y 1.419158, para los estereoisómeros *R* y *S* respectivamente; teniendo en consideración el enlace C13-O, el cual siendo un carbono cuaternario presenta un valor de 1.477 Å, siendo bastante similares a los obtenidos para los estereoisómeros *R* y *S* los cuales fueron 1.499992 y 1.491112 Å respectivamente. Así mismo para el enlace O-C del grupo carbonilo, de manera experimental se reportó un valor de 1.336 Å en contraste con 1.33598 y 1.33701 Å respectivamente para los estereoisómeros *R* y *S* en C12. Considerando el enlace C18-C17 el cálculo arrojó un valor de 1.50889 y 1.50841 Å para *R* y *S* respectivamente; mientras que la literatura reporta un valor de 1.497 Å. Para concluir referente a este compuesto, en relación con el doble enlace C17=O el valor calculado para *R*-*S* fueron 1.21548 y 1.21507 Å respectivamente, comparado con el valor experimental 1.196 Å. Lo anterior muestra una excelente correlación entre los valores teóricos y los obtenidos de manera experimental.

Finalmente, respecto a los valores calculados para **16**, los estereoisómeros *R* y *S* para los enlaces C-12-O y C-13-O fueron 1.43828 , 1.44267, 1.435479 y 1.436665 Å respectivamente. En este sentido, los valores fueron cotejados con los publicados por Ermer y colaboradores<sup>239</sup>. Los cuales reportaron un valor de longitud de enlace C-O experimental de 1.435 y 1.427 Å, valores que mostraron una buena correspondencia con los datos calculados para **16**.

En la Tabla 28 se resumen los valores de longitud de enlace teóricos para **11**, **13**, **15** y **17** contrastados con los valores de rayos X de isoperezona<sup>146</sup>, con la cual se compara la mayor parte de la estructura; así mismo se incluyen los datos para sus correspondientes estereoisómeros en posición C-12. Considerando todos los derivados evaluados, la estructura quinoidal de todos ellos, guarda una estrecha similitud con respecto al de la isoperezona. En este sentido cabe destacar que los enlaces de hidrógeno intermolecular, presentan valores menores en todos los casos al reportado experimentalmente, lo cual puede ser considerada una subestimación de estos, teniendo en cuenta que en estos casos el anillo no sufre modificación alguna que pudiese justificar esta disminución; así mismo entre los derivados las longitudes del anillo de la quinona no sufrieron cambios significativos. El resto de los valores teóricos fueron concordantes y cercanos a los valores experimentales, siendo apropiados con el nivel de teoría usado.

Respecto a las modificaciones realizadas sobre C-12 y C-13, estas fueron evaluadas contrastándolas con las mismas referencias establecidas para los derivados de la perezona<sup>235,236,238,240</sup>, observándose que en todos los casos las longitudes de enlace presentan similitudes estructurales; Lo anterior nos permite confirmar que, el nivel de teoría empleado describe de manera correcta los parámetros geométricos de las moléculas de estudio.

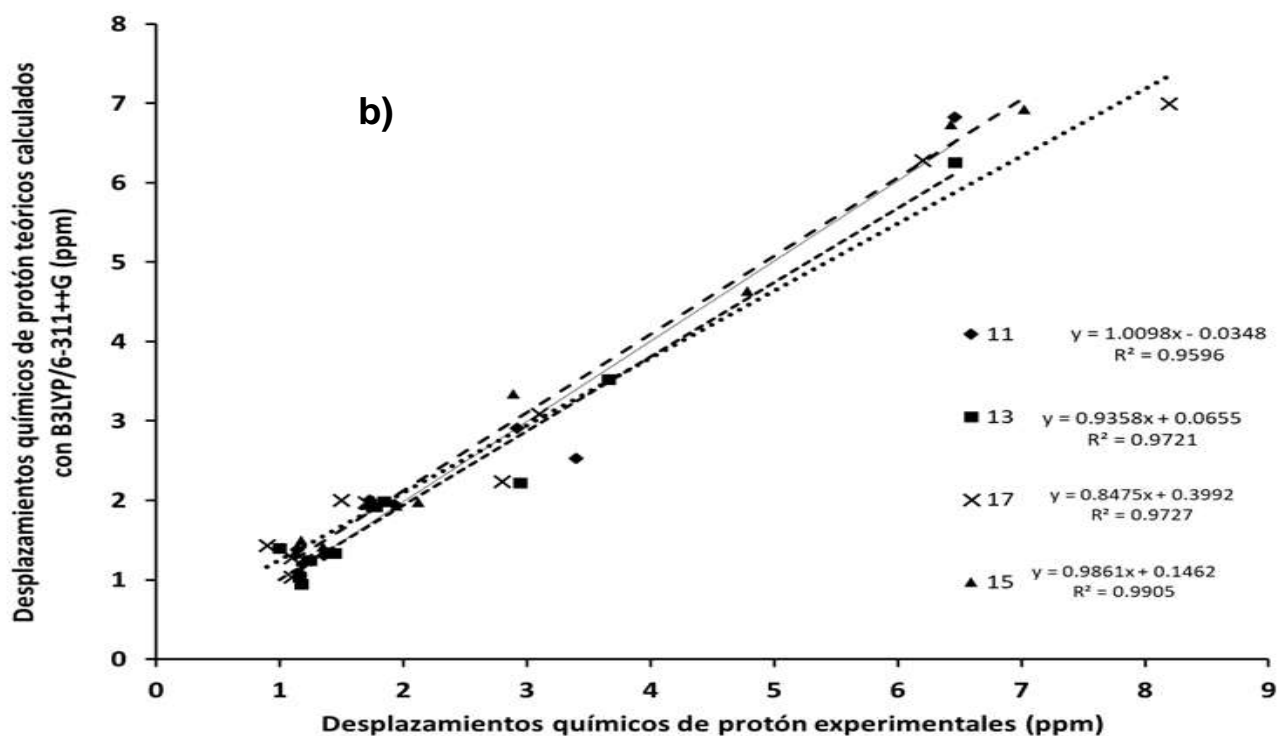
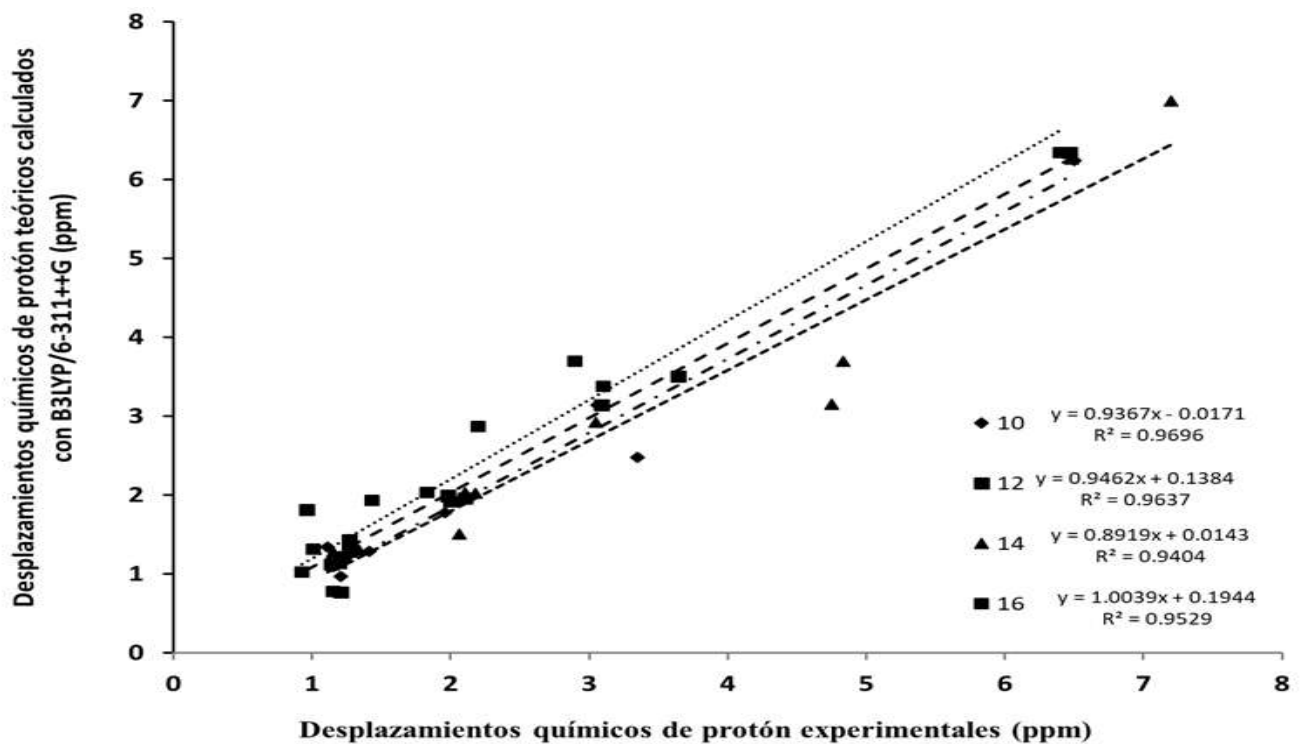
**Tabla 26.** Longitudes de enlace (en Armstrong) teóricas de los derivados de la isoperezona (11,13,15 y 17) contrastados con los valores experimentales de la isoperezona (2)

Enlace	2 <sup>a</sup>	11-R	11-S	13-R	13-S	15-R	15-S	17-R	17-S
C1=O	1.240	1.226834	1.225447	1.22496	1.225752	1.226692	1.225933	1.225542	1.22513
C1-C2	1.450	1.484769	1.487021	1.487354	1.486841	1.484983	1.486784	1.486905	1.48666
C2-C3	1.350	1.344762	1.343179	1.343773	1.344081	1.344646	1.343911	1.34422	1.34392
C3-C4	1.490	1.49041	1.490731	1.490316	1.490108	1.489532	1.489891	1.489867	1.48984
C4-C5	1.430	1.476022	1.47631	1.47453	1.475183	1.475829	1.475633	1.475058	1.47476
C4=O	1.180	1.224484	1.224161	1.224602	1.224366	1.224868	1.224134	1.224615	1.22475
C5-C6	1.390	1.351165	1.351501	1.351786	1.351643	1.351168	1.351558	1.35164	1.35155
C6-C1	1.430	1.498531	1.495047	1.498401	1.498202	1.499109	1.497518	1.498838	1.49883
C5-C7	1.580	1.498405	1.49816	1.498383	1.498267	1.498417	1.498138	1.498379	1.49839
C6/C3-O	1.250	1.344737	1.344676	1.343568	1.34401	1.344753	1.344422	1.344024	1.34389
C2-C8	1.500	1.517115	1.514409	1.516347	1.516419	1.516699	1.515704	1.516069	1.51627
C8-C9	1.500	1.542105	1.545426	1.54206	1.542198	1.542138	1.542633	1.542086	1.542
C8-C10	1.490	1.548831	1.539661	1.546543	1.546355	1.548762	1.551401	1.546495	1.54709
C10-C11	1.510	1.538654	1.537068	1.533501	1.533586	1.539813	1.534748	1.533604	1.05323
C11-C12	1.410	1.511234	1.51012	1.521268	1.521044	1.531508	1.542397	1.527083	1.53638
C12-C13	1.380	1.47746	1.477433	1.547827	1.547971	1.554012	1.556329	1.552219	1.55399
C12-O	-----	1.4454	1.441099	1.428795	1.429705	1.434448	1.425513	1.426166	1.42696
C13-O	-----	1.44769	1.447216	1.446191	1.446265	1.491314	1.480167	1.451397	1.44866
C13-C14	1.520	1.51436	1.514464	1.525713	1.525775	1.527233	1.529493	1.530801	1.5332
C13-C15	1.490	1.51302	1.513106	1.533067	1.53268	1.530288	1.531781	1.531673	1.53244
C=O.....H	2.650	1.99568	2.0157	2.0004	2.00061	1.99423	1.99423	1.99874	1.99757
C17-O12	-----	-----	-----	1.42974	1.437726	-----	-----	-----	-----
C17-O13	-----	-----	-----	1.438135	1.429855	1.354399	1.353272	-----	-----
C18-C17	-----	-----	-----	1.528645	1.522904	1.510368	1.510137	-----	-----
C19-C17	-----	-----	-----	1.522812	1.528873	-----	-----	-----	-----
C17=O	-----	-----	-----	-----	-----	1.206884	1.206093	-----	-----
C17=O---H	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OH---OH	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2.15978	2.21593

a= obtenido de Enríquez *et al*, 1992.

#### V.5.4.2. Correlación teórica-experimental de los desplazamientos químicos de resonancia magnética nuclear <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

Los valores experimentales correspondientes a los desplazamientos químicos de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron correlacionados con los valores calculados por TFD con B3LYP, así como usando el conjunto base 6-311++G(d,p) y el método GIAO.



**Figura 45.** Regresión lineal entre los valores experimentales y calculados con B3LYP/6-311++G (d,p), desplazamiento químico de RMN <sup>1</sup>H; para **(a)** derivados de perezona **(b)** derivados de isoperezona obtenidos en este trabajo.

Los resultados de los desplazamientos químicos fueron comparados con los datos experimentales obtenidos previamente, a fin de determinar si el nivel de teoría aplicado en el presente trabajo resulta adecuado para la determinación de parámetros espectroscópicos de las moléculas en estudio. Una metodología empleada en la literatura por Bednareck, Drobrowolski y Kamienska en el 2003<sup>241,242</sup> para determinar el nivel de aproximación entre los resultados teóricos y experimentales conlleva efectuar una regresión lineal entre los parámetros calculados y los experimentales, determinando con base al coeficiente de regresión el nivel de ajuste presente en los datos. En este sentido. Los desplazamientos químicos de RMN<sup>1</sup>H calculados por GIAO fueron graficados contra los datos experimentales obtenidos para los derivados de la perezona e isoperezona, Figura 45.

**Tabla 27.** Ecuaciones y coeficientes de regresión para los desplazamientos químico de protón para las moléculas objetivo.

<b>Moléculas</b>	<b>Ecuación</b>	<b>Coefficiente de regresión</b>
<b>10</b>	$\delta T = 0.9367ex - 0.0171$	0.9696
<b>11</b>	$\delta T = 1.0098ex - 0.0348$	0.9596
<b>12</b>	$\delta T = 0.9462ex + 0.1384$	0.9637
<b>13</b>	$\delta T = 0.9358ex + 0.0655$	0.9721
<b>14</b>	$\delta T = 0.8919ex + 0.0143$	0.9404
<b>15</b>	$\delta T = 0.9861ex + 0.1462$	0.9905
<b>16</b>	$\delta T = 1.0039ex + 0.1944$	0.9529
<b>17</b>	$\delta T = 0.8475ex + 0.3992$	0.9727

La gráfica nos permite observar que a este nivel de teoría y bajo los modelos aplicados, las moléculas derivadas de la perezona presentan un mejor ajuste, en especial las moléculas **14** y **16** que corresponden al diol monoacetilado y el diol . En el caso de aquellos puntos que distan de la linealidad corresponden a los desplazamientos químicos correspondientes al grupo hidroxilo presente en el anillo quinónico. Las variaciones antes señaladas pueden ser consecuencia de que, a nivel teórico, los cálculos fueron realizados en fase gas; Mientras que, a nivel experimental, la determinación se realizó en disolvente deuterado; por lo tanto, el disolvente puede ser una variable de estas desviaciones. Un fenómeno similar



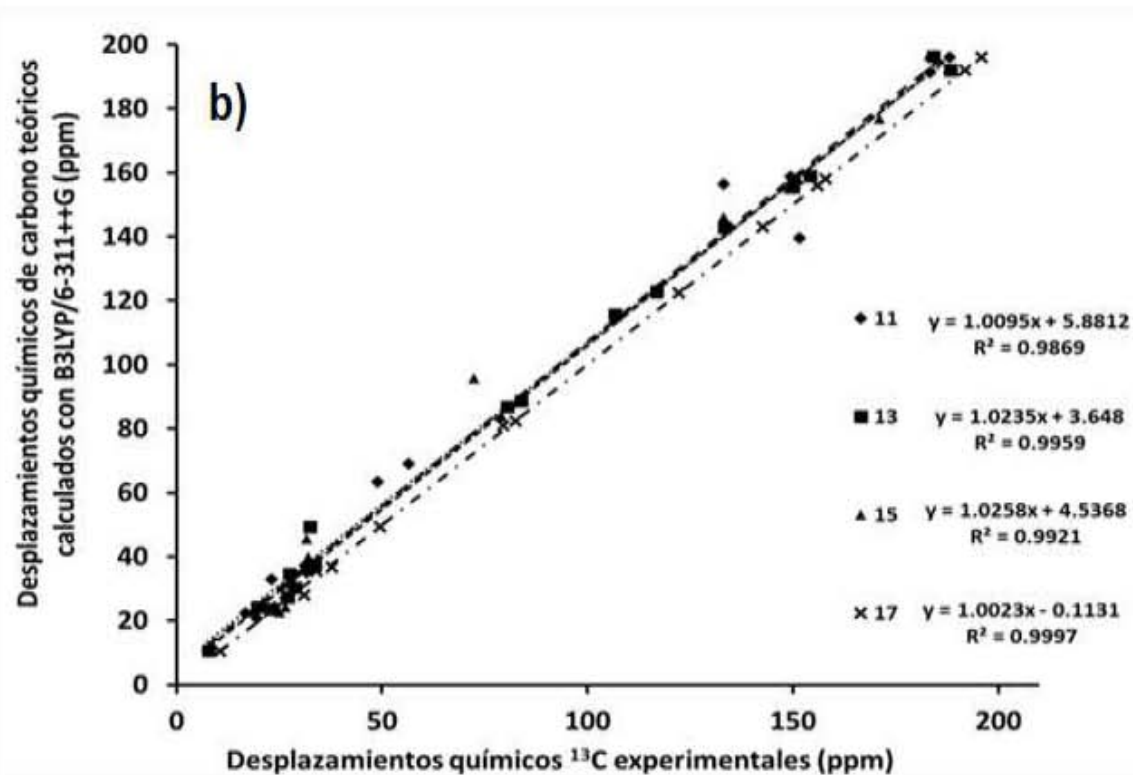
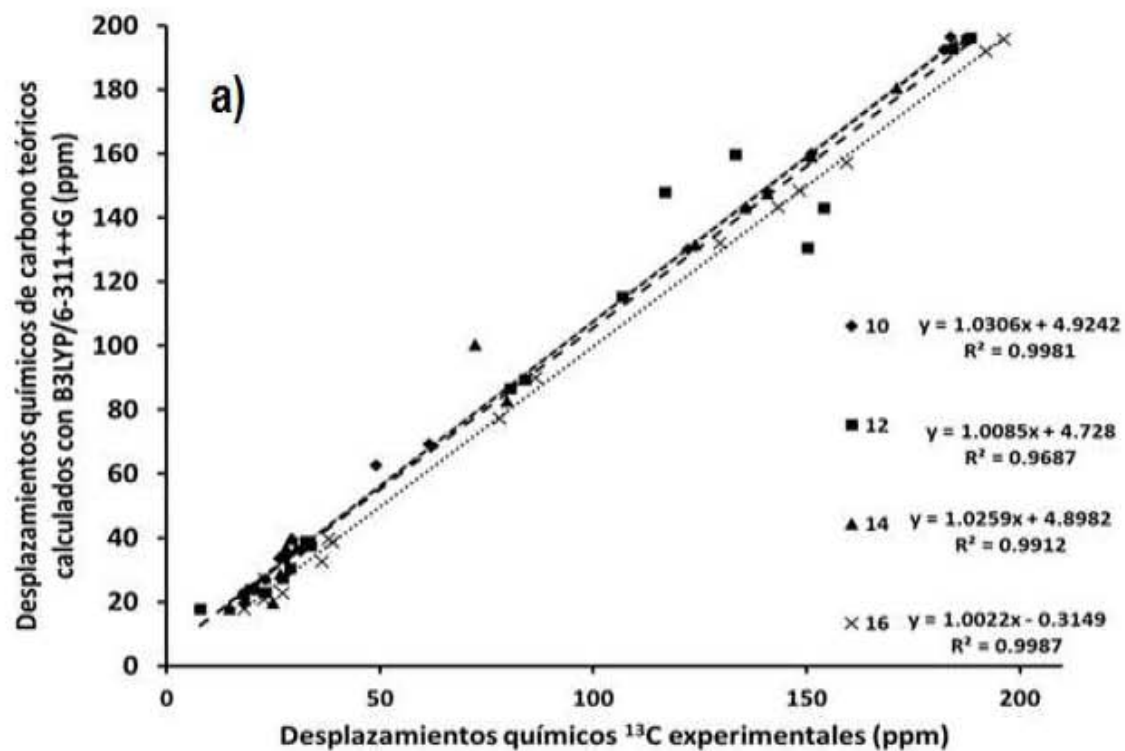
ocurre en el caso de los derivados de la isoperezona observándose una mayor desviación de la linealidad por efecto de los grupos hidroxilos.

El análisis de regresión lineal para los datos de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 45), proporcionaron las ecuaciones de la recta para las correlaciones antes señaladas, las cuales describen el comportamiento de los derivados de la perezona e isoperezona al nivel de teoría evaluado (tabla 29). Los resultados mostraron valores de coeficientes de regresión mayores a 0.940, indicando que la metodología empleada permite una adecuada descripción de los datos experimentales.

**Tabla 28:** Ecuaciones y coeficientes de regresión para los desplazamientos químico de  $^{13}\text{C}$  para las moléculas objetivo

Moléculas	Ecuación	Coefficiente de Regresión
10	$\delta T = 1.0306ex + 4.9242$	0.9981
11	$\delta T = 1.0095ex + 5.8812$	0.9869
12	$\delta T = 1.0085ex + 4.728$	0.9687
13	$\delta T = 1.0235ex + 3.648$	0.9959
14	$\delta T = 1.0259ex + 4.8982$	0.9912
15	$\delta T = 1.0258 ex + 4.5368$	0.9921
16	$\delta T = 1.0022ex - 0.3149$	0.9987
17	$\delta T = 1.0023 ex - 0.1131$	0.9997

El mismo análisis fue realizado para los valores teóricos y experimentales de desplazamiento químico para RMN  $^{13}\text{C}$ , la correspondiente gráfica es mostrada en la Figura 46. El análisis de regresión lineal para los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  dieron coeficientes de regresión en órdenes mayores a 0.960 y las ecuaciones se resumen en la Tabla 30.



**Figura 46.** Graficas de desplazamientos químico-teóricos contra experimentales para  $^{13}\text{C}$  de las moléculas: **a)** derivados de la perezona; **b)** derivados de la isoperezona

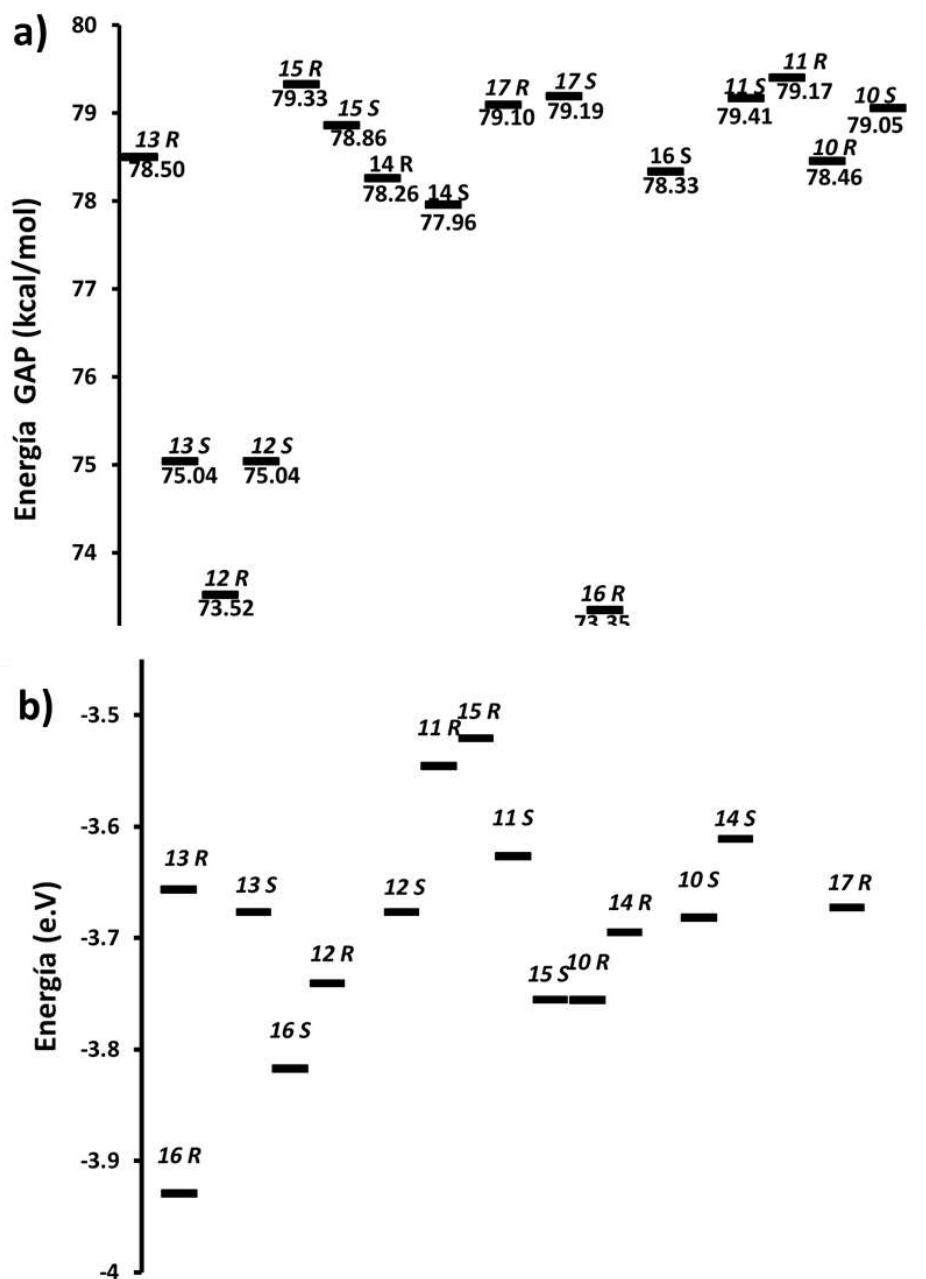
Teniendo en cuenta estas gráficas, se observa una mayor correlación entre los valores teórico-experimentales. Con las tendencias mostradas se verifica que las variaciones observadas anteriormente para los grupos hidroxilos podrían deberse al disolvente empleado.

Los datos obtenidos de los coeficientes de regresión para el caso de estas moléculas, con la misma metodología teórica, permite obtener valores aproximados a los experimentales. En otras palabras, los valores de coeficiente de regresión en ambos análisis reflejan una buena descripción de los desplazamientos químicos experimentales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  por el método, nivel de teoría y conjunto base seleccionados.

### ***V.5.5. Relación estructura-función de los derivados por oxidación C12-C13 mediante estudios cuánticos computacionales, acoplamiento molecular y química informáticos.***

#### ***V.5.5.1 Análisis de orbitales moleculares***

En la literatura se ha establecido una relación entre las estructuras con grupos o fragmentos altamente electrofílicos y la actividad biológica sobre proteínas, ácidos nucleicos y otros metabolitos por interacción con los grupos nucleofílicos que estas últimas presentan. Además, se conocen alrededor de 266 fármacos generados a partir de moléculas naturales que presentan sitios electrofílicos tales como aceptores tipo Michael, estructuras tensionadas, ésteres, carbamatos, entre otras<sup>243</sup>. Lo anteriormente señalado permite establecer una relación entre el carácter electrofílico y una posible función biológica. En este sentido, el estudio teórico de los compuestos mediante sus orbitales moleculares se centró en el comportamiento de los orbitales LUMO, su estabilidad mediante el GAP de los orbitales moleculares, además de tener estos valores como un referente para considerar y explicar los posibles sitios de interacción que permiten un efecto farmacológico.



**Figura 47.** Energía GAP en kcal/mol (a) y de los orbitales LUMO en electrón-volt (b) para las moléculas objetivo.

En la Figura 47 se muestran los valores de diferencia energética entre los orbitales frontera (GAP) calculados ( $E_{LUMO} - E_{HOMO}$ ) (a) así como las energías de los orbitales LUMO (b) de las moléculas en estudio. La comparativa entre los valores de GAP, reflejan una tendencia constante en la cual los derivados de la isoperezona

suelen ser menos reactivos que sus análogos con perezona<sup>76,244</sup>. En este mismo sentido podemos apreciar que, los estereoisómeros *S* resultan menos reactivos que el *R* tanto para la perezona como para la isoperezona. Una estrategia empleada para comparar el carácter electrofílico de las moléculas estudiadas fue comparar los valores energéticos de sus orbitales LUMO.

Estos valores muestran que la molécula menos reactiva corresponde a **11-S**, con un  $\Delta E_{GAP} = 79.41$  kcal/mol, es decir, de los compuestos estudiados es el más estable, seguido por **15-R** ( $\Delta E_{GAP} = 79.33$  kcal/mol) y **17-S** ( $\Delta E_{GAP} = 79.19$  kcal/mol). Siendo atribuida la alta estabilidad de **15** y **17** a la presencia de estructuras menos reactivas en C-12 y C-13, ya que corresponden al diolmonoacetilado y el diol de la isoperezona. Asimismo, las moléculas más reactivas fueron **16-R** ( $\Delta E_{GAP} = 73.35$  kcal/mol) y **12-R** ( $\Delta E_{GAP} = 73.52$  kcal/mol) correspondientes al diol y el acetónido de la perezona respectivamente.

En relación a los resultados antes mencionados, se pueden observar algunas consistencias con los resultados de actividad biológica; por ejemplo el epóxido de la perezona resultó más activo que el de la isoperezona contra las células de cáncer de mama, siendo más reactivo según su valor de *GAP* **10** que con **11**, en ambos estereoisómeros ( $IC_{50} = 2.54$  y  $30.2$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivamente), así mismo los valores de *GAP* de las moléculas **15** y **17** son similares al igual que sus citotoxicidad ( $IC_{50} = 33.22$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  y  $39.4$ ) siendo parecida a su vez tanto en el valor de *GAP* como de citotoxicidad con los de **11**. En el caso del compuesto **12** que resultó de los compuestos más activo biológicamente, presentó un valor de  $E_{GAP}$  bajo, siendo de las moléculas más reactivas. Estos resultados son indicativos de una posible correlación entre la estabilidad de la molécula y la citotoxicidad en las células de cáncer de mama.

Un parámetro adicional que describen la reactividad y la electrofilia de las moléculas es la energía de los orbitales LUMO, para lo cual es conveniente señalar que un valor bajo de  $E_{LUMO}$  está relacionado con la capacidad de la molécula para aceptar electrones.

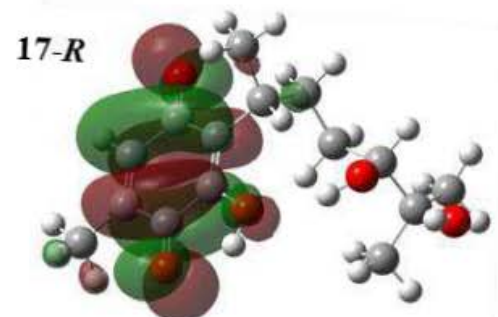
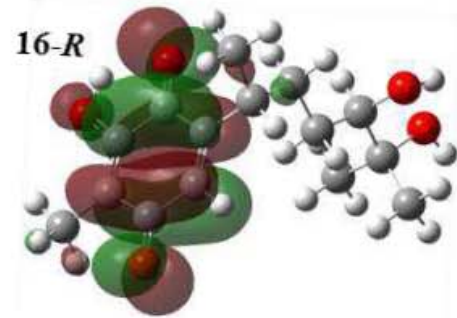
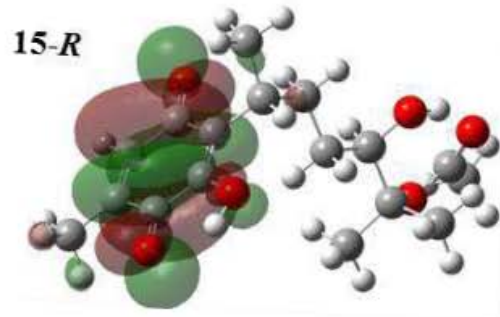
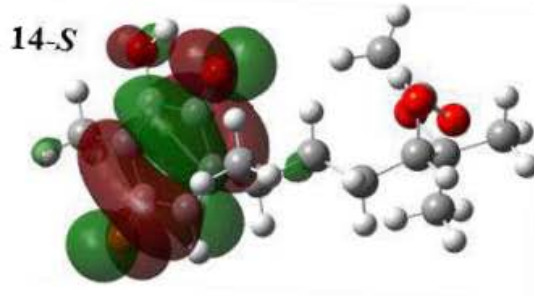
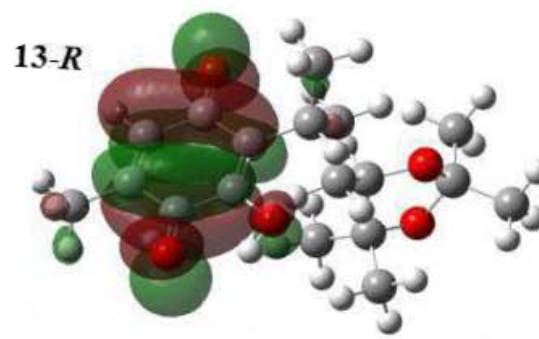
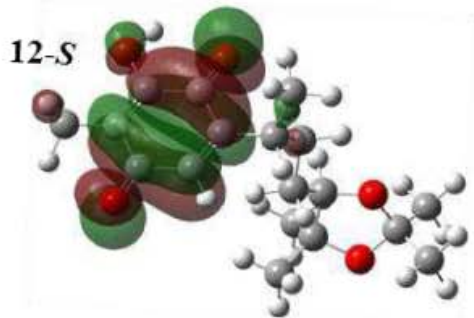
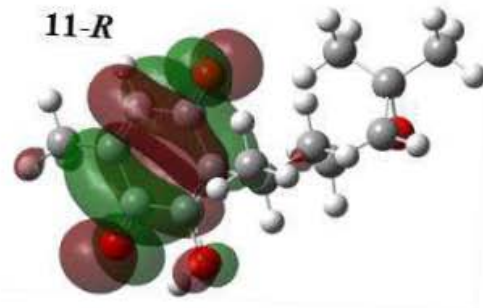
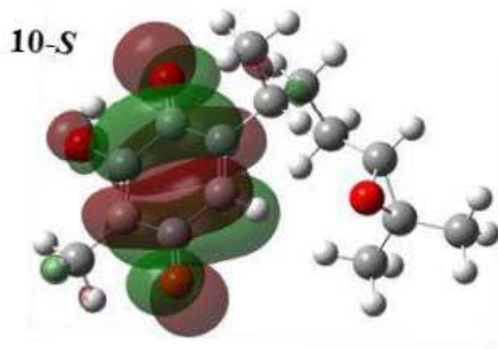


Figura 48. Orbital molecular LUMO de las moléculas estudiadas.

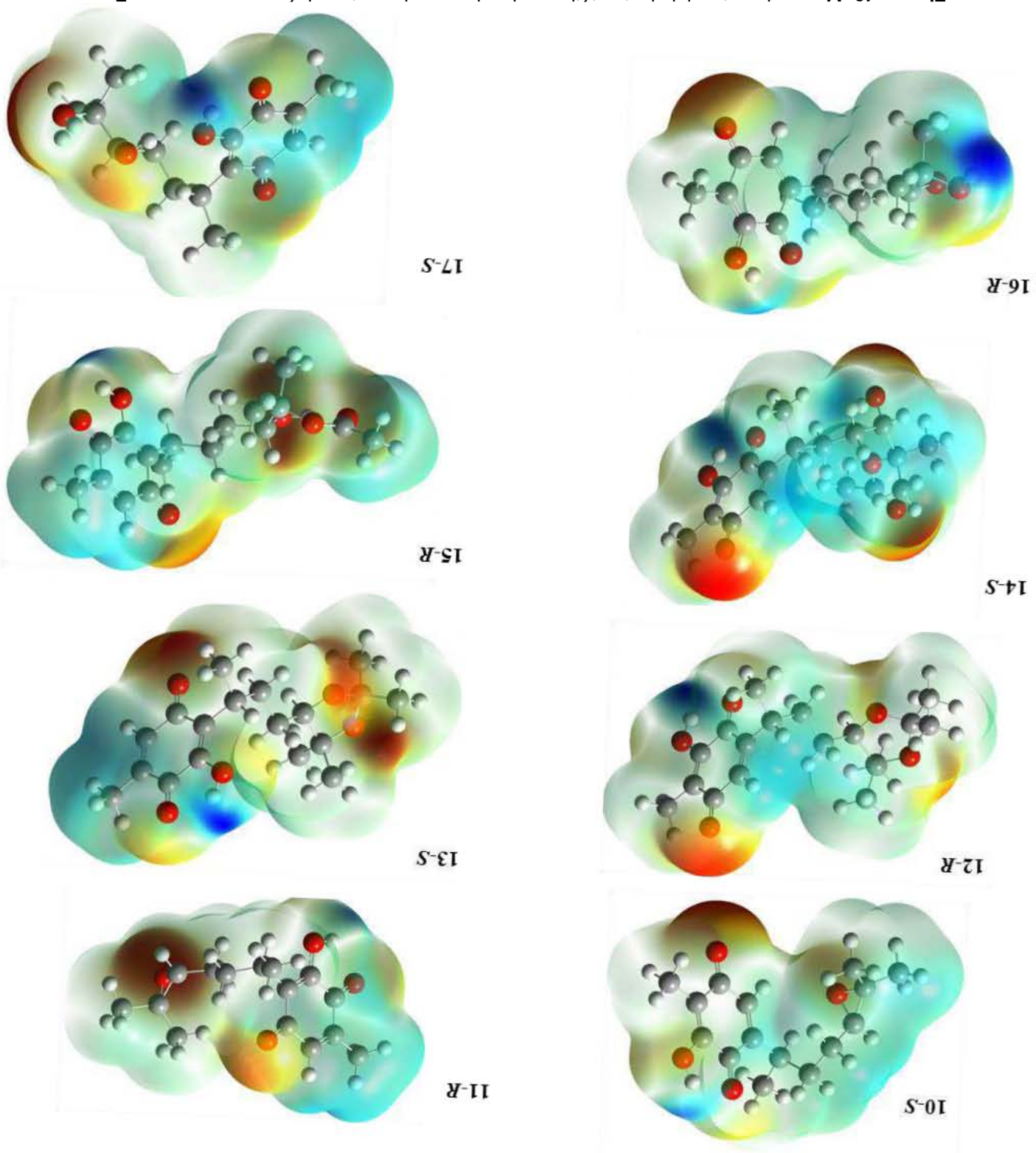
En este sentido, se determinaron estos parámetros químicos cuánticos correspondientes a los compuestos de interés, valores que se muestran en la Figura 47 (b). La electrofilia de las moléculas de interés mostró que el diol *R* de la perezona y el epóxido de la perezona (*R*) serían más reactivas al ataque de un nucleófilo en comparación con los otros sistemas de estudio, seguidos del diol monoacetilado de la isoperezona (*S*). Además, las estructuras que presentan menor electrofilia serían el diol monoacetilado de la isoperezona (*R*) seguido del epóxido (*R*) de la isoperezona. Lo anterior es congruente con la citotoxicidad presentada por dichas moléculas. En forma complementaria a los resultados anteriormente señalados se obtuvieron las superficies de densidad electrónica para los orbitales moleculares LUMO de las moléculas estudiadas, y se muestran en las Figuras 48.

En la Figura 48, se muestra el estereoisómero de cada producto cuyo carácter electrofílico fue mayor, es decir un menor valor de energía en LUMO. Con respecto a los orbitales LUMO, se ubicaron alrededor del anillo de quinona; resultado atribuido tanto a los efectos inductivos como de resonancia del grupo carbonilo conjugado que permite un ataque nucleofílico, en otras palabras, el sustrato actúa como electrófilo.

#### V.5.5.2. Mapas de potencial electrostático molecular

Como se ha mencionado anteriormente, el mapa de potencial electrostático es una propiedad utilizada para predecir apropiadamente la reactividad molecular, así como realizar estudios de la interacción entre los compuestos de interés y las moléculas de origen biológico<sup>179</sup>; Así mismo se ha contemplado como un indicador de las regiones de reactividad de una molécula objetivo, por lo tanto, se han empleado para estudiar las interacciones entre donador de electrones y aceptores de electrones; por ejemplo, un fármaco y los residuos de aminoácidos del receptor celular<sup>180</sup>.

Figura 49. Mapas de potencial electrostático molecular para los estereoisómeros con menor E<sub>LUMO</sub> de los compuestos 10-17.





Consecuentemente, se calculó dicha propiedad para las ocho moléculas objetivo con sus correspondientes estereoisómeros usando el nivel de teoría B3LYP / 6-311 ++ G (d, p), encontrándose los valores en un rango de color de +6.6 E-2 (azul intenso) a -6.6 E-2 (rojo intenso). Los mapas correspondientes se muestran en la Figura 49. En dicha imagen se observa en color rojo los sitios nucleófilos, mientras que en color azul los sitios electrofílicos. Se puede ver que las distribuciones señalan en todos los casos, al anillo de la quinona como la región en la que se presenta una mayor densidad electrónica, colocada en el átomo de oxígeno de los grupos carbonilos (intensa coloración roja) así mismo, los átomos de oxígeno de todas las nuevas funcionalidades generadas mostraron regiones de elevado potencial electrostático; mientras que en los oxígenos de los grupos hidroxilo se presentó una distribución menor, tanto en posición C6, C12 y C13 a consecuencia de puentes de hidrógeno intramoleculares. Por otro lado, la mayoría de las deficiencias electrónicas en las moléculas objetivo se colocan en el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo, tanto el unido al anillo de la quinona, como aquellos nuevos grupos hidroxilo generados en C12-C13. En consecuencia, es importante destacar que estos átomos podrían participar en interacciones no covalentes con algunos residuos en los receptores, es decir, en el caso de puentes de hidrógeno los oxígenos podrán actuar como aceptores mientras que los hidrógenos de los hidroxilos como formadores de puentes de hidrógeno.

#### V.5.5.3 Predicción de propiedades toxicológicas y fisicoquímica

Los derivados de la perezona e isoperezona obtenidos presentaron un efecto citotóxico en células de cáncer de mama humano, por lo que la predicción de los riesgos de efectos nocivos y algunas propiedades fisicoquímicas resultan significativas para su posible uso como fármacos. Dichas predicciones se realizaron utilizando OSIRIS-DATA-WARRIOR<sup>160,245-247</sup>, los resultados correspondientes comparados con **1** y **2** se resumen en la Tabla 31.

El predictor del riesgo de toxicidad muestra que los compuestos con menos probabilidad de efectos indeseables son **12**, **13**, **16** y **17**, que no presentan riesgos

de mutagenicidad, tumorigenicidad, efectos irritantes o reproductivos; en comparación con **1 y 2** que presentan alto riesgo de efecto irritante, mientras que **14 y 15** presentan baja probabilidad. En el caso de los epóxidos **10 y 11** los resultados quimio-informáticos indican una baja probabilidad de efectos tumorigénicos y una alta probabilidad de efectos reproductivos.

**Tabla 29.** Propiedades toxicológicas y fisicoquímicas determinadas con OSIRIS de **10-17**

		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>
<b>Riesgo Toxicológico</b>	Mutagénico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Tumorigénico	N	N	L	L	N	N	N	N	N	N
	Efectos reproductivos	N	N	H	H	N	N	N	N	N	N
	Irritantante	H	H	N	N	N	N	L	L	N	N
	Índice de forma	0.61	0.61	0.58	A0.58	0.52	0.52	0.57	0.57	0.55	0.55
	Flexibilidad Molecular	0.61	0.64	0.57	0.59	0.56	0.57	0.69	0.70	0.67	0.69
	Complejidad Molecular	0.75	0.74	0.77	0.76	0.81	0.80	0.78	0.77	0.76	0.75
<b>Propiedades Fisicoquímicas</b>	<i>cLogP</i>	3.31	3.31	1.88	1.88	2.49	2.49	1.78	1.78	1.29	1.29
	<i>LogS</i>	-2.58	-2.58	-2.48	-2.48	-2.97	-2.97	-2.41	-2.41	-2.00	-2.00
	Área superficial Polar	54.37	54.37	66.90	66.90	72.83	72.83	100.9	100.90	94.83	94.83
	Druglikeness	-3.70	-1.77	-2.54	-0.57	-2.15	-0.19	-5.18	-3.23	-2.11	-0.15
	Drug score	0.265	0.296	0.236	0.299	0.474	0.624	0.360	0.372	0.516	0.682
	Aceptores de H	3	3	4	4	5	5	6	6	5	5
	Donadores de H	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3

**N=** sin riesgo, **M=** riesgo medio, **H=** riesgo alto.

Los efectos adversos pronosticados para los epóxidos **10** y **11**, resultan coherentes con algunos informes que se presentan en la literatura, los cuales indican que los epóxidos pueden provocar daño sobre el DNA, lo cual puede desembocar en la generación de tumores<sup>248-250</sup> o daño al material genético de los gametos<sup>251,252</sup> y en consecuencia problemas reproductivos. Así mismo, es importante señalar que las moléculas **12-17** mejoraron las propiedades toxicológicas en contraste de sus materias primas **1 y 2** según la metodología empleada, siendo determinado solo en **14 y 15** una baja probabilidad de efecto irritante, en comparación de la alta probabilidad de efecto irritante mostrado por las materias primas. Los resultados además nos confirman que las modificaciones en el doble enlace C12-C13 mejoran las propiedades de la molécula tal como se estableció en secciones anteriores. De forma complementaria se determinaron el índice de forma, la flexibilidad molecular y complejidad molecular. El primer parámetro indica que las moléculas estudiadas presentan una geometría lineal ( $>0.5$ ), así mismo, todas las moléculas presentan una alta flexibilidad y complejidad molecular ( $>0.5$ ).

Adicionalmente, algunas propiedades fisicoquímicas de los compuestos se estimaron, como *cLogP*, propiedad que describe la hidrofobicidad de la molécula. El rango de valores para esta propiedad, varió de 1.29 a 2.49, en los compuestos estudiados ( $<5$ )<sup>158,159</sup>. En este sentido, los valores de las moléculas objetivo son menores que 5, lo que indica una probabilidad razonable de ser bien absorbidas<sup>160,161</sup>, donde **16** y **17** presentan los valores más bajos (1.29), seguidos por **14** y **15** (1.79), mientras que los menos solubles y más permeable a la membrana celular fueron **12** y **13** (2.49), los compuestos con mayores valores de *cLogP* correspondieron a los compuestos con mayor actividad citotóxica, lo que podría estar relacionado directamente a una mayor permeabilidad por la membrana; Consecuentemente, es conveniente resaltar que en todos los casos los valores de coeficiente de partición disminuyeron en contraste con las materias primas.

La solubilidad del fármaco (expresada como *Log S*) es un factor importante para describir también el proceso de absorción. La mala solubilidad conduce a una

mala absorción y biodisponibilidad<sup>158,159,161,162</sup>. Los fármacos comerciales comunes tienen valores de *Log S* mayores a -4. Al respecto, también se observa que **16** y **17** (-2.00) muestran una mejor solubilidad; indicando que estos compuestos poseen una mejor absorción, movimiento en el torrente sanguíneo y una mejor eliminación por el tracto urinario. Los compuestos con menor solubilidad fueron **12 y 13** (-2.97) siendo consistentes con los valores de *cLogP* que confirman una menor afinidad al agua en comparación con el resto de los compuestos, incluyendo a las materias primas. Otro aspecto importante es que, salvo los compuestos anteriormente señalados, todos aumentaron su solubilidad en agua al modificar el doble enlace C12-C3, tal como se esperaba al desarrollar la estrategia sintética.

En relación al peso molecular, todos los compuestos tienen valores mayores de 160 y menores de 500 Da, lo cual cumple con la regla de cinco de Lipinski<sup>162</sup>. Además, otro buen descriptor de la absorción es el área superficial polar topológica (TPSA por su acrónimo en inglés), que incluye la absorción intestinal, la biodisponibilidad, la permeabilidad de Caco-2 y la penetración de la barrera hematoencefálica<sup>163</sup>. El valor de TPSA para todos los casos fue menor a 140, indicando que las moléculas presentan un adecuado valor para la penetración por membrana celular; adicionalmente se puede observar que solo las materias primas poseen un valor adecuado para la penetración por barrera hematoencefálica (<60 Å<sup>2</sup>)<sup>163</sup>.

El puntaje de fármaco o Drug Score por su nombre en inglés (DS) es la combinación de la similitud de la molécula de estudio con un fármaco (Drug-likeness), *clogP*, *logS*, peso molecular y riesgos de toxicidad en un valor práctico que podría usarse para juzgar el potencial del compuesto para calificar como medicamento<sup>181</sup>. Al respecto, **17** presentó el mejor puntaje como fármaco, seguido de **13**, el cual como se mencionó es uno de los compuestos más activos biológicamente contra las células cancerosas, mientras que **10** y **11** presentaron el valor menor. El menor puntaje del fármaco pronosticado para **10** y **11** fue a consecuencia de la alta probabilidad de efecto reproductivo y la baja probabilidad de efecto tumorigénico en estas moléculas<sup>253,254</sup>.

Finalmente y en referencia a los aceptores así como los donadores en las interacciones puentes de hidrógeno, Lipinski en su regla de los 5 indica que debe existir un número menor a 5 donadores además de menos de 10 aceptores para que la estructura no presente problemas de biodisponibilidad, este hecho se cumple todas las moléculas sintetizadas, lo que aunado a lo anteriormente señalado permite considerar a varias de ellas para posibles estudios in vivo<sup>161,162</sup>.

#### V.5.5.4. Estudio de acoplamiento molecular en la vía de apoptosis

Los resultados de la citotoxicidad de las moléculas sintetizadas mostraron en las células cancerosas, una morfología que indica una posible vía de apoptosis. También es conveniente resaltar que en trabajos reportados anteriormente, se muestra que la perezona y la isoperezona<sup>76</sup> activan la vía de la apoptosis y que algunos otros derivados podrían también activarlas. Además, se han realizado los estudios correspondientes del acoplamiento molecular, presentado previamente en este trabajo, para la perezona e isoperezona<sup>187</sup> con proteínas implicadas en la apoptosis. En este sentido, se realizó el estudio de acoplamiento molecular de los compuestos estudiados con proteínas participantes en la vía de la apoptosis y <sup>188-</sup><sup>190</sup>. Adicionalmente, teniendo en cuenta que dentro de las moléculas efectoras de la apoptosis se encuentran las caspasas 3 y 9, en el presente estudio se evaluó la interacción entre los productos sintetizados y la primera de estas, a fin de dar una explicación a su efecto citotóxico y sus diferencias en actividad.

Los resultados del acoplamiento molecular de los compuestos objetivo con la caspasa-3 se muestran en la Tabla 32, donde se presenta la energía de interacción entre la proteína y la molécula objetivo, considerando cada uno de sus estereoisómeros.

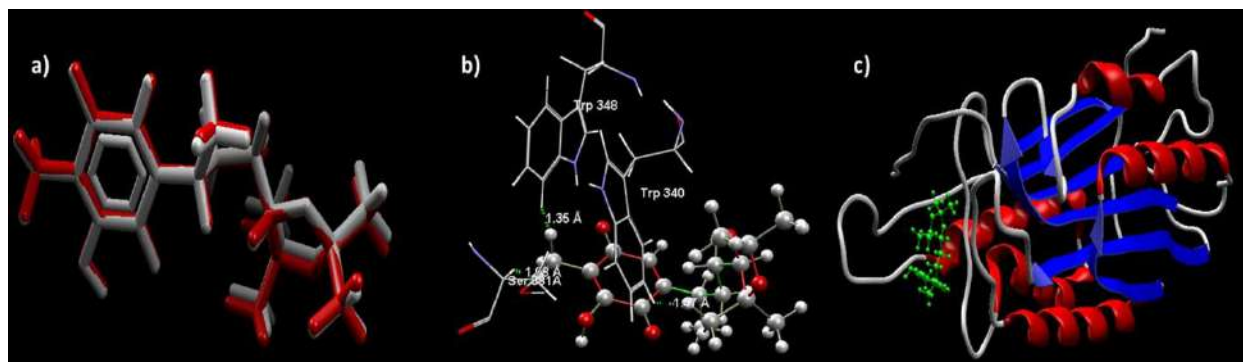
En primera instancia se puede señalar que, según los valores obtenidos, los nuevos derivados presentaron una mayor energía de interacción que la perezona; así mismo se observaron que las moléculas que mayor energía presentaron fueron **13-R** (-104.58) y **10-R** (-100.178), mientras que las moléculas que menor interacción

mostraron con la caspasa-3 fueron **11** en ambos estereoisómeros (-79.910) y también **17-R** (-81.9483).

**Tabla 30.** Valores de energía de interacción entre el ligando y la proteína (score).

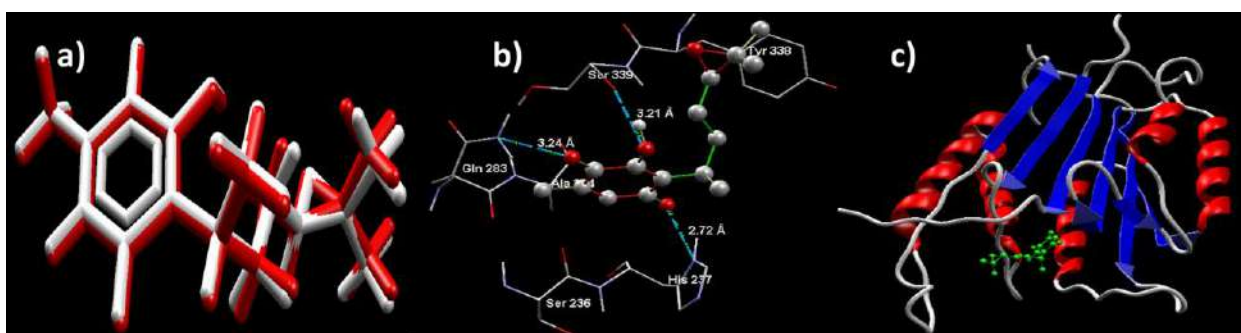
Molécula	Score	Molécula	Score
Perezona	-77.8897	Diol monoacetilado de la perezona <i>R</i>	-93.1109
Cetal isoperezona <i>R</i>	-104.58	Diol monoacetilado de la perezona <i>S</i>	-86.6688
Cetal isoperezona <i>S</i>	-97.026	Diolisoperezona <i>S</i>	-89.1414
Cetal perezona <i>R</i>	-93.9125	Diol perezona <i>R</i>	-92.1014
Cetal perezona <i>S</i>	-94.809	Diol perezona <i>S</i>	-88.5214
Diolisoperezona <i>R</i>	-81.9483	Epóxido isoperezona <i>R</i> y <i>S</i>	-79.9015
Diol monoacetilado de la isoperezona <i>R</i>	-87.4063	Epóxido de perezona <i>R</i>	-100.178
Diol monoacetilado de la isoperezona <i>S</i>	-86.6674	Epóxido de perezona <i>S</i>	-87.6058

En relación con lo señalado anteriormente, el epóxido de la perezona fue el que experimentalmente mayor actividad biológica presentó, seguido del acetal de la isoperezona, lo anterior resulta de gran relevancia ya que los resultados teóricos son coherentes con los resultados de tipo experimental y nos permite explicar las diferencias de citotoxicidad. En el caso del **13-R** los modelos de acoplamiento molecular propuesto se presentan en la Figura 50.



**Figura 50.** Modelo de acoplamiento molecular de **13-R**: **a)** **13-R** y la pose (gris) en superposición con el ligando (rojo). **b)** Interacción del compuesto **13-R** y 1-PAU, tres interacciones con los residuos de la proteína. **c)** Estructura secundaria, ligando (verde) en el medio de la proteína.

En la Figura 50 podemos observar una excelente superposición entre la pose de la molécula objetivo y la geometría del ligante. Así mismo indica que el modo de unión de la molécula con la proteína es mediante 3 interacciones con los residuos, la primera entre el anillo indólico del triptófano 348 con el metilo C-7 a 1.35 Å, la segunda interacción se presenta de igual manera entre C-7 con el residuo Ser381 a una distancia de 1.08 Å, y una tercera interacción similar a la descrita al inicio entre el metilo C-17 con el anillo aromático de Trp 1.47 Å. Estas interacciones se proponen de tipo electrostático, ya que en los mapas de potencial electrostático se observan que los metilos antes señalados son zonas de bajo potencial, además de presentarse parte del orbital LUMO, mientras que como se vio en la sección V.4 los residuos indólicos dado su sistema pi presentan una excedencia electrónica lo que permitiría la interacción.



**Figura 51.** Modelo de acoplamiento molecular de **10-R**: **a)** **10-R** y la pose (gris) en superposición con el ligando (rojo). **b)** Interacción del compuesto **10-R** y 1-PAU, tres interacciones con los residuos de la proteína. **c)** Estructura secundaria, ligando (verde) en el medio de la proteína.

En el epóxido **10-R**, también se observa en el modo de interacción ligando-receptor, que la geometría de la molécula y la pose del mismo revelan un excelente solapamiento (Figura 51a), así mismo se observa que la interacción de este compuesto con la proteína está regida también por tres interacciones de tipo puente de hidrógeno, la primer establecida entre el hidroxilo de la quinona y el grupo hidroxilo de la serina 339 como donador a una distancia de 3.21 Å, la segunda interacción de tipo puente de hidrógeno se establece entre el grupo carbonilo de C-4 el grupo amido de la glutamina 283 a 3.24 Å, y finalmente un puente de hidrógeno entre el carbonilo de C-1 de la quinona y el residuo de Histidina 237 a una distancia

de 2.72 Å. Estas interacciones pueden catalogarse como puentes de hidrógeno débiles, motivo por el cual su energía de interacción es menor que la de **13-R**.

El acetónido de la perezona es la molécula en tercer lugar de actividad citotóxica (IC<sub>50</sub> de 24 µg/ml) y de igual manera sus estereoisómeros corresponden a este orden en interacción entre proteína-ligando, con valores de score -93.9125 y -94.809 a.u., el modelo de interacción con la caspasa es mostrado en la Figura 52. También observa que, la superposición entre la geometría de la molécula objetivo y la pose del ligando no es excelente, lo que puede ser la causa de la disminución en el acoplamiento en comparación de **10-R** y **13-R**.

El modo de interacción (Figura 52) entre la proteína y el ligando se establece por cuatro puentes de hidrógeno, dos de ellos entre el grupo carbonilo de C-1 con el residuo de serina 343, siendo este residuo el donador con el hidroxilo de la serina y los grupos N-H del en el enlace peptídico, cuyas distancias de establecen a 3.31 y 2.83 Å. El tercer puente de hidrógeno se establece entre el grupo hidroxilo de la quinona y el grupo carbonilo del residuo de fenilalanina 381, con una distancia de 2.65 Å. finalmente, el último puente se forma entre uno de los oxígenos del acetónido y el grupo indolilo del Trp 528, con una longitud de enlace de 2.62 Å. por lo que se establece que la interacción se presenta a través de enlaces de hidrógeno débiles dadas sus distancias.

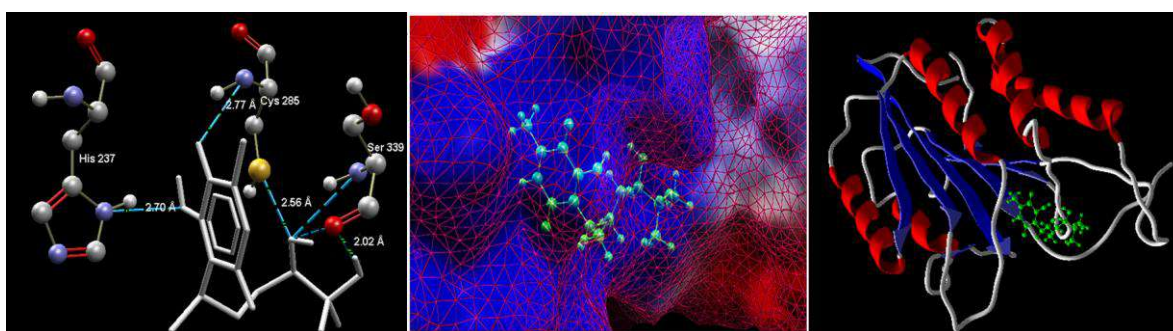


**Figura 52.** Modelo de acoplamiento molecular de **12-R**: **a)** **12-R** y la pose (gris) en superposición con el ligando (rojo). **b)** Interacción del compuesto **12-R** y 1-PAU, tres interacciones con los residuos de la proteína. **c)** Estructura secundaria, ligando (verde) en el medio de la proteína.



Con relación a la actividad biológica, el siguiente compuesto en orden de actividad es el diol de la perezona con un  $IC_{50}$  de  $28.35 \mu\text{g/mL}$ , al respecto el estudio teórico mostró concordancia con los resultados experimentales, dado que ambos estereoisómeros presentaron los siguientes valores en orden de interacción con la proteína (score de  $-94.809$  y  $-93.9125$  u.a).

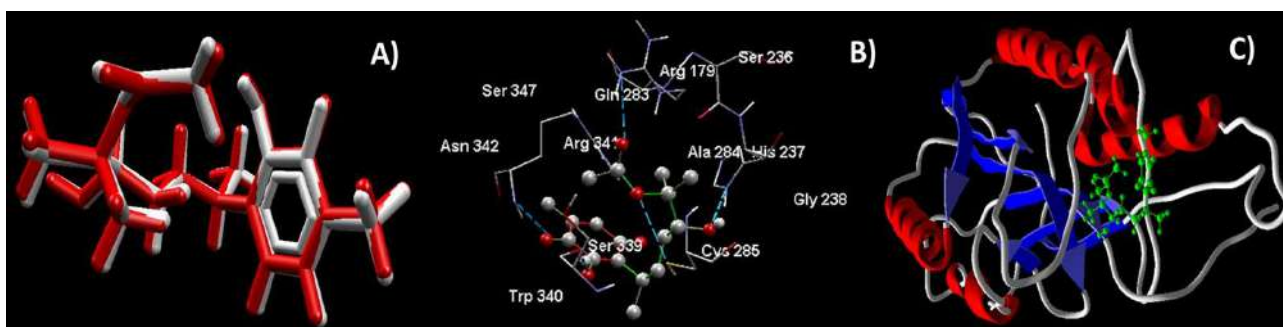
El modelo de interacción (Figura 53) para **16-R** se propone mediante la formación de seis puentes de hidrógeno, cuatro establecidos en la región del diol C12-C13 y dos más en el anillo quinónico.



**Figura 53.** Modelo de acoplamiento molecular de **16-R**: **a)** Interacción del compuesto **16-R** y 1-PAU, tres interacciones con los residuos de la proteína. **b)** superficie de potencial en la proteína y su interacción con el ligando. **c)** Estructura secundaria, ligando (verde) en el medio de la proteína.

En el caso de la región del diol, los puentes de hidrógenos se efectúan con los residuos de Cys 285 además del residuo de Ser 339, dichos enlaces oscilan entre  $2.02 \text{ \AA}$  y  $2.56 \text{ \AA}$ . Siendo más fuertes que los establecidos en con el anillo quinónico, de los cuales, el primero se forma con el residuo de histidina 237, el cual mediante el anillo de imidazol funge como donador mientras que el grupo hidroxilo del derivado de la perezona como aceptor. El segundo puente de hidrógeno se establece entre el residuo de cisteína 285 como donador y el grupo carbonilo en C4 de la quinona como aceptor. Es importante señalar que el diol monoacetilado de la perezona presentó valores similares en energía de interacción que la presentada por **16**; sin embargo, en orden de citotoxicidad resultó de los menos activos ( $33 \mu\text{g/ml}$ ) lo que puede atribuirse según las propiedades calculadas en OSIRIS Data

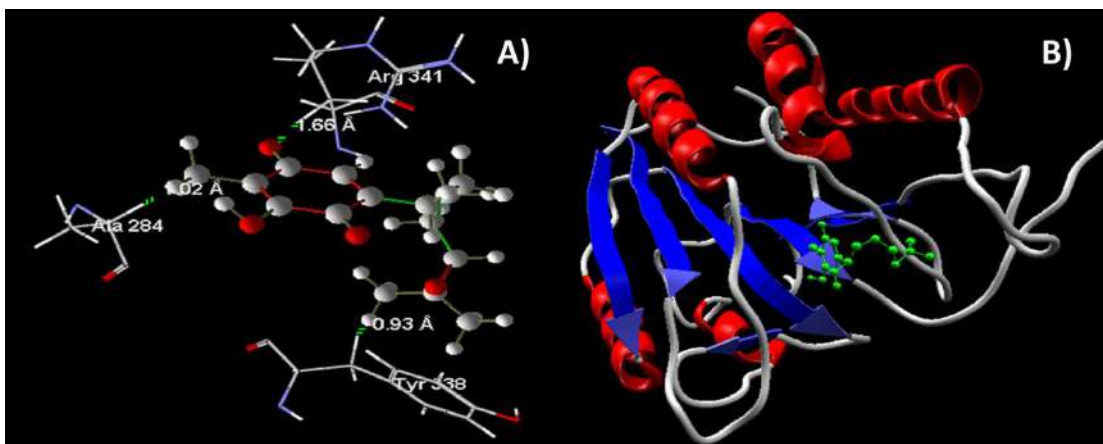
Warrior a una menor solubilidad y un mayor valor de PTSA, lo que reduce se biodisponibilidad, así como la penetración a través de la membrana.



**Figura 54.** Modelo de acoplamiento molecular de **14-R**: **a)** **14-R** y la pose (gris) en superposición con el ligando (rojo). **b)** Interacción del compuesto **14-R** y 1-PAU, tres interacciones con los residuos de la proteína. **c)** Estructura secundaria, ligando (verde) en el medio de la proteína.

Con relación a **14-R**, la propuesta de unión con la caspasa 3 se muestra en la Figura 54. En los resultados se observa un excelente superposición entre la geometría de la molécula y la pose del ligando, estableciéndose 4 puentes de hidrógeno, el primero entre los hidrógenos del grupo amido de la asparagina 342 con el carbonilo C4 del anillo de la perezona; mientras que los tres hidrógenos restantes se establecen dos con el grupo acetilo C13, uno con entre el grupo carbonilo C16 y un residuo de glutamina 283 como donador, mientras que el segundo se establece entre un residuo de Cys 285 que actúa como donador. Finalmente, el último puente de hidrógeno se establece entre el hidroxilo de C12 como donador y el residuo de histidina 237 como aceptor.

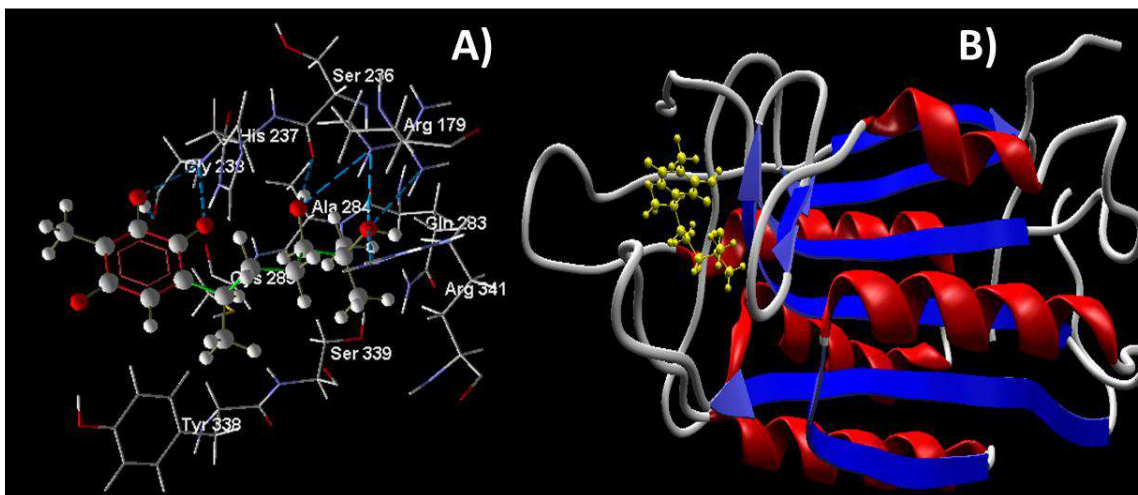
El epóxido de la isoperezona presentó una menor actividad que el diol de la perezona (30  $\mu\text{g/ml}$ ), esto se explica mediante la baja energía de interacción entre la proteína y el ligando (score=-79.9015), observándose que solo se forma un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo C1 de la quinona y un residuo de arginina 34, así mismo se observan dos interacciones de tipo Vander Waals con los residuos de Ala284 y Tyr338 a distancias de 1.02 y 0.93 Å respectivamente.



**Figura 55.** Modelo de acoplamiento molecular de **11-R**: **a)** Interacción del compuesto **11-R** y 1-PAU, tres interacciones con los residuos de la proteína. **c)** Estructura secundaria, ligando (verde) en el medio de la proteína.

Para finalizar el estudio de acoplamiento, la molécula menos activa resulto ser el diol de la isoperezona, el cual presento un valor de energía de interacción de -86.6674 u.a., siendo coherente con las determinaciones teóricas, en las cuales se marca a esta molécula como una con mayor *GAP*, es decir más estable. Otro aspecto que notar, es que presenta una energía de interacción mayor que la del epóxido de la isoperezona, sin embargo, su actividad es menor: esto puede ser explicado por los efectos nocivos predichos para el epóxido lo cual podría estar incrementando la actividad citotóxica ya que en este estudio de acoplamiento solo se está considerando la apoptosis y no otras vías de muerte celular.

El modelo de interacción propuesto (Figura 56) consiste en cuatro puentes de hidrógeno entre el diol de la isoperezona y la proteína, siendo establecido uno de ellos entre el grupo hidroxilo de la quinona y un residuo de Glicina 238; mientras que los otros dos puentes de hidrógeno se establecen entre el Arginina 179 y ambos grupos hidroxilo del diol; así mismo, un cuarto puente de hidrógeno se establece entre el hidroxilo en C12 y el grupo carbonilo del residuo de serina 236. La presencia de estas interacciones son las que brindan mejor acoplamiento a esta molécula.



**Figura 56.** Modelo de acoplamiento molecular de **17-R**: a) Interacción del compuesto **17-R** y 1-PAU, tres interacciones con los residuos de la proteína. c) Estructura secundaria, ligando (verde) en el medio de la proteína.

#### V.5.5.5. Predicción de propiedades farmacológicas y metabólicas

Un estudio químico-informático adicional se realizó para los compuestos de interés, efectuando la predicción de sus propiedades de absorción, metabólicas y de excreción en humanos, considerando el uso potencial de las moléculas estudiadas como fármacos. En este sentido se estudió el comportamiento en diferentes modelos de absorción y modelos de excreción utilizando la metodología ADMETSAR, Resumiéndose los resultados en la Tabla 33 para los derivados de la perezona y 34 para los de la isoperezona, ambas presente en la sección de anexos. Las predicciones propuestas para todos derivados revelan absorción intestinal humana con valores de probabilidad mayores a 0.700, presentándose mejores valores de probabilidad para los derivados de la isoperezona. Con respecto a la barrera hematoencefálica, todos los compuestos muestran valores de probabilidad de absorción mayores a 0.700, siendo las moléculas con mayor probabilidad **10**, **12** y **13** (0.913, 0.907 y 0.907) así mismo **16** presentó la menor probabilidad.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos con OSIRIS DATA WARRIOR, que indicaron que los compuestos con menor solubilidad en agua fueron **10**, **12** y **13** (valores de  $\text{Log } S$  de -2.48, -2.96 y -2.96) en comparación con las otras moléculas analizadas, así mismo **16** y **17** que presentaron los valores de solubilidad

más elevados fueron los que menor probabilidad de absorción presentaron; Además, **16 y 17** son los compuesto más polares, ya que la estructura contiene dos grupos hidroxilo adicionales al presentado por la quinona sin modificar. Con relación a la permeabilidad del fármaco en el cultivo de células monocapa de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2), estándar usado ampliamente en el descubrimiento de fármacos y recomendado por la FDA<sup>193-195</sup>, la predicción para las moléculas objetivo muestra permeabilidad en el caso de **10,11,16 y 17**.

Con respecto a las glicoproteínas P, proteínas involucradas en la eliminación de xenotoxinas contra gradientes de concentración pronunciados, tal como se señaló anteriormente, todos los derivados mostraron buena probabilidad de ser sustratos, presentando la mayor probabilidad **16 y 17**. Además resulta relevante esta propiedad ya que, las glicoproteínas P juegan un papel importante en el transporte de pequeñas moléculas en áreas vitales y está presente en las células cancerosas de resistencia a múltiples fármacos, siendo crucial su inhibición para superar este tipo de resistencia<sup>196,197</sup>.

