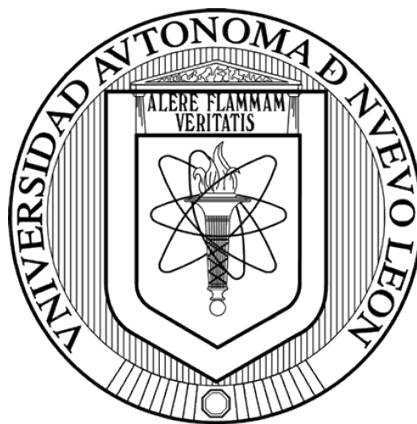


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ACOPLAMIENTO OXIDATIVO ENTRE DIHIDROBENZO[C]FENANTRIDINAS
E INDOLES Y EVALUACIÓN CONTRA BACTERIAS
FARMACORRESISTENTES**

Por

Q.F.B. REYNA MARTHA GALLEGOS ALVARADO

**Como requisito para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

Noviembre, 2018

**Acoplamiento Oxidativo entre Dihidrobenzo[c]fenantridinas e Indoles y
Evaluación contra Bacterias Fármacorresistentes**

Aprobación de la Tesis:

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Presidente

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño

Secretaria

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez

Vocal

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

Subdirectora de Estudios de Posgrado

**“Acoplamiento Oxidativo entre Dihidrobenzo[c]fenantridinas e Indoles y
Evaluación contra Bacterias Fármacorresistentes”**

Revisión de la Tesis:

Comité Tutorial:

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño

Dra. Susana Thelma López Cortina

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

Subdirectora de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS



Se agradece a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el financiamiento a través del proyecto PAICYT No. CE315-15.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo monetario mediante el proyecto de investigación No. CB-2013/222152 y por la beca de manutención otorgada con número (CVU/Becario): 781458/604931.



A la Facultad de Ciencias Químicas por la infraestructura y las facilidades otorgadas para desarrollar el presente trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Edgar Abraham García Zepeda, por haberme confiado este proyecto y darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Productos Naturales y Sintéticos, así como brindarme el apoyo, asesoría y conocimientos para la realización de esta tesis.

A la Dra. María del Rayo Camacho Corona por el apoyo brindado para la realización de los ensayos biológicos.

Al Dr. Luis Demetrio Miranda del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por la adquisición de los espectros de masas y resonancia magnética nuclear

A los miembros del comité tutorial, por las observaciones realizadas al presente trabajo:

Dra. Susana T. López Cortina, Dra. Myrna L. Yeverino Gutiérrez y a la Dra. Patricia C. Esquivel Ferriño.

A la Dra. Elvira Garza González, por las facilidades otorgadas para los ensayos biológicos en el Laboratorio de Gastroenterología del Hospital Universitario de la UANL.

DEDICATORIA

Esta tesis me gustaría dedicarla a las personas que de verdad estuvieron presente durante los dos años de la maestría:

A mi papá, por presumir a su hija química y sentirse orgulloso de mí, a pesar de que jamás pude cumplir la estancia en el extranjero. Siempre recordaré el 27 de mayo en que te dije que presenté para la maestría y me abrazaste.

A mi mamá por todas las veces que me escuchó y llevó al parque. Por darme de comer cuando le decía “no comí nada en todo el día” y ya había comido. Definitivamente por ser la persona que más me apoyó estos dos años.

A mi hermana, por tenerme paciencia cuando grababa para distraerme y por quedarse conmigo desvelándose.

A Zacatecas y Jesús por los ratos de diversión, pláticas y consejos, porque un día difícil de 14 horas de trabajo se alegraba con tan solo una hora de comida con ustedes. Por aguantar mis desplantes de niña... quisiera poner tantas cosas, pero sería una hoja solo para ustedes dos. Sé que se acordarán de mí como yo de ustedes.

A Bryan y Fernando, por enseñarme a ver la ciencia de manera más objetiva y enfocada, por hacerme madurar y decirme las cosas como son, aunque a veces tardara en aceptarlo.

A Deyaní porque fue la única que aceptó hacer las pruebas biológicas conmigo. Por dar su mayor esfuerzo y recordarme la metodología. Porque a pesar del cansancio y sol a las tres de la tarde siempre mantuvo su sonrisa.

A Canchola y a Michelle por permitirme enseñarles y acercarlos a la química de productos naturales. Por ustedes aprendí que me gusta enseñar a las personas. Bryan también va aquí, pero al final él terminó enseñándome más cosas a mí que yo a él. Canchola por venir 20 domingos a realizar su tesis y en el camino ayudarme con el extracto y hacer muchas referencias a Bob Esponja. A Michelle por enseñarme que no importa la edad, si tienes el espíritu de un investigador y por alegrarme en mi cumpleaños al decirme que entraría a QFB.

A Karla y Tomasso; personas muy interesantes con las que conviví, pero por cuestiones de tiempo no coincidimos más, también formaron parte de mi pequeño mundo. A Tadeo por brindarme sus consejos al inicio que no sabía cómo tratar a los alcaloides y con formatos de tesis.

A la Dra. Lucy por ser mi ejemplo a seguir desde primer semestre de licenciatura y con quien tuve el honor de tomar clases nuevamente en posgrado.

Doy gracias a Dios por permitirme concluir mis estudios de maestría y por todas las experiencias buenas y malas. Le agradezco hacerme aprender dos lecciones muy importantes en la vida: la primera es que ser religioso no tiene nada que ver con ser buena persona y la segunda, al fin entendí el significado de que “por algo pasan las cosas”.

RESUMEN

Q.F.B. Reyna Martha Gallegos Alvarado Fecha de Graduación: Noviembre 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Acoplamiento Oxidativo entre Dihidrobenzo[c]fenantridinas e Indoles y Evaluación contra Bacterias Fármacorresistentes

Número de páginas: 174 Candidato al grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de Estudio: Química y Farmacología de Productos Naturales

Propósito y Método del Estudio:

Las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a los agentes antimicrobianos se han incrementado drásticamente en los últimos años. Las tendencias de investigación han sido orientadas al descubrimiento de compuestos que posean estructuras diferentes a los antibióticos prescritos y que en consecuencia tengan dianas moleculares distintas. Los compuestos heterocíclicos como los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina e indoles han sido estudiados por sus propiedades antimicrobianas e inhibidoras de las bombas de expulsión de fármacos, respectivamente. Así, en el presente proyecto de investigación se planteó la síntesis de nuevas moléculas a partir de dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina, dos alcaloides con actividad antibacteriana modesta. Para ello se postuló que la funcionalización del enlace bencílico con diversos indoles les conferiría capacidad antibacteriana contra cepas resistentes a fármacos.

La propuesta se llevó a cabo en tres etapas: el análisis fitoquímico para la purificación y el aislamiento de dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina, a partir del extracto metanólico de las semillas de *Bocconia latisejala*; la funcionalización bencílica de los

alcaloides mediante acoplamiento cruzado deshidrogenativo (ACD) con diversos indoles y asistido con sales de cobre. Los derivados de estos alcaloides se evaluaron sobre cepas de diferentes bacterias Gram-positivas y Gram-negativas resistentes a diferentes antibacterianos utilizando el método de microdilución en placa.

Contribuciones y Conclusiones:

Se realizó la purificación de dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina a partir del extracto metanólico de *B. latisejala* en un rendimiento de 0.05 y 0.09 % respectivamente. Se logró la funcionalización bencílica de dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina con diversos indoles con cantidades catalíticas (5 mol%) de CuBr, en condiciones aeróbicas y a temperatura ambiente, obteniéndose rendimientos moderados, por lo cual representa una metodología amigable al medio ambiente ya que no requiere el uso de peróxidos o benzoquinonas como agentes oxidantes y sólo implica un paso de reacción para la incorporación del indol. Se determinó la actividad antibacteriana de dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina, así como de sus análogos acoplados con diferentes indoles. Se obtuvieron siete derivados indólicos C6–C3' de dihidrosanguinarina (**3a–3g**), de los cuales **3a** y **3b** presentaron potente actividad contra la cepa fármacorresistente de *M. tuberculosis* G122, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 25 y 1.56 µg/mL, respectivamente. Asimismo, se obtuvieron siete derivados indólicos C6–C3' de dihidroqueleritrina (**4a–4g**), de los cuales **4b** presentó un valor de CMI igual a 12.5 µg/mL contra las cepas resistentes de *S. epidermidis* y *E. faecium*, resultando un valor igual al observado para el fármaco de referencia levofloxacino. Aunado a lo anterior, se obtuvieron dos derivados indólicos C6–N1' de dihidroqueleritrina (**4i–4j**) y un artefacto durante el proceso de purificación (**4k**), de los cuales **4k** y **4j** presentaron valores de CMI muy importantes contra las cepas Gram-positivas farmacorresistentes evaluadas. Por un lado, **4k** resultó cuatro veces más potente (CMI = 3.12 µg/mL) contra *S. aureus* que el

control levofloxacino (CMI = 12.5 µg/mL), ocho veces más activo (CMI = 1.56 µg/mL) contra *E. faecium* (CMI = 12.5 µg/mL) e igualmente activo contra *S. epidermidis* (CMI = 6.25 µg/mL). Por el otro, **4j** exhibió la misma actividad (CMI = 6.25 µg/mL) contra *S. aureus* que el control levofloxacino (CMI = 6.25 µg/mL), dos veces mayor actividad (CMI = 6.25 µg/mL) contra *E. faecium* (CMI = 12.5 µg/mL) e igual actividad contra *S. epidermidis* (CMI = 6.25 µg/mL).

La funcionalización bencílica de dihidroqueleritrina podría generar compuestos líderes para el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos, específicos contra cepas Gram-positivas.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Director de Tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Codirector de Tesis

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
2.1 Infecciones bacterianas	4
2.1.1 Tratamiento farmacológico	5
2.1.1.1 Mecanismos de acción	5
2.1.2 Resistencia Bacteriana	9
2.1.2.1 Mecanismos de resistencia	9
2.1.2.1.1 Bombas de expulsión	10
2.1.3 Epidemiología	11
2.1.4 Estrategias para combatir la resistencia bacteriana	14
2.1.4.1 Inhibidores de bombas de expulsión	15
2.1.4.2 Inhibidores de virulencia	17
2.2 <i>Bocconia latispala</i>	18
2.2.1 Alcaloides benzo[c]fenantridínicos	19
2.3 Acoplamiento cruzado deshidrogenativo	25
2.3.1 Acoplamiento C(sp ³)-H y C(sp ²)-H	27
HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	29
3.1 Hipótesis	29
3.2 Objetivo general	29
3.3 Objetivos específicos	30
3.4 Justificación	30
PARTE EXPERIMENTAL	32
4.1 Ubicación	32
4.2 Materiales y métodos	32
4.2.1 Aislamiento y purificación de compuestos por cromatografía	32
4.2.2 Caracterización de los compuestos obtenidos	33
4.2.3 Síntesis de <i>N</i> -metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas	34
4.2.4 Análisis de monocristal por difracción de rayos X	34
4.2.5 Análisis conformacional	35
4.2.6 Ensayos biológicos	35
4.3 Obtención de los alcaloides <i>N</i>-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridínicos	36
4.3.1 Recolección de semillas de <i>B. latispala</i>	36
4.3.2 Preparación del extracto metanólico a partir de las semillas de <i>B. latispala</i>	36
4.4 Procedimiento para la obtención de los derivados de 3	39
4.5 Procedimiento para la obtención de los derivados de 4	40

4.6 Ensayos biológicos	41
4.6.1 Protocolo para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.....	41
4.6.1.1 Cepas y cultivo	41
4.6.1.1.1 Ensayo Biológico.....	41
4.6.2 Protocolo para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	43
4.6.2.1 Cepas y cultivo	43
4.6.2.2 Ensayo Biológico.....	43
4.7 Manejo de residuos.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1 Elucidación estructural de los alcaloides naturales	46
5.1.1 Datos espectroscópicos de los alcaloides dihidrobenzo[c]fenantridínicos.....	46
5.1.1.1 Características de dihidrosanguinarina (3)	46
5.1.1.2 Características de dihidroqueleritrina (4)	47
5.1.1.3 Características de 12-metoxidihidroqueleritrina (5)	48
5.1.1.4 Características de dihidroquelirubina (6)	48
5.2 Elucidación estructural de los alcaloides naturales	49
5.2.1 Caracterización de dihidrosanguinarina (3).....	49
5.2.2 Caracterización de dihidroqueleritrina (4).....	50
5.2.3 Caracterización de 12-metoxidihidroqueleritrina (5).....	52
5.2.4 Caracterización de dihidroquelirubina (6).....	54
5.3 Síntesis de los derivados del compuesto 3	56
5.3.1 Datos espectroscópicos de los derivados de 3.	58
5.3.2 Elucidación estructural de los derivados de 3	64
5.3.2.1 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-indol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, 3a	64
5.3.2.2 Elucidación estructural del producto 6-(1'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, 3b	65
5.3.2.3 Elucidación estructural del producto 6-(2'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, 3c	67
5.3.2.4 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-5'-metoxiindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, 3e	69
5.3.2.5 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-5'-flúorindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, 3f	71
5.3.2.6 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-6'-cloroindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, 3g	73
5.4 Síntesis de los derivados del compuesto 4	75
5.4.1 Datos espectroscópicos de los derivados de 4	76
5.4.2 Elucidación estructural de los derivados de 4	82
5.4.2.1 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-indol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, 4a ..	82
5.4.2.2 Elucidación estructural del producto 6-(1'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, 4b	84
5.4.2.3 Elucidación estructural del producto 6-(2'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, 4c	86
5.4.2.4 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-5'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, 4d	88
5.4.2.5 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-5'-metoxiindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, 4e	90
5.4.2.6 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-5'-flúorindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, 4f	92

5.4.2.7 Elucidación estructural del producto 6-(1'H-6'-cloroindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, 4g	94
5.5 Obtención de subproductos de 4	96
5.5.1 Datos espectroscópicos de los aductos C6-N1' de 4	98
5.5.2 Elucidación estructural de los aductos C6-N1' de 4	99
5.5.2.1 Elucidación estructural de 6-(6'-cloroindol-1'-il)-5,6-dihiqueleritrina, 4i	99
5.5.2.2 Elucidación estructural 6-(5'-nitroindol-1'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, 4j	101
5.6 Obtención de subproductos durante la purificación de 3 y 4	103
5.6.1 Datos espectroscópicos de 4k	104
5.6.2 Elucidación estructural de 6-metoxidihidroqueleritrina, 4k	105
5.7 Propuesta de mecanismo de reacción	107
5.8 Análisis del esquema de reacción propuesto	108
5.9 Actividad antibacteriana	111
5.10 Relación estructura-actividad antibacteriana	114
5.11 Validación de la hipótesis	118
CONCLUSIONES	119
PERSPECTIVAS	122
REFERENCIAS	123
ANEXOS	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Familias de bombas de expulsión	11
Figura 2. Muertes atribuidas a resistencia antimicrobiana cada año en 2050 [34].....	13
Figura 3. a) INF ₅₅ b) Berberina c) Híbrido de berberina/INF ₅₅	16
Figura 4. Sistema benzo[c]fenantridínico.....	18
Figura 5. Hojas (a), frutos (b) y semillas (c) de <i>Bocconia latisejala</i>	19
Figura 6. Benzo[c]fenantridinas cuaternarias, sanguinarina (1) y queleritrina (2).	20
Figura 7. Ensamblaje de 1 con la proteína FtsZ.....	21
Figura 8. Estudio de relación estructura-actividad antimicrobiana de alcaloides benzofenantridínicos [55].....	23
Figura 9. Análogos reducidos de las benzo[c]fenantridinas cuaternarias, dihidrosanguinarina (3) y dihidroqueleritrina (4).	24
Figura 10. Acoplamiento cruzado deshidrogenativo (ACD).....	26
Figura 11. Fraccionamiento del extracto metanólico de las semillas de <i>B. latisejala</i>	38
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto dihidrosanguinarina (3).....	50
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto dihidroqueleritrina (4).....	52
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 12-metoxidihidroqueleritrina (5).	54
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto dihidroquelirubina (6).....	56
Figura 16. Reacción ACD entre 3 y 1-metilindol.....	57
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3a	65
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3b	67
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3c	69
Figura 20. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3e	71
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3f	73
Figura 22. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3g	75
Figura 23. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 4a	84
Figura 24. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 4b	86
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 4c	88
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 4d	90
Figura 27. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 4e	92
Figura 28. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 4f	94
Figura 29. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ + DMSO- <i>d</i> ₆) del compuesto 4g	96
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de 4i	101
Figura 31. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de 4j	103
Figura 32. Subproductos encontrados en las reacciones de ACD de 3 y 4	104
Figura 33. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de 4k	106
Figura 34. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de 4k	107
Figura 35. a) Estructura de mínima energía de 3 . b) Estructura de mínima energía de 4 . c) Vista ORTEP de la estructura de 4	108
Figura 36. Diferencias estructurales entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [74],	115
Figura 37. a) Confórmero más estable de 4a . b) Segundo confórmero más estable de 4a . c) Confórmero más estable de 3^a	117

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos usados actualmente	7
Tabla 2. Lista de bacterias más peligrosas para la salud humana.....	14
Tabla 3. Resultados del ensayo de Gibbons y colaboradores	22
Tabla 4. Bacterias resistentes ante las que se evaluó la actividad antibacteriana de las benzo[c]fenantridinas naturales y funcionalizadas	41
Tabla 5. Disposición de residuos de acuerdo con el reglamento de la Facultad de Ciencias Químicas.....	45
Tabla 6. Rendimientos de la reacción de ACD entre 3 y los distintos indoles.....	58
Tabla 7. Rendimientos de la reacción de ACD entre 4 y los distintos indoles.....	76
Tabla 8. Rendimiento de los aductos C6-N1' entre 4 y diversos indoles	97
Tabla 9. Comparación de rendimientos entre 3 y 4	109
Tabla 10. Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de los análogos de 3 y 4	113
Tabla 11. Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de los controles.	114

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción de acoplamiento entre los alcaloides 3 y 4 e indoles. ...	28
Esquema 2. ACD entre 3 y diversos indoles.....	39
Esquema 3. ACD entre 4 y diversos indoles.....	40
Esquema 4. ACD C6-N1' entre 4 y diversos indoles.....	97

ABREVIATURAS

ACD	Acoplamiento cruzado deshidrogenativo
ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados Celsius
C	Carbono
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CuBr	Bromuro cuproso
δ	Desplazamiento Químico
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de doble
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>dt</i>	Doble de triplete
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
FE	Fase Estacionaria
FM	Fase Móvil
g	Gramos

H	Hidrógeno
h	Horas
H ₂ O	Agua
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
λ	Longitud de onda
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
Mm	Milimolar
mmol	Milimol
N	Nitrógeno
NDM-1+	New Delhi Metalo-beta-lactamasa positiva
OMS	Organización Mundial de la Salud
Oxa-48	Oxacilinas-48
PF	Punto de Fusión
Rf	Factor de Retención

RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
<i>s</i>	Singulete
<i>t</i>	Triplete
TB	Tuberculosis
<i>t</i> BOOH	Hidroperóxido de terc-butilo
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta
UFC	Unidades formadoras de colonias
<i>v</i>	Número de onda

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de las enfermedades infecciosas se produce en respuesta a los cambios ecológicos globales, incluyendo aquellos ocasionados por el desarrollo de las comunidades y uso de la tierra, al comportamiento irracional del ser humano, a los viajes y al comercio internacional, al desarrollo tecnológico e industrial y a las crisis en las medidas de salud pública [1], [2].

En general, las enfermedades infecciosas son combatidas por agentes antimicrobianos como los antibióticos, pero al mismo tiempo, los cambios y adaptaciones microbianas a su vez han generado el fenómeno de la resistencia a los antibióticos en cepas patógenas bacterianas, que se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial [3].

Durante décadas, la estrategia más común que las industrias farmacéuticas han utilizado para contrarrestar la resistencia bacteriana es la producción de análogos a partir de una misma estructura base; sin embargo, a medida que el tiempo avanza las bacterias se adaptan a esa estructura primaria y las probabilidades de modificar la estructura base para conseguir la efectividad

antimicrobiana cada vez son menores [4], [5]. Por todo lo anterior, se han promovido diversas estrategias para combatir la resistencia bacteriana, como la búsqueda de antimicrobianos con nuevos mecanismos de acción, más eficaces y seguros [6].

La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos ha sido orientada a compuestos que posean estructuras diferentes a los antibióticos prescritos y que en consecuencia tengan dianas moleculares distintas, por lo cual se han apoyado de los productos naturales debido a que han sido una rica fuente de fármacos que han mostrado gran eficacia en el tratamiento de infecciones bacterianas [7].

Entre la extensa gama de productos naturales, los alcaloides son un grupo diverso de estructuras responsables de los efectos benéficos de las medicinas tradicionales que han inspirado el desarrollo de varios fármacos antibacterianos y siguen siendo el centro de atención de muchas investigaciones [8].

Otra de las estrategias que se han planteado es la búsqueda de moléculas que inhiban la virulencia y mecanismos de resistencia de las bacterias; las cuales, aunque no tengan actividad antibacteriana por si solas, toman un papel importante en combinación con algunos antibióticos, mejorando el efecto de los mismos [9].

Considerando que las enfermedades infecciosas cada vez son más mortales a consecuencia de las cepas bacterianas farmacorresistentes, es importante implementar nuevas estrategias que permitan desarrollar agentes antibacterianos más eficaces. Por esta razón, en el presente proyecto de

investigación se planteó la síntesis de nuevos derivados de productos naturales, partiendo de alcaloides benzo[c]fenantridínicos que han mostrado propiedades antibacterianas e incorporando diferentes indoles a sus estructuras para mejorar dichas propiedades.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Infecciones bacterianas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las enfermedades infecciosas como alteraciones causadas por bacterias, virus, hongos o parásitos. Aunque muchos de estos organismos viven en nuestros cuerpos y normalmente son inofensivos o incluso útiles, bajo ciertas condiciones, algunos pueden causar enfermedades [10].

Mundialmente, los dos grupos más vulnerables a presentar infecciones son los infantes y los adultos mayores, debido a una función inmune más débil y en parte también a una mayor exposición a ambientes patógenos. Ésto se ha visto reflejado en los aumentos de la tasa de mortalidad en esas edades, por lo que con el paso del tiempo se han creado diversos tratamientos, sobre todo farmacológicos, para solucionar esta problemática [11], [12].

2.1.1 Tratamiento farmacológico

Los antibacterianos son la primera línea de acción para el tratamiento de infecciones bacterianas. Los mecanismos por los que los compuestos con actividad antibacteriana inhiben el crecimiento o causan la muerte de las bacterias son muy variados y dependen de las dianas afectadas.

Teniendo en cuenta su efecto antibacteriano, éstos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (sólo inhiben temporalmente el crecimiento bacteriano) [13].

Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración o afinidad que alcance en la diana terapéutica [14].

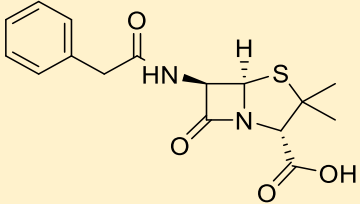
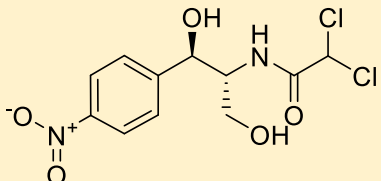
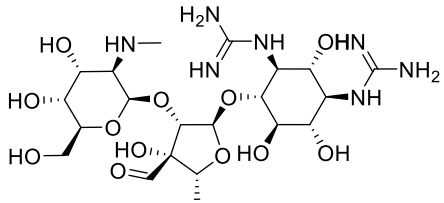
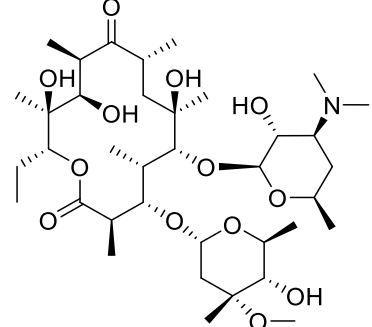
2.1.1.1 Mecanismos de acción

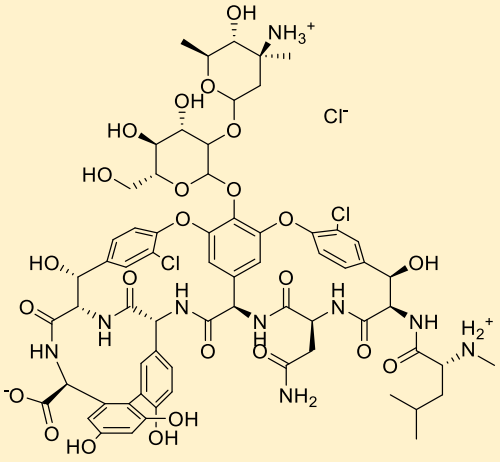
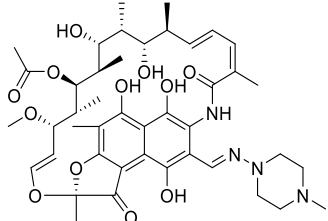
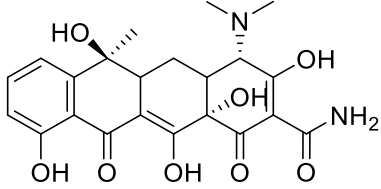
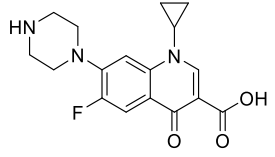
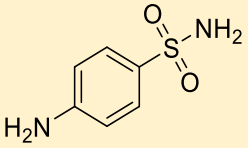
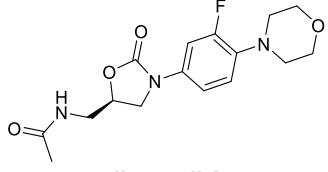
Desde el punto de vista molecular, los antimicrobianos de uso clínico ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplasmática, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos [15]. Los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ácido desoxirribonucleico

(ADN) son bactericidas; y los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos, son bacteriostáticos. [16].

Los antimicrobianos de uso clínico también pueden catalogarse según su estructura química, lo que da lugar a amplias familias de fármacos que comparten un esqueleto y un mecanismo de acción en común. Las principales familias de antimicrobianos junto con su mecanismo de acción se muestran en la Tabla 1 [17].

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos usados actualmente

Clase Química	Diana Terapéutica	Ejemplo	Clase Química	Diana Terapéutica	Ejemplo
β -lactámicos	Biosíntesis de peptidoglicano	 <p>penicilina</p>	Fenicoles	Síntesis de proteínas	 <p>cloranfenicol</p>
Aminoglucósidos	Síntesis de proteínas	 <p>estreptomina</p>	Macrólidos	Síntesis de proteínas	 <p>eritromicina</p>

Clase Química	Diana Terapéutica	Ejemplo	Clase Química	Diana Terapéutica	Ejemplo
Glicopéptidos	Síntesis de la pared celular	 <p>vancomicina</p>	Ansamicinas	Transcripción de RNA	 <p>rifampicina</p>
Tetraciclinas	Síntesis de proteínas	 <p>tetraciclina</p>	Quinolonas	Replicación de ADN	 <p>ciprofloxacino</p>
Sulfonamidas	Síntesis de folato	 <p>sulfonamida</p>	Oxazolidinonas	Síntesis de proteínas	 <p>linezolid</p>

2.1.2 Resistencia Bacteriana

El fenómeno de resistencia se produce cuando las bacterias sufren cambios en respuesta a la exposición a antimicrobianos [18]. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas.

Es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas. Sin embargo, el proceso se ve acelerado por el mal uso y el abuso que los pacientes hacen con la terapia de los antimicrobianos. Los microorganismos resistentes a los antimicrobianos están presentes en las personas, los animales y el medio ambiente (agua, suelo y aire), y pueden transmitirse de persona a persona o entre las personas y los animales. El mal control de las infecciones, las condiciones sanitarias deficientes y la manipulación inadecuada de los alimentos fomentan la propagación de la resistencia a antimicrobianos [19]–[21].

2.1.2.1 Mecanismos de resistencia

La resistencia bacteriana es un mecanismo de defensa que puede ser intrínseco (natural) o adquirido (de una especie bacteriana a otra). La gran mayoría de los mecanismos de resistencia pueden agruparse en tres categorías: inactivación enzimática, modificaciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad [22].

La inactivación enzimática es el principal mecanismo de resistencia que consiste en la hidrólisis, como sucede con las betalactamasas y los betalactámicos, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos. En lo que respecta a las modificaciones en el sitio blanco, existen diversas estrategias entre las que se destacan algunas modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico o la adquisición de genes que codifican para sustitutos de los blancos originales. Por último, las alteraciones de la permeabilidad pueden incluir disminución en la entrada de los fármacos, por ejemplo, por la disminución de porinas y aumento en la salida de éstos mediante la sobreexpresión de bombas de expulsión [23], [24].

2.1.2.1.1 Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión son proteínas de transporte que se encuentran tanto en bacterias Gram-positivas como negativas y están implicadas en la exclusión de sustratos desde el interior de las células al exterior de ellas. Estas proteínas pueden ser específicas para un sustrato o pueden transportar una gama de compuestos estructuralmente diferentes (como antibióticos de múltiples clases) [25].

De acuerdo con su composición, fuentes de energía y sustratos, las bombas de expulsión bacterianas se clasifican en cinco grandes familias (Figura 1): la familia de agregación-división-resistencia (RND, por sus siglas en inglés),

la superfamilia del facilitador principal (MFS, por sus siglas en inglés), la superfamilia de casete de unión a adenosín trifosfato (ATP), también conocida como transportadores ABC, la familia de menor resistencia a múltiples fármacos (SMR, por sus siglas en inglés) y la familia de expulsión de toxinas y multifármacos (MATE, por sus siglas en inglés) [26]. Dependiendo de las clases específicas a las que pertenecen, las bombas de expulsión son transportadores con un componente único o sistemas de componentes múltiples que no solo contienen un transportador interno de membrana, sino también un canal externo de membrana y una proteína adaptadora periplásmica, como la bomba RND [27].

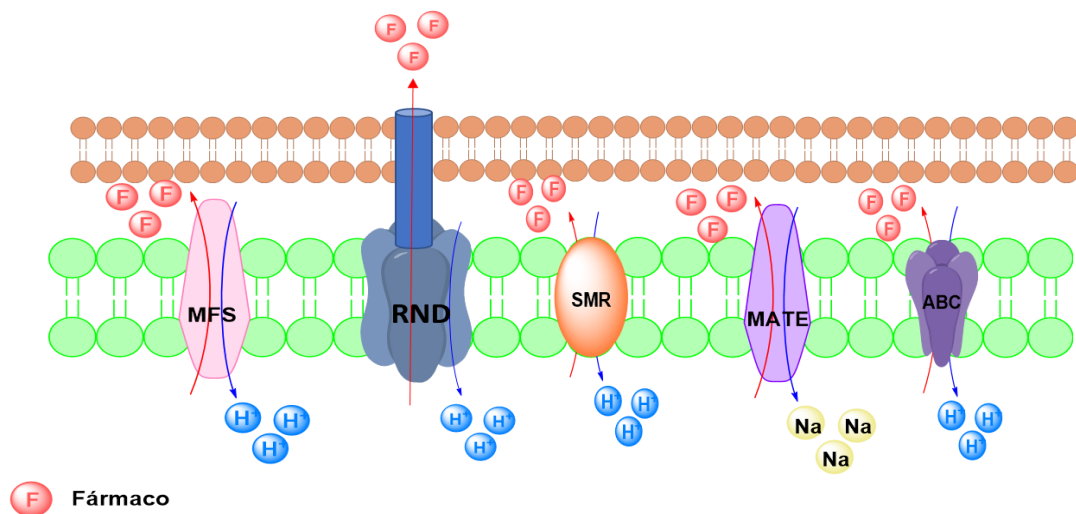


Figura 1. Familias de bombas de expulsión

2.1.3 Epidemiología

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) reportó en 2013 más de 2 millones de casos nuevos de infecciones

cada año desarrolladas por bacterias fármacorresistentes y que 23,000 de estos casos terminaban en defunción [28].

El patógeno mejor documentado es *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, que predomina entre 0.1% en Europa y hasta más del 80% en Asia. El *S. aureus* es una bacteria que está asociada a una alta mortalidad y genera un alto costo en hospitales debido a que es resistente a antibióticos betalactámicos, a macrólidos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos [29]. Otro ejemplo de patógenos que actúan de forma compleja con el reservorio humano son las enterobacterias. Una vez que colonizan el intestino de un paciente internado en un hospital, es altamente probable que ocurra una transmisión nosocomial y los cuidados se vuelvan más difíciles. Suelen ser resistentes a las cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas [30], [31]. Por último, el grupo de bacterias Gram-negativas no fermentadoras de lactosa también están ganando terreno en las infecciones nosocomiales, especialmente *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, que además de ser oportunistas, han demostrado una gran habilidad para resistir la terapia farmacológica común, por lo que prolongar su detección conlleva a que desarrollen rápidamente resistencia a aminoglucósidos, carbapenémicos, ceftazidima y ciprofloxacino [31]–[33].

Si no se toma una acción antes de 2050, se estima que las muertes debido a bacterias fármacorresistentes se elevarán a 10 millones al año. La mayoría de las muertes se producirían en África y Asia con más de 4 millones en cada región. La cifra estimada de muertes para el resto del mundo es menor, pero aún podría llegar a casi 400,000 en América Latina y Europa [34].

Asimismo, para el año 2050 también se estima que la resistencia a los antimicrobianos le cueste al mundo entre 60 y 100 billones de dólares (Figura 2) y podría llevar a más de 28 millones de personas a la pobreza extrema [34].

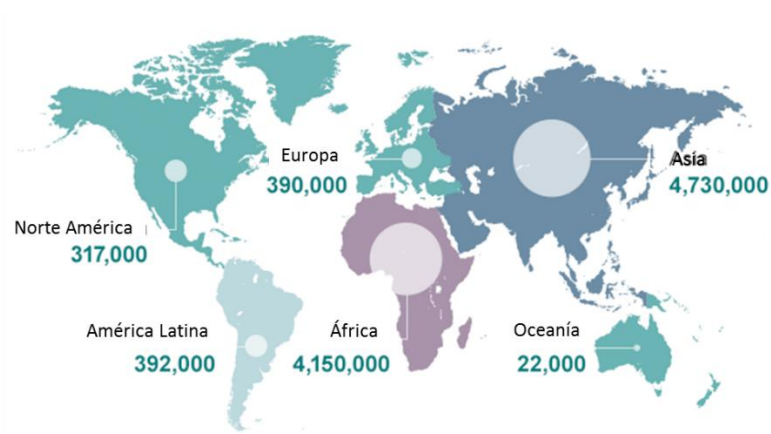


Figura 2. Muertes atribuidas a resistencia antimicrobiana cada año en 2050 [34].

La resistencia bacteriana se ha incrementado de manera drástica en los últimos años y en consecuencia, en septiembre de 2016, la ONU elevó a nivel de crisis el problema de fármacoresistencia bacteriana [35].

En febrero de 2017, la OMS dio a conocer una lista de las bacterias más peligrosas para la salud humana, clasificándolas en prioridad crítica, elevada y media; para así motivar a los investigadores a desarrollar diversas estrategias para contrarrestar esta problemática actual (Tabla 2) [18].

Tabla 2. Lista de bacterias más peligrosas para la salud humana

Prioridad 1: Crítica	<p><i>Acinetobacter baumannii</i>, resistente a los carbapenémicos</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistente a los carbapenémicos</p> <p><i>Enterobacteriaceae</i>, resistentes a los carbapenémicos, productoras de betalactamasas de espectro extendido</p>
Prioridad 2: Elevada	<p><i>Enterococcus faecium</i>, resistente a la vancomicina</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i>, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina</p> <p><i>Helicobacter pylori</i>, resistente a la claritromicina</p> <p><i>Campylobacter</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas</p> <p><i>Salmonellae</i>, resistentes a las fluoroquinolonas</p> <p><i>Neisseria gonorrhoeae</i>, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas</p>
Prioridad 3: Media	<p><i>Streptococcus pneumoniae</i>, sin sensibilidad a la penicilina</p> <p><i>Haemophilus influenzae</i>, resistente a la ampicilina</p> <p><i>Shigella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas</p>

2.1.4 Estrategias para combatir la resistencia bacteriana

La expulsión activa de antibióticos se describió por primera vez hace años y desde entonces numerosas clases de sistemas en patógenos tanto Gram-positivos como Gram-negativos han sido identificados. En general, hay diferentes opciones para inhibir la expulsión de antimicrobianos: interferir con la expresión del gen de expulsión, adición de grupos funcionales al medicamento para evitar el reconocimiento, la interferencia con el ensamblaje de las proteínas del canal,

el desarrollo de compuestos que compitan con el antibiótico durante la expulsión, colapso de la transferencia de energía de expulsión y bloqueo del canal de expulsión [36].

La estrategia más conocida es la combinación de un antibiótico con un inhibidor de su mecanismo de resistencia. El ejemplo más exitoso por el cual este enfoque fue adoptado es la combinación de un antibiótico betalactámico con un inhibidor de la enzima betalactamasa [37].

2.1.4.1 Inhibidores de bombas de expulsión

Los compuestos que inhiben las bombas de expulsión también han sido investigados como adyuvantes para evitar la resistencia a los antibióticos. Una de las moléculas que más se ha estudiado en los últimos años es la reserpina, un alcaloide de la familia del indol. Sin embargo, la reserpina no es utilizada como inhibidor de las bombas de expulsión de fármacos debido a su neurotoxicidad a concentraciones requeridas para inhibir esa bomba [38].

Por esta razón, Markham y colaboradores buscaron en bases de datos estructuras que compartieran similitud con la reserpina para probar su actividad como inhibidor de la bomba de expulsión NorA en *S. aureus*; un tipo de bomba perteneciente a la MFS. Debido a que la reserpina tiene un fragmento indólico en su estructura, era de esperar que en las bases de datos hubiera registro de fragmentos indólicos candidatos a presentar actividad como inhibidores de las

bombas de expulsión. Descartando aquellas moléculas que eran tóxicas para el ser humano, concluyeron que el 2-fenil-5-nitroindol (INF₅₅) fue el inhibidor más potente sobre la bomba de expulsión NorA [39].

