

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

CARRERA DE FARMACIA

**DISEÑO RACIONAL DE ÉSTERES DERIVADOS DE
BENZOTIAZOL COMO POSIBLES ANTIFÚNGICOS
INHIBIDORES DE LA N-MIRISTOILTRANSFERASA PARA EL
USO EN PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA CONTRA EL
HONGO *ASPERGILLUS FUMIGATUS***

Tesis para optar por el grado de Licenciatura

Tutor:

HERNÁNDEZ FLORES, WIGBERTO

Lector:

RODRÍGUEZ ARTAVIA, HEYNER

BLANCO CASTRO, ALLISON NATASHA

San José, Agosto, 2017

CONTENIDO

CAPITULO I. INTRODUCCION

Planteamiento del problema	1
Hipótesis	4
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Justificación	5
Antecedentes	7
Internacionales	8
Nacionales	16
Proyecciones	16
Limitaciones	17

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

Implicaciones de la Contaminación Fúngica en Cuartos Limpios	18
Microorganismos fúngicos	18
Contaminantes biológicos en cuartos limpios	20
Sistemas HVAC como principal fuente de contaminación fúngica en cuartos limpios	24
Uso de desinfectantes en cuartos limpios	27
Infecciones Causadas por <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
Patogenia	29
Manifestaciones clínicas	31
Tratamiento farmacoterapéutico de la aspergilosis	32
Mecanismo de resistencia de <i>Aspergillus fumigatus</i> basado en cyp51A	34
N-Miristoiltransferasa como un Objetivo Fungicida	35
Generalidades de las enzimas	35
Mecanismo catalítico de la N-miristoiltransferasa	36
Inhibidores de la N-miristoiltransferasa	39
Derivados de Benzotiazoles	41
Actividad biológica de los benzotiazoles	42

Técnicas Virtuales en el Desarrollo de Drogas	45
Objetivo macromolecular	49
Descriptores Moleculares	50
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	
Enfoque	58
Diseño	58
Objetos de estudio	59
Variables	59
Instrumentos	63
Proceso para la Recolección y el Análisis de Datos	65
Determinación del acople molecular	65
Estimación de propiedades fisicoquímicas	66
Estimación de permeabilidad dérmica	66
Diseño de modificación racional	66
Predicción de la toxicidad ecológica	66
CAPITULO IV. ANALISIS DE RESULTADOS	
Selección del Objetivo Macromolecular	67
Definición del sitio de unión	68
Generación de la Molécula <i>Hit</i>	70
Análisis de parámetros fisicoquímicos y toxico-ecológicos	73
Análisis del acople molecular	77
Optimización de la Molécula <i>Hit</i>	84
Características de la superficie de interacción	84
Cambios estructurales	87
Análisis de parámetros fisicoquímicos y toxico-ecológicos	96
CAPITULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
Conclusiones	105
Recomendaciones	105
REFERENCIAS	106
APENDICES	117

Contenido de Figuras

Figura 1. Estructuras de los antifúngicos utilizados en la aspergilosis	32
Figura 2. Ciclo catalítico de la NMT	37
Figura 3. Modificación cotraduccional y postraduccional catalizada por la NMT	38
Figura 4. Estructura del RO-09-4879	40
Figura 5. Estructura del benzotiazol	42
Figura 6. Medicamentos derivados de benzotiazol actualmente comercializados	43
Figura 7. Estructura del FTR1335	45
Figura 8. Diagrama del sitio de unión de un objetivo macromolecular	49
Figura 9. Ecuación para la estimación del LogKp	52
Figura 10. Estructura cristalográfica de la N-miristoiltransferasa de <i>Aspergillus fumigatus</i> visualizada en BIOVA Discovery Studio	67
Figura 11. Sitio de unión del objetivo macromolecular utilizando CASTp	68
Figura 12. Gridbox del objetivo macromolecular NMTAf	69
Figuras 13 y 14. Sitio de unión de la Miristoil-CoA con la NMT de <i>Aspergillus fumigatus</i> y con la NMT de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
Figura 15. Estructura del ácido mirístico y de la miristoil-CoA	71
Figura 16. Esteres derivados de benzotiazol 2-sustituidos: Serie CBX y Serie YLA	71
Figura 17. Transporte activo de moléculas anfífilicas mediado por P4-ATPasas	72
Figura 18. Residuos involucrados en la interacción entre la NMTAf y el RO-09-4879 ($\Delta = -9.8$ kcal/mol)	78
Figura 19. Distancia de enlaces (Å) y residuos involucrados en la interacción entre la NMTAf y el 8YLA ($\Delta = -7.6$ kcal/mol)	80
Figura 20. Tipo de interacciones intermoleculares involucradas en la unión del 8YLA con la NMTAf	80
Figura 21. Distancia de enlaces (Å) y residuos involucrados en la interacción entre la NMTAf y el 10 YLA ($\Delta = -7.6$ kcal/mol)	81

Figura 22. Tipo de interacciones intermoleculares involucradas en la unión del 10YLA con la NMTAf	81
Figura 23. Estructura del ácido mirístico y del 10YLA	82
Figura 24. Residuos involucrados en la interacción entre el 10BTA y la NMTAf	83
Figura 25. Superficie de interacción por puentes de hidrogeno de la NMTAf	84
Figura 26. Superficie de interacción hidrofóbica de la NMTAf	85
Figura 27. Superficie de interacción aromática de la NMTAf	86
Figura 28. Superficie ionizable de la NMTAf	87
Figura 29. Estructura del 10YLA con numeración según la IUPAC	88
Figura 30. Estructura de la morfina y de la codeína	90
Figura 31. Reduccion de grupo nitro y formación de complejos	91
Figura 32. Análogo del 10YLA con instauración en posición 5 de la cadena hidrocarbonada: (5C)10YLA	93
Figura 33. Hidrolisis del 3NOH(5C)10YLA catalizada por bacterias	99
Figura 34. Residuos involucrados y distancias de enlace de las interacciones intermoleculares entre la NMTAf y el R3NOH(5C)10YLA	102
Figura 35. Residuos involucrados y distancias de enlace de las interacciones intermoleculares entre la NMTAf y el S3NOH(5C)10YLA	103
Figura 36. Tipos de fuerzas intermoleculares involucradas en la unión entre la NMTAf y el R3NOH(5C)10YLA	103
Figura 37. Tipos de fuerzas intermoleculares involucradas en la unión entre la NMTAf y el S3NOH(5C)10YLA	104

Contenido de Graficos

Gráficos 1 y 2. Coeficiente de reparto o/w (izquierda) y coeficiente de solubilidad acuosa (derecha) según número de carbonos de la cola lipofílica de los esteres derivados de benzotiazol	74
Gráfico 3. Coeficiente de permeabilidad dérmica según número de carbonos de la cola lipofílica de los esteres derivados de benzotiazol	74
Gráficos 4, 5 y 6. LC50 y EC50 según número de carbonos en la cola lipofílica de los ésteres derivados de benzotiazol	76
Gráficos 7, 8 y 9. ChV según número de carbonos en la cola lipofílica de los ésteres derivados de benzotiazol	76
Gráfico 10. Energía libre de Gibbs según número de carbonos de la cola lipofílica de los ésteres derivados de benzotiazol	79
Gráfico 11. Energía libre de Gibbs según la posición de las sustituciones estructurales en el benceno	92
Gráfico 12. Energía libre de Gibbs de la interacción entre la NMTA <i>f</i> con el <i>hit</i> y con análogos insaturados	94
Gráficos 13 y 14. Energía libre de Gibbs según sustituciones estructurales en la cadena hidrocarbonada: posición 2 (izquierda) y posición 3 (derecha)	95
Gráficos 15 y 16. Variación de coeficientes fisicoquímicos según el proceso de optimización: LogP (izquierda) y LogS (derecha)	97
Gráfico 17. Variación del coeficiente de permeabilidad dérmica según el proceso de optimización	97
Gráfico 18. Parámetros de toxicidad ecología de las estructuras optimizadas derivadas del 10YLA	98
Gráficos 19 y 20. Comparación de toxicidad acuática aguda (izquierda) y crónica (derecha) del 3NOH(5C)10YLA y el 2BTOL	100
Gráficos 21 y 22. Comparación de toxicidad acuática aguda (izquierda) y crónica (derecha) del 3NOH(5C)10YLA y el AC3NOH(5C)10	100

Contenido de Tablas

Tabla 1. Definición de las variables de la investigación	60
Apéndice A. Aminoácidos constituyentes del sitio de unión	117
Apéndice B. Estructuras de los esteres derivados de benzotiazol	118
Apéndice C. Parámetros fisicoquímicos	124
Apéndice D. Estimaciones ECOSAR	125
Apéndice E. Resultados de acople molecular	126

RESUMEN

La presente investigación se centró en diseñar, racionalmente, esteres derivados de benzotiazol como posibles antifungicos inhibidores de la N-miristoiltransferasa para uso en procedimientos de limpieza contra el hongo *Aspergillus fumigatus*; con el propósito de abordar el problema de contaminación fúngica en cuartos limpios, donde se realizan procesos críticos como las plantas de manufacturación de medicamentos, o bien, en espacios destinados para procedimientos intrahospitalarios tales como trasplantes, transfusiones, entre otros.

El estudio se caracteriza por exhibir un enfoque de tipo cuantitativo, ya que, se demostró la hipótesis planteada por medio del seguimiento de una serie de procesos en forma secuencial, utilizando como método la medición de variables y, finalmente, produciendo resultados probatorios a través de un diseño experimental.

Como principal conclusión, se destaca que se seleccionó como prototipo antifúngico para la inhibición de la N-Miristoiltransferasa del hongo *Aspergillus fumigatus* el 1,3-benzotiazol-2-il(5Z)-3-(N-hidroxiamino)-5-decaenoato, de acuerdo con los razonamientos planteados a través del proceso de investigación. Además, se recomienda extender los estudios con esteres derivados de benzotiazol debido a la necesidad de continuar el proceso iniciado por medio de esta investigación a través de ensayos *in vivo*, específicamente, pruebas microbiológicas de determinación de concentración mínima inhibitoria, con la finalidad de demostrar los resultados obtenidos.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación se ha seccionado en diferentes capítulos; el primero es una sección introductoria.

Planteamiento del problema

El presente apartado tiene como objetivo afinar y estructurar, formalmente, la idea de investigación, por lo que se explican –brevemente- distintas razones por las cuales es importante explorar el tema propuesto. Cabe mencionar que: “La investigación es el conjunto de procesos sistemáticos, críticos y empíricos que se aplican al estudio de un fenómeno o un problema.” (Hernández, Fernández, Baptista, 2014, p.4)

Actualmente, los microorganismos incluidos en especies fúngicas se han convertido en una de las principales causas de inconformidades en cuanto a la calidad del aire interior. Los hongos están frecuentemente implicados como un agente causal del "síndrome del edificio enfermo", por lo que la contaminación fúngica de ambientes interiores ha sido vinculada con problemas de salud específicos como las micosis. Más de 80 géneros de hongos se han asociado con problemas respiratorios, entre los más comunes se encuentra el género *Aspergillus*. (Rogawansamy, Gaskin, Taylor y Pisaniello, 2015, p.6320)

Remediar la contaminación por hongos, en ambientes interiores, requiere suprimir las especies presentes en estos; además, la modificación del ambiente interior tornándolo menos favorable para el crecimiento de los microorganismos fúngicos. Esto incluye técnicas de tratamiento de espacios interiores mediante el uso de agentes antifúngicos y abordar la prevención del crecimiento futuro. Sin embargo, hoy en día existen pocos datos publicados sobre los agentes químicos adecuados para eliminar especies fúngicas específicas. (Rogawansamy, et al., 2015, p.6319)

Independientemente del avance considerable en el campo de la terapia antimicrobiana, las enfermedades infecciosas causadas por bacterias u hongos siguen siendo un reto importante. Por lo tanto, existe una necesidad, cada vez mayor, de desarrollar nuevas moléculas con mejor perfil antimicrobiano; para ello, se han empleado diferentes métodos de diseño racional modificando la estructura base de sustancias activas o sintetizando moléculas híbridas que tienen efecto sinérgico a través de la combinación de diferentes farmacóforos para potenciar el efecto antibacteriano y antifúngico. (Gill, Rawall, y Bariwal, 2015, p.156)

Actualmente, el número de agentes quimioterapéuticos para combatir las micosis es escaso, debido a que presentan limitaciones como efectos secundarios profundos, un reducido espectro antimicótico, poca perfusión a través de los tejidos y mutaciones generadoras de especies resistentes por selección biológica. Identificar los puntos de acción idóneos en especies fúngicas resulta difícil, ya que, son organismos eucariotas; por ello, diversos procesos celulares y moleculares presentan semejanza con los del ser humano, en consecuencia, suele haber homología extensa entre genes y proteínas. (Brooks, et al., 2014, p.704)

En las dos últimas décadas, los hongos representan una causa importante del desarrollo de infecciones patógenas en el ser humano, afectan -en su mayoría- a sujetos inmunodeprimidos u hospitalizados con padecimientos subyacentes graves; actúan como patógenos oportunistas produciendo una considerable morbimortalidad. La incidencia a nivel mundial de las infecciones micóticas de carácter invasivo y el listado de patógenos fúngicos oportunistas, se incrementa con el paso del tiempo. (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2008, p.67)

El aumento del número de infecciones por hongos puede atribuirse al número creciente de pacientes inmunodeprimidos, como los sujetos receptores de un trasplante, los afectados por un síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), los quejados de cáncer y los sometidos a quimioterapia, así como las personas hospitalizadas con otros trastornos graves de base y las que se someten a diversas intervenciones invasivas. (Murray, et al., 2008, p.67)

Recientemente, la incidencia de infecciones fúngicas invasivas y la mortalidad asociada ha aumentado de forma alarmante; sobresale que especies tales como *Candida albicans* (tasa de mortalidad: 20-40%), *Cryptococcus neoformans* (tasa de mortalidad: 20-70%) y *Aspergillus*

fumigatus (Tasa de mortalidad: 50-90%) han sido identificadas como tres de las principales causantes de infecciones fúngicas invasivas. (Liu, et al., 2013, p.1551)

Con el aumento continuo del número de pacientes inmunocomprometidos, los hospitales se enfrentan al creciente problema de la aspergilosis invasiva y otras infecciones oportunistas. Debido a que el tratamiento de la aspergilosis es difícil y el resultado es, a menudo, fatal, la monitorización y el tratamiento preventivo de los contaminantes microbianos en aire resulta de gran importancia para el control de la aspergilosis invasiva.

“La aspergilosis representa la infección micelial invasiva más frecuente en el mundo.” (Brooks, et al., p.717) En las fuentes consultadas, se expone que el *Aspergillus spp.* junto a otros tres géneros -*Candida*, *Cryptococcus*, y *Pneumocystis*- representan más del 90% de las infecciones fúngicas de carácter invasivo a nivel mundial. Además, se estima que la aspergilosis invasiva, a causa de *Aspergillus fumigatus*, afecta a más de 200 000 personas alrededor del mundo por año y que otros 3 000 000 se perjudican patológicamente con la aspergilosis pulmonar crónica. (Fang, et al., 2015, p.1425)

En la terapia farmacológica, existen cuatro clases de agentes antifúngicos, polienos (p.ej. anfotericina B), 5-fluorocitosina, azoles (p.ej. fluconazol, itraconazol y voriconazol) y equinocandinas (p.ej. caspofungina y micafungina) frecuentemente utilizados para el abordaje terapéutico de infecciones fúngicas de carácter sistémico. Sin embargo, dichos agentes antifúngicos han alcanzado niveles de éxitos limitados en cuanto a la resistencia severa, al espectro de acción limitado, la falta de eficacia clínica, la elevada toxicidad, la farmacocinética poco óptima y la producción de interacciones medicamentosas. Por ejemplo, la anfotericina B es considerada altamente nefrotóxica y los azoles están experimentando resistencia severa en organismos clínicamente significativos. (Liu, et al., 2013, p.1551)

Con base en las consideraciones anteriores, se hace evidente que existe una necesidad crítica por desarrollar nuevos compuestos antifúngicos; específicamente, sustancias que puedan ser utilizadas en procedimientos de limpieza, ya que, es la opción más efectiva para evitar consecuentes problemas de salud a causa de organismos fúngicos en poblaciones susceptibles.

Hoy en día, el descubrimiento de nuevas sustancias es un esfuerzo muy complejo, que incluye la identificación de objetivos, la optimización de moléculas, los ensayos clínicos y

preclínicos. Además, las propiedades de toxicidad y la evaluación del riesgo ambiental de los candidatos a fármacos, pesticidas y productos químicos industriales juegan un papel clave en el descubrimiento de sustancias novedosas.

En décadas anteriores, un número escaso de sustancias estudiadas de cientos de candidatos, finalmente, llegaron al mercado debido a la alta tasa de fracaso en los ensayos clínicos. Se destacan como causas principales la falta de eficacia y la gran toxicidad; asimismo, aproximadamente el 50% de los compuestos terapéuticos potenciales fueron retirados del mercado debido a la producción de efectos secundarios inaceptables y a la posesión de propiedades deficientes. Actualmente, el porcentaje de sustancias novedosas que fallan debido a las malas propiedades fisicoquímicas, de afinidad y toxicológicas ha disminuido considerablemente y es, aproximadamente, del 8%. Esto se debe a que el filtrado a través de descriptores y la optimización de propiedades, en la etapa temprana del descubrimiento de drogas, se investigan con mayor atención comparado con épocas pasadas. (Cheng, et al., 2012, p.3099)

Después de lo expuesto, surge la pregunta central de la investigación, la cual corresponde a: ¿Es un éster derivado de benzotiazol un posible antifúngico inhibidor de la N-Miristoiltransferasa que podría ser utilizado en procedimientos de limpieza contra el hongo *Aspergillus fumigatus*?

Hipótesis

Un éster derivado de benzotiazol es un posible antifúngico inhibidor de la N-Miristoiltransferasa que podría ser utilizado en procedimientos de limpieza contra el hongo *Aspergillus fumigatus*.

Objetivo general

Diseñar, racionalmente, ésteres derivados de benzotiazol como posibles antifúngicos inhibidores de la N-miristoiltransferasa para uso en procedimientos de limpieza contra el hongo *Aspergillus fumigatus*.

Objetivos específicos

- Generar diversas estructuras de esteres derivados de benzotiazol con posible actividad antifúngica.
- Analizar el acople molecular entre la N-Miristoiltransferasa del hongo *Aspergillus fumigatus* y los esteres derivados de benzotiazol.
- Estimar propiedades fisicoquímicas basadas en la estructura de los esteres derivados de benzotiazol.
- Evaluar el impacto en ambientes acuáticos según la estructura de los derivados de ester de benzotiazol.
- Seleccionar un éster derivado de benzotiazol como un prototipo antifúngico para la inhibición de la N-Miristoiltransferasa del hongo *Aspergillus fumigatus*.

Justificación

En esta sección, se justificará el estudio mediante la exposición de razones por las cuales la investigación debe efectuarse y se menciona su la utilidad.

La investigación resulta conveniente debido a que, según la terapéutica actual, existe un déficit en cuanto a las alternativas farmacológicas para tratar infecciones invasivas causadas por

Aspergillus fumigatus; por lo que se pretende analizar, mediante técnicas virtuales, el potencial presente en los derivados de ester de benzotiazol como posibles agentes antifungicos, los cuales puedan ser utilizados en la prevención del desarrollo de contaminación microbiológica en cuartos limpios. Cabe destacar que: “los benzotiazoles tienen un perfil biológico prometedor y son de fácil acceso, lo que hace de este farmacóforo un resto interesante para el diseño de nuevos benzotiazoles” (Gill, et al., 2015, p.155)

Haciendo énfasis en la relevancia social, la propuesta tiene como fundamento el desarrollo de compuestos con potencial a convertirse en agentes antifúngicos mediante evidencia probatoria.

Los primeros pasos más frecuentes en el desarrollo de una nueva droga son el descubrimiento de molecular con potencial actividad y la identificación de un nuevo objetivo biológico. Al diseñar una molécula innovadora, los pasos subsiguientes intentan comprender las interacciones entre la droga y sus blancos biológicos. La aplicación repetida de este enfoque tiene como resultado la obtención de compuestos con eficacia, potencia y selectividad crecientes. (Katzung, et al., 2013, p. 69)

En las últimas décadas, los problemas de infecciones resistentes frente a múltiples fármacos han alcanzado un nivel alarmante alrededor del mundo, debido al creciente desarrollo de mecanismos de resistencia en especies clínicamente significativas, frente a una gran variedad de agentes antimicrobianos como los antifúngicos. (Rangappa, et al., 2015, p.208)

Para superar los inconvenientes de las drogas actuales y obtener drogas más eficaces, es esencial el desarrollo de agentes quimioterapéuticos con un nuevo mecanismo de acción. Uno de estos objetivos que ha sido identificado recientemente para el desarrollo de agentes antifúngicos es la proteína N-miristoiltransferasa (NMT). (Prasad, Toraskar y Kadam, 2008, p.142)

Es evidente entonces que, como implicación práctica, la investigación tiene la inquietud de ayudar a resolver un problema real, el cual corresponde a la inexistente posibilidad de abodar infecciones fúngicas invasivas mediante terapias farmacológicas con antimicrobianos; dado que a través del análisis de un objetivo biológico novedoso se pretenden desarrollar agentes antifúngicos que puedan ser utilizados como alternativas en la limpieza con la finalidad de evitar el crecimiento

de patógenos, los cuales difieren en la estructura con respecto a los actualmente comercializados, y han sido desarrollados como inhibidores de un objetivo macromolecular novedoso, correspondiente a la enzima N-miristoiltransferasa (NMT).

Como valor teórico, se destaca que este proyecto representa un tema innovador; brinda un avance en la calidad terapéutica en cuanto a la actividad antimicrobiana de moléculas novedosas, por ello, se ofrece la posibilidad de una exploración fructífera y sugiere ideas, recomendaciones o hipótesis para futuros estudios. Resulta oportuno mencionar que moléculas con potencial terapéutico deben ser sometidas a experimentación, proveyendo fundamento para la comprobación de los efectos farmacológicos de dichas identidades.

De todas las vías abiertas durante el periodo moderno, una acabaría imponiéndose claramente sobre todas las demás. Fue la experimental, la que partía del principio de que nada podía considerarse terapéutico si antes no había demostrado su eficacia, y que esta solo podía conocerse a través de experimentos especialmente diseñados para ese fin. (Lorenzo, et al., 2009, p.5)

Como utilidad metodológica, se destaca que estudios *in silico* proporcionarían evidencia para introducir esteres derivados de benzotiazol en la investigación y desarrollo de nuevas drogas como posibles antifúngicos inhibidores de la N-miristoiltransferasa. De esta forma, se brindan alternativas diferentes a las actualmente comercializadas en cuanto a los agentes para combatir microorganismos fúngicos invasores en cuartos limpios e infectantes de pacientes inmunosupresos, tal como es *Aspergillus fumigatus*.

Antecedentes

Para profundizar en la idea de investigación, es necesario revisar trabajos anteriores concernientes con el tema en estudio; por lo tanto, en el presente apartado se mencionarán las fuentes de información relacionadas con el tema de investigación, obtenidas a partir de las bases de datos académicos: EPSCO, EMBASE via OVID, MEDLINE via OVID, PubMed y de la

Biblioteca Nacional de Salud y Seguridad Social [BINASSS], las cuales mantienen dentro de su colección publicaciones científicas actuales. Además, se realizaron diversas búsquedas en la revista Journal of Medicinal Chemistry y en el Journal of Biological Chemistry.

Los antecedentes fueron clasificados en internacionales y nacionales. Además, la sección de internacionales se subdividió en tres categorías: contaminación fúngica en cuartos limpios, N-miristoiltransferasa como objetivo antifúngico y actividad antimicrobiana de los benzotiazoles, con la finalidad de presentar la información ordenada.

Internacionales

Desde el siglo XVII, se utilizan drogas en el abordaje de patologías infecciosas; por ejemplo, la quinina -empleada para tratar el paludismo- o la emetina para combatir la amebiasis. Sin embargo, el inicio de la farmacoterapia como ciencia clínica se dio durante el primer decenio del siglo XX, al ser reconocidos una serie de principios, tales como la toxicidad selectiva, la interacción química específica de microorganismos patógenos con las drogas y el surgimiento de la resistencia farmacológica. (Brooks, Carroll, Butel, Morse, y Mietzner, 2014, p. 371)

Contaminación fúngica en cuartos limpios

Durante los últimos 20 años, la FDA (Food and Drug Administration) ha evidenciado múltiples situaciones en las que medicamentos contaminados han producido daños significativamente graves en los pacientes, los cuales -en algunos casos- demostraron ser potencialmente fatales. Los productos comercializados como formas farmacéuticas para uso inyectable son los mayormente implicados. Por ejemplo, en el año 2012, la FDA y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) identificaron contaminación microbiana en viales no abiertos de soluciones de betametasona y triamcinolona distribuidas y, posteriormente, retiradas del mercado. Entre los microorganismos identificados se encuentra el *Aspergillus fumigatus*. (FDA, 2017)

Por otra parte, las infecciones fúngicas nosocomiales de carácter invasor, particularmente la aspergilosis, son un problema progresivo en pacientes inmunocomprometidos. Por ello, Martínez

y otros (2016) realizaron un estudio evaluando la diversidad y presencia de hongos en muestras de aire de dos hospitales. Los resultados mostraron 3 géneros fúngicos más abundantes: *Penicillium*, *Cladosporium* y *Aspergillus*. Además, la prueba de termotolerancia confirmó la identificación de la sección *Fumigati* de *A. fumigatus*. Para concluir, destacan que la importancia de los hallazgos reside en que todas las especies identificadas tienen potencial patógeno, especialmente la especie *A. fumigatus*. Los resultados se han publicado a través del artículo científico titulado “Fungal diversity and *Aspergillus* in hospital environments” (Diversidad de hongos y *Aspergillus* en ambientes hospitalarios). (Martínez, et al., 2016)

En Holanda, se realizó un estudio retrospectivo de cohorte en una Unidad de Cuidados Intensivos. Pacientes de la UCI fueron tratados por sospecha de aspergilosis invasiva y en ellos se cultivó *Aspergillus fumigatus*. Los hallazgos se dieron a conocer mediante la publicación “Emerging aspergillosis by azole-resistant *Aspergillus fumigatus* at an intensive care unit in the Netherlands, 2010 to 2013” (Aspergilosis emergente por *Aspergillus fumigatus* resistente a azoles en una unidad de cuidados intensivos en Holanda 2010 a 2013). Entre las principales conclusiones, destacan la muerte, a los 90 días, de los 10 pacientes identificados con el cuadro de aspergilosis invasiva a causa de *A. fumigatus* azol-resistente fue del 100% (con un 90% dentro de los 30 días después de la admisión en la UCI). (Paassen, Russcher, Wingerden, Verweij, y Kuijper, 2015)

Tong y otros (2016) investigaron las características de distribución de los hongos mediante el análisis de cuatro departamentos constituyentes de un hospital, incluyendo la Unidad de Terapia Intensiva Respiratoria, la Unidad de Cuidados Intensivos, el Servicio de Emergencias y el Departamento de Pacientes Ambulatorios. Como principal hallazgo, destacan que la prevalencia de *Aspergillus*, entre las especies de hongos identificadas, fue la más alta, aproximadamente del 17% al 61%, y la prevalencia de *Aspergillus fumigatus* entre las especies de *Aspergillus* fue del 34% al 50% en los cuatro departamentos del hospital. Los resultados se encuentran en el artículo “High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing based microbiome analysis” (Gran diversidad de hongos en el aire en el ambiente hospitalario, como lo revela el análisis de microbiomas basado en meta-secuenciación). (Tong, et al., 2016)

Pérez y otros, en la publicación titulada “Invasive Aspergillosis in Kidney Transplant Recipients: A Cohort Study” (Aspergilosis Invasiva en Recipientes de Trasplante de Riñón: Un Estudio de Cohorte), destacan que las infecciones son la segunda causa más alta de mortalidad en

los receptores de trasplante renal, con un aumento de la incidencia debido a varios factores, principalmente relacionados con los estados de inmunosupresión; indican que -mediante varios estudios- se han informado incidencias invasivas de infección fúngica entre 1,4% y 9,4% en receptores de trasplante de riñón. La frecuencia de aspergilosis invasiva oscila entre un 0,5% y un 2,2%, con una tasa de mortalidad de más del 88%. (Pérez, et al., 2014)

Bonnal y otros realizan una publicación titulada “Relationship between Fungal Colonisation of the Respiratory Tract in Lung Transplant Recipients and Fungal Contamination of the Hospital Environment” (Relación entre la Colonización Fúngica del Tracto Respiratorio en los Receptores de Trasplante Pulmonar y la Contaminación Fúngica del Medio Ambiente del Hospital), En ella, dieron a conocer los resultados de un estudio con 44 pacientes receptores de trasplante de pulmón, examinados semanalmente, para identificar la colonización de *Aspergillus* durante la totalidad de la estancia hospitalaria. Un total de 12 pacientes (27%) experimentaron colonización transitoria por *Aspergillus*, lo cual ocurrió entre la 1-13 semana después del trasplante de pulmón, sin manifestar sintomatología asociada con un cuadro de aspergilosis. Las especies más frecuentes causantes de los procesos infecciosos fueron *A. fumigatus* y *A. niger*, las cuales afectan a un total de 6 pacientes y 3 pacientes, respectivamente. (Bonnal, et al, 2015)

Caggiano y otros realizaron un estudio, cuya publicación se conoce como: “Mold contamination in a controlled hospital environment: a 3-year surveillance in southern Italy” (Contaminación del moho en un ambiente hospitalario controlado: una vigilancia de tres años en el sur de Italia). Analizaron un total de 465 muestras, de las que 61 fueron positivas para el crecimiento de moho (13.1%): 18 de ambientes controlados (18/81; 22.2%) y 43 muestras de quirófanos (43/384; 11.2%). En la sala de operaciones de oftalmología, se registró la mayor carga de unidades formadoras de colonias por metro cúbico, (u.f.c./m³); mientras que la sala de onco-hematología pediátrica tuvo la carga de hongos aéreos más alta de todas las salas: 47 u.f.c./m³. Los hongos más comunes, identificados en el aire, fueron *Aspergillus spp*, *Penicillium spp* y *Paecilomyces spp*, con un total de 91,8%, 6% y 1.5%, respectivamente. Durante el período de estudio, la especie *Aspergillus fumigatus* fue el patógeno fúngico mayormente aislado, correspondiendo a un 68,5% del total de aislamientos. (Caggiano, et al., 2014)

N-miristoiltransferasa como objetivo antifúngico

La N-Myristoyltransferasa ha sido un nuevo objetivo prometedor para el diseño de nuevos agentes antifúngicos con un mecanismo distinto de acción al de los actualmente comercializados. Prominentes programas de investigación y desarrollo de inhibidores NMT, como molecular antifúngicas, fueron lanzados por Pfizer y Roche en la década de los 90s, posterior al descubrimiento y la caracterización de NMT en levaduras patógenas realizada por Gordon, et al., en el año 1989. (Wright, et al., 2010, p.27)

En el 2007, métodos de acoplamiento molecular y relación de actividad de estructura cuantitativa tridimensional (3D-QSAR) fueron aplicados a un conjunto de nuevos inhibidores derivados de benzotiazol determinando la actividad en la *Candida albicans* N-miristoiltransferasa (CaNmt). El modo de unión de los compuestos en el sitio activo de CaNmt se exploró usando un método de acoplamiento flexible y se observaron diversas interacciones hidrofóbicas e hidrófilicas entre los inhibidores de benzotiazol y la enzima. (Sheng, et al., 2007)

Fang y otros demuestran, a través de la publicación “N-Myristoyltransferase Is a Cell Wall Target in *Aspergillus fumigatus*” (N-Miristoiltransferasa es un blanco de la pared celular en *Aspergillus fumigatus*), que el patógeno fúngico *Aspergillus fumigatus* posee una enzima NMT activa esencial para la supervivencia. Además, a través de cribado de virtual, se condujo al descubrimiento de un compuesto de pirazol sulfonamida que inhibe la enzima, presenta aplicaciones fungicidas junto a un complejo cristalográfico, el cual muestra la unión del inhibidor en la cavidad del sustrato peptídico. Proporcionan evidencia de que la NMT es una potencial diana para atacar al patógeno *Aspergillus fumigatus*. (Fang, et al., 2015)

Yamasaki y otros produjeron la optimización de un compuesto *hit* débil, derivado de benzotiazol. Los resultados fueron expuestos a través del artículo científico titulado “Synthesis of potent and selective inhibitors of *Candida albicans* N-myristoyltransferase based on the benzothiazole structure” (Síntesis de inhibidores potentes y selectivos de *Candida albicans* N-miristoiltransferase basado en la estructura de benzotiazol). En la publicación se indica que varios compuestos mostraron una alta potencia contra la N-miristoiltransferasa; los resultados demuestran la relación estructura-actividad (SAR) y las actividades antifúngicas de una serie de

nuevos derivados de 2-aminobenzotiazoles inhibidores de la N-miristoiltransferasa. (Yamasaki, et al., 2005)

Masubuchi y otros descubrieron uno de los más potentes inhibidores de la N-miristoiltransferasa de *Candida albicans* desarrollados hasta el momento: el [3-(3-metil-2-[(2,3,4-trifluorofenoxy)metil]-1-benzofuran-4-yl)oxy)propil][(piridin-3yl)metil]amina identificado con el código RO-09-4879. Destacan entre los resultados que presenta una IC₅₀ en la NMT de *C. albicans* igual a 0.0057 μM y una IC₅₀ en la NMT humana >430 μM, lo cual evidencia una alta selectividad por la enzima del patógeno fungico. Además, la eficacia se demostró mediante la estimación de la dosis efectiva (mg/kg) para el 50% de supervivencia (ED₅₀) al día 7, por medio de un ensayo in vivo utilizando ratas Fisher (n = 5), las cuales fueron infectadas por vía intravenosa con una dosis letal de *C. albicans* CY1002 y tratadas con dosis múltiples IV del compuesto de ensayo; determinaron un valor de ED₅₀ de 7.1 mg/kg. Cabe mencionar que evaluaron el espectro antifúngico del RO-09-4879 frente a varias especies; entre estas se destaca el patógeno filamentoso *Aspergillus fumigatus*, mostrando una IC₅₀ de 7.2 y una CMI de 55 μM, el cual se compara con el fluconazol (IC₅₀ de 313 μM y una CMI >650 μM). Los resultados fueron publicados a través del artículo científico titulado “Synthesis and Biological Activities of Benzofuran Antifungal Agents Targeting Fungal N-Myristoyltransferase” (Síntesis y Actividades Biológicas de los Agentes Antifúngicos de Benzofurano dirigidos a la N-Myristoyltransferase Fúngica). (Masubuchi, et al., 2003)

Actividad antimicrobiana de los benzotiazoles

En 1887, fue sintetizado el primer benzotiazol 2-sustituido por el científico A. W. Hofmann; a partir de ese momento, un sinnúmero de rutas sintéticas han adoptado el mecanismo de ciclación simple. (Gupta A. y Rawat S; 2010, p.13) (Rangappa, S; Mahadeo, P; Siddappa, A y Srinivasa, B; 2015, p.208)

Patel y otros publican una investigación científica con el título “Synthesis of 1,2,4-triazole derivatives containing benzothiazoles as pharmacologically active molecule” (Síntesis de derivados de 1,2,4-triazol que contienen benzotiazoles como moléculas farmacológicamente activas); en la cual se reporta la síntesis y la evaluación antimicrobiana *in vitro* de de varias series de 3- (3-piridil) -5- (4-nitrofenil) -4- (N-sustituido-1,3-benzotiazol-2-amino) -4H-1,2,4- Triazol,

frente a distintos microorganismos, entre los que se destaca el genero *Aspergillus*. Como resultado expuesto, se destaca que los análogos con sustituyentes nitro emergieron con una mejor actividad antifúngica. (Patel, y Khan, 2011)

Rezki, 2016, en la publicación “A Green Ultrasound Synthesis, Characterization and Antibacterial Evaluation of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles Tethering Bioactive Benzothiazole Nucleus” (Una síntesis de ultrasonido verde, caracterización y evaluación antibacteriana de 1,2,3-Triazoles 1,4-disustituido con anclaje a un núcleo bioactivo de benzotiazol), informa sobre la síntesis de novedosos agentes antibacterianos y antifúngicos bioactivos basados en un sistema combinado de 1,2,3-triazol-benzotiazol. Los resultados del cribado de antimicrobianos reveló que la presencia del núcleo de 1,2,3-triazol en el andamio acetamido-benzotiazol aumentó la actividad antibacterianas y antifúngicas. La relevancia del estudio radica en que se evaluó la actividad de inhibición del crecimiento microbiano de varios compuestos, los cuales incluyen un benzotiazol en su estructura. (Rezki, 2016)

Rouf, 2014, publica un artículo denominado “Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives”. En este, se menciona que los heterociclos, los tiazoles y los benzotiazoles poseen una amplia gama de actividades biológicas y se encuentran en muchas moléculas biológicamente activas potentes y fármacos tales como vitamina tiamina, sulfatiazol (fármaco antimicrobiano), ritonavir (fármaco antirretroviral), abafungin (fármaco antifúngico) y tiazopurina (fármaco antineoplásico). Se menciona que el resto tiazol se encuentra abundantemente en productos naturales, mientras que el resto benzotiazol es raramente encontrado en la naturaleza. En esta revisión se describen los informes bibliográficos de tiazoles y benzotiazoles, los cuales poseen diferentes actividades biológicas. (Rouf, y Tanyeli, 2014)

Herrera y otros, 2015, en la búsqueda de nuevos agroquímicos antifúngicos que podrían reemplazar comercialmente disponibles, produjeron la síntesis de aryl-2-mercaptobenzotiazoles, utilizando tanto la reacción fotoestimulada como la reacción asistida por microondas. Además, llevaron a cabo la determinación de la concentración media inhibitoria contra *Botrytis cinérea*, obteniendo valores de IC₅₀ 0,75, 0,69 y 0,65 µg/mL para el 2-(feniltio) benzotiazol, 2-(2-clorofeniltio) benzotiazol y 2-(3-clorofeniltio) benzotiazol, respectivamente. Como conclusión, destacan que la mayoría de los compuestos benzotiazolicos presentan una excelente actividad

antifúngica y tres, anteriormente mencionados, mostraron un efecto inhibitor superior al fungicida comercial Triadimefon. Los resultados han sido expuestos a través de la publicación “New Synthesis and Biological Evaluation of Benzothiazole Derivates as Antifungal Agents” (Nueva Síntesis y Evaluación Biológica de los Derivados de Benzotiazol como Agentes Antifúngicos). (Herrera, Ballari, López y Santiago, 2015)

Maddila y otros, 2013, en la publicación “Synthesis, antibacterial and antifungal activity of novel benzothiazole pyrimidine derivatives” (Síntesis, actividad antibacteriana y antifúngica de nuevos derivados de benzotiazol pirimidina), muestran una nueva serie de nuevos derivados de benzotiazol pirimidina. Analizaron la actividad antibacteriana *in vitro* de todos los compuestos sintetizados contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes* y para actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Penicillium marneffeii* y *Mucor spp.* Se destaca que varios de ellos demostraron una excelente actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* en comparación con fármacos estándar. (Maddila, Gorle, Seshadri, Lavanya, y Jonnalagadda, 2016)

Malik y otros, 2013, proponen la síntesis de derivados de benzotiazol con sustituciones diarilimidazol [2,1,b], dada a conocer a través del artículo titulado “Synthesis, characterization and evaluation for antifungal activity of substituted diaryl imidazo [2, 1, b]-benzothiazole” (Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad antifúngica de diarilimidazo [2, 1, b] benzotiazol sustituido). Lo primordial es que todos los compuestos sintetizados mostraron una actividad inhibitoria del crecimiento fungico moderada contra las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*, indican que algunos de los compuestos exhibieron actividades antifúngicas prometedoras y merecen más consideración como antimicrobianos prospectivos. (Malik, J., Soni, H., y Singhai, A., 2013)

Achaiah y otros, 2016, realizaron una revisión bibliográfica titulada “Review on 2-substituted benzothiazoles: diversity of synthetic methods and biological activities” (Revisión de los benzotiazoles 2-sustituidos: diversidad de métodos sintéticos y actividades biológicas); en la que se destaca como hallazgo importante que se ha examinado la actividad antibacteriana y antifúngica de algunos benzotiazoles 2 - sustituidos a través de varios estudios, especialmente contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Sobresale

que la mayoría de los compuestos mostraron resultados prometedores para ambas actividades. (Achaiah, Sridhar, Praveen y Mayuri, 2016)

Kukreja y otros, 2016, sintetizaron una nueva serie de 1,2,4-triazolo [3,4-b] benzotiazoles fluorados. Su ensayo antifúngico *in vitro* contra diversos hongos fitopatógenos reveló que un grupo arilo 2 o 3 clorado en la posición 3 del sistema fusionado produjo excelentes y notables resultados de fungotoxicidad. Además, indican que los ensayos *in silico* de acoplamiento molecular produjeron resultados de acuerdo con la tendencia observada *in vitro* de la actividad antifúngica. Los resultados han sido publicados a través del artículo titulado “Synthesis of novel 7-fluoro-3-substituted-1,2,4-triazolo[3,4-b]benzothiazoles (FTBs) as potent antifungal agents: molecular docking and in silico evaluation” (Síntesis de nuevos 1,2,4-triazolo [3,4-b] benzotiazoles 7-fluoro-3-sustituidos (FTBs) como potentes agentes antifúngicos: acoplamiento molecular y evaluación *in silico*). (Kukreja, Sidhu, y Sharma, 2016)

Defrenza y otros, 2014, a partir del 2-amino-1,3-mercaptobenzotiazol, generaron una serie de isómeros 2-mercapto-1,3-benzotiazol, con el fin de evaluar sus actividades antibacterianas y antifúngicas *in vitro*, utilizando *Candida albicans* y *Candida tropicalis* como especies fúngicas. Los hallazgos han sido publicados a través del artículo “1,3-Benzothiazoles as Antimicrobial Agents” (1,3-benzotiazoles como agentes antimicrobianos). Los resultados subrayan que todos los compuestos pertenecientes a esta serie y los cuales llevan un sustituyente voluminoso en la posición 6 del resto arilo, mostraron una alta actividad antifúngica; además, estudios de modelado molecular apoyaron dichos resultados. (Defrenza, et al., 2014)

Hernández y otros plantean la investigación titulada “Síntesis y uso del 2-(1,3-benzotiazolil) carboxilato de etilo como un posible agente antimicótico”. Por medio de ella, se estudia la posibilidad de obtener ésteres de benzotiazol por condensación del 2-amino tiofenol junto con el oxalato de dietilo en ausencia de solvente, a 115 °C por 5 horas. Se destaca que los ésteres de benzotiazol podrían presentar alto potencial antimicótico, por cuanto son estructuras muy semejantes a los ácidos grasos constituyentes de membranas biológicas y brindan la posibilidad del desarrollo de agentes antimicóticos. (Hernández, Rodríguez, Liboy, Castro y García, s.f.)