En relación con estas moléculas, todas resultaron ser sustratos de la glicoproteína P, por lo cual se espera que posean una buena biodisponibilidad. El comportamiento como sustrato de **10-17** está relacionado a que sus estructuras no cumplen la "Regla de cuatro", que señala que compuestos con menos de 400 Da peso molecular, no más de cuatro átomos de nitrógeno y / u oxígeno y una base con pKa menor a 8 resultara ser un no-sustrato<sup>198</sup>, puesto que todas las estructuras contrariamente a poseer una masa menor de 400 Da contienen en su estructura más de cuatro átomos de oxígeno . La predicción del carácter inhibidor de **10-17** sobre la P-glicoproteína I y II indicó que **11,13 y 15** son inhibidores de la glicoproteína I, mientras que **10-15** solo actúan como inhibidor en la glicoproteína II. En el caso de **16 y 17** no presentaron carácter inhibitorio en las glicoproteínas P. Finalmente, ninguna de las moléculas presentó efecto inhibitorio sobre el transportador de catión orgánico renal.

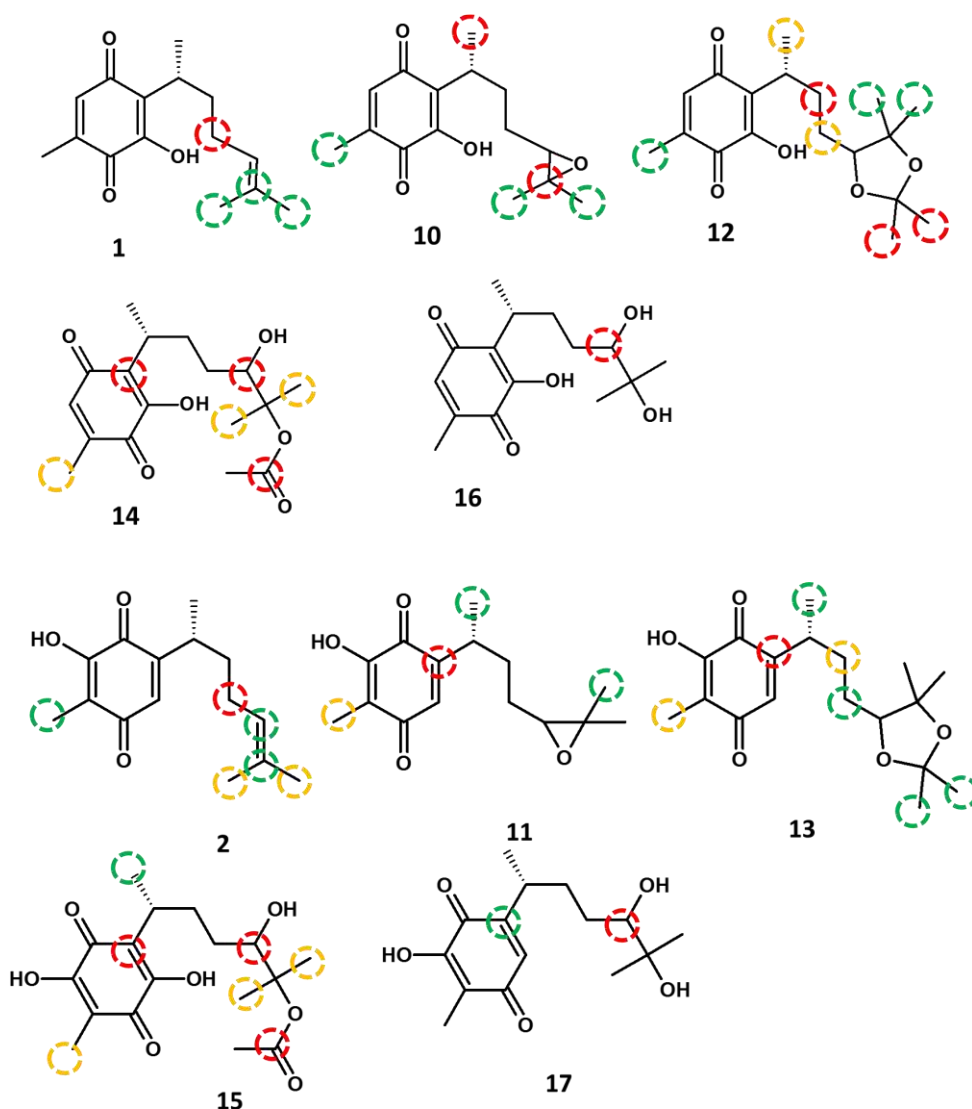
Otros resultados interesantes fueron la predicción del metabolismo de las moléculas objetivo utilizando la metodología de Admetsat y metaprint2D (Tabla 35 y 36 presentes en la sección de anexos). En primer lugar, se evaluó el comportamiento como sustrato o inhibidor de las moléculas sintetizadas en las isoformas más importantes de los citocromos P450 participantes del metabolismo de fármacos terapéuticos, ya señalado previamente. Durante la biotransformación de los fármacos, las moléculas se descomponen y / o los convierten en moléculas más solubles, que desempeñan un papel importante en la acción farmacocinética y terapéutica de los fármacos.

La evaluación de las moléculas objetivo como sustratos de CYP, muestra que **10-17** no son sustratos de las isoformas 2C9 y 2D6 del citocromo P450. Los resultados obtenidos para estos citocromos se pueden explicar considerando la estructura que presentan generalmente sus sustratos; en el caso de los sustratos CYP2C9 poseen propiedades débilmente ácidas y múltiples anillos aromáticos<sup>199</sup>. Todas las moléculas presentan un grupo hidroxilo débilmente ácido, sin embargo, no presentan anillos aromáticos. Considerando al CYP 2D6, la característica principal de sus sustratos es la presencia de un átomo de nitrógeno básico colocado a 5 Å o 7 Å del sitio de oxidación<sup>200,201</sup>, lo que excluiría a las moléculas de estudio ya que no poseen átomos de nitrógeno.

La predicción del comportamiento del sustrato en el CYP3A4 indicó que todas las moléculas podrían ser sustratos, ya que estas moléculas cumplen la característica del modelo de farmacóforo para este citocromo. Las moléculas **6** y **7** presentan, considerando el MEP y la carga, dos aceptores de enlace de hidrógeno (O1 y O4), un donador de enlace de hidrógeno (OH-3, OH-6, OH-12 u OH-13) y una región hidrófoba (cadena alifática para C8 a C15),(*vide supra*). Además, una propiedad metabólica importante a considerar es la capacidad de estos compuestos para inhibir las isoformas de CYP, que es un efecto secundario adverso. En este sentido se predice un comportamiento no inhibitorio por parte de las moléculas objetivo.

V.5.5.6. Metabolismo de los derivados de la perezona e isoperezona de la Fase I humana

Para concluir el presente estudio, se llevó a cabo el estudio de los posibles sitios propicios al metabolismo de la fase I (definido básicamente como reacciones de hidroxilación, oxidación, epoxidación o eliminación) de las moléculas objetivo, mediante el uso de MetaPrint2D presente en la aplicación Bioclipse, la cual es una herramienta que se basa en datos históricos de metabolismo de diversas moléculas.<sup>194,204,255</sup>. Los resultados se muestran en la Figura 57.



**Figura 57.** Sitios de reacción para el metabolismo primario de las moléculas 10-17.

El color que resalta a un átomo, como ya se comentó, indica su proporción de ocurrencia normalizada (NOR por sus siglas en inglés). Una NOR alta indica un sitio o metabolito reportado con mayor frecuencia en la base de datos de metabolitos del programa. El color rojo indica valores altos de NOR (de 0.66 a 1), el color naranja designa valores entre 0.33 y 0.66, el color verde indica un rango de valores NOR de 0.15 a 0.33, color blanco, valores de rango de 0.00 a 0.15 y el gris denota falta de datos.

En el caso de los derivados de **10-15** mostraron de manera recurrente a los carbonos 14 y 15 como centros de metabolismo, con NOR que van de 0.15 a 0.66 tanto para los derivados de la perezona como isoperezona.

Con base a otros resultados y algunos trabajos publicados en la literatura se puede proponer que estos carbonos sufran una hidroxilación e incluso su transformación a grupos carboxilo, lo mismo que puede ser propuesto para C16 y C17 para **12 y 13**.

Otro comportamiento constante señalado para los derivados de la isoperezona es la reactividad en posición C2, lo cual permite suponer una epoxidación en ese doble enlace de la quinona, este sitio posee en general una NOR elevada; dicha epoxidación no es posible cuando en la posición C3 está el hidroxilo como es el caso de la perezona en la cual no se presenta este sitio reactivo.

Adicionalmente, se puede observar que C7 en los derivados **10-15** también muestra un NOR de moderado a bajo (naranja a verde), dicho carbono es un carbono alílico por lo que presenta alta susceptibilidad a hidroxilarse por vía radicalaria.

Consecuentemente, también se observa que el carbono C12 presenta un NOR elevado en **14-17**, dado que ese carbono posee un grupo hidroxilo que puede ser oxidado a compuesto carbonílico.

Así mismo, resulta importante señalar que los dioles **16 y 17** fueron las moléculas que menos sitios metabólicos de la fase I presentaron, lo que es consistente dado que son las moléculas con mejor solubilidad en agua estimada,



por lo cual su excreción sería más fácil a comparación del resto de las moléculas. En este sentido, también se puede comentar que las moléculas **12-15** presentaron un gran número de sitios para el metabolismo, lo que también resulta consistente con sus valores de solubilidad.

## CAPÍTULO VI: SECCIÓN EXPERIMENTAL

### VI.1. Materiales, equipos y reactivos

#### VI.1.1. Materiales y Reactivos

Los reactivos: 3,4,5,6-tetrahidro-2-pirimidintiol, Novozym® 435, hidroperóxido de urea al 97%, menadiona, indol,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para solución de tampón fosfato (PBS), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO) fueron adquiridos de la compañía Sigma-Aldrich; éstos se emplearon sin tratamiento previo. El catalizador Tonsil Actisil FF (TAFF) fue adquirido en Tonsil Mexicana S.A. de C.V. Km 7 Carretera alta Puebla-Tlaxcala, Puebla, México, este se mantiene alrededor de 80-110 °C para su activación y posterior uso. El metanol y la acetona anhidros se prepararon de acuerdo al método informado en la literatura<sup>256,257</sup>. Los disolventes, *n*-hexano y AcOEt son grado reactivo, siendo utilizados sin tratamiento previo alguno. Los metabolitos secundarios, perezona y plumbagina, se aislaron de los especímenes vegetales *Acourtia platyphylla* y *Plumbago pulchella* Boiss, respectivamente, de acuerdo con los procedimientos de la literatura<sup>85,86,88,104,121,258</sup>. Las reacciones se monitorearon mediante cromatografía en capa fina (*ccf*) en *n*-hexano / acetato de etilo (80:20) usando láminas de aluminio recubiertas de gel de sílice 60-F254, el revelado correspondiente se logró usando una lámpara UV de 254 nm y vapores de yodo.

Las líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos dérmicos MDA-MB-231 humanos se obtuvieron de ATTC. Las células se cultivaron en el medio modificado de Eagle Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U / ml de penicilina G y 100 µg/l de estreptomicina en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días y las células se usaron en pasos entre dos y cinco.

#### VI.1.2. Equipos

En relación con los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, se realizaron utilizando un espectrómetro Varian Mercury-300 a 300 MHz y 75 MHz para hidrógeno y carbono,

respectivamente, empleando  $\text{CDCl}_3$ , Acetona- $d_6$ , DMSO- $d_6$  como disolventes y TMS como referencia interna. Las multiplicidades se informaron como señal simple (s), señal simple ancha (bs), señal doble (d), señal triple (t) y señal múltiple (m). Los datos de EMIE y HRMS se determinaron usando un espectrómetro de masas JEOL JMS-700 MStation. La composición elemental se calculó dentro de un rango de masa de  $\pm 10$  ppm a partir de la masa medida exacta.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. La síntesis asistida por microondas para los compuestos de interés se realizó usando un equipo de microondas CEM Focused Microwave™ Synthesis System. La irradiación infrarroja cercana se generó utilizando un dispositivo comercial "Flavor-Wave" (1300 W / 110 V / 120 V-60 Hz-220 V / 240 V-60 Hz). En las reacciones promovidas por molienda se utilizó un molino de esferas de alta velocidad Ball Mill PM 100 Retch, con 6 esferas de acero al carbono (peso 23,85 g, 0,39" de diámetro). La temperatura se determinó, para la activación infrarroja, usando un termómetro de infrarrojo (Termómetro Infrarrojo + Tipo K, Extech Instruments, Sigma Aldrich 2509388-1 EA), realizando estas determinaciones dirigiendo el puntero láser al seno de la reacción.

Los cálculos de  $\text{IC}_{50}$  para los productos, se realizaron mediante un análisis estadístico ejecutado en el programa PRISMA. Los cálculos teóricos a nivel cuántico se efectuaron empleando el programa GAUSSIAN09<sup>259</sup>, mientras que los estudios de acoplamiento molecular fueron desarrollados mediante el software Molegro 3.0<sup>260</sup> y visualizados en el programa PyMOL 1.3.

## **VI.2. Extracción de perezona**

### ***VI.2.1 Extracción convencional***

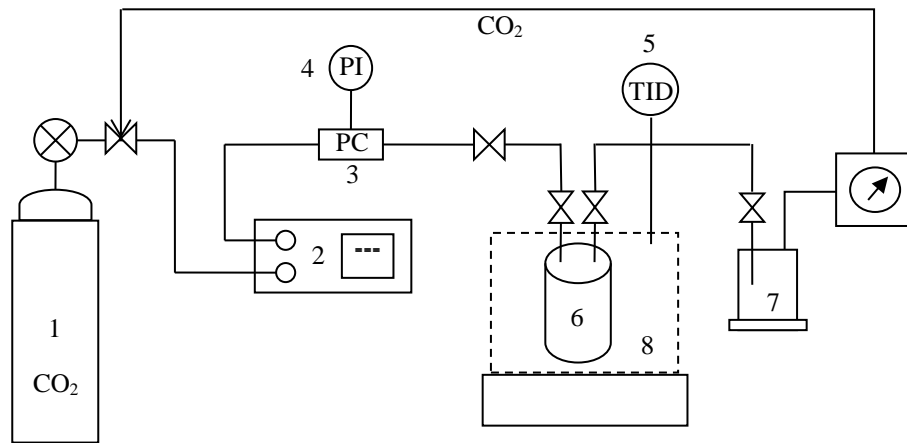
La perezona se aisló de los especímenes vegetales *Acourtia platyphylla* y *Acourtia cordata* según los procedimientos de la literatura<sup>104,261</sup>. En el cual, 5 g de raíces secas y molidas de los especímenes se mezclaron con 30 mL de *n*-hexano y se calentó a reflujo durante 3 h. Después de este tiempo, los extractos se filtraron y se dejaron cristalizar, posteriormente se secaron al vacío.

## **VI.2.2 Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico**

### **VI.2.2.1 Solubilidad de la perezona en CO<sub>2</sub> supercrítico**

En la Figura 58 se muestra de manera esquemática el sistema utilizado para determinar la solubilidad de la perezona en CO<sub>2</sub>SC y realizar las extracciones a partir de las raíces. En la celda de extracción para alta presión (6) se colocó una celdilla de 3cm<sup>3</sup> con tapa porosa la cual contenía 0.1 g de perezona. La celda (6) se introdujo en una cámara de acrílico con recirculación de aire caliente (8), equipada con un controlador de temperatura (5). El aire en la tubería y en la celda de extracción fue desplazado inicialmente con un flujo de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el CO<sub>2</sub> fue comprimido y alimentado mediante una bomba de alta presión (2) (LabAlliance A19284). Cuando en la cámara de recirculación de aire caliente se alcanzó la temperatura de experimentación, la celda se presurizó con CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la presión deseada. El registro de la presión se hizo mediante un transductor (3) (Sensotec THE/7093-03).

Una vez que se alcanzó la presión y la temperatura deseada, el proceso de contacto entre la muestra y el fluido supercrítico se dejó durante 4 horas. Después de este tiempo, el CO<sub>2</sub>SC con la perezona disuelta pasaron a través de una válvula micrométrica climatizada, la cual conecta con la celda de expansión (7) donde se recoge la perezona cristalizada. El flujo de CO<sub>2</sub> utilizado se midió y posteriormente éste se recircula para incrementar la sostenibilidad del proceso. La cantidad de perezona recuperada en la celda de expansión fue determinada por mediciones gravimétricas. La cantidad de perezona disuelta por el CO<sub>2</sub>SC se obtuvo mediante la diferencia entre la masa inicial de la celda de solubilidad con 0.1 g de perezona y la masa final con la perezona no disuelta.



**Figura 58.** Dispositivo construido con tubería de acero inoxidable para determinar la solubilidad de compuestos sólidos con dióxido de carbono supercrítico.

#### VI.2.2.2 Extracción de la perezona con CO<sub>2</sub> supercrítico

Los experimentos típicos de extracción se realizaron utilizando el equipo de la Figura 58. En las celdas de alta presión se colocaron 20 g de raíces secas y molidas del espécimen vegetal *Acourtia platyphylla* y se extrajeron con CO<sub>2</sub>SC usando las condiciones de mayor solubilidad, previamente determinadas. Los tiempos de contacto entre el material vegetal y el fluido supercrítico fueron: 6, 10, 12 y 24 h.

#### **VI.2.3 Extracción con fuentes no convencional**

La extracción se llevó a cabo usando 5 g de raíz seca y molida de los espécimenes vegetales correspondientes, adicionalmente se mezcló con 30 ml de *n*-hexano. Las mezclas se trataron usando y comparando diferentes modos de activación: irradiación infrarroja cercana durante 15-30 minutos a 121 ° C, con ciclos de irradiación de 5 minutos y 5 minutos sin irradiación; irradiación con microondas durante 5-20 minutos a 60 °C y 60 W de potencia, y el tratamiento con ultrasonidos

durante 1 hora a 60 ° C. Después de los tratamientos, los extractos se filtraron y secaron al vacío.

#### **VI.2.4 Cuantificación de perezona en los extractos**

La cuantificación de perezona en los extractos se realizó por determinaciones de RMN  $^1\text{H}$  <sup>262-264</sup>, utilizando como estándar interno 1,4-dinitrobenceno (1,4-DNB). La muestra de análisis se preparó mediante la mezcla de 30 mg de extracto de perezona con 10 mg de 1,4-DNB, disolviendo todo en 0.7 ml de cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). La cantidad de perezona de las muestras se obtuvo mediante la ecuación:

$$C_{perezona} = \frac{I_p}{I_{std}} \times \frac{N_{std}}{N_p} \times \frac{Mw_p}{Mw_{std}} \times C_{std} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde I, N, Mw y C corresponden respectivamente a las integrales, el número de núcleos, el peso molecular y concentración tanto para la perezona (p) como el estándar interno (std). A partir de este valor obtenido de la cantidad de perezona, se obtuvieron dos parámetros: la selectividad, considerada como el contenido de perezona en el extracto y el rendimiento considerado el porcentaje de perezona en la raíz analizada. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Las diferencias de los valores medios se analizaron mediante la prueba ANOVA y la diferencia significativa honesta de Tukey para los resultados, utilizando una significancia estadística a  $p < 0,05$ .

### **VI.3. Isomerización de la perezona**

#### **VI.3.1. Isomerización por el método clásico**

Se colocó en un matraz fondo redondo 4.033 mmol (1 g) de **1** y 4.7325 mmol (550 mg) de 3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-tiol en 60 mL de metanol absoluto, la mezcla se sometió a reflujo por un lapso de 12 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente a presión reducida, y el residuo fue macerado en frío con 100 mL de *n*-hexano, agitándose éste por 30 min. El sólido fue filtrado y el producto

recristalizado en dos ocasiones de *n*-hexano. En esta etapa se obtuvieron cristales amarillos y un rendimiento del 50%, con un punto de fusión de 105-107 °C.

### ***VI.3.2. Isomerización por activación con microondas.***

En un recipiente de vidrio adaptado con un contenedor para hielo seco, se colocaron 2.016 mmol (0.5g) de **1** y 2.37 mmol (220 mg) de 3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-tiol en 6 mL de metanol absoluto, la mezcla se sometió a irradiación con microondas a 600 watts por periodos de 30 segundos durante un tiempo total de 10 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente a presión reducida, y el remanente fue macerado en frío con 50 mL de *n*-hexano, agitándose éste por 30 min. El sólido fue filtrado y el producto recristalizado en dos ocasiones de *n*-hexano. En esta etapa se obtuvieron cristales amarillos y un rendimiento del 30%, con un punto de fusión de 105-107 °C.

### ***VI.3.3. Isomerización por activación triboquímica mediante molienda con esferas a alta velocidad.***

Se colocó en la celdilla de molienda 1.0008 mmol (0.25g) de **1** y 1.185 mmol (110 mg) de 3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-tiol en 6 mL de metanol absoluto, la mezcla se sometió a activación usando 36 esferas de 1/36 pulgadas de acero inoxidable y sometiendo lo anterior a molienda con una velocidad de 500 rpm por un tiempo de 2 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente a presión reducida, y el residuo fue macerado en frío con 50 mL de *n*-hexano agitándose éste por 30 min. El sólido fue filtrado y el producto recristalizado en dos ocasiones de *n*-hexano. En esta etapa se obtuvieron cristales amarillos y un rendimiento del 45%, con un punto de fusión de 105-107 °C.

### ***VI.3.3. Isomerización mediante el uso de dióxido de carbono supercrítico.***

Se colocó en la celda de presurización 2.016 mmol (0.5g) de **1** y 2.37 mmol (220 mg) de 3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-tiol, la mezcla se presurizó a las condiciones de máxima solubilidad de la perzona (50°C, 106 Bar), la mezcla se dejó

en contacto por un lapso de 12 h. Una vez transcurrido el tiempo se liberó la presión y se recuperó el producto en la celda de expansión. El residuo resultante fue macerado en frío con 50 mL de *n*-hexano, agitándose éste por 30 min. El sólido fue filtrado y el producto recristalizado en dos ocasiones de *n*-hexano. En esta etapa se obtuvieron cristales amarillos y un rendimiento del 15%, con un punto de fusión de 105-107 °C.

#### **VI.4. Caracterización fisicoquímica de la perezona e isoperezona**

##### ***VI.4.1 Difracción de rayos X de polvos***

La determinación del patrón de difracción de rayos X de polvos para la perezona e isoperezona, se llevó a cabo empleando un equipo X'pert Pro 2teta de 10 a 80 °, etapa de 0.016° y 30 segundos por etapa. El análisis, refinado e indexado de los patrones se realizó mediante el uso del software en el software X'Pert high score.

##### ***VI.4.2 Calorimetría de barrido diferencial y análisis térmico-gravimétrico***

La caracterización térmica, calorimetría y análisis térmico gravimétrico fueron realizados en un equipo SDTQ 600 TA, en un intervalo de 20 a 800°C usando una rampa de 10°C /min, usando 10 mg de muestra de perezona e isoperezona.

#### **VI.5. Obtención de indolilquinonas por métodos verdes**

##### ***VI.5.1. Experimentos usando condiciones de activación térmica convencional***

Una mezcla de perezona (120 mg, 0.4839 mmol), isoperezona (120 mg, 0.4839 mmol), menadiona (90 mg, 0.5233 mmol) o plumbagina (140 mg, 0.5000 mmol) con indol (60 mg, 0,5128 mmol) y 50 mg de TAFF-activado como catalizador se colocaron en un matraz a microescala, Las mezclas fueron calentadas mediante el uso de una mantilla de calentamiento empleando una temperatura de 95°C por un periodo de 60 minutos. La reacción fue monitoreada mediante *ccf* usando sílice gel como fase estacionaria y una mezcla *n*-hexano con acetato de etilo (90/10) como



eluyente. Los productos puros fueron obtenidos por cromatografía en columna usando la misma fase móvil que la *ccf*.

#### ***VI.5.1. Experimentos usando condiciones de activación no convencional***

Una mezcla de perezona (120 mg, 0.4839 mmol), isoperezona (120 mg, 0.4839 mmol), menadiona (90 mg, 0.5233 mmol) o plumbagina (140 mg, 0.5000 mmol) con indol (60 mg, 0,5128 mmol) y 50 mg de TAFF como catalizador se colocaron en un matraz a microescala. Las mezclas se trataron usando y comparando diferentes modos de activación: irradiación con infrarrojo cercano durante 10 min a 121 ° C; irradiación con microondas durante 10 min a 100 ° C y 250 W de potencia, y molienda con esferas a alta velocidad durante 60 min a 500 rpm de velocidad y 27% de potencia; todas las reacciones se llevaron a cabo en un sistema abierto. Las reacciones se monitorearon mediante cromatografía de capa fina usando sílice gel como fase estacionaria y una mezcla de *n*-hexano y acetato de etilo (80 / 20). Los productos correspondientes se purificaron por cromatografía en columna usando la misma fase móvil que la *ccf*.

### **VI.6. Síntesis de moléculas por oxidación del enlace C12-C13 de la perezona e isoperezona.**

#### ***VI.6.1 obtención de epóxidos de perezona e isoperezona***

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 1.008 mmol (250 mg) de perezona o 1.008 mmol (250 mg) de isoperezona con 2.016 mmol de hidroperóxido de urea al 97% (190 mg) y Novozyme® 435 (30 mg); los cuales fueron disueltos en 5mL de acetato de etilo anhidro<sup>67,216</sup> la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente con agitación por un tiempo de 5 hr. El avance de la reacción se siguió por medio de cromatografía de capa fina, empleando como eluyente una mezcla de *n*-hexano/AcOEt (90/10).Finalizada la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación del producto obtenido se realizó mediante cromatografía de columna empleando como soporte gel de sílice y como fase móvil el sistema de elución *n*-hexano/AcOEt (80/20).

### ***VI.6.2 obtención de acetónidos de perezona e isoperezona***

En un matraz redondo de 50 mL se colocó 1.023 mmol (270 mg) de epóxido de perezona ó 1.023 mmol (270 mg) de epóxido de isoperezona, se disuelven en acetona anhidra (5 mL) y 1250 mg de TAFF-activado como catalizador. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por un lapso de 19 horas<sup>224,265</sup>. El seguimiento de la reacción se efectuó por medio de cromatografía de capa fina, empleando como eluyente una mezcla de *n*-hexano/AcOEt (70/30). Posteriormente, la arcilla TAFF se filtró y se lavó con Acetato de etilo anhidro para posteriormente evaporar el disolvente a presión reducida. La purificación se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía en placa preparativa, empleando como soporte gel de sílice y como fase móvil el sistema de elución *n*-hexano/AcOEt (80/20).

### ***VI.6.3 obtención de dioles monoacetilados de perezona e isoperezona***

En un matraz redondo se colocó 1.023 mmol (270 mg) de epóxido de perezona ó 1.023 mmol (270 mg) del epóxido de la isoperezona disueltos en 5 mL de AcOEt anhidro. A la mezcla se le adicionan 1250 mg de TAFF-activado como catalizador y se somete a agitación a temperatura ambiente por un lapso de 19 horas. El seguimiento de la reacción se efectuó por medio de cromatografía de capa fina, empleando como eluyente una mezcla de *n*-hexano/AcOEt (70/30). Posteriormente se filtró la arcilla, se lavó dicho sólido con AcOEt anhidro para posteriormente evaporar el disolvente a presión reducida. La purificación del producto obtenido se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía en placa preparativa, empleando como soporte gel de sílice y como fase móvil el sistema de elución *n*-hexano/AcOEt (80/20).

### ***VI.6.4 obtención de dioles de perezona e isoperezona***

#### ***VI.6.4.1 obtención de dioles via telescope por hidrolisis en medio ácido***

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 1.008 mmol (250 mg) de perezona o 1.008 mmol (250 mg) de isoperezona con 2.016 mmol de hidroperóxido de urea al 97% (190 mg) y Novozyme® 435 (30 mg), disueltos en 5ml de acetato de etilo

anhidro<sup>67,216</sup> la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente con agitación por un tiempo de 5 hr. El avance de la reacción se siguió por medio de cromatografía de capa fina, empleando como eluyente una mezcla de *n*-hexano/AcOEt (90/10). Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se adicionaron 3 ml de una mezcla 2:1 (agua/ ácido acético) y se mantuvo la agitación por 20 minutos más. La enzima fue filtrada y el disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación del producto obtenido se realizó mediante cromatografía de columna empleando como soporte gel de sílice y como fase móvil el sistema de elución *n*-hexano/AcOEt (70/30).

#### VI.5.4.2 obtención de dioles por hidrolisis activada con microondas.

En un matraz fondo redondo de 50 mL, se colocaron 1.023 mmol (270 mg) del epóxido de la perezona o la isoperezona con 25 mL de agua. La suspensión obtenida se sometió a irradiación empleando microondas con una potencia de 250 W, una temperatura de 100°C y un tiempo de irradiación de 10 minutos. La mezcla de reacción resultante, se extrajo en 2 ocasiones empleando 20 mL de AcOEt como disolvente. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente. La purificación del producto obtenido se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía en columna, empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil el sistema de elución *n*/hexano/AcOEt (70/ 30).

## **VI.7. Estudios de citotoxicidad**

### ***VI.7.1 Ensayo de citotoxicidad por la técnica del bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio (ensayo MTT).***

Esta prueba se realizó con la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231 según Mosmann<sup>266</sup>. Las células se incubaron a diferentes concentraciones de los compuestos de interés. Para generar las curvas de viabilidad celular de todos los compuestos sintetizados, las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 5000 células / pocillo y se cultivaron en DMEM complementado con 10% de FBS. La viabilidad celular se midió usando reactivo

MTT disuelto en PBS (0,5 mg / ml). El día de la medición, el medio se reemplazó cuidadosamente con DMEM fresco y 10% de SFB con MTT diluido (1:10, 10% MTT), y se incubó durante 1 hora a 37 ° C en una incubadora de CO<sub>2</sub> para permitir la transformación del colorante MTT en sal de Formazan. Después de eliminar el medio de incubación, los cristales de Formazan se disolvieron en 100 µL de solución de DMSO. También es importante destacar que la reducción del MTT se cuantificó midiendo la absorbancia a 570 nm usando el lector de microplacas de absorbancia Benchmark Plus (Bio rad). La prueba MTT se repitió nueve veces. El porcentaje de proliferación (% de viabilidad) se calculó de acuerdo con:

$$\% Viability = \frac{B}{A} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde A es el valor de absorbancia del grupo de control y B es el valor de absorbancia de las células tratadas con los compuestos de interés.

### **VI.7.2 Determinación de IC<sub>50</sub>**

La IC<sub>50</sub> se extrapola a partir del gráfico de dosis-respuesta, obtenido al graficar la viabilidad contra la concentración. La concentración del fármaco que redujo la viabilidad de las células en un 50% (IC<sub>50</sub>) se determinó trazando los puntos de los datos por triplicado en un intervalo de concentración y calculando los valores usando el análisis de regresión.

## **VI.8. Estudios de química teórica computacional**

### **VI.8.1 Estudios de química teórica computacional a nivel cuántico**

Los cálculos reportados se llevaron a cabo utilizando la Teoría de los Funcionales de la Densidad (TFD por su acrónimo en inglés)<sup>267,268</sup>, empleando el intercambio de tres parámetros de Becke y el funcional híbrido de correlación Lee-Yang-Parr (B3LYP)<sup>269,270</sup> con el 6-311++G(d,p) conjunto base que incluye funciones de valencia dividida y funciones difusas<sup>271-273</sup>. Los cálculos mecánicos cuánticos

correspondientes para determinar los desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizaron mediante el método estimación del orbital atómico invariante (método GIAO)<sup>274</sup>. La diferencia energética entre el orbital molecular altamente ocupado y el orbital molecular menos ocupado (HOMO-LUMO), también conocido como *GAP*, es una cantidad típica utilizada para describir la estabilidad dinámica de las moléculas<sup>275</sup>. Los valores de la energía del orbital y la superficie de los orbitales frontera se calcularon usando el mismo nivel de teoría. Para el cálculo de análisis de poblaciones electrónicas naturales se empleó la metodología del orbital natural de enlace (NBO por su acrónimo en inglés) presente en el programa Gaussian 09. El análisis de carga se realizó para explicar los modelos de interacción con los ligandos correspondiente a las proteínas probadas<sup>276,277</sup>. Finalmente, se calcularon los mapas de potencial electrostático molecular (MEP por sus siglas en inglés) para las moléculas objetivo al mismo nivel de teoría, a fin de completar el análisis electrónico, teniendo en cuenta la importancia de estos resultados en los modelos de interacción en el sistema biológico estudiado<sup>179</sup>.

## ***VI.8.2 Estudios teóricos de acoplamiento molecular***

### **VI.8.2.1 Detalles de acoplamiento**

El acoplamiento molecular predice la capacidad de unión de una molécula pequeña a una proteína diana mediante el desarrollo de un complejo relativamente estable. Las orientaciones del ligando predichas permiten pronosticar las conformaciones de unión favorecidas y la afinidad entre las proteínas y las moléculas pequeñas como ligandos<sup>278</sup>. Las moléculas pequeñas con afinidades altas de unión se identifican como posibles candidatos para el seguimiento en una validación experimental. A diferencia de los productos químicos sintéticos, la mayoría de los productos naturales no están comercialmente disponibles, aunque se pueden obtener varios productos similares o análogos. Por otra parte, la mayor parte de la estructura proteica tridimensional está lista para obtenerse del Protein Data Bank, utilizando el código apropiado.

### VI.7.2.2 Simulación de acoplamiento molecular.

Las simulaciones de acoplamiento molecular se realizaron utilizando las estructuras cristalinas de diez proteínas de la base de datos PDB: Parp1 (1UKO); BAX (1FI6); BID (2BID); BAK (2IMT); tBID (2M51); p53 (2OCJ), BIM (4I9X); TRAIL-R2 (4N90 y 4YK9); y CD95L (4MSV), respectivamente, del RCSB, Protein Data Bank<sup>279,280,289,281-288</sup>. El software Molegro<sup>260</sup> se usó para estudiar todas las conformaciones y el análisis de los acoplamientos. Los parámetros empleados para el estudio en Molegro se mantuvieron en sus valores predeterminados. El ligando no fue rígido y se le permitió torsión en los primeros procesos de acoplamiento ciego. La caja de la rejilla era 15 Å x 15 Å x 15 Å, que abarca la cavidad de unión del ligando de cada proteína, para lo cual se fijaron un máximo de cinco superficies para el proceso de acoplamiento típico. Los modos de unión se agruparon utilizando la raíz de la desviación media estándar entre las coordenadas cartesianas de los átomos del ligando. Los resultados del acoplamiento se clasificaron de acuerdo con la energía libre de unión y la raíz de la desviación media estándar (RMSD <2 Å) (valores del complejo de proteína ligando correspondiente. Los modos de unión con la energía libre de unión más negativa) y la estructura número máximo de enlaces de hidrógeno se seleccionaron como la conformación de acoplamiento óptima. Los resultados de enlace se presentan gráficamente utilizando el Sistema de gráficos moleculares PyMOL Versión 1.3<sup>290</sup> y el visualizador Molegro.

## **VI.8.3 Estudios quimio-informáticos de las moléculas obtenidas**

### VI.8.3.1 Estudios de propiedades fisicoquímicas

Las predicciones de propiedades fisicoquímicas para las moléculas en estudio proporcionan información valiosa de la facilidad con la que una molécula de fármaco actúa con los residuos de aminoácidos dentro de las células o los receptores de membrana. El riesgo toxicológico y las propiedades fisicoquímicas de las moléculas estudiadas se obtuvieron utilizando el explorador de propiedades OSIRIS, así como el paquete OSIRIS-Data Warrior. El proceso de predicción del riesgo toxicológico se basa en un conjunto recompilado de fragmentos estructurales

que dan lugar a alertas de toxicidad en caso de que se encuentren en la estructura proporcionada al sistema.  $\text{Log}P$  y  $\text{log } S$  se estimaron utilizando el método OSIRIS, que se implementa como un sistema aditivo de contribuciones por cada átomo en función de sus propiedades. El enfoque de semejanza de drogas (drug likeness) se basa en una lista de alrededor de 5300 fragmentos de subestructura distintas con puntajes de semejanza a uno o varios fármacos asociados. La similitud de las moléculas con un fármaco se calcula empleando los valores de puntuación de los fragmentos presentes en la molécula bajo investigación<sup>160,161,181,245</sup>.

#### V.1.8.3.2 Estudios de metabolismo, absorción y excreción.

La absorción y las propiedades metabólicas de los compuestos estudiados se calcularon utilizando el servidor admetSAR, que predice cerca de 50 puntos finales ADMET (adsorción, metabolismo y excreción) usando una herramienta quimio-informática llamada simulador ADMET, que integra modelos predictivos QSAR de alta calidad<sup>194,195,291</sup>.

#### V.1.8.3.3 Estudios de metabolismo fase I y II

El metabolismo humano propuesto para los compuestos sintetizados se planteó utilizando el software MetaPrint2D-Reaction, así como el módulo del software anterior presente en el paquete Bioclipse, los cuales consisten en un conjunto de predicción de metabolismo xenobiótico mediante extracción de datos y análisis estadístico de transformaciones metabólicas conocidas y reportadas en la literatura científica<sup>204,255,292–296</sup>. Los resultados se muestran en marcas circulares de color que predicen las reacciones en ese sitio y los posibles tipos de reacción, mostrando en algunos casos el metabolito formado. El color de la marca en los átomos indica sus valores de razón de ocurrencia normalizada (NOR por sus siglas en inglés). Un valor alto de NOR indica un sitio de metabolismo frecuentemente informado en la base de datos de metabolitos.

## REFERENCIAS

- (1) Reyna, S. E. *Declaracion De La Delegacion De Republica Dominicana Ante La Segunda Reunion Preparatoria Intergubernamental De La Conferencia De La Naciones Unidas Para El Desarrollo Sostenible (Rio+20)*; New York, 2011.
- (2) Nasibulina, A. Education for Sustainable Development and Environmental Ethics. *Procedia - Soc. Behav. Sci.* **2015**, 214, 1077–1082.
- (3) ONU. *Aichi-Nagoya Declaration on Education for Sustainable Development*; Nagoya, Japan, 2014.
- (4) Arroyo, G.; Hernández, E.; Martínez, J.; Miranda, R. Prácticas de Laboratorio de Química Orgánica Verde. *Tecnológica Costa Rica* **2010**.
- (5) Reyes-Sánchez, L. B. Aporte de La Química Verde a La Construcción de Una Ciencia Socialmente Responsable. *Educ. Quim.* **2012**, 23 (2), 222–229.
- (6) Miranda-Ruvalcaba, R.; Penieres-Carrillo, J. G.; Obaya-Valdivia, A.; Palma-Cruz, A.; Frontana-Uribe, B.; Nicolás-Vázquez, M. I.; Vargas-Rodríguez, Y. M.; Martínez, J. O.; Martín-Hernández, O.; Reyes-Sánchez, L. B. *Química Verde Experimental*; Cuautitlán Izcalli, 2011.
- (7) Anastas, P.; Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford university press: New York, 2000.
- (8) Gupta, M.; Paul, S.; Gupta, R. General Aspects of 12 Basic Principles of Green Chemistry with Applications. *Curr. Sci.* **2010**.
- (9) Kerton, F. M.; Marriott, R. *Alternative Solvents for Green Chemistry*, 2nd Editio.; Royal Society of Chemistry, Ed.; RCPublishing: Cambridge, UK, 2013.
- (10) Anastas, P. T.; Wasserscheid, P.; Stark, A. *Handbook of Green Chemistry, Green Solvents, Ionic Liquids.*; Wiley, 2014.
- (11) Capello, C.; Fischer, U.; Hungerbühler, K.; Bottin-Weber, U.; Filser, J.; Heimers, A.; Ondruschka, B.; Ranke, J.; Schaefer, M.; Schröder, H.; et al.



What Is a Green Solvent? A Comprehensive Framework for the Environmental Assessment of Solvents. *Green Chem.* **2007**, 9 (9), 927.

- (12) Doria Serrano, M. D. C. Química Verde: Un Nuevo Enfoque Para El Cuidado Del Medio Ambiente. *Educ. quím* **2009**, 20 (4), 412–420.
- (13) Lindström, U. M. (Ulf M.; Wiley InterScience (Online service)). *Organic Reactions in Water: Principles, Strategies and Applications*; Blackwell Pub, 2007.
- (14) Earle, M. J.; Seddon, K. R. Ionic Liquids. Green Solvents for the Future. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72 (7), 1391–1398.
- (15) Gupta, R. B.; Shim, J.-J. *Solubility in Supercritical Carbon Dioxide*; CRC Press, 2007.
- (16) Brunner, G. Supercritical Fluids: Technology and Application to Food Processing. *J. Food Eng.* **2005**, 67 (1–2), 21–33.
- (17) Cruz-Olivares, J.; Ortiz-Estrada, C. H.; Pérez-Alonso, C.; Chaparro-Mercado, M. C.; Barrera-Díaz, C. Solubility of Mesquite Gum in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Chem. Eng. Data* **2011**, 56 (5), 2449–2452.
- (18) Ortiz-Estrada, C. H.; Díaz-Díaz, C. Y.; Cruz-Olivares, J.; Pérez-Alonso, C. Coenzyme Q10 Microparticles Formation with Supercritical Carbon Dioxide. *Rev. Mex. Ing. Química (México)*. **2015**, 14 (1).
- (19) Cave, G. W. V.; Raston, C. L.; Hudson, M. J.; Liljenzin, J. O.; Spjuth, L.; Cordier, P.-Y.; Enarsson, A.; Hill, C.; Madic, C. Toward Benign Syntheses of Pyridines Involving Sequential Solvent Free Aldol and Michael Addition Reactions. *Chem. Commun.* **2000**, 2 (22), 2199–2200.
- (20) Scott Oakes, R.; Heppenstall, T. J.; Shezad, N.; Clifford, A. A.; Rayner, C. M. Use of Scandium Tris(Trifluoromethanesulfonate) as a Lewis Acid Catalyst in Supercritical Carbon Dioxide: Efficient Diels–Alder Reactions and Pressure Dependent Enhancement of Endo:Exo Stereoselectivity. *Chem. Commun.* **1999**, 0 (16), 1459–1460.

- (21) Cave, G. W. V.; Raston, C. L.; Scott, J. L.; Kaupp, G.; Mannig, F.; Frolow, F.; Lahav, M.; Leiserowitz, L.; Cram, D. J.; Zimmermann, Y. Recent Advances in Solventless Organic Reactions: Towards Benign Synthesis with Remarkable Versatility. *Chem. Commun.* **2001**, 42 (21), 2159–2169.
- (22) Dunk, B.; Jachuk, R. A Novel Reactor for UV Irradiated Reactions. *Green Chem.* **2000**, 2 (1), G13–G14.
- (23) Baig, R. B. N.; Varma, R. S.; Zhang, M.; Yu, S. H.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P.; Tanabe, G.; McCarthy, P. J.; Zhang, R.; Moreland, S.; et al. Alternative Energy Input: Mechanochemical, Microwave and Ultrasound-Assisted Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (4), 1559–1584.
- (24) Anastas, P. T.; Kirchhoff, M. M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35 (9), 686–694.
- (25) Vázquez, M. Á.; Landa, M.; Reyes, L.; Miranda, R.; Tamariz, J.; Delgado, F. Infrared Irradiation: Effective Promoter in the Formation of *N*-Benzylideneanilines in the Absence of Solvent. *Synth. Commun.* **2004**, 34 (15), 2705–2718.
- (26) Alcerreca, G.; Sanabria, R.; Miranda, R.; Arroyo, G.; Tamariz, J.; Delgado, F. Preparation of Benzylidene Barbituric Acids Promoted by Infrared Irradiation in Absence of Solvent. *Synth. Commun.* **2000**, 30 (7), 1295–1301.
- (27) Escobedo, R.; Miranda, R.; Martínez, J. Infrared Irradiation: Toward Green Chemistry, a Review. *Int J Mol Sci.* **2016**, 17 (4), 453.
- (28) Miranda, R.; Noguez, O.; Velasco, B.; Arroyo, G.; Penieres, G.; Martínez, J. O.; Delgado, F. Irradiación Infrarroja: Una Alternativa Para La Activación de Reacciones y Su Contribución a La Química Verde. *Educ. Química* **2009**, 20, 421–425.
- (29) Hayes, B. Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light 2002. *CEM Matthews, NC* **2006**.
- (30) Hayes, B. L. Recent Advances in Microwave-Assisted Synthesis. *Aldrichimica*

*Acta* **2004**, 37 (2), 66–74.

- (31) Kappe, C. O.; Stadler, A.; Dallinger, D. Microwave Theory. In *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2012; pp 9–39.
- (32) Tierney, J. P.; Lidström, P. *Microwave Assisted Organic Synthesis*; Blackwell Pub., 2005.
- (33) Polshettiwar, V.; Varma, R. S. Microwave-Assisted Organic Synthesis and Transformations Using Benign Reaction Media. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41 (5), 629–639.
- (34) Suslick, K. S.; Casadonte, D. J.; Green, M. L. H.; Thompson, M. E. Effects of High Intensity Ultrasound on Inorganic Solids. *Ultrasonics* **1987**, 25 (1), 56–59.
- (35) Cintas, P.; Luche, J.-L.; Boldo, P.; Bernis, A.; Delmas, H.; Wilhem, A. M.; Felner, I.; Boye, A. Green Chemistry. *Green Chem.* **1999**, 1 (3), 115–125.
- (36) Cravotto, G.; Gaudino, E. C.; Cintas, P.; Peters, G. W. M.; Meijer, E. W.; Sijbesma, R. P.; Aizenberg, J.; Okustu, T.; Morin, R.; Veessler, S.; et al. On the Mechanochemical Activation by Ultrasound. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (18), 7521.
- (37) Cravotto, G.; Cintas, P. Power Ultrasound in Organic Synthesis: Moving Cavitation Chemistry from Academia to Innovative and Large-Scale Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35 (2), 180–196.
- (38) Fischer, T. E. Tribochemistry. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1988**, 18 (1), 303–323.
- (39) Masuda, H.; Higashitani, K.; Yoshida, H. *Powder Technology Handbook*; CRC/Taylor & Francis, 2006.
- (40) Anastas, P. T.; Bartlett, L. B.; Kirchoff, M. M.; Williamson, T. C. The Role of Catalysis in the Design, Development, and Implementation of Green Chemistry. *Catal. Today* **2000**, 55 (1–2), 11–22.

- (41) Anastas, P. T.; Kirchhoff, M. M.; Williamson, T. C. Catalysis as a Foundational Pillar of Green Chemistry. *Appl. Catal. A Gen.* **2001**, *221* (1–2), 3–13.
- (42) Vargas-Rodríguez, Y. M.; Gómez-Vidales, V.; Vázquez-Labastida, E.; García-Bórquez, A.; Aguilar-Sahagún, G.; Murrieta-Sánchez, H.; Salmón, M. Caracterización Espectroscópica de Una Montmorillonita Mexicana. *Rev. mex. cienc. geol.* **2008**, *25* (1), 135–144.
- (43) Miranda, R.; Arroyo, G.; Penieres, G.; Delgado, F. Preparative Heterocyclic Chemistry Using Tonsil a Bentonitic Clay; 1981 to 2003. *Trends Heterocycl. Chem* **2003**.
- (44) Salmón, M.; Miranda, R.; Nicolás-Vázquez, I. Effects of Bentonite on P-Methoxybenzyl Acetate: A Theoretical Model for Oligomerization via an Electrophilic-Substitution Mechanism. *Molecules* **2011**.
- (45) Miranda, R.; Ríos, H.; Delgado, F.; Castro, M.; Cogordán, A.; Salmón, M. Characterization of a Bentonitic Clay and Its Application as Catalyst in the Preparation of Benzyltoluenes and Oligotoluenes. *Appl. Catal. A Gen.* **2003**, *244* (2), 217–233.
- (46) Arroyo, G.; Osnaya, R.; Cruz, T.; Londoño, A.; Álvarez, C.; Delgado, F.; Santiago, R.; Miranda, R. Oxidation of Thiols with Metal Nitrates Supported on TAFF. *Heteroat. Chem.* **2003**, *14* (3), 262–265.
- (47) Salmón, M.; Penieres, G.; Miranda, R.; Alvarez, C. The Action of Bentonitic Earth on Natural Product Epoxides. *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, *18* (7), 1475–1476.
- (48) Cabrera, A.; Rosas, N.; Márquez, C.; Salmón, M.; Angeles, E.; Miranda, R.; Lozano, R. ChemInform Abstract: Solvolytic Epoxide Opening Catalyzed by Bentonite Clay. *ChemInform* **2010**, *22* (34), 127–130.
- (49) Cabrera, A.; Peón, J.; Velasco, L.; Miranda, R.; Salmón, A.; Salmón, M. Clay-Mediated Cyclooligomerization of Olefin Oxides: A One-Pot Route to Crown Ethers. *J. Mol. Catal. A Chem.* **1995**, *104* (1), L5–L7.

- (50) Maldonado, E.; Marquez, C. L.; Ortega, A. A Thymol Derivative from *Calea Nelsonii*. *Phytochem.* **1992**, *31* (7), 2527–2528.
- (51) Osnaya, R.; Arroyo, G. A.; Parada, L.; Delgado, F.; Trujillo, J.; Salmón, M.; Miranda, R. Biginelli vs Hantzsch Esters Study under Infrared Radiation and Solventless Conditions. *ARKIVOC* **2003**, 112–117.
- (52) Velasco-Bejarano, B.; Enid Sánchez-Torres, L.; Guadalupe García-Estrada, J.; Miranda-Ruvalcaba, R.; Álvarez-Toledano, C.; Penieres-Carrillo, G. Diindolymethane Derivatives as Apoptosis Inductors in L5178y Cells. *Chem. Soc.* **2008**, *52* (3), 224–228.
- (53) Penieres-Carrillo, G.; García-Estrada, J. G.; Gutiérrez-Ramírez, J. L.; Alvarez-Toledano, C.; García, O.; Alvarez, C.; Rudler, H. Infrared-Assisted Eco-Friendly Selective Synthesis of Diindolymethanes. *Green Chem.* **2003**, *5* (3), 337–339.
- (54) Zarco Juarez, M.; Martínez, J. O.; Noguez Cordova, O.; Nicolás Vazquez, M. I.; Ramírez-Apan, T.; Pérez Flores, J.; Miranda Ruvalcaba, R.; Arroyo Razo, G. A. A Green Approach to the Production of Hybrid Diindolymethane-Phenylboronic Acids via a 3MCR: Promising Antineoplastic Molecules. *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1–9.
- (55) Miranda, R.; Aceves, J. M.; Gutierrez, C.; Martinez, R.; Delgado, F.; Cabrera, A.; Salmón, M. A Comparative Study of the Oxidation of Hantzsch Esters Induced by TAFF-Metalic Nitrates. *Heterocycl. Commun.* **1997**, *3* (2), 147–150.
- (56) Yadav, G. D.; Trivedi, A. H. Kinetic Modeling of Immobilized-Lipase Catalyzed Transesterification of n-Octanol with Vinyl Acetate in Non-Aqueous Media. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32* (7), 783–789.
- (57) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. Lipases: Useful Biocatalysts for the Preparation of Pharmaceuticals. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *40* (3–4), 111–120.

- (58) Goswami, A.; Goswami, J. DMSO-Triggered Enhancement of Enantioselectivity in Novozyme[435]-Catalyzed Transesterification of Chiral 1-Phenylethanols. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (25), 4411–4413.
- (59) Zhao, H.; Song, Z. Migration of Reactive Trace Compounds from Novozym® 435 into Organic Solvents and Ionic Liquids. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *49* (1), 113–118.
- (60) Itoh, T.; Akasaki, E.; Kudo, K.; Shirakami, S. Lipase-Catalyzed Enantioselective Acylation in the Ionic Liquid Solvent System: Reaction of Enzyme Anchored to the Solvent. *Chem. Lett.* **2001**, *30* (3), 262–263.
- (61) Otto, R. T.; Scheib, H.; Bornscheuer, U. T.; Pleiss, J.; Syldatk, C.; Schmid, R. D. Substrate Specificity of Lipase B from *Candida Antarctica* in the Synthesis of Arylaliphatic Glycolipids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2000**, *8* (4–6), 201–211.
- (62) Zoumpantioti, M.; Merianou, E.; Karandreas, T.; Stamatis, H.; Xenakis, A. Esterification of Phenolic Acids Catalyzed by Lipases Immobilized in Organogels. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32* (10), 1457–1462.
- (63) Adachi, S.; Kobayashi, T. Synthesis of Esters by Immobilized-Lipase-Catalyzed Condensation Reaction of Sugars and Fatty Acids in Water-Miscible Organic Solvent. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *99* (2), 87–94.
- (64) Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. . Lipase-Catalyzed Esterification of Rutin and Naringin with Fatty Acids of Medium Carbon Chain. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *21* (1–2), 59–62.
- (65) Ismail, H.; Lau, R. M.; van Langen, L. M.; van Rantwijk, F.; Švedas, V. K.; Sheldon, R. A.; Voelter, W.; Kasche, V. A Green, Fully Enzymatic Procedure for Amine Resolution, Using a Lipase and a Penicillin G Acylase. *Green Chem.* **2008**, *10* (4), 415.
- (66) Björkling, F.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O.; Veeger, C. Lipase-Mediated Formation of Peroxycarboxylic Acids Used in Catalytic Epoxidation of Alkenes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, *79* (19), 1301–1303.

- (67) Ankudey, E. G.; Olivo, H. F.; Peeples, T. L.; Mincione, E. Lipase-Mediated Epoxidation Utilizing Urea–hydrogen Peroxide in Ethyl Acetate. *Green Chem.* **2006**, 8 (10), 923–926.
- (68) Pchelka, B. K.; Gelo-Pujic, M.; Guibé-Jampel, E. Chemoenzymatic Autocatalytic Baeyer–Villiger Oxidation. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 0 (17), 2625–2628.
- (69) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (1), 301–312.
- (70) Brierley, S. M.; Kelber, O. Use of Natural Products in Gastrointestinal Therapies. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, 11 (6), 604–611.
- (71) Fasalu, R.; Rupesh, K.; Tamizh, M. A Review of Hepatoprotective Natural Products. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res* **2011**.
- (72) Wang, B.; Deng, J.; Gao, Y.; Zhu, L.; He, R.; Xu, Y. The Screening Toolbox of Bioactive Substances from Natural Products: A Review. *Fitoterapia* **2011**, 82 (8), 1141–1151.
- (73) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70 (3), 461–477.
- (74) Greenlee, H. Natural Products for Cancer Prevention. *Semin. Oncol. Nurs.* **2012**, 28 (1), 29–44.
- (75) Reddy, L.; Odhav, B.; Bhoola, K. D. Natural Products for Cancer Prevention: A Global Perspective. *Pharmacol. Ther.* **2003**, 99 (1), 1–13.
- (76) Sánchez-Torres, L. E.; Torres-Martínez, J. A.; Godínez-Victoria, M.; Omar, J.-M.; Velasco-Bejarano, B. Perezone and Its Isomer Isoperezone Induce Caspase-Dependent and Caspase-Independent Cell Death. *Phytomedicine* **2010**, 17 (8–9), 614–620.
- (77) Gómez-Serrano, G.; Cristiani-Urbina, E.; Villegas-Garrido, T. Time-Dependent Perezone Production in Different Culture Systems of *Acourtia Cordata*. *Open*

*Life Sci.* **2012**, 7 (3), 507–518.

- (78) Concepción Lozada, M.; Soria-Arteche, O.; Teresa Ramírez Apan, M.; Nieto-Camacho, A.; Enríquez, R. G.; Izquierdo, T.; Jiménez-Corona, A. Synthesis, Cytotoxic and Antioxidant Evaluations of Amino Derivatives from Perezone. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20 (17), 5077–5084.
- (79) Segundo, G. Pigmentos Naturales Quinónicos. *Lima, Perú. Univ. Nac. Mayor San* **1998**.
- (80) Thomson, R. H. (Ronald H. *Naturally Occurring Quinones*; Academic Press, 1971.
- (81) Mylius, F. Ueber Die Pipitzahoinsäure Oder Das Perezon. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1885**, 18 (1), 936–947.
- (82) Anschütz, R.; Leather, W. Ueber Einige Derivate Der Pipitzahoinsäure. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1885**, 18 (1), 715–717.
- (83) Remfry, F. G. P. CXVI.—Perezone. *J. Chem. Soc., Trans.* **1913**, 103 (0), 1076–1088.
- (84) Kögl, F.; Boer, A. G. Über Die Konstitution Des Perezons. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **2010**, 54 (10), 779–794.
- (85) Walls, F.; Salmón, M.; Padilla, J.; P, J.; Romo, J. La Estructura de La Perezona. *Bol. del Inst. Quim. la Univ. Nac. Auton. Mex.* **1965**, 17 (1), 3.
- (86) Joseph-Nathan, P.; Hernández, J. D.; Román, L. U.; E. García, G.; Mendoza, V. Sesquiterpenes from *Perezia Carpholepis*. *Phytochem.* **1982**, 21 (3), 669–672.
- (87) Joseph-Nathan, P.; Garcia-G, E.; Mendoza, V. Quinones from *Perezia Runcinata*. *Phytochem.* **1977**, 16 (7), 1086–1087.
- (88) Garcia G., E.; Mendoza, V.; Guzmán B., J. A. Sesquiterpenes from *Perezia Longifolia*. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51 (1), 150–151.
- (89) Bohlmann, F.; Ahmed, M.; Grenz, M.; King, R. M.; Robinson, H. Bisabolene



Derivatives and Other Constituents from *Coreopsis* Species. *Phytochem.* **1983**, 22 (12), 2858–2859.

- (90) Joseph-Nathan, P.; Hernández, J. D.; Román, L. U.; García, E. G.; Mendoza, V.; Mendoza, S. Coumarin and Terpenoids from *Perezia Alamani* Var. *Oolepis*. *Phytochem.* **1982**, 21 (5), 1129–1132.
- (91) Jolad, S. D.; Timmermann, B. N.; Hoffmann, J. J.; Bates, R. B.; Camou, F. A.; Cole, J. R. Sesquiterpenoids from *Coreocarpus Arizonicus*. *Phytochem.* **1988**, 27 (11), 3545–3548.
- (92) Sanchez, I. H.; Yanez, R.; Enriquez, R.; Joseph-Nathan, P. Reaction Mechanism Change in the Lewis Acid Catalyzed Perezone-Pipitzol Transformation. *J. Org. Chem.* **1981**, 46 (13), 2818–2819.
- (93) Joseph-Nathan, P.; González, M. P.; Román, L. U.; Hernández, J. D.; Flores-Vela, A.; Santillan, R. L. Contribution to the Chemistry of  $\beta$ -Pipitzol. *J. Nat. Prod.* **1985**, 48 (4), 585–591.
- (94) Sánchez\*, I. H.; Larraza, M. I.; Basurto, F.; Yañez, R.; Avila, S.; Tovar, R.; Joseph-Nathan, P. Formal Total Synthesis of  $\beta$ -Pipitzol. *Tetrahedron* **1985**, 41 (12), 2355–2359.
- (95) Soriano-García, M.; Toscano, R. A.; Flores-Valverde, E.; Montoya-Vega, F.; López-Celis, I.; IUCr. Structure of 2-(1,5-Dimethyl-4-Hexenyl)-3-Hydroxy-5-Methyl-1,4-Benzoquinone (Perezone), a Sesquiterpene. *Acta Cryst.* **1986**, 42 (3), 327–329.
- (96) Rodríguez-Hernández, A.; Barrios, H.; Collera, O.; Enríquez, R. G.; Ortiz, B.; Sánchez-obregón, R.; Walls, F.; Yuste, F.; Reynolds, W. F.; Yu, M. Isomerization of Perezone into Isoperezone and Preparation of Dihydroisoperezinone. *Nat. Prod. Lett.* **1994**, 4 (2), 133–139.
- (97) Burgueño-Tapia, E.; Joseph-Nathan, P. Detailed Studies of Perezone Rearrangements. *Monatshefte für Chemie Chem. Mon.* **1997**, 128 (6–7), 651–658.

- (98) Carabez-T, A.; Sandoval-Z, F. The Action of the Sesquiterpenic Benzoquinone, Perezone, on Electron Transport in Biological Membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *260* (1), 293–300.
- (99) Garcia, X.; Alcantara-Sarabia, G.; Cartas-Heredia, L.; Gijon, E. Actions of Perezone on Rat Smooth Muscle. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **1995**, *26* (8), 1741–1745.
- (100) Alarcon-Aguilar, F. J.; Roman-Ramos, R.; Jimenez-Estrada, M.; Reyes-Chilpa, R.; Gonzalez-Paredes, B.; Flores-Saenz, J. L. Effects of Three Mexican Medicinal Plants (Asteraceae) on Blood Glucose Levels in Healthy Mice and Rabbits. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *55* (3), 171–177.
- (101) Téllez, J.; Carvajal, K.; Cruz, D.; Carabez, A.; Chávez, E. Effect of Perezone on Arrhythmias and Markers of Cell Injury during Reperfusion in the Anesthetized Rat. *Life Sci.* **1999**, *65* (16), 1615–1623.
- (102) De La Peña, A.; Izaguirre, R.; Baños, G.; Viveros, M.; Enriquez, R. G.; Fernandez, J. M. Effect of Perezone, Aminoperezone and Their Corresponding Isomers Isoperezone and Isoaminoperezone upon in Vitro Platelet Aggregation. *Phytomedicine* **2001**, *8* (6), 465–468.
- (103) Burgueño-Tapia, E.; Castillo, L.; González-Coloma, A.; Joseph-Nathan, P. Antifeedant and Phytotoxic Activity of the Sesquiterpene p-Benzoquinone Perezone and Some of Its Derivatives. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34* (6), 766–771.
- (104) Martínez, J.; Velasco-Bejarano, B.; Delgado-Reyes, J. Eco-Contribution to the Chemistry of Perezone, a Comparative Study, Using Different Modes of Activation and Solventless Conditions. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3* (9), 1465–1468.
- (105) Chacón-García, L.; Valle-Sánchez, M.; Contreras-Celedón, C. A. A Novel Semisynthetic Anion Receptor: Synthesis and Ion Recognition of (1-H-Pyrrol-2-Yl)-4-Oxo-Perezone. *Lett. Org. Chem.* **2013**, *10*, 632–636.
- (106) Mehta, G.; Singh, V.; Ugi, I.; Grubert, L.; Koert, U.; Boom, J. H. van; Sankar,

- A. R.; Kunwar, A. C.; Doring, A.; Schuberth, I.; et al. Hybrid Systems through Natural Product Leads: An Approach towards New Molecular Entities. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, 31 (6), 324–334.
- (107) Dhanani, T.; Singh, R.; Shah, S.; Kumari, P.; Kumar, S. Comparison of Green Extraction Methods with Conventional Extraction Method for Extract Yield, L-DOPA Concentration and Antioxidant Activity of *Mucuna Pruriens* Seed. *Green Chem. Lett. Rev.* **2015**, 8 (2), 43–48.
- (108) Niu, G.; Xie, Y.; Lou, J.; Liu, H. Isolation and Purification of Glycyrrhizic Acid with Solvent Extraction. *Sep. Purif. Technol.* **2005**, 44 (3), 189–196.
- (109) Hartonen, K.; Parshintsev, J.; Sandberg, K.; Bergelin, E.; Nisula, L.; Riekkola, M.-L. Isolation of Flavonoids from Aspen Knotwood by Pressurized Hot Water Extraction and Comparison with Other Extraction Techniques. *Talanta* **2007**, 74 (1), 32–38.
- (110) Zhu, Z.; Jiang, T.; He, J.; Barba, F.; Cravotto, G.; Koubaa, M. Ultrasound-Assisted Extraction, Centrifugation and Ultrafiltration: Multistage Process for Polyphenol Recovery from Purple Sweet Potatoes. *Molecules* **2016**, 21 (11), 1584.
- (111) Roselló-Soto, E.; Galanakis, C. M.; Brnčić, M.; Orlie, V.; Trujillo, F. J.; Mawson, R.; Knoerzer, K.; Tiwari, B. K.; Barba, F. J. Clean Recovery of Antioxidant Compounds from Plant Foods, by-Products and Algae Assisted by Ultrasounds Processing. Modeling Approaches to Optimize Processing Conditions. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, 42 (2), 134–149.
- (112) Pan, X.; Niu, G.; Liu, H. Microwave-Assisted Extraction of Tea Polyphenols and Tea Caffeine from Green Tea Leaves. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2003**, 42 (2), 129–133.
- (113) Mandal, V.; Mohan, Y.; Hemalatha, S. Microwave Assisted Extraction—an Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacogn. Rev.* **2007**.

- (114) Kaufmann, B.; Christen, P. Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13* (2), 105–113.
- (115) Zhou, H.-Y.; Liu, C.-Z. Microwave-Assisted Extraction of Solanesol from Tobacco Leaves. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1129* (1), 135–139.
- (116) Hayouni, E.; Abedrabba, M.; Bouix, M.; Hamdi, M. The Effects of Solvents and Extraction Method on the Phenolic Contents and Biological Activities in Vitro of Tunisian *Quercus Coccifera* L. and *Juniperus Phoenicea* L. Fruit Extracts. *Food Chem.* **2007**, *105* (3), 1126–1134.
- (117) Sánchez Mendoza, P. I. Estudio Comparativo Para La Extracción de Perezona de *Acourtia Cordata* Empleando Fuentes Alternativas de Activación, Universidad Nacional Autónoma de México, facultad de estudios superior de Cuautitlán, 2017.
- (118) Domínguez, A. Estudio de La Extracción de Perezona de *Acourtia Cordata* Empleando CO<sub>2</sub>-Supercritico., Facultad de estudios superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 2018.
- (119) Joseph-Nathan, P.; Santillan, R. The Chemistry of Perezone and Its Consequences. *Stud.Nat. prod.* **1989**, *5*, 763–813.
- (120) Joseph-Nathan, P.; González, M. P.; García, G. E.; Barrios, H.; Walls, F. Further Studies on Hydroxyperezone Derivatives. *Tetrahedron* **1974**, *30* (18), 3461–3464.
- (121) Joseph-Nathan, P.; González, M. P.; Rodríguez, V. M. Terpenoids of *Perezia Hebeclada*. *Phytochem.* **1972**, *11* (5), 1803–1808.
- (122) Enríquez, R.; Ortega, J.; Lozoya, X. Active Components in *Perezia* Roots. *J. Ethnopharmacol.* **1980**, *2* (4), 389–393.
- (123) García-González, J.; Molina, M. J.; Rodríguez, F.; Mirada, F. Solubilities of Hydroquinone and P-Quinone in Supercritical Carbon Dioxide. *Fluid Phase Equilib.* **2002**, *200* (1), 31–39.

- (124) Coutsikos, P.; Magoulas, K.; Tassios, D. Solubilities of *p*-Quinone and 9,10-Anthraquinone in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Chem. Eng. Data* **1997**, *42* (3), 463–466.
- (125) Sun, Y.; Li, S. Measurement and Correlation of the Solubility of Ligusticum Chuanxiong Oil in Supercritical CO<sub>2</sub>. *Chinese J. Chem. Eng.* **2005**, *13* (6), 796–799.
- (126) Jouyban, A.; Chan, H.; Foster, N. R. Mathematical Representation of Solute Solubility in Supercritical Carbon Dioxide Using Empirical Expressions. **2006**, *24* (2002), 19–35.
- (127) Sparks, D. L.; Hernandez, R.; Estévez, L. A. Evaluation of Density-Based Models for the Solubility of Solids in Supercritical Carbon Dioxide and Formulation of a New Model. *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *63* (17), 4292–4301.
- (128) Hintermair, U.; Leitner, W.; Jessop, P.; Hintermair, U.; Leitner, W.; Jessop, P. Expanded Liquid Phases in Catalysis: Gas-Expanded Liquids and Liquid-Supercritical Fluid Biphasic Systems. In *Handbook of Green Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2010.
- (129) Miranda, R.; Noguez, O.; Velasco, B.; Arroyo, G.; Penierres, G.; Martínez, J. O.; Delgado, F. Irradiación Infrarroja: Una Alternativa Para La Activación de Reacciones y Su Contribución a La Química Verde.
- (130) Hao, J.; Han, W.; Huang, S.; Xue, B.; Deng, X. Microwave-Assisted Extraction of Artemisinin from *Artemisia Annua* L. *Sep. Purif. Technol.* **2002**, *28* (3), 191–196.
- (131) Pan, X.; Liu, H.; Jia, G.; Shu, Y. Y. Microwave-Assisted Extraction of Glycyrrhizic Acid from Licorice Root. *Biochem. Eng. J.* **2000**, *5* (3), 173–177.
- (132) Galanakis, C. M. Emerging Technologies for the Production of Nutraceuticals from Agricultural By-Products: A Viewpoint of Opportunities and Challenges. *Food Bioprod. Process.* **2013**, *91* (4), 575–579.
- (133) Kobus, Z. Dry Matter Extraction from Valerian Roots (*Valeriana Officinalis* L.)

with the Help of Pulsed Acoustic Field. *Int. Agrophysics* **2008**, *22*, 133–137.

- (134) Lagnika, C.; Zhang, M.; Nsor-Atindana, J.; Tounkara, F. Extension of Mushroom Shelf-Life by Ultrasound Treatment Combined with High Pressure Argon. *Int. Agrophysics* **2014**, *28* (1), 39–47.
- (135) Brittany, L.; Hayes, D. *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*, 2002.
- (136) Martín-Aranda, R. M.; Vicente-Rodríguez, M. A.; López-Pestaña, J. M.; López-Peinado, A. J.; Jerez, A.; de D. López-González, J.; Bañares-Muñoz, M. A. Application of Basic Clays in Microwave Activated Michael Additions: Preparation of N-Substituted Imidazoles. *J. Mol. Catal. A Chem.* **1997**, *124* (2–3), 115–121.
- (137) Amore, K. M.; Leadbeater, N. E.; Miller, T. A.; Schmink, J. R. Fast, Easy, Solvent-Free, Microwave-Promoted Michael Addition of Anilines to  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Alkenes: Synthesis of N-Aryl Functionalized  $\beta$ -Amino Esters and Acids. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (48), 8583–8586.
- (138) Perreux, L.; Loupy, A. A Tentative Rationalization of Microwave Effects in Organic Synthesis According to the Reaction Medium, and Mechanistic Considerations. *Tetrahedron* **2001**, *57* (45), 9199–9223.
- (139) de la Hoz, A.; Díaz-Ortiz, Á.; Moreno, A.; Jiménez, J. L.; Palacios, J. C.; Cossío, F. P.; Arrieta, A.; Vivanco, S.; Foces-Foces, C. Microwaves in Organic Synthesis. Thermal and Non-Thermal Microwave Effects. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (2), 164–178.
- (140) Kaszuba, J. P.; Janecky, D. R.; Snow, M. G. Experimental Evaluation of Mixed Fluid Reactions between Supercritical Carbon Dioxide and NaCl Brine: Relevance to the Integrity of a Geologic Carbon Repository. *Chem. Geol.* **2005**, *217* (3–4), 277–293.
- (141) Licence, P.; Ke, J.; Sokolova, M.; Ross, S. K.; Poliakoff, M.; Poliakoff, M. Chemical Reactions in Supercritical Carbon Dioxide: From Laboratory to

Commercial Plant This Work Was Presented at the Green Solvents for Catalysis Meeting Held in Bruchsal, Germany, 13–16th October 2002. *Green Chem.* **2003**, 5 (2), 99–104.

- (142) Sheldon, R. A.; Langen, L. M. van; Sheldon, R. A.; Minnaard, A. J.; Maschmeyer, T.; Sheldon, R. A.; Mattiasson, B.; Pogorzelec, P. Green Solvents for Sustainable Organic Synthesis: State of the Art. *Green Chem.* **2005**, 7 (5), 267.
- (143) Mezouar, M.; Crichton, W. A.; Bauchau, S.; Thurel, F.; Witsch, H.; Torrecillas, F.; Blattmann, G.; Marion, P.; Dabin, Y.; Chavanne, J.; et al. Development of a New State-of-the-Art Beamline Optimized for Monochromatic Single-Crystal and Powder X-Ray Diffraction under Extreme Conditions at the ESRF. *J. Synchrotron Radiat.* **2005**, 12 (5), 659–664.
- (144) Holland, T. J. B.; Redfern, S. A. T. Unit Cell Refinement from Powder Diffraction Data; the Use of Regression Diagnostics. *Mineral. Mag.* **1997**, 61 (1).
- (145) Boultif, A.; Louër, D.; IUCr. Indexing of Powder Diffraction Patterns for Low-Symmetry Lattices by the Successive Dichotomy Method. *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, 24 (6), 987–993.
- (146) Enríquez, R. G.; Fernández-G, J. M.; Gnecco, D.; Pénicaud, A.; Reynolds, W. F. The Crystal and Molecular Structures of Isoperezone, Aminoperezone, and Isoaminoperezone: A Comparative Study of Their Crystal Packing. *J. Chem. Crystallogr.* **1998**, 28 (7), 529–537.
- (147) Bugay, D. E.; Newman, A. W.; Findlay, W. P. Quantitation of Cefepime · 2HCl Dihydrate in Cefepime · 2HCl Monohydrate by Diffuse Reflectance IR and Powder X-Ray Diffraction Techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, 15 (1), 49–61.
- (148) Pagola, S.; Benavente, A.; Raschi, A.; Romano, E.; Molina, M. A. A.; Stephens, P. W. Crystal Structure Determination of Thymoquinone by High-Resolution X-Ray Powder Diffraction. *AAPS. Pharm.Sci.Tech.* **2004**, 5 (2), 24–

31.