Posteriormente, Ball y colaboradores [40] sintetizaron un híbrido a partir de berberina y INF₅₅ (Figura 3) para conjugar las propiedades antibacterianas del alcaloide protoberberínico y las propiedades inhibitorias de la bomba de expulsión del INF₅₅. Los resultados mostraron que el híbrido presentaba valores más bajos de concentración mínima inhibitoria (CMI = 3.12 a 6.25 µM) frente a cepas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium* y *B. anthracis* que sobreexpresaban las bombas de expulsión; en comparación a la adición equimolar (relación 1:1 en moles) de la mezcla de berberina y INF₅₅ que presentaba valores de CMI más altos frente a las mismas cepas.

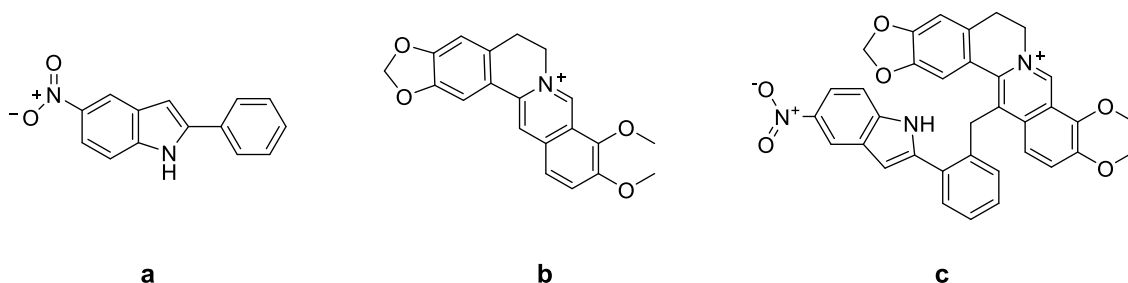


Figura 3. a) INF₅₅ b) Berberina c) Híbrido de berberina/INF₅₅.

Tomando como antecedente a Ball, Zeng y colaboradores [41] sintetizaron distintos derivados indólicos, de los cuales el 3-amino-6-carboxiindol y el 3-nitro-6-aminoindol pueden ser usados como inhibidores de la proteína expulsora de fármacos TolC. La inhibición de esta diana empleando métodos computacionales

mostraron que dichos indoles interactuaban con los residuos aromáticos de tirosina y fenilalanina agrupados en un anillo alrededor de la base de la proteína TolC, los cuales son importantes en el estado inactivo de esta proteína, impidiendo su apertura.

Lepri y colaboradores [42] realizaron un estudio de relación estructura-actividad dirigido a la inhibición de la bomba de expulsión NorA en *S. aureus*. En dicho estudio se concluye que una sustitución en la posición C5' del indol con un grupo electroatractor, como el grupo nitro (NO₂), potenciaba el efecto inhibitor de las bombas de expulsión, más no era indispensable para presentar dicho efecto. Además de lo anterior, concluyeron que la sustitución en el nitrógeno del indol con un fragmento bencílico aumentaba la lipofilicidad y las interacciones hidrofóbicas con la proteína NorA.

2.1.4.2 Inhibidores de virulencia

Los indoles también han sido objeto de estudio como inhibidores de diferentes mecanismos de virulencia bacteriana. Lee y su equipo de trabajo [43] demostraron mediante un ensayo de microarreglos la influencia del indol y el 7-hidroxiindol sobre la regulación de genes de expresión de bombas de expulsión y de factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*. Al realizar un aumento de indol y 7-hidroxiindol en el medio donde se cultivó la bacteria (2mM), se observó una disminución la capacidad de las bacterias de controlar su propia densidad celular, reduciendo el crecimiento de la cepa en un 47%. Por otro lado,

indol y 7-hidroxiindol manifestaron un segundo mecanismo totalmente diferente reprimiendo los genes mexGHI-opmD, que codifican para las bombas de expulsión del tipo transportadores ABC.

2.2 *Bocconia latisejala*

Bocconia es un género perteneciente a la familia Papaveraceae que comúnmente es conocido como “llora sangre”. Las especies de este género son endémicas de las zonas cálidas que abarcan desde México a Sudamérica, entre las cuales resaltan *B. arborea*, *B. cordata*, *B. frutescens*, *B. integrifolia*, *B. latisejala*, *B. laurine*, *B. microcarpa*, *B. pearcei* y *B. vulcanica* [44].

Se le han atribuido propiedades como anestésico local, antiinflamatorio, antiinfeccioso y antitumoral a las plantas pertenecientes a este género, debido principalmente a la presencia de alcaloides en su corteza, semillas y hojas. Los estudios fitoquímicos y farmacológicos han permitido identificar a los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina (Figura 4) como las moléculas responsables de la actividad biológica [44]–[49].

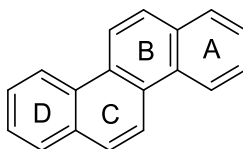


Figura 4. Sistema benzo[c]fenantridínico.

Bocconia latisejala (Figura 5) es una especie endémica del estado de Nuevo León, localizada sobre los plegamientos de las faldas de la Sierra Madre Oriental, a una altura de entre 400 y 800 metros sobre el nivel del mar. Es un arbusto que puede alcanzar hasta dos metros de altura con tallo quebradizo. Tiene las hojas grandes, lobuladas, de 15 a 35 cm de largo y de 10 a 30 cm de ancho que frecuentemente están concentradas en los extremos de las ramas. La cara superior de la hoja es verde y la cara inferior es verde grisáceo con vellosidades. El fruto es una cápsula lisa de forma elipsoidal de color rojo, carnosa y puntiaguda en ambos extremos, que llega a medir hasta 7 mm de largo. Las semillas son pequeñas, negras, con un extremo de color rojo [50].

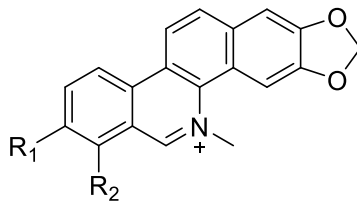


Figura 5. Hojas (a), frutos (b) y semillas (c) de *Bocconia latisejala*.

2.2.1 Alcaloides benzo[c]fenantridínicos

La actividad biológica de los alcaloides benzo[c]fenantridínicos está ligada al equilibrio que existe entre el catión de su amina cuaternaria y su pseudobase

(Figura 6); ésta última aporta lipofilicidad y ésta a su vez aumenta la biodisponibilidad [51].



(1) $R_1=R_2=-OCH_2O-$

(2) $R_1=R_2=-OCH_3$

Figura 6. Benzo[c]fenantridinas cuaternarias, sanguinarina (1) y queleritrina (2).

Beuria y Tushar [52] realizaron un estudio *in vitro* para observar el comportamiento de sanguinarina (1) con la proteína filamentosa Z sensible a la temperatura (FtsZ, por sus siglas en inglés). Sus resultados mostraron que existe un ensamblaje entre 1 y la proteína FtsZ que puede llevarse en ambos o uno de dos pasos: el primero, inhibe que los monómeros formen protofilamentos, y el segundo, inhibe que los protofilamentos formen el polímero de FtsZ. Una vez hecho esto, inhabilita la formación Z del ADN e induce la elongación celular, deteniendo la citocinesis de la célula sin afectar la estructura de membrana (Figura 7).

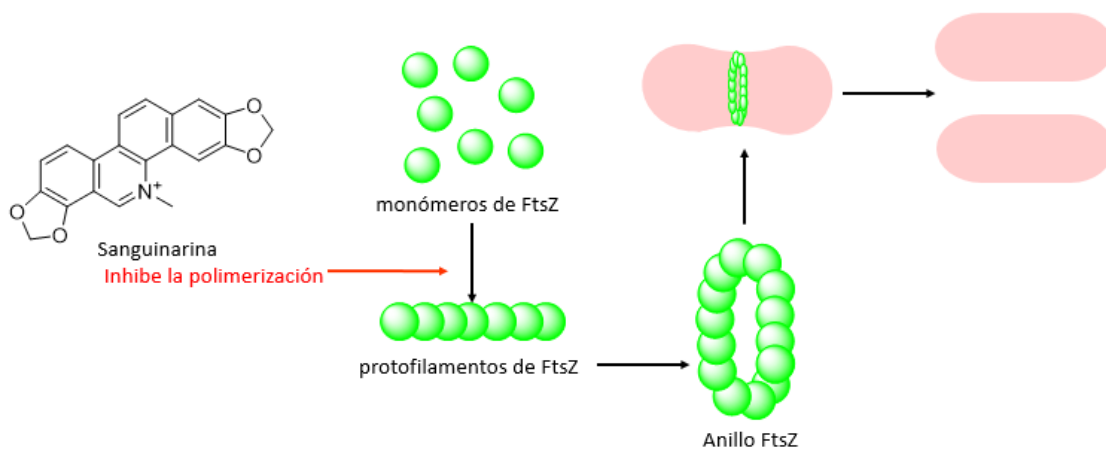


Figura 7. Ensamblaje de **1** con la proteína FtsZ

Quelerritrina (**2**) se evaluó contra *S. aureus* resistente a meticilina por Gibbons y su equipo [53], específicamente tres cepas que sobreexpresaban bombas de expulsión que les confieren resistencia a tetraciclina, macrólidos y fluoroquinolonas y una cepa de *S. aureus* no resistente como control. Se comparó el valor de CMI con un medicamento representativo de cada familia (tetraciclina, eritromicina y norfloxacino) y los resultados indicaron que **2** posee actividad antibacteriana significativa en comparación a los antibióticos antes mencionados, ya que los valores de CMI resultaron menores para cada uno con su correspondiente bomba de expulsión (Tabla **3**).

Tabla 3. Resultados del ensayo de Gibbons y colaboradores

<i>S. aureus</i> resistente a meticilina	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	Quelerritrina	Norfloxacino	Eritromicina	Tetraciclina
RN4220 (Msr (A)) (resistente a macrólidos)	8	32	64	0.5
XU212 (Tet (K)) (resistente a tetraciclinas)	16	8	4096	256
1199-B (Nor (A)) (resistente a fluoroquinolonas)	8	64	2	32
ATCC 25923	4	16	0.25	0.5

De forma similar, Obiang-Obounou y colaboradores [54] llevaron a cabo un protocolo para determinar la CMI de **1** sobre *S. aureus* resistente a meticilina. Se obtuvieron valores de CMI comprendidos entre 3.12 y 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, los cuales resultaron menores a los observados para los controles ampicilina (31.25 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ciprofloxacino (125-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En 2014, Tavares [55] realizó estudios de relación estructura-actividad antimicrobiana de diversos alcaloides benzo[c]fenantridínicos concluyendo que el ion iminio era imprescindible para presentar dicha actividad y que los grupos electrodonadores en las posiciones 7 y 8 aumentaban el efecto antibacteriano de las benzo[c]fenantridinas (Figura 8). En el estudio se trabajó con siete bacterias Gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus spp*; y ocho Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. cloacae*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Burkholderia cepacia*, *Morganella morganii*.

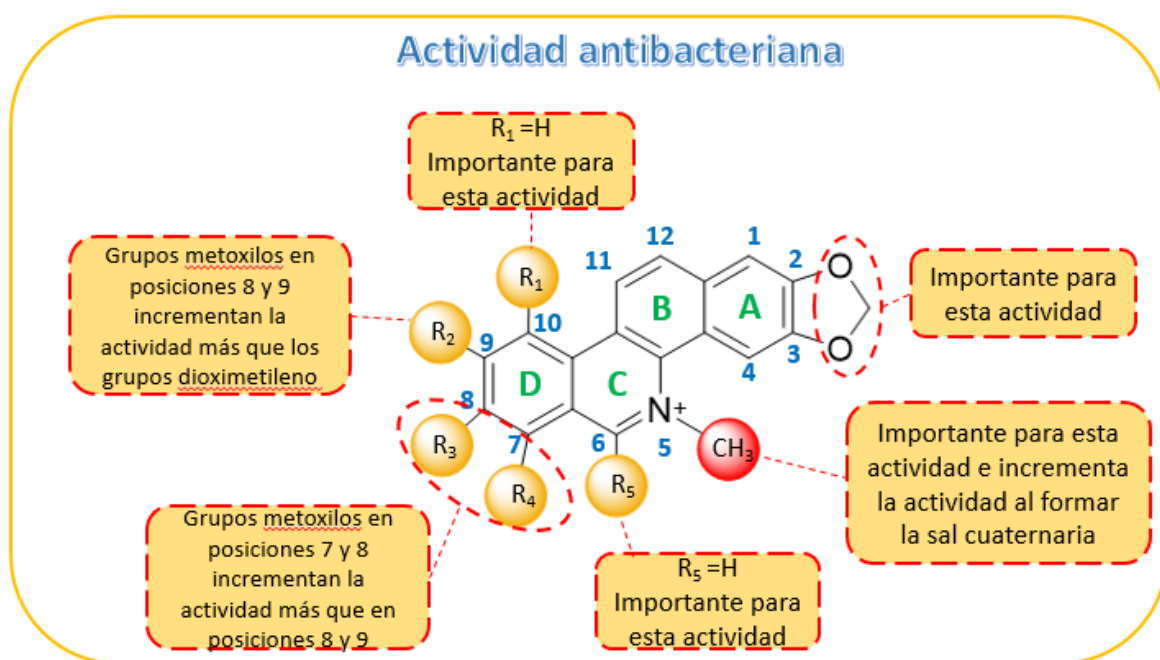
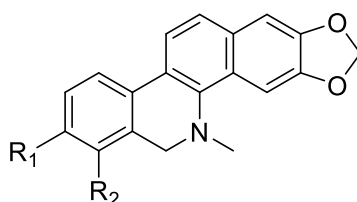


Figura 8. Estudio de relación estructura-actividad antimicrobiana de alcaloides benzofenantridínicos [55].

En otros estudios se ha observado que los análogos reducidos de las benzo[c]fenantridinas cuaternarias **1** y **2**, dihidrosanguinarina (**3**) y dihidroqueleritrina (**4**) (Figura 9), también han mostrado actividad antibacteriana contra cepas sensibles y resistentes a distintos antibióticos.



(1) $R_1=R_2= -OCH_2O-$

(2) $R_1=R_2= -OCH_3$

Figura 9. Análogos reducidos de las benzo[c]fenantridinas cuaternarias, dihidrosanguinarina (**3**) y dihidroqueleritrina (**4**).

Navarro y colaboradores [46] observaron CMI de 9.3 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto **3** en contra de *S. aureus* y *S. faecalis* sensibles a gentamicina, un valor muy cercano al del control (CMI de gentamicina: 5 $\mu\text{g/mL}$).

De manera similar, Zuo y colaboradores [56] reportaron que el compuesto **3** presentó actividad antibacteriana moderada (CMI= 23.4 $\mu\text{g/mL}$) frente a *S. aureus* resistente a meticilina, en comparación con el control vancomicina (CMI= 1 $\mu\text{g/mL}$).

Por otro lado, Tantapakul y colaboradores [57] reportaron que el compuesto **4** presentó potente actividad antibacteriana contra *S. aureus* resistente a meticilina (CMI= 8 $\mu\text{g/mL}$) y actividad moderada frente a *E. coli* (CMI=

16 µg/mL) en comparación con el control vancomicina (CMI= 1 µg/mL). Además, las CMI reportadas por Tavares [55] en cepas sensibles a cloranfenicol como *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *K. pneumoniae* resultaron de 3.12 µg/mL, mientras que la CMI del control cloranfenicol fue de 0.7-0.8 µg/mL.

Aunado a lo anterior, algunas dihidrobenzo[c]fenantridinas funcionalizadas en la posición bencílica, mostraron un aumento considerable en su actividad antibacteriana; tal es el caso de 6-metoxidihidrosanguinarina, que mostró una CMI de 1.9-3.9 µg/mL contra *S. aureus* resistente a meticilina, utilizando como control ampicilina (CMI= 0.06 µg/mL) [58].

Otro hallazgo importante fue reportado por Hernández [59] donde se observó que (–)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina presentaba valores de CMI de 6.25 y 12.5 µg/mL contra aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida-rifampicina-etambutol e isoniacida-rifampicina-estreptomina, respectivamente.

2.3 Acoplamiento cruzado deshidrogenativo

Históricamente, las adiciones nucleofílicas, las sustituciones y las reacciones tipo Friedel-Crafts formaron los pilares de los métodos para conectar dos moléculas más simples a través de la formación de un enlace C–C en estructuras acíclicas [60].

En las últimas décadas, los catalizadores de metales de transición a través de acoplamiento cruzado han superado algunas limitaciones de las reacciones clásicas (por ejemplo, sustituciones nucleofílicas que involucran carbonos sp^2) y han aumentado enormemente la eficiencia de las formaciones de enlaces C-C, especialmente las que involucran arenos y alquenos, en la química orgánica moderna (Figura 10) [61], [62].

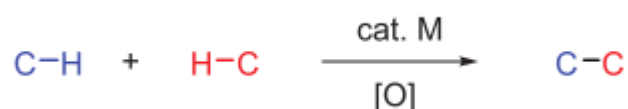


Figura 10. Acoplamiento cruzado deshidrogenativo (ACD).

La activación y funcionalización de enlaces carbono-hidrógeno (C-H) adyacentes a un heteroátomo representa una estrategia sintética relevante que permite explorar el espacio químico con nuevas moléculas o mejorar las propiedades farmacocinéticas de compuestos bioactivos [63]. El término funcionalización C-H incluye la ruptura (o activación) de un enlace C-H y subsecuente formación de un enlace carbono-carbono (C-C) o carbono-heteroátomo (C-X) [64].

Una de las ventajas más importantes de la funcionalización C-H es que permite la conversión directa del enlace C-H en un solo paso. Efectivamente, la transformación directa de enlaces C-H ofrece atajos en comparación con la síntesis orgánica clásica, haciendo así más sencillas las vías de síntesis y por ende se impacta de forma positiva en la economía de pasos y proceso total; es decir, no se requieren pasos adicionales como las reacciones de protección y

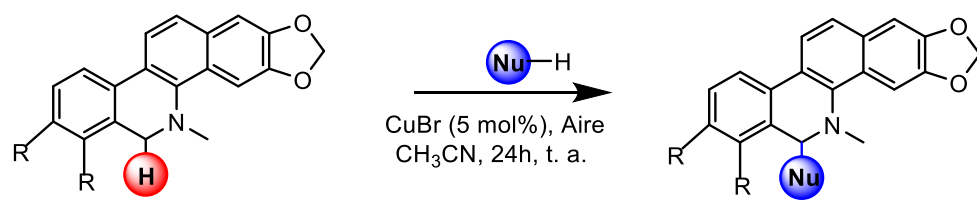
desprotección [63]-[65]. Adicional a lo anterior, es una reacción amigable al medio ambiente porque requiere cantidades catalíticas de un metal de transición para efectuar el acoplamiento oxidativo y en algunos casos la reacción se puede realizar con oxígeno molecular haciendo innecesario el uso de agentes oxidantes fuertes como peróxidos y benzoquinonas [66].

2.3.1 Acoplamiento C(sp³)-H y C(sp²)-H.

Las tetrahydroisoquinolinas e indoles son estructuras comunes en productos naturales. La síntesis asimétrica de ambos compuestos orgánicos es otro esfuerzo importante en la química orgánica moderna [67].

En 2005 Li y colaboradores [68] implementaron el ACD para conectar el C(sp³) de la tetrahydroisoquinolina con el C(sp²) de un indol. De acuerdo con los resultados, las ventajas de este método incluyen alta regioselectividad, el uso de un indol desprotegido (grupo amino libre) y el uso de cobre, un metal relativamente barato, como catalizador.

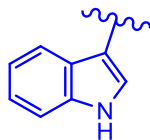
Recientemente, Romo y colaboradores [69] reportaron la funcionalización de los compuestos **3** y **4** con diversos nucleófilos, entre ellos indol y 2-metilindol (Esquema **1**), utilizando bromuro cuproso como catalizador y acetonitrilo como disolvente, obteniéndose rendimientos que van desde 39.7 hasta 60.1 %.



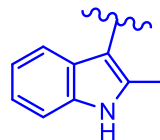
3 R= OCH₂O

4 R= OCH₃

[Nu]:



indol



2-metilindol

Esquema 1. Reacción de acoplamiento entre los alcaloides **3** y **4** e indoles.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Hipótesis

La funcionalización de dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina con un fragmento indólico favorecerá que alguno de los derivados presente mayor actividad antibacteriana, contra cepas fármacorresistentes, que su precursor.

3.2 Objetivo general

Sintetizar, caracterizar estructuralmente y determinar la actividad antibacteriana contra cepas fármacorresistentes de derivados de dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina C(6)-funcionalizadas con diversos indoles.

3.3 Objetivos específicos

1. Aislar y purificar dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina a partir del extracto metanólico de las semillas de *Bocconia latisejala*.
2. Funcionalizar dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina mediante acoplamiento cruzado deshidrogenativo del enlace C(sp³)-H bencílico con diversos indoles.
3. Caracterizar las estructuras químicas de las dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
4. Evaluar la actividad antibacteriana de las dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas contra cepas sensibles y fármacorresistentes de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

3.4 Justificación

A pesar de que las benzo[c]fenantridinas cuaternarias (Ej.: Queleritrina, **2**) poseen mayor actividad antibacteriana que sus contrapartes reducidas (Ej.: Dihidroqueleritrina, **4**), las primeras no son selectivas y son altamente tóxicas debido a la capacidad que tienen para intercalarse con el ADN y de sufrir adiciones nucleofílicas de grupos amino o tiol presentes en las biomoléculas.

Tomando en cuenta que algunas dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-sustituidas (Ej.: 6-metoxidihidroqueleritrina) mejoran la actividad antibacteriana de las dihidrobenzo[c]fenantridinas contra algunas cepas resistentes (*S. aureus*

resistente a meticilina) y que algunos indoles han mostrado excelentes resultados como inhibidores de la bomba de expulsión de fármacos y factores de virulencia en bacterias resistentes; en el presente proyecto de investigación se postuló que la incorporación de diversos indoles en la posición 6 de los alcaloides **3** y **4** mediante acoplamiento cruzado deshidrogenativo, conferirían propiedades inhibitorias del crecimiento celular de cepas bacterianas resistentes a antibióticos. Con esta propuesta de diseño se esperaba que los indoles confirieran mayor capacidad antibacteriana a los alcaloides, principalmente contra bacterias resistentes a fármacos.

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Ubicación

La obtención de los alcaloides naturales y la obtención de los derivados semisintéticos se realizaron en el Laboratorio de Productos Naturales y Sintéticos ubicado en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los ensayos para determinar la actividad antibacteriana se realizaron en el Laboratorio de Gastroenterología del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Aislamiento y purificación de compuestos por cromatografía

Para la realización de cromatografías en columna (CC) se utilizó como fase estacionaria gel de sílice con tamaño de partícula de 0.040-0.063 mm (EMD

Chemical Inc). Para la cromatografía en capa fina (CCF) se emplearon cromatofolios de gel de sílice 60 F-254 de dimensiones 20 x 20 cm, con un grosor de 0.2 mm con indicador fluorescente marca Merck. Los disolventes utilizados como fase móvil fueron Hexano (Hex), Acetato de etilo (AcOEt), Diclorometano (DCM), Cloroformo (CHCl_3) y Metanol (MeOH). Las mezclas de disolventes empleadas en el análisis por CCF y en las purificaciones por cromatografía en columna se presentan como volumen por volumen. Como revelador se utilizó una lámpara de UV, marca Spectroline (λ_{254} y 365nm), solución de sulfato cérico amoniacal y yodo. Para eliminar el disolvente de las muestras, se utilizó el evaporador rotativo marca Yamato y Büchi.

4.2.2 Caracterización de los compuestos obtenidos

Los puntos de fusión (sin corregir) se determinaron en un aparato de Fisher Johns. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) se registraron en los instrumentos Varian Unity (300 MHz) y Bruker AVANCE (300 MHz) usando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en partes por millón (ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se informan en Hz. Los patrones de división se describen como singulete (s), singulete ancho (sa), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), multiplete (m), doblete de doblete (dd) y triplete de doblete (td). Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C NMR) se registraron usando un espectrómetro de RMN a 75 MHz y

los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm. Los espectros de masas de baja y alta resolución (EMBR y EMAR, respectivamente) se registraron en un espectrómetro de masas JEOL JMS-AX505HA.

4.2.3 Síntesis de *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridinas C(6)-funcionalizadas

La funcionalización de los compuestos **3** y **4** se llevó a cabo a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación con un agitador magnético sobre una plancha Cimarec. Se utilizó bromuro cuproso (CuBr) como catalizador, 1,4-dicloroetano (DCE) como disolvente y oxígeno ambiental como oxidante (O₂).

Todos los reactivos se compraron de Sigma Aldrich y se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Los nucleófilos con los que se funcionalizaron las dihidrobenzo[*c*]fenantridinas mediante acoplamiento oxidativo fueron: indol, 1-metilindol, 2-metilindol, 5-metoxiindol, 5-nitroindol, 5-metilindol, 5-flúorindol y 6-cloroindol.

A menos que se indique lo contrario, todos los rendimientos se refieren a productos aislados después de la cromatografía en columna.

4.2.4 Análisis de monocristal por difracción de rayos X

Las mediciones de difracción de rayos X de **3a** se obtuvieron en un difractómetro con geometría κ Bruker D8 Venture equipado con radiación

multicapa Cu K α (λ 0,71073 Å) y detector de área CCD. La estructura cristalina se resolvió mediante métodos directos utilizando SHELXS-2014/7 [70] y se refinó mediante mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 utilizando SHELXL-2014/7 [70] con factores de temperatura anisotrópicos para átomos que no son de hidrógeno que convergen en índices R finales [$I > 2\sigma(I)$], $R_1 = 0.0829$, $wR_2 = 0.1887$. Los átomos de hidrógeno, excepto los que formaron parte de los sistemas de enlaces de hidrógeno, se incluyeron en las posiciones calculadas y no se refinaron

4.2.5 Análisis conformacional

El análisis conformacional se realizó mediante mecánica molecular con los programas PCMODEL (Program. Serena Software, PO Box, 3076, Bloomington, IN 47402-3076, USA) y ChemDraw (CambridgeSoft Corporation, 875 Massachusetts Ave. Cambridge, MA 02139, USA), donde se obtuvieron los conformeros de menor energía potencial relativa (MMX en kcal/mol).

4.2.6 Ensayos biológicos

Para todos los ensayos biológicos se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos con tapa (Corning Costar, New York). En los ensayos para determinar actividad antimicobacteriana se empleó: medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), rezasurina (Biotum, Hayward, CA), ácido oleico,

albúmina, dextrosa y catalasa (OADC; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), Tween 80 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), glicerina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), tubos cónicos de 10 y 25 mL (Falcon, USA), agua bidestilada, dimetilsulfóxido (J.T.Baker, USA), Incubadora (SANYO, Miami).

4.3 Obtención de los alcaloides *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridínicos

4.3.1 Recolección de semillas de *B. latisepala*

Se recolectaron las semillas de *Bocconia latisepala* S. Wats el 31 de julio y el 3 de septiembre de 2016. La especie fue localizada en una zona pedrera ubicada en la zona montañosa de San Pedro Garza García, Nuevo León, a una altitud de 1500 metros sobre el nivel del mar. Un ejemplar vegetal se depositó en el Herbario UANL Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (número de voucher: 26668). La parte fitoquímica del proyecto se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales y Sintéticos de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.3.2 Preparación del extracto metanólico a partir de las semillas de *B. latisepala*

Las semillas de *Bocconia latisepala* se dejaron secar al sol y se retiró la vaina obteniendo 1.04 Kg de semilla de la primera colecta y 310 g de la segunda

colecta. Después se pulverizaron en un molino de cuchillas hasta la obtención de un polvo. Las extracciones se realizaron por separado según la colecta. Se dividió en 3 partes la primera colecta y en dos la segunda y se depositaron en matraces Erlenmeyer de 2 L. A cada matraz se adicionó 1.5 L de metanol y la mezcla se dejó en maceración durante 48 horas con agitaciones intermitentes durante este tiempo. El macerado se filtró a través de algodón y se concentró en un evaporador rotativo a presión reducida con una temperatura de baño de 35°C. Este proceso se repitió 10 veces antes de desechar la materia orgánica. El extracto metanólico seco de la primera colecta pesó 312 g y el de la segunda colecta pesó 52 g. Ambos se conservaron en un refractario previamente pesado en una balanza granataria libres del polvo y la humedad hasta su procesamiento.

A partir de los sólidos insolubles del extracto metanólico de la primera colecta se realizó una cromatografía en columna. La columna fue empacada con gel de sílice en relación 1:20 a la muestra y se eluyó con Hexano (Hex), Diclorometano (DCM) en gradiente de polaridad. El gel de sílice fue preparado con Hexano al 100% y se inició la columna con Hex:DCM 90:10.

De las fracciones más abundantes se lograron aislar y purificar, por diferentes técnicas cromatográficas y de cristalización tres alcaloides dihidrobenzo[c]fenantridínicos, los cuales fueron identificados por sus datos espectroscópicos como dihidrosanguinarina (**3**), dihidroqueleritrina (**4**) y 12-metoxidihidroqueleritrina (**5**).

La parte aceitosa del extracto metanólico se procesó de manera similar en partes de 10 g debido a la labilidad de los compuestos que esperábamos obtener.

Se realizaron diversas cromatografías en columna con dimensiones de 5 cm x 30 cm en relación 1:20 a la muestra y se eluyó con Hex:Acetato de etilo (AcOEt) en gradiente de polaridad. El gel de sílice se preparó con Hexano al 100% y posteriormente la columna se eluyó con Hex:AcOEt 99:01. Durante el fraccionamiento se purificaron los alcaloides **3**, **4** y **5**, además de otro alcaloide, que no se había encontrado en los sólidos insolubles y se identificó como dihidroquelirubina (**6**) (Figura 11).

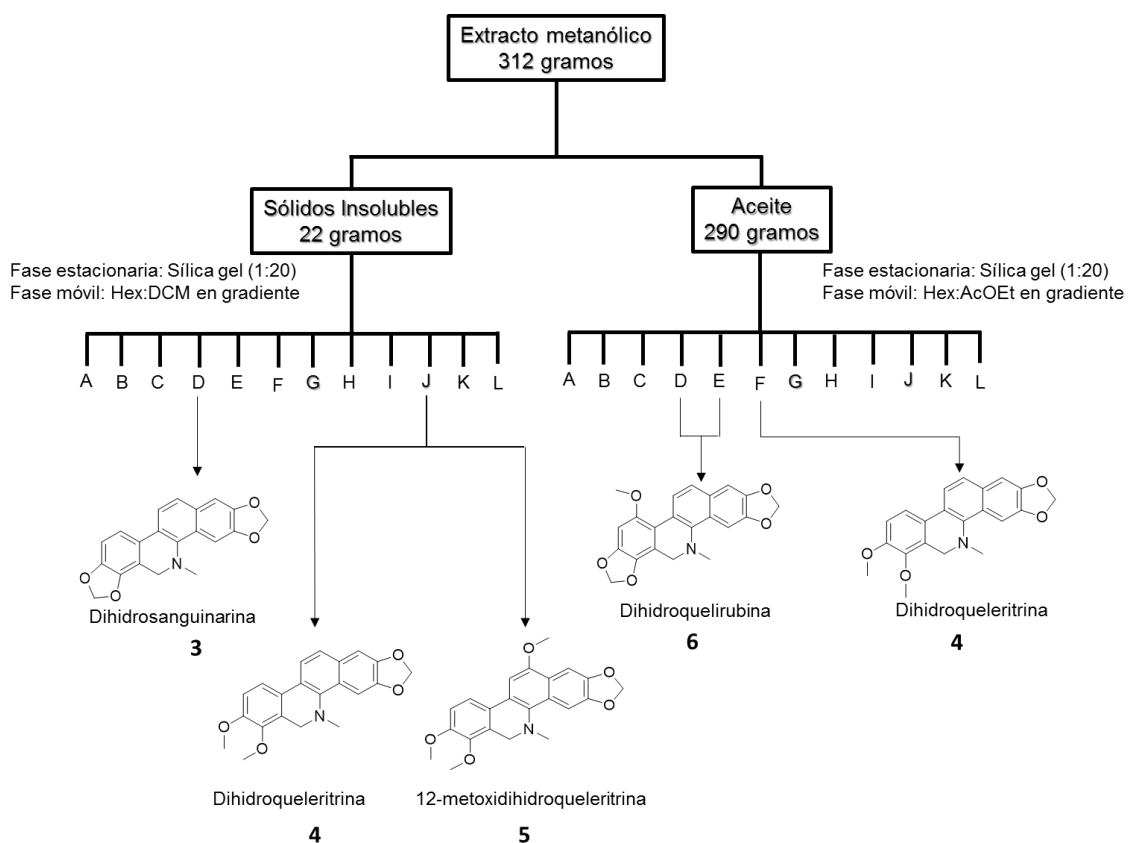
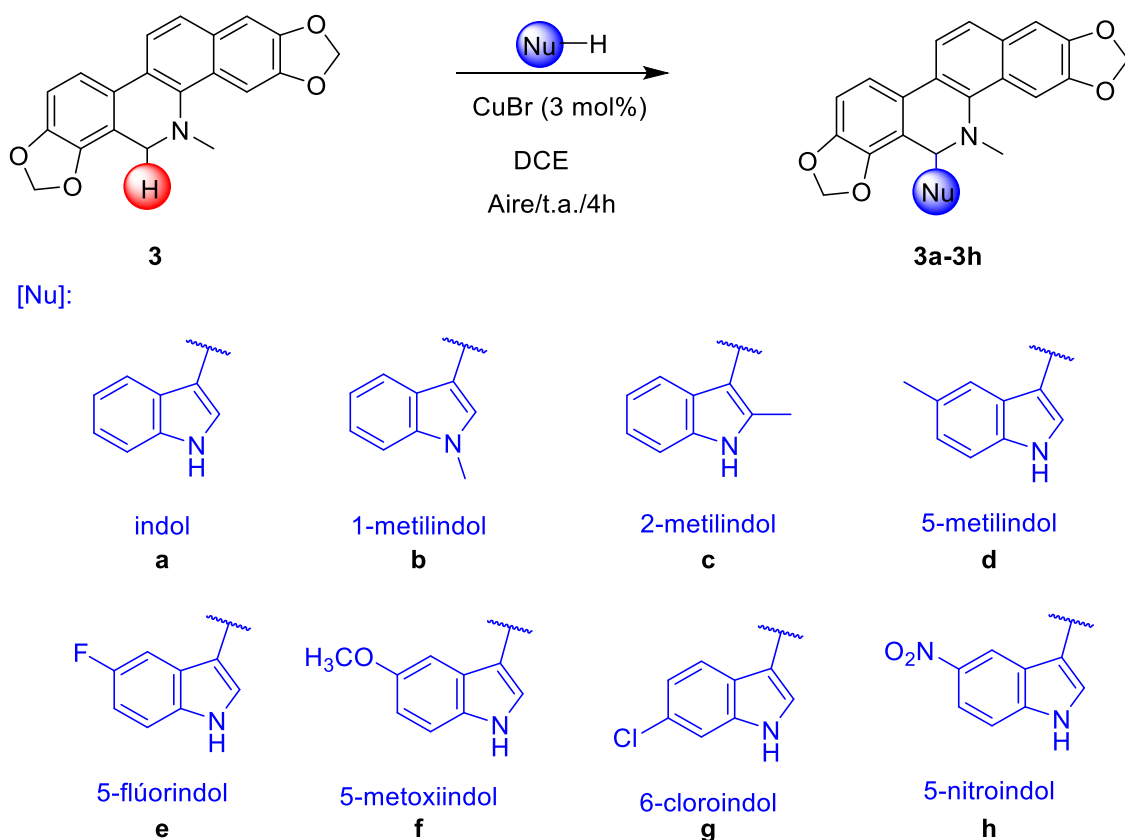


Figura 11. Fraccionamiento del extracto metanólico de las semillas de *B. latispala*.

4.4 Procedimiento para la obtención de los derivados de 3

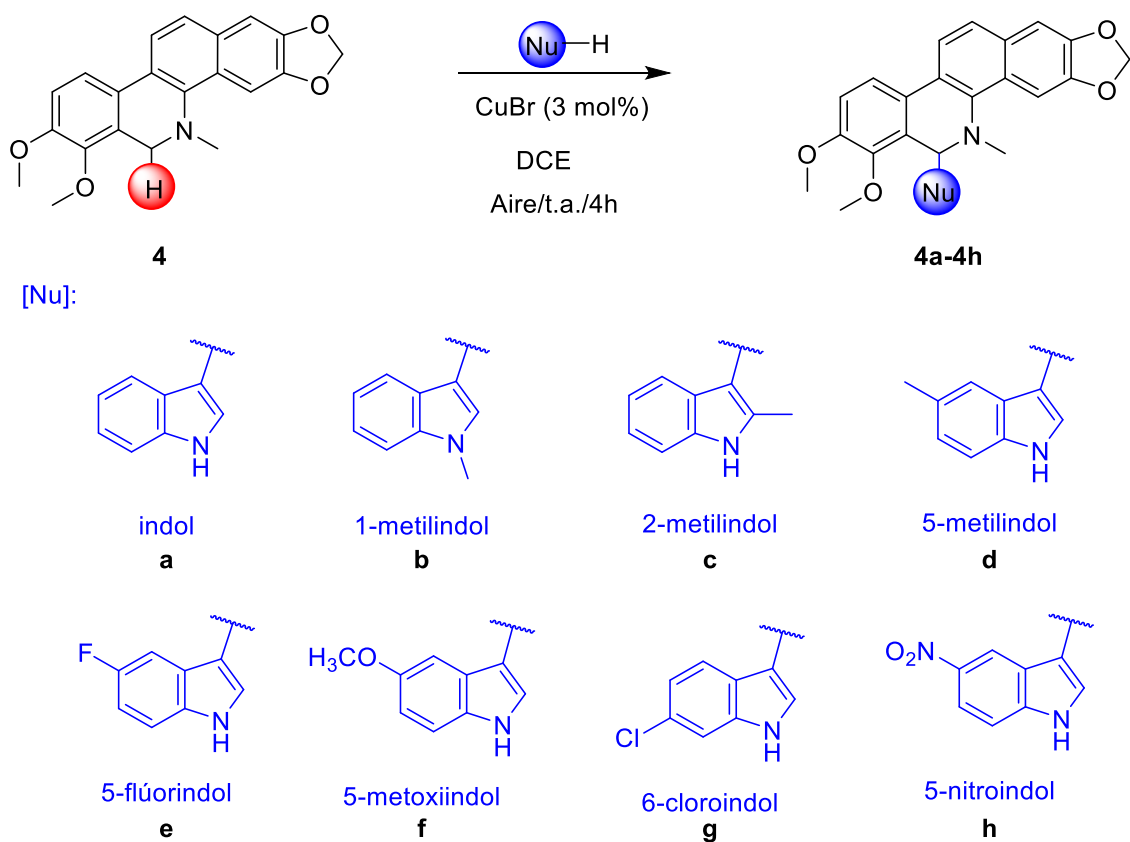
En un vial de vidrio se adicionó **3** (20 mg, 0.06 mol), indol (NuH, 1 eq), CuBr (3 mol%, 1.7×10^{-3} mol) y 1 mL de 1,2-dicloroetano (DCE) (Esquema 2). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 4 horas. El residuo de la reacción se fraccionó en cromatografía en columna con Hex:DCM (7:3 v/v) hasta la obtención del derivado correspondiente.