Nacionales

Cruz, 2015, presenta el trabajo de graduación, con el tema: “Identificación de un inhibidor de la proteasa NS3/NS2B en productos naturales descritos en la biodiversidad costarricense por técnicas de modelaje molecular para el diseño de un potencial prototipo de fármaco para el tratamiento del virus del dengue.” La investigación consistió en un estudio de modelaje molecular, lo cual presenta relación con el método de la presente investigación. (Cruz, 2015)

Según la búsqueda de investigaciones realizadas a nivel nacional en relación con el tema propuesto, no se halló antecedente alguno; esto en cuanto a las siguientes instituciones: Universidad de Costa Rica, Universidad Latina, Universidad Iberoamericana y Universidad de las Ciencias Médicas.

La razón por la cual se dificulta encontrar información relacionada reside en que el tema propuesto es innovador, por cuanto las moléculas que se propone analizar son nuevas estructuras; además, actualmente en Costa Rica, este tipo de análisis es de carácter inusual para la realización de investigaciones referentes a las ciencias de la salud.

Proyecciones

La investigación tiene como principal finalidad brindar a la comunidad científica nuevas moléculas de estudio con potencial a convertirse en agentes fungicidas, específicamente como alternativa para el abordaje de la contaminación en cuartos limpios, dando solución al evidente problema que conllevan las infecciones causadas por microorganismos comprendidos dentro de las especies fúngicas patógenas.

Como se trata de un estudio novedoso, ofrece la expansiva posibilidad de continuidad con futuras investigaciones relacionadas; se destaca que los resultados se deben validar a través de ensayos *in vitro* con el fin de comprobar la eficacia antifúngica del prototipo que se plantea como alternativa para ser utilizado en procedimientos de limpieza contra el hongo *Aspergillus fumigatus*.

Limitaciones

Los resultados no pudieron ser validados a través de ensayos *in vitro*, debido a que en la Universidad Internacional de las Américas no se cuenta con las condiciones requeridas para la realización de pruebas microbiológicas según lo estipulado por el CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute), como es la determinación de la concentración mínima inhibitoria utilizando cámaras de flujo laminar que provean condiciones ambientales aisladas.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

En este segundo capítulo, se muestra información obtenida a partir de diferentes fuentes bibliográficas en relación con el tema de investigación.

Implicaciones de la contaminación fúngica en cuartos limpios

En primer lugar, resulta necesario definir contaminación fúngica; esto es la introducción de hongos en un medio, lo cual provoca que éste sea inseguro o inapto para su uso: es siempre una alteración negativa del estado normal del medio.

“Los hongos son capaces de crecer en casi todos los materiales naturales y sintéticos, especialmente si son higroscópicos o húmedos. Los materiales inorgánicos se colonizan con frecuencia cuando absorben el polvo y sirven como buenos sustratos de crecimiento para especies como *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus versicolor*.” (Haleem, y Mohan, 2012, p.406)

Microorganismos fúngicos

Los microorganismos fúngicos son eucariotas, por ello, poseen un núcleo definido, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático. Pueden hallarse en una morfología unicelular llamada levadura, capaz de replicarse de manera asexual o en una morfología filamentosa conocida como moho, capaz de replicarse sexual y asexualmente. Sin embargo, algunos presentan la capacidad de adoptar ambas formas y son llamados hongos dimórficos. (Murray, 2008, p. 2)

Los hongos llevan una vida heterotrófica como saprofitos (microorganismos que subsisten en materia muerta o en descomposición), simbioses (microorganismos que viven conjuntamente y obtienen ventajas de su asociación), comensales (microorganismos que

se desarrollan en estrecha relación, en la que uno de los participantes obtiene beneficios mientras que el otro ni se beneficia ni resulta perjudicado) o parásitos (microorganismos que se establecen sobre o en el interior de un anfitrión del que se obtienen beneficios sin corresponder con ninguna ventaja; en el caso de los patógenos, la relación es perjudicial para el anfitrión). (Murray, et al., 2008, p. 67)

En los últimos veinte años, los hongos se han convertido en importantes microorganismos causantes de infecciones en el ser humano; afectan especialmente a sujetos con cuadros de inmunosupresión u hospitalizados con padecimientos subyacentes graves, originan considerable morbimortalidad al actuar como patógenos oportunistas. A través de los años, se evidencia un incremento en la incidencia global de las micosis invasivas, de igual forma, la cantidad de especies incluidas en la clasificación de los patógenos fúngicos oportunistas se amplía cada año. (Murray, et al., 2008, p.67)

Cabe mencionar que el incremento drástico de micosis invasivas puede atribuirse al aumento de casos de sujetos inmunodeprimidos, entre los que se incluyen pacientes trasplantados, sujetos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pacientes con cáncer y sujetos hospitalizados por trastornos graves de base sometidos a intervenciones invasivas. (Murray, et al., 2008, p.67) (Brooks, et al., 2013, p.671-672)

Las personas con deterioro de las defensas inmunitarias son susceptibles a la acción de hongos de distribución muy amplia a los cuales están expuestas personas sanas, pero por lo común resisten. En muchos casos, el tipo de hongos y la evolución natural de la micosis son gobernados por el estado predisponente básico del hospedador. Ciertas micosis oportunistas son causadas por hongos exógenos que aparecen en forma global en la tierra, el agua y el aire. (Brooks, et al., 2013, p.694)

Entre las especies más frecuentes causantes de procesos infecciosos, clasificadas como patógenas oportunistas, se encuentran las levaduras pertenecientes al género *Candida*, los organismos de la especie *Cryptococcus neoformans* y varias especies de *Aspergillus* y *Pneumocystis jiroveci*. (Murray, 2008, p. 73). Se dice que *Aspergillus fumigatus* es uno de los más comunes agentes causales de infecciones. (Liu, et al., 2016, p.400)

Contaminantes biológicos en cuartos limpios

Un cuarto limpio corresponde a un espacio en donde se controla la concentración de partículas del aire con la finalidad de cumplir con una clase específica de calidad de este con respecto al número e identidad de partículas; por ejemplo, se monitorea la concentración de microorganismos en el ambiente. (USP38-NF33, p.1312)

La contaminación microbiana, a cierto nivel, es inevitable en cualquier espacio en el que los humanos deban participar activamente. “Ni siquiera los diseños y operaciones más cuidadosos de cuartos limpios son capaces de eliminar el desprendimiento de microorganismos ante la presencia de operadores humanos.” Por consecuencia, es técnicamente imposible e irrealista esperar que un espacio interno presente un grado de contaminación nulo durante la ejecución de operaciones de procesamiento aséptico. No existe la posibilidad de demostrar la esterilidad de un ambiente de procesamiento aséptico, por lo que el monitoreo de instalaciones necesita basarse en una evaluación de riesgos del espacio interno. (USP38-NF33, p.1301)

En ambientes controlados, se requiere un programa eficaz de limpieza y calidad sanitaria, ya sea en espacios en los que se fabrican medicamento o cuartos limpios destinados para procedimientos quirúrgicos, con el fin de prevenir la contaminación microbiana allí. (USP38-NF33, p.1097)

Por lo general, los hongos contaminan espacios internos debido a la dispersión de bioaerosoles, que corresponden a “suspensiones aéreas de partículas de organismos vivos, microorganismos u otros materiales biológicos” (Martínez, et al., 2016, p.264). Los bioaerosoles presentan la capacidad de ser dispersados a largas distancias por corrientes de aire y son inhalados, ingeridos o entran en contacto con los seres humanos por de cualquier otra vía.

Cuartos limpios para la fabricación de medicamentos

Los productos farmacéuticos pueden contaminarse a través de múltiples factores, entre los que se incluye el entorno de fabricación. Los requisitos para el procesamiento aséptico incluyen pisos, paredes y techos fáciles de limpiar, con superficies lisas y no porosas; control de

temperatura, humedad y partículas y procedimientos de limpieza y desinfección que provean y mantengan las condiciones asépticas. (USP38-NF33, p.1097)

En lo que respecta al control del riesgo de contaminación microbiana, los medicamentos se clasifican en dos categorías: la primera corresponde a los productos estériles, en los que la biocarga se elimina utilizando metodologías validadas; la segunda incluye los productos no estériles, en los cuales la biocarga del producto farmacéutico se controla por medio de atributos del producto como la vía de administración y la población destino del producto terminado. Una consideración crítica para asegurar la calidad de un medicamento es prevenir aquellas condiciones que puedan favorecer el ingreso y la proliferación de microorganismos durante los procesos de fabricación; por ello, se promueve una adecuada gestión de riesgos al disminuir las posibles fuentes de biocarga y se evita la generación de daños a las propiedades químicas y farmacológicas del medicamento. (USP38-NF33, p.1293-1294)

La transmisión de un agente infeccioso a través de un producto farmacéutico puede provenir de varias causas, por ejemplo: contaminación de materias primas, contaminación durante el proceso de manufactura o atenuación inadecuada de los agentes infecciosos utilizando sustancias activas. (EMEA, 2006, p.6)

Se considera que la transmisión de cualquier agente infeccioso a través de un medicamento es una reacción adversa grave. (EMEA, 2006, p.8) La EMEA (European Medicines Agency) considera la contaminación microbiana de un producto estéril inyectable u oftálmico como un defecto de calidad Clase I, esto significa que pueden poner en peligro la vida o pueden ocasionar graves riesgos para la salud; por otra parte, la de un medicamento no inyectable u oftálmico como Clase II (medicamentos contaminados con potencial de causar enfermedad o daño pero no son Clase I).

Los medicamentos que producen un efecto directo o indirecto sobre el estado inmunitario del paciente podrían conducir a la proliferación de infecciones oportunista; cabe mencionar que ciertas esporas contaminantes sólo pueden afectar a individuos inmunocomprometidos. Por lo tanto, se debe considerar la susceptibilidad de la población ante cualquier agente infeccioso. (EMEA, 2006, p.7)

Cabe señalar que la sospecha de transmisión de un agente infeccioso mediante el uso de un medicamento puede confundirse con otras posibles causas como la infección secundaria por resistencia antibiótica, los errores de medicación o el manejo inadecuado del medicamento. (EMA, 2006, p.8)

La FDA y la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) publican alertas de seguridad cuando un medicamento incumple con parámetros críticos de calidad, entre las cuales, constantemente, se incluyen problemas de contaminación microbiana del producto durante su manufactura. Por ejemplo, el 16 de junio del 2017, la FDA emitió un comunicado mediante el cual se expone que se ha realizado un retiro de seis lotes de Clindamicina Inyectable USP, manufacturados por Hospira-Pfizer Inc y se destaca como causalidad el crecimiento microbiano detectado durante una simulación de rutina del proceso de fabricación, que representa la encaje potencial de microorganismos en el producto. Además, se menciona que “en el caso de que se administre el producto afectado, existe una probabilidad razonable de que el paciente pueda experimentar eventos adversos, desde fiebre, escalofríos y malestar hasta eventos adversos severos, incluyendo micosis invasivas sistémicas.” (FDA, 2017)

En el 2012, la FDA y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) identificaron la contaminación bacteriana y fúngica en viales no abiertos de soluciones de betametasona y triamcinolona distribuidas y, posteriormente, retiradas del mercado. Éstas incluyen bacterias conocidas como *Bacillus* y especies fúngicas. Inclusive, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium spp.* y *Penicillium spp.* En la publicación, se destaca que algunos de los organismos fúngicos identificados, en particular *Aspergillus fumigatus*, pueden causar enfermedades graves en los seres humanos. (FDA, 2017)

Tomando como referencia información publicada por la FDA, en los últimos 20 años se han evidenciado múltiples situaciones en las que productos farmacéuticos contaminados han causado muertes y lesiones graves. Por ejemplo:

- En 1997, dos pacientes fueron hospitalizados con infecciones graves después de la administración de la inyección de riboflavina contaminada, la cual se manufacturó en Colorado.

- En 2001, 13 pacientes -en California- fueron hospitalizados y 22 recibieron atención médica después de las inyecciones de viales contaminadas por una solución de esteroides. Como resultado, tres pacientes fallecieron.
- En 2002, cinco pacientes -en Carolina del Norte- sufrían meningitis por hongos resultante del acetato de metilprednisolona contaminado: una persona murió.
- En 2005, la solución de cardioplegia contaminada, la cual se produjo en una industria ubicada en Maryland, produjo cinco casos de infecciones inflamatorias sistémicas severas; tres de estos pacientes fallecieron.
- En 2012, 43 pacientes desarrollaron infecciones oculares por hongos causadas por productos oftálmicos estériles contaminados; se estima que al menos 29 de estos pacientes sufrieron pérdida de visión. (FDA, 2017)

Ante lo antes expuesto, se evidencia que la contaminación microbiana de productos farmacéuticos tiene un alto potencial para originar procesos patológicos significativamente severos; por ello, el control de especies frecuentes encontradas en los laboratorios de producción de medicamentos es considerado un aspecto crítico.

Cuartos limpios en hospitales

El aislamiento, la identificación y la caracterización de especies fúngicas en entornos intrahospitalarios son acciones críticas, pues la mayoría de estos hongos presentan un significativo potencial patógeno, especialmente para pacientes, quienes se encuentran en unidades de cuidados intensivos y en hematología. Resulta importante aclarar que la presencia del género *Aspergillus* dentro de los ambientes hospitalarios debe monitorearse con rigurosidad en áreas, las cuales albergan pacientes susceptibles al exponerse a este patógeno, específicamente sujetos inmunosupresos. Por este motivo, resulta obligatoria la necesidad crítica por desarrollar protocolos de seguridad más estrictos a fin de promover una reducción sustancial de la morbimortalidad a causa de infecciones fúngicas y la mengua de los altos costos hospitalarios. (Martínez, et al., 2016, p.268)

Aparte de la fuente de humedad que permita el crecimiento de especies fúngicas, la colonización activa o latente no debe ser tolerada en ambientes interiores ocupados, sobre todo si

se trata de centros de salud, lo cual es de alta alarma. Para remediar dicha contaminación es necesario el proceso de exterminio y limpieza de la colonización de moho en los edificios, por lo que se debe eliminar la colonización visible y proveer alternativas de protección preventiva; además, en todos los centros hospitalarios, se deben preocupar por la aparición de esporas viables termotolerantes que podrían conducir a infecciones en pacientes inmunocomprometidos. (Horner, 2006, p.S34)

En las fuentes bibliográficas científicas, se expone que, constantemente, especies fúngicas son aisladas de cuartos limpios como las unidades de cuidados intensivos, quirófanos, salas de oncología, salas de hematología, entre otras; se destaca la especie *Aspergillus fumigatus* como un organismo fúngico muy frecuente implicado en complicaciones clínicamente significativas. (Martínez, et al., 2016) (Paassen, et al., 2015) (Tong, et al., 2016) (Pérez, et al., 2014) (Bonnal, et al., 2015) (Caggiano, et al. 2014)

Sistemas HVAC como principal fuente de contaminación fúngica en cuartos limpios

Para comprender las infecciones por hongos adquiridas dentro de un espacio interno, es preciso determinar la prevalencia de esporas de hongos en el aire intrahospitalario, o bien, en el aire de un cuarto limpio. Los sistemas de aire acondicionado, que se utilizan en hospitales y ambientes cerrados pueden reducir el número de esporas presentes o, contrariamente, ser colonizados por hongos y promover su diseminación.

Factores ambientales, específicamente la temperatura y la humedad, afectan el crecimiento y las características de esporulación de los hongos en el aire; el crecimiento se favorece por medio de temperaturas ambientales elevadas y agua disponible. La liberación de esporas se incrementa posteriormente durante períodos intermitentes de sequedad y se da cabida a su dispensación. (Rogawansamy, et al., 2015, p.6320)

Los sistemas HVAC, además de recolectar y distribuir esporas latentes, pueden facilitar, de múltiples formas, la colonización de superficies con mohos. Por lo general, la ventilación mecánica provoca desequilibrios de presurización, por lo cual induce al crecimiento del moho en las paredes exteriores de los edificios. Además, los sistemas HVAC también influyen,

directamente, sobre los equilibrios de humedad en el aire interior. Es importante saber que la ventilación mecánica puede recolectar y redistribuir el material fúngico desprendido de superficies mohosas en diferentes zonas de un edificio, colonizadas debido a fugas en el techo, en la plomería, o problemas de humedad ascendente. (Horner, 2006, p.S33)

Según las condiciones climáticas, el rendimiento de los sistemas HVAC varía significativamente. En climas cálidos y húmedos, cambian el balance de humedad del aire al proporcionar enfriamiento, induciendo la condensación. Por otra parte, en climas calientes y secos, los enfriadores evaporativos añaden, de manera intencional, humedad a las corrientes de aire entrante. (Horner, 2006, p.S33)

Las especies fúngicas contaminantes a nivel interior, por lo general, reflejan aquellas que constituyen el ambiente exterior; sin embargo, las concentraciones pueden variar según la época estacional o cuando el ambiente interior es favorable para el crecimiento de especies particulares. Especies tales como *Aspergillus* y *Penicillium* se encuentran en concentraciones relativamente bajas en el aire exterior pero a niveles superiores en el espacio interior; dichas especies han sido reconocidas como alérgenos significativos en el aire interior. (Rogawansamy, et al., 2015, p.6320-6321)

Evitar de forma total las esporas de *Aspergillus*, de forma particular de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*, no es una práctica posible en ambientes interiores ventilados mecánicamente y suministrados con aire exterior, pues dichos hongos se encuentran distribuidos de manera amplia en el espacio aéreo externo. Por lo tanto, existe un grado de riesgo de ingresar esporas en un edificio por medio del aire exterior; por lo tanto, la colonización de ambientes interiores por especies fúngicas debe ser prevenida mediante técnicas de limpieza eficaces. (Horner, 2006, p.S34)

La serie ISO 14644 abarca el diseño y la construcción de cuartos limpios y ambientes controlados. Esta norma define el desempeño de un ambiente limpio con respecto a la concentración de partículas totales por unidad de volumen. La norma ISO 14644-1 estipula los recuentos totales de partículas permitidos para que el ambiente limpio cumpla con las clasificaciones definidas de calidad del aire. (USP38-NF33, p.1302)

Las áreas limpias se deben certificar de acuerdo con lo descrito en la serie ISO 14644 y cumpliendo con requisitos de clasificación estipulados; por cuanto, el diseño de cuartos limpios varía considerablemente según sea el área destinada. A causa de esto, resulta difícil generalizar parámetros tales como la integridad del filtro, la velocidad del aire, los patrones de flujo del aire, el número de recambios de aire y la presión diferencial necesaria. (USP38-NF33, p.1304)

En la actualidad, se han utilizado una gran variedad de procesos tecnológicos para el tratamiento del aire, incluyendo filtración de aire de partículas de alta eficiencia (HEPA) y regulación de la presión del aire. Sin embargo, todos tienen limitaciones técnicas. Se destaca que la filtración ya no parece ser el único proceso requerido para el tratamiento de aire, por cuanto puede resultar de la acumulación de contaminantes que posteriormente podrían ser liberados al aire en forma de bioaerosoles, principalmente cuando se evidencian problemas de crecimiento microbiano en los filtros de purificación. (Desoubeaux, et al., 2014, p.588)

Recientemente, se ha intentado abordar el problema mencionado a través del desarrollo de diversos dispositivos para el tratamiento del aire. Por ejemplo, algunos de los dispositivos incorporan tres procesos, cada uno es independientemente letal para los microorganismos. Entre estos, se incluyen filtración con simultánea irradiación UVC germicida y, posteriormente, cromatografía heterogénea. (Desoubeaux, et al., 2014, p.588)

Especies contaminantes frecuentes en sistemas HVAC

“La mayoría de los hongos en el ambiente, tanto interno como externo, pertenecen a las divisiones Ascomycota, Basidiomycota y hongos mitosporicos, como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Alternaria* que son los géneros más abundantes.” (Martínez, et al., 2016, p.264)

Actualmente, se han realizado numerosos estudios sobre los efectos adversos provocados por los microorganismos fúngicos en el ser humano: son productores de infecciones en ambientes internos y externos. En la mayoría de ensayos para detección de partículas fúngicas presentes en el aire, se utiliza el muestreador de partículas viables de Andersen (Thermo Scientific, Waltham), mediante el cual se realizan estimaciones de unidades formadoras de colonias (UFC) por unidad de área, generalmente por metro cúbico. (Martínez, et al., 2016, p.264)

“Un género que ha surgido con mayor frecuencia como una causa importante de morbilidad y alta mortalidad en pacientes inmunocomprometidos es *Aspergillus*.” (Martínez, et al., 2016, p.264). Además, se destaca la especie *Aspergillus fumigatus* como el principal hongo filamentoso aerotransportado responsable de cuadros de aspergilosis invasiva en todo el mundo.

A pesar de que *Aspergillus fumigatus* crece óptimamente en condiciones de 37°C y un pH de 3.7 a 7.6, la especie se puede aislar a las temperaturas que oscilen entre 12°C y 65°C y a niveles de pH entre 2.1 – 8.8. (Kwon y Sugui, 2013, p.1) Esto significa que la especie es un patógeno termotolerante y su crecimiento no se afecta altamente por cambios de pH.

La termotolerancia de *Aspergillus fumigatus* es aún más notable en las ascosporas, correspondientes a los propágulos producidos en el ciclo sexual. Las ascosporas de *Aspergillus fumigatus* están protegidas por una pared significativamente gruesa en comparación con las otras especies de *Aspergillus*, lo cual le proporciona la capacidad de germinar en ambientes de 70°C y pueden sobrevivir a temperaturas mayores a 70°C. Cabe mencionar que *A. fumigatus* no crece en temperaturas por debajo de 12°C; sin embargo, sus conidios pueden tolerar -durante períodos prolongados- las tensiones impuestas por la congelación. Además, dependiendo de la cepa, los conidios tienen la capacidad de sobrevivir en nitrógeno líquido por un máximo de 18 años. (Kwon, et al., 2013, p.1)

Por otra parte, se dice que los conidios de *Aspergillus fumigatus* se dispersan más eficientemente en el aire en comparación con los otros mohos, debido a que acumulan 1,8-dihidroxinaftaleno melanina en su pared celular, la cual proporciona protección frente a la irradiación ultravioleta. (Kwon, et al., 2013, p.1)

Según lo anteriormente mencionado, se infiere que el *Aspergillus fumigatus* es una especie difícil de eliminar mediante técnicas de limpieza de sistemas de aire comúnmente utilizadas, como la radiación UV, el aumento de temperatura o la alteración del pH con el uso de desinfectantes.

Uso de desinfectantes en cuartos limpios

Se conoce como desinfectantes químicos a los agentes empleados en superficies y objetos inanimados para destruir virus, bacterias y hongos infecciosos, aunque no necesariamente sus

esporas. Los agentes antivirales y esporicidas pueden considerarse como una clase especial de desinfectantes, los esporicidas destruyen esporas fúngicas y bacterianas cuando se usa en una concentración suficiente durante un tiempo de contacto específico, después de este se espera la eliminación de todos los microorganismos vegetativos presentes en el espacio determinado. En este punto, es necesario diferenciar la situación sanitizante, la cual corresponde a sustancias reductoras de la cantidad de toda forma de vida microbiana, que incluye hongos, virus y bacterias en superficies inanimadas. (USP38-NF33, p.1098)

Entre los agentes esporicidas, se utilizan –principalmente- Glutaraldehído al 2%, Hipoclorito de sodio al 0.5%, Ozono (8% de gas en peso), Peróxido de hidrógeno (solución del 10% al 25%) y la β -Propiolactona (100 μ g/g). (USP38-NF33, p.1098-1099)

Múltiples factores influyen en la eficacia de un desinfectante; entre ellos, se destacan la actividad biocida intrínseca, la concentración del desinfectante, el tiempo de contacto, la naturaleza de la superficie, la dureza del agua de dilución, la cantidad de material orgánico presente en la superficie y la identidad y cantidad de microorganismos presentes. (USP38-NF33, p.1099)

En la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIRA, por sus siglas en inglés: Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act), se estipula que la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (EPA) es el ente encargado de registrar los desinfectantes químicos comercializados en los Estados Unidos. Se exige que los fabricantes suministren información del producto en cuanto a su adecuada dilución, los microorganismos específicos que eliminan y el tiempo de contacto necesario para la ocurrencia de la acción. Resulta preciso destacar que ciertos esterilizantes químicos líquidos destinados al uso en dispositivos médicos críticos o semicríticos se encuentran definidos y regulados por la FDA, Food and Drug Administration. (USP38-NF33, p.1099)

En el ámbito hospitalario, se desinfectan las manos con antisépticos como la clorhexidina al 5% y el alcohol isopropílico al 70%,; asimismo, los sitios de intervención quirúrgica para reducir la flora residente y eliminar la flora transitoria implicada en el desarrollo de infecciones intrahospitalarias. (USP38-NF33, p.1099)

Conforme la FIFRA, la EPA exige que las empresas productoras de sustancias antimicrobianas para uso en la salud pública -entre las cuales se incluyen agentes desinfectantes,

sanitizantes, esporicidas y esterilizantes- garanticen la seguridad y eficacia de los productos; se enfatiza en que las especificaciones de los productos deben incluir datos toxicológicos y de eficacia contra organismos específicos. (USP38-NF33, p.1101)

Infecciones causadas por *Aspergillus fumigatus*

La aspergilosis es la infección micelial invasiva más frecuente, causada por los microorganismos fúngicos pertenecientes a la especie *Aspergillus*, las cuales son saprofitas; (significado) consecuentemente, la enfermedad resulta ser una problemática a nivel mundial. En los seres humanos, *Aspergillus fumigatus* es el patógeno mayormente involucrado en procesos infecciosos, destacan –además- otras especies menos comunes *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. lentulus*. (Murray, et al., 2008, p.700)

Patogenia

El género *Aspergillus* produce conidios de forma abundante, fácilmente dispersables en el aire, específicamente, en forma de aerosol y brindan la posibilidad de ser inhalados. Los conidios de *A. fumigatus* presentan un tamaño de aproximadamente 2.0mm de diámetro con extremos de hasta 3.5 mm, los cuales son adecuados para evitar la depuración mucociliar y alcanzar las vías respiratorias inferiores. El tamaño de los conidios no presenta una variación significativa al aumentar la humedad relativa del 30% al 90%; por lo que los conidios aerotransportados mantienen constantemente el tamaño óptimo para alcanzar las vías aéreas inferiores, independientemente de la humedad relativa. (Kwon, et al., 2013, p.2)

La especie *A. fumigatus* contiene melanina en la pared conidial, la cual ofrece protección contra las especies reactivas de oxígeno y provee un mecanismo de resistencia frente a la lisis por las células del sistema inmunológico del huésped. Además, la superficie conidial de *A. fumigatus* contiene residuos de ácido siálico cargados negativamente, más expuestos que otras especies de *Aspergillus*, lo que media parcialmente la unión a las proteínas de lámina basal del huésped. “Por

lo tanto, los conidios de *A. fumigatus* pueden adherirse al epitelio de las vías respiratorias y alvéolos más eficazmente que otras especies de hongos con esporas aéreas de tamaño similar”. (Kwon, et al., 2013, p.2)

Un factor de riesgo predisponente a infecciones producidas por *Aspergillus* es la inmunodeficiencia, destacada en patologías como la leucemia, en sujetos que han recibido trasplantes de blasto y pacientes abordados con terapias corticoesteroides; por cuanto, dichas personas son altamente propensas para germinar los conidios, los cuales producen hifas y estas, enfermedad por colonización de las vías respiratorias y ulterior aparición de reacciones alérgicas, colonización de las cavidades preexistentes (aspergiloma) o invasión hística. (Murray, et al., 2008, p.700) (Brooks, et al., pp.717-718)

Ante lo mencionado, es posible inferir que la vía primaria de infección en la aspergilosis es la inhalación de conidios transportadas por el aire, de un tamaño aproximado de 2.5µm. A nivel pulmonar, los macrófagos alveolares y los neutrófilos llevan a cabo la respuesta inmunitaria del organismo anfitrión frente al *Aspergillus*; los macrófagos son los encargados de ingerir y destruir los conidios y los neutrófilos se adhieren y destruyen las hifas. Las formas miceliales supervivientes son capaces de invadir la vasculatura y el tejido pulmonar, lo cual produce – consecuentemente- cuadros trombóticos y necrosis hística local; además, la diseminación hematogena; a causa de ello, se afectan múltiples órganos. (Brooks, et al., p.718)

La virulencia de las especies de *Aspergillus* es influida por la secreción de ciertos productos metabólicos como las gliotoxinas y diversas enzimas, entre las que se destacan la catalasa, la elastasa, la fosfolipasa, y algunas proteasas. Por ejemplo, la inhibición de la actividad de los macrófagos alveolares y la proliferación de linfocitos T se produce por acción de las gliotoxinas. (Brooks, et al., p.718)

“En la enfermedad granulomatosa crónica, los neutrófilos son incapaces de generar el estallido respiratorio necesario para destruir los microorganismos productores de catalasas”, entre estos se incluyen las especies de *Aspergillus*. Entre la enfermedad granulomatosa crónica y las infecciones producidas por *Aspergillus*, existe una estrecha asociación, la cual subraya el importante rol asumido por los neutrófilos como parte de la defensa inmunitaria frente a la aspergilosis. (Brooks, et al., p.718)

Manifestaciones clínicas

Aspergilosis broncopulmonar alérgica

La aparición de inmunoglobulinas E (IgE) contra los antígenos de superficie de los conidios de *Aspergillus* producen reacciones de carácter asmático inmediato en sujetos atópicos. En otras personas, las hifas colonizan el árbol bronquial por germinación de los conidios, sin producir invasión del parénquima pulmonar, lo cual resulta un cuadro de aspergilosis broncopulmonar alérgica, caracterizada por ataques de asma, eosinofilia, infiltrados pulmonares recurrentes, hipersensibilidad cutánea tipo I (inmediata) y III (de Arthus). (Murray, et al., 2008, p.700)

Aspergiloma y colonización extrapulmonar

El aspergiloma surge como consecuencia de la penetración de los conidios en las vías respiratorias y posterior invasión de las cavidades, en las cuales experimentan germinación y produce hifas de manera abundante; por ello, resulta importante destacar el alarmante peligro que esto representa para quienes presenten alguna enfermedad cavitaria como tuberculosis, sarcoidosis o enfisema. Generalmente, los casos de aspergiloma conllevan invasión a nivel extrapulmonar, en órganos como el cerebro y el riñón. (Murray, et al., 2008, p.700)

Aspergilosis invasora

Cuando los conidios son inhalados, puede resultar un cuadro de neumónico agudo con diseminación. De forma mayor, las personas con más predisposición son quienes presentan cuadros de inmunosupresión, el riesgo es mucho mayor en los que han recibido alérgenos en trasplantes de hemoblastos y los pacientes con SIDA que tengan los linfocitos menores a 50 células/milímetro cúbico. Entre los síntomas, se destacan la hemoptisis, expectoración sanguinolenta proveniente de tejido pulmonar; además, se originan cuadros de trombosis, infarto y necrosis debido a la invasión de las hifas en el interior de los vasos sanguíneos. La infección presenta la capacidad de propagarse hacia el sistema gastrointestinal, el hígado, el cerebro, entre otros tejidos, produciendo abscesos y posteriores lesiones necróticas. El abordaje terapéutico de la aspergilosis invasora debe ser muy rápido, ya que el pronóstico de enfermos con aspergilosis es significativamente grave. (Murray, et al., 2008, p.700)

Tratamiento farmacoterapéutico de la aspergilosis

Los antifúngicos, también conocidos como antimicóticos, corresponden a sustancias quimioterapéuticas que interfieren en el crecimiento de especies de hongos, en este caso, en identidades patógenas. Es importante destacar que “los antimicóticos disponibles tienen efectos sobre la síntesis de membrana y los componentes de la pared celular, la permeabilidad de la membrana, la síntesis de ácidos nucleicos y la función del microtúbulo y el huso mitótico.” (Brunton, et al., 2012, p.1571)

Los hongos son eucariotas y, por esa razón, comparten innumerables genes homólogos, productos génicos y vías con sus hospedadores humanos. Como consecuencia, son pocos los puntos de ataque particulares donde actúan los fármacos eficaces. (Brooks, et al., 2013, p.672)

Los cuadros de aspergilosis son abordados mediante el uso de fármacos antimicóticos tales como (Figura 1) la anfotericina B (A), el voriconazol (B), el posaconazol (C), el itraconazol (D) y la caspofungina (E). (Brunton, et al., 2016, p.1185)

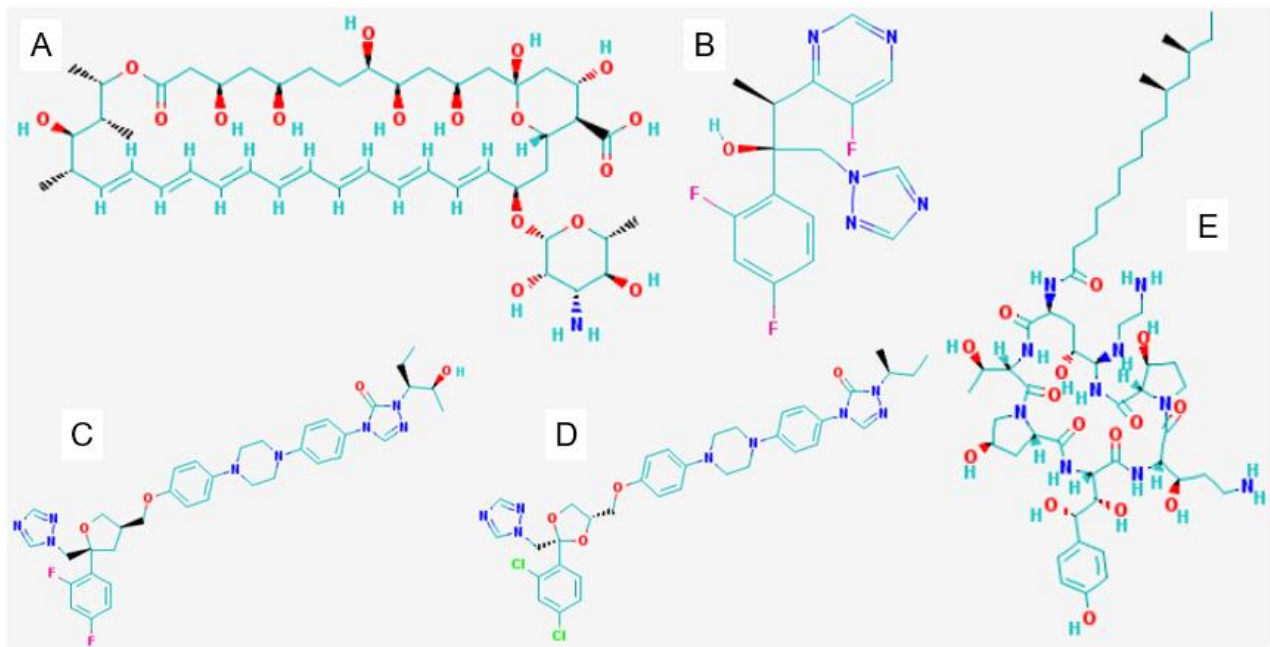


Figura 1. Estructuras de los antifúngicos utilizados en la aspergilosis

Fuente: (PubChem, 2017)

La anfotericina B es un fármaco perteneciente al grupo de los macrolidos polienos, empleados en el tratamiento de infecciones fúngicas potencialmente mortales, ya que sigue siendo el antimicótico de espectro de acción más amplio. Brinda la acción antifúngica a través de dos mecanismos: el primario implica la unión al ergosterol; produce canales iónicos, los cuales destruyen la integridad osmótica de la membrana celular de los hongos y provoca la pérdida de componentes intracelulares y posterior muerte celular. Además, como mecanismo secundario, presenta unión al colesterol, lo que genera altos niveles de toxicidad producidos en el ser humano. (Brooks, et al., p.718) (Brunton, et al., 2016, p.1178)

El daño renal corresponde a la reacción tóxica más significativa tras el uso de terapias con anfotericina B; ocurre en casi todos los pacientes tratados con dosis importantes. El grado de azoemia es variable, puede ser suficientemente grave para requerir diálisis. Existen dos componentes de toxicidad: uno reversible vinculado con la disminución de la perfusión renal, el cual representa una forma de insuficiencia prerenal; otro irreversible por lesión tubular y disfunción renal subsiguiente. (Brunton, et al., 2016, p.1179-1180)

Los fármacos azólicos -entre los que se incluyen los triazólicos como el itraconazol, el voriconazol, y el posaconazol- actúan disminuyendo la síntesis de ergosterol al inhibir las enzimas del citocromo P450 del hongo. “El itraconazol tiene actividad contra *Aspergillus spp* pero ha sido sustituido por el voriconazol como compuesto azólico ideal para la aspergilosis”. Actualmente, el posaconazol tiene autorización para ser utilizado como tratamiento de rescate en los cuadros de aspergilosis invasora. (Brunton, et al., 2016, p.1182-1183)

El uso de caspofungina está autorizado en la aspergilosis invasora solo como tratamiento de rescate en pacientes tratados con anfotericina B, sin respuesta satisfactoria y no como tratamiento primario. La caspofungina pertenece a la clase de las equinocandinas, correspondiente a péptidos cíclicos grandes enlazados con un ácido graso de cadena larga; actúan sobre la pared micótica por inhibición de la síntesis de β -glucanos y causan fragmentación de la pared micótica y posterior muerte celular. (Brunton, et al., 2016, p.1183)

Mecanismo de resistencia de *Aspergillus fumigatus* basado en cyp51A

Los triazoles son ahora los agentes antifúngicos de primera línea para el tratamiento de la aspergilosis, debido a su fuerte actividad antifúngica y baja toxicidad. Sin embargo, la prevalencia de resistencia a los azoles ha ido aumentando continuamente durante las dos últimas décadas. En la actualidad, la prevalencia de resistencia a azoles en *A. fumigatus* oscila entre el 2,1% y el 8% en diferentes regiones geográficas. Las mutaciones de la proteína (Citocromo P450 14- α Sterol desmetilasa) desempeñan un papel central en la resistencia a azoles de *Aspergillus fumigatus*. (Liu, et al., 2016, p.401)

Principalmente, el mecanismo de la resistencia de *A. fumigatus* frente a los azoles corresponde a la mutación de la proteína Citocromo P450 14- α esterol desmetilasa, de manera específica, en el gen CYP51A, codificador de la α -desmetilasa, una enzima central en la ruta de la biosíntesis del ergosterol en las especies fúngicas. Para las levaduras y los hongos filamentosos, la proteína CYP51A desempeña un papel clave como blanco de fármaco en la quimioterapia antifúngica. Los fármacos pertenecientes a la familia de los triazoles como el itraconazol, el posaconazol y el voriconazol se unen a la α -desmetilasa e inhiben su actividad catalítica; por ello, producen inhibición de la biosíntesis de la membrana y, eventualmente, inhiben el crecimiento de hongos. (Liu, et al., 2016, p.401)

Existe evidencia de que las mutaciones ocurren en las posiciones L98, M220 y Y431, lo cual produce una disminución de la afinidad de unión de los azoles a la proteína CYP51A y, por lo tanto, reducen su efecto inhibitorio. Además, ciertas mutaciones en las posiciones L98 y G432 proveen inestabilidad a la proteína, lo que podría conducir al cambio conformacional del sitio activo y, eventualmente, a la resistencia frente a los azoles. (Liu, et al., 2016, p.400)

N-Miristoiltransferasa como un objetivo fungicida

La proteína N-miristoiltransferasa (NMT) es una enzima investigada actualmente para el desarrollo de nuevas drogas; pertenece a la superfamilia GCN acetil-transferasa (GNAT). (Liu, et al., 2013, p.1551) “La NMT es un objetivo terapéutico validado en infecciones oportunistas de los seres humanos por hongos o protozoarios”. (Wright, et al., 2010, p.19)

Generalidades de las enzimas

Las enzimas son proteínas las cuales actúan como catalizadores, compuestos que incrementan la velocidad de las reacciones químicas mediante la unión de sustratos; los modifican estructuralmente y liberan sus respectivos productos. La geometría espacial requerida para las interacciones entre el sustrato y la enzima asegura la formación de los productos necesarios para la supervivencia del organismo. Los sitios de unión a sustrato se sobrepone en el sitio catalítico activo de la enzima, correspondiente a la región de la enzima donde ocurren las interacciones que producen una reacción. Dentro del sitio catalítico, grupos funcionales proveídos, en su mayoría, por los residuos de los aminoácidos constituyentes de la enzima participan en la catálisis. (Lieberman y Marks, 2013, p.112)

“Para catalizar una reacción química, la enzima forma un complejo enzima-sustrato en su sitio catalítico activo”. El sitio activo es una hendidura en la estructura de la enzima, formada por una o más regiones de la cadena polipéptica. La especificidad de la enzima es resultado del acomodo tridimensional de los residuos de aminoácidos específicos en el sitio de unión para el sustrato, los que tiene la capacidad de activar la función catalítica, por cuanto presentan interacciones con el sustrato. (Lieberman, et al., 2013, p.113-115)

Como lo indica el nombre, la NMT se incluye dentro de las enzimas conocidas como transferasas, las cuales catalizan reacciones de transferencia de un grupo funcional de una molécula a otra. Cuando el grupo transferido es un acilo graso, la enzima es identificada como una aciltransferasa. (Lieberman y Marks, 2013, p.131)

“Una de las formas de alterar la actividad enzimática es a través de la unión de compuestos en el sitio activo. Si estos compuestos no son parte de la reacción normal, inhiben a la enzima.” Se define como inhibidores enzimáticos, a los compuestos que disminuyen la velocidad de la reacción al unirse a la enzima por medio del impedimento de unión del sustrato normal. Se conoce como inhibidor reversible, a las moléculas capaces de unirse al sitio de unión a sustratos a través de un enlace no covalente, por lo que presenta la capacidad de disociarse a una velocidad significativa. (Lieberman y Marks, 2013, p.139)

Mecanismo catalítico de la N-miristoiltransferasa

La actividad biológica de la NMT es la catálisis en la miristoilación, o sea, la unión de ácido mirístico -un ácido graso saturado de 14 carbonos- sobre el residuo glicina N-terminal de una serie de proteínas en células eucariotas, a través de un enlace amida, el cual es de carácter irreversible al ser una unión de tipo covalente. (Liu, et al., 2013, p.1551) (Wright, et al., 2010, p.21)

Las modificaciones covalentes de lipidación de proteínas son cruciales para la regular la plasticidad celular, pues afectan tanto propiedades químicas como físicas brindando características tales como actividad, localización y estabilidad. El resto lipídico de peptidos modificados es esencial para permitir que las proteínas hidrosolubles interactúen fuertemente con las membranas o inducen cambios estructurales en las proteínas críticas para procesos como la respiración, el transporte, la transducción de la señal y la motilidad, varios procesos patológicos inducidos y la apoptosis. (Hentschel, Zahedi y Ahrends, 2016, p.759) (Prasad, et al., 2008, p.142-143)

