



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Posgrado en Ciencias Químicas
(Área de Fisicoquímica)

**“Estudio de la interacción molecular de
derivados de casiarinas con actividad
anti-malaria”**

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Químicas (Fisicoquímica)

Presenta: Quím. Estefanía del Alba Lizama
García

Directores de tesis:
Dra. María Eugenia Castro Sánchez

Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante

Febrero 2026

**BUAP****A QUIEN CORRESPONDA:**

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el D.C. Thomas Scior, D.C. Norma Angélica Caballero Concha, D.C. Julián Alejandro Yunes Rojas y la D.C. Andrea Moreno Ceballos, informan haber leído y aprobado, la tesis denominada “Estudio de la interacción molecular de derivados de casiarinas con actividad anti-malaria”, que presenta la alumna Estefanía del Alba Lizama García (224470029), para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintiséis días del mes de enero del año dos mil veintiséis.

ATENTAMENTE

D.C. Thomas Scior

D.C. Norma Angélica Caballero Concha

D.C. Julián Alejandro Yunes Rojas

D.C. Andrea Moreno Ceballos

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca de maestría (CVU:1340304).



A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP-BUAP).



Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP).



Al Cuerpo Académico BUAP-CA-263 (SEP, PRODEP).



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

prodep
TIPO SUPERIOR

Deseo expresar un especial agradecimiento a mis asesores de tesis, la Dra. María Eugenia Castro Sánchez y el Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante, por la orientación, apoyo académico y la disposición brindada a lo largo del desarrollo de este trabajo. Sus conocimientos, observaciones y sugerencias fueron fundamentales para la correcta realización de esta investigación, así como para mi formación académica y profesional. Agradezco de igual manera a los revisores, Dr. Thomas Scior, Dr. Julián Alejandro Yunes Rojas, Dra. Andrea Moreno Ceballos y Dra. Norma Angélica Cabellero Concha, a esta última un especial agradecimiento por el apoyo que me brindó durante mis estudios de maestría.

Asimismo, extendiendo mi agradecimiento a los profesores y personal académico que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a mi formación durante la maestría, brindándome las herramientas necesarias para el desarrollo de este proyecto.

A mi familia, especialmente a mis padres, Ma. Trinidad García Naranjo y José Gildardo Lizama Pérez, por su apoyo incondicional, comprensión y motivación constante a lo largo de esta etapa. Su confianza y aliento fueron un pilar fundamental para culminar este trabajo. A mis hermanos, Gildardo y Carlos, por siempre estar para mí y apoyarme en todo momento. A mi abuelita Esperanza que siempre ha creído en mí y he recibido su incondicional apoyo.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que, de alguna manera, contribuyeron a la realización de esta tesis y me acompañaron durante este proceso académico.

Lista de trabajos que resultaron del proyecto:

Estefanía del Alba Lizama García, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Francisco J. Melendez. **LatinXChem 2024** con el trabajo titulado: Estudio de la reactividad química de la Casiarina A y sus derivados para el tratamiento de la malaria, celebrado mediante la plataforma X, del 14 y 15 de octubre de 2024, modalidad virtual.

Estefanía del Alba Lizama García, María Eugenia Castro Sánchez, Francisco Javier Meléndez Bustamante. **XXIX Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con el trabajo titulado: Estudio de la interacción molecular de fitoquímicos con actividad anti-malaria, celebrado en Puebla, Puebla, del 11 al 14 de noviembre de 2024, participación en póster.

Estefanía del Alba Lizama García, María Eugenia Castro Sánchez, Francisco Javier Meléndez Bustamante. **XXX Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con el trabajo titulado: Estudio de la interacción molecular de fitoquímicos con actividad anti-malaria, celebrado en Puebla, Puebla, del 4 al 7 de noviembre de 2025, participación en póster.

Estefanía del Alba Lizama García, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Francisco J. Melendez. **XXIII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica (RMFQT 2025)** con el trabajo titulado: Casiarinas como inhibidores de Dihidroorotato Deshidrogenasa Plasmodium falciparum, celebrado en Guanajuato, Guanajuato, del 13 al 15 de noviembre de 2025, participación en póster.

Estefanía del Alba Lizama García, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Thomas Scior, Francisco J. Melendez. Las plantas: Una oportunidad de tratamiento para la malaria. **RD-ICUAP** (Enviado noviembre 2025).

Contenido

Índice de figuras..... VIII

Índice de tablasXII

Introducción..... 1

CAPITULO 1. ANTECEDENTES..... 3

1.1 Malaria 3

1.2 Historia 4

1.3 La malaria en México..... 7

1.4 Plantas medicinales de México para el tratamiento de la Malaria..... 8

1.5 Síntomas 10

1.6 Tratamiento 11

1.7 Ciclo vital del parásito..... 12

1.8 Compuestos naturales con actividad antimálarica. Casiarinas 13

1.9 Diana farmacológica. Plasmepsina V 15

1.10 Estudios teóricos..... 18

CAPITULO II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 20

2.2 Justificación..... 20

2.3 Hipótesis..... 20

2.4 Objetivos 20

2.4.1 Objetivo general 20

2.4.2 Objetivos particulares..... 21

CAPITULO III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS 22

3.1 Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) 22

3.2 Conjunto de funciones de base 23

3.3 Potencial electrostático molecular (MEP) 25

3.4 Orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO y reactividad química global 26

3.5. Solvatación implícita. Modelo SMD 29

3.6 Acoplamiento molecular..... 30

3.7 Propiedades fisicoquímicas *in silico*..... 32

CAPITULO IV. METODOLOGÍA 34

4.1 Optimización de estructuras 34

4.2 Análisis MEP..... 35

4.3 Orbitales moleculares frontera y parámetros de reactividad química global 35

4.4 Acoplamiento molecular 35

4.5	Propiedades fisicoquímicas <i>in silico</i>	37
CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		38
5.1	Estructuras optimizadas.....	38
5.2	Mapas de los potenciales electrostáticos moleculares (MEP)	40
5.3	Orbitales moleculares frontera y parámetros de reactividad química global	42
5.4	Acoplamiento molecular	49
5.4.1	Acoplamiento molecular ciego con las casiarinas optimizadas en disolvente implícito en agua	49
5.4.2	Acoplamiento molecular dirigido con las casiarinas optimizadas en disolvente implícito en agua..	58
5.5	Propiedades fisicoquímicas <i>in silico</i>	67
CAPITULO VII. REFERENCIAS.....		72
ANEXO A.....		79
ANEXO B.		97

Índice de figuras

Figura 1. Mosquito hembra del género <i>Anopheles</i> [2]	3
Figura 2. Mapa de especies de <i>Plasmodium</i> que predominan en los países con de casos autóctonos A del año 2023 [3].	4
Figura 3. (A) Planta <i>Artemisia annua</i> y estructura química de la artemisinina. (B) Corteza de quina y estructura química de la quinina [4]	5
Figura 4. Estructuras químicas de fármacos antimaláricos más utilizados: (A) mepacrina, (B) cloroquina, (C) mefloquina, (D) halofantrina y (E) primaquina.....	6
Figura 5. Entidades de México con el número casos autóctonos por <i>P. vivax</i> registrados en México en 2024 [10].....	7
Figura 6. Entidades de México con el número casos importados registrados en México en 2024 [10].....	8
Figura 7. (A) Hierba arrocillo y la estructura de Parthenin [12]. (B) Verbena con la estructura de verbenalina, fotografía de Pedro Tenorio Lezama [14]. (C) Planta de guayacán y estructura de la quinolizidina [15]. (D) Planta damiana y la estructura de luteolina [16]. (E) Planta bayetilla, fotografía por Pedro Tenorio Lezama [17] y estructura química pteropodina [18].....	10
Figura 8. Ciclo de vida <i>Plasmodium vivax</i>	13
Figura 9. Planta <i>Cassia siamea</i> y la estructura química de la casiarina A [33].....	14
Figura 10. Estructura tridimensional del sitio activo de la proteína PvPMV (PDB ID: 4ZL4); de color violeta se representa al subcavidad S1, de color verde el subcavidad S2, de naranja se muestra el subcavidad S3. Los ácidos aspárticos (Asp80 y Asp313) están de color rosa. Figura realizada en UCSF Chimera.....	16
Figura 11. (A) Composición del merozoíto [25]. (B) Eritrocito infectado por el parásito <i>Plasmodium</i>	17
Figura 12. Estructura química de las casiarinas en estudio.....	34
Figura 13. Estructuras de las casiarinas optimizadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío.....	38
Figura 14. Estructuras de las casiarinas optimizadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en disolvente implícito en agua.....	39
Figura 15. Mapas del potencial electrostático molecular de las casiarinas obtenidas usando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío.....	41
Figura 16. Mapas del potencial electrostático molecular de las casiarinas obtenidas usando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en disolvente implícito en agua.....	42
Figura 17. Orbitales moleculares HOMO y LUMO de las casiarinas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío.....	43
Figura 18. Orbitales moleculares HOMO y LUMO de las casiarinas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en disolvente implícito en agua.....	44
Figura 19. Gráfico de los valores de los parámetros de la reactividad química global de las casiarinas en vacío.....	46
Figura 20. Gráfico de los valores de los parámetros de la reactividad química global de las casiarinas en disolvente implícito en agua.....	47
Figura 21. Gráfico de comparaciones de los parámetros de reactividad química global de la casiarina B en vacío y en disolvente implícito en agua.....	48

Figura 22. Gráfico de comparaciones de los parámetros de reactividad química global de la casiarina G en vacío y en disolvente implícito en agua	48
Figura 23. Gráfico de comparaciones de los parámetros de reactividad química global de la casiarina H en vacío y en disolvente implícito en agua.	49
Figura 24. Representación tridimensional del acoplamiento molecular ciego de las casiarinas B, D, G y H con PvPMV (PDB: 4ZL4). Se muestran las conformaciones representativas obtenidas mediante ArgusLab, con visualización en UCSF Chimera.....	50
Figura 25. Interacciones de la casiarina B (A), casiarina D (B), casiarina G (C) y casiarina H (D) con los aminoácidos de la proteína PvPMV (ID PDB: 4ZL4) obtenidas del acoplamiento molecular ciego en ArgusLab, representados en 2D en Discovery Studio.....	53
Figura 26. Representación tridimensional del acoplamiento molecular ciego de las casiarinas B, D, G y H con PvPMV (PDB: 4ZL4). Se muestran las conformaciones representativas obtenidas mediante AutoDock4, con visualización en UCSF Chimera.	54
Figura 27. Interacciones de la casiarina B (A), casiarina D (B), casiarina G (C) y casiarina H (D) con los aminoácidos de la proteína PvPMV (ID PDB: 4ZL4) obtenidas del acoplamiento molecular ciego en AutoDock4, representados en 2D en Discovery Studio.....	56
Figura 28. Representación tridimensional de la casiarina B, visualizado en UCSF Chimera. (A) Primera conformación, (B) segunda conformación.....	58
Figura 29. Interacciones de la casiarina B con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 2D en Discovery Studio.....	59
Figura 30. Interacciones de las conformaciones de la casiarina B con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 3D en Discovery Studio.....	60
Figura 31. Estructura tridimensional del acoplamiento molecular dirigido de la casiarina D, realizado en AutoDock Vina y visualizado en UCSF Chimera. (A) Primera conformación y (B) segunda conformación	60
Figura 32. Interacciones de la casiarina D con los residuos de la enzima PvPMV (ID PDB: 4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en 2D en Discovery Studio.....	61
Figura 33. Interacciones de las conformaciones de la casiarina D con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en 3D en Discovery Studio.....	62
Figura 34. Estructura tridimensional del acoplamiento molecular dirigido de la casiarina G, realizado en AutoDock Vina y (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en Discovery Studio.	62
Figura 35. Interacciones de la casiarina G con los residuos de la enzima PvPMV (ID PDB: 4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 2D en Discovery Studio.....	63
Figura 36. Interacciones de las conformaciones de la casiarina G con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación.	

Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 3D en Discovery Studio.....	64
Figura 37. Representación tridimensional del acoplamiento molecular de la casiarina H (A) Primera conformación y (B) segunda conformación (ID PDB: 4ZL4). Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 2D en Discovery Studio.....	64
Figura 38. Interacciones de la casiarina H con los residuos de la enzima PvPMV (ID PDB: 4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido. Representados en 2D en Discovery Studio.....	65
Figura 39. Interacciones en 3D de las conformaciones de la casiarina H con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en Discovery Studio.....	65
Figura A1. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina A en $CDCl_3/CD_3OD$ (1:1) [31].....	79
Figura A2. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina A en $CDCl_3/CD_3OD$ (1:1) [31].....	79
Figura A3. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina B en $CDCl_3/CD_3OD$ (1:1) [31].....	81
Figura A4. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina B en $CDCl_3/CD_3OD$ (1:1) [31].....	81
Figura A5. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina C en CD_3OD [78].....	83
Figura A6. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina C en CD_3OD [78].....	83
Figura A7. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina D en piridina- d_5 [78]...84	
Figura A8. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina D en piridina- d_5 [78]...84	
Figura A9. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina E en piridina- d_5 [78]...86	
Figura A10. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina E en piridina- d_5 [78]...86	
Figura A11. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina F en piridina- d_5 [79]...88	
Figura A12. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina F en piridina- d_5 [79]...88	
Figura B1. Representación tridimensional del acoplamiento molecular ciego de la casiarina B (A), la casiarina G (B) y la casiarina H (C) con la proteína cristalizada de PvPMV (ID PDB:4ZL4). Visualizada en UCSF Chimera	97
Figura B2. Interacciones de la casiarina B (A), casiarina G (B) y casiarina H (C) con los aminoácidos de la proteína PvPMV (ID PDB: 4ZL4). Representados en 2D en Discovery Studio.	99
Figura B3. Representación tridimensional del acoplamiento molecular de la casiarina B (A), la casiarina G (B) y la casiarina H (C). Proteína cristalizada de PvPMV (ID PDB:4ZL4). Visualizado en UCSF Chimera.....	100
Figura B4. Interacciones de la casiarina b (A), casiarina G (B) y casiarina H (C) con los aminoácidos de la proteína PvPMV (ID PDB: 4ZL4). Representados en 2D en Discovery Studio.....	101
Figura B5. Representación tridimensional del acoplamiento molecular dirigido de la casiarina B con la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Figura visualizada en UCSF Chimera.....	103
Figura B6. Interacciones de la casiarina B con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Obtenidas del	

acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 2D en Discovery Studio.....105

Figura B7. Interacciones de las conformaciones de la casiarina B con los residuos aminoacídicos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en 3D en Discovery Studio.....105

Índice de tablas

Tabla 1. Plantas medicinales usadas en México para el tratamiento de la malaria.....	8
Tabla 2. Valores de las actividades antiplasmodiales y citotóxicas in vitro de los compuestos aislados de la planta <i>Cassia siamea</i>	15
Tabla 3. Energías electrónicas totales (en u.a.) y energías relativas (en kcal/mol) de las casiarinas calculadas en el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío y en disolvente implícito en agua	39
Tabla 4. Valores de HOMO, LUMO (en eV) para las casiarinas, usando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío y en disolvente implícito en agua	44
Tabla 5. Valores de los descriptores de reactividad global (en eV) para las casiarinas, usando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío y en disolvente implícito en agua	46
Tabla 6. Interacciones de las casiarinas con los aminoácidos de interés obtenidos en ArgusLab y AutoDock4.....	57
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas, accesibilidad sintética y violación de la regla de Lipinski de las casiarinas, usando el servidor SwissADME.....	68
Tabla A1. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina A en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	80
Tabla A2. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina A en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	80
Tabla A3. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina B en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	81
Tabla A4. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina B en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	82
Tabla A5. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina C en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	83
Tabla A6. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina B en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	83
Tabla A7. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina D en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	84
Tabla A8. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina D en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	85
Tabla A9. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina E en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	87
Tabla A10. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina E en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	87

Tabla A11. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina F en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	89
Tabla A12. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina F en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	89
Tabla A13. Valores de RMN de H^1 [δ_H (J, Hz)] y C^{13} [δ_C] de las casiarinas G, H, J y K (1-4) en metanol- d_5 a 300 K [80].....	90
Tabla A14. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina G en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	91
Tabla A15. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina G en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	91
Tabla A16. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina H en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	92
Tabla A17. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina H en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	93
Tabla A18. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina J en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	93
Tabla A19. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina J en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	94
Tabla A20. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina K en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	95
Tabla A21. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina K en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).....	95
Tabla B1. Interacciones de las casiarinas optimizadas en vacío con los aminoácidos de interés obtenidos en ArgusLab y AutoDock4.....	102

Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad mortal causada en la mayoría de los casos por la picadura del mosquito hembra del mosquito del género *Anopheles*. Esta enfermedad representa una importante amenaza para la salud pública, afectando principalmente a países del continente africano. Además de la transmisión vectorial, puede propagarse mediante transfusiones sanguíneas y agujas contaminadas. No obstante, la malaria es prevenible y curable. Cinco especies del parásito *Plasmodium* son los que han sido identificados que afectan a los humanos, las cuales son *P. falciparum*, que es el más mortífero. *P. vivax*, es el más dominante en la mayoría de los países fuera de África Subsahariana. Las otras especies son *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. Se estima que, en 2023 hubo 263 millones de casos y 597 000 muertes en 83 países. En México, aunque se encuentra en proceso de eliminación, desde el 2024 se dio un incremento de casos autóctonos y desde hace 3 años en casos importados.

La enfermedad se manifiesta inicialmente con fiebre, dolor de cabeza y escalofríos. En casos graves los síntomas son cansancio, fatiga extrema, deterioro del estado de conciencia, convulsiones, dificultad para respirar, orina de color oscuro o con sangre, coloración amarillenta en los ojos y piel, hemorragias anormales.

A lo largo de la historia, el tratamiento de la malaria ha evolucionado, desde el uso de los remedios caseros hasta la síntesis de fármacos. Uno de los primeros tratamientos efectivos fue la quinina, un alcaloide aislado de la corteza de quina (*Cinchona*) en 1860, no obstante, en 1980 se registró la resistencia a este medicamento y actualmente ya no se usa como tratamiento de primera línea. Se sintetizaron diferentes análogos de la quinina, sin embargo, se fue descubriendo resistencia a esos medicamentos o fueron presentando efectos secundarios para la salud. Hoy en día la Organización Mundial de la Salud menciona que el tratamiento más efectivo contra *P. falciparum* es la polifarmacoterapia combinada con artemisinina o terapia combinada basada en artemisinina (TCA). La artemisinina fue extraída de la planta *Artemisia annua* (Qinghao), que ha sido usada desde hace más de 2000 años en la medicina tradicional China. Otros fármacos recomendados por la OMS son la cloroquina

para la especie *P.vivax*, aunque solo para lugares donde el parásito es sensible. La primaquina, se recomienda para prevenir recaídas por los parásitos *P.vivax* y *P.ovale*.

Debido al aumento de cepas resistentes, ha surgido un renovado interés por compuestos de productos naturales que cuentan con actividad antimalárica, también referida como antiplasmodial, los cuales representan una alternativa prometedora para el tratamiento de la malaria. Entre éstos, destacan las casiarinas, que son alcaloides aislados de la planta *Cassia siamea*, que es usada en Indonesia para tratar a la malaria y la fiebre. Diversos estudios han demostrado que las casiarinas poseen una interesante actividad antiplasmodial, lo que ha motivado su estudio como posibles inhibidores de proteínas esenciales en el parásito.

En este contexto, la familia de las plasmepsinas (PM), un conjunto de proteasas aspárticas compuestas por diez isoformas, son esenciales en el ciclo de vida del parásito *Plasmodium*. Cumplen con diversas funciones que van desde la degradación de la hemoglobina hasta el procesamiento de proteínas secretoras de orgánulos implicadas en los procesos de salida, invasión y exportación de efectores. En particular, la plasmepsina V (PMV) desempeña un papel fundamental en la exportación de proteínas hacia el eritrocito, las cuales son responsables de la remodelación celular de la célula huésped durante la infección. Dado que PMV es esencial para la supervivencia del parásito, representa un blanco farmacológico atractivo para el diseño de nuevos compuestos antipalúdicos.

Debido a la creciente resistencia del parásito *Plasmodium* a los medicamentos, es urgente identificar nuevas alternativas terapéuticas. En este proyecto de tesis, se presenta un estudio computacional basado en cálculos de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT), acoplamiento molecular y propiedades fisicoquímicas, de la Casiarina A y sus derivados, en interacción con la plasmepsina V, que es primordial para la exportación de proteínas y la supervivencia del parásito, con el objetivo de comprobar que son posibles inhibidores de la PMV y terminar con el ciclo de vida del parásito.

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Malaria

La malaria o paludismo es una enfermedad mortal que es transmitida por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectadas por el parásito *Plasmodium* (Figura 1), no obstante, es prevenible y curable con los fármacos adecuados. Otras formas de contagio son las transfusiones sanguíneas y agujas contaminadas. Se han identificado cinco diferentes especies del parásito que infectan al ser humano, siendo los de mayor riesgo el *Plasmodium falciparum*, por ser el más mortífero y prevalente en el continente africano y el *Plasmodium vivax* por ser el más dominante en la mayoría de los países fuera del África Subsaharina. Las otras especies son *P. malariae*, *P. ovale*, y *P. knowlesi* [1].



Figura 1. Mosquito hembra del género *Anopheles* [2].

Esta enfermedad afecta principalmente a las regiones tropicales y se registró que en 2023 hubo 263 millones de casos y 597 000 muertes en 83 países. Actualmente, la malaria sigue siendo un problema de salud para la sociedad, en mayor medida en el continente africano en la cual registros de la OMS informaron que en 2023 esta región concentró un 94% de los casos y 95% de las defunciones, siendo el 76% correspondiente a niños menores de 5 años [1]. En la Figura 2 se muestra las especies que predominan en los países con casos endémicos.

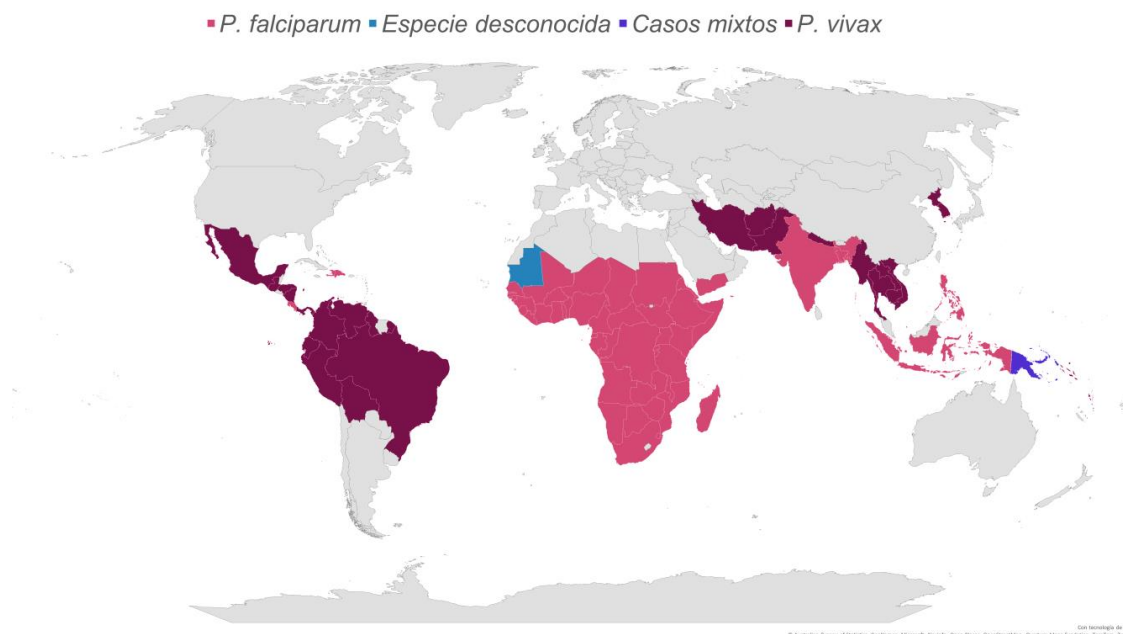


Figura 2. Mapa de especies de *Plasmodium* que predominan en los países con de casos autóctonos A del año 2023 [3].

1.2 Historia

La malaria ha sido conocida desde tiempos antiguos. Se han encontrado menciones en civilizaciones como la mesopotámica, en textos médicos antiguos chinos “Nei Ching” e incluso en obras clásicas como la *Ilíada* de Homero y otros escritos griegos. Se ha debatido que esta enfermedad fue una de las principales causas del declive de las ciudades-estado griegas. Fue documentada en el sur de Italia entre los siglos I y II d.C., por lo que pudo haber sido una causa de la caída del Imperio Romano. Los antiguos griegos y romanos asociaban la enfermedad con el “mal aire” (*mala aria* en italiano), creyendo que provenían de zonas pantanosas con aire fétido. Muchas de estas áreas estaban cerca del Vaticano, afectando al papado. La palabra “malaria” fue introducida en la literatura científica en inglés por John Macculloch, reemplazando términos como “fiebre de los pantanos” o “fiebre de los marjales”, que se usaban comúnmente [4].

La malaria siguió siendo un problema en gran parte de Europa y Estados Unidos hasta principios del siglo XX. Por otra parte, el descubrimiento del parásito de la malaria por

Alphonse Laveran en 1880 y del mosquito *Anopheles* como vector por Ronald Ross en 1897, contribuyeron para reducir la población del mosquito [5].

Desde que se conoce el paludismo, se ha tratado de combatir esta enfermedad con diferentes productos naturales, los cuales han contribuido al tratamiento farmacológico, empezando por el uso de la planta artemisa llamada “Qinghao” (*Artemisia annua*) en el siglo II a.C. en China (Figura 3A). La artemisinina fue redescubierta y aislada en 1971 por Tu Youyou de la planta *Artemisia annua*, ésta ha tenido un gran impacto con la lucha contra la malaria, dado que se ha demostrado que es eficaz contra la *P. falciparum* [6, 7]. Actualmente existen derivados de este fitofármaco, los más comunes son arteméter, artesunato y dihidroartemisinina.

Posteriormente, se descubrió la quinina en 1600 donde fue usada para el tratamiento de la malaria, este fitofármaco es el componente activo de la corteza de quina (*Cinchona*) y aislada en 1820 por los químicos franceses Pierre-Joseph Pelletier y Joseph Caventou, primer tratamiento eficaz contra la malaria (Figura 3B) [8]. La quinina ha sido utilizada como uno de los tratamientos más efectivos, a pesar de ello, en 1980 se presentó resistencia a este medicamento. En 2006, se dejó de usar como tratamiento de primera línea [6, 9].

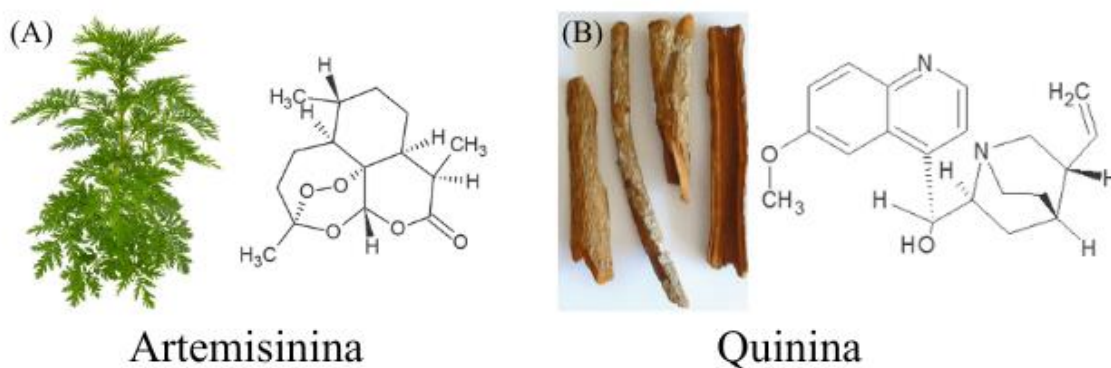


Figura 3. (A) Planta *Artemisia annua* y estructura química de la artemisinina. (B) Corteza de quina y estructura química de la quinina [4].

Debido a los efectos secundarios que fue presentando la quinina y su costo, fue necesario buscar fármacos alternativos, por lo que se sintetizaron análogos [6], entre ellos están la mepacrina (Figura 4A), usada durante la Segunda Guerra Mundial como profiláctico y que resultó ser eficaz contra la malaria. La cloroquina se sintetizó en 1934 y se empezó a usar en los años de 1940 para tratar a esta enfermedad, no obstante, en 1950 el parásito desarrolló

resistencia a este fármaco (Figura 4B). En los últimos años se dejó de usar en la mayoría de las zonas endémicas por problemas cardíacos [4, 6, 8]. La mefloquina fue sintetizada en los años de 1970, pero se en 1986 se presentó resistencia a este medicamento. Se sigue usando en la actualidad en combinación con un fármaco complementario, aunque ya no se usa ampliamente debido a los efectos secundarios que presenta (Figura 4C). La halofantrina fue desarrollada entre 1960 y 1970 y se utilizó inicialmente para el tratamiento contra todas las formas del parásito *Plasmodium*, sin embargo, se ha dejado de usar por sus efectos secundarios (Figura 4D) [6]. La primaquina es análoga de la pamequina y se sintetizó en 1946 en Estados Unidos debido a que es menos tóxico (Figura 4E) [4]. El desarrollo de los productos sintéticos también ha sido de suma importancia, sin embargo, con el paso del tiempo, el parásito comenzó a mostrar signos de resistencia a diversos medicamentos, por lo que su uso se ha cesado o está restringido [6].

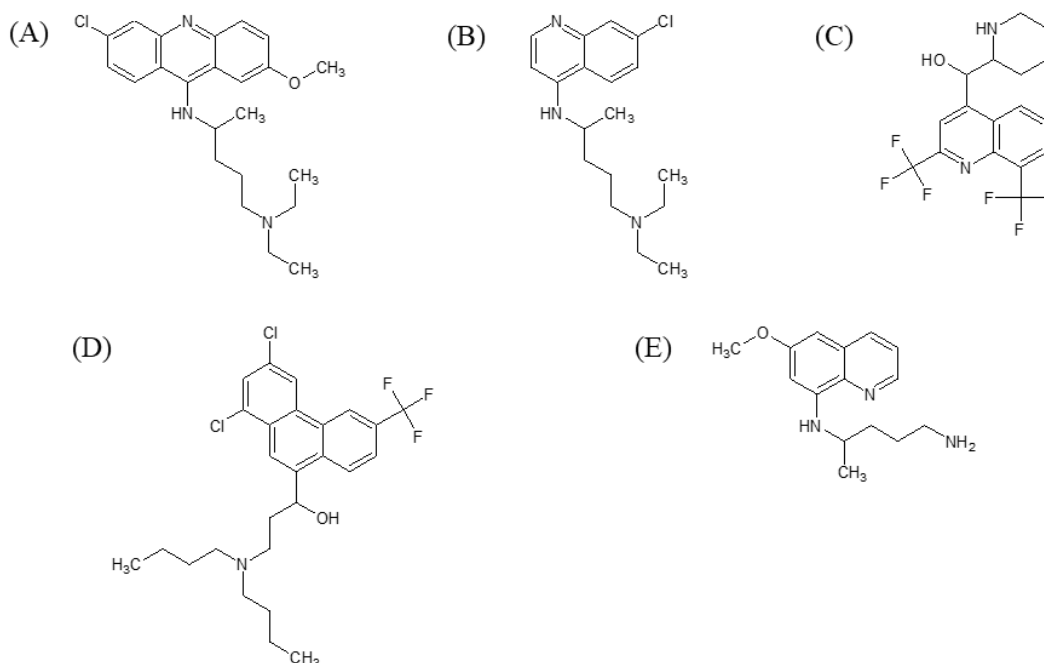


Figura 4. Estructuras químicas de fármacos antimaláricos más utilizados: (A) mepacrina, (B) cloroquina, (C) mefloquina, (D) halofantrina y (E) primaquina.

1.3 La malaria en México

En México, la especie que predomina es *Plasmodium vivax*. La malaria se encuentra en proceso de eliminación, por lo que se ha colocado al país en fase de pre-eliminación, a pesar de ello, en ambos casos, endémicos e importados, se ha observado un incremento en los últimos años.

En 2024, se tuvo un incremento de 266 casos autóctonos por *P. vivax* en 4 entidades, Chiapas, Oaxaca, Campeche y Chihuahua (Figura 5), respecto a 44 casos del 2023 [10].



Figura 5. Entidades de México con el número casos autóctonos por *P. vivax* registrados en México en 2024 [10].

Respecto a casos importados se ha observado un incremento desde hace 3 años, en 2024 se registró 614 casos en 22 entidades (Figura 6), lo cual representó un aumento de 105.35% en comparación del 2023. Del total de casos, 593 son de *P. vivax*, 19 de *P. falciparum* y 2 de *P. ovale* [10].

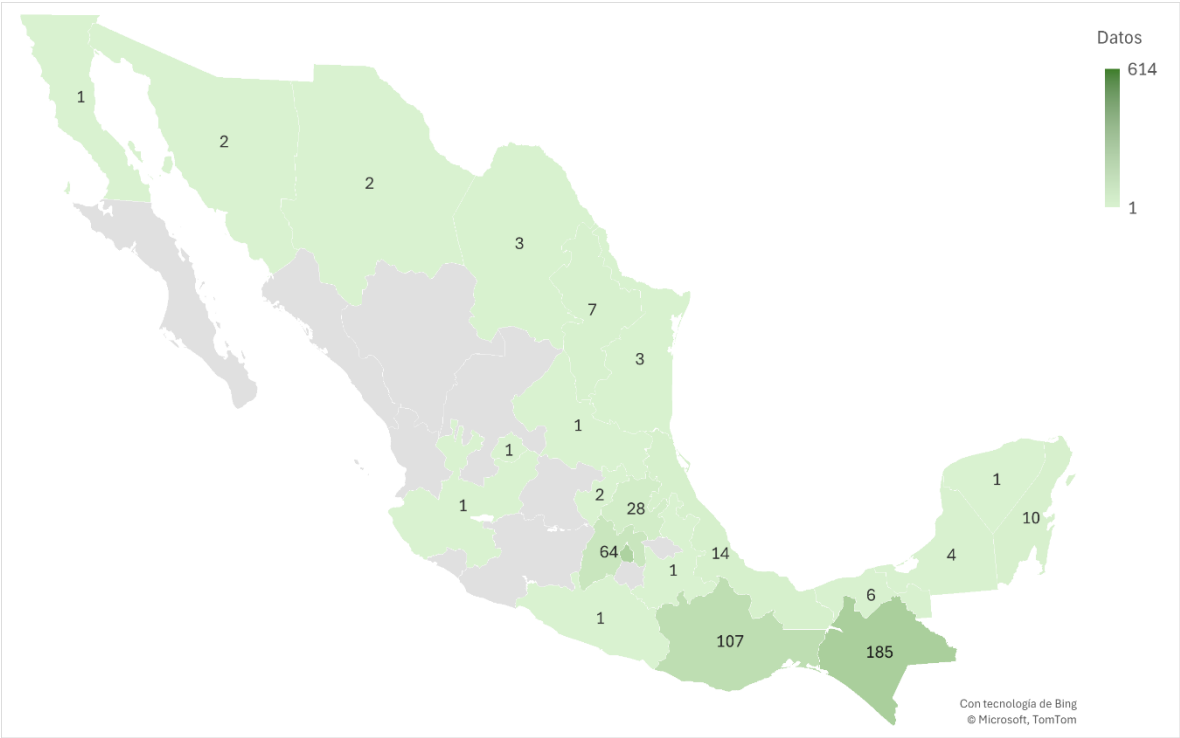


Figura 6. Entidades de México con el número casos importados registrados en México en 2024 [10].