- (149) Fuentes-Prior, P.; Salvesen, G. S. The Protein Structures That Shape Caspase Activity, Specificity, Activation and Inhibition. *Biochem. J.* **2004**, *384* (2).
- (150) Türk, D.; Hall, M. D.; Chu, B. F.; Ludwig, J. A.; Fales, H. M.; Gottesman, M. M.; Szakács, G. Identification of Compounds Selectively Killing Multidrug-Resistant Cancer Cells. *Cancer Res.* **2009**, *69* (21).
- (151) O'Brien, T.; Lee, D. Prospects for Caspase Inhibitors. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2004**, *4* (2), 153–165.
- (152) Ganesan, R.; Mittl, P. R. E.; Jelakovic, S.; Grütter, M. G. Extended Substrate Recognition in Caspase-3 Revealed by High Resolution X-Ray Structure Analysis. *J. Mol. Biol.* **2006**, *359* (5), 1378–1388.
- (153) Ganesan, R.; Jelakovic, S.; Mittl, P. R. E.; Caflisch, A.; Grütter, M. G.; IUCr; Murcko M., A.; Chambers S., P.; Aldape R., A.; Raybuck S., A.; et al. In Silico Identification and Crystal Structure Validation of Caspase-3 Inhibitors without a P1 Aspartic Acid Moiety. *Acta Crystallogr Sect F Struct. Biol. Cryst Commun.* **2011**, *67* (8), 235–242.
- (154) Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. AutoDock 4 Scoring Function. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 1145–1152.
- (155) Morris, G.; Huey, R.; Lindstrom, W. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *16*, 2785–2791.
- (156) Pagola, S.; Benavente, A.; Raschi, A.; Romano, E.; Molina, M. A. A.; Stephens, P. W. Crystal Structure Determination of Thymoquinone by High-Resolution X-Ray Powder Diffraction. *AAPS Pharm.Sci.Tech.* **2004**, *5* (2), 24–31.
- (157) Maccorkle, R. A.; Freeman, K. W.; Spencer, D. M. Synthetic Activation of



Caspases: Artificial Death Switches. *Cell Biol.* **1998**, *95*, 3655–3660.

- (158) Escobedo-González, R.; Méndez-Albores, A.; Villarreal-Barajas, T.; Aceves-Hernández, J. M.; Miranda-Ruvalcaba, R.; Nicolás-Vázquez, I. A Theoretical Study of 8-Chloro-9-Hydroxy-Aflatoxin B<sub>1</sub>, the Conversion Product of Aflatoxin B<sub>1</sub> by Neutral Electrolyzed Water. *Toxins (Basel)*. **2016**, *8* (7).
- (159) Polkam, N.; Ramaswamy, V. R.; Rayam, P.; Allaka, T. R.; Anantaraju, H. S.; Dharmarajan, S.; Perumal, Y.; Gandamalla, D.; Yellu, N. R.; Balasubramanian, S.; et al. Synthesis, Molecular Properties Prediction and Anticancer, Antioxidant Evaluation of New Edaravone Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (10), 2562–2568.
- (160) Sander, T. OSIRIS Property Explorer. <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/> (accessed Feb 2, 2016).
- (161) Cheminformatics, M. Molinspiration <http://www.molinspiration.com/> (accessed Feb 2, 2016).
- (162) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1–3), 3–25.
- (163) Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (20), 3714–3717.
- (164) Zhang, H.-B.; Liu, L.; Chen, Y.-J.; Wang, D.; Li, C.-J. “On Water”-Promoted Direct Coupling of Indoles with 1,4-Benzoquinones without Catalyst. *European J. Org. Chem.* **2006**, *2006* (4), 869–873.
- (165) Koulouri, S.; Malamidou-Xenikaki, E.; Spyroudis, S. Acid-Catalyzed Addition of Indoles to Hydroxyquinones. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10894–10902.
- (166) Yadav, J. S. .; Reddy, B. V. S. .; Swamy, T. Bi(OTf)<sub>3</sub>-Catalyzed Conjugate

Addition of Indoles to p-Quinones: A Facile Synthesis of 3-Indolyl Quinones. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (51), 9121–9124.

- (167) Gomez Pliego, R.; Ramirez-San Juan, E.; Miranda, R.; Villalobos-Molina, R.; Delgado, F.; Osnaya, R.; Trujillo Ferrara, J. Vasodilator Effects of Bis-Dihydropyridines Structurally Related to Nifedipine. *Med.Chem.* **2006**, *2* (5), 527–534.
- (168) Noguez, M. O.; García, A.; Ibarra, C.; Cabrera, A.; Aceves, J. M.; Nicolas, M. I.; Miranda, R. Green Synthesis of Bis-Biginelli Esters, with Vasodilatory Effects, Their Mass Spectrometric and Physical Studies. *Trends Org. Chem.* **2009**, *4*, 6–10.
- (169) Reyes, L.; Corona, S.; Arroyo, G.; Delgado, F.; Miranda, R. Eco-Contribution for the Production of N-Arylnitrones: Solvent-Free and Assisted by Microwaves. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11* (6), 2576–2583.
- (170) Martínez, J.; Romero-Vega, S.; Abeja-Cruz, R.; Álvarez-Toledano, C.; Miranda, R. Green Approach—Multicomponent Production of Boron—Containing Hantzsch and Biginelli Esters. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (2), 2903–2915.
- (171) Li, S. H.; Palekar, V. Quantum Mechanochemistry Understanding of Tribochemical Reactions. *Tribol. - Mater. Surfaces Interfaces* **2009**, *3*(3), 132–142.
- (172) Tarko, L.; Putz, M. V. On Electronegativity and Chemical Hardness Relationships with Aromaticity. *J. Math. Chem.* **2010**, *47* (1), 487–495.
- (173) Parr, R. G.; Pearson, R. G. Absolute Hardness: Companion Parameter to Absolute Electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (26), 7512–7516.
- (174) Tanoue, Y.; Teraoka, T.; Kai, N.; Nagai, T.; Ushio, K. Reaction of 3-Iodoindole with 1,4-Naphthoquinones. *J. Heterocycl. Chem.* **2010**, *47* (6), 1447–1449.
- (175) Liu, B.; Ji, S.; Su, X.; Wang, S. Novel Synthesis of 3-Indolylquinones Catalyzed by Molecular Iodine under Ultrasonic Irradiation. *Synth. Commun.*

**2008**, 38 (8), 1279–1290.

- (176) Vijayalakshmi, J.; Rajan, S. S.; Srinivasan, R. Structure of Plumbagin. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1987**, 43 (12), 2375–2377.
- (177) Nowell, H.; Atfield, J. P. X-Ray and Neutron Powder Diffraction Studies of the Crystal Structure of Vitamin K 3. *New J. Chem.* **2004**, 28 (3), 406–411.
- (178) Noltemeyer, M.; Sheldrick, G.; Hoppe, H.-U.; Zeeck, A. 2-Ethyl-5-(3-Indolyl)Oxazole from *Streptomyces Cinnamomeus* Discovered by Chemical Screening. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1982**, 35 (5), 549–555.
- (179) Politzer, P.; Laurence, P. R.; Jayasuriya, K. Molecular Electrostatic Potentials: An Effective Tool for the Elucidation of Biochemical Phenomena. *Environ. Health Perspect.* **1985**, 61, 191.
- (180) Kumar, A.; Mohan, C. G.; Mishra, P. C. Molecular Electrostatic Potential and Field as Descriptors of Hydrogen Bonding and Molecular Activity. Effects of Hybridization Displacement Charge. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1996**, 361 (1–3), 135–144.
- (181) Tariq, M.; Sirajuddin, M.; Ali, S.; Khalid, N.; Tahir, M. N.; Khan, H.; Ansari, T. M. Pharmacological Investigations and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) Analyses of Newly Synthesized Potentially Bioactive Organotin (IV) Carboxylates. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2016**, 158, 174–183.
- (182) Thasni, K. A.; Ratheeshkumar, T.; Rojini, G.; Sivakumar, K. C.; Rakesh Sathish, N.; Srinivas, G.; Asoke, B.; Veena, S.; Priya, S. Structure Activity Relationship of Plumbagin in BRCA1 Related Cancer Cells. *Mol. Carcinog.* **2013**, 52 (5), 392–403.
- (183) Yan, W.; Tu, B.; Liu, Y.-Y.; Wang, T.-Y.; Qiao, H.; Zhai, Z.-J.; Li, H.-W.; Tang, T.-T. Suppressive Effects of Plumbagin on Invasion and Migration of Breast Cancer Cells via the Inhibition of STAT3 Signaling and Down-Regulation of Inflammatory Cytokine Expressions. *Bone Res.* **2013**, 1 (4), 362–370.
- (184) Kaji, A.; Saito, R.; Nomura, M.; Miyamoto, K.; Kiriya, N. Mechanism of the

Cytotoxicity of Asterriquinone, a Metabolite of *Aspergillus Terreus*. *Anticancer Res.* **1997**, *17* (5A), 3675–3679.

- (185) Xue, L.; Shi-Long, Z.; Xian, L.; Ju-Lian, L.; Ou, Q.; Rui, L.; Ling, H. Synthesis and Anti-Breast Cancer Activity of New Indolylquinone Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 42–48.
- (186) Jamal, M. S.; Parveen, S.; Beg, M. A.; Suhail, M.; Chaudhary, A. G. A.; Damanhour, G. A.; Abuzenadah, A. M.; Rehan, M. Anticancer Compound Plumbagin and Its Molecular Targets: A Structural Insight into the Inhibitory Mechanisms Using Computational Approaches. *PLoS One* **2014**, *9* (2), e87309.
- (187) Escobedo-González, R. G.; Bahena, L.; Tellez, J. L. A.; Torres, J. H.; Ruvalcaba, R. M.; Aceves-Hernández, J. M. Characterization and Comparison of Perezone with Some Analogues. Experimental and Theoretical Study. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1097*, 98–105.
- (188) Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35* (4), 495–516.
- (189) Hongmei, Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. In *Apoptosis and Medicine*; Intech, 2012.
- (190) Fulda, S.; Debatin, K.-M. Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy. *Oncogene* **2006**, *25* (34), 4798.
- (191) Xu, M.; Liu, C.; Zhou, M.; Li, Q.; Wang, R.; Kang, J. Screening of Small-Molecule Inhibitors of Protein--Protein Interaction with Capillary Electrophoresis Frontal Analysis. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (16), 8050–8057.
- (192) Wang, X.-D.; Li, C.-Y.; Jiang, M.-M.; Li, D.; Wen, P.; Song, X.; Chen, J.-D.; Guo, L.-X.; Hu, X.-P.; Li, G.-Q.; et al. Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cells through an Intrinsic Pathway by Cathachunine, a Unique Alkaloid Isolated from *Catharanthus Roseus*. *Phytomedicine* **2016**, *23* (6), 641–653.

- (193) Pham The, H.; González-Álvarez, I.; Bermejo, M.; Mangas Sanjuan, V.; Centelles, I.; Garrigues, T. M.; Cabrera-Pérez, M. Á. In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach. *Mol. Inform.* **2011**, *30* (4), 376–385.
- (194) Van De Waterbeemd, H.; Gifford, E. ADMET in Silico Modelling: Towards Prediction Paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (3).
- (195) East China University of Science and Technology, S. of P. admetSAR <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/> (accessed Feb 2, 2016).
- (196) Wang, Z.; Chen, Y.; Liang, H.; Bender, A.; Glen, R. C.; Yan, A. P-Glycoprotein Substrate Models Using Support Vector Machines Based on a Comprehensive Data Set. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51* (6), 1447–1456.
- (197) Broccatelli, F.; Carosati, E.; Neri, A.; Frosini, M.; Goracci, L.; Oprea, T. I.; Cruciani, G. A Novel Approach for Predicting P-Glycoprotein (ABCB1) Inhibition Using Molecular Interaction Fields. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (6), 1740–1751.
- (198) Didziapetris, R.; Japertas, P.; Avdeef, A.; Petrauskas, A. Classification Analysis of P-Glycoprotein Substrate Specificity. *J. Drug Target.* **2003**, *11* (7), 391–406.
- (199) Mishra, N. K.; Agarwal, S.; Raghava, G. P. S. Prediction of Cytochrome P450 Isoform Responsible for Metabolizing a Drug Molecule. *BMC Pharmacol.* **2010**, *10* (1), 8.
- (200) Povey, A. Guide to Cytochrome P450 Structure and Function. *Ann. Occup. Hyg.* **2004**, *48* (1), 85.
- (201) Brown, C. M.; Reisfeld, B.; Mayeno, A. N. Cytochromes P450: A Structure-Based Summary of Biotransformations Using Representative Substrates. *Drug Metab. Rev.* **2008**, *40* (1), 1–100.
- (202) Cheng, F.; Yu, Y.; Zhou, Y.; Shen, Z.; Xiao, W.; Liu, G.; Li, W.; Lee, P. W.; Tang, Y. Insights into Molecular Basis of Cytochrome P450 Inhibitory

- Promiscuity of Compounds. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51* (10), 2482–2495.
- (203) Hopkins, A. L. Network Pharmacology: The Next Paradigm in Drug Discovery. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (11), 682–690.
- (204) Chen, K.; Wang, K.; Kirichian, A. M.; Al Aowad, A. F.; Iyer, L. K.; Adelstein, S. J.; Kassis, A. I. In Silico Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Radioiodinated Quinazolinone Derivatives for Alkaline Phosphatase--Mediated Cancer Diagnosis and Therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5* (12), 3001–3013.
- (205) Pappo, R.; Allen Jr, D.; Lemieux, R.; Johnson, W. Osmium Tetroxide-Catalyzed Periodate Oxidation of Olefinic Bonds. *J. Org. Chem.* **1956**, *21* (4), 478–479.
- (206) Cooley, G.; Ellis, B.; Hartley, F.; Petrow, V. Hydroxylation of Pregn-16-En-20-Ones. Part I. Permanganate Oxidation of Pregn-16-En-20-Ones. *J. Chem. Soc.* **1955**, 4373–4377.
- (207) Rigby, W. 475. Hydroxylations with Potassium Manganate. *J. Chem. Soc.* **1956**, 2452–2454.
- (208) Gunstone, F. D. Hydroxylation Methods. *Adv. Org. Chem* **1960**, *1*, 103–147.
- (209) Wiberg, K. B.; Saegbarth, K. A. The Mechanisms of Permanganate Oxidation. IV. Hydroxylation of Olefins and Related Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (11), 2822–2824.
- (210) Bataille, C. J. R.; Donohoe, T. J. Osmium-Free Direct Syn-Dihydroxylation of Alkenes. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 114–128.
- (211) Wensheng Yu; Yan Mei; Ying Kang; Zhengmao Hua, and; Jin\*, Z. Improved Procedure for the Oxidative Cleavage of Olefins by OsO<sub>4</sub>-NaIO<sub>4</sub>. **2004**.
- (212) Nicolaou, K. C.; Adsool, V. A.; Hale, C. R. H. An Expedient Procedure for the Oxidative Cleavage of Olefinic Bonds with PhI(OAc)<sub>2</sub>, NMO, and Catalytic OsO<sub>4</sub>. *Org. Lett.* **2010**, *12* (7), 1552–1555.

- (213) de Champdoré, M.; Lasalvia, M.; Piccialli, V. OsO<sub>4</sub>-Catalyzed Oxidative Cyclization of Geranyl and Neryl Acetate to Cis-2,5-Bis(Hydroxymethyl)Tetrahydrofurans. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 (52), 9781–9784.
- (214) VanRheenen, V.; Kelly, R. C.; Cha, D. Y. An Improved Catalytic OsO<sub>4</sub> Oxidation of Olefins to Cis-1,2-Glycols Using Tertiary Amine Oxides as the Oxidant. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17 (23), 1973–1976.
- (215) Chen, B.; Hu, J.; Miller, E. M.; Xie, W.; Cai, M.; Gross, R. A. *Candida Antarctica* Lipase B Chemically Immobilized on Epoxy-Activated Micro- and Nanobeads: Catalysts for Polyester Synthesis. *Biomacromolecules* **2008**, 9 (2), 463–471.
- (216) Chen, B.; Hu, J.; Miller, E.; Xie, W.; Cai, M. *Candida Antarctica* Lipase B Chemically Immobilized on Epoxy-Activated Micro-and Nanobeads: Catalysts for Polyester Synthesis. **2008**.
- (217) Sarma, K.; Bhati, N.; Borthakur, N.; Goswami, A. A Novel Method for the Synthesis of Chiral Epoxides from Styrene Derivatives Using Chiral Acids in Presence of *Pseudomonas* Lipase G6 [PSL G6] and Hydrogen Peroxide. *Tetrahedron* **2007**, 63 (36), 8735–8741.
- (218) Naemura, K.; Fukuda, R.; Murata, M.; Konishi, M.; Hirose, K.; Tobe, Y. Lipase-Catalyzed Enantioselective Acylation of Alcohols: A Predictive Active Site Model for Lipase YS to Identify Which Enantiomer of an Alcohol Reacts Faster in This Acylation. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6 (9), 2385–2394.
- (219) Nassreddine, S.; Karout, A.; Christ, M. L.; Pierre, A. C. Transesterification of a Vegetable Oil with Methanol Catalyzed by a Silica Fibre Reinforced Aerogel Encapsulated Lipase. *Appl. Catal. A Gen.* **2008**, 344 (1), 70–77.
- (220) Giraldo, L. J. L.; Laguerre, M.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M.-C.; Barouh, N.; Baréa, B.; Villeneuve, P. Lipase-Catalyzed Synthesis of Chlorogenate Fatty Esters in Solvent-Free Medium. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 41 (6), 721–726.

- (221) Prilezhaev, N. Ber. 1909, 42, 4811.(b) Swern, D. *Chem. Rev* **1949**, 45, 1–68.
- (222) Dryuk, V. G. The Mechanism of Epoxidation of Olefins by Peracids. *Tetrahedron* **1976**, 32 (23), 2855–2866.
- (223) Kwart, H.; Hoffman, D. M. Observations Regarding the Mechanism of Olefin Epoxidation with per Acids. *J. Org. Chem.* **1966**, 31 (2), 419–425.
- (224) Cabrera, A.; Rosas, N.; Marquez, C.; Salmón, M.; Angeles, E.; Miranda, R.; Lozano, R. Solvolytic Epoxide Opening Catalyzed by Bentonite Clay . *Gazz. Chim. Ital.* **1991**, 121 (3), 127–130.
- (225) Bahulayan, D.; Das, S. K.; Iqbal, J. Montmorillonite K10 Clay: An Efficient Catalyst for the One-Pot Stereoselective Synthesis of  $\beta$ -Acetamido Ketones. *J. Org. Chem.* **2003**, 68 (14), 5735–5738.
- (226) Varma, R. S. Clay and Clay-Supported Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2002**, 58 (7), 1235–1255.
- (227) Gautier, E. C. L.; Graham, A. E.; McKillop, A.; Standen, S. P.; Taylor, R. J. K. Acetal and Ketal Deprotection Using Montmorillonite K10: The First Synthesis of Syn-4, 8-Dioxatricyclo [5.1. 0.0 3, 5]-2, 6-Octanedione. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (11), 1881–1884.
- (228) Soetaredjo, F. E.; Ayucitra, A.; Ismadji, S.; Maukar, A. L. KOH/Bentonite Catalysts for Transesterification of Palm Oil to Biodiesel. *Appl. Clay Sci.* **2011**, 53 (2), 341–346.
- (229) Ponde, D. E.; Deshpande, V. H.; Bulbule, V. J.; Sudalai, A. Selective Catalytic Transesterification, Transthiolesterification, and Protection of Carbonyl Compounds over Natural Kaolinitic Clay. *J. Org. Chem.* **1998**, 63 (4), 1058–1063.
- (230) March, J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*; John Wiley & Sons, 1992.
- (231) Fox, J. M.; Dmitrenko, O.; Liao, L.; Bach, R. D. Computational Studies of



Nucleophilic Substitution at Carbonyl Carbon: The SN2 Mechanism versus the Tetrahedral Intermediate in Organic Synthesis. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (21), 7317–7328.

- (232) Joseph-Nathan, P.; Santillan, R. The Chemistry of Perezone and Its Consequences. *Stud.Nat. prod.* **1989**.
- (233) Cortés, E.; Ortiz, B.; Sánchez-Obregón, R.; Walls, F.; Yuste, F. The Mass Spectral Fragmentation of Perezone and Related Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom. Spectrom.* **1997**, *11* (8), 904–906.
- (234) Lee, H.-H.; Yamaguchi, H.; Senda, H.; Kuwae, A.; Hanai, K. X-Ray and Vibrational Studies of Methyl (N-Benzoylaminoxy)Acetate. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1996**, *52* (3), 297–303.
- (235) Sankar, T.; Raju, P.; Mohanakrishnan, A. K.; Naveen, S.; Lokanath, N.; Gunasekaran, K. Crystal Structure Analysis of Epoxy Derivatives. *Struct. Chem. Crystallogr. Commun.* **2015**, *1* (14).
- (236) Xu, J.-F.; Jian-Long, D.; Deng, Q.; Gu, X.-F.; Tang, Y.; Zhang, Z.-F. Synthesis of Cyclohexanone Pentaerythritol Ketal Catalyzed by Sulfonated Zeolite. In *Proceedings of the 3rd International Conference on Material Engineering and Application (ICMEA 2016)*; Atlantis Press: Paris, France, 2016.
- (237) Birnbaum, G. I.; Stoessl, A.; Grover A N, S. H.; Stothers, D. J. B. The Complete Stereostructure of Capsidiol. X-Ray Analysis and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance of Eremophilane Derivatives Having Trans-Vicinal Methyl Groups. *Can.J.Chem* **1974**, *52*, 993.
- (238) Allen, F. H.; Kennard, O.; Watson, D. G.; Brammer, L.; Orpen, A. G.; Taylor, R. Tables of Bond Lengths Determined by X-Ray and Neutron Diffraction. Part 1. Bond Lengths in Organic Compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1987**, *0* (12), S1.
- (239) Ermer, O.; Dunitz, J. D.; Bernal, I.; IUCr. The Structures of Medium-Ring Compounds. XVIII. X-Ray and Neutron Diffraction Analysis of Cyclodecane-

1,6- *Trans* -Diol. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **1973**, 29 (10), 2278–2285.

- (240) Praefcke, K.; Marquardt, P.; Kohne, B.; Stephan, W.; Levelut, A.-M.; Wachtel, E. Inositol Liquid Crystals, X-Ray Diffraction Studies of Their Hydrogen-Bond Supported Supramolecular Mesophases <sup>1</sup>. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1991**, 203 (1), 149–158.
- (241) Bednarek, E.; Dobrowolski, J. C.; Kamieńska-Trela, K. Theoretical and Experimental <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR Spectra of Monomethyl Substituted Tetramethyl 9aH- and 4H-Quinolizine-1,2,3,4-Tetracarboxylate. *J. Mol. Struct.* **2003**, 651–653, 719–727.
- (242) Abraham, R. J.; Bardsley, B.; Mobli, M.; Smith, R. J. <sup>1</sup>H Chemical Shifts in NMR. Part 21? Prediction of The <sup>1</sup>H Chemical Shifts of Molecules Containing the Ester Group: A Modelling Andab Initio Investigation. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43 (1), 3–15.
- (243) Gersch, M.; Kreuzer, J.; Sieber, S. A. Electrophilic Natural Products and Their Biological Targets. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29 (6), 659.
- (244) DePeña, A.; Izaguirre, R.; Baños, G.; Viveros, M.; Enriquez, R. G.; Fernández-G, J. M. Effect of Perezone, Aminoperezone and Their Corresponding Isomers Isoperezone and Isoaminoperezone upon Platelet Aggregation. *Phytomedicine* **2001**, 8 (6), 465–468.
- (245) Toepak, E. P.; Tambunan, U. S. F. In Silico Design of Fragment-Based Drug Targeting Host Processing  $\alpha$ -Glucosidase i for Dengue Fever. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2017**, 172 (1), 012017.
- (246) Kumar, T. V. A.; Kabilan, S.; Parthasarathy, V. Screening and Toxicity Risk Assessment of Selected Compounds to Target Cancer Using QSAR and Pharmacophore Modelling. *Int. J. PharmTech Res.* **2017**, 10 (4), 219–224.
- (247) Balasundaram, A.; Chellathai, D.; Janarthanan, K. Phytochemical Based in Silico Drug Design of Potent Inhibitors for PDE7B-A Therapeutic Target for

Cognitive Enhancement in Neurological Disorders. *Eur. J. Mol. Biol. Biochem.* **2015**, 2 (5), 220–222.

- (248) Wood, A. W.; Wislocki, P. G.; Chang, R. L.; Levin, W.; Lu, A. Y.; Yagi, J.; Hernandez, O.; Herina, D. M.; Conney, A. H. Mutagenicity and Cytotoxicity of Benzo(a)Pyrene Benzo-Ring Epoxides. *Cancer Res.* **1976**, 36 (9 pt.1), 3358–3366.
- (249) Wood, A. W.; Chang, R. L.; Levin, W.; Ryan, D. E.; Thomas, P. E.; Mah, H. D.; Karle, J. M.; Yagi, H.; Jerina, D. M.; Conney, A. H. Mutagenicity and Tumorigenicity of Phenanthrene and Chrysene Epoxides and Diol Epoxides. *Cancer Res.* **1979**, 39 (10), 4069–4077.
- (250) Hecht, S. S.; Amin, S.; Huie, K.; Melikian, A. A.; Harvey, R. G. Enhancing Effect of a Bay Region Methyl Group on Tumorigenicity in Newborn Mice and Mouse Skin of Enantiomeric Bay Region Diol Epoxides Formed Stereoselectively from Methylchrysenes in Mouse Epidermis. *Cancer Res.* **1987**, 47 (20), 5310–5315.
- (251) Sipinen, V.; Laubenthal, J.; Baumgartner, A.; Cemeli, E.; Linschooten, J. O.; Godschalk, R. W. L.; Van Schooten, F. J.; Anderson, D.; Brunborg, G. In Vitro Evaluation of Baseline and Induced DNA Damage in Human Sperm Exposed to Benzo[a]Pyrene or Its Metabolite Benzo[a]Pyrene-7,8-Diol-9,10-Epoxide, Using the Comet Assay. *Mutagenesis* **2010**, 25 (4), 417–425.
- (252) Fabiani, R.; Rosignoli, P.; De Bartolomeo, A.; Fuccelli, R.; Morozzi, G. DNA-Damaging Ability of Isoprene and Isoprene Mono-Epoxide (EPOX I) in Human Cells Evaluated with the Comet Assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2007**, 629 (1), 7–13.
- (253) Ertl, P.; Schuffenhauer, A. Estimation of Synthetic Accessibility Score of Drug-like Molecules Based on Molecular Complexity and Fragment Contributions. *J. Cheminform.* **2009**, 1 (1), 8.
- (254) Greeff, J.; Joubert, J.; Malan, S. F.; van Dyk, S. Antioxidant Properties of 4-Quinolones and Structurally Related Flavones. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20

(2), 809–818.

- (255) Carlsson, L.; Spjuth, O.; Adams, S.; Glen, R. C.; Boyer, S. Use of Historic Metabolic Biotransformation Data as a Means of Anticipating Metabolic Sites Using MetaPrint2D and Bioclipse. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11* (1), 362.
- (256) Leonard, J. (John); Lygo, B.; Procter, G. *Advanced Practical Organic Chemistry.*, third.; Francis & Taylor: Boca Raton, FL, 2013.
- (257) Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. (Douglas D. *Purification of Laboratory Chemicals*, Fifth.; Butterworth Heinemann: Oxford, UK, 1997.
- (258) Villavicencio, M. A.; Perez Escandon, B. E. *Concentracion de Plumbagina En Plumbago Pulchella Boiss.(Plumbaginaceae) y Su Efecto En La Seleccion de Alimento de Larvas de Arachnis Aulaea (Geyer)(Lepidoptera: Arctiidae).*; 1994.
- (259) Frisch, M.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. *Gaussian 09, Revision D. 01*; Gaussian, Inc.,: Wallingford, CT,USA, 2009.
- (260) Molegro; APS. MVD 5.0 Molegro Virtual Docker. *DK-8000 Aarhus C, Denmark*. 2011.
- (261) Joseph-Nathan, P.; Santillan, R. L. The Chemistry of Perezone and Its Consequences. *Stud.Nat. prod.* **1989**, *5*, 763–813.
- (262) Mojsiewicz-Pieńkowska, K.; Jamrógiewicz, Z.; Łukasiak, J. Determination of Polydimethylsiloxanes by H1-NMR in Wine and Edible Oils. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20* (5), 438–444.
- (263) Li, Z. Y.; Welbeck, E.; Wang, R. F.; Liu, Q.; Yang, Y. B.; Chou, G. X.; Bi, K. S.; Wang, Z. T. A Universal Quantitative <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) Method for Assessing the Purity of Dammarane-Type Ginsenosides. *Phytochem. Anal.* **2015**, *26* (1), 8–14.

- (264) Sahoo, S.; H. Desai, N.; Bhatt, A.; Shivramchandra, K.; Kamath, B. V. <sup>1</sup>H QNMR Approach for Estimation of a Toxic Compound N,N-Dimethylamine in Metformin Hydrochloride: An Equivalent Efficient Method over Reversed Phase Derivatization HPLC Method. *Payame Noor Univ. Iran* **2015**, *2* (2), 112–119.
- (265) Salmón, M.; Penierres, G.; Miranda, R.; Alvarez, C. The Action of Bentonitic Earth on Natural Product Epoxides. *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, *18* (7), 1475–1476.
- (266) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63.
- (267) Parr, R. G. W. Yang Density-Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford University Press, New York: New York 1989, pp 1–333.
- (268) Parr, R. G.; Yang, W. Density-Functional Theory of the Electronic Structure of Molecules. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1995**, *46* (1), 701–728.
- (269) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- (270) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785.
- (271) Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Pople, J. A.; Frisch, M. J. The Performance of the Becke-Lee-Yang-Parr (B-LYP) Density Functional Theory with Various Basis Sets. *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *197* (4–5), 499–505.
- (272) Clark, T.; Chandrasekhar, J.; Spitznagel, G. W.; Schleyer, P. V. R. Efficient Diffuse Function-Augmented Basis Sets for Anion Calculations. III. The 3-21+G Basis Set for First-Row Elements, Li–F. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4* (3), 294–301.
- (273) London, F. Théorie Quantique Des Courants Interatomiques Dans Les

Combinaisons Aromatiques. *J. phys. radium* **1937**, 8 (10), 397–409.

- (274) Bühl, M.; Kaupp, M.; Malkina, O. L.; Malkin, V. G. The DFT Route to NMR Chemical Shifts. *J. Comput. Chem.* **1999**, 20 (1), 91–105.
- (275) Erdogdu, Y.; Tahir Güllüoğlu, M.; Kurt, M. DFT, FT-Raman, FT-IR and NMR Studies of 2-Fluorophenylboronic Acid. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, 40 (11), 1615–1623.
- (276) Gangadharan, R. P.; Sampath Krishnan, S. First Order Hyperpolarizabilities, NPA and Fukui Functions of Cyclohexanone by Density Functional Theory Method. *ACTA Phys. Pol. A* **2015**, 127 (2015), 748–752.
- (277) Hunter, C. A. Quantifying Intermolecular Interactions: Guidelines for the Molecular Recognition Toolbox. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, 43 (40), 5310–5324.
- (278) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, 31 (2), NA-NA.
- (279) Kinoshita, T.; Nakanishi, I.; Warizaya, M.; Iwashita, A.; Kido, Y.; Hattori, K.; Fujii, T. Inhibitor-Induced Structural Change of the Active Site of Human Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *FEBS Lett.* **2004**, 556 (1–3), 43–46.
- (280) Wang, Y.; Rosengarth, A.; Luecke, H.; IUCr. Structure of the Human P53 Core Domain in the Absence of DNA. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2007**, 63 (3), 276–281.
- (281) Liu, W.; Ramagopal, U.; Cheng, H.; Bonanno, J. B.; Toro, R.; Bhosle, R.; Zhan, C.; Almo, S. C. Crystal Structure of the Complex of Human FasL and Its Decoy Receptor DcR3. *Structure* **2016**, 24, 2016–2023.
- (282) Ha, N. C.; Kim, J. S. Complex Structure of BCL-XL and Mutated BIM BH3 Domain. *TO BE Publ.*
- (283) Nemcovicova, I.; Benedict, C. A.; Zajonc, D. M. Structure of Human

Cytomegalovirus UL141 Binding to TRAIL-R2 Reveals Novel, Non-Canonical Death Receptor Interactions. *Plos Pathog.* **2013**, *9*, e1003224–e1003224.

- (284) Graves, J. D.; Kordich, J. J.; Huang, T. H.; Piasecki, J.; Bush, T. L.; Sullivan, T.; Foltz, I. N.; Chang, W.; Douangpanya, H.; Dang, T.; et al. Apo2L/TRAIL and the Death Receptor 5 Agonist Antibody AMG 655 Cooperate to Promote Receptor Clustering and Antitumor Activity. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 177–189.
- (285) Dutta, S. K.; Serrano, P.; Geralt, M.; Wuthrich, K. NMR Structure of the SH3 Domain of Human RAS P21 Protein Activator (GTPase Activating Protein) 1. *TO BE Publ.*
- (286) Suzuki, M.; Youle, R. J.; Tjandra, N. Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell* **2000**, *103*, 645–654.
- (287) Moldoveanu, T.; Liu, Q.; Tocilj, A.; Watson, M.; Shore, G.; Gehring, K. The X-Ray Structure of a BAK Homodimer Reveals an Inhibitory Zinc Binding Site. *Mol. Cell* **2006**, *24*, 677–688.
- (288) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235–242.
- (289) Chou, J. J.; Li, H.; Salvesen, G. S.; Yuan, J.; Wagner, G. Solution Structure of BID, an Intracellular Amplifier of Apoptotic Signaling. *Cell* **1999**, *96* (5), 615–624.
- (290) DeLano; L., W. The PyMOL Molecular Graphics System. <http://pymol.org>. DeLano Scientific 2002.
- (291) Chen, L.; Li, Y.; Zhao, Q.; Peng, H.; Hou, T. ADME Evaluation in Drug Discovery. 10. Predictions of P-Glycoprotein Inhibitors Using Recursive Partitioning and Naive Bayesian Classification Techniques. *Mol. Pharm.* **2011**, *8* (3), 889–900.
- (292) Adams, S. E. *Molecular Similarity and Xenobiotic Metabolism*, University of Cambridge, 2010.

- (293) Adams, S. Metaprint2D-React metabolic product predictor <http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/metaprint2d-react> (accessed Feb 25, 2016).
- (294) Boyer, S.; Arnby, C. H.; Carlsson, L.; Smith, J.; Stein, V.; Glen, R. C. Reaction Site Mapping of Xenobiotic Biotransformations. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47* (2), 583–590.
- (295) Piechota, P.; Cronin, M. T.; Hewitt, M.; Madden, J. C. Pragmatic Approaches to Using Computational Methods to Predict Xenobiotic Metabolism. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (6), 1282–1293.
- (296) Braga, R. C.; Alves, V. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; de Oliveira, V.; Andrade, C. H. Combination of Docking, Molecular Dynamics and Quantum Mechanical Calculations for Metabolism Prediction of 3, 4-Methylenedioxybenzoyl-2-Thienylhydrazine. *J. Mol. Model.* **2012**, *18* (5), 2065–2078.
- (297) Morales Galicia, M. L.; Martínez, J. O.; Reyes Sánchez, L. B.; Martín Hernández, O.; Arroyo Razo, G. A.; Obaya Valdivia, A.; Miranda Ruvalcaba, R. ¿ Qué Tan Verde Es Un Experimento? *Educ. Química* **2011**, *22* (3), 240–248.



# CONCLUSIONES

## VII.1. Conclusión general

En relación con el planteamiento del problema e hipótesis establecidos se concluye que se contribuyó a la educación para el desarrollo sostenible mediante nuevas estrategias de extracción y producción de moléculas orgánicas bajo el protocolo de la Química Verde; Además se produjeron 12 moléculas nuevas derivadas de la perezona, las cuales mostraron actividad citotóxica contra células de cáncer a nivel *in vitro*.

## VII.1. Conclusiones particulares

A manera de conclusión respecto

1. Se realizó un estudio profundo de la solubilidad de la perezona en CO<sub>2</sub> supercrítico, mostrando que a 50°C y 106 bar se logró la máxima solubilidad. Los resultados se usaron para extraer perezona de raíces de *A. platyphylla* con rendimientos mayores al método convencional; este procedimiento impactó en los principios de la Química Verde: *búsqueda de procesos sin necesidad de disolvente o con disolventes inocuos* como es el CO<sub>2</sub> supercrítico. Estos resultados cumplieron con los objetivos particulares I y II de la presente tesis.
2. se desarrolló un acercamiento verde a la extracción de la perezona, comparando los resultados de dos raíces del género *Acourtia*, contrastando además el uso de diversas fuentes de activación, así como el método clásico. Los resultados mostraron que los métodos de activación obtuvieron rendimientos más elevados, selectividades mayores y tiempos menores que los logrados con mantilla de calentamiento. Además, se impactaron en los principios de *eficiencia en los requerimientos energéticos y disminución en la generación de residuos*; cumpliendo con el objetivo III y IV de la tesis.
3. Una tercera conclusión relacionada a la isomerización de la perezona es que se logró contribuir al estudio de la isomerización de la perezona, a través de dos estrategias desarrolladas bajo el protocolo de la Química Verde, teniendo

rendimientos equiparables al método convencional. Además, incidiendo principalmente en los *principios 5 y 6*. Con lo cual se cumple de forma satisfactoria el objetivo V del presente trabajo doctoral.

4. La caracterización fisicoquímica experimental permitió contribuir a la caracterización de los compuestos de interés **1 y 2**, a través de técnicas de uso común para el área farmacéutica, en miras del uso de dichas moléculas como fármacos. Asimismo, el estudio teórico ayudó a explicar la actividad citotóxica de **1 y 2** por la activación de las caspasas, coincidiendo además con los resultados experimentales al señalar una mayor energía de interacción con **1** y por ende una mayor actividad. Además, fue posible establecer un modelo de interacción a través del estudio de acoplamiento molecular resaltando la importancia de la interacción entre los ligandos y los residuos de aminoácidos Arg207, Ser209, y Trp214 presentes en el sitio activo de la caspasa-3. Finalmente, la información quimio-informática de **1 y 2** fue consistente acerca del potencial farmacológico que tienen estas moléculas, estableciendo regiones de la estructura que presentan riesgo de efecto irritante para el organismo, indicando que el doble enlace C12-C13 como un blanco de modificación mediante procesos verdes en aras de reducir este efecto adverso. Dando cumplimiento con estos resultados al objetivo partículas IV del presente trabajo aportando al cumplimiento del objetivo XII con los estudios teóricos.
5. Respecto a la obtención de indolilquinonas se puede establecer con base a los resultados que la metodología empleada procede con un buen acercamiento verde<sup>297</sup>, esto de acuerdo con los siguientes *Principios de la Química Verde: prevención (principio 1), economía atómica (principio 2), Síntesis menos peligrosas (principio 3), disolventes y sustancias auxiliares seguros (principio 5), diseños con eficiencia energética (principio 6), catálisis (principio 9), químicos seguros para prevenir accidentes (principio 12)*. Adicionalmente, es conveniente resaltar que las moléculas obtenidas tienen efecto citotóxico en células de cáncer de seno humanas sin aparente efecto

tóxico en células sanas, y que la molécula más citotóxica fue **7**. El estudio teórico- cuántico mostró una buena correlación entre los valores calculados y los valores experimentales. Posteriormente, el estudio *in silico* de la ruta de apoptosis seguidas por las moléculas objetivo **6-9** permitió complementar el estudio del efecto citotóxico; Los resultados teóricos del estudio *in silico* coinciden con los datos de la citotoxicidad experimental, lo que nos permite predecir algunas propiedades y dilucidar los posibles mecanismos metabólicos, así como las vías apoptóticas factibles que pueden ser seguidas por cada molécula y explicar su diferencia en los valores de IC<sub>50</sub>. Estos resultados permitieron cumplir de manera satisfactoria el objetivo VII y contribuir a los objetivos XI y XII.

6. En relación al estudio de la oxidación de C12-C13, se puede concluir que se establecieron metodologías con un buen acercamiento verde<sup>297</sup> para la oxidación del doble enlace, lo anterior teniendo en cuenta los siguientes *Principios de la Química Verde: prevención (principio 1), economía atómica (principio 2), Síntesis menos peligrosas (principio 3), disolventes y sustancias auxiliares seguros (principio 5), diseños con eficiencia energética (principio 6), catálisis (principio 9), químicos seguros para prevenir accidentes (principio 12)*. Complementariamente, se considera prudente resaltar que las moléculas obtenidas tienen efecto citotóxico en células de cáncer de seno humanas sin aparente efecto tóxico en células sanas, y que las moléculas **10** y **13** presentaron mayor citotoxicidad. Por otro lado, el estudio teórico de la actividad citotóxica de **10-17** muestra concordancia con los datos de la citotoxicidad experimental y nos permitió explicar sus diferencias en los valores de IC<sub>50</sub>. Estos resultados, además, permitieron obtener cumplir con los objetivos VIII-X y concluir satisfactoriamente los objetivos XI y XII de la presente tesis.

## PERSPECTIVAS

Con base a los resultados obtenidos en este proyecto de investigación nos permite proponer las siguientes perspectivas a futuro:

Una vez establecidas las condiciones de máxima solubilidad de la perezona en CO<sub>2</sub> supercrítico, una línea a seguir será el establecer varias metodologías que permitan llevar a cabo las diferentes reacciones que pueden experimentar la perezona e isoperezona usando como disolvente el CO<sub>2</sub> supercrítico, haciendo dichos procesos más verdes.

Una segunda perspectiva de trabajo conlleva probar la metodología de adición tipo Michael empleada para la síntesis de indolilquinonas con otras estructuras heterocíclicas y probar el efecto citotóxico de las moléculas obtenidas.

La síntesis del diol en C12 y C13 de la perezona e isoperezona dan la pauta a probar algunas metodologías de escisión del enlace para obtener el aldehído correspondiente, cuya versatilidad permitiría la síntesis de nuevas moléculas derivadas de los diindolilmetanos, dihidropiridinas y dihidropirimidonas.

## **APÉNDICE**

**A.I. Clasificación del espécimen de *Acourtia platyphylla***

**A.II. Selección de espectros de los productos**

**A III. Probatorios de presentación de trabajos y artículos publicados como resultado de este trabajo.**

**A.I. Clasificación del especímenes del genero *Acourtia***



**FACULTAD DE CIENCIAS  
HERBARIO**

**DICTAMEN**

**DATOS DE USUARIO**

Facultad de Química, UAEMex

**DATOS DE LA PLANTA**

Fecha de recepción: 31 de Agosto de 2016

Fecha de entrega: 06 de Septiembre de 2016

Nombre común: snc.

Lugar de recolecta: Sierra de Guadalupe, Estado de México

**TIPO DE ANÁLISIS**

Identificación taxonómica

**TÉCNICAS O MÉTODOS EMPLEADOS**

Observación macroscópica y al microscopio estereoscópico simple, de características diagnósticas de género y especie; empleo de claves dicotómicas: Rzedowski G.C. y J. Rzedowski. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología AC. Y CONABIO. Pátzcuaro Michoacán).

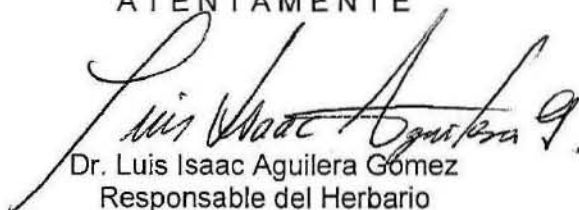
**DIAGNOSIS**

Familia: Compositae

Género: *Acourtia*

Especie: *Acourtia platyphylla* (A. Gray) Reveal & King

ATENTAMENTE

  
Dr. Luis Isaac Aguilera Gomez  
Responsable del Herbario



**UAEM**

Universidad Autónoma  
del Estado de México



**FACULTAD DE CIENCIAS  
HERBARIO**

**DICTAMEN**

**DATOS DE USUARIO**

Dr. Julián Cruz Olivares

Facultad de Química, UAEmex.  
Unidad El Cerrillo, Méx.

**DATOS DE LA PLANTA**

Fecha de recepción: 25 de Octubre de 2018  
Fecha de entrega: 14 de Noviembre de 2018

Nombre común: Perezona  
Lugar de recolecta: Estado de México

**TIPO DE ANÁLISIS**

Identificación taxonómica

**TÉCNICAS O MÉTODOS EMPLEADOS**

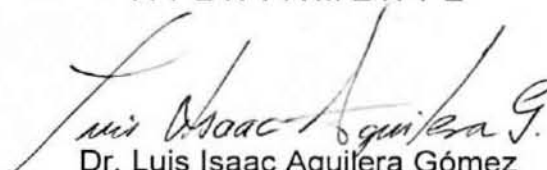
Observación macroscópica y al microscopio estereoscópico simple de características diagnósticas de género y especie; empleo de clave dicotómica Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología AC. Y CONABIO. (Pátzcuaro Michoacán).

**DIAGNOSIS**

Familia: Asteraceae  
Género: *Acourtia*

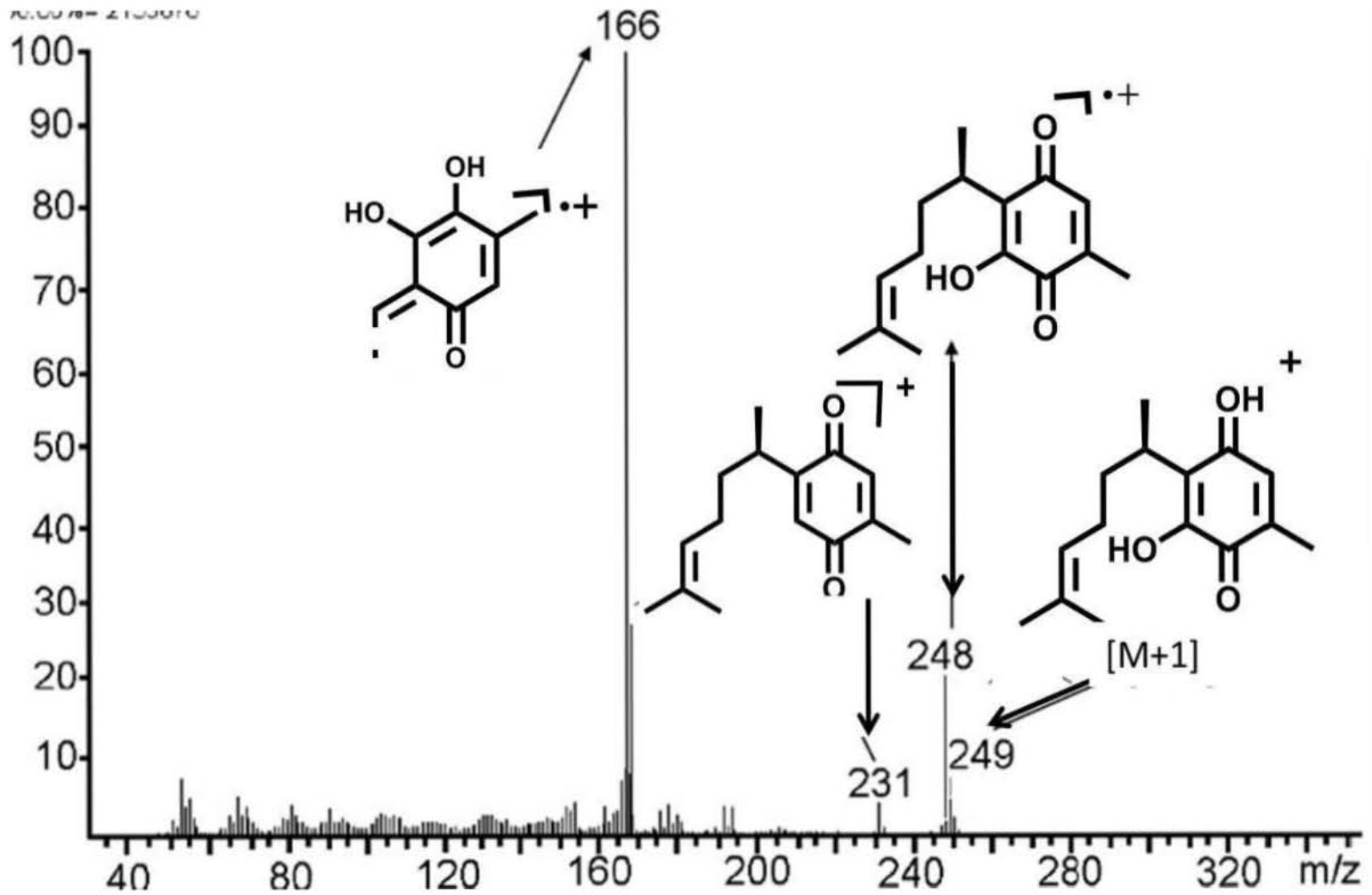
Especie: *Acourtia cordata* (Cerv.)Turner

ATENTAMENTE

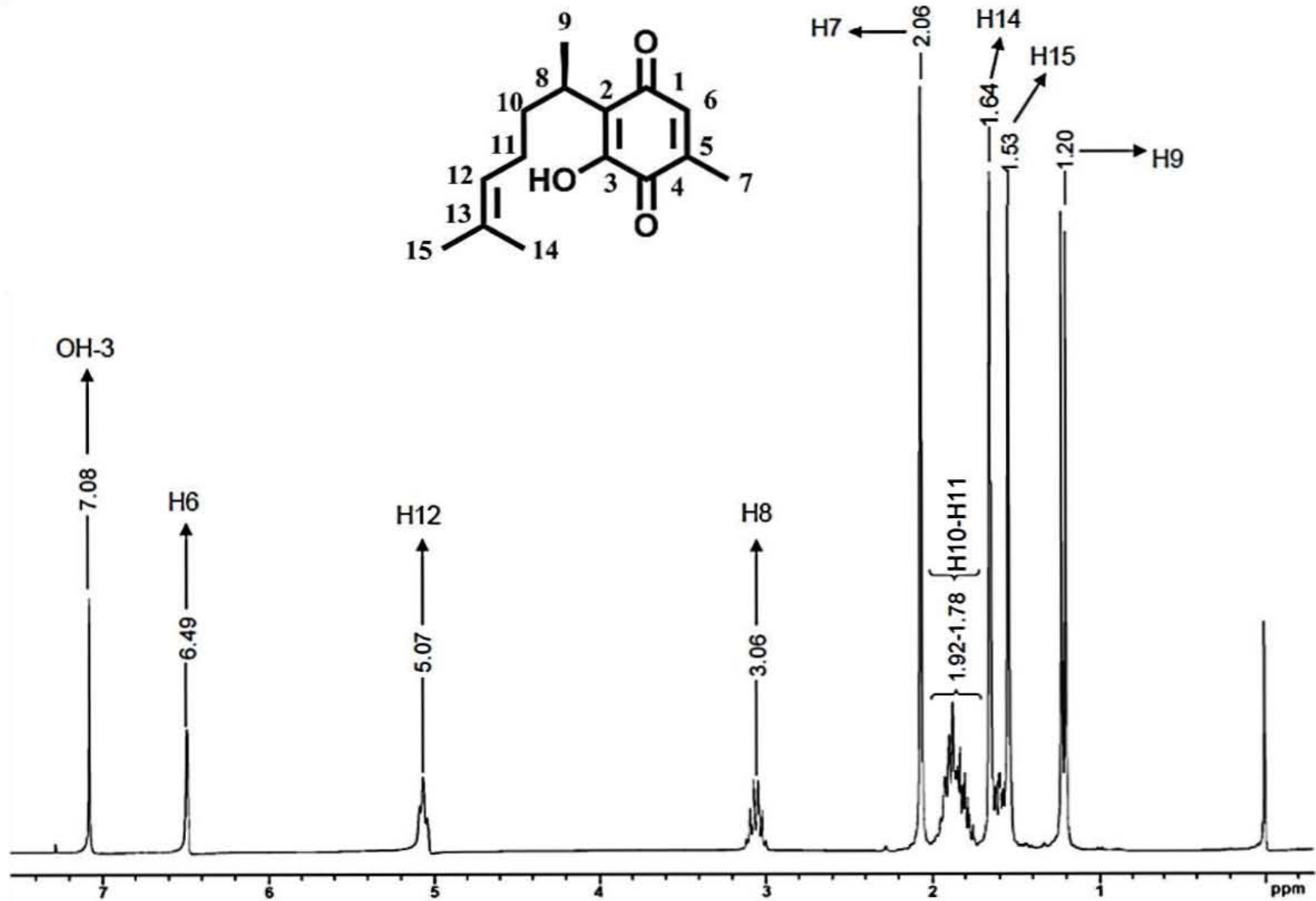
  
Dr. Luis Isaac Aguilera Gómez  
Responsable del Herbario

## **A.II. Selección de espectros de los productos**

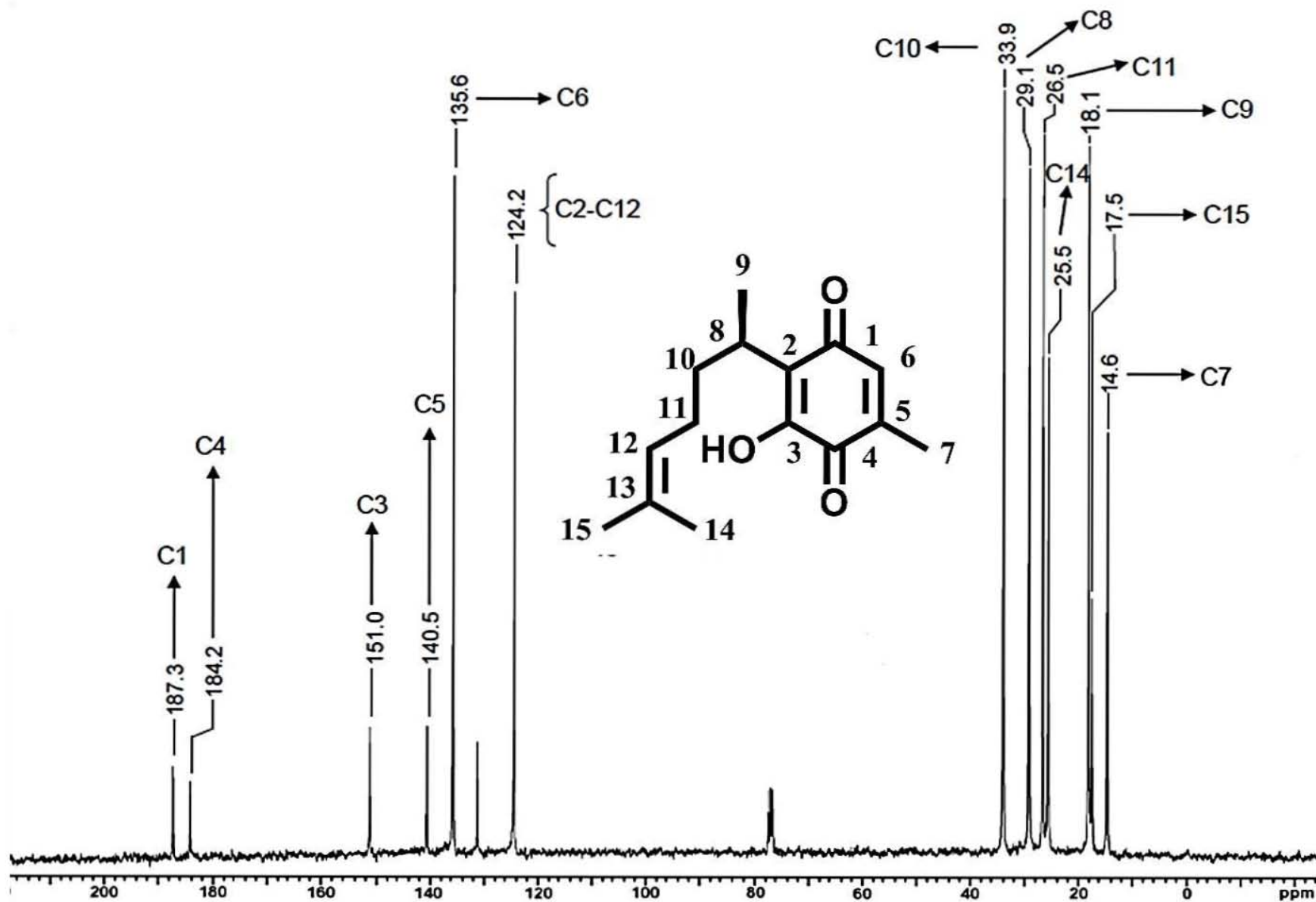




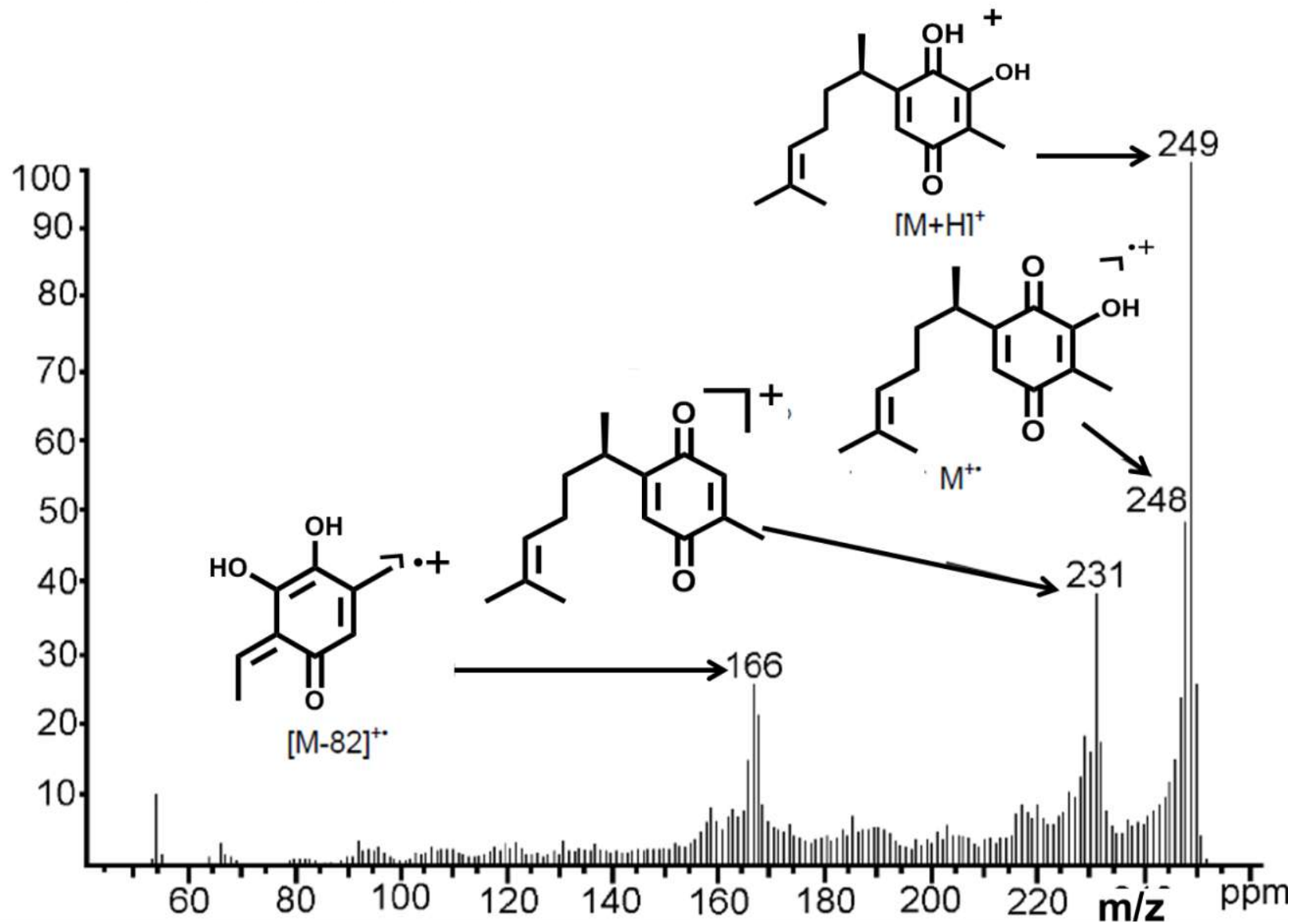
Espectro 1. EMIE de 1, potencial de ionización 70 eV



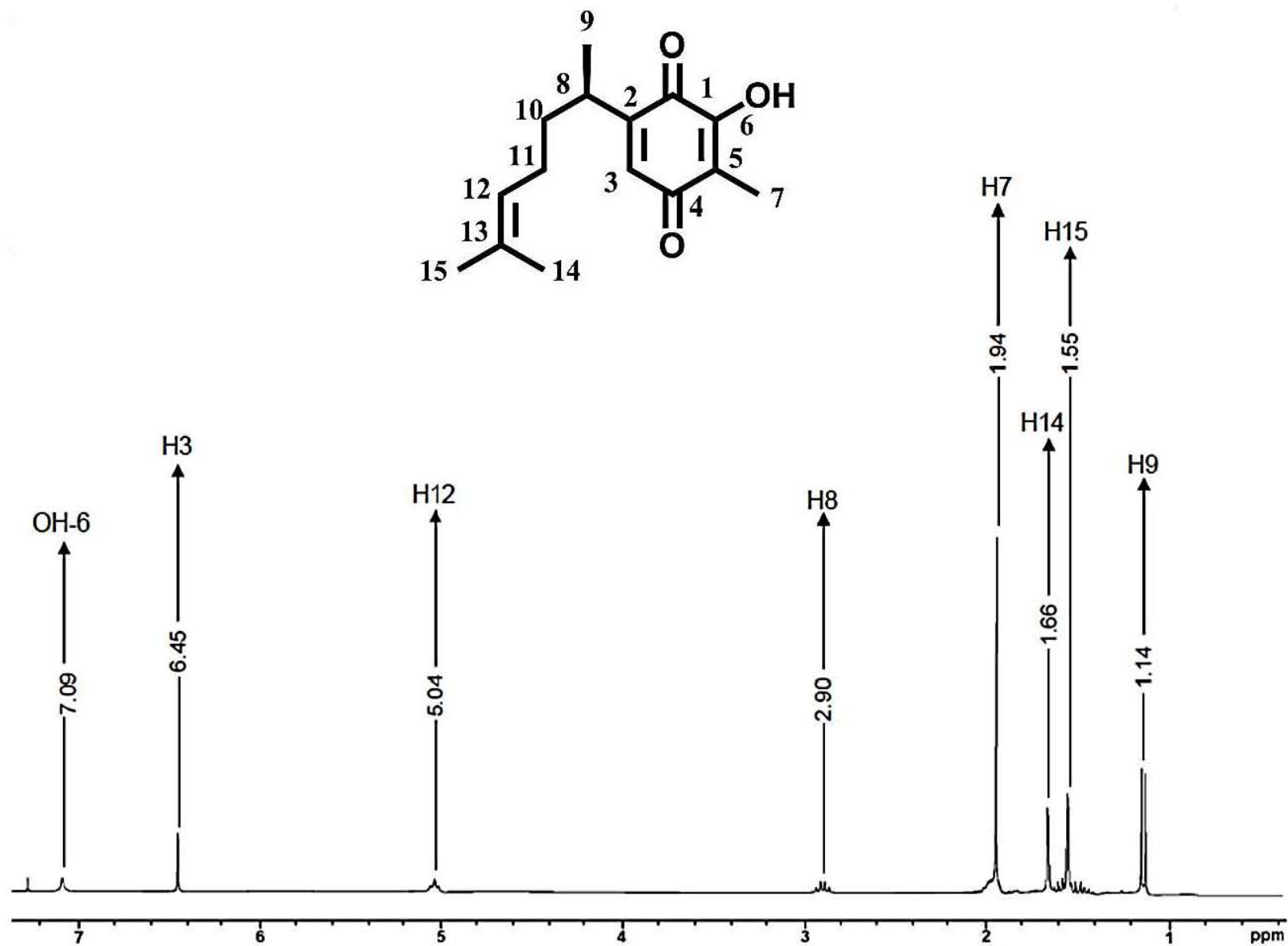
**Espectro 2.** RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de 1, determinado a 300 MHz



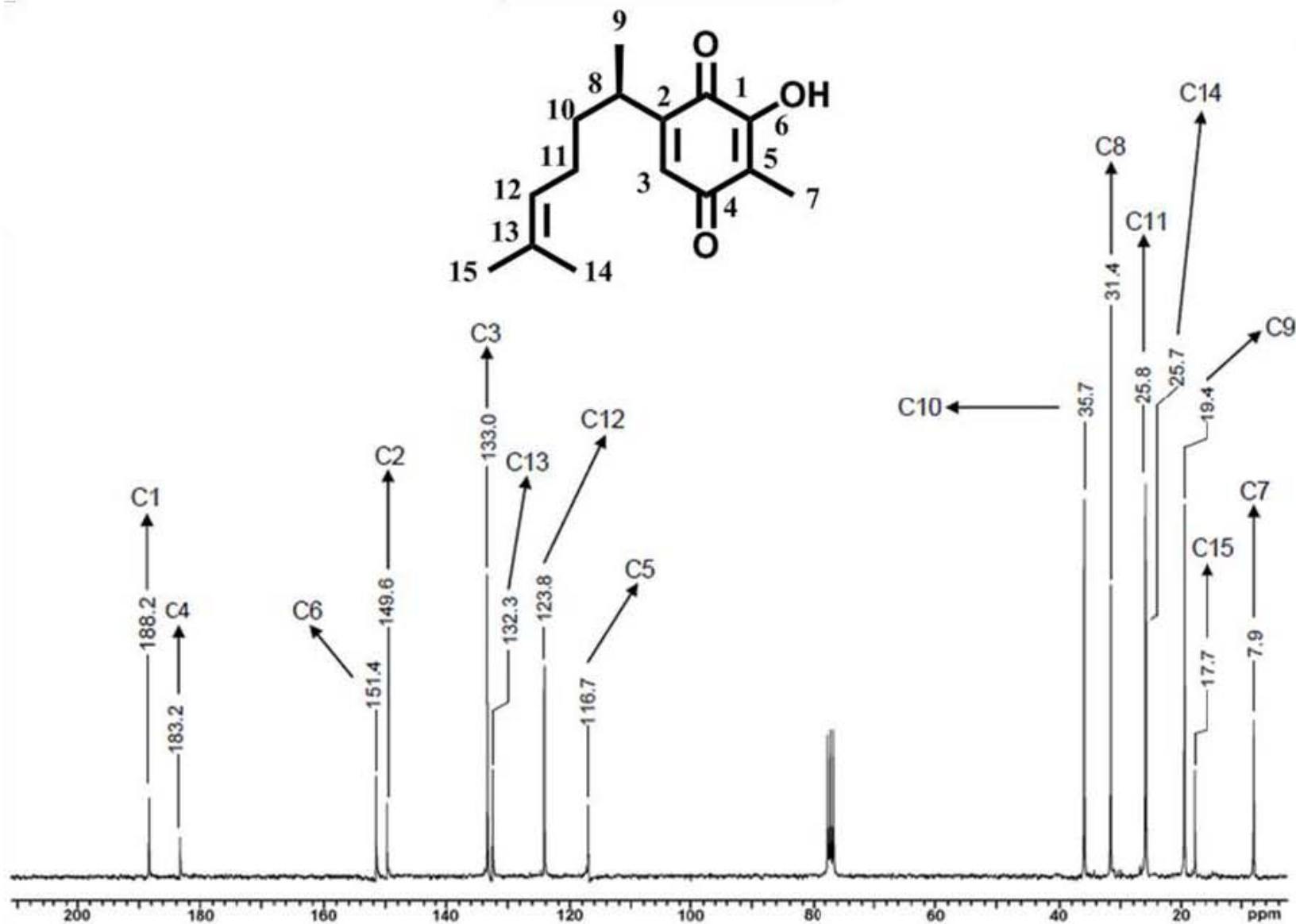
**Espectro 3.** RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) de 1, determinado a 75 MHz.