Esquema 2. ACD entre **3** y diversos indoles.

4.5 Procedimiento para la obtención de los derivados de 4

En un vial de vidrio se adicionó **4** (20 mg, 0.057 mol), indol (NuH, 1 eq), CuBr (3 mol%, 1.7×10^{-3} mol) y 1 mL de DCE (Esquema 3). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 4 horas. El residuo de la reacción se fraccionó en cromatografía en columna con Hex: DCM (7:3 v/v) hasta la obtención del derivado correspondiente.



Esquema 3. ACD entre **4** y diversos indoles.

4.6 Ensayos biológicos

4.6.1 Protocolo para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

4.6.1.1 Cepas y cultivo

Para la actividad antibacteriana se utilizaron las siguientes cepas de aislados clínicos resistentes a diferentes fármacos (Tabla 4).

Tabla 4. Bacterias resistentes ante las que se evaluó la actividad antibacteriana de las benzo[c]fenantridinas naturales y funcionalizadas

Gram (+)	Gram (-)	
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos y cefalosporinas de amplio espectro (NDM-1+)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente a linezolid		<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE
<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a oxacilinas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos

4.6.1.1 Ensayo Biológico

Las cepas se inocularon en placas preparadas con agar-sangre al 5% y cultivadas por 24 horas. Para la preparación del inóculo para el ensayo, de tres a cinco colonias de cada cultivo se transfirieron a tubos con solución salina estéril, y la turbidez se ajustó al tubo 0.5 de McFarland (1.5×10^8 Unidades formadoras de colonias (UFC)/mL). Posteriormente se transfirieron 10 μ L en 11 mL de caldo Mueller-Hinton, para alcanzar una concentración de 5×10^5 UFC/mL.

El ensayo se realizó de acuerdo con el método de microdilución reportado en la literatura [71]. Consistió en utilizar microplacas de 96 pocillos de fondo redondo estériles con tapa y en primer lugar se adicionaron 100 μ L de medio de cultivo en cada pocillo de toda la placa. A continuación, en el primer y segundo pocillo de la fila A se añadieron 100 μ L de la solución de trabajo (por duplicado) con la concentración de 4X (200 μ g/mL), se mezcló utilizando la micropipeta multicanal y de esta mezcla se tomaron 100 μ L y se transfirieron a la fila B para realizar una dilución 1:2, y se continuó así hasta la fila G, desechando los últimos 100 μ L. Posteriormente, se tomaron 100 μ L de la suspensión bacteriana ajustada al tubo 0.5 de McFarland y se adicionaron a los pozos con o sin muestra. A la fila H no se le adicionó suspensión bacteriana, ya que esta fila sirve como control de esterilidad. La microplaca se sometió a incubación a 37 °C durante 16-24 horas, a excepción de la cepa *S. epidermidis* resistente a linezolid, la cual se incubó 48 horas. Al término de la incubación se evaluó de forma visual el crecimiento o inhibición de la bacteria, tomándose como inhibición los pocillos donde no se observó turbidez ni depósito de bacterias en el fondo. Cada concentración se evaluó por duplicado y el experimento se realizó dos veces en días diferentes. Se utilizó levofloxacina como control positivo de referencia. Se determinó la CMI como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria.

4.6.2 Protocolo para *Mycobacterium tuberculosis*

4.6.2.1 Cepas y cultivo

Para este ensayo se empleó un aislado clínico de *M. tuberculosis* G122, el cual es resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol.

4.6.2.2 Ensayo Biológico

La evaluación de la actividad antimicobacteriana de los compuestos sintetizados y aislados se realizó frente a una cepa resistente a rifampicina e isoniazida de *M. tuberculosis* (G122) por el Ensayo de Microplaca con Alamar Azul (MABA) [72]. Para el cultivo de *M. tuberculosis* se utilizó el medio Middlebrook 7H9, el cual se esterilizó por autoclave y enfriado a temperatura ambiente para adicionar ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC). Las cepas se cultivaron a 37 °C durante 2 semanas con el propósito de alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. El inóculo para el ensayo se preparó diluyendo el cultivo y ajustando al tubo 1 de McFarland, seguido de la dilución 1:20 con medio Middlebrook.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos colocando 200 µL de agua estéril en los pozos de la periferia y añadiendo en los demás 100 µL de caldo 7H9. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de la solución de trabajo (compuestos puros) partiendo de una concentración de 200 µg/mL y haciendo una serie de diluciones 1:2 a lo ancho de la placa. Se añadieron 100 µL del inóculo previamente ajustado.

Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días y luego se les adicionó 20 µL del reactivo Azul de Alamar y 12 µL de Tween 80 al 10% a todos los pocillos. La placa se re-incubó a 37 °C por 24 horas. Si después de esta incubación se observó cambio de color azul a rosa, se interpretó que existe un crecimiento micobacteriano y que los compuestos evaluados se consideraron inactivos. Si el color permanecía azul se interpretó como ausencia de crecimiento micobacteriano y por consiguiente los compuestos evaluados se consideraron activos a las concentraciones ensayadas. En cada microplaca se incluyó etambutol y levofloxacina como controles positivos, mientras que el medio de cultivo y dimetilsulfóxido (DMSO) al 2.5% (v/v) se incluyeron como disolvente y control negativo, respectivamente. Cada concentración se evaluó por duplicado y el experimento se realizó dos veces en días diferentes.

4.7 Manejo de residuos

4.7.1 Síntesis y purificación.

La disposición de los residuos generados en la síntesis y purificación de los análogos de las dihidrobenzo[c]fenantridinas se realizó en los contenedores ubicados en el Laboratorio de Productos Naturales y Sintéticos en base al

reglamento interno de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Tabla 5).

Tabla 5. Disposición de residuos de acuerdo con el reglamento de la Facultad de Ciencias Químicas.

Colector A	Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas.
Colector B	Sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.
Colector C	Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos. no halogenados.
Colector D	Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos halogenados.
Colector E orgánico	Muy tóxico, cancerígeno, orgánico
Colector E inorgánico	Muy tóxico, cancerígeno, inorgánico.
Colector F	Reciclo de sales de metales preciosos.
Colector G	Combinaciones orgánicas sólidas.
Colector H	Oxidantes.
Vidrio Impregnado con Sustancias Peligrosas	
Plástico Impregnado con Sustancias Peligrosas	
Basura Industrial	Arena, sanitas, papel o magitel impregnado con residuos peligrosos. Absorbente que se utilizan para contener derrames. Guantes de plástico y látex

4.7.2. Ensayos biológicos.

Los residuos generados en los ensayos de actividad antibacteriana y antituberculosa fueron dispuestos en base a lo establecido por el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico Especializado del Hospital Universitario.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la preparación de las dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas primero se realizó la purificación de dihidrosanguinarina (**3**) y dihidroqueleritrina (**4**) a partir del extracto metanólico de las semillas de *B. latisepala* y su posterior análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C para confirmar las estructuras.

5.1 Elucidación estructural de los alcaloides naturales

5.1.1 Datos espectroscópicos de los alcaloides dihidrobenzo[c]fenantridínicos

5.1.1.1 Características de dihidrosanguinarina (**3**)

Cristales transparentes que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm. Después de oxidarse en la placa se ve una mancha naranja en la luz visible.

Punto de fusión (PF): 194-195°C

Rf: 0.52 (Hex:AcOEt, 80:20)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.68 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-11), 7.67 (1H, s, H-4), 7.47 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-10), 7.29 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-12), 7.10 (1H, s, H-1), 6.85 (1H, d, *J* = 8.1, H-9), 6.05 (2H, s, OCH₂O), 6.03 (2H, s, OCH₂O), 4.19 (2H, s, H-6), 2.61 (3H, s, N-CH₃).

5.1.1.2 Características de dihidroqueleritrina (4)

Cristales con reflejos amarillos que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ₂₅₄ y λ₃₆₀ nm. Después de oxidarse en la placa se ve una mancha amarilla en la luz visible.

PF: 164-165°C

Rf: 0.48 (Hex:AcOEt, 80:20)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): δ 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11), 7.67 (s, 1H, H-4), 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-10), 7.10 (s, 1H, H-1), 6.94 (d, *J* = 8.5, 1H, H-9), 6.04 (s, 2H, OCH₂O), 4.29 (s, 2H, H-6), 3.92 (s, 3H, O-CH₃), 3.87 (s, 3H, O-CH₃), 2.59 (s, 3H, N-CH₃).

5.1.1.3 Características de 12-metoxidihidroqueleritrina (5)

Cristales con reflejos amarillos que revelan azul celeste en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm. Después de oxidarse en la placa se ve una mancha amarilla en la luz visible.

PF: 179-181°C

Rf: 0.46 (Hex:AcOEt, 80:20)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.64 (s, 1H, H-4), 7.54 (s, 1H, H-11), 7.47 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-10), 7.05 (s, 1H, H-1), 6.94 (d, $J = 8.4$, 1H, H-9), 6.04 (s, 2H, OCH_2O), 4.26 (s, 2H, H-6), 4.02 (s, 3H, O-CH_3), 3.92 (s, 3H, O-CH_3), 3.87 (s, 3H, O-CH_3), 2.52 (s, 3H, N-CH_3).

5.1.1.4 Características de dihidroquelirubina (6)

Sólido rosa que revela celeste en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm. Después de oxidarse en la placa se ve una mancha rosa en la luz visible.

PF: 198-199 °C

Rf: 0.52 (Hex:AcOEt, 80:20)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-11), 7.69 (s, 1H, H-4), 7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-10), 7.10 (s, 1H, H-1), 6.60 (s, 1H, H-9), 6.03 (s, 2H, OCH_2O), 6.00 (s, 2H, OCH_2O), 4.10 (s, 2H, H-6), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 2.58 (s, 3H, N-CH_3).

5.2 Elucidación estructural de los alcaloides naturales

5.2.1 Caracterización de dihidrosanguinarina (**3**)

El fraccionamiento por CC de los sólidos insolubles del extracto metanólico permitió la purificación de un sólido blanco que recristalizó con AcOEt como cristales cúbicos translúcidos (549.2 mg equivalente al 0.05 % del total del peso de las semillas), cuyo espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **12**) mostró patrones de señales muy similares a los reportados para dihidrosanguinarina (**3**). El espectro exhibió un singulete en δ_{H} 2.61 ppm que integra para tres hidrógenos, el cual es característico de grupo metilo unido a nitrógeno. En δ_{H} 4.19 ppm está presente un singulete que integra para dos hidrógenos, el cual corresponde a los protones del metileno unido al nitrógeno. En δ_{H} 6.03 y 6.04 ppm se observaron dos singuletes que integran para dos hidrógenos cada uno y que, de acuerdo con sus desplazamientos químicos, corresponden a dos grupos dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_{H} 6.86, 7.28, 7.49 y 7.70 ppm; H-9, H-10, H-12 y H-11 respectivamente) con constantes de acoplamiento (J) típicas para protones en posición *orto* (alrededor de 8.1 Hz) y dos señales sencillas (δ_{H} 7.10 y 7.67 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones aromáticos en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

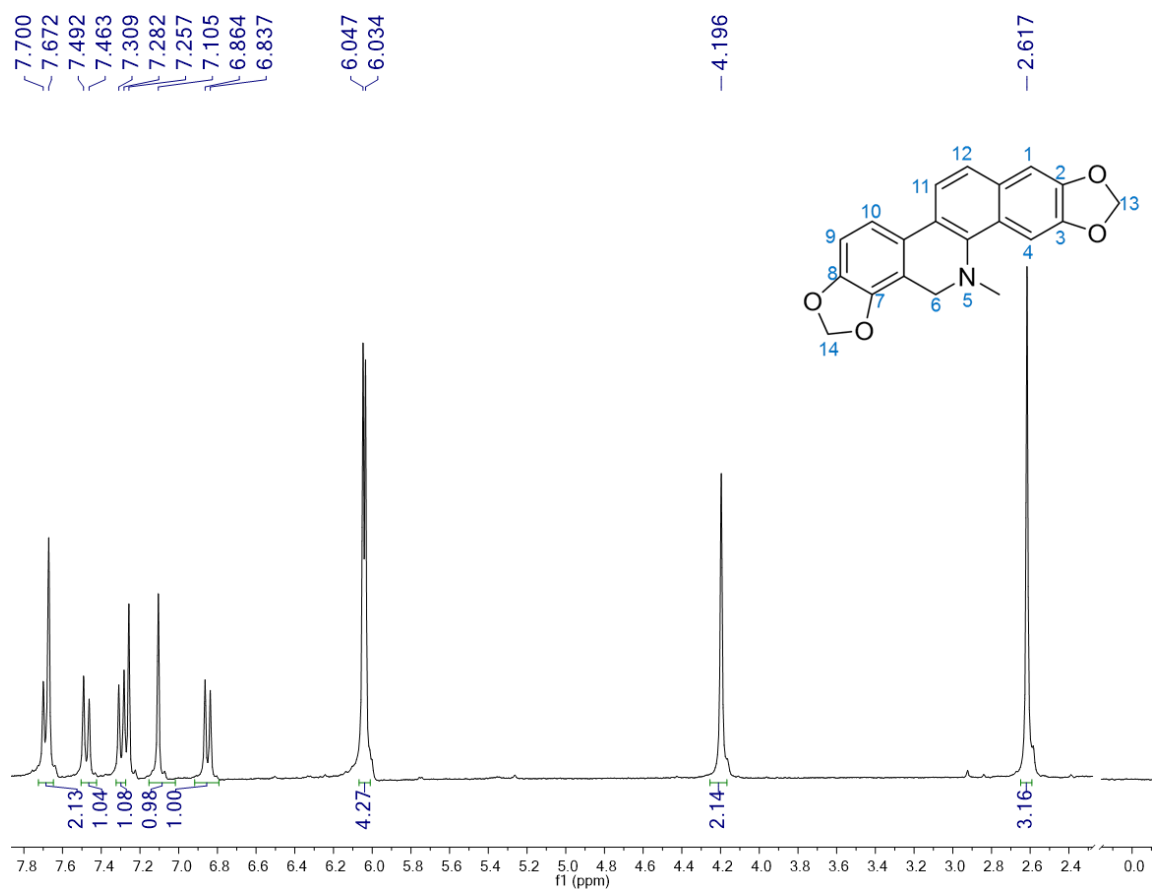


Figura 12. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto dihidroanguinarina (**3**).

5.2.2 Caracterización de dihidroqueleritrina (**4**)

El fraccionamiento por CC de la parte aceitosa del extracto metanólico permitió la purificación de un sólido amarillo, que recristalizó con AcOEt como cristales amorfos amarillos claros (951.7 mg equivalente al 0.09 % del total del peso de las semillas). El espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, Figura 13) de los cristales mostró patrones de señales muy similares a los reportados para dihidroqueleritrina (**4**). En el espectro se observó un singlete que resonó en δ_H 2.59 ppm que integra para tres hidrógenos y se atribuye a los hidrógenos del

grupo N-metilo, un singulete en δ_H 4.29 ppm que integra para dos hidrógenos y corresponde al metileno unido a nitrógeno, un singulete típico de grupo dioximetileno en δ_H 6.04 ppm con integración para dos hidrógenos, los protones *orto* aromáticos (cuatro dobletes en δ_H 6.94, 7.48, 7.51 y 7.70 ppm; H-9, H-12, H-10 y H-11, respectivamente) con integraciones para un hidrógeno y $J = 8.7$ Hz y los dos singuletes correspondientes a los protones aromáticos en posición *para* (δ_H 7.10 y 7.67 ppm, H-1 y H-4, respectivamente). Al comparar el espectro de RMN 1H de este compuesto con el obtenido para **3**, se puede observar la ausencia de un singulete de grupo dioximetileno y en su lugar se observó la presencia de dos singuletes en δ_H 3.87 y 3.92 ppm, los cuales integran para tres hidrógenos cada uno y muestran desplazamientos químicos característicos de grupos metoxilo unidos a benceno.

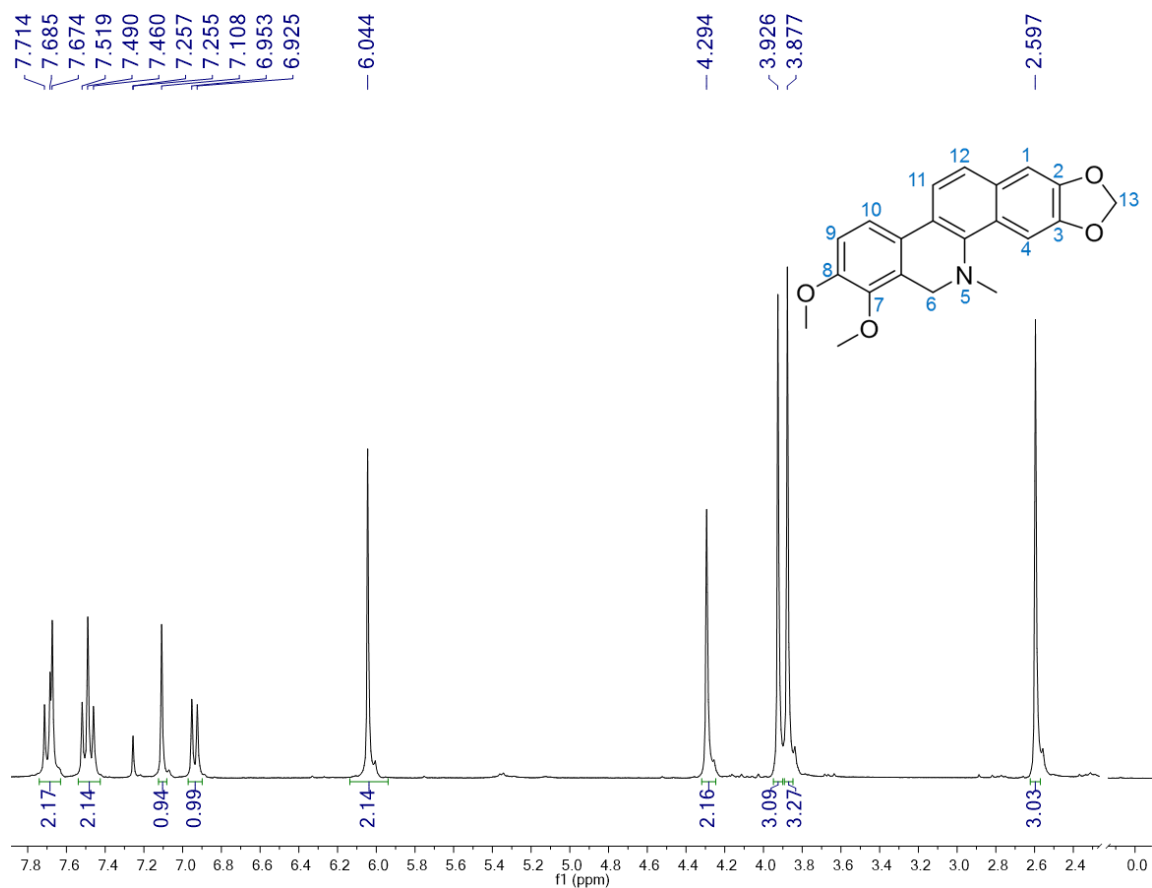


Figura 13. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto dihidroqueleritina (**4**).

5.2.3 Caracterización de 12-metoxidihidroqueleritina (**5**)

Durante la purificación de **4** también se logró el aislamiento y purificación de sólidos amarillos (6.9 mg equivalente al 0.0006 % del total del peso de las semillas), los cuales fueron analizados por RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, Figura **14**). En dicho espectro se observaron patrones de señales muy similares a los de **4**, lo cual permitió inferir que su estructura molecular correspondía a un análogo de

la misma. Las similitudes espectroscópicas radican en el singulete que resonó en δ_{H} 2.52 ppm con una integral para tres hidrógenos y se atribuye a los hidrógenos del grupo *N*-metilo, dos singuletes en δ_{H} 3.87 y 3.92 ppm que integran para tres hidrógenos y que corresponden a los grupos metoxilo unidos a benceno, un singulete en δ_{H} 4.26 ppm que integra para dos hidrógenos correspondientes al metileno unido a nitrógeno, un singulete típico de grupo dioximetileno en δ_{H} 6.04 ppm con integración para dos hidrógenos, dos dobletes que integran para un protón cada uno correspondientes a los protones *orto* aromáticos (δ_{H} 6.95 ppm, H-9, $J=8.4$ Hz y δ_{H} 7.48 ppm, H-10, $J=8.4$ Hz) y dos singuletes correspondientes a los protones aromáticos en posición *para* (δ_{H} 7.05 y 7.64 ppm, H-1 y H-4, respectivamente). Al comparar el espectro de RMN ^1H de este compuesto con el obtenido para **4**, se observó una señal singulete adicional en δ_{H} 4.02 ppm que integra para tres hidrógenos y muestra desplazamiento químico característico de grupo metoxilo unido a benceno y en la parte aromática se observó la ausencia de dos dobletes de los protones *orto* aromáticos y en su lugar se observa la presencia de un singulete en δ_{H} 7.54 ppm que corresponde al protón aromático vecinal al grupo metoxilo (H-11).

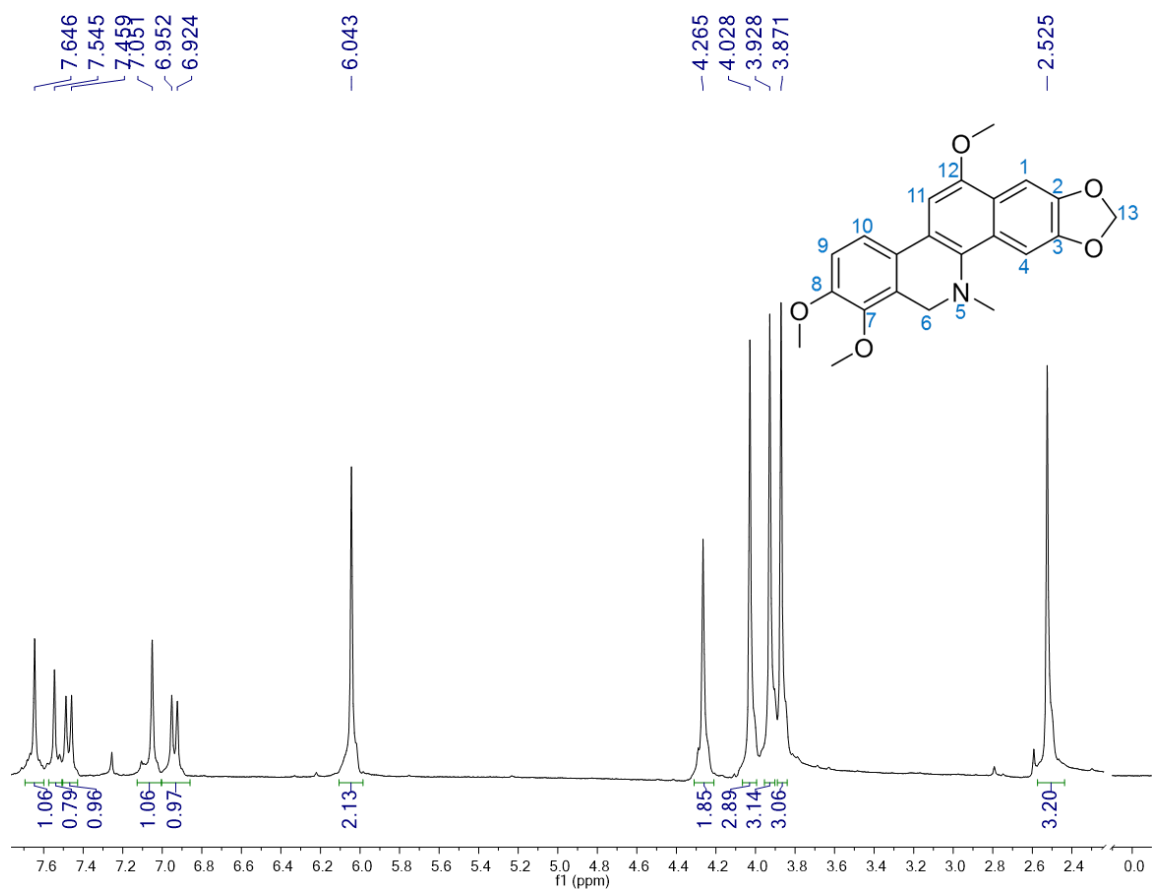


Figura 14. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto 12-metoxidihidroqueleritina (5).

5.2.4 Caracterización de dihidroquelerubina (6)

Durante el fraccionamiento por CC de la parte oleosa del extracto metanólico con un sistema de elución de Hex:AcOEt 95:05, se aisló un aceite rojo de una de las fracciones, en el cual precipitaron unos sólidos que se lavaron con hexano y se recrystalizaron con AcOEt, obteniendo un sólido amorfo color rosa (63.5 mg equivalente al 0.006 % del total del peso de las semillas). Se le realizó una CCF y su R_f era muy similar al de las plataformas naturales de interés, por lo tanto, se analizó por RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, Figura 15). En dicho espectro

se observaron patrones de las señales muy similares a los de **3**, lo cual permitió inferir que su estructura molecular correspondía a un análogo de la misma. Las similitudes espectroscópicas radicaron en la presencia de un singulete que resonó en δ_{H} 2.58 ppm con una integral para tres hidrógenos y se atribuyó a los hidrógenos del grupo *N*-metilo, un singulete en δ_{H} 4.10 ppm que integra para dos hidrógenos correspondientes al metileno unido a nitrógeno, dos singuletes típicos de los grupos dioximetileno en δ_{H} 6.03 ppm y 6.0 ppm con integración para dos hidrógenos. En la región de los protones aromáticos se observaron dos dobletes (δ_{H} 8.30 y 7.75 ppm, H-11 y H-12, respectivamente) con *J* típicas para protones en posición *orto* (8.8 Hz) y dos señales sencillas (δ_{H} 7.68 y 7.10 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-4 y H-1, respectivamente). Al comparar el espectro de RMN ^1H de este compuesto con el espectro RMN ^1H de **3**, se observó una señal singulete adicional en δ_{H} 3.87 ppm que integra para tres hidrógenos y muestra desplazamiento químico característico de grupo metoxilo unido a benceno y en la parte aromática se observó la ausencia de dos dobletes de los protones *orto* aromáticos y en su lugar se observa la presencia de un singulete en δ_{H} 6.60 ppm que corresponde al protón aromático vecinal al grupo metoxilo (H-9).

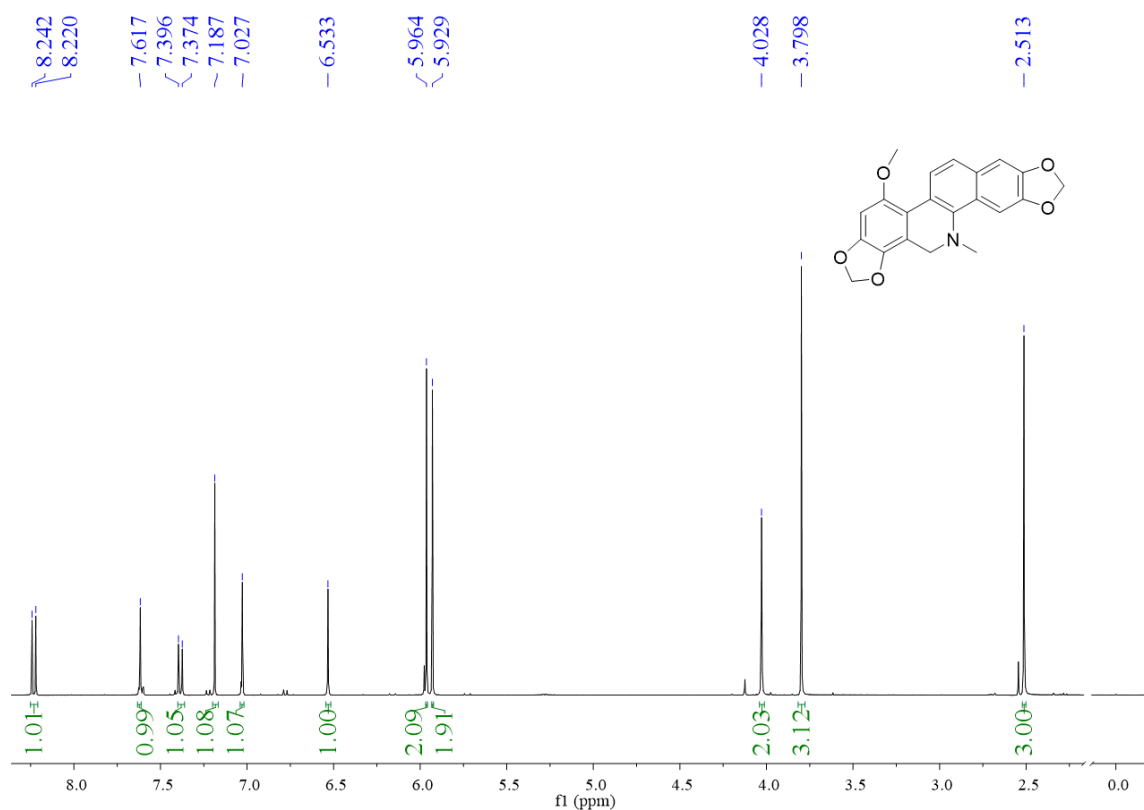


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto dihidroquelinirubina (**6**).

5.3 Síntesis de los derivados del compuesto **3**

Después de la obtención del alcaloide **3** a partir del extracto metanólico de las semillas de *Bocconia latispala*, se realizó el acoplamiento cruzado deshidrogenativo entre **3** y 1-metilindol, siendo considerada como la reacción modelo para optimizar las condiciones de reacción (Figura **16**).

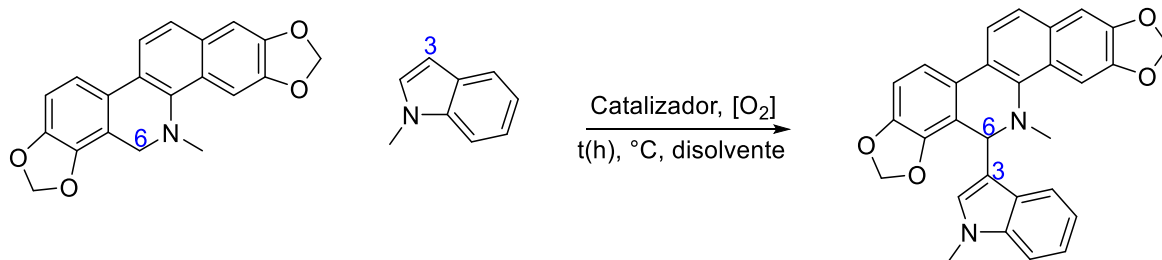


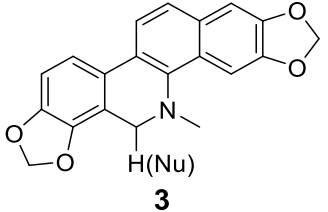
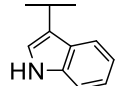
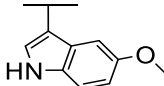
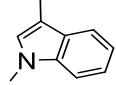
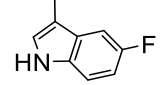
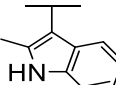
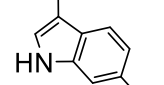
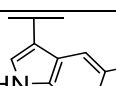
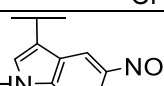
Figura 16. Reacción ACD entre **3** y 1-metilindol.

Considerando las condiciones establecidas por Romo y colaboradores [69], se utilizó CuBr (10 mol%) como catalizador en condiciones aerobias a temperatura ambiente, con CH₃CN como disolvente, pero la plataforma **3** no se disolvía y el producto de la funcionalización C6-C3' sólo se obtuvo en 10.8%. Aunado a lo anterior, la reacción se llevó a cabo durante 24 horas y al purificarla por CC se logró recuperar parte de la plataforma (**3**) que no reaccionó. Por lo anterior, se decidió utilizar 1,2 dicloroetano (DCE) como disolvente y reducir la cantidad de CuBr a 3 mol%. Bajo dichas condiciones de reacción, la plataforma se transformó en 4 horas, mejorándose el rendimiento a 35%. El uso de CuBr en cantidades mayores (5 mol% y 10 mol%), conservando DCE como disolvente, favoreció el consumo de la plataforma, pero se obtenían menores rendimientos (25.2% y 7.5% respectivamente). El uso de otro oxidante como peróxido de *ter*-butilo (DTBP), con 3 mol% de CuBr como catalizador favoreció el consumo de la plataforma en 2 horas, pero el rendimiento disminuyó a 7.2%.

Considerando los rendimientos para **3a**, las mejores condiciones de reacción resultaron: **3** (1 eq.), 1-metilindol (1.2 eq), CuBr (3 mol%), DCE (1 mL), temperatura ambiente (30°C) y 4 horas. Estas condiciones fueron extrapoladas para el acoplamiento cruzado deshidrogenativo de **3** con otros indoles (Nu),

obteniéndose los derivados correspondientes en rendimientos moderados y buenos (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimientos de la reacción de ACD entre **3** y los distintos indoles.

 3					
Nu	No.	Rendimiento (%)	Nu	No.	Rendimiento (%)
	3a	60.95		3e	57.17
	3b	35.01		3f	51.82
	3c	46.85		3g	62.27
	3d	NP*		3e	NF*

***NF**: No formado, ***NP**: No purificado

5.3.1 Datos espectroscópicos de los derivados de **3**.

6-(1'H-indol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina (**3a**)

Cristales amorfos color blanco que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm.

PF: 209-211 °C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.10 (d, *J* = 7.5,

3.0 Hz, 1H, H-4'), 7.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-11),

7.65 (s, 1H, H-4), 7.55 (sa, 1H, NH), 7.39 (d, *J* =

7.8 Hz, 1H, H-10), 7.36 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-12) 7.20

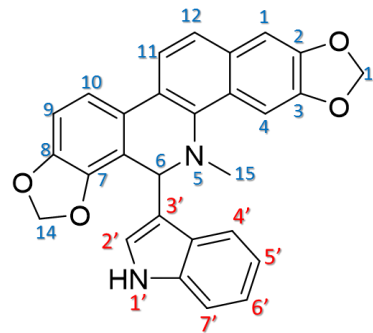
– 7.03 (m, 3H, H-5', H-6', H-7'), 6.98 (s, 1H, H-1),

6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-9), 6.32 (dd, *J* = 2.5, 1.2

Hz, 1H, H-2'), 6.04 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-13), 6.03 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-13), 5.98

(d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-14), 5.93 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-14), 5.80 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H,

H-6), 2.89 (s, 3H, CH₃-N5).



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 147.97, 147.41, 147.13, 144.99, 141.03,

136.56, 130.96, 127.60, 126.96, 126.75, 124.10, 123.60, 122.86, 121.86, 120.15,

120.01, 119.46, 116.64, 116.61, 115.91, 111.03, 107.55, 104.20, 101.49, 101.23,

100.94, 54.39, 42.81.

6-(1'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina (**3b**)

Cristales cúbicos, transparentes que revelan azul rey en la lámpara de UV
a λ_{254} y λ_{360} nm.

PF: 231- 233°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.07 (dd, *J* = 8.6,

3.2 Hz, 1H, H-4'), 7.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-11), 7.65

(s, 1H, H-4), 7.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-10), 7.35 (d,

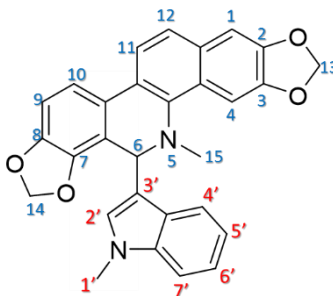
J = 9 Hz, 1H, H-12), 7.09 – 7.02 (m, 3H, H-5', H-6',

H-7'), 6.97 (s, 1H, H-1), 6.94 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-9),

6.15 (s, 1H, H-2'), 6.04 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-14a), 6.02 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-14b),

5.98 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H-13a), 5.92 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H-13b), 5.79 (s, 1H, H-

6), 3.41 (s, 3H, N1'-CH₃), 2.88 (s, 3H, CH₃-N5).



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 161.18, 147.91, 144.92, 127.43, 123.52,

121.37, 120.26, 120.01, 118.89, 116.53, 115.96, 114.86, 114.55, 109.14, 107.49,

104.15, 101.49, 101.33, 100.91, 54.35, 42.90, 32.59.

6-(1'H-2'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina (**3c**)

Sólido rojo amorfo que revela azul rey en la lámpara de UV a λ₂₅₄ y λ₃₆₀ nm.

PF: 234-236°C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.78 (sa, 1H,

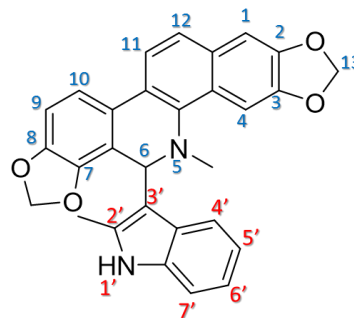
NH), 7.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-11), 7.48 (s, 1H, H-

4), 7.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-10), 7.28 (d, *J* = 8.6

Hz, 1H, H-12), 7.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-4'), 7.00

(d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-7'), 6.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H,

H-9), 6.88 (s, 1H, H-1) 6.86 – 6.77 (m, 2H, H-6', H-5'), 5.92 (s, 1H, H-14a), 5.91



(s, 2H, H-13), 5.85 (s, 1H, H-14b), 5.68 (s, 1H, H-6), 2.79 (s, 3H, N5-CH₃), 2.48 (s, 3H, C2'-CH₃).