1.4 Plantas medicinales de México para el tratamiento de la Malaria

En México, la medicina tradicional ha sido de gran utilidad para el tratamiento de diversas enfermedades, incluida la malaria, por lo que se tiene un registro de diversas plantas que ayudan en el tratamiento de esta enfermedad (Tabla 1) [11].

Tabla 1. Plantas medicinales usadas en México para el tratamiento de la malaria.

Nombre popular	Nombre científico	Familia botánica
Ajo	<i>Allium sativum</i> L.	LILIACEAE
Altamisa	<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	COMPOSITAE
Amapola	<i>Papaver somniferum</i> L.	PAPAVERACEAE
Anemats (L. Mixe)	<i>Russelia sarmentosa</i> Jacq.	SCROPHULARIACEAE
Campana bomol	<i>Brugmansia arborea</i> (L.) Lagerh	SOLANACEAE
Cempazuchil	<i>Tagetes erecta</i> L.	COMPOSITAE
Copalchi	<i>Coutarea latiflora</i> Moc. & Sessé	RUBIACEAE
Copalchi	<i>Hintonia latiflora</i> var. <i>leiantha</i> (DC.) Bullock	RUBIACEAE
Fresno	<i>Fraxinus uhdei</i> (Wenz.) Lingelsh.	OLEACEAE

Guayacán	<i>Acosmium panamense</i> (Benth.) Yakovzelev	LEGUMINOSAE
Sikaxinga (L. Mixe)	<i>Polymnia maculata</i> Cav.	COMPOSITAE
Tres hojitas	<i>Hamelia patens</i> Jacq.	RUBIACEAE
Xjo'oyok (L. Maya)	<i>Morinda yucatanensis</i> Greenm.	RUBIACEAE
Verbena	<i>Verbena litoralis</i> H.B.K.	VERBENACEAE

El arrocillo (*Parthenium hysterophorus* L.) (Figura 7A) también conocida como altamisa, es una hierba que puede ser localizada desde la zona norte del país (Chihuahua y Nuevo León) hasta la región centro-este (Veracruz y Puebla) y suroeste (Guerrero) [12]. En la medicina tradicional, sus hojas son usadas en la cual se hierven para preparar infusión para ser tomada antes de cada comida. Asimismo, se recomienda que el enfermo se bañe cada tercer día con el cocimiento de la verbena (Figura 7B) (*Verbena litoralis* H.B.K.) evitando exponerse al aire después del baño [11]. El guayacán (Figura 7C) (*Acosmium panamense*) y la damiana (Figura 7D) o hoja de fibre (*Turnera diffusa*) también han sido utilizadas antiguamente en baños e infusiones para el tratamiento de la malaria. En el caso del guayacán se emplea la corteza, mientras que en la hoja de fiebre se utiliza la parte aérea —tallos, hojas, flores y frutos [13]. Por otra parte, la bayetilla, conocida como coralillo o tres hojitas (*Hamelia patens* Jacq.) (Figura 7E), es un arbusto que crece en zonas de clima cálido y semicálido. Para su uso tradicional contra la malaria, se preparan infusiones con 3 hojas para posteriormente ser tomada [11].

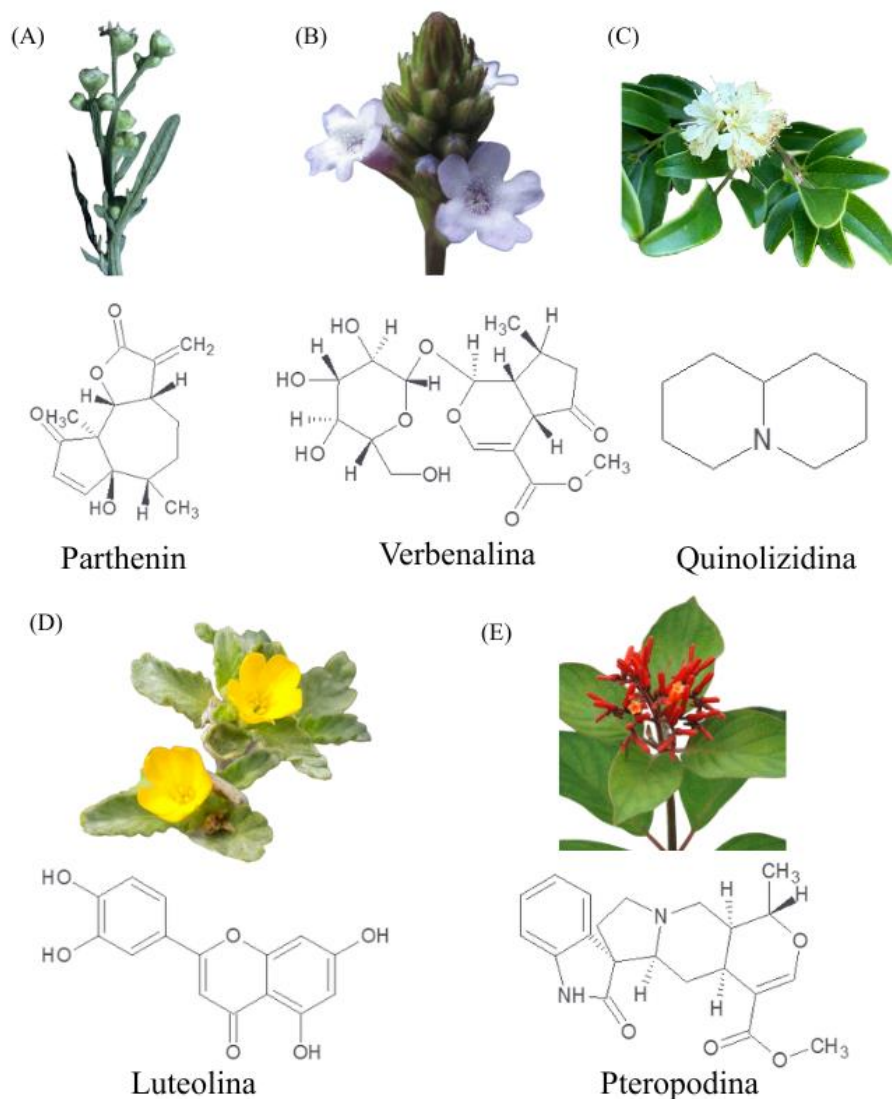


Figura 7. (A) Hierba arrocillo y la estructura de parthenin [12]. (B) Verbena con la estructura de verbenalina, fotografía de Pedro Tenorio Lezama [14]. (C) Planta de guayacán y estructura de la quinolizidina[15]. (D) Planta damiana y la estructura de luteolina [16]. (E) Planta bayetilla, fotografía por Pedro Tenorio Lezama [17] y estructura química pteropodina [18].

1.5 Síntomas

Los síntomas más frecuentes del paludismo son fiebre, dolor de cabeza y escalofríos, generalmente suelen manifestarse entre los 10 y 15 días posteriores a la transmisión. En etapas iniciales, estas manifestaciones pueden ser leves y difíciles de identificar como malaria, por lo que es recomendable hacerse una prueba parasitológica [1].

La malaria grave se define por la presencia de uno o varios síntomas que son: pérdida de conocimiento, postración, convulsiones múltiples, acidosis, hipoglucemia, anemia malárica grave, insuficiencia renal, ictericia (coloración amarillenta en ojos y piel), edema pulmonar, shock, hemorragia significativa, entre otros [19].

Los lactantes, niños menores de 5 años, mujeres embarazadas, viajeros y personas con VIH o sida presentan un mayor riesgo de complicaciones, debido a la debilidad de su sistema inmunológico [1].

1.6 Tratamiento

El manejo de los casos de malaria se basa en un diagnóstico temprano y en la administración inmediata de un tratamiento eficaz. En los países donde la infección por *P. falciparum* es endémica, se emplean principalmente los tratamientos combinados basados en artemisinina (ver Figura 3A) (TCA), los cuales han demostrado ser eficaces y bien tolerados por el organismo [19].

La cloroquina (ver Figura 4B) se recomienda para el tratamiento de infecciones por el parásito *P. vivax*, únicamente en regiones donde el parásito aún es sensible a este medicamento. Por su parte, la primaquina debe añadirse al tratamiento principal con el fin de prevenir recaídas por *P. vivax* y *P. ovale*, debido a que ambas especies forman hipnozoítos, etapas latentes del parásito en el hígado responsables de las recaídas [1, 19].

El TCA no solo es eficaz contra *P. falciparum*, sino también frente a las demás especies que infectan al ser humano, así como en los casos de infecciones mixtas [19].

En los casos de malaria grave, el tratamiento consiste en administrar de forma inmediata una dosis completa de un fármaco antimalárico eficaz por vía parenteral o rectal, de los derivados de artemisinina (artesanato o arteméter) o alcaloides de la quina (quinina y quinidina). Posteriormente, se debe continuar con una dosis plena de un TCA eficaz por vía oral [19].

En los últimos años, se ha observado que el parásito ha desarrollado resistencia a múltiples fármacos, lo que se ha convertido en un problema de salud pública para eliminar y reducir la carga de malaria. Hasta el momento, se ha documentado resistencia de los parásitos a los medicamentos antimaláricos en tres de las cinco especies que infectan al humano: *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae* [20].

1.7 Ciclo vital del parásito

El ciclo de vida del parásito *Plasmodium* involucra dos etapas de vida asexual dentro de un huésped humano y una etapa sexual dentro del mosquito vector (Figura 8) [21].

La infección por *P. vivax* se inicia cuando el mosquito *Anopheles* pica al humano e inyecta los esporozoítos al huésped. Éstos se desplazan por el torrente sanguíneo hasta llegar al hígado en cuestión de minutos, donde infectan a los hepatocitos [22, 23], dando comienzo a el ciclo exoeritrocítico (replicación asexual o esquizogonia) [6]. En esta fase, el parásito pasa por varias etapas de desarrollo que concluyen en la formación de miles de merozoítos, los cuales posteriormente se liberan de los hepatocitos para infectar preferentemente a los reticulocitos nacientes, iniciando la etapa sanguínea [21, 24].

Una característica distintiva del *P. vivax* es la presencia de hipnozoítos latentes, una forma del parásito que permanece en el hígado durante semanas, meses o incluso años. Dichos hipnozoítos pueden reactivarse y originar infecciones en la sangre, fenómeno conocido como recaída [23-25].

Los merozoítos son la forma extracelular más pequeña del parásito, los cuales invaden a los eritrocitos durante la etapa sanguínea [21, 26]. Weiss y col. en 2015 clasificaron la invasión de los merozoítos en tres fases: pre-invasión, internalización o invasión activa y equinocitosis, que termina con la formación de una vacuola parasitófora [27].

Después de la invasión, el parásito se replica asexualmente dentro de la vacuola parasitófora [4, 21]. Este proceso se repite aproximadamente cada 48 horas y se conoce como ciclo intraeritrocitario [25]. Durante este ciclo, el parásito avanza a través de cuatro etapas: anillo, trofozoíto, esquizonte y ruptura del eritrocito, momento en el que se liberan los merozoítos hijos. Éstos invaden a nuevos eritrocitos, prolongando la etapa sanguínea. Este ciclo de constante invasión es el responsable de los síntomas de la malaria, como son anemia, fatiga y fiebre.

Durante la etapa sanguínea, un pequeño porcentaje de parásitos se someten a gametocitogénesis, originando a los gametocitos, que son ingeridos por un mosquito *Anopheles* hembra durante una ingesta de sangre, iniciando la etapa sexual del ciclo dentro de éste [4, 21].

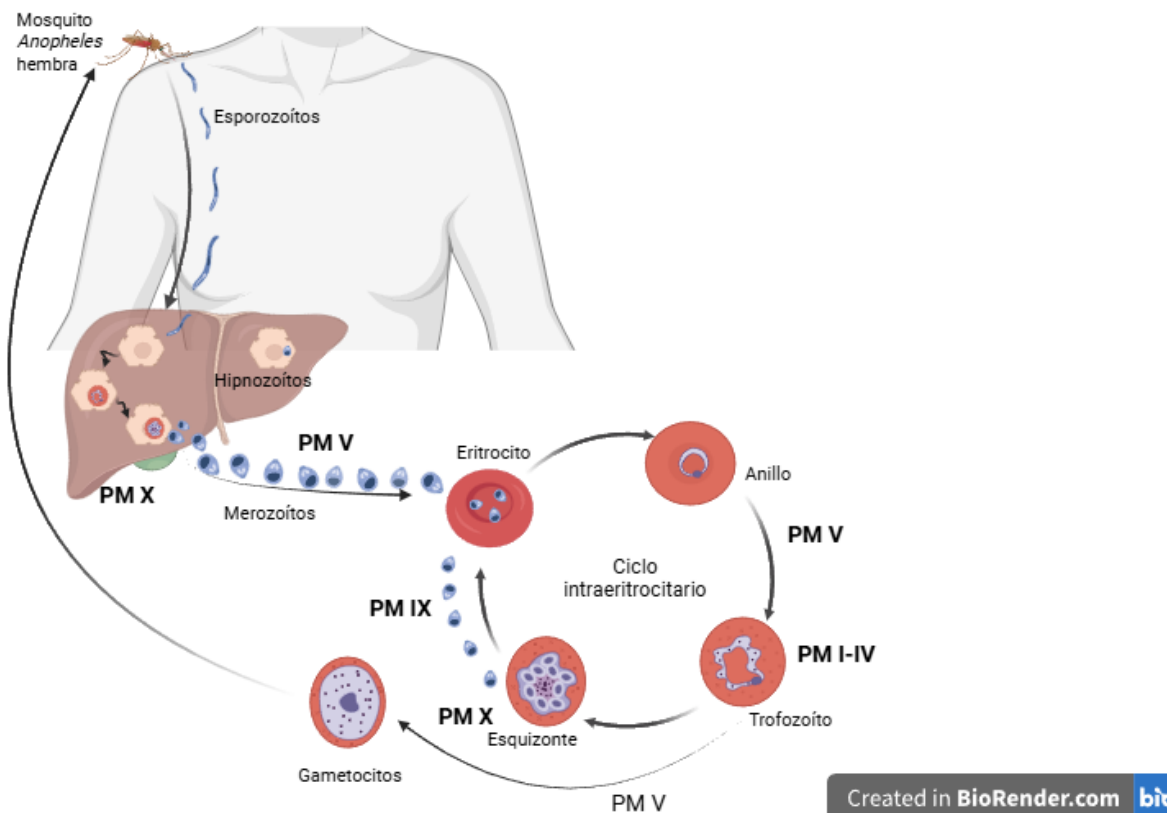


Figura 8. Ciclo de vida *Plasmodium vivax*.

1.8 Compuestos naturales con actividad antimalárica. Casiarinas

Los fitoquímicos son sustancias bioactivas presentes en plantas como frutas, verduras, semillas, frutos secos, cereales y plantas medicinales. Diversos estudios han demostrado que poseen diversos beneficios para la salud, entre los que destacan efectos antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios y anticancerígenos. Por ello numerosas investigaciones se han centrado en estas moléculas con el fin de desarrollar tratamientos para diversas enfermedades [28, 29].

En este contexto, los productos naturales han representado una fuente importante de compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de la malaria. En la actualidad, se han identificado una gran variedad de plantas medicinales con actividad antimalárica, que se clasifican en alcaloides, flavonoides, terpenoides, quinonas, cumarinas, fenólicos, poliacetilenos, xantonas, estereoides y lignanos [30].

Entre los alcaloides, las casiarinas tienen reportada una importante actividad antiplasmodial [8, 31]. La casiarina A es un fitofármaco aromático con un esqueleto tricíclico aislado de las hojas de *Cassia siamea* y es usada tradicionalmente en Indonesia para tratar la fiebre y la malaria (Figura 9). Morita y col. aislaron a la casiarina A, la cual mostró actividad antiplasmodial *in vitro* contra *P. falciparum* de de IC_{50} de 0.005 $\mu\text{g/mL}$ y de IC_{50} de 23 nM contra una cepa 3D7 de *P. falciparum* sensible a la cloroquina [31, 32].

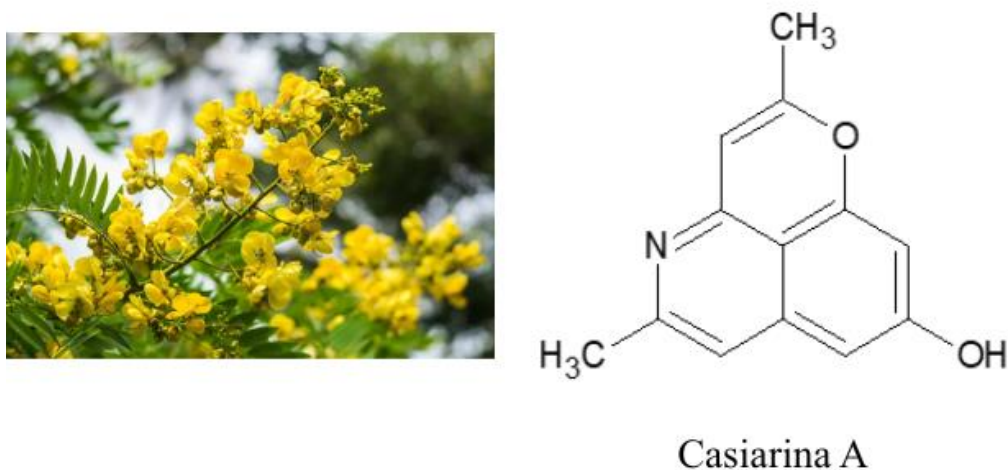


Figura 9. Planta *Cassia siamea* y la estructura química de la casiarina A [33].

Se ha reportado que este compuesto activo tiene diversos derivados con actividad antimalárica. Algunos derivados reportados en la literatura son las casiarinas B, G, H J, K, 5-acetonil-7-hidroximetilcromona, crobisiamona A, aislados de las hojas y las casiarina C, D, E, F; 10,11-dihidroanhidrobarakol, anhdrobarakol, aislados de la flor. Además, su papel antipalúdico se detalló a través de su actividad vasorrelajante, provocada por la producción de óxido nítrico del endotelio, que podría inhibir la adhesión del parásito a la superficie de la célula huésped. Negi y col. reportaron las actividades antiplasmodiales y citotóxicas *in vitro* (Tabla 2) de los compuestos aislados de la planta *Cassia siamea* [32].

Tabla 2. Valores de las actividades antiplasmodiales y citotóxicas in vitro de los compuestos aislados de la planta *Cassia siamea*.

Alcaloides	<i>Plasmodium falciparum</i> ($IC_{50}=\mu M$)	Citotóxicidad μM
Casiarina A	0.0023 ^a , 0.005 ^b	>100 ^c , 35 ^e
Casiarina B	22.0 ^a , 6.9 ^b	>100 ^c
Casiarina C	24.2 ^a	>100 ^c , >100 ^e
Casiarina D	3.6 ^a	>100 ^d
Casiarina E	7.3 ^a	>100 ^d
Casiarina F	3.3 ^b	>50 ^d
10, 11 -dihidroanhidrobarakol (DHB)	2.3 ^a	>100 ^d
Anhidrobarakol (ANH)	4.7 ^a , 7.8 ^b	>100 ^d
5-acetonil-7-hidroxi-2-metilcromona (AHMC)	8.6 ^a , 4.5 ^b	>100 ^d
Crobisiamona A	2.6 ^a	-

^a Sensible a la cloroquina *P. falciparum*.

^b *P. falciparum* 3D7.

^c MCF7 Línea celular (adenocarcinoma de mama humano).

^d HL-60 Leucemia promielocítica en sangre humana.

^e P388 Células de leucemia de ratón.

1.9 Diana farmacológica. Plasmepsina V

Las plasmepsinas constituyen una familia de proteasas aspárticas involucradas en diferentes etapas del ciclo del *Plasmodium* [25]. El sitio activo cuenta con dos residuos de ácido aspártico (Asp80 y Asp313) que sirven, respectivamente, como donadores y aceptores de protones, catalizando así la hidrólisis de la amida de los enlaces peptídicos en proteínas destinadas a ser exportadas hacia la membrana de la vacuola parasitófora que rodea al parásito. Este procesamiento es esencial para la posterior modificación de la célula huésped. El genoma de *Plasmodium* codifica 10 isoformas diferentes de estas proteínas (PMs I a X). Las plasmepsinas I-IV se encuentran en la vacuola digestiva del parásito y participan en la degradación de la hemoglobina [25, 34]. La plasmepsina V se encuentra en el retículo endoplasmático y escinde a cientos de proteínas que contienen el motivo PEXEL, las cuales son posteriormente exportadas por el complejo PTEX hacia el eritrocito huésped, donde

modifican la célula huésped para mantener el crecimiento y la supervivencia del parásito [25, 35]. Las plasmepsinas VI-VII se expresan en las etapas del mosquito y sus funciones permanecen indefinidas [36]. Las plasmepsinas IX y X son indispensables para el desarrollo de parásitos asexuales. La PM IX se localiza en *rhoptry* (en inglés) y es necesaria para la invasión, mientras que la PM X está involucrada tanto en la salida como en la invasión de merozoítos de los glóbulos rojos y se localiza en los exonemas [25, 35, 36].

De las 10 isoformas que codifica la familia de las plasmepsinas, la plasmepsina V (PM V) (Figura 10) desempeña un papel fundamental en la escisión de las proteínas, para su posterior exportación por el complejo PTEX, desde el parásito intraeritrocítico hacia al citosol de los glóbulos rojos. Por esta razón, se considera un importante blanco farmacológico para las especies *P. falciparum* y *P. vivax* [37, 38].

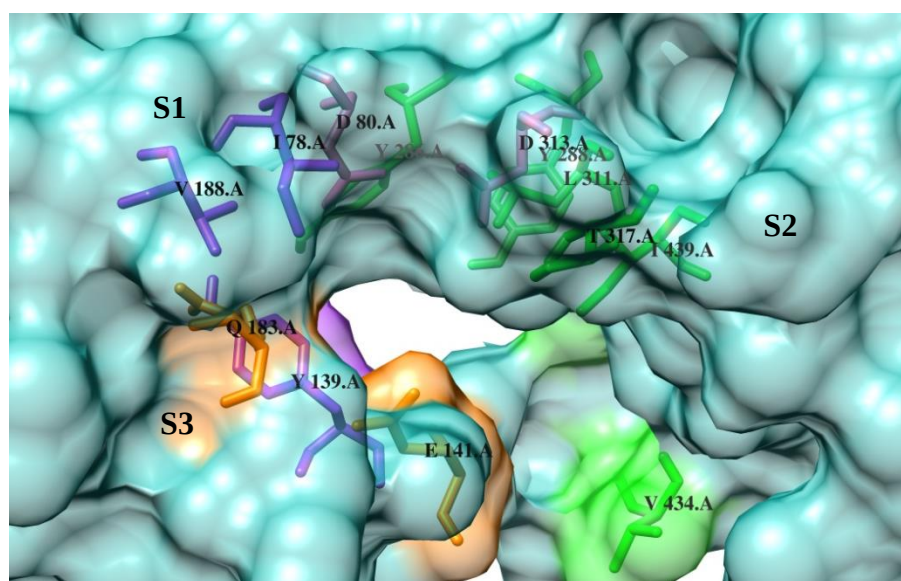


Figura 10. Estructura tridimensional del sitio activo de la proteína PvPMV (PDB ID: 4ZL4); de color violeta se representa al subcavidad S1, de color verde el subcavidad S2, de color naranja se muestra el subcavidad S3. Los ácidos aspárticos (Asp80 y Asp313) están de color rosa. Figura realizada en UCSF Chimera.

La plasmepsina V se localiza en el retículo endoplasmático (RE) del parásito (Figura 11) [39]. Esta enzima reconoce y escinde una secuencia pentamérica después de la leucina (R_xL_xE-Q-D), conocida como motivo PEXEL (*Plasmodium* Export Element) [38]. Las proteínas que contienen este motivo, una vez procesadas por la PM V se secretan en la

vacuola parasitófora, donde se exportan más de 450 proteínas hacia la membrana de la vacuola parasitófora que rodea al parásito. En esta región, dichas proteínas son reconocidas por PTEX (*Plasmodium* Translocon of Exported Proteins), un complejo proteico encargado de translocarlas al interior del eritrocito infectado [25, 38, 40].

Los efectores exportados desempeñan un papel esencial en la modificación de la célula huésped, reconstituyendo un complejo sistema de tráfico en el citosol de los glóbulos rojos y alterando la rigidez, la permeabilidad a los nutrientes y las propiedades de unión endotelial de la célula huésped [25].

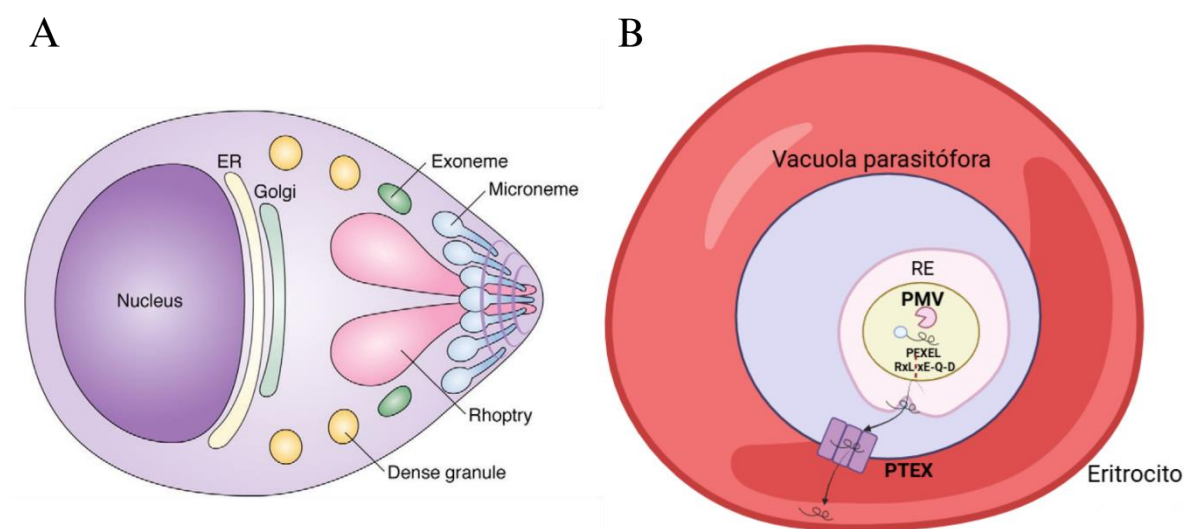


Figura 11. (A) Composición del merozoíto [25]. (B) Eritrocito infectado por el parásito *Plasmodium*.

La plasmepsina V está conformada por tres subcavidades, S1, S2 y S3, las cuales tienen diferentes funciones para el reconocimiento e incisión de la secuencia PEXEL. La subcavidad S1, constituida por los aminoácidos Ile78, Tyr139 y Val188, tiene la función de reconocimiento primario del sustrato, altamente conservada y responsable de la fuerte preferencia de la plasmepsina V por la leucina en la posición P1 de la secuencia PEXEL (RxLxE/Q/D). Esta subcavidad genera un entorno predominantemente apolar que favorece el reconocimiento y la estabilización de residuos hidrofóbicos voluminosos, en particular la leucina en P1 del motivo PEXEL. Dicho residuo se encuentra estrechamente encapsulado dentro de esta subcavidad, lo que explica la marcada preferencia de la enzima por el motivo

RxL y su baja tolerancia a sustituciones, incluso por isómeros estructurales como la isoleucina [38].

La subcavidad S2 integrada por los residuos Ile439, Val434, Tyr286, Tyr288, Leu311 y Thr317 generan un entorno favorable para el ordenamiento de sustituyentes voluminosos del ligando. Se ha sugerido que la ocupación completa de esta subcavidad puede incrementar significativamente la afinidad del inhibidor hacia la plasmepsina V, al mejorar la estabilidad del complejo dentro del sitio activo [41].

La subcavidad S3, formada por los siguientes aminoácidos: Glu141 y Gln183, desempeñan un papel fundamental en la especificidad del sustrato, dado que aloja al residuo arginina en la posición P3 del motivo PEXEL. Esta región, el residuo Glu141 forma interacciones electrostáticas tipo puente salino con el grupo guanidinio del ligando WEHI-842, mientras Gln183 participa mediante enlaces de hidrógeno adicionales, contribuyendo a la estabilización del complejo enzima-sustrato. Estas interacciones explican por qué la arginina es altamente preferida en la posición P3 y por qué aminoácidos como la lisina son pobremente tolerados [38].

1.10 Estudios teóricos

Negi y col. realizaron un estudio de cribado inverso basado en metodologías de acoplamiento molecular con el propósito de identificar posibles dianas proteicas en *P. falciparum*. Obtuvieron como resultado 16 dianas proteicas para las casiarinas y se reveló que las proteínas de triptofanil-ARNt sintetasa y 1-desoxi-D-xilosa-5-fosfato reductoisomerasa son los objetivos más comunes para las casiarinas [32]. Ogungbe y col. mostraron que las casiarinas D y E tienen altas energías de acoplamiento para la pteridina reductasa 1 y la *N*-miristoil transferasa [42].

Los estudios teóricos realizados sobre la enzima plasmepsina V (PMV) han permitido caracterizar con detalle su sitio activo y los tipos de interacciones moleculares que se establecen con diferentes inhibidores. Esta información resulta esencial para el diseño racional de fármacos, ya que permite identificar los residuos catalíticos clave y las subcavidades que contribuyen a la unión y estabilización del ligando dentro del sitio activo.

Diversos autores han reportado la formación de enlaces de puente de hidrógeno con los residuos Asp80 y Asp313, los cuales son relevantes para la actividad inhibitoria. El bolsillo S1 (ver Figura 10) está conformado principalmente por los aminoácidos hidrofóbicos Ile78, Tyr139 y Val188 [38]. Por su parte, la cavidad de unión S2 (ver Figura 10) está revestida por los residuos Ile439, Val434, Tyr286, Tyr288, Leu311 y Thr317. Estudios previos sugieren que la ocupación completa de la subcavidad S2 podría aumentar en gran medida la actividad contra PMV [37]. Finalmente, en la subcavidad S3 (ver Figura 10) se presentan interacciones de enlace de puente de H con los residuos de Glu141 y Gln183, que también podrían contribuir a la inhibición [37, 38].

Sleebs y col. reportaron la formación de enlaces de puente de hidrógeno con los dos residuos catalíticos conservados de Asp118 y Asp365 en *Pf*PMV [40]. Por su parte Hodder y col. describieron que el complejo *Pv*PMV-WM36 forma enlaces de puente de hidrógeno con Ser87, His173 y Glu176 en la parte superior de la cavidad S1 (ver Figura 10), así como con Tyr139 y Glu177 en la cavidad S2 (ver Figura 10). El compuesto WM36 consiste en una imino-pirimidinona fusionada a un anillo de pirrolidina con un sustituyente Cl en la posición 2 del benceno. Además, el átomo de flúor del inhibidor puede participar en enlaces de hidrógeno de Phe180 e Tyr61 y establecer un enlace de halógeno débil con Ser138. En el caso del compuesto con WM48, cuya estructura es una imino-pirimidinona fusionada a un anillo de pirrolidina con un sustituyente Cl en la posición 4 del benceno, se reportó un enlace de halógeno con His173 y un enlace de hidrógeno con Ser87, lo que favorece su anclaje al sitio activo [36].

Las interacciones del compuesto WM36 involucraron los residuos Tyr61, Ile78, Asp80, Gly82, Ser83, Ser87, Tyr135, Gln137, Ser138, Tyr139, Ile145, His173, Leu179, Phe180, Gln183, Val188, Asp313, Gly315, Ser316, mientras que WM48 comparte la mayoría de estas interacciones. En ambos casos, Asp80 y Asp313 participan mediante enlaces de puente de hidrógeno en el sitio catalítico [36]. Finalmente, el compuesto WEHI-842 (*N*-[(benciloxi)carbonil]-O-carbamidamido-L-homoseril-*N*-{(3*S*,4*S*)-3-hidroxi-6-metil-1-oxo-1-[(2-feniletil)amino]heptan-4-il}-L-valinamida) tiene interacciones con los residuos de Gly82, Ile78, Val188, Tyr139, Glu141, Gln183, Cys140, Asp80, Asp313, Gly315 y Thr317 [38].

CAPITULO II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Planteamiento del problema

En los últimos años se ha documentado un aumento en la resistencia del parásito *Plasmodium vivax* a los tratamientos antipalúdicos, lo que representa un desafío significativo para el control de la malaria. Esta situación resalta la necesidad urgente de identificar nuevas estrategias terapéuticas. En este sentido, los compuestos fitoquímicos con potencial actividad antimalárica representan una alternativa prometedora. Por ello, en el presente proyecto de tesis se realiza un estudio computacional de diversos fitoquímicos, derivados de la casiarina A que es aislada de la planta *Cassia siamea*, con el objetivo de evaluar su afinidad hacia blancos moleculares clave del parásito, en este caso la Plasmepsina V de *Plasmodium vivax* (PvPMV), como una posible estrategia para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la malaria.

2.2 Justificación

Es necesario buscar nuevas alternativas de medicamentos para el tratamiento de la malaria, debido a la creciente resistencia del parásito *P. vivax* a los fármacos actuales. Se han reportado fitoquímicos derivados de la casiarina A con actividad antiplasmodial, por lo que, con la ayuda de metodologías computacionales, basadas en la DFT y el acoplamiento molecular, se estudiará su capacidad antimalárica, validando la función que tienen en el crecimiento poblacional del parásito.

2.3 Hipótesis

La casiarina A y sus derivados poseen actividad antimalárica y mediante metodologías computacionales es posible determinar sus propiedades de reactividad química global y su interacción favorable con la proteína plasmepsina V, que es clave en el crecimiento poblacional y desarrollo del parásito *Plasmodium vivax*.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Investigar por métodos computacionales las propiedades de reactividad química global de la casiarina A y sus derivados, así como sus posibles interacciones favorables con la plasmepsina V, que es una enzima esencial para la supervivencia del parásito *Plasmodium vivax*.

2.4.2 Objetivos particulares

1. Estudiar la estructura molecular, propiedades electrónicas y los parámetros de reactividad química global de la casiarina A y sus derivados en vacío y en solvente implícito en agua, usando métodos basados en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).
2. Determinar la energía de afinidad e interacciones favorables con la plasmepsina V, usando acoplamiento molecular, para proponer cuál es el mejor complejo receptor-ligando para inhibir al parásito de la malaria.
3. Analizar las propiedades de Log P, Log S, peso molecular, aceptores de H (HBA), donadores de H (HBD), enlaces rotables, además de su accesibilidad sintética y la regla de Lipinski de las casiarinas para determinar si podrán ser posibles fármacos orales.

CAPITULO III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)

La Teoría del Funcional de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés *Density Functional Theory*) es un método poderoso para la predicción y análisis de estructuras moleculares orgánicas y sus propiedades electrónicas [43]. La DFT es un método de cálculo de la estructura electrónica que se basa en la densidad electrónica total del sistema. Las implementaciones modernas de esta teoría pueden ofrecer una precisión significativamente mayor que los métodos de Hartree Fock (HF), además de requerir un menor costo computacional. Estas ventajas han impulsado un incremento en el uso del DFT para el estudio de moléculas grandes.

La Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) se fundamenta en los teoremas propuestos por Pierre Hohenberg y Walter Kohn, junto con las ecuaciones de Kohn y Sham [44].