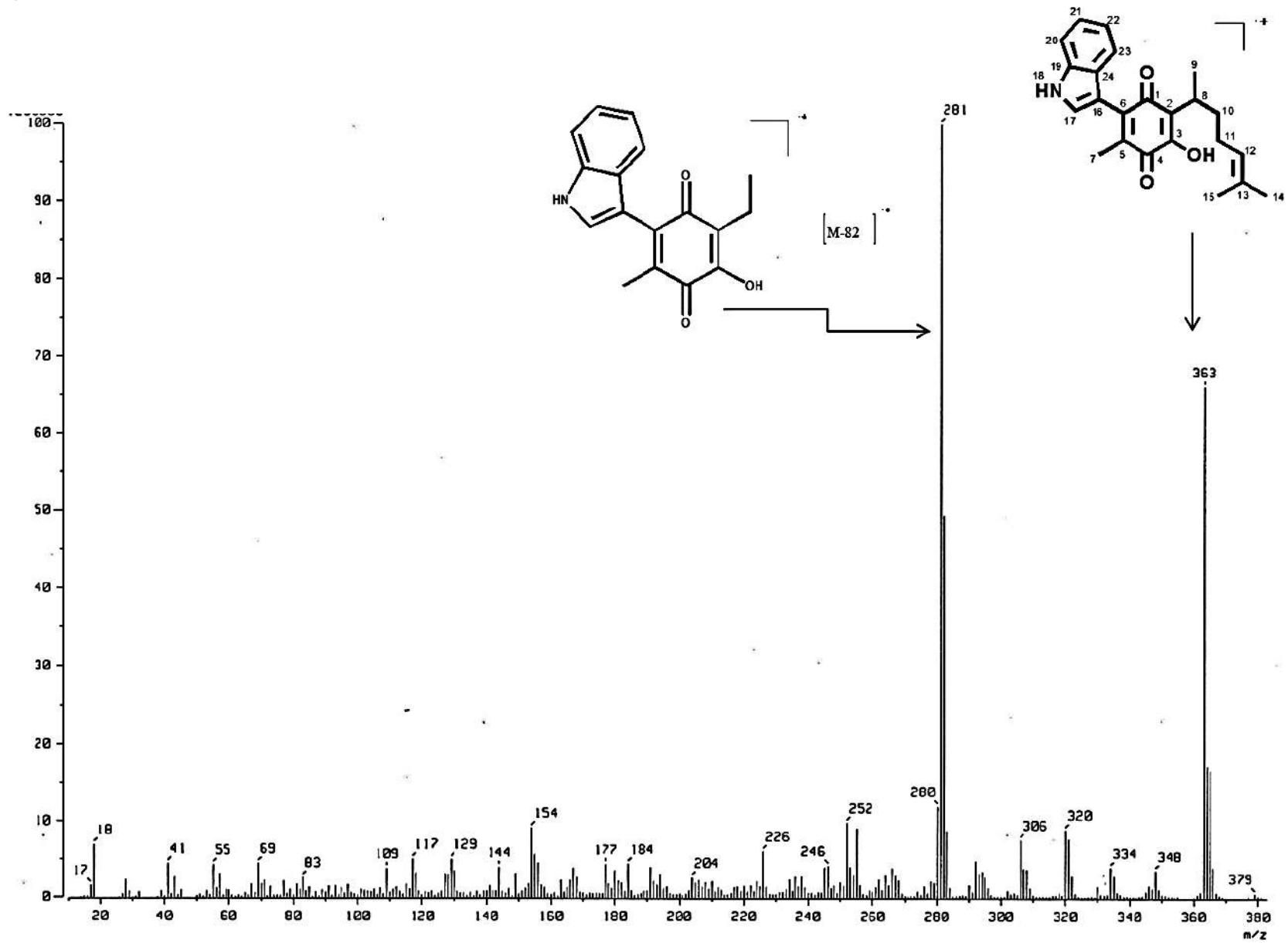
Espectro 4. EMIE de 2, potencial de ionización 70 eV



**Espectro 5.** RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de 2, determinado a 300 MHz



**Espectro 6.** RMN $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de 2, determinado a 75 MHz.



**Espectro 7.** EMIE de 6, potencial de ionización 70 eV

## [ Elemental Composition ]

Data : DR.MIRANDA124 Date : 28-Sep-2015 11:54

Sample: M.en.C.VLADIMIR-CARRANZA-TELLEZ

Note : PeIn3-363-131

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

RT : 6.16 min

Scan#: (32,50)

Elements : C 26/0, H 27/0, N 1/0, O 4/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 10mmu if m/z &gt; 10

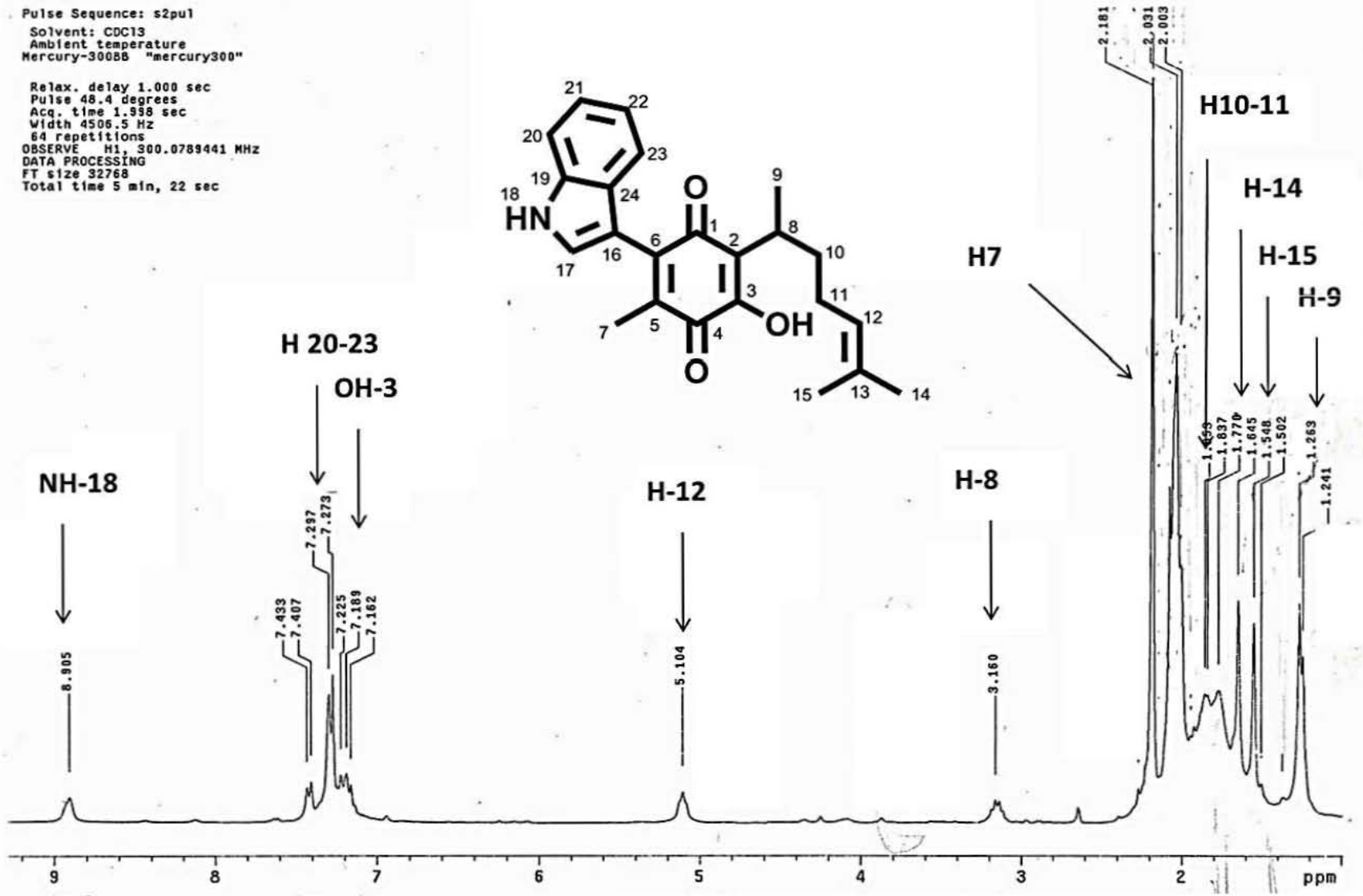
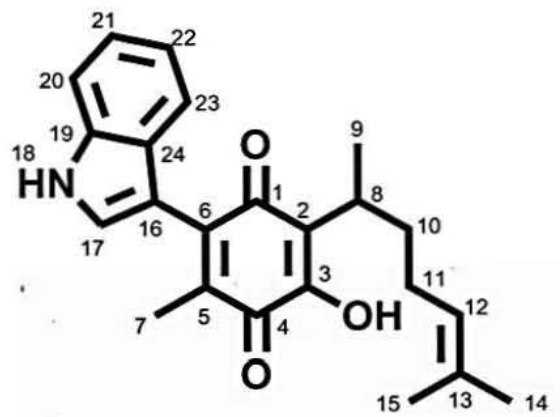
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 12.0

Observed m/z	Int%						
363.1816	51.2						
Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O	
363.1834	-5.0 / -1.8	12.0	23	25	1	3	

Figura 59. Resultados de la espectrometría de masas de alta resolución para 6

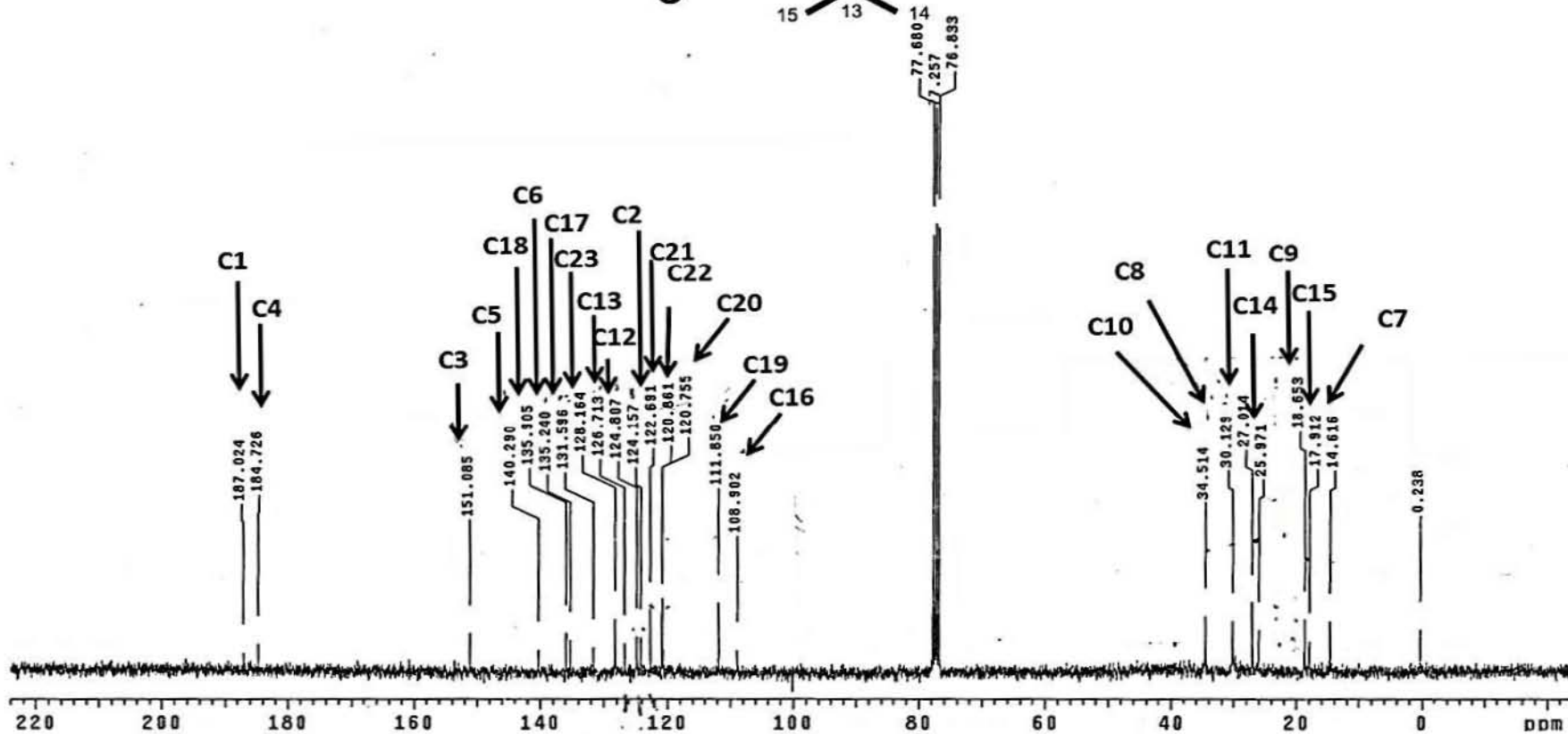
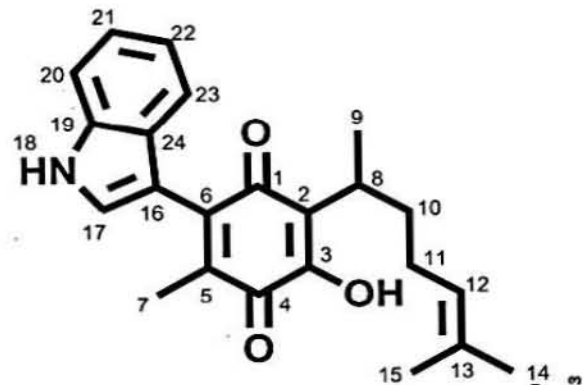


PIF2  
 250914  
 Pulse Sequence: s2pu1  
 Solvent: CDCl3  
 Ambient temperature  
 Mercury-300BB "mercury300"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 48.4 degrees  
 Acq. time 1.998 sec  
 Width 4506.5 Hz  
 64 repetitions  
 OBSERVE H1, 300.0789441 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 5 min, 22 sec

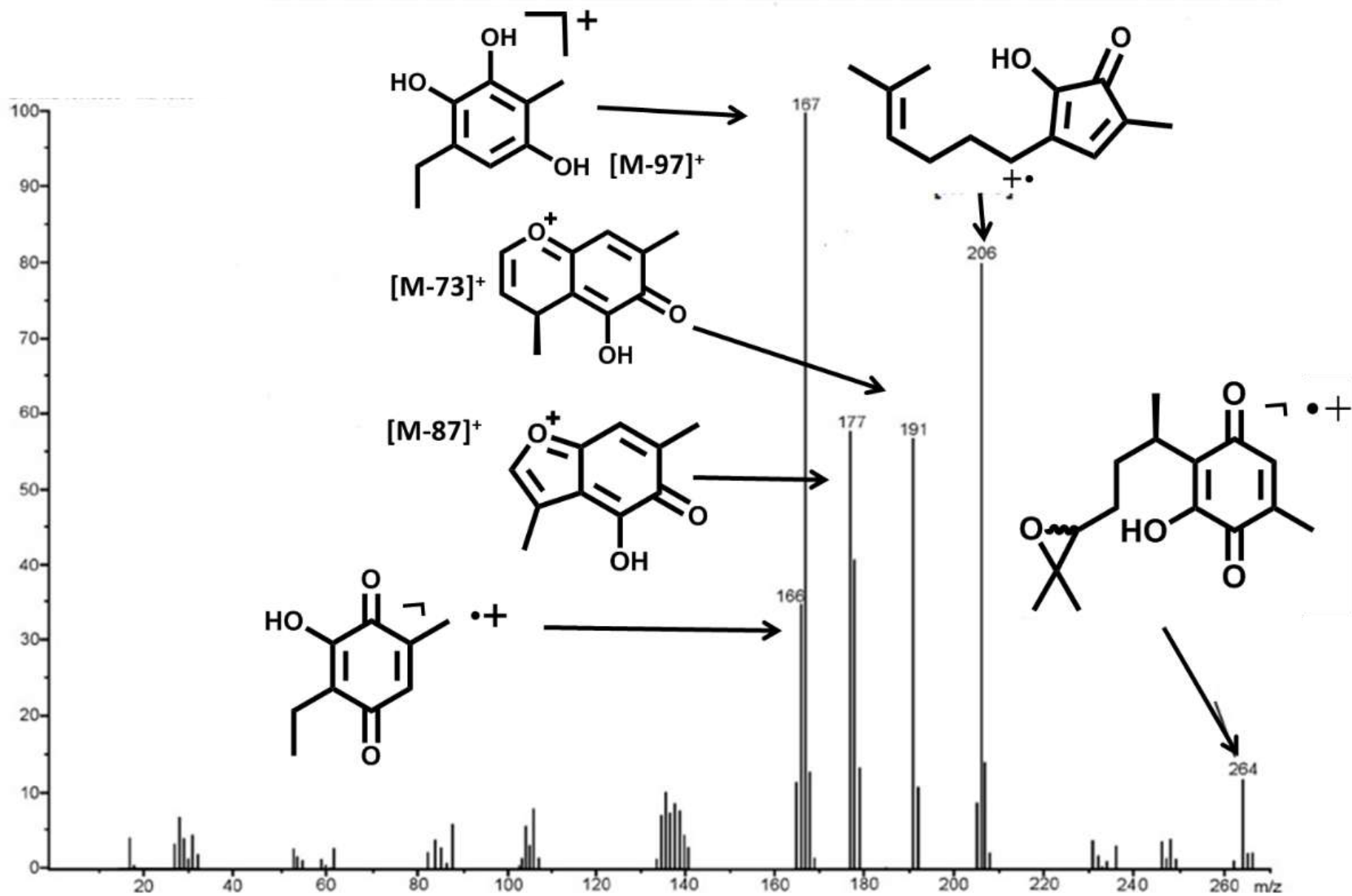


Espectro 8. RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) del 6, determinado a 300 MHz.

plf2  
081014  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDC13  
Ambient temperature  
Mercury-30088 "mercury300"  
Relax. delay 0.800 sec  
Pulse 35.1 degrees  
Acq. time 0.301 sec  
Width 18691.6 Hz  
4000 repetitions  
OBSERVE C13, 75.4548933 MHz  
DECOUPLE H1, 300.0804132 MHz  
Low power 1023 dB atten.  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 1.0 Hz  
FT size 32768  
Total time 1 hr, 30 min, 27 sec



Espectro 9. RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) de 6, determinado a 75 MHz



**Espectro 10.** EMIE de 10, potencial de ionización 70 eV.

[Elemental Composition]

Data: M.C. Vladimir Carranza

Sample: BUAP 163

Note: EPOP

Inlet: Direct

Ion Mode: EI+

RT: 1.73 min

Scan#: 45

Elements: C 17/0, H 24/0, O 4/0

Mass Tolerance: 1000ppm, 10mmu if m/z > 10

Unsaturation (U.S.): -0.5 - 10.0

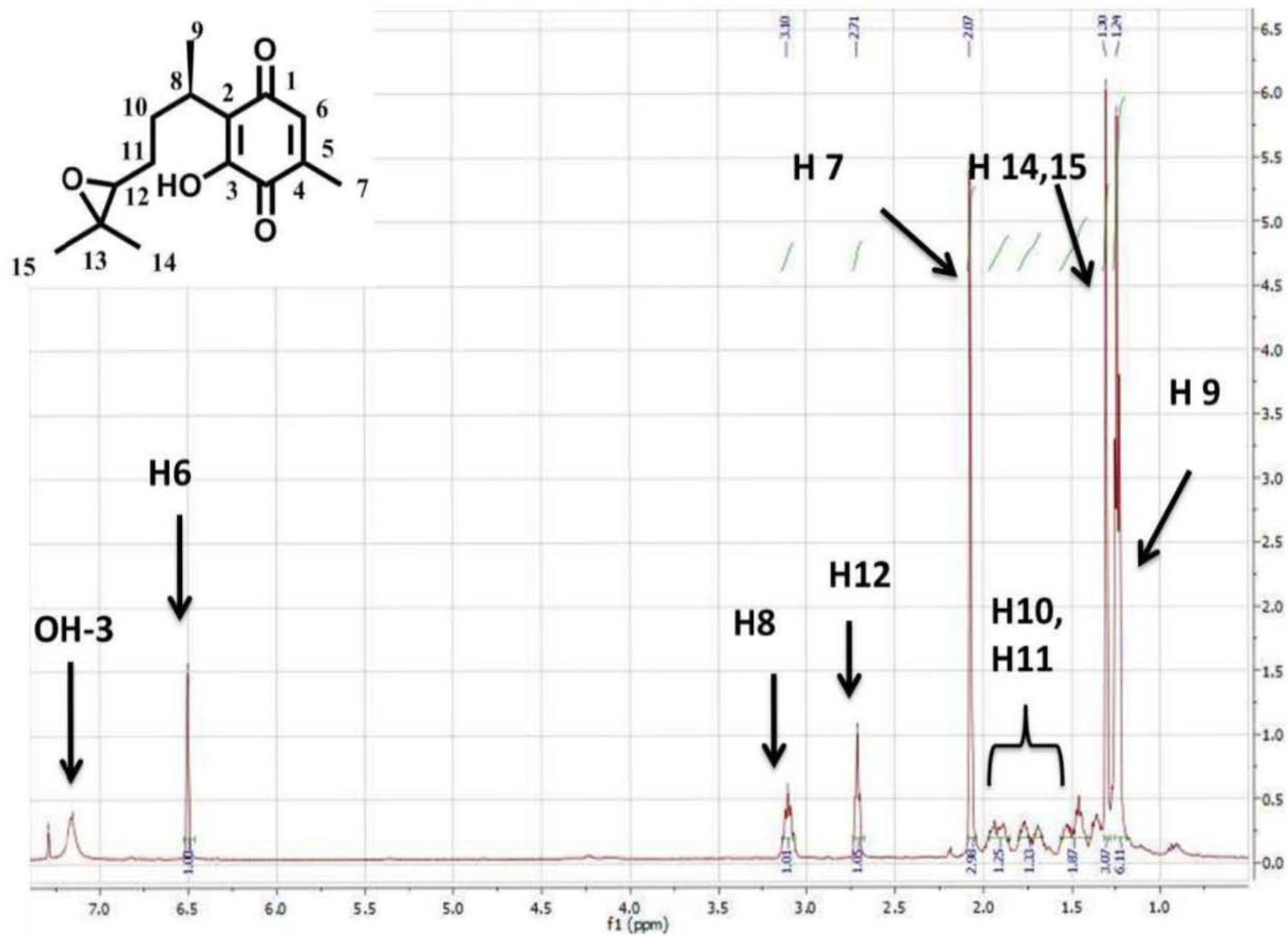
Observed m/z	Int%
--------------	------

264.1355	6.8
----------	-----

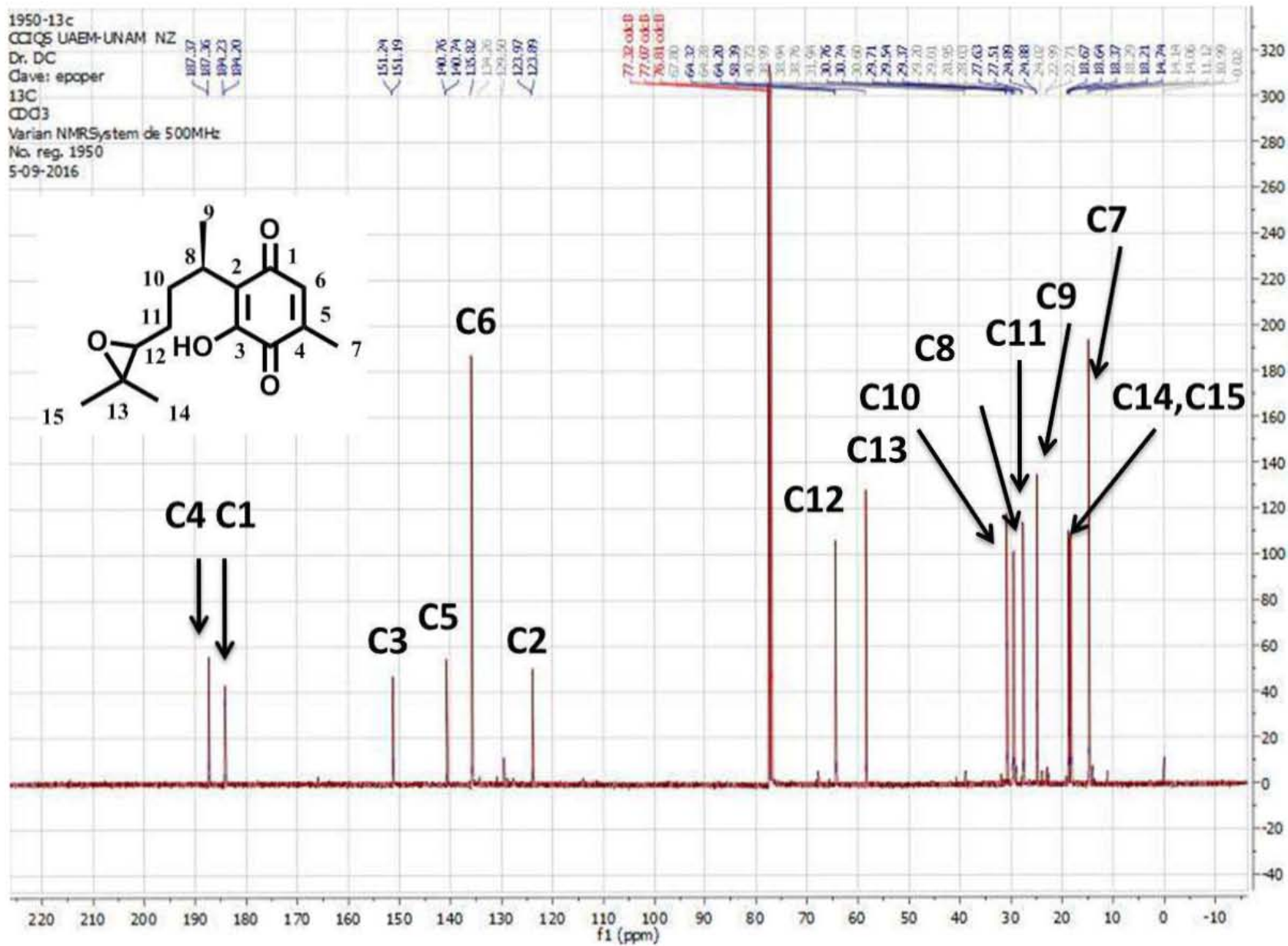
Estimated m/z	Err[ppm / mmu]	U.S.	C	H	O
---------------	----------------	------	---	---	---

264.1362	-2.9 / -1.5	6.0	15	20	4
----------	-------------	-----	----	----	---

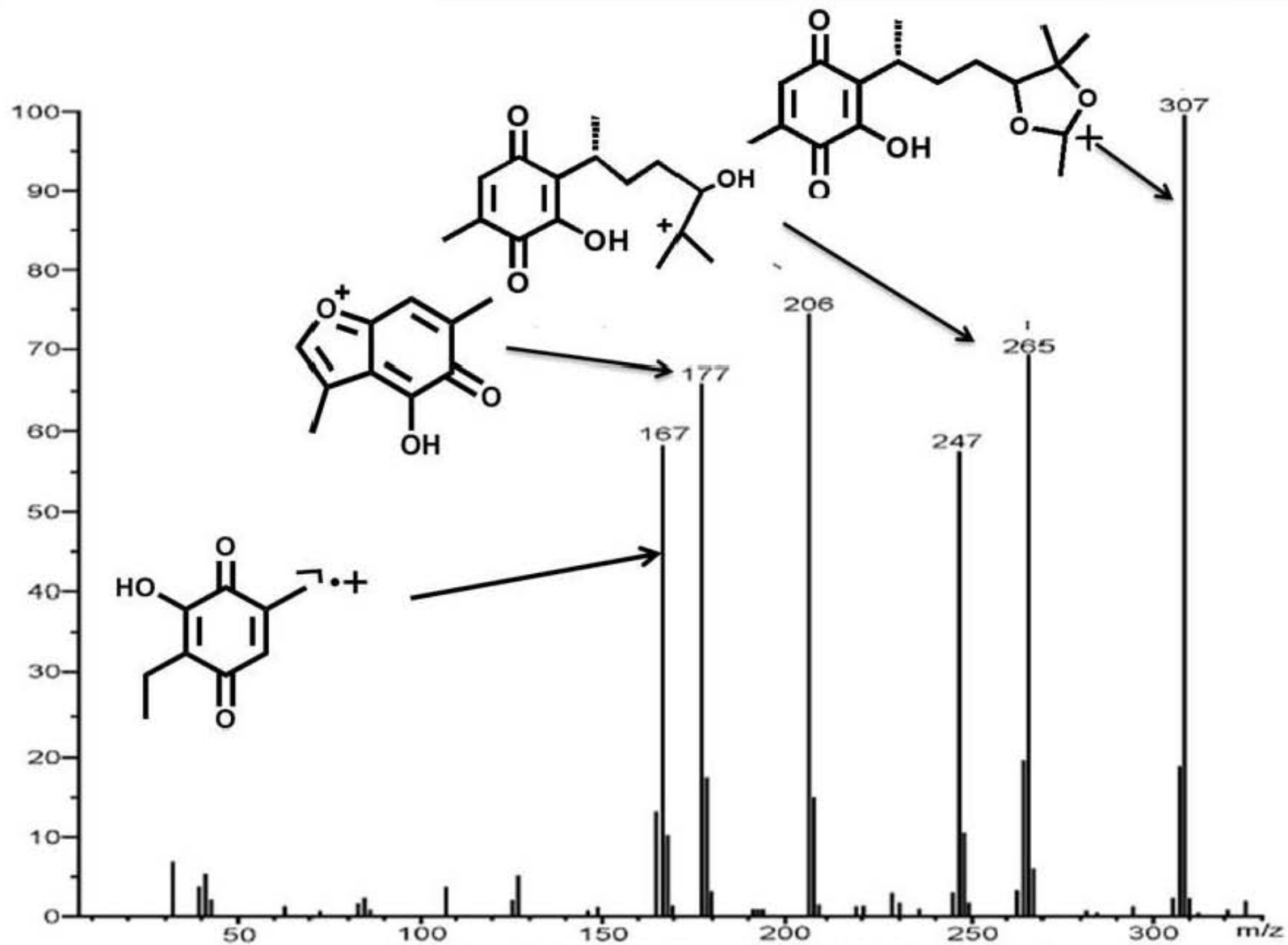
Figura 60. Resultados de la espectrometría de masas de alta resolución para 10.



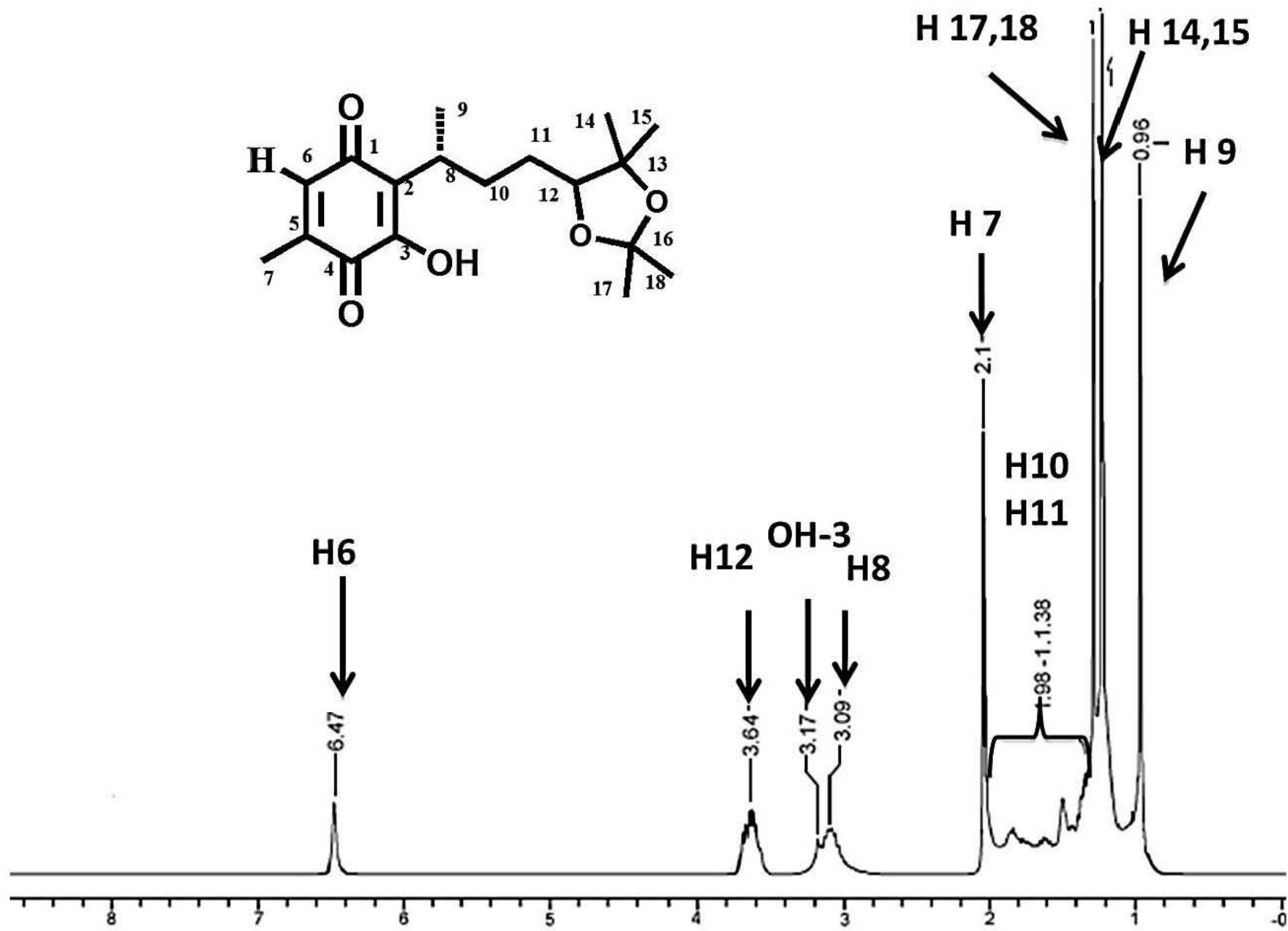
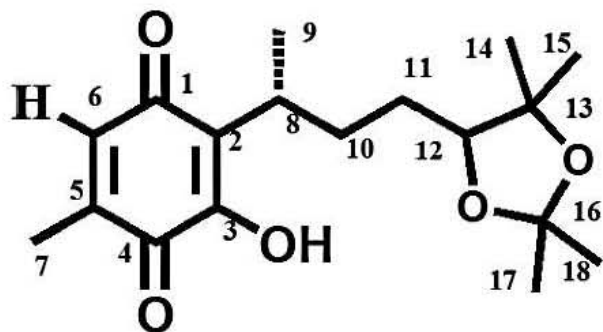
**Espectro 11.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de **10**, determinado a 500 MHz



**Espectro 12.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de **10**, determinado a 125 MHz.

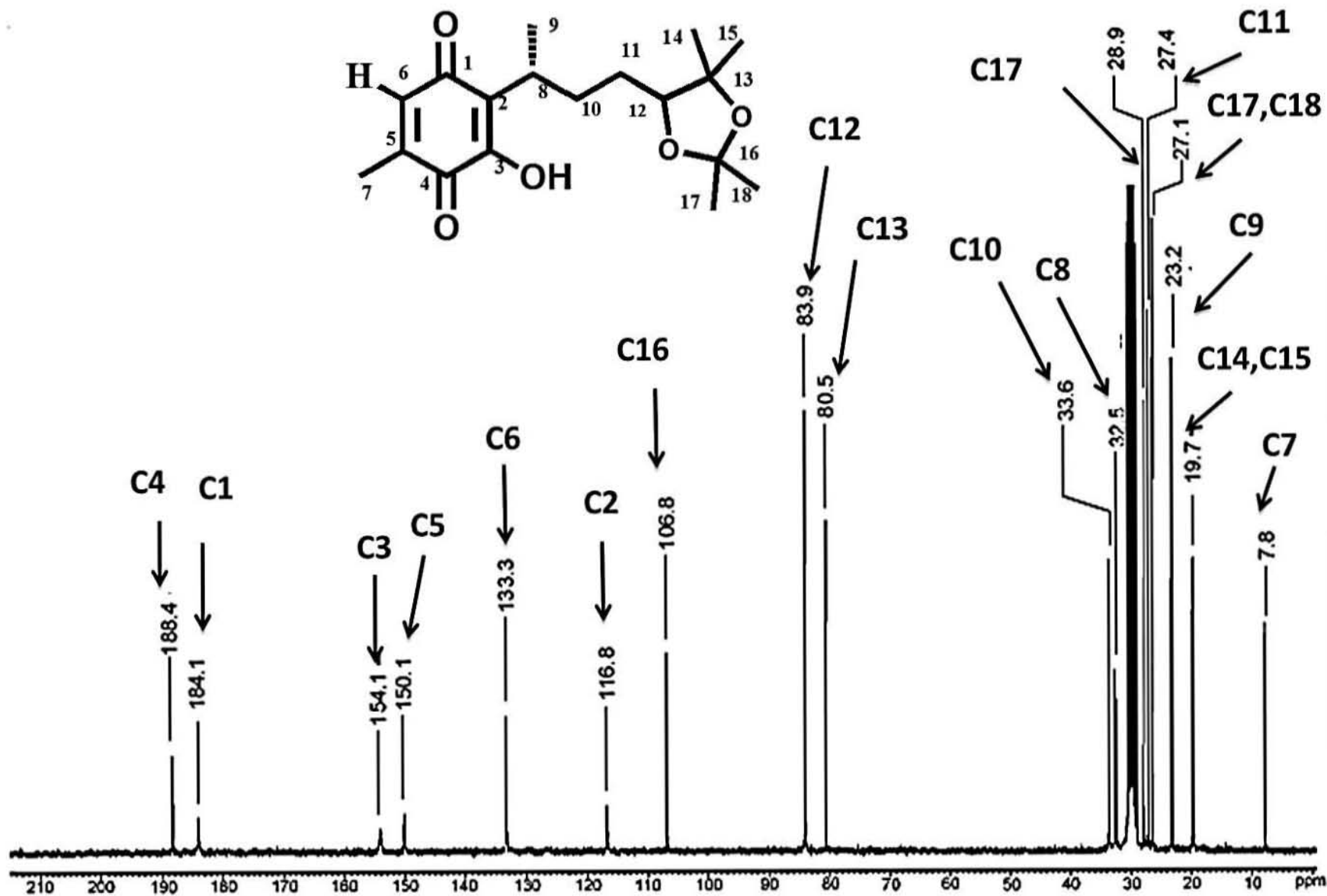


Espectro 13. Espectro EMIE de 12, potencial de ionización de 70eV

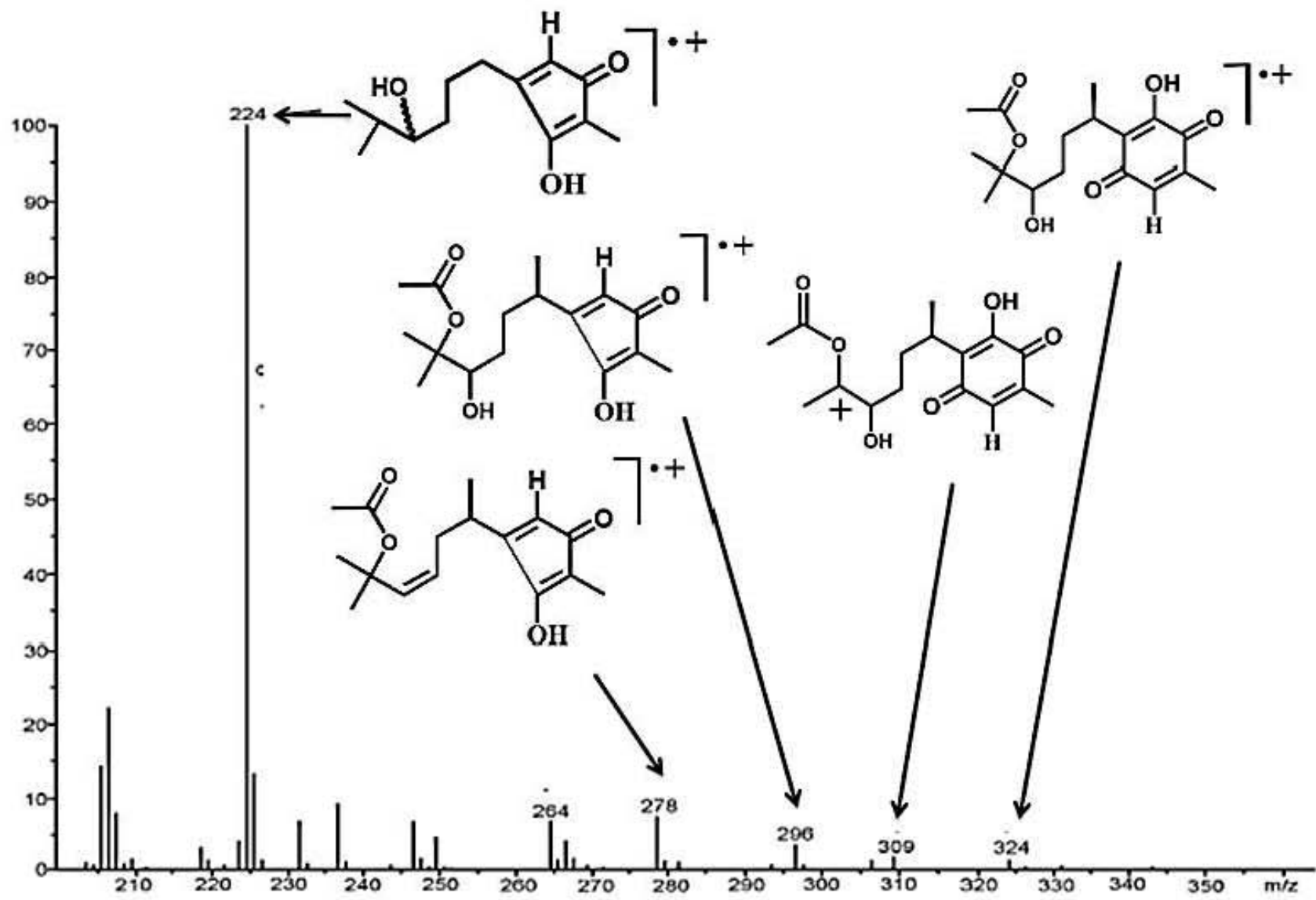


**Espectro 14.** Espectro RMN $^1\text{H}$  (acetona- $d_6$ ) de 12, determinado a 300 MHz





**Espectro 15.** Espectro RMN<sup>13</sup>C (acetona-*d*<sub>6</sub>) de 12, determinado a 75 MHz.



**Espectro 16.** Espectro EMIE de 14, potencial de ionización de 70eV

[Elemental Composition]

Data: M.C. Vladimir Carranza

Sample: BUAP-207

Note: DPAC

Inlet: Direct

Ion Mode: EI+

RT: 2.37 min

Scan#: 8,23

Elements: C 23/0, H 35/0, O 6/0

Mass Tolerance: 1000ppm, 6mmu if m/z > 6

Unsaturation (U.S.): -0.5 - 20.0

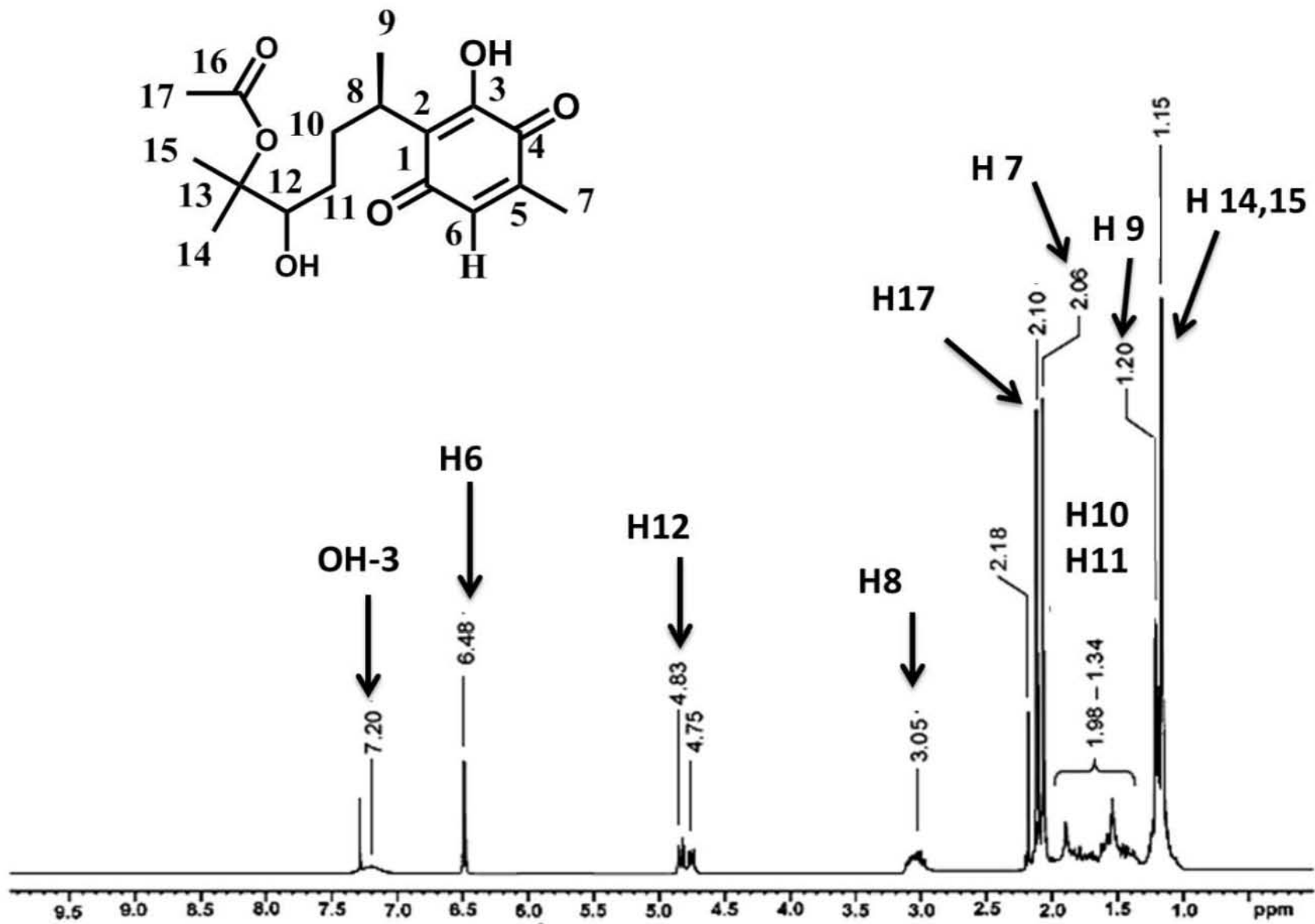
Observed m/z    Int%

324.1601        1.4

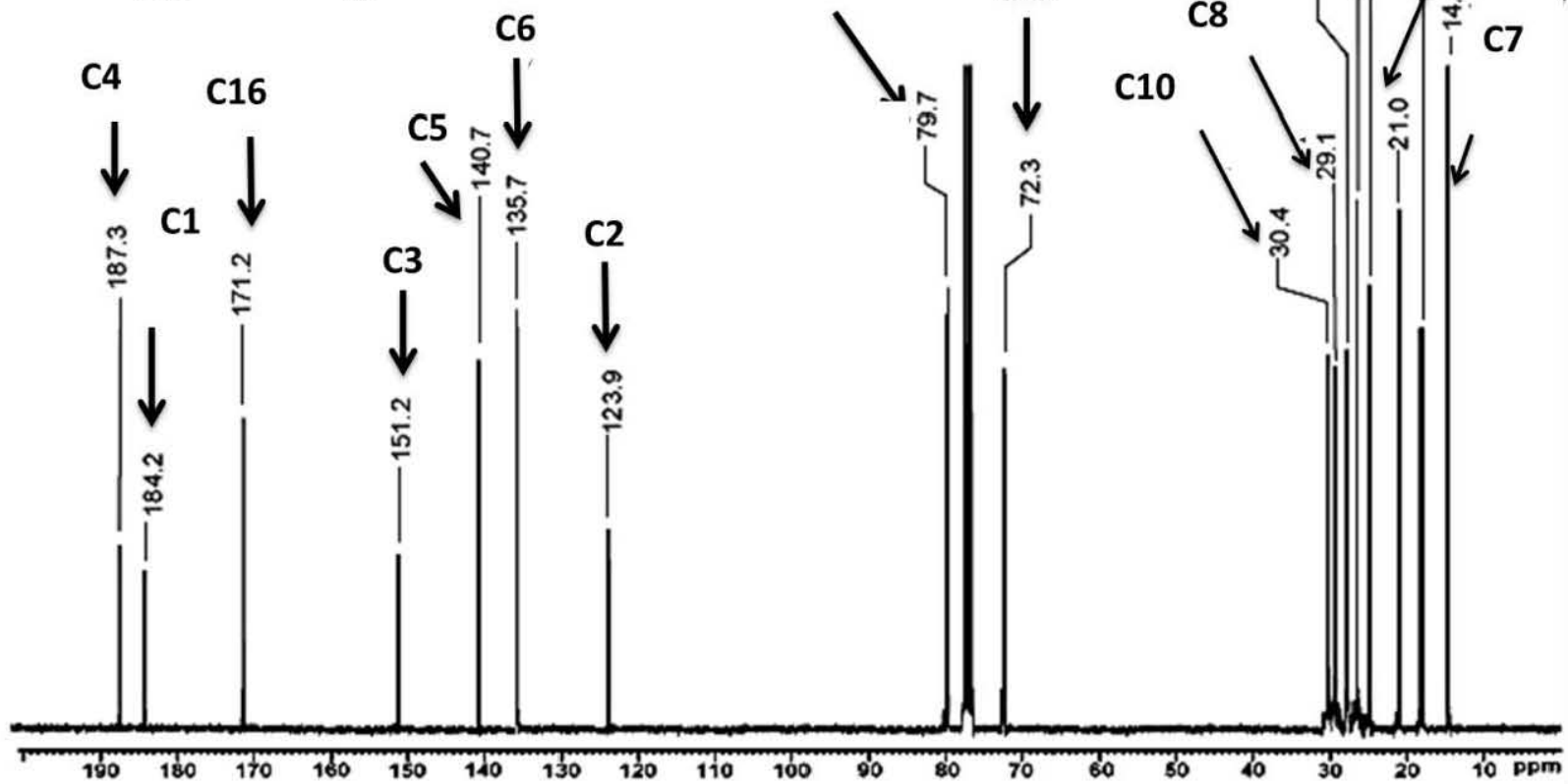
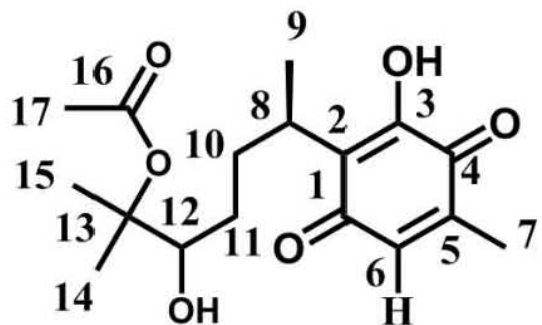
Estimated m/z    Err [ppm / mmu] U.S.    C    H    O

324.1573        +8.8 / +2.8    6.0    17    24    6

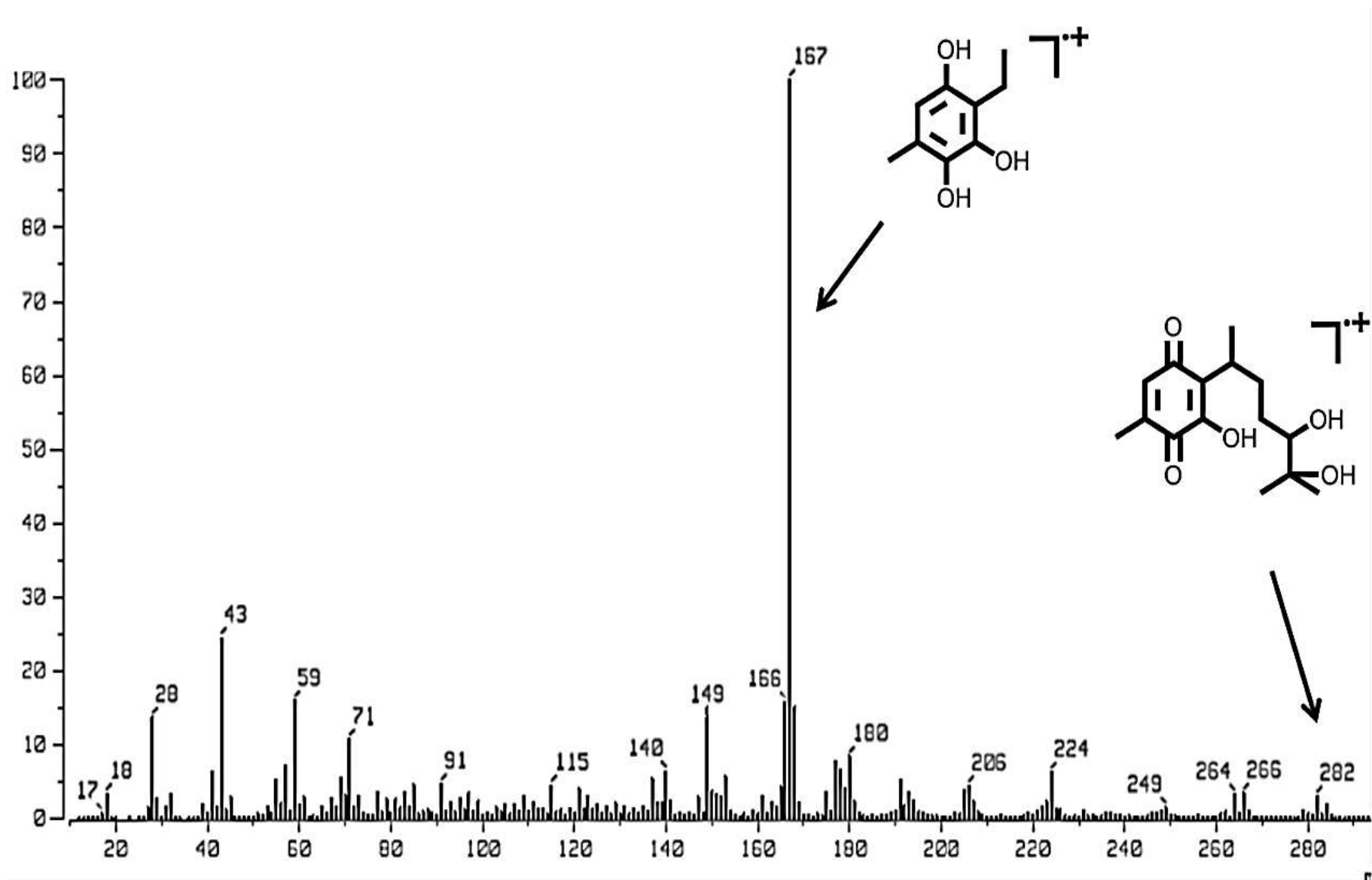
Figura 61. Resultados de espectrometría de masas de alta resolución para 14.



**Espectro 17.** Espectro RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>), del 14, determinado a 300 MHz



**Espectro 18.** Espectro RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), de **14**, a 75 MHz



**Espectro 19.** EMIE de 17, potencial de ionización de 70 eV.

Note : DioP2-282-147

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

RT : 5.41 min

Scan#: (37,46)

Elements : C 15/0, H 22/0, O 5/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z > 5

Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 20.0

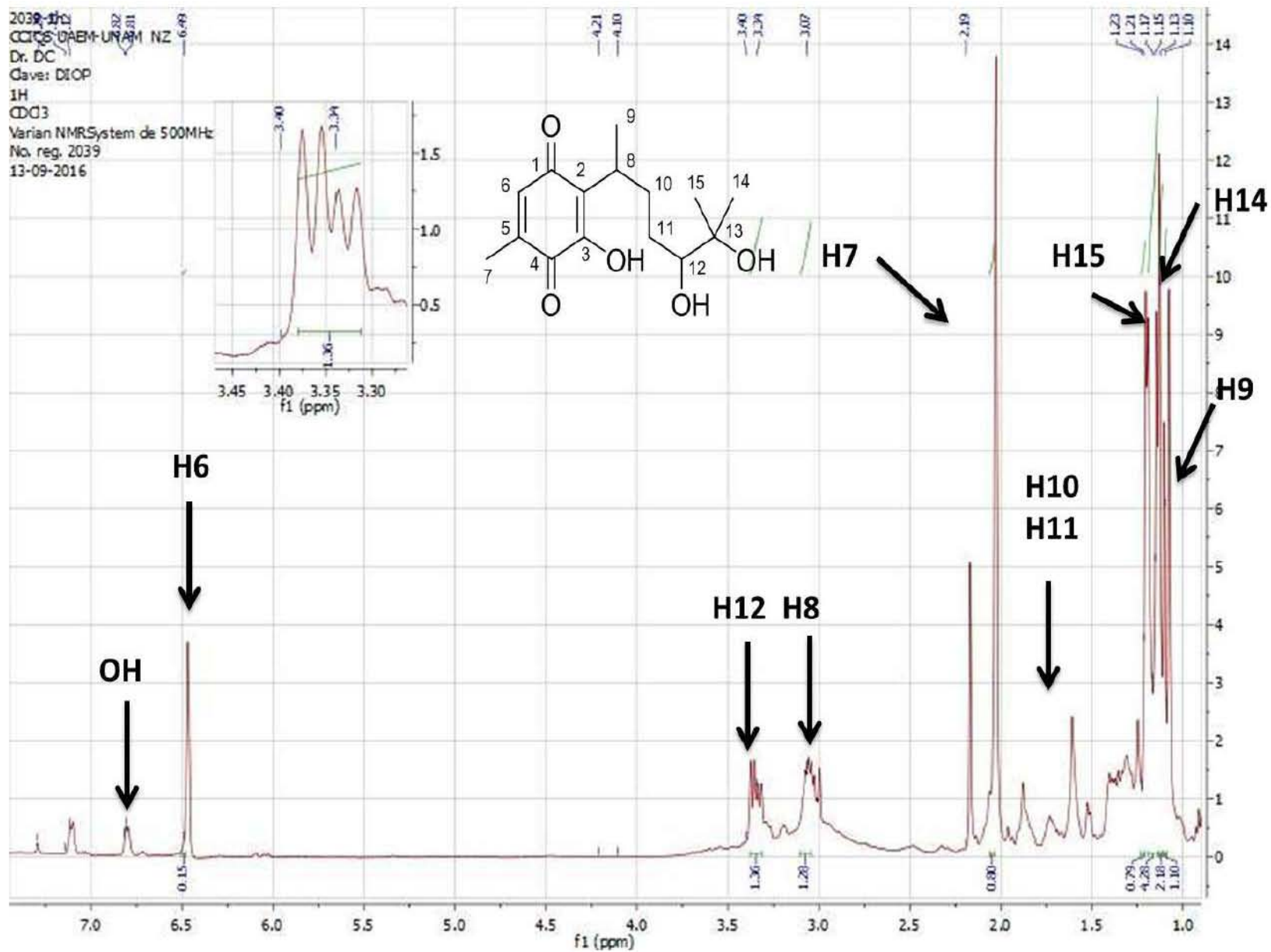
Observed m/z Int%

282.1472 24.5

Estimated m/z Err [ppm / mmu] U.S. C H O

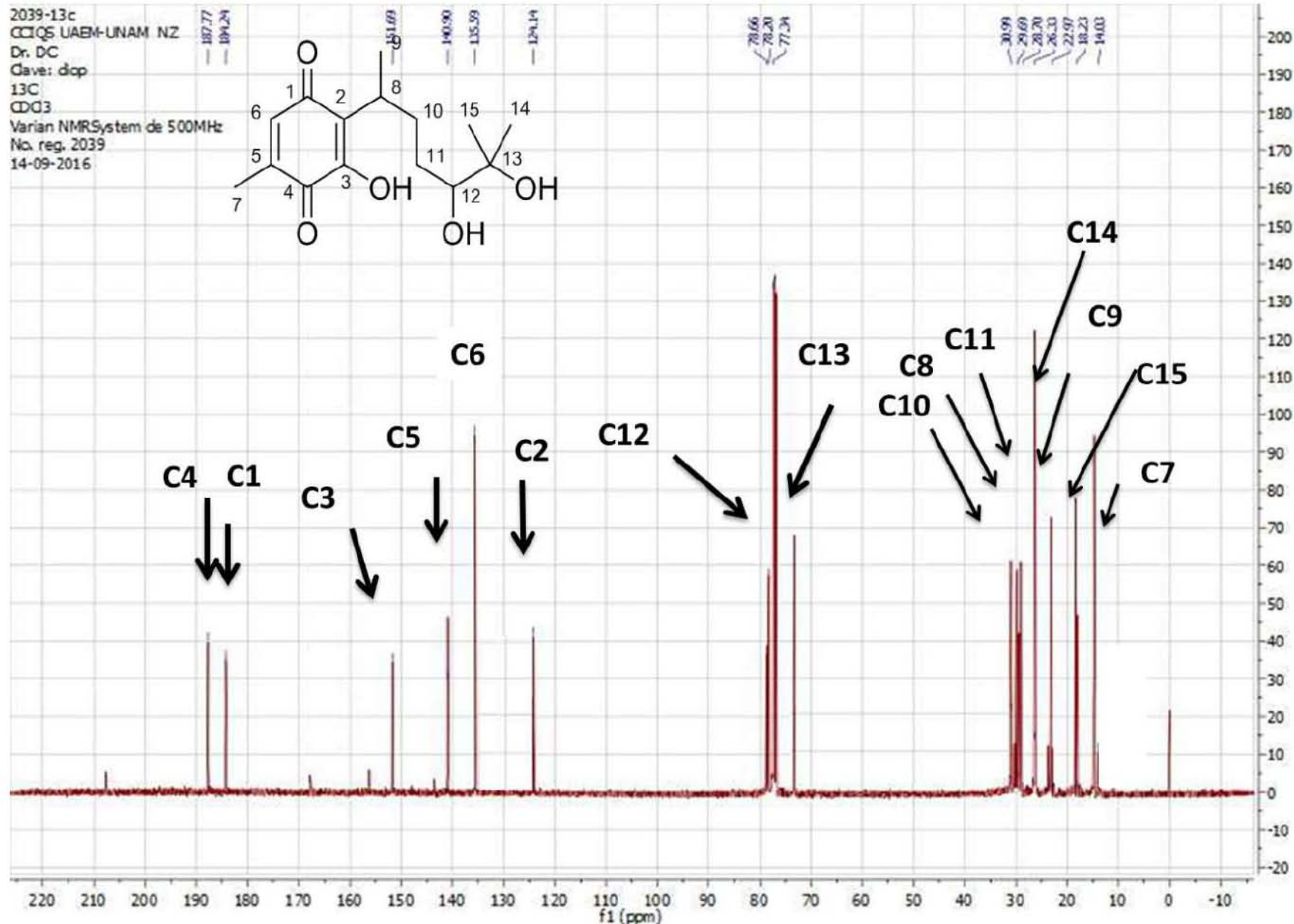
282.1467 +1.6 / +0.5 5.0 15 22 5

Figura 62. Resultados de espectrometría de masas de alta resolución para 16.



**Espectro 20.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de **16**, determinado a 500 MHz.





**Espectro 21.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) de **16**, determinado a 125 MHz

### **A.III. Tablas de propiedades calculadas**

**Tabla 31.** Propiedades toxicológicas y fisicoquímicas determinadas con OSIRIS de **6-9**

		<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>Riesgo toxicológico</b>	Mutagénico	N	N	N	N
	Tumorigénico	N	N	N	N
	Irritante	H	H	N	N
	Efecto reproductivo	N	N	N	N
	<i>cLogP</i>	4.6	4.6	3.17	2.83
<b>Propiedades fisicoquímicas</b>	Solubilidad ( <i>Log S</i> )	-4.07	-4.07	-4.46	-4.15
	Masa molar	363	363	287	303
	TPSA	70.16	70.16	49.93	70.16
	Druglikeness	-0.87	-0.87	-0.57	2.29
	Drug Score	0.24	0.24	0.5	0.74

6: indolilperezona, 7: indolilisoperezona, 8: indolilmenadiona, 9: indolilplumbagina.  
 N= sin riesgo, M= riesgo medio, H= riesgo alto. DL= drug likeness, DS= drug score.

Tabla 32. Resultados de la predicción del metabolismo

Modelo de Metabolismo	Moléculas evaluadas							
	6		7		8		9	
	Resultado	P	Resultado	P	Resultado	P	Resultado	P
Sustrato CYP450 2C9	NS	0.764	NS	0.794	NS	0.734	NS	0.740
Sustrato CYP450 2D6	NS	0.810	NS	0.807	NS	0.814	NS	0.818
Sustrato CYP450 3A4	S	0.678	S	0.646	NS	0.500	NS	0.569
Inhibidor CYP450 1A2	I	0.637	I	0.664	I	0.914	I	0.912
Inhibidor CYP450 2C9	I	0.510	NI	0.511	I	0.894	I	0.907
Inhibidor CYP450 2D6	NI	0.812	NI	0.812	NI	0.530	NI	0.687
Inhibidor CYP450 2C19	NI	0.589	NI	0.619	I	0.840	I	0.719
Inhibidor CYP450 3A4	NI	0.809	NI	0.808	NI	0.707	NI	0.830

6: indolilperezona, 7: indolilisoperezona, 8: indolilmenadiona, 9: indolilplumbagina. S = sustrato, I = inhibidor, NI = no inhibidor, HI = alta inhibición, NS = no sustrato, P = probabilidad

**Tabla 33.** Predicción de la absorción de los derivados de la perezona en diferentes modelos.

Modelo de absorción	Moléculas									
	1		10		12		14		16	
	Res	P	Res	P	Res	P	Res	P	Res	P
<b>Barrera hematoencefálica</b>	BBB+	0.841	BBB+	0.913	BBB+	0.903	BBB+	0.804	BBB+	0.718
<b>Absorción intestinal humana</b>	HIA+	0.991	HIA+	0.915	HIA+	0.813	HIA+	0.847	HIA+	0.913
<b>Permeabilidad Caco-2</b>	Caco2+	0.711	Caco2+	0.598	Caco2-	0.529	Caco2-	0.572	Caco2+	0.500
<b>Sustrato de la glicoproteína P</b>	S	0.514	S	0.672	S	0.527	S	0.738	S	0.767
<b>Inhibidor de la glicoproteína P</b>	NI	0.555	NI	0.508	NI	0.533	NI	0.618	NI	0.787
	I	0.664	I	0.500	I	0.529	I	0.580	NI	0.750
<b>Transportador renal de cationes orgánicos</b>	NI	0.831	NI	0.862	NI	0.847	NI	0.893	NI	0.909

**Res:** Resultados, **1:** perezona, **10:** epóxido de la perezona, **12:** cetal del diol de la perezona, **14:** diol monoacetilado de la perezona. **16:** diol de la perezona. + = positivo a la absorción, - = negativo a la absorción, S = sustrato, I = inhibidor, NI = no inhibidor NS = no sustrato, P = probabilidad.

**Tabla 34.** Predicción de la absorción de los derivados de la isoperezona en diferentes modelos.

Modelo de absorción	Moléculas									
	2		11		13		15		17	
	Res	P	Res	P	Res	P	Res	P	Res	P
<b>Barrera hematoencefálica</b>	BBB+	0.798	BBB+	0.878	BBB+	0.903	BBB+	0.740	BBB+	0.718
<b>Absorción intestinal humana</b>	HIA+	0.995	HIA+	0.953	HIA+	0.927	HIA+	0.912	HIA+	0.913
<b>Permeabilidad Caco-2</b>	Caco2+	0.720	Caco2+	0.604	Caco2-	0.526	Caco2-	0.561	Caco2+	0.500
<b>Sustrato de la glicoproteína P</b>	NS	0.522	S	0.641	S	0.538	S	0.709	S	0.767
<b>Inhibidor de la glicoproteína P</b>	I	0.537	I	0.580	I	0.608	I	0.514	NI	0.787
	I	0.644	I	0.512	NI	0.512	I	0.579	NI	0.750
<b>Transportador renal de cationes orgánicos</b>	NI	0.850	NI	0.878	NI	0.861	NI	0.905	NI	0.909

**Res:** Resultado, **2:** isoperezona, **11:** epóxido de la isoperezona, **13:** cetal del diol de la isoperezona, **15:** Diol monoacetilado de la isoperezona. **17:** Diol de la isoperezona + = positivo a la absorción, - = negativo a la absorción, S = sustrato, I = inhibidor, NI = no inhibidor NS = no sustrato, P = probabilidad.

**Tabla 35.** Resultados de la predicción del metabolismo para derivados de la perezona.

Modelo de Metabolismo	Moléculas									
	1		10		12		14		16	
	Res	P	Res	P	Res	P	Res	P	Res	P
<b>Sustrato CYP450 2C9</b>	NS	0.794	NS	0.771	NS	0.789	NS	0.851	NS	0.851
<b>Sustrato CYP450 2D6</b>	NS	0.870	NS	0.873	NS	0.880	NS	0.913	NS	0.890
<b>Sustrato CYP450 3A4</b>	S	0.609	S	0.686	S	0.645	S	0.695	S	0.680
<b>Inhibidor CYP450 1A2</b>	NI	0.687	NI	0.769	NI	0.768	NI	0.904	NI	0.897
<b>Inhibidor CYP450 2C9</b>	NI	0.656	NI	0.800	NI	0.819	NI	0.771	NI	0.828
<b>Inhibidor CYP450 2D6</b>	NI	0.743	NI	0.893	NI	0.923	NI	0.919	NI	0.902
<b>Inhibidor CYP450 2C19</b>	NI	0.759	NI	0.758	NI	0.834	NI	0.815	NI	0.807
<b>Inhibidor CYP450 3A4</b>	NI	0.862	NI	0.715	NI	0.750	NI	0.840	NI	0.748

**Res:** Resultados, **1:** perezona, **10:** epóxido de la perezona, **12:** cetol del diol de la perezona, **14:** diol monoacetilado de la perezona. **16:** diol de la perezona. S = sustrato, I = inhibidor, NI = no inhibidor NS = no sustrato, P = probabilidad.

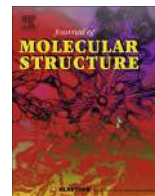
**Tabla 36.** Resultados de la predicción del metabolismo para derivados de la isoperezona.

Modelo de Metabolismo	Moléculas									
	2		11		13		15		17	
	Res	P	Res	P	Res	P	Res	P	Res	P
<b>Sustrato CYP450 2C9</b>	NS	0.822	NS	0.801	NS	0.8229	NS	0.8720	NS	0.8510
<b>Sustrato CYP450 2D6</b>	NS	0.867	NS	0.873	NS	0.8880	NS	0.9120	NS	0.8892
<b>Sustrato CYP450 3A4</b>	S	0.565	S	0.648	S	0.6304	S	0.6520	S	0.6797
<b>Inhibidor CYP450 1A2</b>	NI	0.686	NI	0.784	NI	0.7895	NI	0.9288	NI	0.8971
<b>Inhibidor CYP450 2C9</b>	NI	0.729	NI	0.839	NI	0.8618	NI	0.8113	NI	0.8284
<b>Inhibidor CYP450 2D6</b>	NI	0.802	NI	0.907	NI	0.9385	NI	0.9295	NI	0.9020
<b>Inhibidor CYP450 2C19</b>	NI	0.823	NI	0.819	NI	0.9075	NI	0.8788	NI	0.8067
<b>Inhibidor CYP450 3A4</b>	NI	0.883	NI	0.759	NI	0.7772	NI	0.8516	NI	0.7480

**Res:** Resultado, **2:** isoperezona, **11:** epóxido de la isoperezona, **13:** cetal del diol de la isoperezona, **15:** Diol monoacetilado de la isoperezona. **17:** Diol de la isoperezona, S = sustrato, I = inhibidor, NI = no inhibidor NS = no sustrato, P = probabilidad.



**A IV. Probatorios de artículos publicados con los resultados de este trabajo.**



## Characterization and comparison of perezone with some analogues. Experimental and theoretical study



Rene Gerardo Escobedo-González<sup>a</sup>, Luis Bahena<sup>c</sup>, José Luis Arias Tellez<sup>a</sup>, Jaime Hinojosa Torres<sup>b</sup>,  
Rene Miranda Ruvalcaba<sup>a</sup>, Juan Manuel Aceves-Hernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1 de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Asimilación Tecnológica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Jorge Jiménez Cantú s/n, Cuautitlán Izcalli CP 54729, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, CP 36010 Guanajuato, Gto, Mexico

### HIGHLIGHTS

- Perezone presents inhibitory properties against leukemia cell line K-562.
- Perezone is more potent inhibitor than its analogue isoperezone.
- Molecular docking results corroborates cancer inhibitory results.
- Theoretical calculations and experimental results are in good agreement.
- Perezone and analogues present properties ascribed to cancer inhibitors.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 February 2015

Received in revised form 6 May 2015

Accepted 7 May 2015

Available online 15 May 2015

#### Keywords:

Perezone  
Cancer inhibitors  
Characterization  
Docking  
DFT  
Sesquiterpenes

### ABSTRACT

Perezone had been used for centuries in the traditional Mexican medicine, it is useful and a handful of illness. Perezone and other derivatives also present activity against certain lines of cancer, such as the myeloblastoid leukemia cell line K-562 and carcinoma cell lines (PC-3 and SKLU-1) with IC<sub>50</sub> <10 μM. Perezone and isoperezone have shown the major cytotoxic potency. Characterization of perezone was carried out by UV-Visible, IR, DSC, TGA and powder X-ray diffraction, as well as docking studies using caspase-3 structures as receptors. Theoretical studies for optimizing the geometry of perezone were carried out and the results compared with values of single crystal X-ray diffraction. The experimental values of atomic distances, angles and dihedral angles are in good agreement with the theoretical values. Interaction of perezone with the cysteine catalytic site with the caspase-3 was found in the docking studies. A docking study of perezone, with horminone, thymoquinone and isoperezone as ligands and the protein apoptein, caspase-3 as receptor, was carried to demonstrate that the hindrance steric factor, chemical structure and the functional groups are important in the biological activity of these natural products. The docking score energetic values are in good agreement with the experimental cytotoxic results obtained from the experiments when perezone and analogues were studied in different types of cancer.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Perezone, (2-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-3-hydroxymethyl-p-benzoquinone) a sesquiterpene quinone, molecular weight 248.3 Dalton, is a secondary metabolite from the genus *Perezia* and recently renamed 'Acurtia'. Perezone (**1**) was first reported in 1852 by Leopoldo Río de la Loza [1]. This natural product was isolated for the first time from the root of *Perezia adnata*. It has been

studied in order to know the effect of its structure on its biological properties [2–5].

The structure of **1** was determined by using NMR spectroscopic methods [6–8] and its crystal structure was reported in 1986 [9]. Synthetic methods have been developed to obtain **1** in racemic form and related compounds [10–12]. In the Mexican traditional medicine the roots of *perezia* is used in laxative drinks, and for diuretic, regenerative and analgesic purposes. Perezone has interesting biological activities, such as the hypoglycemic effect, [13] inhibition of platelet aggregation [14], it increases the release of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> maintaining ATP production during reperfusion

\* Corresponding author.

[15], also it relaxes the basal tonus of the smooth muscle [16] and blocks the contractile response induced by Ach,  $K^+$  and  $Ba^{2+}$  [17]. Perezone acts as an electron sink in electron transport in the mitochondria [18] and it is considered to be a cardio protective agent [19]. Anti-feedant effects and phytotoxic activity [20] have been studied as well as the cytotoxic effect against several cancer cell lines [20]. In the present work we studied the properties of perezone in the caspase mechanism of some cancer cell lines, since some research the cytotoxic effect of ten derivative compounds including perezone and isoperezone, [NSC697124] was determined on the K-562 leukemia cell line and other cancer cell lines. Perezone and isoperezone have shown the major cytotoxic potency.

It was shown that perezone has greater cytotoxic effect than isoperezone [21]. Besides, perezone was part of the screening of compounds that induce apoptosis of cancer cell lines [22] and for the screening of agents against neuroblastoma [23].

#### Isolation of perezone and its isomerization to isoperezone

Perezone was isolated from dry roots of *Acourtia cuernavacana* spp. and extracted three times by using maceration with hexane at room temperature. As a result orange crystals were obtained. The yield was 2%, after purification 1% was achieved by recrystallization with acetone–hexane (1% yield). The non-natural derivative isoperezone **2** was prepared according to the protocol previously described with specific modifications [29].

Synthesis of other derivatives was described previously [1]. However, to our knowledge it is the first time that an explanation of mode of action of perezone in the catalytic site of a caspase 3 is given.

#### Cytotoxic activity in human tumor cell lines

The new derivatives of perezone reported in the literature [24] are a set of molecules with potential cytotoxic activities. After the cytotoxic test it is found that those compounds were less cytotoxic than Adriamycin, all of them exhibited high cytotoxicity predominantly on leukemia cell line K-562. Perezone and its isomer isoperezone can be considered as high cytotoxic agents for the

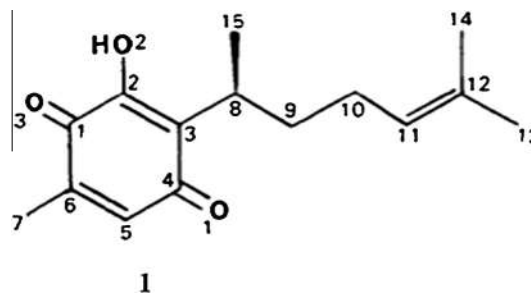


Fig. 1. Chemical structure of perezone.

myeloblastoid leukemia cell line K-562 and for carcinoma cell lines (PC-3 and SKLU-1) with  $IC_{50} < 10 \mu M$ .

There are other studies of perezone in the death induction on the K-562 human leukemia cell line [25]. In order to understand the action mechanism in the present report, a docking study of perezone as ligand and caspase 3, PDB code 1PAU as receptor, was carried out. The main objective is to explore the possibility to show that there is a specific site in this protein that interacts with the active compound perezone and some analogues.

## Materials and methods

### X-ray diffraction

Perezone was extracted and purified as reported previously from the root of *Perezia adnata*. A diffractometer made by SIEMENS model D-5000 Kristalloflex with a scanning rate of  $1^\circ/\text{min}$  and 2 h ranging from  $3^\circ$  to  $70^\circ$  was used at room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ). Cu  $K\alpha$  radiation with nickel filter and the powder method was employed to obtain the X-ray pattern. Experimental values from the X-ray diffraction analysis were compared with the corresponding calculated values using theoretical methods.

### Differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis

A TA-Instruments-DSC-2060-Differential-Scanning-Calorimeter was employed with Indium (In) as reference for calibration. The

Table 1

Experimental<sup>a</sup> X-ray diffraction values of bond lengths in Å, angles (e.s.d.), and dihedral angles (e.s.d.); in **bold**, the calculated equilibrium values using B3LYP, 6-31G(d,p), 6-311G, and 6-311G(d,p) basis sets.

Bond lengths Å from X-ray pattern (e.s.d.) and theoretical values			
O(1)–C(4) 1.226 (7) <b>1.226</b>	O(2)–C(2) 1.347 (7) <b>1.386</b>	O(3)–C(1) 1.220 (8) <b>1.228</b>	C(1)–C(2) 1.498 (8) <b>1.490</b>
C(1)–C(6) 1.472 (9) <b>1.478</b>	C(2)–C(3) 1.334 (8) <b>1.344</b>	C(3)–C(4) 1.469 (9) <b>1.492</b>	C(3)–C(8) 1.499 (7) <b>1.525</b>
C(4)–C(5) 1.469 (9) <b>1.477</b>	C(5)–C(6) 1.332 <b>1.337</b>	C(6)–C(7) 1.507 (8) <b>1.495</b>	C(8)–C(9) 1.535 (7) <b>1.544</b>
C(8)–C(15) 1.523 (8) <b>1.535</b>	C(9)–C(10) 1.509 (8) <b>1.532</b>	C(10)–C(11) 1.512 (9) <b>1.505</b>	C(11)–C(12) 1.312 (8) <b>1.347</b>
C(12)–C(13) 1.478 (10) <b>1.506</b>	C(12)–C(14) 1.495 (11) <b>1.504</b>		
Angles (°) experimental (e.s.d.) and theoretical values			
O(3)–C(1)–C(2) 119.3 (5) <b>119.2</b>	O(3)–C(1)–C(6) 122.0 (5) <b>122.67</b>	C(2)–C(1)–C(6) 118.6 (5) <b>118.5</b>	
O(2)–C(2)–C(1) 115.0 (1) <b>114.8</b>	O(2)–C(2)–C(3) 121.4 (5) <b>121.2</b>	C(1)–C(2)–C(3) 123.6 (5) <b>123.4</b>	
C(2)–C(3)–C(4) 116.6 (5) <b>116.3</b>	C(2)–C(3)–C(8) 124.5 (5) <b>124.7</b>	C(4)–C(3)–C(8) 118.9 (5) <b>118.7</b>	
O(1)–C(4)–C(3) 120.4 (5) <b>120.2</b>	O(1)–C(4)–C(5) 119.3 (6) <b>119.2</b>	C(3)–C(4)–C(5) 120.3 (6) <b>120.5</b>	
C(4)–C(5)–C(6) 123.4 (6) <b>123.2</b>	C(1)–C(6)–C(5) 117.5 (5) <b>117.3</b>	C(1)–C(6)–C(7) 117.5 (6) <b>117.6</b>	
C(5)–C(6)–C(7) 124.8 (6) <b>124.6</b>	C(3)–C(8)–C(9) 112.5 (5) <b>112.2</b>	C(3)–C(8)–C(15) 110.9 (4) <b>111.2</b>	
C(9)–C(8)–C(15) 111.9 (5) <b>111.7</b>	C(8)–C(9)–C(10) 114.3 (5) <b>114.6</b>	C(9)–C(10)–C(11) 113.6 (6) <b>113.8</b>	
C(10)–C(11)–C(12) 127.2 (6) <b>126.9</b>	C(11)–C(12)–C(13) 122.7 (6) <b>122.5</b>	C(11)–C(12)–C(14) 122.6 (6) <b>122.3</b>	
C(13)–C(12)–C(14) 114.7 (5) <b>114.3</b>			
Dihedral angles (°) experimental (e.s.d.) and theoretical values			
C(2)–C(3)–C(8)–C(15) 63.8 (7) <b>71.30</b>	C(4)–C(3)–C(8)–C(15) –114.7 (6) <b>–113.8</b>	O(3)–C(1)–C(6)–C(7) 0.3 (8) <b>0.43</b>	
C(3)–C(8)–C(9)–C(10) –116.4 (5) <b>–115.80</b>	O(2)–C(2)–C(3)–C(8) 1.0 (8) <b>0.94</b>	C(8)–C(9)–C(10)–C(11) –179.9 (6) <b>174.66</b>	
C(8)–C(3)–C(4)–O(1) 0.3 (8) <b>1.08</b>	C(10)–C(11)–C(12)–C(14) –2.5 (12) <b>2.33</b>	C(10)–C(11)–C(12)–C(13) 176.0 (7) <b>178.39</b>	
O(3)–C(1)–C(2)–O(2) –0.1 (7) <b>–0.48</b>			

<sup>a</sup> Experimental values from Ref. [9], CCDC code DIPVON SUP 42582.SUP.

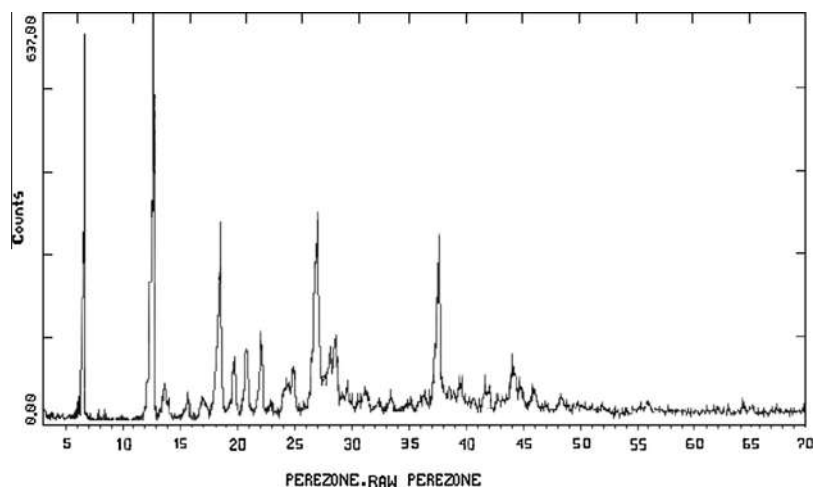


Fig. 2. X ray diffraction pattern of Perezzone. The peaks in the pattern correspond to a monoclinic crystallographic system.

quantity of perezzone crystalline powder used was approximately 4 mg and a heating rate of 2 C was established under a dry nitrogen atmosphere with a flux of 20 ml/min. Thermogravimetric analysis of perezzone was also carried out using approximately 3 mg and a heating rate of 5 °C/min under air, in a TA Instruments TGA model 2010.

#### IR spectrum

A solid sample in NaCl, pellet was used to obtain the IR spectrum of perezzone. A typical IR spectrophotometer made by Bruker model alpha, was used from 200 to 4000  $\text{cm}^{-1}$  of wavenumber values in order to obtain the experimental IR spectrum.

#### Virtual screening

The 3D structures of all ligand molecules were constructed by using Spartan 08 software and further these molecules are subjected to energy minimization using the steepest descent algorithm with a convergence gradient value of 0.001 kcal/mol. The geometry optimization was carried out with the software packages using semi empirical AM1 Hamiltonian method. [26] First, X-ray crystal structure of Caspase-3 (PDB code 1pau) with a resolution of 2.50 Å was used for docking studies [26–43]. Preparation of the protein for docking included removal of ligand and solvent coupled with addition of hydrogen atoms. All selected inhibitors were docked into the active site of the target protein using AutoDock 4.1 and Mollegro. The binding region was defined by a regions selected automatically by the program. No scaling factors were applied to the Van der Waals radii. Default settings were used for all the remaining parameters. Maximum top 5 poses were generated for each ligand. The docking poses were then energy minimized with Spartan with flexible ligand and rigid receptor. Best pose was selected on the basis of score and the RMSD values with a critical value of 1.9, and the interactions formed between the ligands and active residues of amino acids were determined.

Models were generated for known inhibitors of caspase-3: perezzone and analogues isoperezzone, horminone and thymoquinone for comparison, using PDB code 1PAU for the protein structures.

The generation and optimization of the three dimensional models of the compounds used in the study was conducted using Molegro and AutoDock 4.2.5.1, and Maestro, version 9.1 (Schrodinger, LLC, New York, NY, 2010). Docking analysis was performed removing ligands from caspase structures by using the

software UCSF Chimera package 1.5.2 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, CA). Caspase structures and the ligand models were prepared for docking, using the software ADT 1.5.2.66. One hundred conformations for each compound were obtained after docking, and then clustered for the analysis using ADT software.

#### Docking studies

Initial docking calculations were performed for the known inhibitors to analyze the important interactions between protein and the ligand to generate a structural model for virtual ligand docking (VLS). All the compounds in the study were docked in the active site of receptor and calculated the binding interactions. We have collected several proteins prone to be effected by perezzone from research articles and the caspase protein with PDB code 1PAU was used for the docking study.

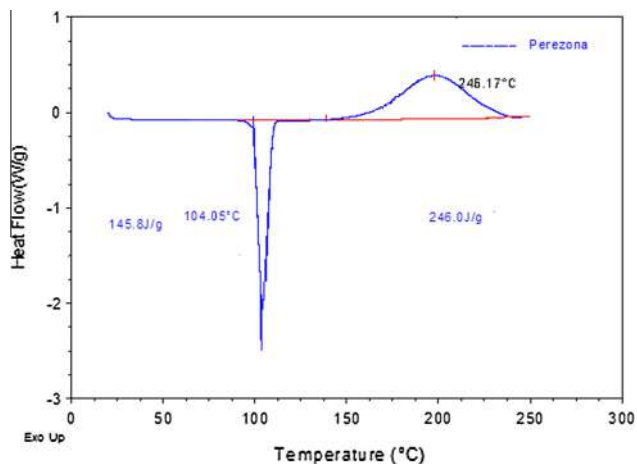
## Results

#### X-ray diffraction

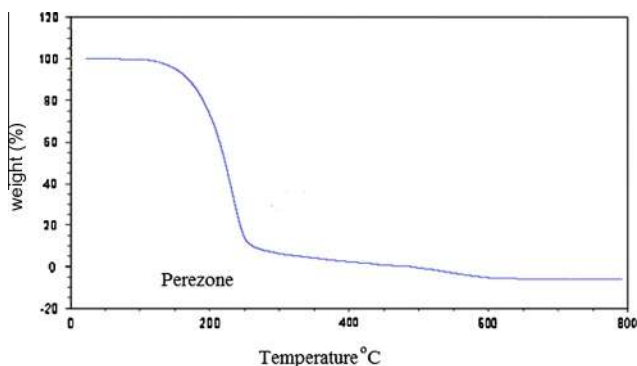
The X-ray diffraction pattern by the powder method of perezzone is presented in Fig. 2, where a typical array of peaks

**Table 2**  
Experimental and calculated IR vibration frequencies and the corresponding force constant.

N	$\nu(\text{exp})$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu(\text{calcd})$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	k (mDynes/Å <sup>2</sup> )	Assignments
1	3304.6	3306.7	7.79	$\nu(\text{OH})$ $\gamma$ aromatic ring
2	2975.7	2986.6	6.28	$\nu(\text{CH}_2 \text{ aliphatic})$ $\nu(\text{CH})$ aliphatic
3	2974.5	2986.6	6.28	$\nu(\text{CH}_2 \text{ aliphatic})$ $\nu(\text{CH})$ aliphatic
4	2968	2986.6	6.28	$\nu(\text{CH}_2 \text{ aliphatic})$ $\nu(\text{CH})$ aliphatic
5	1648.8	1776.27	19.14	$\nu(\text{C=O})$ $\nu$ aromatic ring, $\delta(\text{OH})$
6	1626.8	1632.62	1.84	Intramolecular H bond to carbonyl
7	1608.8	1608.65	14.42	$\delta(\text{CH})$ aliphatic, $\delta(\text{CH}_2)$ aliphatic
8	1463.0	1467.74	1.75	$\delta(\text{CH})$ aliphatic
9	1389.5	1377.24	2.62	$\gamma(\text{OH})$ aromatic ring
10	1369.2	1377.24	2.62	$\nu(\text{CO})$ , $\gamma(\text{OH})$ aromatic ring
11	1305.2	1341.85	1.65	(CH) aliphatic, $\gamma(\text{CH}_2)$ aromatic ring
12	1283.3	1341.85	1.65	(CH) aliphatic, $\gamma(\text{CH}_2)$ aromatic ring
13	1199.5	1200.6	2.15	(CH) aliphatic, $\gamma(\text{CH}_2)$ aromatic ring
14	1094.5	1076.41	1.47	(CH) aliphatic, $\gamma(\text{CH}_2)$ aromatic ring
15	893.6	756.68	0.69	(CH) aliphatic, $\gamma(\text{CH}_2)$ aromatic ring
16	715.1	718.01	0.5	(CH) aliphatic, $\gamma(\text{CH}_2)$ aromatic ring



**Fig. 3.** Differential scanning calorimetry, DSC, where the melting point of perezona is 104.05 °C and the melting enthalpy is 145.8 J/g, while the second peak corresponds to perezona decomposition with a maximum at 245.17 °C and enthalpy value of 246.0 J/g.



**Fig. 4.** Thermogravimetric pattern of perezona, from temperature of 5–800 °C.

corresponding to a monoclinic crystallographic system is observed and the corresponding crystallographic planes are also given.

Perezona at room temperature have a crystalline solid monoclinic structure, [9] space group  $P2_1$ , with  $a = 6.662$  (3) Å,

**Table 3**

Energy values of the main interaction between the ligands (kcal/mol) and the active site of Caspase 3.

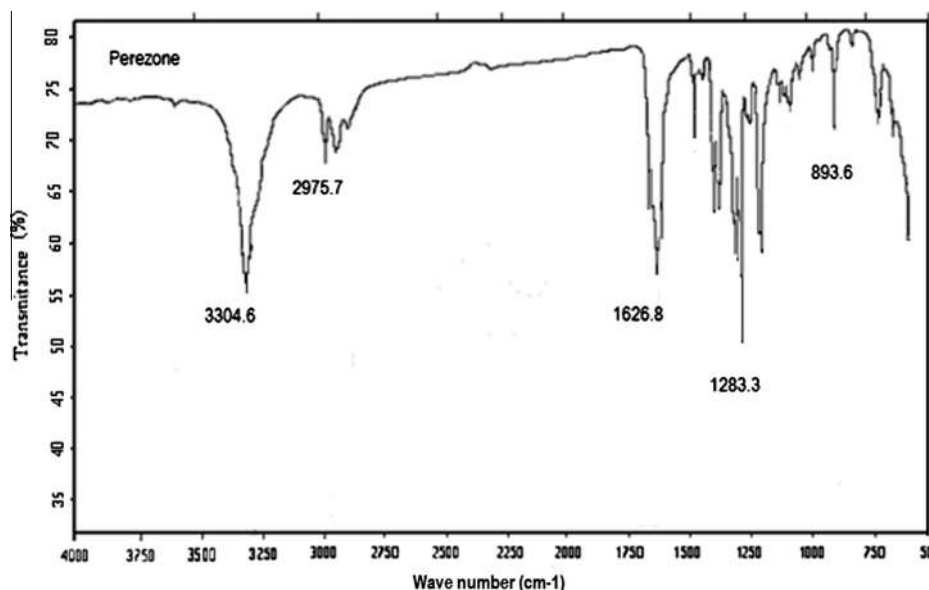
Properties	Perezona	Isoperezona	Thymoquinone	Horminone
MolDock score	-90.66	-87.45	-64.88	-74.85
Ligand efficiency	-5.04	-4.86	-5.41	-3.12
Hydrogen bond (no directionable)	-15.50	-17.14	-8.89	-18.56
Hydrogen bond (directionable)	-6.99	-8.84	-4.19	-13.33
Hydrogen bonds, total	-22.48	-25.98	-13.08	-31.89
Hindrance effect	-120.28	-107.15	-80.44	-81.47
Protein–ligand interactions	-101.63	-105.90	-71.21	-96.60

$b = 7.343$  (3) Å  $c = 14.537$  (6) Å,  $\beta = 98.20$  (4)°,  $V = 0.703.9$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 2$  and a density of 1.17 kg/dm<sup>3</sup>. A comparison of the experimental X-ray diffraction and calculated equilibrium values, of distance and angles of the perezona atoms, were carried out and the values are presented in Table 1. The atom numbers assigned by Spartan when the geometry optimization was carried out are in Fig. 1 and are the number of the perezona atoms in Table 1. The corresponding computed structures of horminone, isoperezona, perezona and thymoquinone are provided as Tables in Supporting Information.

The following equation describes the factors that influence the stretching frequency of a covalent bond between two atoms of mass  $m_1$  and  $m_2$ , it was used for calculating  $f$ , the force constant reported in Table 2.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}} \quad (1)$$

The studies were performed within the framework of density functional theory with the B3LYP hybrid functional, theoretical calculations at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory for the model *p*-benzoquinones used in this study, were similar to previous study, full geometry optimization (without symmetry constraints) on the model structures of perezona derivatives was performed at the B3LYP/6-31G(d,p) level with the Gaussian 09 Program (G09). The Becke3LYP hybrid functional defines the exchange function as a linear combination of Hartree–Fock, local, and gradient-corrected terms. The exchange function is combined with a local and gradient-corrected correlation function [55].



**Fig. 5.** Perezona infra-red spectrum, indicating the wavenumber of some peaks of absorption.

### Thermal analysis

Enthalpy values of 36.02 kJ/mol, with a melting temperature of 104.05 °C, and a decomposition enthalpy value of 61.08 kJ/mol with a temperature maximum at 246.17 °C were obtained (see Fig. 3).

Thermal gravimetric analysis was carried out in order to determine the specific nature of the decomposition, which corresponds to the calcination of perezone, with a remaining amount of 5% of the initial mass at 246 °C was obtained, Fig. 4.

### IR spectroscopy

The corresponding IR spectrum is presented in Fig. 5. The typical O–H, C–H, are in the zone from 400 to 2500  $\text{cm}^{-1}$ , C=O, C=C, are in the interval from 1800 to 1500  $\text{cm}^{-1}$  and finally C–C, C–O bonds are presented in the range from 1550 to 500  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. The experimental and calculated peak values, obtained by using Eq. (1), are presented in Table 2.

### Virtual screening

The conformations selected yield the lowest values of binding energy. The molecule of perezone was docked in the caspase 1 structure containing the ligand coupled to the active site, as described above.

*In silico* studies led to the identification of 5 poses of perezone as ligand with caspase-3 inhibitor activity, [34] only the best RMSD value and MolDock score were used. In order to compare the interacting energy values of perezone and analogues thymoquinone, horminone and isoperezone with apopain protein, ligands were docked to form complexes with the same caspase-3, apopain, PDB entry 1PAU.

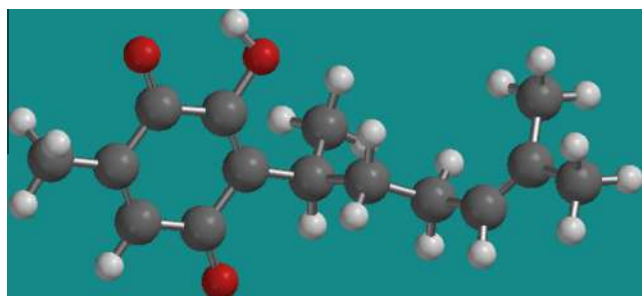
The 3D structures of all ligand molecules were optimized by using Spartan 08 software and further these molecules are subjected to energy minimization using the steepest descent algorithm with a convergence gradient value of 0.001 kcal/mol. The geometry optimization was carried out with the software packages using semi empirical AM1 Hamiltonian method [47].

Models were generated for known inhibitors of caspase-3: perezone, isoperezone, horminone and thymoquinone for comparison, using PDB code 1PAU for the protein structures and software package [43].

### Docking results

The estimated docking scores (MolDock Score) by the algorithm for these compounds are listed in Table 3.

These studies provided insight into interactions that may be important for inhibitor activity by comparing docking simulations



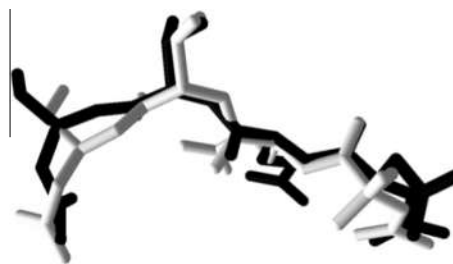
**Fig. 6.** Perezone conformer with the structure optimized for docking in the pose with lowest energy. Spartan 08 was used for optimization of the conformer with lowest energy.

of each inhibitor in the Caspase-3. The docked conformations determined by AutoDock 4.1 software, with the best docking energy for the high active compounds are in the range of –90.66 kcal/mol for perezone and for the low active compound are having in the range of –64.88 kcal/mol for thymoquinone. It is noteworthy that the ligand and the pose with the highest MolScore value overlap almost in all the atoms, given a low and therefore a good RMSD value.

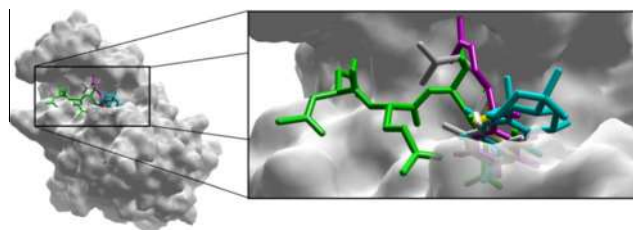
In Fig. 6, it is shown the docking generated by a binding pose of highly active compound inside the active site of Caspase-3. The compound is showing hydrogen bond interactions with the atoms of active amino acid residues (see Fig. 8).

The structure of the caspase-3 complex (PDB entry 1pau) has been superimposed for comparison. It is worth to mention that the ligand molecules (thymoquinone, perezone, isoperezone and horminone) have in common a similar aromatic functional group, given as result a similar pathway of interaction with the active site of apopain, caspase-3 [44,45]. Their particular characteristic is determinant for the interaction energy and therefore the MolDock score and the other interaction values [46–54]. The oxygen atoms of the conjugated quinones, in all cases are forming bonds of the type hydrogen-acceptor favorable, while the hydroxyl groups are forming bonds of the type hydrogen donor favorable with the closest residues of the caspase-3 protein (Fig. 9). We could explained this biological activity by the chemical properties of the quinone group in their structures as it could be acting as electron pump. The model consisted of one H-bond acceptor (HBA), one H-bond donor (HBD), and two hydrophobic (HY) features.

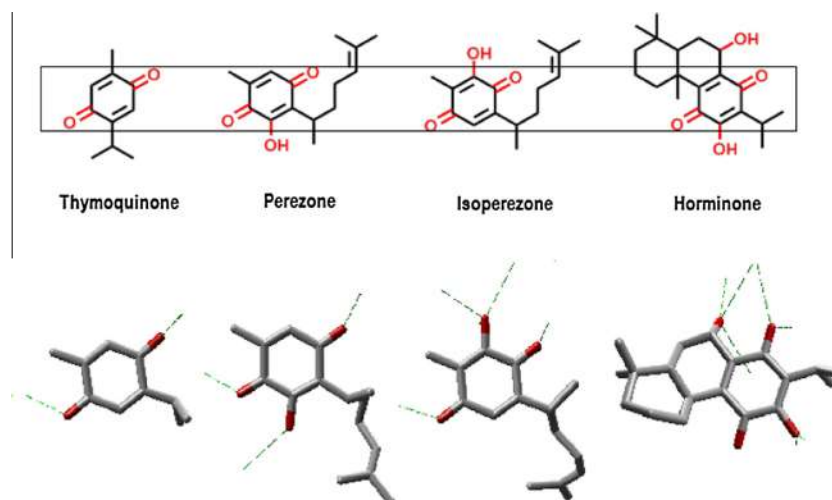
The strongest interactions are present with twelve amino acid residues on the active site of caspase-3: Cys 285, Arg 179, Ser 236, Hist 237, Gly 238, Gln 283, Ala 284, Tyr 338, Ser 339, Trp 340, Arg 341 y Phe 381. The stronger interactions are with atoms of the aromatic cycle, since the aromatic part is inserted in the protein active site. The atoms with bigger interaction energy are represented in bigger sizes, the same is done with the atoms of the caspase-3, apopain, PDB entry 1PAU (see Figs. 10–12)



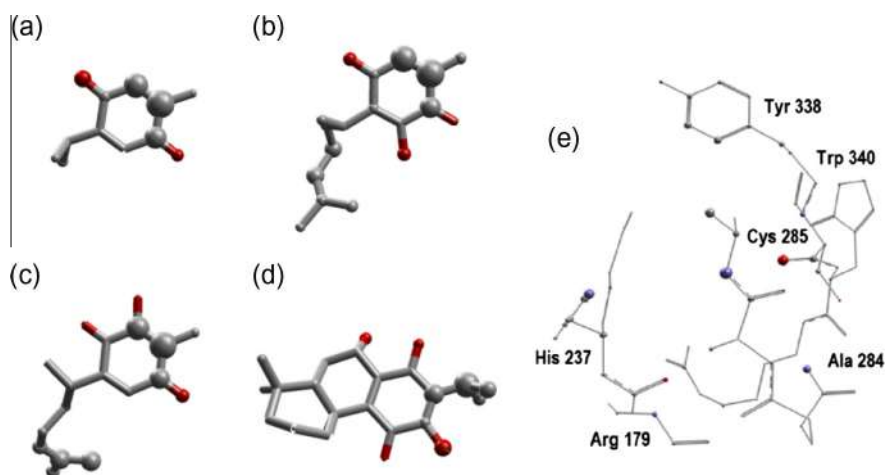
**Fig. 7.** Conformation of perezone ligand in black and the conformation of the best pose of the same ligand with the minimum energy in white, RMDS = 1.32 Å.



**Fig. 8.** Docking view of the active site of caspase-3 (PDB code 1PAU), in complex with the studied compounds: perezone (green), isoperezone (grey), thymoquinone (blue) and horminone (red), respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 9.** Docking view of the four ligands and the docking results *in silico* of the active site of caspase-3. The hydrogen bonds are shown with the dotted lines in ligand.

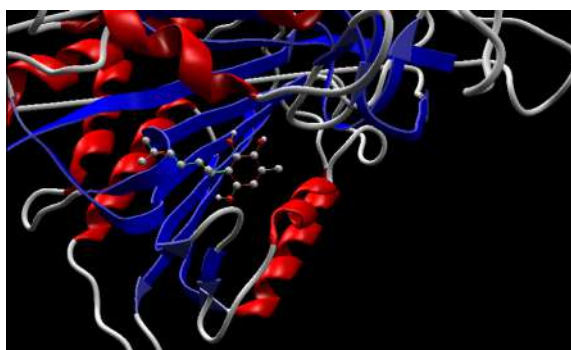


**Fig. 10.** Atoms size representation are proportional to the energy interaction value, a. Thymoquinone, b. Perezone, c. Isoperezone, d. Horminone and e. Active site of caspase-3.

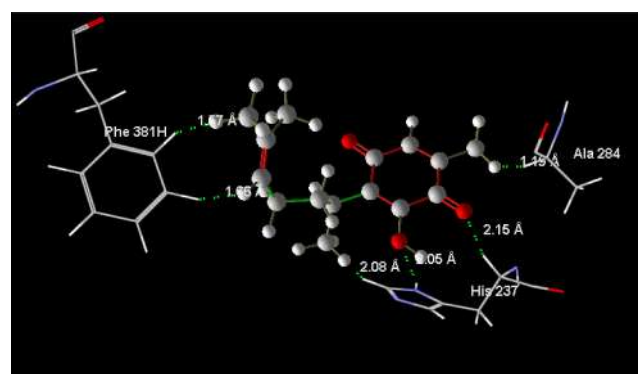
The Cys 285, His237 and Ala 284 residues, show the bigger energy interaction, and with less energy of interaction are Arg 179, Trp 340 and Tyr 338. The four closer residues of the protein 1PAU and each ligand (perezone, isoperezone, thymoquinone and horminone) are presented in Table 4. It is noteworthy that the first three ligands are interacting with the same residues although at

different distances and of course with different atoms of the residues. These facts could be used as explanation for the different behavior with different cancer cell lines and the corresponding therapeutic action.

The two important hydrogen bonds of perezone with Cys285 are the first one of the quinone carbonyl, of the ligand (CO—HN,



**Fig. 11.** Docked conformation of the most active compound perezone in the active site of protein PDB 1pau, with a secondary structure presentation.



**Fig. 12.** Complex 1 PAU-Perezone, showing the residue name and distances to the ligand perezone.

**Table 4**  
Interaction distances of 1PAU-ligand, RMSD and MolScore values, from the docking process.

Complex 1 PAU-ligand	Mol score (–kJ/mol)	RMSD (Å)	Residue name and ligand-residue distances					
			Cys285 (Å)	His237 (Å)	Ala284	Arg179	Phe381	Arg341
Perezona	178.3	0.84	1.92	2.05	1.1 C	n.a.	1.5 Å	n.a.
Isoperezona	118.2	1.28	2.72	2.35	2.49 Å	1.29 Å	n.a.	n.a.
Thymoquinone	97.3	1.83	3.87	2.29	1.90 Å	2.17 Å	n.a.	n.a.
Horminone	122.4	1.95	2.41	2.09	n.a.	1.95 Å	n.a.	1.30 Å

1.2 Å) and the second hydrogen bond is formed by side chain NH of His237 and the CO group of the ligand (NH–OC, 2.05 Å).

All ligand molecules were docked into the active site of Caspase-3, and the correlation was calculated between Mol-score and the RMSD values, to select the best poses. Other considerations on the docking study are presented in supplementary material, SM.

The main aim of the present study is to identify the non-peptide inhibitors against Caspase-3, such as perezona, a natural product. Secondary structure of the complex 1PAU-Perezona where perezona has strong hydrogen bond with the active site amino acid Cys285 is presented in Fig. 7 (backbone CO with amide NH of the protein with a interaction distance of 1.92 Å).

The interactions perezona-residues and the distances are presented in Fig. 7, where only for clarity the Cys285 is not shown, but there is the Ala284, which is the next residue in the protein sequence.

## Conclusions

It is known that perezona and its analogue isoperezona present cytotoxic activity and we could explained this biological activity by the chemical properties of the quinone group in their structures as it could be acting as electron pump. The model consisted of one H-bond acceptor (HBA), one H-bond donor (HBD), and two hydrophobic (HY) features. The characterization of perezona was obtained with conventional pieces of equipment to complement the understanding of the perezona properties, obtained with theoretical calculations of the distances, angles and configuration. Further docking studies were performed on these inhibitors and the results indicated that the amino acids Arg207, Ser209, and Trp214 present in the active site of caspase-3 are important for the ligand binding process. Also it is worth to mention that Cys 285, plays an important role in the apoptosis function of the caspase 3, protein. Using the complex ligand-structure based models, a virtual screening was performed to find these novel non-peptide caspase inhibitors. We identified the compound perezona as a non-peptide inhibitor of the caspase-3 with high cytotoxic effect against several cancer cell lines. Similar results were found when compared the docking of perezona with some analogues as: thymoquinone, horminone, isoperezona, with a quinone group in common. The cytotoxic activity of perezona was explained by the docking study, where the cysteine285 catalyst region of the apopein, caspase-3, interacts strongly with the ligand perezona and the corresponding analogues. The docking results are in good agreement with the biological properties against the cancer lines studied previously.

## Acknowledgments

Access to the supercomputer MIZTLI is appreciated by JMAH, we thanks the technical support from Moisés Hernandez Duarte. JMAH acknowledge the financial support of the programa de cátedras, NOC105.

RGEG acknowledge the financial support of the Project PAPIIT IN221514-3.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.05.016>.

## References

- [1] J.M. Noriega (compilador). *Speech to the Medical Academy of México. Escritos de Leopoldo Río de la Loza*, Imprenta de Ignacio Escalante, México, 1911.
- [2] F. Walls, F. Padilla, J. Joseph-Nathan, P. Giral, F. Romo, J. Tetrahedron Lett. 21 (1965) 1577–1582.
- [3] F. Walls, F. Padilla, P. Joseph-Nathan, F. Giral, M. Escobar, J. Romo, J. Tetrahedron 22 (1966) 2387–2391.
- [4] I.H. Sánchez, R. Yañez, R. Enríquez, P. Joseph-Nathan, J. Org. Chem. 46 (1981) 2818–2819.
- [5] R.G. Enríquez, B. Ortíz, E. Alducin, F. Walls, D. Gnecco, M. Yu, W.F. Reynolds, Nat. Prod. Res. 6 (1995) 103–109.
- [6] F. Walls, M. Salmón, J. Padilla, P. Joseph-Nathan, J. Romo, Bol. Inst. Quim. Univ. Nac. Auton. Mex. XVII (1965) 3–15.
- [7] E.R. Wagner, R.D. Moss, R.M. Brooker, J.P. Heesch, W.J. Potts, M.L.A. Dilling, Tetrahedron Lett. 47 (1965) 4233–4339.
- [8] D.A. Archer, R.H. Thomson, Chem. Commun. 14 (1965) 354–355.
- [9] M. Soriano-García, R.A. Toscano, E. Flores-Valverde, F. Montoya-Vega, I. López-Celis, Acta Cryst. C42 (1986) 327–329.
- [10] E. Cortés, M. Salmón, F. Walls, Bol. Inst. Quim. Univ. Autón. Méx. XVII (1965) 19–33.
- [11] I.H. Sánchez, S. Mendoza, M. Calderón, M.I. Larraza, H.J. Flores, Org. Chem. 50 (1985) 5077–5779.
- [12] E. García, V. Mendoza, A. Guzmán, J. Nat. Prod. (1987) 1055–1058.
- [13] F.J. Alarcón-Aguilar, R. Román-Ramos, M. Jiménez-Estrada, R. Reyes-Chilpa, B. González-Paredes, J.L. Flores-Saenz, J. Ethnopharmacol. 55 (1997) 171–177.
- [14] A. De la Peña, R. Izaguirre, G. Baños, M. Viveros, R.G. Enríquez, G.J.M. Fernández, Phytomedicine 8 (2001) 465–468.
- [15] J.F. Téllez, K. Carvajal, D. Cruz, A. Cárbaz, E. Chávez, Life Sci. 65 (1999) 1615–1623.
- [16] R. Enríquez, J. Ortega, X.J. Lozoya, Ethnopharmacology 2 (1980) 389–398.
- [17] X. García, A. Alcantara-Sarabia, L. Cartas-Heredia, E. Gijón, Gen. Pharmacol. 26 (1995) 1741–1745.
- [18] A. Carabaz-T, F. Sandoval-Z, Arch. Biochem. Biophys. 260 (1988) 293–300.
- [19] E. Chávez, Arch. Cardiol. México 74 (2004) S271–S274.
- [20] E. Burguenio-Tapia, L. Castillo, A. Gonzáles-Coloma, P. Joseph-Nathan, J. Chem. Ecol. 34 (2008) 766–771.
- [21] M.G. Grutter, Curr. Opin. Struct. Biol. 10 (2000) 649–655.
- [22] R. Herrmann, W. Fayad, S. Schwarz, M. Berndtsson, S. Linder, J. Biomol. Screen. 13 (2008) 1–8.
- [23] J.S. Gheeya, Q.R. Chen, C.D. Benjamin, A.T. Cheuk, P. Tsang, J.Y. Chung, B.B. Metaferia, T.c. Badgett, P. Johansson, J.S. Wei, S.M. Hewitt, S. Khan, J. Cancer Biol. Ther. 8 (2009) 2386–2395.
- [24] M. Concepción Lozada, O. Soria-Arteche, M.T. Ramírez Apan, A. Nieto-Camacho, R.G. Enríquez, T. Izquierdo, A. Jiménez-Corona, Bioorg. Med. Chem. 20 (2012) 5077–5084.
- [25] L.E. Sanchez-Torres, J.A. Torres-Martinez, M. Godínez-Victoria, J.-M. Omar, B. Velasco, Phytomedicine 17 (2010) 614–620.
- [26] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian Inc., Gaussian 09, Revision A.02, Wallingford CT, 2009.
- [27] I.M. Ghobrial, T.E. Witzig, A.A. Adjei, Cancer J. Clin. 55 (2005) 178–194.
- [28] L.M. Howells, E.P. Moiseeva, C.P. Neal, B.E. Foreman, C.K. Andreadi, Y.Y. Sun, F.A. Hudson, M.M. Manson, Acta Pharmacol. Sin. 28 (2007) 1274–1304.



- [29] B. Howley, H.O. Fearnhead, *J. Cell Mol. Med.* 12 (2008) 1502–1516.
- [30] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Lagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovskiy, G. Melino, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 3–11.
- [31] M. Lamkanfi, N. Festjens, W. Declercq, T. VandenBerghe, P. Vandenabeele, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 44–55.
- [32] F. Lefranc, V. Facchini, R. Kiss, *The Oncologist.* 12 (2007) 1395–1403.
- [33] R.A. Lockshin, Z. Zakeri, *J. Cell Mol. Med.* 11 (2007) 1214–1224.
- [34] H. Nohl, W. Jordan, R.J. Youngman, *Adv. Free Radic. Biol. Med.* 2 (1986) 211–279.
- [35] P. Jhansi Lakshmi, B.V.S. Suneel Kumar, R. Shasi Nayana, M. Srinivas Mohan, Ramababu Bolligarla, Samar K. Das, M. Uday Bhanu, Anand K. Kondapi, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6040–6047.
- [36] D. Türk, M.D. Hall, B.F. Chu, J.A. Ludwig, H.M. Fales, M.M. Gottesman, G. Szakács, *Cancer Res.* 69 (2009) 21.
- [37] P. Fuentes-Prior, G.S. Salvesen, *Biochem. J.* 384 (2004) 201–232.
- [38] T. O'Brien, D. Lee, *Mini Rev. Med. Chem.* 2 (2004) 153–165.
- [39] Rajkumar Ganesan, Stjepan Jelakovic, Peer R.E. Mittl, Amedeo Caffisch, Markus G. Grutter, *Acta Cryst. F67* (2011) 842–850. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications.*
- [40] R. Ganesan, P.R. Mittl, S. Jelakovic, M.G. Grütter, *J. Mol. Biol.* 359 (2006) 1378–1388.
- [41] K.E. James, J.L. Asgian, Z.Z. Li, O.D. Ekici, J.R. Rubin, J. Mikołajczyk, G.S. Salvesen, J.C. Powers, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1553–1574.
- [42] T.A. Jones, J.-Y. Zou, S.W. Cowan, M. Kjeldgaard, *Acta Cryst. A47* (1991) 110–119.
- [43] O.D. Ekici, Z.Z. Li, A.J. Campbell, K.E. James, J.L. Asgian, J. Mikołajczyk, G.S. Salvesen, R. Ganesan, S. Jelakovic, M.G. Grutter, J.C. Powers, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 5728–5749.
- [44] P.R.E. Mittl, S. Di Marco, J.F. Krebs, X. Bai, D.S. Karanewsky, J.P. Priestle, K.J. Tomaselli, M.G. Grutter, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 6539–6547.
- [45] R.A. MacCorkle, K.W. Freeman, D.M. Spencer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 3655–3660.
- [46] J.A. Hardy, J. Lam, J.T. Nguyen, T. O'Brien, T.J.A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12461–12466.
- [47] W.G. McCluggage, R. Ganesan, L. Hirschowitz, K. Miller, T.P. Rollason, *Am. J. Surg. Pathol.* 30 (2006) 209–215.
- [48] N. Keller, J. Mares, O. Zerbe, M.G. Grutter, *Structure* 17 (2009) 438–448.
- [49] N. Keller, M.G. Grutter, O. Zerbe, *Cell Death Differ.* 17 (2010) 710–718.
- [50] R. Thomsen, M. Christensen, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3315–3321.
- [51] A. Caffisch, S. Fischer, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* 25 (1997) 412–422.
- [52] D. Ekonomiuk, S.-C. Su, K. Ozawa, C. Bodenreider, S.P. Lim, G. Otting, A. Huang, A. Caffisch, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 4860–4868.
- [53] J. Rotonda, D.W. Nicholson, K.M. Fazil, M. Gallant, Y. Gareau, M. Labelle, E.P. Peterson, D.M. Rasper, R. Ruel, J.P. Vaillancourt, N.A. Thornberry, J.W. Becker, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 619–625.
- [54] T.J. Fan, L.H. Han, R.S. Cong, J. Liang, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 37 (2005) 719–727.
- [55] M. Aguilar-Martínez, J.A. Bautista-Martínez, N. Macías-Ruvalcaba, I. Gonzalez, E. Tovar, T. Marín del Alizal, O. Collera, G. Cuevas, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8349–8363.



Review

# Infrared Irradiation: Toward Green Chemistry, a Review

René Escobedo <sup>1</sup>, René Miranda <sup>1</sup> and Joel Martínez <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Superior Studies Cuautitlan, Campus 1, Autonomous National University of Mexico, Cuautitlan Izcalli, State of Mexico 54740, Mexico; renergerardo.escobedo@gmail.com (R.E.); mirruv@yahoo.com.mx (R.M.)

<sup>2</sup> Chemistry Science Faculty, Sciences and Engineering Postgrade, Autonomous University of San Luis, San Luis Potosi, State of San Luis Potosí 78210, Mexico

\* Correspondence: atlanta126@gmail.com; Tel.: +52-444-826-2300 (ext. 6441)

Academic Editor: Hermenegildo García

Received: 12 January 2016; Accepted: 17 March 2016; Published: 26 March 2016

**Abstract:** This review provides a comprehensive overview of where infrared irradiation has been employed, mainly as regards activating green mode for natural products extractions, as well as to favor a reaction, highlighting its actual importance. It is also underlined that infrared irradiation heating has been around for a long time; however, only in the last eighteen years have many of its advantages been applied to satisfy a wide range of chemical processes, natural products extractions, and for the promotion of many kinds of reactions. In addition, it is brought to light that near infrared irradiation is more efficient than middle and far infrared irradiations, being easily controllable and with the quality of a fast responding heat source. Thus, the main objective of this review is to offer infrared irradiation as an alternative clean energy source to activate reactions, in addition to favor the selective extraction of natural products, all of which is within the Green Chemistry protocol. Some recent results from our laboratory are also included.

**Keywords:** catalytic clay; clean energy; green chemistry; infrared irradiation; natural products extraction; reaction activation

## 1. Introduction

Green Chemistry is an actual field that strives to work at the molecular level to achieve sustainability; since the early 1990s, this paradigm has acquired its up-to-date position as a scientific discipline, as well as a practical mode for the prevention of pollution.

Green Chemistry has a Protocol of a cohesive set of Twelve Principles [1]. In this regard, researchers at the vanguard of innovation must have the knowledge to design chemicals and chemicals manufacturing processes with little or no risk to human health or to the environment. However, no activity can be completely risk free, waste free or lower harmful emissions. Consequently the “Twelve Principles of Green Chemistry” should be viewed and applied as a scientific reflection [2].

Most chemical processes (75%) use thermal sources of energy that originate from fossil fuels, and the rest come from biomass and non-carbon sources [3]. It is worth noting that Principle 6 (energy requirement should be more recognized for their environmental and economic impacts, and they must be minimized) is one of the most ignored of the 12 principles of Green Chemistry. Thus, in order to minimize energy requirements, with a view to green chemistry, attempts are, and must continue being, made to make energy input in chemical systems as efficient as possible. Approaches have been taken and new possibilities are investigated; in this regard, some of the so-called non-classical energy forms include: sonication (US), mechanical, also known as tribochemistry or mechanical milling (MM), microwave (MW) and, more recently, the infrared irradiation (IR); all them employed to

minimize reaction time, improve the product yield and avoid undesired byproducts. It is also worth mentioning that other classical methods exist: thermal-typical mantle heating (MH), photochemical and electrochemical [4].

Taking into account that the goal of this review is to bring to light the importance of infrared irradiation in the chemistry field and more particularly the Green Chemistry Protocol, it is worth noting that the infrared region in the electromagnetic spectrum is divided into three zones: shortwave infrared, also known as “near” or “high intensity” infrared with band spans from 0.76 to 2  $\mu\text{m}$  (NIR); medium wave infrared also known as “middle” or “medium intensity” infrared with band spans from 2 to 4  $\mu\text{m}$  (MIR); and long wave infrared also known as “far” or “low intensity” infrared with band spans from 4 to 1000  $\mu\text{m}$  (FIR).

Moreover, infrared energy is dispersed from an infrared emitter (lamp) and consequently exposes product surfaces, which easily absorb it and are heated. Therefore, heating effectiveness is related to the line of sight between the source and the product; in other words, infrared irradiation is a direct form of heating. This in addition to the promotion of vibrational modes in a molecule are the main reasons for the inherent high energy efficiency of infrared systems to activate a reaction or favor an extraction.

Emitters are specifically designed for different energy output characteristics [5]. For long wavelength (FIR), a resistance element is sandwiched in hardened glass or vitrified ceramic. It is in general considered a low temperature heat source since the resistance element has high mass, which can increase the temperature up to 1000 °F (540 °C), with peak wavelength 3–5  $\mu\text{m}$  and response time 5 min. Related to medium wavelength (MIR), a chromium alloy filament is suspended in a quartz or metal sheath. The filament can operate in open air, increasing the temperature up to 1800 °F (980 °C), with peak wavelength 2.3  $\mu\text{m}$  and response time 30 s. Finally, for short wavelength (NIR), a tungsten filament is sealed in a quartz envelope with a halogen gas. It is important to note that the thin filament, due to its little mass, is very reactive to the voltage applied. Consequently, NIR heat output changes immediately with the corresponding changes of the applied voltage, increasing the temperature up to 4000 °F (2200 °C), with peak wavelength 1.2  $\mu\text{m}$  and response time <1 s. Thus, it is noteworthy that NIR offers many advantages over long and medium infrared wavelengths (*vide supra*).

In addition, the interaction of NIR with matter can be considered from classical mechanical model for a diatomic molecule. Thus, in an anharmonic model, the molecule is considered as two balls connected by means of a coil, that take into account several assumed behaviors: the repulsion among the electrical-neighboring of the approximated atomic nucleuses and the bond strength when the atoms move away from each other. Consequently, it can be considered that this tension, between the atomic cores, could cause the corresponding bond separation. The anharmonicity can also be present in the electrical properties of a molecule; it affects its dipole moment, which, in anharmonic model, does not have a linear dependence with the interatomic distance.

Now, it is not surprising that the NIR technology has found a vast field of application [6], some of the sectors where NIR technology has succeeded for qualitative and quantitative purposes are: Agricultural/Food (agricultural products, industrial food products, and precision agriculture/soil); Polymer (polymer processing and polymer quality characteristics), Petroleum and Fuel Industry (fuel quality control, fuel production process, and petroleum characterization), Environmental, Textiles, Biomedical/Clinical, Pharmacy and Cosmetics, and NIR-image.

Taking into account all previous commentaries, it is worth mentioning several innovative modes favoring the activation of a chemical reaction, other than conventional mantle-heating, have been developed. The use of the mechanical ultrasound waves, mechanochemistry, microwave and infrared electromagnetic irradiations have earned increasing attention in the Green Chemistry protocol, according Principle 6. Thus, MW, US and MM, under controlled conditions, are invaluable technologies with enormous applications in academic and industrial research. However, the successful use of these methodologies is limited by requiring access to specific and expensive equipment [7]. Consequently the goal of this Review is to offer an overview of works where IR has been successively employed, and sometimes in comparison with other technics; for example, microwaves are quite useful and appear

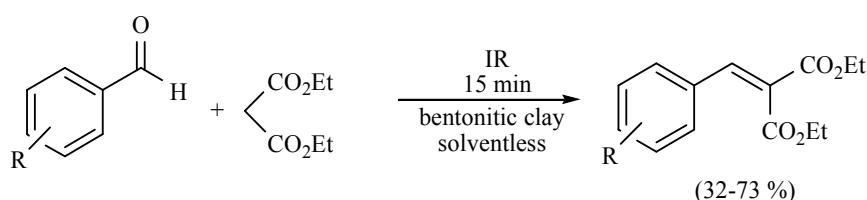
quicker than IR; however, in general, the difference is not significantly important and occasionally this is not the case. In other words researchers developing IR reactions are able to obtain very good work conditions for their reactions.

Thus, the main goal of this review is to offer a comprehensive overview of where “green” infrared irradiation has been employed as the activating mode both for natural products extractions, as well as to favor a reaction, highlighting its actual importance in the chemistry field and more particularly in the Green Chemistry Protocol; therefore, the results of a wide literature search are summarized in the following sections.

## 2. Related Aldol Condensation Reactions

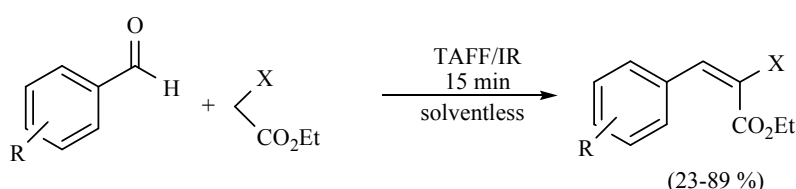
The well-known condensation of Knoevenagel, a base or acid catalyzed aldol-type reaction, is generally raised between aromatic aldehydes as substrate and a methylene active reagent [8]; this interesting protocol has been promoted in many cases by the use of middle infrared irradiation.

In this sense, the synthesis of benzylidenemalonates (Scheme 1) [9], benzylidenemalononitriles, benzylidenecyanoacetamides, benzylidenecyanoacetic acids (Scheme 2) [10], and benzylidenebarbituric acids (Scheme 3) [11] have been promoted in the presence of Tonsil Actisil FF (TAFF) [12], a bentonitic clay, as catalyst without the presence of solvent. In general, the reactions developed with good yields in short reaction times; these procedures involve simple work-up.



R = H, *p*-NO<sub>2</sub>, *m*-NO<sub>2</sub>, *p*-N(Me)<sub>2</sub>, *p*-OH, *p*-OMe, *o*-OMe, *p*-Cl, *p*-Br

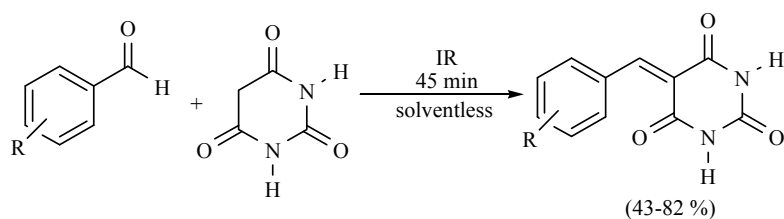
**Scheme 1.** Synthesis of benzylidenemalonates.



X = CN, CO<sub>2</sub>H, CONH<sub>2</sub>

R = H, *p*-NO<sub>2</sub>, *o*-NO<sub>2</sub>, *p*-N(Me)<sub>2</sub>, *p*-OMe, *o*-OMe, *p*-Cl, *o*-Cl, *p*-Br

**Scheme 2.** Synthesis of benzylidenemalononitriles, benzylidenecyanoacetamides, and benzylidenecyanoacetic acid.

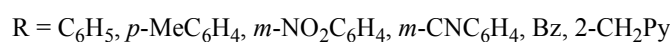
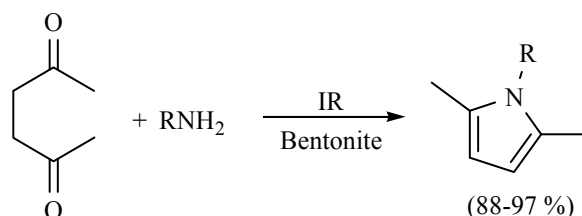


R = H, *o*-OMe, *o*-Cl, *p*-N(Me)<sub>2</sub>, *p*-Me, *p*-OMe, *p*-F, *p*-Cl, *p*-Br, 3,4-methylenedioxy, 2,3,4-trimethoxy

**Scheme 3.** Synthesis of benzylidenebarbituric acids.

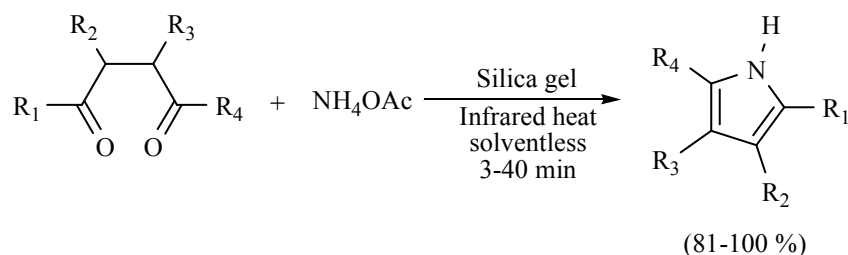
### 3. Nucleophilic Addition to Carbonylic Substrates

The Paal–Knorr reaction is the most general synthetic method to prepare furans, thiophenes and pyrroles; according to this protocol, various *N*-substituted-pyrroles were obtained from primary amines and acetonylacetone using middle infrared irradiation as activating mode, and a natural clay as catalyst in the absence of solvent. The reaction proceeded with high yield in short reaction times (Scheme 4) [13].



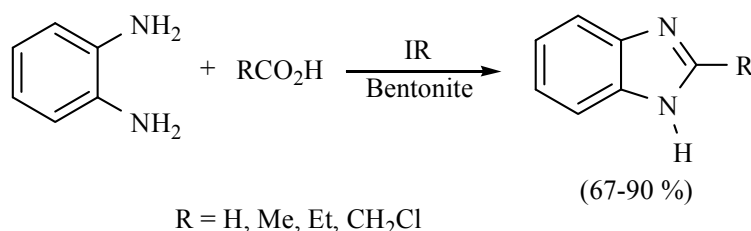
**Scheme 4.** Production of *N*-substituted pyrroles.

Zhang and coworkers reported a pyrrole synthesis via a the Paal–Knorr protocol approach using inorganic ammonium salts as a nitrogen source and silica gel as the catalyst; the MIR activated reaction was conducted in a solid state, which means that no volatile organic compounds were used. The reaction time is short (Scheme 5) [14].



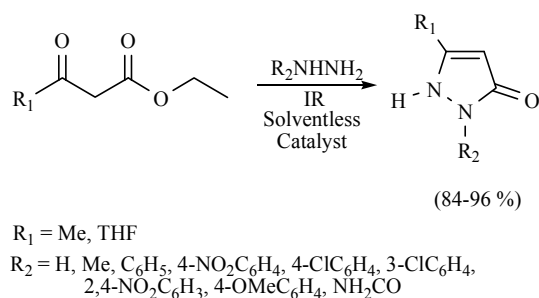
**Scheme 5.** Synthesis of pyrroles.

It is important to mention the benzimidazoles, a family of compounds with broad spectrum of pharmaceutical activity. In this sense, a green method has been developed using natural clay as the catalyst and employing MIR as the activating mode in solvent free conditions with good yield (Scheme 6) [15].



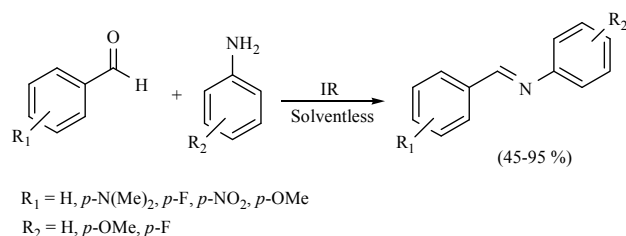
**Scheme 6.** Obtention of benzimidazoles.

Some pyrazolone derivatives have also been produced with excellent regioselectivity under MIR conditions and the catalytic activity of Co doped with ZnS nanoparticles. The catalyst enhances the overall capacity to absorb IR in the reaction mixture, providing the products with good to excellent yields (Scheme 7). The MIR activation was also compared to the conventional MH method [16].

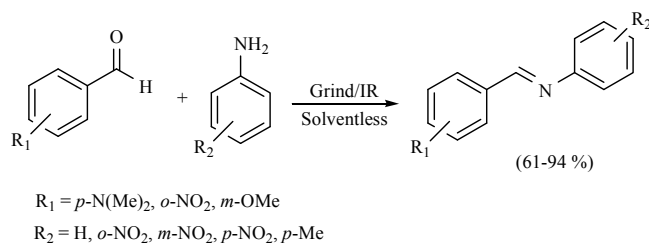


Scheme 7. Production of pyrazolones.

Middle infrared irradiation has also been employed to promote the formation of a series of Schiff bases in the absence of solvent, with good yields. In general, if the substrate is a benzaldehyde bearing an electron-releasing group, the conversion rate decreases. In other words, when the substrate bears an electron-withdrawing group, a more efficient conversion took place. Moreover, an electron-releasing group on the aniline ring improves the yields (Schemes 8 and 9) [17,18].

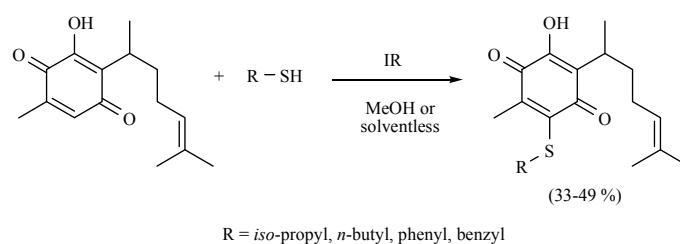


Scheme 8. Formation of Schiff bases.

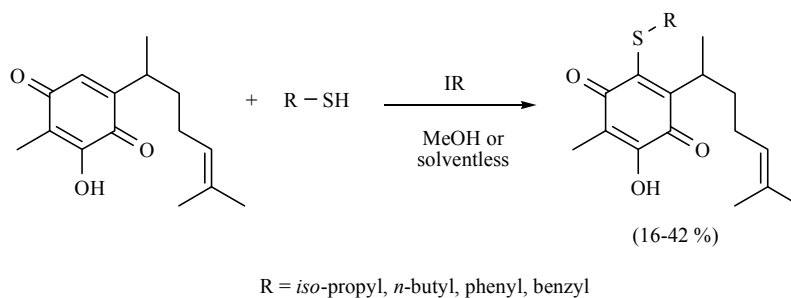


Scheme 9. Production of Schiff bases.

An excellent contribution to the chemistry of perezone, the first metabolite isolated in the New World, was performed by Martínez and coworkers [19]. In this regard, they reported a comparative study of perezone and isoperezone with a set of four different mercaptans: *i*-PropSH, *n*-BuSH, PhSH, and BzSH (Schemes 10 and 11 respectively). The transformations were conducted by 1,4-addition/oxidation tandem reaction using MIR as the activating mode, comparing solvent or solvent-free conditions, obtaining the new molecules with moderate yields.



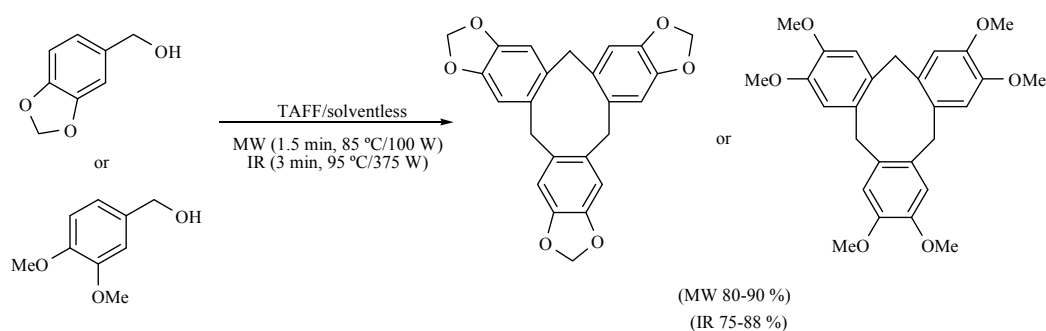
Scheme 10. Obtention of sulfur-derivatives of perezone.



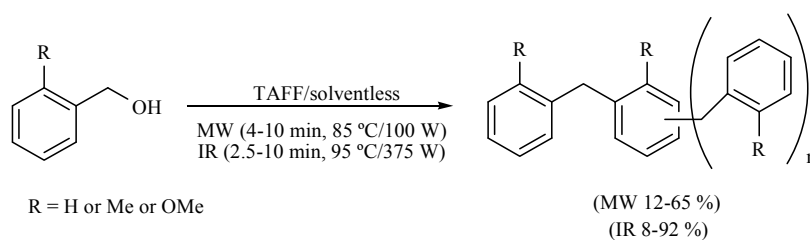
**Scheme 11.** Obtention of sulfur-derivatives of isoperezone.

#### 4. Macrocycles.

The formation of cycloveratrylene macrocycles (Scheme 12) and benzyl oligomers (Scheme 13) from the corresponding benzyl alcohol has also been reported. The product generation was studied comparing two different activating modes: MW (85 °C/100 W, 1.50 min) and MIR (95 °C/375 W, 3–7 min), both in the absence of solvent, using TAFF as Lewis catalyst. The products were obtained in short reaction times with good yields in both cases. The molecules generated were the condensation products of the corresponding benzylic cations. These processes have the advantage that they eliminate both the use of solvents and halogenated starting materials. In addition, the natural clay is environmentally friendly in comparison to the typical mineral acid solutions or metallic catalysts. It is also offered as a time-efficient process [20].



**Scheme 12.** Formation of cycloveratrylene macrocycles.



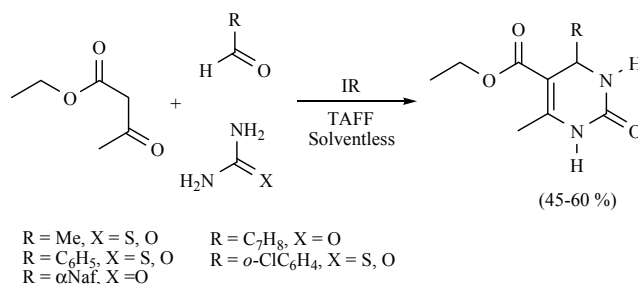
**Scheme 13.** Production of benzyl oligomers.

#### 5. Multicomponent Reactions

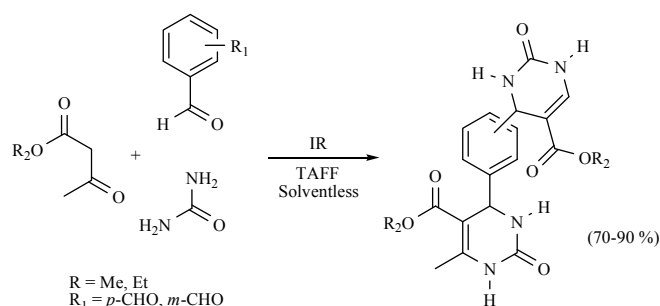
A key objective of Green Chemistry is to accomplish a reaction employing eco-conditions [1]; under such protocol, an ideal synthesis would be that by which a target molecule is produced quantitatively in one step from available and inexpensive starting compounds in an environmentally sustainable process. In this regard, multicomponent reactions (MCR), a significant subclass of tandem reactions [21], are considered as favorable green chemistry procedures, because at least three or more components react directly to yield a unique product, incorporating the atoms of the starting materials

with great atomic efficiency; in other words, it is not necessary to isolate the reaction intermediates, making the complete procedure sustainable, simplifying the purification procedure and consequently enhancing the corresponding synthetic efficiency [22].

The Biginelli (B-3MCR) and the Hantzsch (H-4MCR) procedures are common protocols for producing dihydropyrimidinones (DHPMs) and dihydropyridines (DHPs), also known as Biginelli and Hantzsch esters, respectively. Several DHPMs were produced using MIR for the promotion of the reaction, with TAFF as catalyst under solvent-free conditions (Scheme 14) [23]. It is also worth mentioning that some *bis*-DHPMs (Scheme 15) have shown smooth muscle relaxation effects *in vitro* [24].

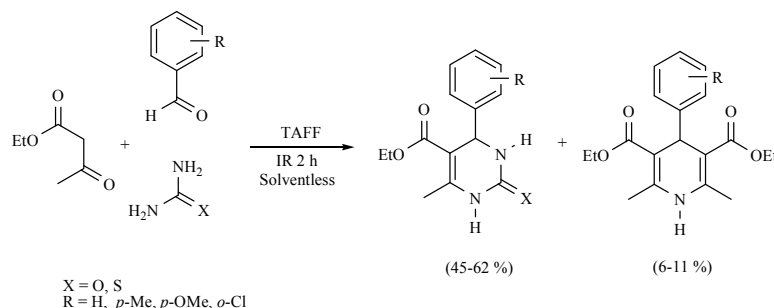


**Scheme 14.** Synthesis of Biginelli esters.



**Scheme 15.** Production of *bis*-DHPMs.

It is also worth noting that competition between DHPs and DHPMs has been detected using the Biginelli protocol: the expected dihydropyrimidinones were the main products, while the production of DHPs was promoted by the ammonia produced by decomposition of urea or thiourea employed as reagents (Scheme 16) [25].

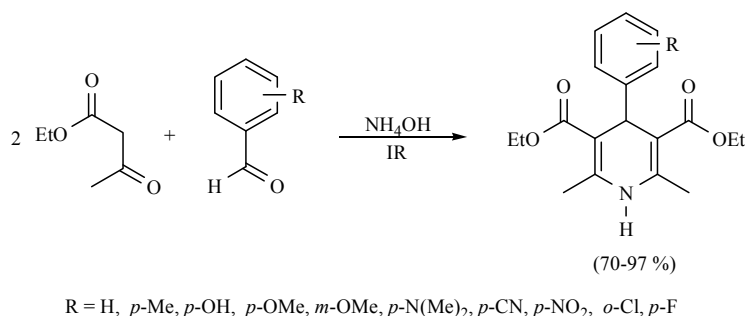


**Scheme 16.** Comparative formation between DHPMs and DHPs.

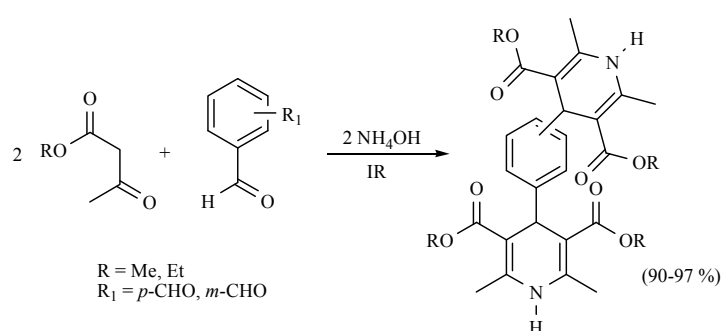
Gómez-Pliego and coworkers [26] have also developed a procedure for the production of DHPs in a water-based biphasic medium (Scheme 17); in this research, a set of four *bis*-1,4-DHPs (Scheme 18)



was also generated. It is important to highlight that these *bis*-1,4-DHPs exhibited vasodilatory and anticonvulsant effects [27,28].

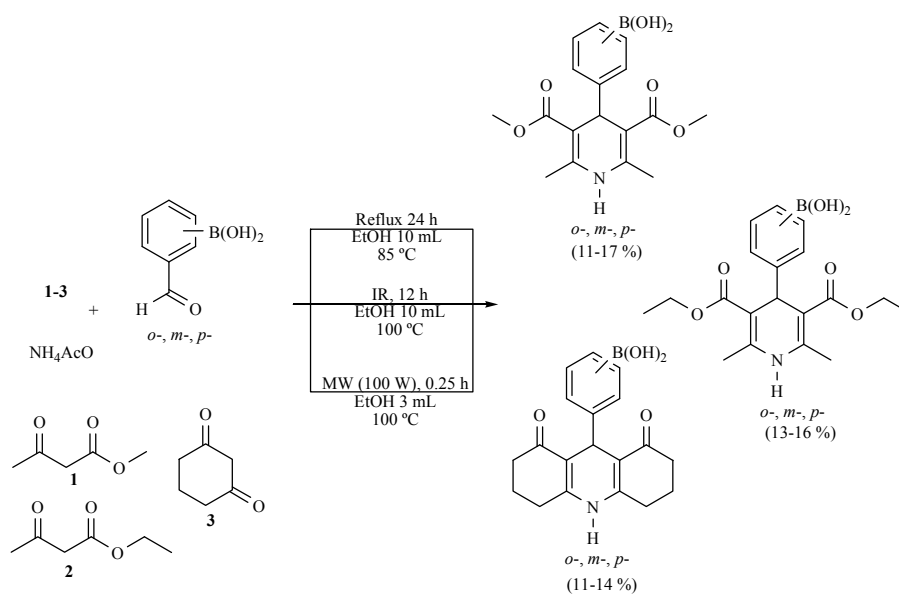


**Scheme 17.** Synthesis of DHPs in water-based biphasic medium.

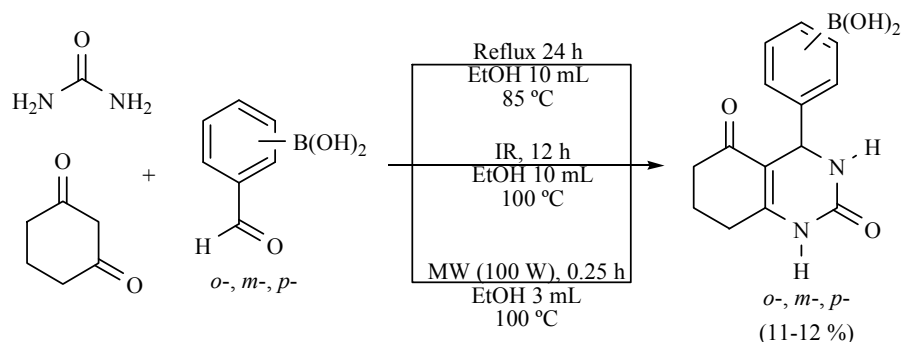


**Scheme 18.** Formation of *bis*-DHPs.

Several new hybrid-boron-containing 1,4-dihydropyridines (Scheme 19) and 3,4-dihydropyrimidinones (Scheme 20) were obtained from the corresponding regioisomeric formylphenylboronic acids. The target molecules were obtained in a comparative study (MW *vs.* MH *vs.* NIR) using ethanol as a green solvent. The infrared irradiation process was not the best procedure, but it can be considered as an alternative for generating these molecules according to the green chemistry protocol [29].

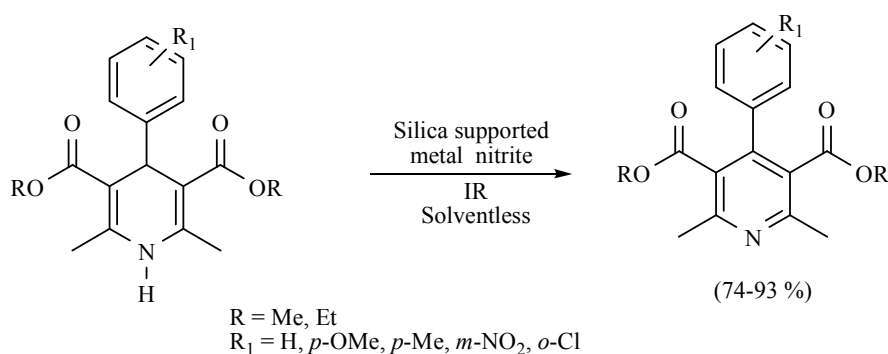


**Scheme 19.** Production of boron-DHPs.



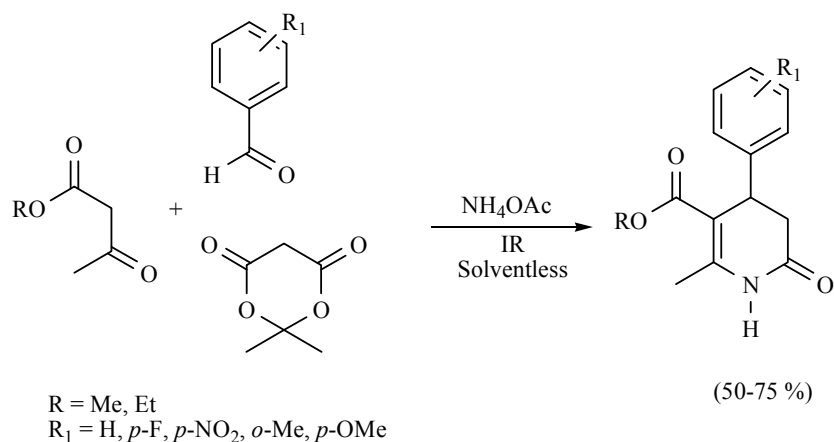
Scheme 20. Formation of boron-DHPMs.

The oxidation of DHPs has been conducted using catalytic amounts of silica-supported transition metal nitrates such as  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  under solvent-free conditions, previously grinding in a mortar (Scheme 21) [30].

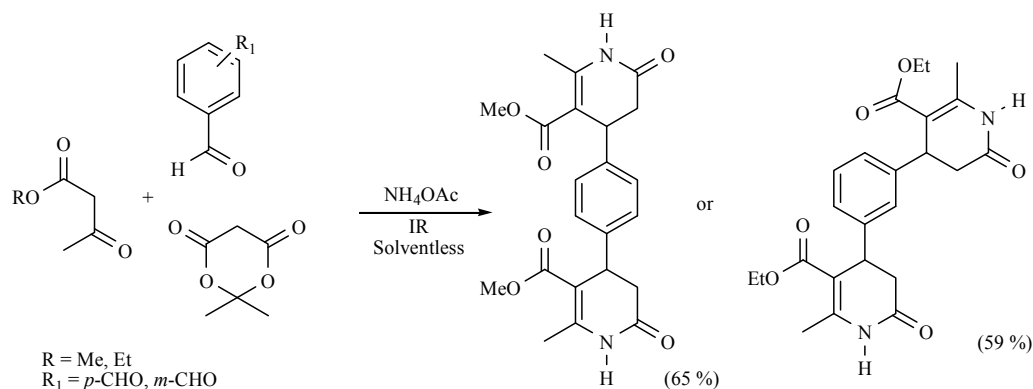


Scheme 21. Oxidation of DHPs.