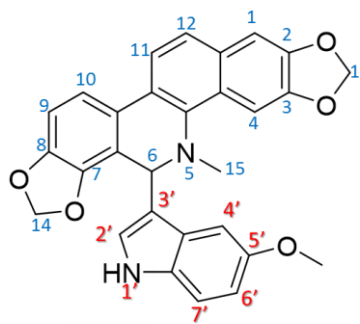
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 147.66, 147.19, 147.12, 145.23, 141.59, 134.62, 132.99, 130.63, 128.54, 127.62, 127.55, 124.33, 123.47, 119.98, 118.78, 118.69, 115.98, 115.63, 110.04, 109.53, 107.56, 103.94, 101.31, 100.90, 100.74, 54.59, 42.54, 12.08.

6-(1'H-5'-metoxiindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina (**3e**)

Cristales amorfos color lila que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ₂₅₄ y λ₃₆₀ nm.

PF: 203-205 °C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.08 (dd, *J* = 8.8, 3.8 Hz, 1H, H-7') 7.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-11), 7.65 (s, 1H, H-4), 7.40 (d *J* = 8.4, Hz, 1H, H-10), 7.37 (d *J* = 8.3, Hz, 1H, H-12), 7.12 (m, 3H, H-4', H-6', H-7'), 6.98 (s, 1H, H-1), 6.93 (d, *J* = 8.1



Hz, 1H, H-9), 6.15 (s, 1H, H-2'), 6.04 (s, 1H, H-13a), 6.02 (s, 1H, H-13b), 5.98 (s, 1H, H-14a), 5.92 (s, 1H, H-14b), 5.79 (s, 1H, H-6), 3.42 (s, 3H, O-CH₃), 2.88 (s, 3H, N5-CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 153.73, 141.16, 139.99, 137.46, 132.99, 131.66, 130.87, 129.62, 129.29, 123.56, 119.93, 118.32, 117.57, 116.78, 116.62,

116.32, 112.07, 111.56, 107.45, 104.14, 102.14, 101.39, 101.04, 100.88, 55.99, 54.57, 42.65.

6-(1'H-5'-flúorindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina (**3f**)

Cristales amorfos incoloros que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm.

PF: 203 °C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) δ 8.16 (sa, 1H, NH),

7.63 (d, $J = 8.7$, 1H, H-11), 7.61 (s, 1H, H-4), 7.63 (dd,

$^3J_{H-F} = 10.5$ Hz, $^4J_{H-H} = 3.0$ Hz, 1H, H-4'), 7.34 (d, $J = 7.8$

Hz, 2H, H-10, H-12), 7.03 (dd, $^3J_{H-H} = 8.7$ Hz, $^4J_{H-F} = 4.5$

Hz, 1H, H-7'), 6.95 (s, 1H, H-1), 6.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H,

H-09), 6.80 (td, $^3J_{H-H} = 8.7$ Hz, $^3J_{H-F} = 8.7$ Hz, $^4J_{H-H} = 2.7$

Hz, 1H, H-6'), 6.35 (s, 1H, H-2'), 6.02 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, H-13), 5.96 (s, 1H, H-

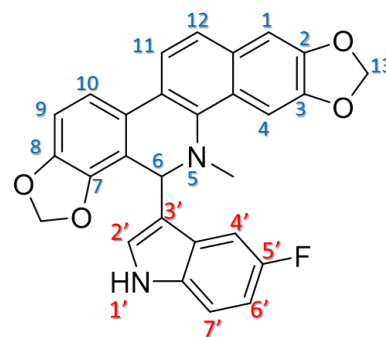
14a), 5.93 (s, 1H, H-14b), 2.83 (s, 3H, N-CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 148.09, 147.47, 147.18, 140.90, 140.80,

133.02, 130.95, 127.51, 126.62, 124.61, 124.03, 123.69, 122.97, 120.00, 119.10,

116.74, 109.81, 107.66, 104.21, 102.14, 101.52, 101.05, 101.01, 99.99, 54.32,

42.77.



6-(1'H-6'-cloroindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina (**3g**)

Cristales amorfos color rosa que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm.

PF: 204-206°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.91 (d, J = 8.5

Hz, 1H, H-4'H), 7.58 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-11), 7.56

(s, 1H, H-4), 7.38 (s, 1H, NH), 7.31 (d, J = 8.2 Hz,

1H, H-10), 7.29 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.03 (dd,

J = 8.5, 1.8 Hz, 3H, H-5'), 6.97 (d, J = 1.3 Hz, 1H,

H-7'), 6.90 (s, 1H, H-1), 6.86 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-9), 6.21 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H-

2'), 5.98 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H-13a), 5.96 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H-13b), 5.93 (d, J =

1.2 Hz, 1H, H-14a), 5.89 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H-14b), 5.67 (s, 1H, H-6), 2.79 (s, 3H,

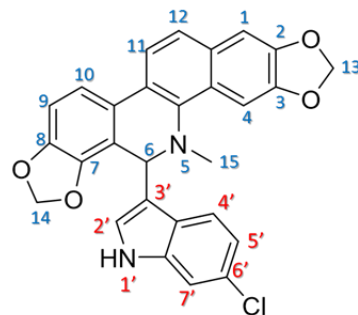
N5-CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 147.99, 147.40, 147.07, 144.89, 140.69,

136.85, 130.88, 127.69, 127.41, 126.59, 125.40, 123.98, 123.65, 123.31, 120.94,

120.09, 119.87, 116.73, 116.65, 115.44, 110.83, 107.60, 104.15, 101.43, 100.92,

54.23, 42.63.



5.3.2 Elucidación estructural de los derivados de **3**

5.3.2.1 Elucidación estructural del producto 6-(1'H-indol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, **3a**

El producto (**3a**) se obtuvo con un 60.95 % de rendimiento como cristales traslúcidos cúbicos que funden a 223 °C. El espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, Figura **17**) exhibió señales atribuibles al fragmento indólico. En δ_H 6.32 ppm se observó una señal doble de doble ($J = 2.5, 1.1$ Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol se acopla tanto a H-1' como a H-6 a larga distancia. En consecuencia, H-6 se observa como un doblete ($J = 1.2$ Hz) en 5.79 ppm. Entre δ_H 7.08 y 7.17 ppm se observó un multiplete que corresponde a los protones H-5', H-6' y H-7' del indol, mientras que en δ_H 8.1 ppm se observó un doble de dobletes ($J = 7.5, 3.0$ Hz) que corresponde al protón H-4' del indol. En δ_H 7.55 ppm se observó un singulete ancho que integra para un protón y que corresponde a H-1' unido al nitrógeno del indol. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **3**: en δ_H 2.89 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos, el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. En δ_H 6.04 ($J = 1.41$), 6.03 ($J = 1.37$), 5.98 ($J = 1.21$) y 5.92 ppm ($J = 1.19$) se observaron cuatro dobletes que integran para un hidrógeno cada uno y que corresponden a dos grupos dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_H 6.93, 7.37, 7.39 y 7.68 ppm) con J típicas para protones aromáticos en posición *orto* (entre 8.2 y 8.6 Hz) que corresponden a los protones en las posiciones H-9, H-12, H-10 y H-

11, respectivamente y dos señales sencillas (δ_{H} 6.97 y 7.65 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4 respectivamente).

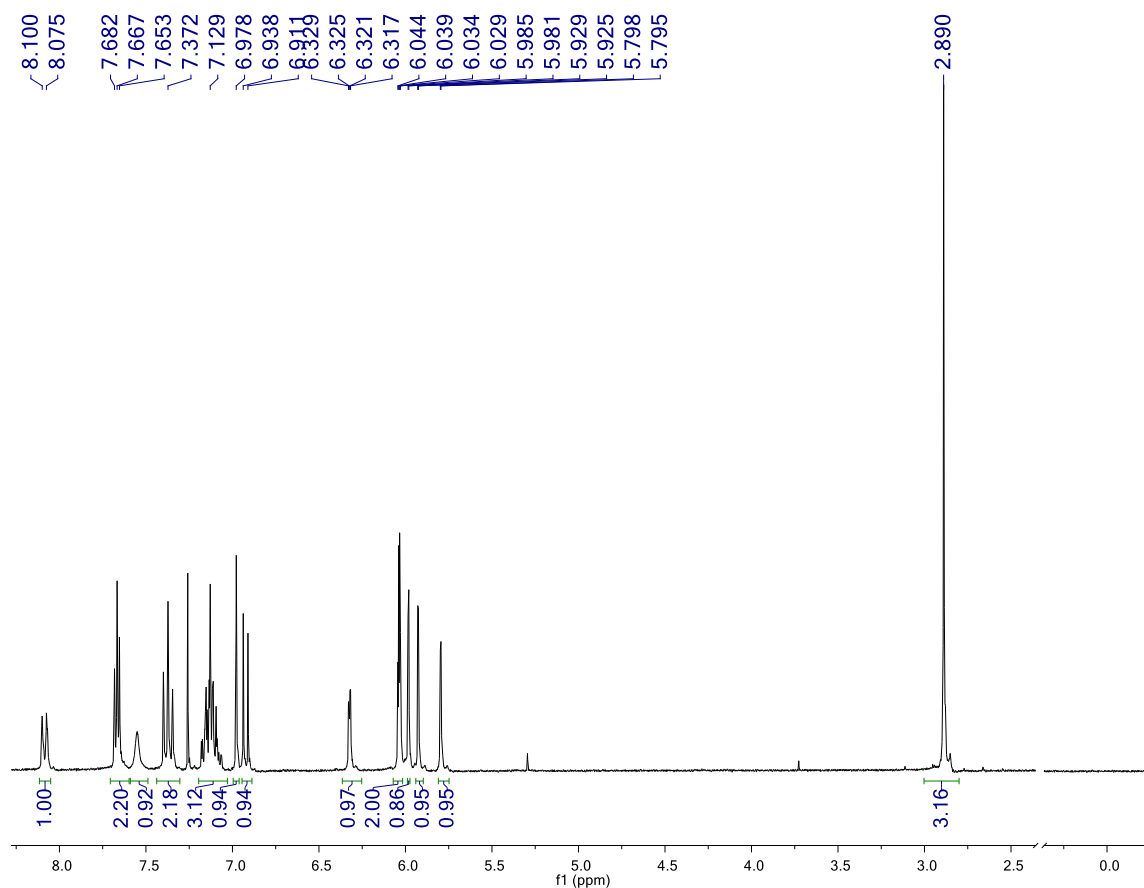


Figura 17. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3a**

5.3.2.2 Elucidación estructural del producto 6-(1'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, **3b**

El producto (**3b**) se obtuvo con un 35.01 % de rendimiento como cristales traslúcidos cúbicos que funden a 221 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **18**) exhibió señales correspondientes al fragmento de 1-metilindol.

En δ_H 3.41 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo unido al nitrógeno del indol. En δ_H 6.15 ppm se observó un singulete que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol. Entre δ_H 7.02 y 7.09 ppm apareció un multiplete que corresponde a los protones H-5', H-6' y H-7' y en δ_H 8.04 ppm una señal doble de doble ($J = 8.6, 3.2$ Hz) que corresponde al protón H-4' del indol. La unión de 1-metilindol a **3** también quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_H 5.79 ppm que integra para un protón y corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **3**: en δ_H 2.88 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos, el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. En δ_H 6.04, 6.02, 5.98 y 5.92 ppm se observaron cuatro dobletes ($J = 1.2, 1.1, 0.9$ y 0.9 Hz respectivamente), que integran para un hidrógeno cada uno y que corresponden a los cuatro protones de los dos grupos dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_H 6.94, 7.35, 7.41 y 7.70 ppm) con J típicas para protones en posición *orto* (entre 8.1 y 8.8 Hz) que corresponden a los protones de las posiciones H-9, H-12, H-10 y H-11, respectivamente y dos señales sencillas (δ_H 6.97 y 7.65 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones aromáticos en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

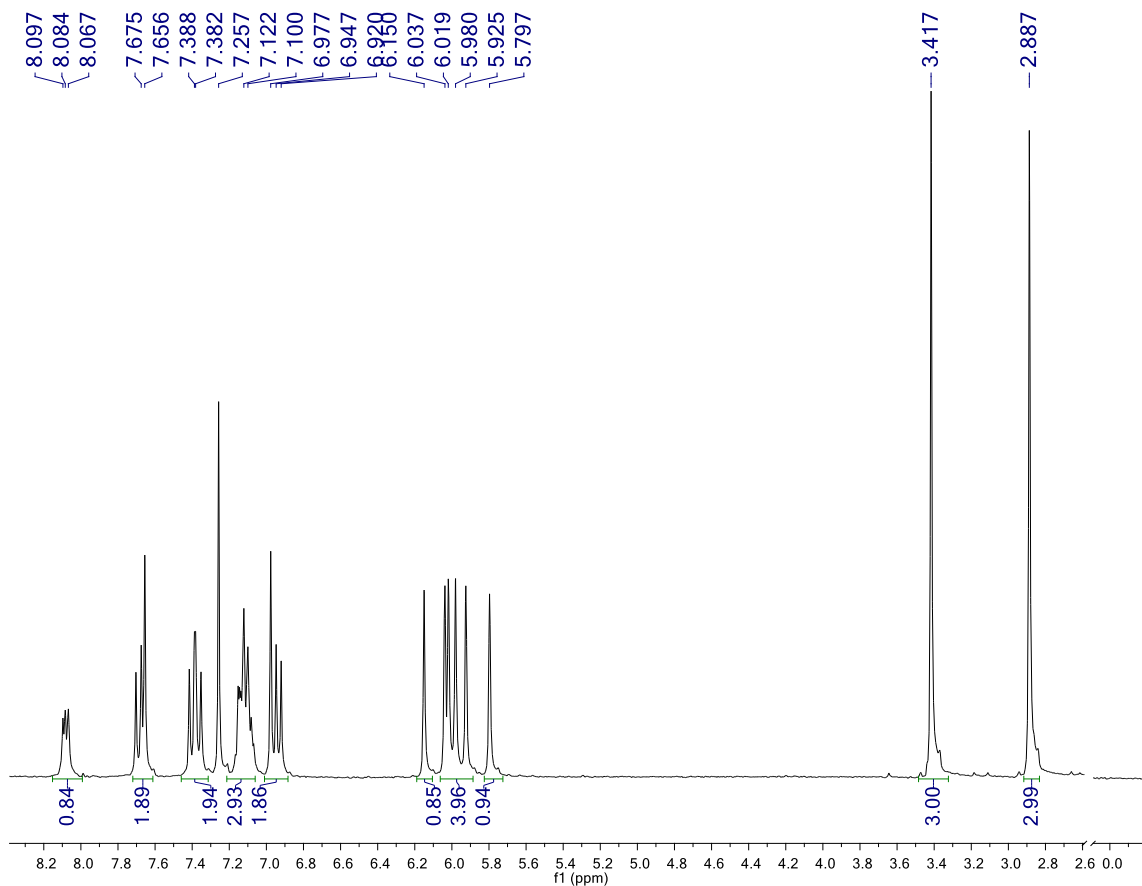


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3b**.

5.3.2.3 Elucidación estructural del producto 6-(2'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, **3c**

El producto (**3c**) se obtuvo con un 46.85 % de rendimiento como un sólido rojo que funde a 234-236°C. El espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , Figura 19) exhibió señales atribuibles al fragmento de 2-metilindol. En δ_{H} 2.48 ppm se observó un singulete que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo unido a C-2' del indol. En δ_{H} 8.78 ppm se observó un singulete que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón NH libre del 2-metilindol. En δ_{H}

7.14 y 7.00 ppm resonaron dos señales dobles ($J = 7.7$ Hz) que integran para un protón cada una y que corresponden a los protones H-4' y H-7' del indol, mientras que entre δ_{H} 6.86 y 6.78 ppm se observó un multiplete que integra para dos protones atribuibles a los protones H-6' y H-5' del 2-metilindol. La unión de 2-metilindol a **3** también quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_{H} 5.68 ppm que integra para un protón y corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **3**: en δ_{H} 2.79 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos, el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. En δ_{H} 5.92, 5.89 y 5.85 ppm se observaron tres singuletes, que integran para cuatro protones, correspondientes a dos grupos dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_{H} 6.90, 7.28, 7.34 y 7.63 ppm) con J típicas para protones en posición *orto* (entre 7.7 y 8.6 Hz) (H-9, H-12, H-10 y H-11 respectivamente) y dos señales sencillas (δ_{H} 6.90 y 7.48 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

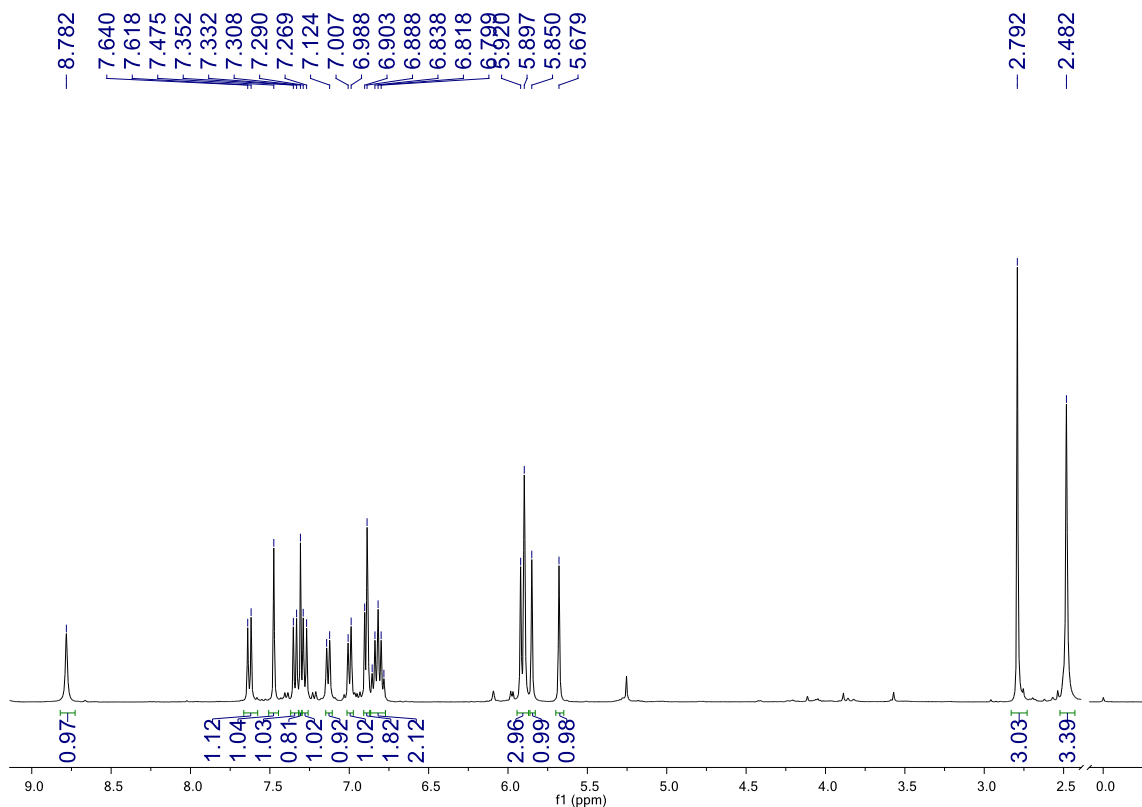


Figura 19. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3c**.

5.3.2.4 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-5'-metoxiindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, **3e**

El producto (**3e**) se obtuvo con un 57.17 % de rendimiento como cristales traslúcidos cúbicos que funden a 217 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **20**) exhibió señales correspondientes al fragmento de 5-metoxiindol. En δ_{H} 3.95 ppm sobresalió una señal simple que integra para tres hidrógenos y que corresponde a los protones del grupo metoxilo del indol. En δ_{H} 6.32 ppm se observó una señal doble ($J = 1.5$ Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol. El resto de las señales del fragmento

indólico se observaron como: un doblete de dobletes que integra para un protón (δ_{H} 6.74 ppm, $J = 8.8, 2.5$ Hz, H-6'), una señal doble en δ_{H} 7.03 ppm (1H, $J = 8.8$ Hz, H-4'), un doblete de dobletes en 7.36 ppm (1H, 8.8, 3.8 Hz, H-7') y un singulete ancho en 7.46 ppm (1H, NH). La unión del 5-metoxiindol a **3** también quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_{H} 5.75 ppm que integra para un protón y que corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **3**: en δ_{H} 2.88 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. A δ_{H} 6.04 ($J = 1.34$), 6.03 ($J = 1.33$), 5.98 ($J = 1.13$) y 5.94 ppm ($J = 1.13$) se observaron cuatro dobletes que integran para dos hidrógenos cada uno y que corresponden a dos grupos dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_{H} 6.93, 7.34, 7.39 y 7.67 ppm) con J típicas (entre 8.1 y 8.7 Hz) para los protones en posición *orto* (H-9, H-12, H-10 y H-11, respectivamente) y dos señales sencillas (δ_{H} 6.98 y 7.70 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

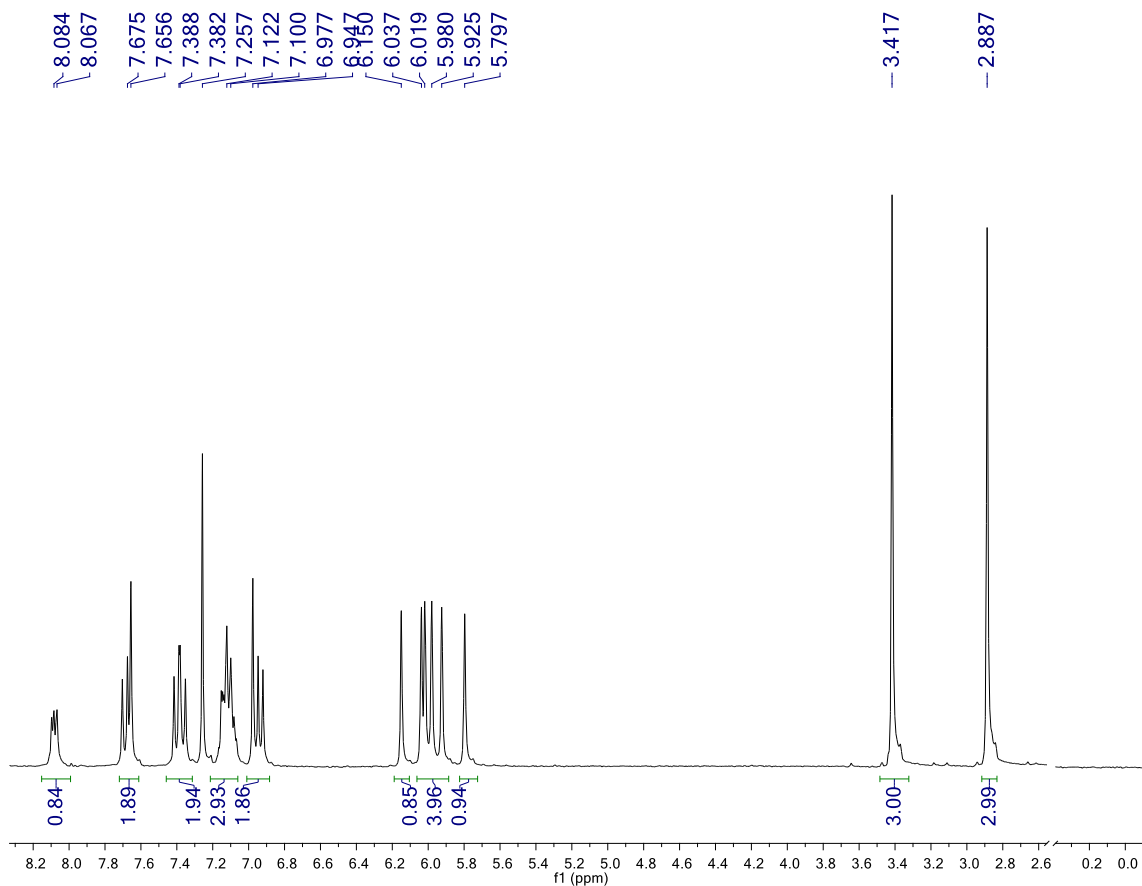


Figura 20. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3e**.

5.3.2.5 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-5'-flúorindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, **3f**

El producto (**3f**) se obtuvo con un 51.82 % de rendimiento como cristales traslúcidos en forma de agujas que funden a 203 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **21**) exhibió señales debidas al fragmento de 5-flúorindol. En δ_{H} 6.34 ppm se observó un singlete ancho que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol; así como, un singlete ancho en 8.16 que integra para un hidrógeno y se atribuye a H-1' unido a nitrógeno. En δ_{H} 6.80 ppm resonó una señal triple de doblete ($^3J_{\text{H-H}} = 8.7$ Hz, $^3J_{\text{H-F}} = 8.7$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 2.7$ Hz) que

integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-6' del indol. En 7.03 ppm se observó un doblete de dobletes (${}^3J_{H-H} = 8.7$ Hz, ${}^4J_{H-F} 4.5$ Hz) que corresponde al protón H-7' del indol y en 7.63 se observó una señal doble de doble (${}^3J_{H-F} = 10.5$ Hz, ${}^4J_{H-H} 3.0$ Hz) que corresponde al protón H-4'. La unión de 5-flúorindol a **3** quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_H 5.68 ppm que integra para un protón y corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **3**: en δ_H 2.83 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos, el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. En δ_H 5.92 ($J = 1.21$) y 5.96 ($J = 1.39$) se observan dos singuletes anchos que integran para un protón cada uno y corresponden a uno de los grupos dioximetileno de **3**, mientras que en 6.02 ppm ($J = 4.4$ Hz) se observó un doblete que integra para dos hidrógenos y que corresponde al otro grupo dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron dos dobletes (δ_H 6.88, y 7.63 ppm) con J típicas (8.1y 8.6 Hz, respectivamente) para los protones en posición *orto* (H-9 y H-11, respectivamente), un doblete ($J = 7.8$ Hz) que integra para dos protones que corresponde a las señales empalmadas de los protones H-10 y H-12 posición *orto* y dos señales sencillas (δ_H 6.95 y 7.61 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

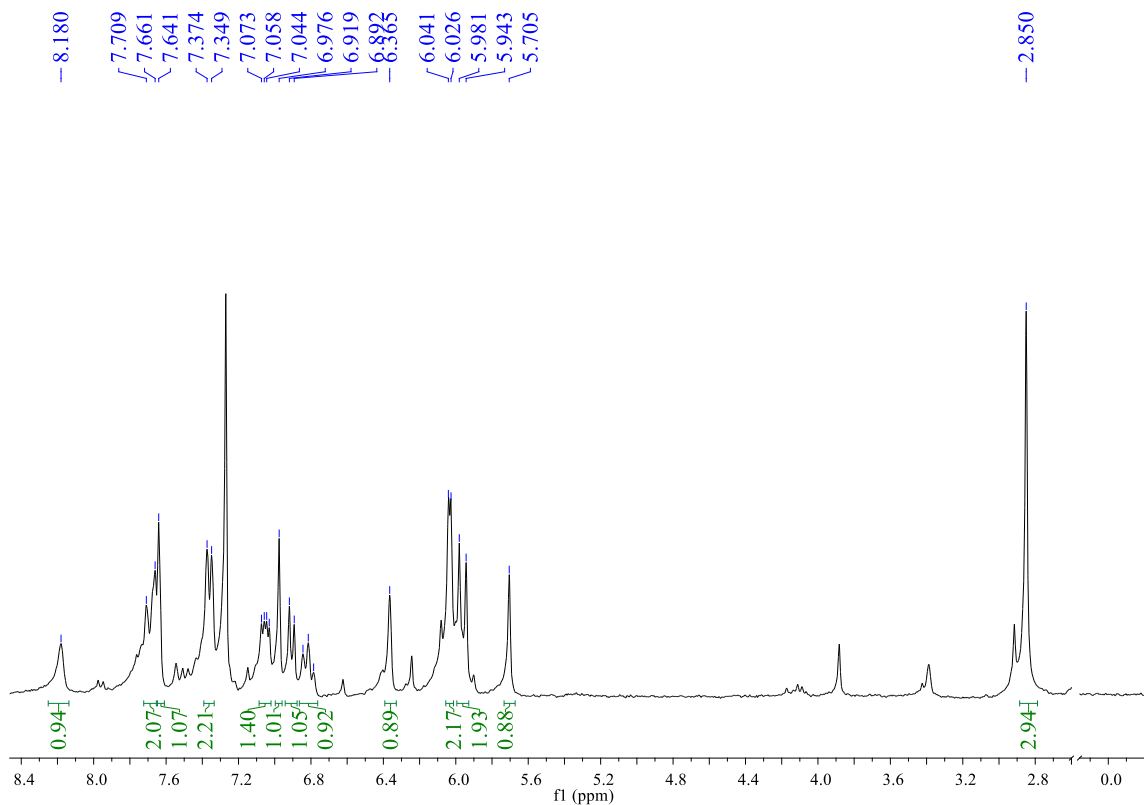


Figura 21. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3f**.

5.3.2.6 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-6'-cloroindol-3'-il)-5,6-dihidrosanguinarina, **3g**

El producto (**3g**) se obtuvo con un 62.27 % de rendimiento como cristales traslúcidos cúbicos que funden a 216 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **22**) exhibió señales debidas al fragmento de 6-cloroindol. En δ_{H} 6.21 ppm se observó una señal doble ($J = 2.4$ Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol. En δ_{H} 6.97 ppm se observó una señal doble ($J = 1.2$ Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-7' del indol, mientras que en δ_{H} 7.02 ppm resonó una señal doble de doble ($J =$

8.4, 1.6 Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-5' del indol y en δ_{H} 7.91 ppm se observó una señal doblete ($J = 8.5$ Hz) que corresponde al protón H-4' del indol. La unión de 6-cloroindol a **3** quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_{H} 5.67 ppm que integra para un protón y corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **3**: en δ_{H} 2.79 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos, el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. En δ_{H} 5.88 ($J = 1.20$), 5.92 ($J = 1.21$), 5.96 ($J = 1.39$) y 5.97 ppm ($J = 1.40$) se observaron cuatro dobletes que integran para un hidrógeno cada uno y que corresponden a dos grupos dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_{H} 6.86, 7.30, 7.32 y 7.59 ppm) con J típicas (entre 8.0 y 8.8 Hz) para los protones en posición *orto* (H-9, H-12, H-10 y H-11, respectivamente) y dos señales sencillas (δ_{H} 6.90 y 7.55 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

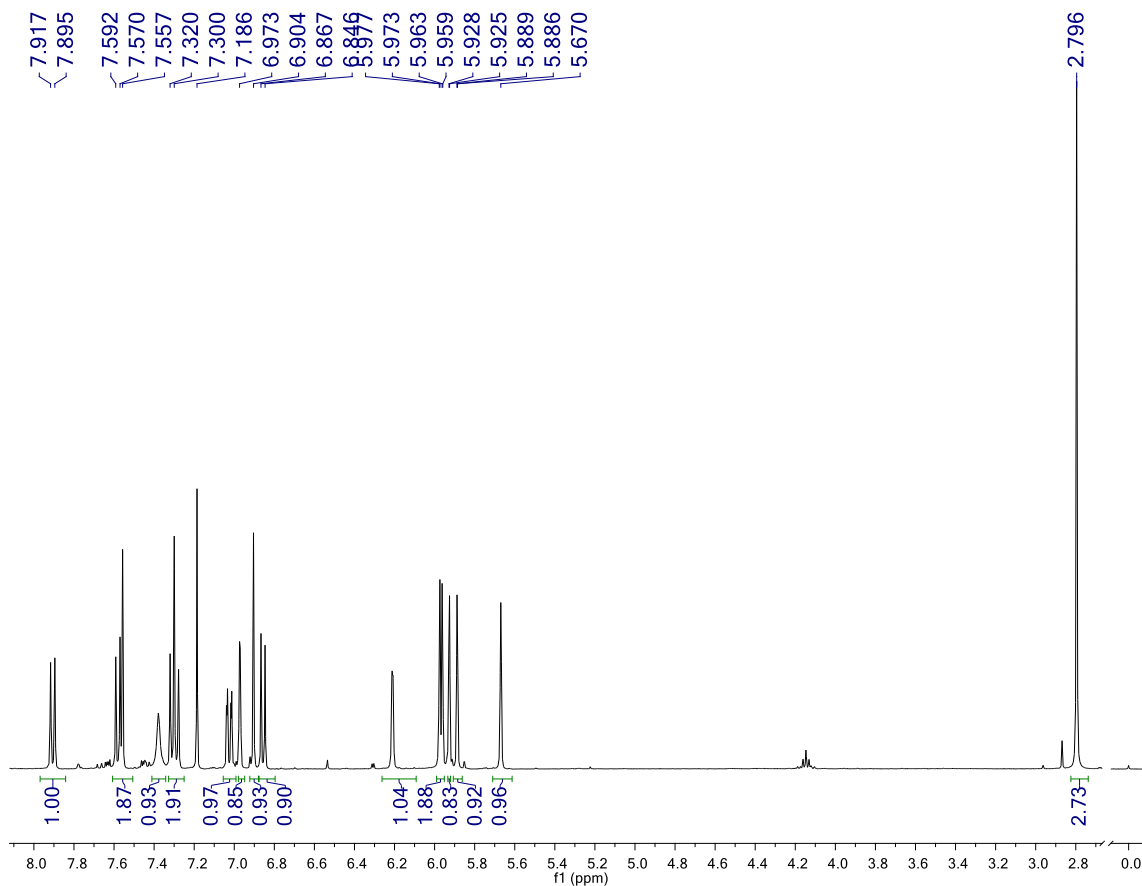


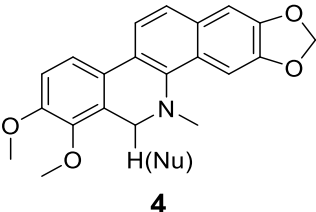
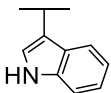
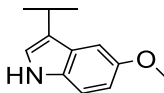
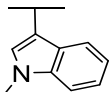
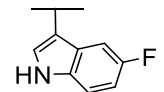
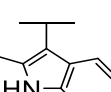
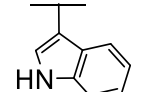
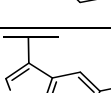
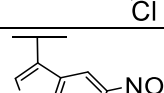
Figura 22. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3g**.

5.4 Síntesis de los derivados del compuesto 4

Después de la obtención del alcaloide **4** a partir del extracto metanólico de las semillas de *Bocconia latisejala*, se realizó el acoplamiento cruzado deshidrogenativo entre **4** y los diferentes indoles. Tomando en cuenta las condiciones de reacción óptimas para el ACD de **3** con 1-metilindol, el primer experimento de ACD entre el alcaloide **4** con indol fue realizado con 3 mol% de CuBr en condiciones ambientales de temperatura y presión, alcanzando un 58.37 % de producto deseado. Después de haber obtenido un rendimiento bueno de

este producto, se realizó el ACD de **4** con diversos indoles, obteniéndose los derivados correspondientes en rendimientos moderados y buenos (Tabla 7).

Tabla 7. Rendimientos de la reacción de ACD entre **4** y los distintos indoles.

 4					
Nu	No.	Rendimiento (%)	Nu	No.	Rendimiento (%)
	4a	56.79		4e	26.49
	4b	29.54		4f	24.25
	4c	40.15		4g	60.05
	4d	27.38		4e	NF*

*NF: No formado

5.4.1 Datos espectroscópicos de los derivados de **4**

6-(1'H-indol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritina (**4a**)

Cristales amorfos amarillos que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm.

PF: 174-175 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) δ 8.08 (d, *J* = 7.8

Hz, 1H, H-4'), 7.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-11), 7.58 (s,

1H, H-4), 7.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-12), 7.46 (sa, 1H,

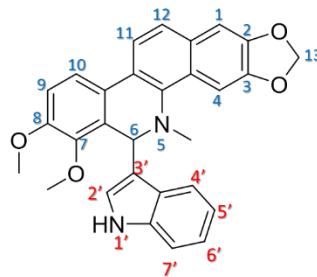
NH), 7.27 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-10), 7.11 – 6.98 (m,

3H, H-5', H-6', H-7'), 6.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-9), 6.88

(s, 1H, H-1), 6.17 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-2'), 5.94 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, H-13), 5.90 (d, *J* =

0.8 Hz, 1H, H-13), 5.84 (s, 1H, H-6), 3.88 (s, 3H, CH₃O-C7), 3.70 (s, 3H, CH₃O-

C8), 2.79 (s, 3H, CH₃-N5).



RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 152.21, 147.7, 147.3, 146.34, 136.38,

127.26, 123.26, 122.94, 121.62, 120.47, 119.61, 119.2, 118.9, 111.34, 110.8,

104.5, 101.19, 100.77, 61.15, 55.8, 54.34, 42.31.

6-(1'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina (**4b**)

Cristales amorfos blancos que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ₂₅₄

y λ₃₆₀ nm.

PF: 224-226 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) δ 8.14 (ddd, *J* = 7.6,

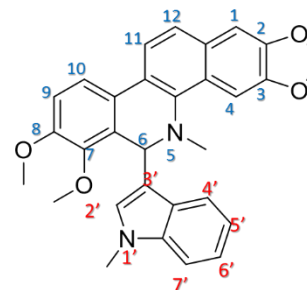
2.4, 0.8 Hz, 1H, H-4'), 7.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-11),

7.65 (s, 1H, H-4), 7.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-12), 7.34

(d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-10), 7.16 – 7.05 (m, 3H, H-5', H-

6', H-7'), 7.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-9), 6.96 (s, 1H, H-

1), 6.06 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, H-2'), 6.00 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, H-6), 5.97 (d, *J* = 1.3 Hz,



1H, H-13), 5.91 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-13), 3.96 (s, 3H, CH₃O-C7), 3.77 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.38 (s, 1H, CH₃-N1'), 2.86 (s, 3H, CH₃-N5).