De acuerdo con los teoremas de Hohenberg-Kohn [45, 46], la energía del estado fundamental de un sistema (E_0) puede expresarse exclusivamente en función de su densidad electrónica en ese estado (ρ_0), como se indica en la ecuación (1):

$$E_0 = E_0[\rho_0] \quad (1)$$

El segundo teorema postula que la densidad electrónica real del estado fundamental (ρ_0) es la que conduce al valor mínimo de la energía, es decir, cualquier otra densidad electrónica (ρ') diferente de ρ_0 dará lugar a una energía mayor, como se representa en la ecuación (2):

$$E_0[\rho'] \geq E_0[\rho_0] \text{ si } \rho' \neq \rho_0 \quad (2)$$

Una de las ventajas clave de la DFT es que permite determinar la función de onda y las propiedades electrónicas del sistema a partir únicamente de la densidad electrónica en su estado base (ρ_0). Esta densidad es una función que solo depende de tres coordenadas espaciales, sin importar la cantidad de electrones presentes [47]. La energía total del sistema, en función de ρ_0 , se puede descomponer en varias contribuciones, como se muestra en la ecuación (3):

$$E_0[\rho_0] = E_{en}[\rho_0] + V_{nn} + J[\rho_0] + T[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0] \quad (3)$$

Dos de estos términos, la energía cinética de los electrones ($T[\rho_0]$) y la energía de intercambio y correlación ($E_{xc}[\rho_0]$), no pueden calcularse de forma exacta y universal. Por tanto, es necesario emplear diversas aproximaciones o modelos para estimarlos. Habitualmente, el término de intercambio-correlación se divide en dos componentes: una parte correspondiente al intercambio (E_x) y otra a la correlación (E_c) tal como se muestra en la ecuación (4):

$$E_{xc}[\rho_0] = E_x[\rho_0] + E_c[\rho_0] \quad (4)$$

La diversidad de metodologías en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) surge de las distintas aproximaciones al término de intercambio-correlación ($E_{xc}[\rho_0]$). Los funcionales híbridos, ampliamente utilizados en la actualidad, se caracterizan por emplear una componente exacta de intercambio, calculada con el método Hartree-Fock (HF), complementada con un modelo aproximado para la energía de correlación.

Entre estos, el funcional B3LYP destaca por su favorable relación costo-rendimiento computacional. Éste se construye a partir del funcional de intercambio de tres parámetros de Becke (B3) y del funcional de correlación de Lee, Yang y Parr (LYP) [47]. Su eficiencia lo hace particularmente adecuado para el tratamiento de sistemas con un número elevado de electrones, logrando una alta precisión en la localización de geometrías de mínima energía para moléculas orgánicas.

3.2 Conjunto de funciones de base

Los conjuntos de funciones de base constituyen un conjunto de funciones matemáticas empleadas para representar a la función de onda electrónica en métodos de estructura electrónica. Su implementación permite transformar las ecuaciones diferenciales parciales propias del formalismo cuántico en ecuaciones algebraicas, facilitando así su resolución numérica de manera eficiente en sistemas computacionales. Estas funciones son fundamentales para la realización de cálculos de estructura electrónica, tales como los

métodos de Campo Autoconsistente (SCF, por sus siglas en inglés), teoría de perturbaciones o Clústers Acoplados (CC, por sus siglas en inglés).

Los orbitales moleculares se expresan matemáticamente como una Combinación Lineal de Orbitales Atómicos (CLOA), de la forma:

$$\phi_i = \sum_r c_{ri} \chi_r \quad (5)$$

donde χ_r representa una función base atómica y c_{ri} son los coeficientes que se determinan variacionalmente.

Entre las funciones atómicas más utilizadas se encuentran las de tipo Slater (STO) y las de tipo Gausiana (GTO). Las funciones STO describen con mayor fidelidad la forma de los orbitales atómicos; no obstante, la evaluación de las integrales moleculares conlleva un costo computacional elevado. En contraste, las funciones GTO, si bien ofrecen una representación menos precisa del orbital, permiten un cálculo significativamente más rápido de dichas integrales, lo que ha resultado en su adopción generalizada.

Para mejorar la precisión de los cálculos sin incurrir en costos computacionales elevados, es común utilizar conjuntos de bases extendidas o de valencia desdoblada (*split-valence*) [48]. Sobre estas bases, se pueden incorporar dos tipos de funciones adicionales:

Funciones de Polarización: Introducen flexibilidad en la descripción de la densidad electrónica, permitiendo la deformación de los orbitales atómicos dentro del espacio molecular, para una caracterización precisa de la formación de enlaces químicos.

Funciones Difusas: Diseñadas para describir regiones donde la densidad electrónica se extiende a distancias mayores del núcleo atómico, estas funciones son esenciales para modelar sistemas con electrones débilmente ligados. Su aplicación es particularmente relevante en el estudio de aniones, especies con pares de electrones solitarios, interacciones no covalentes, como enlaces de puente de hidrógeno, y sistemas donde la densidad electrónica está muy dispersa. En la nomenclatura estándar, su inclusión se denota con los símbolos "+" o "++".

En el presente trabajo de investigación se emplea el conjunto de funciones de base que incorporan estos elementos, específicamente el 6-31+G(d), desarrollado por Pople y colaboradores [49,50].

3.3 Potencial electrostático molecular (MEP)

El potencial eléctrico ϕ en un punto P del espacio, se define como el trabajo, ω , necesario para mover una carga de prueba infinitesimal, Q_t , desde el infinito hasta el punto P y se expresa como la ecuación (6):

$$\phi_P \equiv \frac{\omega_{\infty \rightarrow P}}{Q_t} \quad (6)$$

El potencial eléctrico en el espacio alrededor de un punto de carga Q se define como se indica en la ecuación (7), donde la d es la distancia entre el punto P y la carga y ϵ_0 es la permitividad o constante eléctrica:

$$\phi_P = \frac{Q}{4\pi\epsilon_0 d} \quad (7)$$

El potencial eléctrico es una función de posición (x, y, z) del punto P en el espacio, por lo que, si en el sistema se consideran varias cargas puntuales, el potencial se representa como la ecuación (8):

$$\phi_1 = \sum_i \frac{Q}{4\pi\epsilon_0 r_{1i}} \quad (8)$$

Si el sistema es una molécula, se estima como un conjunto de cargas nucleares puntuales y cargas electrónicas en una distribución continua. Por lo que los electrones se pueden considerar como una nube de carga electrónica, en la cual la probabilidad de encontrar un electrón en volumen determinado está dada por $\rho(x, y, z)$, que se define como la densidad electrónica de probabilidad electrónica. Combinando la contribución de los núcleos α y la carga electrónica molecular, es posible obtener la ecuación (9):

$$\phi(x_1, y_1, z_1) = \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha} e}{4\pi\epsilon_0 r_{1\alpha}} - e \iiint \frac{\rho(x_2, y_2, z_2)}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} dx_2 dy_2 dz_2 \quad (9)$$

donde r_{12} es la distancia entre los puntos 1 y 2 y la integración se extiende a todo el espacio. Al ϕ se le denomina potencial electrostático molecular o MEP (por sus siglas en inglés *Molecular Electrostatic Potential*), las unidades SI son en voltios sin embargo comúnmente se expresa en J/mol, por la carga del protón e (julios) y por la constante de Avogadro, N_A .

El MEP en un punto P representa la energía de interacción eléctrica molar entre la molécula y una carga de prueba de magnitud e situada en el punto P si se considera que la molécula no está polarizada por la carga de prueba.

El MEP se expresa como la suma de las contribuciones de los núcleos (siempre positivas) y de los electrones (negativas), lo que genera una superficie tridimensional o un mapa de contorno donde se identifican regiones con diferente carácter electrostático.

En general, las zonas cercanas a los núcleos presentan valores positivos debido a la repulsión electrostática, mientras que las regiones dominadas por la densidad electrónica muestran valores negativos. Estas últimas suelen indicar los sitios susceptibles de interacción con especies electrofílicas, mientras que las regiones positivas tienden a atraer a nucleófilos. Por ello, el MEP es una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de interacciones intermoleculares, reconocimiento molecular e incluso la predicción de sitios reactivos en procesos como interacciones enzima-sustrato o receptor-ligando [51].

3.4 Orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO y reactividad química global

Para evaluar la reactividad de las moléculas con actividad antimalárica se emplean los descriptores de reactividad química global. En este trabajo se consideran el potencial químico (μ), la electronegatividad (χ), la dureza (η), la blandura (S) y el índice de electrofilicidad (ω). Estos parámetros se calculan a partir de las energías de los orbitales HOMO (por sus siglas en inglés Highest Occupied Molecular Orbital) y LUMO (por sus siglas en inglés Lowest Unoccupied Molecular Orbital), obtenidos mediante cálculos de DFT, utilizando el teorema de Koopmans.

El ΔE_{gap} HOMO–LUMO como se representa en la ecuación (10), es uno de los criterios más utilizados para estimar la reactividad química de una molécula. En general, valores pequeños de ΔE_{gap} indican una mayor facilidad para participar en reacciones químicas, mientras que

valores grandes se asocian con moléculas más duras y, por lo tanto, menos reactivas o más estables [52].

$$\Delta E = (E_{LUMO} - E_{HOMO}) \quad (10)$$

3.4.1 Potencial químico (μ)

El potencial químico (μ) se define como la variación de la energía del sistema respecto al número de electrones N , manteniendo fijo un potencial externo, tal como se muestra en la ecuación (11). Este parámetro está asociado con la viabilidad de un sistema para intercambiar densidad electrónica con el entorno en su estado fundamental.

Mediante la aproximación por diferencias finitas, el potencial químico (μ) se puede expresar en función del potencial de ionización (I) y de la afinidad electrónica (A), como se indica en la ecuación (12). Aplicando el teorema de Koopmans y el formalismo de Kohn-Sham dentro de la DFT, es posible aproximar el potencial de ionización como $I = -E_{HOMO}$ y la afinidad electrónica como $A = -E_{LUMO}$ [51]. De este modo, el potencial químico μ se puede expresarse en términos de los orbitales frontera, conforme a la ecuación (13) [53].

$$\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)} \quad (11)$$

$$\mu \approx -\frac{(I+A)}{2} \quad (12)$$

$$\mu \approx \frac{(E_{HOMO}+E_{LUMO})}{2} \quad (13)$$

3.4.2 Electronegatividad (χ)

La electronegatividad (χ) se define como la tendencia de un sistema a la resistencia de la pérdida de la densidad electrónica, la cual es el negativo del potencial químico (μ), como se muestra en la ecuación (14) [53, 54].

$$\chi = -\mu \approx \frac{(I+A)}{2} \quad (14)$$

3.4.3 Dureza (η)

La dureza (η) se define, dentro de la DFT conceptual, como una medida cuantitativa de la resistencia del potencial químico (μ) al cambio en el número de electrones N , manteniendo constante el potencial externo. La cual se expresa mediante la ecuación (15) [55].

Aplicando la aproximación de diferencias finitas, la dureza puede reescribirse en función del potencial de ionización (I) y la afinidad electrónica (A), obteniéndose la ecuación (16), que al sustituir las aproximaciones basadas en el teorema de Koopmans es posible tener la ecuación (17). De manera habitual, se omite el factor $\frac{1}{2}$, por lo que la dureza (η) suele escribirse como la ecuación (18) [53].

$$\eta \approx \left(\frac{\partial \mu}{\partial N} \right)_{v(r)} = \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{v(r)} \quad (15)$$

$$\eta \approx \frac{(I-A)}{2} \quad (16)$$

$$\eta \approx \frac{(E_{LUMO} - E_{HOMO})}{2} \quad (17)$$

$$\eta \approx (E_{LUMO} - E_{HOMO}) \quad (18)$$

3.4.4 Blandura (S)

La blandura fue introducida como el inverso de la dureza (η), como se muestra en la ecuación (19) [53].

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (19)$$

3.4.5 Índice de electrofilicidad (ω)

El índice de electrofilicidad (ω) se define como una medida de la estabilización energética de una molécula cuando adquiere una cantidad adicional de densidad electrónica proveniente del entorno. Este parámetro abarca la tendencia de un electrófilo a aceptar densidad

electrónica extra, representada por el potencial químico (μ) y la resistencia de una molécula a intercambiar su número de electrones con el entorno, descrita por la dureza (η). Matemáticamente, el índice de electrofilicidad se define como en la ecuación (20) [53]:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (20)$$

Esta relación permite cuantificar la capacidad de una especie química para actuar como electrófilo en términos de sus propiedades globales de reactividad dentro del marco de DFT conceptual.

3.5. Solvatación implícita. Modelo SMD

La solvatación es un proceso fundamental en química, dado que afecta la estructura, estabilidad y reactividad de las moléculas. En química computacional, los efectos del disolvente se pueden incorporar mediante modelos explícitos, que representan cada molécula del disolvente, o mediante modelos implícitos, donde el disolvente se trata como un medio continuo con propiedades macroscópicas [56].

El modelo SMD (Solvation Model based on Density, por sus siglas en inglés) es un modelo de solvatación continua basado en la densidad electrónica de una molécula de soluto sin definir cargas atómicas parciales que interactúa con un disolvente, que se representa como un medio dieléctrico con tensión superficial en el límite soluto-disolvente, con el objetivo de describir la interacción electrostática con el disolvente. SMD es un modelo de solvatación universal, es decir, que puede ser usado para cualquier soluto y disolvente [57].

En este modelo, el soluto se coloca dentro de una cavidad definida por su superficie molecular, mientras que el disolvente se caracteriza mediante propiedades macroscópicas como la constante dieléctrica y parámetros empíricos ajustados experimentalmente.

La energía total de solvatación se obtiene al sumar la contribución electrostática ΔG_{EP} , que denota los componentes electrónicos (E) y la polarización (P) de la energía libre, y la contribución no electrostática ΔG_{CDS} , que enfatiza a la energía libre asociada con la cavitación del disolvente (C), cambios en la energía de dispersión (D) y posibles cambios en

la estructura en la estructura local del disolvente (S), como se representa en la ecuación (21) [57]:

$$\Delta G_S^\circ = \Delta G_{EP} + \Delta G_{CDS} \quad (21)$$

3.6 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (*molecular docking*) es una técnica computacional que predice la orientación, conformación y afinidad más favorable con la que un ligando interactúa con proteínas diana. Su objetivo principal es modelar cómo un compuesto puede unirse al sitio activo de una proteína, estimando la energía de unión y explorando posibles modos de unión mediante funciones de energía y algoritmos de búsqueda [58-60]. El proceso de acoplamiento consta de dos pasos principales: el muestreo del ligando y la utilización de una función de puntuación.

Los algoritmos de búsqueda ayudan a identificar las conformaciones energéticamente más favorables del ligando dentro del sitio activo de la proteína, considerando su modo de unión [61]. Estos algoritmos emplean funciones de puntuación (*scoring functions*) que evalúan las interacciones intermoleculares, tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y contribuciones electrostáticas [60, 62]. La función de puntuación estima la afinidad de unión entre un ligando y una macromolécula, lo que ayuda a evaluar qué estructura y conformación del ligando son los más estables [61].

Para este trabajo se emplearon los programas de libre acceso; ArgusLab, AutoDockVina y AutoDock4, que utilizan estrategias de búsqueda combinatoria y estocástica para explorar el espacio conformacional del ligando y determinar los complejos más estables [60, 62].

ArgusLab

ArgusLab fue uno de los primeros programas gratuitos para realizar el acoplamiento molecular con una interfaz gráfica sencilla. Creado por Mark Thomson, utiliza una combinación de algoritmos de mecánica cuántica y mecánica clásica para modelar los efectos del disolvente, con una interfaz gráfica sencilla. Utiliza el método AScore/ShapeDock, un

algoritmo que considera interacciones de tipo hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y complementariedad de forma para determinar la conformación óptima del ligando [63].

AutoDock4

AutoDock4 es uno de los programas más utilizados para estudios de acoplamiento molecular. Es un *software* libre y de código abierto que es capaz de predecir de forma rápida y precisa las conformaciones y energías de enlace de ligandos con dianas. El método principal para la búsqueda conformacional es el algoritmo genético Lamarckiano (Lamarckian Genetic Algorithm, por sus siglas en inglés), en la cual se seleccionan finalmente a las conformaciones de menor energía de enlace. Autodock4 también ofrece el método de búsqueda por recocido simulado y el de algoritmo genético tradicional. Autodock4 utiliza un campo de fuerza de energía libre semiempírico para predecir las energías libres de enlaces de moléculas pequeñas a las dianas [62].

Autodock Vina

AutoDock Vina es una versión más reciente que Autodock4, que optimiza tanto la velocidad como la precisión del proceso del acoplamiento molecular. Utiliza un algoritmo iterativo de búsqueda local basado en técnicas de optimización estocástica con gradiente, lo que permite explorar el espacio conformacional de manera más eficiente [60]. En la función de puntuación usa el parámetro de energía de Gibbs ΔG , ecuación (22), que muestra la energía libre de unión $\Delta G_{unión}$ como la suma de la energía libre del disolvente ΔG_{solv} , la energía libre del conformero ΔG_{conf} , la energía libre de interacción ΔG_{inter} , la energía libre de rotación ΔG_{rot} , la energía libre del complejo ΔG_{comp} y la energía libre de vibración ΔG_{vib} [64]:

$$\Delta G_{unión} = \Delta G_{solv} + \Delta G_{conf} + \Delta G_{inter} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{comp} + \Delta G_{vib} \quad (22)$$

Particularmente, la función de puntuación general de AutoDockVina es la ecuación (23):

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (23)$$

En la cual la suma se realiza sobre todos los pares de átomos que pueden moverse entre sí, excluyendo las interacciones 1-4, es decir, átomos separados por 3 enlaces covalentes consecutivos. Cada átomo i posee un tipo átomo t_i y un conjunto simétrico de funciones de interacción dada por $f_{t_i t_j}$ en función de la distancia interatómica r_{ij} . La función total c se considera como la suma de dos componentes:

$$c = c_{inter} + c_{intra} \quad (24)$$

El algoritmo de optimización de AutoDockVina busca el mínimo global de esta función, generando múltiples conformaciones y clasificándolas según sus valores de energía [60].

3.7 Propiedades fisicoquímicas *in silico*

Las propiedades fisicoquímicas son esenciales para la predicción del comportamiento de compuestos bioactivos y permiten evaluar la similitud a fármacos (*drug-likeness*) de una molécula y su posible desempeño como fármaco oral.

El coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$) es una medida de la lipofilicidad de una molécula y constituye un método cuantitativo utilizado en los estudios de relación estructura-actividad, ya que proporciona una descripción general de la permeabilidad celular [65]. Es un parámetro fisicoquímico clave en el diseño y desarrollo de fármacos [66]. Por ello, el $\log P$ es una propiedad estándar en la evaluación de moléculas candidatas a fármacos [65].

En este trabajo, se utilizó la predicción WLOGP, que está clasificado como un método atomístico basado en el sistema fragmentario de Wildman y Crippen [65, 67].

El parámetro $\log S$ indica el logaritmo de la solubilidad de una molécula de agua. La solubilidad adecuada es crucial para la absorción y distribución del compuesto, ya que contribuye a una biodisponibilidad favorable durante el desarrollo de fármacos. En este trabajo se usó el método topológico ESOL para la predicción de solubilidad en agua.

La Escala de $\log S$ es: Insoluble < -10 $<$ baja solubilidad < -6 $<$ moderada solubilidad < -4 $<$ soluble < -2 $<$ muy soluble < 0 $<$ alta solubilidad [67, 68].

Los donadores de enlaces de hidrógeno (HBD) corresponden a átomos electronegativos capaces de donar un protón en interacciones de puente de hidrógeno. Un número elevado de HBD puede afectar la permeabilidad debido al aumento de polaridad.

Los aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA) son átomos electronegativos capaces de aceptar un protón. Valores altos de HBA también incrementan la polaridad y reducen la capacidad de atravesar membranas [69].

Los enlaces rotables se definen como enlaces sencillos no terminales que permiten libertad conformacional [70]. Por lo que un mayor número de enlaces rotables se relaciona con la flexibilidad molecular, lo que puede disminuir la permeabilidad y la biodisponibilidad oral. Una rigidez moderada favorece la estabilidad conformacional y una unión más específica al receptor.

El valor de accesibilidad sintética es una puntuación basada en el análisis fragmentario de las estructuras de más de 13 millones de compuestos disponibles, asumiendo que cuanto más frecuente sea un fragmento molecular, más fácil será su síntesis. Este método de contribución fragmentaria se corrige mediante descriptores de tamaño molecular y complejidad. La puntuación se normaliza entre 1 (síntesis fácil) y 10 (síntesis difícil) [67].

La regla de Lipinski (Regla de los 5, recibe este nombre debido a que los parámetros que lo conforman corresponden a múltiplos del número cinco), es un conjunto de criterios empíricos que permiten predecir la capacidad de un compuesto para ser absorbido por vía oral. Una molécula cumple la regla si presenta: $\text{Log}P \leq 5$, peso molecular ≤ 500 Da, donadores de enlaces de hidrógeno (HBD) ≤ 5 , aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA) ≤ 10 [69]. El cumplimiento de estos parámetros sugiere una buena permeabilidad y absorción intestinal. Aunque existen excepciones, la regla sigue siendo uno de los filtros más importantes en la química medicinal.

CAPITULO IV. METODOLOGÍA

4.1 Optimización de estructuras

Las estructuras químicas de las casiarinas se obtuvieron de la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) [71] empleando los siguientes identificadores casiarina A (CID: 17756117), casiarina B (CID: 17756116), casiarina C (CID:135883817), casiarina D (CID:135883818), casiarina E (CID: 135883819), casiarina F (SID: 274860329) Casiarina G (SID: 273986952), casiarina H (SID: 273986953), casiarina J (SID: 273986954) y la casiarina K (SID: 273986955) (Figura 12).

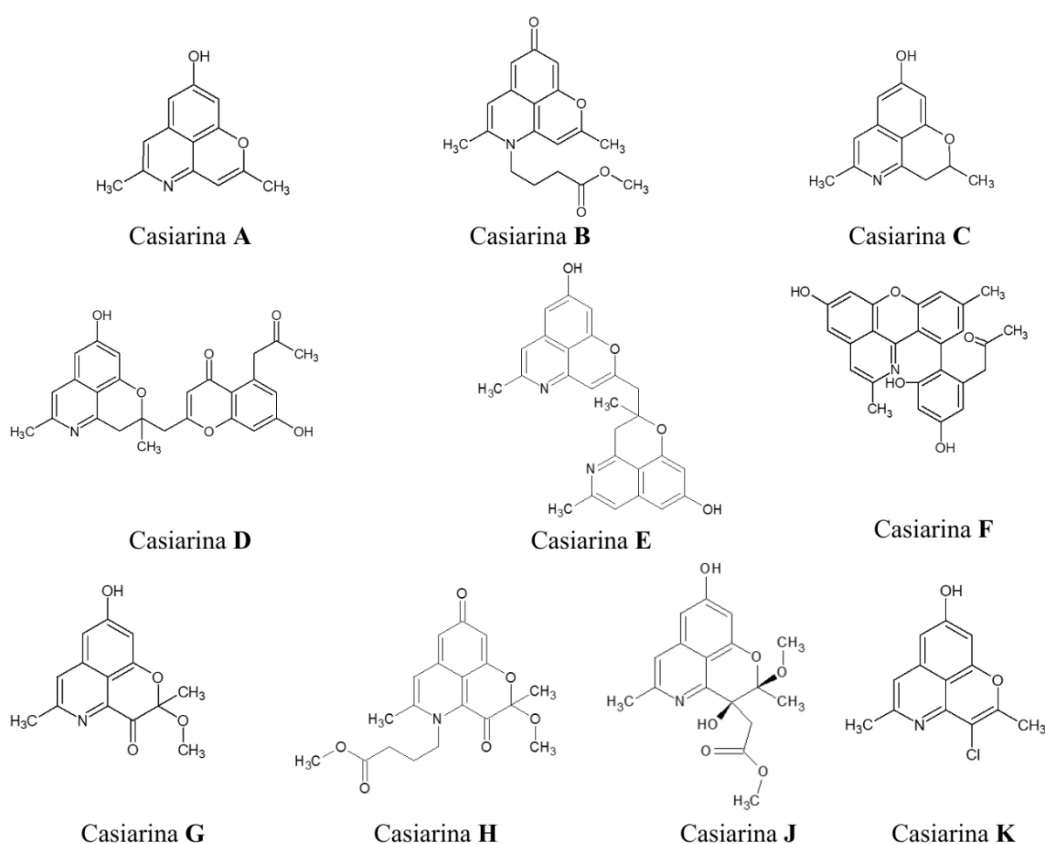


Figura 12. Estructura química de las casiarinas en estudio.

La estructura de la casiarina A fue modificada manualmente para obtener la conformación correcta. Las casiarinas F, G, H, J y K se encontraban únicamente en formato bidimensional (2D); por ello se utilizó el programa Avogadro [72, 73] para generar las respectivas estructuras tridimensionales (3D) empleando el campo de fuerza *Universal Force Field*

(UFF). Las casiarinas restantes se descargaron en 3D. Todas las moléculas fueron obtenidas en el formato SDF.

A continuación, se llevaron a cabo los cálculos de optimización y de frecuencias vibracionales utilizando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d), tanto en vacío como en disolvente implícito en agua, mediante el modelo de solvatación implícito SMD [57]. Los parámetros de cada molécula se asignaron en el visualizador GaussView 6.0 [74] y los cálculos se ejecutaron en el programa Gaussian 16W [75].

Se calcularon los desplazamientos químicos (δ) de RMN de ^1H y ^{13}C para las casiarinas, con el propósito de compararlos con los valores reportados en la literatura [31, 76-78] para validar el nivel de teoría que se utilizó en este trabajo (ver ANEXO A).

4.2 Análisis MEP

Los mapas de Potencial Electrostático Molecular (MEP) se generaron a partir de las estructuras previamente optimizadas en el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d), tanto en vacío como en solvente implícito en agua. La visualización de los MEP se realizó empleando el visualizador GaussView 6.0

4.3 Orbitales moleculares frontera y parámetros de reactividad química global

Los análisis de los Orbitales Frontera (HOMO y LUMO) se realizaron a partir de las estructuras optimizadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d), tanto en vacío como en solvente implícito en agua. La visualización de los orbitales se llevó a cabo en el programa GaussView 6.0. Se obtuvo el ΔE_{gap} mediante la ecuación (11).

Los descriptores de reactividad química global: potencial químico (μ), electronegatividad (χ), dureza (η), blandura (s) e índice de electrofilicidad (ω), se obtuvieron a partir de los cálculos DFT, con el teorema de Koopmans, usando las ecuaciones (13), (14), (18), (19) y (20), respectivamente.

4.4 Acoplamiento molecular

Como primer paso, se descargó la estructura cristalizada de la proteína plasmepsina V de *Plasmodium vivax* (PvPMV) (ID PDB:4ZL4) desde la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) [79]. Posteriormente, la proteína se preparó en el programa Discovery Studio v24.1.0.23298 [80], donde se eliminaron las moléculas de agua y los ligandos co-cristalizados, y se le añadieron los hidrógenos polares correspondientes.

Se realizaron los cálculos de acoplamiento molecular ciego (*Blind Docking*) rígido empleando el software ArgusLab (versión 4.0.1) [63] para las casiarinas seleccionadas. En vacío se evaluaron las casiarinas B, G y H, mientras que en disolución acuosa implícito se consideraron las casiarinas B, D, G y H. En la cual se tomó como criterio previo sus parámetros de reactividad química. Este criterio permitió seleccionar aquellas moléculas con mayor potencial de interacción electrónica con el blanco farmacológico antes de llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular. El espacio de búsqueda se delimitó por una caja de 60 Å x 60 Å x 60 Å, correspondiente al tamaño máximo permitido por software.

Adicionalmente, se efectuó un segundo acoplamiento molecular ciego rígido utilizando AutoDock4 (versión 4.2.6) [62]. Para ello, fue necesario asignarle a la proteína las cargas de Kollman United Atoms y generar los archivos en formato PDBQT. La caja de búsqueda empleada cubrió toda la proteína, con un tamaño de 126 Å x 126 Å x 126 Å y coordenadas centrales de 5.753, 100.365 y 46.430 Å para X, Y, Z. Todos estos pasos se llevaron a cabo en AutoDockTools (versión 1.5.7) [62].

Por último, se hizo el acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina v1.2x [60, 81], utilizando al ligando en vacío que presentó el mejor resultado del acoplamiento molecular ciego, de acuerdo con la energía de afinidad estimada. Mientras que en solvente implícito en agua se les realizó a las casiarinas B, D, G y H. La caja de búsqueda fue del tamaño de 40 Å x 40 Å x 40 Å, con las coordenadas de X = -2.701, Y = 93.407 y Z = 47.09 Å, correspondientes al centro geométrico de la caja sobre la estructura proteica. Tanto la proteína como el ligando empleado en este cálculo correspondieron a las estructuras previamente generadas en el formato PDBQT. Los ligandos utilizados fueron los que se obtuvieron a partir de las estructuras optimizadas con el método B3LYP/6-31G(d) en vacío y considerando un modelo de solvente implícito en agua. El modelo en vacío permitió establecer una referencia teórica del sistema, mientras que la inclusión del disolvente

implícito en agua permitió considerar los efectos de solvatación relevantes en entornos biológicos.

Las interacciones obtenidas de los acoplamiento moleculares se visualizaron con los programas Discovery Studio v24.1.0.23298 y UCSF Chimera (versión 1.18) [82].

Es importante señalar que, en los cálculos de acoplamiento molécula realizados, no se consideró de manera explícita el estado de protonación de los residuos catalíticos ni el pH fisiológico del medio. Asimismo, la preparación de la proteína no contempló ajustes específicos en los residuos catalíticos característicos de la plasmepsina V, como los residuos del ácido aspártico. Por tanto, las energías de afinidad obtenidas se reportan como estimaciones relativas y no como valores de afinidad absolutos de afinidad de unión. No obstante, los resultados permiten comparar de manera consistente la tendencia de interacción de las casiarinas con el sitio activo de PvPMV.

4.5 Propiedades fisicoquímicas *in silico*

Se realizaron las predicciones de las propiedades fisicoquímicas, accesibilidad sintética y posibles violaciones de la regla de Lipinski utilizando el servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) [67]. Los códigos SMILES de las casiarinas se obtuvieron de la base de datos PubChem, empleando los mismos identificadores utilizados en la sección 3.1 de esta tesis. En el caso particular de la casiarina A, su código SMILES se generó directamente en el servidor SwissADME.

CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estructuras optimizadas

Las estructuras optimizadas de las casiarinas en vacío (Figura 13) y disolvente implícito en agua (Figura 14) son parecidas entre sí, sin embargo, se llega a apreciar que en fase acuosa los grupos funcionales se encuentran más juntos y se observa que los oxígenos de los grupos hidroxilo y carbonilo se acercan a diferentes hidrógenos de otros sustituyentes.

En la Tabla 3, se muestran los valores de las energías electrónicas totales obtenidas de las optimizaciones en vacío y en solvente implícito en agua. Las casiarinas optimizadas en solvente implícito en agua tienen valores menores de energía, como es de esperarse, por lo que son más estables, el disolvente implícito en agua, es un disolvente polar que estabiliza las cargas e interacciones entre los oxígenos de los grupos hidroxilo y los hidrógenos en la molécula, mediante interacciones intramoleculares. Se puede observar en la Tabla 3, que las casiarinas que más se estabilizan con el efecto del disolvente son las casiarinas B, D, E, F, H, J y G, mientras que las que cambian en menor proporción su energía y geometría con el disolvente son las casiarinas K, A, C.

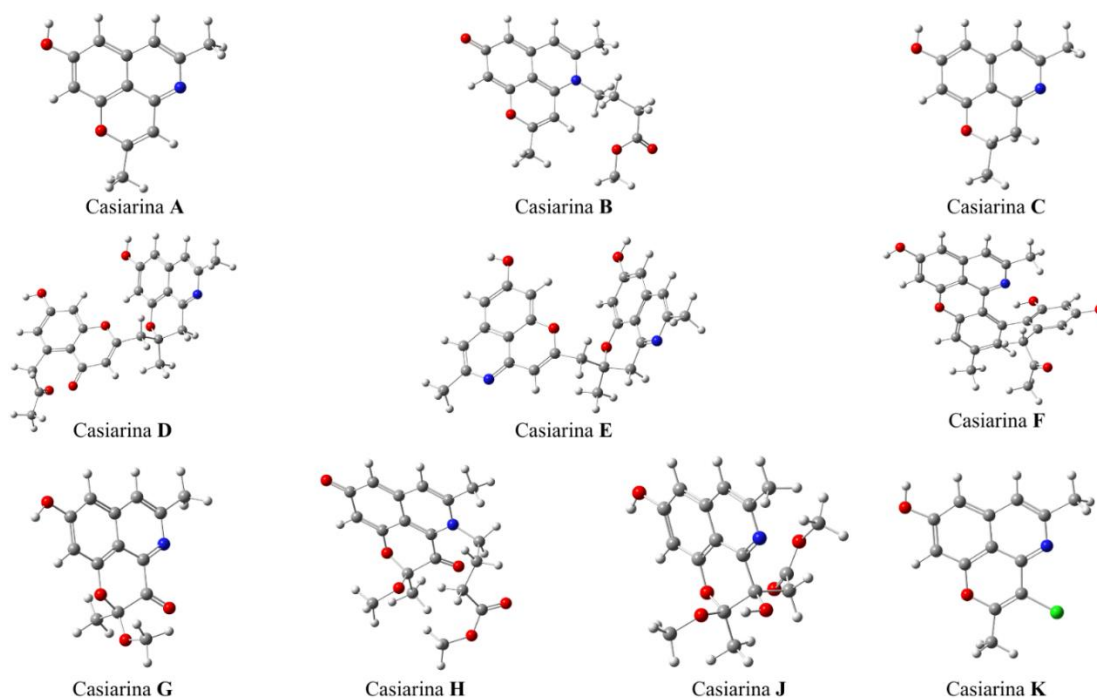


Figura 13. Estructuras de las casiarinas optimizadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío.

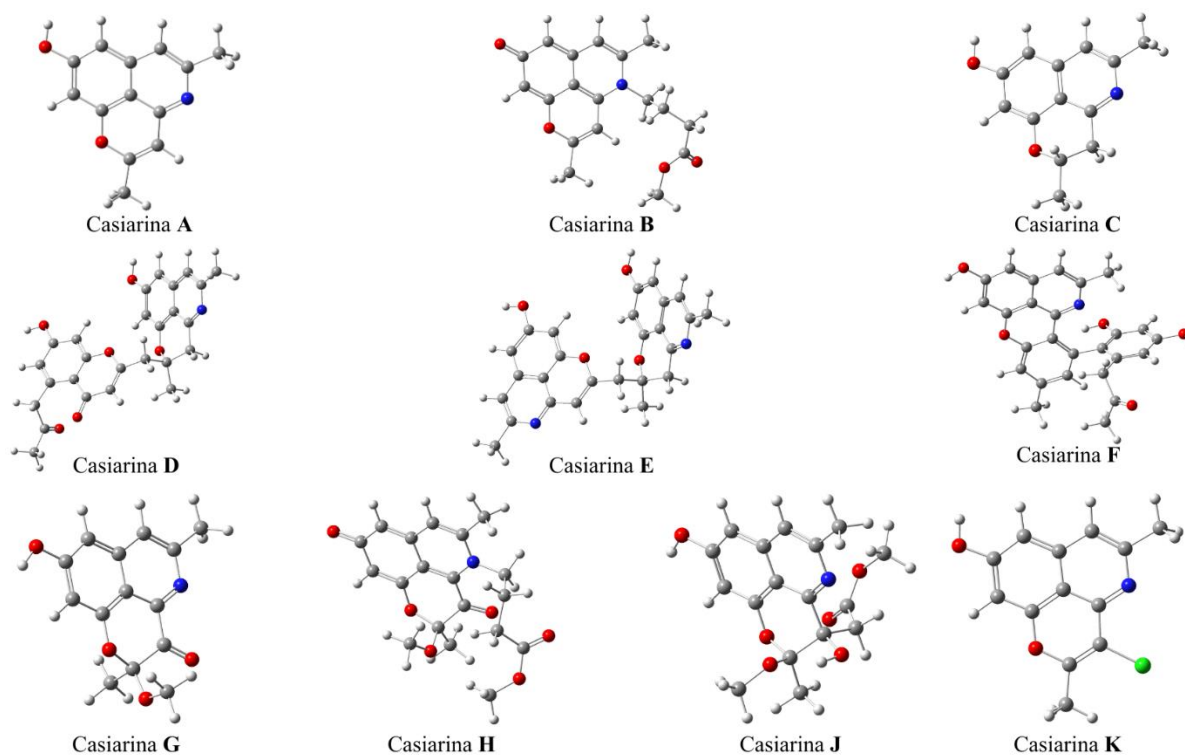


Figura 14. Estructuras de las casiarinas optimizadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en disolvente implícito en agua.