In a research developed by Noguez and coworkers to produce dihydropyridinones (DHPDs) in a M-4MCR protocol in the absence of solvent, NIR was employed as the activating mode with better yields (50%–75%) in comparison to MH (40% or less) (Scheme 22). Two *bis*-3,4-DHPDs were also reported (Scheme 23) [31].

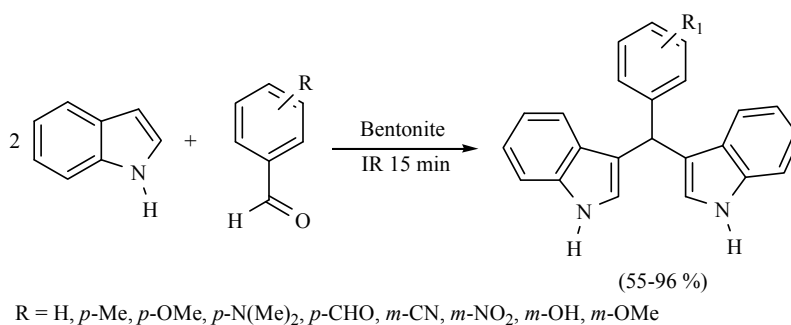


Scheme 22. Multicomponent formation of DHPDs.



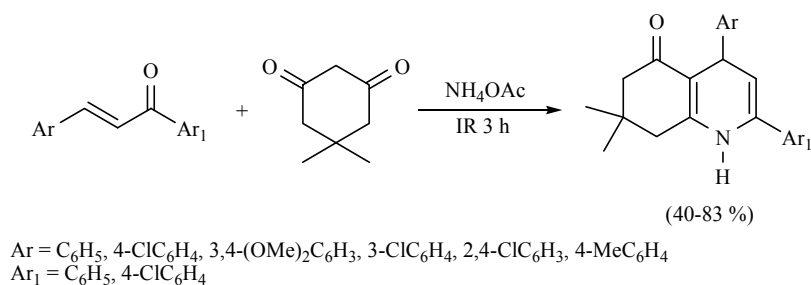
**Scheme 23.** Production of *bis*-DHPDs.

Diindolylmethanes are a very important class of chemical compounds; many of them show preventive antineoplastic activity. Consequently, novel procedures, mainly under the green chemistry protocol, are welcome. In this sense, several diindolylmethanes were produced from indole and various aryl aldehydes, using MIR to activate the reaction in presence of bentonitic clay as catalyst (Scheme 24) [32]; some of these molecules exhibited antitumor activity *in vitro* against murine L5178Y lymphoma cells [33].



**Scheme 24.** Obtention of diindolylmethanes.

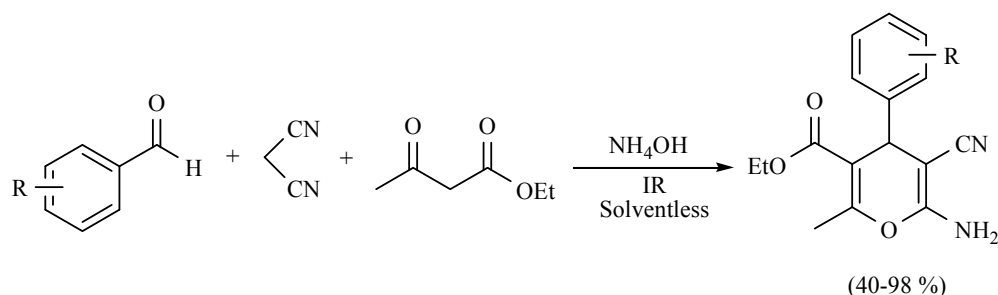
The reaction to produce various octahydroquinolines using infrared irradiation for 3 h in the absence of solvent has also been performed between an active methylene diene with various diarylpropenones in the presence of ammonium acetate. The reactions proceeded with good chemical yields. It is worth mentioning that the presence of electron-withdrawing or electron-donating groups are not important to the corresponding yields (Scheme 25) [34].



**Scheme 25.** Production of octahydroquinolines.

Molecules of the class 4*H*-pyrans are very significant because their basic portion is present in a great diversity of secondary metabolites and several biologically active products. In this sense, a novel

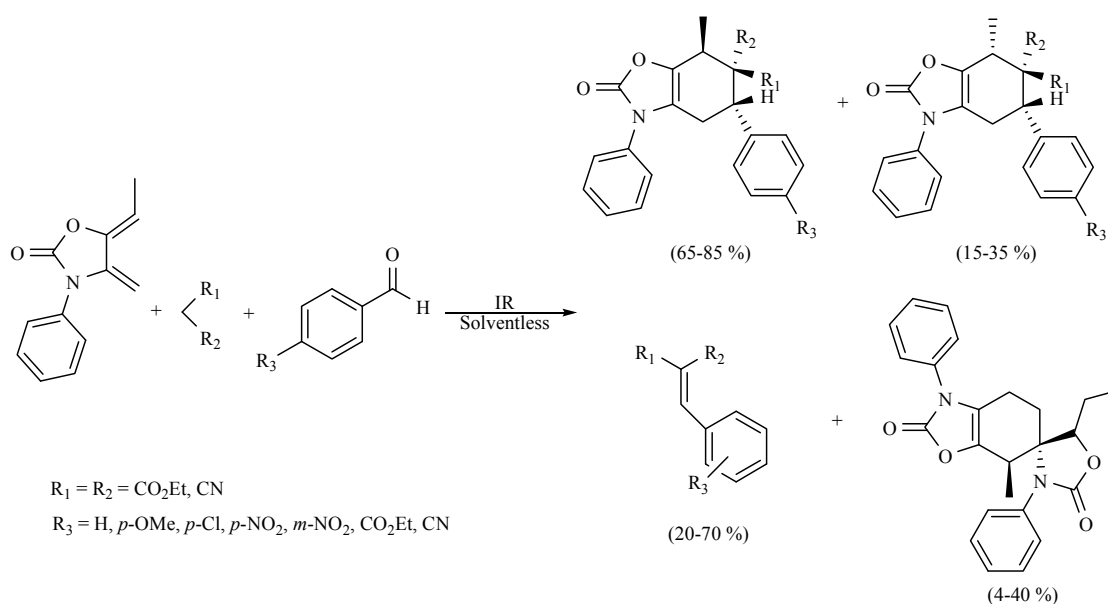
and efficient three-component method for the synthesis of 4*H*-pyrans derivatives was developed. It was catalyzed with NH<sub>4</sub>OH and promoted by infrared irradiation. The offered method involves a multicomponent reaction in short reaction times under eco-friendly conditions (Scheme 26) [35].



R = H, *p*-OMe, *p*-NO<sub>2</sub>, *o*-NO<sub>2</sub>, *p*-CHO, *m*-CHO, *m*-Cl, *p*-F, *p*-pyridyl, *o*-furyl, *o*-thienyl, propyl

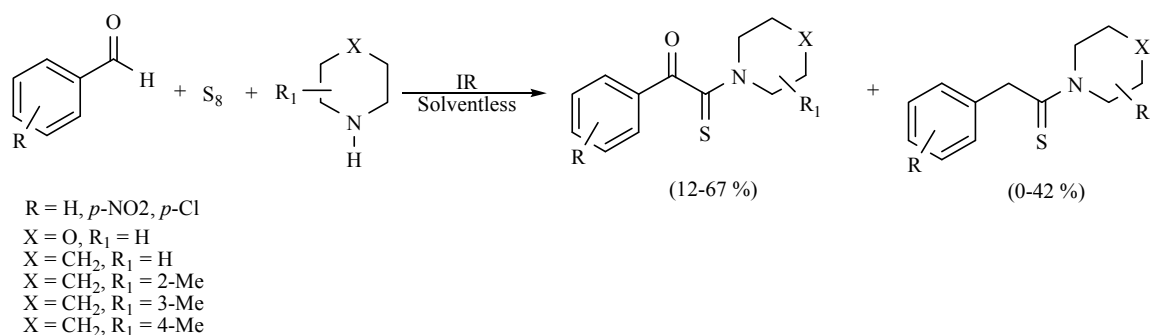
**Scheme 26.** Multicomponent synthesis of 4*H*-pyrans.

A one-pot three-component process was developed to obtain several tetrahydrobenzo[*d*]oxazol-2-ones using MIR in order to activate the reaction under solvent-free conditions (Scheme 27) favoring the *para*-*endo* cycloadducts with respect to the *meta* or *para*-*exo* adducts [36]. No catalyst was required.



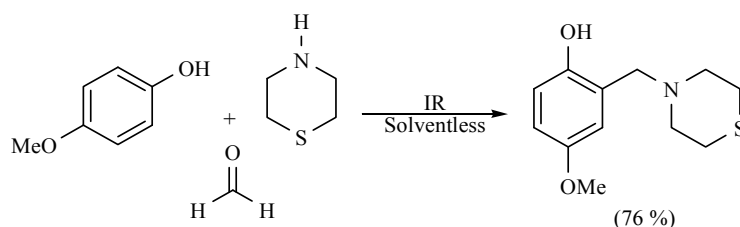
**Scheme 27.** Obtention of tetrahydrobenzo[*d*]oxazol-2-ones.

A novel mode for the production of thioamides and  $\alpha$ -ketothioamides has also been reported. It is an appropriate modification of the Willgerodt–Kindler reaction: solvent-free, non-catalyst and IR energy as activating mode of reaction. The results showed that the  $\alpha$ -ketothioamides is the main product and the corresponding Willgerodt–Kindler is the minor product. These results show better yields in comparison to previously reported procedures (Scheme 28) [37].



**Scheme 28.** Production of thioamides and  $\alpha$ -ketothioamides.

Some other interesting nitrogen containing compounds have been reported, obtained by means of a one pot procedure. Among them are several derivatives of piperidine, morpholine and thiomorpholine; the target compounds were obtained with good yields in the absence of solvent using MIR as activating source with short reaction times (Scheme 29) [38,39].



**Scheme 29.** Formation of nitrogen containing compounds.

## 6. Reduction–Oxidation Reactions

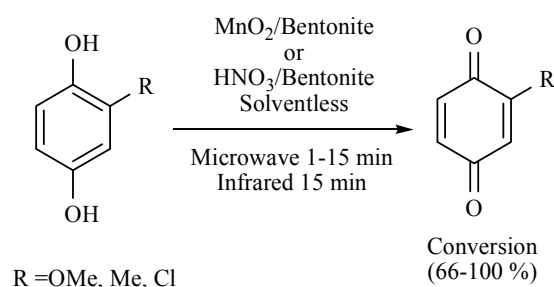
Reduction of several functionalities represents a corner-stone reaction within organic chemistry. Owing to its importance, a great deal of effort has been dedicated to the development of green catalytic methods for the corresponding reductions. On the other hand, the oxidative practice involves important steps for the inter-conversion of chemical functionalities from readily available starting materials. Despite its importance, traditional oxidative methodology has some disadvantages, including the use of environmentally incompatible reagents (such as chromium, nickel, or copper-based reagents) and the potential for undesired side reactions [40]. Thus, in relation to the green chemistry protocol, photo-catalysis is an environmentally friendly technique to eliminate toxic organic substances in air and water [41].

The production of reduced graphene oxide (GO) is important because of its employment as sensors, and among other applications. To this point, Guo and coworkers presented an alternative for the efficient photothermic reduction of GO by MIR, producing both porous reduced GO and crack-free highly conductive thin films of reduced GO. The authors determined the reduction of GO by FT-IR in addition to other studies, including thermogravimetric analysis, Raman, and X-ray photoelectron spectroscopy. This work is a good green method because no chemical reducing agent was employed [42].

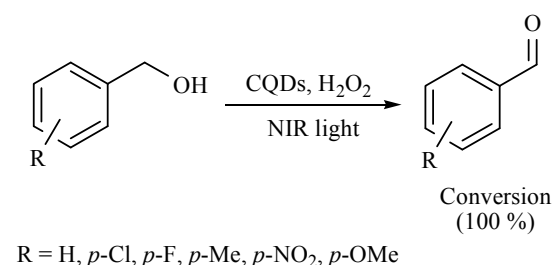
An example of an oxidation assisted by MIR, is the conversion of hydroquinones to quinones reported by a simple and straightforward procedure employing  $\text{MnO}_2$  or  $\text{HNO}_3$ , both separately supported on a bentonitic earth and in solvent-free conditions (Scheme 30) [43].

The selective oxidation of alcohols is a fundamental and significant transformation for the production of fine chemicals; in this sense, the ultraviolet and visible light driven photocatalytic systems for alcohol oxidation have been previously reported. In this work, the authors informed that the named carbon quantum dots (CQDs) are able to behave as valuable NIR form photocatalyst for the

selective oxidation of several benzylic alcohols to their corresponding benzaldehydes with good yields. Based on its NIR driven photo-induced electron transfer property and its photocatalytic activity for  $H_2O_2$  decomposition, this metal-free catalyst performed the oxidations (Scheme 31) [44].



**Scheme 30.** Oxidation of hydroquinones to quinones.



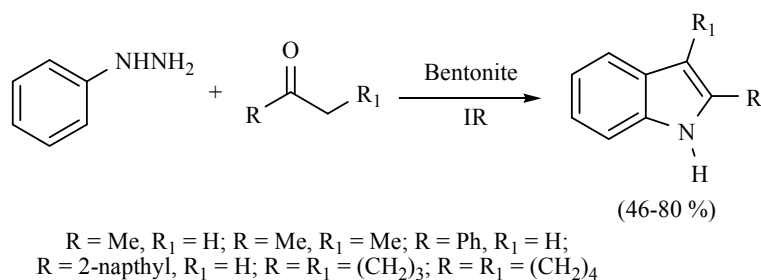
**Scheme 31.** Obtention of benzaldehydes from alcohols oxidation.

An oxidative photocatalytic decomposition of 2,4-dichlorophenol in aqueous solution was reported using  $\text{Cu}_2(\text{OH})\text{PO}_4$  microcrystals under NIR; the authors explain the photocatalytic activity of  $\text{Cu}_2(\text{OH})\text{PO}_4$  by an effective separation of the electron hole pairs from  $\text{CuO}_4(\text{OH})$  to  $\text{CuO}_4(\text{OH})_2$  octahedral [45].

Ikeue and coworkers have reported the photo-oxidation of 1,3-diphenylisobenzofuran in aerated toluene employing the annulated dinuclear palladium (II) phthalocyanine complex as an effective photo-oxidation catalyst using NIR as activating reaction mode [46].

## 7. Miscellaneous Reactions

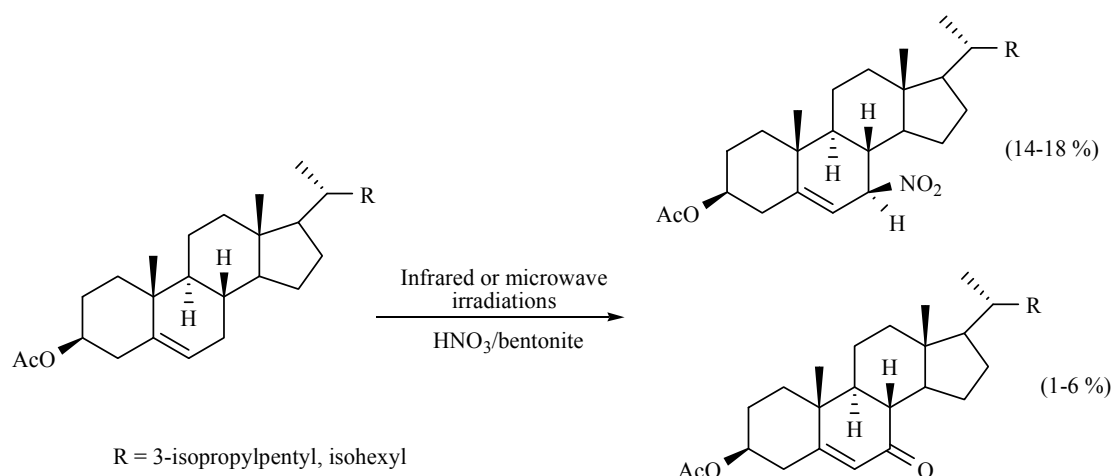
A Classical mode to produce indole is the Fischer method; in this regard, MIR was used as the activating mode in a modified procedure to produce related compounds, employing TAFF as a Lewis acid catalyst, with good reaction yields (Scheme 32) [47].



**Scheme 32.** Production of indoles.

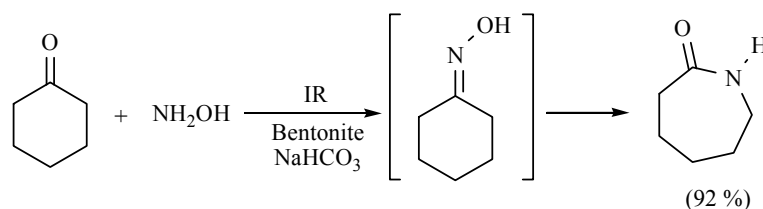
A method to prepare nitro steroids was reported by Jiménez-Estrada and coworkers. In this study,  $7\alpha$ -nitro- $3\beta$ -sitosterol and  $7\alpha$ -nitro- $3\beta$ -cholesterol acetates were produced using the  $\text{HNO}_3/\text{bentonite}$

system. The corresponding reaction mixtures were comparatively activated with MIR or MW over 45 and 27 min, respectively (Scheme 33). The title compounds were the most abundant products. The authors suggest a mechanism involving the possible formation of  $\text{NO}_2$  free radicals [48].



**Scheme 33.** Preparation of nitro steroids.

The production of  $\epsilon$ -caprolactam, the required substrate to obtain nylon-6, was performed in a comparative study, involving a modified Beckmann rearrangement protocol. The compared activating modes were MW, MIR, MH and US. Bentonitic clay was employed as the catalyst. It is important to note that the MIR procedure offered the best yields (Scheme 34) [49].



**Scheme 34.** Obtention of  $\epsilon$ -caprolactam.

Among self-activating reactions, the peptide formation reaction is the most interesting one. In this sense, when *N*-phosphoamino acid ( $\text{DIPP-aa}_1$ ) and an amino acid ( $\text{aa}_2$ ) were dissolved in aqueous solution and irradiated by infrared light, the corresponding oligopeptides were formed. The authors propose that the oligopeptides might be formed in the self-activating reaction process via intramolecular carboxylic–phosphoric–anhydride intermediate. In addition, is noteworthy that no matter what kind of entities were used, there were only two types of produced peptides:  $\text{DIPP-(aa}_1)_n$  or  $\text{DIPP-(aa}_1)_{n-1}\text{-aa}_2$  [50].

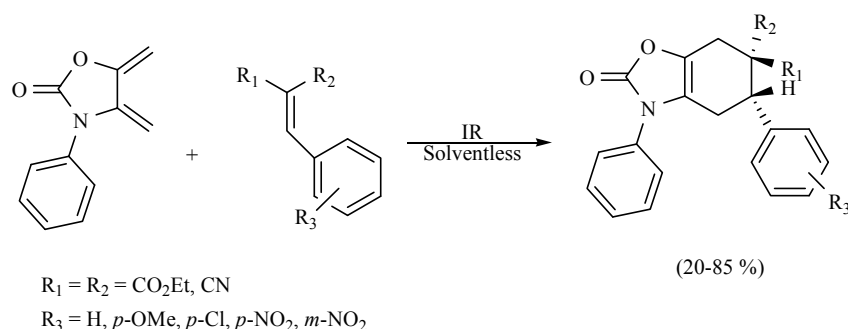
The production of several alpha-alumina powders was described by Hernández and González following the conventional Pechini synthesis in order to study its dielectric behavior. The corresponding polymerization was conducted between nitrate or lactate aluminum and aqueous citric solution and ethylene glycol, employing MW or MIR as comparative activating sources. However, the best final alumina powder was synthesized by applying MW [51].

The formation of  $\text{SnO}_2$  nanoparticles with four different sizes was performed using infrared irradiation and typical thermal treatment. The title materials have considerable value in gas sensors and dye-based solar cells. The authors reported that the best size of this type material is  $\sim 11$  nm because it has fewer lattice defects in addition to suffering less electrochemical agglomeration [52].

Different materials are used as protective coatings on metallic substrates because of their interesting properties, including high thermal conductivity, low electric conductivity, and excellent thermal stability. In this sense, boron nitride (BN) in a hexagonal form was prepared using a liquid polyborazylene as a BN source and its annealing was activated by infrared irradiation to perform the polymer-to-ceramic conversion. It is the first report about the preparation of BN coating on titanium substrate with liquid BN polymeric precursor through MIR; this study creates an access toward the molecular design of hexagonal boron nitride coatings as protective materials for low melting point metals [53].

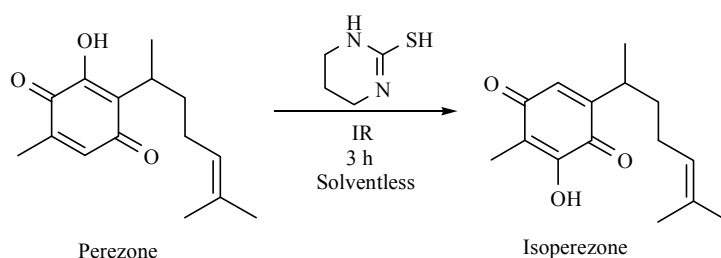
It is well known that the percentage of UV light in the solar spectrum is only 5%, which is very low compared to visible light (~48%) and near-infrared light (~44%). The low usage of sunlight has restrained photocatalytic efficiency to pure TiO<sub>2</sub>, as the most promising photocatalyst, for environmental remediation. With this in mind, a photocatalyst consisting of YF<sub>3</sub>:Yb<sup>3+</sup> and TM<sup>3+</sup>/TiO<sub>2</sub> core/shell nanoparticles has been reported demonstrating that NIR energy can be used as an activating source. Complementarily, methylene blue was used in this study, which suffers decomposition by core/shell nanoparticles under a 980 nm laser and NIR [54].

A new, efficient, regio- and stereoselective Diels–Alder reaction (Scheme 35) was developed by Flores-Conde and coworkers, between a series of Knoevenagel adducts as dienophiles in the presence of *exo*-2-oxazolidinone with MIR as activating source under solvent-free conditions and in the absence of a catalyst [36].



**Scheme 35.** Synthesis of 2-oxazolidinone derivatives.

It is worth noting that isoperezone was produced using perezone as substrate in the presence of 3,4,5,6-tetrahydro-2-pyrimidinethiol and in absence of solvent using MIR as activating source. The process was carried out over three hours and the reaction yield was similar to the previously reported procedure, typical thermal conditions for 12 h (Scheme 36) [19].

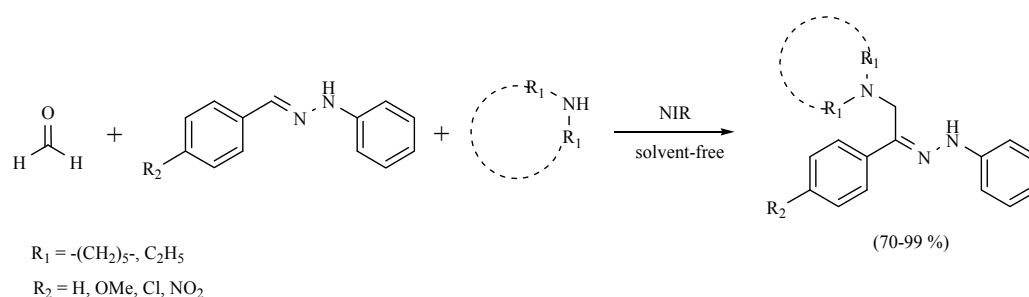


**Scheme 36.** Production of isoperezone.

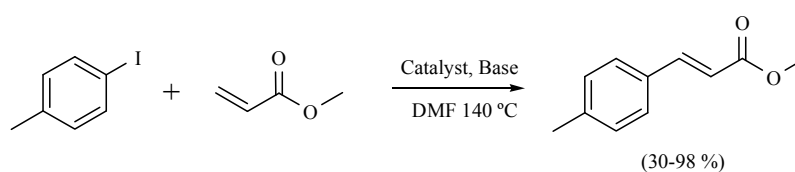
Recently, the Mannich coupling reaction between various arylhydrazones, formaldehyde and a secondary amine to generate the corresponding (*Z*)-(aminomethyl(aryl)phenyl)hydrazones assisted by near infrared irradiation under solvent-free conditions has been performed (Scheme 37). In addition, the catalytic potential of the obtained molecules in the palladium-catalyzed NIR-assisted Heck coupling



reaction was evaluated. The coupling products were obtained in high yields and in short reaction times (Scheme 38) [55].

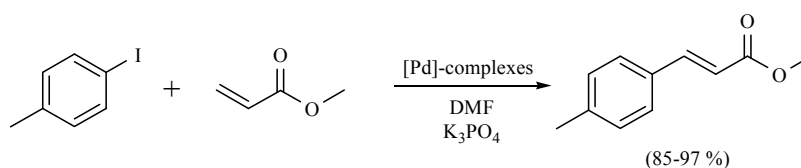


**Scheme 37.** Synthesis of amino(aryl)phenylhydrazones.



**Scheme 38.** Formation of C-C bond by mean Heck coupling.

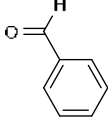
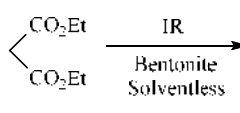
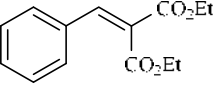
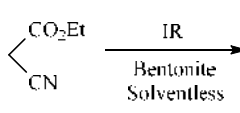
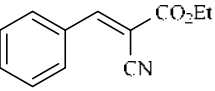
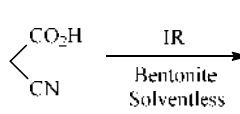
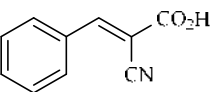
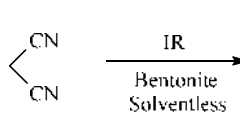
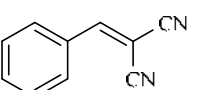
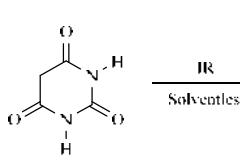
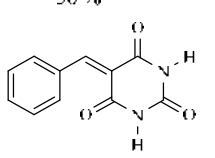
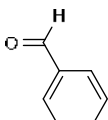
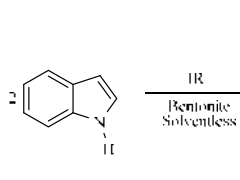
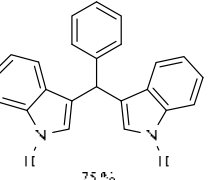
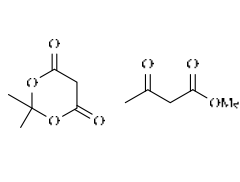
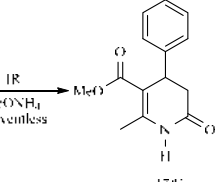
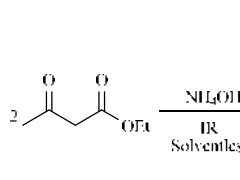
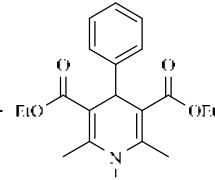
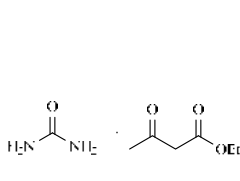
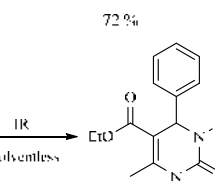
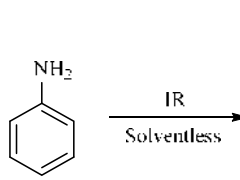
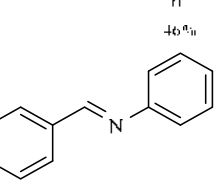
In another recent report, an alternative and environmentally friendly strategy to promote the Mizoroki–Heck cross-coupling reaction using NIR as the activating mode of reaction and employing palladacycles as precatalyst has been offered. A comparison with the classical use of reflux conditions, and commercial sources of palladium complexes shows the advantages of this new alternative for promoting the target reactions. The authors highlight this report as the first time NIR was used for this purpose. The results obtained indicate that NIR can be considered an excellent, economical and accessible alternative to promote this coupling reaction, showing advantages such as short reaction times and good yields, facilitating access to a clean, simple and economic methodology comparable to those involving microwaves (Scheme 39) [7].



**Scheme 39.** Production of C-C bond by mean Mizoroki-Heck cross-coupling.

As was mentioned at the beginning of the review, the infrared spectrum is divided into three zones (near, middle, and far). With this in mind, it is also worth mentioning that the majority of chemical reactions described herein have been made using middle infrared irradiation. In this sense, Noguez Cordova and coworkers performed a comparative study between NIR and MIR [56]. Thus, the results of various different reactions are summarized in Table 1. During the development of this work, the expected molecules were obtained using NIR compared with MIR as the activating mode. As can be seen, the reaction times of the NIR mode in comparison to the MIR procedure are significantly reduced (to half and in some cases even to a third). Other advantages mentioned by the authors include: the immediate response time for the heat source ( $\leq 1$  s), the efficient use of applied energy by convection, and the longer life time of the tungsten-halogen filament. In addition, in comparison to the typical mantle heating mode, the reactions are “greener”, offering an environmentally friendly way of practicing chemistry.

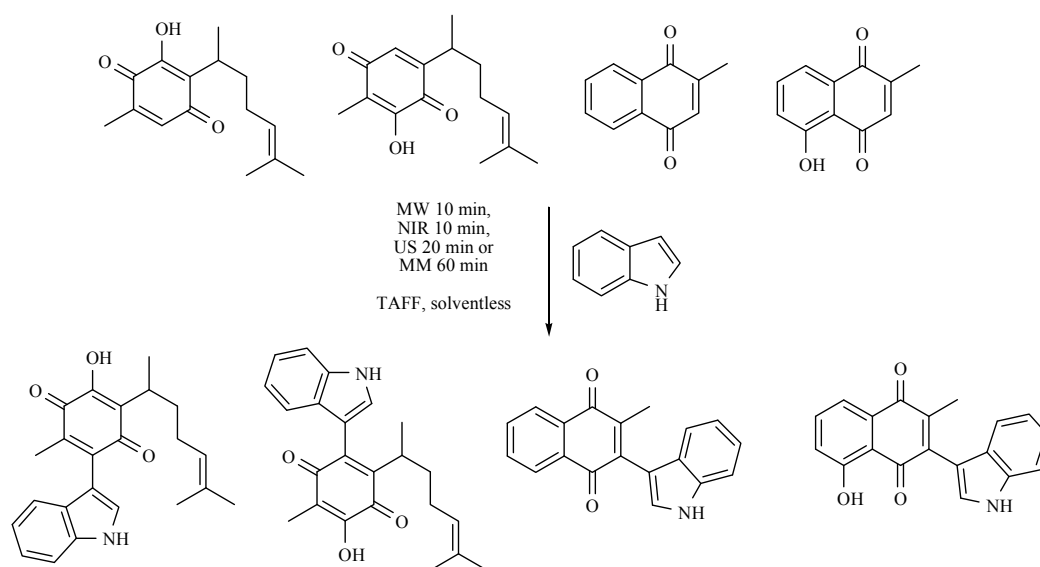
Table 1. Near vs. middle infrared irradiation for the completion of organic reactions.

Substrate	Reactions		MIR: Time/Temp	NIR: Time/Temp
	Reagent	Product	Literature [57]	This Work [56]
		 75 %	15 min/80 °C	7 min/170 °C
		 70 %	15 min/80 °C	7 min/170 °C
		 43 %	15 min/80 °C	7 min/170 °C
		 56 %	15 min/80 °C	7 min/170 °C
		 74 %	45 min/80 °C	20 min/170 °C
		 75 %	15 min/80 °C	7 min/170 °C
		 47 %	3 h/80 °C	50 min/170 °C
		 72 %	3 h/80 °C	50 min/170 °C
		 46 %	3 h/80 °C	1.5 h/170 °C
		 98 %	40 min/80 °C	20 min/170 °C

## 8. Novel Results from Our Research Laboratory

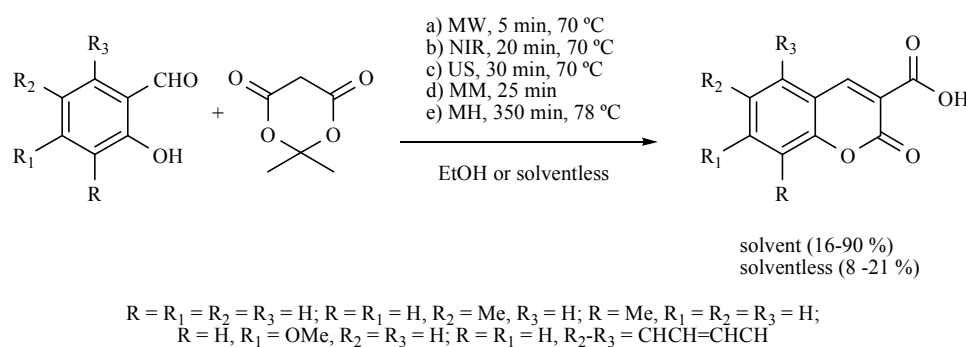
The results displayed in this section correspond to recent, novel results obtained by our research group. It is important to note that they are currently being written up or have recently been submitted for publication.

Several indol-derivatives from four natural quinones (perezone, isoperezone, menadione and plumbagine) have been prepared, employing four non-conventional activating modes, including NIR, under solvent-free conditions and with the employment of TAFF as catalyst (Scheme 40). The target molecules are under several pharmacological assays.



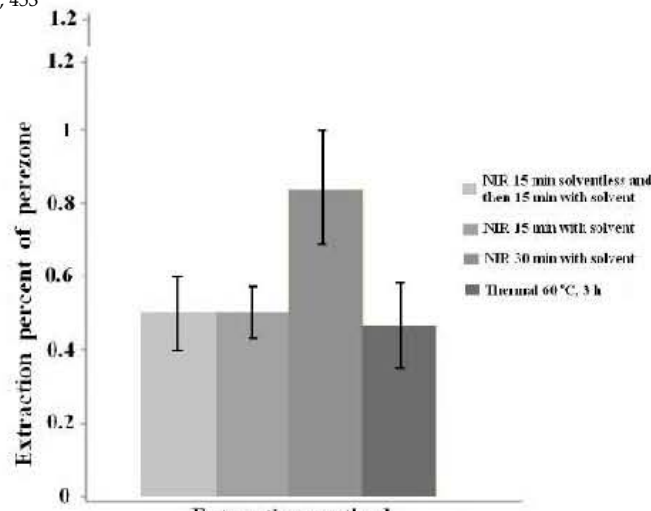
**Scheme 40.** Production of several indol-derivatives of natural quinones.

Various coumarins have also been produced to compare several non-conventional activating sources with the typical mantle heating, in the presence or absence of ethanol as solvent and without catalyst (Scheme 41). The reactions proceeded in short reaction times with moderate to good yields. It is worth mentioning that NIR has shown the best yields.



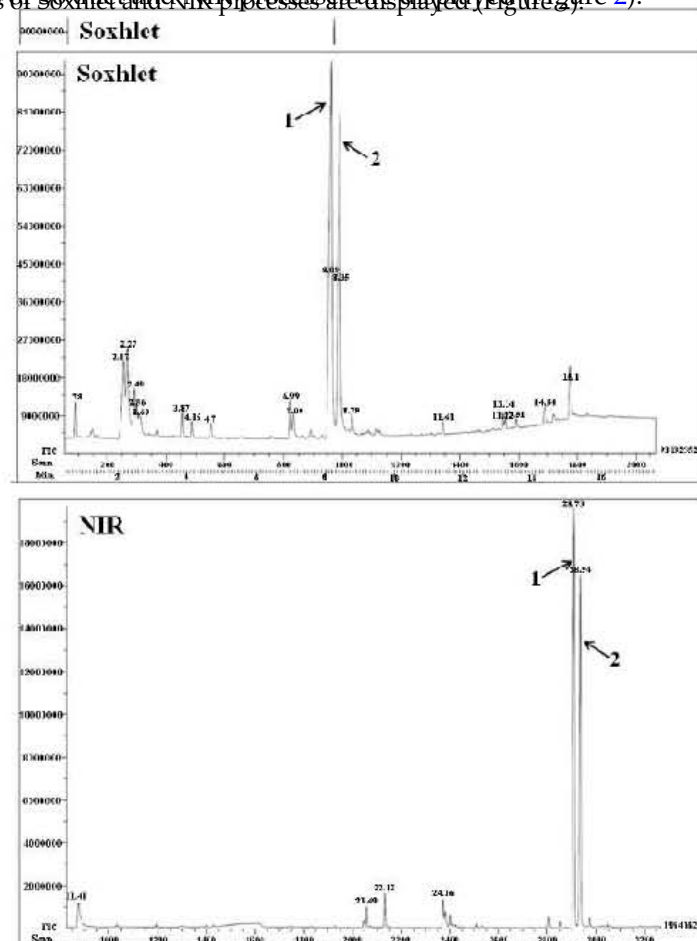
**Scheme 41.** Formation of coumarins.

Related to natural products extraction, a wide study about the extraction of perezone from roots of *Acourtia* plants has recently been performed by our group to compare various modes: MH, NIR, MW, US and supercritical CO<sub>2</sub>. It is worth mentioning that the yields obtained from the extraction using NIR for 15 min were statically equal to the conventional thermal extraction (reflux for 3 h). Figure 1 exhibits a comparative histogram between MH and NIR extractions.



**Figure 1.** Comparison of extractions percent between NIR and MH methods.

**Figure 1.** Comparison of extractions percent between NIR and MH methods. The extraction of capsaicin and dihydrocapsaicin from habanero pepper powder has been evaluated recently to compare several modes: MH-Soxhlet, NIR, MW, and US using ethanol as the solvent. The best results were: 30 min for NIR, 6 min for MW and 65 min for US. As an example, the chromatograms of Soxhlet and NIR processes are displayed (Figure 2).



**Figure 2.** Chromatograms extraction of capsaicin (1) and dihydrocapsaicin (2).

**Figure 2.** Chromatograms extraction of capsaicin (1) and dihydrocapsaicin (2).

## 9. Natural Products Extractions

As is well known, several methods are available to extract the metabolic compounds present in vegetable species: solvent [58], pressurized hot water [59], ultrasound [60], microwave [61–63] and supercritical fluids [64,65]. However, it is worth noting that infrared irradiation, mainly FIR, has also been employed. Thus, we have summarized the corresponding results from a literature searching Table 2. As can be seen, it contains the studied vegetable material, a brief description of the corresponding procedure, the present metabolites and the respective reference.

**Table 2.** Natural products extractions by infrared irradiation.

Vegetable Material	Work Description	Compounds Analyzed	Refs.
<i>Oriza sativa</i> L. (Rice cultivar)	The rice hulls were treated with FIR for 30 min. After irradiation, a methanolic extract was prepared at room temperature for 1 h. The yields and antioxidant activity of the extract was better in comparison to the conventional method. In addition, The obtained results indicate that FIR could liberate and activate covalently bound phenolic compounds with antioxidant activities.		[66]
	Rice hulls pulverized and passed through a 48-mesh molecular sieve were treated with FIR for 2 h, and then a methanolic extract was prepared at room temperature overnight. The antioxidant effect of far infrared-treated rice hull (FRH) extracts in irradiated turkey breast meat was compared with that of sesamol and rosemary oleoresin. The FRH extracts significantly decreased thiobarbituric acid-reactive substances values and volatile aldehydes (hexanal, pentanal, and propanal) and was effective in reducing the production of dimethyl disulfide responsible for irradiation off-odor in irradiated raw and cooked turkey meat during aerobic storage.	<i>p</i> -Coumaric acid; 3-vinyl-1-oxybenzene; 4-hydroxybenzaldehyde; vanillin; 4-hydroxybenzoic acid; and 4,7-dihydroxyvanillic acid.	[67]
<i>Sesamum indicum</i> L. (Sesame)	Sesame seeds were treated with FIR. The sample was defatted and the residue was used to prepare a methanolic extract by shaking overnight at room temperature. After that, the corresponding antioxidant activities were determined.	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid; <i>o</i> -coumaric acid, vanillic acid; <i>p</i> -coumaric acid, isoferulic acid; sesamol and tocopherol.	[68]
<i>Arachis hypogaea</i> L. (Peanut)	Peanut hulls dried under room temperature, were treated with FIR for 5 to 60 min at 150 °C. The irradiated material was extracted with distilled water at room temperature overnight. The total phenol contents, radical scavenging activities, and reducing power of these water extracts were determined.	2-Methoxyphenol; 2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid; 2-methoxy-2-vinylphenol; 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde; 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)phenol; 4-hydroxy-3-methoxybenzenoic acid; vanillyl alcohol; methylcinnamate.	[69]
<i>Camellia sinensis</i> var. <i>sinensis</i> (Green tea leaves)	In a first instance, the processed green tea leaves were treated with FIR at 80–150 °C for 10 min. Then, the leaves were prepared by soaking them in boiling water and the corresponding physicochemical characteristics were determined. The applied FIR at 90 °C increased total phenol and total flavanol contents in comparison with non-irradiated control. FIR also significantly affected the amounts of epigallocatechin and epigallocatechin gallate. These results support the idea that FIR could be a useful method for increasing the health-promoting properties of green tea.		[70]
	Green tea leaves were processed by seven modes, six of them using FIR at 90 °C for 10 min at different moments of the manufacturing process (during roasting and drying and finally on the dried product). The physicochemical characteristics of the green tea were determined. The obtained results indicate that the chemical properties of green tea are significantly affected by FIR at specific stages of the manufacturing process of green tea leaves, providing a high-quality green tea.	Polyphenolic compounds; caffeine; (–)-epicatechin; (–)-catechin; (–)-epicatechingallate; (–)-catechingallate; (–)-epigallocatechin; (–)-gallocatechin; (–)-epigallocatechingallate; (–)-gallocatechingallate; and ascorbic acid.	[71]
	The effect of FIR on the physicochemical characteristic of green tea during processing was determined. Green tea leaves were irradiated by FIR during the roasting and drying step; then, the leaves were extracted by soaking them in water, and the components analyzed. The obtained results show that FIR, during the green tea process, affected its chemical properties. In addition, the authors comment the FIR can be employed to increase the physicochemical qualities of green tea.		[72]
<i>Puerariae radix</i>	The antioxidant activity modulated by FIR on <i>Puerariae radix</i> extract was evaluated. In addition, it is mentioned that this specimen has been widely used in Eastern Asia to treat the common cold and influenza and as an antidiposotropic agent. FIR at 110 °C for 40 min increased the values of total phenol contents, radical scavenging activity, reducing power and puerarin content in the corresponding methanolic extract in comparison to the non-irradiated material. The obtained results suggest that FIR could be used to increase the quality of the studied herb.	Polyphenols compounds, isoflavonoids such: puerarin, daidzein, daidzin, luteolin and biochanin A.	[73]
<i>Morus alba</i> L. (Mulberry)	The antioxidant and physical properties, and consequently the change in polyphenolic compound in mulberry tea, as influenced by FIR, were determined. This study aimed to use FIR for convection drying to improve physical quality and antioxidant properties of mulberry tea. In addition, it was demonstrated that the intensity of FIR affected the total phenolic and flavanoid contents.	<i>p</i> -Coumaric acid; benzoic acid; (+)-catechin; chlorogenic acid; vanillic acid; syringic acid; sinapic acid; protocathechuic acid; ferulic acid; gallic acid and caffeic acid.	[74]
<i>Radix Salviae miltiorrhizae</i> (Dashen)	In this study, FIR was employed to extract the active compounds from <i>Radix Salviae miltiorrhizae</i> ; the optimal conditions were as follows: extraction time 15 min; extraction solvent 70% <i>v/v</i> methanol in water solution; and solid/liquid ratio of 0.1:15 (g/mL). Thus, four phenolic compounds and four diterpenoids were isolated. It is also worth noting that FIR was compared with conventional heat-reflux extraction, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction. The FIR mode resulted as the best mode to extract the target molecules.	Danshensu; protocathechuic acid; protocathechuic aldehyde; salvianolic acid B; dihydrotanshinone; cryptotanshinone; tanshinone I; and tanshinone II A.	[75]
<i>Lycium barbarum</i> Linn	FIR-assisted methanolic extraction was employed to extract rutin, quercetin and genticic acid. The effect of detection potential, irradiation time, and the voltage applied, was investigated in order to acquire the optimum analysis conditions. It is worth noting the use of capillary electrophoresis as a complementary method for the determination of bioactive constituents. The yields were similar to the conventional methods but at lower time.	Quercetin; rutin; and genticic acid.	[76]
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch (Licorice roots)	Licorice roots powders were treated with FIR for 30 min at 120–200 °C. After irradiation, a 50% ethanol extract was prepared at room temperature for 1 h. The total phenolic and flavanol contents in addition to the radical scavenging activities were determined. The contents of liquiritin, glycyrrhetic acid and glycyrrhizin increased.	Liquiritin; glycyrrhetic acid; and glycyrrhizin.	[77]
<i>Lysium chinensis</i> Mill	Folium <i>Lysium Chinensis</i> , a commonly used traditional Chinese medicine, is the dried leaf of <i>Lysium chinensis</i> Mill, and it has been employed to treat consumptive disease, fever, polydipsia, headache, metrorrhagia, and carbuncle. In this work, a method based on capillary electrophoresis and FIR-water assisted extraction has been developed to determine mannitol, sucrose, glucose and fructose quantities. The extraction time was significantly reduced to 7 min compared with several hours for the conventional hot solvent extraction.	Mannitol; sucrose; glucose and fructose.	[78]

Table 2. Cont.

Vegetable Material	Work Description	Compounds Analyzed	Refs.
Grape seeds	In this work, FIR-assisted extraction was combined with HPLC for the determination of catechin, epicatechin and procyanidin B2 in grape seeds. The grape seeds powder was dispersed in different mixtures of water–methanol. These mixtures were irradiated for 30 min. The extraction efficiency was compared with other methods, including microwave extraction, ultrasonic extraction and the classical mantle heating.	Catechin; epicatechin; and procyanidin B2.	[79]
<i>Rhododendron mucronulatum</i> Turcz	A combined method with FIR procedure was employed for the extraction of two flavones and three phenolic acids from the dried leaves of <i>Rhododendron mucronulatum</i> Turcz, commonly used in traditional Chinese medicine. The dried and pulverized leaves were dispersed in 60% aqueous methanol and treated with FIR for 6 min under reflux with methanol. The results indicate that FIR significantly enhances the extraction efficiency and reduces the time from 3 h to 6 min in comparison with the conventional heat solvent extraction.	Rutin; farrerol; syringic acid; vanillic acid and 4-hydroxybenzoic acid.	[80]
<i>Tagetes erecta</i> L. (marigold flower)	Marigold flower has long been used as a food colorant and ingredient in human food and animal feed. Drying is one the most important processes for the production of marigold powder. Therefore, in this work, the effects of different drying processes—freeze-drying, hot air drying and combined FIR-hot air convection—on the color, in addition to the carotenoids and phenolic compounds presence in the marigold flowers were evaluated. The obtained results demonstrate that FIR-hot air convection should be considered as a suitable drying method for marigold in order to preserve its color, antioxidant properties and bioactive compounds.	<i>p</i> -Coumaric acid; catechin; chlorogenic acid; vanillic acid; syringic acid; sinapic acid; protocatechuic; ferulic acid; gallic acid; caffeic acid and three carotenoids (lycopene, $\beta$ -carotene and lutein).	[81]
<i>Picrorhiza scrophulariiflora</i> Pennell	The obtained results in this work show that FIR-assisted non-ionic surfactant extraction is good, efficient and a green analytical preparatory technique for the rapid extraction and pre-concentration of pharmacologically active ingredients from <i>Picrorhiza scrophulariiflora</i> Pennell.	Picroside I and picroside II.	[82]
<i>Hibiscus cannabinus</i> L. (Kenaf leaf tea)	In this work, the effect of FIR on the total polyphenol, total flavonoid, antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition ability were investigated in Kenaf leaf tea. The corresponding obtained data indicate that FIR at 60 °C increased the total polyphenol contents and flavonoid contents; in addition, the free radical scavenging and the lipid peroxidation inhibition activity were also increased.	Polyphenolic and flavonoid compounds; kaempferitrin, afzelin; $\alpha$ -rhamnosorobin; and kaempferol.	[83]
<i>Glycine max</i> M. (black soy bean)	The goal of this work was to study the optimal temperature and time to obtain daidzein and genistein from their corresponding glycosides, employing FIR as a thermal source on black soybean. In other words, FIR is offered as a convenient green tool for the chemical conversion of isoflavone glycosides in soybean.	Daidzein and genistein.	[84]
<i>Fagopyrum</i> spp. (Buckwheat)	In this work, the FIR effect on total polyphenol, total flavonoid content, antioxidant properties and aglycone quercetin production in tartary buckwheat sprout were investigated. The powder of the herbal material was mixed with water and exposed to FIR at different temperatures (80–160 °C) for 1 h. Then, the samples were extracted with ethanol at room temperature. The corresponding results indicate that the total antioxidant capacity and metal chelating decreased, however the radical scavenging activity, the total flavonoid and polyphenol contents increased with the temperature.	Polyphenols and flavonoids (quercetin and rutin).	[85]

## 10. Conclusions

In this review, a deep literature search, appropriate analysis and adequate organization of the obtained information, present the use of infrared irradiation (in its three zones, NIR, MIR, and FIR) as a clean and effective mode to activate a reaction, as well as an appropriate procedure for the extraction of natural products from corresponding vegetable materials. In addition, taking into account many of the offered reaction conditions (solvent-free and catalysis, for example) in the examined papers, infrared irradiation is shown to be a good green approach.

**Acknowledgments:** The authors received grants from PAPPIT-UNAM/DGAPA project IN221514-3/14-17 for financial support and from CONACyT-México—205289 for the postdoctoral scholarship of Joel Martínez and 24992 for the PhD scholarship to René Escobedo.

**Author Contributions:** René Escobedo and Joel Martínez performed the deep literature search, Joel Martínez and René Miranda wrote, revised and edited the paper, and all authors are agree with the edited version.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict interest.

## Abbreviations

aa <sub>2</sub>	Amino acid
BN	Boron nitride
BzSH	Benzylthiol
CQDs	Carbon quantum dots
DIPP-aa <sub>1</sub>	<i>N</i> -Phosphoamino acid
DHPs	Dihydropyridines
DHPDs	Dihydropyridinones
DHPMs	Dihydropyrimidinones
FIR	Far infrared irradiation
FRH	Far infrared-treated rice hull
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
GO	Graphene oxide

<i>i</i> -PropSH	Isopropanethiol
<i>n</i> -BuSH	<i>n</i> -Butanethiol
MCR	Multicomponent reaction
MH	Mantle heating
MIR	Middle infrared irradiation
MM	Mechanical milling
MW	Microwave irradiation
NIR	Near infrared irradiation
PhSH	Thiophenol
TAFF	Tonsil Actisil FF
US	Ultrasound

## References

1. Anastas, P.T.; Warner, J.C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1998.
2. Clark, J.; Macquarrie, D. *Handbook of Green Chemistry and Technology*; Blackwell Science: Oxford, UK, 2002.
3. Victor, G.D. Strategies for cutting carbon. *Nature* **1998**, *395*, 837–838.
4. Doble, M.; Kruthiventi, A.K. *Green Chemistry and Engineering*; Academic Press: Burlington, VT, USA, 2007.
5. Shortwave Electric Infrared the Facts. Copyright© ITW BGK Finishing Systems 05/03. Available online: <http://www.bgk.com/ir-the-facts> (accessed on 12 January 2016).
6. Pasquini, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 198–219.
7. Ortega-Jiménez, F.; Domínguez-Villa, F.X.; Rosas-Sánchez, A.; Penieres-Carrillo, G.; López-Cortés, J.G.; Ortega-Alfaro, M.C. An expedient approach to enhance Mizoroki-Heck coupling reaction by infrared irradiation using palladacycle compounds. *Appl. Organometal. Chem.* **2015**, *29*, 556–560.
8. Knoevenagel, E. Method for the synthesis of glutaric acid. *Ber* **1894**, *27*, 2345–2346. [[CrossRef](#)]
9. Delgado, F.; Tamariz, J.; Zepeda, G.; Landa, M.; Miranda, R.; García, J. Knoevenagel condensation catalyzed by a Mexican bentonite using infrared irradiation. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 753–759. [[CrossRef](#)]
10. Obrador, E.; Castro, M.; Tamariz, J.; Zepeda, G.; Miranda, R.; Delgado, F. Knoevenagel condensation in heterogeneous phase catalyzed by IR radiation and tonsil actisil FF. *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 4649–4663. [[CrossRef](#)]
11. Alcerreca, G.; Sanabria, R.; Miranda, R.; Arroyo, G.; Tamariz, J.; Delgado, F. Preparation of benzylidene barbituric acids promoted by infrared irradiation in absence of solvent. *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 1295–1301. [[CrossRef](#)]
12. Miranda, R.; Ríos, H.; Delgado, M.; Cogordán, J.A.; Salmón, J. Characterization of TAFF, a bentonitic clay and its application in the obtention of oligotoluene. *J. Appl. Catal.* **2003**, *224*, 217–233. [[CrossRef](#)]
13. Penieres, G.; Soto, V.; Alvarez, C.; García, O.; García, J.G. A new strategy for the synthesis of *N*-substituted 2,5-dimethylpyrroles in heterogeneous medium. *Heterocycl. Commun.* **1998**, *4*, 31–32. [[CrossRef](#)]
14. Zhang, C.; Wang, J.; Li, J.H. Infrared heat aided solid state synthesis of pyrroles from 1,4-diketones and ammonium acetate. *J. Heterocycl. Chem.* **2012**, *49*, 204–207. [[CrossRef](#)]
15. Penieres, C.G.; Bonifas, A.I.; López, C.J.G.; García, E.J.G.; Alvarez, T.C. Synthesis of benzimidazoles in dry medium. *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 2191–2195. [[CrossRef](#)]
16. Dandia, A.; Parewa, V.; Gupta, S.L.; Rathore, K.S. Cobalt doped ZnS nanoparticles as a recyclable catalyst for solvent-free synthesis of heterocyclic privileged medicinal scaffolds under infrared irradiation. *J. Mol. Catal. A* **2013**, *373*, 61–71. [[CrossRef](#)]
17. Vázquez, M.A.; Landa, M.; Reyes, L.; Miranda, R.; Tamariz, J.; Delgado, F. Infrared irradiation: Effective promoter in the formation of *N*-benzylideneanilines in the absence of solvent. *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 2705–2718. [[CrossRef](#)]
18. Tong, J.Y.; Sun, N.B.; Wu, H.K. Grinding synthesis of Schiff bases combined with infrared irradiation. *Asian J. Chem.* **2013**, *25*, 5399–5401.

19. Martínez, J.; Velasco-Bejarano, B.; Delgado, F.; Pozas, R.; Torres Domínguez, H.M.; Trujillo Ferrara, J.G.; Arroyo, G.A.; Miranda, R. Eco-contribution to the chemistry of perezone, a comparative study, using different modes of activation and solventless conditions. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 1465–1468.
20. Miranda, R.; Valencia-Vázquez, O.; Maya-Vega, C.A.; Nicolás-Vázquez, I.; Vargas-Rodriguez, Y.M.; Morales-Serna, J.A.; García-Ríos, E.; Salmón, M. Synthesis of cycloveratrylene macrocycles and benzyl oligomers catalysed by bentonitic under microwave/infrared and solvent-free conditions. *Molecules* **2013**, *18*, 12820–12844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Zhu, J.; Bienaymé, H. *Multicomponent Reactions*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005.
22. Zarco, M.; Martínez, J.O.; Noguez, O.; Nicolás-Vázquez, M.I.; Ramírez-Apan, T.; Pérez, J.; Miranda, R.; Arroyo-Razo, G.A. A green approach to the production of hybrid diindolylmethane-phenylboronic acids via a 3MCR: Promising antineoplastic molecules. *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1–9. [[CrossRef](#)]
23. Salmón, M.; Osnaya, R.; Gómez, L.; Arroyo, G.; Delgado, F.; Miranda, R. Contribution to the Biginelli reaction, using a bentonitic clay as catalyst and solventless procedure. *J. Mex. Chem. Soc.* **2001**, *45*, 206–207.
24. Noguez, M.O.; García, A.; Ibarra, C.; Cabrera, A.; Aceves, J.M.; Nicolás, M.I.; Miranda, R. Green synthesis of *bis*-Biginelli esters, with vasodilatory effects, their mass spectrometric and physical studies. *Trends Org. Chem.* **2009**, *13*, 75–82.
25. Osnaya, R.; Arroyo, G.A.; Parada, L.; Delgado, F.; Trujillo, J.; Salmón, M.; Miranda, R. Biginelli vs Hantzsch esters study under infrared radiation and solventless conditions. *Arkivoc* **2003**, *2003*, 112–117.
26. Gómez-Pliego, R.; Osnaya, R.; Zamora, I.; Velasco-Bejarano, B.; Arroyo, G.; Ramírez-San Juan, E.; Trujillo, J.; Delgado, F.; Miranda, R. The Hantzsch ester production in a water-based biphasic medium, using infrared irradiation as the activating source. *J. Mex. Chem. Soc.* **2007**, *51*, 181–184.
27. Gómez Pliego, R.; Ramírez-San Juan, E.; Miranda, R.; Villalobos-Molina, R.; Delgado, F.; Osnaya, R.; Trujillo Ferrara, J. Vasodilator effects of *bis*-dihydropyridines structurally related to nifedipine. *Med. Chem.* **2006**, *2*, 527–534. [[CrossRef](#)]
28. Ramírez-San Juan, E.; Soriano-Ursúa, M.A.; Espinosa-Raya, J.; Correa-Basurto, J.; Trujillo-Ferrara, J.G.; Miranda Ruvalcaba, R.; Gómez-Pliego, R. Anticonvulsant effects of *bis*-1,4-dihydropyridines and the probable role of L-type calcium channels suggested by docking simulations. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 5149–5159. [[CrossRef](#)]
29. Martínez, J.; Romero-Vega, S.; Abeja-Cruz, R.; Álvarez-Toledano, C.; Miranda, R. Green approach multicomponent production of boron containing Hantzsch and Biginelli esters. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 2903–2915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Chandrachood, P.; Gadkari, T.; Deshpande, N.; Kashalkar, R. Highly efficient methodology for aromatization of 1,4-dihydropyridines using silica-supported transition metal nitrates under infra-red radiations. *J. Iran Chem. Soc.* **2012**, *9*, 47–51. [[CrossRef](#)]
31. Noguez, M.O.; Marcelino, V.; Rodríguez, H.; Martín, O.; Martínez, J.O.; Arroyo, G.A.; Pérez, F.J.; Suárez, M.; Miranda, R. Infrared assisted production of 3,4-dihydro-2(1H)-pyridones in solvent-free conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2641–2649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Penieres-Carrillo, G.; García-Estrada, J.G.; Gutiérrez-Ramírez, J.L.; Alvarez-Toledano, C. Infrared-assisted eco-friendly selective synthesis of diindolylmethanes. *Green Chem.* **2003**, *5*, 337–339. [[CrossRef](#)]
33. Velasco-Bejarano, B.; Sánchez-Torres, L.E.; García-Estrada, J.G.; Miranda-Ruvalcaba, R.; Álvarez-Toledano, C.; Penieres-Carrillo, G. Diindolylmethane derivatives as apoptosis inducers in L5178Y cells. *J. Mex. Chem. Soc.* **2008**, *52*, 224–228.
34. Wang, S.X.; Guo, S.B.; Gao, M.Z.; Li, J.T.; Duan, Y.F. Infrared irradiation synthesis of substituted 5-oxo-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroquinoline derivatives under solvent-free conditions. *J. Chem.* **2006**, *3*, 159–163.
35. Sánchez, A.; Hernández, F.; Cruz, P.C.; Alcaraz, Y.; Tamariz, J.; Delgado, F.; Vázquez, M.A. Infrared irradiation-assisted multicomponent synthesis of 2-amino-3-cyano-4H-pyran derivatives. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56*, 121–127.
36. Flores-Conde, M.I.; Reyes, L.; Herrera, R.; Rios, H.; Vazquez, M.A.; Miranda, R.; Tamariz, J.; Delgado, F. Highly regio- and stereoselective Diels–Alder cycloadditions via two-step and multicomponent reactions promoted by infrared irradiation under solvent-free conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 2590–2617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



37. Valdez-Rojas, J.E.; Ríos-Guerra, H.; Ramírez-Sánchez, A.L.; García-González, G.; Álvarez-Toledano, C.; López-Cortés, J.G.; Toscano, R.A.; Penieres-Carrillo, J.G. A study of the Willgerodt–Kindler reaction to obtain thioamides and  $\alpha$ -ketothioamides under solvent-less conditions. *Can. J. Chem.* **2012**, *90*, 567–573. [[CrossRef](#)]
38. Velázquez, A.M.; Torres, L.A.; Díaz, G.; Ramírez, A.; Hernández, R.; Santillán, H.; Martínez, L.; Martínez, I.; Díaz-Barriga, S.; Abrego, V.; *et al.* A novel one pot, solvent-free Mannich synthesis of methylpiperidinyl phenols, methylphenylmorpholinyl phenols and methylthiophenylmorpholinyl phenols using infrared light irradiation. *Arkivoc* **2006**, *2006*, 150–161.
39. Velázquez, A.M.; Torres, L.A.; González, R.; Valencia, A.; Díaz-Barriga, S.; Menconi, I.; Martínez, L.; Ramírez, A.; Martínez, I.; Camacho, B.; *et al.* Synthesis of 4-methoxy-2-thiomorpholin-4-ylmethyl-1-phenol. *Molbank* **2007**, *2007*, M547. [[CrossRef](#)]
40. Clouthier, C.M.; Pelletier, J.N. Expanding the organic toolbox: A guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585–1605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Li, C.; Wang, F.; Zhu, J.; Yu, J.C. NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm/CdS composite as a novel near-infrared-driven photocatalyst. *App. Catal. B* **2010**, *100*, 433–439. [[CrossRef](#)]
42. Guo, H.; Peng, M.; Zhu, Z.; Sun, L. Preparation of reduced graphene oxide by infrared irradiation induced photothermal reduction. *Nanoscale* **2013**, *5*, 9040–9048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gómez-Lara, J.; Gutiérrez-Pérez, R.; Penieres-Carrillo, G.; López-Cortés, J.G.; Escudero-Salas, A.; Álvarez-Toledano, C. Reaction of hydroquinones with supported oxidizing reagents in solvent-free conditions. *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 2713–2720. [[CrossRef](#)]
44. Li, H.; Liu, R.; Lian, S.; Liu, Y.; Huang, H.; Kang, Z. Near-infrared light controlled photocatalytic activity of carbon quantum dots for highly selective oxidation reaction. *Nanoscale* **2013**, *5*, 3289–3297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wang, G.; Huang, B.; Ma, X.; Wang, Z.; Qin, X.; Zhang, X.; Dai, Y.; Whangbo, M.H. Cu<sub>2</sub>(OH)PO<sub>4</sub>, a near-infrared-activated photocatalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4810–4813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ikeue, T.; Sonoda, M.; Kurahashi, S.; Tachibana, H.; Teraoka, D.; Sugimori, T.; Kasuga, K.; Handa, M. Annulated dinuclear palladium(II) phthalocyanine complex as an effective photo-oxidation catalyst for near-infrared region light. *Inorg. Chem. Commun.* **2010**, *13*, 1170–1172. [[CrossRef](#)]
47. Penieres, G.; Miranda, R.; García, J.; Aceves, J.; Delgado, F. Modification of the Fischer indole synthesis. *Heterocycl. Commun.* **1996**, *2*, 401–402.
48. Jiménez-Estrada, M.; García, M.O.; Navarro, A.O.; Eusebio, J.L.; Álvarez, C.T.; Penieres, G.C.; Gutiérrez, R.P. Allylic nitration of 3-sitosterol and cholesterol acetate: Preparation of 7-nitro derivatives. *Steroids* **1997**, *62*, 500–503. [[CrossRef](#)]
49. Penieres, G.; Aceves, J.M.; Flores, A.; Mendoza, G.; García, O.; Álvarez, C. Comparative study of  $\epsilon$ -caprolactam synthesis using different energy sources and natural clay as catalyst. *Heterocycl. Commun.* **1997**, *3*, 507–508. [[CrossRef](#)]
50. Deng, C.H.; Li, Y.M.; Zhao, Y.F. Formation of oligopeptides from *N*-phosphoamino acid by infrared radiation. *Phosphorus Sulfur Silicon* **2000**, *163*, 203–210. [[CrossRef](#)]
51. Hernández, M.T.; González, M. Synthesis of resins as  $\alpha$ -alumina precursors by the Pechini method using microwave and infrared heating. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2002**, *22*, 2861–2868. [[CrossRef](#)]
52. Huang, L.; Wei, H.B.; Ke, F.S.; Cai, J.S.; Fan, X.Y.; Sun, S.G. Infrared irradiation-assisted one-step synthesis of nanosized tin dioxide particles and particle size effect on lithium storage performance. *Colloids Surf. A* **2007**, *308*, 87–92. [[CrossRef](#)]
53. Termoss, H.; Toury, B.; Pavan, S.; Brioude, A.; Bernard, S.; Cornu, D.; Valette, S.; Benayoun, S.; Miele, P. Preparation of boron nitride-based coatings on metallic substrates via infrared irradiation of dip-coated polyborazylene. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2671–2674. [[CrossRef](#)]
54. Qin, W.; Zhang, D.; Zhao, D.; Wang, L.; Zheng, K. Near-infrared photocatalysis based on YF<sub>3</sub>:Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>/TiO<sub>2</sub> core/shell nanoparticles. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2304–2306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ortega-Jiménez, F.; Penieres-Carrillo, J.G.; Lagunas-Rivera, S.; López-Cortés, J.G.; Álvarez-Toledano, C.; Ortega-Alfaro, M.C. Infrared irradiation assisted both the synthesis of (*Z*)-(aminomethyl)(aryl) phenylhydrazones *via* the Mannich coupling reaction and their application to the palladium-catalyzed Heck reaction. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 80911–80918. [[CrossRef](#)]

56. Noguez-Córdova, M.O.; Flores-Ramírez, C.I.; Velasco-Bejarano, B.; Arroyo-Razo, G.A.; Pérez-Flores, F.J.; Carranza-Tellez, V.; Miranda-Ruvalcaba, R. Comparative study using different infrared zones of the solventless activation of organic reaction. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 8575–8580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Miranda, R.; Noguez, O.; Velasco, B.; Arroyo, G.; Penieres, G.; Martínez, J.O.; Delgado, F. Irradiación infrarroja: Una alternativa para la activación de reacciones y su contribución a la química verde. *Educ. Quím.* **2009**, *20*, 421–425.
58. Niu, G.G.; Xie, Y.C.; Lou, J.F.; Liu, H.Z. Isolation and purification of glycyrrhizic acid with solvent extraction. *Sep. Sci. Technol.* **2005**, *44*, 189–192. [[CrossRef](#)]
59. Hartonen, K.; Parshintsev, J.; Sandberg, K.; Bergelin, E.; Nisula, L.; Riekkola, M.L. Isolation of flavonoids from aspen knotwood by pressurized hot water extraction and comparison with other extraction techniques. *Talanta* **2007**, *74*, 32–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. De Rijke, E.; Zafra-Gómez, A.; Ariese, F.; Th Brinkman, U.A.; Gooijer, C. Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pretense* L. (red clover) extracts: Quantification and stability studies. *J. Chromatogr. A* **2001**, *932*, 55–64. [[CrossRef](#)]
61. Zhou, H.Y.; Liu, C.Z. Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1129*, 135–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ji, J.; Deng, C.; Zhang, H.; Wu, Y.; Zhang, X. Microwave-assisted steam distillation for the determination of organochlorine pesticides and pyrethroids in Chinese teas. *Talanta* **2007**, *71*, 1068–1074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hu, F.; Deng, C.; Liu, Y.; Zhang, X. Quantitative determination of chlorogenic acid in *Honeysuckle* using microwave-assisted extraction followed by nano-LC-ESI mass spectrometry. *Talanta* **2009**, *77*, 1299–1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Pourmortazavi, S.M.; Hajimirsadeghi, S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1163*, 2–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Peng, J.; Fan, G.; Wu, Y. Supercritical fluid extraction of aurenitiamide acetate from *Patrinia villosa* Juss and subsequent isolation by silica gel and high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1083*, 52–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Lee, S.C.; Kim, J.H.; Jeong, S.M.; Kim, D.R.; Ha, J.U.; Nam, K.C.; Ahn, D.U. Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of rice hulls. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4400–4403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lee, S.C.; Kim, J.H.; Nam, K.C.; Ahn, D.U. Antioxidant properties of far infrared-treated rice hull extract in irradiated raw and cooked turkey breast. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 1904–1909. [[CrossRef](#)]
68. Lee, S.C.; Jeong, S.M.; Kim, S.Y.; Nam, K.C.; Ahn, D.U. Effect of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1495–1498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Lee, S.C.; Jeong, S.M.; Kim, S.Y.; Park, H.R.; Nam, K.C.; Ahn, D.U. Effect of far-infrared radiation and heat treatment on the antioxidant activity of water extract from peanut hulls. *Food Chem.* **2006**, *94*, 489–493. [[CrossRef](#)]
70. Lee, S.C.; Kim, S.Y.; Jeong, S.M.; Park, J.H. Effect of far-infrared irradiation on catechins and nitrite scavenging activity of green tea. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 399–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Kim, S.Y.; Jeong, S.M.; Jo, S.C.; Lee, S.C. Application of far-infrared irradiation in the manufacturing process of green tea. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9943–9947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Park, J.H.; Lee, J.M.; Cho, Y.J.; Kim, C.T.; Kim, C.J.; Nam, K.C.; Lee, S.C. Effect of far-infrared heater on the physicochemical characteristics of green tea during processing. *J. Food Biochem.* **2009**, *33*, 149–162. [[CrossRef](#)]
73. Kim, J.W.; Bae, H.C.; Kim, M.C.; Lee, S.C. Effect of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of *Puerariae radix* extract. *J. Food Biochem.* **2008**, *32*, 85–95. [[CrossRef](#)]
74. Wanyo, P.; Siriamornpun, S.; Meeso, N. Changes in phenolic compounds, antioxidant and physical properties of mulberry tea influenced by intensity of far-infrared radiation. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* **2009**, *6*, 470–479.
75. Chen, Y.; Duan, G.; Xie, M.; Chen, B.; Li, Y. Infrared-assisted extraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of eight active compounds in *Radix Salviae miltiorrhizae*. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 2888–2897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Duan, H.; Chen, Y.; Chen, G. Far infrared-assisted extraction followed by capillary electrophoresis for the determination of bioactive constituents in the leaves of *Lycium barbarum* Linn. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4511–4516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

77. Lee, J.M.; Lee, S.C. The effects of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) root. *J. Food Biochem.* **2010**, *34*, 172–181. [[CrossRef](#)]
78. Fu, Y.; Zhang, L.; Chen, G. Determination of carbohydrates in Folium Lysium Chinensis using capillary electrophoresis combined with far-infrared light irradiation-assisted extraction. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 3272–3278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Cai, Y.; Yu, Y.; Duan, G.; Li, Y. Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1872–1877. [[CrossRef](#)]
80. Fu, Y.; Zhang, L.; Chen, G. Far infrared-assisted extraction followed by MEKC for the simultaneous determination of flavones and phenolic acids in the leaves of *Rhododendron mucronulatum* Turcz. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 468–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Siriamornpun, S.; Kaisoon, O.; Meeso, N. Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene,  $\beta$ -carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *J. Funct. Food* **2012**, *4*, 757–766. [[CrossRef](#)]
82. Li, F.; Yu, Y.; Zhang, H.; Liu, T.; Li, Y.; Duan, G. Infrared-assisted non-ionic surfactant extraction as a green analytical preparatory technique for the rapid extraction and pre-concentration of picroside I and picroside II from *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 3747–3753. [[CrossRef](#)]
83. Jin, C.W.; Ghimeray, A.K.; Wang, L.; Xu, M.L.; Piao, J.P.; Cho, D.H. Far infrared assisted kenaf leaf tea preparation and its effect on phenolic compounds, antioxidant and ACE inhibitory activity. *J. Med. Plant Res.* **2013**, *7*, 1121–1128.
84. Ghimeray, A.K.; Sharma, P.; Hu, W.; Jin, C.W.; Park, C.H.; Rho, H.S.; Cho, D.H. Far infrared assisted conversion of isoflavones and its effect on total phenolics and antioxidant activity in black soybean seed. *J. Med. Plant Res.* **2013**, *7*, 1129–1137.
85. Ghimeray, A.K.; Sharma, P.; Phoutaxay, P.; Salitxay, T.; Woo, S.H.; Park, S.U.; Park, C.H. Far infrared irradiation alters total polyphenol, total flavonoid, antioxidant property and quercetin production in tartary buckwheat sprout powder. *J. Cereal Sci.* **2014**, *59*, 167–172. [[CrossRef](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Research Article

# Green Production of Indolylquinones, Derivatives of Perezone, and Related Molecules, Promising Antineoplastic Compounds

**René Gerardo Escobedo-González,<sup>1</sup> Héctor Pérez Martínez,<sup>1</sup> Ma. Inés Nicolás-Vázquez,<sup>1</sup> Joel Martínez,<sup>2</sup> Gabriela Gómez,<sup>3</sup> Juan Nava Serrano,<sup>3</sup> Vladimir Carranza Téllez,<sup>4</sup> C. L. Vargas-Requena,<sup>5</sup> and René Miranda Ruvalcaba<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 54740 Cuautitlán Izcalli, MEX, Mexico*

<sup>2</sup>*Facultad de Ciencias Químicas, Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 78210 San Luis Potosí, SLP, Mexico*

<sup>3</sup>*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Casco de Santo Tomas, 11340 Ciudad de México, CDMX, Mexico*

<sup>4</sup>*Laboratorio de Espectrometría de Masas, Centro de Química, ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, PUE, Mexico*

<sup>5</sup>*Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo Envoltante del Pronaf S/N, 32315 Ciudad Juárez, CHIH, Mexico*

Correspondence should be addressed to René Miranda Ruvalcaba; [mirruv@yahoo.com.mx](mailto:mirruv@yahoo.com.mx)

Received 4 May 2016; Accepted 14 June 2016

Academic Editor: Siva S. Panda

Copyright © 2016 René Gerardo Escobedo-González et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A green approach to produce the indolyl derivatives from four natural quinones (perezone, isoperezone, menadione, and plumbagin) was performed; in this regard, a comparative study was accomplished among the typical mantle heating and three nonconventional activating modes of reaction (microwave, near-infrared, and high speed ball milling or tribochemical), under solventless conditions and using bentonitic clay as a catalyst. In addition, the tribochemical production of isoperezone from perezone is also commented on. It is also worth noting that the cytotoxicity of the synthesized indolylquinones in human breast cancer cell was tested by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, with the 3-indolylisoperezone being the most active. The structural attribution of the target molecules was performed by typical spectroscopic procedures; moreover, the experimental and computed <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts data, with previous acquisition of the corresponding minimum energetic structures, were in good agreement.