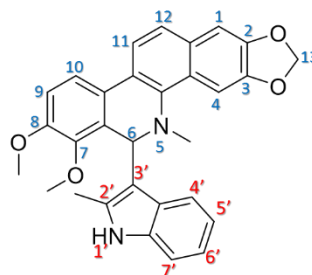
RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 152.15, 147.69, 147.22, 146.26, 141.24, 137.31, 130.87, 128.21, 127.72, 127.56, 127.48, 125.84, 123.94, 123.19, 121.10, 120.55, 119.64, 118.85, 118.60, 115.89, 111.27, 108.91, 104.03, 101.27, 100.76, 61.16, 55.81, 54.39, 42.35, 32.41, 29.70.

6-(1'H-2'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina (**4c**)

Sólido color rojo amorfo, que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm.

PF: 204-205°C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.71 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-11), 7.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-12), 7.57 (s, 1H, H-4), 7.39 (sa, 1H, NH), 7.35 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 10), 7.35 (dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz, 1H, H-4'), 7.07 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-9), 7.05 – 7.02 (m, 1H, H-7'),



6.95 (s, 1H, H-1), 6.94 – 6.92 (m, 2H, H-5', H-6'), 6.00 (s, 1H, H-6), 5.96 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-13a), 5.90 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-13b), 3.96 (s, 3H, CH₃O-C7), 3.65 (s, 3H, CH₃O-C8), 2.86 (s, 3H, CH₃-N5), 1.91 (s, 3H, CH₃-C2').

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 152.46, 147.65, 147.22, 146.76, 141.92, 134.59, 132.30, 130.84, 129.03, 128.26, 127.68, 126.95, 124.28, 123.41, 120.32,

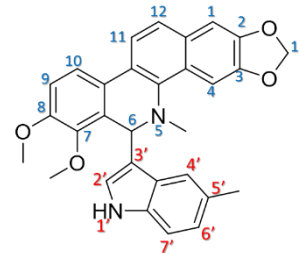
119.78, 119.39, 119.02, 118.56, 111.60, 109.63, 104.03, 101.12, 100.73, 60.65, 55.87, 54.69, 42.21.

6-(1'H-5'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina (**4d**)

Sólido color rosa, amorfo, que revela azul rey en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm.

PF: 273-275°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (sa, 1H, H-4'), 7.68 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-11), 7.65 (s, 1H, H-4), 7.60 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-12), 7.44 (sa, 1H, NH), 7.34 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-10), 7.03 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-7'), 7.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-9), 6.95 (s, 1H, H-1), 6.91 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H, H-6'), 6.18 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-2'), 5.98 (sa, 1H, H-6), 5.97 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, 13b), 5.92 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, 13a), 3.95 (s, 3H, CH₃O-C7), 3.74 (s, 3H, CH₃O-C8), 2.86 (s, 3H, CH₃-N5), 2.53 (s, 3H, CH₃-C5').



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 152.29, 147.82, 147.33, 146.35, 141.26, 134.89, 130.95, 128.48, 128.38, 127.59, 125.91, 124.11, 123.35, 123.31, 123.23, 120.27, 119.70, 118.98, 117.18, 111.35, 110.52, 104.13, 101.38, 100.88, 61.25, 55.91, 54.37, 42.45, 29.81, 21.77.

6-(1'H-5'-metoxiindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina (**4e**)

Cristales amorfos, incoloros que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm.

PF: 218-220 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (s, 1H, H-4), 7.67

(d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-11), 7.63 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-

4'), 7.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-12), 7.44 (sa, 1H, NH),

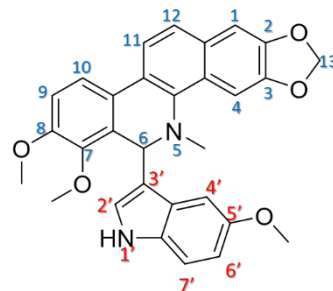
7.34 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-10), 7.03 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H,

H-7', H-9'), 6.96 (s, 1H, H-1), 6.74 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz,

1H, H-6'), 6.24 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-2'), 5.98 (s, 1H, H-13), 5.97 (s, 1H, H-13)

5.94 (s, 1H, H-6), 3.98 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.96 (s, 3H, CH₃O- C5'), 3.79 (s, 3H,

CH₃O-C7'), 2.87 (s, 3H, CH₃-N5).



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 153.63, 152.18, 147.72, 147.26, 146.32,

141.08, 130.86, 128.79, 128.17, 127.65, 127.36, 125.81, 123.76, 123.31, 119.64,

118.94, 117.31, 112.02, 111.42, 111.33, 104.11, 102.53, 101.13, 100.83, 61.18,

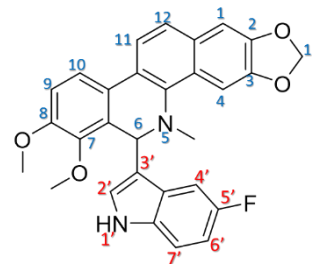
56.04, 55.82, 54.60, 42.22.

6-(1'H-5'-flúorindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina (**4f**)

Sólido verde, que revela azul rey en la lámpara de UV a λ_{254} y λ_{360} nm.

PF: 251-252 °C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) 7.76 (dd, ³J_{H-F} = 9.9 Hz, ⁴J_{H-H} = 2.7 Hz, 1H, H-4'), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-11), 7.63 (s, 1H, H-4), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.51 (sa, 1H, NH), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 7.03 (d, ³J_{H-H} = 8.7 Hz, ⁴J_{H-F} 3.3 Hz, 1H, H-7'), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-9), 6.96 (s, 1H, H-1), 6.82 (td, ³J_{H-F} = 9.0 Hz, ⁴J_{H-H} 2.4 Hz, 1H, H-6'), 6.27 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-2'), 5.98 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-13), 5.94 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-13), 5.93 (s, 1H, H-6), 3.95 (s, 3H, CH₃O-C7), 3.79 (s, 3H, CH₃O-C8), 2.84 (s, 3H, N-CH₃).



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 156.12, 152.30, 147.97, 147.43, 146.33, 141.00, 133.07, 130.95, 127.90, 127.46, 125.81, 124.76, 124.03, 123.49, 119.70, 119.08, 117.83, 111.51, 111.37, 110.30, 109.95, 105.58, 105.27, 104.17, 101.12, 100.97, 61.26, 55.92, 54.35, 42.38.

6-(1'H-6'-cloroindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritina (**4g**)

Cristales amorfos color rosa, que revelan azul rey en la lámpara de UV a λ₂₅₄ y λ₃₆₀ nm.

PF:234-235 °C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆) δ (ppm) δ

8.43 (sa, 1H, NH), 7.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-11), 7.63

(d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-4'), 7.57 (s, 1H, H-4), 7.55 (d, *J*

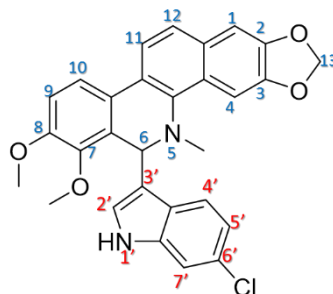
= 8.1 Hz, 1H, H-12), 7.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-10),

7.40 (s, 1H, H-4), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 7.07

(sa, 1H, H-7'), 7.04 (da, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5'), 6.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-9), 6.92

(s, 1H, H-1), 6.18 (sa, 1H, H-2'), 5.94 (s, 1H, H-6), 5.91 (s, 2H, H-13), 3.91 (s, 3H,

CH₃O-C7), 3.73 (s, 3H, CH₃O-C8), 2.80 (s, 3H, CH₃-N5).



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆) δ (ppm) 152.20, 147.83, 147.32, 130.90,

127.37, 127.27, 125.79, 123.73, 123.41, 121.26, 119.65, 119.09, 111.47, 110.86,

104.12, 101.01, 100.90, 61.23, 55.84, 54.34, 42.24

5.4.2 Elucidación estructural de los derivados de **4**

5.4.2.1 Elucidación estructural del producto 6-(1'H-indol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, **4a**

El producto (**4a**) se obtuvo con un 56.79 % de rendimiento como cristales amorfos amarillos. El espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, Figura **23**) exhibió señales debidas al fragmento indólico. En δ_H 6.17 ppm se observó una señal doble (*J* = 1.6 Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol. Entre δ_H 6.98 y 7.11 ppm resonó un multiplete que integra para tres protones y que corresponde a los protones H-5', H-6'y H-7' del indol, mientras que en δ_H 8.08 ppm se observó un doblete (*J* = 7.8 Hz) que corresponde al protón

H-4' del indol. En δ_H 7.46 ppm se observó un singulete ancho que integra para un protón correspondiente al hidrógeno unido al nitrógeno del indol. La unión del indol a **4** también quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_H 5.84 ppm que integra para un protón y que corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **4**: en δ_H 2.80 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos el cual es característico del grupo metilo unido al nitrógeno. En δ_H 5.90 y 5.84 ppm se observaron dos dobletes ($J = 1.2$ Hz) que integran para un hidrógeno cada uno y que corresponden al grupo dioximetileno. A δ_H 3.70 y 3.88 resonaron dos singuletes que integran para tres protones cada uno y que corresponden a los grupos metilos unidos a oxígeno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_H 7.61, 7.53, 7.27 y 6.95 ppm) con $J = 8.6$, típicas para protones aromáticos en posición *orto* (H-11, H-12, H-10 y H-9, respectivamente) y dos señales sencillas (δ_H 6.88 y 7.57 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones aromáticos en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

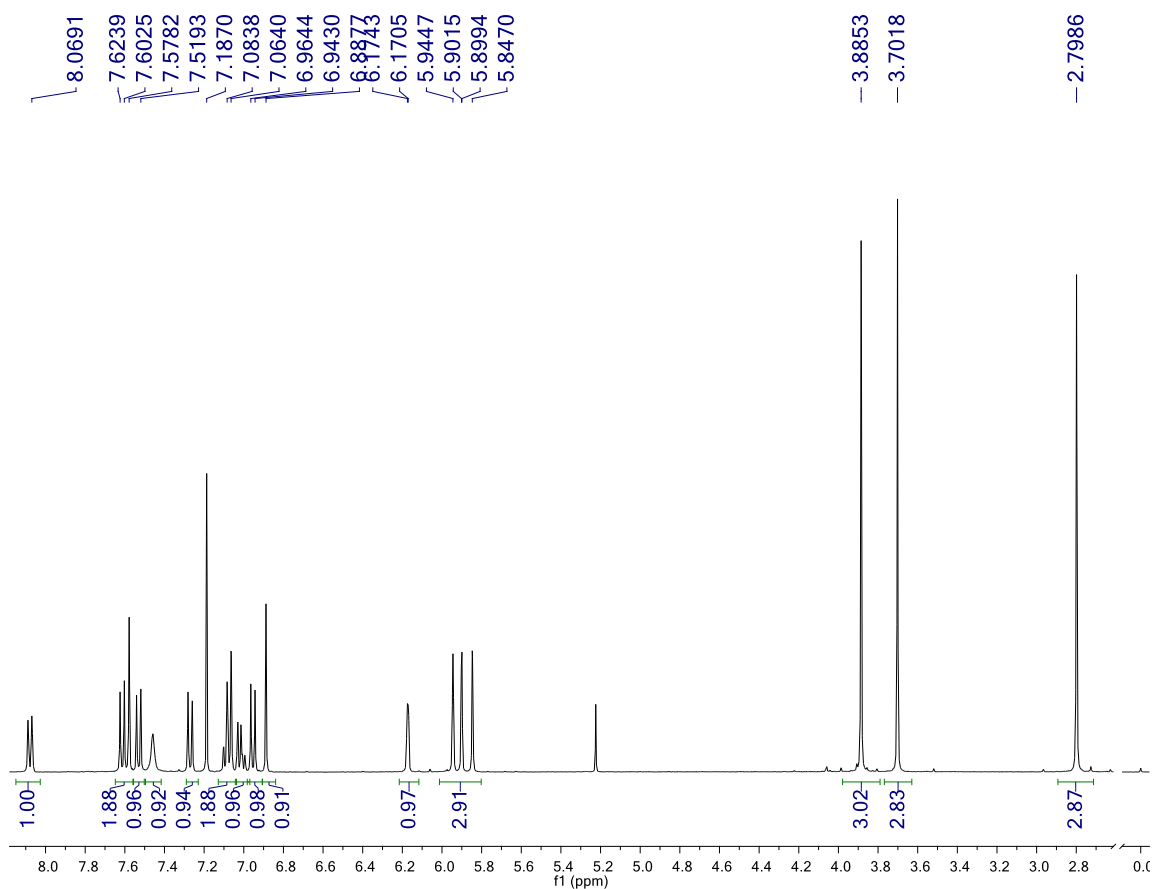


Figura 23. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **4a**.

5.4.2.2 Elucidación estructural del producto 6-(1'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, **4b**

El producto (**4b**) se obtuvo con un 29.54 % de rendimiento como cristales blancos. El espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , Figura **24**) exhibió señales atribuibles al fragmento de 1-metilindol. En δ_{H} 3.39 ppm se observó un singlete que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo unido al nitrógeno del 1-metilindol. En δ_{H} 6.06 ppm se observó un doblete ($J = 0.8$ Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol acoplado a

larga distancia con H-6. Entre δ_H 7.05 y 7.16 ppm resonó un multiplete que integra para tres hidrógenos y que corresponde a los protones H-5', H-6' y H-7', mientras que en δ_H 8.14 ppm se observó una señal doble de doble de doble ($J = 7.6, 2.4, 0.8$ Hz) que integra para un protón y que corresponde al protón H-4' del indol. La unión de 1-metilindol a **4** también quedó evidenciada por la señal doble ($J = 0.8$ Hz) en δ_H 6.0 ppm que integra para un protón y corresponde a H-6 acoplado a larga distancia con H-2'. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **4**: en δ_H 2.87 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. A δ_H 3.78 y 3.96 resonaron dos singuletes que integran para tres protones cada uno y que corresponden a los grupos metilos unidos a oxígeno. Aunado a lo anterior se observaron dos dobletes ($J = 1.2$ Hz) en 5.97 y 5.91, los cuales integran para un hidrógeno cada uno y corresponden a los protones del grupo dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observan cuatro dobletes (δ_H 7.70 ppm, H-11; 7.61 ppm, H-12; 7.34 ppm, H-10 y 7.03 ppm, H-9) con J típicas para protones aromáticos en posición *orto* (entre 8.5 y 8.6 Hz) y dos señales sencillas (δ_H 6.95 y 7.65 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

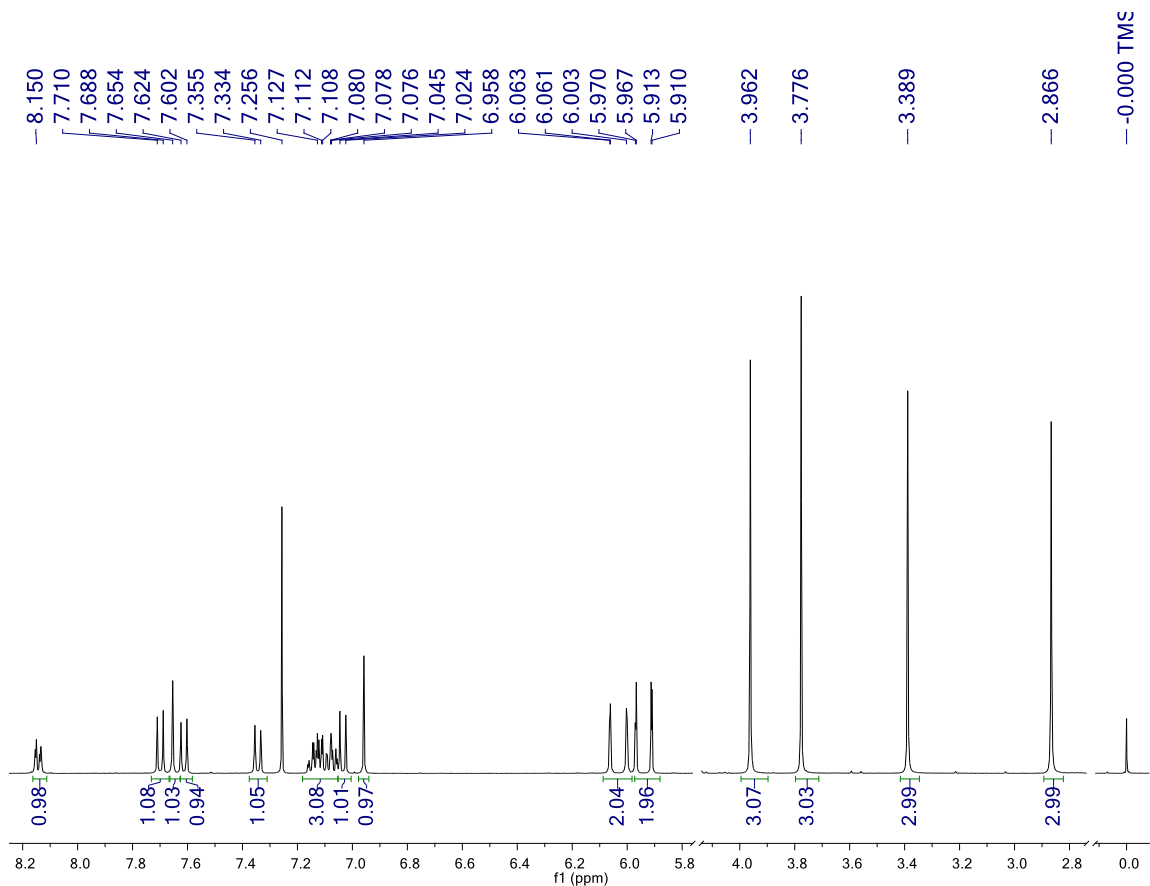


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **4b**.

5.4.2.3 Elucidación estructural del producto 6-(2'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, **4c**

El producto (**4c**) se obtuvo con un 40.15 % de rendimiento como un sólido rojo con punto de fusión de 203-204°C. El espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , Figura 25) exhibió señales correspondientes al fragmento de 2-metilindol. En δ_{H} 1.91 ppm se observó un singlete que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo en posición C-2' del 2-metilindol. En δ_{H} 7.39 ppm se observó un singlete ancho que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón libre unido al nitrógeno (NH) del indol. En δ_{H} 7.32 ppm resonó un doble de

doblete que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-4'. Entre δ_H 6.95 y 6.93 ppm resonó un multiplete que integra para dos protones y que corresponde a los protones H-5' y H-6' del indol, mientras que entre δ_H 7.03 y 7.02 ppm se observó otro multiplete que integra para un protón y que corresponde al protón H-7' del indol. La unión de 2-metilindol a **4** también quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_H 6.00 ppm que integra para un protón y que corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **4**: en δ_H 2.86 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. En δ_H 5.96 y 5.90 ppm se observaron dos dobletes ($J = 1.2$ Hz) que integran para un protón cada uno y que corresponden a los protones del grupo dioximetileno. A δ_H 3.65 y 3.96 ppm resonaron dos singuletes que integran para tres protones cada uno y corresponden a los grupos metilos unidos a oxígeno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_H 7.71, 7.61, 7.35 y 7.07 ppm) con J típicas para protones en posición *orto* (entre 8.4 y 8.6 Hz) correspondientes a los protones H-11, H-12, H-10 y H-9 respectivamente; y dos señales sencillas (δ_H 6.95 y 7.56 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

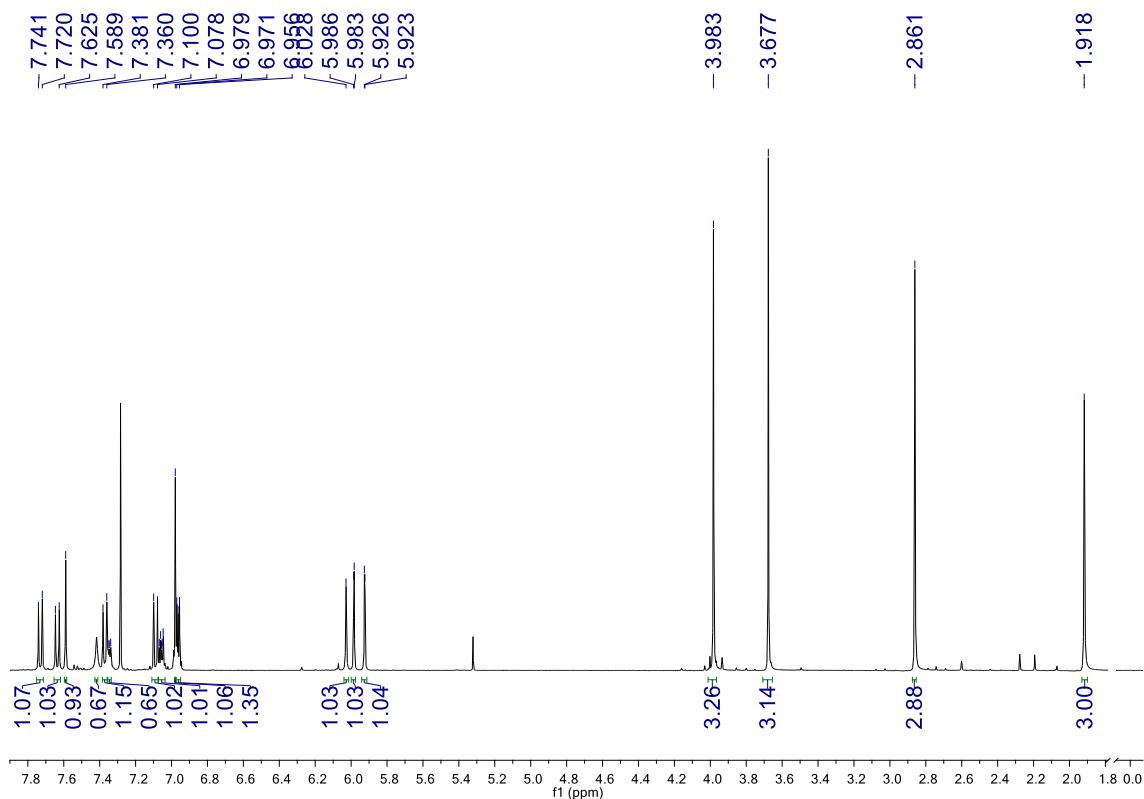


Figura 25. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **4c**.

5.4.2.4 Elucidación estructural del producto 6-(1'H-5'-metilindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, **4d**

El producto (**4d**) se obtuvo con un 27.38 % de rendimiento como un sólido verde limón con punto de fusión de 273-275 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **26**) exhibió señales que evidencian al fragmento de 5-metilindol. En δ_{H} 2.86 ppm se observó un singlete que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo unido en la posición C-5'. Se observó la desaparición del singlete que integraba para dos hidrógenos en δ_{H} 4.29 que correspondía a los protones de la posición 6 de **4** y en su lugar se

observó una señal simple en δ_H 5.98 que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-6. En δ_H 6.18 ppm se observó un doblete ($J = 1.5$ Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol. En δ_H 6.91 ppm se observó una señal doble de doble ($J = 8.2, 1.3$ Hz) que corresponde al protón H-6'. En δ_H 7.03 ppm resonó una señal doble ($J = 8.1$ Hz) y que corresponde al protón de la posición H-7' del indol, mientras que en δ_H 7.94 ppm se observó un singulete ancho que integra para un protón que corresponde al protón H-4' del indol. En δ_H 7.44 ppm se observó un singulete ancho que integra para un protón correspondiente al hidrógeno unido al nitrógeno del 5-metilindol. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **4**: en δ_H 2.53 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos la cual es característica del grupo metilo unido al nitrógeno. A δ_H 3.74 y 3.95 resonaron dos singuletes que integran para tres protones cada uno y corresponden a los grupos metilos unidos a oxígeno, mientras que en δ_H 5.97 y 5.92 ppm se observaron dos dobletes ($J = 0.8$) que integran para un protón cada uno y que corresponden a los protones del grupo dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes con desplazamiento δ_H 7.68, 7.60, 7.34 y 7.02 ppm con J típicas para protones en posición *orto* (alrededor de 8.6 Hz) correspondientes a H-11, H-12, H-10 y H-9, respectivamente y dos señales sencillas (δ_H 6.95 y 7.65 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4 respectivamente).

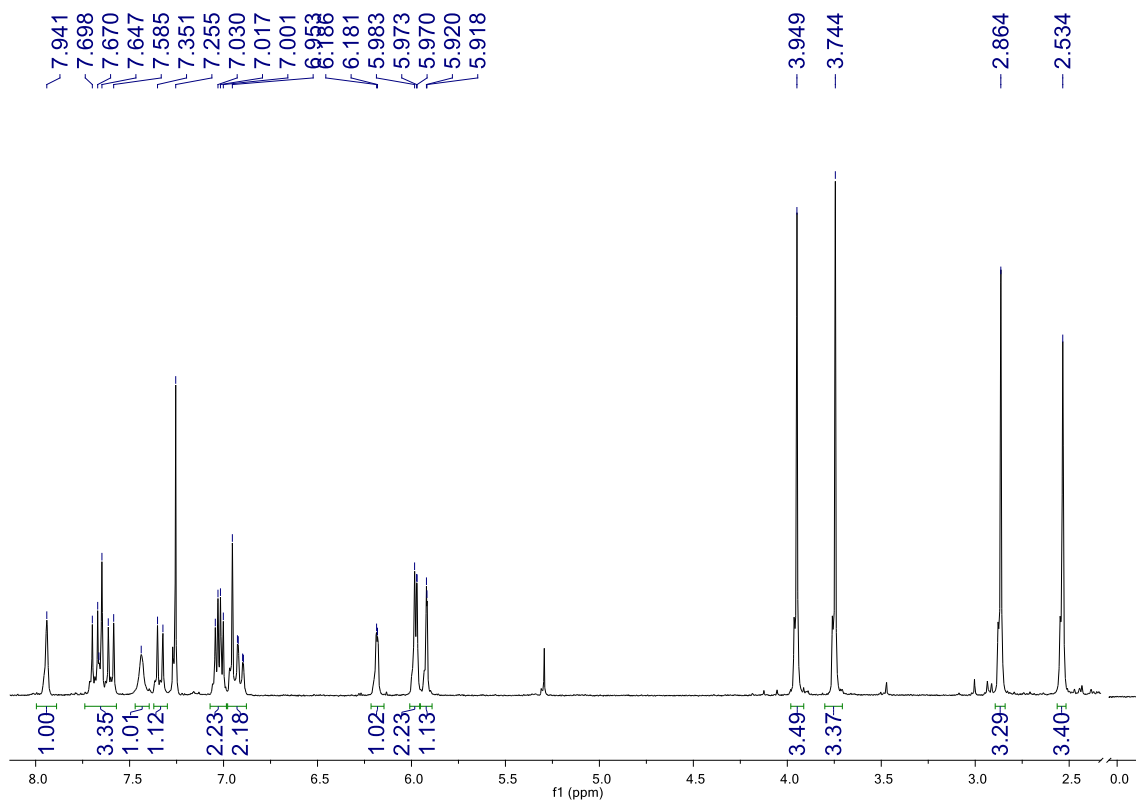


Figura 26. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **4d**.

5.4.2.5 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-5'-metoxiindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, **4e**

El producto (**4e**) se obtuvo con un 26.49 % de rendimiento como cristales traslúcidos amorfos. El espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , Figura **27**) exhibió señales que incorporan el fragmento de 5-metoxiindol a **4**. En δ_{H} 3.95 ppm sobresale un singulete que integra para 3 hidrógenos y corresponde a los protones del grupo metoxilo del indol. En δ_{H} 6.24 ppm se observó una señal doble ($J = 1.5$ Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol. En δ_{H} 6.74 ppm resonó una señal doble de doble ($J = 8.4, 2.4$ Hz) que

integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-6' del indol. En δ_H 7.63 ppm resonó una señal doble ($J = 2.4$ Hz) que integra para un hidrógeno que corresponde al protón H-4', mientras que en δ_H 7.03 ppm se observó un doblete ($J = 8.5$ Hz) que corresponde al protón H-7' del indol. En δ_H 7.44 ppm se observó un singulete ancho que integra para un protón correspondiente al hidrógeno unido al nitrógeno del indol. La unión del 5-metoxiindol a **4** también quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_H 5.94 ppm que integra para un protón y corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **4**: en δ_H 2.87 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos el cual es característico del grupo metilo unido al nitrógeno. A δ_H 3.79 y 3.98 resonaron dos singuletes que integran para tres protones cada uno y corresponden a los grupos metilos unidos a oxígeno, mientras que en δ_H 5.97 y 5.98 ppm se observaron dos singuletes que integran para un protón cada uno y que corresponden a los protones del grupo dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_H 7.67, 7.59, 7.34 y 7.03 ppm) correspondientes a H-11, H-12, H-10 y H-9, respectivamente, con J para protones en posición *orto* (alrededor de 8.5 Hz) y dos señales sencillas (δ_H 6.97 y 7.69 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

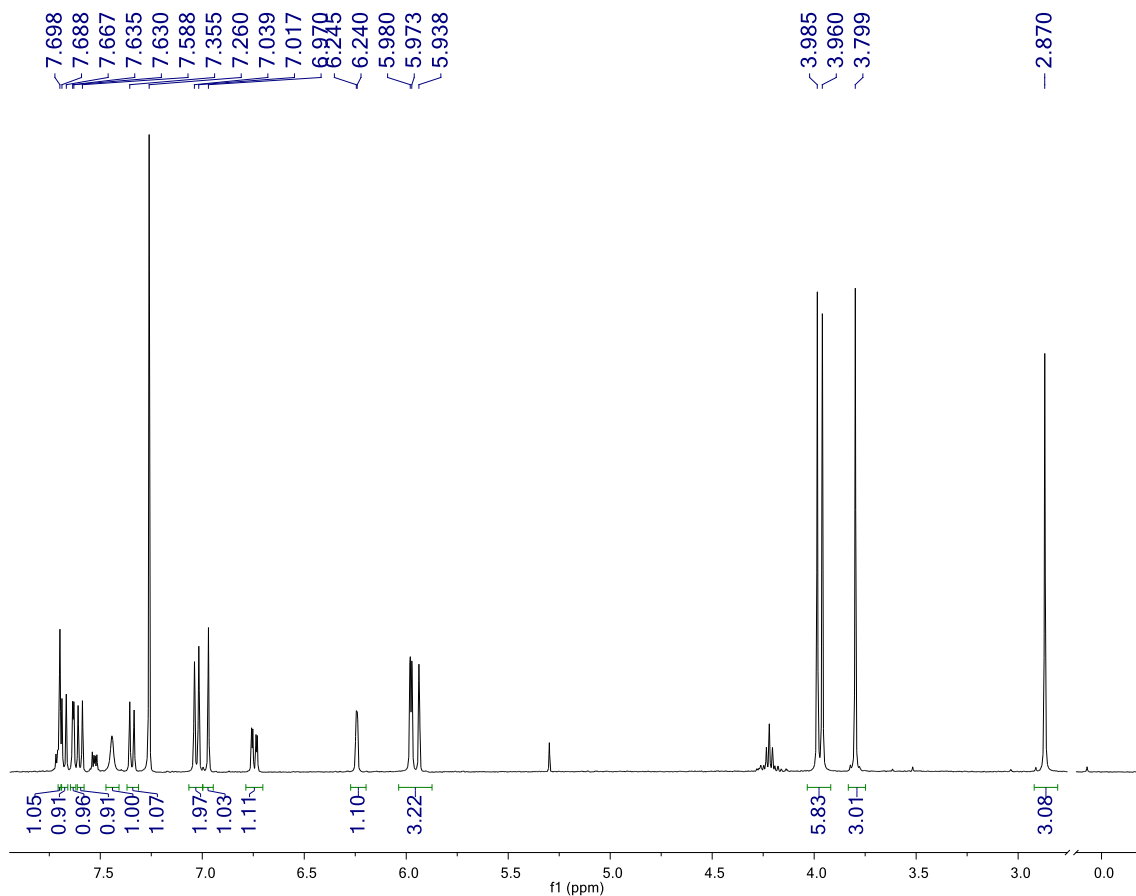


Figura 27. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **4e**.

5.4.2.6 Elucidación estructural del producto 6-(1'-H-5'-flúorindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritina, **4f**

El producto (**4f**) se obtuvo con un 24.25% de rendimiento como un sólido verde limón con punto de fusión de 252°C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **28**) exhibió señales atribuibles al fragmento de 5-flúorindol. Se observó la desaparición del singulete que integraba para dos hidrógenos en δ_{H} 4.29 que correspondía a los protones de la posición 6 de **4** y en su lugar se observó un un singulete en δ_{H} 5.93 que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-6. En δ_{H} 6.27 ppm se observó un doblete ($J = 2.1$ Hz)

que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol. En δ_H 6.83 ppm se observó un triplete de dobletes ($^3J_{H-F} = 9.0$, $^4J_{H-H} = 2.4$ Hz) que corresponde al protón H-6'. En δ_H 7.03 ppm resonó un doble de doblete ($^3J_{H-H} = 8.7$ Hz, $^4J_{H-F} = 3.3$ Hz) que corresponde al protón de la posición H-7' mientras que en δ_H 7.76 ppm se observó una señal doble de doblete ($^3J_{H-F} = 9.9$ Hz, $^4J_{H-H} = 2.7$ Hz) que integra para un protón que corresponde al protón H-4' del 5-flúorindol. En δ_H 7.52 ppm se observó un singulete ancho que integra para un protón correspondiente al hidrógeno unido al nitrógeno del indol. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **4**: en δ_H 2.85 ppm se observó una señal simple con integración para tres hidrógenos la cual es característica de grupo metilo unido al nitrógeno. A δ_H 3.79 y 3.95 resonaron dos singuletes que integran para tres protones cada uno y corresponden a los grupos metilos unidos a oxígeno, mientras que en δ_H 5.98 y 5.94 ppm se observaron dos dobletes ($J = 1.1$) que integran para un protón cada uno y que corresponden a los protones del grupo dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes con desplazamiento δ_H 7.68, 7.60, 7.35, 7.02 ppm con constantes de acoplamiento típicas para protones en posición *orto* (entre 8.4 a 8.7 Hz) correspondientes a H-11, H-12, H-10 y H-9 respectivamente y dos señales sencillas (δ_H 6.96 y 7.65 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

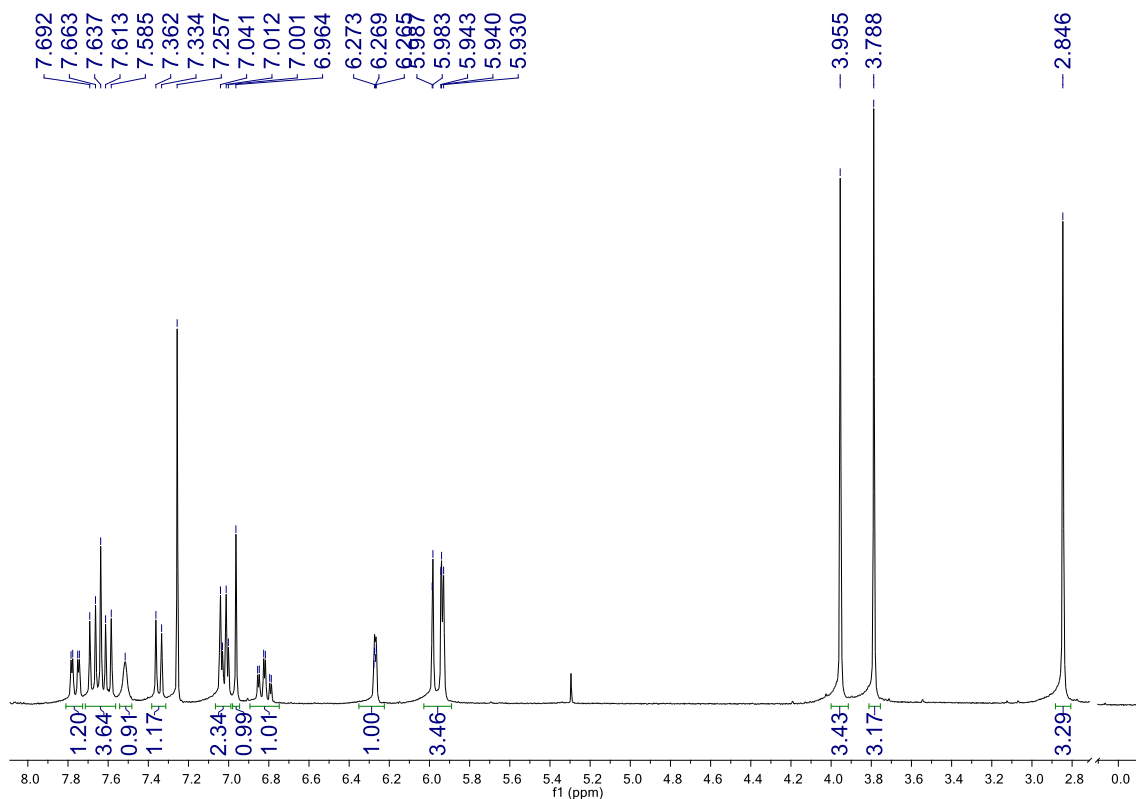


Figura 28. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **4f**.