Tabla 3. Energías electrónicas totales (en u.a.) y energías relativas (en kcal/mol) de las casiarinas en el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío y en disolvente implícito en agua.

Compuesto	Vacío (u.a.)	Agua (u.a.)	ΔE (kcal/mol)
Cas A	-707.2208	-707.2346	8.62
Cas B	-1053.0055	-1053.0420	22.87
Cas C	-708.4332	-708.4481	9.34
Cas D	-1510.7364	-1510.7747	24.07
Cas E	-1414.4491	-1414.4797	19.17
Cas F	-1434.3068	-1434.3373	19.14
Cas G	-896.9557	-896.9777	13.83
Cas H	-1242.7360	-1242.7646	17.99
Cas J	-1165.3347	-1165.3631	17.81
Cas K	-1166.8090	-1166.8223	8.36

5.2 Mapas de los potenciales electrostáticos moleculares (MEP)

Se puede apreciar que en los mapas de potencial electrostático molecular (MEP) en vacío (Figura 15) y en disolvente implícito en agua (Figura 16), los sitios de mayor densidad electrónica (color rojo) se encuentran en los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo e hidroxilo, siendo éstas las regiones nucleofílicas. Los sitios deficientes de densidad electrónica (color azul) se encuentran en diferentes zonas para cada una de las moléculas, por ejemplo, en los hidrógenos ácidos enlazados a los heteroátomos electronegativos, y éstas son las regiones electrofílicas. Se observa que la casiarina H y la casiarina B son en donde más predomina la deficiencia de densidad electrónica, por lo que son moléculas más electrofílicas. Analizando su estructura esta tiene como sustituyentes a un grupo éster, éter y un metilo; en la cual los dos primeros son grupos propensos a que ocurran diferentes tipos de reacciones. También regiones de densidad electrónica acumulada en los oxígenos de la cetona y del ácido carboxílico. Las casiarinas A, C y K presentan una acumulación de densidad electrónica en el oxígeno del grupo hidroxilo y en el nitrógeno del anillo tricíclico. Por otro lado, la deficiencia electrónica se muestra en el hidrógeno ácido del grupo hidroxilo. Las casiarinas D y E muestran la presencia de una acumulación de densidad electrónica en los oxígenos de los grupos hidroxilo y en el nitrógeno del anillo tricíclico; sin embargo, esta región es más pronunciada en la casiarina D, específicamente en la zona donde se encuentran los oxígenos de los grupos cetona. La deficiencia de densidad electrónica se observa en los hidrógenos ácidos del hidroxilo. La casiarina F presenta una acumulación de densidad electrónica en los oxígenos de los tres grupos hidroxilos, en contraste con los hidrógenos ácidos de estos mismos grupos, los cuales exhiben una deficiencia de densidad electrónica. Las casiarinas G y J muestran una acumulación de densidad electrónica en el oxígeno del grupo hidroxilo y una deficiencia en el hidrógeno correspondiente. No obstante, la casiarina G presenta una acumulación de densidad electrónica en el oxígeno de la cetona y en el nitrógeno del anillo. Asimismo, la casiarina J exhibe una región más extensa de acumulación de densidad electrónica, atribuida a la presencia de sustituyentes adicionales, específicamente en los oxígenos de otro grupo hidroxilo y del ácido carboxílico.

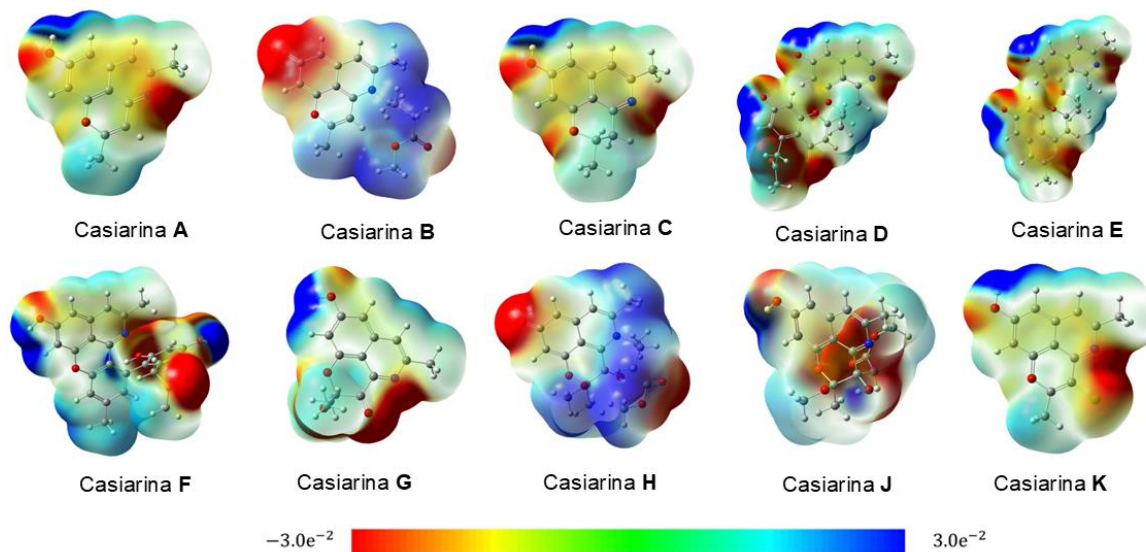


Figura 15. Mapas del potencial electrostático molecular de las casiarinas obtenidas usando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío.

De manera general, se observa que, en los MEP en disolución acuosa, destaca la deficiencia o acumulación de la densidad electrónica en comparación a los MEP obtenidos en vacío. Las moléculas en las que se observa un mayor cambio son en las casiarinas B y H, sobre todo en la deficiencia de la densidad electrónica, dado que tiene una mayor extensión de regiones con densidad electrónica positiva, asociadas principalmente a hidrógenos polarizados y a carbonos influenciados por el efecto inductivo de grupos oxigenados. En el caso de la casiarina E, se observa una acumulación de densidad electrónica en los oxígenos de los dos anillos tricíclicos, la cual en la fase vacío no se aprecia. Asimismo, la casiarina J muestra un notable aumento de la acumulación electrónica, específicamente en el grupo éter. Por su parte, las casiarinas A, C, F, G y K presentan una mayor intensidad tanto en las regiones de acumulación como de deficiencia de densidad electrónica. Estos cambios pueden atribuirse a la redistribución de la densidad electrónica inducida por el disolvente implícito en agua, ya que la presencia del disolvente favorece una mayor polarización en comparación las moléculas optimizadas en vacío.

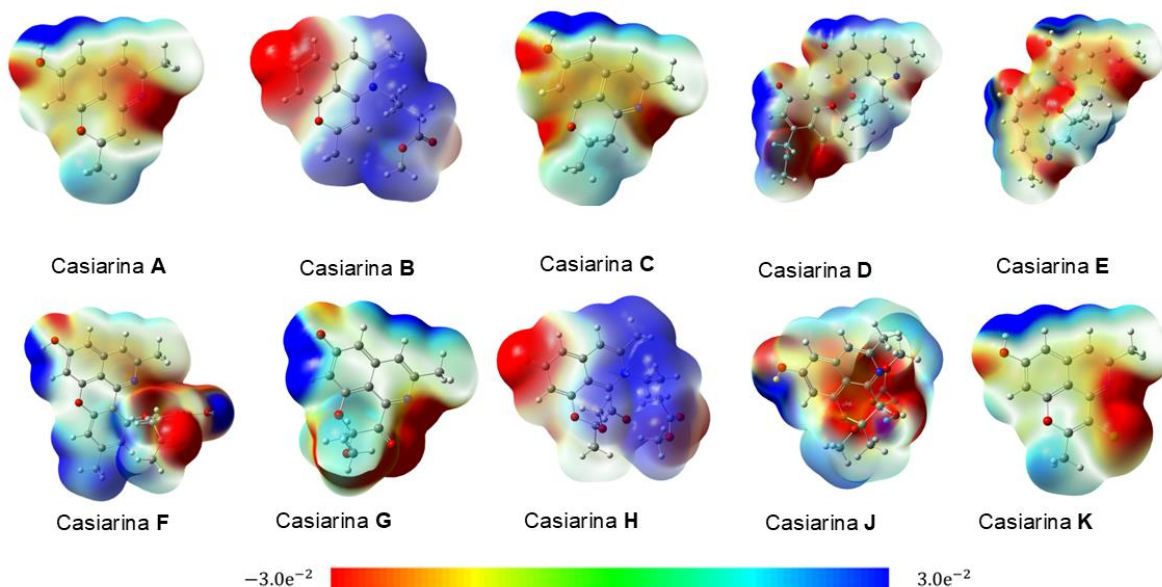


Figura 16. Mapas del potencial electrostático molecular de las casiarinas obtenidas usando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en disolvente implícito en agua.

5.3 Orbitales moleculares frontera y parámetros de reactividad química global

Los orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO de las casiarinas en vacío y el ΔE_{gap} se muestran en la Figura 17. Se puede observar que los orbitales HOMO están localizados sobre los grupos furánicos y sistemas π adyacentes ricos en electrones, mientras los orbitales LUMO se encuentran localizados en los grupos carbonilo, específicamente en α,β -insaturados, dado que es la zona más deficiente de electrones y actúa como un aceptor fuerte. Se observa que la casiarina C tiene una mayor brecha con un valor de 4.64 eV, por lo que tiene una mayor estabilidad y al contrario de la casiarina H que tiene una energía gap de $\Delta E_{\text{gap}} = 2.59$ eV, es menos estable y por consiguiente más reactiva. Las otras casiarinas más reactivas, que tienen el ΔE_{gap} más pequeño son la B con 3.31 eV y la casiarina G con 3.66 eV.

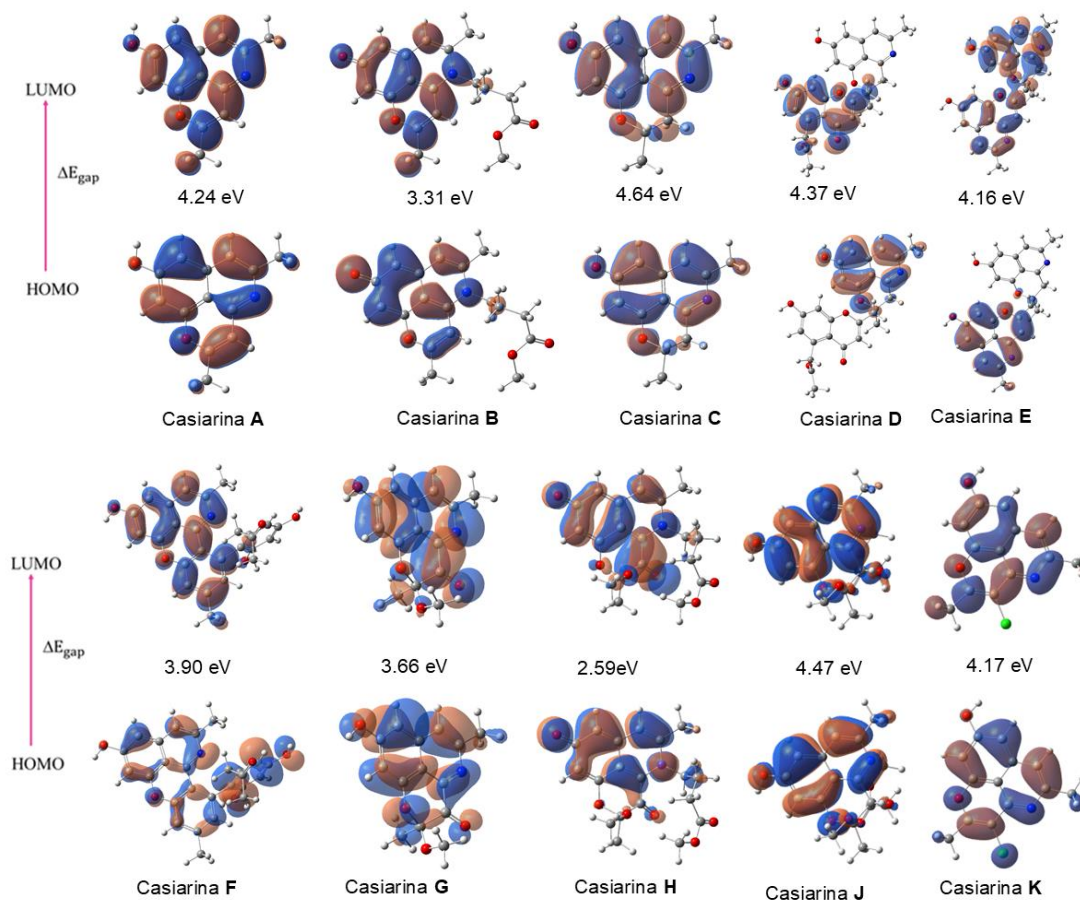


Figura 17. Orbitales moleculares HOMO y LUMO de las casiarinas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío.

También se obtuvieron los orbitales frontera en disolvente implícito en agua. La contribución de los grupos furánicos a los orbitales HOMO de las casiarinas A-K tiene parecido a los obtenidos en vacío, con algunas diferencias en que los grupos carbonilo de la lactona/pirona contribuyeron mayoritariamente a los orbitales LUMO en las casiarinas A-K. La casiarina C es la que tiene la mayor brecha con el valor de $\Delta E_{\text{gap}} = 4.62$ eV y la casiarina H es la que tiene el menor valor de $\Delta E_{\text{gap}} = 2.66$ eV. En general, en vacío se observa la siguiente tendencia en valor decreciente de ΔE_{gap} : casiarina C > J > D > A > K > E > F > G > B > H, mientras que en disolvente implícito en agua la tendencia es: casiarina C > J > A > E > D > K > F > B > G > H. En la Tabla 4 se resumen los valores de los orbitales HOMO y LUMO, así como de la energía gap ΔE_{gap} en ambas fases.

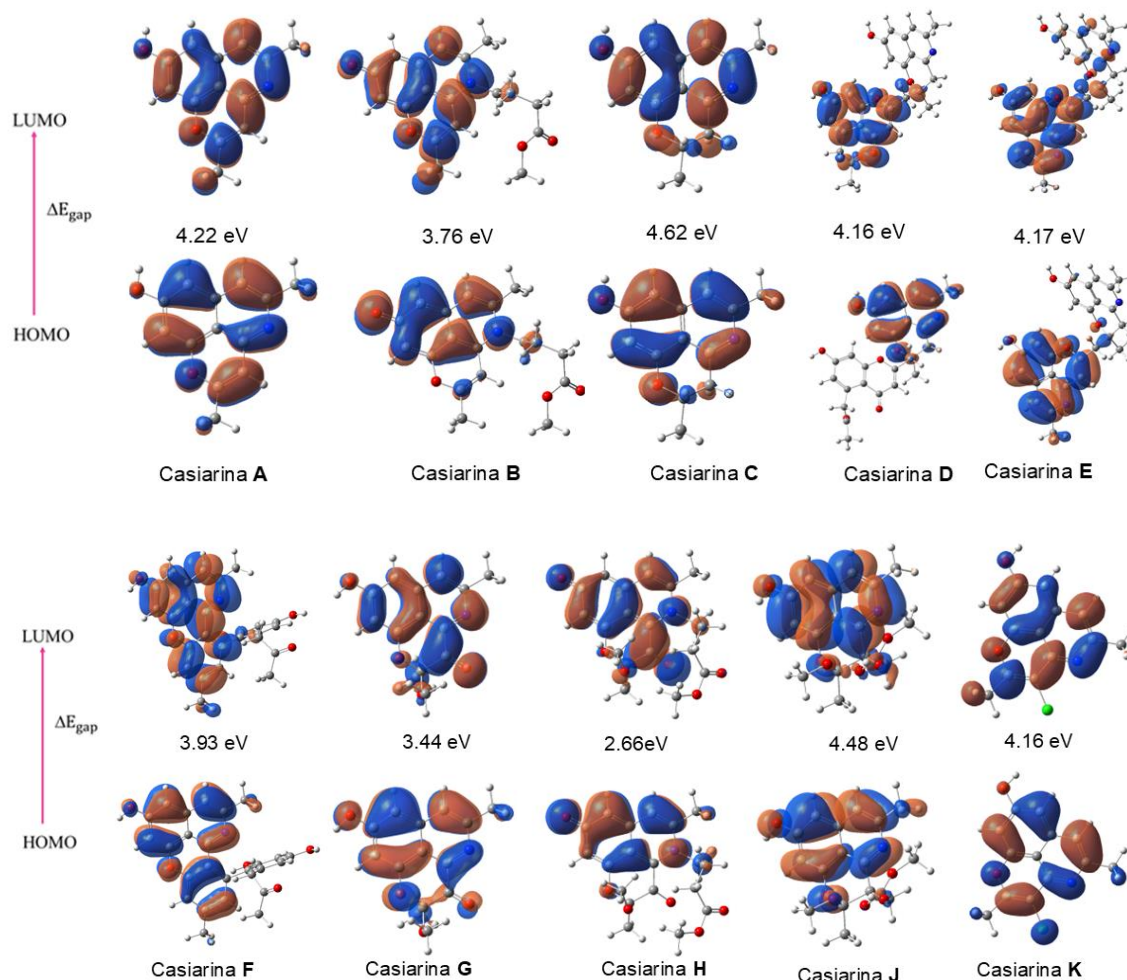


Figura 18. Orbitales moleculares HOMO y LUMO de las casiarinas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en disolvente implícito en agua.

Tabla 4. Valores de HOMO, LUMO (en eV) para las casiarinas, usando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío y en disolvente implícito en agua

Compuesto	Vacío			Disolvente implícito en agua		
	LUMO	HOMO	ΔE_{gap}	LUMO	HOMO	ΔE_{gap}
Cas A	-0.972	-5.208	4.236	-1.053	-5.271	4.218
Cas B	-1.484	-4.792	3.307	-1.493	-5.252	3.759
Cas C	-0.925	-5.564	4.638	-0.990	-5.613	4.622
Cas D	-1.314	-5.682	4.368	-1.477	-5.638	4.161
Cas E	-1.023	-5.185	4.162	-1.110	-5.276	4.166
Cas F	-1.587	-5.484	3.898	-1.447	-5.382	3.935
Cas G	-2.223	-5.886	3.662	-2.394	-5.835	3.441
Cas H	-2.780	-5.365	2.585	-2.810	-5.475	2.664
Cas J	-1.232	-5.705	4.473	-1.263	-5.747	4.483
Cas K	-1.223	-5.393	4.170	-1.232	-5.389	4.157

Se evaluaron los descriptores de reactividad global para los compuestos de interés: potencial químico (μ), electronegatividad (χ), dureza (η), blandura (S) e índice de electrofilicidad (ω) de acuerdo con la teoría DFT conceptual. En vacío (Tabla 5 y Figura 19), se observa que el potencial químico de las casiarinas H, G y F son los que tienen un menor valor por lo que son más viables a intercambiar densidad electrónica, pero éstas se clasificarían en electrofílicas; mientras que las casiarinas A, E y B llegarían a reaccionar como nucleófilos. En el parámetro de electronegatividad, las casiarinas H, G y F con las que mayores valores tienen, 4.072, 4.054 y 3.536 eV, respectivamente, por lo que estas moléculas tienen una mayor resistencia a la pérdida de la densidad electrónica, lo que concuerda con el potencial químico al ser clasificadas como electrófilos. Las moléculas más duras son las casiarinas C, J y D, los valores son 4.622, 4.473 y 4.368 eV, respectivamente, por lo que éstas tienen una mayor resistencia al cambio en la densidad electrónica, al contrario de las casiarinas H, B y G, que son blandas, por lo que éstas son más accesibles a este intercambio de densidad electrónica. Por último, en el parámetro del índice de electrofilicidad se tiene que las casiarinas H, G y F, son las que tendrán una mayor estabilización energética cuando reciban una cantidad adicional de densidad electrónica. A partir del análisis de los parámetros de reactividad química global y el ΔE_{gap} , se observa que las moléculas con mayor facilidad para reaccionar con otras especies químicas son principalmente las casiarinas H, G, B y F, dado que presentan brechas energéticas más pequeñas y valores elevados en el índice de electrofilicidad, por tanto, un carácter electrofílico más pronunciado. Esta tendencia está relacionada con la presencia de un mayor número de grupos funcionales reactivos como éster, carbonilo, hidroxilo y éter. En contraste, con la casiarina C, que exhibe un mayor valor de ΔE_{gap} y dureza, lo que sugiere una menor reactividad química y una mayor estabilidad frente a procesos de transferencia electrónica y en su estructura química tiene a grupos metilo como sustituyentes, los cuales contribuyen a incrementar su estabilidad y reducir su susceptibilidad a reaccionar.

Tabla 5. Valores de los descriptores de reactividad global (en eV) para las casiarinas, usando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en vacío y en disolvente implícito en agua.

Compuesto	Vacío					Disolvente implícito en agua				
	μ	χ	η	S	ω	μ	χ	η	S	Ω
Cas A	-3.090	3.090	4.236	0.236	1.127	-3.162	3.162	4.218	0.237	1.185
Cas B	-3.138	3.138	3.307	0.302	1.489	-3.372	3.372	3.759	0.266	1.513
Cas C	-3.245	3.245	4.638	0.216	1.135	-3.301	3.301	4.622	0.216	1.179
Cas D	-3.498	3.498	4.368	0.229	1.400	-3.558	3.558	4.161	0.240	1.521
Cas E	-3.104	3.104	4.162	0.240	1.157	-3.193	3.193	4.166	0.240	1.224
Cas F	-3.536	3.536	3.898	0.257	1.603	-3.414	3.414	3.935	0.254	1.481
Cas G	-4.054	4.054	3.662	0.273	2.244	-4.114	4.114	3.441	0.291	2.460
Cas H	-4.072	4.072	2.585	0.387	3.207	-4.142	4.142	2.664	0.375	3.220
Cas J	-3.468	3.468	4.473	0.224	1.345	-3.505	3.505	4.483	0.223	1.370
Cas K	-3.308	3.308	4.170	0.240	1.312	-3.311	3.311	4.157	0.241	1.318

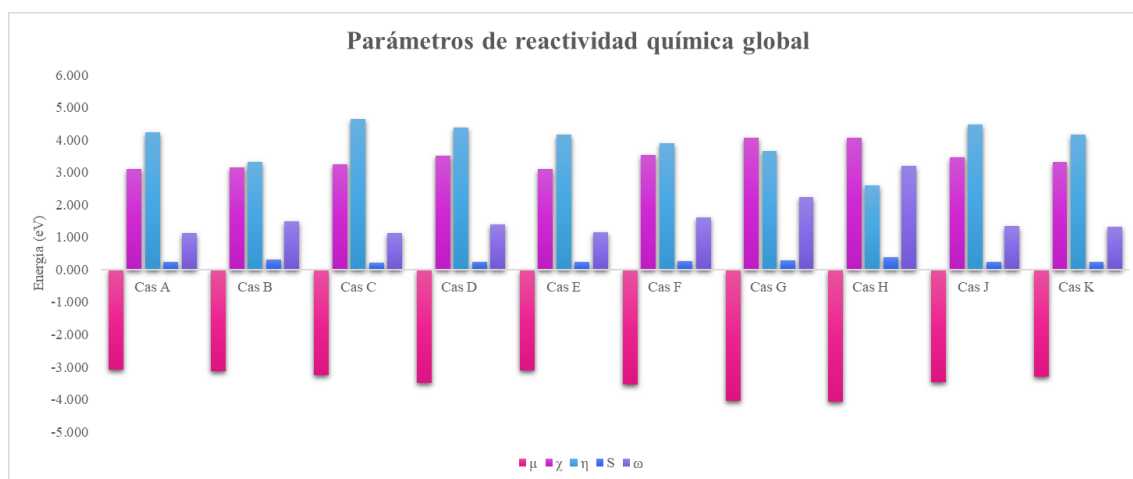


Figura 19. Gráfico de los valores de los parámetros de la reactividad química global de las casiarinas en vacío.

Con las moléculas optimizadas en disolvente implícito en agua (Tabla 5 y Figura 20). La casiarina H es la que tiene el menor valor en el potencial químico con -4.142 eV y el más alto valor en la electronegatividad, por lo que la hace una especie electrofílica, le siguen las casiarinas G y D, esta última no tuvo este comportamiento en vacío. Las casiarinas H, G y B son las que tienen una menor dureza y por ende una mayor blandura, al igual que en fase vacío. Sin embargo, con la casiarina D, disminuyó la dureza y aumentó la blandura con respecto a la fase vacío. En el índice de electrofilicidad los valores más altos fueron para las mismas casiarinas, H y G, pero después le siguió la casiarina D, por lo que si recibe densidad electrónica adicional podrá estabilizarse con mayor facilidad. Analizando estos parámetros y el ΔE_{gap} , las casiarinas H, G y B en solvente implícito en agua son las especies químicas que

con mayor facilidad podrán reaccionar, sin embargo, la casiarina D por sus resultados obtenidos en esta fase, podría también fácilmente reaccionar. A partir del análisis de los parámetros de reactividad química global, se eligieron a las casiarinas B, D, G y H para realizar el estudio de acoplamiento molecular, debido a que su mayor capacidad para interactuar con otras especies químicas, específicamente con la enzima PvPMV

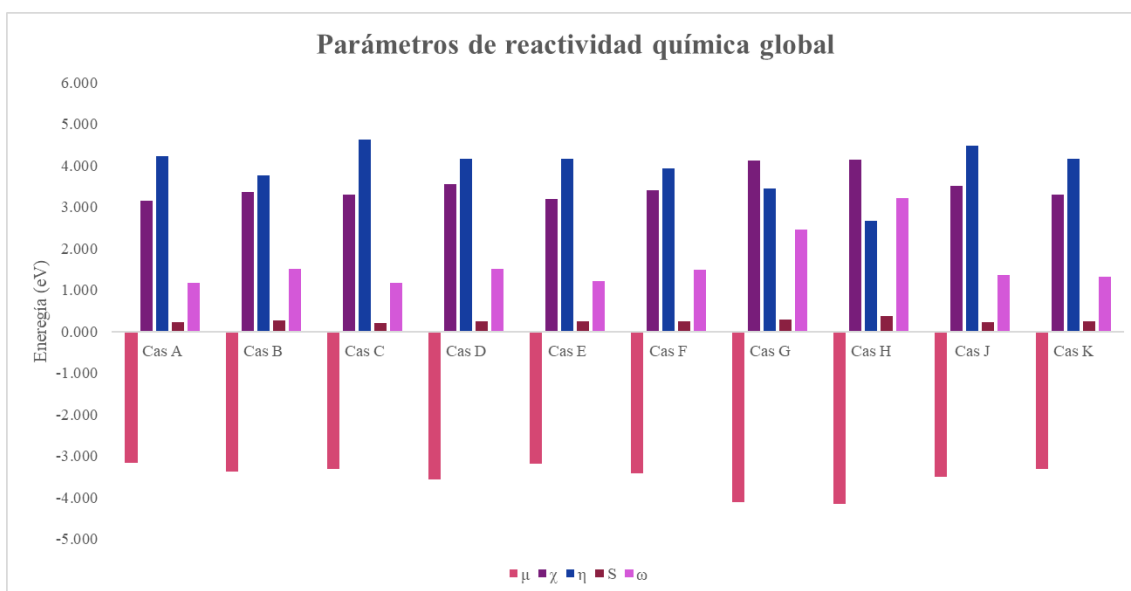


Figura 20. Gráfico de los valores de los parámetros de la reactividad química global de las casiarinas en fase acuosa.

En la Figura 21 se observa la comparación de los parámetros de reactividad química global en vacío y en disolvente implícito en agua de la casiarina B. En vacío los valores de potencial químico y blandura son más grandes, mientras que en disolvente implícito los valores de electronegatividad, blandura e índice de electrofilicidad son más altos. En la Figura 22, en el caso de la casiarina G, los valores de potencial químico y dureza disminuyeron en disolución acuosa, mientras que en la electronegatividad, blandura e índice de electrofilicidad, sus valores aumentaron, por lo que es más reactiva. En la casiarina H (Figura 23), los valores del potencial químico y blandura disminuyeron en disolvente implícito y los parámetros de electronegatividad, dureza e índice de electrofilicidad aumentaron. Estas variaciones en los parámetros de reactividad química se deben al disolvente polar, agua, que se usó en el modelo de solvatación implícito SMD, ya que estabilizó cargas y dipolos, haciendo los resultados más realistas, ya que las casiarinas interactuarían en medio fisiológico.

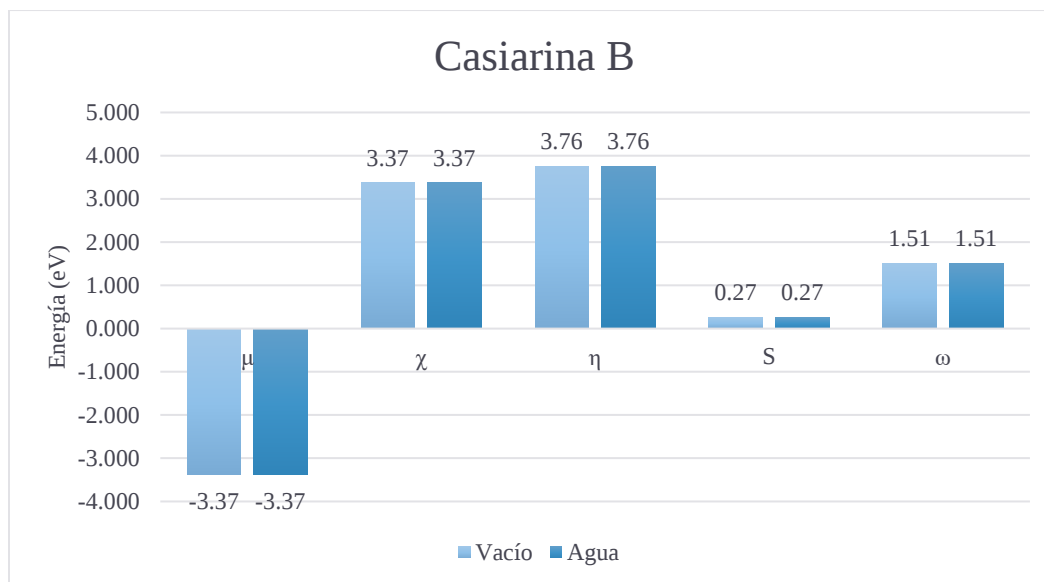


Figura 21. Gráfico de comparaciones de los parámetros de reactividad química global de la casiarina B en vacío y en disolvente implícito.

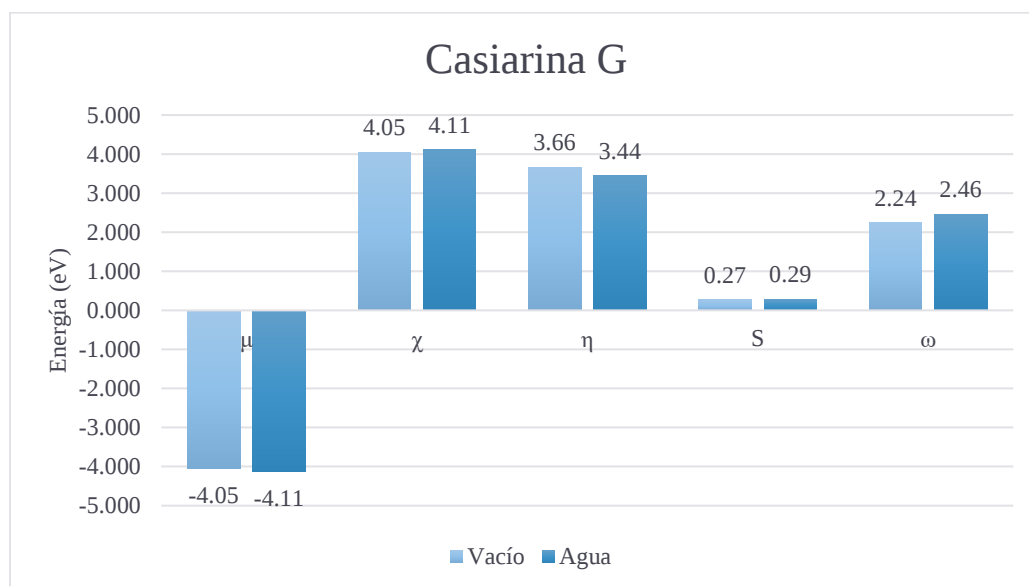


Figura 22. Gráfico de comparaciones de los parámetros de reactividad química global de la casiarina G en vacío y en disolvente implícito.

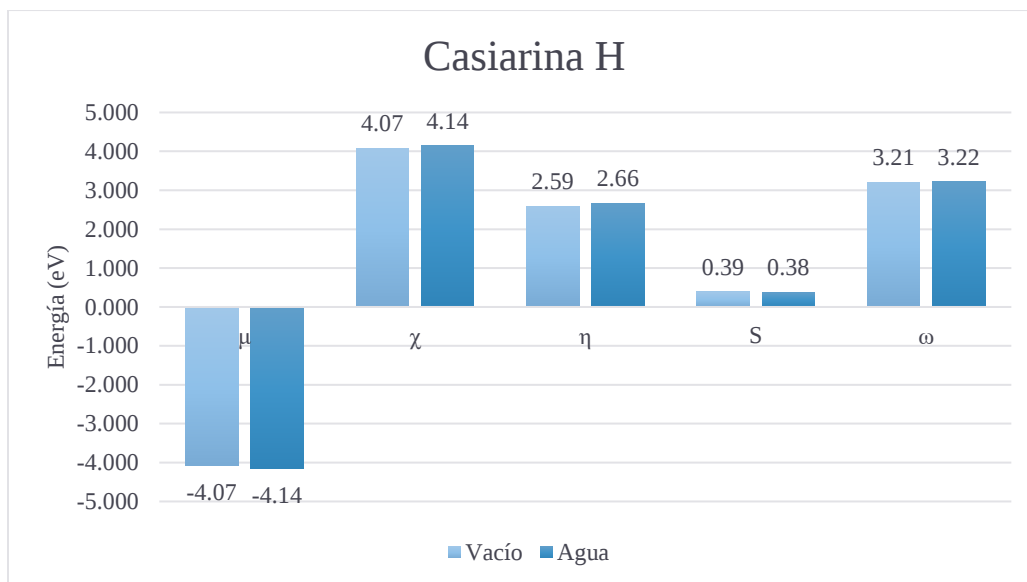


Figura 23. Gráfico de comparaciones de los parámetros de reactividad química global de la casiarina H en vacío y en disolvente implícito.

5.4 Acoplamiento molecular

En esta sección se recopilan y discuten los resultados de los cálculos de acoplamiento molecular empleando como blanco terapéutico a la proteína plasmepsina V de *Plasmodium vivax* (PvPMV) y como ligandos a las casiarinas B, D, G y H previamente optimizados considerando un modelo de solvatación implícita en agua, con el fin de aproximar un entorno más cercano a las condiciones biológicas. Adicionalmente, se presentan los resultados del acoplamiento molecular de las casiarinas B, G y H optimizadas en vacío (ver ANEXO B). Los ligandos elegidos para ambas fases fueron seleccionados con base en los valores obtenidos de los parámetros de reactividad química global, los cuales sugieren una mayor capacidad para establecer interacciones moleculares.