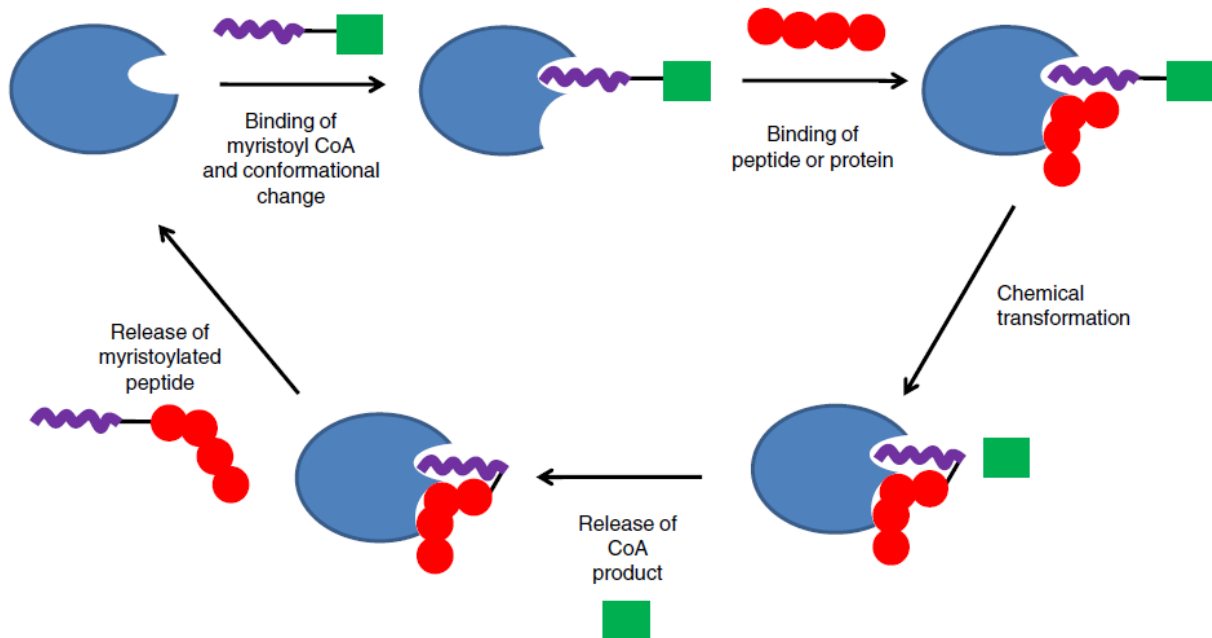


Figura 2. Ciclo catalítico de la NMT

Fuente: (Wright, et al., 2010, p.21)

La catálisis por NMT ocurre a través de un mecanismo Bi-Bi secuencial ordenado, lo cual significa que la formación del producto se deriva de dos mecanismos consecutivos. La enzima forma primero un complejo binario miristol-CoA-NMT con alta selectividad para miristoil-CoA, dicho complejo influye en la interacción de la NMT con péptido por cuanto induce un cambio conformacional necesario para la unión del sustrato peptídico. A continuación, un péptido se une para generar un complejo ternario de miristoil-CoA-NMT-péptido. La transformación química tiene lugar mediante sustitución nucleofílica por ataque de la amina N-terminal de la glicina sobre el tioéster miristoil-CoA. Después de la transferencia catalítica de miristoil-CoA al sustrato peptídico, CoA se libera y, seguidamente, lo hace la proteína N-miristoilada. (Wright, et al., 2010, p.20) (Prasad, et al., 2008, p.143)

En la literatura científica, se menciona que la NMT actúa tanto a nivel cotraduccional - cuando ocurre la translocación al mismo tiempo que la traducción- como postraduccional - correspondientes a cambios posteriores a la síntesis proteica en los ribosomas. La modificación postraduccional permite la incorporación de sustancias químicas no codificadas directamente por la secuencia génica, lo cual brinda nuevas funciones moleculares. Esto incluye cambios en la

proteína interna, eliminación de residuos de aminoácidos, fijación de otras proteínas, modificaciones de cadenas laterales y modificaciones N-terminales como la lipidación por miristoilación; tales modificaciones producen diversas funciones biológicas debido a que se encuentran implicadas en la maduración, señalización, localización, tráfico, comunicación extracelular, regulación y metabolismo de las proteínas. (Wright, et al., 2010, p.19)

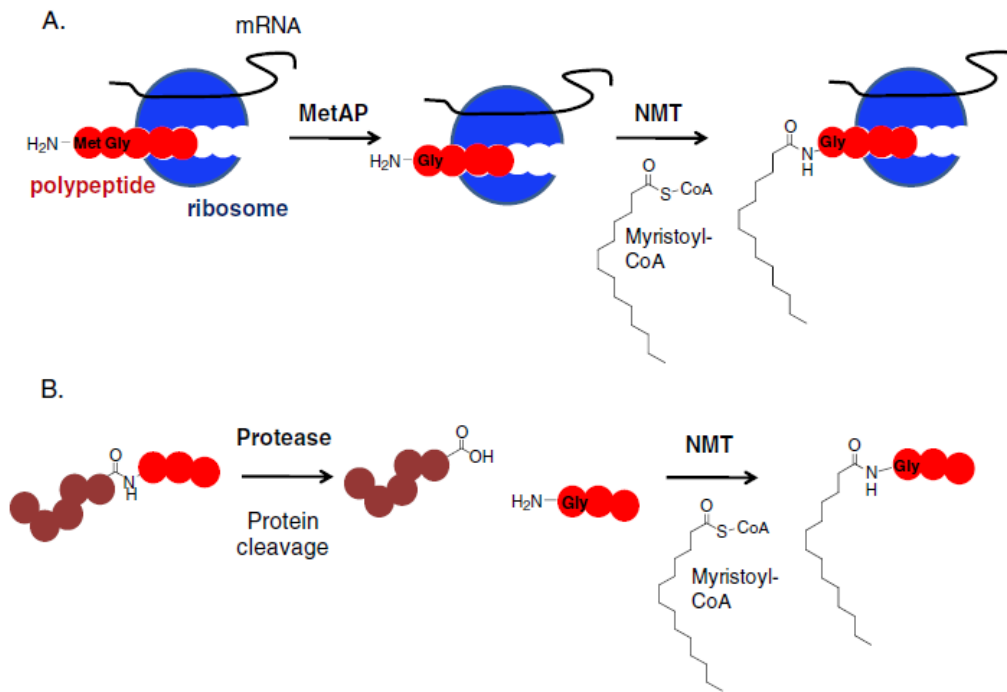


Figura 3. Modificación cotraduccional y postraduccional catalizada por la NMT

Fuente: (Wright, et al., 2010, p.20)

La miristoilación ocurre a nivel cotraduccional máxima cuando menos de 100 residuos han sido polimerizados por el ribosoma y el paso posterior corresponde a la eliminación del residuo líder de metionina por una metionina aminopeptidasa para exponer un residuo glicina N-terminal. Además, la miristoilación postraduccional puede producirse después de la exposición de una glicina interna posterior a la escisión de proteínas pro-apoptóticas mediante caspasas en la cascada apoptótica. El ejemplo anteriormente explicado se visualiza en la Figura 3. (Wright, et al., 2010, p. 20)

Inhibidores de la N-miristoiltransferasa

La unión de la cadena de acilo se ha investigado mediante la creación de análogos de ácido mirístico, en general, como una herramienta para investigar el sitio de unión de la miristoil-CoA y las potenciales inhibidores enzimáticos, entre los cuales se han incluido moléculas formadas por cadenas de longitud variable que contienen éteres, tioéteres, enlaces dobles, enlaces triples, ciclos aromáticos, carbonilos y grupos funcionales de nitrógeno. La mayoría de dichos estudios se han realizado utilizando la NMT de *Saccharomyces cerevisiae* y evidencian similitud de acuerdo con la estructura del sitio de unión determinado por cristalografía de rayos X. (Wright, et al., 2010, p.20)

Al estudiar la NMT como objetivo macromolecular, los investigadores han destacado varias conclusiones, entre ellas: el sitio de unión miristoil-CoA puede acomodar una amplia variedad de grupos funcionales polares y salientes en la cadena, aunque la actividad disminuye con polaridad creciente; para que ocurra la unión entre un ligando y la NMT, la longitud de la cadena es más importante que la hidrofobicidad de la molécula; por lo general, la miristoil-CoA se encuentra unida en una conformación doblada y el sitio de unión de la enzima NMT para miristoil-CoA es altamente conservado entre diferentes especies. (Wright, et al., 2010, p.22)

A partir de lo anteriormente mencionado, se infiere que la NMT es un buen objetivo para el desarrollo de agentes antifúngicos con un nuevo mecanismo de acción si se compara con los actualmente comercializados. Además, estudios genéticos han establecido que “varios patógenos humanos eucariotas, tales como hongos patógenos y parásitos, requieren NMT para su supervivencia” (Wright, et al., 2010, p.22)

La primera caracterización integral de NMT de *Aspergillus fumigatus* fue realizada por Fang y otros (2015) validando la N-miristoiltransferasa de dicha especie como un objetivo para la inhibición del crecimiento del patógeno fúngico filamentoso a través de combinación genética, estructural y química. Se confirma que la NMT es esencial para la viabilidad de *A. fumigatus*. (Fang, et al., 2015, p.1432)

En los últimos años, los investigadores se han interesado por el desarrollo de nuevos inhibidores NMT, entre los que se destacan cinco clases: inhibidores peptidomiméticos, análogos

del ácido mirístico, derivados de p-tolueno sulfonamida, derivados de benzofurano y derivados de benzotiazol. (Prasad, et al., 2008, p.143)

Según lo mencionado en los antecedentes, el [3-(3-metil-2-[(2,3,4-trifluorofenoxy)metil]-1-benzofuran-4-yl)oxy)propil][(piridin-3yl)metil]amina identificado con el código RO-09-4879, es considerado uno de los más potentes y selectivos inhibidores de la NMT de *C. albicans*; se demuestra, además, inhibición en el crecimiento del patógeno *Aspergillus fumigatus*. (Masubuchi, 2003) (Fang, et al., 2015) (PubChem, 2017)

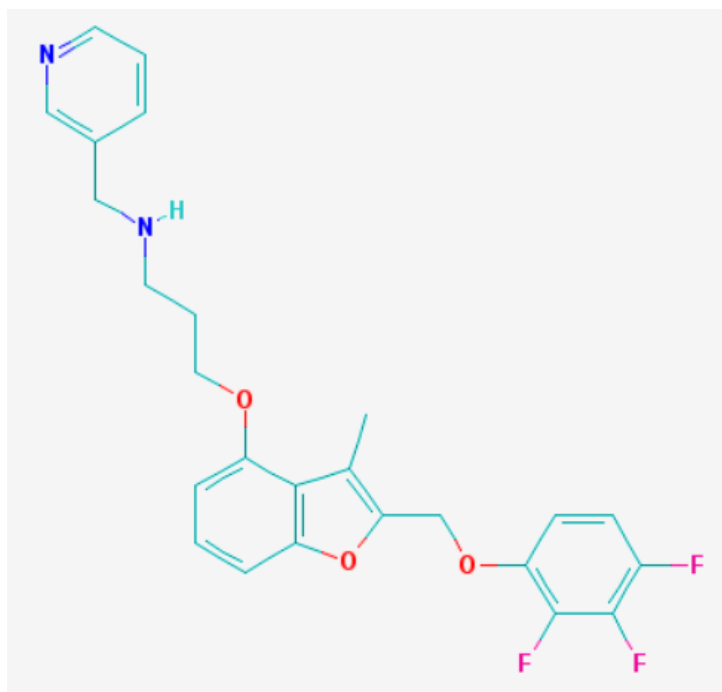


Figura 4. Estructura del RO-09-4879

Fuente: (PubChem, 2017)

Derivados de Benzotiazoles

Las estructuras heterocíclicas proporcionan un gran potencial en el descubrimiento de nuevos quimioterapéuticos; por lo general, forman los elementos centrales de las biomoléculas naturales, además, están presentes en diversos fármacos utilizados clínicamente. En el descubrimiento de drogas, los heterociclos son ampliamente incluidos en las moléculas con el fin de modular las propiedades en un fármaco tales como potencia, lipofilidad, polaridad, solubilidad, entre otras y se investigan arduamente en la búsqueda de agentes terapéuticos con propiedades deseadas. (Kamal, Syed, y Mohammed, 2015, p.1)

Una serie de derivados heterocíclicos que contienen átomos de nitrógeno y azufre sirven como andamios únicos y versátiles para el diseño experimental de moléculas novedosas; es el benzotiazol uno de los compuestos heterocíclicos más importantes, una base débil con actividades biológicas variadas de gran interés científico en la actualidad. Dichas estructuras, se encuentran ampliamente estudiadas en la química bioorgánica y medicinal con aplicación en el descubrimiento de drogas; por ello, se afirma que el benzotiazol es un sistema bicíclico privilegiado. (Achaiah, et al., 2016, p.1375)

Un benzotiazol es un compuesto heterocíclico con fórmula molecular C_7H_5NS , compuesto por un anillo de benceno fusionado con un anillo de tiazol de cinco miembros.

“Los azoles son una clase de anillo de cinco miembros, compuestos heteroaromáticos, isoconjugados con el anión ciclopentadienilo y derivados de esta especie reemplazando dos de los carbonos con un átomo de nitrógeno y otro heteroátomo” (Turchi, Dewar, 1974, p. 389). Se encuentran significativamente relacionados con el pirrol, ya que es un heteroátomo de 5 miembros, difiriendo únicamente en uno de los heteroátomos. Cuando el otro heteroátomo es un azufre, a la estructura se le conoce como tiazol. (Carey, et al., 2014, p.441)

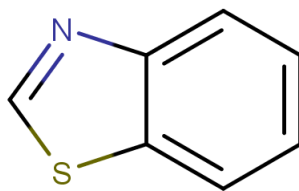


Figura 5. Estructura del benzotiazol

Fuente: (Chemaxon, 2017)

Los métodos tradicionales para la preparación de la estructura de benzotiazol incluyen reacciones de condensación de 2-aminotiofenoles con nitrilos sustituidos, aldehídos, ácidos carboxílicos, cloruros de acilo o ésteres. Otros métodos para la obtención del anillo de benzotiazol incluyen la ciclación de Jacobson de tiobenzanilidas, la reacción mediada por microondas de o-aminotiofenol con bclorocinnamaldehydos, la reacción de disulfuros de dibencilo con oaminotiofenol, la reducción de disulfuro de o,o0-dinitrodifenilo, la reacción de tiobenzoato de S-arilo con arilhaloaminas a partir de 1,2,3-benzoditiazol -2-óxidos, la ciclización radical de intermedios de bencilo y las reacciones de Grignard de arilisotiocianatos. (Rangappa, et al., 2015, p.208)

Actividad biológica de los benzotiazoles

El benzotiazol y sus derivados han sido ampliamente reconocidos como andamios favoritos en el diseño de medicamentos asociados con un amplio espectro de aplicaciones medicinales. En estudios recientes, se ha descubierto que el núcleo benzotiazol es responsable de diversas actividades biológicas, tales como las actividades antiinflamatoria, anticonvulsivante, anticancerígena, antihelmíntica, antidiabética, antitumoral, antifúngica y antituberculosa. (Ali, y Siddiqui, 2013, p.1) (Gill, et al., 2015, p.155) (Rezki, 2016, p.1) (Prabhu, Shastry, Pande, y Selvam, 2011, p.6) (Kamal, et al., 2015, p.1)

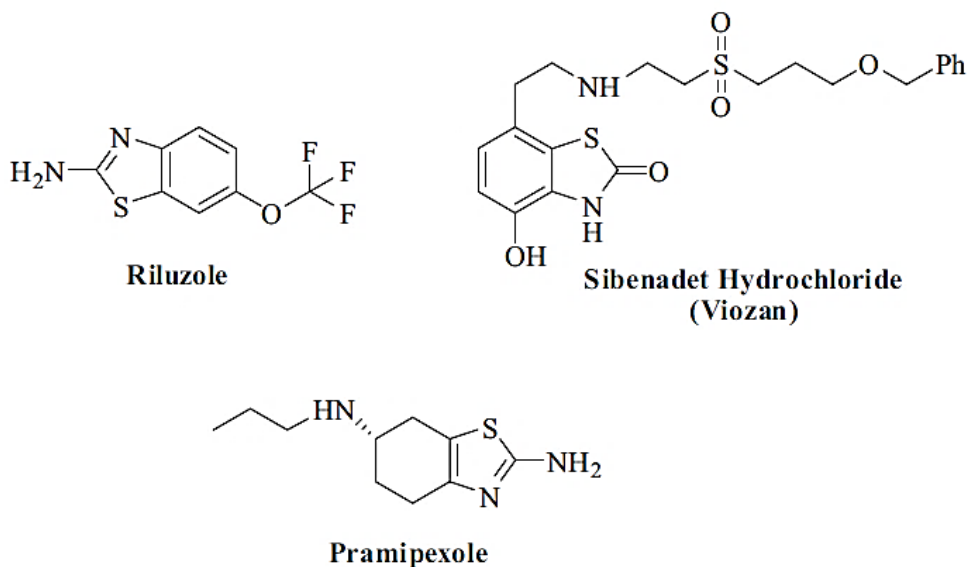


Figura 6. Medicamentos derivados de benzotiazol actualmente comercializados

Fuente: (Gill, et al., 2015, p.156)

En la Figura 3, se muestra la estructura de tres principios activos actualmente comercializados. El riluzol es un fármaco neuroprotector, que bloquea la neurotransmisión glutamatérgica en el SNC por medio de la inactivación de los canales de sodio dependientes del voltaje en las terminales nerviosas glutamatérgicas y de la activación de un proceso de transducción de señales dependiente de la proteína G. (Doble, 1996, p.S233) El Viozan, sildenafil HCl, es un agonista dual del receptor de dopamina D2, y del β 2-adrenoceptor; fue desarrollado específicamente para tratar los síntomas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, EPOC. (Laurson, 2003, p.S23) El pramipexol es un agonista de dopamina; tiene afinidad preferente por el subtipo de receptor D3, que -según estudios preclínicos- podría contribuir a la eficacia adicional para el tratamiento de síndromes motor y psiquiátrico en la enfermedad de Parkinson. (Piercey, 1998, p.141)

Con referencia a lo anterior, actualmente no se comercializan fármacos derivados de benzotiazol para fines infecciosos; por ello, la investigación se centra principalmente en las actividades antifúngicas que provee la estructura base del benzotiazol con el fin de presentar resultados de relevancia en el desarrollo de nuevos agentes.

Benzotiazoles como agentes antifúngicos

A través de diversos ensayos *in vitro*, se ha evidenciado la capacidad antifúngica de los benzotiazoles al inhibir el crecimiento de especies clínicamente significativas entre las cuales se destacan *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Botrytis cinérea*, *Candida albicans*, *Penicillium marneffeii* *Penicillium funiculosum* y *Mucor spp.* (Herrera, et al., 2015) (Maddila, et al., 2016) (Malik, et al., 2013) (Patel, et al., 2011) (Torres, 2006)

Como se mencionó anteriormente, hasta la fecha, se han estudiado una variedad de inhibidores NMT; se destaca que los inhibidores benzoheterocíclicos, como benzofurano, benzotiazol y benzoxazol, son las estructuras que poseen las más potentes actividades antifúngicas. (Liu, et al., 2013, p.1551)

Cabe mencionar que “Los benzotiazoles se han desarrollado como los inhibidores más prometedores y selectivos de la NMT fúngica.” (Prasad, et al., 2008, p.146)

El acoplamiento molecular y el análisis 3D-QSAR se ha aplicado con éxito a un conjunto de derivados de benzotiazol como inhibidores de la *Candida albicans* NMT; se demuestra que la NMT es un objetivo macromolecular para la creación de moléculas innovadoras con benzotiazoles en su estructura. (Sheng, et al., 2007) (Yamasaki, et al., 2005)

El (1R, 3S)-N-{2-[(ciclopropilcarbonil) amino] benzotiazol-6-il}-3-[(2-naftilmetil) amino] ciclohexanocarboxamida, conocido como FTR1335, es un derivado de benzotiazol que muestra fuerte inhibición dosis dependiente de la *Candida albicans* NMT, con una IC₅₀ de 0.49 ± 0.04nM. Además, el FTR1335 mostró una leve inhibición, de igual forma dosis dependiente, de la NMT humana, con una IC₅₀ de 5400 ± 260nM; lo que indica una excelente selectividad sobre 10000X entre 0,49nM y 5400nM. (Prasad, et al., 2008, p.146)

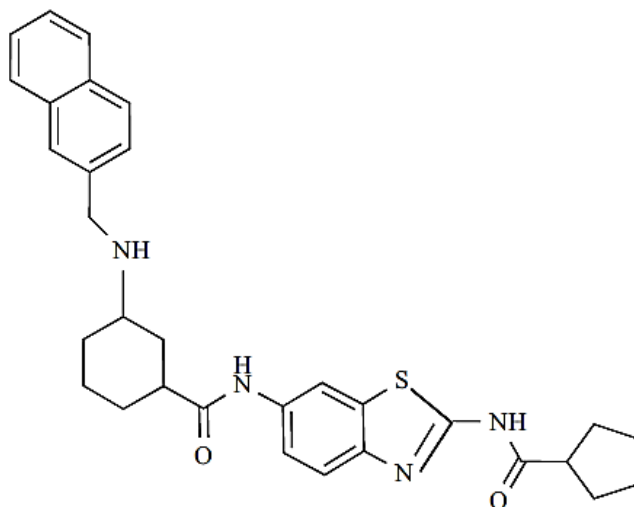


Figura 7. Estructura del FTR1335

Fuente: (Prasad, et al., 2008, p.146)

Resulta importante mencionar que “el FTR1335 es una plataforma adecuada para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos, ya que la estructura de benzotiazol ofrece las más prometedoras en términos de selectividad y actividad fungicida.” (Prasad, et al., 2008, p.147)

Técnicas virtuales en el desarrollo de drogas

La investigación tiene un fin dirigido por la rama de la ciencia llamada química medicinal. Según la comisión especializada IUPAC, química medicinal concierne al descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del mecanismo de acción de compuestos biológicamente activos a nivel molecular; además, se refiere al estudio, identificación y síntesis de los productos metabólicos y compuestos relacionados con las drogas. (Georges, et al., 2015, p.3)

Las drogas, sintéticas o naturales, son identidades químicas capaces de interactuar con complejos sistemas biológicos. Al desarrollar drogas, el estudio se basa en la interacción entre dichas sustancias con diversos receptores biológicos. (Georges, et al., 2015, p.3)

Ante lo mencionado, es posible definir el concepto de química medicinal como una ciencia interdisciplinaria, que cubre un amplio dominio situado en la interface de química orgánica con ciencias de la salud como bioquímica, farmacología, biología molecular, genética, inmunología, farmacocinética y toxicología; además, disciplinas basadas en la química como fisicoquímica y técnicas computacionales como simulación, análisis y visualización de datos. (Georges, et al., 2015, p.4)

El rol de la química medicinal está implicado en los primeros pasos para el desarrollo de una droga; comprende las siguientes fases:

1. Fase de descubrimiento: Consiste en la elección de un objetivo macromolecular (bioquímico, celular o modelo *in vivo*) y la identificación de sustancias activas innovadoras que interaccionen con el objetivo seleccionado.
2. Fase de optimización: Se refiere al mejoramiento del compuesto activo; primero, se busca incrementar la potencia, selectividad y disminuir la toxicidad. Las características que describen el proceso son el establecimiento de relación estructura-actividad (SAR: Structure Activity Relationships), idealmente basado en la comprensión del mecanismo de acción molecular. (Georges, et al., 2015, p.5)

Un esfuerzo de carácter lógico consiste en diseñar moléculas de la manera más racional posible reduciendo al mínimo el enfoque de ensayo y la tendencia al error; esto resulta accesible a través del estudio de biodinámica de la droga y de las interacciones entre moléculas y componentes los receptores biológicos. (Kar, 2007, p.3)

En la “edad actual *in silico*”, las funciones de tecnología de la información (IT) son esenciales en la investigación y desarrollo para la industria farmacéutica, la cual –continuamente– se encuentra inclinada hacia objetivos que permitan mejorar la productividad y reducir los costos asociados con el descubrimiento de drogas. La toxicoinformática, un enfoque *in silico*, surgió como un área importante en el campo de la toxicología e implica la predicción de la toxicidad de las moléculas en sistemas vivos. Los procedimientos para descubrir drogas *in silico* ha alcanzado un desarrollo significativo a fin de predecir nuevas entidades químicas (NCEs) al reducir el número de ensayos experimentales necesarios para la selección de drogas. (Mohan, Gandhi, Garg y Shinde, 2007, p.499)

El modelado molecular permite al investigador utilizar técnicas computacionales para la visualización de moléculas, descubrir nuevos compuestos con potencial para convertirse en drogas aprobadas o para refinar las drogas existentes. El término modelado molecular hace referirse refiere a un software capaz de mostrar y manipular estructuras simples de moléculas. (Lemke, Williams, Roche, Zito, 2008, p.54)

De una manera simple, la informática molecular se basa en la aplicación de métodos informáticos para resolver problemas químicos. Sin embargo, no se limita únicamente a la manipulación y procesamiento de información relacionada con la química. Como alternativa al *high-throughput screening* (HTS), la informática molecular ofrece una multitud de herramientas *in silico* involucradas prácticamente en todas las fases del descubrimiento de drogas. Los métodos de detección virtual proporcionan una solución rentable y conveniente para acceder al espacio químico y descubrir compuestos prototipo en cortos plazos de procesamiento. (Georges, et al., p.142)

Las herramientas computacionales tienen la capacidad de guiar el proceso de optimización de drogas mediante el ajuste de la cinética de unión, mejorando la afinidad con el objetivo macromolecular y eventualmente la potencia; también, es una herramienta modelo de predicción de propiedades fisicoquímicas que conducen a mejorar las características farmacocinéticas, predecir la toxicidad y el compromiso fuera del objetivo, entre otros. Actualmente, la informática molecular desempeña un papel transversal y decisivo, específicamente, en las primeras fases del descubrimiento de fármacos e intenta abordar la actual pérdida de innovación. (Georges, et al., p.142)

En química medicinal, una pregunta clave que debe ser respondida cuando se estudia una clase de compuestos bioactivos, es cómo determinar la variación del acople con un receptor definido dentro de un conjunto de análogos; debido a que, en el curso del diseño de una droga, los principales tipos de modificaciones químicas se realizan por medio de la formación de análogos, alterando los sustituyentes en una estructura base.

Normalmente se acepta que un análogo es esa modificación que produce una relación carbono-esquelético por transformación o síntesis de sustituyentes. Ejemplos:

oxitetraciclina, demclociclina, clortetraciclina, trans-dietilestilbesterol con respecto al estradiol. (Kar, 2007, p.3)

El acoplamiento molecular, o bien llamado *docking*, “es un método que predice la conformación preferida de una molécula, al estar unida a otra, con el fin de formar un complejo estable.” (Lengauer, y Rarey, 1996)

Con la creciente cantidad de datos biológicos moleculares disponibles, el análisis computarizado de las interacciones moleculares se hace cada vez más factible. Los métodos para el acoplamiento molecular asistido por computadora tienen que incluir un modelo razonablemente exacto de la energía y, deben poder tratar la complejidad combinatoria incurrida por la flexibilidad molecular de los socios de acoplamiento. (Lengauer, et. al., 1996)

En forma virtual, pruebas bioquímicas y basadas en células, la ejecución se realiza contra un objetivo aislado o que se incorpora fisiológicamente; asimismo, ha de involucrarse en un proceso patológico. Los compuestos que exceden un determinado valor umbral en la vinculación con el objetivo fisiológico o la modulación de ciertas señales funcionales son llamados *hits*. Si la identidad y la pureza del compuesto y los resultados del ensayo se confirman en una determinación de actividad multipunto, el compuesto se eleva al estado de *validated hit*; de él se espera que se deriven los *leads*. Un “lead” es un compuesto o una serie de compuestos con actividad y selectividad probada de forma virtual y cumple con ciertos criterios de desarrollo de fármacos como originalidad, patentabilidad y accesibilidad, por extracción o síntesis. La variación molecular se espera que cambie los parámetros fisicoquímicos y adecúe el proceso ADME. (Georges, et al., 2015, p.5)

Si el resultante *optimized “lead”* -candidato preclínico- demuestra no poseer toxicidad en modelos celulares y en animales, se convierte en un candidato clínico. Si el candidato cumple con los criterios establecidos para seguridad y eficacia en humanos y supera los obstáculos de comercialización, se convierte en un *new drug entity*, nueva identidad farmacológica. (Georges, et al., 2015, p.5)

Objetivo macromolecular

Los efectos terapéuticos producidos por la mayor parte de las drogas son consecuentes de su interacción con constituyentes macromoleculares del organismo; por esta razón, alteran la función de componentes pertinentes e inicia cambios bioquímicos y fisiológicos. El término receptor drogable designa a las células o complejos macromoleculares con los que es capaz de interactuar una droga para desencadenar un cambio en la función celular. Los fármacos, de manera general, se encargan de alterar la magnitud de una respuesta celular intrínseca más que de crear nuevas respuestas. (Brunton, et al., 2012, p.42)

La interacción de una droga con un objetivo macromolecular envuelve un proceso conocido como *binding* (unión). Usualmente, la unión se desarrolla en un área específica de la macromolécula, la cual se identifica como el *binding site* (sitio de unión). Por lo general, el sitio de unión se representa como un orificio en la superficie de la macromolécula, lo que permite a la droga hundirse dentro de la estructura del objetivo macromolecular. (Graham, 2013, p.4)

Algunas drogas experimentan una interacción permanente con el sitio de unión por medio de un enlace covalente, el cual tiene una fuerza de 200 a 400 kJ/mol. Sin embargo, la mayoría de drogas interaccionan mediante formas débiles conocidas como enlaces intermoleculares, ninguno de estos enlaces iguala a la fuerza de un enlace covalente. (Graham, 2013, p.4)

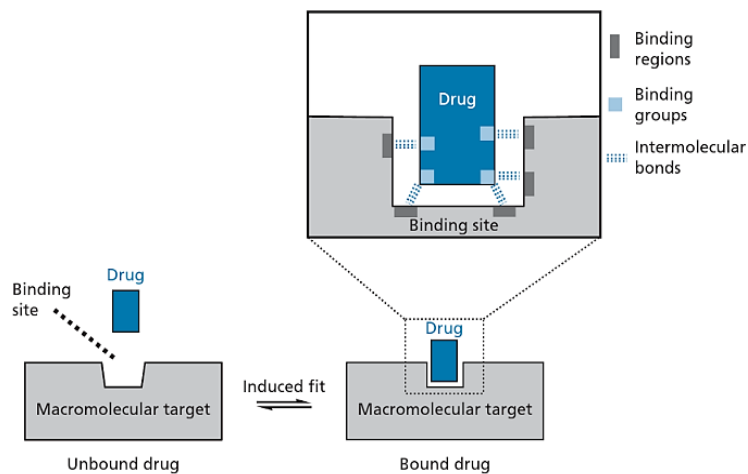


Figura 8. Diagrama del sitio de unión de un objetivo macromolecular

Fuente: (Graham, 2013, p.5)

Las fuerzas intermoleculares incluyen enlaces electrostáticos o iónicos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, interacciones dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas. Al ser enlaces débiles, se forman y luego se rompen, por lo que se produce un equilibrio entre la droga al estar unida o no con su objetivo. Sin embargo, las fuerzas de *binding* que proveen dichos enlaces son lo suficientemente fuertes para mantener la interacción por cierto periodo necesario y que se produzca un efecto; el tiempo de unión depende del número de enlaces intermoleculares involucrados. (Graham, 2013, p.4)

Descriptores moleculares

La elección de distintas variables, que se realiza en un estudio *in silico*, conduce a un conjunto de parámetros o descriptores moleculares; estos se pueden calcular a partir de datos experimentales o de modelos teóricos utilizando programas virtuales.

Con el fin de evaluar el posible comportamiento de las moléculas, para la presente investigación, los descriptores moleculares fueron divididos en cuatro categorías: parámetros fisicoquímicos, indicadores de acople molecular, descriptores de permeación de barreras biológicas y parámetros toxicocinéticos.

Parámetros fisicoquímicos

Peso molecular

El término peso molecular corresponde a la suma del peso de un mol de cada uno de los átomos que constituyen un determinado compuesto.

Área Polar Superficial Topológica (TPSA)

El área polar superficial (PSA) es la suma superficial de área sobre todos los átomos polares que forman parte de una molécula, principalmente oxígeno y nitrógeno, incluyendo también sus hidrógenos unidos. El PSA es un parámetro fisicoquímico comúnmente usado en química

medicinal para la optimización de moléculas en cuanto a la capacidad de permeabilidad a través de barreras o membranas celulares. Las moléculas con una superficie polar de más de 140 Å tienden a ser incapaces de atravesar membranas celulares. (ChemAxon, 2016) (Graham, et al., 2013, p.155)

Enlaces rotables

Estos son los enlaces que permiten rotación libre alrededor de ellos mismos, definidos como cualquier enlace de tipo simple. “Los enlaces no saturados y los enlaces simples conectados a hidrógenos o átomos terminales, los enlaces simples de amidas, sulfonamidas y los que conectan dos anillos aromáticos impedidos (que tienen al menos tres sustituyentes orto) se consideran no rotatorios.” (ChemAxon, 2016)

LogP

El coeficiente de partición, representado por logP, corresponde al “Coeficiente de reparto octanol / agua, que se utiliza en el análisis QSAR y en el diseño racional de fármacos como medida de hidrofobicidad molecular. El logP de una molécula se compone del incremento de sus átomos.” (Chemaxon, 2016)

LogS

La solubilidad acuosa es una de las principales propiedades fisicoquímicas que se optimizan en el descubrimiento de drogas novedosas. La mayoría de los métodos desarrollados para la predicción *in silico* calcula la solubilidad intrínseca para el compuesto dado. La solubilidad intrínseca de un compuesto es la concentración en equilibrio con la fase sólida que se disuelve en la solución; en lugar de la concentración, su logaritmo, logS, se utiliza por conveniencia en el desarrollo de análisis predictivos. (ChemAxon, 2017)

LogKp

En los campos farmacéutico, cosmético y agroquímico, es importante predecir la permeabilidad de la piel como un parámetro crucial para el uso seguro de drogas. Mediante el valor de LogKp, correspondiente al coeficiente de permeabilidad, se estima el transporte de compuestos

a través de la epidermis de mamíferos empleando un modelo simple, basado en el volumen molecular y el coeficiente de partición octanol/agua ($\text{LogKow} = \text{LogP}$). (Potts y Guy, 1992)

Según la U.S. EPA, para productos químicos no listados en RAGS E (Risk Assessment Guidance for Superfund Volume I: Human Health Evaluation Manual: Part E, Supplemental Guidance for Dermal Risk Assessment), el valor de LogKp recomendado es ≤ -1.8 ; se puede estimar utilizando una función del coeficiente octanol/agua, Kow y el peso molecular (MW) por medio de la siguiente ecuación:

$$\log K_p = -2.80 + 0.66 \log K_{ow} - 0.0056 MW$$

Figura 9. Ecuación para la estimación del LogKp

Fuente: (U.S. EPA, 2007, p.23)

Indicadores de acople molecular

Energía libre de Gibbs (ΔG)

El ΔG es un parámetro que indica la “energía libre para realizar trabajo” (Chang, et al., 2013, p. 791). En la presente investigación, será la energía necesaria para que se lleve a cabo la unión de la molécula con el receptor.

Como cualquier otro proceso espontáneo, un evento de unión no covalente tiene lugar sólo cuando está asociado con una energía libre de unión negativa (ΔG), que es la suma de un término entálpico (ΔH) y un término entrópico ($-T\Delta S$). (Bissantz, Kuhn, y Stahl, 2010, p.5061)

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Fuente: (Chang, et al., 2013, p. 791).

Al analizar la ecuación anterior, es posible inferir que, al aumentar la entropía en un sistema, se promueve la negatividad en la energía libre de Gibbs; contrariamente, al aumentar la entalpia se produce un aumento directamente proporcional del ΔG . Por lo tanto, una estrategia para

fomentar procesos espontáneos es el aumento en la entropía, que puede ser considerado como el aumento en los grados de libertad que presenta una molécula.

Es importante mencionar que pequeños cambios ΔG , a menudo, enmascaran cambios grandes y mutuamente compensadores en ΔH y $T\Delta S$. Centrarse en ΔG en el diseño de nuevas moléculas es sin duda la apuesta más segura. (Bissantz, et al., 2010, p.5063)

En resumen, procesos que involucren un valor negativo de ΔG corresponden a los efectuados espontáneamente. Además, “cuanto más estrecha y dirigida sea una interacción, menos se favorece entrópicamente.” (Bissantz, et al., 2010, p.5062)

Ante lo expuesto, se evidencia un objetivo puntual de la química medicinal en el desarrollo de fármacos correspondiente a la búsqueda de cambios estructurales, lo cual favorece la afinidad de distintas moléculas a través de procesos espontáneos de unión y, mediante estos, se espera el surgimiento de un efecto deseado.

Residuos involucrados

Los sustratos, también conocidos como reactantes o moléculas activas, están fusionados específicamente a sitios de unión a sustratos en la enzima a través de interacciones con residuos de aminoácidos de la enzima, que pueden ser interacciones hidrofóbicas, electrostáticas o puentes de hidrógeno, así, brindan la capacidad de producir un cambio conformacional y un posterior efecto. (Lieberman y Marks, 2013, p.112)

Distancia de enlace

La distancia de enlace, también conocida como longitud de enlace o geometría molecular, corresponde a la longitud promedio entre los núcleos de dos átomos enlazados mediante fuerzas intramoleculares o intermoleculares. Las longitudes de un enlace son datos experimentales que se relacionan inversamente con la fuerza de él mismo: cuanto menor sea la distancia más fuerte será el enlace.

Tipo de interacción intermolecular

Las interacciones intermoleculares se producen a través de fuerzas de atracción entre moléculas. Existen diferentes tipos de fuerzas intermoleculares que producen la interacción, entre estas se incluyen las fuerzas de van der Waals (dipolo-dipolo, ion-dipolo, de dispersión) y los puentes de hidrógeno. (Chang, et al., 2013, p.469)

Es importante mencionar que el enlace de hidrógeno es “un tipo especial de interacción dipolo-dipolo entre el átomo de hidrógeno y un enlace polar, como N-H, O-H, o F-H, y un átomo electronegativo de O, N o F.” (Chang, et al., 2013, p.473)

En la literatura, se indica que la fuerza del puente de hidrógeno es determinada por la interacción coulombica entre el par libre de electrones del átomo electronegativo y el núcleo del hidrógeno. Por ejemplo, el flúor es más electronegativo que el nitrógeno, por lo que se esperaría que las interacciones intermoleculares F-H sean más fuertes en comparación con las N-H. (Chang, et al., 2013, p.473-474)

Por otra parte, las moléculas aromáticas apiladas cara a cara (*stacked in a face-to-face manner*) pueden verse implicadas en interacciones atractivas, denominadas interacciones π - π . En la literatura científica, se indica que la energía típica de interacción π - π es 2-3 kcal/mol para el dímero de benceno. Dado que las interacciones π - π se originan principalmente a partir de fuerzas de dispersión, es probable que la magnitud de la energía de interacción varíe significativamente para moléculas heteroaromáticas dependiendo de sus caracteres π -excesivo, como el furano y π -deficiente como el imidazol. (Hayashi, Higuchi, y Ninomiya, 2009, p.2)

Cuando los restos π se colocan de manera borde frente a cara (*edge-to-face manner*), se produce una interacción atractiva entre el grupo CH y el resto π , denominada interacción π -CH. En las interacciones π -CH, las fuerzas de transferencia de carga y dispersión juegan papeles importantes; además, se dice que la energía de la interacción π -CH es comparable a la de la interacción π - π en el dímero de benceno. (Hayashi, et al., 2009, p.2)

La energía de la interacción es considerablemente más grande al producirse fuerzas intermoleculares entre especies catiónicas y electrones π , las cuales son conocidas como

interacciones π -cation; cabe agregar que las interacciones π -cation parecen originarse a partir de fuerzas electrostáticas entre la carga positiva del catión y el carácter negativo de los electrones π .

En cuanto a los aniones, también presentan capacidad de involucrarse en las interacciones electrones π , las cuales se denominan interacciones π -anión. Dado que el benceno es un resto π -excesivo muy significativo, la interacción π -anión no resulta tan importante en la mayoría de los derivados de benceno; sin embargo, para las moléculas heteroaromáticas las interacciones π -anión -en muchos casos- son consideradas importantes. (Hayashi, et al., 2009, p.2)

Finalmente, las interacciones π -OH y π -NH son conocidas como "enlaces de hidrógeno débiles", donde los radicales δ^+ polarizados y los electrones π interactúan de forma atractiva. Aunque las energías de interacción son bastante pequeñas, aparecen con frecuencia en compuestos bioquímicos. (Hayashi, et al., 2009, p.3)

Toxicidad en ambientes acuáticos

La toxicidad en especies incluidas entre el grupo de los peces, los invertebrados acuáticos y las plantas acuáticas se utiliza para predecir la toxicidad de la población acuática en general. La Oficina de Prevención de la Contaminación y Tóxicos de la EPA (EPA/OPPT) se ha centrado, principalmente, en el desarrollo de modelos de toxicidad acuática para organismos que habiten en ambientes de agua dulce, pues la mayoría de las emisiones de productos químicos industriales producen contaminación directa del agua dulce. (Mayo¹, et al., 2012, p.3) Por ello, se desarrolló el programa virtual ECOSAR, Ecological Structure Activity Relationships.

De manera frecuente, en la estimación de parámetros para peces de agua dulce, se incluyen especies tales como la carpa común (*Cyprinus carpio*), el guppy (*Poecilia reticulata*), el matrimonio rojo (*Oryzias latipes*), el pez cebra (*Brachydanio rerio*), el pez gordo (*Pimephales promelas*), el pez luna (*Lepomis macrochirus*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Por otra parte, en el grupo de los invertebrados de agua dulce, generalmente, se incorporan las especies *Daphnia magna* o *Daphnia pulex*. Además, se incluyen la *Desmodesmus subspicatus* o la *Pseudokirchneriella subcapitata*, como especies de algas de agua dulce. (Mayo¹, et al., 2012, p.5)

Sin embargo, las ecuaciones del programa ECOSAR se derivan de especies sustitutivas de peces, zooplancton y fitoplancton, pudiendo comprender varios géneros y familias; por lo que dichas ecuaciones no pretenden estimar la toxicidad para ciertas especies en específico; contrariamente, se inclinan por determinar el posible impacto en los niveles tróficos generales que representan, correspondientes a peces, invertebrados acuáticos y plantas acuáticas. (Mayo¹, et al., 2012, p.5)

Los principales predictores del impacto tóxico en ambientes acuáticos y utilizados en el programa ECOSAR son los definidos a continuación.

LC50

La concentración letal media (por sus siglas en inglés LC50: Media Lethal Concentration) es definida como la concentración de un químico en el aire o en el agua, causante de la muerte del 50% del grupo de animales de prueba. Normalmente, se expresa en miligramos de sustancia por litro de agua, mg/L (Mayo², Moran, Nabholz, Meylan, y Howard, 2012, p.53). En el desarrollo de esta investigación, se estimó la LC50 para animales acuáticos, tales como peces e invertebrados acuáticos.

EC50

Se conoce como EC50 a la concentración media del efecto, específicamente, corresponde a una concentración estadística de una sustancia que, se puede esperar, cause un efecto específico (por ejemplo, inhibición del crecimiento) en el 50% de los organismos de ensayo. Por lo general, se expresa en miligramos de sustancia por litro de agua, mg/L. (Mayo², et al., 2012, p.53) En la presente investigación, se utilizó la EC50 para determinar posibles efectos en el crecimiento del alga verde (Green Algae), destacando que la EC50 de las algas no se basa en índices de letalidad, sino en la tasa de crecimiento o en las producciones de biomasa. (Mayo¹, et al., 2012, p.11)

ChV

El valor crónico, reconocido por sus siglas en inglés como ChV (Chronic Value), se define como la media geométrica de la concentración del efecto no observado (NOEC) y la concentración más baja del efecto observado (LOEC); lo que puede ser representado matemáticamente como: $ChV = 10^{([\log (LOEC \times NOEC)] / 2)}$. (Mayo¹, et al., 2012, p.3)

Para esta investigación, se realizó el análisis de parámetros de ChV estimados para peces, invertebrados acuáticos y plantas acuáticas, correspondientes a DChV (Daphnid Chronic Value), FChV (Fish Chronic Value) y GACHV (Green Algae Chronic Value), respectivamente.