5.4.2.7 Elucidación estructural del producto 6-(1'H-6'-cloroindol-3'-il)-5,6-dihidroqueleritina, **4g**

El producto (**4g**) se obtuvo con un 60.05 % de rendimiento como un sólido amarillo pálido. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$, Figura 29) exhibió señales que corresponden al fragmento de 6-cloroindol. En δ_{H} 8.43 ppm se observó un singlete ancho que integra para un hidrógeno y que corresponde al hidrógeno unido al nitrógeno del indol. En δ_{H} 6.18 ppm se observó un singlete ancho que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-2' del indol. En δ_{H} 7.63 ppm resonó un singlete que integra para un hidrógeno que

corresponde al protón H-4' del indol, en δ_H 7.04 ppm resonó un doblete ancho ($J = 8.7$ Hz) que integra para un hidrógeno que corresponde al protón H-5', mientras que en δ_H 7.07 ppm se observó un singulete ancho que integra para un hidrógeno que corresponde al protón H-7' del indol. La unión de 6-cloroindol a **4** también quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_H 5.94 ppm que integra para un protón y corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **4**: en δ_H 2.80 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. A δ_H 3.73 y 3.91 ppm resuenan dos singuletes que integran para tres protones cada uno y corresponden a los grupos metilos unidos a oxígeno, mientras que en δ_H 5.91 ppm se observó un singulete que integra para dos protones correspondiente a los protones del grupo dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_H 7.99, 7.55, 7.30 y 6.99 ppm) correspondientes a H-11, H-12, H-10 y H-9, respectivamente, con J típicas para protones en posición *orto* (alrededor de 8.6 Hz) y dos singuletes (δ_H 6.92 y 7.57 ppm) que integran para un hidrógeno cada uno y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

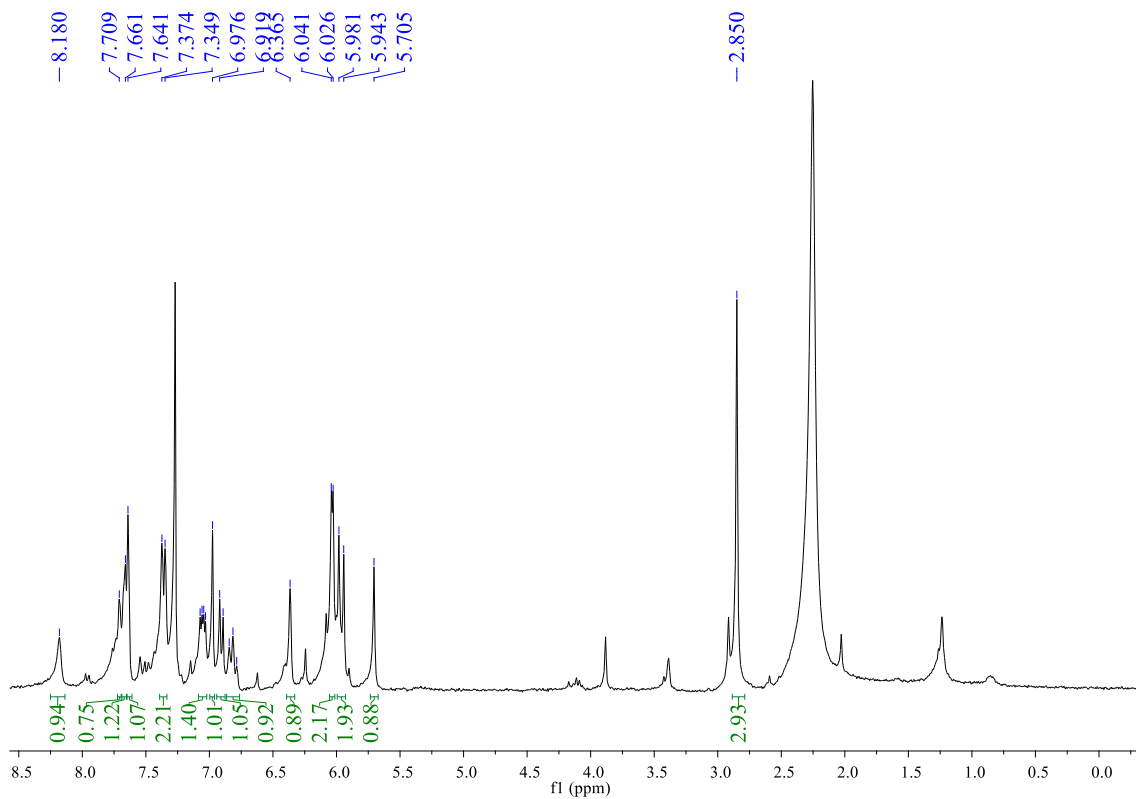
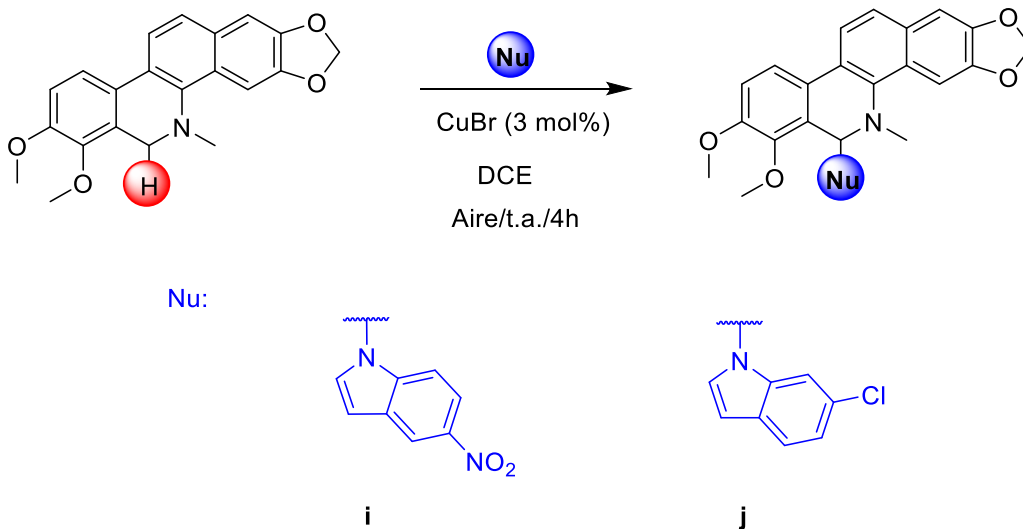


Figura 29. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) del compuesto **4g**.

5.5 Obtención de subproductos de **4**

Con algunos de los nucleófilos bajo las mismas condiciones que en el Esquema **3** (3 mol% de CuBr en condiciones ambientales de temperatura y presión) se obtuvo la funcionalización C6-N1' del indol en lugar la del acoplamiento C6-C3' que se esperaba (Esquema **4**).



Esquema 4. ACD C6-N1' entre **4** y diversos indoles.

Los aductos C6-N1' de los nucleófilos 5-nitroindol y 6-cloroindol se obtuvieron con rendimientos bajos (Tabla **8**).

Tabla 8. Rendimiento de los aductos C6-N1' entre **4** y diversos indoles

 4					
Nu	No.	Rendimiento (%)	Nu	No.	Rendimiento (%)
	i	25.45		j	17.14

5.5.1 Datos espectroscópicos de los aductos C6-N1' de **4**

6-(6'-cloroindol-1'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, **4i**

Cristales amorfos, rosas PF: 234-235 °C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.89 (sa, 1H, H-7'),

7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-11), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H,

H-4'), 7.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-12), 7.40 (s, 1H, H-4),

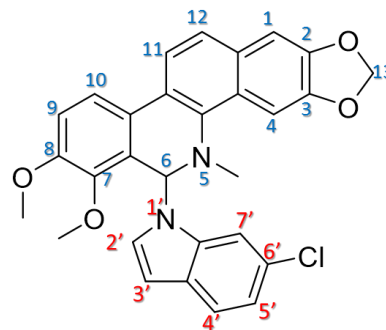
7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 7.16 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H,

H-9), 7.06 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H, H-5'), 7.00 (s, 1H,

H-1), 6.84 (s, 1H, H-6), 6.29 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-2'), 6.01 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-

3'), 5.99 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H-13), 5.93 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H-13), 3.96 (s, 3H,

CH₃O-C7), 3.52 (s, 3H, CH₃O-C8), 2.92 (s, 3H, CH₃-N5).



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 152.47, 148.19, 147.77, 146.83, 138.81,

136.41, 131.26, 127.83, 127.04, 126.54, 124.27, 123.02, 122.69, 121.59, 120.45,

119.57, 119.06, 113.66, 111.05, 104.30, 101.11, 100.93, 100.84, 77.53, 77.10,

76.68, 67.11, 60.94, 56.03, 41.75.

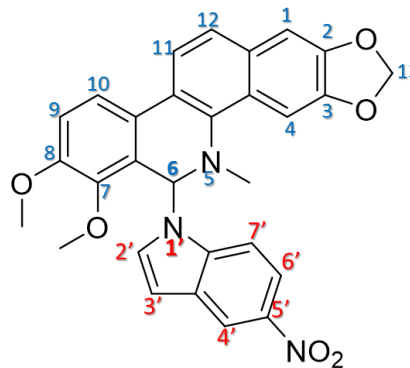
6-(5'-nitroindol-1'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, **4j**

Sólido amarillo opaco, PF:244-245 °C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8.42 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-4'), 8.24 (dd, *J* = 9.1, 2.2

Hz, 1H, H-6'), 7.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-7'), 7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-11), 7.75

(d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-12), 7.46 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-10), 7.33 (s, 1H, H-4), 7.19 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-9), 7.00 (s, 1H, H-1), 6.92 (s, 1H, H-6), 6.46 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-2'), 6.21 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-3'), 5.98 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H-13), 5.92 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, H-13), 3.97 (s, 3H, CH₃O-C7), 3.59 (s, 3H, CH₃O-C8), 2.93 (s, 3H, CH₃-N5).



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 152.48, 128.97, 128.64, 126.86, 125.79, 124.53, 122.19, 119.57, 119.21, 118.09, 117.29, 113.99, 111.03, 104.40, 103.15, 102.72, 101.18, 100.54, 100.00, 95.92, 67.60, 61.00, 56.05, 41.72.

5.5.2 Elucidación estructural de los aductos C6-N1' de **4**

5.5.2.1 Elucidación estructural de 6-(6'-cloroindol-1'-il)-5,6-dihiqueleritrina, **4i**

El producto (**4i**) se obtuvo con un 25.45 % de rendimiento como cristales amorfos rosas. El espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, Figura **30**) exhibió señales que corresponden al fragmento de 6-cloroindol. En δ_H 7.06 ppm resonó una señal doble de doble ($J = 8.4, 1.8$ Hz) que integra para un hidrógeno que corresponde al protón H-5' del indol y en δ_H 7.73 ppm resonó un doblete ($J = 8.6$ Hz) que integra para un hidrógeno que corresponde al protón H-4', mientras que en δ_H 7.89 ppm se observó una señal simple que integra para un hidrógeno que corresponde al protón H-7' del indol. La unión N-1' de 6-cloroindol a **4** quedó

evidenciada por las dos señales dobles en δ_{H} 6.29 y 6.01 ppm con constantes de acoplamiento típicas para pirroles ($J = 3.3$ y 3.2 Hz, respectivamente) que integran para un hidrógeno cada una y que corresponden al protón H-2' y H-3' del indol, respectivamente. Además, se observó una señal simple en δ_{H} 6.84 ppm que integra para un protón y que corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **4**: en δ_{H} 2.92 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. A δ_{H} 3.52 y 3.93 resuenan dos singuletes que integran para tres protones cada uno y corresponden a los grupos metilos unidos a oxígeno, mientras que en δ_{H} 5.99 y 5.93 ppm se observaron dos singuletes que integran para un protón cada uno y que corresponden a los protones del grupo dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_{H} 7.77, 7.45, 7.36 y 7.16 ppm) correspondientes a H-11, H-12, H-10 y H-9, respectivamente, con J típicas para protones en posición *orto* (entre 8.4 y 8.7 Hz) y dos singuletes (δ_{H} 7.00 y 7.40 ppm) que integran para un hidrógeno cada uno y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-1 y H-4, respectivamente).

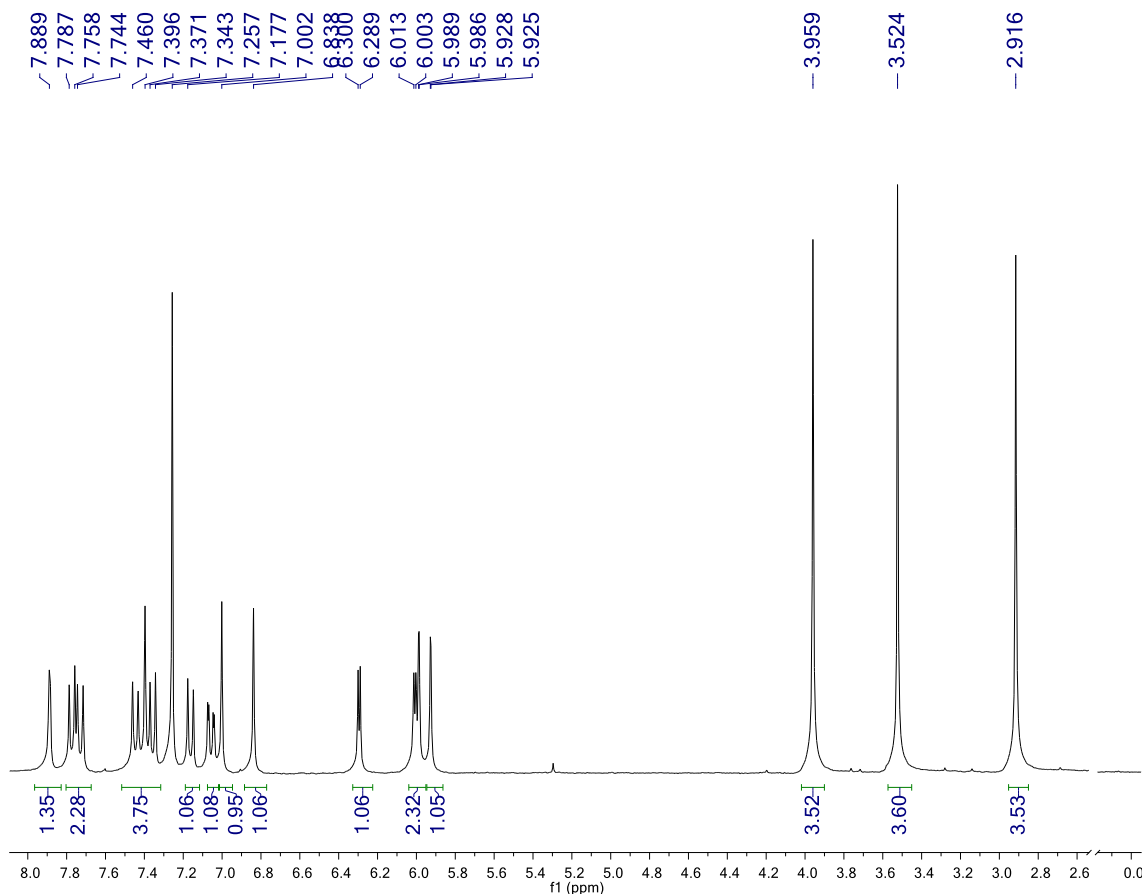


Figura 30. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **4i**

5.5.2.2 Elucidación estructural 6-(5'-nitroindol-1'-il)-5,6-dihidroqueleritrina, **4j**

El producto (**4j**) se obtuvo con un 17.14 % de rendimiento como un sólido amarillo opaco. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura 31) exhibió señales que corresponden al fragmento de 5-nitroindol. En δ_{H} 8.24 ppm resonó una señal doble de doble ($J = 9.1, 2.2$ Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón H-6' del indol. En δ_{H} 8.42 ppm resonó un doblete ($J = 2.2$ Hz) que integra para un hidrógeno que corresponde al protón H-4', mientras que en δ_{H} 7.94 ppm se observó una señal doble ($J = 9.0$ Hz) que integra para un

hidrógeno y que corresponde al protón H-7' del indol. La unión N-1' de 5-nitroindol a **4** quedó evidenciada por las dos señales dobles en δ_H 6.21 y 6.46 ppm con constantes de acoplamiento típicas para pirroles ($J = 3.4$ Hz), las cuales integran para un hidrógeno cada una y corresponden a los protones H-3' y H-2' del indol, respectivamente. Adicionalmente se observó una señal simple en δ_H 6.92 ppm que integra para un protón y que corresponde a H-6. Las señales remanentes son congruentes con las señales de **4**: en δ_H 2.93 ppm se observó un singulete con integración para tres hidrógenos el cual es característico de grupo metilo unido al nitrógeno. A δ_H 3.58 y 3.97 resuenan dos singuletes que integran para tres protones cada uno y corresponden a los grupos metilos unidos a oxígeno, mientras que en δ_H 5.92 y 5.98 ppm se observaron dos singuletes que integran para un protón cada uno y que corresponden a los protones del grupo dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes (δ_H 7.77, 7.75, 7.46 y 7.19 ppm) correspondientes a H-11, H-12, H-10 y H-9 respectivamente, con J típicas para protones en posición *orto* (entre 8.4 y 8.7 Hz) y dos singuletes (δ_H 7.33 y 7.00 ppm) que integran para un hidrógeno cada uno y que son atribuibles a los protones en posición *para* (H-4 y H-1, respectivamente).

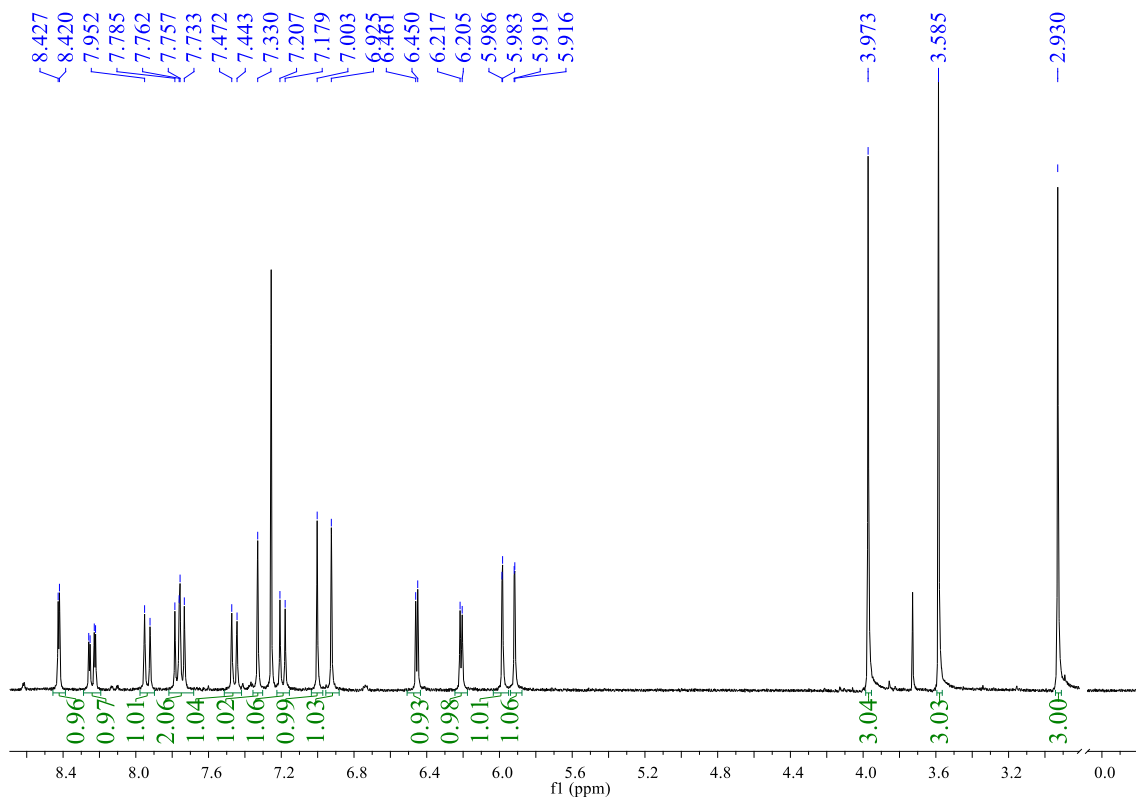


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **4j**

5.6 Obtención de subproductos durante la purificación de **3** y **4**

Al realizar una CCF de las reacciones de ACD entre las plataformas **3** y **4** y los diferentes nucleófilos, se observaron varias manchas que correspondían a distintos subproductos de la reacción. Estos subproductos no se purificaron rigurosamente debido a la pequeña cantidad presente en el crudo de reacción y a la labilidad de los mismos que resultaba al contacto con el gel de sílice; por tal motivo, tampoco fueron caracterizados mediante técnicas espectrométricas. No obstante, algunos de los subproductos fueron identificados por CCF comparando

su Rf con el de un estándar previamente caracterizado en nuestro laboratorio. Se confirmó la formación de la amida oxisanguinarina (**7**) cuando las reacciones realizadas con dihidrosanguinarina sobrepasaban un tiempo de 5 horas, aunado a la formación de los intermediarios de reacción sanguinarina (**1**) y queleritrina (**2**) (Figura 32).

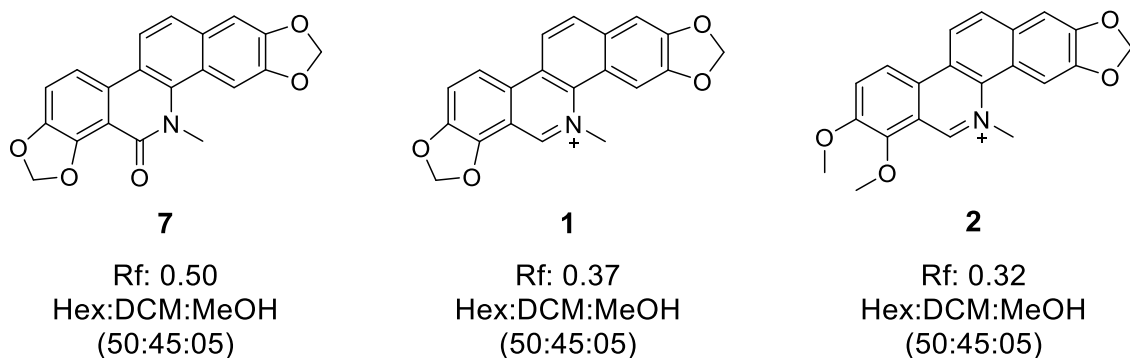


Figura 32. Subproductos encontrados en las reacciones de ACD de **3** y **4**.

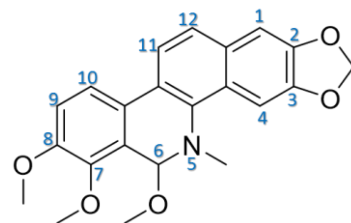
Al intentar recuperar la benzo[*c*]fenantridina **1** de la reacción de ACD entre la plataforma **4** y 5-nitroindol se eluyó la columna cromatográfica con metanol, obteniendo un nuevo compuesto el cual se caracterizó como 6-metoxidihidroqueleritrina (**4k**). Este subproducto fue de gran interés debido a que en antecedentes (Sección 2.2.1) se ha reportado su actividad frente a la cepa sensible de tuberculosis y aún no está reportada su actividad en bacterias resistentes, por este motivo, también se incluyó en el presente trabajo.

5.6.1 Datos espectroscópicos de **4k**

6-metoxidihidroqueleritrina

Agujas blancas cristalinas, PF:240-241 °C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-11), 7.70 (s, 1H, H-4), 7.63 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-10), 7.47 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-12), 7.12 (s, 1H, H-1), 7.04 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-9), 6.06 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H-13), 6.05 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H-13), 5.55 (s, 1H, H-6), 3.96 (s, 3H, CH₃O-C7), 3.93 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.46 (s, 3H, CH₃O-C6), 2.77 (s, 3H, CH₃-N5).



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 152.21, 148.04, 147.44, 146.71, 138.46, 131.13, 126.84, 125.81, 124.91, 123.56, 122.63, 120.15, 119.05, 113.00, 104.74, 101.13, 100.74, 86.15, 61.78, 56.07, 54.08, 40.72.

5.6.2 Elucidación estructural de 6-metoxidihidroqueleritina, **4k**

El producto (**4k**) se obtuvo con un 23.92 % de rendimiento como agujas blancas cristalinas que funden a 240 °C. El espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, Figura **33**) exhibió patrones de señales muy similares a los de la plataforma **4**, lo cual permitió inferir que su estructura molecular correspondía a un análogo de la misma. Las similitudes espectroscópicas radican en el singulete que resonó en δ_H 2.77 ppm con una integral para tres hidrógenos y se atribuye a los hidrógenos del grupo *N*-metilo, dos singuletes en δ_H 3.93 y 3.96 ppm que integran para tres hidrógenos y que corresponden a los grupos metoxilo unidos a benceno, dos dobletes (*J* = 1.13 ppm) de grupo dioximetileno en δ_H 6.05 y 6.06 ppm con integración para un hidrógeno cada uno, cuatro dobletes (δ_H 7.04 ppm,

7.47, 7.6 y 7.78) que integran para un protón cada uno correspondientes a los protones *orto* aromáticos ($J = 8.6$ Hz) y dos singuletes correspondientes a los protones aromáticos en posición *para* (δ_H 7.12 y 7.70 ppm). Al comparar el espectro de RMN 1H de este compuesto con el obtenido para **4**, se observó una señal singulete adicional en δ_H 3.46 ppm que integra para tres hidrógenos y muestra desplazamiento químico característico de grupo metoxilo unido a benceno. La unión de un metoxilo a **4** quedó evidenciada por la señal simple que resonó en δ_H 5.55 ppm que integra para un protón y que corresponde a H-6.

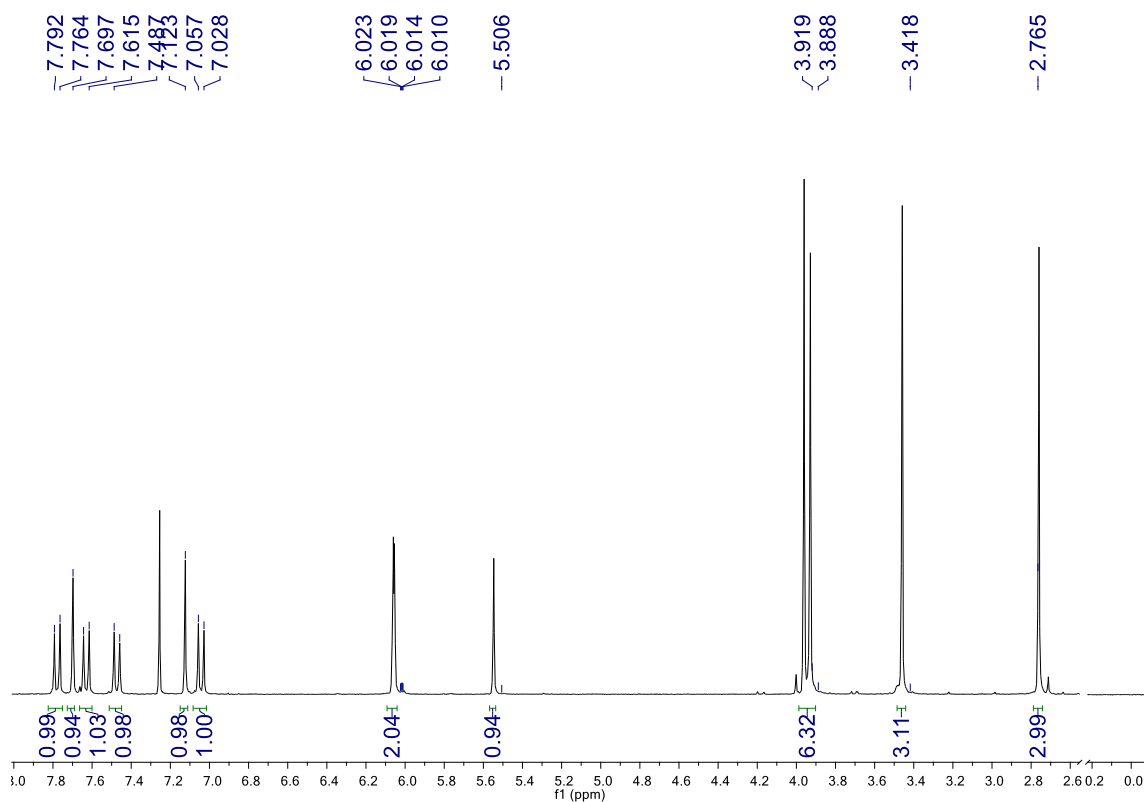


Figura 33. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) de **4k**

5.7 Propuesta de mecanismo de reacción

Considerando lo establecido por Klussman y colaboradores [73] se propuso un mecanismo de reacción para justificar la aparición de subproductos en el proceso de purificación y los rendimientos de la reacción (Figura 34).

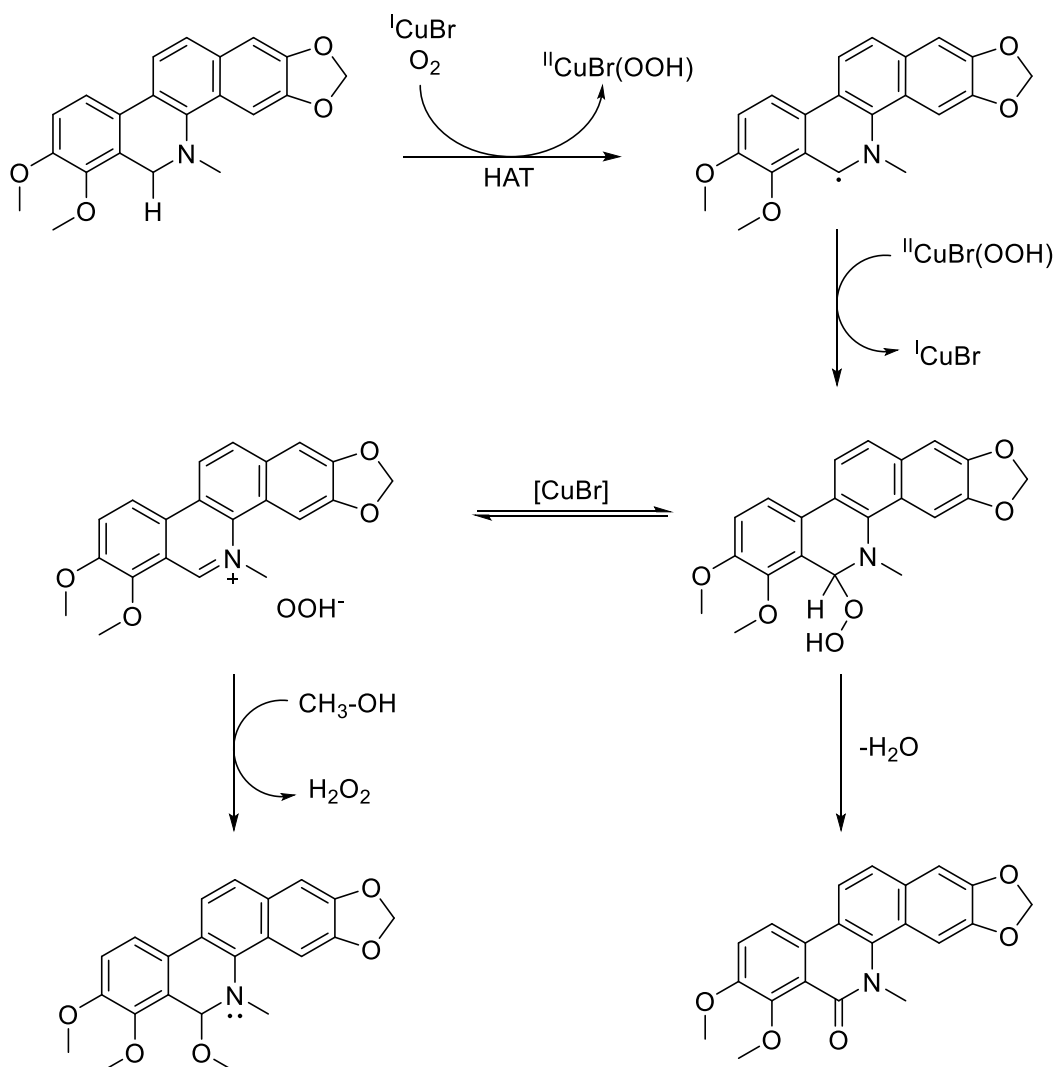


Figura 34. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de 4k

5.8 Análisis del esquema de reacción propuesto

Los rendimientos de las reacciones de ACD entre las plataformas **3** y **4** varían entre un 20 a un 60%. En general, las reacciones con la plataforma de **3** fueron mayores a los rendimientos con **4** (Tabla 9). De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis conformacional mediante mecánica molecular por ChemDraw, en la plataforma **3** (Figura 35 a) el grupo dioximetileno permanece rígido, por lo que al formarse el ion iminio éste puede ser atacado por arriba o por abajo del plano. En cambio, en **4** (Figura 35 b) el grupo metoxilo en C7 se mueve libremente, ocasionando impedimento estérico y disminuyendo las probabilidades de adición nucleofílica al grupo iminio, lo cual concuerda con los resultados del análisis por difracción de rayos X de monocristal de **4** (Figura 35 c). Esto permite suponer también por qué las reacciones con **3** duraban entre dos y cuatro horas, mientras que las de **4** duraban entre de cuatro y seis horas.

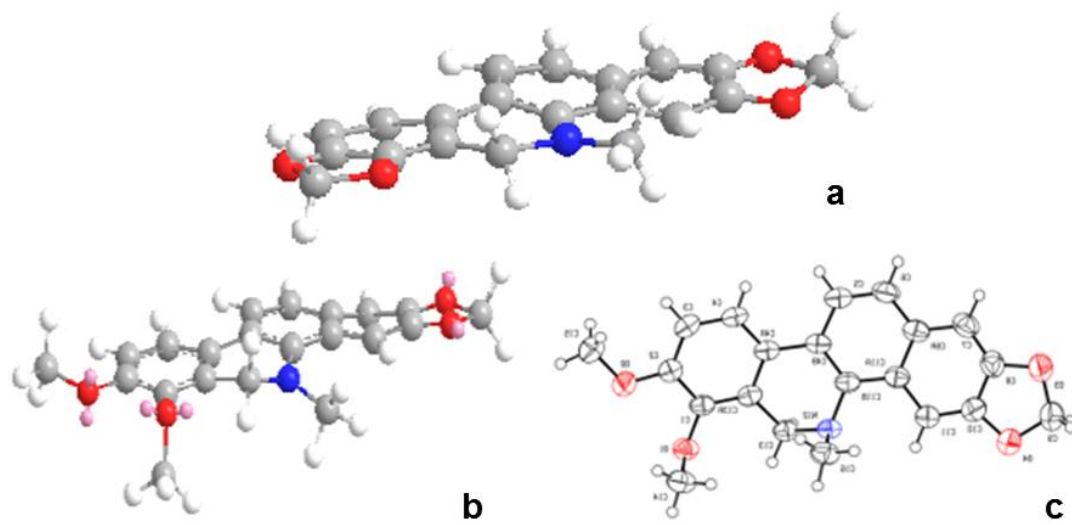
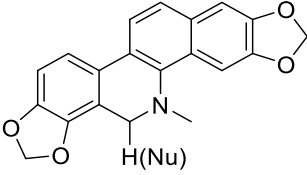
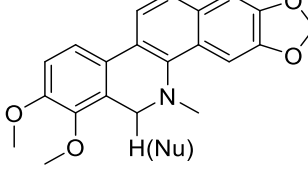
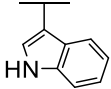
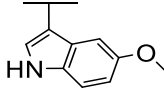
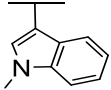
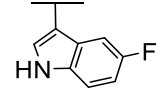
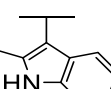
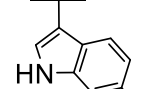
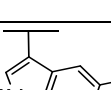
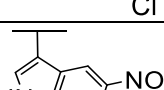


Figura 35. a) Estructura de mínima energía de **3**. b) Estructura de mínima energía de **4**. c) Vista ORTEP de la estructura de **4**.

Tabla 9. Comparación de rendimientos entre **3** y **4**.

 3			 4		
Nu	No.	Rendimiento (%)	Nu	No.	Rendimiento (%)
	3a	60.95		3e	57.17
	4a	56.79		4e	26.49
	3b	35.01		3f	51.82
	4b	29.54		4f	24.25
	3c	46.85		3g	62.27
	4c	40.15		4g	60.05
	3d	NP*		3e	NF*
	4d	27.38		4e	NF*

*NF: No formado, *NP: No purificado

Al comparar el rendimiento de los derivados con indol y sus análogos con un grupo metilo en la posición 1' y 2' como sustituyente se observó que hay mayor rendimiento con NH libre y sin sustituyentes en el anillo pirrólico del indol. Probablemente el grupo *N*-metilo del fragmento pirrólico disminuye la nucleofilicidad de C3' y el grupo metilo unido a C2' provoque impedimento estérico, lo cual reduce la probabilidad de acoplamiento oxidativo de C3' con C6. La sustitución con un metoxilo en la posición 5' hace al indol un mejor nucleófilo ya que se incorpora un grupo electrodonador fuerte en uno de los sitios más electrofílicos del indol. El efecto de resonancia alcanza a influenciar a la posición 3', efecto que no se observó con un electrodonador débil como el metilo en la

posición 5', el cual tiene menor rendimiento de todos los análogos que exhiben un fragmento metilindólico.

La sustitución con un grupo electroattractor en posición 6' favoreció el rendimiento de la reacción y se obtuvieron mejores rendimientos con este nucleófilo en ambas plataformas. El efecto inductivo del cloro parece no tener una influencia sobre la nucleofilicidad de C3'. Por el contrario, en el caso del 5-flúorindol, un electroattractor aún más fuerte que el cloro y en una posición más cercana a la posición C3', probablemente indujo mayor electrofilicidad en dicha posición, disminuyendo el rendimiento.

5.9 Actividad antibacteriana

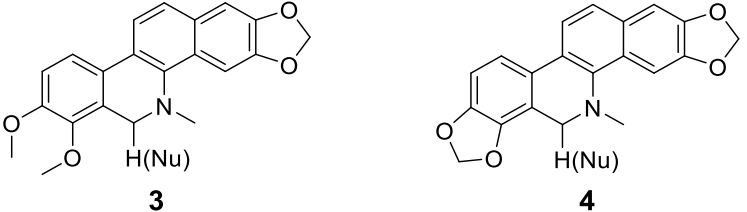
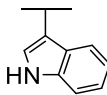
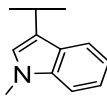
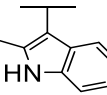
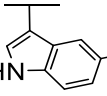
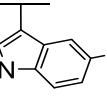
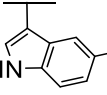
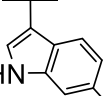
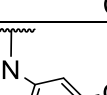
Se evaluaron las plataformas **3** y **4** junto con siete derivados de **3** y diez derivados de **4** contra 9 bacterias resistentes a antibióticos las cuales se mencionaron previamente en la sección de materiales y métodos (sección 4.2.6). Los resultados de la Tabla **10** indican, en primer lugar, que las plataformas naturales **3** y **4** no presentaron actividad antibacteriana contra las cepas resistentes y, en segundo lugar, los análogos derivados de la plataforma **3** tampoco presentaron actividad antibacteriana. Por otro lado, tres de los análogos derivados de la plataforma **4** (**4b**, **4j** y **4k**) presentaron actividad antibacteriana contra cepas resistentes, con valores de CMI en el rango de 1.5625 a 12.5 µg/mL contra tres bacterias resistentes (*E. faecium* resistente a vancomicina, *S. aureus* resistente a meticilina y *S. epidermidis* resistente a linezolid); mientras que, los otros derivados fueron inactivos a las concentraciones ensayadas (CMI > 50 µg/mL). Cabe resaltar que únicamente las bacterias Gram positivas resultaron afectadas por los análogos **4b**, **4j** y **4k**, sin importar la presencia de sustituyentes electrodonadores o electroattractores.