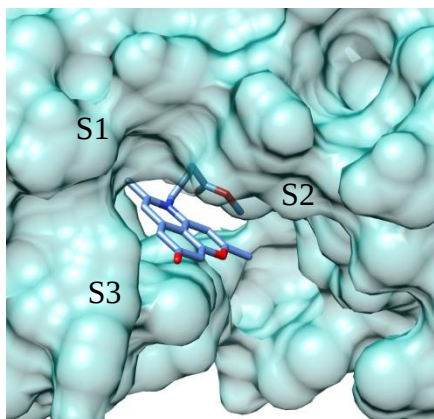
5.4.1 Acoplamiento molecular ciego con las casiarinas optimizadas en disolvente implícito en agua

ArgusLab

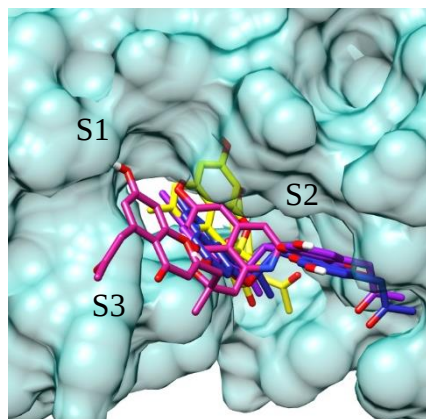
Los resultados obtenidos del acoplamiento molecular ciego entre las casiarinas optimizadas en disolución acuosa y la enzima plasmepsina V de *Plasmodium vivax* (PvPMV), realizados en ArgusLab, se presentan en la Figura 24. Para las casiarinas B, D, G y H se analizaron las

conformaciones con las energías de afinidad estimadas más favorables y su localización respecto al sitio activo de la proteína. En la casiarina B (Figura 24A) se presenta a la conformación con una energía de -7.90 kcal/mol, representada en color azul, que se localiza en el sitio activo de la proteína. Para la casiarina D (Figura 24B) se identificaron cuatro conformaciones dentro del sitio activo, con energías de afinidad de -9.63 , -8.74 , -7.94 y -7.92 kcal/mol, identificadas con los colores de amarillo, morado, azul medio y rojo violáceo, respectivamente. Estas conformaciones muestran una ocupación consistente del sitio activo, lo que sugiere una interacción favorable entre este ligando y la cavidad catalítica de PvPMV. En el caso de la casiarina G (Figura 24C) se observaron a tres conformaciones posicionadas en el sitio activo, con las energías de -7.93 (color rojo), -7.55 (color rosa) y -7.39 kcal/mol (color oro). Con respecto a la casiarina H (Figura 24D) se analizaron las dos conformaciones con las energías de afinidad más favorables, con valores de -8.41 y -7.47 kcal/mol, representadas en color azul marino y orquídea, respectivamente. Ambas conformaciones se encuentran localizadas en el sitio activo. De manera general, la casiarina D presentó las energías de afinidad estimadas más favorables en comparación con el resto de casiarinas estudiadas en este apartado, además de mostrar un mayor número de conformaciones localizadas en el sitio activo. Estos resultados sugieren una mayor complementariedad geométrica y energética entre este ligando y la cavidad catalítica de PvPMV dentro del marco del acoplamiento molecular.

(A)



(B)



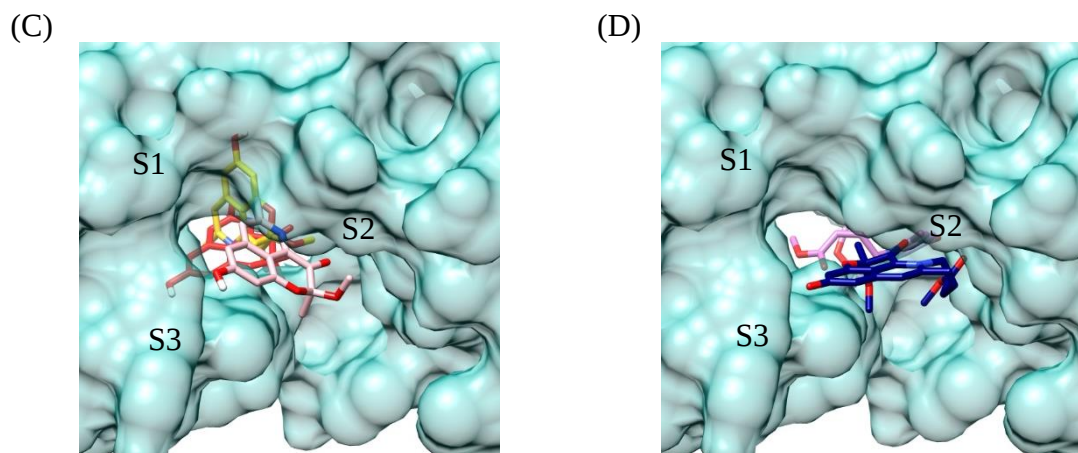


Figura 24. Representación tridimensional del acoplamiento molecular ciego de las casiarinas B, D, G y H con PvPMV (PDB: 4ZL4). Se muestran las conformaciones representativas obtenidas mediante ArgusLab, con visualización en UCSF Chimera.

En la Figura 25 se muestran las interacciones presentes en las mejores conformaciones seleccionadas para cada casiarina. En el caso de la casiarina B, se identificaron interacciones tipo alquilo con el residuo **Ile78**, el cual forma parte de la subcavidad S1, región clave para el reconocimiento de la leucina en la posición P1 de la secuencia PEXEL. La presencia de esta interacción sugiere que la casiarina B podría imitar parcialmente el reconocimiento del sustrato natural. Asimismo, se observaron enlaces carbono-hidrógeno con **Thr317**, residuo perteneciente a la subcavidad S2, así como **Gly315**, este último previamente reportado por su interacción con inhibidores de PvPMV [36, 38]. No obstante, también se observó una interacción estérica no favorable, lo que podría afectar la estabilidad relativa del complejo. Asimismo, se identificaron interacciones de van der Waals con los residuos **Gln183** y **Glu141** PvPMV, que forman parte de la subcavidad S3, región clave en la especificidad del sustrato, ya que participan en el reconocimiento de la arginina en la posición P3 del motivo PEXEL. Si bien estas interacciones son débiles, contribuyen a la estabilidad del ligando-receptor. Para la casiarina D se seleccionó la conformación con la mejor energía de afinidad, debido a que representa el complejo ligando-proteína más estable desde el punto de vista energético. Esta mostró interacciones π -anión con **Glu141**, π -par solitario con **Thr317**, un enlace de hidrógeno con **Asp313** y contacto de van der Waals con los residuos **Ile78**, **Gln183**, **Leu311**, **Val434**, **Ile439**, las cuales forman parte de las subcavidades S1, S2 y S3 de la plasmepsina V y participan de manera coordinada en el reconocimiento del motivo PEXEL. Con la casiarina G se eligió la conformación con una energía de afinidad de -7.55 kcal/mol,

ya que es la que presenta interacciones con los residuos clave: π -anión con **Thr317**, residuo perteneciente a la subcavidad S2, cuya ocupación completa se ha sugerido que puede incrementar significativamente la afinidad del inhibidor hacia la plasmepsina V. Asimismo, se observaron interacciones de tipo alquilo con **Ile78**, localizado en la subcavidad S1, región responsable del reconocimiento de la leucina en la posición P1 de la secuencia PEXEL. Sin embargo, también se identificó una interacción no favorable aceptor-aceptor, lo que podría reducir la estabilidad del complejo. Finalmente, con la casiarina H se muestra la conformación que obtuvo la mejor energía de afinidad, la cual tiene interacciones de enlace carbono-hidrógeno con **Glu141** y enlace de hidrógeno con **Thr317**, aminoácidos que conforman las subcavidades de S3 y S2, respectivamente.

Al comparar las interacciones observadas, se identificó que las casiarinas D y G comparten una interacción π -anión con **Glu141**, mientras que las casiarinas B y G presentan interacciones de tipo alquilo con **Ile78**. Estas similitudes sugieren patrones de interacción comunes dentro del sitio activo de PvPMV. En particular, **Glu141**, al formar parte de la subcavidad S3, participa en el reconocimiento de la arginina en la posición P3 del motivo PEXEL, mientras que **Ile78** perteneciente a la subcavidad S1, contribuye al reconocimiento de la leucina en la P1 de dicha secuencia.

Analizando estos resultados, la casiarina D es la que mostró el mayor número de interacciones con los residuos aminoácidos relevantes, además de establecer un enlace de hidrógeno con uno de los dos ácidos aspárticos involucrados en la hidrólisis de proteínas.

Esta observación podría estar relacionada con su mayor tamaño y complejidad estructural, al presentar un esqueleto tricíclico y bicíclico que le permite ocupar de manera más amplia la cavidad catalítica. Por el contrario, la casiarina G, mostró un menor número de interacciones con residuos claves y una energía de afinidad estimada menos favorable dentro del conjunto analizado.

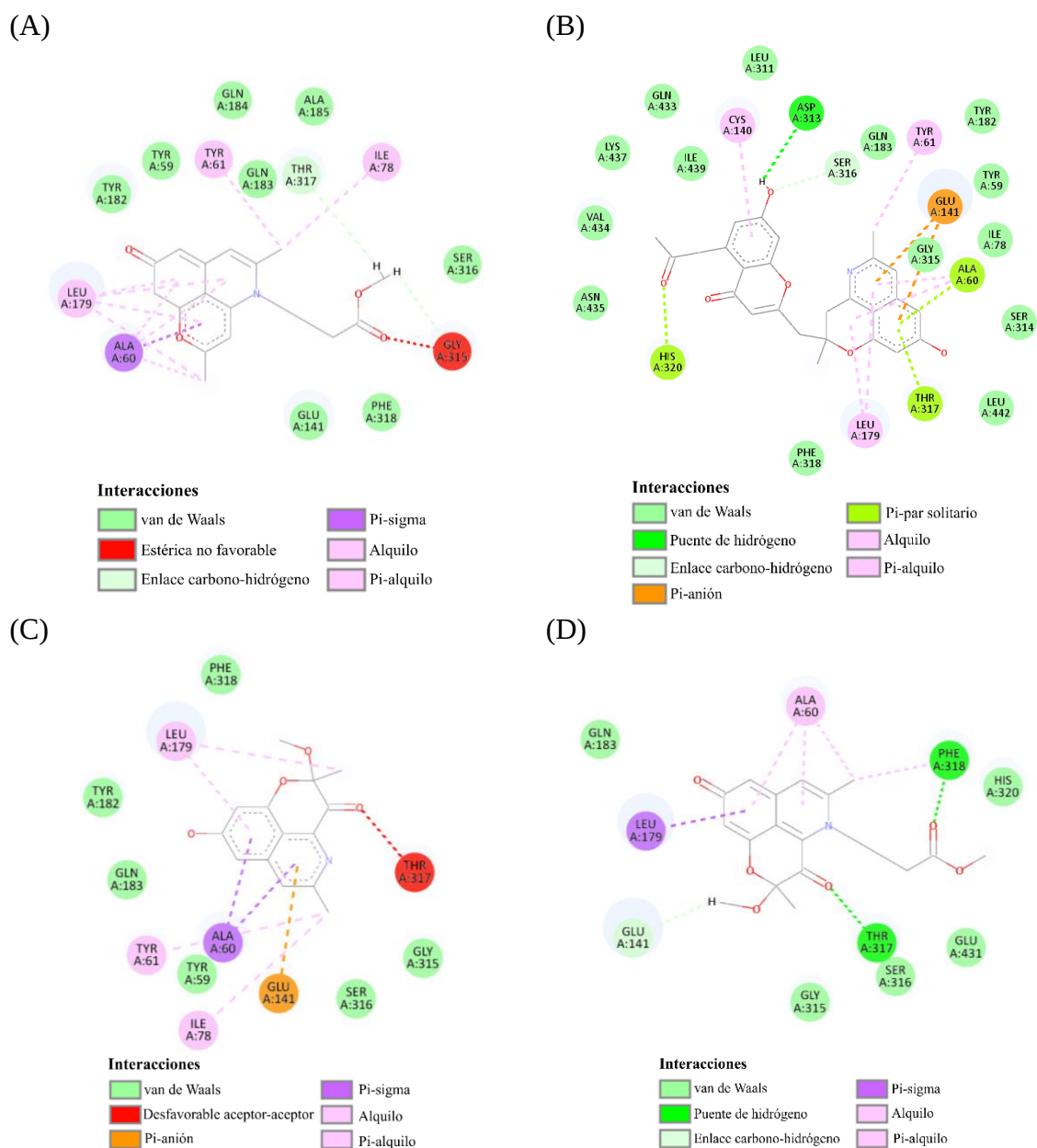


Figura 25. Interacciones de la casiarina B (A), casiarina D (B), casiarina G (C) y casiarina H (D) con los aminoácidos de la proteína PvPMV (ID PDB: 4ZL4) obtenidas del acoplamiento molecular ciego en ArgusLab, representados en 2D en Discovery Studio.

AutoDock4

En el acoplamiento molecular ciego de la casiarina B, se analizaron las conformaciones con los mejores valores de energía de afinidad, -4.24 y -4.20 kcal/mol, representados en los colores rojo ladrillo y verde oliva oscuro, respectivamente (Figura 26A). Con la casiarina D,

se identificó una conformación ubicada en el sitio activo con la energía de afinidad de -5.20 kcal/mol visualizada en color magenta oscuro (Figura 26B). La casiarina G solo una conformación se encuentra del sitio activo de la enzima, la cual se representa en color beige claro y su energía de afinidad es de -4.97 kcal/mol (Figura 26C). En la casiarina H se identificaron dos conformaciones presentes en el sitio catalítico, con las energías de afinidad de -4.62 y -3.65 kcal/mol (Figura 26D), con los colores rojo anaranjado y gris claro, respectivamente. De manera general, las energías de afinidad estimadas obtenidas mediante AutoDock4 son menos favorables en comparación con las calculadas en ArgusLab. No obstante, en ambos programas la casiarina D presentó la energía de afinidad estimada más favorable dentro del conjunto analizado, lo que sugiere una mayor complementariedad energética con la cavidad catalítica de PvPMV.

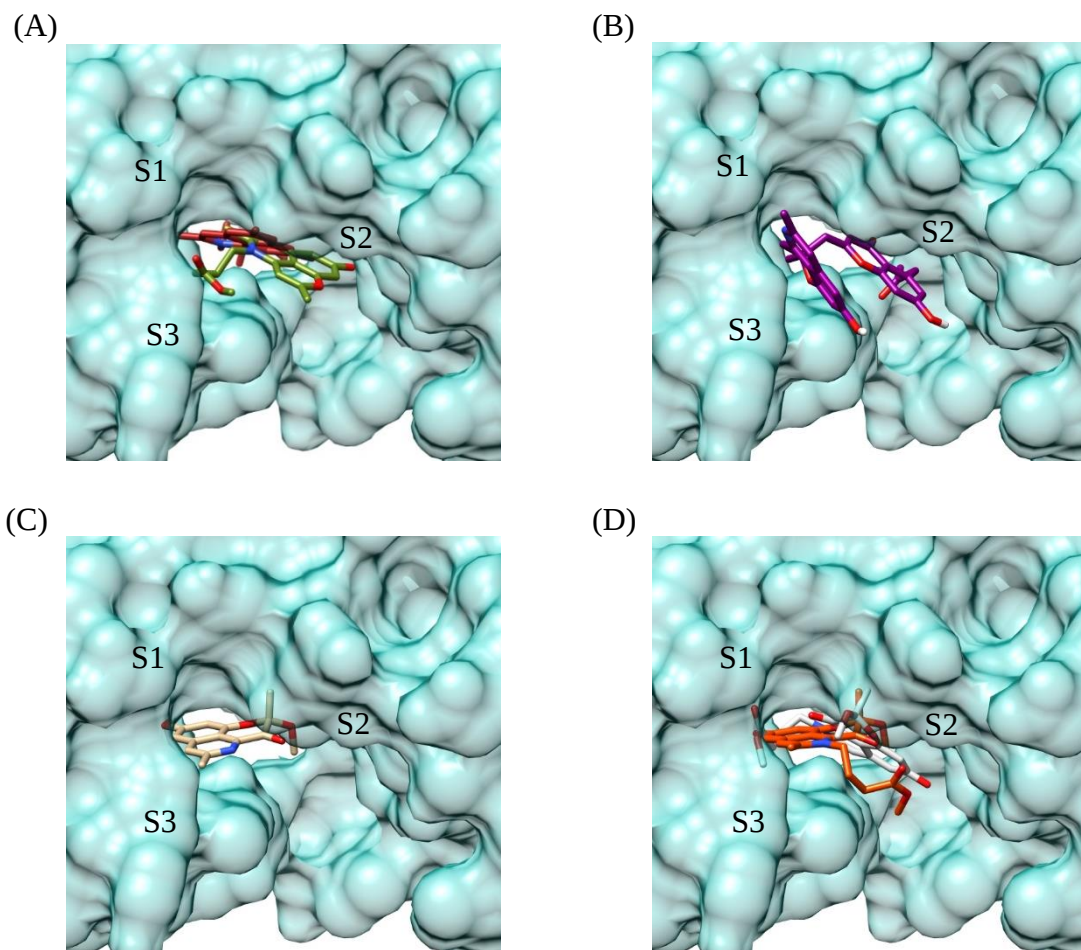


Figura 26. Representación tridimensional del acoplamiento molecular ciego de las casiarinas B, D, G y H con PvPMV (PDB: 4ZL4). Se muestran las conformaciones representativas obtenidas mediante AutoDock4, con visualización en UCSF Chimera.

En el caso de la casiarina V (Figura 27A), la conformación seleccionada presenta una interacción con π -alquilo con **Ile78** y una π - σ con **Tyr139**, ambos pertenecientes al subcavidad S1 (ver Figura 10). También presenta un puente de hidrógeno con **T317** y dos interacciones π -anión con **Glu141**, residuos localizados en los subcavidad S2 y S3, respectivamente. Además, se observan interacciones de van der Waals con **Val188**, **Ile439** y con los dos ácidos aspárticos **Asp80** y **Asp313**, estos últimos de especial relevancia catalítica dado que son los responsables de la hidrólisis de proteínas para la exportación de estas. No obstante, se identificó una interacción no favorable con **Tyr59**, lo que podría generar cierta desestabilización en el complejo. En el caso de la casiarina D (Figura 27B), las interacciones con los aminoácidos de interés incluyen un puente de hidrógeno con **Thr317**, el cual podría contribuir a su estabilidad dentro del sitio activo, así como una interacción con π -anión con **Glu141** y un enlace carbono hidrógeno con **Gln183**, estos dos residuos pertenecientes al subcavidad S3 (ver Figura 10). La conformación de la casiarina G (Figura 27C) tiene interacciones π -alquilo con **Ile78**, π -anión con **Glu141** y dos puentes de hidrógeno con **Thr317**, además de tener las interacciones de van der Waals con **Gln183** y **Val188**. Todos estos residuos forman parte de las subcavidades antes mencionados. Con la casiarina H (Figura 27D), se describen las interacciones de la primera conformación, ya que es la que muestra un mayor contacto con los residuos relevantes. En esta se observa una interacción π -alquilo con **Ile78**, una interacción π -anión con **Glu141** y dos puentes de hidrógeno con **Thr317**. Las interacciones de van der Waals involucran a **Tyr139**, **Gln183** y **Val188**. Sin embargo, presenta una interacción no favorable aceptor-aceptor con **Gly315**, lo que podría contribuir a la desestabilización del complejo ligando-receptor.

En conjunto, se observa que en las conformaciones de las cuatro casiarinas se presentan consistentemente puentes de hidrógeno con **Thr317** e interacción π -anión con **Glu141**, residuos que forman parte de los subcavidad S2 y S3 (ver Figura 10), respectivamente, de la enzima. Otra interacción recurrente en tres de las cuatro casiarinas es la π -alquilo con **Ile78** perteneciente a la subcavidad S1, así como **Leu179**, residuo que ha sido previamente reportado como participante en interacciones con el inhibidor WM36 [36], por lo que dichas interacciones con los aminoácidos mencionados parecen ser relevantes para el reconocimiento con la proteína. Como se mencionó anteriormente, la casiarina D es de las

que muestra un mayor número de interacciones con los residuos, además de tener interacciones tipo puente de hidrógeno que podrían conferirle una mayor estabilidad en el complejo ligando-receptor.

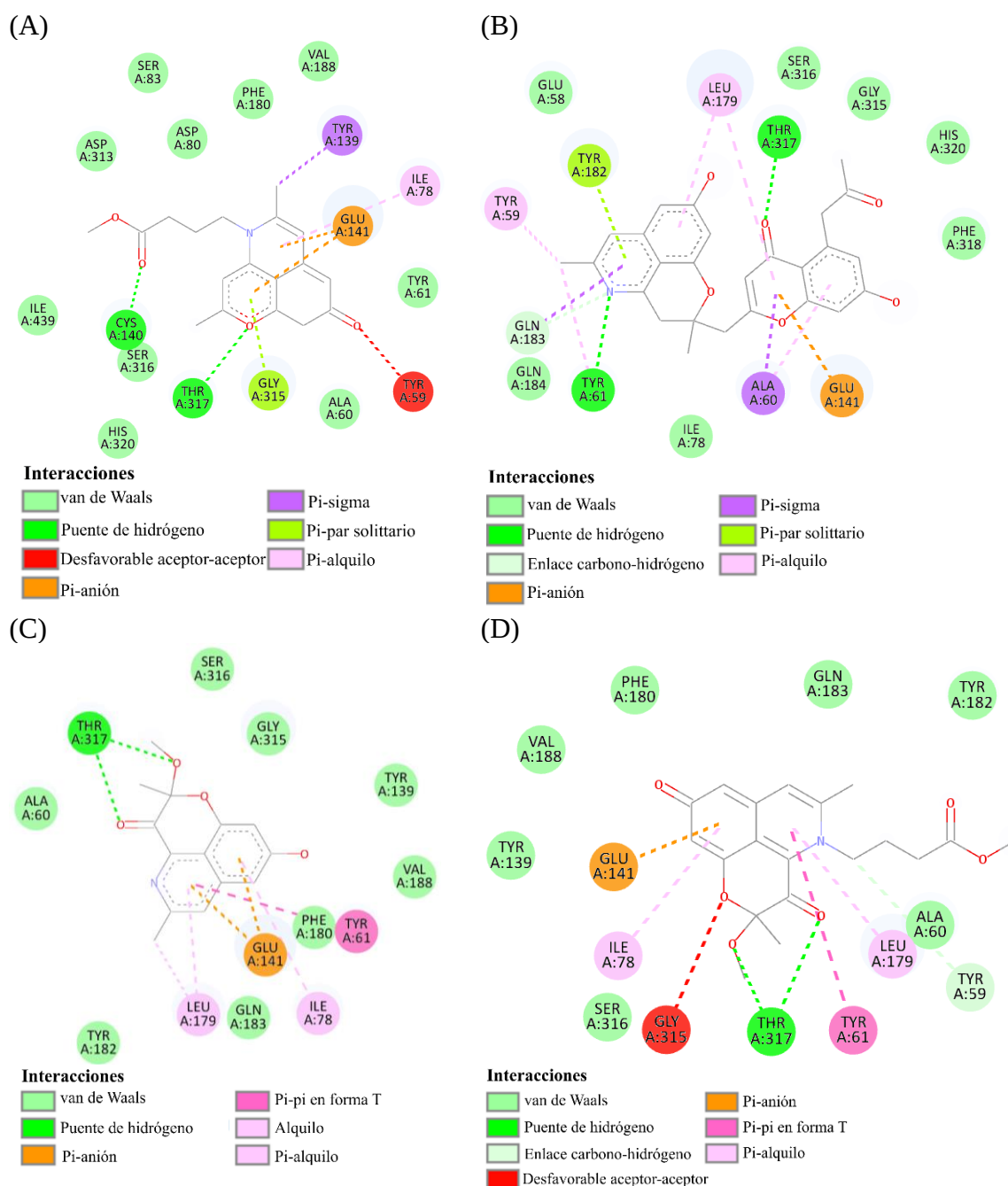


Figura 27. Interacciones de la casiarina B (A), casiarina D (B), casiarina G (C) y casiarina H (D) con los aminoácidos de la proteína PpPMV (ID PDB: 4ZL4) obtenidas del acoplamiento molecular ciego en AutoDock4, representados en 2D en Discovery Studio.

Se puede apreciar en la Tabla 6 la comparación de las interacciones obtenidas con los dos programas utilizados para el acoplamiento molecular ciego con las casiarinas optimizadas en fase acuosa. En la casiarina B no se comparten las interacciones para los mismos aminoácidos, aunque sí existen residuos en común, como el **Ile78**, que en ArgusLab presenta una interacción alquilo y en AutoDock4 de tipo π -alquilo. Con la casiarina D se observa la interacción de van der Waals con **Ile78** y la de π -anión con **Glu141**; además, el residuo **Thr317** muestra una interacción π -par solitario en uno de los programas y un enlace de hidrógeno en el otro. En la casiarina G se presenta la interacción de van der Waals con **Gln183** y la de π -anión con **Glu141**; asimismo en Arguslab se observa una interacción de alquilo con **Ile78**, mientras que en AutoDock4 corresponde a π -alquilo. Por último, en la casiarina H se reportan la interacción de van der Waals con **Gln183** y el enlace de hidrógeno con **Thr317**. El residuo **Glu141** aparece como interacción de enlace carbono-hidrógeno en uno de los programas y como interacción π -anión en el otro. En general, los compuestos que más comparten un mayor número de interacciones coincidentes entre ambos programas son las casiarinas D y G, particularmente la interacción de π -anión con el residuo de **Glu141**.

Tabla 6. Interacciones de las casiarinas optimizadas en disolvente implícito en agua con los aminoácidos de interés obtenidos en ArgusLab y AutoDock4.

Compuesto	ArgusLab	AutoDock4
	Interacciones con el aminoácido	
Casiarina B	van der Waals: Glu141, Gln183 Enlace carbono hidrógeno: Thr317 Alquilo: Ile78	van der Waals: Asp80, Val188, Asp313, Ile439 Enlace de hidrógeno: Thr317 π-anión: Glu141 π-alquilo: Ile78
Casiarina D	van der Waals: Ile78, Gln183, Val434, Ile439 Enlace de hidrógeno: Asp313 π-anión: Glu141 π-par solitario: Thr317	van der Waals: Ile78 Enlace de hidrógeno: Thr317 Enlace carbono hidrógeno: Gln183 π-anión: Glu141
Casiarina G	van der Waals: Gln183 Alquilo: Ile78 π-anión: Glu141 No favorable acceptor-acceptor: Thr317	van der Waals: Tyr139, Gln183, Val188 π-alquilo: Ile78 π-anión: Glu141 Enlace de hidrógeno: Thr317
Casiarina H	van der Waals: Gln183 Enlace de hidrógeno: Thr317 Enlace carbono-hidrógeno: Glu141	van der Waals: Gln183, Val188 π-anión: Glu141 π-alquilo: Ile78 Enlace de hidrógeno: Thr317

5.4.2 Acoplamiento molecular dirigido con las casiarinas optimizadas en disolvente implícito en agua.

AutoDock Vina

El acoplamiento molecular dirigido se realizó para las casiarinas B, D, G y H optimizadas en disolvente implícito en agua, las mismas empleadas previamente en los acoplamientos moleculares ciegos realizados con los programas en ArgusLab y AutoDock4. En este caso se utilizó el programa AutoDock Vina con el objetivo de analizar con mayor detalle las interacciones dentro del sitio activo previamente definido.

En el acoplamiento molecular dirigido de la casiarina B, se analizaron las dos conformaciones con las energías de afinidad estimadas más favorables y con mayor número de contactos con residuos de interés. La primera (Figura 28A) presentó una energía de afinidad estimada de -8.40 kcal/mol visualizada en color siena, mientras que en la segunda de color orquídea (Figura 28B) tiene un valor de -8.00 kcal/mol. Ambas conformaciones difieren notablemente en su orientación espacial dentro del sitio activo.

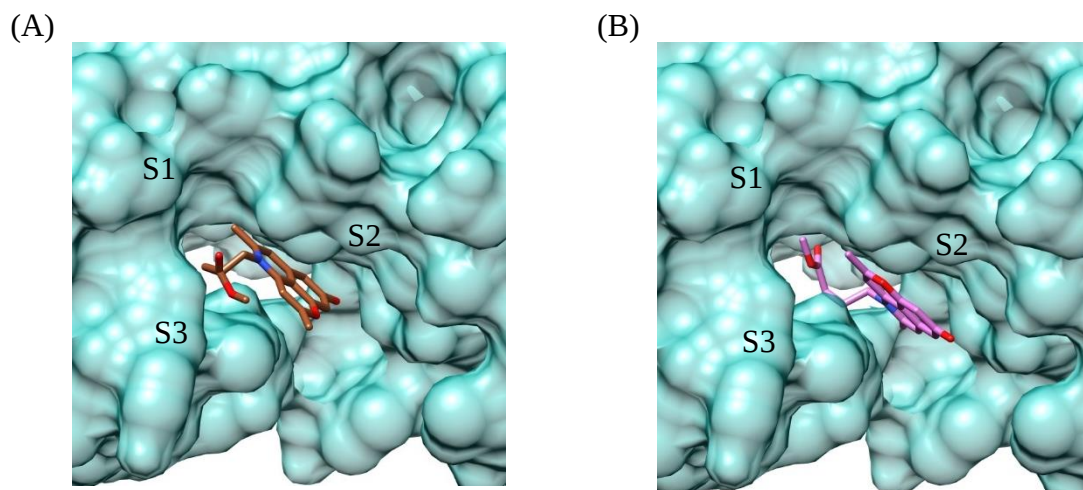


Figura 28. Representación tridimensional de la casiarina B, (A) Primera conformación, (B) segunda conformación. Visualizado en UCSF Chimera

Los residuos que interactúan con la primera conformación se muestran en las Figuras 29A y 30A. En esta pose, se observa una doble interacción π -anión con el residuo **Glu141**, con el sistema aromático con oxígeno y otra con el anillo adyacente; este residuo forma parte del

subcavidad S3 (ver Figura 10). Asimismo, se identificaron interacciones π -alquilo con **Ala60**, π - σ con **Leu179** y un puente de hidrógeno con **His320**. Las interacciones de van der Waals con los aminoácidos de interés son **Ile78**, **Gln183** y **Thr317**. En la segunda conformación, se presenta una interacción π -anión con el oxígeno del ácido carboxílico de **Gln141** y los electrones deslocalizados del sistema aromático. El residuo **Thr317** establece un puente de hidrógeno con el oxígeno del sistema aromático, además de dos interacciones de puente de hidrógeno donador- π con el mismo anillo. También se observa un enlace carbono-hidrógeno con **Gly315**. Las interacciones de van der Waals se establecen con los residuos de **Ile78**, **Tyr139**, **Ile439** y con los ácidos aspárticos catalíticos **Asp80** y **Asp313**.

En ambas conformaciones se conserva la interacción de π -anión entre **Glu141** y el sistema aromático con oxígeno, lo que resalta la importancia de la estructura del ligando en el proceso de reconocimiento en el sitio activo.

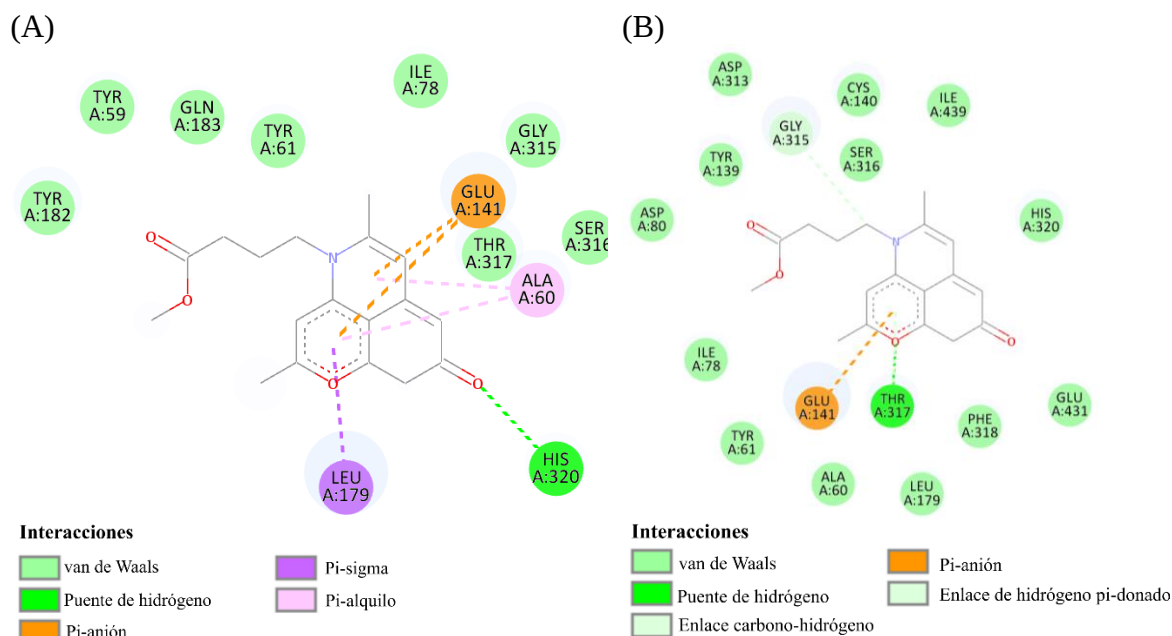


Figura 29. Interacciones de la casiarina B con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 2D en Discovery Studio.

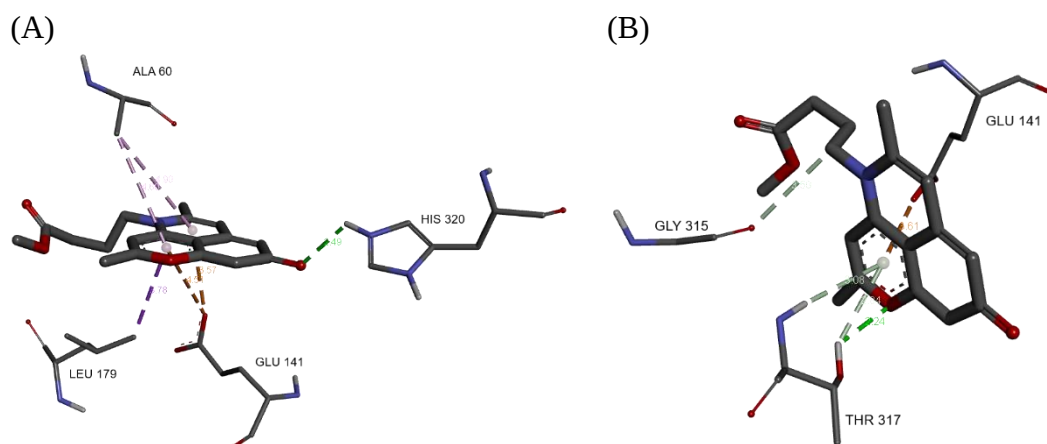


Figura 30. Interacciones de las conformaciones de la casiarina B con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 3D en Discovery Studio.

Los resultados obtenidos del acoplamiento molecular de la casiarina D, se presentan en la Figura 31, se muestran a las dos mejores conformaciones, las cuales tienen las energías de afinidad de -9.8 kcal/mol (Figura 31A) visualizada en color gris medio oscuro y -9.2 kcal/mol de color rojo oscuro (Figura 31B).