Cabe mencionar que en el programa ECOSAR se indican valores de LogP máximos para que las estimaciones realizadas sean evocativas a resultados significativamente probables. “Si el Log Kow de la sustancia química es mayor que los puntos específicos presentados a continuación, no se esperan efectos a la saturación para esos parámetros”. (ECOSAR, 2017)

En general, cuando el Log P es menor o igual a 5.0 ECOSAR, proporciona estimaciones confiables de la toxicidad cuantitativa (numérica) para los efectos agudos hacia peces e invertebrados; para las algas verdes el valor de LogP requerido es ≤ 6.4 . Si el LogP excede esos límites generales, los datos empíricos indican que la baja solubilidad de estos productos químicos lipófilos da como resultado "ningún efecto a la saturación" durante un ensayo de 48 o 96 horas. (Mayo², et al., 2012, p.17)

En cuanto a las exposiciones crónicas, el rango de LogP aplicable para obtener valores cuantitativos confiables se extiende hasta el Log P 8.0; en caso de que el producto químico exceda el valor establecido, indica que es poco soluble, por lo cual no se esperan efectos en soluciones saturadas, incluso, con exposiciones a largo plazo. (Mayo², et al., 2012, p.17)

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

En este capítulo, se describen los distintos procesos metodológicos seguidos al ejecutar la investigación.

Enfoque

El presente estudio se caracteriza por exhibir un enfoque de tipo cuantitativo, debido a que se pretende demostrar la hipótesis planteada a través de una serie de procesos en forma secuencial, llegando así a la obtención de resultados probatorios utilizando como método la medición.

La recolección de datos se fundamenta en la medición (se miden las variables o conceptos contenidos en la hipótesis). Esta recolección se lleva a cabo al utilizar procedimientos estandarizados y aceptados por la comunidad científica. Para que una investigación sea creíble y aceptada por otros investigadores, debe demostrarse que se siguieron tales procedimientos. (Hernández, et al., 2014, p. 5)

Diseño

La investigación se realizará manipulando diferentes variables, utilizando diferentes estrategias para la obtención de la información resultante y dando respuesta al planteamiento del problema a través de la comprobación de la hipótesis planteada; por lo que se concreta que el estudio de investigación presenta un diseño experimental: “la investigación experimental consiste en llevar a cabo ensayos a través de los cuales se pretende observar algún aspecto del caso en análisis”. Estas “se basan en hipótesis preestablecidas, miden variables y su aplicación debe sujetarse al diseño concebido con antelación, al desarrollarse, el investigador está centrado en la validez, el rigor y el control de la situación de investigación”. (Quintana, 2014, p.9) (Hernández, et al. 2014, p. 150)

Objetos de estudio

En el presente estudio experimental, se realizarán análisis virtuales para la evaluación del acople molecular haciendo uso de la N-Miristoiltransferasa como objetivo macromolecular. Además, se utilizará el benzotiazol, como la estructura del farmacóforo, del cual serán derivados distintos ésteres análogos a través de racionales cambios estructurales.

Hit

Corresponde al éster derivado de benzotiazol, con alteraciones en la cadena lipofílica, que presenta la mejor energía de acople molecular con el objetivo biológico. A partir de él, se proponen diferentes modificaciones a nivel estructural, conservando la estructura basal, o bien, el farmacóforo para únicamente modificar parámetros fisicoquímicos e interacciones moleculares.

Lead

El término *lead* se utilizará para designar la molécula derivada de sucesivas modificaciones estructurales, que presente mayor potencial a convertirse en agente antifúngico, lo cual será determinado por la afinidad del acople con el objetivo macromolecular en el cual se pretende ejercer el efecto.

Variables

Una variable está definida como: “una propiedad que puede fluctuar y cuya variación es susceptible de medirse u observarse.” (Fernández, et al., 2014, p.105)

Tabla 1. Definición de las variables de la investigación

Variable	Definición conceptual	Definición operacional e instrumental
Sito activo	Área específica del objetivo macromoléculas, identificada como <i>binding site</i> , que permite a la droga hundirse dentro de la estructura produciendo enlaces con capacidad de brindar un efecto. (Graham, 2013, p.4)	Se definió el sitio activo con estimaciones realizadas a través de la herramienta virtual CASTp.
Grupo funcional	"Grupo de átomos que es responsable del comportamiento químico de la molécula que lo contiene". (Chang, et al., 2013, p. 1028)	Se produjeron cambios estructurales en los ésteres derivados de benzotiazol utilizando el programa virtual Marvin Sketch.
Peso molecular	Es la suma de los pesos moleculares de los átomos, que constituyen un determinado compuesto; será identificado mediante las siglas MW.	Se determinaron los distintos parámetros fisicoquímicos mediante las técnicas virtuales brindadas por el programa Chemicalize.
TPSA	El presente estudio corresponde al área polar superficial y es definida como la suma superficial de área sobre todos los átomos polares que forman parte de una molécula, principalmente oxígeno y nitrógeno, se incluyen, también, sus hidrógenos unidos. (ChemAxon, 2016)	

Enlaces rotables	Enlaces que permiten rotación libre alrededor de ellos mismos, definidos como cualquier enlace de tipo simple, identificados con las siglas RB.	
LogS	Logaritmo base 10 de la concentración en equilibrio con la fase sólida que se disuelve en la solución acuosa. (ChemAxon, 2017)	
LogP	Logaritmo base 10 del coeficiente de una relación de concentraciones de un compuesto no ionizado en dos fases de disolventes inmiscibles en equilibrio. (Chemaxon, 2016)	
LogKp	Coeficiente de permeabilidad, que predice el transporte de compuestos a través de la epidermis de mamíferos, basado en el volumen molecular y el coeficiente de partición octanol/agua. En RAGS E, -1.82 corresponde al valor de LogKp recomendado. (U.S. EPA, 2007, p.34)	Se estimó el LogKp mediante la ecuación mostrada en la Figura 8, tomando como fuente U.S. EPA, 2007, p.23.
ΔG	“Energía libre para realizar trabajo” (Chang, et al., 2013, p. 791). En el presente trabajo, será la energía necesaria para que se lleve a cabo la unión de la molécula con el receptor.	Los indicadores de acople molecular fueron obtenidos a través de los métodos virtuales ofrecidos por AutoDock Tools, AutoDock Vina, PyMol y Discovery Studio.

<p>Residuos involucrados</p>	<p>Aminoácidos presentes en el sitio activo del objetivo macromolecular involucrados en interacciones intermoleculares con los ésteres derivados de benzotiazol.</p>	
<p>Distancia de enlace</p>	<p>Longitud entre los núcleos de dos átomos involucrados en un enlace. En la presente investigación, corresponde a un parámetro descriptor de la fuerza del enlace entre los ésteres de benzotiazol con el objetivo macromolecular.</p>	
<p>Tipo de interacción intermolecular</p>	<p>Fuerza intermolecular involucrada en la interacción entre un grupo funcional del ligando con un residuo (aminoácido) presente en el sitio activo del objetivo macromolecular. La clasificación incluye fuerzas de van der Waals (dipolo-dipolo, ion-dipolo, de dispersión) y puentes de hidrógeno. (Chang, et al., 2013, p.469)</p>	
<p>LC50</p>	<p>Concentración de un químico en el aire o en el agua causante de la muerte del 50% del grupo de animales de prueba. Es expresada en mg/L (Mayo², 2012, p.53). En la presente investigación, fue utilizada para predecir posibles efectos en peces y animales invertebrados, identificados como Fish y Daphnid, respectivamente.</p>	<p>A través del programa ECOSAR, fueron determinados los posibles parámetros de impacto ecológico.</p>

<p>EC50</p>	<p>Concentración estadística de una sustancia, de la cual se espera que cause un efecto específico (inhibición del crecimiento) en el 50% de los organismos de ensayo; se expresa en mg/L. (Mayo², et al., 2012, p.53). En la investigación, se utilizó para determinar posibles efectos en el crecimiento del alga verde. (Mayo¹, et al., 2012, p.11)</p>	
<p>ChV</p>	<p>Media geométrica de la concentración del efecto no observado (NOEC) y la concentración más baja del efecto observado (LOEC). (Mayo¹, et al., 2012, p.3) Para esta investigación, se se determinó DChV, FChV y GACHV.</p>	

Instrumentos

La generación de resultados en la presente investigación se produjo a través de técnicas analíticas virtuales, utilizando programas computacionales afines al método.

Al llevar a cabo un análisis virtual para el diseño racional de compuestos, resulta esencial preparar las moléculas analíticas y el objetivo macromolecular, lo cual fue posible por medio de los programas Marvin Sketch, CASTp, Discovery Studio y AutodockTools.

Las herramientas de predicción utilizadas fueron AutoDock Vina, PyMol y Chemicalize. Además, se empleó la ecuación, que se muestra en la Figura 8, para realizar estimaciones de

permeabilidad dérmica. También, se analizó la toxicidad como impacto ecológico, a través del programa ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationship) brindado por el servidor EPISuite de la United States Environmental Protection Agency (EPA).

MarvinSketch es un editor químico avanzado, sirve para dibujar estructuras y reacciones químicas. El programa brinda una serie de herramientas con el propósito de editar a través de funciones básicas en la interfaz gráfica de usuario y funciones avanzadas como dibujo de germinación, accesos directos personalizables y grupos abreviados. (Chemaxon, 2017)

BIOVIA Discovery Studios es un conjunto de aplicaciones científicas validadas y construidas sobre BIOVIA Pipeline Pilot. El software ofrece una mezcla de herramientas de investigación abiertas, escalables y colaborativas diseñadas a fin de solventar las necesidades actuales en el descubrimiento de nuevas sustancias. (BIOVIA, 2017) En la presente investigación, el programa será utilizado como herramienta para la preparación del objetivo macromolecular y la visualización de resultados de acople molecular.

AutoDockTools es una herramienta creada por The Scripps Research Institute, se emplea en la preparación de coordenadas y el diseño de experimentos de acoplamiento; permite, al usuario, identificar el sitio activo y determinar –visualmente- el volumen de espacio buscado en la simulación de acoplamiento. Además, ayuda a especificar parámetros de búsqueda y el lanzamiento de cálculos de acoplamiento; facilita el formato de los archivos de las moléculas de entrada a través de la protonación, el cálculo de las cargas y la especificación de enlaces giratorios en el ligando y la proteína. (Morris, et al., 2009, p.2786)

AutoDock Vina se trata de un novedoso programa para el acoplamiento molecular y la proyección virtual; consigue una aceleración de aproximadamente dos órdenes de magnitud en comparación con el software de acoplamiento molecular previamente desarrollado (AutoDock 4) por el mismo laboratorio, The Scripps Research Institute. Además, mejora, de manera significativa, la exactitud de las predicciones de *docking*, pues calcula automáticamente los mapas de cuadrícula y agrupa los resultados de una manera transparente para el usuario. (Trott, y Olson, 2010, p.455)

El sistema de gráficos moleculares PyMOL es una plataforma para varios programas y aplicaciones que usan las propiedades versátiles de visualización de PyMOL. (Seeliger, y Groot,

2010, p.417) En la presente investigación, fue utilizado para visualizar los resultados de *docking* anteriormente realizados a través de AutoDock Vina.

Chemicalize es un programa desarrollado por ChemAxon, el cual proporciona predicciones basadas en la estructura para cualquier molécula. Los cálculos disponibles incluyen análisis elemental, nombres e identificadores, pKa, logP / logD, así como solubilidad. (Chemicalize, 2017)

El programa ECOSAR, Ecological Structure Activity Relationships es un sistema predictivo computarizado, que calcula niveles de toxicidad acuática, la cual puede producir un determinado compuesto. Mediante el uso de Relaciones de Estructura de Actividad (SAR: Structure Activity Relationships), la herramienta calcula parámetros tales como toxicidad aguda (a corto plazo) de un producto químico y toxicidad crónica (a largo plazo o retrasada) en organismos acuáticos, incluyendo peces, invertebrados acuáticos y plantas acuáticas. (EPA, 2017)

Proceso para la recolección y el análisis de datos

En el presente apartado, se tiene como finalidad proporcionar una descripción del procedimiento que se utilizó para llevar cabo la obtención y el análisis de datos.

Determinación del acople molecular

Al realizar el *docking*, el primer paso es la selección de una proteína para que funcione como objetivo macromolecular. Por ello, se realizaron diferentes búsquedas en Protein Data Bank (PDB) hasta identificar la proteína con mejor resolución. Con base en la literatura científica y a través de la herramienta CASTp, se identificó el sitio de unión. Además, se preparó el objetivo usando el programa BIOVA Discovery Studio eliminando las aguas y ligandos. Posteriormente, el análisis de acople molecular se realizó utilizando AutoDock Tools y AutoDock Vina; después, la correspondiente visualización de los resultados fue posible a través de los programas PyMol y BIOVA Discovery Studio.

Estimación de propiedades fisicoquímicas

Se analizaron las propiedades fisicoquímicas de las moléculas con la finalidad de comparar distintos parámetros entre el *hit* y sus correspondientes análogos derivados, empleando la herramienta virtual Chemicalize.

Además, se realizaron estimaciones de permeabilidad dérmica utilizando la ecuación mostrada en la Figura 8, junto a los valores de masa molar y de LogP, estimados a través de Chemicalize; con el propósito de caracterizar la absorción dérmica de los ésteres de benzotiazol en seres humanos, para determinar si el contacto a través de piel es una posible ruta de exposición.

Diseño de modificación racional

Tomando en cuenta variables estéricas y electrónicas, se analizaron posibles cambios estructurales en la molécula *hit*, generando una serie de ligandos, con la finalidad de mejorar la unión con el respectivo objetivo macromolecular. Resulta oportuno mencionar que, al analizar los primeros 12 resultados del *docking*, se identificó la molécula *hit* con una longitud de cadena hidrocarbonada definida. La importancia de lo anteriormente mencionado reside en que dicha extensión de cadena, al parecer importante para la unión, se mantuvo inmodificada.

Predicción de la toxicidad ecológica

Los ésteres de benzotiazol, estudiados a través de esta investigación, se proponen como moléculas con potencial antimicótico para ser utilizadas en procedimientos de limpieza de cuartos que requieren condiciones específicas en cuanto a calidad del aire interior; por lo que resulta necesario establecer la capacidad de crear toxicidad a nivel ambiental. A fin de realizar dicho análisis, se hizo uso del programa ECOSAR, estimando distintos parámetros que brindan la posibilidad de predecir efectos tóxicos en organismos acuáticos.

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Selección del objetivo macromolecular

Al analizar el acople molecular, la selección del objetivo macromolecular involucra la identificación de una estructura cristalográfica con buenas cualidades y la definición del respectivo sitio de unión con el fin de promover interacciones que, potencialmente, puedan estar involucradas en la alteración de efectos o respuestas esperadas por parte del objetivo biológico.

La estructura cristalográfica de la N-miristoiltransferasa ha sido ampliamente estudiada para diversas especies, entre las que se incluyen *Leishmania major*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*. Considerando lo mencionado en el planteamiento del problema y el marco teórico, el interés reside en la NMT de la especie *Aspergillus fumigatus*; por ello, se realizaron búsquedas específicas en el banco de proteínas Protein Data Bank y se seleccionó la 4QBJ debido a la resolución de la estructura (*Spacing* de 2.1 Å) y a las publicaciones científicas de respaldo que presenta. (Shimada, Suzuki, Katakura, 2015) (Fang, et al., 2015)



Figura 10. Estructura cristalográfica de la N-miristoiltransferasa de *Aspergillus fumigatus* visualizada en BIOVA Discovery Studio

Fuente: (Protein Data Bank, 2017)

Definición del sitio de unión

La definición del sitio de unión, área de la macromolécula en donde la unión de un ligando puede desencadenar una respuesta, se hizo según lo indicado en la literatura científica, donde se menciona que la NMT de *Aspergillus fumigatus* (NMTAf) presenta -en su sitio activo- los residuos 378-Serina, 389-Valina y 391-Alanina. Es necesario aclarar que el sitio de unión a péptidos de NMT está altamente conservado con diferencias mínimas de secuencia entre especies; sin embargo, el residuo Val-389 es único para la NMTAf. (Fang, et al., 2015)

Mediante la herramienta CASTp, fue posible determinar el *pocket* (hendidura en la estructura proteica del objetivo macromolecular) correspondiente al sitio activo, compuesto por 78 residuos de aminoácidos, incluyendo los anteriormente mencionados.

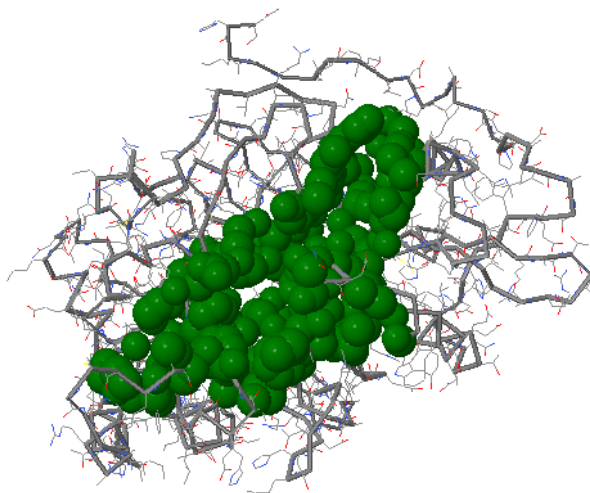


Figura 11. Sitio de unión del objetivo macromolecular utilizando CASTp

Fuente: (Dundas, et al., 2006)

Seguidamente, se procedió a preparar el objetivo macromolecular usando BIOVA Discovery Studio: se eliminó el ligando y las moléculas de agua que rodeaban la estructura proteica. Según la literatura científica, el éxito de los cálculos de acoplamiento depende fundamentalmente de la especificación del sitio de unión para restringir la búsqueda, por lo que mediante Autodock Tools, se definió el Gridbox, correspondiente a las dimensiones del área donde se espera que se produzca la unión de los ligandos; se realiza indicando las siguientes coordenadas:

center x=14.20, y=6.00, y z=18.90, *size*: x=22, y=24, z=28 y un *spacing*, (espaciado) de 1.000 Å, tomando como referencia el *pocket* identificado mediante CASTp.

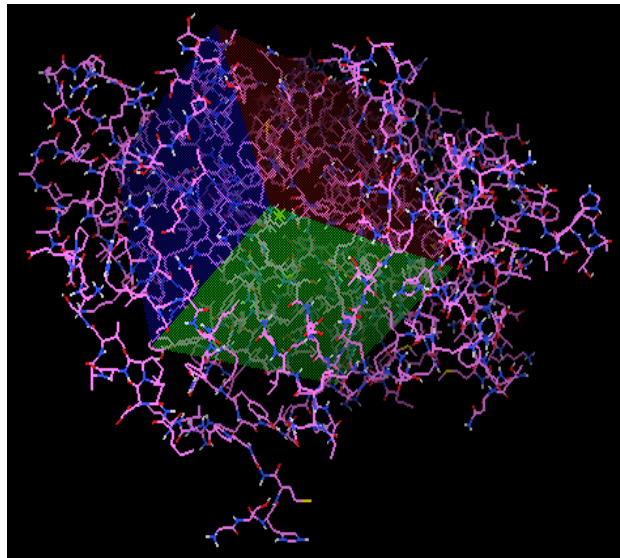


Figura 12. Gridbox del objetivo macromolecular NMTAf

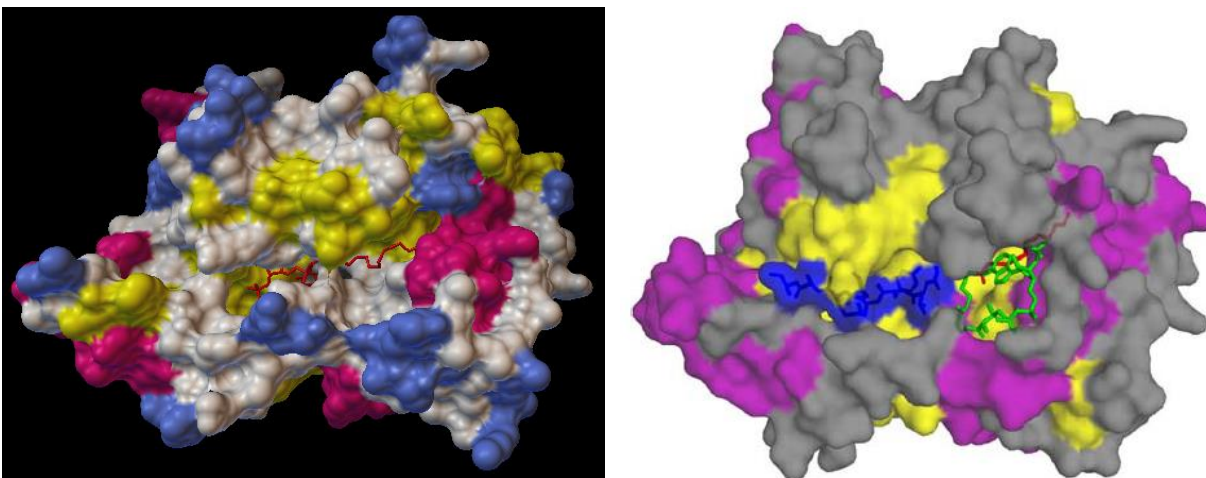
Fuente: (Autodock Tools, 2017)

Resulta necesario verificar si el sitio de unión anteriormente definido corresponde al correcto, por lo que se procedió a comparar el espacio con el sitio activo definido por Wright y otros (2010). La estructura se analizó empleando PyMOL, en el que se visualizó el sitio de acople de la Miristoil-CoA con el objetivo macromolecular.

Efectivamente, el área definida como sitio de unión para la NMTAf corresponde al sitio activo, pues –como se evidencia en las Figuras 13 y 14- las interacciones de la Miristoil-CoA con la NMT de ambas especies se producen en un espacio similar: al ser proteínas homólogas, dicha comparación es válida. El término proteínas homólogas se refiere a que ambas estructuras presentan un origen evolutivo en común: “la evidencia principal de la homología entre proteínas, y por ende de su ancestro común, es la similitud en sus secuencias o estructuras.” (Lodish, et al., 2005, p.68)

La mayoría de los enfoques computacionales realizan investigaciones a través de la búsqueda de estructuras similares u homólogas de la secuencia de consulta para determinar el sitio de unión al ligando, debido al limitado número disponible de estructuras proteicas.

Es importante destacar que en la Figura 12, en la imagen de la derecha, la Miristoil-CoA corresponde a la estructura de color verde con rojo y el resto azul es un péptido. Respecto a la imagen de la izquierda, únicamente muestra la estructura de la Miristoil-CoA con color rojo.



Figuras 13 y 14. Sitio de unión de la Miristoil-CoA con la NMT de *Aspergillus fumigatus* (izquierda) y con la NMT de *Saccharomyces cerevisiae* (derecha)

Fuente (derecha): (Wright, et al., 2010, p.21)

Generación de la molécula *Hit*

Tomando en consideración que los grupos COO-R están presentes en gran cantidad de moléculas biológicas, entre los que destacan los ácidos grasos y se encuentra el ácido mirístico, un ácido graso de 14 carbonos implicado en el proceso de miristoilación como precursor de la

miristoil-CoA, se produjo la inclusión del grupo éster dentro de la estructura de los análogos derivados de benzotiazol para generar moléculas semejantes a los ácidos grasos.

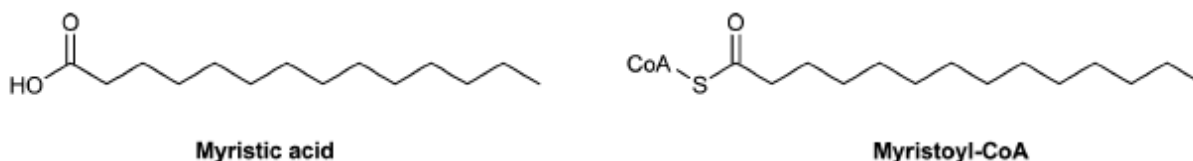


Figura 15. Estructura del ácido mirístico y de la miristoil-CoA

Fuente: (Wright, et al., 2010, p.31)

Por otra parte, con base en la literatura científica, se sabe que los benzotiazoles 2-sustituídos presentan un alto potencial para brindar actividad biológica; por ello, se decidió analizar derivados de benzotiazol 2-carboxilato. Es preciso agregar que los ésteres de benzotiazol, en posición 2, pueden presentar dos acomodos estructurales distintos, los cuales se indican en la Figura 16; por lo tanto, se procedió a realizar el análisis virtual para ambas estructuras: R1-1,3-benzotiazol-2-carboxilato (Serie CBX) y 1,3-benzotiazol-2yl-R1ato (Serie YLA), respectivamente. Estas corresponden a isómeros estructurales de posición, debido a que el grupo éster ocupa una posición diferente en cada isómero (moléculas con misma fórmula, pero estructura diferente). (McMurry, et al., 2013, p.82)

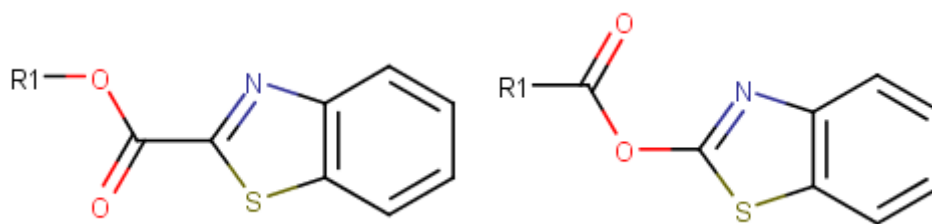


Figura 16. Ésteres derivados de benzotiazol 2-sustituídos: Serie CBX (izquierda) y Serie YLA (derecha)

Tomando como referencia que el ácido mirístico es un ácido graso saturado de 14 carbonos, se propuso analizar un total de 12 moléculas con alteraciones a nivel de R1, generando una cadena lipofílica con números pares de carbonos hasta llegar a obtener una longitud total de 14 carbonos, para mimetizar dicha estructura. Resulta necesario mencionar que a nivel biológico los ácidos grasos se caracterizan por tener un número par de átomos de carbono; esto es consecuente en cuanto que la sintasa de ácidos grasos agrega, secuencialmente, unidades de dos carbonos a partir de malonil-CoA a la cadena acilo graso. (Lieberman, et al., 2014, p.597)

Por otra parte, resulta oportuno considerar que la estructura de los ésteres de benzotiazol con cadenas hidrocarbonadas corresponden a moléculas anfifílicas; por lo tanto, podrían verse implicados en procesos de transporte celular activo mediado por P4-ATPasas, comúnmente conocidas como flipasas, las cuales corresponden a proteínas integrales de membrana transportadoras de moléculas anfifílicas, desde el espacio exoplásmico hasta el citosólico de las membranas celulares eucarióticas. (López, Theorin, Palmgren y Günther, 2014, p.1227) (Coleman, Quazi, y Molday, 2013, p.2) (Andersen, et al., 2016, p.2) El posible mecanismo implicado en la actividad transportadora de las flipasas se muestra en la siguiente figura.

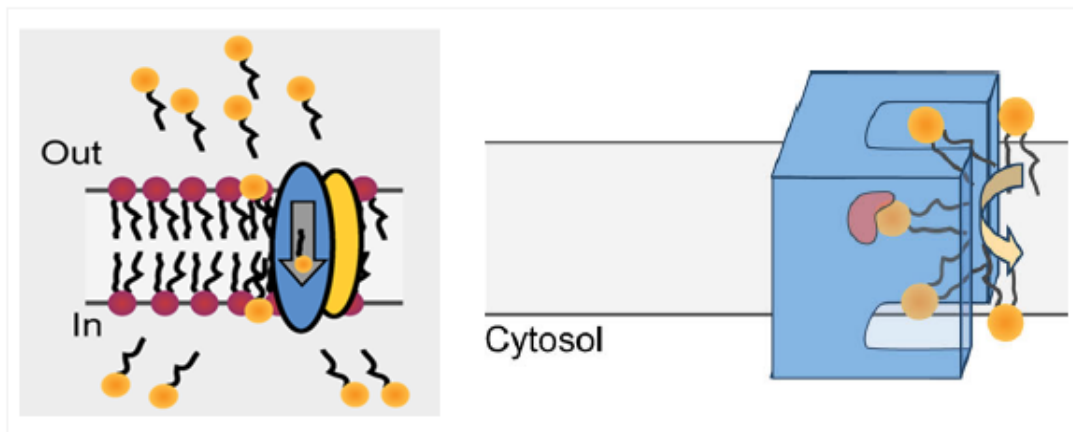


Figura 17. Transporte activo de moléculas anfifílicas mediado por P4-ATPasas

Fuente: (López, et al., 2014, p.1227)

Como se muestra en la Figura 17 y entendiendo el modelo de mosaico fluido -donde se explica que en la membrana plasmática los lípidos se disponen formando una bicapa de fosfolípidos, situados con sus cabezas hidrofílicas hacia el medio externo y hacia el citosol y sus

colas hidrofóbicas dispuestas en el interior de la membrana- se establece que las moléculas anfifílicas inician el proceso de perfusión de la membrana celular a través de la cola lipofílica y, posteriormente, las P4-ATPasas se encargan de rotar la estructura haciendo que la cabeza polar se dirija hacia el citosol, proveyendo un mecanismo de transporte activo mediante el uso de energía a partir de la hidrólisis del ATP. (López, et al. 2014) (Andersen, et al., 2016, p.2)

Cabe indicar que los fosfolípidos corresponden a estructuras esterificadas como consecuencia de que son sintetizados por la esterificación de un alcohol al fosfato del ácido fosfatídico; esto demuestra que comparten semejanza con las estructuras derivadas de benzotiazol, propuestas en la presente investigación, al contener un grupo éster entre la cola hidrocarbonada y la cabeza polar, por lo que evidentemente los análogos de benzotiazol podrían verse implicados en el mecanismo anteriormente expuesto, el cual resulta significativo en la inhibición de la N-miristoiltransferasa, debido a que la NMT está situada a nivel citoplasmático.

Análisis de parámetros fisicoquímicos y tóxico-ecológicos

Con el fin de caracterizar fisicoquímicamente las estructuras derivadas de benzotiazol con alteraciones en la cola lipofílica, primero, se procedió a realizar el análisis de coeficientes. Se evidenció que el aumento en el número de carbonos de los análogos de benzotiazol promueve cambios significativos en los parámetros fisicoquímicos referentes a la solubilidad; asimismo, promueven un aumento en el LogP directamente proporcional al aumento de carbonos y una disminución en el LogS inversamente proporcional al número de carbonos, lo cual es posible observar en los Gráficos 1 y 2, respectivamente.

Gráficos 1 y 2. Coeficiente de reparto o/w (izquierda) y coeficiente de solubilidad acuosa (derecha) según número de carbonos de la cola lipofílica de los esteres derivados de benzotiazol

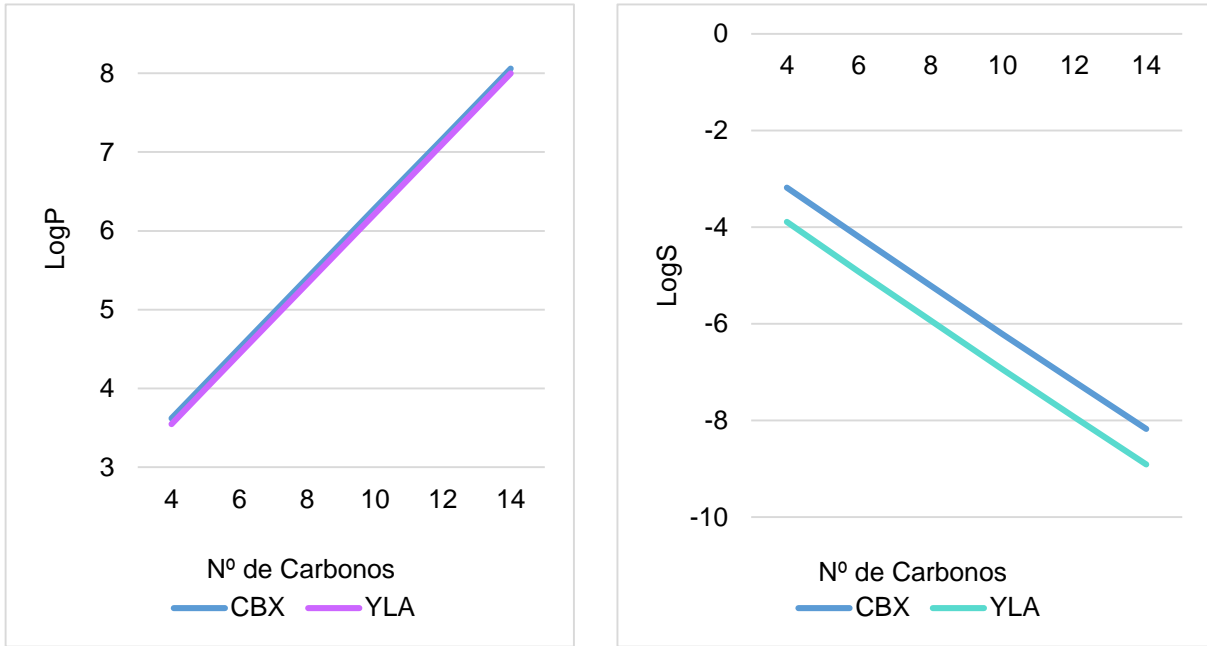
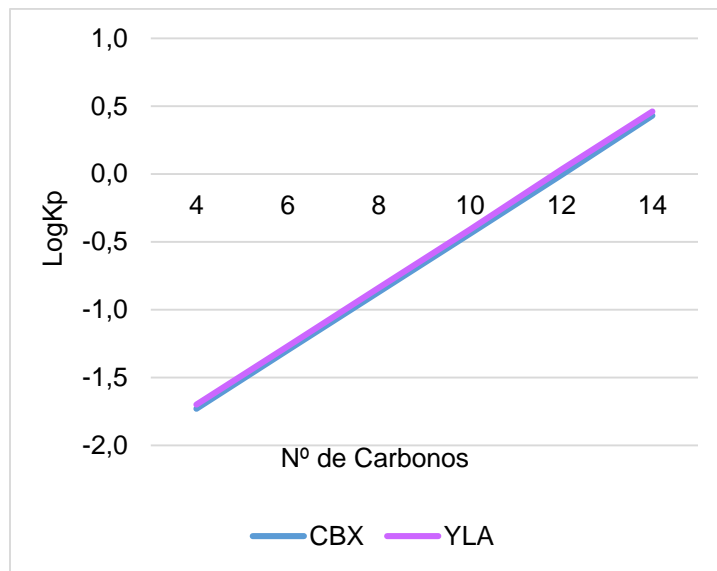


Gráfico 3. Coeficiente de permeabilidad dérmica según número de carbonos de la cola lipofílica de los esteres derivados de benzotiazol

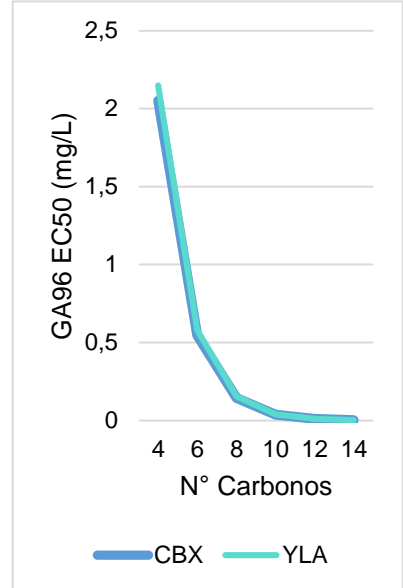
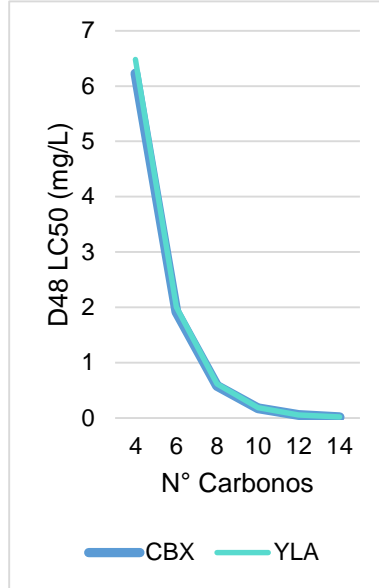
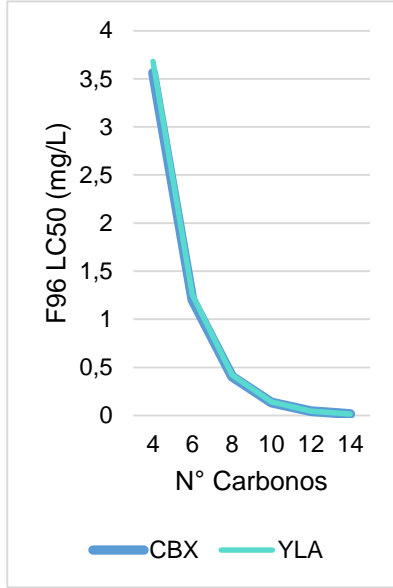


Según los valores estimados de LogKp, es posible inferir que el aumento de la liposolubilidad de los ésteres de benzotiazol conlleva a un aumento en la permeación dérmica, debido a que el LogKp es directamente proporcional al LogP; por ello, resulta posible visualizar una tendencia similar en los Gráficos 1 y 4. Considerando que el valor base, según U.S. EPA, es -1.82, las moléculas analizadas -tanto de la Serie CBX como de la Serie YLA- podrían producir cierto riesgo en cuanto a permeabilidad de piel humana. Analizando el Gráfico 4, es posible inferir que los ésteres derivados de benzotiazol con cadenas de carbonos cortas cercanas al parámetro esperado. Los ésteres son mucho más hidrosolubles en comparación con los de cadena larga, por lo tanto, se infiere que al aumentar la liposolubilidad se produce un aumento directamente proporcional de la capacidad de penetración por vía dérmica.

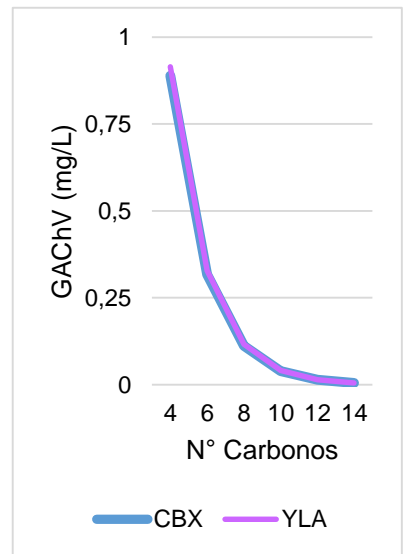
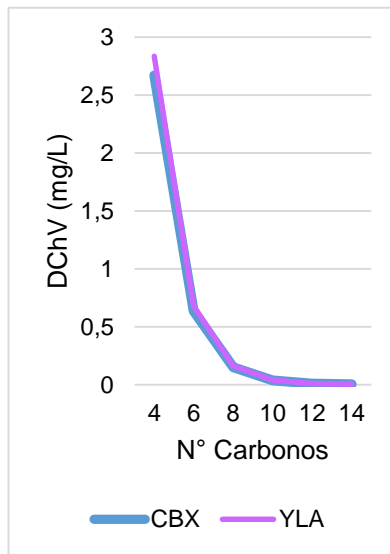
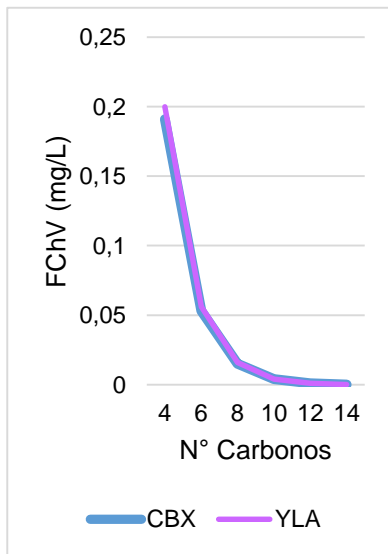
En la literatura científica, se indica que el paso a través de membranas celulares se encuentra impedido para moléculas, cuyos valores de Área Polar Superficial sean mayores a 140 Å². Esto permite concluir en que los ésteres derivados benzotiazol incluidos en ambas series, Serie CBX y Serie YLA, tienen la capacidad de atravesar dichas barreras biológicas al obtener una estimación de TPSA igual a 39.19 Å². Dicho parámetro se considera relevante, debido a que la NMTA_f es una enzima localizada en el citoplasma de las células fúngicas. (Uniprot, 2017)

En los Gráficos 4, 5 y 6, se observa que los valores de LC50 y EC50 son considerablemente bajos, debido a que la mayoría de los derivados de benzotiazol no son lo suficientemente solubles para medir dicho efecto, pues presentan valores de LogP que exceden los máximos permitidos para hacer predicciones de efectos a saturación. Sin embargo, las estructuras con 6 o menos constituyentes en la cadena hidrocarbonada muestran valores confiables de LC50 y EC50, se obtienen dosis letales medias de 1.25 a 3.68 mg/L para peces y de 1.9 a 6.4 mg/L para invertebrados. Además, de 0.6 a 2.1 mg/L como valores de concentración media de efecto, en este caso para la inhibición del crecimiento de las algas verdes.

Gráficos 4, 5 y 6. LC50 y EC50 según número de carbonos en la cola lipofílica de los ésteres derivados de benzotiazol



Gráficos 7, 8 y 9. ChV según número de carbonos en la cola lipofílica de los ésteres derivados de benzotiazol



Respecto a los efectos de toxicidad crónica en organismos acuáticos, se determinaron valores máximos: 0.2 mg/L para peces, 2.8 mg/L para invertebrados y 0.9 mg/L para algas verdes.

Con referencia a lo expuesto a partir del Gráfico 4 hasta el Grafico 9, es evidente que al aumentar el número de carbonos se incrementó el potencial tóxico de las moléculas. Sin embargo, según el programa ECOSAR, al contener cadenas sumamente lipofílicas mayores a 10C, se hace significativamente difícil que la molécula presente la capacidad de producir efectos tóxicos en los organismos acuáticos; por ello, como estrategia de optimización resulta oportuno mantener características de alta liposolubilidad en las estructuras derivadas.

Análisis del acople molecular

Al realizar un análisis de acople molecular, es preciso tomar una estructura de referencia para comparar la energía de unión. Como se menciona en el marco teórico, el RO-09-4879 es un potente inhibidor de la NMT de *Candida albicans*; además, mediante pruebas *in vitro* se ha comprobado que también presenta fuerte actividad inhibitoria en el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* MTU06002 con una IC50 de 7.2 μ M. Por lo tanto, se procedió a realizar el acoplamiento molecular entre la NMTAf y el RO-09-4879 con el fin de tomar el resultado de energía libre de Gibbs como valor de referencia, el cual correspondió a -9.8 kcal/mol.

Al analizar la Figura 14, es importante destacar que se identifican tres grupos funcionales involucrados en puentes de hidrógeno con los residuos proteicos, los cuales corresponden a dos átomos de flúor sustituyentes en un areno en posición *meta* y *para*, a un éter y a una piridina (amina heterocíclica de 6 carbonos). Además, se observa que los residuos Tyr-147, Glu-149, Phe-157, Tyr-159, Tyr-263, Tyr-374, Tyr-393, Leu-436 y Leu-492 se encuentran implicados en interacciones intermoleculares con diferentes grupos funcionales del RO-09-4879.