## 1. Introduction

Green Chemistry, with a protocol of a cohesive set of twelve principles [1], is an actual discipline that encourages working at the molecular level, in order to achieve sustainability; since the early 1990s, this paradigm has acquired its up-to-date position as a scientific discipline, preventing pollution via the implementation of reactions without damaging conditions to the environment [2]. Under such a protocol, an ideal synthesis would be that by which a target molecule is produced quantitatively in one step from available and inexpensive

starting compounds in an ecologically sustainable process; hence, the request of novel sustainable processes is among the major challenges in organic synthesis. In this regard, researchers at the vanguard of innovation must have the knowledge to design chemical processes with little or no risk to the environment. However, no activity can be completely risk-free or waste-free or have lower harmful emissions. Consequently, the “Twelve Principles of Green Chemistry” should be viewed and applied as a scientific reflection [3].

Many quinones are secondary metabolites generally isolated from plants [4]. In particular, perezone or

pipitzaic acid, a sesquiterpene quinone, is recognized as the first secondary metabolite isolated in the New World by Río de la Loza [5], from the roots of *Perezia* (currently *Acourtia*) specimens; this important molecule has been the target of many chemical, structural, and biological studies, for example, its transformation into pipitzols [6–8] and isoperezone [9], its structural elucidation [10, 11], several green contributions [12], its use as a pigment [13], and highlighting several pharmacological effects [14–21]. By the way, plumbagin, a naphthoquinone from the genus *Plumbago* [22, 23], has been ascribed to several biological properties, for example, its antineoplastic activity [24].

In recent years, cancer prevention by means of natural products has received considerable attention; consequently, the chemistry of secondary metabolites is a powerful source for novel drug candidates. It is also convenient to underline the notion that the design and implementation of synthetic processes moving toward the Green Chemistry Protocol [2, 25] are one of the major challenges in modern organic synthesis.

The indolylquinone moiety is present in many natural products with interesting biological activities [26, 27]; consequently, the promising pharmaceutical use of the indolylquinones has attracted attention for the synthesis of new molecules of this class, mainly under a green approach. In this sense, the most common mode for the preparation of 3-indolylquinones is the direct coupling of indole with several quinones, in the presence of a catalyst (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AcOH, Bi(OTf)<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>, or InBr<sub>3</sub>) in the presence of solvent, using the mantle heating procedure in order to activate the reactions [28].

As part of our ongoing research program, we are interested in the implementation of green synthetic strategies, in order to synergize or modify the pharmacological activities of single known compounds throughout the construction of novel hybrid molecules, mainly using nonconventional activating sources such as microwave (MW) and near-infrared (NIR) irradiation, ultrasound (US), and high speed ball milling (HSBM) in the absence of solvent or using innocuous solvents [29–34] and when required employing Tonsil Actisil FF (TAFF), commercial bentonitic clay, as a green catalyst [35].

Taking into account the aforementioned commentaries, the goals of this work are, in a first stage, to offer a green contribution for the production of four pharmacologic candidates, the indolyl derivatives of perezone (1), isoperezone (2), menadione (3), and plumbagin (4), by comparison of typical mantle heating conditions (MH) with uncommon activating modes, MW and NIR irradiation, in addition to the mechanical procedure of HSBM, all them in the absence of solvent and using TAFF as a catalyst. Additionally, we make an evaluation of the cytotoxic effect of the title molecules, in breast cancer cells as complement to theoretical-computation characterization of them. And finally, novel and convenient transformation of perezone into isoperezone, using for the first time HSBM, is also recommended.

## 2. Materials and Methods

*General.* The reagents indole and menadione were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. and were used without further preparation. The secondary metabolites, perezone and plumbagin, were isolated from the vegetal specimens *Acourtia adnata* and *Plumbago pulchella* Boiss., respectively, according to literature procedures [36–39]. The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) in *n*-hexane/ethyl acetate (80 : 20) using silica gel 60-F<sub>254</sub> coated aluminum sheets; the corresponding visualization was achieved using a 254 nm UV lamp. The catalyst, Actisil FF (TAFF), bentonitic clay, was purchased from Tonsil Mexicana S.A. de C.V., Km 7 High Road, Puebla-Tlaxcala, Puebla, Mexico.

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were performed using a Varian Mercury-300 spectrometer at 300 MHz and 75 MHz for hydrogen and carbon, respectively, employing CDCl<sub>3</sub> as a solvent and TMS as an internal reference. The multiplicities are reported as singlet (s), broad singlet (bs), doublet (d), triplet (t), and multiplet (m). The EIMS and HRMS data were determined using JEOL JMS-700 MStation mass spectrometer. The elemental composition was calculated within a mass range of ±10 ppm from the accurate measured mass. The melting points were determined in a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. The microwave-assisted production of the target compounds was performed using CEM Focused Microwave™ Synthesis System. The near-infrared irradiation was generated using a commercial device “Flavor-Wave®” (1300 W/110 V/120 V-60 Hz|220 V/240 V-60 Hz) [45]. The high speed ball milling was generated using Ball Mill PM 100 Retch, with 6 carbon steel balls (weight: 23.85 g, 0.39" diameter). The temperature was determined, for NIR, employing infrared thermometer (Infrared + Type K Thermometer, Extech Instruments, Sigma-Aldrich 2509388-1 EA); herein, the laser pointer was directed to the reaction center.

The human MDA-MB-231 breast cancer and dermal fibroblast normal cells lines were obtained from ATTC; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> for phosphate buffer solution (PBS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma-Aldrich without further purification. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin G, and 100 µg/L streptomycin in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The culture medium was replaced every two days and the cells were used at passages between two and five. Statistical analysis of IC<sub>50</sub> was executed by PRISMA statistical program.

The theoretical calculations were performed employing GAUSSIAN09 program [46].

*2.1. Typical Experiments Using Thermal Conditions.* A mixture of perezone 1 (120 mg, 0.4839 mmol), isoperezone 2 (120 mg, 0.4839 mmol), menadione 3 (90 mg, 0.5233 mmol) or plumbagin 4 (140 mg, 0.5000 mmol), indole 5 (60 mg, 0.5128 mmol), and 50 mg of TAFF as catalyst was placed in a micro scale glass vessel. The mixtures were treated using

mantle heating during a period of 60 min at 95°C. The reactions were monitored by TLC using silica gel/*n*-hexane/ethyl acetate (80:20). The corresponding pure molecules were obtained by column chromatography using the same mobile phase as TLC.

**2.2. Typical Experiments Using Nonconventional Activating Sources.** A mixture of perezone **1** (120 mg, 0.4839 mmol), isoperezone **2** (120 mg, 0.4839 mmol), menadione **3** (90 mg, 0.5233 mmol) or plumbagin **4** (140 mg, 0.5000 mmol), indole **5** (60 mg, 0.5128 mmol), and 50 mg of TAFF as catalyst was placed in a micro scale glass vessel. The mixtures were treated using and comparing different activation modes: near-infrared irradiation during a period of 10 min at 121°C; microwave irradiation during a period of 10 min at 100°C and 250 W power, and high speed ball milling during a period of 60 min with 500 rpm and 27% power; all reactions were carried out in open vessel. The reactions were monitored by TLC using silica gel/*n*-hexane/ethyl acetate (80:20). The corresponding products were purified by column chromatography using the same mobile phase as TLC.

**2-Hydroxy-5-(1*H*-indol-3-yl)-6-methyl-3-(6-methylhept-5-en-2-yl)cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (6).** Purple solid; mp 65–67°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 8.905 (bs, 1H, NH), 8.250 (s, 1H, OH), 7.430 (d, 1H, H-7'), 7.297 (d, 1H, H-4'), 7.225–7.162 (m, 2H, H-5',6'), 7.162 (s, 1H, H-2'), 5.104 (bs, 1H, H-12), 3.100–3.220 (m, 1H, H-8), 2.181 (s, 3H, H-7), 1.853–1.770 (m, 4H, H-10,11), 1.645 (s, 3H, H-14), 1.548 (s, 3H, H-15), 1.263 (d, 3H, H-9). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 187.00 (C-1), 184.70 (C-4), 151.10 (C-3), 140.30 (C-5), 135.90 (C-6), 135.2 (C-9'), 131.60 (C-8'), 128.20 (C-2'), 126.70 (C-13), 124.90 (C-12), 124.20 (C-2), 122.70 (C-6'), 120.90 (C-5'), 120.80 (C-4'), 111.90 (C-7'), 108.90 (C-3'), 34.50 (C-10), 30.10 (C-8), 27.00 (C-11), 25.90 (C-14), 18.70 (C-9), 17.90 (C-15), 14.60 (C-7). EIMS (70 eV) *m/z* (%): 363 (69) M<sup>+</sup>, 348 (6) [M-15]<sup>+</sup>, 334 (7) [M-29]<sup>+</sup>, 281 (100) [M-82]<sup>+</sup>, 246 (6) [M-112]<sup>+</sup>. HRMS-EI *m/z* 363 M<sup>+</sup>, calculated for C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>: 363.1834 Da; found for C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub> 363.1816 Da (–5 ppm error).

**2-Hydroxy-5-(1*H*-indol-3-yl)-3-methyl-6-(6-methylhept-5-en-2-yl)cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (7).** Purple solid; mp 62–65°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 8.476 (bs, 1H, NH), 8.100 (s, 1H, OH), 7.424 (d, 1H, H-7'), 7.350 (d, 1H, H-4'), 7.26–7.128 (m, 2H, H-5',6'), 6.797 (s, 1H, H-2'), 4.830 (bs, 1H, H-12), 2.810–2.920 (m, 1H, H-8), 1.988 (s, 3H, H-7), 1.742–1.627 (m, 4H, H-10,11), 1.497 (s, 3H, H-14), 1.430 (s, 3H, H-15), 1.260 (d, 3H, H-9). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 188.00 (C-1), 183.70 (C-4), 151.40 (C-6), 149.60 (C-2), 135.70 (C-9'), 132.30 (C-13), 130.90 (C-8'), 128.20 (C-3), 123.80 (C-12), 122.80 (C-2'), 122.60 (C-6'), 120.90 (C-5'), 120.40 (C-4'), 116.50 (C-5), 114.10 (C-7'), 108.60 (C-3'), 38.70 (C-10), 30.36 (C-8), 29.00 (C-11), 23.98 (C-14), 23.01 (C-9), 14.09 (C-15), 11.12 (C-7). EIMS (70 eV) *m/z* (%): 363 (25) M<sup>+</sup>, 348 (2) [M-15]<sup>+</sup>, 279 (28) [M-84]<sup>+</sup>, 261 (100) [M-102]<sup>+</sup>, 149 (90) [M-214]<sup>+</sup>, 167 (60) [M-196]<sup>+</sup>. HRMS-IE: *m/z*

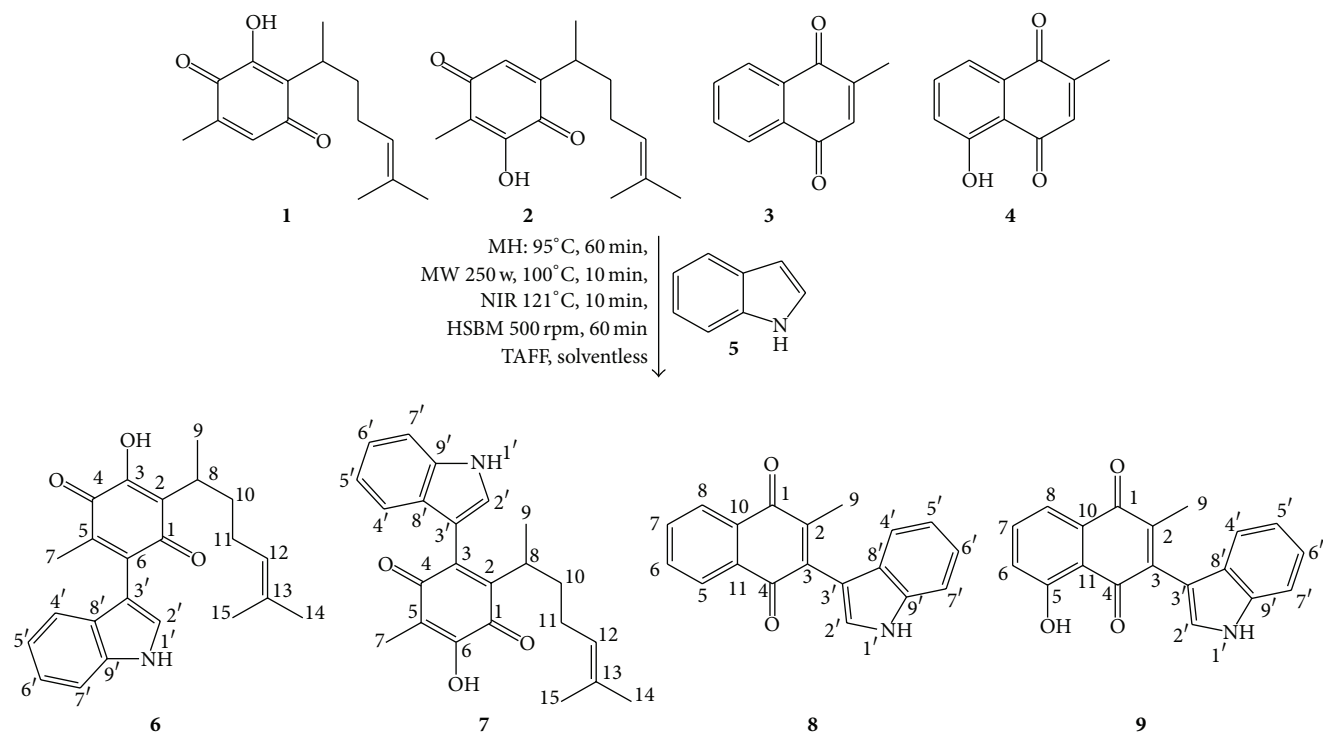
363 M<sup>+</sup>, calculated for C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>: 363.1834 Da; found for C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>: 363.1829 Da (–1.5 ppm error).

**2-(1*H*-Indol-3-yl)-3-methylnaphthalene-1,4-dione (8).** Red dark solid, mp 123°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 8.800 (bs, 1H, NH), 8.220–8.120 (m, 2H, H-5,8), 7.800–7.740 (m, 2H, H-6,7), 7.456 (d, 1H, H-7'), 7.430 (s, 1H, H-2'), 7.319 (d, 1H, H-4'), 7.220–7.104 (m, 2H, H-5', 6'), 2.213 (s, 3H, H-9). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 186.00 (C-1), 184.80 (C-4), 143.30 (C-2), 140.40 (C-3), 135.80 (C-9'), 133.50 (C-7), 133.40 (C-6), 132.52 (C-10), 132.48 (C-11), 127.20 (C-8'), 126.70 (C-5), 126.20 (C-8), 122.30 (C-2'), 120.40 (C-6'), 120.30 (C-5'), 111.70 (C-4'), 111.60 (C-7'), 108.30 (C-3'), 15.80 (C-9). EIMS (70 eV) *m/z* (%): 287 (30) M<sup>+</sup>, 270 (100) [M-17]<sup>+</sup>, 269 (12) [M-18]<sup>+</sup>, 258 (8) [M-29]<sup>+</sup>, 246 (40) [M-41]<sup>+</sup>. HRMS-EI: *m/z* 287 M<sup>+</sup>, calculated for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: 287.0946 Da; found for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: 287.0974 Da (+9.8 ppm error).

**5-Hydroxy-3-(1*H*-indol-3-yl)-2-methylnaphthalene-1,4-dione (9).** Dark solid, mp 134–137°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 12.250 (s, 1H, OH), 8.600 (bs, 1H, NH), 7.709 (d, 1H, H-8), 7.600–7.520 (m, 1H, H-7), 7.450 (d, 1H, H-7'), 7.414 (s, 1H, H-2'), 7.300 (d, 1H, H-4'), 7.260–7.190 (m, 2H, H-5',6'), 7.200 (d, 1H, H-6), 2.196 (s, 3H, H-9). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS) (δ/ppm): 189.87 (C-4), 185.00 (C-1), 161.50 (C-5), 145.05 (C-2), 140.10 (C-3), 136.10 (C-9'), 135.70 (C-7), 132.50 (C-10), 126.90 (C-2'), 126.50 (C-8'), 123.90 (C-6), 122.70 (C-6'), 120.70 (C-5'), 120.30 (C-4'), 118.90 (C-8), 115.20 (C-11), 111.70 (C-7'), 107.90 (C-3'), 15.90 (C-9). EIMS (70 eV) *m/z* (%): 303 (100) M<sup>+</sup>, 286 (44) [M-17]<sup>+</sup>, 274 (20) [M-29]<sup>+</sup>, 186 (8) [M-117]<sup>+</sup>. HRMS-EI: *m/z* 303 M<sup>+</sup>, calculated for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: 303.0895 Da; found for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: 303.0873 Da (–7.4 ppm error).

**2.3. The 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide Assay (MTT Assay).** This test was performed with MDA-MB231 breast cancer cell line according to Mosmann [47]. Cells were incubated at different indolylquinone concentrations. To derive viability curves of **6–9** treated cells, the cells were seeded onto 96-well culture plate at density of 5000 cells/well and grown in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells viability was measured using MTT reagent dissolved in PBS (0.5 mg/mL). On the day of measurement, the medium was carefully replaced by fresh DMEM + 10% FBS with diluted MTT (1:10, 10% MTT) and incubated for 1 h at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator to allow the transformation of MTT dye to formazan salt. After removing incubation medium, formazan crystals were dissolved in 100 μL solution of DMSO. It is also important to highlight the notion that MTT reduction was quantified by measuring the light absorbance at 570 nm using the Benchmark Plus absorbance microplate reader (Bio-Rad). MTT test was repeated nine times. Percentage of proliferation (% viability) was calculated according to

$$\% \text{ viability} = \frac{B}{A} \times 100, \quad (1)$$



SCHEME 1: Synthesis of indole-quinone derivatives.

where  $A$  is the absorbance value of the control group and  $B$  is the absorbance value of the cells treated with indolylderivatives.

**2.4.  $IC_{50}$  Determination.**  $IC_{50}$  was extrapolated from the dose-response graph (Figure 1). The drug concentration that reduced the viability of cells by 50% ( $IC_{50}$ ) was determined by plotting triplicate data points over a concentration range and calculating values using regression analysis.

**2.5. Computational Calculations.** The reported calculations were carried out using Density Functional Theory (DFT) [48], employing Becke's three-parameter exchange and Lee-Yang-Parr correlation hybrid functional (B3LYP) [49, 50] with the 6-311++G(d,p) basis set including the split-valance and diffuse functions [51–53]. The corresponding quantum-mechanical calculations to determine the  $^1H$  and  $^{13}C$  chemical shifts were performed by Gauge-Invariant-Atomic Orbital method (GIAO method) [54].

### 3. Results and Discussion

**3.1. Synthesis.** The reactions of **1–4** with indole (**5**), under solventless conditions and with TAFF as a catalyst, were performed using the following three nonconventional modes of activation: microwave and near-infrared irradiation and high speed ball milling, affording the respective indole derivatives **6–9** (Scheme 1); in addition, the target molecules were comparatively obtained using mantle heating conditions; the corresponding results are summarized in Table 1.

TABLE 1: Production of indolyquinones derivatives, using different activating modes.

Product	Yields %			
	MH	MW	NIR	HSBM
<b>6</b>	24	79	62	24
<b>7</b>	12	35	31	18
<b>8</b>	46	42	51	30
<b>9</b>	25	41	64	35

Best reaction conditions: MH, 95°C and 60 min; MW, 250 W, 100°C, and 10 min; NIR, 121°C and 10 min; HSBM, 500 rpm and 60 min.

In general, the pathway must occur by classical Michael addition by the indole to the corresponding quinonic substrates, assisted by an interaction of the oxygen of a carbonyl group with the Lewis acidic sites of TAFF, followed by in situ oxidation, producing **6–9** in moderated yields at low times. It is appropriate to note that **6**, **7**, and **9** are novel molecules, and according to our knowledge **8** has been previously produced by MH and US in the presence of solvent with the employment of a noninnocuous catalyst [28, 55, 56]. Moreover, literature research shows that this seems to be the first report for the green production of indolyquinones using MW, NIR, and HSBM as the activating modes without a solvent and in the presence of a natural ecofriendly catalyst.

A complementary and interesting result was the transformation of perezone into isoperezone, using for the first time HSBM (Scheme 2), in comparative yields and reaction times, with values previously reported [9, 12].

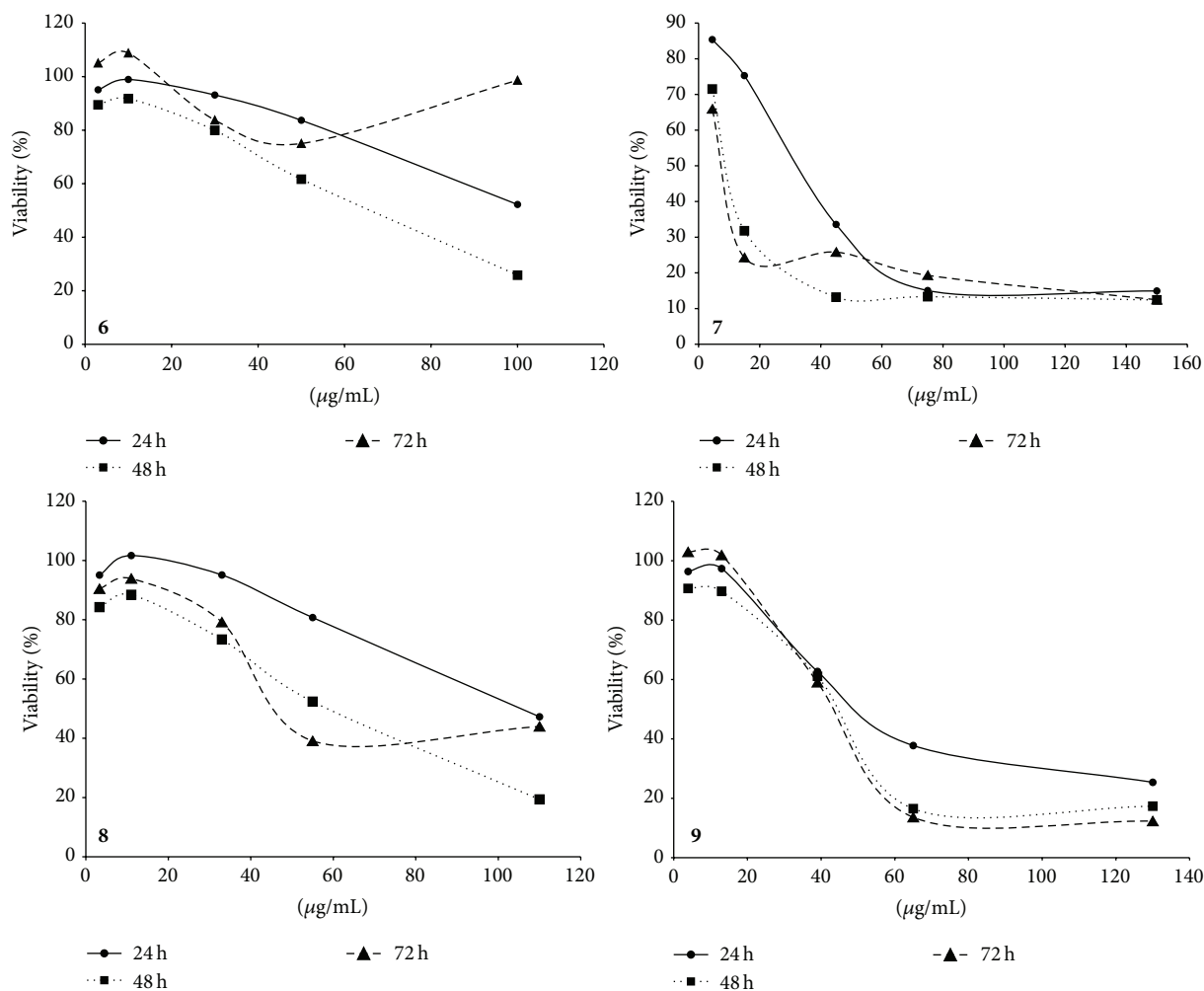
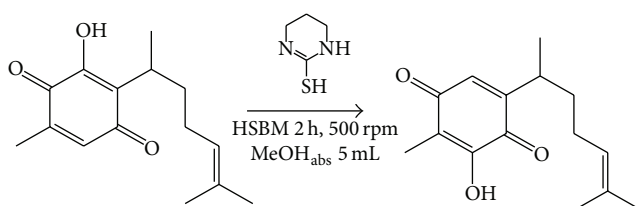


FIGURE 1: Dose-response graphs at 24, 48, and 72 h of 6, 7, 8, and 9.



SCHEME 2: Transformation of perezone into isoperezone.

For the structural attribution of 2 and 6–9, in a first instance, isoperezone was spectroscopically correlated with literature data [9] as well as its melting point (108–109°C). Considering the notion that 6, 7, and 9 are novel products and that they are structurally related to 8, appropriate spectroscopic characterizations of the target molecules were performed. Thus, in a first place, the corresponding accurate molecular ions were acquired by HRMS-EI to achieve the elemental compositions; this was obtained in agreement with the expected products.

In regard to the  $^1\text{H}$  NMR, it is worth noting the disappearance of the corresponding signals assigned to H-3 of

indole and reagents 2–4, in addition to the signal assigned to H-6 of perezone; moreover, the signal due to the proton linked to the nitrogen of the indole,  $\delta$  7.81 ppm, was displaced, for 6–9 to lower fields 8.4–8.9 ppm, unequivocally due to deprotection generated by the high degree of conjugation between the indolic-quinonic moieties of the products. In this sense, the obtained  $^{13}\text{C}$  NMR data complemented the structural characterization of molecules 6–9, and the signals of C-3 and C-2 of indole at 102.22 ppm and 111.10 ppm were, respectively, displaced to lower fields, 107.9–108.9 and 122.3–128.2 ppm, respectively. This change in the chemical shift was also attributed to deprotection by the quinonic system. In general, the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR experimental data correlated appropriately with those values predicted by computational models.

**3.2. Cytotoxic Activity.** Indolylquinones cytotoxicities were evaluated in human MDA-MB-231 breast cancer cells using the MTT assay, employing as control normal fibroblast cells. The studied compounds were assayed in concentrations of 0 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 6, 0 to 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 7, 0 to 110 for 8, and finally 0 to 130  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 9. According to Figure 1,



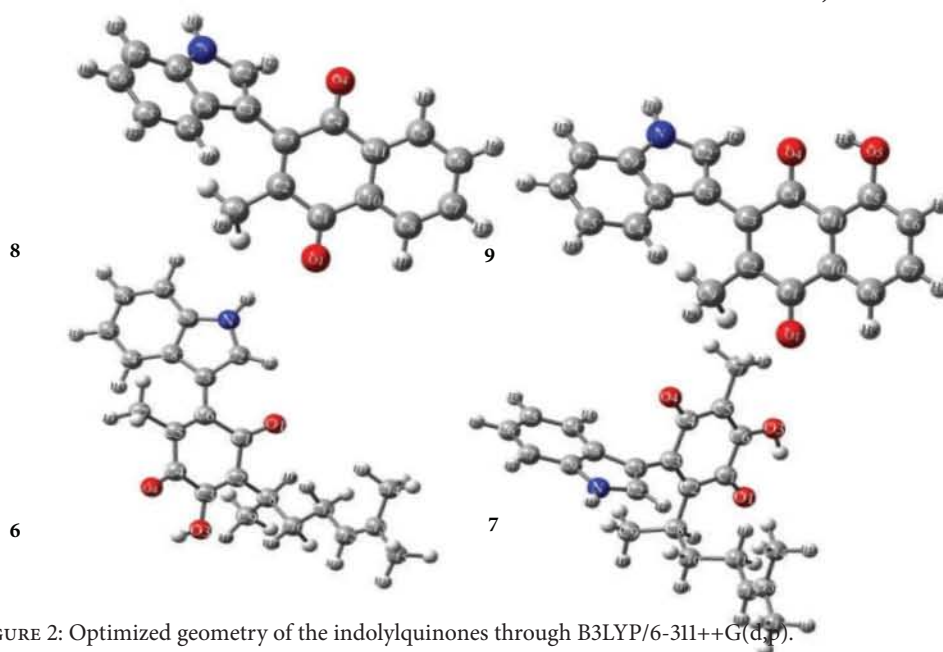


FIGURE 2: Optimized geometry of the indolyquinones through B3LYP/6-311++G(d,p).

the decrease of viable cells starts at 24 hours of incubation of the studied compounds; moreover molecule 7 began to decrease at a lower concentration (15 mg/mL); on the other hand, for the rest of the molecules, the decrease of the viability began at concentrations higher than 20  $\mu\text{g/mL}$ . The same behavior was exhibited at 48 h with cancer cell viability in the range from 10 to 20% when the highest concentrations of 100, 150, 110, and 130  $\mu\text{g/mL}$  to 6, 7, 8, and 9, respectively, were used. The results after 72 h showed in 7 and 9 similar trends to those at 48 h; however, 6 and 8 increased the cellular viability in the highest concentrations.

The  $\text{IC}_{50}$  values were obtained through extrapolation from the dose-response graphs (Figure 1). The results of the viability in human breast cancer cells against the four molecules tested recognize 7 as the most active molecule with  $\text{IC}_{50}$  of 25  $\mu\text{g/mL}$ . In addition, for 6, 8, and 9, the values of  $\text{IC}_{50}$  were 40.6, 41.6, and 32.3  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. These concentrations were tested against healthy dermal fibroblast. With this result, it is important to point out that only 9 developed a cytotoxic effect with 15% mortality; on the other hand, 6–8, instead of promoting cells death, caused fibroblast proliferation. The effect in healthy cells is very interesting and is currently under study by our research group, as the cytotoxic pathway presented for these compounds.

**3.3. Computational Study.** The molecules obtained were also studied through computational chemistry methods. In the optimization of the target molecules, a conformer distribution and the selection of the most stable conformer were achieved. Additionally, the selected geometries were appropriately optimized by DFT employing B3LYP functional and the 6-311++G(d,p) basis set. The structures obtained in phase gas are depicted in Figure 2.

**Molecular Geometries.** The calculated geometrical parameters of 6–9 are displayed in Tables 2 and 3. Since the target

molecules have no experimental X-rays partners and considering the important motif in the biological activities, the experimental data of the starter substrates and similar indol derivative present in the literature [40–42] was compared with the predicted value for the target molecules.

Table 2 shows the bond length of 6 and 7 by similar structure in both molecules. In the case of 6 compared with perezone quinonic ring, the predicted values are very similar to 1. However, the C1–C6 bond in 6 is longer in comparison with the perezone. Additionally, the hydrogen bond present between the  $\text{O3} \cdots \text{H}$  hydroxyl group and the O4 carbonyl group decreases the distance, signaling a more stronger bond (intramolecular hydrogen bond); the  $\text{O3} \cdots \text{O4}$  and  $\text{H3} \cdots \text{O4}$  distances are 2.583 and 1.965 Å beside  $\text{O3-H3} \cdots \text{O4}$  angle of 118.839°; these data agree with those of Soriano-García et al. [40]. Considering the indolyl moiety, the values were compared with the experimental values obtained for the X-ray diffraction of 2-ethyl-5-(3-indolyl)oxazole [41].

The contrast of the indolyl fragment of 6 with the reference shows very similar values in both molecules; however, the predicted bonds are longer in 6.

The predicted values of 7 compared with the isoperezone show a similar trend in the quinonic ring; however, the bonds C3–C4 and C1–C6 are longer than in the experimental case. In the same sense, the intramolecular hydrogen bond is shorter, indicating the increase of the strength in this bond.

Regarding the indolyl moiety in 7, the estimated values are in good agreement with the experimental values considering the structural difference between 7 and the 2-ethyl-5-(3-indolyl)oxazole.

Table 3 summarizes some theoretical values of bond length for 8 and 9 contrasted with the X-rays values of 3 and 4 [43, 44] and the indolyl structure with 5-(3-indolyl)oxazole [41]. The calculated values for the bond C3–C4 of 8 and 9 are larger and the hydrogen bond of 9 is shorter following the same trends as the previous compounds (3 and 4). The rest of

TABLE 2: Theoretical and experimental selected bond length (in angstrom) of **6** and **7**.

Bond	<b>6</b>		<b>7</b>	
	Theoretical length	Experimental length	Theoretical length	Experimental length
C1-O1	1.223	1.226 <sup>a</sup>	1.228	1.240 <sup>c</sup>
C1-C2	1.480	1.469 <sup>a</sup>	1.489	1.450 <sup>c</sup>
C2-C3	1.351	1.334 <sup>a</sup>	1.359	1.350 <sup>c</sup>
C3-C4	1.494	1.498 <sup>a</sup>	1.523	1.490 <sup>c</sup>
C1-C6	1.527	1.469 <sup>a</sup>	1.491	1.430 <sup>c</sup>
C3/C6-O	1.343	1.347 <sup>a</sup>	1.340	1.250 <sup>c</sup>
C4-O4	1.231	1.220 <sup>a</sup>	1.221	1.180 <sup>c</sup>
C2-C8	1.518	1.499 <sup>a</sup>	1.527	1.500 <sup>c</sup>
C4-C5	1.467	1.472 <sup>a</sup>	1.474	1.430 <sup>c</sup>
C5-C7	1.503	1.507 <sup>a</sup>	1.499	1.580 <sup>c</sup>
C=O...H	1.965	2.340 <sup>a</sup>	1.985	2.650 <sup>c</sup>
C5-C6	1.362	1.332 <sup>a</sup>	1.348	1.390 <sup>c</sup>
C6/C3-C3'	1.461	1.448 <sup>b</sup>	1.475	1.448 <sup>b</sup>
C2'-C3'	1.382	1.375 <sup>b</sup>	1.373	1.375 <sup>b</sup>
C2'-N	1.368	1.363 <sup>b</sup>	1.377	1.363 <sup>b</sup>
C8'-N	1.389	1.370 <sup>b</sup>	1.382	1.370 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Obtained from Soriano-García et al., 1986 [40]; <sup>b</sup>obtained from Noltemeyer et al., 1982 [41]; <sup>c</sup>obtained from Enríquez et al., 1998 [42].

TABLE 3: Theoretical and experimental selected bond length (in Å) of **8** and **9**.

Bond	<b>8</b>		<b>9</b>	
	Theoretical length	Experimental length	Theoretical length	Experimental length
C1=O1	1.223	1.229 <sup>a</sup>	1.223	1.228 <sup>c</sup>
C1-C2	1.494	1.453 <sup>a</sup>	1.491	1.451 <sup>c</sup>
C2-C3	1.363	1.366 <sup>a</sup>	1.365	1.306 <sup>c</sup>
C3-C4	1.503	1.484 <sup>a</sup>	1.498	1.470 <sup>c</sup>
C3-C3'	1.471	1.448 <sup>a</sup>	1.467	1.448 <sup>c</sup>
C4=O4	1.219	1.231 <sup>a</sup>	1.240	1.229 <sup>c</sup>
C2-C11	1.503	1.491 <sup>a</sup>	1.501	1.525 <sup>c</sup>
C4-C10	1.492	1.467 <sup>a</sup>	1.465	1.460 <sup>c</sup>
C10-C5	1.397	1.392 <sup>a</sup>	1.415	1.460 <sup>c</sup>
C10-C9	1.400	1.401 <sup>a</sup>	1.405	1.386 <sup>c</sup>
C5-C6	1.391	1.398 <sup>a</sup>	1.384	1.318 <sup>c</sup>
C6-C7	1.398	1.387 <sup>a</sup>	1.400	1.405 <sup>c</sup>
C7-C8	1.391	1.389 <sup>a</sup>	1.387	1.400 <sup>c</sup>
C8-C9	1.397	1.398 <sup>a</sup>	1.410	1.364 <sup>c</sup>
C9-C1	1.488	1.479 <sup>a</sup>	1.49	1.492 <sup>c</sup>
C5-HO5	—	—	1.339	1.320 <sup>c</sup>
C=O...H	—	—	1.696	1.870 <sup>c</sup>
C2'-C3'	1.376	1.375 <sup>b</sup>	1.379	1.375 <sup>b</sup>
C2'-N	1.374	1.363 <sup>b</sup>	1.370	1.363 <sup>b</sup>
C8'-N	1.383	1.370 <sup>b</sup>	1.383	1.370 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Obtained from Nowell and Attfield, 2004 [43]; <sup>b</sup>obtained from Noltemeyer et al., 1982 [41]; <sup>c</sup>obtained from Vijayalakshmi et al., 1987 [44].

the theoretical values are coherent and near the experimental values, appropriate with the theory level used.

The enlargement of the bonds C1-C6 (for **6** and **7**) and C3-C4 (for **7**, **8**, and **9**) in the quinonic rings and shortening in the intramolecular hydrogen bond (**6**, **7**, and **9**) can be explained by the resonance effect promoted by the addition

of the indolic structure. The electrons of indole moiety can produce greater localization of electrons in the carbonyl group oxygen (C4=O4 in **6** and C1=O1 in **7**, **8**, and **9**) in contrast to **1-4** in which the double bonds of the quinone ring can be delocalized to both carbonyl groups. The consequence of this effect in **6-9** is the major negative charge in the oxygen

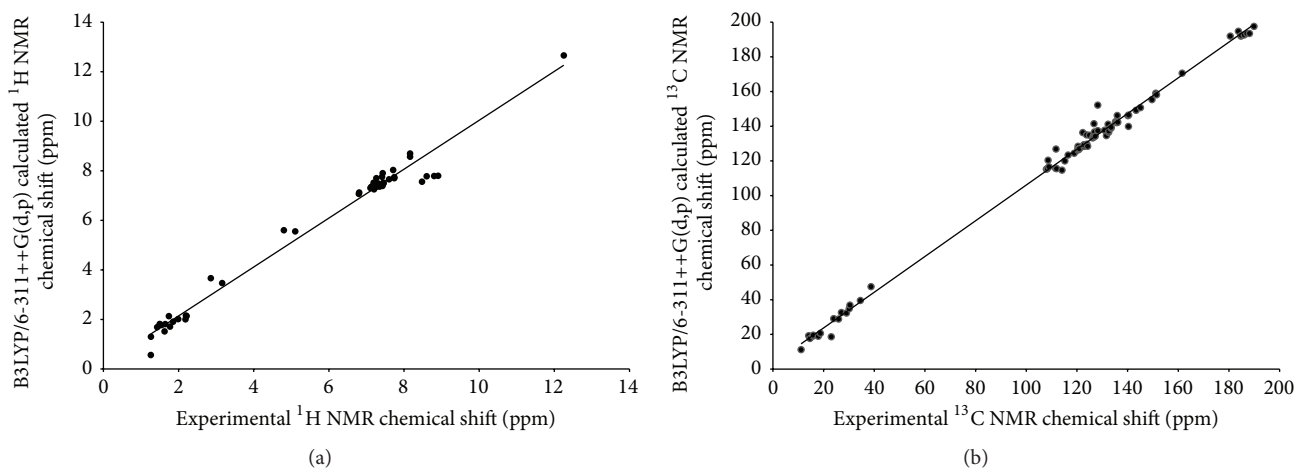


FIGURE 3: Linear regression between experimental and calculated B3LYP/6-311++G(d,p): (a)  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts and (b)  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts for the indolyquinones obtained in this work.

atom in the previous carbonyl group signaled and therefore greater attractive force to hydrogen and minor electronic delocalization to the bonds C1-C6 and C3-C4, provoking enlargement of these bonds.

**NMR Parameters.** The experimental values corresponding to the chemical shifts of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  were correlated with the calculated values by DFT at the B3LYP and using the 6-311++G(d,p) basis set and the GIAO method.

The calculated GIAO  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts were plotted versus the experimental data obtained for the indolyquinones (Figure 3(a)).

Linear regression analysis of the data set of  $^1\text{H}$  NMR shifts provided the following results and presented a regression coefficient of 0.9806 and standard deviation of 0.3930 ppm; the equation to describe the fit is  $\delta_T = 0.9875\delta_{ex} + 0.1661$  ppm, where  $\delta_T$  is a chemical shift predicted in the base of the experimental values  $\delta_{ex}$ , with the slope and intercept having a standard deviation of 0.0196 and 0.1261, respectively.

The same analysis was made for the theoretical and experimental chemical shifts values obtained for  $^{13}\text{C}$  NMR; the corresponding plot is shown in Figure 3(b); in this regard, the linear regression analysis for  $^{13}\text{C}$  chemical shifts yielded a regression coefficient of 0.9955 and standard deviation of 3.35 ppm; the equation to describe the fit is  $\delta_T = 1.0297\delta_{ex} + 3.138$  ppm, where the slope and intercept showed a standard deviation of 0.0076 and 0.937, respectively.

In other words, the values of the regression coefficients in both analyses reflected a good description of the experimental chemical shifts of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR by the selected method, theory level, and basis set.

## 4. Conclusions

The methodology employed proceeded with a good green approach [57]; it is in agreement with the following *Green Chemistry Principles: prevention (principle 1), atom economy (principle 2), less hazardous chemical synthesis (principle 3),*

*safer solvents and auxiliaries (principle 5), design for energy efficiency (principle 6), catalysis (principle 9), and inherently safer chemistry for accident prevention (principle 12).* In addition, it is convenient to note that the obtained molecules have a cytotoxic effect in breast cancer cells without apparently toxic effect in healthy cells, and the most cytotoxic molecule (7) corresponds to the minor gap energy (theoretical calculations); and it is also important to mention that the experimental activity will be explained on the base of theoretical studies under the course by our research group.

Finally, taking into account the fact that three of the molecules are new, appropriate spectroscopic characterizations were performed by means of  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, EIMS, and HRMS, and it is important to highlight that the experimental NMR spectroscopic data of the target compounds showed good agreement with theoretical characterization.

## Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

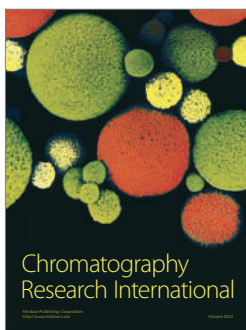
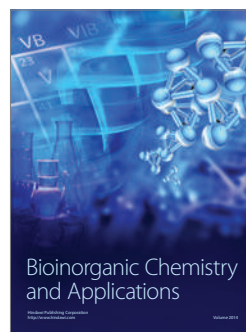
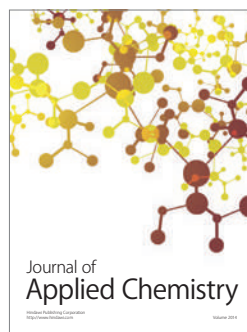
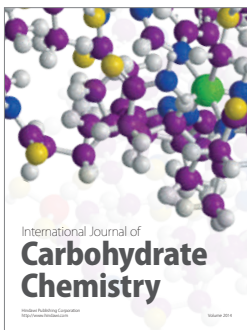
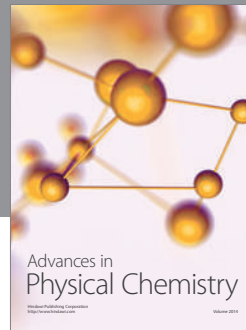
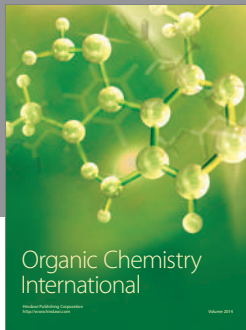
The authors are mainly thankful to Grant PAPIIT UNAM IN221514-3, in addition to DGTIC-UNAM SC16-1-IR-27, and also René Escobedo and Joel Martínez acknowledge CONACyT-México 24992 for the Ph.D. scholarship and 205289 for the postdoctoral scholarship, respectively.

## References

- [1] P. T. Anastas and J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 1998.
- [2] P. T. Anastas and T. C. Williamson, *Green Chemistry, Frontiers in Bening Chemical Synthesis and Processes*, vol. 2, Oxford University Press, Oxford, UK, 1998.



- [3] J. Clark and D. Macquarrie, *Handbook of Green Chemistry and Technology*, Blackwell Science, Oxford, UK, 2002.
- [4] G. P. Moss, *Nomenclature of Quinones with Isoprenoid Side-Chains*, Department of Chemistry, Queen Mary University of London, London, UK, 1973, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/quinone.html>.
- [5] L. Río de la Loza, "Discurso pronunciado por el catedrático de química médica de la Escuela de Medicina (Noviembre 23, 1852)," in *Escritos de Leopoldo Río de la Loza*, J. M. Noriega, Ed., pp. 94–100, Imprenta de Ignacio Escalante, México City, Mexico, 1911.
- [6] P. Joseph-Nathan, V. Mendoza, and E. García, "The chemistry of perezone and its consequences," in *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, Ed., vol. 5 of *Structural Elucidation (Part B)*, pp. 763–813, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, 1989.
- [7] I. H. Sánchez, R. Yáñez, R. Enriquez, and P. Joseph-Nathan, "A reaction mechanism change in the Lewis acid catalyzed perezone-pipitzol transformation," *Journal of Organic Chemistry*, vol. 46, no. 13, pp. 2818–2819, 1981.
- [8] I. H. Sánchez, F. Basurto, and P. Joseph-Nathan, "The stereo-control of the perezone to pipitzol transformation," *Journal of Natural Products*, vol. 47, no. 2, pp. 382–383, 1984.
- [9] A. Rodríguez-Hernández, H. Barrios, O. Collera et al., "Isomerization of perezone into isoperezone and preparation of dihydroisoperezinone," *Natural Product Letters*, vol. 4, no. 2, pp. 133–139, 1994.
- [10] E. Burgueño-Tapia and P. Joseph-Nathan, "<sup>13</sup>C NMR substituent chemical shifts in hydroxy-*p*-benzoquinones," *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 38, no. 5, pp. 390–393, 2000.
- [11] E. Burgueño-Tapia and P. Joseph-Nathan, "Detailed studies of perezone rearrangements," *Monatshefte für Chemie*, vol. 128, no. 6–7, pp. 651–658, 1997.
- [12] J. Martínez, B. Velasco-Bejarano, F. Delgado et al., "Eco-contribution to the chemistry of perezone, a comparative study, using different modes of activation and solventless conditions," *Natural Product Communications*, vol. 3, no. 9, pp. 1465–1468, 2008.
- [13] J. Arellano, F. Vázquez, T. Villegas, and G. Hernández, "Establishment of transformed root cultures of *Perezia cuernavacana* producing the sesquiterpene quinone perezone," *Plant Cell Reports*, vol. 15, no. 7, pp. 455–458, 1996.
- [14] R. Enriquez, J. Ortega, and X. Lozoya, "Active components in *Perezia* roots," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 2, no. 4, pp. 389–393, 1980.
- [15] F. J. Alarcon-Aguilar, R. Roman-Ramos, M. Jimenez-Estrada, R. Reyes-Chilpa, B. Gonzalez-Paredes, and J. L. Flores-Saenz, "Effects of three Mexican medicinal plants (*Asteraceae*) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 55, no. 3, pp. 171–177, 1997.
- [16] A. L. De Peña, R. Izaguirre, G. Baños, M. Viveros, R. G. Enriquez, and J. M. Fernández-G, "Effect of perezone, aminoperezone and their corresponding isomers isoperezone and isoaminoperezone upon in vitro platelet aggregation," *Phytomedicine*, vol. 8, no. 6, pp. 465–468, 2001.
- [17] E. Burgueño-Tapia, L. Castillo, A. González-Coloma, and P. Joseph-Nathan, "Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene *p*-benzoquinone perezone and some of its derivatives," *Journal of Chemical Ecology*, vol. 34, no. 6, pp. 766–771, 2008.
- [18] J. F. Téllez, K. Carvajal, D. Cruz, A. Cárabez, and E. Chávez, "Effect of perezone on arrhythmias and markers of cell injury during reperfusion in the anesthetized rat," *Life Sciences*, vol. 65, no. 16, pp. 1615–1623, 1999.
- [19] L. E. Sánchez-Torres, J. A. Torres-Martínez, M. Godínez-Victoria, J.-M. Omar, and B. Velasco-Bejarano, "Perezone and its isomer isoperezone induce caspase-dependent and caspase-independent cell death," *Phytomedicine*, vol. 17, no. 8–9, pp. 614–620, 2010.
- [20] M. Concepción Lozada, O. Soria-Arteche, M. Teresa Ramírez Apan et al., "Synthesis, cytotoxic and antioxidant evaluations of amino derivatives from perezone," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 20, no. 17, pp. 5077–5084, 2012.
- [21] R. G. Escobedo-González, L. Bahena, J. L. Arias Tellez, J. Hinojosa Torrres, R. M. Ruvalcaba, and J. M. Aceves-Hernández, "Characterization and comparison of perezone with some analogues. Experimental and theoretical study," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1097, pp. 98–105, 2015.
- [22] Y. Gou, Y. Zhang, J. Qi et al., "Binding and anticancer properties of plumbagin with human serum albumin," *Chemical Biology and Drug Design*, vol. 86, no. 3, pp. 362–369, 2015.
- [23] W. Yan, B. Tu, Y. Liu et al., "Suppressive effects of plumbagin on invasion and migration of breast cancer cells via the inhibition of STAT3 signaling and down-regulation of inflammatory cytokine expressions," *Bone Research*, vol. 1, no. 4, pp. 362–370, 2013.
- [24] D. Sajan, K. P. Laladhas, I. Hubert Joe, and V. S. Jayakumar, "Vibrational spectra and density functional theoretical calculations on the antitumor drug, plumbagin," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 36, no. 10, pp. 1001–1011, 2005.
- [25] P. Tundo, P. Anastas, D. S. C. Black et al., "Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 72, no. 7, pp. 1207–1228, 2000.
- [26] S. Koulouri, E. Malamidou-Xenikaki, and S. Spyroudis, "Acid-catalyzed addition of indoles to hydroxyquinones," *Tetrahedron*, vol. 61, no. 46, pp. 10894–10902, 2005.
- [27] H.-B. Zhang, L. Liu, Y.-J. Chen, D. Wang, and C.-J. Li, "On water'-promoted direct coupling of indoles with 1,4-benzoquinones without catalyst," *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2006, no. 4, pp. 869–873, 2006.
- [28] J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, and T. Swamy, "Bi(OTf)<sub>3</sub>-catalyzed conjugate addition of indoles to *p*-quinones: a facile synthesis of 3-indolyl quinones," *Tetrahedron Letters*, vol. 44, no. 51, pp. 9121–9124, 2003.
- [29] R. Gómez, E. Ramírez-San Juan, R. Miranda et al., "Vasodilator effects of *bis*-dihydropyridines structurally related to nifedipine," *Medicinal Chemistry*, vol. 2, no. 5, pp. 527–534, 2006.
- [30] B. Velasco-Bejarano, J. G. Trujillo-Ferrara, L. H. F. Castillo, R. Miranda, and L. E. Sánchez-Torres, "In vitro apoptotic activity of 2,2-diphenyl-1,3,2-oxazaborolidin-5-ones in L5178Y cells," *Life Sciences*, vol. 80, no. 11, pp. 1007–1013, 2007.
- [31] M. O. Noguez, A. Garc, C. Ibarra, A. Cabrera, J. M. Aceves, and R. Miranda, "Green synthesis of *bis*-Biginelli esters, with vasodilatory effects, their mass spectrometric and physical studies," *Trends in Organic Chemistry*, vol. 13, pp. 75–82, 2009.
- [32] L. Reyes, S. Corona, G. Arroyo, F. Delgado, and R. Miranda, "Eco-contribution for the production of *N*-arylnitrones: solvent-free and assisted by microwaves," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 11, no. 6, pp. 2576–2583, 2010.
- [33] J. Martínez, S. Romero-Vega, R. Abeja-Cruz, C. Álvarez-Toledano, and R. Miranda, "Green approach-multicomponent production of boron-containing Hantzsch and Biginelli esters," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 2, pp. 2903–2915, 2013.

- [34] M. Zarco Juarez, J. O. Martínez, O. Noguez Cordova et al., "A green approach to the production of hybrid diindolylmethane-phenylboronic acids via a 3MCR: promising antineoplastic molecules," *Journal of Chemistry*, vol. 2013, Article ID 531208, 9 pages, 2013.
- [35] R. Miranda, H. Ríos, F. Delgado, M. Castro, A. Cogordán, and M. Salmón, "Characterization of a bentonitic clay and its application as catalyst in the preparation of benzyltoluenes and oligotoluenes," *Applied Catalysis A: General*, vol. 244, no. 2, pp. 217–233, 2003.
- [36] F. Walls, M. Salmon, J. Padilla, P. Joseph-Nathan, and J. Romo, "La estructura de la perezona," *Boletín del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México*, vol. 17, pp. 3–15, 1965.
- [37] T. García, E. Domínguez, and J. Romo, "Aislamiento de la hidroxiperezona de *Perezia alami*," *Boletín del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México*, vol. 17, pp. 16–18, 1965.
- [38] M. A. Villavicencio and B. Perez-Escandon, "Actividad de la plumbagina (de *Plumbago pulchella* boiss: Plumbaginaceae) como suavisante de la alimentación en tres especies de Orthoptera," *Folia Entomológica Mexicana*, vol. 86, 1992.
- [39] M. A. Villavicencio and B. Perez-Escandon, "Concentración de plumbagina en *Plumbago pulchella* (Plumbaginaceae) y su efecto en la selección de alimento de larvas de *Arachnis aulaea* (Lepidoptera)," *Folia Entomológica Mexicana*, vol. 90, pp. 17–24, 1994.
- [40] M. Soriano-García, R. A. Toscano, E. Flores-Valverde, F. Montoya-Vega, and I. López-Celis, "Structure of 2-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (perezona), a sesquiterpene," *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, vol. 42, no. 3, pp. 327–329, 1986.
- [41] M. Noltemeyer, G. M. Sheldrick, H. U. Hoppe, and A. Zeeck, "2-Ethyl-5-(3-indolyl)oxazole from *Streptomyces cinnamomeus* discovered by chemical screening characterization and structure elucidation by X-ray analysis," *Journal of Antibiotics*, vol. 35, no. 5, pp. 549–555, 1982.
- [42] R. G. Enríquez, J. M. Fernández-G, D. Gnecco, A. Pénicaud, and W. F. Reynolds, "The crystal and molecular structures of isoperezona, aminoperezona, and isoaminoperezona: a comparative study of their crystal packing," *Journal of Chemical Crystallography*, vol. 28, no. 7, pp. 529–537, 1998.
- [43] H. Nowell and J. P. Attfield, "X-Ray and neutron powder diffraction studies of the crystal structure of vitamin K<sub>3</sub>," *New Journal of Chemistry*, vol. 28, no. 3, pp. 406–411, 2004.
- [44] J. Vijayalakshmi, S. S. Rajan, and R. Srinivasan, "Structure of plumbagin," *Acta Crystallographica Section C*, vol. 43, no. 12, pp. 2375–2377, 1987.
- [45] R. Escobedo, R. Miranda, and J. Martínez, "Infrared irradiation: toward green chemistry, a review," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 4, p. 453, 2016.
- [46] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel et al., *Gaussian 09, Revision D.01*, Gaussian, Wallingford, Conn, USA, 2013.
- [47] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55–63, 1983.
- [48] R. G. Parr and W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 1989.
- [49] A. D. J. Becke, "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 98, no. 7, pp. 5648–5652, 1993.
- [50] C. Lee, W. Yang, and R. G. Parr, "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density," *Physical Review B*, vol. 37, no. 2, pp. 785–789, 1988.
- [51] P. M. W. Gill, B. G. Johnson, J. A. Pople, and M. J. Frisch, "The performance of the Becke-Lee-Yang-Parr (B-LYP) density functional theory with various basis sets," *Chemical Physics Letters*, vol. 197, no. 4-5, pp. 499–505, 1992.
- [52] F. London, "Théorie quantique des courants interatomiques dans les combinaisons aromatiques," *Journal de Physique et le Radium*, vol. 8, no. 10, pp. 397–409, 1937.
- [53] T. Clark, J. Chandrasekhar, G. W. Spitznagel, and P. V. R. Schleyer, "Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III. The 3-21+G basis set for first-row elements, Li-F," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 4, no. 3, pp. 294–301, 1983.
- [54] M. Bühl, M. Kaupp, O. L. Malkina, and V. G. Malkin, "The DFT route to NMR chemical shifts," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 91–105, 1999.
- [55] Y. Tanoue, T. Teraoka, N. Kai, T. Nagai, and K. Ushio, "Reaction of 3-iodoindole with 1,4-naphthoquinones," *Journal of Heterocyclic Chemistry*, vol. 47, no. 6, pp. 1447–1449, 2010.
- [56] B. Liu, S.-J. Ji, X.-M. Su, and S.-Y. Wang, "Novel synthesis of 3-indolylquinones catalyzed by molecular iodine under ultrasonic irradiation," *Synthetic Communications*, vol. 38, no. 8, pp. 1279–1290, 2008.
- [57] M. Morales, J. Martínez, L. Reyes-Sánchez et al., "How green experiment is?" *Educación Química*, vol. 22, pp. 240–248, 2011.



Article

# In silico Study of the Pharmacologic Properties and Cytotoxicity Pathways in Cancer Cells of Various Indolylquinone Analogues of Perezone

René Escobedo-González <sup>1</sup> , Claudia Lucia Vargas-Requena <sup>2</sup> , Edgar Moyers-Montoya <sup>3</sup>, Juan Manuel Aceves-Hernández <sup>1</sup>, María Inés Nicolás-Vázquez <sup>1,\*</sup> and René Miranda-Ruvalcaba <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54740, México; renegerardo.escobedo@gmail.com (R.E.-G.); juanmanuel.is.acevesh@gmail.com (J.M.A.-H.); mirruv@yahoo.com.mx (R.M.-R.)

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Henry Dunant #4600, Ciudad Juárez 32310, México; cvargas@uacj.mx

<sup>3</sup> Instituto de Ingeniería y tecnología, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ave. Del Charro 450 Norte, Ciudad Juárez 32310, México; edgar\_moymon@hotmail.com

\* Correspondence: nicovain@yahoo.com.mx; Tel.: +52-5623-2056

Received: 30 May 2017; Accepted: 19 June 2017; Published: 25 June 2017

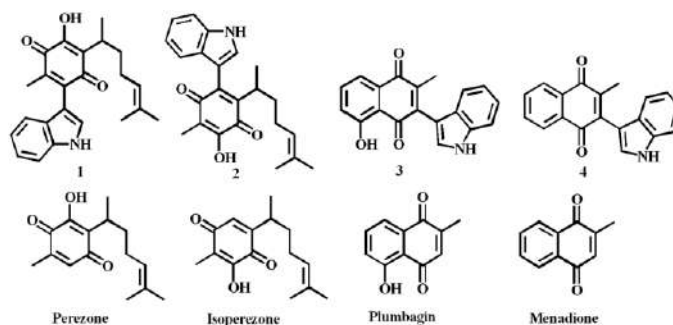
**Abstract:** Several indolylquinone analogues of perezone, a natural sesquiterpene quinone, were characterized in this work by theoretical methods. In addition, some physicochemical, toxicological and metabolic properties were predicted using bioinformatics software. The predicted physicochemical properties are in agreement with the solubility and cLogP values, the penetration across the cell membrane, and absorption values, as well as with a possible apoptosis-activated mechanism of cytotoxic action. The toxicological predictions suggest no mutagenic, tumorigenic or reproductive effects of the four target molecules. Complementarily, the results of a performed docking study show high scoring values and hydrogen bonding values in agreement with the cytotoxicity IC<sub>50</sub> value ranking, i.e., indolylmenadione > indolylperezone > indolylplumbagine > indolylisoperezone. Consequently, it is possible to suggest an appropriate apoptotic pathway for each compound. Finally, potential metabolic pathways of the molecules were proposed.

**Keywords:** indolylquinones; perezone; apoptosis; cancer; quantum chemistry calculations; docking study; chemoinformatics tools

## 1. Introduction

Many secondary metabolites isolated from plant specimens are quinones [1]. Perezone or pipitzaic acid (Figure 1), obtained from specimens of the roots of *Perezia* (currently *Acourtia*) by Río de la Loza, is reportedly the first secondary metabolite isolated in the New World [2]. The molecule has been the focus of many chemical, structural and biological studies [3–8]. It has also been used in an interesting green route for the production of various derivatives [9] and many of its pharmacological effects have been also reported [10–14].

In recent years, cancer prevention by means of natural products has received considerable attention. Chemical modification of secondary metabolites is considered a powerful method for the construction of novel drug candidates. As the indolylquinone moiety is present in many natural products with interesting biological activities [15,16], consequently, the promising pharmaceutical use of the indolylquinones has attracted attention for the synthesis of new molecules of this class.



**Figure 1.** Target molecules, and their corresponding quinone raw material.

As a part of our ongoing research interest in the implementation of green synthetic strategies to synergize and modify the pharmacological activities of single known compounds through the construction of novel hybrid molecules [17–22], in a recent work, we reported the cytotoxic effects on a human breast cancer cell line of a set of four indolylquinones 1–4 obtained from perezone, isoperezone, plumbagine and menadione, respectively [23]. Based on the corresponding cytotoxicity  $IC_{50}$  values the studied compounds could be ranked as follows: indolylisoperezone > indolylplumbagine > indolylperezone > indolylmenadione, i.e., 2 was the most active compound and 4 the least active, while 1 was less active than 3. It should also be mentioned that the cytotoxic effect of perezone and its synthetic isomer (isoperezone) has also been studied on the K562 human leukemia cell line and perezone showed a greater cytotoxic effect than isoperezone [13].

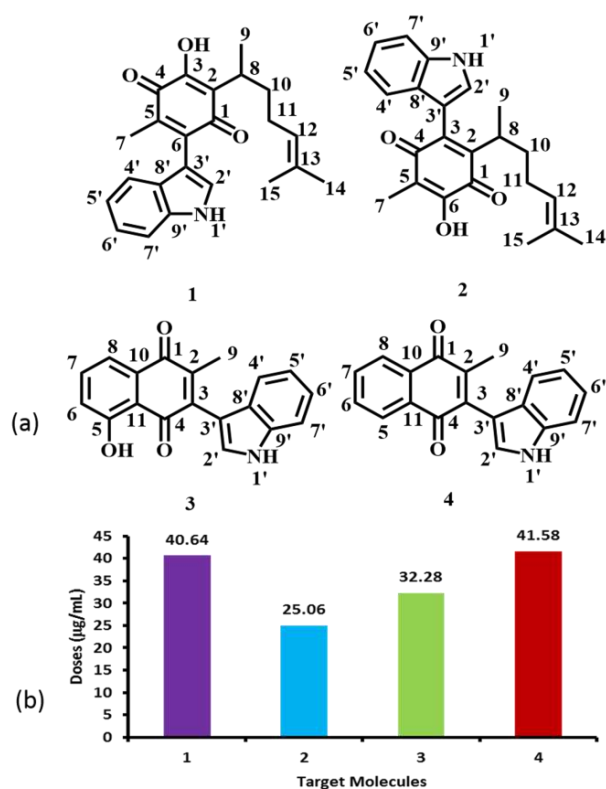
Recently computational chemistry methods such as quantum chemical calculations, molecular modelling and chemoinformatics tools have been used in both the design of new drugs and the study of their possible mechanisms of action. Quantum-chemical calculations have been extensively used in structure-activity studies in biochemistry, where these calculations provide descriptors that can be correlated with the biological activity. Some of these descriptors are atomic charges, HOMO-LUMO energies, and frontier orbital graphs [24].

Docking studies provide models of the possible interactions of protein residues with ligands, and can also furnish potential explanations for the therapeutic action on a protein receptor. Thus, docking score values, hydrogen bonds and bonding energy values are very important in the elucidation of ligand-receptor interaction mechanisms and the possible therapeutic action of drugs under study. Binding poses with the lowest binding free energy, the number and energy of hydrogen bonds and bonding energy are selected for the optimum docking conformation [25]. Finally, the chemoinformatics tools allow an approach to certain properties of studied molecules by use of diverse methodologies applied in the drug discovery process, such as compound selection, virtual screening, and metabolic prediction [26]. Taking into account the aforementioned facts, the goal of this work was examine several physicochemical predicted properties in addition to the apoptotic pathway of four indolylquinones, by using quantum determinations, molecular docking and chemoinformatics tools, in combination with the previously reported experimental results [23].

## 2. Results and Discussion

As previously mentioned, our research group recently reported the cytotoxic activity of 1–4 (Figure 2a) in a human breast cancer cell line (MDA-MB-231) [23]. Taking into account the corresponding  $IC_{50}$  values (Figure 2b), we have now analyzed their structure-activity correlations, using the reactivity parameters calculated by both quantum chemical calculations and molecular modelling; in addition, the values of adsorption, metabolism, toxicological and physicochemical properties were predicted using chemoinformatics tools.



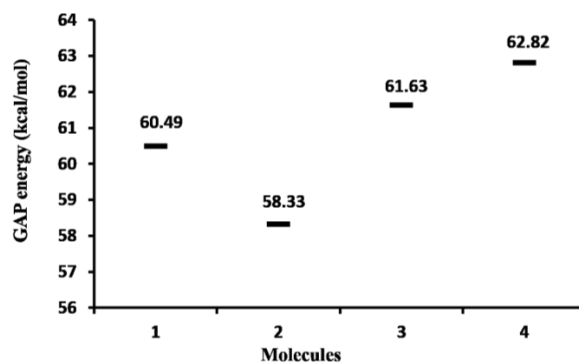


**Figure 2.** Cytotoxic effect of indolylquinones in cancer breast cells. (a) Atom numbering assignments of compounds 1–4. (b) Histogram of the corresponding IC<sub>50</sub> values.

## 2.1. Molecular Reactivity

### 2.1.1. Molecular Orbital Analysis

Calculated gap values ( $E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$ ) of the studied molecules are displayed in Figure 3. These values show that 4, with a  $\Delta E_{\text{gap}} = 62.82$  kcal/mol, is the least reactive (the most stable) molecule. The higher stability in 4 can be explained considering its greater aromatic nature. The most cytotoxic compound was 2 ( $\text{IC}_{50} = 25.06$  µg/mL), which is the molecule with the smallest energy gap ( $E_{\text{gap}} = 58.33$  kcal/mol) and largest reactivity. These results suggest a possible correlation between the chemical stability and the breast cancer cell cytotoxicity.



**Figure 3.** Gap energy plot (kcal/mol) of the target molecules.

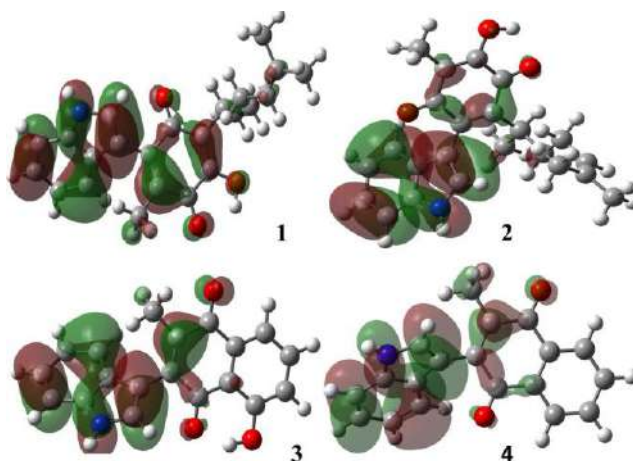
The value of  $E_{\text{HOMO}}$  is regularly associated with the electron donating capability, and a higher value of  $E_{\text{HOMO}}$  is indicative of a greater ease of donating electrons to unoccupied orbitals. A lower

value of  $E_{LUMO}$  is related to the ability of the molecule to accept electrons. The corresponding quantum chemical parameters calculated by DFT are summarized in Table 1. As it can be seen, the  $E_{HOMO}$  energy values of 1–3 were greater than that of 4 (−5.905 eV), suggesting that the presence of a hydroxyl group could facilitate the interaction between the ligand and an appropriate receptor site. Furthermore, the LUMO orbital energy shows the same trend as the gap energy. In other words, 2 has more electron-accepting capability and 4 has the lowest reactivity, in agreement with the previously reported experimental results [23].

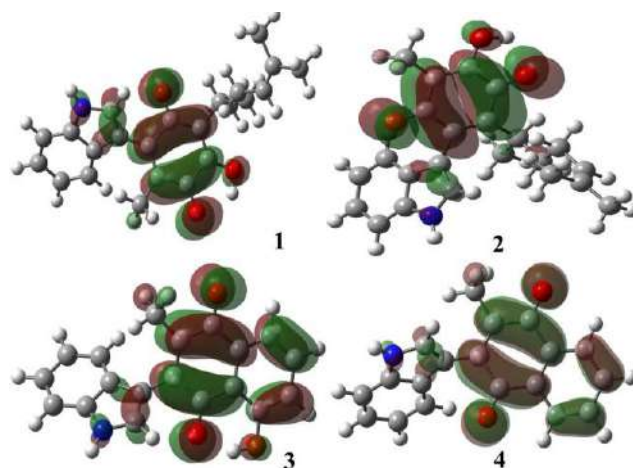
**Table 1.**  $E_{HOMO}$  and  $E_{LUMO}$  of the studied molecules.

Molecule	Energy (eV)	
	HOMO	LUMO
1	−5986	−3374
2	−5959	−3428
3	−6013	−3347
4	−5905	−3184

The contours of the frontier molecular orbitals for the studied molecules are displayed in Figures 4 and 5.



**Figure 4.** Molecular HOMO orbitals of the target molecules.



**Figure 5.** Molecular LUMO orbitals of the target molecules.

In all cases, the HOMO orbitals were located on the indole moiety and partially on the conjugated double bonds in the quinone motif; these  $\pi$ -electrons regions are available to perform electrophilic attack, in other words, these substrates behave as nucleophiles. The LUMO orbitals were located around the quinone ring; this fact is attributed both to the withdrawing-inductive and resonance effects of the conjugated carbonyl group allowing a nucleophilic behavior, in other words the substrate acts as an electrophile.

### 2.1.2. Atomic Charges

Charge values of the target molecules are displayed in Figure 6. As previously mentioned, the studied molecules presented cytotoxicity in cancer cells, an effect due to the corresponding interaction of 1–4 with receptor sites, mostly by non-covalent interactions between the ligand and amino acid residues of the protein receptor. In this sense, the natural population of charges was determined in order to identify possible interaction sites of the ligand molecules with the studied protein residues.

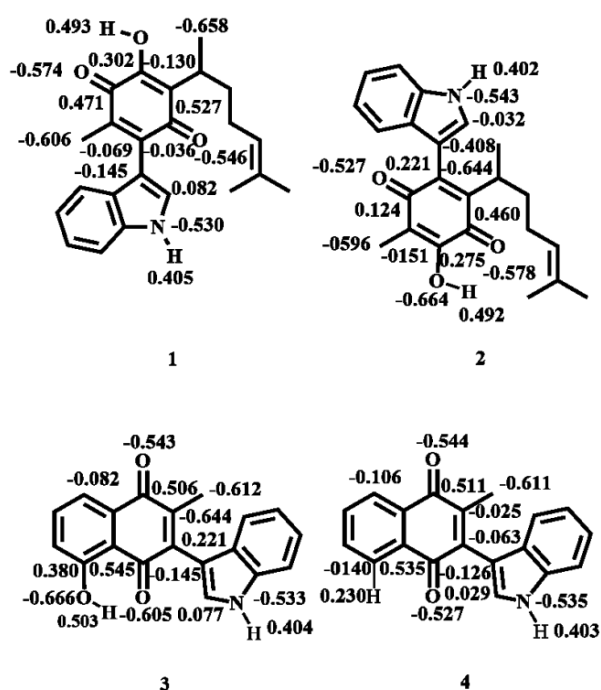


Figure 6. Charge distribution of selected atoms.