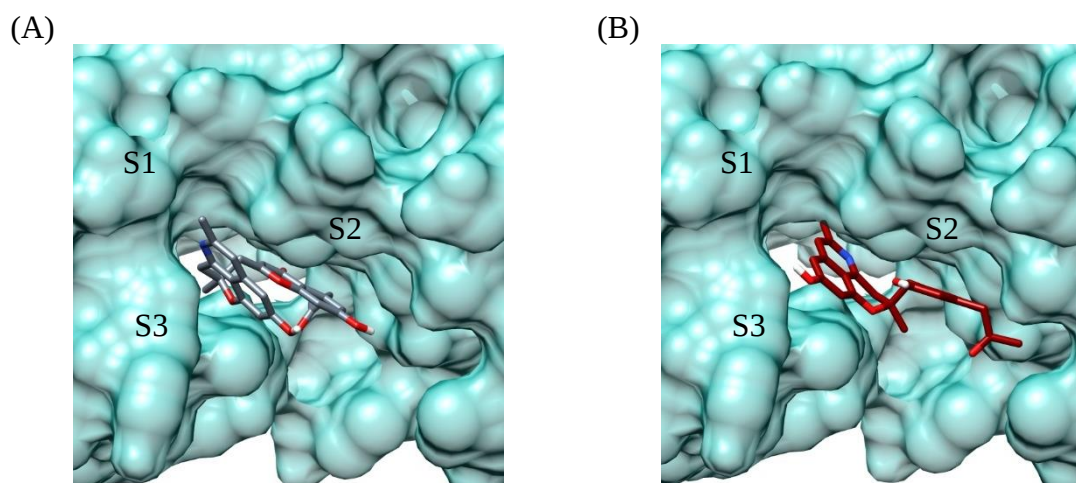


Figura 31. Estructura tridimensional del acoplamiento molecular dirigido de la casiarina D, realizado en AutoDock Vina y visualizado en UCSF Chimera. (A) Primera conformación y (B) segunda conformación.

Las interacciones correspondientes a las dos conformaciones reportadas se muestran en las Figuras 32 y 33. En la primera conformación (Figura 32A y 33A) se identifican dos

interacciones de puente de hidrógeno: uno con **Tyr61** y con **Thr317**, el cual se establece a través del oxígeno del sistema bicíclico. Además, se observa una interacción π -anión entre **Glu141** y el anillo del sistema bicíclico. Esta conformación también presenta diversas interacciones π -alquilo con los residuos **Tyr59**, **Ala60**, **Tyr61** y **Leu179**. En la segunda conformación (Figura 32 y 33B) se identifican dos puentes de hidrógeno con **Thr317**: uno con el nitrógeno del sistema tricíclico y otro con **Tyr182** mediante el hidrógeno del grupo hidroxilo del mismo sistema. También se presenta una interacción π -anión entre **Glu141** y el anillo piridínico fusionado. Adicionalmente, se observa una interacción tipo alquilo con **Ile78**, así como interacciones π -alquilo con **Ala60** y **Leu179**, no obstante, estos dos últimos residuos no son de especial relevancia, dado que no pertenecen a las subcavidades previamente descritos. Las interacciones que se repiten en ambas conformaciones son las de π -anión con **Glu141** y el puente de hidrógeno con **Thr317**; no obstante, en cada conformación estas interacciones se establecen con átomos distintos de la molécula. Asimismo, se observan interacciones π -alquilo con **Leu179** y **Ala60**, aunque estas no forman parte de las subcavidades antes mencionadas. Estas interacciones sugieren la relevancia de dichos residuos en el reconocimiento molecular dentro del sitio activo.

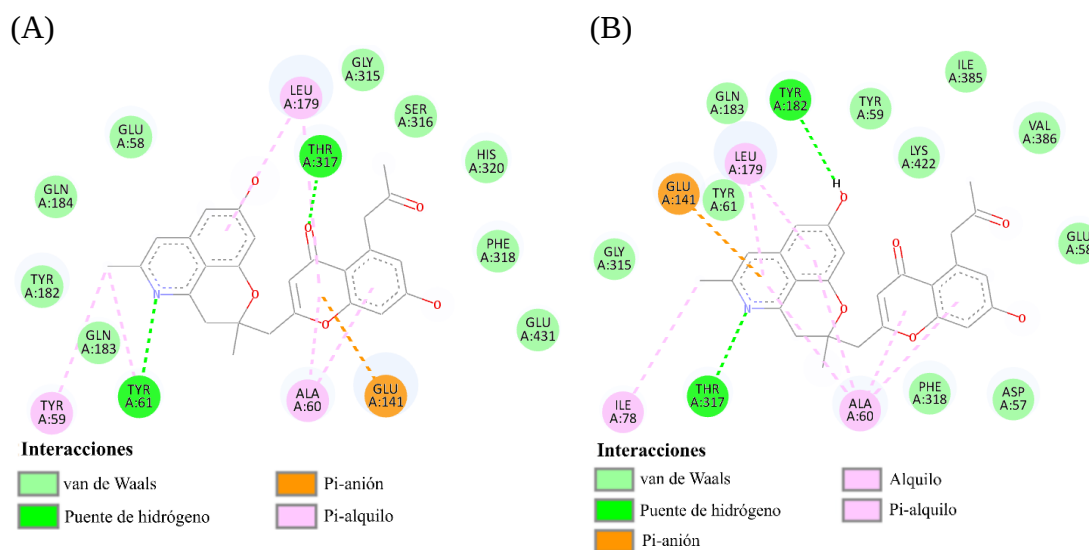


Figura 32. Interacciones de la casiarina D con los residuos de la enzima PvPMV (ID PDB: 4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en 2D en Discovery Studio.

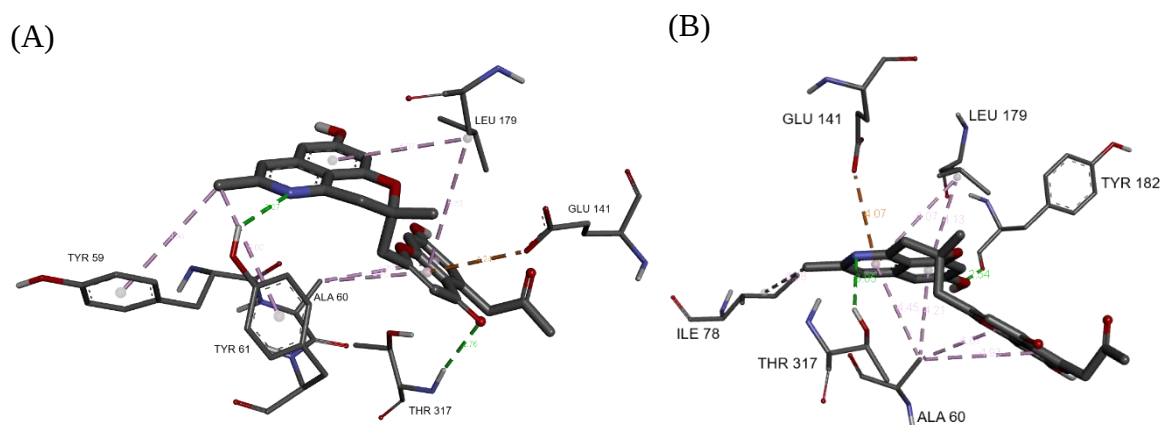


Figura 33. Interacciones de las conformaciones de la casiarina D con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en 3D en Discovery Studio.

Con la casiarina G, se muestran las dos conformaciones con las mejores energías de afinidad. La primera tiene una energía de afinidad de -7.2 kcal/mol de color azul acero (Figura 34A) y la segunda de -7.1 kcal/mol visualizada en color marrón rosado (Figura 34B),

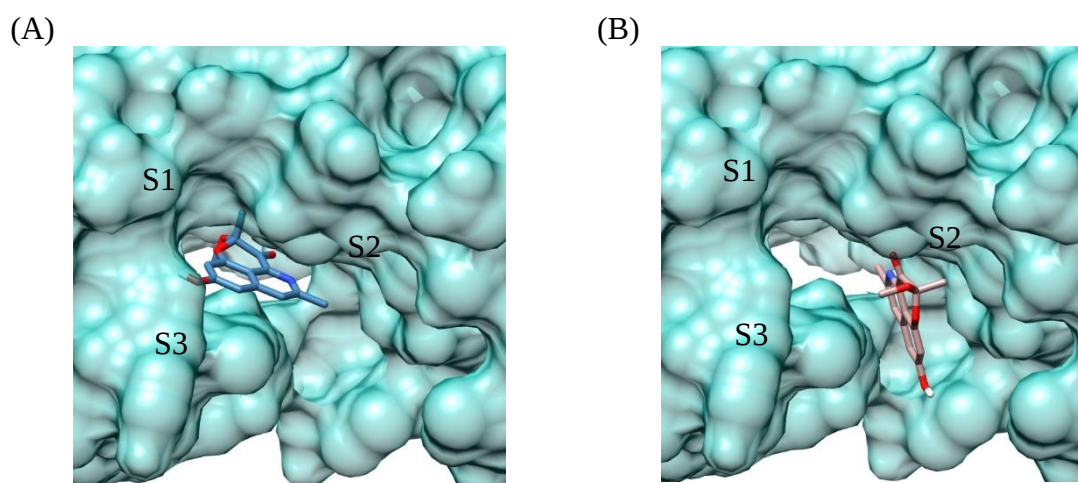


Figura 34. Estructura tridimensional del acoplamiento molecular dirigido de la casiarina G, realizado en AutoDock Vina y (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en Discovery Studio.

En la primera conformación (Figura 35A y 36A) se observa un enlace carbono-hidrógeno con el residuo **Glu141**, establecido entre el oxígeno del ácido carboxílico y el metilo del grupo éter. Además, se observa una interacción π -anión entre el mismo oxígeno y los

electrones deslocalizados del anillo piridínico. Se presenta igualmente un puente de hidrógeno entre **Thr317** y el nitrógeno del sistema tricíclico. Otras interacciones relevantes incluyen dos interacciones π -alquilo entre el residuo **Ala60** y dos de los anillos del sistema tricíclico y una interacción π - σ entre el residuo **Leu179** y los electrones deslocalizados del anillo piridínico. Asimismo, se presenta una interacción π -alquilo entre el mismo residuo y los electrones deslocalizados del anillo benzoico. Las interacciones de van der Waals con los residuos que forman parte de los subcavidad (ver Figura 10) son **Ile78** y **Glu141**. En la segunda conformación (Figura 35 y 36B), las interacciones principales con los residuos aminoacídicos de interés corresponden a tres puentes de hidrógeno con **Thr317**: dos de ellos con el oxígeno del doble enlace y uno con el oxígeno del éter. Otro residuo de importancia es el **Ile439**, que presenta una interacción de tipo alquilo con el sustituyente metilo del anillo piridínico. Adicionalmente, se observan interacciones con aminoácidos que no pertenecen a las subcavidades (ver Figura 10) previamente descritos, tales como una interacción π -catión con **His320** y una doble interacción de apilamiento amida- π con **Cys140**. Cuenta interacciones de van der Waals con los residuos **Glu141**, **Val434** y **Asp313**, este último de mucha importancia catalítica, dado que es uno de los ácidos aspárticos necesarios para la hidrólisis de proteínas. El residuo **Thr317** es el que repite la interacción de puente de hidrógeno en ambas conformaciones, sin embargo, se presenta en diferentes átomos de la casiarina.

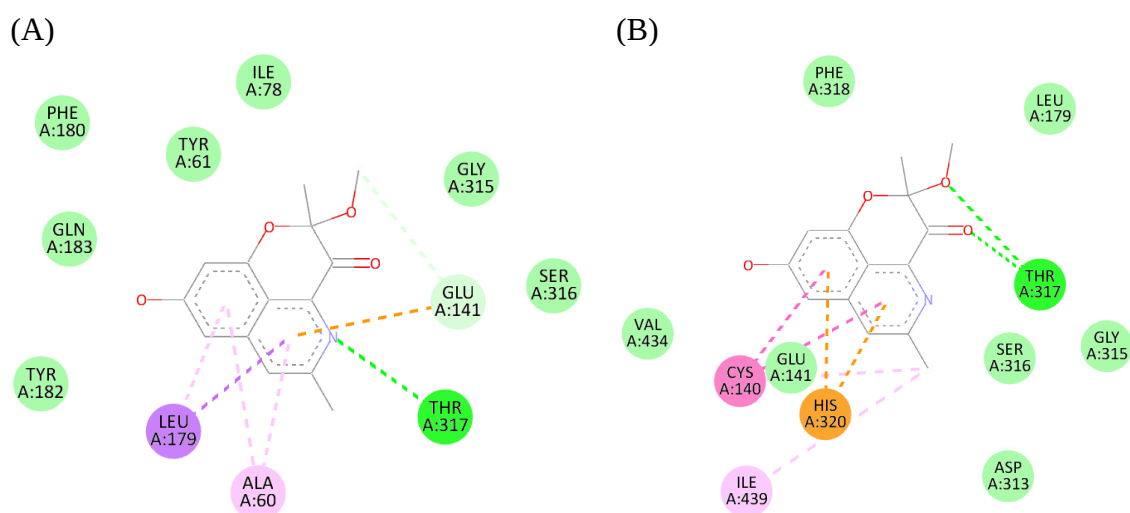




Figura 35. Interacciones de la casiarina G con los residuos de la enzima PvPMV (ID PDB: 4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 2D en Discovery Studio.

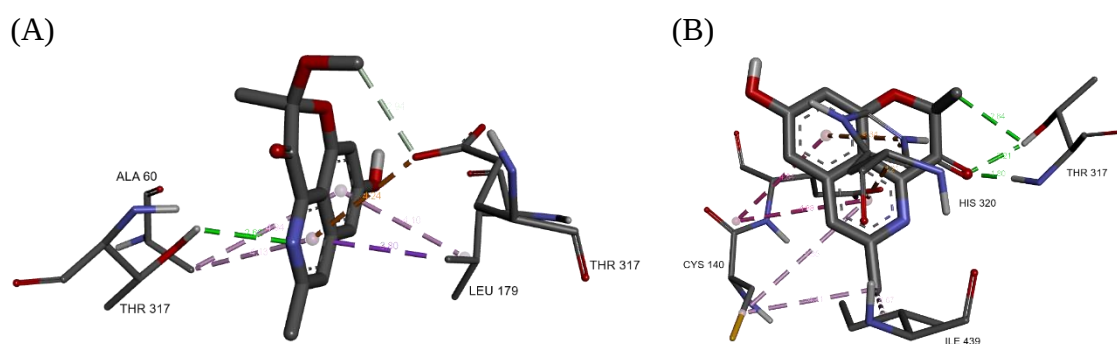


Figura 36. Interacciones de las conformaciones de la casiarina G con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 3D en Discovery Studio.

En el acoplamiento molecular dirigido de la casiarina H se analizaron las dos conformaciones que presentaron las interacciones más relevantes con los residuos del sitio activo. En la primera conformación (Figura 37A), la energía de afinidad fue de -7.5 kcal/mol de color púrpura medio, mientras que, en la segunda, de color gris pizarra oscuro (Figura 37B), fue de -7.00 kcal/mol. En ambos casos, las conformaciones se observan ligeramente desplazadas del sitio activo de la enzima.

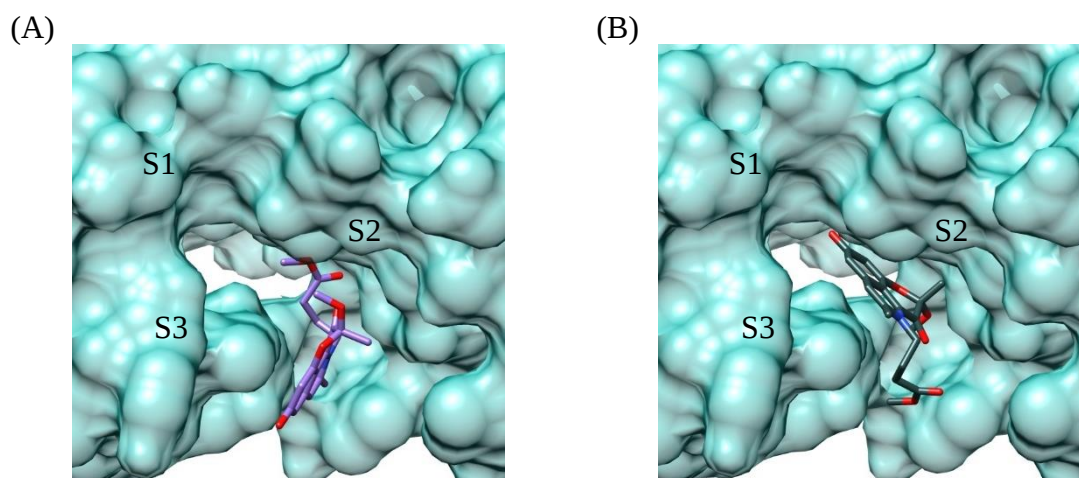


Figura 37. Representación tridimensional del acoplamiento molecular de la casiarina H (A) Primera conformación y (B) segunda conformación (ID PDB: 4ZL4). Obtenidas del acoplamiento molecular dirigido en AutoDock Vina, representados en 2D en Discovery Studio.

En la primera conformación (Figura 38A y 39A), se identifican interacciones π - σ con **Leu179**, así como puentes de hidrógeno con **His320** y con **Thr317**; este último se establece con el oxígeno del ácido carboxílico. También se observa una interacción no favorable aceptor-aceptor con **Ser316**, lo cual podría disminuir la estabilidad del complejo. También se observan interacciones de van der Waals con **Val434**, residuo que forma parte del subcavidad S2 (ver Figura 10). En la segunda conformación (Figura 38B y 39B), se observa un enlace carbono-hidrógeno entre **Glu141** y el metilo terminal del ácido carboxílico. Este mismo residuo establece una interacción π -anión con uno de los anillos del sistema tricíclico. Otras interacciones que se aprecian son π - σ con **Leu179**, π -alquilo con **Ala60** y un puente de hidrógeno con **His320**, sin embargo, estos residuos no se encuentran reportados como parte de las subcavidades (ver Figura 10). Las interacciones de van der Waals se presentan con **Ile78** y **Thr317**, ambos residuos forman parte de las subcavidades S1 y S2, respectivamente. En ambas conformaciones se conserva la interacción π - σ con **Leu179**, un puente de hidrógeno con **His320** y el enlace carbono hidrógeno con el mismo metilo.

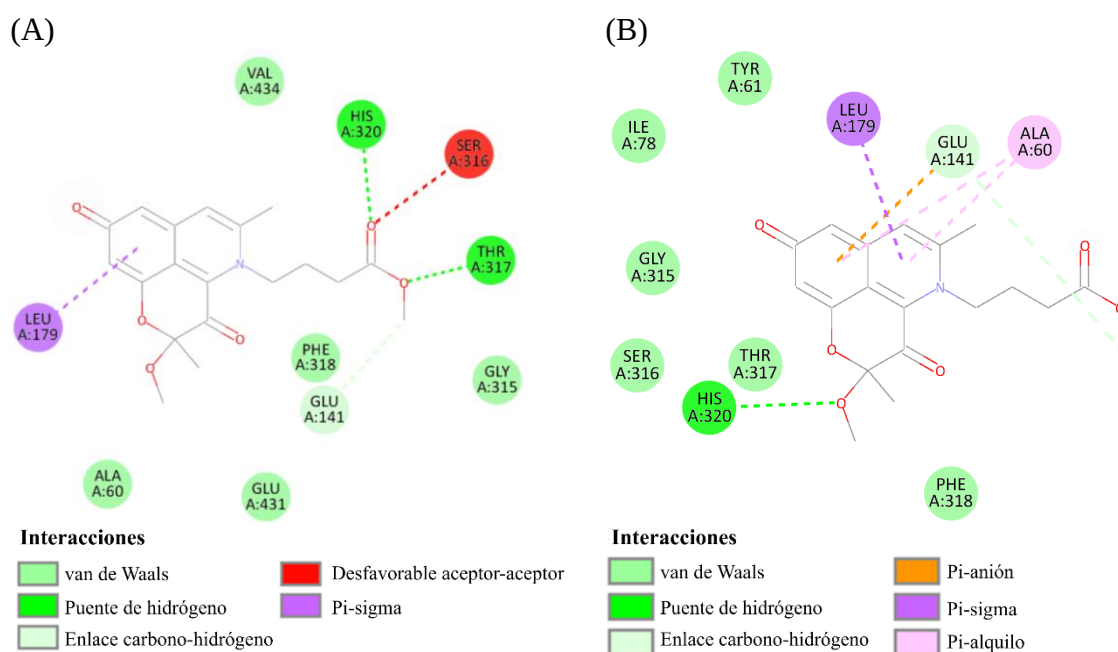


Figura 38. Interacciones de la casiarina H con los residuos de la enzima PvPMV (ID PDB: 4ZL4). (A) Primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en 2D en Discovery Studio.

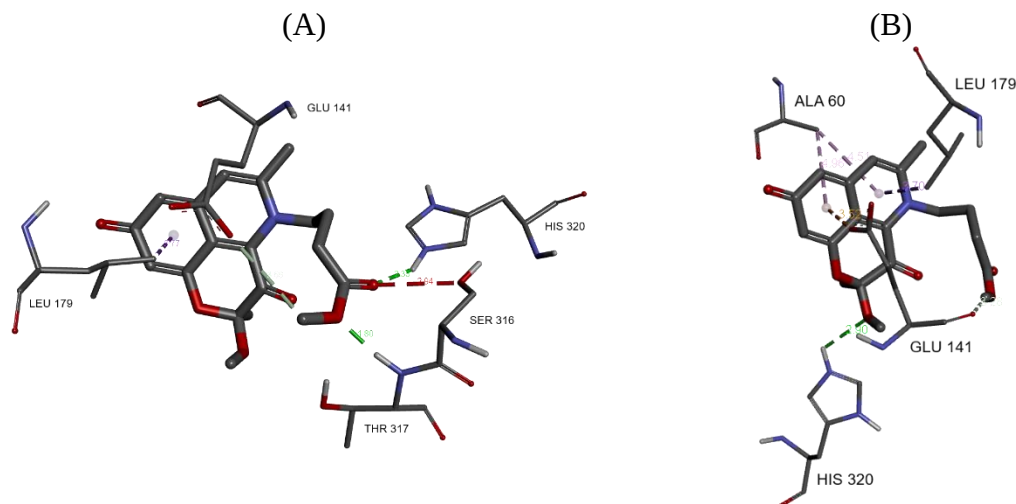


Figura 39. Interacciones en 3D de las conformaciones de la casiarina H con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en Discovery Studio.

La molécula con la mejor energía de afinidad fue la casiarina D, con un valor de -9.8 kcal/mol, además de presentar un mayor número de interacciones con los residuos aminoacídicos, seguida de la casiarina B con -8.4 kcal/mol. En conjunto, ambas muestran una mayor estabilidad dentro del complejo ligando-receptor. En las casiarinas B, D y G se observa consistentemente la interacción de π -anión con el residuo **Glu141**; en el caso de la casiarina H esta interacción se muestra en la segunda conformación. Es importante señalar que el **Glu141** forma parte del subcavidad S3 (ver Figura 10), lo que podría desempeñar un papel relevante en el reconocimiento de este tipo de compuestos. Otra interacción recurrente es el puente de hidrógeno con **Thr317**, presente en las casiarinas D, G y H. Este residuo se encuentra en el subcavidad S2 (ver Figura 10). En la casiarina B, la interacción se observa en la segunda conformación. En conjunto, esto indica que las casiarinas se caracterizan por tener estas interacciones con **Glu141** y **Thr317**. Asimismo, se identificó la interacción π -alquilo con **Ala60**, la cual se repite en las casiarinas B, D, G, y aparece en la casiarina H en su segunda conformación. Otra interacción observada es la π - σ con **Leu79**, presente en las casiarinas B, G y H. Aunque estos dos últimos residuos no están reportados como parte de

los subcavidad, su recurrencia sugiere que podría ser una característica adicional del modo de unión de las casiarinas en la enzima PvPMV.

Por lo que la casiarina D podría ser un inhibidor de la enzima PvPMV, ya que es la que tiene la mejor energía de afinidad, además de que en el acoplamiento molecular ciego presentó un puente de hidrógeno con **Asp313**, que es uno de los ácidos aspárticos necesarios para la incisión de la secuencia PEXEL. Otro compuesto que obtuvo interacciones con los residuos aminoacídicos de interés es la casiarina B, además que presentó una buena energía de afinidad, comparada con las otras dos.

En conjunto, los resultados del acoplamiento molecular muestran que las casiarinas presentan un patrón de reconocimiento consistente dentro del sitio activo de PvPMV, caracterizado principalmente por interacciones recurrentes con los residuos **Glu141** y **Thr317**, localizados en las subcavidades S3 y S2, respectivamente. Importantes para el reconocimiento de la secuencia PEXEL. La casiarina D destacó por presentar la mejor energía de afinidad y un mayor número de interacciones con residuos de interés, incluyendo **Asp313** en el acoplamiento molecular ciego, lo que sugiere un posible comportamiento inhibitorio. No obstante, las energías de afinidad deben interpretarse de manera cualitativa, ya que los cálculos no consideran explícitamente el estado de protonación ni el efecto del pH, factores relevantes en enzimas aspárticas. En este sentido, los resultados permiten identificar residuos clave y modos de unión recurrentes más que establecer afinidades absolutas, proporcionando una base estructural para estudios posteriores bajo condiciones fisiológicas más realistas.

5.5 Propiedades fisicoquímicas *in silico*

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas *in silico* para las casiarinas (Tabla 7). En el parámetro Log P, los valores oscilan entre 1.65 a 5.54, lo que indica que la mayoría de las casiarinas presentan un perfil de lipofilidad compatible con la permeabilidad pasiva a través de membranas biológicas. Las casiarinas D, E y F muestran los valores más elevados de Log P, lo que sugiere una mayor afinidad lipofílica, lo cual podría representar una posible limitación para su administración oral, debido a un impacto negativo en la solubilidad y biodisponibilidad. No obstante, es importante destacar que en este trabajo se reporta únicamente una predicción y que el servidor empleador genera cinco métodos distintos de estimación lipofílica; por ello, los valores pueden variar entre métodos. Los valores obtenidos

para Log S se encuentran -5.82 a -2.50 . con base a este rango, las casiarinas presentan una solubilidad que va de moderada a adecuada, lo que sugiere que estos compuestos podrían exhibir una absorción y distribución favorables en el organismo. Respecto al peso molecular, las casiarinas se encuentran en el rango de 213.23 a 445.46 g/mol, siendo la casiarina D la de mayor masa, lo que implica un mayor volumen molecular. Los enlaces aceptores de hidrógeno varían entre 2 y 5, mientras que los donadores se encuentran entre 0 y 3. El número de enlaces rotables va de 0 y 6; las casiarinas A, C y K no presentan enlaces rotables, por lo que son moléculas rígidas, lo cual podría dificultar su ajuste conformacional al unirse con un receptor. Las demás casiarinas presentan una rigidez moderada, lo que favorece su estabilidad conformacional y su capacidad de interacción con sitios activos proteicos. La accesibilidad sintética va de 2.79 a 4.51 , indicando que estos compuestos son desde fácilmente hasta moderadamente sintetizables. La casiarina E presenta el valor más alto, lo que sugiere una mayor complejidad sintética, coherente con su peso molecular y la presencia de dos sistemas tricíclicos fusionados. Todas las casiarinas cumplen con la regla de Lipinski [69], lo cual corrobora con los resultados mostrados en la Tabla 10, sin embargo, se observa que, en Log P, las casiarinas E y F parecen violar esta regla al presentar valores de 5.22 y 5.54 , respectivamente. Es importante señalar que el servidor SwissADME aplica el método MLOGP para determinar este criterio [67], mientras que en este trabajo solo se utilizó exclusivamente WLOGP. Por lo tanto, de acuerdo con la evaluación de SwissADME, se puede deducir que todas las casiarinas estudiadas presentan una adecuada capacidad para ser absorbidas de forma oral, incluyendo permeabilidad y absorción intestinal favorables.

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas, accesibilidad sintética y violación de la regla de Lipinski de las casiarinas.

Compuesto	Propiedades fisicoquímicas						Accesibilidad sintética	No. Violaciones de Lipinski
	Log P	Log S	Peso molecular (g/mol)	Aceptores de enlace de H (HBAs)	Donadores de enlace de H (HBDs)	Enlaces rotables		
Cas A	2.89	-3.30	213.23	3	1	0	2.96	0
Cas B	3.32	-2.77	313.35	4	0	5	2.79	0
Cas C	2.57	-3.29	215.25	3	1	0	2.95	0
Cas D	4.13	-4.86	445.46	7	2	4	4.39	0

Cas E	5.22	−5.82	426.46	6	2	2	4.51	0
Cas F	5.54	−5.52	427.45	6	3	3	3.76	0
Cas G	2.19	−3.16	259.26	5	1	1	3.13	0
Cas H	2.20	−2.5	359.37	6	0	6	3.67	0
Cas J	1.65	−2.88	333.34	7	2	4	3.93	0
Cas K	3.57	−3.71	247.68	3	1	0	3.06	0

CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este proyecto de tesis se estudió un grupo de casiarinas en interacción con la enzima PvPVM, que es esencial para el ciclo de vida del parásito *Plasmodium*, como posibles compuestos fitoquímicos con propiedades antimaláricas. En primer lugar, se realizaron cálculos de optimización y frecuencias vibracionales tanto en vacío como en disolvente implícito en agua. En estos cálculos, las moléculas que más se estabilizaron fueron las casiarinas B, D, E, F, H, J y G, debido al efecto del disolvente; además, estructuralmente presentaron conformaciones más compactas, lo que indica una mayor estabilidad estructural en presencia del disolvente.

En relación con los orbitales moleculares frontera, en vacío la **casiarina H** presentó el menor valor de ΔE_{gap} , lo que sugiere una mayor reactividad frente a otras especies químicas, mientras que la **casiarina C** mostró el mayor valor de ΔE_{gap} , asociado a una mayor estabilidad y menor reactividad. Este comportamiento general se mantuvo para las moléculas optimizadas en disolvente implícito en agua, sin embargo, en este medio en la **casiarina D** el valor de ΔE_{gap} disminuye considerablemente. De acuerdo con los parámetros de reactividad química global, en vacío las casiarinas con mayor tendencia a interactuar con otras especies químicas fueron principalmente **H, G y B**, mientras que en disolvente implícito en agua este comportamiento se observó en las casiarinas **H, G, B y F**.

En el acoplamiento molecular ciego con las **casiarinas B, D, G y H** optimizadas en disolución acuosa —también seleccionadas con base en los parámetros de reactividad química— se llevó a cabo utilizando ArgusLab y AutoDock4. En ambos programas se observó que la casiarina D presentó la mejor energía de afinidad de -9.63 kcal/mol y -5.20 kcal/mol, además de establecer el mayor número de interacciones con los residuos aminoacídicos del sitio activo, incluyendo un enlace de hidrógeno con el residuo Asp313, uno de los dos ácidos aspárticos catalíticos involucrados en la hidrólisis de proteínas durante el ciclo de vida del parásito *Plasmodium*. En el resto de las casiarinas se identificó de manera recurrente la interacción π -anión con **Glu141** y puente de hidrógeno con **Thr317**, observándose con mayor frecuencia en los resultados obtenidos con AutoDock4. En el acoplamiento molecular dirigido, la casiarina D también presentó la mejor energía de afinidad, seguida de la casiarina B, manteniéndose las interacciones π -anión con el residuo

Glu141 y puente de hidrógeno con **Thr317**. Con base en estos resultados, la **casiarina D** se perfila como el posible inhibidor más prometedor de la enzima *PvPMV*, seguida de la **casiarina B**.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas *in silico* y considerando la regla de Lipinski, evaluadas mediante el servidor SwissADME, se puede concluir que todas las casiarinas estudiadas presentan una adecuada capacidad para ser absorbidas por vía oral. Asimismo, los valores de accesibilidad sintética indican que estos compuestos se encuentran en un rango de fácil a moderadamente sintetizables, lo que refuerza su potencial como candidatos a fármacos.

Como perspectivas del proyecto sería recomendable en futuros trabajos:

1. Extender los estudios de solvatación empleando tanto modelos implícitos como explícitos con diferentes disolventes.
2. Validar los mínimos de energía mediante con algún método teórico, para garantizar que las geometrías optimizadas corresponden a verdaderos mínimos.

Los hallazgos de esta investigación abren varias líneas de trabajo en un futuro, entre las que destacan:

- Realizar estudios de dinámica molecular para evaluar la flexibilidad conformacional de las casiarinas y su posible influencia en la interacción con blancos biológicos.
- Extender el estudio a otros compuestos con actividad antimalárica reportados en plantas nativas de México y del continente americano.