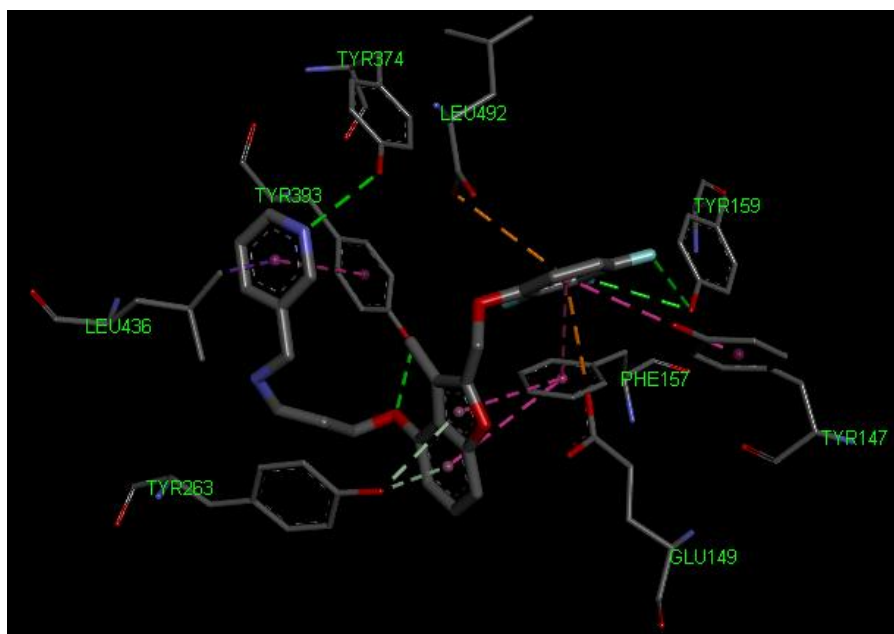
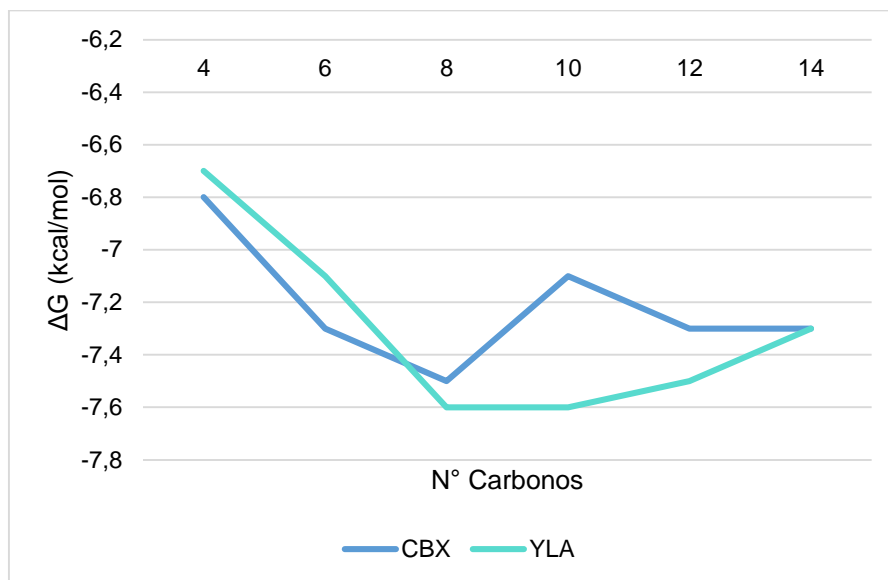


Figura 18. Residuos involucrados en la interacción entre la NMTAf y el RO-09-4879 ($\Delta = -9.8$ kcal/mol)

Posteriormente, al realizar el análisis de acoplamiento molecular de las diferentes estructuras derivadas de ésteres de benzotiazol con sustituciones de cadena par de carbonos en posición 2, a partir de 4 carbonos hasta 14 carbonos, se determinó que el menor valor de energía libre de Gibbs (ΔG) se produce cuando la cola lipofílica se encuentra constituida por 8 y 10 carbonos en total. Recordando que la energía libre caracteriza la espontaneidad de un proceso es posible inferir que la unión de los ésteres derivados de benzotiazol con la NMT se ve favorecida. Cabe destacar que la mejor energía libre se obtuvo para el 10YLA, 1,3-benzotiazol-2-yl-decanoato, y para el 8YLA, 1,3-benzotiazol-2-yl-octanoato, correspondiente a -7.6 kcal/mol. En el Gráfico 10, se muestran los respectivos resultados.

Gráfico 10. Energía libre de Gibbs según número de carbonos de la cola lipofílica de los ésteres derivados de benzotiazol



Tomando como base las consideraciones anteriores, se eligieron el 8YLA y el 10YLA como las moléculas con mayor afinidad hacia la NMT, por lo que se procedió a estudiar las interacciones que brindaban la unión del 8YLA y el 10YLA con el objetivo macromolecular. En el Gráfico 10, se visualiza que la Serie YLA con número entre 10 y 14 carbonos presenta menores valores de energía libre de unión en comparación con la Serie CBX, por lo que el proceso se torna hacia la espontaneidad, en otras palabras, se ve favorecido.

Con el fin de analizar las interacciones que producen la unión de los ligandos con la enzima NMTA_f, se identificaron los residuos proteicos involucrados y las distancias de los enlaces. El 8YLA presentó interacción con la proteína a través de 6 residuos; los implicados en interacciones con la estructura cíclica del benzotiazol fueron: Tyr-263 (5.56 Å y 5.94 Å ambos π - π Stracked), Tyr-393 (5.36 Å y 4.85 Å ambos π - π T Shaped), Leu-436 (3.38 Å π -Sigma y 4.78 Å π -CH) y la Leu-457 (4.87 Å π -CH). Por último, la Phe-214 promovió una interacción π -CH a una longitud de 4.30 Å y la Leu-492 con distancia de 4.88 Å tipo Alquilo, los cuales se produjeron a nivel del carbono 10 de la cola lipofílica. (Figuras 15 y 16)

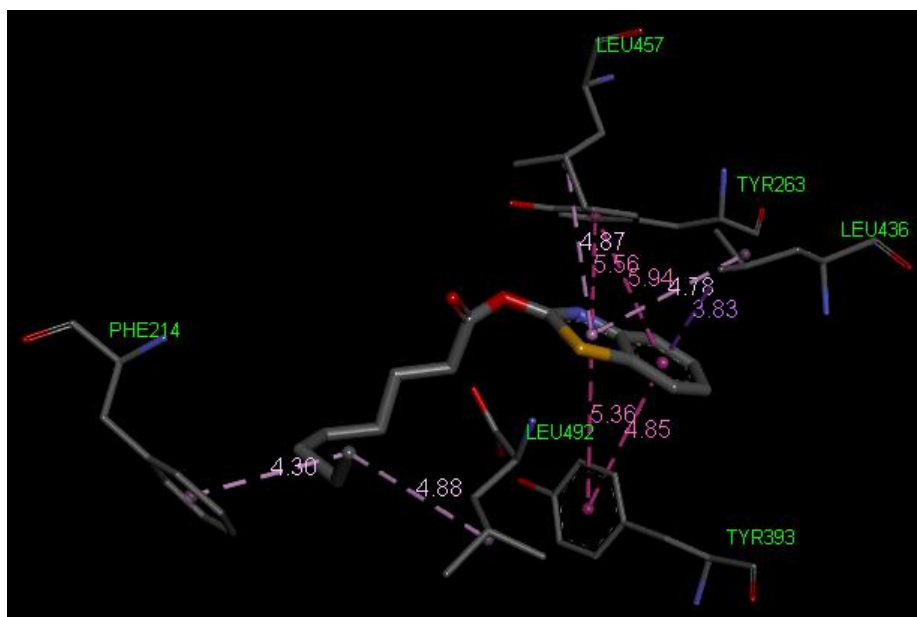


Figura 19. Distancia de enlaces (\AA^2) y residuos involucrados en la interacción entre la NMTAf y el 8YLA ($\Delta = -7.6$ kcal/mol).

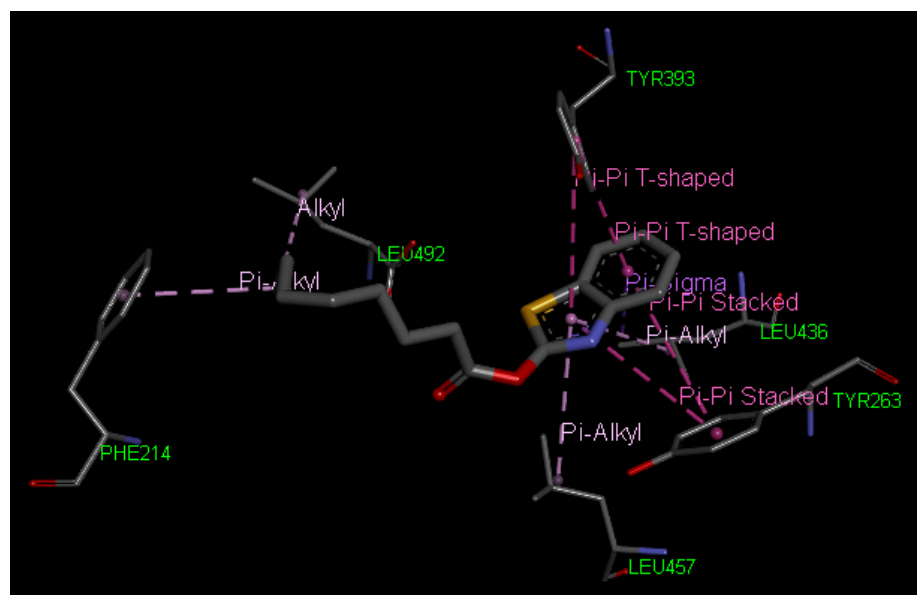


Figura 20. Tipo de interacciones intermoleculares involucradas en la unión del 8YLA con la NMTAf

Al enfatizar en el 10YLA, este se involucró en la unión a través de 7 residuos proteicos, entre los que Phe-163 (5.36 \AA de tipo π -Sigma), Phe-214 (3.98 \AA de tipo π -CH) y Leu-492 (\AA de tipo Alquilo) promovieron interacciones al final de la cadena hidrocarbonada. En cuanto a la

estructura base del benzotiazol, generó fuerzas intermoleculares con los residuos Tyr-263 (5.55 Å de tipo π -Stacked), Tyr-393 (π -T Shaped a distancias de 4.91 y 5.08 Å), Leu-436 (4.44 Å de tipo π -CH y 3.65 Å tipo π -Sigma) y, finalmente, la Leu-457 (5.30 Å de tipo π -CH).

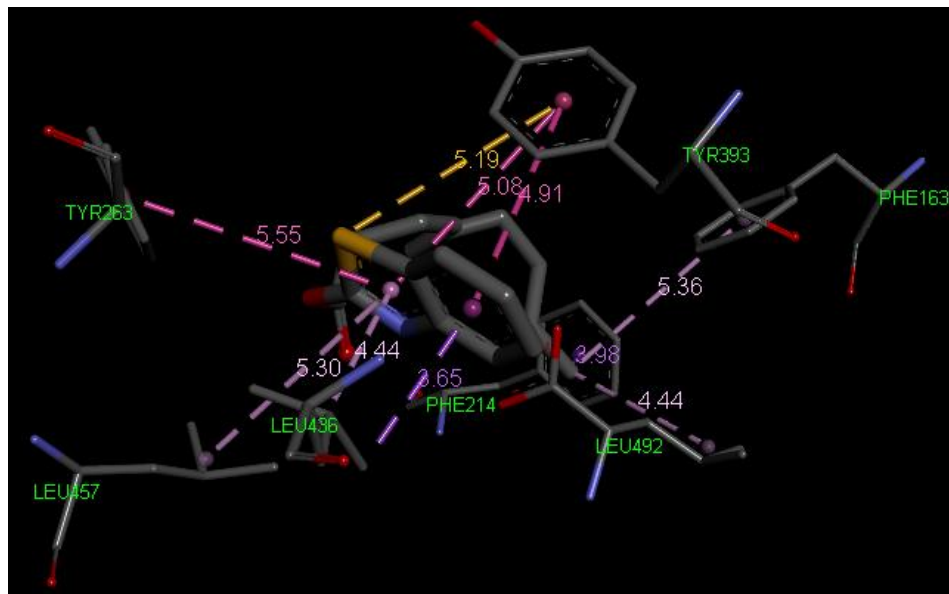


Figura 21. Distancia de enlaces (Å) y residuos involucrados en la interacción entre la NMTAf y el 10 YLA ($\Delta = -7.6$ kcal/mol)

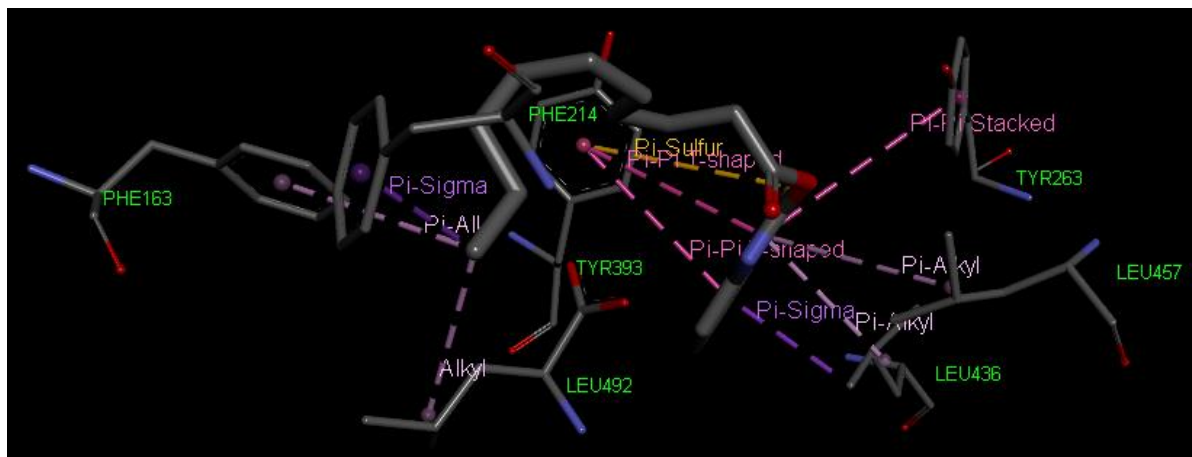


Figura 22. Tipo de interacciones intermoleculares involucradas en la unión del 10YLA con la NMTAf

Al comparar las interacciones intermoleculares presentes en la NMTAf con los ligandos 8YLA y 10YLA, se infiere que el 10YLA se une con mayor estabilidad, pues involucra

interacciones con un residuo más (Phe-163) y una una interacción π -Azufre con el residuo Tyr-393, el cual no se produce en el acople del 8YLA. Es imprescindible mencionar que las interacciones que involucran configuraciones insaturadas, con enlaces π , se consideran significativamente estables. Además, tomando como referencia la Teoría Ácido-Base Duro-Blando, se puede explicar porque el azufre presenta capacidad de formar interacciones π ; lo cual se debe a que el azufre es una especie blanda: grande y fuertemente polarizable, por lo cual da como resultado electrones de valencia que ceden fácilmente.

Según las consideraciones anteriores, se selecciona como molécula *hit* al 1,3-benzotiazol-2-yl-decanoato, identificado con el código 10YLA. Resulta importante que el acomodo estructural del grupo COO-R en el 10YLA es idéntico al del miristoil, lo cual es posible visualizarlo en la Figura 19, por lo tanto se infiera que dicho acomodo estructural, posiblemente, influyó en que la Serie YLA presentara mayor afinidad.

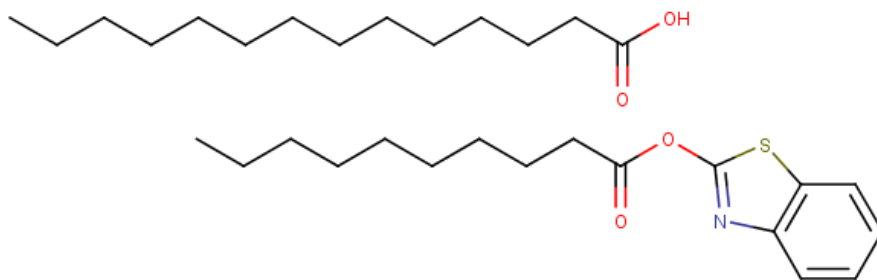


Figura 23. Estructura del ácido mirístico y del 10YLA respectivamente

Sin embargo, se observa que el éster incluido dentro de la molécula no presenta ninguna interacción de forma directa con los aminoácidos presentes en el sitio activo de la NMTA_f; por consiguiente, se evaluó la posibilidad de excluir dicho grupo de la estructura y se generó un benzotiazol con una cadena hidrocarbonada de 10C en posición 2 (2-decil-1,3-benzotiazol: 10BTA) y se evaluó su acople molecular con el objetivo macromolecular. Al realizar el análisis, se obtuvo un valor de energía libre de -7.2 kcal/mol, el cual -al ser comparado con el resultado obtenido tras el acople del 10YLA ($\Delta G = -7.6$ kcal/mol)- hace posible evidenciar que la estructura con presencia de un grupo éster resulta más afín; se demuestra que el proceso de unión con la NMTA_f se favorece.

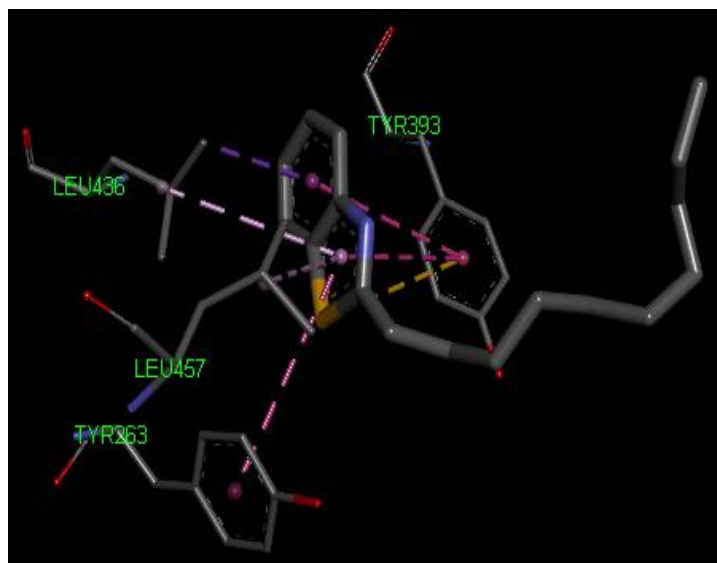


Figura 24. Residuos involucrados en la interacción entre el 10BTA y la NMTAf

Es preciso recordar, según la literatura consultada, que un éster no puede actuar como un grupo donador de puentes de hidrógeno, pero existe posibilidad de que se comporte como un aceptor; sin embargo, el volumen adicional del grupo acilo produce impedimento estérico en la interacción. Además, existe una significativa diferencia entre las propiedades electrónicas de un éster en comparación con un alcohol, pues el grupo carboxilo ejerce una débil atracción sobre los electrones del oxígeno vecino y produce una estructura de resonancia; por consecuencia, el grupo es menos eficaz como aceptor de enlaces de hidrógeno en comparación con los alcoholes. Asimismo, se podría argumentar que el oxígeno del carbonilo es potencialmente un aceptor de enlace de hidrógeno más eficaz; pero al estar en una posición diferente en relación con el resto de la molécula podría verse impedida la formación de una interacción eficaz con el sitio de unión. (Graham, 2013, p.217)

De acuerdo con lo anteriormente citado, se fundamentan los resultados obtenidos, mediante los cuales se demuestra que el grupo éster no se implica, directamente en la formación de enlaces, con los residuos del objetivo macromolecular presentes en el sitio de unión; pero cabe destacar que el grupo funcional se puede implicar indirectamente en la interacción, porque características como polaridad y tamaño molecular producen variaciones en la actividad y afinidad de las drogas hacia una proteína brindando características de acople dirigido. Así, en la Figura 21, se visualiza que el 10YLA presenta 3 enlaces intermoleculares más en comparación con el 10BTA,

involucrando el CH₃ del final de la cola lipofílica, lo cual comprueba que el éster es indirectamente necesario para que dichas interacciones ocurran.

Optimización de la Molécula *Hit*

Características de la superficie de interacción

Con el fin de analizar la capacidad del sitio de unión para formar distintos tipos de interacciones intermoleculares, se estudian las distintas superficies correspondientes a aromática, de interacción por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y ionizable; de la interacción entre el 10YLA y la *NMTAf*.

La importancia del análisis de las características de la superficie de interacción reside en que informa acerca de las posibilidades de incluir distintos grupos funcionales en las moléculas análogos del 10YLA, las cuales promuevan ciertas interacciones intermoleculares.

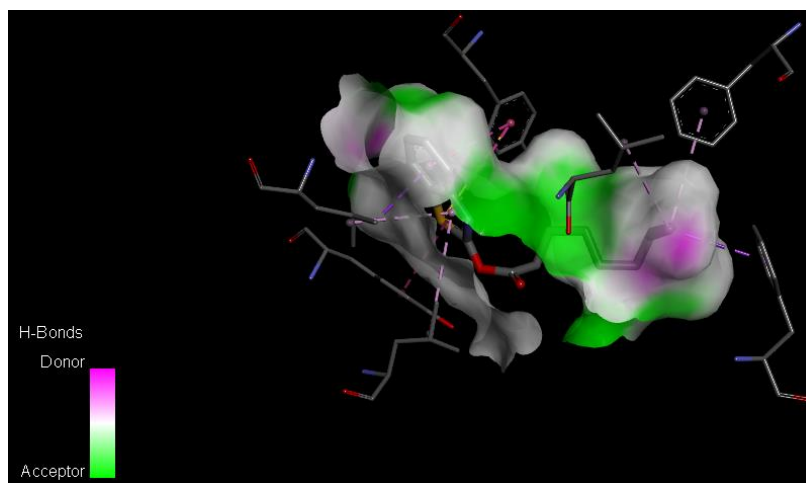


Figura 25. Superficie de interacción por puentes de hidrógeno de la *NMTAf*

En la Figura 25, se observa que el objetivo macromolecular presenta varios grupos aceptores de puentes de hidrógeno en la superficie de unión; a partir de esto, se infiere que al agregar grupos donadores de puentes de hidrógeno en las estructuras derivadas de benzotiazol, se podrían

promover este tipo de interacciones intermoleculares. El interés en formar puentes de hidrógeno reside en que, según se indica en la literatura científica, los enlaces de hidrógeno son interacciones específicas significativamente importantes en los procesos de reconocimiento biológico. (Bissantz, et al., 2010, p.5065)

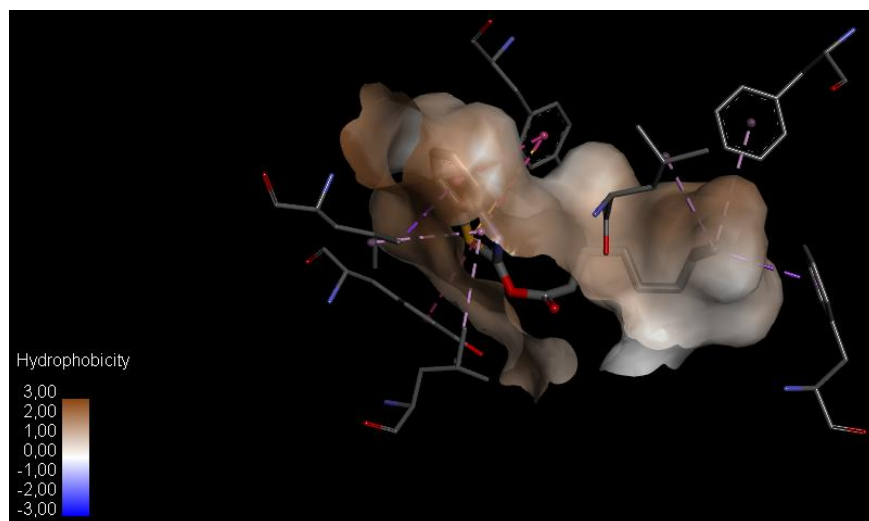


Figura 26. Superficie de interacción hidrofóbica de la NMTAf

En la Figura 26, se evidencia que el objetivo macromolecular presenta una gran superficie de interacción con características hidrofóbicas; por ello, resulta oportuno mencionar que: “las interacciones de van der Waals son más débiles que los puentes de hidrogeno y pueden tomar espacio entre dos regiones hidrofóbicas” (Graham, 2013, p.22)

Las fuerzas de van der Waals implican interacciones entre regiones hidrofóbica de diferentes moléculas tales como sustituyentes alifáticos o el esqueleto de carbono total. La distribución electrónica en regiones neutras y no polares producen áreas transitorias de densidades electrónicas altas y bajas con dipolos temporales. Es importante señalar que los dipolos en una molécula pueden inducir dipolos en la molécula vecina; esto da lugar a interacciones débiles; por ello, la contribución general de las interacciones de van der Waals es a menudo crucial para la unión. (Graham, 2013, p.8)

Muy frecuentemente, las interacciones de van der Waals se producen entre los anillos aromáticos de los ligandos y las regiones hidrofóbicas planas del sitio de unión (Graham, 2013, p.217). Por lo tanto, es evidente que la estructura cíclica del benzotiazol está implicada en

interacciones de este tipo, lo cual concuerda con los razonamientos que se han venido realizando acerca de las interacciones implicadas en la unión entre el 10YLA y la NMTA*f*.

De la misma manera que los anillos aromáticos, los alquenos son estructuras planas e hidrófobas; por este motivo pueden interactuar con regiones hidrófobas del sitio de unión a través de fuerzas de van der Waals (Graham, 2013, p.218). A casa de ello, resulta preciso promover dichas interacciones a través de la inclusión de insaturaciones en la cadena hidrocarbonada de los derivados de benzotiazol, específicamente, en los análogos del 10YLA.

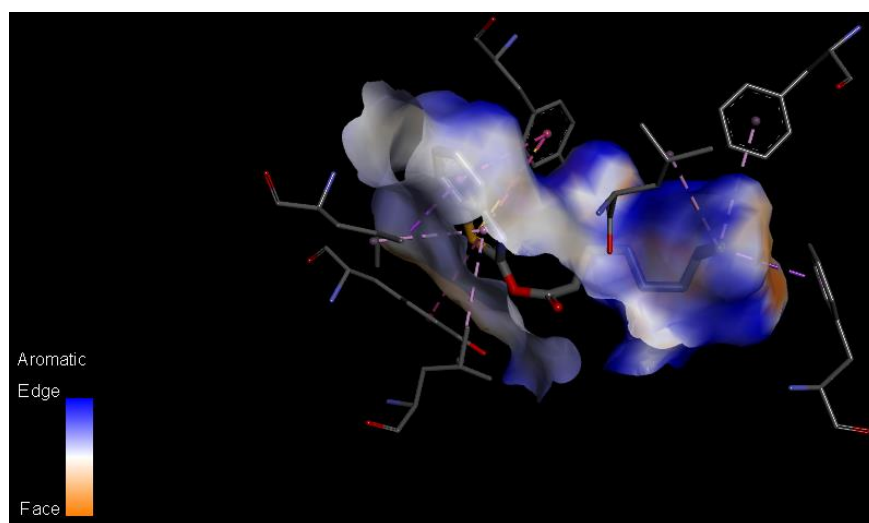


Figura 27. Superficie de interacción aromática de la NMTA*f*

En la Figura 27, se aprecia una gran superficie de interacción aromática. Los aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) contienen anillos aromáticos en su estructura, consecuentemente se pueden ver involucrados en interacciones π -X, donde X puede corresponder a: otro enlace π , un CH, un anión, un catión, un OH o un NH. Por lo tanto, resulta evidente que la inclusión de dichos grupos en la estructura de los derivados de benzotiazol podrían favorecer la unión con el objetivo proteico.

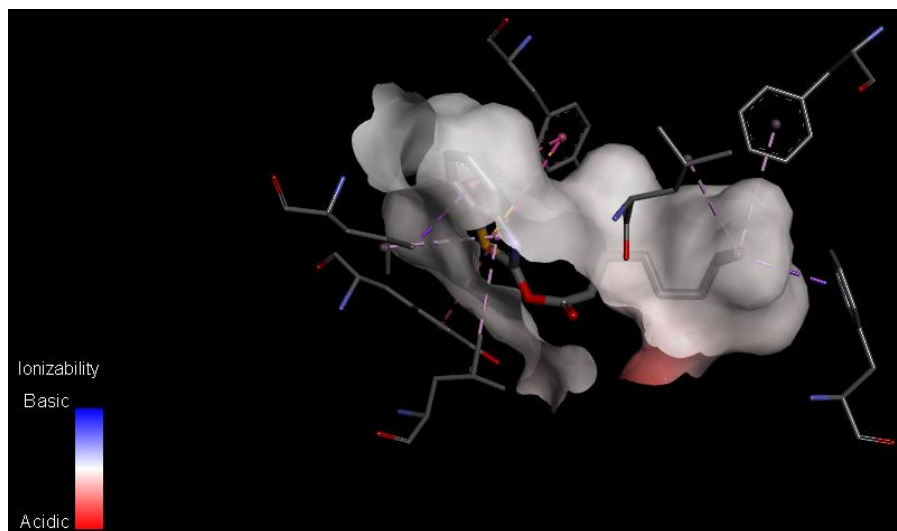


Figura 28. Superficie ionizable de la *NMTAf*

La superficie ionizable, visualizada en la Figura 28, muestra la existencia de una pequeña zona con características ácidas, la cual puede verse implicada en interacciones con un grupo básico del ligando afín. Es relevante mencionar que un enlace de tipo iónico, también conocido como puente salino, puede formarse entre un ion carboxilato y un ion amonio, lo cual da como resultado una interacción significativamente fuerte. (Graham, 2013, p.21)

Cambios estructurales

En una molécula activa, la sustitución de un átomo de hidrógeno por un sustituyente (por ejemplo: alquilo, hidroxilo, nitro, u amino) puede modificar, profundamente, la afinidad e, incluso, la naturaleza del efecto. Las perturbaciones causadas por un sustituyente pueden afectar varios parámetros en una molécula como el coeficiente de partición, la densidad electrónica, el ambiente estérico y la capacidad de establecer interacciones directas con el receptor o la enzima. (Georges, et al., 2015, p.319)

Primero, se procedió a numerar la estructura del 1,3-benzotiazol-2-yl-decanoato (10YLA), para definir los posibles sitios en los cuales realizarían cambios de sustituyentes estructurales. Es importante recordar, que los cambios estructurales corresponden a sustituciones en la periferia de la estructura base, en este caso, alrededor del benceno y de la cadena hidrocarbonada.

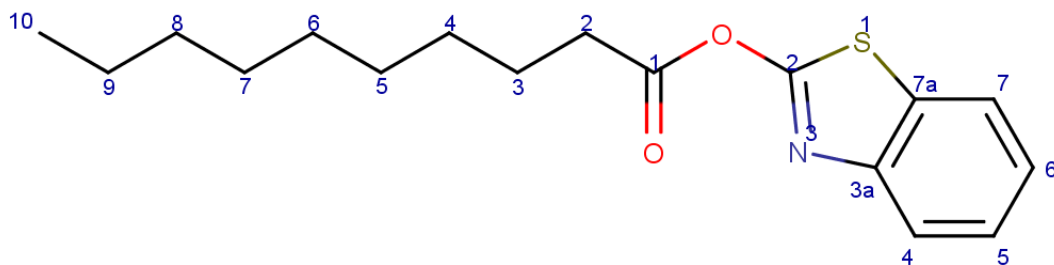


Figura 29. Estructura del 10YLA con numeración según la IUPAC.

Cambios en los sustituyentes del benceno

Con el fin de caracterizar las ventajas de la inclusión de sustituyentes en posiciones específicas del benceno, se produjeron cambios únicos alrededor de toda la estructura, o sea, se generaron sustituciones incluyendo cada grupo funcional en cada una de las posiciones. Tomando como base el anterior análisis de la superficie de interacción de la NMTAf, se seleccionaron los sustituyentes, los cuales se describen a continuación.

Halógenos: Flúor (F) y Cloro (Cl)

“Los halógenos, especialmente el flúor y el cloro, son sustituyentes ampliamente utilizados en la química medicinal.” (Wilcken, Zimmermann, Lange, Joerger y Boeckler, 2013, p.1363)

Los efectos electrónicos de los halógenos se atribuyen a sus propiedades inductivas de atracción de electrones, los cuales son máximos para el cloro y muy débiles para el flúor. Además, la obstrucción de una molécula por medio de sustitución, incorporando halógenos, puede imponer ciertas conformaciones. Así, por ejemplo, los átomos de halógeno pueden impedir la rotación libre y mantener los planos de un anillo aromático en una posición perpendicular entre sí. Además, es fundamental recordar que la fuerza de los enlaces halógenos aumenta con el tamaño del átomo de halógeno; por ello, el fluor es considerado el más pequeño. (Bissantz, et al., 2010, p.5072) (Georges, et al., 2015, p.339)

En la literatura científica, se menciona que las moléculas que contienen cloro también pueden formar contactos cerrados dirigidos del tipo R-X \cdots Y-R', donde el halógeno “X” actúa

como un ácido de Lewis y “Y” puede corresponder a cualquier donador de electrones. Esta interacción, denominada "unión halógena", es impulsada por el agujero σ : una región cargada positivamente en el lado posterior de “X” a lo largo del eje de enlace R-X, causada por una anisotropía de la densidad electrónica en el halógeno. (Wilcken, et al., 2013, p.1363) (Bissantz, et al., 2010, p.5069)

Asimismo, se dice que la introducción de halógenos, como el cloro, induce importantes contribuciones lipofílicas; las cuales son considerablemente mayores en comparación con la contribución de un grupo metilo. (Georges, et al., 2015, p.341)

En cuanto al flúor, resulta importante incluirlo en los sustituyentes con la finalidad de responder a la consideración expuesta al analizar la superficie de interacción por puentes de hidrógeno. Cabe mencionar que: “debido a su alta densidad de electrones y baja polarizabilidad, el flúor prefiere las interacciones dipolares más fuertemente que los otros halógenos”; por ello, se implica en enlaces de hidrógeno. (Bissantz, et al., 2010, p.5072)

Grupos oxigenados: hidroxilo (OH) y éter (OCH₃)

Como estrategia de modificación racional, abordando lo anteriormente expuesto en la Figura 22, resulta oportuno incluir alcoholes como sustituyentes estructurales, pues son grupos funcionales que están involucrados comúnmente en fuerzas intermoleculares a través de puentes de hidrógeno. “El oxígeno puede actuar como un aceptor de enlace de hidrógeno, y el hidrógeno puede actuar como un enlace donante de hidrógeno.” (Graham, 2013, p.216)

En cuanto al grupo funcional conocido como éter, al igual que el éster, no presenta un gran potencial por formar puentes de hidrógeno; sin embargo, es un grupo considerado fuertemente activante, capaz de variar -de manera significa- las propiedades de una droga. Como ejemplo de la afirmación anterior, es el caso la codeína (A) en comparación con la morfina (B): por el bloqueo del radical fenólico hidroxílico en posición 3, se produce una notable reducción en la capacidad de unión a receptores opioides por parte de la codeína. (Brunton, et al., 2013, p. 515)

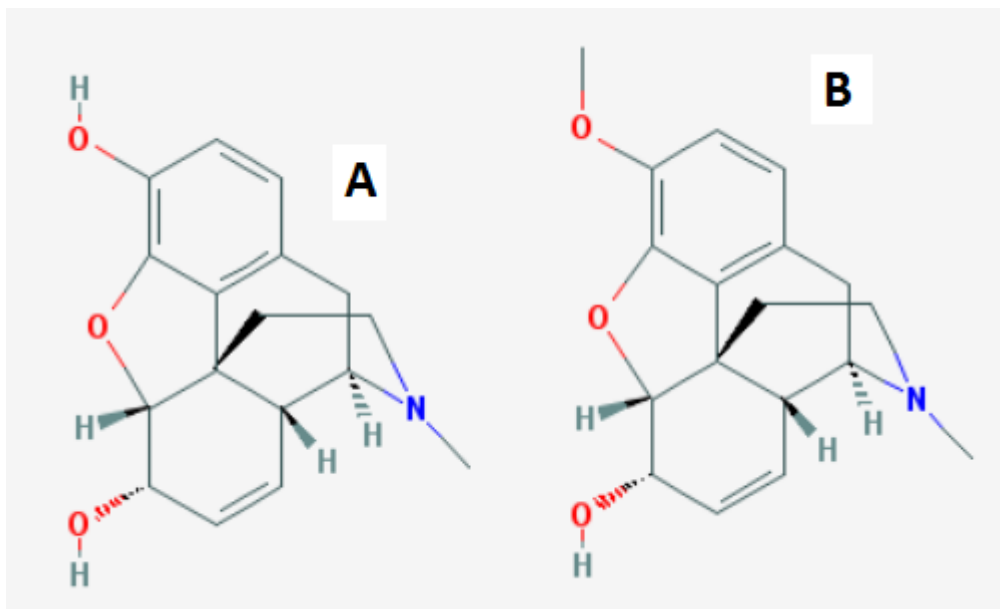


Figura 30. Estructura de la morfina (A) y la codeína (B)

Fuente: (PubChem, 2017)

Resulta oportuno mencionar que, a través de la generación de sustituciones con alquil éteres, se promueve la capacidad de la molécula para generar ciertos impedimentos estéricos que pueden resultar en la creación de restricciones e imponer conformaciones particulares, estas pueden ser favorables o desfavorables para las interacciones del ligando con el objetivo biológico. (Georges, et al., 2015, p.323)

Grupos nitrogenados: amino (NH₂), hidroxilamino (NOH) y nitro (NO₂)

Las aminas al igual que los alcoholes pueden estar implicadas en enlaces de hidrógeno, tanto como aceptores o como donadores de puentes de hidrógeno. El átomo de nitrógeno tiene un solo par de electrones y presenta potencial para actuar como un aceptor; además, las estructuras de aminas primarias y secundarias contienen grupos NH, las cuales pueden involucrarse en dichas interacciones como donadores. Contrariamente, las aminas aromáticas y heteroaromáticas solamente pueden actuar como donadores de puentes de hidrógeno, debido a que el único par interactúa con el anillo. (Graham, 2013, p.218)

Es muy importante mencionar lo señalado por Patel y otros con respecto a que la inclusión de grupos nitro dentro de la estructura de derivados de benzotiazol producen un evidente aumento en la actividad antifúngica. (Patel, et al., 2011)

Por otra parte, las hidroxilaminas son productos intermedios entre la oxidación de aminos y la reducción de nitros, siendo las mismas sumamente reactivas capaces de formar complejos covalentes con ADN (Figura 31), lo cual es un potencial mecanismo de citotoxicidad. Es posible argumentar que las hidroxilaminas presentan la capacidad de brindar mayores efectos de toxicidad en comparación con el grupo nitro; debido a que la base de la toxicidad selectiva del nitro depende de su reducción, pudiendo aceptar hasta 6 electrones formando dos intermediarios en la producción de la hidroxilamina correspondiente. Además, se dice que la oxidación de un grupo amino tarda menos en comparación con la reducción del grupo nitro, por lo que eventualmente las aminos podrían ser más tóxicas. (Zayas, et al., 2009, p.1163)

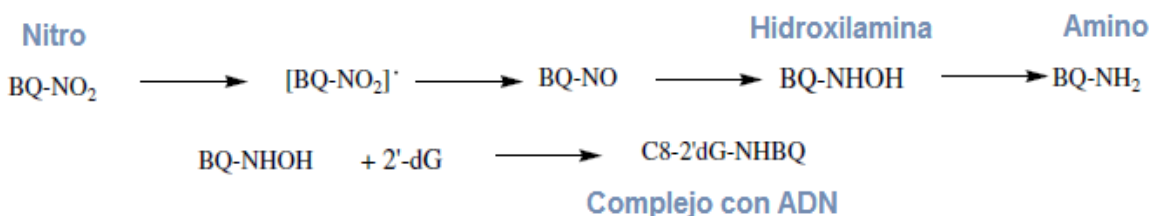


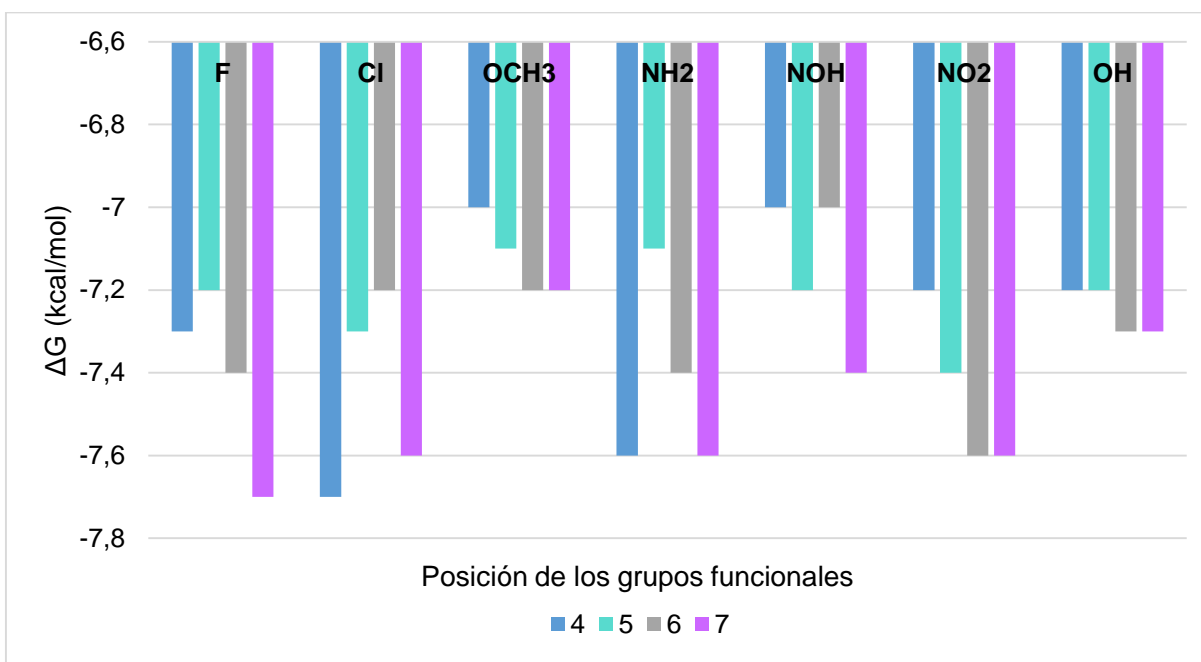
Figura 31. Reducción de grupo nitro y formación de complejos

Fuente: (Zayas, et al., 2009, p.1163)

Sobre la base de las consideraciones anteriores, surge la inquietud por incluir grupos funcionales nitrogenados en los derivados de ésteres de benzotiazol, debido a que podrían aumentar potenciales efectos tóxicos en las células fúngicas de la especie *Aspergillus fumigatus*.

Como paso posterior a la definición de los sustituyentes que serían incluidos en el proceso de modificación estructural del benceno, se realizaron los correspondientes estudios de acople molecular con el objetivo macromolecular NMTAf estimando la energía libre de unión. Los respectivos resultados se muestran en el Gráfico 11.