El análogo **4b** presentó un valor de CMI igual a 12.5 µg/mL contra las cepas resistentes de *S. epidermidis* y *E. faecium*, resultando un valor igual al observado para el fármaco de referencia levofloxacino para *E. faecium*, pero siendo dos veces menos activo que levofloxacino para la cepa de *S. epidermidis* (CMI = 6.25 µg/mL). Aunado a lo anterior, **4k** y **4j** presentaron valores de CMI muy importantes contra las cepas Gram-positivas farmacorresistentes evaluadas.

Por un lado, **4k** resultó cuatro veces más potente (CMI = 3.12 µg/mL) contra *S. aureus* que el control levofloxacino (CMI = 12.5 µg/mL), ocho veces más activo (CMI = 1.56 µg/mL) contra *E. faecium* (CMI = 12.5 µg/mL) e igualmente activo contra *S. epidermidis* (CMI = 6.25 µg/mL). Por el otro, **4j** exhibió la misma actividad (CMI = 6.25 µg/mL) contra *S. aureus* que el control levofloxacino (CMI = 6.25 µg/mL), dos veces mayor actividad (CMI = 6.25 µg/mL) contra *E. faecium* (CMI = 12.5 µg/mL) e igual actividad contra *S. epidermidis* (CMI = 6.25 µg/mL).

En cuanto a la actividad antimicobacteriana, solamente dos análogos de la plataforma **3** (**3a** y **3b**) presentaron actividad contra la cepa G122 de *M. tuberculosis*, mostrando una CMI de 1.5625 y 25 µg/ mL, respectivamente. Es importante señalar que el análogo **3a** mostró la misma CMI que el control positivo levofloxacino (1.56 µg/mL), pero se necesita realizar una confirmación del ensayo.

Tabla 10. Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de los análogos de **3** y **4**.

											
Nu	No.	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>p. BLEE</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>NMD-1+</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>r. oxacilina</i>	<i>M. tuberculosis</i>
		H	3	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	4	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	3a	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	1.56
	4a	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	3b	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	25
	4b	>50	12.5	12.5	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	3c	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	4c	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	3d	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	4d	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	3e	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	4e	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	3f	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	4f	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	3g	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	4g	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	4i	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50

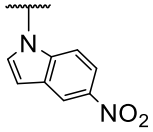

	4j	6.25	6.25	6.25	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	4k	3.12	1.56	6.25	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50

Tabla 11. Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de los controles.

Controles	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>p. BLEE</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>NMD-1+</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>r. oxacilina</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Levofloxacin	12.5	12.5	6.25	12.5	0.8	>50	12.5	>50	25	1.56
Vancomicina		>200								
Linezolid			50							

5.10 Relación estructura-actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los compuestos solo se presentó en bacterias Gram-positivas. Esta actividad podría deberse por las diferencias estructurales que existen entre bacterias Gram-positivas con las Gram-negativas, ya que las las Gram-negativas, además de poseer pared celular, también tienen una membrana externa y espacio periplásmico (Figura 36) [74], lo que dificultaría la entrada de los compuestos a la célula. Asimismo, las bacterias Gram-negativas que se utilizaron en las pruebas biológicas (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*) también presentan otros factores de virulencia

como cápsula y biopelícula [75], [76], aumentando la dificultad de que los compuestos puedan penetrar la bacteria.

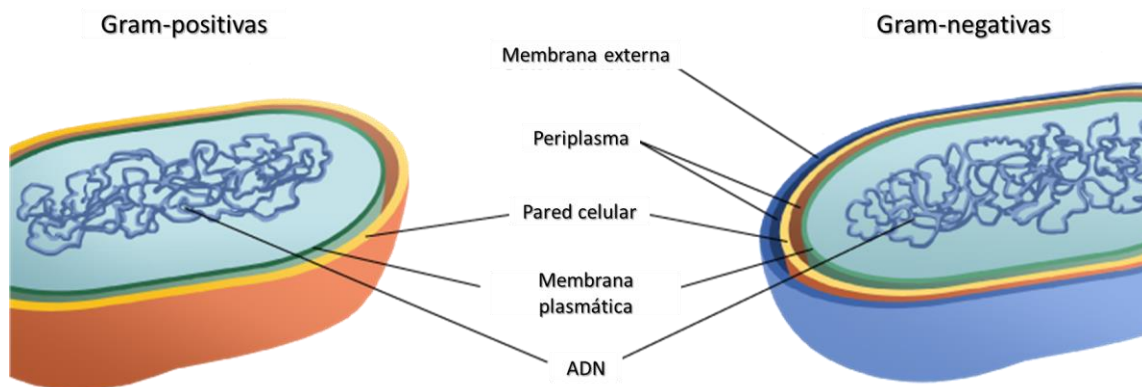


Figura 36. Diferencias estructurales entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [74],

Las bacterias Gram-positivas utilizadas (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecium*) también presentan diferencias estructurales entre ellas. *S. aureus* tiene una cápsula de polisacáridos como uno de sus principales factores de virulencia [77], por otro lado, *S. epidermidis* puede presentar o no una cápsula y en caso de presentar, es más delgada en comparación con la cápsula de *S. aureus* [78]. Por último, *E. faecium* no presenta cápsula [79]. Esto explicaría por qué los compuestos resultaron más activos contra *E. faecium* que contra el género *Staphylococcus*.

A pesar de que **3** y **4** tienen grupos electrodonadores en las posiciones C7 y C8, la presencia de los grupos metoxilo en los análogos de **4** sugiere que la actividad de **4** puede ser debido a que los grupos metoxilo causan mayor

impedimento estérico y limitan el movimiento del indol, por lo tanto, hay menos confórmeros en solución, y eso facilitaría la unión con una diana terapéutica. Por otro lado, los grupos dioximetilenos unidos al anillo D de la benzofenantridina en los derivados de 3 se encuentran casi planos y restringidos a una menor área de Van der Waals, dándole mayor libertad al indol y aumentando el número de confórmeros.

Para fundamentar lo anterior, se realizó un análisis conformacional mediante mecánica molecular con el software PCMODEL v.06 donde se obtuvieron los confórmeros de menor energía potencial relativa (MMX) de los compuestos **3a** y **4a**. (Figura **37**). Se observó que el compuesto **4a** presenta dos confórmeros más estables, sin embargo, aquel que tiene el metoxilo unido en C7 y orientado hacia el mismo plano que el indol tiene menor energía potencial, de tal manera que es el más estable (Figura **37 a**). Por el contrario, **3a** tiene mayor energía potencial que los dos confórmeros de **4a**, siendo así el más inestable.

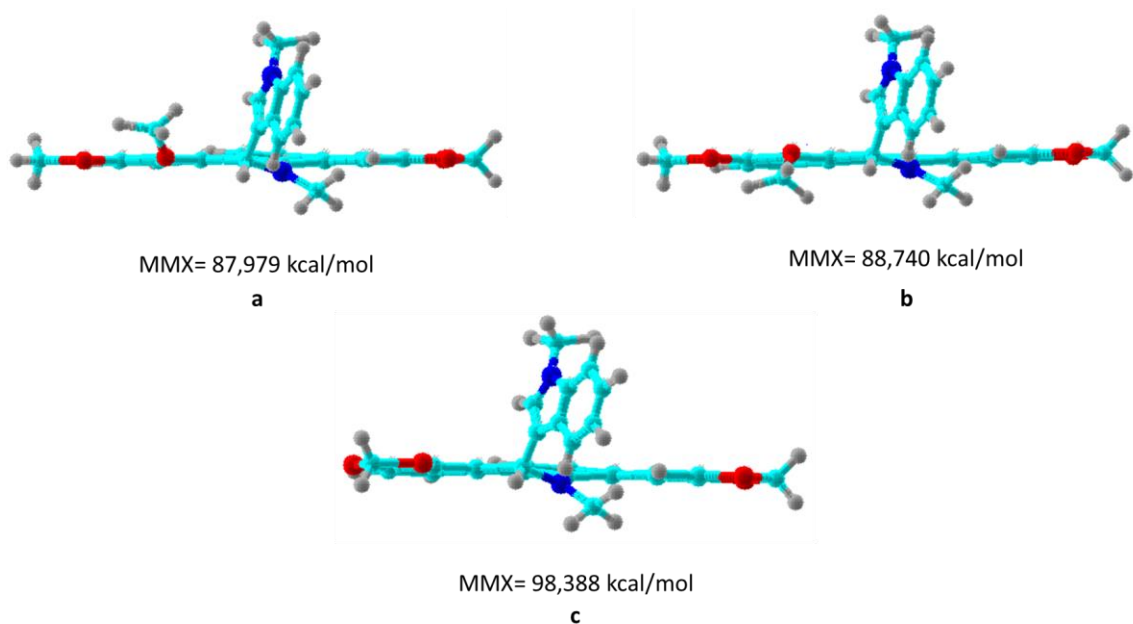


Figura 37. a) Confórmero más estable de **4a**. b) Segundo confórmero más estable de **4a**. c) Confórmero más estable de **3^a**

A pesar de que se utilizaron indoles con diferentes sustituyentes tanto con grupos electrodonadores y electroattractores, solamente la funcionalización C6-C3' de **4** con 1-metilindol fue activa contra *S. epidermidis* y *E. faecium*. Esto es indicativo de que la presencia del NH libre no es indispensable para presentar actividad y es necesario una parte hidrófoba en esa región de la molécula. Probablemente ocurra una interacción con una cavidad hidrófoba de una proteína como una posible diana molecular.

Por otro lado, entre los aductos C6-N1' de **4** con 5-nitroindol y 6-cloroindol, solamente el primero presentó actividad antibacteriana, lo cual indica que la presencia de un grupo electrotractor fuerte es necesaria para incrementar considerablemente la actividad. Además, el grupo nitro puede presentar

interacciones iónicas con otros aminoácidos ya que tiene carga positiva y negativa.

5.11 Validación de la hipótesis

Tomando en cuenta que las plataformas naturales no presentaron actividad antibacterina contra cepas resistentes (CMI > 50 µg/mL) y que el compuesto **4b** presentó buena actividad contra algunas bacterias resistentes Gram-positivas (CMI_{*E. faecium*} = 12.5 µg/mL; CMI_{*S. epidermidis*} = 12.5 µg/mL) la hipótesis se acepta, ya que la funcionalización C6–C3' con un fragmento indólico aumentó la actividad de una de las plataformas naturales. Del mismo modo, el compuesto **4j** también incrementó considerablemente la actividad antibacteriana contra las bacterias resistentes Gram-positivas (*S. aureus* 12.5 µg/mL; *E. faecium* 6.25 µg/mL, *S. epidermidis* 12.5 µg/mL), a pesar de ser una funcionalización C6–N1' que no se esperaba, también aprueba la hipótesis.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

1. Se aislaron, caracterizaron y purificaron del extracto metanólico de las semillas de *B. latisepala* los alcaloides del tipo benzo[c]fenantridina: dihidrosanguinarina (**3**), dihidroqueleritrina (**4**), 12-metoxidihidroqueleritrina (**5**) y dihidroquelirubina (**6**) con un porcentaje en base al peso seco de la planta de 0.05 %, 0.09 %, 0.006 % y 0.006 %, respectivamente.
2. Los alcaloides 12-metoxidihidroqueleritrina y dihidroquelirubina. fueron aislados por primera vez de *B. latisepala*.
3. Se logró la funcionalización C(sp³)–H de dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina con diversos indoles con cantidades catalíticas de CuBr (5 mol%), en condiciones ambientales, obteniendo rendimientos moderados (20-60 %) y sin requerir el uso de peróxidos o benzoquinonas como agentes oxidantes.
4. Se sinterizaron, purificaron y elucidaron estructuralmente 6 nuevos análogos de dihidrosanguinarina.
5. Se sinterizaron, purificaron y elucidaron estructuralmente 9 nuevos análogos de dihidroqueleritrina.

6. El análogo de dihidroqueleritrina funcionalizado con un fragmento de 1-metilindol unido de manera C6-C3' (**4b**) presentó actividad antibacteriana contra *E. faecium* resistente a vancomicina (CMI= 12.5 µg/ mL), siendo igual de activo que el fármaco de referencia levofloxacino y también presentó actividad contra *S. epidermidis* resistente a linezolid (CMI= 12.5 µg/ mL), sin embargo, el levofloxacino fue dos veces más activo (CMI= 6.25 µg/ mL).
7. El análogo de dihidroqueleritrina funcionalizado con un fragmento de 5-nitroindol en posición C6-N1' (**4j**) exhibió la misma actividad (CMI = 6.25 µg/mL) contra *S. aureus* que el control levofloxacino (CMI = 6.25 µg/mL), dos veces mayor actividad (CMI = 6.25 µg/mL) contra *E. faecium* (CMI = 12.5 µg/mL) e igual actividad contra *S. epidermidis* (CMI = 6.25 µg/mL).
8. El subproducto análogo de dihidroqueleritrina funcionalizado con grupo metoxilo en la posición C6 (**4k**) resultó cuatro veces más potente (CMI = 3.12 µg/mL) contra *S. aureus* que el control levofloxacino (CMI = 12.5 µg/mL), ocho veces más activo (CMI = 1.56 µg/mL) contra *E. faecium* (CMI = 12.5 µg/mL) e igualmente activo contra *S. epidermidis* (CMI = 6.25 µg/mL).
9. El análogo de dihidrosanguinarina funcionalizado con un fragmento de indol unido de manera C6-C3' (**3a**) y su funcionalizado con un fragmento de 1-metilindol unido de manera C6-C3' (**3b**) presentaron actividad antibacteriana contra la cepa G122 de *M. tuberculosis* la cual es resistente a isoniacida, rifampicina y etambutol (CMI= 1.56 y 25 µg/mL, respectivamente), siendo la actividad de **3a** equivalente a la del fármaco de referencia levofloxacino (CMI= 1.56 µg/mL).

10. Los derivados indólicos de dihidroqueleritrina (**4b** y **4j**) presentaron potencial como agentes selectivos de bacterias fármacorresistentes Gram-positivas, lo que los convierte en moléculas promisorias como antibióticos *in vivo*.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS

1. Optimizar la síntesis para la obtención de los derivados indólicos de dihidroqueleritrina.
2. Realizar estudios de actividad antibacteriana *in vivo*.
3. Determinar la citotoxicidad de los compuestos **4b** y **4j** contra una línea celular normal.
4. Determinar el mecanismo por el cuál **4b** y **4j** inhiben específicamente cepas Gram-positivas resistentes.
5. Realizar un diseño racional de nuevos derivados, incorporando grupos funcionales diferentes al indol que también confieran propiedades antibacterianas.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS

- [1] S. S. Morse, “Factors and determinants of disease emergence.,” *Rev. Sci. Tech.*, vol. 23, no. 2, pp. 443–51, 2004.
- [2] C. Dye, “After 2015: infectious diseases in a new era of health and development.,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 369, no. 1645, p. 20130426, 2014.
- [3] K. Kümmerer, “Resistance in the environment,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 54, no. 2, pp. 311–320, 2004.
- [4] R. Laxminarayan, A. Duse, C. Wattal, A. K. M. Zaidi, H. F. L. Wertheim, N. Sumpradit, E. Vlieghe, G. L. Hara, I. M. Gould, H. Goossens, C. Greko, A. D. So, M. Bigdeli, G. Tomson, W. Woodhouse, E. Ombaka, A. Q. Peralta, F. N. Qamar, F. Mir, S. Kariuki, Z. A. Bhutta, A. Coates, R. Bergstrom, G. D. Wright, E. D. Brown, and O. Cars, “Antibiotic resistance-the need for global solutions,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 13, no. 12, pp. 1057–1098, 2013.
- [5] V. K. Viswanathan, “Off-label abuse of antibiotics by bacteria,” *Gut*

- Microbes*, vol. 5, no. 1, pp. 3–4, 2014.
- [6] U. Theuretzbacher, “Global antibacterial resistance: The never-ending story,” *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 1, no. 2, pp. 63–69, 2013.
- [7] P. W. Taylor, “Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents.,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 42, no. 3, pp. 195–201, Sep. 2013.
- [8] T. P. T. Cushnie, B. Cushnie, and A. J. Lamb, “Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 44, no. 5, pp. 377–386, 2014.
- [9] R. Dua¹, R. Dua, S. Shrivastava, S. K. Sonwane, and S. K. Srivastava, “Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review,” *Adv. Biol. Res. (Rennes)*, vol. 5, no. 3, pp. 120–144, 2011.
- [10] World Health Organization, “World Health Organization, Infectious Diseases,” *Health topics*, 2013. [Online]. Available: http://www.searo.who.int/topics/infectious_diseases/en/. [Accessed: 11-Feb-2018].
- [11] A. L. Rice, L. Sacco, A. Hyder, and R. E. Black, “Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries,” *Bull. World Heal. Organ*, vol. 78, no. 10, pp. 1207–1221, 2000.
- [12] C. González-González and R. Palloni, Alberto Palloni; Wong, “HHS Public Access,” vol. 344, no. 6188, pp. 1173–1178, 2015.

- [13] D. L. Kasper, A. S. Fauci, S. L. Hauser, D. L. (Dan L. Longo, J. L. Jameson, and J. Loscalzo, *Harrison's principles of internal medicine*. 2008.
- [14] M. E. Levison and J. H. Levison, "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents," *Infect Dis Clin North Am*, vol. 23, no. 4, pp. 791–819, 2009.
- [15] C. O. Gualerzi, L. Brandi, A. Fabbretti, and C. L. Pon, *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.
- [16] C. G. Gemmell, "Protein Synthesis Inhibitors and Bacterial Susceptibility to Phagocytosis," in *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993, pp. 987–991.
- [17] M. K. Bhattacharjee, *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*. 2016.
- [18] "WHO | Antimicrobial resistance," *WHO*, 2016.
- [19] J. Davies and D. Davies, "Origins and evolution of antibiotic resistance.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 74, no. 3, pp. 417–33, Sep. 2010.
- [20] C. A. Michael, D. Dominey-Howes, and M. Labbate, "The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management," *Front. Public Heal.*, vol. 2, no. September, pp. 1–8, 2014.
- [21] D. I. Andersson, "The ways in which bacteria resist antibiotics," *Int. J. Risk Saf. Med.*, vol. 17, no. May, pp. 111–116, 2005.
- [22] J. Calvo and L. Martínez-Martínez, "Mecanismos de acción de los

- antimicrobianos,” *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 27, no. 1, pp. 44–52, 2009.
- [23] O. Skold, *Prophylactic antibiotics and antibiotic resistance.*, vol. 1, no. 1. 1977.
- [24] C. O. Gualerzi and L. Brandi, *Antibiotics: Targets, Targets, Mechanisms and Resistance*, 1st ed. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.
- [25] M. A. Webber and L. J. V Piddock, “The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 51, no. 1, pp. 9–11, 2003.
- [26] J. Sun, Z. Deng, and A. Yan, “Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 453, no. 2, pp. 254–267, 2014.
- [27] X. Li and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria*, vol. 69, no. 12. 2009.
- [28] “Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC,” *CDC*, 2013. [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>.
- [29] H. A. Grema, “Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): A Review,” *Adv. Anim. Vet. Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 79–98, 2015.
- [30] M. . Anton Y. Peleg, M.B., B.S., M.P.H. and David C. Hooper, “Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria,” *N. Engl. J. Med.*, vol.

362, no. 19, pp. 1804–1813, 2010.

- [31] B. Mehrad, N. M. Clark, G. G. Zhanel, and J. P. Lynch, “Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections,” *Chest*, vol. 147, no. 5, pp. 1413–1421, 2015.
- [32] D. Nathwani, G. Raman, K. Sulham, M. Gavaghan, and V. Menon, “Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis,” *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, vol. 3, no. 1, p. 32, 2014.
- [33] S. B. Almasaudi, “*Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features,” *Saudi J. Biol. Sci.*, 2015.
- [34] J. O’Neil, “Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations,” *Rev. Antimicrob. Resist.*, no. December, p. 20, 2014.
- [35] “The United Nations’ historic meeting on antibiotic resistance puts the threat on a level with HIV and Ebola — Quartz,” *Quartz*, 2016. [Online]. Available: <http://qz.com/788548/the-united-nations-historic-meeting-on-antibiotic-resistance-puts-the-threat-on-a-level-with-hiv-and-ebola/>.
- [36] K. Poole, *Efflux-mediated antimicrobial resistance*, no. May. 2014.
- [37] P. Ball, “Conclusions: the future of antimicrobial therapy - Augmentin® and beyond,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 30, no. SUPPL. 2, pp. 139–141, 2007.
- [38] F. J. Schmitz, A. C. Fluit, M. Lückefahr, B. Engler, B. Hofmann, J. Verhoef,

- H. P. Heinz, U. Hadding, and M. E. Jones, "The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 42, no. 6, pp. 807–810, Dec. 1998.
- [39] P. N. Markham, E. Westhaus, K. Klyachko, M. E. Johnson, and A. A. Neyfakh, "Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, no. 10, pp. 2404–2408, 1999.
- [40] A. R. Ball, G. Casadei, S. Samosorn, J. B. Bremner, F. M. Ausubel, T. I. Moy, and K. Lewis, "Conjugating berberine to a multidrug efflux pump inhibitor creates an effective antimicrobial.," *ACS Chem. Biol.*, vol. 1, no. 9, pp. 594–600, 2006.
- [41] B. Zeng, H. Wang, L. Zou, A. Zhang, X. Yang, and Z. Guan, "Evaluation and target validation of indole derivatives as inhibitors of the AcrAB-TolC efflux pump.," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 74, no. 11, pp. 2237–2241, 2010.
- [42] S. Lepri, F. Buonerba, L. Goracci, I. Velilla, R. Ruzziconi, B. D. Schindler, S. M. Seo, G. W. Kaatz, and G. Cruciani, "Indole Based Weapons to Fight Antibiotic Resistance: A Structure-Activity Relationship Study," *J. Med. Chem.*, vol. 59, no. 3, pp. 867–891, 2016.
- [43] J. Lee, C. Attila, S. L. G. Cirillo, J. D. Cirillo, and T. K. Wood, "Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence," *Microb.*

Biotechnol., vol. 2, no. 1, pp. 75–90, 2009.

- [44] X. Yu, X. Gao, Z. Zhu, Y. Cao, Q. Zhang, P. Tu, and X. Chai, “Alkaloids from the tribe Bocconieae (Papaveraceae): A chemical and biological review,” *Molecules*, vol. 19, no. 9, pp. 13042–13060, 2014.
- [45] E. Sánchez-Arreola, L. R. Hernández-Molina, J. L. Sánchez-Salas, and G. Martínez-Espino, “Alkaloids from *Bocconia frutescens* . and Biological Activity of their Extracts,” *Pharm. Biol.*, vol. 44, no. 7, pp. 540–543, Oct. 2008.
- [46] V. Navarro and G. Delgado, “Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 66, no. 2, pp. 223–226, Aug. 1999.
- [47] H. Almanza, E. Tadeo, A. Romo Pérez, A. Acosta Huerta, C. Corona, M. del Rayo, and A. García, “Alcaloides de *Bocconia latisepala* con potencial antimicobacteriano,” *Química hoy. Chem. Sci.*, vol. 4, no. A, p. 40, 2014.
- [48] L. G. Armendariz and P.- Ulino, “A Chemical Study of *Bocconia Latisepala* Wats,” *Can. J. Chem.*, vol. 43, no. 1, p. 4, 1964.
- [49] B. Krane, M. Fagbule, and S. Maurice, “The benzophenanthridine alkaloids,” *J. Nat. Prod.*, vol. 47, no. 1, pp. 1–43, 1984.
- [50] C. Gunn and S. Margaret, *Seeds and fruits of North American Papaveraceae*, vol. 1516–1525, no. Agricultural Research Service. 1976.
- [51] Z. Dvorák, “Metabolism of Sanguinarine: The Facts and The Myths,” *Curr. Drug Metab.*, vol. 8, pp. 173–176, 2007.

- [52] T. K. Beuria, M. K. Santra, and D. Panda, "Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly a bundling," *Biochemistry*, vol. 44, no. 50, pp. 16584–16593, 2005.
- [53] S. Gibbons, J. Leimkugel, M. Oluwatuyi, and M. Heinrich, "Activity of *Zanthoxylum clava-herculis* extracts against multi-drug resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mdr-MRSA)," *Phyther. Res.*, vol. 17, no. 3, pp. 274–275, 2003.
- [54] B. W. Obiang-Obounou, O.-H. Kang, J.-G. Choi, J.-H. Keum, S.-B. Kim, S.-H. Mun, D.-W. Shin, K. W. Kim, C.-B. Park, Y.-G. Kim, S.-H. Han, and D.-Y. Kwon, "The mechanism of action of sanguinarine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *J. Toxicol. Sci.*, vol. 36, no. 3, pp. 277–283, 2011.
- [55] L. de C. Tavares, G. Zanon, A. D. Weber, A. T. Neto, C. P. Mostardeiro, I. B. M. Da Cruz, R. M. Oliveira, V. Ilha, I. I. Dalcol, and A. F. Morel, "Structure-Activity Relationship of Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* Having Antimicrobial Activity," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e97000, May 2014.
- [56] G. Y. Zuo, F. Y. Meng, X. Y. Hao, Y. L. Zhang, G. C. Wang, and G. L. Xu, "Antibacterial alkaloids from *Chelidonium majus* Linn (Papaveraceae) against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 4, pp. 90–94, 2008.
- [57] C. Tantapakul, W. Phakhodee, T. Ritthiwigrom, K. Yossathera, S.

- Deachathai, and S. Laphookhieo, "Antibacterial compounds from zanthoxylum rhetsa," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 1139–1142, 2012.
- [58] J. G. Choi, O. H. Kang, H. S. Chae, B. Obiang-Obounou, Y. S. Lee, Y. C. Oh, M. S. Kim, D. W. Shin, J. A. Kim, Y. H. Kim, and D. Y. Kwon, "Antibacterial activity of hylomecon hylomeconoides against methicillin-resistant staphylococcus aureus," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 160, no. 8, pp. 2467–2474, 2010.
- [59] T. Hernandez Almanza, "Aislamiento, caracterización estructural y evaluación antimicobacteriana de los alcaloides de *Bocconia latisejala*," 2015.
- [60] Paula Yurkanis Bruice, *Organic chemistry*, vol. 480, no. 7376. 2007.
- [61] J. Tsuji., *Transition metal reagents and catalysts: innovations in organic synthesis*. Wiley, 2000.
- [62] R. H. Crabtree, "The Organometallic Chemistry of the Transition Metals." Wiley-Interscience, p. 562, 2005.
- [63] J. Wencel-Delord and F. Glorius, "C–H bond activation enables the rapid construction and late-stage diversification of functional molecules," *Nat. Chem.*, vol. 5, no. 5, pp. 369–375, 2013.
- [64] J. Yamaguchi, A. D. Yamaguchi, and K. Itami, "C-H bond functionalization: Emerging synthetic tools for natural products and pharmaceuticals," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 36, pp. 8960–9009, 2012.

- [65] P. T. Anastas and J. C. Warner, "12 Principles of Green Chemistry. Green Chemistry: Theory and Practice," *Oxford Univ. Press New York, By Permis. Oxford Univ. Press*, 1998.
- [66] T. Gensch, M. N. Hopkinson, F. Glorius, and J. Wencel-Delord, "Mild metal-catalyzed C–H activation: examples and concepts," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, no. 10, pp. 2900–2936, 2016.
- [67] K. W. Bentley, "β-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 14, no. 4, p. 387, 1997.
- [68] Z. Li and C. J. Li, "CuBr-catalyzed direct indolation of tetrahydroisoquinolines via cross-dehydrogenative coupling between sp³ C-H and sp² C-H bonds," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 19, pp. 6968–6969, 2005.
- [69] A. Romo-Pérez, L. D. Miranda, A. D. Chávez-Blanco, A. Dueñas-González, M. del R. Camacho-Corona, A. Acosta-Huerta, and A. García, "Mild C(sp³)–H functionalization of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine for development of highly cytotoxic derivatives," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 138, pp. 1–12, 2017.
- [70] G. M. Sheldrick, "Crystal structure refinement with SHELXL," *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.*, vol. 71, no. Md, pp. 3–8, 2015.
- [71] J. R. Zgoda and J. R. Porter, "A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi," *Pharm. Biol.*, vol. 39, no. 3, pp. 221–225, Sep. 2008.

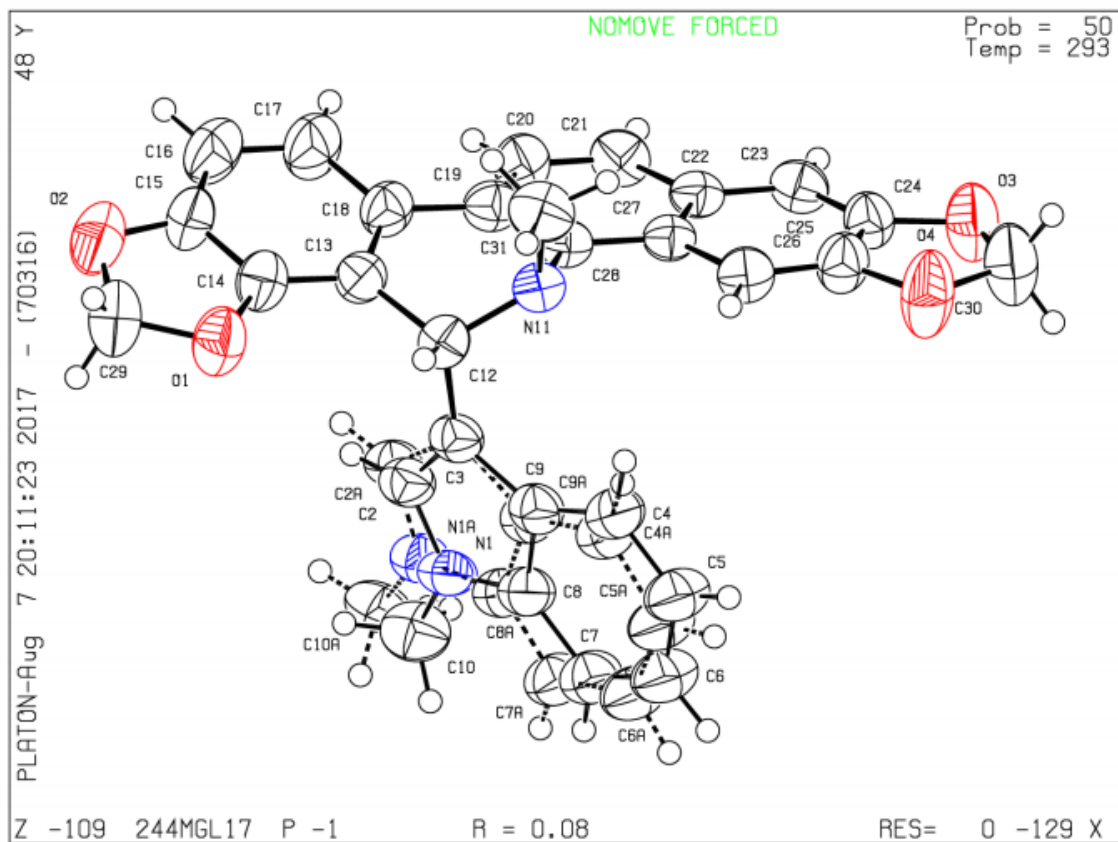
- [72] S. G. Franzblau, R. S. Witzig, J. C. Mclaughlin, P. Torres, G. Madico, A. Hernandez, M. T. Degnan, M. B. Cook, V. K. Quenzer, R. M. Ferguson, and R. H. Gilman, "Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 362–366, 1998.
- [73] E. Boess, L. M. Wolf, S. Malakar, M. Salamone, M. Bietti, W. Thiel, and M. Klussmann, "Competitive Hydrogen Atom Transfer to Oxyl- and Peroxyl Radicals in the Cu-Catalyzed Oxidative Coupling of N-Aryl Tetrahydroisoquinolines Using tert-Butyl Hydroperoxide," *ACS Catal.*, vol. 6, no. 5, pp. 3253–3261, 2016.
- [74] D. A. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, *Brock: Biology of Microorganisms*, 14th ed. Benjamin Cumming, 2015.
- [75] S. Santajit and N. Indrawattana, "Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens," *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, 2016.
- [76] M. K. Paczosa and J. Meccas, "Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 80, no. 3, pp. 629–661, 2016.
- [77] T. J. Foster, "Immune evasion by staphylococci," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 12, pp. 948–958, 2005.
- [78] L. O. F. Papers, "Staphylococcus epidermidis - virulence factors and innate immune response."
- [79] J. Huebner, Y. Wang, W. A. Krueger, L. C. Madoff, G. Martirosian, S. Boisot,

D. A. Goldmann, D. L. Kasper, A. O. Tzianabos, and G. B. Pier, "Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." *Infect. Immun.*, vol. 67, no. 3, pp. 1213–9, 1999.