CAPITULO VII. REFERENCIAS

- [1] Paludismo. (2024, diciembre 11). *Organización Mundial de la Salud*. Página web <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. (último acceso 10 de octubre de 2025)
- [2] The Editors of Encyclopaedia britannica. (s. f.). Anopheles. Encyclopaedia Britannica. Página web: <https://www.britannica.com/animal/Anopheles#/media/1/26605/321507> (último acceso 22 de agosto de 2025)
- [3] World Health Organization. (2024). World malaria report 2024: Addressing inequity in the global malaria response.
- [4] Kingston, D. G. I., & Cassera, M. B. (2022). Antimalarial Natural Products (Vol. 117). Springer Nature Switzerland.
- [5] Cox, F. E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-5>
- [6] Tse, E. G., Korsik, M., & Todd, M. H. (2019). The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malaria Journal*, 18:93(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>
- [7] Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research group. (1979). ANTIMALARIA STUDIES ON QINGHAOSU. *Chinese Medical Journal*, 92(12), 811–816. <https://doi.org/10.5555/cmj.0366-6999.92.12.p811.01>
- [8] Rathod, G. K., Jain, M., Sharma, K. K., Das, S., Basak, A., & Jain, R. (2022). New structural classes of antimalarials. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 242, 114653. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114653>
- [9] Achan, J., Talisuna, A. O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J. K., Baliraine, F. N., Rosenthal, P. J., & D'Alessandro, U. (2011). Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10(1), 144. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-144>
- [10] Flores Cisneros, L. A., & Vidal Aguirre, D. (2025, agosto 1). Informe Quincenal de Vigencia Epidemiológica de Paludismo 2025. Secretaría de Salud. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informe-quincenal-de-vigilancia-epidemiologica-de-paludismo-2025> (último acceso, 04 de diciembre de 2025)
- [11] Aguilar Contreras, A., Camacho Pulido, J. R., Chino Vargas, S., Jacquez Ríos, P., & López Villafranco, M. E. (1998). Plantas medicinales del herbario IMSS: Su distribución por enfermedades. Instituto Mexicano del Seguro Social/Grupo Roche Syntex.
- [12] Hanan Alipi, A. M., & Mondragón Pichardo, J. (2009, agosto 16), Malezas de México, Asteraceae Parthenium hysterophorus L., fecha de acceso 2025, julio 08, <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/parthenium-hysterophorus/fichas/ficha.htm>
- [13] Frei, B., Baltisberger, M., Sticher, O., & Heinrich, M. (1998). Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(2), 149–165. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00051-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00051-8)
- [14] Hanan Alipi, A. M., & Mondragón Pichardo, J. (2010, junio 24), Malezas de México, Verbenaceae Lippia alata Kunth, fecha de acceso 2025, agosto 08, <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/verbenaceae/lippia-alata/fichas/ficha.htm#9.%20Referencias>

- [15] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2024). Bálsama amarillo. Enciclovida. Recuperado el 8 de julio de 2025, de <https://enciclovida.mx/especies/239571>
- [16] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2024). Damiana. Enciclovida. Recuperado el 8 de julio de 2025, de <https://enciclovida.mx/especies/6031798>
- [17] Hanan Alipi, A. M., & Mondragón Pichardo, J. (2009, agosto 10), Malezas de México, Rubiaceae *Hamelia patens* Jacq, fecha de acceso 2025, julio 08, <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rubiaceae/hamelia-patens/fichas/pagina1.htm>
- [18] Lizama García, E. del A., Castro, M. E., Caballero, N. A., Scior, T., & Meléndez, F. J. (2025). Las plantas: una oportunidad de tratamiento para la malaria. Manuscrito de divulgación científica, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- [19] Organización Panamericana de la Salud & Organización Panamericana de la Salud. (2025). Directrices de la OMS sobre la malaria, 25 de noviembre del 2022. 439 p.
- [20] Tajuddeen, N., & Van Heerden, F. R. (2019). Antiplasmodial natural products: An update. *Malaria Journal*, 18(1), 404. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-3026-1>
- [21] Salinas, N. D., Tang, W. K., & Tolia, N. H. (2019). Blood-Stage Malaria Parasite Antigens: Structure, Function, and Vaccine Potential. *Mechanisms and Strategies of Host Response to Pathogens*, 431(21), 4259-4280. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.018>
- [22] Balaji, S. N., Deshmukh, R., & Trivedi, V. (2020). Severe malaria: Biology, clinical manifestation, pathogenesis and consequences. *Journal of Vector Borne Diseases*, 57(1). https://journals.lww.com/jvbd/fulltext/2020/57010/severe_malaria__biology,_clinical_manifestation,.1.aspxhttps://journals.lww.com/jvbd/fulltext/2020/57010/severe_malaria__biology,_clinical_manifestation,.1.aspx
- [23] Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L., & del Portillo, H. A. (2009). Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(9), 555–566. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
- [24] Anstey, N. M., Tham, W.-H., Shanks, G. D., Poespoprodjo, J. R., Russell, B. M., & Kho, S. (2024). The biology and pathogenesis of vivax malaria. *Trends in Parasitology*, 40(7), 573–590. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2024.04.015>
- [25] Nasamu, A. S., Polino, A. J., Istvan, E. S., & Goldberg, D. E. (2020). Malaria parasite plasmepsins: More than just plain old degradative pepsins. *Journal of Biological Chemistry*, 295(25), 8425–8441. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.009309>
- [26] Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W.-H., Wilson, D., Nebl, T., Marapana, D., Triglia, T., Wong, W., Rogers, K. L., & Cowman, A. F. *Cell Host & Microbe*, **2016**, 20(1), 60–71.
- [27] Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalerpaisarn, T., Tham, W.-H., de Jong, N. W. M., Harvey, K. L., Fowkes, F. J. I., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2015). Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *PLOS Pathogens*, 11(2), e1004670. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004670>

- [28] Behl, T., Kumar, K., Brisc, C., Rus, M., Nistor-Cseppento, D. C., Bustea, C., Aron, R. A. C., Pantis, C., Zengin, G., Sehgal, A., Kaur, R., Kumar, A., Arora, S., Setia, D., Chandel, D., & Bungau, S. (2021). Exploring the multifocal role of phytochemicals as immunomodulators. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110959. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110959>
- [29] Hu, Y., Lin, Q., Zhao, H., Li, X., Sang, S., McClements, D. J., Long, J., Jin, Z., Wang, J., & Qiu, C. (2023). Bioaccessibility and bioavailability of phytochemicals: Influencing factors, improvements, and evaluations. *Food Hydrocolloids*, 135, 108165. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108165>
- [30] Amoa Onguéné, P., Ntie-Kang, F., Lifongo, L. L., Ndom, J. C., Sippl, W., & Mbaze, L. M. (2013). The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants. Part I: A pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids. *Malaria Journal*, 12(1), 449. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-449>
- [31] Morita, H., Oshimi, S., Hirasawa, Y., Koyama, K., Honda, T., Ekasari, W., Indrayanto, G., & Zaini, N. C. (2007). Cassiarins A and B, Novel Antiplasmodial Alkaloids from *Cassia siamea*. *Organic Letters*, 9(18), 3691–3693. <https://doi.org/10.1021/ol701623n>
- [32] Negi, A., Bhandari, N., Shyamlal, B. R. K., & Chaudhary, S. (2018). Inverse docking based screening and identification of protein targets for Cassiarin alkaloids against *Plasmodium falciparum*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(4), 546–567. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.017>
- [33] Dreamstime. (s.f.). Árbol de Cassod (*Cassia siamea*) [Fotografía]. Recuperado de <https://es.dreamstime.com/imagenes-de-archivo-%C3%A1rbol-de-cassod-siamea-de-la-casia-o-sen-siam%C3%A9s-image34037044>
- [34] Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M., & Goldberg, D. E. (2002). Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), 990–995. <https://doi.org/10.1073/pnas.022630099>
- [35] Cheuka, P. M., Dziwornu, G., Okombo, J., & Chibale, K. (2020). Plasmepsin Inhibitors in Antimalarial Drug Discovery: Medicinal Chemistry and Target Validation (2000 to Present). *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(9), 4445–4467. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01622>
- [36] Hodder, A. N., Sleebs, B. E., Adams, G., Rezazadeh, S., Ngo, A., Jarman, K., Scally, S., Czabotar, P., Wang, H., McCauley, J. A., Olsen, D. B., & Cowman, A. F. (2025). Structure–activity analysis of imino-pyrimidinone-fused pyrrolidines aids the development of dual plasmepsin V and plasmepsin X inhibitors. *The FEBS Journal*, 292(11), 2843–2864. <https://doi.org/10.1111/febs.70038>
- [37] Ji, X., Wang, Z., Chen, Q., Li, J., Wang, H., Wang, Z., & Yang, L. (2022). In Silico and In Vitro Antimalarial Screening and Validation Targeting *Plasmodium falciparum* Plasmepsin V. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092670>
- [38] Hodder, A. N., Sleebs, B. E., Czabotar, P. E., Gazdik, M., Xu, Y., O'Neill, M. T., Lopaticki, S., Nebl, T., Triglia, T., Smith, B. J., Lowes, K., Boddey, J. A., & Cowman, A. F. (2015). Structural basis for plasmepsin V inhibition that blocks export of malaria proteins to human erythrocytes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(8), 590–596. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3061>
- [39] Boddey, J. A., Hodder, A. N., Günther, S., Gilson, P. R., Patsiouras, H., Kapp, E. A., Pearce, J. A., de Koning-Ward, T. F., Simpson, R. J., Crabb, B. S., & Cowman, A. F.

- (2010). An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature*, 463(7281), 627–631. <https://doi.org/10.1038/nature08728>
- [40] Sleebs, B. E., Lopaticki, S., Marapana, D. S., O'Neill, M. T., Rajasekaran, P., Gazdik, M., Günther, S., Whitehead, L. W., Lowes, K. N., Barfod, L., Hviid, L., Shaw, P. J., Hodder, A. N., Smith, B. J., Cowman, A. F., & Boddey, J. A. (2014). Inhibition of Plasmeprin V Activity Demonstrates Its Essential Role in Protein Export, PfEMP1 Display, and Survival of Malaria Parasites. *PLOS Biology*, 12(7), e1001897. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001897>
- [41] Nguyen, W., Hodder, A. N., de Lezongard, R. B., Czabotar, P. E., Jarman, K. E., O'Neill, M. T., Thompson, J. K., Jousset Sabroux, H., Cowman, A. F., Boddey, J. A., & Sleebs, B. E. (2018). Enhanced antimalarial activity of plasmeprin V inhibitors by modification of the P2 position of PEXEL peptidomimetics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 154, 182–198. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.022>
- [42] Nguyen, W., Hodder, A. N., de Lezongard, R. B., Czabotar, P. E., Jarman, K. E., O'Neill, Ogungbe, I. V., Ng, J. D., & Setzer, W. N. (2013). Interactions of Antiparasitic Alkaloids with Leishmania Protein Targets: A Molecular Docking Analysis. *Future Medicinal Chemistry*, 5(15), 1777–1799. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.114>
- [43] Frau, J., & Glossman-Mitnik, D. (2017). Conceptual DFT Descriptors of Amino Acids with Potential Corrosion Inhibition Properties Calculated with the Latest Minnesota Density Functionals. *Frontiers in Chemistry*, 5, 16. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00016>
- [44] Baseden, K. A., & Tye, J. W. (2014). Introduction to Density Functional Theory: Calculations by Hand on the Helium Atom. *J. Chem. Educ.*, 91(12), 2116–2123. <https://doi.org/10.1021/ed5004788>
- [45] Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*, 136(3B), B864–B871. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864>
- [46] Kohn, W., & Sham, L. J. (1965). Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*, 140(4A), A1133–A1138. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.140.A1133>
- [47] Parr, R.G., Yang, W. (1989) Density-Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford Univ. Press, New York.
- [48] Becke, A. D. (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exchange. *Journal of Chemical Physics*. 98: 5648-5652.
- [49] Binkley J.S., Pople J.A., Hehre W J. (1980) Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 21. Small Split-Valence Basis Sets for First-Row Elements, *J. Am. Chem. Soc.* 102: 939-947.
- [50] Hariharan, P. C., Pople, J. (1974). Accuracy of AH n equilibrium geometries by single determinant molecular orbital theory. *Mol. Phys.*, 27(1), 209-214.
- [51] Levine IN (2001) Química Cuántica, 5ta ed. Pearson Educación, S.A. Prentice Hall, Madrid, España
- [52] Pearson, R. G. (1986). Absolute electronegativity and hardness correlated with molecular orbital theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(22), 8440-8441. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8440>
- [53] Domingo, L. R., Ríos-Gutiérrez, M., & Pérez, P. (2016). Applications of the Conceptual Density Functional Theory Indices to Organic Chemistry Reactivity. *Molecules*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/molecules21060748>

- [54] Parr, R. G., Donnelly, R. A., Levy, M., & Palke, W. E. (1978). Electronegativity: The density functional viewpoint. *The Journal of Chemical Physics*, 68(8), 3801–3807. <https://doi.org/10.1063/1.436185>
- [55] Parr, R. G., & Pearson, R. G. (1983). Absolute hardness: Companion parameter to absolute electronegativity. *Journal of the American Chemical Society*, 105(26), 7512–7516. <https://doi.org/10.1021/ja00364a005>
- [56] Cramer, C. J., & Truhlar, D. G. (1999). Implicit Solvation Models: Equilibria, Structure, Spectra, and Dynamics. *Chemical Reviews*, 99(8), 2161–2200. <https://doi.org/10.1021/cr960149m>
- [57] Marenich, A. V., Cramer, C. J., & Truhlar, D. G. (2009). Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(18), 6378–6396. <https://doi.org/10.1021/jp810292n>
- [58] Xuan-Yu Meng, Hong-Xing Zhang, Mihaly Mezei, & Meng Cui. (2011). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- [59] Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular Docking. En A. Kukol (Ed.), *Molecular Modeling of Proteins* (pp. 365–382). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- [60] Trott, O., & Olson, A. J. (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. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- [61] Agu, P. C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezech, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., Ugwuja, E. I., & Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports*, 13(1), 13398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
- [62] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- [63] Thompson, M. A. (2004). ArgusLab 4.0. Planaria Software LLC. <http://www.arguslab.com>
- [64] Rangel Galván, M. (2021). Descripción teórico-molecular de la interacción de distintos bloqueadores con los canales de calcio Tipo T. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/15281>
- [65] Wildman, S. A., & Crippen, G. M. (1999). Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 39(5), 868–873. <https://doi.org/10.1021/ci9903071>
- [66] Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2014). iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(12), 3284–3301. <https://doi.org/10.1021/ci500467k>
- [67] Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

- [68] Delaney, J. S. (2004). ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 44(3), 1000–1005. <https://doi.org/10.1021/ci034243x>
- [69] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), 3723–3732. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. Special issue dedicated to Dr. Eric Tomlinson, *Advanced Drug Delivery Reviews*, A Selection of the Most Highly Cited Articles, 1991-1998, 46(1), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- [70] Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
- [71] Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2025). PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Res.*, 53(D1), D1516–D1525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1059> Último acceso 15 de mayo de 2025.
- [72] Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.2.0. <http://avogadro.cc/>
- [73] Marcus D Hanwell, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek and Geoffrey R Hutchison; “Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform” *Journal of Cheminformatics* 2012, 4:17.
- [74] GaussView, Version 6, Dennington, Roy; Keith, Todd A.; Millam, John M. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2016.
- [75] Gaussian 16, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [76] Oshimi, S., Deguchi, J., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Wahyuni, T. S., Zaini, N. C., Shirota, O., & Morita, H. (2009). Cassiarins C–E, Antiplasmodial Alkaloids from the Flowers of *Cassia siamea*. *Journal of Natural Products*, 72(10), 1899–1901. <https://doi.org/10.1021/np9004213>
- [77] Deguchi, J., Hirahara, T., Oshimi, S., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Shirota, O., Honda, T., & Morita, H. (2011). Total Synthesis of A Novel Tetracyclic Alkaloid, Cassiarin F from

- the Flowers of *Cassia siamea*. *Organic Letters*, 13(16), 4344–4347. <https://doi.org/10.1021/ol201674a>
- [78] Deguchi, J., Hirahara, T., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Shirota, O., Shiro, M., & Morita, H. (2012). New Tricyclic Alkaloids, Cassiarins G, H, J, and K from Leaves of *Cassia siamea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 60(2), 219–222. <https://doi.org/10.1248/cpb.60.219>
- [79] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank (2000) *Nucleic Acids Research* 28: 235-242 <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>. Última fecha de acceso: 22 de Agosto de 2025
- [80] BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio, 2021, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.
- [81] J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, and S. Forli. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- [82] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. UCSF Chimera: un sistema de visualización para investigación y análisis exploratorios. *J Comput Chem*. 2004 Oct 15;25(13):1605-12.

ANEXO A

Las estructuras cristalográficas de las casiarinas A-K no se encuentran disponibles en las distintas bases de datos, por lo que se realizó un análisis de RMN de H^1 y C^{13} con el fin de validar el método de cálculo empleado.

En el siguiente apartado se presentan los espectros experimentales de RMN de C^{13} y H^1 de las casiarinas, así como los valores de los desplazamientos químicos teóricos de RMN de C^{13} y H^1 correspondientes, calculados con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) tanto en vacío como en disolvente implícito en agua.

En las Figuras A1 y A2 se muestran los espectros experimentales de RMN de C^{13} y H^1 , respectivamente, de la casiarina A. En la Tabla A1 y A2, se muestran los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, en vacío y en disolvente implícito de la casiarina A. Los resultados muestran que los desplazamientos químicos teóricos de RMN de 1H , en ambas fases, presentan una buena concordancia con los valores experimentales, siendo en el disolvente implícito la que exhibe el mejor ajuste. En el caso de la RMN de C^{13} , los valores teóricos se encuentran más alejados de los valores experimentales en comparación con los de H^1 ; sin embargo, permanecen dentro de un intervalo aceptable. Al igual que en RMN de H^1 , los valores calculados en disolvente implícito muestran una mejor aproximación a los datos experimentales.

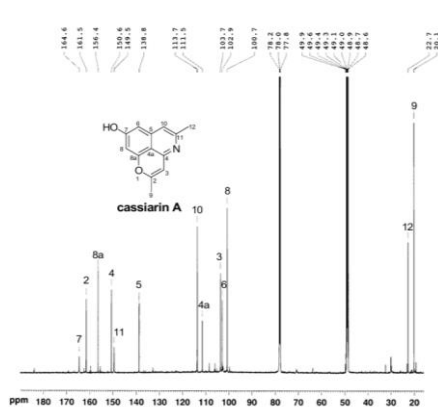


Figura A1. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina A en $CDCl_3/CD_3OD$ (1:1) [31]

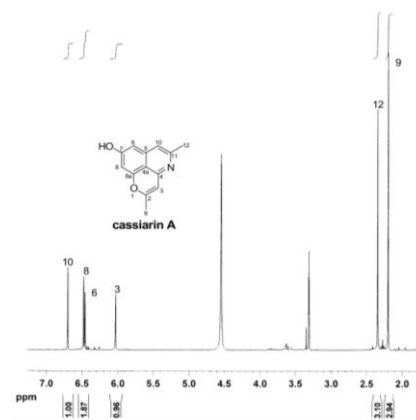


Figura A2. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina A en $CDCl_3/CD_3OD$ (1:1) [31]

Tabla A1. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina A (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, vacío}}$	$\delta_{H_{teo, agua}}$
17	6.70	6.35	6.67
18	6.03	5.77	5.89
19	6.46	5.65	6.27
20	6.48	6.12	6.33
21	2.34	1.73	1.97
22	2.34	2.47	2.38
23	2.34	2.47	2.38
24	2.20	2.16	2.26
25	2.20	2.16	2.26
26	2.20	1.73	1.97

Tabla A2. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina A (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
4	111.5	108.48	109.44
5	138.8	131.94	133.47
6	150.6	144.83	147.28
7	156.4	149.51	151.31
8	113.7	107.30	109.15
9	102.9	93.34	96.48
10	103.7	105.73	104.84
11	149.5	150.65	151.96
12	100.7	91.89	93.23
13	161.5	152.16	158.50
14	164.6	150.83	153.42
15	22.7	25.34	25.19
16	20.1	20.30	20.10

En las Figuras A3 y A4 se muestran los espectros experimentales de la casiarina B, de RMN de C^{13} y H^1 , respectivamente. En la Tabla A3 y A4, se muestran los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, este último en vacío y en disolvente implícito en agua de la casiarina B. Se observa que los valores de RMN de H^1 teóricos presentan una buena concordancia con los valores experimentales, particularmente en vacío. En cuanto a los desplazamientos químicos teóricos de RMN de C^{13} ,

estos muestran una mayor desviación respecto a los valores experimentales, con diferencias que oscilan entre 14.02 y 0.13 ppm en vacío, y entre 12.72 y 1.43 ppm en disolvente implícito en agua.

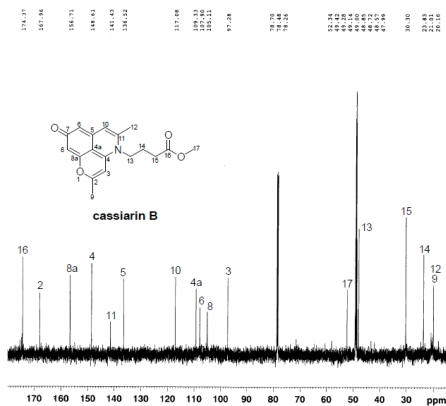


Figura A3. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina B en $CDCl_3/CD_3OD$ (1:1) [31].

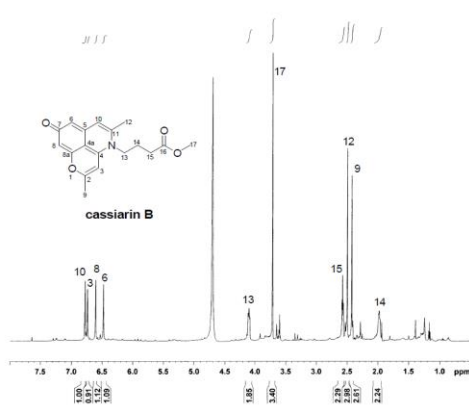


Figura A4. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina B en $CDCl_3/CD_3OD$ (1:1) [31].

Tabla A3. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina B (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, vacío}}$	$\delta_{H_{teo, agua}}$
24	4.10	3.26	3.20
25	4.10	3.21	3.15
26	1.98	2.31	2.25
27	1.98	1.43	1.36
28	6.78	5.70	5.64
29	6.74	5.30	5.24
30	2.57	2.50	2.44
31	2.57	2.08	2.02
32	6.48	5.47	5.41
33	2.50	1.87	1.80
34	2.50	1.77	1.71
35	2.50	2.08	2.02
36	6.60	5.70	5.64
37	2.43	2.18	2.12
38	2.43	1.53	1.47
39	2.43	2.18	2.12
40	3.72	3.46	3.40
41	3.72	3.81	3.75
42	3.72	3.81	3.75

Tabla A4. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina B (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
6	148.60	134.58	135.88
7	48.00	45.23	46.53
8	109.30	103.55	104.85
9	141.40	127.95	129.25
10	136.50	124.38	125.68
11	23.80	25.67	26.97
12	117.10	111.56	112.86
13	156.70	147.49	148.79
14	97.30	90.52	91.82
15	30.30	32.66	33.96
16	107.90	110.60	111.90
17	168.00	155.16	156.46
18	20.20	20.49	21.79
19	105.10	105.80	107.10
20	174.60	167.36	168.66
21	21.00	21.13	22.43
22	174.40	161.07	162.37
23	52.30	51.31	52.61

En las Figuras A5 y A6 se muestran los espectros experimentales, de RMN de C^{13} y H^1 , respectivamente, de la casiarina C. En la Tabla A5 y A6, se muestran los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, este último en vacío y en disolvente implícito en agua de la casiarina C. Los resultados muestran que los desplazamientos químicos teóricos de RMN de H^1 presentan similitud con los valores experimentales en ambas fases. Con respecto a los valores de RMN de C^{13} exhiben una mayor desviación, sin embargo, la diferencia máxima observada es de 7.99 ppm en vacío y de 6.67 ppm en disolvente implícito en agua.

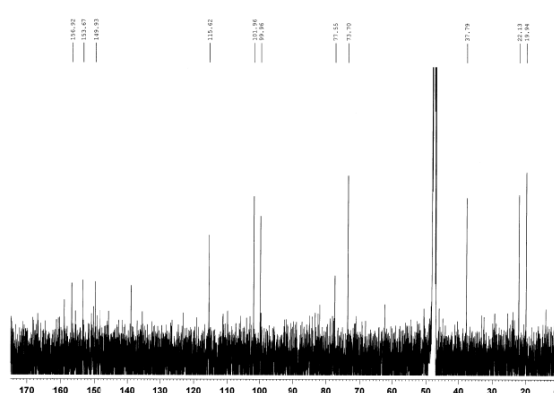


Figura A5. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina C en CD_3OD [78].

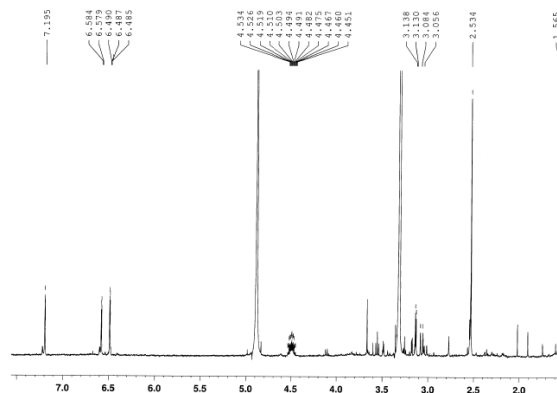


Figura A6. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina C en CD_3OD [78].

Tabla A5. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina C (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, vacío}}$	$\delta_{H_{teo, agua}}$
17	4.49	4.72	4.65
18	3.13	3.21	3.15
19	3.06	2.92	2.85
20	1.56	1.55	1.48
21	1.56	1.75	1.67
22	1.56	1.45	1.39
23	7.20	7.12	7.08
24	6.48	6.41	6.38
25	6.57	6.41	6.38
26	2.53	2.66	2.58
27	2.53	2.66	2.58
28	2.53	2.19	2.14

Tabla A6. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina B (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
4	73.70	74.65	75.98
5	37.80	38.58	39.85
6	110.60	105.99	107.33
7	153.60	150.69	152.25
8	156.90	150.81	152.34

9	139.10	131.69	132.93
10	19.90	20.86	22.04
11	115.60	110.77	112.21
12	103.10	95.11	96.43
13	149.90	148.79	150.16
14	100.00	94.72	96.35
15	159.10	152.11	153.70
16	22.10	23.99	25.16

En las Figuras A7 y A8 se muestran los espectros experimentales, de RMN de C^{13} y H^1 , respectivamente, de la casiarina D. En la Tabla A7 y A8, se tienen los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, este último en vacío y en disolvente implícito en agua de la casiarina D. Los valores de RMN de H^1 teóricos muestran similitud con los desplazamientos químicos experimentales. En el caso de C^{13} , los valores teóricos también presentan una buena concordancia, aunque con diferencias ligeramente mayores. En ambos casos, los resultados obtenidos en disolvente implícito en agua muestran una mejor aproximación a los valores experimentales.

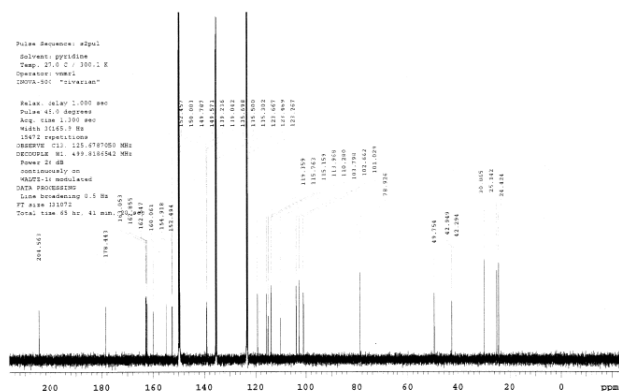


Figura A7. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina D en piridina- d_5 [78].

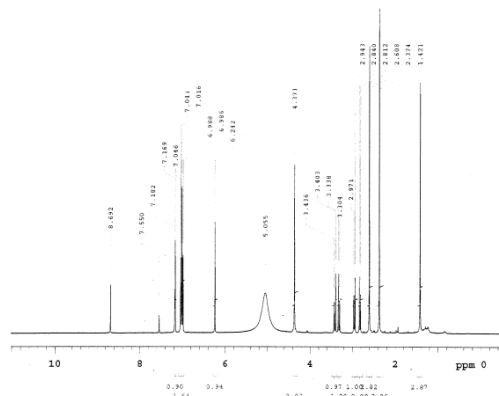


Figura A8. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina D en piridina- d_5 [78].

Tabla A7. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de ^1H de la casiarina D (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, \text{ vacío}}}$	$\delta_{H_{teo, \text{ agua}}}$
34	3.32	3.29	3.47
35	3.42	2.84	3.02

36	2.96	2.94	3.02
37	2.83	2.06	2.59
38	1.42	2.06	1.85
39	1.42	1.17	1.50
40	1.42	1.49	1.50
41	6.98	6.53	6.59
42	7.17	6.81	7.16
43	7.02	5.88	6.51
44	6.24	5.61	5.95
45	2.61	1.95	2.18
46	2.61	2.68	2.59
47	2.61	2.68	2.59
48	7.04	6.53	6.69
49	4.37	4.70	4.63
50	4.37	2.84	3.53
51	7.02	5.83	6.59
52	-	4.04	5.62
53	-	3.86	5.62
54	2.37	2.06	2.59
55	2.37	3.10	2.79
56	2.37	1.64	1.68

Tabla A8. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina D (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
8	78.90	79.12	82.77
9	42.30	43.42	43.85
10	42.90	40.75	41.46
11	152.50	146.57	150.71
12	25.10	26.70	27.05
13	110.30	105.41	106.77
14	154.90	149.09	150.58
15	163.10	156.95	163.14
16	139.00	131.03	132.72
17	103.80	96.82	97.40
18	115.80	110.63	112.48
19	152.40	148.86	150.64
20	101.00	93.26	96.59
21	114.00	110.80	111.35
22	162.50	151.98	154.22

23	115.10	112.59	113.06
24	160.10	152.78	154.71
25	178.40	167.64	172.43
26	139.20	137.47	137.23
27	24.40	25.23	25.20
28	102.70	96.82	98.04
29	49.80	49.72	51.24
30	119.40	110.63	114.46
31	162.90	150.11	153.89
32	204.60	194.13	208.21
33	30.10	29.33	30.06

En las Figuras A9 y A10 se muestran los espectros experimentales, de RMN de C^{13} y H^1 , respectivamente, de la casiarina E. En la Tabla A9 y A10, se tienen los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, este último en vacío y en disolvente implícito en agua de la casiarina E. A partir de los resultados obtenidos, se observa que los desplazamientos químicos teóricos de RMN de H^1 presentan una excelente concordancia con los valores experimentales, especialmente en disolvente implícito en agua, donde el mayor porcentaje de error es de 0.61%, mientras que en vacío es de 1.25%. En el caso de C^{13} , se observa un aumento en la diferencia respecto a los valores experimentales, con un mayor porcentaje de error de 11.11% en vacío y de 8.56% en disolvente implícito en agua.

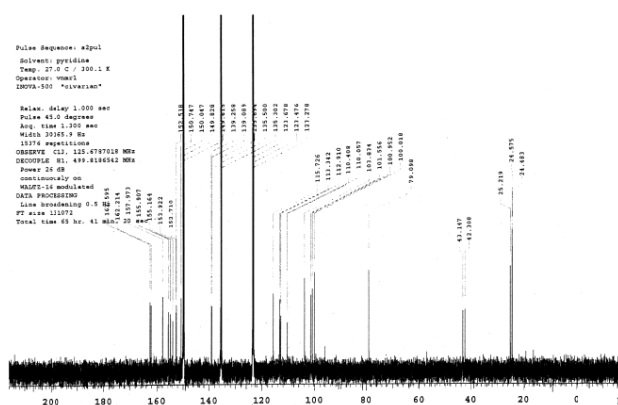


Figura A9. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina E en piridina- d_5 [78].

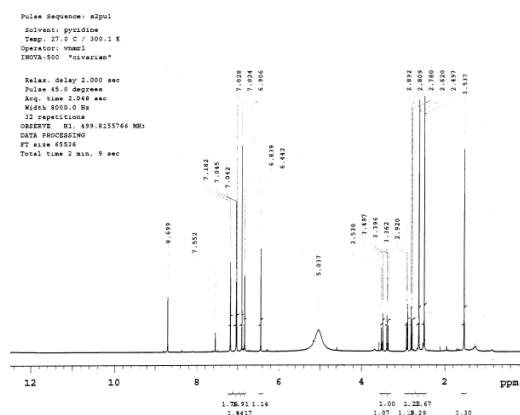


Figura A10. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina E en piridina- d_5 [78].

Tabla A9. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina E (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, vacío}}$	$\delta_{H_{teo, agua}}$
32	3.52	3.28	3.46
33	3.38	2.86	2.99
34	2.90	2.86	2.93
35	2.79	2.02	2.42
36	1.54	2.21	1.98
37	1.54	1.17	1.50
38	1.54	1.48	1.50
39	6.44	5.81	6.00
40	7.04	6.53	6.62
41	7.19	6.81	7.15
42	7.02	5.87	6.49
43	6.84	6.36	6.69
44	6.91	6.22	6.38
45	2.62	1.94	2.17
46	2.52	2.68	2.62
47	2.62	2.68	2.62
48	6.91	5.66	6.30
49	2.50	2.47	2.42
50	2.50	1.75	1.98
51	2.50	2.47	2.42
52	-	4.01	5.60
53	-	-	-
54	-	3.78	5.42

Tabla A10. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina E (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
6	79.10	79.03	82.79
7	42.30	43.30	43.82
8	43.10	40.63	41.17
9	152.70	146.70	150.83
10	25.20	26.77	27.03
11	110.40	105.57	106.92
12	155.20	149.25	150.69

13	158.00	153.11	158.08
14	139.10	130.99	132.69
15	110.00	108.34	108.39
16	103.80	96.99	97.47
17	150.70	144.56	146.95
18	112.90	108.82	109.82
19	115.70	110.56	112.42
20	152.50	148.71	150.61
21	155.90	149.68	151.19
22	100.90	93.13	96.46
23	162.60	151.96	154.23
24	139.20	131.93	133.52
25	153.90	150.57	152.11
26	113.30	107.46	109.42
27	100.00	92.38	93.47
28	24.50	25.25	25.21
29	101.60	93.31	96.53
30	162.20	151.09	153.64
31	24.60	25.33	25.21

En las Figuras A11 y A12 se tienen los espectros experimentales, de RMN de C^{13} y H^1 , respectivamente, de la casiarina F. En la Tabla A11 y A12, se muestran los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, este último en vacío y en disolvente implícito en agua de la casiarina F. Los resultados indican que los desplazamientos químicos teóricos de RMN de H^1 presentan una alta concordancia con los valores experimentales. En comparación, los valores teóricos de C^{13} muestran una mayor desviación, aunque permanecen dentro de un intervalo aceptable. En ambos casos, en disolvente implícito en agua presenta un mejor ajuste respecto a los datos experimentales.

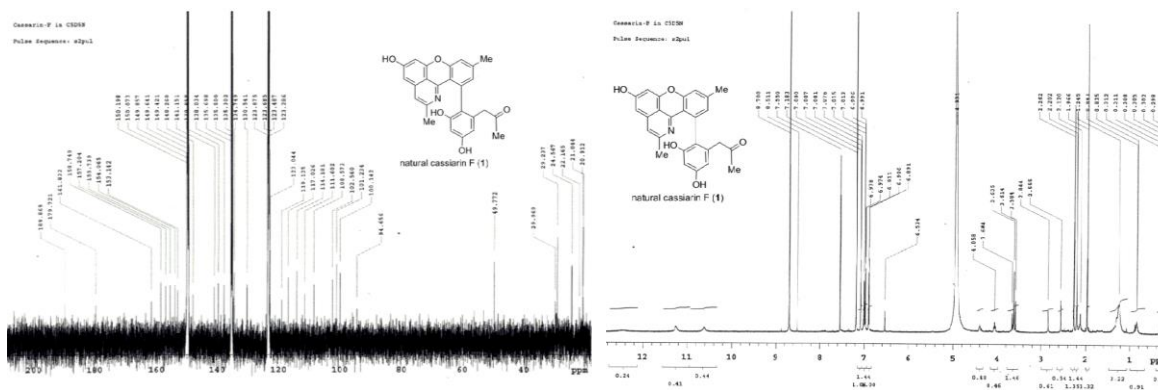


Figura A11. Espectro experimental de RMN de C^{13} de la casiarina F en piridina- d_5 [79].

Figura A12. Espectro experimental de RMN de H^1 de la casiarina F en piridina- d_5 [79].

Tabla A11. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina F (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, vacío}}$	$\delta_{H_{teo, agua}}$
33	7.09	6.84	7.14
34	7.01	6.84	7.14
35	6.89	6.60	6.87
36	6.98	5.74	6.41
37	6.91	6.28	6.41
38	3.60	2.88	2.92
39	3.65	2.88	3.18
40	6.99	5.96	6.27
41	2.20	1.91	2.04
42	2.20	2.41	2.50
43	2.20	2.49	2.57
44	7.08	6.19	6.27
45	2.26	2.20	2.04
46	2.26	2.20	2.04
47	2.26	1.68	1.89
48	-	3.78	4.70
49	-	3.78	5.43
50	1.97	1.60	2.04
51	1.97	2.08	2.50
52	1.97	1.43	1.46
53	-	3.54	5.00

Tabla A12. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina F (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
7	119.10	118.01	120.60
8	138.00	131.43	130.59
9	148.30	142.00	144.82
10	111.60	107.47	108.97
11	155.70	149.68	151.29
12	120.00	116.17	120.60
13	154.10	146.56	148.63

14	139.90	132.87	134.15
15	130.50	124.80	127.90
16	141.20	134.50	139.27
17	134.00	129.33	131.35
18	117.00	113.09	115.03
19	114.20	110.28	111.71
20	153.10	149.80	151.29
21	100.10	91.57	94.75
22	157.20	147.07	148.63
23	101.20	95.70	96.25
24	49.80	45.61	46.96
25	161.80	150.09	153.20
26	108.60	98.67	101.76
27	21.00	21.70	22.20
28	102.60	94.96	95.15
29	158.70	148.61	149.89
30	24.60	25.00	25.00
31	206.00	196.13	208.97
32	29.20	27.77	29.38

En las Tabla A13 se muestran los valores experimentales de RMN de H^1 y C^{13} , respectivamente, de la casiarina G, H, J y K.

Tabla A13. Valores de RMN de H^1 [δ_H (J, Hz)] y C^{13} [δ_C] (en ppm) de las casiarinas G, H, J y K (1-4) en metanol- d_5 a 300 K [80].