Grafico 11. Energía libre de Gibbs según la posición de las sustituciones estructurales en el benceno



Según los resultados presentados en el Gráfico 11, las sustituciones en el benceno se consideran no favorables, debido a que brindan energías libres de unión menores o muy cercanas a las obtenidas mediante el acople del hit con el objetivo biológico, por lo que no se toman como una fuente de optimización estructural. Se destaca que el cloro en posición 4 y el flúor en posición 7 son los únicos sustituyentes que evidenciaron una leve disminución en el ΔG : es de -0,1 con respecto al 10YLA.

Cambios en los sustituyentes de la cola lipofílica

Diversas investigaciones de acople molecular indican que “la unión se opone al movimiento y el movimiento se opone a la unión”. (Bissantz, et al., 2010, p.5062) Por lo tanto, resulta preciso realizar cambios estructurales que promuevan rigidez en las estructuras derivadas de benzotiazol como la incorporación de enlaces dobles en la cadena, donde se ubican los 10 enlaces rotables presentes en el 1,3-benzotiazol-2-yl-decanoato.

La introducción de un grupo insaturado en una molécula produce varias consecuencias, como la existencia de efectos electrónicos debido a que las insaturaciones se comportan como

atractores de electrones a través de efectos inductivos. Además, las interacciones directas del tipo donador-aceptor son posibles gracias a los entornos de nubes de electrones π presentes en enlaces múltiples y brinda la posibilidad de presentar isomería *cis* o *trans*. (Georges, et al., 2015, p.331) Resulta oportuno mencionar que “todos los ácidos grasos naturales tienen enlaces dobles en la configuración *cis*.” (Lieberman, et al., 2014, p.232)

Tomando como referencia lo anteriormente citado, se propone realizar un cambio estructural en posición C5=C6 de la cola lipofílica, alterando un enlace simple por uno doble con la finalidad de proponer un análogo derivado del ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado, el cual se forma por una cadena de 20 carbonos con varios dobles enlaces entre los que se incluye una insaturación en posición 5. (Lieberman, et al., 2013, p.665) El correspondiente análogo es identificado mediante el código (5C)10YLA, en donde el 5 indica la posición del doble enlace y la letra C señala la configuración *cis*.

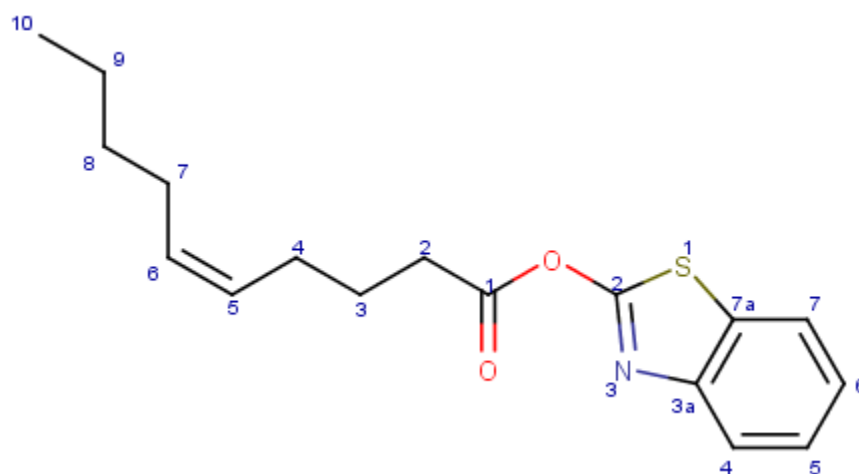
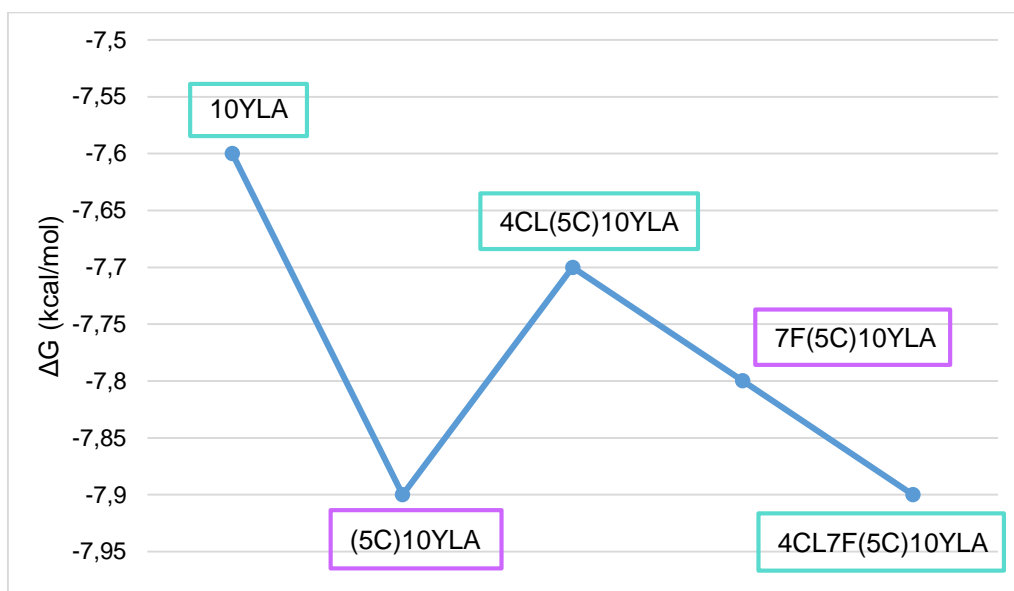


Figura 32. Análogo del 10YLA con insaturación en posición 5 de la cadena hidrocarbonada: (5C)10YLA

Después de la generación de la estructura insaturada, se procedió a cuantificar la energía libre al realizar el acople molecular con la NMTA f con el fin de analizar si la modificación estructural resultó favorable.

Gráfico 12. Energía libre de Gibbs de la interacción entre la NMTAf con el *hit* y con análogos insaturados



A partir del gráfico anterior (Gráfico 12), se puede inferir que incluir una insaturación en la cadena hidrocarbonada del 10YLA disminuye la energía libre de Gibbs involucrada en el proceso de unión con el objetivo macromolecular ($\Delta G = -7.9$) al compararla con la energía que presentó el 10YLA ($\Delta G = -7.6$). Significa, entonces, que la unión del ligando con la NMTAf resulta favorable; por lo tanto, se tomó el (5C)10YLA como molécula optimizada para continuar el proceso de modificación racional.

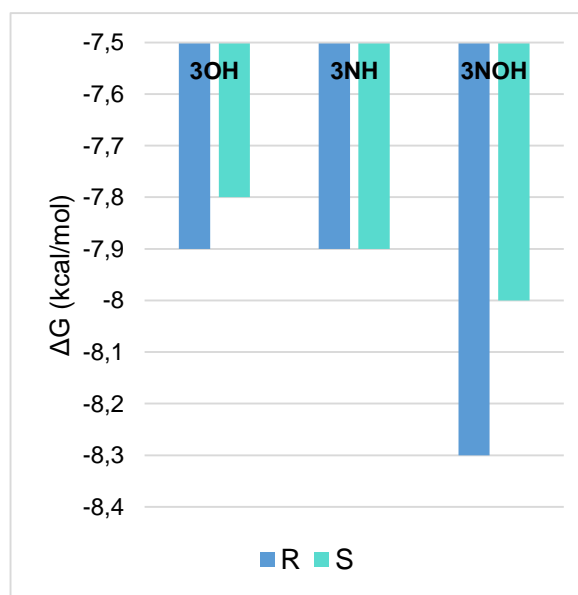
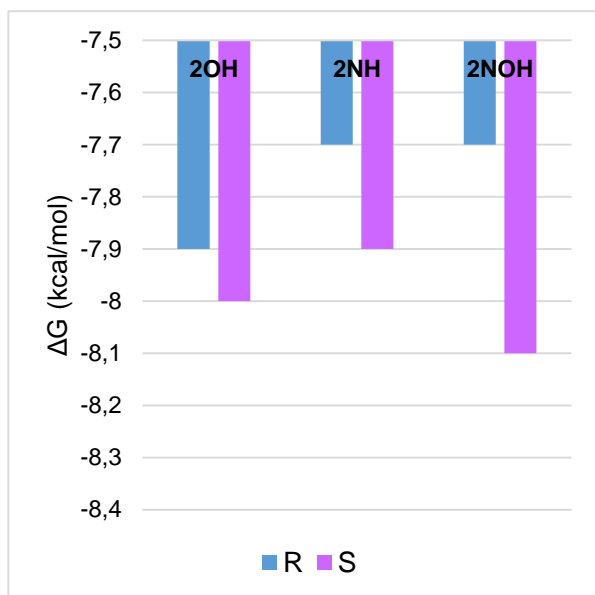
Además, con el fin de verificar lo mencionado anteriormente acerca de las sustituciones a nivel del benceno, se generaron tres análogos conteniendo la insaturación C5=C6: uno con cloro en posición 4 (código 4CL(5)10YLA), otro con flúor en posición 7 (código 7F(5)10YLA) y otro incluyendo ambos halógenos en las mismas posiciones (código 4CL7F(5)10YLA). La elección de dichas sustituciones se basó en la energía libre de Gibbs que involucró el proceso de unión, correspondiendo a los sustituyentes que presentaron el menor valor de ΔG . Como resultado, se comprobó que la halogenación del benceno no promueve una considerable disminución en energía libre, aún cuando en los análogos se incluyó la insaturación que había demostrado un término óptimo de la molécula. Consecuentemente, se concluye que alteraciones en la estructura cíclica no

brindan una significativa diferencia en espontaneidad del proceso, por lo tanto, las sustituciones en el benceno no se consideran favorables.

Como estrategia de optimización del (5C)10YLA, se generaron cambios incluyendo grupos funcionales en posición 2 y 3 de la cola lipofílica; y de esta forma, se evitó la alteración del final de la cadena hidrocarbonada con el fin de mantener una estructura similar a la de los ácidos grasos. Además, en dichas posiciones, las sustituciones proveen un acomodo estructural semejante a un ciclo de seis constituyentes, por lo tanto, brindan mayores grados de libertad mejorando la entropía del sistema. “Los cambios en los grados de libertad durante el proceso de unión tienen un gran impacto en la energía libre involucrada.” (Bissantz, et al., 2010, p.5061)

Los grupos funcionales incluidos como sustituyentes de cadena fueron hidroxilo, amino y hidroxilamino, con la finalidad de evaluar diferencias en el acople molecular al incrementar el tamaño del resto hidrofílico. Cabe mencionar que sustituir en dichas posiciones, produce centros quirales -el átomo de carbono presenta cuatro sustituyentes diferentes- por lo tanto, se analizaron las conformaciones S y R de los análogos derivados.

Gráficos 13 y 14. Energía libre de Gibbs según sustituciones estructurales en la cadena hidrocarbonada: posición 2 (izquierda) y posición 3 (derecha)



Después de examinar los resultados obtenidos tras el análisis de acople molecular, se infiere que 4 análogos [R2OH(5C)10YLA; S2NOH(5C)10YLA; R3NOH(5C)10YLA; S3NOH(5C)10YLA] presentan un valor menor de energía libre de unión en comparación con el (5C)10YLA; por lo tanto, se tomaron dichas estructuras como moléculas optimizadas, a las cuales se debían determinar los parámetros fisicoquímicos y tóxico-ecológicos.

Análisis de parámetros fisicoquímicos y tóxico-ecológicos

Tras la inclusión de los grupos OH, NH y NOH, se evidenció un aumento significativo en la hidrosolubilidad (al aumentar el valor del LogS), inversamente proporcional a la variación en el coeficiente de reparto (Log P); debido a que dichos sustituyentes producen un incremento en la polaridad de las moléculas y, además, presentan la capacidad de formar puentes de hidrógeno con moléculas de agua.

Por otra parte, se evidenciaron alteraciones en el área polar superficial, que concuerdan con los cambios en las características de solubilidad de las moléculas. Tomando como base la TPSA del 10YLA, que corresponde a 39.19 \AA^2 , se evidencia un aumento de 20.23 \AA^2 al agregar un grupo hidroxilo y de 32.26 \AA^2 al producir sustituciones con hidroxilamina, las cuales no sobrepasan el parámetro establecido para el paso a través de membranas ($<140 \text{ \AA}^2$). Como ya se ha aclarado, dicho parámetro resulta importante para la inhibición de la NMT debido a que se encuentra en el citoplasma celular; posibilita difundir a través de la membrana mediante transporte pasivo; sin embargo, anteriormente, se explicó el transporte activo mediado por P4-ATPasas que, de forma eventual, podría facilitar la perfusión de moléculas anfifílicas derivadas de benzotiazol.

Gráficos 15 y 16. Variación de coeficientes fisicoquímicos según el proceso de optimización: LogP (izquierda) y LogS (derecha)

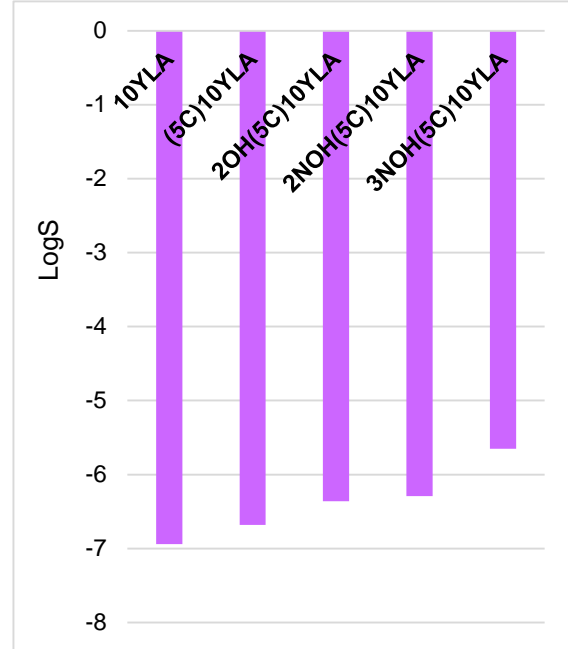
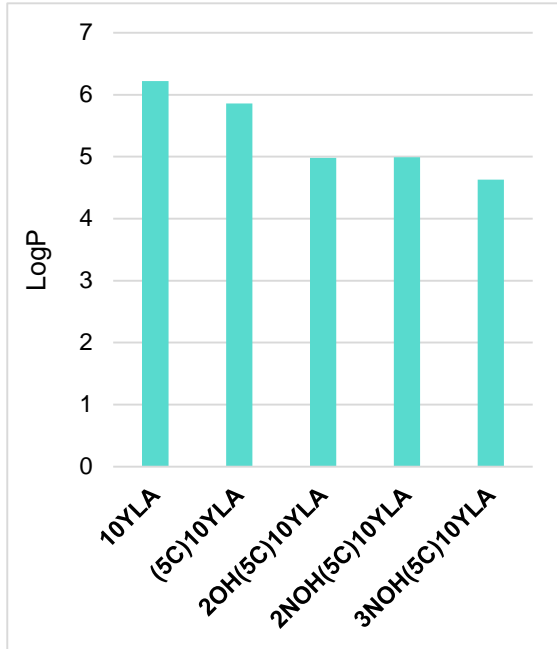
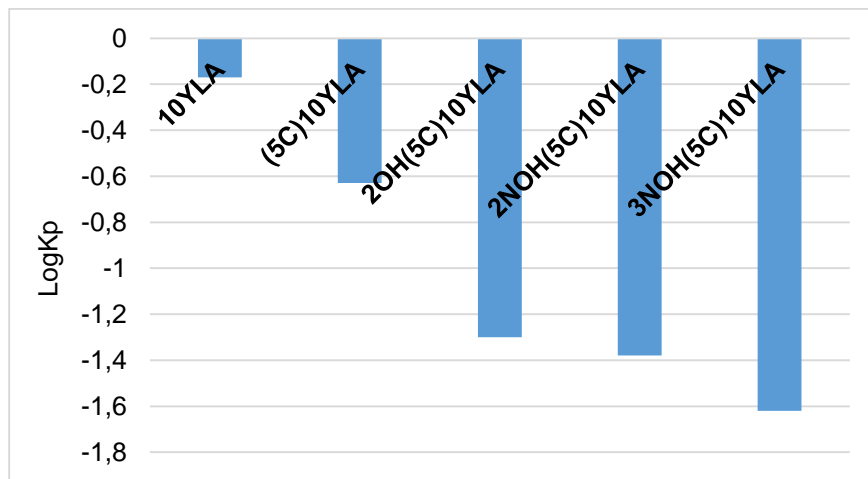
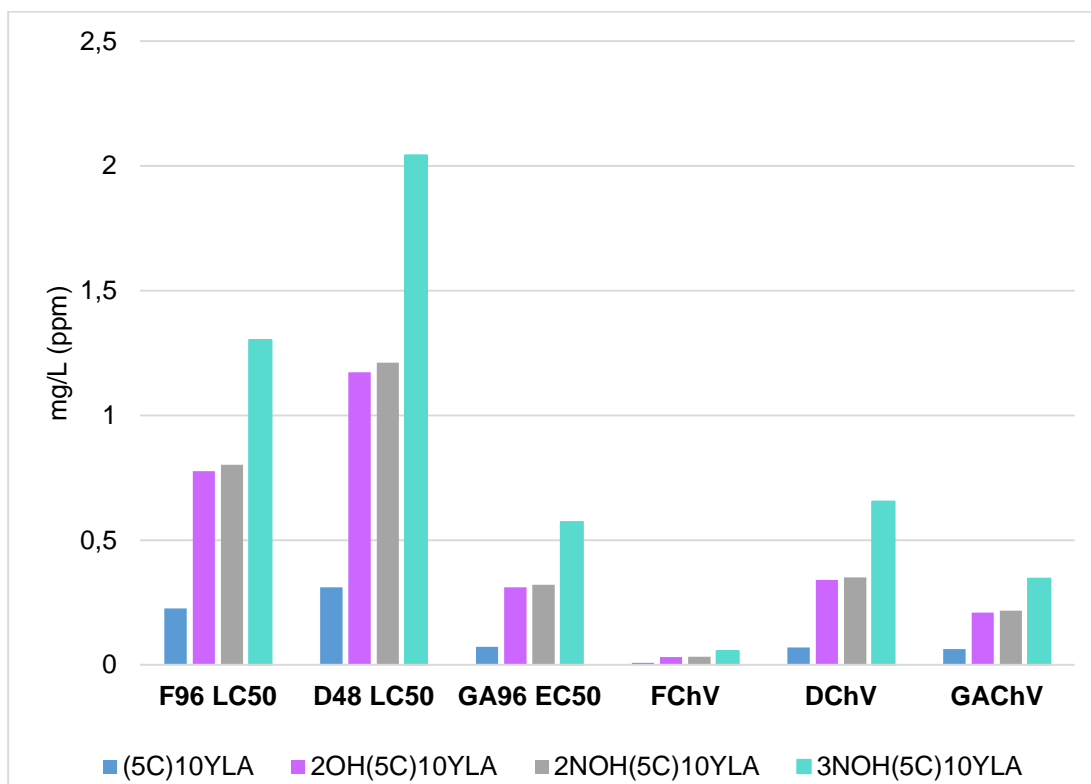


Gráfico 17. Variación del coeficiente de permeabilidad dérmica según el proceso de optimización



En el Gráfico 17, se muestran los resultados del coeficiente de permeabilidad dérmica obtenidos para las moléculas optimizadas. Es posible observar que el 3NOH(5C)10YLA, correspondiente a la molécula con la inclusión de la hidroxilamina en posición 3, presenta la menor capacidad de penetrar la piel según su valor de LogKp; este se encuentra muy cercano al valor estipulado por la EPA para agentes químicos con potenciales tóxicos (LogKp= -1.8). Por lo tanto, se deduce que el 3NOH(5C)10YLA es el análogo que posiblemente no represente un riesgo al ser manipulado por seres humanos.

Gráfico 18. Parámetros de toxicidad ecología de las estructuras optimizadas derivadas del 10YLA



Según lo mostrado en el Gráfico 18, todos los derivados optimizados del 10YLA son potencialmente tóxicos tanto para animales como para plantas acuáticas. Cabe destacar, que presenta mayores valores de LC50, EC50 y ChV el 3NOH(5C)10YLA; por lo cual es el menos tóxico, sin embargo, se considera altamente peligroso en el habitat acuático.

Es importante mencionar que los ésteres derivados de benzotiazol son susceptibles a hidrólisis por parte de las bacterias presentes en las tuberías de desecho de aguas, ya que, los hábitats acuáticos son fuentes de microorganismos con características especiales en la producción de metabolitos y enzimas, lo cual posibilita la biodegradación en el correspondiente alcohol y ácido carboxílico. La afirmación anterior se hizo considerando que la hidrólisis enzimática del enlace éster del triglicérido puede ser llevada a cabo mediante lipasas excretadas por bacterias presentes en aguas contaminadas, entre las que se destacan las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*. (Gonzales, et al., 2012, p.105-107)

Dadas las consideraciones que anteceden, se propone la siguiente reacción de degradación del 3NOH(5C)10YLA, siendo la molécula que presentó las mejores características de afinidad con el objetivo macromolecular, mediante hidrólisis catalizada por bacterias (CAT).

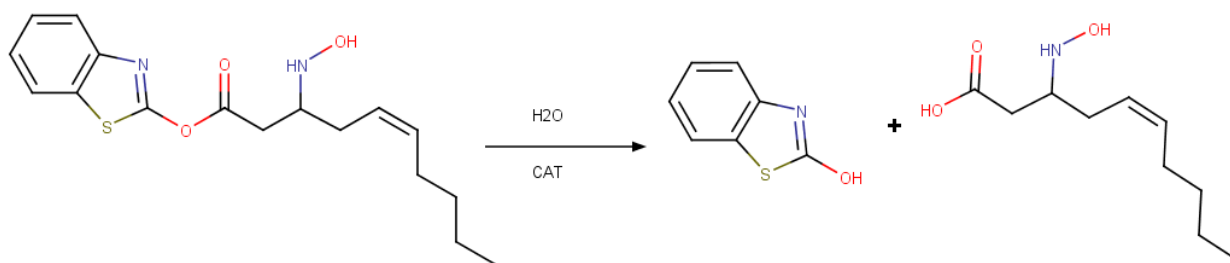
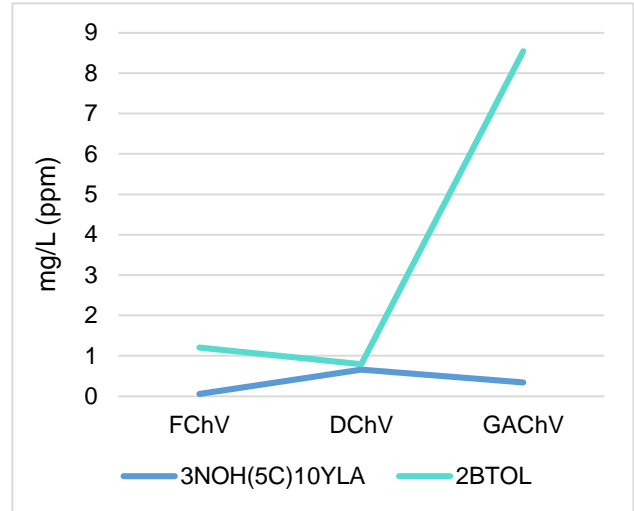
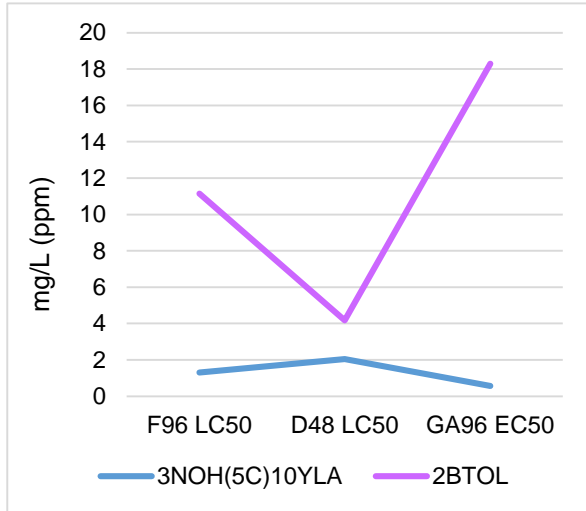


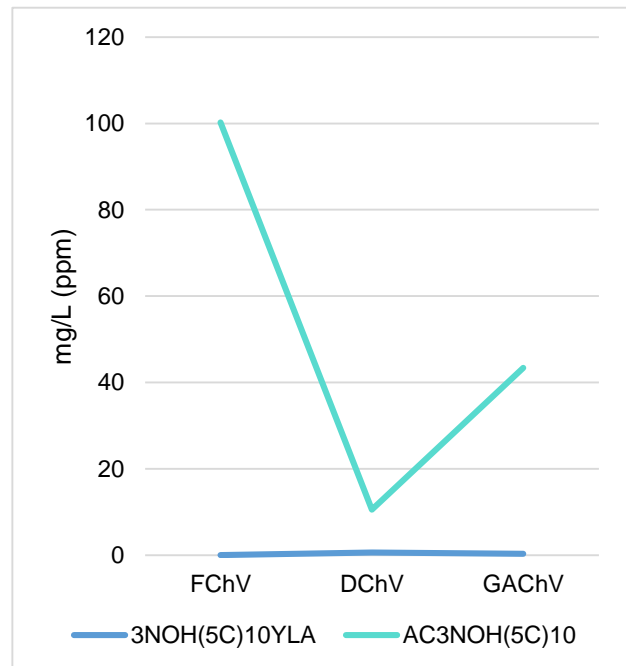
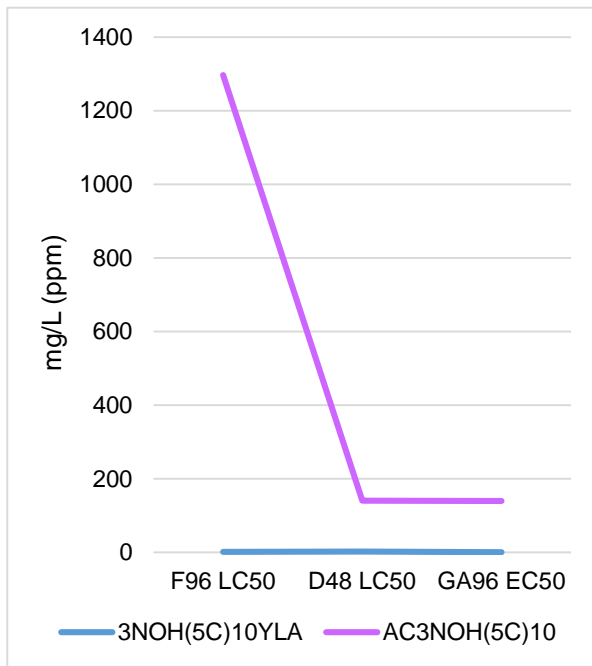
Figura 33. Hidrólisis del 3NOH(5C)10YLA catalizada por bacterias

Después de lo anteriormente expuesto, resulta oportuno evaluar el potencial tóxico presente en los productos de degradación del 3NOH(5C)10YLA; por lo que se procedió a realizar el análisis ECOSAR para el 2-hidroxi-1,3-benzotiazol (código 2BT10) y el ácido (5Z)-3-(hidroxiamino)-5-decaenoico (código AC3NOH(5C)10).

Gráficos 19 y 20. Comparación de toxicidad acuática aguda (izquierda) y crónica (derecha) del 3NOH(5C)10YLA y el 2BTOL



Gráficos 21 y 22. Comparación de toxicidad acuática aguda (izquierda) y crónica (derecha) del 3NOH(5C)10YLA y el AC3NOH(5C)10



Con respecto al 2BTOL, en el Gráfico 19, se muestra que la LC50 (96h) para peces presentó un aumento muy significativo al comparar el valor con el estimado para el R3NOH(5C)10YLA, pasando de 1.302 mg/L a 11.139 mg/L. También, se evidencia un aumento de la EC50 (96h) en algas verdes, con una diferencia de 17.722 mg/L frente al R3NOH(5C)10YLA. En cuanto a la LC50 de invertebrados, presentó un incremento de 2.130 ppm, el cual no es tan significativo; sin embargo, evidencia la disminución en la toxicidad producida.

Los efectos crónicos estimados también muestran la disminución en la toxicidad producida por el 2BTOL al ser comparada con la del R3NOH(5C)10YLA y sigue una tendencia similar a la expuesta en el párrafo anterior.

En el Gráfico 2, correspondiente al AC3NOH(5C)10, es posible visualizar un considerable aumento en la F96 LC50, en la D96 LC50 y en la GA96 EC50: 1295.502 mg/L, 138.814 mg/L y 139.126 mg/L., respectivamente. Por otra parte, en el Gráfico 22, se muestran los resultados de estimaciones para efectos crónicos que evidencian un descenso en la toxicidad producida por el AC3NOH(5C)10 al compararse con los calculados para el R3NOH(5C)10YLA.

De acuerdo con los razonamientos que se han venido realizando, se selecciona el 1,3-benzotiazol-2-il(5Z)-3-(N-hidroxiamino)-5-decaenoate, identificado mediante los códigos R3NOH(5C)10YLA y S3NOH(5C)10YLA, como molécula prototipo (*lead*) para la inhibición de la NMTAf, tomando en cuenta que se trata de la estructura en la cual se presenta la más baja energía libre de unión en ambas configuraciones (R: -8.3 kcal/mol y S: -8.0 kcal/mol); esto promueve una muy baja perfusión a través de la piel humana evitando la producción de efectos tóxicos al ser manipulado y utilizado como un agente antifúngico de limpieza por los seres humanos; asimismo, presenta la posibilidad de no ser tóxico para animales acuáticos al hidrolizarse por la bacterias presentes en las tuberías de desecho.

Sobre la base de las consideraciones anteriores, resulta preciso analizar las interacciones entre la la NMTAf y el 3NOH(5C)10YLA. En las Figuras 34 y 35, se aprecia que el 3NOH(5C)10YLA, en ambas configuraciones (R y S), se involucra en la unión con el objetivo macromolecular mediante interacciones con seis residuos proteicos; sin embargo, cada uno presenta un residuo diferente involucrado en la interacción con el oxígeno de la hidroxilamina, por ello se evidencia que cambios en quiralidad alteran las interacciones intermoleculares. Dichas

interacciones son puentes de hidrógeno con el aminoácido Asn-434 con una longitud de enlace de 3.01 Å y con el residuo Met-491 (distancia de enlace= 3.18 Å), por parte de la configuración R y S, respectivamente.

Además, cabe agregar que el grupo carbonilo del ester, al encontrarse la molécula en conformación R y S, generó un puente de hidrógeno con el residuo Tyr-263 a una longitud de enlace de 3.09 Å y 3.06 Å, respectivamente. Hecha la observación anterior, se evidencia que al incluir el grupo hidroxilamino como sustituyente en la cadena lipofílica, del ester derivado de benzotiazol, se produce una unión más estable con la NMTAf.

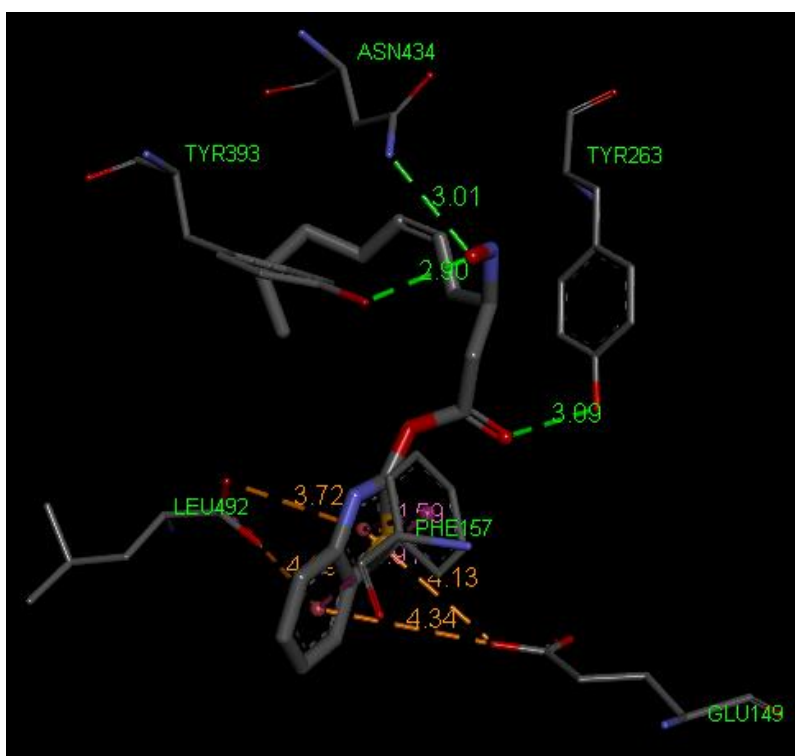


Figura 34. Residuos involucrados y distancias de enlace de las interacciones intermoleculares entre la NMTAf y el R3NOH(5C)10YLA

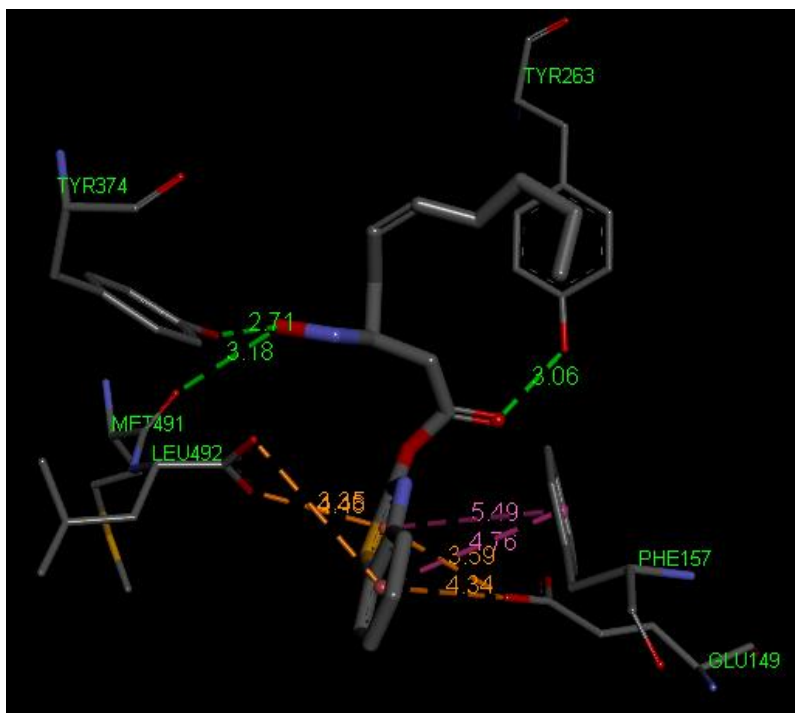


Figura 35. Residuos involucrados y distancias de enlace de las interacciones intermoleculares entre la NMTAf y el S3NOH(5C)10YLA

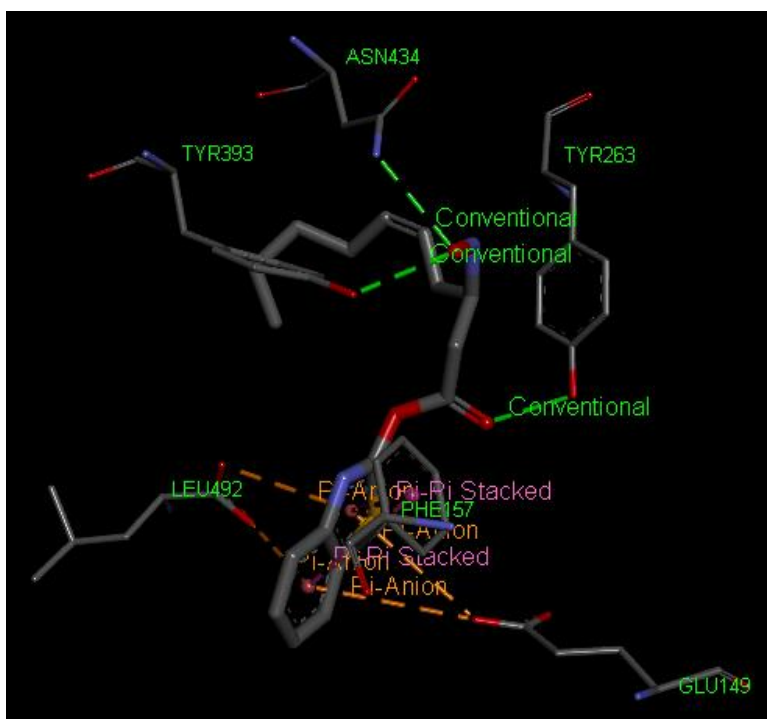


Figura 36. Tipos de fuerzas intermoleculares involucradas en la unión entre la NMTAf y el R3NOH(5C)10YLA.

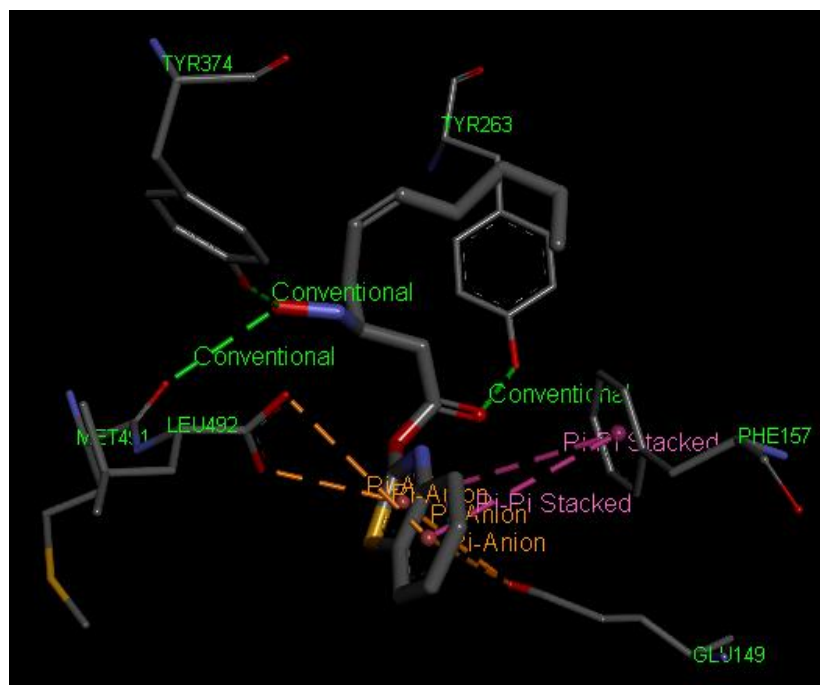


Figura 37. Tipos de fuerzas intermoleculares involucradas en la unión entre la NMTAf y el S3NOH(5C)10YLA

Según se visualiza en las Figuras 36 y 37, las interacciones mayormente implicadas en la unión entre el 3NOH(5C)10YLA son de tipo π -X, donde X corresponde a aniones y anillos aromáticos. También, se evidencian 3 puentes de hidrógeno, proporcionados por la interacción de residuos proteicos con los oxígenos de la hidroxilamina y del carbonilo. En total, la unión del ligando al sitio de unión se da a través de 9 enlaces que varían desde los 2.71 hasta los 5.49 Å; los enlaces de hidrógeno son las interacciones con mayor fuerza.

Finalmente, no se alcanzó el valor de energía de referencia ($\Delta G = -9.1$); sin embargo, se logró optimizar, significativamente, la afinidad y estabilidad del acople de esteres derivados de benzotiazol con la NMTAf, alcanzando un valor de energía libre de unión igual a -8.3, mejorando las características de espontaneidad del proceso. Cabe agregar que pequeños cambios ΔG a menudo enmascaran grandes cambios en ΔH y $T\Delta S$. (Bissantz, et al., 2010, 5063)

CAPITULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se propone la inhibición de la N-miristoiltransferasa como posible mecanismo antifúngico, producido por esteres derivados de benzotiazol contra el hongo *Aspergillus fumigatus*; de esta manera, se impide la lipidación de proteínas al evitar la formación del enlace covalente entre el miristato y la estructura peptídica, lo cual es fundamental para la supervivencia de los organismos fúngicos.

Se generaron cincuenta y ocho estructuras de esteres derivados de benzotiazol por modificación racional, produciendo moléculas con similitud estructural a los ácidos grasos.

Se realizaron análisis de acople molecular entre la N-miristoiltransferasa del hongo *Aspergillus fumigatus* y los esteres derivados de benzotiazol; determinando que la mejor afinidad la muestran los análogos con cadenas de 8 o 10 carbonos, que las sustituciones estructurales a nivel del areno no son favorables, y que la inclusión de grupos polares en posición 2 y 3 mejoran la espontaneidad del proceso de unión.

Se estimaron propiedades fisicoquímicas basadas en la estructura de los esteres derivados de benzotiazol; demostrando la hidrosolubilidad, la lipofilicidad y la capacidad de permeabilidad dérmica que presenta cada una de las moléculas que evidenciaron la mejor afinidad por el objetivo macromolecular.

Se evaluó el impacto ambiental, basándose en la estructura de los esteres derivados de benzotiazol; prediciendo las características de toxicidad que eventualmente podrían producir en ecosistemas acuáticos.

Se seleccionó como prototipo antifúngico para la inhibición de la N-Miristoiltransferasa del hongo *Aspergillus fumigatus* al 1,3-benzotiazol-2-il(5Z)-3-(N-hidroxiamino)-5-decaenoato, identificado mediante el código: 3NOH(5C)10YLA, de acuerdo con los razonamientos que se han realizado referentes a los análisis del acople molecular y de las estimaciones de parámetros fisicoquímicos y toxicoecologicos.

Recomendaciones

Con respecto a la molécula prototipo seleccionada, el 1,3-benzotiazol-2-il(5Z)-3-(N-hidroxi-amino)-5-decaenoato, identificado mediante el código: 3NOH(5C)10YLA, es necesario efectuar estudios de síntesis orgánica; con la finalidad de identificar la ruta que involucre el menor número de pasos sintéticos y el mayor porcentaje de rendimiento.

Además, los estudios con ésteres derivados de benzotiazol deben extenderse debido a que resulta indiscutible la necesidad de continuar con la investigación mediante ensayos *in vitro*; específicamente pruebas microbiológicas de determinación de concentración mínima inhibitoria, con la finalidad de demostrar los resultados obtenidos.

Resulta oportuno mencionar que, el 1,3-benzotiazol-2-il(5Z)-3-(N-hidroxi-amino)-5-decaenoato presenta características de alta lipofilia al tener un LogP igual a 4.63, consecuentemente tiene baja hidrosolubilidad y brinda la alternativa de formular un producto de limpieza correspondiente a una emulsión. Cabe destacar que, al comparar la estructura con el lauril sulfato de sodio (dodecil sulfato de sodio) -correspondiente a uno de los surfactantes más utilizados en la formulación de diversos productos debido a sus propiedades emulsificantes- se observa un número semejante de carbonos en la cola lipofílica. Así, 12 C son para el lauril sulfato y de 14 C para la del 3NOH(5C)10YLA. Por lo tanto, se recomienda llevar a cabo estudios de formulación evaluando la posible capacidad emulsificante que presenten los ésteres derivados de benzotiazol.