Analysis of the results shows that the most negative charge is localized on the oxygen atom of the hydroxyl group, consequently molecules 1–3 are the more reactive, a property suitably explained by a strong intramolecular hydrogen bond between the hydroxyl group with the adjacent carbonyl group ( $O-H \cdots O = C$ ). In addition, molecule 4, which does not have a hydroxyl group, presents the most negative charge on C9, ascribed to the methyl group bonded to the quinone ring; this situation, can be extended to the second atom in order of negative charge for 3 (C9) 1 (C7) and 2 (C2), a behavior conveniently explained by the electron-donating resonance effect of the nitrogen atom present in the indole moiety.

On the other hand, sites with high positive charge are localized at the carbons atoms of the closer carbonyl moiety, but not affected by the resonance effect of the indole group, and moreover not affected by intramolecular hydrogen bonding due to the hydroxyl group; as a complementary fact, the second atoms in order of positive charge correspond to the protons attached to the hydroxyl groups. In addition the respective positive charge values correspond to the hydrogen atoms joined to the nitrogen atom in the indole moiety. It is convenient to highlight that these hydrogens could be involved in hydrogen bonds with the receptor sites of proteins.

### 2.1.3. Molecular Electrostatic Potential Maps

The potential electrostatic map is an advantageous technique employed to both appropriately predict the molecular reactivity in addition to performing biological studies of compounds of interest [27]. In other works, they have been contemplated as an indicator of the reactivity regions of a target molecule, hence they have been employed in order to study electron-donator and electron-acceptor interactions, for example, between a drug and the amino acid residues of the cellular receptor [28].

Thus, this property was calculated for the four target molecules at the B3LYP/6-311++G (d,p) level of theory, and indicated by a color range from  $+6.6 \times 10^{-2}$  (deepest blue) to  $-6.6 \times 10^{-2}$  (deepest red) in the corresponding maps displayed in Figure 7, which show in red the nucleophilic sites, in blue color the electrophilic sites and the potential values are indicated in the highest electron density sites. It can be seen that the observed distributions evidence, in all cases, a bigger electronic density placed in the oxygen atoms of the carbonyl groups (values range of  $-0.0314$  to  $-0.0553$ ) and a minor distribution on the hydroxyl group oxygens (potential values between  $-0.0235$  and  $-0.0342$ ). This electrostatic potential decrease corresponding to the oxygen atoms of hydroxyl groups is a consequence of the intramolecular hydrogen bonds. In addition, the highest electronic deficiencies in the target molecules are located at H-1' ( $+0.0626$  to  $+0.0657$ ), the hydrogen atom bonded at the indole moiety nitrogen. It is convenient to note the presence of another electron density deficiency at H-2' bonded at the C<sub>2'</sub> carbon atom in the indole moiety ( $+0.0294$  to  $+0.0338$ ). This is in addition to the hydrogen atom of the hydroxyl group ( $+0.0114$  to  $+0.0351$ ). Consequently, it is important to highlight that these atoms would participate in non-covalent interactions with some receptor amino acid residues.

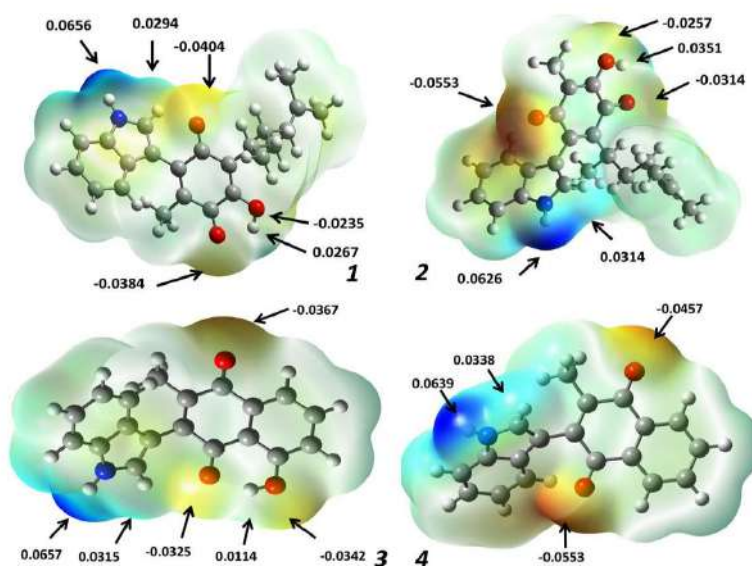


Figure 7. Molecular electrostatic potential surface of 1–4.

### 2.2. Toxicological and Physicochemical Properties Prediction

The target molecules presented cytotoxic effects in human breast cancer cells, so a prediction of their toxicity risk and some significant physicochemical properties were performed using OSIRIS-Property-Explorer [29]. The corresponding results are summarized in Table 2.

The toxicity risk predictor shows that the compounds with less risk of undesirable effects are 3 and 4, which do not present risks of mutagenicity, tumorigenicity, irritant or reproductive effects in comparison with 1 and 2 which present high risk of irritant effects. These results suggest that the risk is due to the presence of the aliphatic chain, explaining why the compounds 3 and 4 do not present this effect.

**Table 2.** OSIRIS toxicological and physicochemical predicted properties.

Property		Compound			
		1	2	3	4
Toxicity Risks	Mutagenic	N	N	N	N
	Tumorigenic	N	N	N	N
	Irritant	H	H	N	N
	Reproductive effect	N	N	N	N
Physicochemical Properties	cLogP	4.6	4.6	2.83	3.17
	Solubility (Log S)	−4.07	−4.07	−4.15	−4.46
	Mol. weight	363	363	303	287
	TPSA	70.16	70.16	70.16	49.93
	Druglikeness	−0.87	−0.87	2.29	−0.57
	Drug Score	0.24	0.24	0.74	0.5

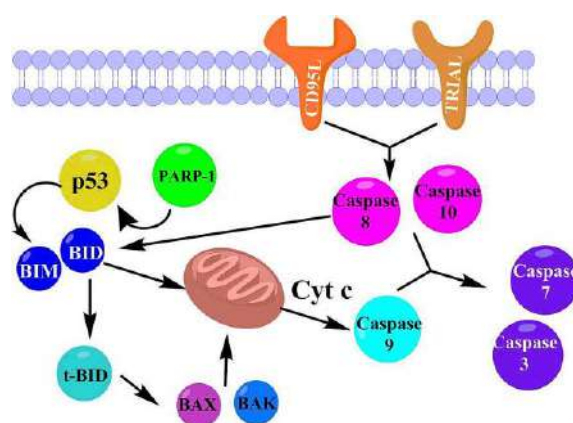
1: indolylperezone, 2: indolylisoperezone, 3: indolylplumbagin, 4: indolylmenadiione; N = no risk, H = High risk.

Physicochemical properties of the compounds were also estimated, such as cLogP, the logarithm of its partition coefficient between *n*-octanol and water, which is a property that describes the molecular hydrophobicity. The value range for this property varied from 2.83 to 4.6 in the studied compounds, with **3** and **4** presenting the lower values [30,31]. As the target molecules' values are less than 5, it indicates a reasonable probability they will be well absorbed [29,32]. Drug solubility (expressed as Log S) is an important factor to describe the absorption process. Poor solubility leads to poor absorption and bioavailability [30–33]. The common commercial drugs have values of Log S greater than −4. It is important to highlight that the best solubility is also observed for **1** and **2**; indicating that these compounds possess the best absorption, movement in the bloodstream and better elimination by the urinary tract. The compound with the lowest solubility was **4** which showed a low absorption value that could be the cause of the previously observed lower cytotoxic effect [23]. Regarding the molecular weight, all the compounds had values greater than 160 and less than 500 in agreement with Lipinski's rule of five [33]. Furthermore, another good descriptor of the absorption is the total polar surface area (TPSA), including intestinal absorption, bioavailability, Caco-2 permeability and blood-brain barrier penetration [34]. The value of TPSA for the molecules **1** to **3** were the same (70.16), while in the case of **4** it was 49.93, confirming the lower absorption in comparison with the other studied molecules.

The drug score (DS) is the combination of drug likeness, cLogP, log S, molecular weight and toxicity risks into one handy value that could be used to judge a compound's potential to qualify as a drug [35]. In this sense, **3** presented the best drug score while **1** and **2** had the lowest values. The lower drug score predicted for **1** and **2** was a consequence of the high probability of irritant effects in these molecules, however, **1** and **2** presented the best parameters in the physicochemical property prediction for drug use.

### 2.3. Docking Study in the Apoptosis Pathways

It is convenient to recall that we have previously reported experimental cytotoxicity results for the studied compounds in cancer cells [23]; the morphology results of the treated cells suggested a possible apoptotic pathway. In addition perezzone, isoperezone [13], plumbagin [36,37] and some other indolyquinones [38,39] have also shown apoptotic activity. It is additionally interesting to note that several quinones and naphthoquinones are recognized for their capability of association with certain proteins; the corresponding interaction can be assigned to a covalent-bond produced by a Michael type addition to the quinone ring. These molecules also can form other non-covalent interactions with specific proteins [40,41]. On the other hand, theoretical studies of the molecular docking of perezzone [42] and plumbagin [43] with proteins involved in apoptosis have been previously performed. Accordingly, in this work, a molecular docking of the indolyquinones **1–4**, with the corresponding proteins involved in the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways [44–46] was proposed (Figure 8), without considering any covalent binding; such a consideration must be taken into account due to the fact that the sites required to undergo a Michael interaction are already unavailable.



**Figure 8.** Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis.

### 2.3.1. Intrinsic Pathway Considerations

The first step in the considered activation mode of the intrinsic pathway was the interaction of the indolylquinones with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1), activating p53 and then promoting the action of the BIM protein on the mitochondria. The mitochondrial stress causes both the release of cytochrome C, the conversion of the procaspase 9 in caspase 9, and finally the activation of caspases 3 and 7. Moreover, the molecular recognition among the ligands 1–4 with the proteins p53 and BIM, were also considered and then appropriately proved. On the other hand, when the ligand activates the intrinsic apoptotic pathway, without any interaction with p53, it is called the p53-independent route. Thus in this study, the p53-independent route is considered to involve the interaction between the target molecules directly with BIM protein.

### 2.3.2. Extrinsic Pathway Considerations

The extrinsic pathway of the studied compounds interaction with the membrane receptors CD95L and TRAIL (Figure 7) was also studied. After the interaction with these receptors, the caspases 8 and 10 were activated. In addition, these enzymes can activate the caspases 7 and 3, or stimulate the conversion of BID in t-BID, promoting an interaction of t-BID with BAX or BAK and consequently producing mitochondrial stress. In this sense, the interactions of the indolylquinones with t-BID, BAX and BAK were also studied. The results of the molecular docking study with the aforementioned proteins are summarized in Table 3.

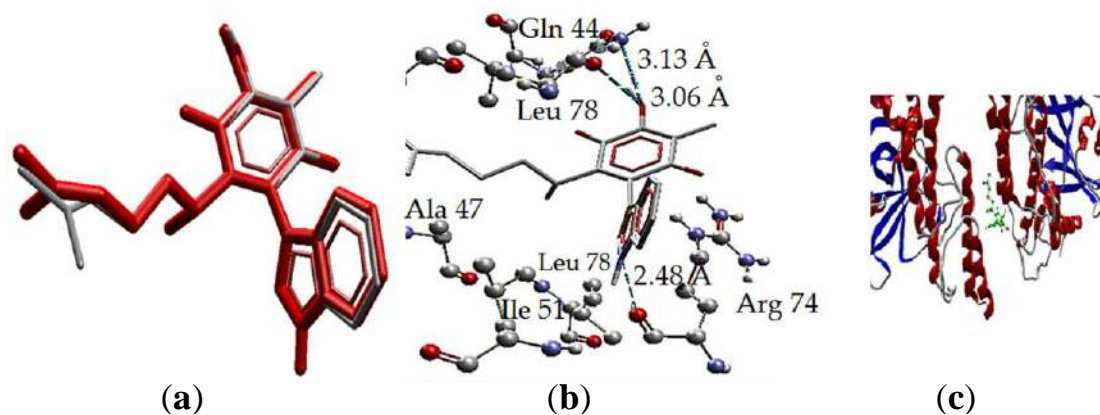
**Table 3.** Energy values of the interaction (score) between the ligands with the protein and their root mean standard deviation (RMSD in Å).

Protein (PDB)	Target Molecules							
	1		2		3		4	
	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD
PARP-1 (1UKO)	−144.263	22.569	−136.380	0.702	−103.384	0.117	−102.680	0.254
p53 (2OCJ)	−115.059	5.92	−102.806	2.274	−107.622	1.975	−97.960	0.212
BID (2BID)	−157.069	0.654	−133.750	52.699	−141.290	0.082	−137.550	0.16
BIM (4YK9)	−126.480	6.99	−141.566	0.837	−99.742	2.744	−100.855	0.142
CD95L (4MSV)	−99.340	0.6789	−132.437	0.457	−102.592	0.17	−105.411	0.127
TRAIL-R2 (4I9X)	−126.081	1.342	−137.349	16.801	−101.123	6.465	−101.083	7.82
(4N90)	−140.412	1.6765	−132.437	136.013	−121.757	0.136	−122.564	31.917
t-BID (2M51)	No docking	No docking	−1790.830	0.454	−1552.800	0.073	−1556.770	0.389
BAX (1FI6)	−140.360	9.819	−138.366	0.884	−130.975	0.08	−126.530	0.072
BAK (2IMT)	−116.520	0.3111	−135.800	0.868	−121.235	0.146	−95.060	2.179

### 2.3.3. Intrinsic Pathway Docking Study Results

Taking into account the intrinsic pathway, the molecules 1–4 need to penetrate the cellular membrane and act in the cytosol. Compound 1 and 2 have the best predicted penetration, considering their aforementioned predicted cLogP values (4.46 for both); meanwhile, 3 and 4 would have less penetration and minor activity in this route (cLogP = 2.81 and 3.17, respectively). In this sense, considering the last mentioned route, the first interaction would be with PARP-1, which does not have an interaction with 1, this fact is also in agreement with the docking values of RMSD for this molecule (RMSD = 22.569). The other three molecules have interactions with the PARP-1; being the stronger with 2 (score = −136.380), follow by 3 (score = −103.384) and finally 4 (score = −102.680). In this first step the order of interaction is in agreement with the experimental values, since compound 2 is the most active and 4 is the less active, in addition to the lower permeability predicted for 4.

The interactions of 2 with the amino acid residues of PARP-1 are displayed in Figure 9. The binding of 2 with the protein is by three hydrogen bonds (H bonds), two of these bonds are between the hydroxyl group of isoperezone with Gln44 and Leu78, and the third is between the H1' in the indole moiety and the Arg74 residue. The first hydrogen bond in the hydroxyl group had a distance of 3.13 Å where the amide group of the glutamine residue is the donor and the oxygen (the bigger negative charge) of the hydroxyl group is the acceptor. The second hydrogen bond is between the hydroxyl group as donor while the leucine carbonyl group is the acceptor and the distance between the atoms is 3.04 Å, being the biggest of the mentioned interactions. Finally, the stronger hydrogen bond is between the N–H group as donor, corresponding to the surface with high electronic density deficiency (in the MEP), and the carbonyl of the Arg46 residue with a distance of 2.48 Å (Figure 9b). Overlapping of the ligand (red) and the pose (grey) is shown in Figure 9b, with small differences in the aliphatic chain conformation. Moreover, the hydrogen bonding and arrangement of 2 in the protein (1UKO) secondary structure is exposed in Figure 9b,c, respectively.

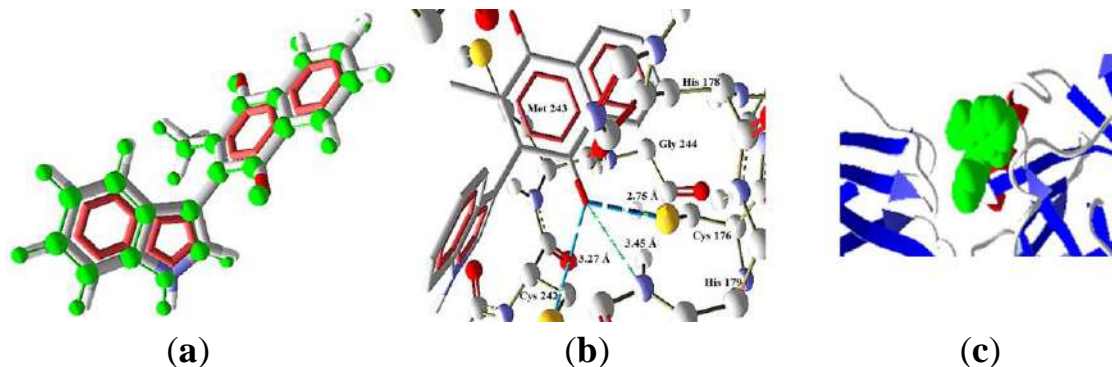


**Figure 9.** Interaction of 2 with PARP-1, PDB code (1UKO). (a) 2 and the pose, overlapping of the ligand (red) and the pose (grey). (b) Interaction of 2 and PARP-1 complex, three H bonds with protein residues. (c) Secondary structure, ligand (green) in the middle of the two isomers protein.

On the other hand, the interaction of 3 with PARP-1 is formed by only one hydrogen bond. This bond is between the carbonyl group of Arg74 as acceptor and the hydrogen (high positive charge) of the hydroxyl group; the bond length is 3.08 Å, indicating a strong H bond and the hydrogen bond energy of −2.5 a.u., which is the maximum value for an H bond, in the Molegro software set. Finally, the docking of 4 does not present hydrogen bonds with PARP-1, for this reason the interaction energy value was the lowest of the four ligands.

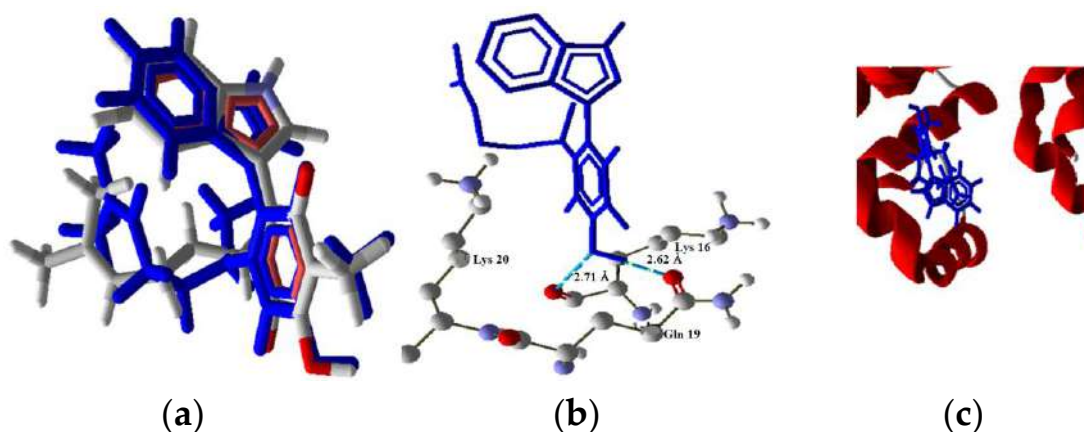
The function of PARP-1 is to activate another protein, p53, which does not present any interaction with 1–3. Molecule 4 shows values that indicate an interaction (Molscore = −97.960). This result indicates the possibility that 4 could activate the intrinsic pathway via p53. The docking of 4 with p53

showed excellent overlapping between the pose and the ligand conformation (Figure 10a). Additionally, three hydrogen bonds were found (Figure 10b); these bonds are between the oxygen atom of the carbonyl group O4 (bigger electronic density in the MEP) and the residues Cys176, Cys242 and Hys179, being the stronger bond the one with Cys176 (2.51 Å and bond energy of  $-1.72$  a.u.).



**Figure 10.** Interaction of 4 with p53. (a) 4 overlapping of the ligand (red) and the pose (grey). (b) Interaction of 4 and p53 (PDB code 2OCJ) complex, three H bonds with protein residues. (c) Secondary structure, ligand (green) in the middle of the two monomers.

The next proteins in the cascade are members of the family called “BH3-only” known as Bim. This protein is activated in the intrinsic pathway p53 dependent and independent. The results show the interaction of 2 and 4, where the interaction energy decreases from 2 to 4 (scores of  $-141.566$  and  $-100.855$ , respectively). These results continue the trend whereby 4 had the smallest interaction energy with the proteins involved and causes minor cytotoxicity. Furthermore, the compounds 1 and 3 did not show any molecular docking with this protein (RMSD values of 6.99 and 2.744, respectively). The interaction model (Figure 11) of 2 (high cytotoxicity) with the protein Bim was modeled with two hydrogen bonds between the hydroxyl group of 2 and the residues Lys16 and Gln19 at distances of 2.67 Å and 2.71 Å, respectively. This protein is important because the intrinsic pathway could be initiated in this point, independently from p53. Furthermore, the pathway could be activated by the four ligands.



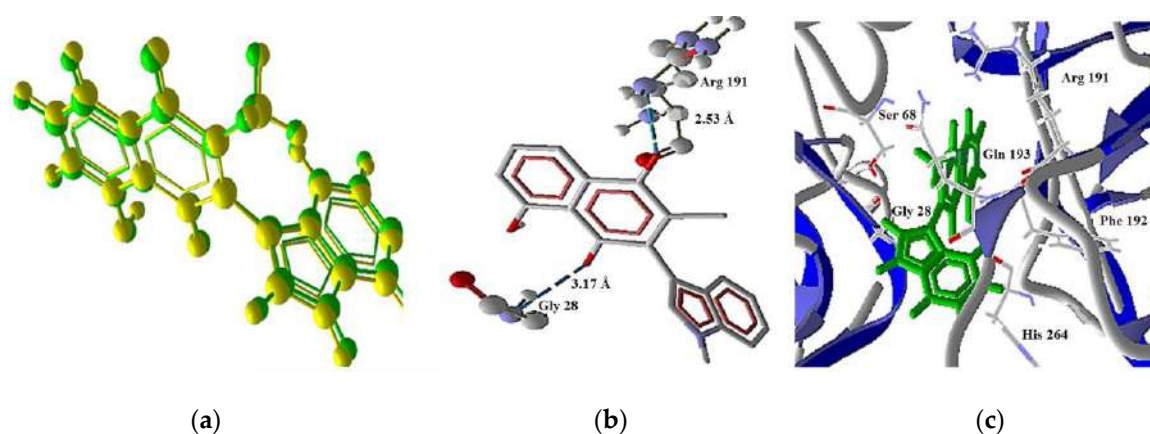
**Figure 11.** Model of interaction of 2 with Bim. (a) Poor overlapping of the ligand (blue) and the pose (red). (b) Interaction of 2 and Bim complex, two H bonds with protein residues. (c) Secondary structure, ligand (blue) in the middle of the two monomers.



### 2.3.4. Extrinsic Pathway Docking Study

The extrinsic pathway (Figure 7) was analyzed by interaction of the target molecules with the membrane receptors such as CD95L (4MSV) and TRAIL-R2 in two isoforms (4I9X and 4N90). Concerning CD95L, the molecules 1–4 have good docking results with these proteins, showing the best interaction with 2 (score =  $-132.437$ ), followed by 4 (score =  $-105.411$ ) and a lesser interaction with 1 (score =  $-99.340$ ).

Regarding the TRAIL-R2 isoforms, the 4I9X protein displayed docking only with 1 (score =  $-126.081$  and RMSD = 1.342). However, the 4N90 protein interacts with 1 (score =  $-140.412$  and RMSD = 1.677) and 3 (score =  $-121.757$  and RMSD = 0.136). Molecule 3 establishes two hydrogen bonds, the first one between Arg191 as donor, and the oxygen atom (O1) of the carbonyl group as the acceptor; meanwhile a second kind of bond appeared between the Gly28 residue as donor, and the oxygen atom (O4) as acceptor (Figure 12). These observations are in agreement with the quantum calculation results, since the acceptors of the hydrogen are the two atoms with bigger negative charge and electronic density. A model of the interaction of 3 with 4N90 is shown in Figure 12.

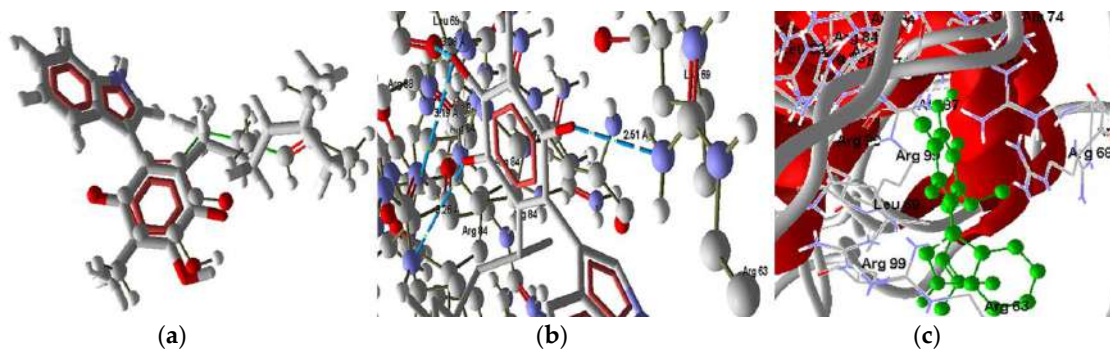


**Figure 12.** Model of the interaction of 3 with TRAIL-2 (4N90 isoform). (a) Compound 3 and TRAIL-2 complex, overlapping of the ligand (green) and the pose (yellow); (b) Interaction of 3 and TRAIL-2 complex, showing three H bonds with protein residues; (c) Secondary structure, ligand (green) in the middle of the two protein isomers.

The activation of these membrane receptors changes the procaspases 8 and 10 to caspases, which could activate the caspases 3 and 7. Then, these proteins could promote the conversion of Bid to the t-Bid. The outcome showed molecular docking of 1, 3, 4 with Bid protein, where 1 had the best score of  $-157.069$  and exhibits four hydrogen bonds with the quinone hydroxyl group as donor. The acceptors of the hydrogen bonds are: (a) the amine group of the His91 residue ( $2.77 \text{ \AA}$ , energy of  $-1.33 \text{ a.u.}$ ), (b) the oxygen atom of the Ser119 residue ( $3.175 \text{ \AA}$ , energy  $-2.157 \text{ a.u.}$ ), (c) the amine group of the Asp4 residue ( $3.023 \text{ \AA}$ ,  $-2.5 \text{ a.u.}$ ) and finally the NH group of Met3 ( $2.732 \text{ \AA}$ ,  $-2.07 \text{ a.u.}$ ). In this sense, the ligand 3 displays the lower interaction. The binding of the molecules with Bid could inhibit the protein-protein interaction that is an essential phenomenon for its function in the apoptotic pathway [46]. This effect is also observed with calectrol, a molecule with a similar moiety as the target molecules [47]; in this case the activity of caspase 8 on Bid in the extrinsic route can be inhibited. This effect explains the difference in cytotoxicity between 2 (RMSD of 52.699) and the rest of the studied molecules; additionally, there is the lower cytotoxicity of 1 as result of the high interaction with this protein (score of  $-157.069$ ) in comparison with 3 (score =  $-141.290$ ).

The molecules 2–4 could interact with the protein t-Bid, being the stronger interaction with 2 (score =  $-1790.830$ ). The binding mode of 2 with t-Bid is established by five hydrogen bonds (Figure 13), three of them with the oxygen atom (O4) as acceptor (high electronic density region in the MEP) and

the Glu59 residue in three of the isomeric chains of the protein as donors. Moreover, there are two more bonds with the indole N–H group as donor (high electronic density difference in the MEP value) with the two Glu54 residues of isomeric chains as acceptors. The next molecule in order of affinity with this protein was ligand 4 (score =  $-1556.770$ ), while ligand 3 has the lower interaction energy values.



**Figure 13.** Model of interaction of 2 with t-BID. (a) Compound 2 and t-BID complex, overlapping of the ligand (red) and the pose (grey); (b) Interaction of 2 and t-BID complex, showing three H bonds between the carbonyl group and the protein residues; (c) Secondary structure, ligand (green) in the middle of the protein.

Finally, the activation of t-Bid causes the interaction with BAX (1FI6) y/o BAK (2IMT) which stimulates the release of cytochrome c. In this point, the target molecules 2–4 interact with BAX in order to strengthen the release. Compound 2 (score =  $-138.366$ ) has the bigger interaction followed by 3 (score =  $-130.975$ ). The interaction of 2 with this protein was proposed to occur by the formation of three hydrogen bonds with Asp2 ( $3.15 \text{ \AA}$ , H bond energy =  $-2.27 \text{ a.u.}$ ), Arg9 ( $3.09 \text{ \AA}$ , H bond energy =  $-2.5 \text{ a.u.}$ ) and Met1 ( $3.24 \text{ \AA}$ , H bond energy =  $-0.98 \text{ a.u.}$ ). In the case of the molecular docking with BAK, 2 has also the stronger interaction (score =  $-135.800$ ) followed by 3 (score =  $-121.235$ ) and the last is 1 (score =  $-116.52$ ). Molecule 4 did not show docking with this protein (RMSD value of 2.179).

### 2.3.5. Proposed Apoptosis Pathways

Taking into account the previously described results, the proposed pathways are:

- Molecule 2 acts by initiating the p53-dependent way, considering the interaction with PARP-1; this protein have an eventful contribution in important biological process as transcription and the regulation cellular cycle, DNA damage response, apoptosis and the preserver of genome integrity [48]. This activation induces proapoptotic BIM proteins, which stimulate BAX/BAK proteins, generating mitochondrial stress and promoting the intrinsic apoptotic pathway. Moreover, the p53-independent intrinsic pathway could be activated as consequence of the interaction of 2 with BIM protein. Ligand 2 has the bigger predicted permeability among the target molecules, though the extrinsic apoptosis pathways also can be initiated by recognition with FasL (CD95L) death receptor provoking the cellular death mediated by caspase 8. The high cytotoxicity in breast cancer cells was explained by the activation of the two pathways and the high interactions with the proteins involved in these routes.
- The next molecule in order to cytotoxic activity value was 3, which also can activate the intrinsic (p53-dependent and -independent) and extrinsic pathway by recognition with CD95 and TRIAL membrane receptor (FasL receptors). However, this molecule displayed the lowest predicted permeability, making the most probable the extrinsic pathway and the lower interaction with BID (it has the less probability to inhibit the interaction of BID with caspase 8). Besides, 3 presented moderate interactions with the proteins studied.

- (c) Molecule **1** can interact with the FasL (CD95L and TRAIL-R2) receptors, however it presented the biggest value of permeability and has high affinity for BID protein, so this molecule can inhibit the interaction among the caspase 8 and BID and suppress the extrinsic apoptotic pathway. Since it does not have a molecular docking conformation with PARP-1, the prospective pathway inside of the cell (considering the big predicted membrane permeability) is the activation of the proteins t-Bid and BAK (considering the moderate affinity in comparison with the other target molecules).
- (d) Finally, the proposed pathway for **4** is the activation of the intrinsic (p53-dependent and -independent) and the extrinsic pathway for CD95L recognition; however the lower cytotoxic activity is a consequence of the low affinity with the proteins involved in the apoptosis, in addition of the low reactivity of this molecule.

## 2.4. Pharmacological and Metabolic Properties

### 2.4.1. Target Molecules Absorption Predictions

Complementary and interesting results, considering the potential use of the studied molecules as drug, are the prediction of its absorption, metabolic and excretion properties of the studied molecules in humans.

The behavior in different absorption and excretion models were predicted using admetSAR methodology and the results are given in Table 4. The predictions for **1–4** to exhibit human intestinal absorption have a probability value of 1 in each case. Concerning the blood brain barrier, the compounds **1**, **2** and **4** show medium absorption probability values, being ligand **4** the one displaying the biggest probability (0.872).

**Table 4.** Prediction of the absorption of the target molecules in different models.

Absorption Model	Molecules							
	1		2		3		4	
	Result	P	Result	P	Result	P	Result	P
Blood-Brain Barrier	BBB+	0.650	BBB+	0.556	BBB–	0.570	BBB+	0.872
Human Intestinal Absorption	HIA+	1	HIA+	1	HIA+	1	HIA+	1
Caco-2Permeability	Caco2+	0.500	Caco2+	0.507	Caco2+	0.527	Caco2+	0.646
P-glycoprotein Substrate	S	0.722	S	0.692	S	0.620	NS	0.511
P-glycoprotein Inhibitor	I	0.536	I	0.604	NI	0.818	I	0.742
	I	0.946	I	0.946	NI	0.897	NI	0.711
Renal Organic Cation Transporter	NI	0.769	NI	0.793	NI	0.834	NI	0.746

1: indolylperezone, 2: indolyisoperezone, 3: indolylplumbagin, 4: indolylmenadione; + = positive to absorption, – = negative to absorption, S = substrate, I = inhibitor, NI = non-inhibitor NS = non-substrate, P = probability.

These results are in agreement with the results obtained with OSIRIS, which indicated the lower water solubility of **4** (Log S value of  $-4.46$ ); in addition, **4** is the less polar compound, since the structure does not have a hydroxyl group. A model considered the “gold standard” for the drug permeability is the human colon adenocarcinoma (Caco-2) monolayer cell culture which is widely used in drug discovery and has been recommended by the Food and Drug Administration (FDA) [49,50], in this sense the prediction for the target molecules show permeability in all cases. Regarding the P-glycoproteins, this molecule is one of the mayor ABD transporters, distributed in several tissues, and involved in the clearance of xenotoxins against steep concentration gradients, at the expense of ATP hydrolysis. Additionally, the P-glycoprotein plays an important role in the transport of small molecules in vital areas. In addition, this protein is present in the multidrug resistance cancer cells and its inhibition can be used to overcome the multidrug resistance [51–53]. In this sense, the molecules **1–3** showed possibilities of being good substrates when used with those proteins.

In respect to ligand **4**, which was a non-substrate, its bioavailability could be minor in comparison with the other studied molecules limiting its biological activity. This result is in agreement with the less activity shown in cancer cells. The non-substrate behavior of **4** is related with the fulfillment of the

“rule of four”, which is assigned to compounds with less than 400 Da molecular weight, no more than four nitrogen and/or oxygen atoms and base pKa minor to 8 as non-substrate [54]. The prediction of the inhibitor character of indolylquinones studied in P-glycoprotein-I and II indicated that **1** and **2** are inhibitors of these proteins, while **4** only act as inhibitor in glycoprotein-I. In the case of **3** did not present inhibitory characteristics against the P-glycoproteins. Finally, none of the molecules considered present inhibitory effects on the renal organic cation transporter.

#### 2.4.2. Target Molecule Metabolism

Another interesting result was to predict the metabolism of the studied compounds using admetSAR and MetaPrint2D-React methodology (Table 5). Firstly, the behavior as substrate or inhibitor of the target molecules in the most important isoforms of the cytochrome P450 participants in the metabolism of therapeutic drugs was evaluated. During the biotransformation of the drugs, the molecules are broken down and/or converted into more soluble molecules, which play important roles in the pharmacokinetic and therapeutic action of drug molecules.

**Table 5.** Prediction of metabolism.

Metabolism Model	Molecules							
	1		2		3		4	
	Result	P	Result	P	Result	P	Result	P
CYP450 2C9 Substrate	NS	0.764	NS	0.794	NS	0.740	NS	0.734
CYP450 2D6 Substrate	NS	0.810	NS	0.807	NS	0.818	NS	0.814
CYP450 3A4 Substrate	S	0.678	S	0.646	NS	0.569	NS	0.500
CYP450 1A2 Inhibitor	I	0.637	I	0.664	I	0.912	I	0.914
CYP450 2C9 Inhibitor	I	0.510	NI	0.511	I	0.907	I	0.894
CYP450 2D6 Inhibitor	NI	0.812	NI	0.812	NI	0.687	NI	0.530
CYP450 2C19 Inhibitor	NI	0.589	NI	0.619	I	0.719	I	0.840
CYP450 3A4 Inhibitor	NI	0.809	NI	0.808	NI	0.830	NI	0.707

1: indolylperezone, 2: indolylisoperezone, 3: indolylplumbagin, 4: indolylmenadione; S = substrate, I = inhibitor, NI = non-inhibitor, HI = high inhibition, NS = non-substrate, P = probability.

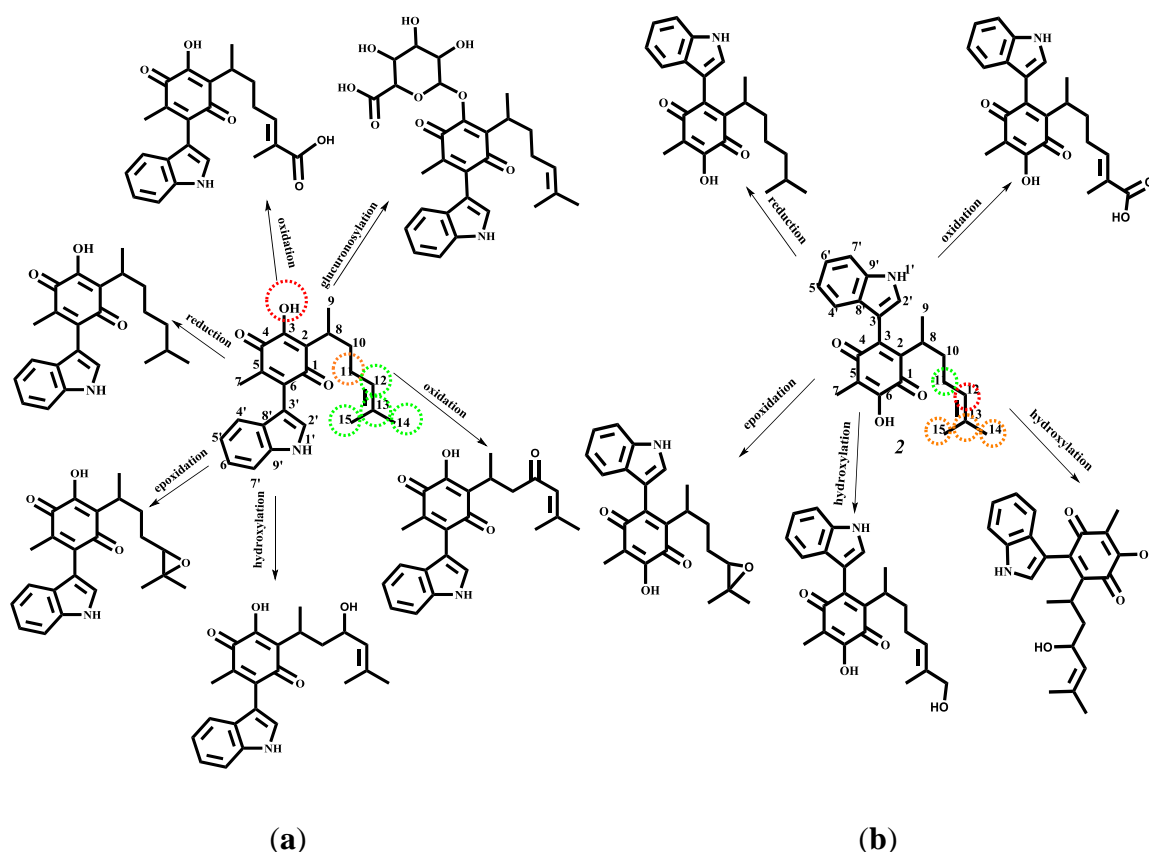
Evaluation of the target molecules as substrates of CYP shows that **1–4** act as non-substrates of the 2C9 and 2D6 isoforms of cytochrome P450 (CYP). The obtained results for these cytochromes can be explained by considering the usual structure of their substrates; CYP2C9 substrates possess weakly acidic properties and multiple aromatic rings [55]. The molecules **1**, **2**, **3** present a weakly acid hydroxyl group, however do not present a multiple aromatic ring, while **4** does not present any of these characteristics. Regarding CYP 2D6, the primary characteristic of their substrates is the presence of basic nitrogen atom placed 5 Å or 7 Å from the site of oxidation [56,57]. The structures of **1–4** have a nitrogen atom in the indole motif, however, the unshared electron pair is not available due to the resonance effect, and also the distance between the nitrogen and the aromatic group in **3** and **4** or the double bond C14–C15 in **1** and **2** are placed in a distance different from 5 Å or 7 Å. The substrate behavior prediction in the CYP3A4 indicated that only **1** and **2** could be substrates, because these molecules meet the characteristics of the pharmacophore model for this cytochrome. The molecules **1** and **2** present, by considering the MEP and charge, two hydrogen bond acceptors (O1 and O4), one hydrogen bond donor (OH–3, OH–6 or N–H) and one hydrophobic region (aliphatic chain for C8 to C15), (*vide supra*). Additionally, an important metabolic property to consider is the capability of these compounds to inhibit the CYP isoforms, which is an adverse effect.

Prediction of the ligand effect in CYP1A2 show the inhibitory effect of **1–4**; this result could be explained considering the similitude between the substrates (polar heterocyclic compounds and arylamines) of cytochrome 1A2 [56–59] with the indole motif of the target molecules. Another CYP isoform inhibited by the studied molecules is the –CYP2C9, in agreement with result obtained in the

substrate behavior studies. In the same way, 3 and 4 show inhibitory effects on CYP2C19. On the other hand, the compounds 1–4 did not show inhibitory effect on CYP2D6 and CYP3A4.

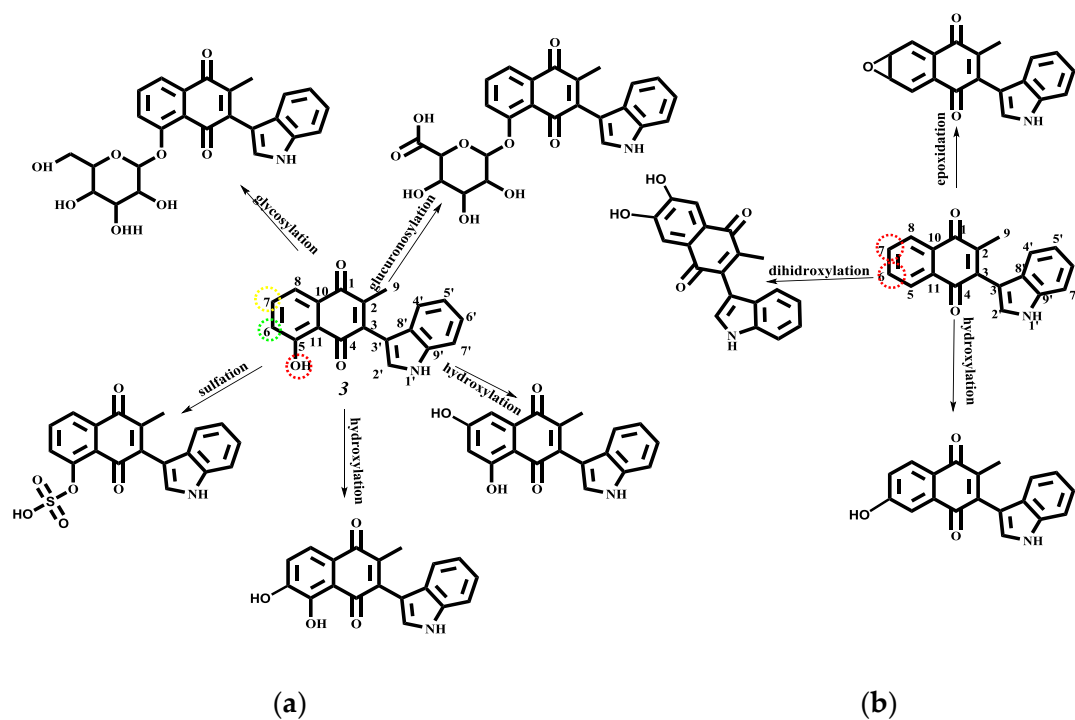
#### 2.4.3. Phase I and II Metabolic Pathway

Finally, the study of the possible way to degradation of 1–4 during the human phase I and II metabolism was predicted using the MetaPrint2D-React program [60,61]. The results are displayed in Figure 12 for 1 and 2. Meanwhile, the metabolism pathway of 3 and 4 is shown in Figure 14.



**Figure 14.** Predicted metabolism for: (a) indolylperezone and (b) indolylisoperezone.

Molecule 4 corresponds is the least reactive compound, and this is reflected in the number of metabolites predicted. The color highlighting an atom indicates its normalized occurrence ratio (NOR), Figures 14 and 15. A high NOR indicates a more frequently reported site or metabolism in the metabolite database of the program. The red color indicates high values of NOR (from 0.66 to 1), the orange color designate values between 0.33 to 0.66, the green color indicates a NOR value range of 0.15 to 0.33, white color, range values of 0.00 to 0.15 and grey, denotes lack of data. The high NOR in 1 is exhibited in the hydroxyl group, indicating a possible glucuronosylation increasing the solubility and the excretion of the compound. The C-11 position, present the next NOR value proposing a hydroxylation and oxidation on this carbon, producing an allylic alcohol or an  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone. Additionally, the transformation of the double bond and the oxidation of the carbons C14–C15 has the lowest NOR value. The possible metabolites produced are the epoxide at C12–C13, the C12–C13 reduction product and the product of oxidation to a carboxylic acid at C14–C15. Compound 2 reveals similar metabolites in comparison with 1. However, the glucuronosylation and the oxidation to ketone in C-11 are not shown. In contrast the allylic hydroxylation in C14 or C15 is predicted.



**Figure 15.** Predicted metabolism for: (a) indolylplumbagine (3) and (b) indolylmenadione (4).

Concerning the metabolism of **3** and **4**, since the first has a hydroxyl group (a group with high NOR value), this molecule can be conjugated with glucuronic acid or some glycosides to increase the solubility and the compound excretion; moreover, the sulfation of the hydroxyl is also predicted. The metabolism reaction on **3** and **4** aromatic systems are the hydroxylation via production of the corresponding dihydroxylated compounds; additionally in **4** an epoxide at C6–C7 is proposed.

### 3. Methods

#### 3.1. Reactivity Parameters

Theoretical calculations were carried out using the corresponding structures previously optimized of the target molecules [23] by Density Functional Theory (DFT) [62] with GAUSSIAN09 program [63], employing Becke's three parameters exchange and the Lee-Yang-Parr correlation hybrid functional (B3LYP) [64] with the 6-311++G(d,p) basis set, including the split-valance and of diffuse functions [65–68]. The highest occupied molecular orbital-lowest unoccupied molecular orbital (HOMO-LUMO) gap is a typical quantity used to describe the dynamic stability of molecules [30,69]. Values of the orbital energy and the surface of the frontier orbitals were calculated using the same level of theory. Natural Bond Orbital (NBO) was used for electron natural population analysis in Gaussian program. Natural Population Analysis was used for comparing differences rather than determining absolute atomic charges. The charge analysis was performed to explain the model of interaction of the corresponding ligand with the probed proteins [70,71]. Molecular electrostatic potential maps (MEPs) were obtained for the target molecules to complete the electronic analysis considering the importance of these results in the interaction models in the studied biological system [28].

#### 3.2. Toxicological and Physicochemical Properties Prediction

Physicochemical properties predicted for the molecules under study provide pertinent information about the facility of a drug molecule to interact with the amino acid residues inside cells or the membrane receptors. The toxicological risk and physicochemical properties of the studied molecules were obtained using the OSIRIS property explorer. The toxicological risk prediction process

relies on a precompiled set of structural fragments that give rise to toxicity alerts in case they are encountered in the structure currently drawn. LogP and log S were estimated by using the OSIRIS method, which is implemented as system for adding the contributions of every atom based on its properties. The drug like-ness approach is based on a list of about 5300 distinct substructure fragments with associated drug-likeness scores. The drug likeness is calculated employing the score values of those fragments present in the molecule under investigation [29,32,36].

### 3.3. Docking Study

#### 3.3.1. Docking Details

Molecular docking predicts the binding capability of a small molecule to a target protein by developing a relatively stable complex. The predicted ligand orientations allow the prediction of the preferred binding conformations and affinity between the proteins and small molecules as ligands [25]. The small molecules with high-binding affinities are identified as potential candidates for follow-up experimental validation. Traditionally, molecular docking is primarily employed to screen pure compounds; the top-ranking chemicals are subsequently selected for experimental validation. Unlike synthetic chemicals, most natural products are commercially unavailable, although several similar or analogue products could be obtained. Besides, most of the three dimensional protein structure is ready obtained from the Protein Data Bank, by using the appropriate code.

#### 3.3.2. Molecular Docking Simulation

Molecular docking simulations were performed using the three dimensional crystal structures of ten proteins from the PDB dataset: Parp1 (1UKO); BAX (1FI6); BID (2BID); BAK (2IMT); tBID (2M51); p53 (2OCJ), BIM (4I9X); TRAIL-R2(4N90 and 4YK9); and CD95L (4MSV), respectively, from the RCSB, Protein Data Bank [72–82]. The Molegro software package [83] was used for all docking conformations and analysis. The docking parameters for Molegro docking study were maintained at their default values. The ligand was not rigid and allowed to torsion in the first blind docking processes. The grid box was  $15 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA}$ , encompassing the ligand binding cavity of each protein. Only a maximum of five surfaces for docking were fixed for the typical docking process. The binding modes were clustered using the root-mean-square deviation among the cartesian coordinates of the ligand atoms. The docking results were ranked according to the binding free energy and the root mean standard deviation  $\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$  (values of the corresponding ligand protein complex, in order to compare with the leader drug. The binding modes with the more negative binding free energy (Docking score) and maximum hydrogen bonding number were selected as the optimum docking conformation. The binding results are graphically presented using the PyMOL Molecular Graphics System Version 1.3 [84] and the Molegro visualizer.

### 3.4. Pharmacological and Metabolic Properties

Absorption and metabolic properties of the studied compounds were calculated by using the admetSAR server [49,85], which predict about 50 ADMET endpoints using a chemo-informatics-based toolbox, called ADMET-Simulator, which integrates high quality and predictive QSAR models. The proposed human metabolism for the target compounds was made using MetaPrint2D-Reaction software, a prediction set of xenobiotic metabolism by means of data-mining and statistical analysis of known metabolic transformations reported in scientific literature [86–91]. The results are displayed in circular colored marks predicting the reactions at that site and the possible reaction types, showing the metabolite formed. The color of the mark in the atoms indicates its normalized occurrence ratio (NOR) values. High NOR value indicates a more frequently reported site of metabolism in the metabolite database.

#### 4. Conclusions

An *in silico* study of the apoptosis pathway for a set of several novel indolylquinones was carried out, being important to note that the obtained theoretical results are in agreement with the data reported in an experimental cytotoxic study previously performed by our research group.

The most cytotoxic compound was **2**, with the smallest energy gap of the HOMO and LUMO orbitals and consequently big reactivity values; meanwhile, the less cytotoxic compound **4**, showed the least reactivity and the biggest energy gap value. These results are indicative of a possible correlation between the chemical stability and breast cancer cell cytotoxicity. In addition, the toxicity risk predictor shows that the compounds with less risk of undesirable effects are molecules **3** and **4**, without any risks of mutagenicity, tumorigenicity, irritant or reproductive effects, while molecules **1** and **2** show a high risk of irritant effects. These results indicate that the risk is due to the presence of the aliphatic chain, therefore the compounds **3** and **4** do not present this effect. Moreover, the respective docking studies of the target molecules as ligands, considering the different proteins involved in the different pathways were also carried out; in this sense, a data analysis related to the anticancer mechanism of action was conveniently performed. The results are in agreement with a previously experimental study of the ligands' cytotoxicity. Feasible apoptotic pathways and explanation of the corresponding IC<sub>50</sub> values by each molecule were also achieved.

On the other hand molecules **1–3** were the more reactive since the most negative charge is localized on the oxygen atom of the hydroxyl group of the studied molecules. Furthermore, molecule **2** could be interacting with the receptor site showing its pharmacological activity; consequently, molecule **4**, which does not have a hydroxyl group, is the less reactive. The biggest electronic density was observed on the oxygen atom of the carbonyl groups, and the minor value on the oxygen of the hydroxyl group. In addition, the most electronic deficiency in the target molecules were observed in H-1' hydrogen atom, bonded at the nitrogen in the indole moiety, followed by H-2' bonded at the carbon atom in the indole moiety, and the hydrogen atom of the hydroxyl group. Consequently, it is important to highlight that these atoms could participate in non-covalent interactions with some receptor amino acid residues.

In regards to several physicochemical properties (cLogP, log S, molecular weight and toxicity risks) that were obtained for the target compounds, it must be noted that were estimated using bioinformatics in order to evaluate the compounds as possible drugs; thus, compound **3** offered the best drug score while the molecules **1** and **2** presented the worst values. In addition, the less drug score predicted for compounds **1** and **2** was considered a consequence of the high probability of irritant effects in these molecules. However, **1–2** gave the best parameters in the physicochemical properties prediction for a drug use.

Absorption and excretion models indicate that the exhibited human intestinal absorption for **1–4** have a probability of 1. Concerning the blood brain barrier, the compounds **1**, **2** and **4** showed medium absorption probability values. In respect to ligand **4** (a non-substrate), its bioavailability could be minor in comparison with the other studied molecules, limiting its biological activity. This result is in agreement with its lower activity value shown in cancer cells. Lastly, none of the molecules considered present inhibitory effects on the renal organic cation transporter.

Finally, the possible degradation pathways of **1–4** during human phase I and II metabolism were predicted. Molecule **4** corresponds to the less reactive compound, reflected in the number of predicted metabolites.

**Acknowledgments:** The authors mainly grant to PAPIIT UNAM IN221514-3, in addition to DGTIC-UNAM LANDCAD-UNAM-DGTIC-165, also René Escobedo CONACyT-México 24992 for the PhD scholarship. The authors also acknowledge the technical assistance of Moisés Hernández Duarte.

**Author Contributions:** R.E.-G., J.M.A.-H and M.I.N.-V. carried out theoretical calculations and analyzed the data; C.L.V.-R., E.M.-M., and R.M.-R. took part in discussion and helped in editing the manuscript. All authors read and approved the final version of the document.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.



## References

1. Nomenclature of Quinones with Isoprenoid Side-Chains. Available online: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/quinone.html> (accessed on 10 February 2016).
2. De la Loza, R.; Leopoldo. Discurso pronunciado por el catedrático de química medica de la Escuela de Medicin. In *Escritos de Leopoldo Río de la Loza*; Noriega, J.M., Ed.; Imprenta de Ignacio Escalante: México City, México, 1911; Volume 1, pp. 94–100.
3. Joseph-Nathan, P.; Santillan, R.L. The chemistry of perezone and its consequences. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1989**, *5*, 763–813.
4. Sánchez, I.H.; Yanez, R.; Enríquez, R.; Joseph-Nathan, P. Reaction mechanism change in the Lewis acid catalyzed perezone-pipitzol transformation. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2818–2819. [[CrossRef](#)]
5. Sánchez, I.H.; Basurto, F.; Joseph-Nathan, P. The stereocontrol of the perezone to pipitzol transformation. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 382–383. [[CrossRef](#)]
6. Rodríguez-Hernández, A.; Barrio, H.; Collera, O.; Enríquez, R.G.; Ortiz, B.; Sánchez-Obregón, R.; Yu, M. Isomerization of perezone into isoperezone and preparation of dihydroisoperezinone. *Nat. Prod. Lett.* **1994**, *4*, 133–139. [[CrossRef](#)]
7. Burgueño-Tapia, E.; Joseph-Nathan, P. <sup>13</sup>C-NMR substituent chemical shifts in hydroxyl-*p*-benzoquinones. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 390–393. [[CrossRef](#)]
8. Burgueño-Tapia, E.; Joseph-Nathan, P. Detailed studies of perezone rearrangements. *Monatsh. Chem./Chem. Mon.* **1997**, *128*, 651–658. [[CrossRef](#)]
9. Martínez, J.; Velasco-Bejarano, B.; Delgado-Reyes, J.F.; Pozas, R.; Torres Domínguez, H.M.; Trujillo-Ferrara, J.G.; Miranda, R. Eco-contribution to the chemistry of perezone, a comparative study, using different modes of activation and solventless conditions. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 1465–1468.
10. Enriquez, R.; Ortega, J.; Lozoya, X. Active components in *Perezia* roots. *J. Ethnopharmacol.* **1980**, *2*, 389–393. [[CrossRef](#)]
11. Alarcon-Aguilar, F.J.; Roman-Ramos, R.; Jimenez-Estrada, M.; Reyes-Chilpa, R.; Gonzalez-Paredes, B.; Flores-Saenz, J.L. Effects of three Mexican medicinal plants (*Asteraceae*) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *55*, 171–177. [[CrossRef](#)]
12. De La de Peña, A.; Izaguirre, R.; Baños, G.; Viveros, M.; Enríquez, R.G.; Fernández-G, J.M. Effect of perezone, aminoperezone and their corresponding isomers isoperezone and isoaminoperezone upon in vitro platelet aggregation. *Phytomedicine* **2001**, *8*, 465–468.
13. Sanchez-Torres, L.E.; Torres-Martínez, J.A.; Godinez-Victoria, M.; Omar, J.M.; Velasco-Bejarano, B. Perezone and its isomer isoperezone induce caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 614–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lozada, M.C.; Soria-Arteche, O.; Apan, M.T.R.; Nieto-Camacho, A.; Enríquez, R.G.; Izquierdo, T.; Jiménez-Corona, A. Synthesis, cytotoxic and antioxidant evaluations of amino derivatives from perezone. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5077–5084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Koulouri, S.; Malamidou-Xenikaki, E.; Spyroudis, S. Acid-catalyzed addition of indoles to hydroxyquinones. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10894–10902. [[CrossRef](#)]
16. Zhang, H.B.; Liu, L.; Chen, Y.J.; Wang, D.; Li, C.J. “On Water”-Promoted Direct Coupling of Indoles with 1, 4-Benzoquinones without Catalyst. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 869–873. [[CrossRef](#)]
17. Pliego, R.G.; Juan, E.R.; Miranda, R.; Villalobos-Molina, R.; Delgado, F.; Osnaya, R.; Ferrara, J.T. Vasodilator effects of bis-dihydropyridines structurally related to nifedipine. *Med. Chem.* **2006**, *2*, 527–534.
18. Velasco, B.; Trujillo-Ferrara, J.G.; Castillo, L.H.F.; Miranda, R.; Sánchez-Torres, L.E. In vitro apoptotic activity of 2,2-diphenyl-1,3, 2-oxazaborolidin-5-ones in L5178Y cells. *Life Sci.* **2007**, *80*, 1007–1013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Noguez, M.O.; García, A.; Ibarra, C.; Cabrera, A.; Aceves, J.M.; Nicolas, M.I.; Miranda, R. Green synthesis of bis-Biginelli esters, with vasodilatory effects, their mass spectrometric and physical studies. *Catalysts* **2009**, *4*, 6–10.
20. Reyes, L.; Corona, S.; Arroyo, G.; Delgado, F.; Miranda, R. Eco-Contribution for the production of *N*-arylnitrones: Solvent-Free and assisted by microwaves. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 2576–2583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Martínez, J.; Romero-Vega, S.; Abeja-Cruz, R.; Álvarez-Toledano, C.; Miranda, R. Green Approach-Multicomponent Production of Boron-Containing Hantzsch and Biginelli Esters. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 2903–2915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zarco Juarez, M.; Martínez, J.O.; Noguez Cordova, O.; Nicolás Vazquez, M.I.; Ramírez-Apan, T.; Pérez Flores, J.; Arroyo Razo, G.A. A green approach to the production of hybrid diindolylmethane-phenylboronic acids via a 3MCR: Promising antineoplastic molecules. *J. Chem.* **2013**, *2013*, 531208. [[CrossRef](#)]
23. Escobedo-González, R.G.; Pérez Martínez, H.; Nicolás-Vázquez, M.I.; Martínez, J.; Gómez, G.; Serrano, J.N.; Miranda Ruvalcaba, R. Green Production of Indolylquinones, Derivatives of Perezone, and Related Molecules, Promising Antineoplastic Compounds. *J. Chem.* **2016**, *2016*, 3870529. [[CrossRef](#)]
24. Karelson, M.; Lobanov, V.S.; Katritzky, A.R. Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1027–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[PubMed](#)]
26. Xu, J.; Hagler, A. Chemoinformatics and drug discovery. *Molecules* **2002**, *7*, 566–600. [[CrossRef](#)]
27. Kumar, A.; Mohan, C.G.; Mishra, P.C. Molecular electrostatic potential and field as descriptors of hydrogen bonding and molecular activity. Effects of hybridization displacement charge. *J. Mol. Struct. Theochem.* **1996**, *361*, 135–144. [[CrossRef](#)]
28. Politzer, P.; Laurence, P.R.; Jayasuriya, K. Molecular Electrostatic Potentials: An Effective Tool for the Elucidation of Biochemical Phenomena. *Environ. Health Persp.* **1985**, *61*, 191–202. [[CrossRef](#)]
29. OSIRIS Property Explorer. Actelion Pharmaceuticals Ltd.: Allschwil, Switzerland, 2010. Available online: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/> (accessed on 2 February 2016).
30. Escobedo-González, R.; Méndez-Albores, A.; Villarreal-Barajas, T.; Aceves-Hernández, J.M.; Miranda-Ruvalcaba, R.; Nicolás-Vázquez, M.I. Theoretical Study of 8-Chloro-9-Hydroxy-Aflatoxin B1, the Conversion Product of Aflatoxin B1 by Neutral Electrolyzed Water. *Toxins* **2016**, *8*, 225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Polkam, N.; Ramaswamy, V.R.; Rayam, P.; Allaka, T.R.; Anantaraju, H.S.; Dharmarajan, S.; Perumal, Y.; Gandamalla, D.; Yellu, N.R.; Balasubramanian, S.; et al. Synthesis, molecular properties prediction and anticancer, antioxidant evaluation of new edaravone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *10*, 2562–2568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Molinspiration cheminformatics. Available online: <http://www.molinspiration.com/> (accessed on 2 February 2016).
33. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 4–25. [[CrossRef](#)]
34. Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714–3717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tariq, M.; Sirajuddin, M.; Ali, S.; Khalid, N.; Tahir, M.N.; Khan, H.; Ansari, T.M. Pharmacological investigations and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) analyses of newly synthesized potentially bioactive organotin (IV) carboxylates. *J. Photochem. Photobiol. B* **2000**, *158*, 174–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Thasni, K.A.; Sivakumar, K.C.; Nair, R.S.; Banerji, A.; Somasundaram, V.; Srinivas, P. Structure activity relationship of plumbagin in BRCA1 related cancer cells. *Mol. Carcinogen.* **2003**, *52*, 392–403.
37. Yan, W.; Tu, B.; Liu, Y.Y.; Wang, T.Y.; Qiao, H.; Zhai, Z.J.; Tang, T.T. Suppressive effects of plumbagin on invasion and migration of breast cancer cells via the inhibition of STAT3 signaling and down-regulation of inflammatory cytokine expressions. *Bone Res.* **2013**, *1*, 362–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kaji, A.; Saito, R.; Nomura, M.; Miyamoto, K.I.; Kiriyama, N. Mechanism of the cytotoxicity of asterriquinone, a metabolite of *Aspergillus terreus*. *Anticancer Res.* **1996**, *17*, 3675–3679.
39. Li, X.; Zheng, S.L.; Li, X.; Li, J.L.; Qiang, O.; Liu, R.; He, L. Synthesis and anti-breast cancer activity of new indolylquinone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 42–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Klotz, L.O.; Hou, X.; Jacob, C. 1,4-Naphthoquinones: From oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. *Molecules* **2014**, *19*, 14902–14918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Jamal, M.S.; Parveen, S.; Beg, M.A.; Suhail, M.; Chaudhary, A.G.; Damanhour, G.A.; Rehan, M. Anticancer compound plumbagin and its molecular targets: A structural insight into the inhibitory mechanisms using computational approaches. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87309. [CrossRef] [PubMed]
42. Escobedo-González, R.G.; Bahena, L.; Arias Tellez, J.L.; Hinojosa Torrès, J.; Ruvalcaba, R.M.; Aceves Hernández, J.M. Characterization and comparison of perezone with some analogues. Experimental and theoretical study. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1097*, 98–105. [CrossRef]
43. Wang, X.D.; Li, C.Y.; Jiang, M.M.; Dong, Li.; Wen, P.; Song, X.; Zhang, J. Induction of apoptosis in human leukemia cells through an intrinsic pathway by cathachunine, a unique alkaloid isolated from *Catharanthus roseus*. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 641–653. [CrossRef] [PubMed]
44. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516.
45. Hongmei, Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. In *Apoptosis and Medicine*; Ntuli, T.M., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012.
46. Fulda, S.; Debatin, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **2006**, *25*, 4798–4811. [CrossRef] [PubMed]
47. Xu, M.; Liu, C.; Zhou, M.; Li, Q.; Wang, R.; Kang, J. Screening of Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interaction with Capillary Electrophoresis Frontal Analysis. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 8050–8057. [CrossRef] [PubMed]
48. Isabelle, M.; Moreel, X.; Gagné, J.P.; Rouleau, M.; Ethier, C.; Gagné, P.; Poirier, G.G. Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. *Proteome Sci.* **2010**, *8*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
49. East China University of Science and Technology, School of Pharmacy, ADMETSAR, Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, Laboratory of Molecular Modeling and Design. Available online: <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000> (accessed on 10 February 2016).
50. Pham The, H.; González-Álvarez, I.; Bermejo, M.; Mangas Sanjuan, V.; Centelles, I.; Garrigues, T.M.; Cabrera-Pérez, M.Á. In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach. *Mol. Inf.* **2011**, *30*, 376–385. [CrossRef] [PubMed]
51. Wang, Z.; Chen, Y.; Liang, H.; Bender, A.; Glen, R.C.; Yan, A. P-glycoprotein substrate models using support vector machines based on a comprehensive data set. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1447–1456. [CrossRef] [PubMed]
52. Broccatelli, F.; Carosati, E.; Neri, A.; Frosini, M.; Goracci, L.; Oprea, T.I.; Cruciani, G.A. Novel approach for predicting P-glycoprotein (ABC1) inhibition using molecular interaction fields. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1740–1751. [CrossRef] [PubMed]
53. Chen, L.; Li, Y.; Zhao, Q.; Peng, H.; Hou, T. ADME evaluation in drug discovery. 10. Predictions of P-glycoprotein inhibitors using recursive partitioning and naive Bayesian classification techniques. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 889–900. [CrossRef] [PubMed]
54. Didziapetris, R.; Japertas, P.; Avdeef, A.; Petrauskas, A. Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity. *J. Drug Targ.* **2003**, *11*, 391–406. [CrossRef] [PubMed]
55. Mishra, N.K.; Agarwal, S.; Raghava, G.P. Prediction of cytochrome P450 isoform responsible for metabolizing a drug molecule. *BMC Pharmacol.* **2010**, *10*, 8–18. [CrossRef] [PubMed]
56. Brown, C.M.; Reisfeld, B.; Mayeno, A.N. Cytochromes P450: A structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab. Rev.* **2008**, *40*, 1–100. [CrossRef] [PubMed]
57. Lewis, D.F.V. *Guide to Cytochromes P450: Structure and Function*; Taylor & Francis: London, UK, 2001.
58. Cheng, F.; Yu, Y.; Zhou, Y.; Shen, Z.; Xiao, W.; Liu, G.; Tang, Y. Insights into molecular basis of cytochrome p450 inhibitory promiscuity of compounds. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2482–2495. [CrossRef] [PubMed]
59. Hopkins, A.L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 682–690. [CrossRef] [PubMed]
60. Lahari, B.L.; Rajkumar, T.; Reddy, L.S.S.; Reddy, Y.S.R.; Sivudu, G.; Krishna, P.N. In-silico Design, Synthesis and Biological Evaluation of Some Michael Adducts from Chalcones. *Inventi Impact Med. Chem.* **2015**, *2015*, 119–132.
61. Van De Waterbeemd, H.; Gifford, E. ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 192–204. [CrossRef] [PubMed]
62. Parr, R.G.; Yang, W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1989.

63. Frisch, M.J.; Trucks, W.G.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; et al. *Gaussian 09 Revision D.01*; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA, 2013.
64. Becke, A.D.J. Density-Functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5656. [[CrossRef](#)]
65. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785. [[CrossRef](#)]
66. Gill, P.M.; Johnson, B.G.; Pople, J.A.; Frisch, M.J. The performance of the Becke-Lee-Yang-Parr (B-LYP) density functional theory with various basis sets. *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *197*, 499–505. [[CrossRef](#)]
67. London, F. Théorie quantique des courants interatomiques dans les combinaisons aromatiques. *J. Phys. Radium* **1937**, *8*, 397–409. [[CrossRef](#)]
68. Clark, T.; Chandrasekhar, J.; Spitznagel, G.W.; Schleyer, P.V.R. Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III. The 3-21 + G basis set for first-row elements, Li-F. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 294–301. [[CrossRef](#)]
69. Erdogdu, Y.; Tahir Güllüo-lu, M.; Kurt, M. DFT, FT-Raman, FT-IR and NMR studies of 2-fluorophenylboronic acid. *J. Raman. Spectrosc.* **2009**, *40*, 1615–1623. [[CrossRef](#)]
70. Gangadharan, R.P.; Krishnan, S.S. First Order Hyperpolarizabilities, NPA and Fukui Functions of Cyclohexanone by Density Functional Theory Method. *Acta. Phys. Pol. A* **2015**, *127*, 748–752. [[CrossRef](#)]
71. Hunter, C.A. Quantifying intermolecular interactions: Guidelines for the molecular recognition toolbox. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, *43*, 5310–5324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Kinoshita, T.; Nakanishi, I.; Warizaya, M.; Iwashita, A.; Kido, Y.; Hattori, K.; Fujii, T. Inhibitor-induced structural change of the active site of human poly (ADP-ribose) polymerase. *FEBS Lett.* **2004**, *556*, 43–46. [[CrossRef](#)]
73. Wang, Y.; Rosengarth, A.; Luecke, H. Structure of the human p53 core domain in the absence of DNA. *Acta Crystallogr. D* **2007**, *63*, 276–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Chou, J.J.; Li, H.; Salvesen, G.S.; Yuan, J.; Wagner, G. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* **1999**, *96*, 615–624. [[CrossRef](#)]
75. Ha, N.C.; Kim, J.S. Complex structure of BCL-XL and mutated BIM BH3 domain. Available online: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4YK9> (accessed on 10 February 2016).
76. Liu, W.; Ramagopal, U.A.; Zhan, C.; Bonanno, J.B.; Bhosle, R.C.; Nathenson, S.G.; Almo, S.C. Crystal structure of FASL and DcR3 complex. *Structure* **2016**, *24*, 2016–2023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Nemoviová, I.; Benedict, C.A.; Zajonc, D.M. Structure of human cytomegalovirus UL141 binding to TRAIL-R2 reveals novel, non-canonical death receptor interactions. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Graves, J.D.; Kordich, J.J.; Huang, T.H.; Piasecki, J.; Bush, T.L.; Sullivan, T.; O'Neill, J.W. Apo2L/TRAIL and the death receptor 5 agonist antibody AMG 655 cooperate to promote receptor clustering and antitumor activity. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 177–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Dutta, S.K.; Serrano, P.; Geralt, M.; Wuthrich, K. NMR structure of the SH3 domain of human RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1. Available online: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2M51> (accessed on 10 February 2016).
80. Suzuki, M.; Youle, R.J.; Tjandra, N. Structure of Bax: Coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **2000**, *103*, 645–654. [[CrossRef](#)]
81. Moldoveanu, T.; Liu, Q.; Tocilj, A.; Watson, M.; Shore, G.; Gehring, K. The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol. Cell* **2006**, *24*, 677–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [[CrossRef](#)]
83. Molegro, A.P.S. *MVD Molegro Virtual Docker 5.0*; Molegro: Aarhus C, Denmark, 2011.
84. DeLano, W.L. *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.3; Schrödinger LLC: San Carlos, CA, USA, 2002.
85. Feixiong, C.; Weihua, L.; Zhou, Y.; Shen, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Lee, P.W.; Tang, Y. admetSAR: A comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3099–3105.
86. Metaprint2D-React metabolic product predictor. Available online: <http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/metaprint2d-react> (accessed on 25 February 2016).

87. Correa-Basurto, J.; Bello, M.; Rosales-Hernandez, M.C.; Hernández-Rodríguez, M.; Nicolás-Vázquez, I.; Rojo-Domínguez, A.; Flores-Sandoval, C.A. QSAR, docking, dynamic simulation and quantum mechanics studies to explore the recognition properties of cholinesterase binding sites. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *209*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Boyer, S.; Arnby, C.H.; Carlsson, L.; Smith, J.; Stein, V.; Glen, R.C. Reaction site mapping of xenobiotic biotransformations. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 583–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Piechota, P.; Cronin, M.T.; Hewitt, M.; Madden, J.C. Pragmatic approaches to using computational methods to predict xenobiotic metabolism. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 1282–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Boyer, S.; Zamora, I. New methods in predictive metabolism. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 403–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Braga, R.C.; Alves, V.M.; Fraga, C.A.; Barreiro, E.J.; de Oliveira, V.; Andrade, C.H. Combination of docking, molecular dynamics and quantum mechanical calculations for metabolism prediction of 3,4-methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazone. *J. Mol. Model.* **2012**, *18*, 2065–2078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Sample Availability:** Not available.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).