	1		2		3		4	
Position	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2		106.8		102.2		107.1		157.4
3		189.0		187.0		76.1		113.7
4		152.0		137.5		156.9		148.4
4a		110.2		115.9		111.0		112.8
5		142.0		141.4		141.0		139.9
6	6.88 (1H, brs)	103.0	6.33 (1H, d, 1.8)	106.5	6.83 (1H, brs)	103.1	6.57 (1H, brs)	102.5
7		168.9		183.5		167.9		163.0
8	6.79 (1H, brs)	107.6	6.58 (1H, d, 1.8)	116.6	6.74 (1H, brs)	107.3	6.54 (1H, brs)	100.5
8a		155.4		153.2		154.4		155.2
9	1.71 (3H, s)	14.9	1.79 (3H, s)	17.4	1.76 (3H, s)	15.5	2.41 (3H, s)	18.2
10	7.70 (1H, s)	121.7	7.40 (1H, s)	121.8	7.57 (1H, s)	120.3	6.91 (1H, s)	115.3
11		144.0		145.1		141.0		153.8
12	2.73 (3H, s)	19.7	2.72 (3H, s)	20.1	2.65 (3H, s)	20.3	2.45 (3H, s)	23.9
13	3.25 (3H, s)	50.5	3.42 (3H, s)	51.3	3.20 (3H, s)	50.6		
14a			4.40 (2H, t, 8.5)	49.9	2.87 (1H, d, 13.2)	43.6		
14b					3.00 (1H, d, 13.2)			
15a			1.90 (1H, m)	27.0		170.7		
15b			2.14 (1H, m)					
16			2.51 (2H, m)	31.2	3.40 (3H, s)	52.4		
17				174.5				
18			3.69 (3H, s)	52.3				

En la Tabla A14 y A15, se muestran los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, este último en vacío y en disolvente implícito en agua de la casiarina G. Se observa que los valores calculados de RMN de H^1 son consistentes con los desplazamientos químicos experimentales, mientras que los correspondientes a C^{13} presentan diferencias ligeramente mayores. No obstante, los resultados en disolvente implícito en agua muestran una mejor aproximación a los valores experimentales en comparación con los resultados obtenidos en vacío.

Tabla A14. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina G (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, vacío}}$	$\delta_{H_{teo, agua}}$
20	1.71	1.17	1.49
21	1.71	1.34	1.37
22	1.71	1.57	1.65
23	6.79	5.91	6.58
24	7.70	7.12	7.64
25	6.88	6.43	6.73
26	2.73	2.83	2.76
27	2.73	2.83	2.76
28	2.73	2.05	2.34
29	3.25	3.55	3.33
30	3.25	3.55	3.72
31	3.25	3.35	3.54

Tabla A15. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina G (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
6	106.80	107.22	109.15
7	110.20	109.95	112.28
8	152.00	139.87	140.07
9	155.40	148.58	148.63
10	189.00	185.34	193.43
11	142.00	132.47	134.15
12	14.90	25.48	26.52
13	107.60	96.88	100.99
14	121.70	116.03	120.81

15	103.00	95.17	97.00
16	144.00	150.60	152.31
17	168.90	150.84	154.34
18	19.70	25.21	25.09
19	50.50	50.06	52.15

En la Tabla A16 y A17, se muestran los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, este último en vacío y en disolvente implícito en agua de la casiarina H. Los desplazamientos químicos teóricos de RMN de H^1 muestran una excelente concordancia con los valores experimentales, en la cual el error va de 0.03 % a 1.16% en vacío y de 0.06% a 1.37% en disolvente implícito en agua, mientras que para C^{13} se observa una mayor dispersión. En general, los cálculos en disolvente implícito en agua presentan un mejor ajuste con respecto a los datos experimentales.

Tabla A16. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina H (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, vacío}}$	$\delta_{H_{teo, agua}}$
26	4.40	5.56	5.77
27	4.40	3.47	4.05
28	7.40	6.07	7.00
29	1.79	1.48	1.47
30	1.79	1.48	1.91
31	1.79	1.57	1.47
32	2.14	2.17	2.20
33	1.90	1.24	1.73
34	6.58	5.96	6.23
35	6.33	5.43	5.77
36	2.72	2.17	2.54
37	2.72	2.26	2.64
38	2.72	1.87	2.28
39	2.51	1.87	2.45
40	2.51	2.49	2.72
41	3.42	3.78	3.35
42	3.42	3.33	3.54
43	3.42	3.18	3.54
44	3.69	3.33	3.86
45	3.69	3.89	4.00

46	3.69	3.66	3.86
----	------	------	------

Tabla A17. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina H (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
7	137.50	128.52	132.33
8	187.00	181.80	187.49
9	102.20	98.46	101.93
10	115.90	115.51	114.11
11	153.20	142.70	147.81
12	49.90	43.58	46.96
13	141.40	128.29	133.31
14	145.10	133.08	142.18
15	121.80	113.24	118.31
16	17.40	18.79	25.80
17	27.00	28.39	28.60
18	116.60	114.67	111.00
19	106.50	105.95	102.82
20	20.10	21.37	22.37
21	183.50	170.75	174.05
22	31.20	26.89	28.94
23	51.30	48.84	52.48
24	174.50	161.47	172.93
25	52.30	51.92	55.52

En la Tabla A18 y A19, se muestran los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, este último en vacío y en disolvente implícito en agua de la casiarina J. Al comparar ambas fases, se observa que los valores teóricos de RMN de H^1 reproducen adecuadamente los datos experimentales tanto en vacío como en disolvente implícito en agua. En el caso de C^{13} , las diferencias son más notorias, aunque los cálculos en disolvente implícito en agua muestran una mayor proximidad a los valores experimentales.

Tabla A18. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina J (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, vacío}}$	$\delta_{H_{teo, agua}}$
25	3.00	2.99	3.18

26	2.87	2.58	2.91
27	1.76	2.58	1.98
28	1.76	1.46	1.60
29	1.76	1.60	1.98
30	-	2.25	3.05
31	6.74	5.81	6.40
32	7.57	6.96	7.31
33	6.83	6.36	6.59
34	3.20	3.47	3.55
35	3.20	3.32	3.55
36	3.20	2.92	3.10
37	2.65	2.02	2.26
38	2.65	2.70	2.69
39	2.65	2.70	2.69
40	3.40	3.83	5.47
41	3.40	2.70	2.91
42	3.40	3.17	3.68
43	-	2.92	3.29

Tabla A19. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina J (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
8	76.10	76.73	78.67
9	107.10	105.35	107.16
10	156.90	152.02	152.93
11	43.60	39.67	40.36
12	111.00	105.41	106.24
13	154.40	146.54	147.26
14	15.50	16.78	18.05
15	141.00	131.39	132.88
16	107.30	96.04	99.26
17	120.30	112.33	114.27
18	141.00	148.48	150.97
19	170.70	159.53	168.73
20	103.10	95.45	97.08
21	167.90	150.94	153.85
22	50.60	47.95	50.36
23	20.30	25.32	25.27
24	52.40	52.72	56.29

En la Tabla A20 y A21, se muestran los valores de los desplazamientos químicos de RMN de H^1 y C^{13} experimentales y teóricos, este último de la casiarina en vacío y en disolvente implícito en agua. El análisis comparativo de los desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN evidencia una buena concordancia para los núcleos de H^1 en ambas fases evaluadas. En contraste, los desplazamientos de C^{13} presentan discrepancias ligeramente mayores; no obstante, los valores calculados reproducen de manera adecuada la tendencia experimental, siendo la fase acuosa la que ofrece el mejor ajuste global.

En conjunto, los resultados de RMN obtenidos para las casiarinas analizadas muestran una adecuada concordancia entre los valores teóricos y experimentales, lo que permite validar el método computacional empleado. La correcta reproducción de los desplazamientos químicos respalda la confiabilidad de las geometrías optimizadas y de las propiedades electrónicas calculadas; en consecuencia, estas estructuras pueden emplearse de manera adecuada en los estudios posteriores de reactividad química global y el acoplamiento molecular.

Tabla A20. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de H^1 de la casiarina K (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{H_{exp}}$	$\delta_{H_{teo, vacío}}$	$\delta_{H_{teo, agua}}$
16	6.91	6.44	6.80
17	6.57	5.72	6.38
18	6.54	6.14	6.38
19	2.41	2.00	2.23
20	2.41	2.00	2.23
21	2.41	2.57	2.47
22	-	3.83	5.47
25	2.45	1.80	2.04
26	2.45	2.57	2.47
27	2.45	2.57	2.47

Tabla A21. Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de RMN de C^{13} de la casiarina K (en ppm) en vacío y en disolvente implícito en agua con el nivel de teoría de B3LYP/6-31G(d).

Posición	$\delta_{C_{exp}}$	$\delta_{C_{teo, vacío}}$	$\delta_{C_{teo, agua}}$
5	112.80	108.27	109.44
6	139.90	131.99	133.51

7	148.40	141.49	143.36
8	155.20	147.53	149.11
9	115.30	108.13	110.60
10	113.70	121.52	120.04
11	102.50	93.69	97.18
12	157.40	150.37	156.10
13	100.50	92.03	93.73
14	163.00	150.79	153.51
15	18.20	17.57	18.38
23	153.80	150.86	151.82
24	23.90	25.31	25.20

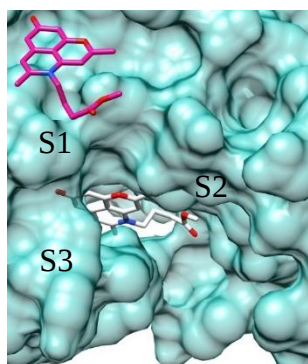
ANEXO B.

En el siguiente apartado se muestran los resultados del acoplamiento molecular ciego de las casiarinas B, G y H con la enzima *PvPMV*, así como los resultados del acoplamiento molecular dirigido de la casiarina B con la misma enzima, optimizadas en fase vacío.

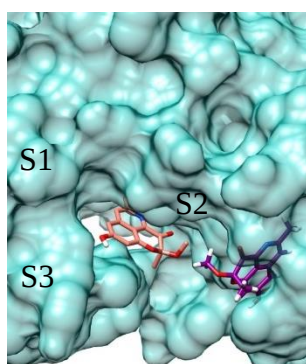
ArgusLab

Los resultados obtenidos del acoplamiento molecular ciego de las casiarinas optimizadas en vacío con la enzima *PvPMV* en ArgusLab se presentan en la Figura B1. La casiarina B (Figura B1-A) muestra las dos conformaciones con mejores energías de afinidad, sus valores son -8.66 y -8.18 kcal/mol, representados con los colores blanco y rosa intenso, respectivamente. La conformación con la energía más favorable se localizó dentro del sitio activo de la enzima, mientras que la segunda conformación quedó posicionada fuera de dicha región. En el caso de la casiarina G (Figura B1-B) se seleccionaron las dos conformaciones más relevantes. La conformación visualizada de color magenta oscuro, presentó la mejor energía de afinidad con un valor de -8.35 kcal/mol, se ubicó fuera del sitio activo, en tanto la conformación de color salmón, situada dentro de este sitio mostró un valor de -7.55 kcal/mol. Para la casiarina H (Figura B1-C), las tres conformaciones con energías favorables fueron de -8.48 , -8.34 y -8.10 kcal/mol, representadas con los colores naranja, ciruela y azul, respectivamente. Todas ellas se encontraron en el sitio activo de la proteína. La casiarina que tuvo la mejor energía de afinidad frente a la proteína *PvPMV* (ID PDB:4ZL4) fue la casiarina B, lo que sugiere que la interacción ligando-receptor correspondiente es la más estable.

(A)



(B)



(C)

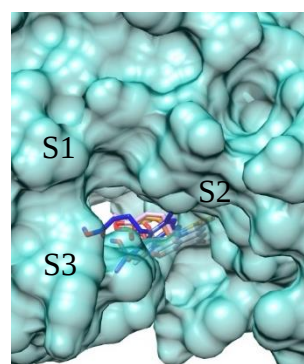


Figura B1. Representación tridimensional del acoplamiento molecular ciego de la casiarina B (A), la casiarina G (B) y la casiarina H (C) con la proteína cristalizada de PvPMV (ID PDB:4ZL4). Visualizada en UCSF Chimera.

En la Figura B2, se muestran las interacciones presentes en las mejores conformaciones seleccionadas para cada casiarina. En el caso de la casiarina B (Figura B2-A), se analizó la conformación con la mejor energía de afinidad, que fue de -8.66 kcal/mol, la cual establece interacciones de π -alquilo y alquilo con **Ile78**, así como π - σ con **Tyr139** y una de alquilo con **Val188**; todos ellos pertenecientes a la subcavidad S1 (ver Figura 10). Además, se identificaron interacciones de van der Waals con **Thr317** y **Ile439**, las cuales forman parte de la subcavidad S2 (ver Figura 10). En la subcavidad S3 (ver Figura 10), se observan interacciones de enlace carbono-hidrógeno con **Glu141** y van der Waals con **Gln183**. También se destaca una interacción van der Waals con **Asp313**, que es uno de los aminoácidos clave en el proceso de la hidrólisis de proteínas. Para la casiarina G (Figura B2-B), se seleccionó la conformación con una energía de -7.55 kcal/mol, la cual se localiza dentro del sitio activo, a pesar de no ser la que presentó el mejor valor energético. Entre sus interacciones relevantes destacan una interacción alquilo con **Ile78**, π -anión con **Glu141** y una interacción de van der Waals con **Gln183**. Sin embargo, se presentó una interacción no favorable aceptor-aceptor con **Thr317**, esto nos indica un posible conflicto de repulsión electrostática, lo que podría contribuir a una menor afinidad, esto respalda el hecho de que, aun situándose dentro del sitio activo, esta conformación no supera energéticamente a la casiarina B. En el caso de la casiarina H (Figura B2-C), las tres conformaciones se encuentran dentro del sitio activo, no obstante, se seleccionó para un análisis detallado a la conformación que presenta una energía de -8.34 kcal/mol. Esta muestra una interacción van der Waals con **Asp313**, lo cual es relevante debido al papel catalítico de este residuo. También se observaron π - π en forma de T con **Tyr288**, así como interacciones estéricas no favorables con **Ile439** y **Leu311**. Este tipo de interacciones sugieren un posible impedimento estérico en esta región, lo que podría limitar la estabilidad del acoplamiento pese a su energía favorable. Con respecto a estos resultados se infiere que la casiarina B es la molécula que establece el mayor número de interacciones favorables con los residuos aminoacídicos de interés de PvPMV y, además, es la que presenta la mejor energía de afinidad, lo que sugiere un acoplamiento más estable frente al receptor en comparación con la casiarina G y la casiarina H.

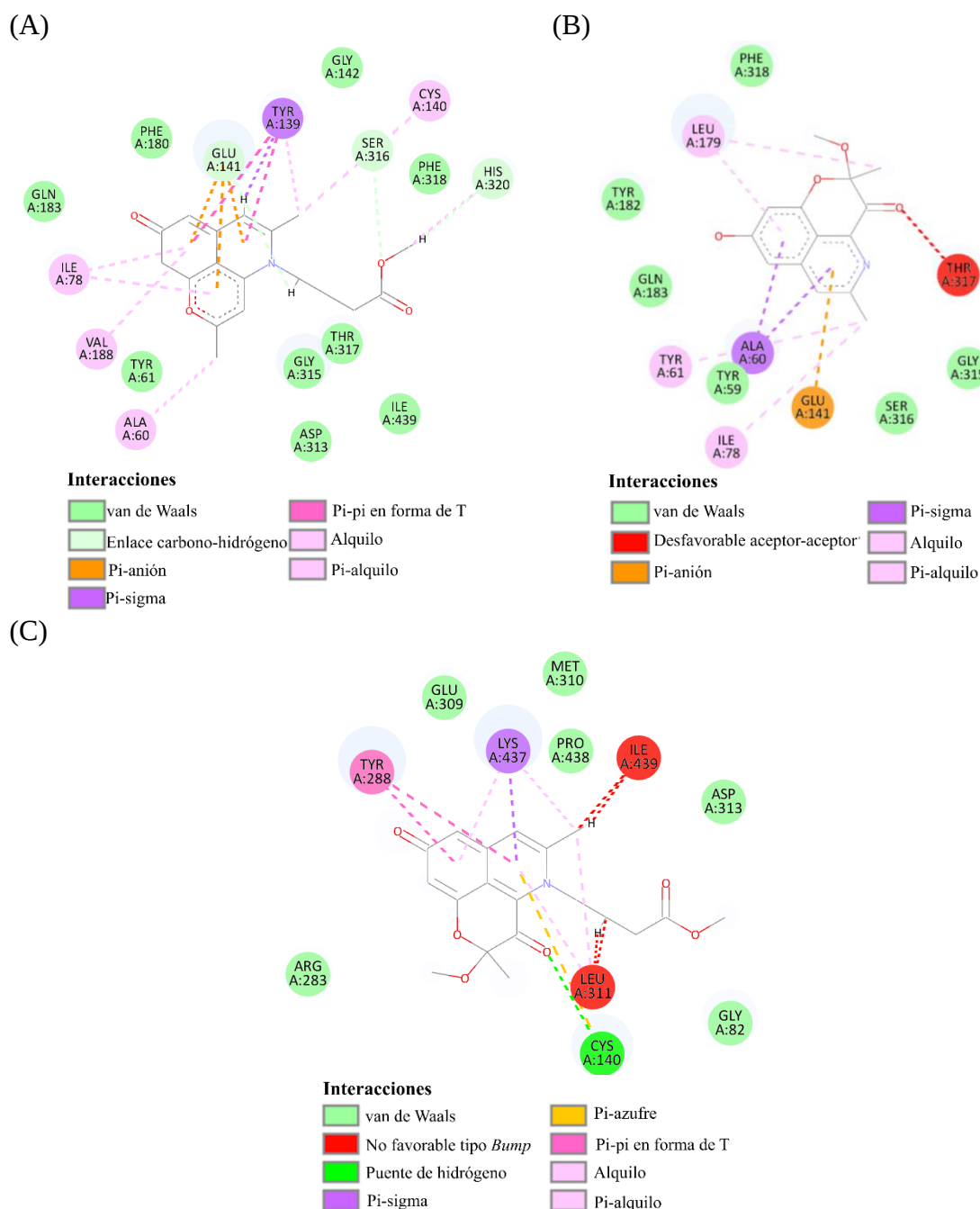


Figura B2. Interacciones de la casiarina B (A), casiarina G (B) y casiarina H (C) con los aminoácidos de la proteína PvPMV (ID PDB: 4ZL4) Representados en 2D en Discovery Studio.

AutoDock4

Los resultados del acoplamiento molecular ciego obtenidos en AutoDock4 se presentan en la Figura B3. Para la casiarina B (Figura B3-A) se identificaron dos conformaciones principales: la primera, representa en color azul cielo, mostró una energía de afinidad de -4.00 kcal/mol, mientras que la segunda, color ciruela, presentó un valor de -3.39 kcal/mol. Sin embargo, esta última se ubicó fuera del sitio activo, por lo que no se consideró relevante para el análisis funcional. Con la casiarina G (Figura B3-B), se obtuvo únicamente una conformación localizada en el sitio activo, visualizada de color fucsia, con una energía de afinidad de -4.97 kcal/mol, siendo este el mejor valor registrado entre las casiarinas evaluadas con este software. Para la casiarina H (Figura B3-C), la conformación localizada en el sitio activo presentó una energía de afinidad de -3.76 kcal/mol representa en color café. De manera general, AutoDock4 produjo energías menos favorables y un menor número de conformaciones ubicadas en el sitio activo en comparación con los resultados obtenidos con ArgusLab. No obstante, dentro de este conjunto de análisis, la casiarina G fue la molécula que mostró la mejor afinidad hacia la proteína.

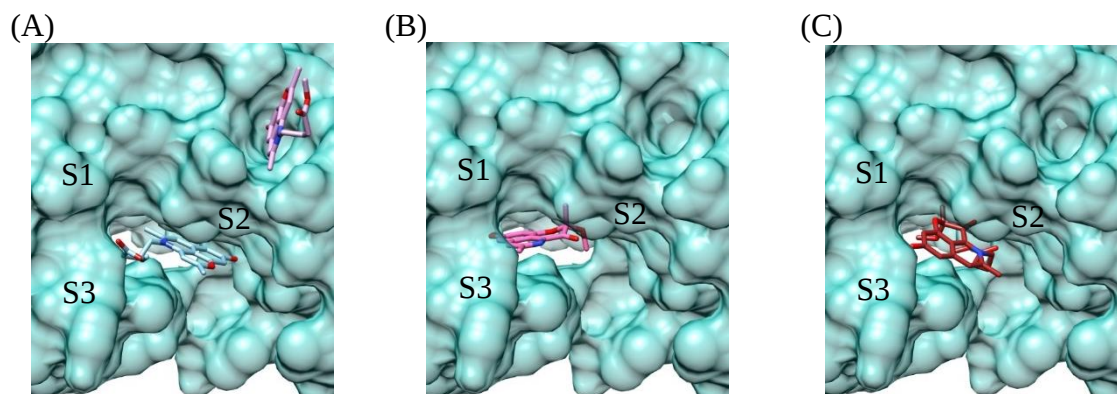
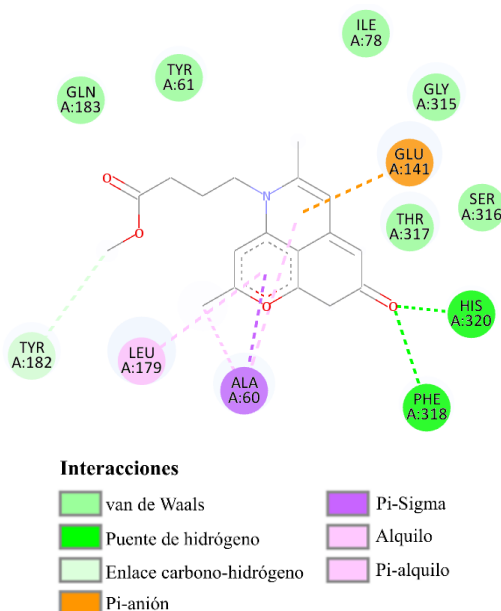


Figura B3. Representación tridimensional del acoplamiento molecular de la casiarina B (A), la casiarina G (B) y la casiarina H (C). Proteína cristalizada de PvPMV (ID PDB:4ZL4). Visualizado en UCSF Chimera.

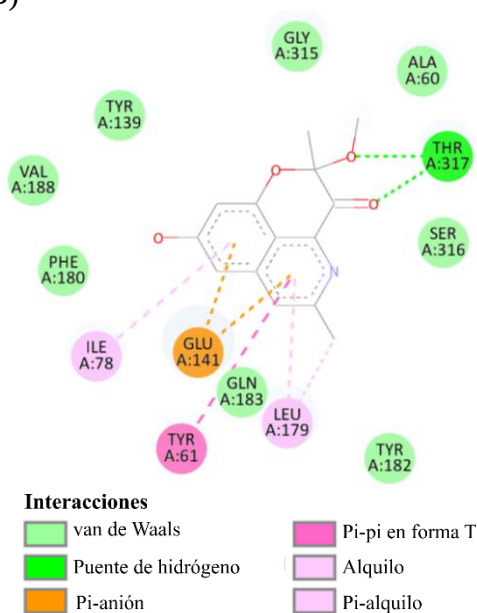
En la Figura B4 se muestran las interacciones presentes en las mejores conformaciones seleccionadas para cada casiarina en la enzima PvPMV. Para la casiarina B (Figura B4-A), se analizó la conformación con la energía de -4.00 kcal/mol, la cual establece interacciones de van der Waals con los residuos **Ile78**, **Gln183**, **Thr317**, además de una π -anión con

Glu141. La casiarina G (Figura B4-B), se seleccionó a la conformación que se encuentra dentro del sitio activo. Entre las interacciones relevantes son van de Waals con **Tyr139**, **Gln183**, **Val188**, así como π -alquilo con **Ile78** y π -anión con **Glu141**. De manera adicional, se observó un puente de hidrógeno con **Thr317**, el cual participa con dos átomos de oxígeno de la molécula, lo que sugiere una interacción relevante para su estabilización energética dentro del sitio de unión. Para la casiarina H (Figura B4-C), se identificaron interacciones de van der Waals con **Ile78** y **Gln183**, adicionalmente de una interacción π -anión y un enlace carbono-hidrógeno con **Glu141**, así como un puente de hidrógeno con **Thr317**, que, al igual que la casiarina G, establece contacto con dos átomos de oxígeno presentes en la estructura. De manera general, las casiarinas B, G y H comparten una interacción π -anión con el residuo **Glu141**, que parece ser un punto clave en el reconocimiento dentro del bolsillo catalítico. La casiarina G y H comparten el enlace de hidrógeno con **Thr317**, por lo que igual podría ser de importancia catalítica. Sin embargo, la casiarina G es la molécula que establece el mayor número de interacciones con los residuos catalíticos de interés y es la mejor energía de afinidad tiene.

(A)



(B)



(C)

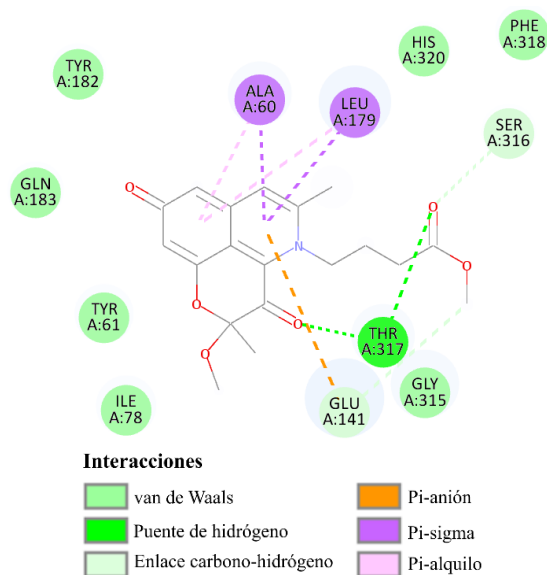


Figura B4. Interacciones de la casiarina b (A), casiarina G (B) y casiarina H (C) con los aminoácidos de la proteína PvPMV (ID PDB: 4ZL4). Representados en 2D en Discovery Studio.

Al comparar los resultados del acoplamiento molecular ciego para las casiarinas optimizadas en vacío en los softwares de ArgusLab y AutoDock4 (Tabla B1), se observa que la casiarina B es la molécula que reproduce el mayor número de interacciones con los mismos residuos aminoacídicos, lo que sugiere un patrón de reconocimiento más consistente dentro del sitio activo. La casiarina G también presenta algunos residuos recurrentes, además de mostrar una interacción π -anión con **Glu141**. Por último, la casiarina H no comparte las interacciones con los mismos residuos catalíticos.

Tabla B1. Interacciones de las casiarinas optimizadas en vacío con los aminoácidos de interés obtenidos en ArgusLab y AutoDock4.

Compuesto	ArgusLab	AutoDock4
	Interacciones con el aminoácido	
Casiarina B	van der Waals: Gln183, Asp313, Thr317, Ile439 Alquilo: Ile78, Val188 π-alquilo: Ile78 π-σ: Tyr139 Enlace carbono-hidrógeno: Glu141	van der Waals: Ile78, Gln183, Thr317 π-anión: Glu141

Casiarina G	van der Waals: Gln183 Alquilo: Ile78 π-anión: Glu141 No favorable acceptor-acceptor: Thr317	van der Waals: Tyr139, Gln183, Val188 π-alquilo: Ile78 π-anión: Glu141 Enlace de hidrógeno: Thr317
Casiarina H	van der Waals: Asp313 π-π en forma T de: Thr288 no favorables tipo <i>bump</i>: Ile439 y Leu311	van der Waals: Ile78, Gln183 π-anión: Glu141 Enlace carbono de hidrógeno: Glu141 Enlace de hidrógeno: Thr317

Acoplamiento molecular dirigido con la casiarina B optimizadas en vacío

AutoDock Vina

Se realizó un acoplamiento molecular dirigido en la cual se verificó que se realizara en el sitio de unión de la enzima. Este cálculo se efectuó únicamente con la casiarina B empleando Autodock Vina, los resultados se muestran en el Figura B5. Se seleccionaron las conformaciones con mejores energías de afinidad, la primera, visualizada de color rojo violeta, de -8.30 kcal/mol y -7.8 kcal/mol de color caqui, cuyas estructuras presentan diferentes poses.

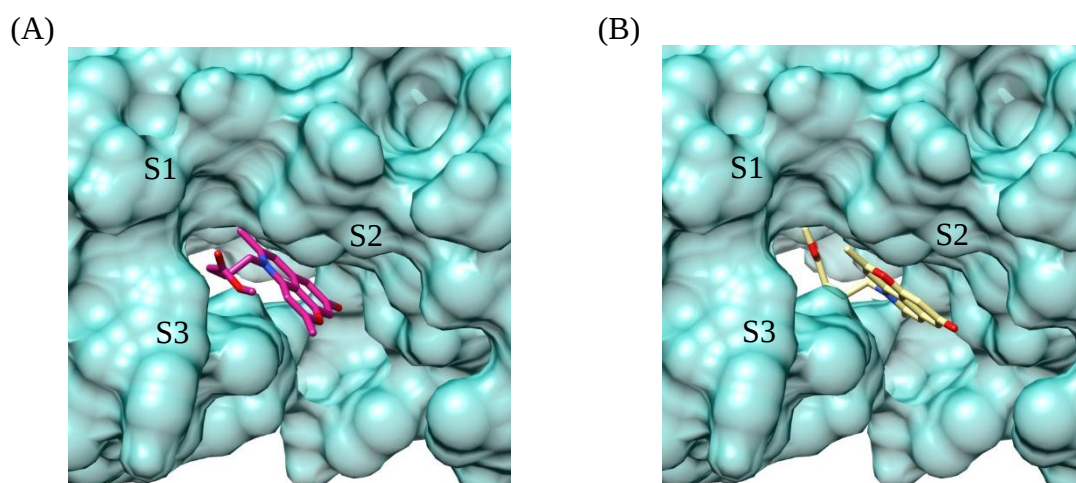


Figura B5. Representación tridimensional del acoplamiento molecular dirigido de la casiarina B con la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Figura visualizada en UCSF Chimera.

En la primera conformación (Figura B6.A y B7.A), con una energía de afinidad -8.30 kcal/mol, se observa una interacción π -anión con el residuo **Glu141**, en la cual el oxígeno del doble enlace del ácido carboxílico participa en la interacción con el anillo aromático. También se observan interacciones π -alquilo con **Ala60**, π - σ y π -alquilo con **Leu179**, un enlace de hidrógeno con **His320**; sin embargo, estos residuos no se encuentran reportados previamente en la literatura como relevantes para la unión del inhibidor. Finalmente, se identifican las interacciones de van der Waals con los aminoácidos reportados son **Ile78**, **Gln183** y **Thr317**.

En la segunda conformación (Figura B6-B y B7-B), cuya energía de afinidad de -7.8 kcal/mol, también se muestra una interacción π -anión con **Glu141**, donde el oxígeno interactúa con los electrones deslocalizados del anillo benzoico. El residuo **Thr317** forma un enlace de hidrógeno con el nitrógeno del mismo anillo. Además, este residuo establece dos interacciones de tipo π -donador enlace de hidrógeno con el anillo. Se observa también una interacción de tipo enlace carbono-hidrógeno con **Gly315**, este residuo ha sido reportado que participa en las interacciones con los inhibidores WM36 y WEHI-892 [36, 38]. De igual modo, se identifican interacciones de van der Waals con los residuos de **Ile78**, **Leu179**, **Ile439** y **Asp80**, este último de relevancia para la hidrólisis de proteínas. En general, ambas conformaciones muestran interacciones con residuos de interés, en la que comparten la interacción π -anión con **Glu141**, no obstante, la segunda conformación es la que tiene una menor distancia, además de presentar una interacción van der Waals con **Asp80**.

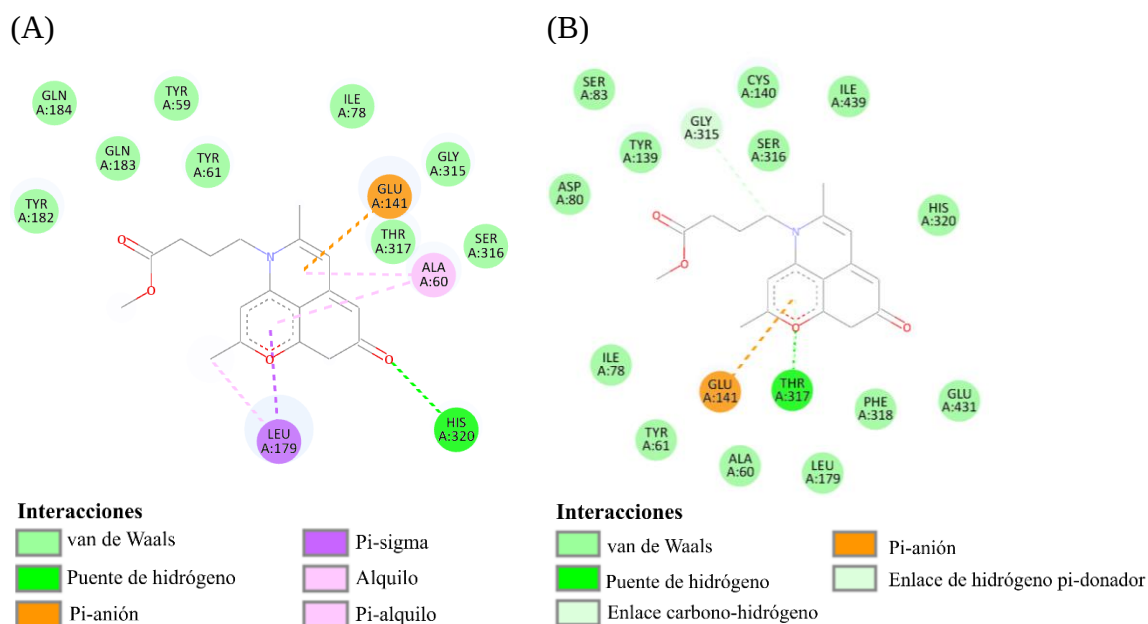


Figura B6. Interacciones de la casiarina B con los aminoácidos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en 2D en Discovery Studio.

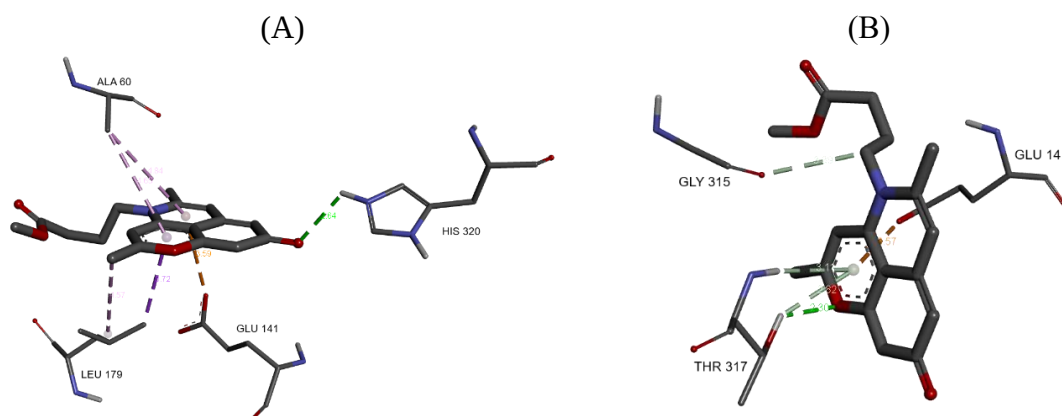


Figura B7. Interacciones de las conformaciones de la casiarina B con los residuos aminoacídicos de la enzima PvPMV (ID PDB:4ZL4). (A) primera conformación y (B) segunda conformación. Representados en 3D en Discovery Studio.