REFERENCIAS

- Achaiah, G., Sridhar, N., Praveen, K., y Mayuri, P. (2016) Review on 2-substituted benzothiazoles: diversity of synthetic methods and biological activities. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(4): 1375-1382. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(4).1375-82
- Ali, R., y Siddiqui, N. (2013) Biological Aspects of Emerging Benzothiazoles: A Short Review. *Journal of Chemistry*, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/345198>
- Andersen, J., Vestergaard, A., Mikkelsen, S., Mogensen, L., Chalat, M., y Molday, R. (2016) P4-ATPases as Phospholipid Flippases—Structure, Function, and Enigmas. *Frontiers in Physiology*, 7(275):1-23. DOI: 10.3389/fphys.2016.00275
- Barile, F. (2013) *Principles of Toxicology Testing*, 2da Edición. Florida: CRC Press.
- BIOVA. (10, junio, 2017) Discovery Studio [Definición del programa]. Recuperado de: <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>
- Bissantz, C., Kuhn, B., y Stahl, M. (2010) A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53: 5061–5084. DOI: 10.1021/jm100112j
- Bonnal, C., Leleu, C., Brugière, O., Chochillon, C., Porcher, R., Boelle, P., Menotti, J., Houze, S., Lucet, J., y Derouin, F. (2015) Relationship between Fungal Colonisation of the Respiratory Tract in Lung Transplant Recipients and Fungal Contamination of the Hospital Environment. *PlosOne*, 10(12): 1-11. DOI:10.1371/journal.pone.0144044
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., y Mietzner, T. (2014) *Jawetz, Melnick y Adelberg: Microbiologia Medica 26a. Edicion*. Mexico: Mc Graw Hill Education.
- Brunton, L., Chabner, B., y Knollmann, B. (2012) *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica 12ª Edición*. Mexico: Mc Graw Hill Education.

- Brunton, L., Katzung, B., y Hernández, A. (2016) *Farmacología General: Tomo II*. Mexico: Mc Graw Hill Education.
- Caggiano, G., Napoli, C., Coretti, C., Lovero, G., Scarafile, G., Giglio, O., y Montagna, M. (2014) Mold contamination in a controlled hospital environment: a 3-year surveillance in southern Italy. *BMC Infectious Diseases* 14(595): 1-5. DOI: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/595>
- Carey, F., y Giuliano, R. (2014) *Química Orgánica*. 9na Edición. Mexico: Mc Graw Hill Education.
- Chang, R., y Goldsby, K. (2013) *Química* 11ma Edición. Mexico: Mc Graw Hill Education.
- Chemaxon. (27, noviembre, 2016). Drug Discovery Filtering. Recuperado de: https://www.chemaxon.com/jchem4excel/userguide/drug_discovery_filtering.html
- Chemaxon. (10, junio, 2017). MarvinSketch [Descripción del programa]. Recuperado de: <https://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/>
- Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., Lee, P., y Tang, Y. (2012) AdmetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *Journal of Chemical Information and Modelling*, 52: 3099–3105. DOI: [dx.doi.org/10.1021/ci300367a](https://doi.org/10.1021/ci300367a)
- Coleman, J., Quazi, F., y Molday, R. (2013) Mammalian P4-ATPases and ABC Transporters and their Role in Phospholipid Transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(3): 555–574. DOI: [10.1016/j.bbali.2012.10.006](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.10.006)
- Cruz, C. (2015). Identificación de un inhibidor de la proteasa NS3/NS2B en productos naturales descritos en la biodiversidad costarricense por técnicas de modelaje molecular para el diseño de un potencial prototipo de fármaco para el tratamiento del virus del dengue. Costa Rica: Universidad Internacional de las Américas.

- Defrenza, I., Catalano, A., Carocci, A., Carrieri, A., Muraglia, M., Rosato, A., Corbo, F., y Franchini, C. (2014) 1,3-Benzothiazoles as Antimicrobial Agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1-8. DOI 10.1002/jhet
- Desoubeaux, G., Bernard, M., Gros, V., Sarradin, P., Perrodeau, E., Vecellio, L., Piscopo, A., Chandenier, J., y Bernard, L. (2014) Testing an innovative device against airborne *Aspergillus* contamination. *Medical Mycology*, 52: 584–590. DOI: 10.1093/mmy/myu011
- Doble, A. (1996) The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*. 47(4):S233-41.
- EMA [European Medicines Agency]. (2006) Guideline on Reporting of Suspected Transmission of Any Infectious Agent Via a Medicinal Product. Committee for Medicinal Products for Human Use, 1-10. Doc. Ref. EMA/CHMP/296412/2005
- Fang, W., Robinson, D., Raimi, O., Blair, D., Harrison, J., Lockhart, D., Torrie, L., Ruda, G., Wyatt, P., Gilbert, I., y Van Aalten, D. (2015) N-Myristoyltransferase is a cell wall target in *Aspergillus fumigatus*. *American Chemical Society*, 10, 1425–1434. DOI: 10.1021/cb5008647
- Food and Drug Administration [FDA]. (21, junio, 2017) Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts. Recuperado de: <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/default.htm>
- Food and Drug Administration [FDA]. (21, junio, 2017) News and Events: Testimony. Recuperado de: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/default.htm>
- Georges, C., Aldous, D., Raboisson, P., y Rognan, D. (2015) *The Practice of Medicinal Chemistry*. United Kingdom, United States: Elsevier.
- Gill, R., Rawal, R., y Bariwal, J. (2015) Recent Advances in the Chemistry and Biology of Benzothiazoles. *Archiv Der Pharmazie*, 348: 155–178. DOI 10.1002/ardp.201400340

- González, D., Amaíz, L., Medina, L., Vargas, R., Izzeddin, N., y Valbuena, O. (2012) Biodegradación de residuo graso industrial empleando bacterias endógenas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 3(2):105-118. ID: 40682
- Graham, P. (2013) *An Introduction to Medicinal Chemistry*. U.K.: Oxford University Press.
- Grosdidier, A., Zoete, V., y Michielin, O. (2011) SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*. 39:W270-W277. doi:10.1093/nar/gkr366
- Gull, Y., Rasool, N., Noreen, M., Altaf, A., Musharraf, S., Zubair M., Nasim, F., Yaqoob, A., DeFeo, V., y Zia-Ul-Haq, M. (2016) Synthesis of N-(6-Arylbenzo[d]thiazole-2-acetamide Derivatives and Their Biological Activities: An Experimental and Computational Approach. *Molecules*; 21(3): 266.
- Gupta, A., y Rawat, S. (2010) Synthesis and Cyclization of Benzothiazole: Review; *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(1):12-23.
- Hayashi, N., Higuchi, H., Ninomiya, K. (2009) X/ π interactions in Aromatic Heterocycles: Basic Principles and Recent Advances. *Top Heterocycle Chemistry*, 18: 1-35. DOI: 10.1007/7081-2008-15
- Hentschel, A., Zahedi, R., y Ahrends, R. (2016) Protein lipid modifications—More than just a greasy ballast. *Proteomics*, 16: 759–782. DOI 10.1002/pmic.201500353
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación 6ta Edición*. Mexico: Mc Graw Hill Education.
- Hernández, W., Rodríguez, D., Liboy, A., Castro, I., y García, D. (s.f.) Síntesis y uso del 2-(1,3-benzotiazolil) carboxilato de etilo como un posible agente antimicótico. Departamento de Ciencias y Tecnología, Universidad Metropolitana, Puerto Rico.
- Herrera, N., Ballari, M., López, A., y Santiago, A. (2015) New Synthesis and Biological Evaluation of Benzothiazole Derivates as Antifungal Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 3681–3686. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00150

- Horner, E. (2006) Managing building-related *Aspergillus* exposure. *Medical Mycology*, 44: S33-S38. DOI: 10.1080/13693780600925194
- Kamal, A., Syed, M., y Mohammed, S. (2014) Therapeutic potential of benzothiazoles: a patent review (2010 - 2014). *Informa Healthcare*, 1-15. DOI: 10.1517/13543776.2014.99976
- Kar, A. (2007). *Medicinal Chemistry*. New Delhi: New Age International Publishers.
- Katzung, B., Masters, S., y Traveor, A. (2013). *Farmacologia Basica y Clinica 12va Edicion*. Mexico: Mc Graw Hill Education.
- Kukreja, S., Sidhu, A., y Sharma, V. (2016) Synthesis of novel 7-fluoro-3-substituted-1,2,4-triazolo[3,4-b]benzothiazoles (FTBs) as potent antifungal agents: molecular docking and in silico evaluation. *Springer Science*, 1-16. DOI 10.1007/s11164-016-2599-3
- Kwon, K., y Sugui, J. (2013) *Aspergillus fumigatus*: What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? *PLOS Pathogens*, 9(12): 1-4. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003743
- Laursen, L., Hepburn, T., Lloyd, J., Perrett, J., Sanders, N., y Rocchiccioli, K. (2003) The role of the novel D2/beta2-agonist, Viozan (sibenaedet HCl), in the treatment of symptoms of chronic obstructive pulmonary disease: results of a large-scale clinical investigation. *Respiratory Med.* 97(A):S23-33.
- Lemke, T., Williams, D., Roche, V., y Zito, S. (2008). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry 6th Edition*. U.S.: Wolters Kluwer. Lippincott William & Wilkins.
- Lengaguer, T., y Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*; 6(3): 402-406.
- Lieberman, M., Marks, A y Peet, A. (2013) *Bioquímica Medica Básica: Un Enfoque Clínico*. 4ta Edición. Lippincott Williams and Wilkins.

- Lieberman, M y Ricer, R. (2014) *Bioquímica, Biología Molecular y Genética*. 6ta Edición. Lippincott Williams and Wilkins.
- Liu, M., Zheng, N., Li, D., Zheng, H., Zhang, L., Ge, L., y Liu, W. (2016) CYP51A-based mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Illustration by a new 3D Structural Model of *Aspergillus fumigatus* CYP51A protein. *Medical Mycology*, 54: 400–408. doi: 10.1093/mmy/myv102
- Liu, Y., Wang, Y., Dong, Q., Zhang, Y., Wu, S., Miao, Z., Yao, J., Zhang, W., y Sheng, C. (2013) Novel benzothiazole derivatives with a broad antifungal spectrum: design, synthesis and structure–activity relationships. *The Royal Society of Chemistry*, 4: 1551–1561. DOI: 10.1039/c3md00215b
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L., y Darnell, J. (2005) *Biología Celular y Molecular*. 5ta Edición. Editorial Panamericana.
- López, R., Theorin, L., Palmgren, M., y Günther, T. (2014) P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 466: 1227–1240. DOI 10.1007/s00424-013-1363-4
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, C. J., Moro, M. A., y Portoles, A. (2009). *Velázquez Farmacología Básica y Clínica*. 18va Edición. Editorial Panamericana.
- Lounkine, E., Keiser, M., Whitebread, S., Mikhailov, D., Hamon, J., Jenkins, J., Lavan, P., Weber, E., Doak, A., Côté, S., Shoichet, B., y Urban, L. (2012) Large Scale Prediction and Testing of Drug Activity on Side-Effect Targets. *Nature*, 486(7403): 361–367. DOI:10.1038/nature11159
- Maddila, S., Gorle, S., Seshadri, N., Lavanya, P., y Jonnalagadda, S. (2016) Synthesis, antibacterial and antifungal activity of novel benzothiazole pyrimidine derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 9: 681–687. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.003>

- Malik, J., Soni, H., y Singhai, A. (2013) Synthesis, characterization and evaluation for antifungal activity of substituted diaryl imidazo [2, 1, b]-benzothiazole. *Journal of Pharmacy Research*, 7:39-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.01.002>
- Martínez, E., Frías de León, M., Duarte, E., Calderón, M., Jiménez, M., Acosta, G., Rivera, F., Toriello, C., y Reyes, M. (2016) Fungal diversity and *Aspergillus* in hospital environments. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2): 264–269. DOI: 10.5604/12321966.1203888
- Masubuchi, M., Ebiike, H., Kawasaki, K., Sogabe, S., Morikami, K., Shiratori, Y., Tsujii, S., Fujii, T., Sakata, K., Hayase, M., Shindoh, H., Aoki, Y., Ohtsuka, T., y Shimma, N. (2003) Synthesis and Biological Activities of Benzofuran Antifungal Agents Targeting Fungal N-Myristoyltransferase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11: 4463–4478. DOI:10.1016/S0968-0896(03)00429-2
- Mayo¹, K., Moran, K., Meylan, B., y Ranslow, P. (2012) Methodology Document for the ECOlogical Structure-Activity Relationship Model (ECOSAR) Class Program. MS-Windows Version 1.11, 1-46.
- Mayo², K., Moran, K., Nabholz, B., Meylan, W., y Howard, P. (2012) Operation Manual for the ECOlogical Structure-Activity Relationship Model (ECOSAR) Class Program. U.S. Environmental Protection Agency.
- Meyer, E., Castellano, R., y Diederich, F. (2003) Interactions with Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition. *Angewandte Chemie International*, 42: 1210 – 1250. DOI: 1433-7851/03/4211-1210
- Morris, G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D., y Olson, A. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30: 2785–2791. DOI 10.1002/jcc.21256
- Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2008). *Microbiología Medica* 5ta Edición. Barcelona: Elsevier.

- Paassen, J., Russcher, A., Wingerden, A., Verweij, P., y Kuijper, E. (2015) Emerging aspergillosis by azole-resistant *Aspergillus fumigatus* at an intensive care unit in the Netherlands, 2010 to 2013. *Euro Surveillance*, 21(30): 1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.30.30300>
- Patel, N., y Khan, I. (2011). Synthesis of 1,2,4-triazole derivatives containing benzothiazoles as pharmacologically active molecule. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*; 26(4): 527–534.
- Pérez, M., Mir, M., Montero, M., Crespo, M., Montero, N., Gómez, J., Horcajada, P., y Pascual, J. (2014) Invasive Aspergillosis in Kidney Transplant Recipients: A Cohort Study. *Experimental and Clinical Transplantation*, 2: 101-105 DOI: 10.6002/ect.2013.0205
- Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., y Ferrin, T. (2004) UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13): 1606- 1612. DOI 10.1002/jcc.20084
- Piercey, M. (1998) Pharmacology of pramipexole, a dopamine D3-preferring agonist useful in treating Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology*, 21(3):141-51.
- Potts, R., y Guy, R. (1992) Predicting skin permeability. *Pharm Research*, 9(5):663-9.
- Prabhu, P., Shastry, C., Pande, S., y Selvam, T. (2011) Design, synthesis, characterization and biological evaluation of Benzothiazole-6-carboxylate derivatives. *Research in Pharmacy*, 1(2): 6-12.
- Prasad, K., Toraskar, M., y Kadam, V. (2008) N-Myristoiltransferase: A novel target. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8:142-149.
- Protein Data Bank. (20, mayo, 2017). Crystal structure of N-myristoyl transferase from *Aspergillus fumigatus* complexed with a synthetic inhibitor. Recuperado de: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4QBJ>

- ProTox (10, junio, 2017). Toxic doses and toxicity classes, Prediction of oral rodent toxicity.
Recuperado de: <http://tox.charite.de/tox/>
- Quintana, L. (2013). Metodología de la investigación. Mexico: Mc Graw Hill Education.
- Rangappa, K., Mahadeo, P., Siddappa, A., y Srinivasa, B. (2015) A comprehensive review in current developments of benzothiazole-based molecules in medicinal chemistry; 89: 207-251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.059>
- Rezki, N. (2016). A Green Ultrasound Synthesis, Characterization and Antibacterial Evaluation of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles Tethering Bioactive Benzothiazole Nucleus. *Molecules*; 21(4): 505.
- Rogawansamy, S., Gaskin, S., Taylor, M., y Pisaniello, D. (2015) An Evaluation of Antifungal Agents for the Treatment of Fungal Contamination in Indoor Air Environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12: 6319-6332. doi:10.3390/ijerph120606319
- Rouf, A., y Tanyeli, C. (2014). Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 97: 911-927.
- Sebaugh, J. (2011). Guidelines for Accurate EC50/IC50 Estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 2: 128-134. DOI:10.1002/pst.426
- Seeliger, D., y Groot, B. (2010) Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24:417–422. DOI 10.1007/s10822-010-9352-6
- Sheng, C., Zhu, J., Zhang, W., Zhang, M., Ji, H., Song, Y., Xu, H., Yao, J., Miao, Z., Zhou, Y., Zhu, J., y Lu, J. (2007) 3D-QSAR and molecular docking studies on benzothiazole derivatives as *Candida albicans* N-myristoyltransferase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(4): 477–486. doi:10.1016/j.ejmech.2006.11.001

- Shimada, T., Suzuki, M., y Katakura, S. (2015) Structure of N-myristoyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *International Union of Crystallography, Acta Crystallographica*, D71: 754–761. doi:10.1107/S1399004715000401
- Tong, X., Xu, H., Zou, L., Cai, M., Xu, X., Zhao, Z., Xiao, F., y Li, Y. (2016) High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis. *Scientific Reports*, 7:1-8. DOI: 10.1038/srep39606
- Trott, O., y Olson, A. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2): 455–461. DOI:10.1002/jcc.21334.
- Turchi, I., y Dewar, M. (1974). *The Chemistry of Oxazoles*. Texas: Department of Chemistry, The University of Texas at Austin.
- Uniprot. (20, mayo, 2017) (10, junio, 2017). Protein Knowledgebase [Objetivos Macromoleculares]; [Función de receptores específicos]. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/>
- U.S. EPA [Environmental Protection Agency]. (4, junio, 2017) ECOSAR: Ecological Structure Activity Relationships. Recuperado de <https://www.epa.gov/>
- U.S. EPA [Environmental Protection Agency]. (2007) *Dermal Exposure Assessment: A Summary of EPA Approaches*. EPA 600/R-07/040F, 1-59.
- Wilcken, R., Zimmermann, M., Lange, A., Joerger, A., y Boeckler, F. (2013) Principles and Applications of Halogen Bonding in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 1363–1388. DOI:10.1021/jm3012068
- Wright, M., Heal, W., Mann, D., y Tate, E. (2010) Protein myristoylation in health and disease. *Journal of Chemical Biology*, 3:19–35. DOI 10.1007/s12154-009-0032-8
- Yamazaki, K., Kaneko, Y., Suwa, K., Ebara, S., Nakazawa, K., y Yasuno, K. (2005) Synthesis of potent and selective inhibitors of *Candida albicans* N myristoyltransferase based on

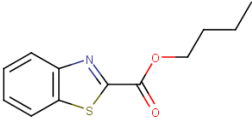
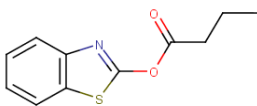
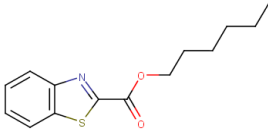
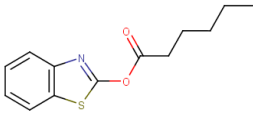
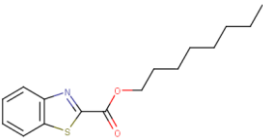
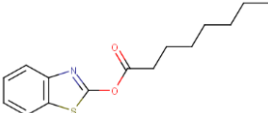
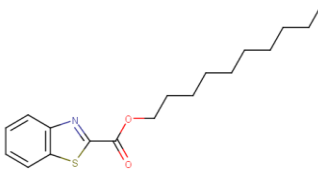
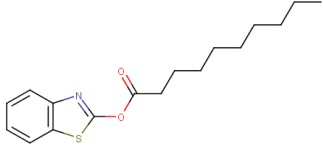
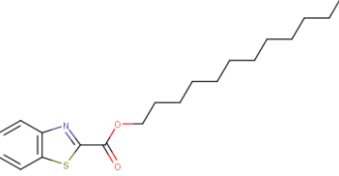
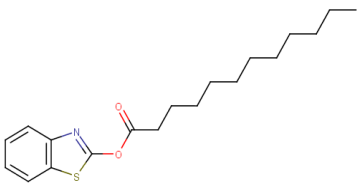
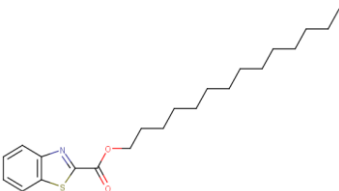
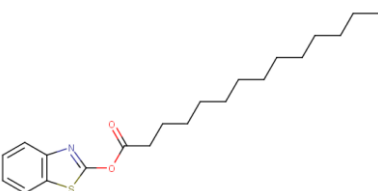
the benzothiazole structure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 2509–2522.
DOI:10.1016/j.bmc.2005.01.033

Zayas, B, Beyley, J., Terron, M., Cordero, M., Hernandez, W., Alegr, A., y Cox, O (2009)
Comparison of the nucleic acid covalent binding capacity of two nitro-substituted
benzazolo[3,2-a]quinolinium salts upon enzymatic reduction. *Toxicology in Vitro*, 21:
1155–1164. DOI:10.1016/j.tiv.2007.03.004

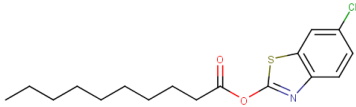
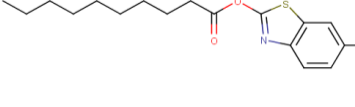
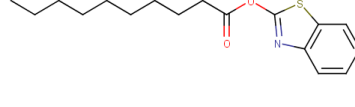
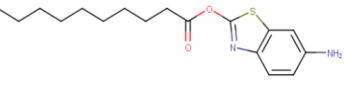
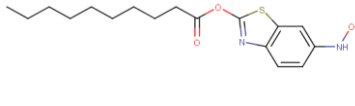
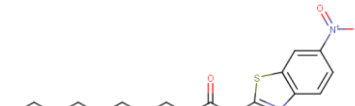
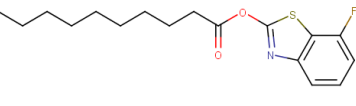
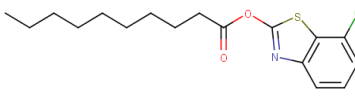
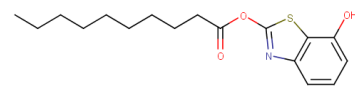
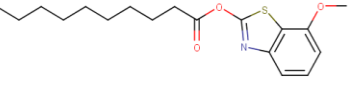
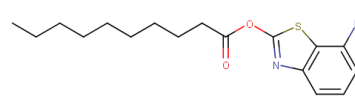
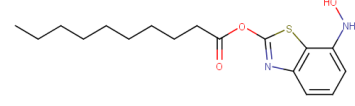
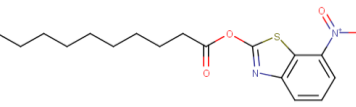
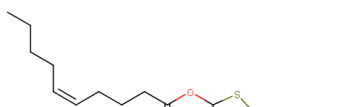
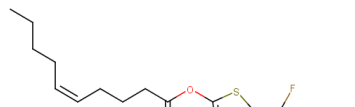
Apéndice A. Aminoácidos constituyentes del sitio de unión

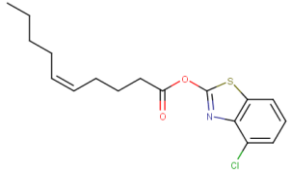
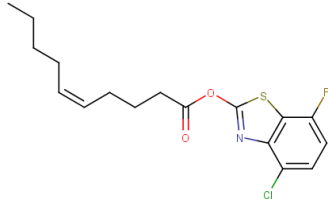
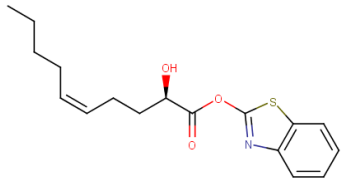
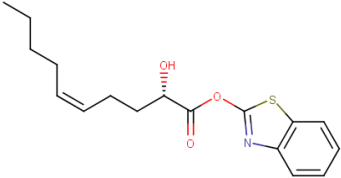
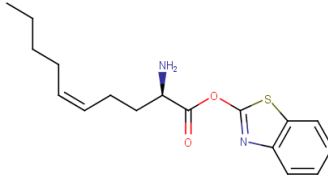
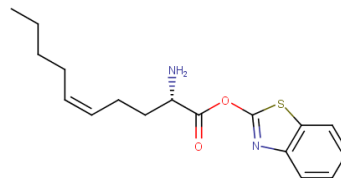
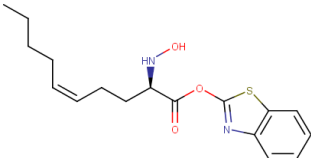
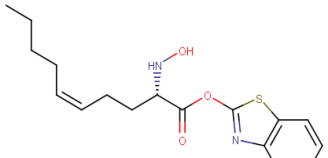
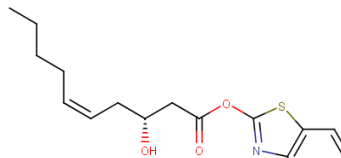
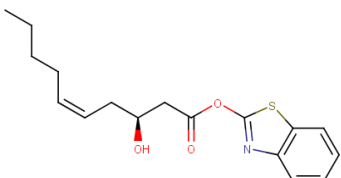
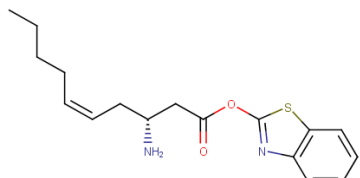
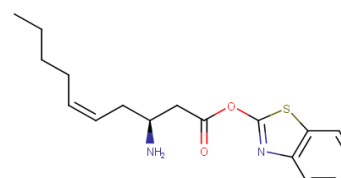
143-Leu	212-Ile	250-Ala	290-Gln	439-His
144-Thr	213-Asn	251-Gly	293-Lys	441-Asn
147-Tyr	214-Phe	252-Val	294-Asn	449-Lys
148-Val	215-Leu	254-Leu	374-Tyr	451-Gly
149-Glu	227-Thr	263-Tyr	376-Leu	452-Ala
150-Asp	231-Ile	264-Tyr	378-Ser	453-Gly
152-Asn	234-Ile	265-His	389-Val	452-Asp
153-Ala	235-Thr	267-Pro	391-Ala	455-Gly
154-Met	238-Cys	270-Trp	393-Tyr	456-Gln
155-Phe	239-Tyr	273-Leu	394-Leu	457-Leu
156-Arg	243-Ile	276-Val	395-Tyr	462-Tyr
157-Phe	244-Tyr	277-Gly	432-Val	490-Val
159-Tyr	245-Gln	278-Phe	434-Asn	491-Met
163-Phe	246-Ala	279-Ser	435-Ala	492-Val
193-Ile	248-Tyr	280-Pro	436-Leu	
210-Val	249-Thr	282-Pro	438-Leu	

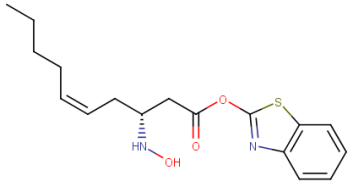
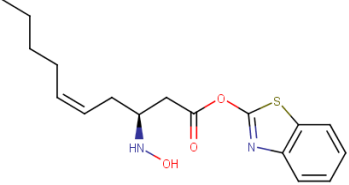
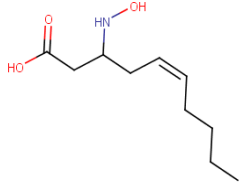
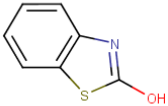
Apéndice B. Estructuras de los derivados de ester de benzotiazol

Código / Formula molecular / Estructura		
<p>4CBX</p> <p><chem>CCCCOC(=O)C1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>4YLA</p> <p><chem>CCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>6CBX</p> <p><chem>CCCCCCOC(=O)C1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 
<p>6YLA</p> <p><chem>CCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>8CBX</p> <p><chem>CCCCCCCCOC(=O)C1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>8YLA</p> <p><chem>CCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 
<p>10CBX</p> <p><chem>CCCCCCCCCOC(=O)C1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>10YLA</p> <p><chem>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>12CBX</p> <p><chem>CCCCCCCCCOC(=O)C1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 
<p>12YLA</p> <p><chem>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>14CBX</p> <p><chem>CCCCCCCCCOC(=O)C1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>14YLA</p> <p><chem>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 

<p>4F10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2F</p>	<p>4CL10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2Cl</p>	<p>4OH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2O</p>
<p>4CO10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2OC</p>	<p>4NH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2N</p>	<p>4NOH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2NO</p>
<p>4NO10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2[N+](=O)[O-]</p>	<p>5F10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC(F)=C2</p>	<p>5CL10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC(Cl)=C2</p>
<p>5OH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC(O)=C2</p>	<p>5CO10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC(OC)=C2</p>	<p>5NH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC(N)=C2</p>
<p>5NOH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC(NO)=C2</p>	<p>5NO10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC(=C2)[N+](=O)[O-]</p>	<p>6F10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=C(F)C=C2</p>

<p>6CL10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=C(Cl)C=C2</p> 	<p>6OH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=C(O)C=C2</p> 	<p>6CO10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=C(OC)C=C2</p> 
<p>6NH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=C(N)C=C2</p> 	<p>6NOH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=C(NO)C=C2</p> 	<p>6NO10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=C(C=C2)[N+](O-)=O</p> 
<p>7F10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C(F)=CC=C2</p> 	<p>7CL10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C(Cl)=CC=C2</p> 	<p>7OH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C(O)=CC=C2</p> 
<p>7CO10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C(OC)=CC=C2</p> 	<p>7NH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C(N)=CC=C2</p> 	<p>7NOH10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C(NO)=CC=C2</p> 
<p>7NO10YLA</p> <p>CCCCCCCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C(=CC=C2)[N+](O-)=O</p> 	<p>(5C)10YLA</p> <p>CCCC\C=C/CCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</p> 	<p>7F(5C)10YLA</p> <p>CCCC\C=C/CCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C(F)=CC=C2</p> 

<p>4CL(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/CCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2Cl</chem></p> 	<p>4CL7F(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/CCCC(=O)OC1=NC2=C(S1)C(F)=CC=C2Cl</chem></p> 	<p>R2OH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/CC[C@H](O)C(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 
<p>S2OH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/CC[C@H](O)C(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>R2NH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/CC[C@H](N)C(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>S2NH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/CC[C@H](N)C(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 
<p>R2NOH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/CC[C@H](NO)C(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>S2NOH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/CC[C@H](NO)C(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>R3OH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/C[C@H](O)CC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 
<p>S3OH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/C[C@H](O)CC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>R3NH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/C[C@H](N)CC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 	<p>S3NH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/C[C@H](N)CC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 

<p>R3NOH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/C[C@H](CC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2)NO</chem></p> 	<p>S3NOH(5C)10YLA</p> <p><chem>CCCC\C=C/C[C@@H](CC(=O)OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2)NO</chem></p> 	<p>AC3NOH(5C)10</p> <p><chem>CCCC\C=C/CC(CC(O)=O)NO</chem></p> 
<p>2BTOL</p> <p><chem>OC1=NC2=C(S1)C=CC=C2</chem></p> 		

Apéndice C. Parámetros fisicoquímicos

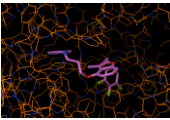
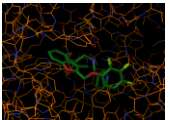
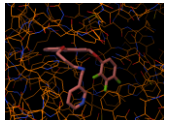
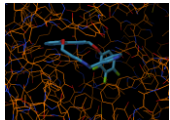
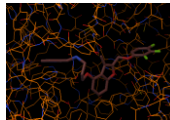
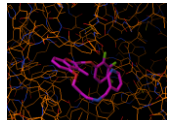
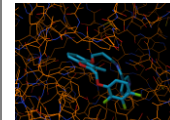
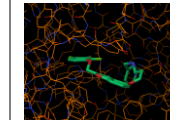
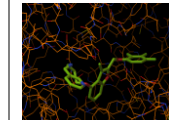
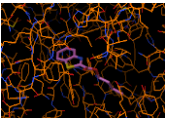
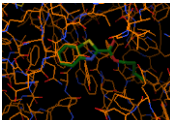
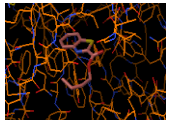
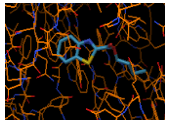
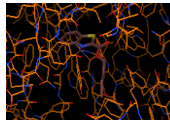
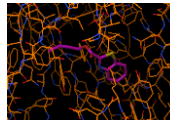
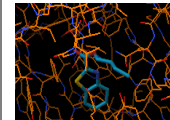
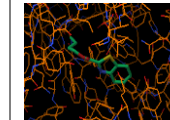
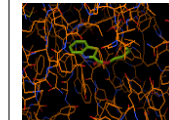
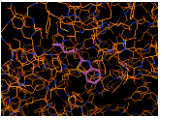
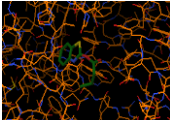
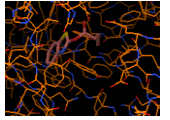
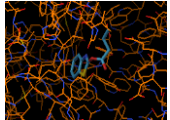
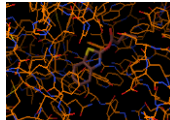
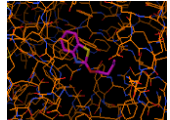
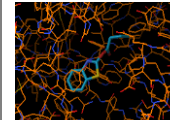
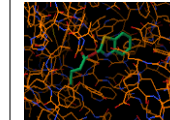
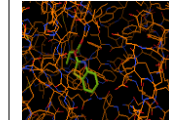
Código	MM (g/mol)	ER	TPSA (Å)	LogP	LogS / Categoría	LogKp
4CBX	235,5	5	39,19	3,62	-3,18 / Alta	-1,59
4YLA	221,27	4	39,19	3,55	-3,89 / Moderada	-1,55
6CBX	263,36	7	39,19	4,51	-4,20 / Moderada	-1,12
6YLA	249,33	6	39,19	4,44	-4,92 / Baja	-1,09
8CBX	291,13	9	39,19	5,40	-5,21 / Baja	-0,66
8YLA	277,38	8	39,19	5,33	-5,93 / Baja	-0,63
10CBX	319,46	11	39,19	6,29	-6,21 / Baja	-0,20
10YLA	305,44	10	39,19	6,22	-6,94 / Baja	-0,17
12CBX	347,52	13	39,19	7,17	-7,19 / Baja	0,25
12YLA	333,49	12	39,19	7,11	-7,93 / Baja	0,29
14CBX	375,57	15	39,19	8,06	-8,17 / Baja	0,71
14YLA	361,54	14	39,19	8,00	-8,91 / Baja	0,75
(5C)10YLA	303,42	9	39,19	5,86	-6,68 / Baja	-0,63
2OH(5C)10YLA	319,42	9	59,42	4,98	-6,36 / Baja	-1,30
2NOH(5C)10YLA	334,43	10	71,45	4,99	-6,29 / Baja	-1,38
3NOH(5C)10YLA	334,43	10	71,45	4,63	-5,65 / Baja	-1,62
AC3NOH(5C)10	201,266	8	69,56	1,20	-2,32 / Alta	NA
2BTOL	151,18	0	33,12	2,49	-2,22 / Alta	NA

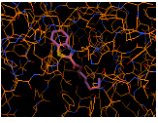
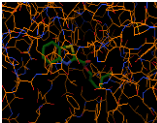
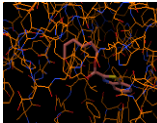
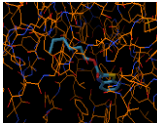
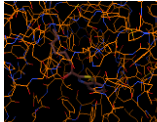
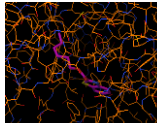
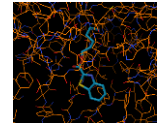
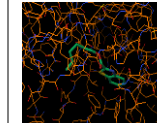
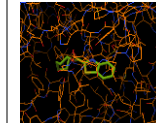
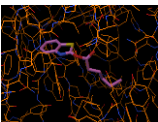
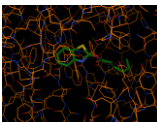
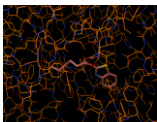
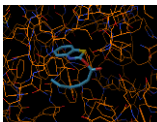
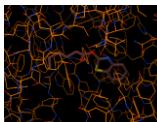
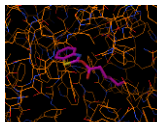
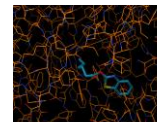
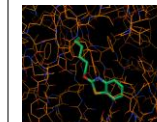
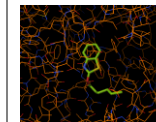
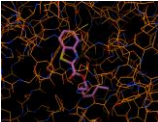
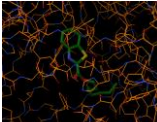
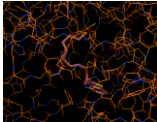
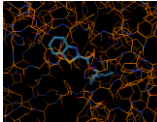
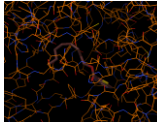
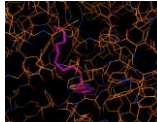
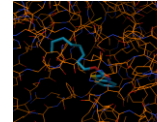
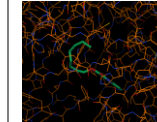
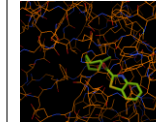
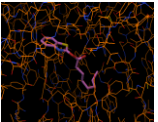
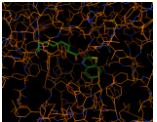
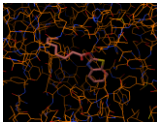
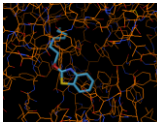
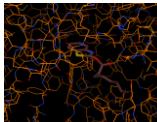
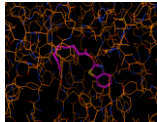
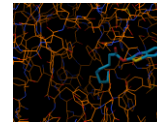
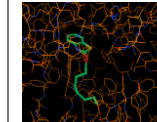
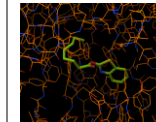
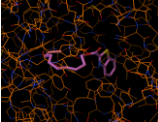
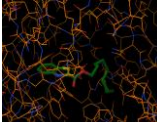
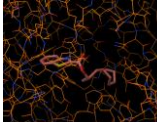
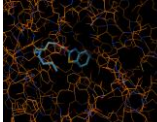
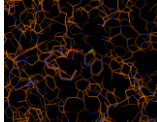
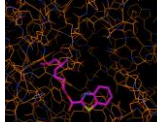
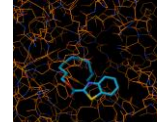
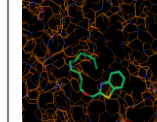
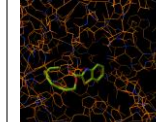
Apéndice D. Estimaciones ECOSAR

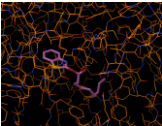
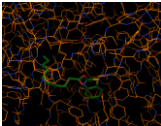
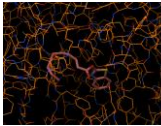
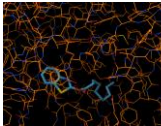
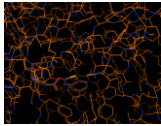
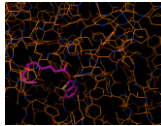
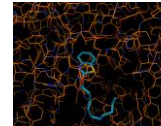
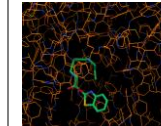
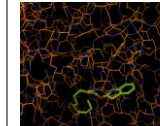
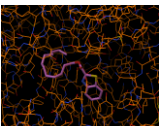
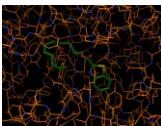
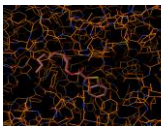
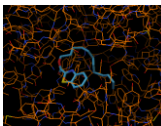
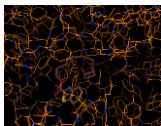
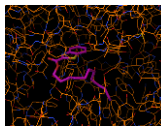
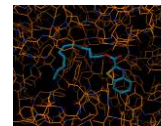
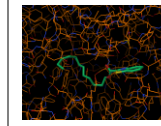
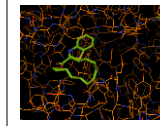
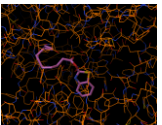
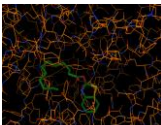
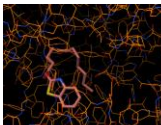
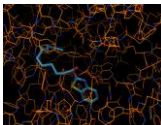
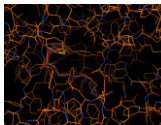
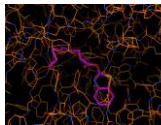
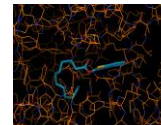
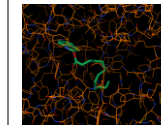
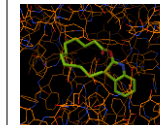
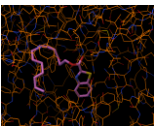
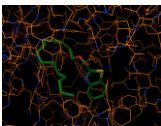
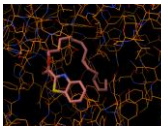
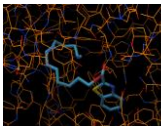
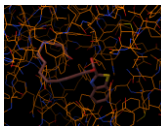
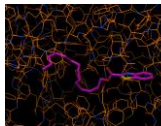
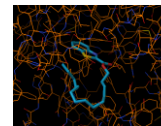
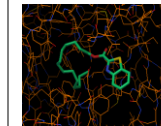
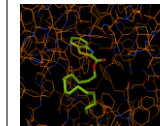
Código	mg/L (ppm)					
	F96 LC50	D48 LC50	GA96 EC50	FChV	DChV	GACHV
4CBX	3,562	6,225	2,050	0,191	2,671	0,889
4YLA	3,680	6,480	2,157	0,200	2,837	0,915
6CBX	1,204	1,914	0,547	0,053	0,636	0,317
6YLA	1,253	2,006	0,580	0,056	0,680	0,328
8CBX	0,403	0,582	0,144	0,015	0,150	0,112
8YLA	0,421	0,613	0,154	0,016	0,161	0,116
10CBX	0,133*	0,175*	0,038*	0,004*	0,035*	0,039*
10YLA	0,140*	0,185*	0,040*	0,004*	0,038*	0,041*
12CBX	0,044*	0,053*	0,010*	0,001*	0,008*	0,014*
12YLA	0,046*	0,056*	0,011*	0,001*	0,009*	0,014*
14CBX	0,015*	0,016*	0,003*	0,000*	0,002*	0,005*
14YLA	0,015*	0,017*	0,003*	0,000*	0,002*	0,005*
(5C)10YLA	0,226	0,311	0,072	0,008	0,070	0,064
2OH(5C)10YLA	0,777	1,173	0,311	0,031	0,340	0,210
2NOH(5C)10YLA	0,802	1,211	0,321	0,032	0,350	0,217
3NOH(5C)10YLA	1,302	2,042	0,573	0,056	0,655	0,345
AC3NOH(5C)10	1296,804	140,856	139,699	100,252	10,570	43,368
2BTOL	11,139	4,172	18,295	1,208	0,793	8,542

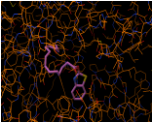
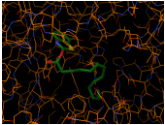
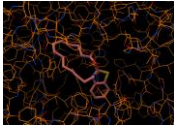
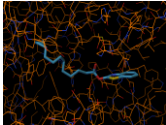
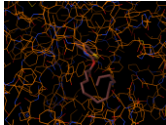
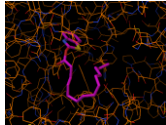
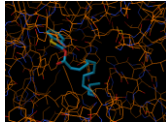
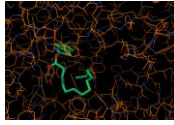
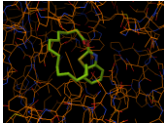
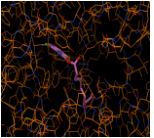
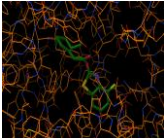
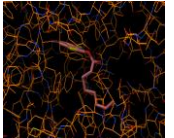
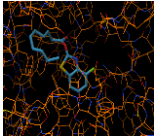
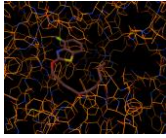
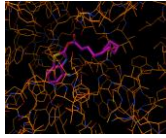
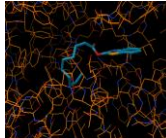
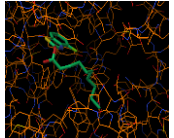
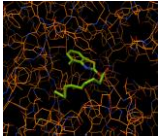
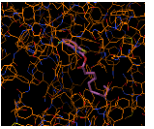
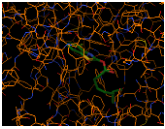
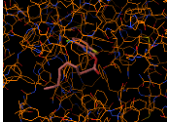
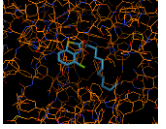
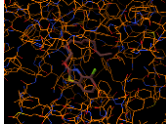
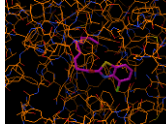
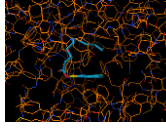
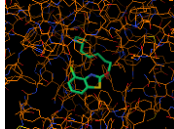
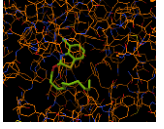
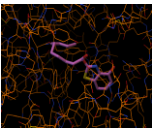
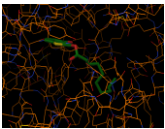
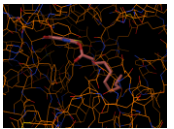
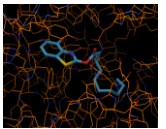
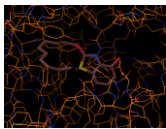
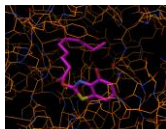
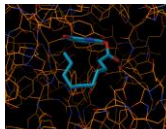
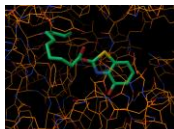
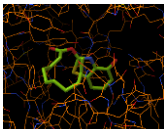
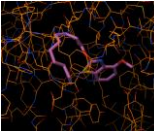
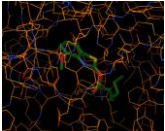
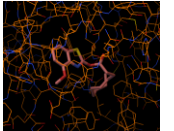
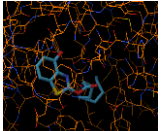
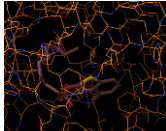
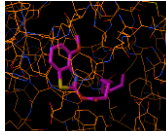
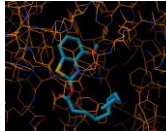
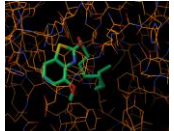
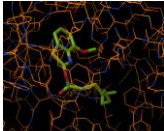
*No se estiman posibles efectos a saturación.

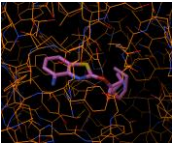
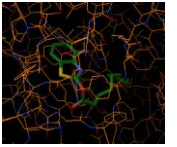
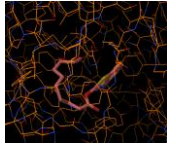
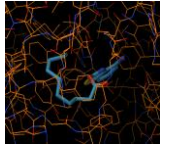
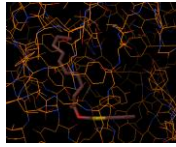
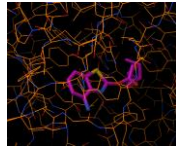
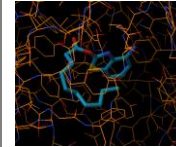
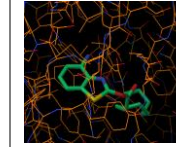
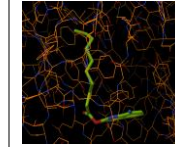
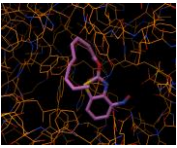
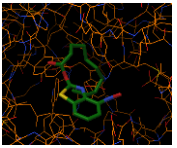
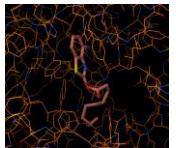
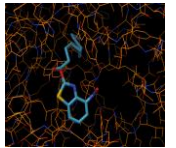
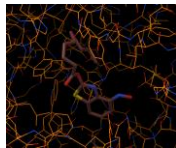
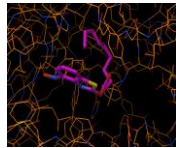
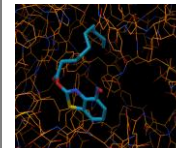
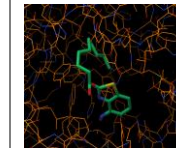
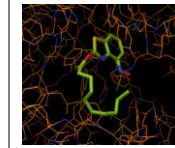
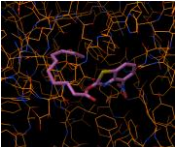
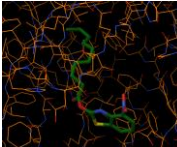
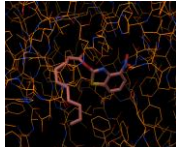
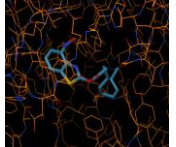
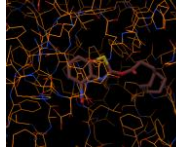
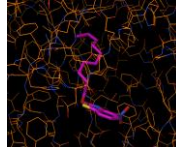
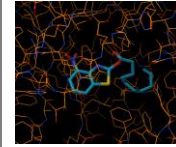
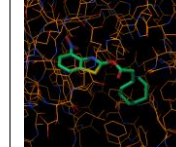
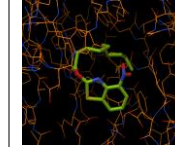
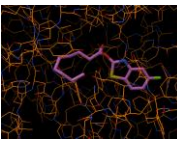
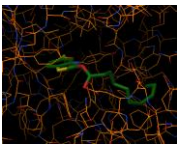
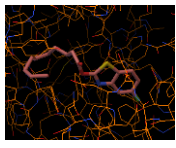
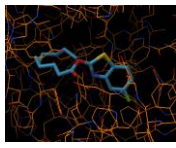
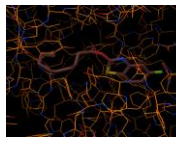
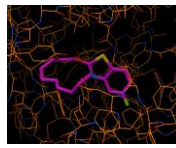
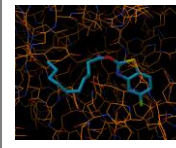
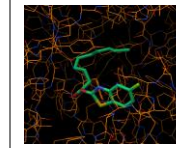
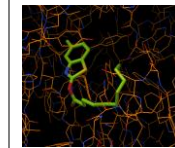
Apéndice E. Resultados de acople molecular

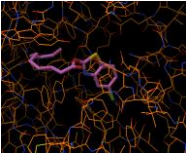
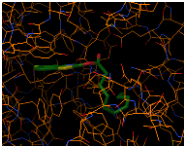
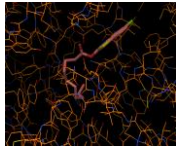
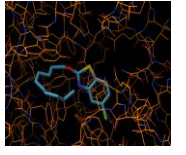
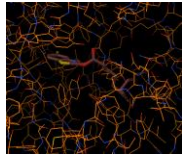
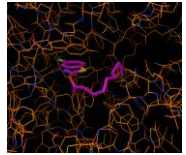
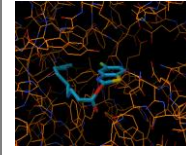
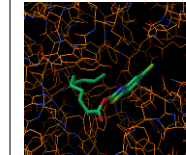
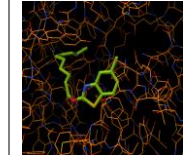
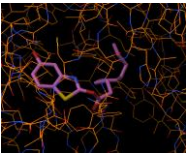
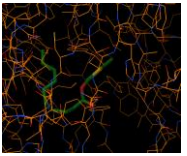
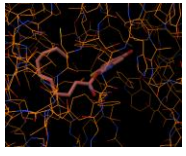
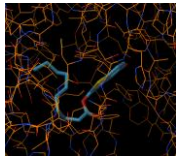
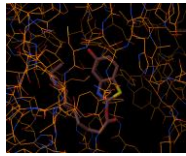
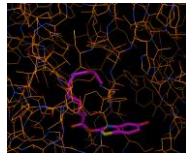
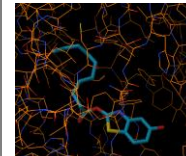
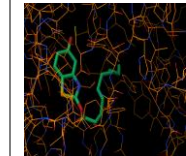
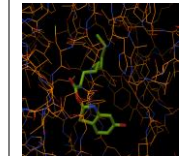
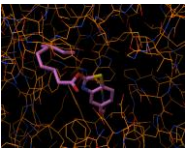
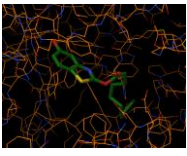
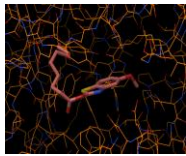
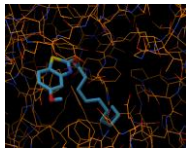
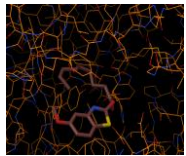
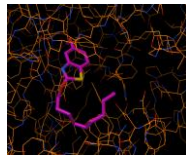
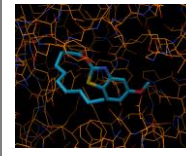
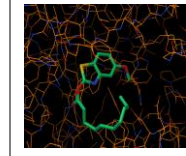
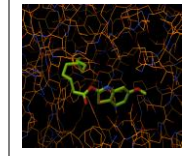
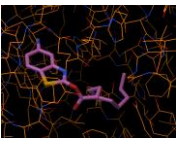
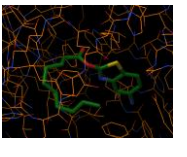
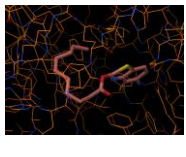
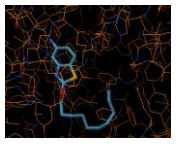
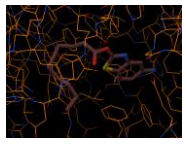
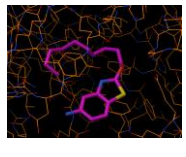
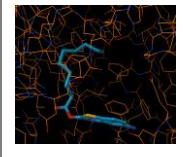
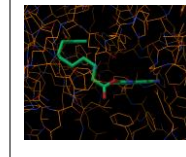
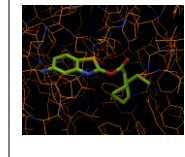
Código	ΔG (kcal/mol) / Posición de unión								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RO-09-4879	-9.8 	-9.6 	-9.5 	-9.5 	-9.2 	-9.0 	-9.0 	-8.9 	-8.5 
4CBX	-6.8 	-6.7 	-6.7 	-6.6 	-6.4 	-6.3 	-6.2 	-6.1 	-6.1 
4YLA	-6.7 	-6.6 	-6.5 	-6.5 	-6.4 	-6.4 	-6.3 	-6.3 	-6.2 

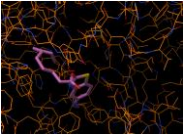
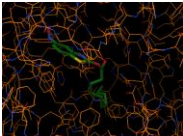
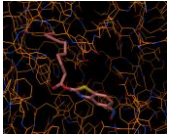
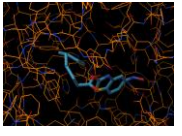
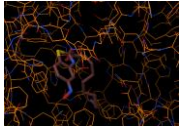
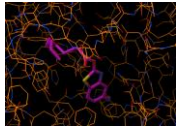
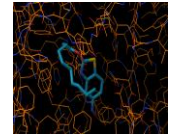
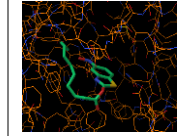
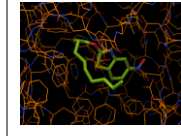
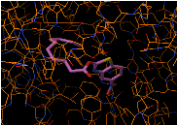
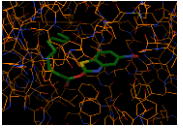
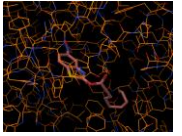
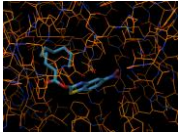
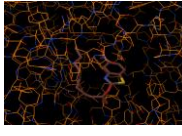
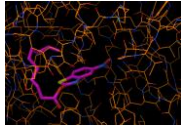
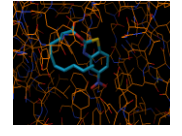
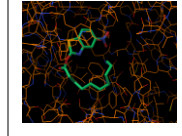
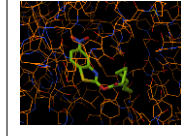
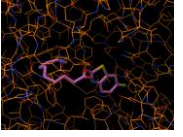
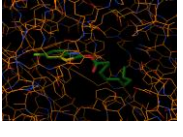
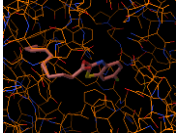
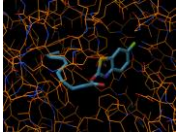
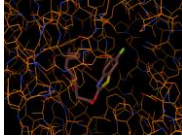
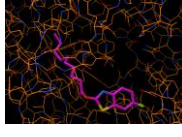
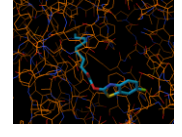
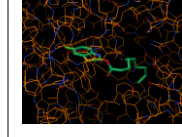
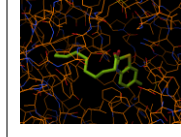
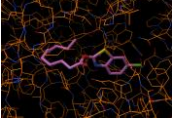
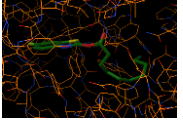
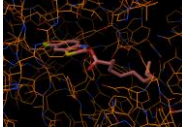
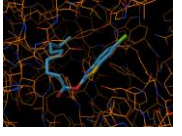
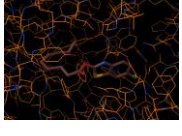
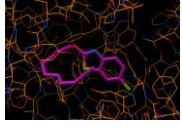
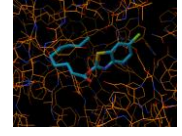
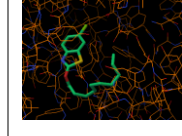
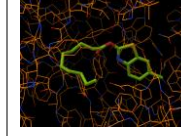
6CBX	-7.3 	-7.3 	-6.8 	-6.8 	-6.8 	-6.7 	-6.6 	-6.4 	-6.2 
6YLA	-7.1 	-7.0 	-6.8 	-6.8 	-6.8 	-6.7 	-6.6 	-6.5 	-6.5 
8CBX	-7.5 	-7.4 	-7.0 	-6.9 	-6.9 	-6.8 	-6.8 	-6.4 	-6.4 
8YLA	-7.6 	-7.2 	-7.1 	-7.1 	-6.8 	-6.8 	-6.6 	-6.4 	-6.4 
10CBX	-7.1 	-7.1 	-6.9 	-6.9 	-6.8 	-6.8 	-6.7 	-6.6 	-6.4 

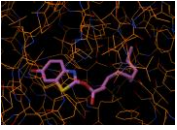
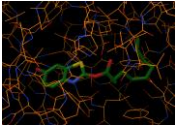
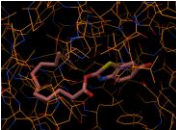
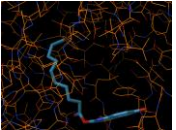
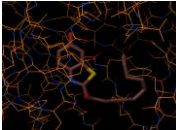
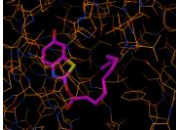
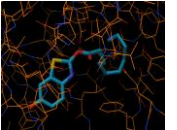
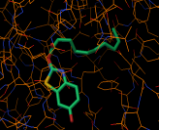
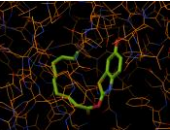
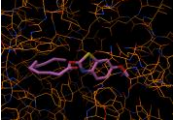
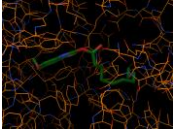
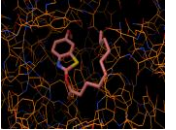
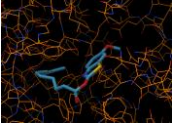
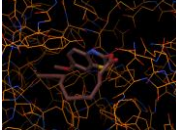
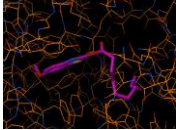
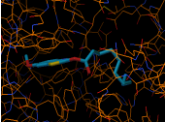
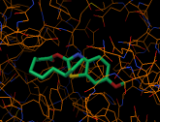
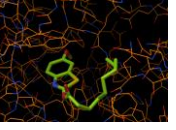
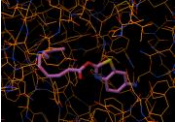
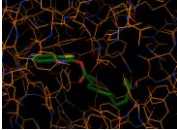
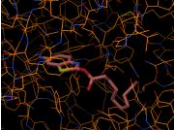
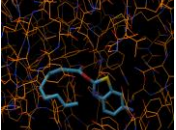
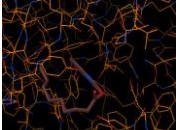
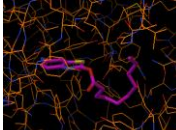
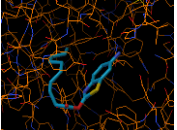
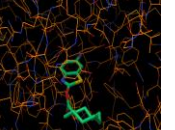
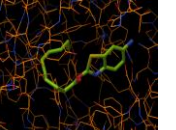
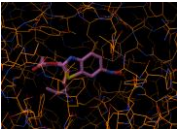
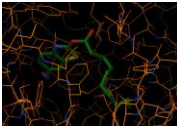
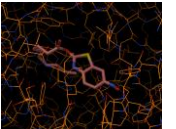
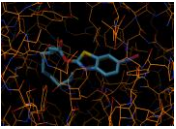
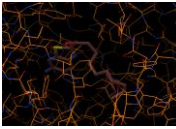
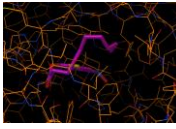
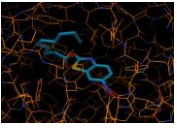
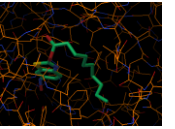
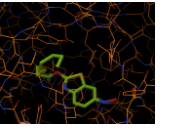
10YLA	-7.6	-7.5	-7.4	-7.2	-7.0	-7.0	-6.9	-6.9	-6.8
									
12CBX	-7.3	-7.3	-6.9	-6.9	-6.8	-6.7	-6.6	-6.6	-6.5
									
12YLA	-7.5	-7.2	-7.0	-7.0	-7.0	-6.9	-6.9	-6.8	-6.5
									
14CBX	-7.3	-7.1	-7.0	-6.9	-6.8	-6.7	-6.7	-6.4	-6.4
									

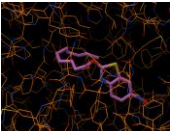
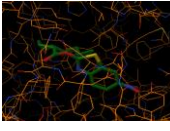
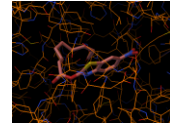
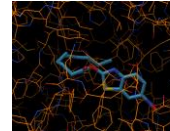
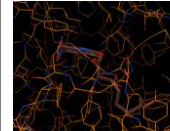
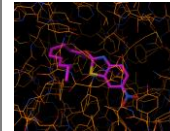
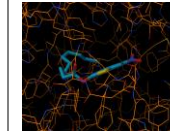
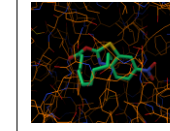
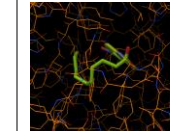
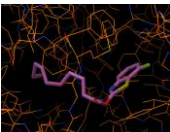
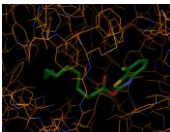
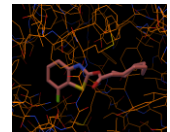
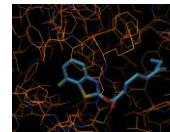
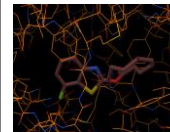
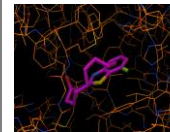
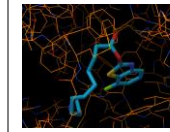
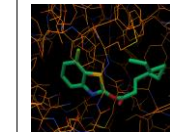

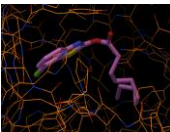
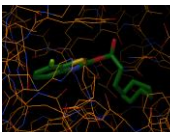
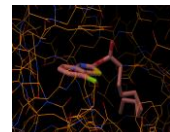
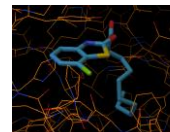
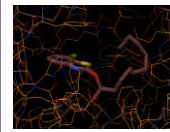
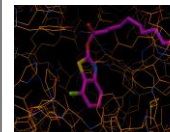
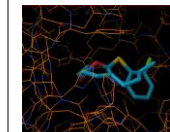
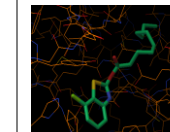
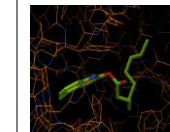
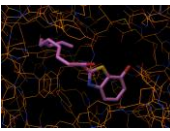
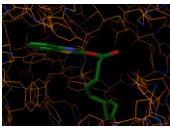
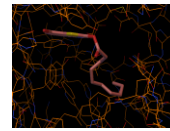
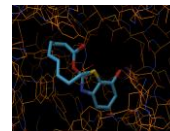
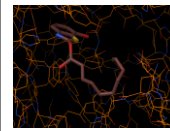
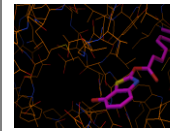
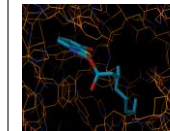
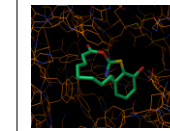
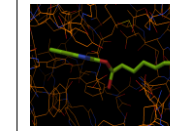
14YLA	-7.3 	-7.1 	-7.0 	-6.8 	-6.8 	-6.8 	-6.7 	-6.6 	-6.6 
4F10YLA	-7.3 	-7.2 	-7.2 	-7.0 	-6.9 	-6.8 	-6.6 	-6.5 	-6.4 
4CL10YLA	-7.7 	-6.8 	-6.7 	-6.7 	-6.6 	-6.6 	-6.5 	-6.5 	-6.4 
4OH10YLA	-7.2 	-7.1 	-7.1 	-6.9 	-6.9 	-6.5 	-6.4 	-6.3 	-6.0 
4CO10YLA	-7.0 	-7.0 	-6.8 	-6.8 	-6.6 	-6.5 	-6.5 	-6.4 	-6.2 

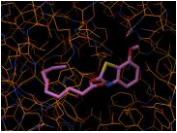
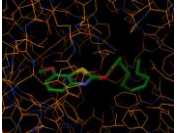
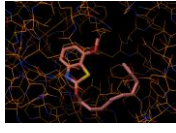
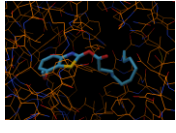
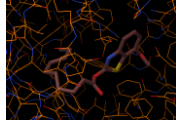
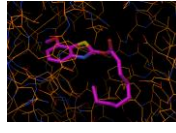
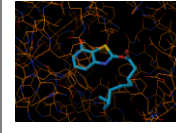
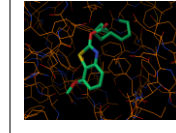
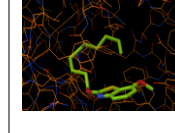
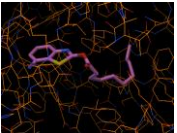
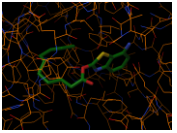
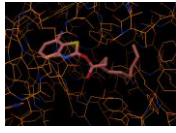
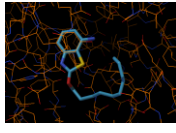
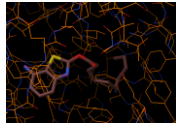
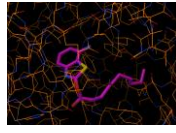
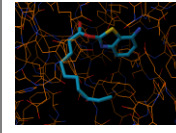
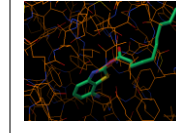
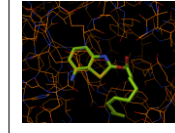
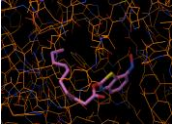
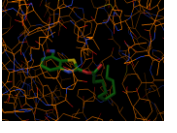
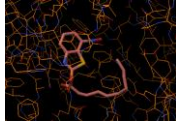
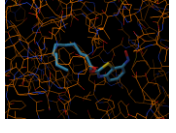
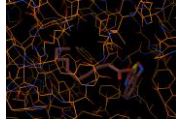
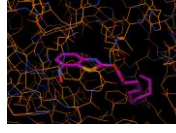
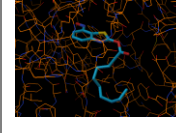
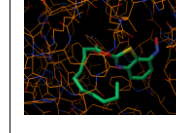
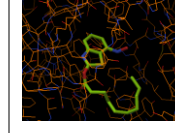
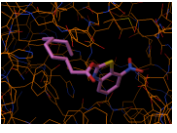
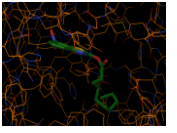
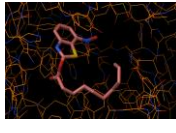
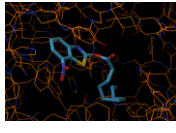
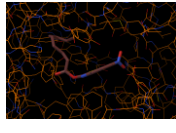
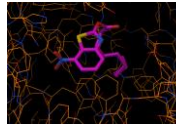
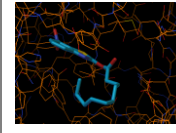
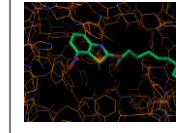
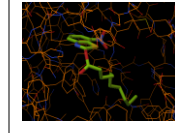
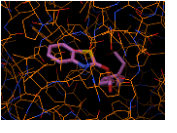
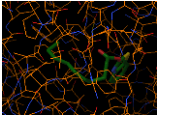
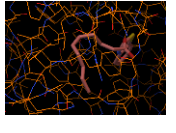
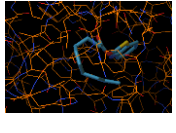
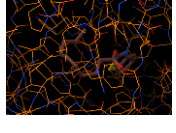
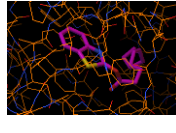
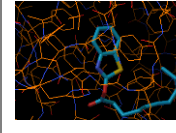
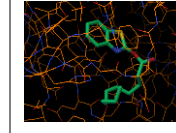
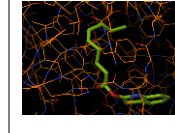
4NH10YLA	-7.6 	-7.2 	-7.2 	-7.1 	-7.1 	-7.0 	-6.9 	-6.9 	-6.8 
4NOH10YLA	-7.0 	-6.8 	-6.7 	-6.7 	-6.7 	-6.6 	-6.5 	-6.5 	-6.5 
4NO10YLA	-7.2 	-7.2 	-7.0 	-6.9 	-6.9 	-6.9 	-6.8 	-6.7 	-6.6 
5F10YLA	-7.2 	-7.2 	-7.2 	-7.0 	-6.9 	-6.7 	-6.7 	-6.6 	-6.6 

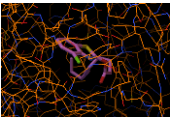
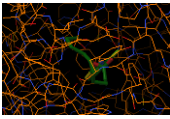
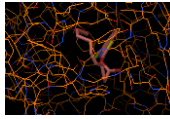
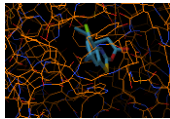
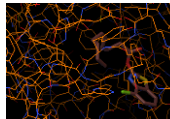
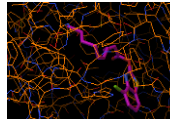
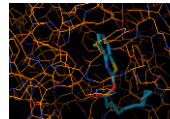
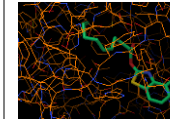
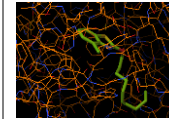
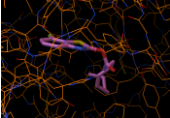
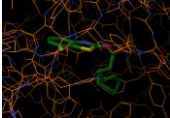
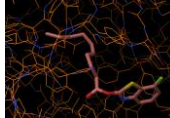
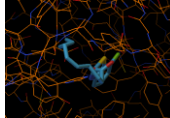
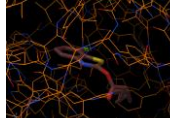
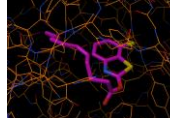
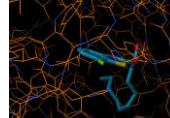
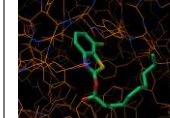
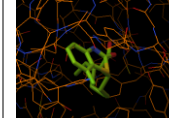
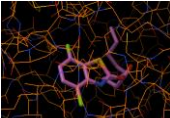
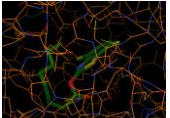
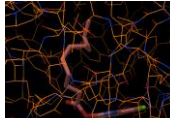
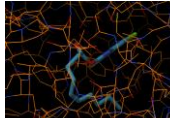
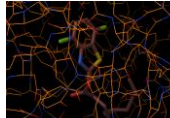
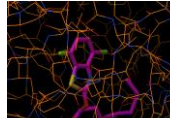
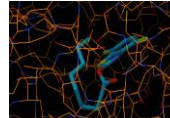
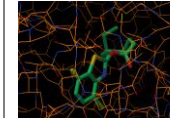
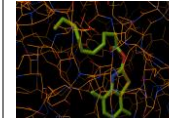
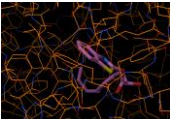
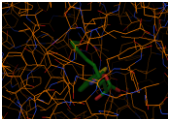
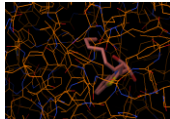
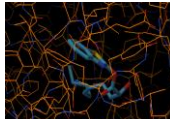
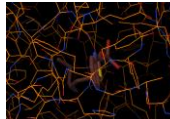
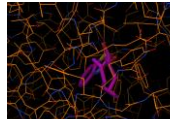
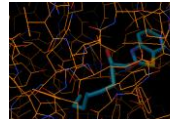
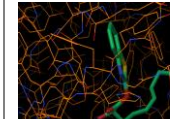
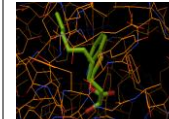
5CL10YLA	-7.3 	-6.8 	-6.7 	-6.5 	-6.4 	-6.4 	-6.4 	-6.4 	-6.3 
5OH10YLA	-7.2 	-7.1 	-7.0 	-6.8 	-6.5 	-6.5 	-6.5 	-6.5 	-6.5 
5CO10YLA	-7.1 	-6.8 	-6.7 	-6.6 	-6.5 	-6.4 	-6.3 	-6.3 	-6.2 
5NH10YLA	-7.1 	-7.0 	-6.9 	-6.6 	-6.5 	-6.5 	-6.4 	-6.4 	-6.3 

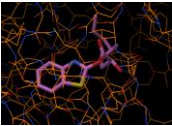
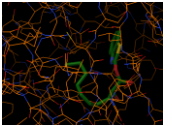
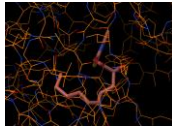
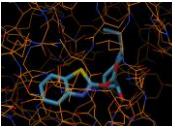
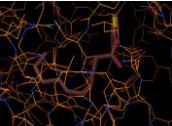
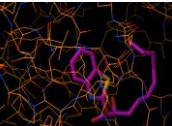
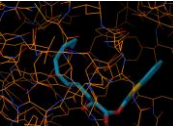
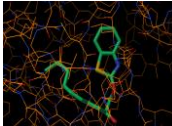
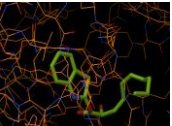
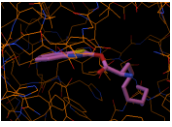
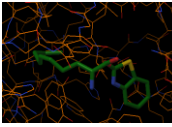
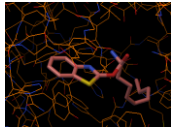
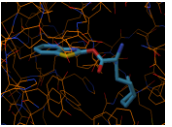
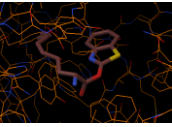
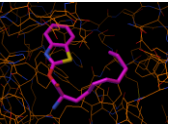
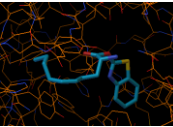
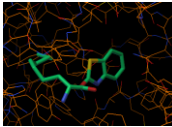
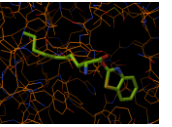
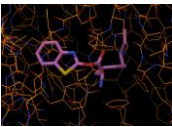
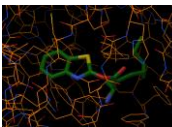
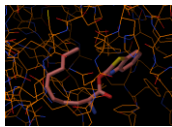
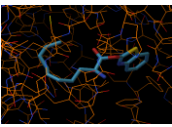
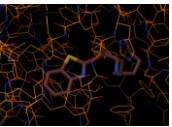
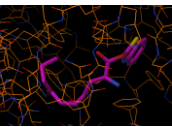
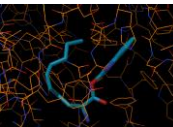
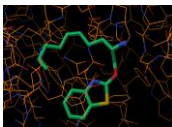
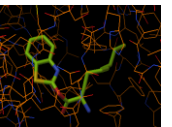
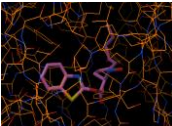
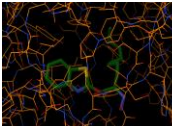
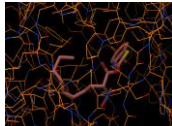
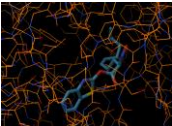
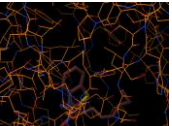
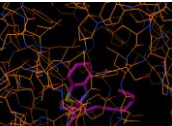
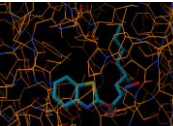
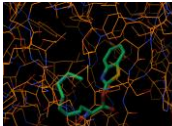
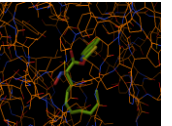
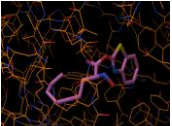
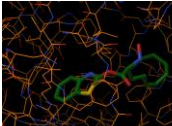
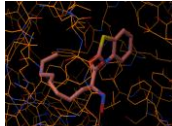
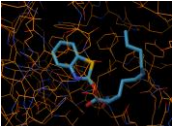
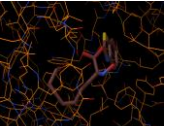
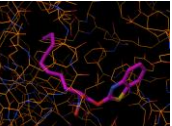
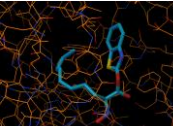
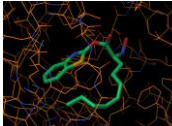
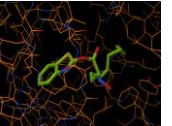
5NOH10YLA	-7.2	-6.8	-6.8	-6.6	-6.5	-6.4	-6.4	-6.3	-6.3
									
5NO10YLA	-7.4	-7.1	-6.8	-6.8	-6.5	-6.5	-6.4	-6.4	-6.4
									
6F10YLA	-7.4	-7.3	-7.0	-6.7	-6.5	-6.4	-6.4	-6.2	-6.2
									
6CL10YLA	-7.2	-7.1	-7.0	-6.8	-6.7	-6.7	-6.7	-6.6	-6.6
									

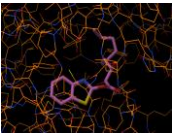
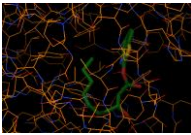
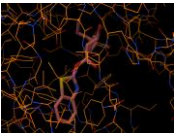
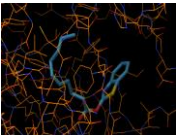
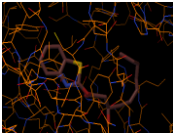
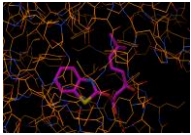
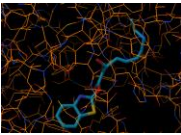
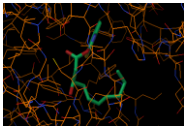
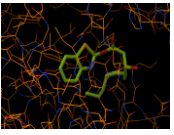
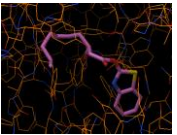
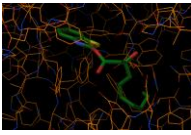
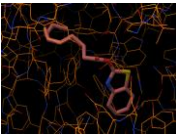
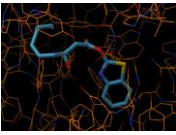
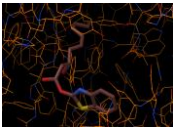
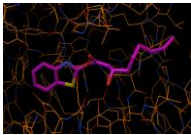
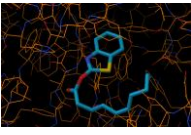
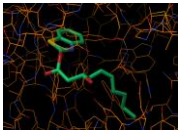
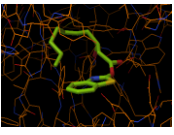
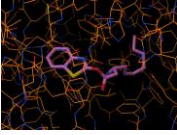
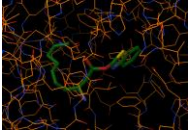
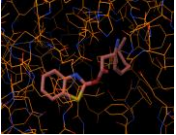
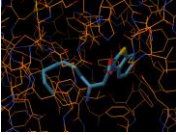
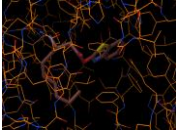
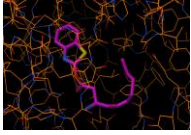
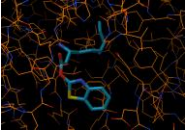
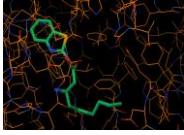
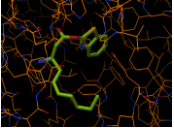
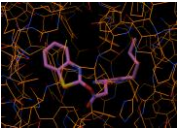
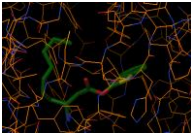
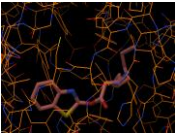
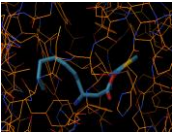
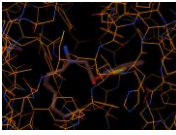
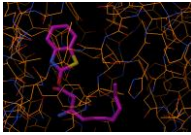
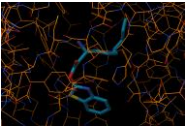
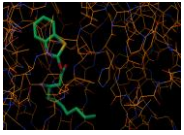
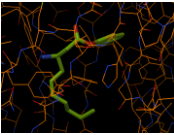
6OH10YLA	-7.3	-7.0	-7.0	-6.9	-6.7	-6.4	-6.3	-6.3	-6.3
									
6CO10YLA	-7.2	-6.6	-6.5	-6.5	-6.5	-6.4	-6.3	-6.2	-6.0
									
6NH10YLA	-7.4	-7.3	-7.2	-7.1	-6.8	-6.5	-6.5	-6.3	-6.3
									
6NOH10YLA	-7.0	-6.8	-6.8	-6.8	-6.5	-6.2	-6.0	-5.9	-5.9
									

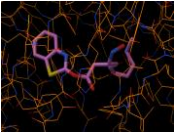
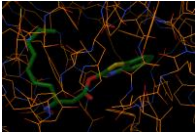
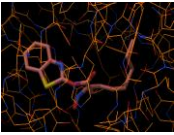
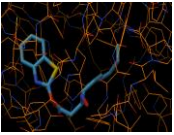
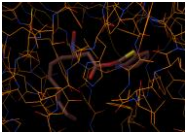
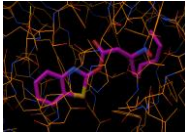
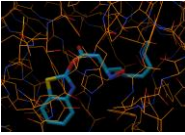
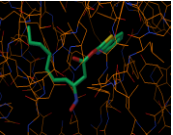
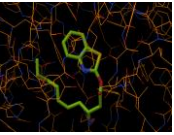
6NO10YLA	-7.6	-7.2	-7.0	-7.0	-6.9	-6.9	-6.7	-6.6	-6.4
									
7F10YLA	-7.7	-7.6	-7.4	-7.2	-6.9	-6.8	-6.8	-6.8	-6.8
									
7CL10YLA	-7.6	-7.4	-7.1	-6.9	-6.9	-6.7	-6.7	-6.7	-6.6
									
7OH10YLA	-7.3	-7.2	-6.9	-6.8	-6.7	-6.6	-6.5	-6.5	-6.5
									

7CO10YLA	-7.2	-7.1	-6.8	-6.6	-6.6	-6.4	-6.3	-6.2	-6.2
									
7NH10YLA	-7.6	-7.6	-7.3	-7.2	-6.8	-6.8	-6.4	-6.4	-6.4
									
7NOH10YLA	-7.4	-7.2	-6.9	-6.7	-6.6	-6.6	-6.5	-6.4	-6.4
									
7NO10YLA	-7.6	-7.2	-6.9	-6.8	-6.7	-6.6	-6.5	-6.1	-6.1
									
(5C)10YLA	-7.9	-7.3	-7.3	-7.1	-6.9	-6.7	-6.6	-6.6	-6.5
									

4CL(5C)	-7.7	-7.7	-7.3	-7.3	-7.0	-7.0	-6.8	-6.7	-6.6
10YLA									
7F(5C)	-7.8	-7.7	-7.4	-7.2	-7.1	-7.0	-6.8	-6.8	-6.6
10YLA									
4CL7F(5C)	-7.9	-7.6	-7.4	-7.4	-7.3	-7.2	-7.2	-7.0	-7.0
10YLA									
R2OH(5C)	-7.9	-7.6	-7.5	-7.5	-7.4	-7.4	-7.1	-6.9	-6.5
10YLA									

S2OH(5C)	-8.0	-7.5	-7.5	-7.4	-7.3	-7.2	-7.0	-6.9	-6.9
10YLA									
R2NH(5C)	-7.7	-7.6	-7.6	-7.2	-7.1	-7.1	-7.0	-6.9	-6.9
10YLA									
S2NH(5C)	-7.9	-7.8	-7.5	-7.4	-7.3	-7.2	-6.6	-6.6	-6.6
10YLA									
R2NOH(5C)	-8.1	-8.0	-8.0	-7.6	-7.5	-7.4	-7.1	-7.0	-6.7
10YLA									
S2NOH(5C)	-7.7	-7.6	-7.6	-7.3	-6.9	-6.9	-6.9	-6.8	-6.8
10YLA									

R3OH(5C)	-7.9	-7.5	-7.4	-6.9	-6.8	-6.7	-6.6	-6.6	-6.4
10YLA									
S3OH(5C)	-7.8	-7.7	-7.6	-7.3	-7.0	-6.8	-6.8	-6.8	-6.7
10YLA									
R3NH(5C)	-7.9	-7.7	-7.7	-7.2	-7.1	-7.0	-6.9	-6.8	-6.8
10YLA									
S3NH(5C)	-7.9	-7.8	-7.5	-7.2	-7.2	-7.1	-7.1	-7.0	-6.7
10YLA									

R3NOH(5C)	-8.3	-7.9	-7.9	-7.6	-7.5	-7.5	-7.3	-7.1	-7.1
10YLA									
S3NOH(5C)	-8.0	-7.4	-7.4	-7.2	-6.8	-6.5	-6.5	-6.5	-6.3
10YLA	