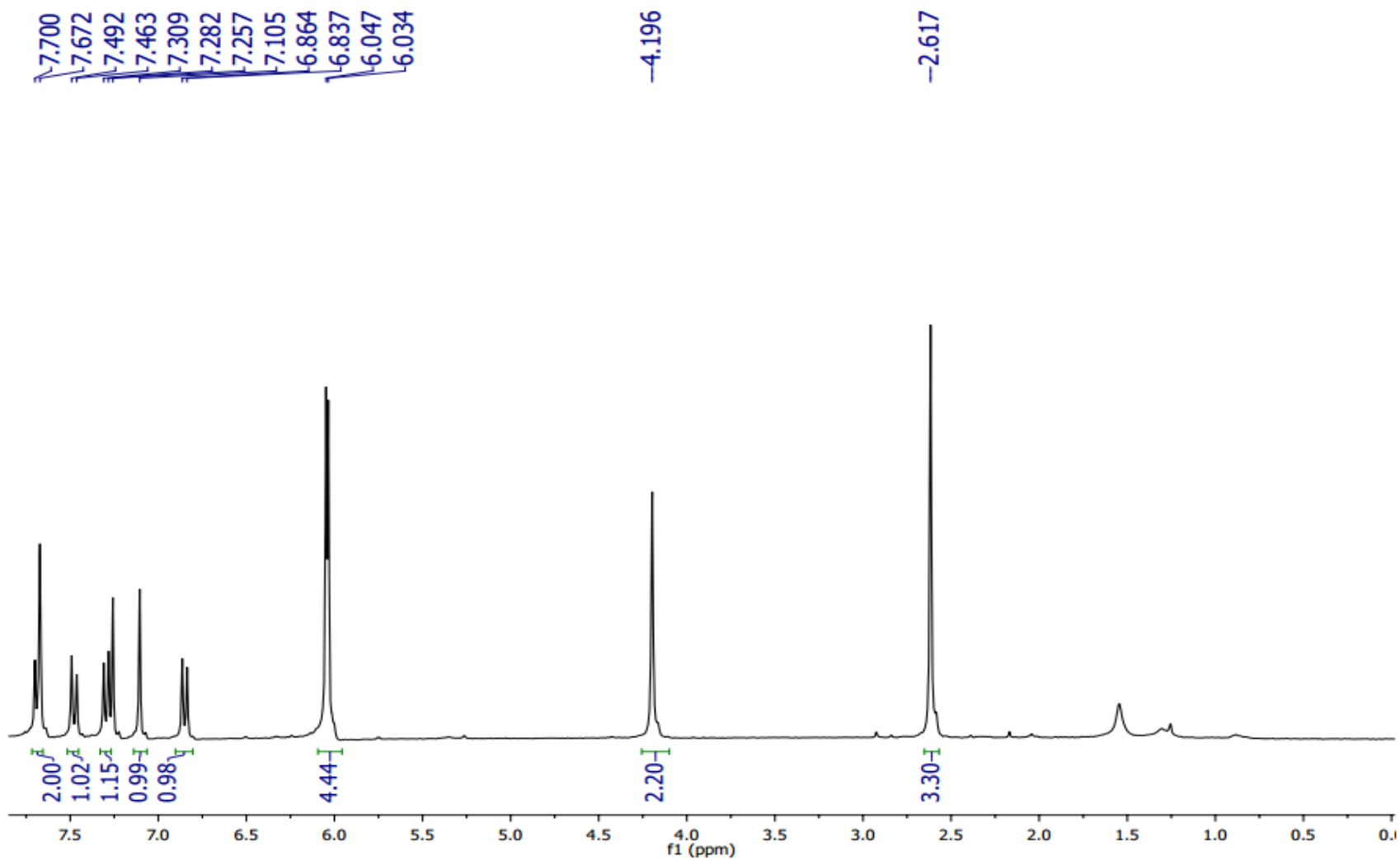
ANEXOS

Parámetros de la cristalografía, recopilación de datos y detalles de refinamiento para el compuesto **3a**

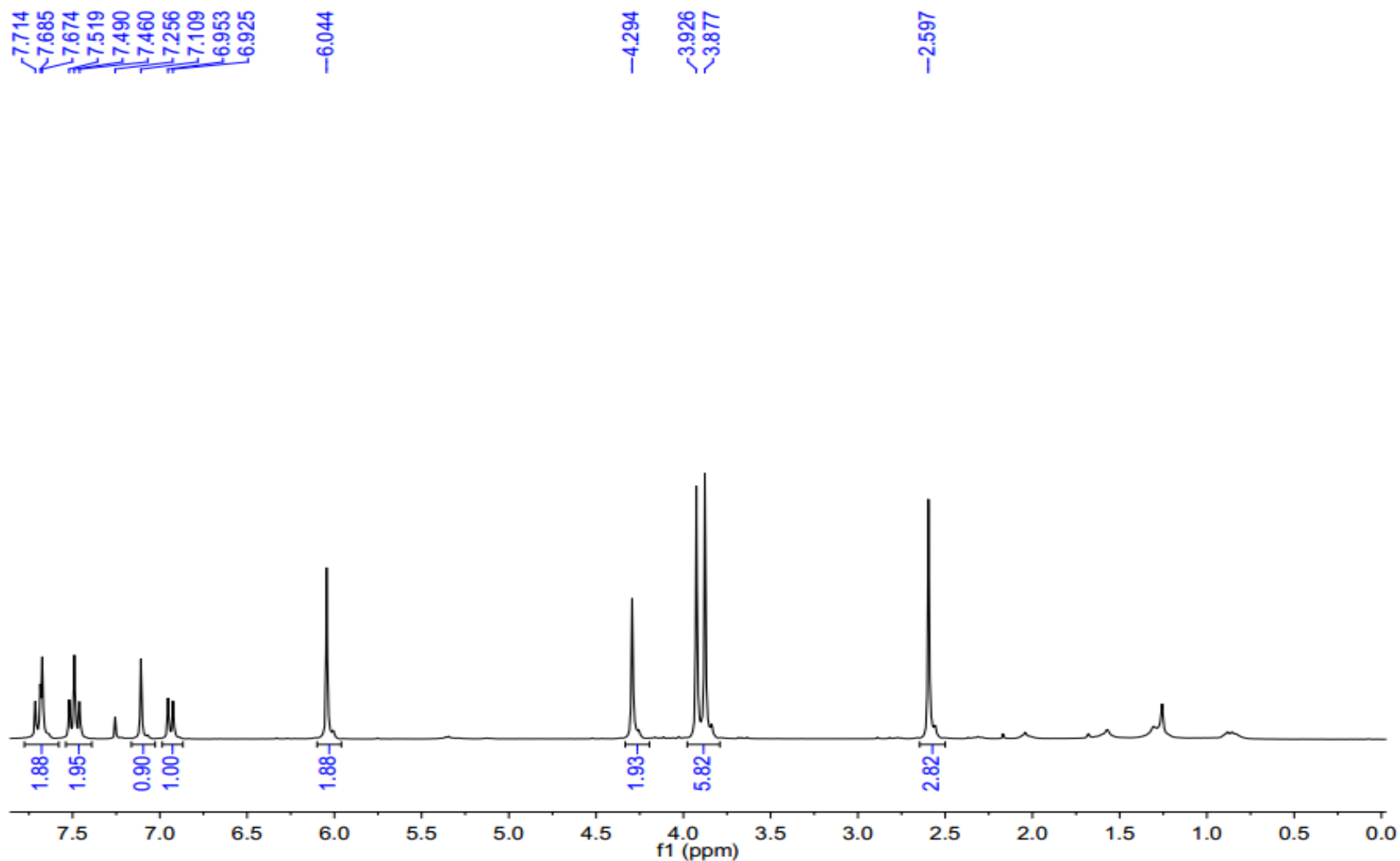
Empirical formula	C ₂₉ H ₂₂ N ₂ O ₄	
Formula weight	462.48	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a = 9.119(3) Å	α = 82.74(2)°.
	b = 9.420(3) Å	β = 89.04(2)°.
	c = 13.471(2) Å	γ = 86.74(2)°.
Volume	1146.0(5) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.340 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.730 mm ⁻¹	
F(000)	484	
Crystal size	0.236 x 0.210 x 0.066 mm ³	
Theta range for data collection	3.307 to 68.391°.	
Index ranges	-10 ≤ h ≤ 10, -11 ≤ k ≤ 9, -16 ≤ l ≤ 16	
Reflections collected	11868	
Independent reflections	4155 [R(int) = 0.1323]	
Completeness to theta = 67.679°	99.1 %	
Absorption correction	Analytical	
Max. and min. transmission	0.9771 and 0.8931	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	4155 / 358 / 401	
Goodness-of-fit on F ²	1.101	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0829, wR2 = 0.1887	
R indices (all data)	R1 = 0.1428, wR2 = 0.2298	
Largest diff. peak and hole	0.260 and -0.227 e.Å ⁻³	



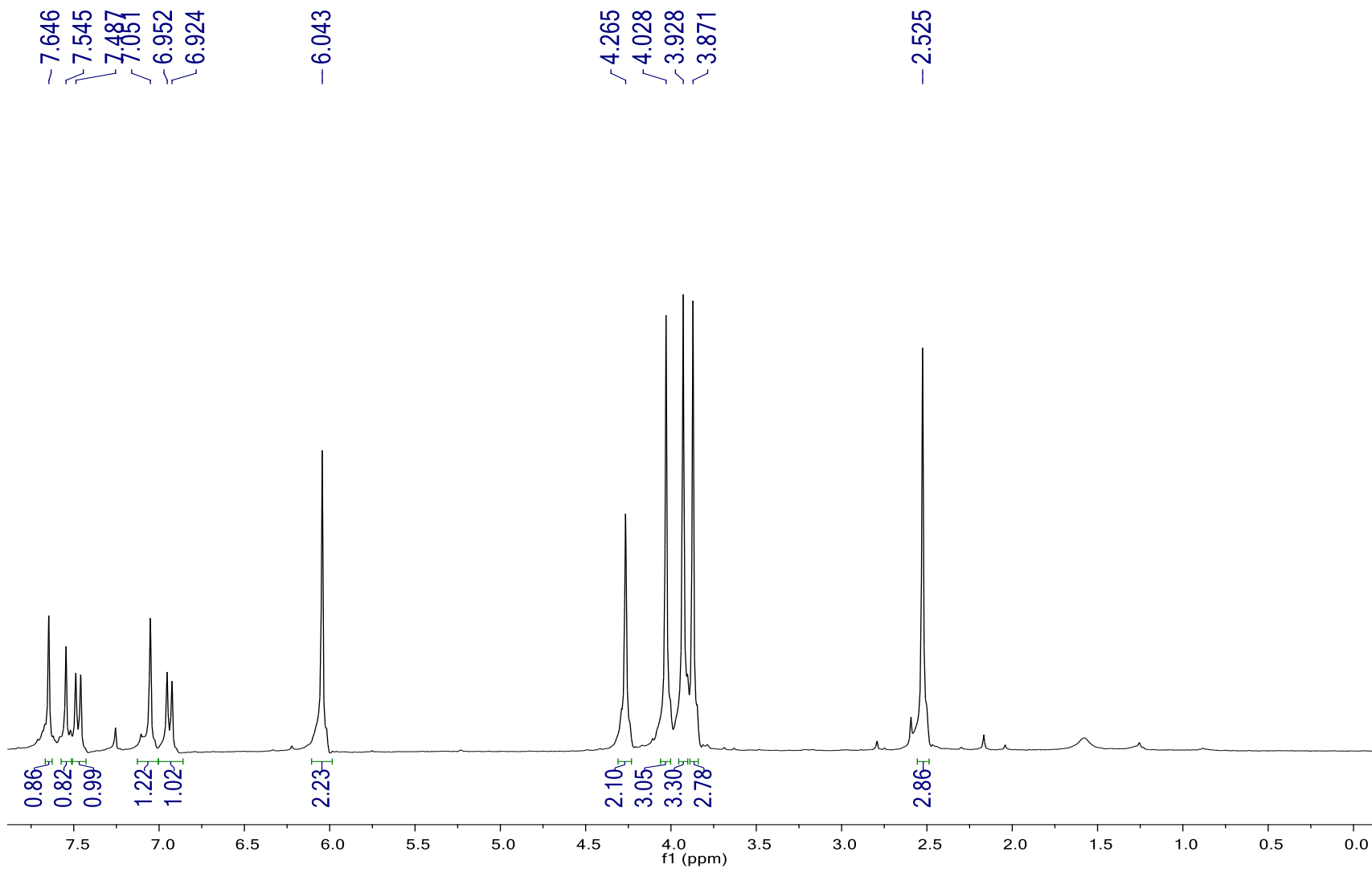
Vista ORTEP de la estructura de **3b**



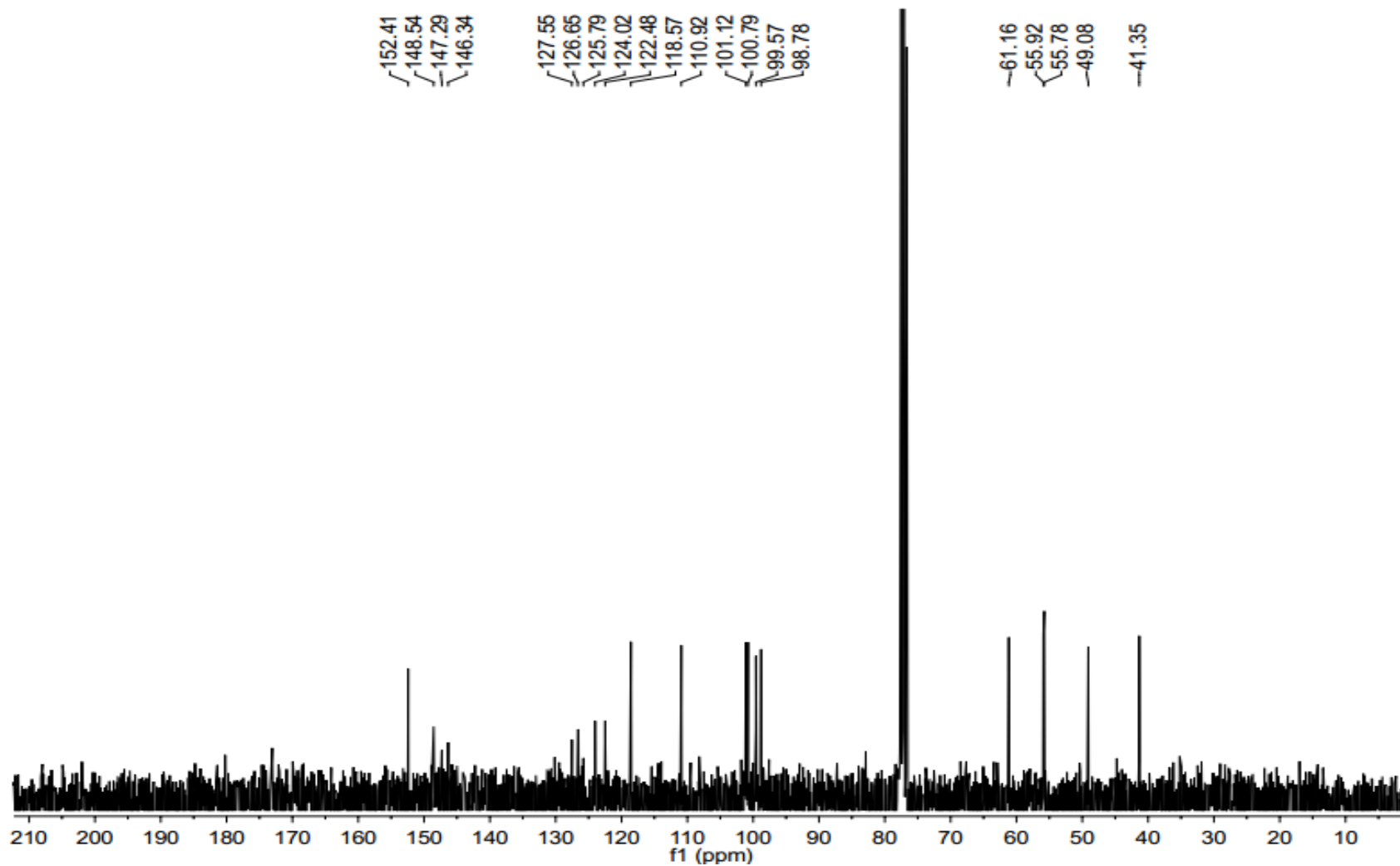
Espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de dihidrosanguinarina (**3**)



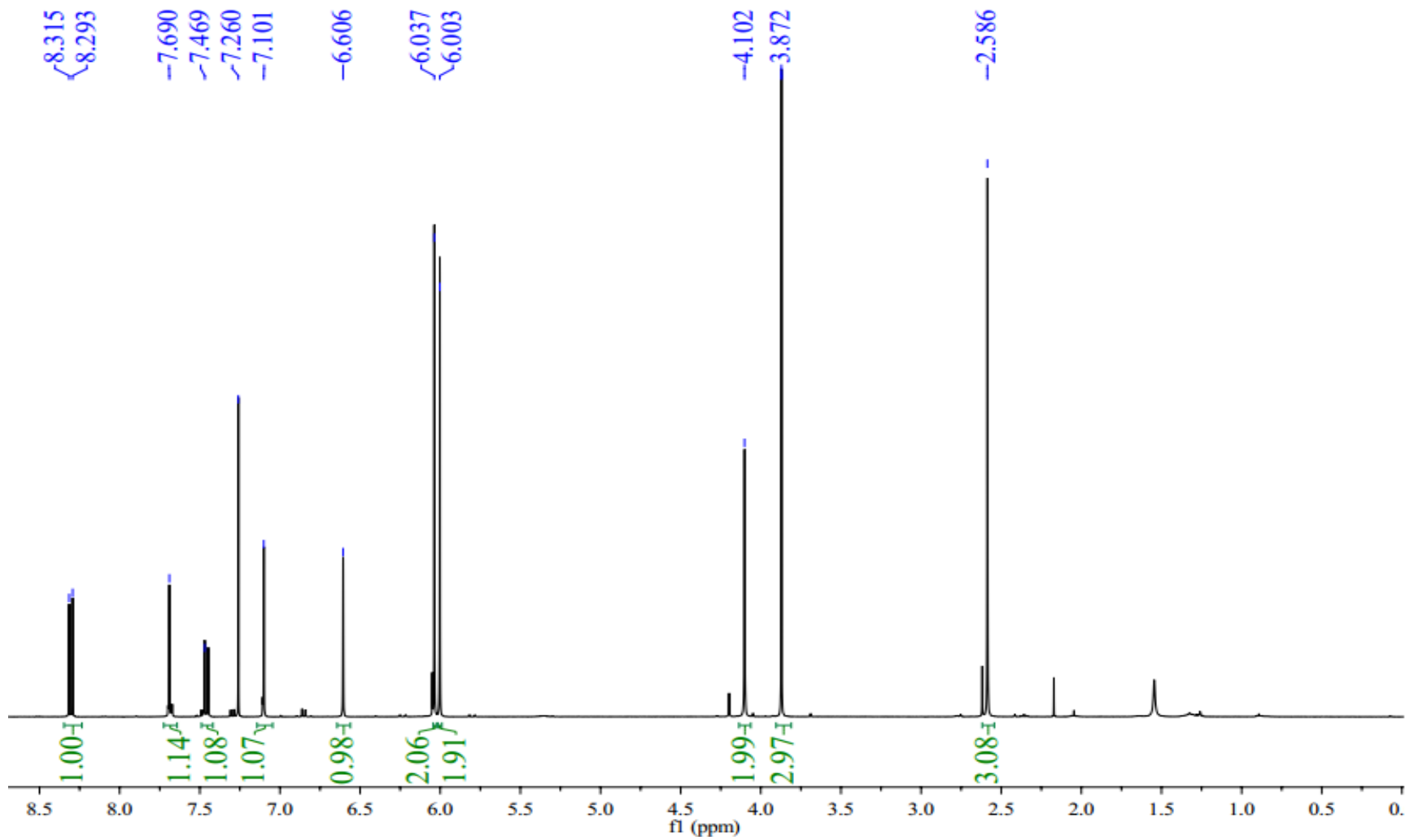
Espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de dihidroqueleritina (4)



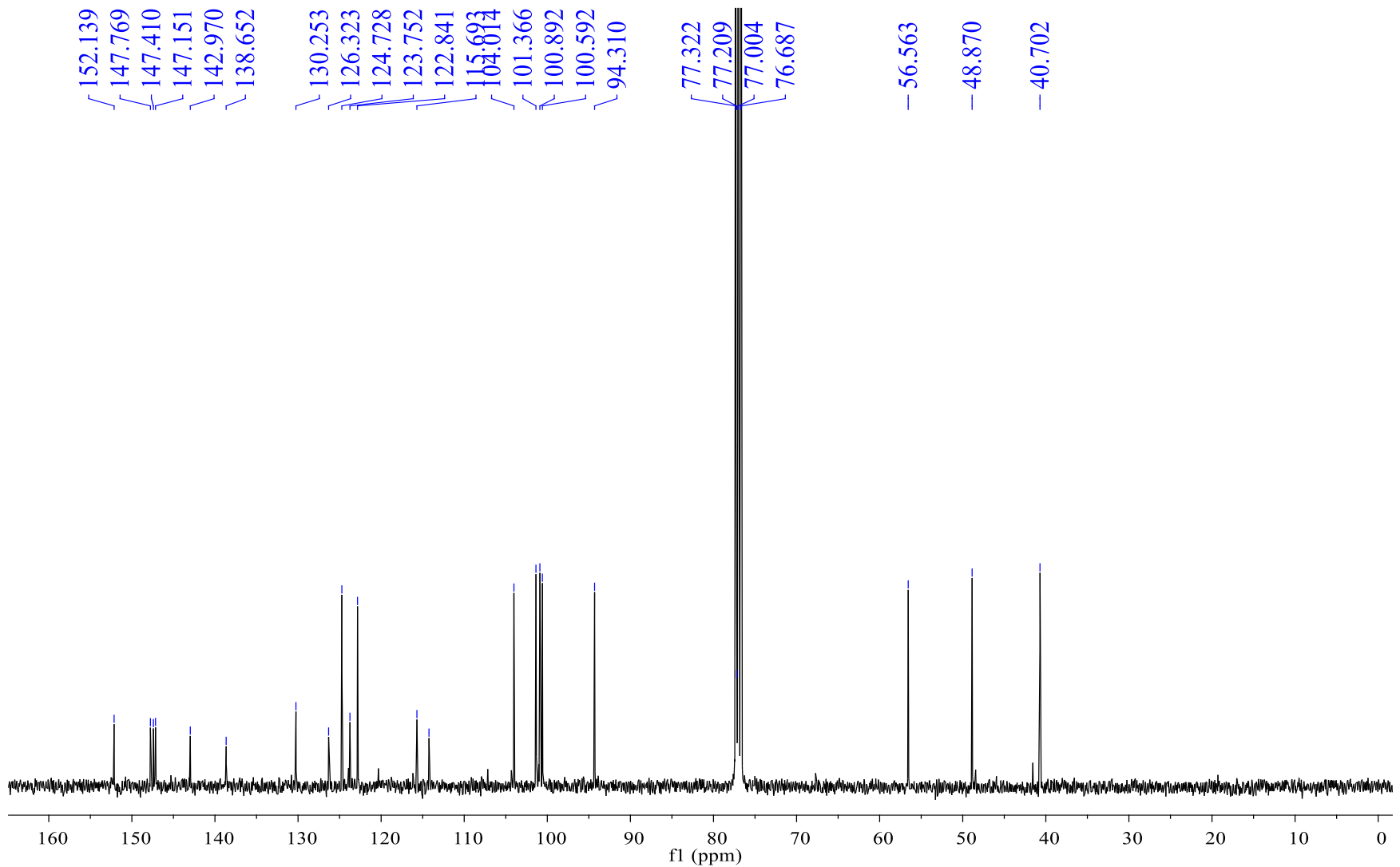
Espectro RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de 12-metoxidihidroqueleritina (5)



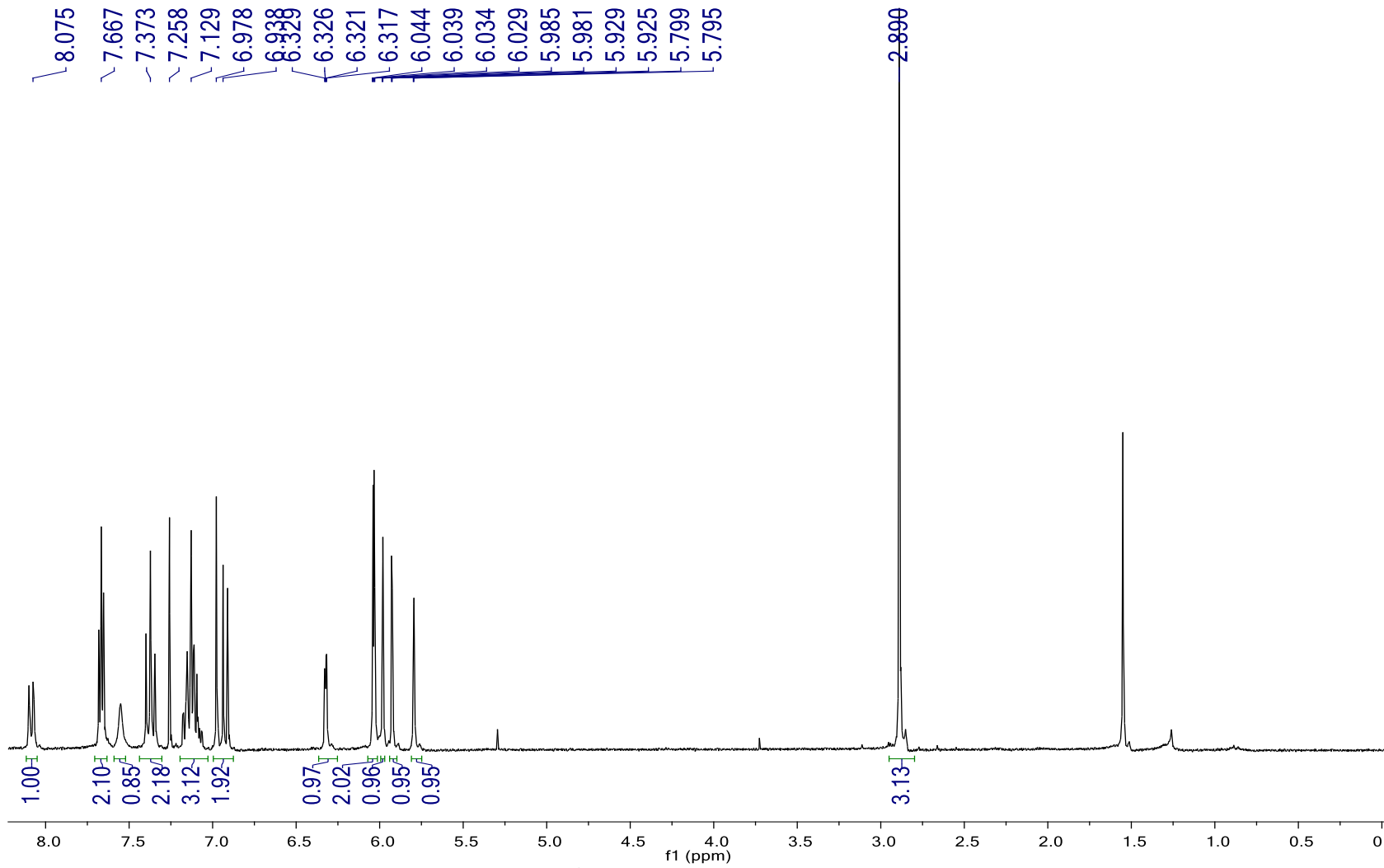
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 12-metoxidihidroqueleritina (**5**)



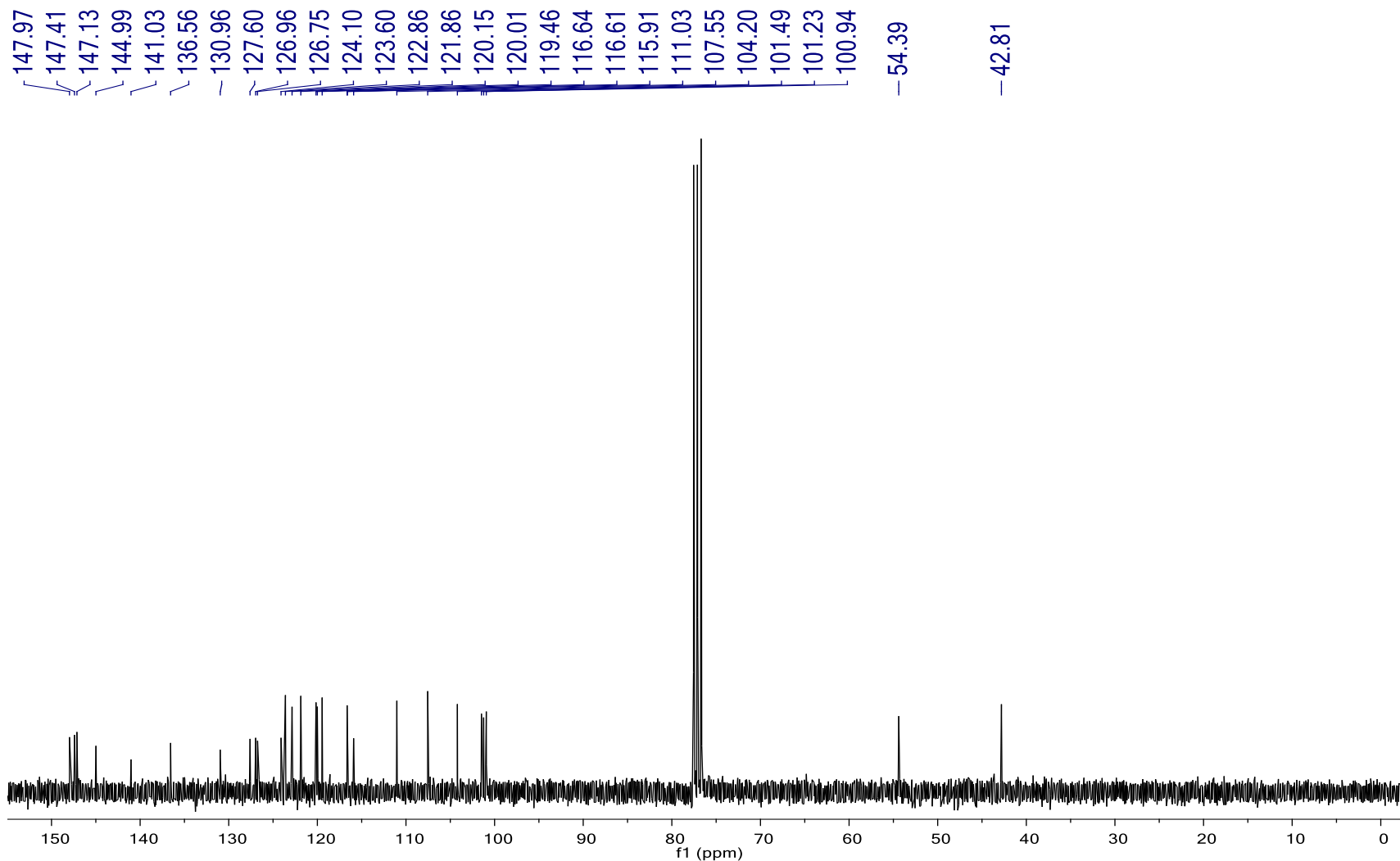
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de dihidroquelinirubina (**6**)



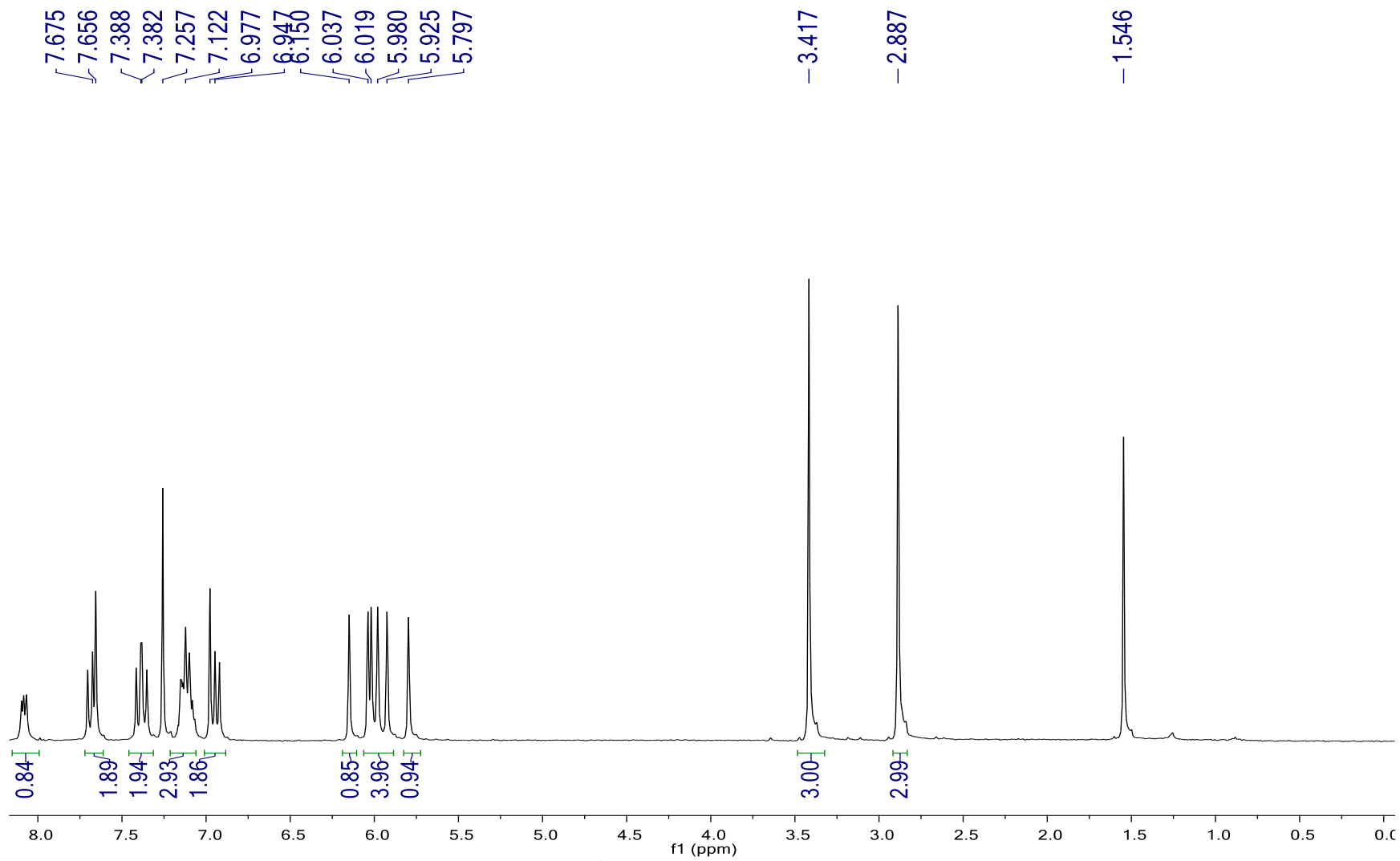
Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de dihidroquelinirubina (6)



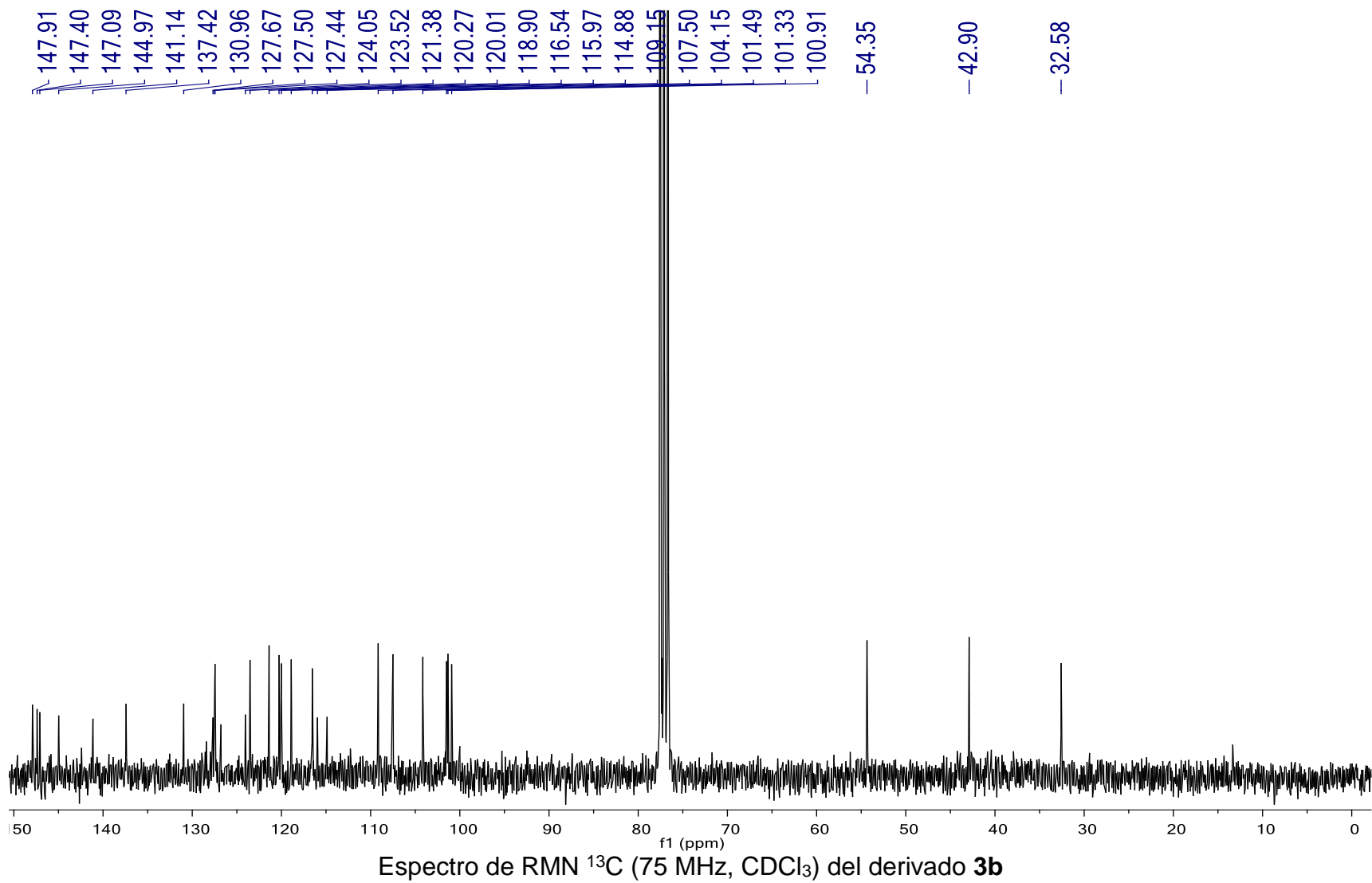
Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto **3a**

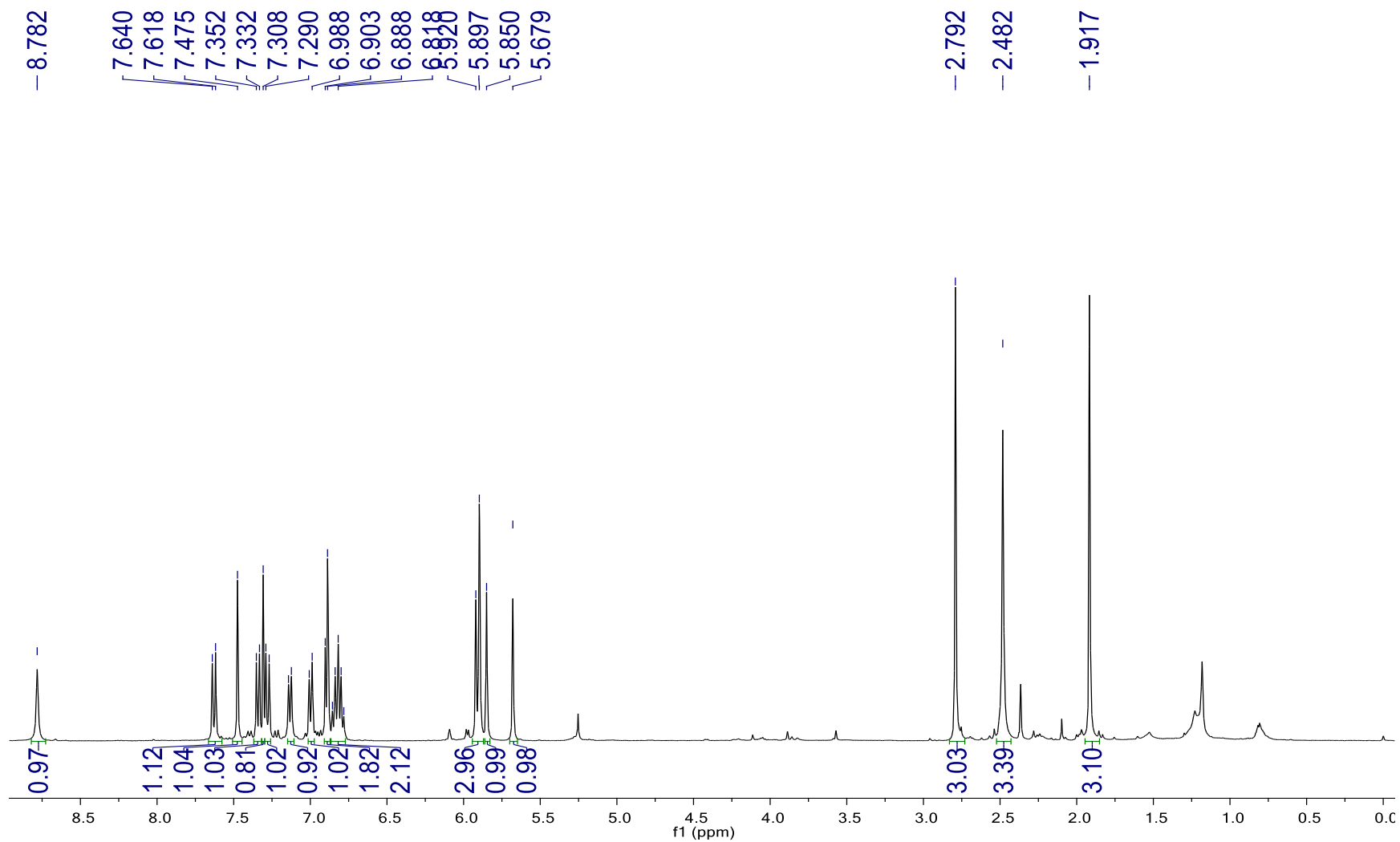


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3a**

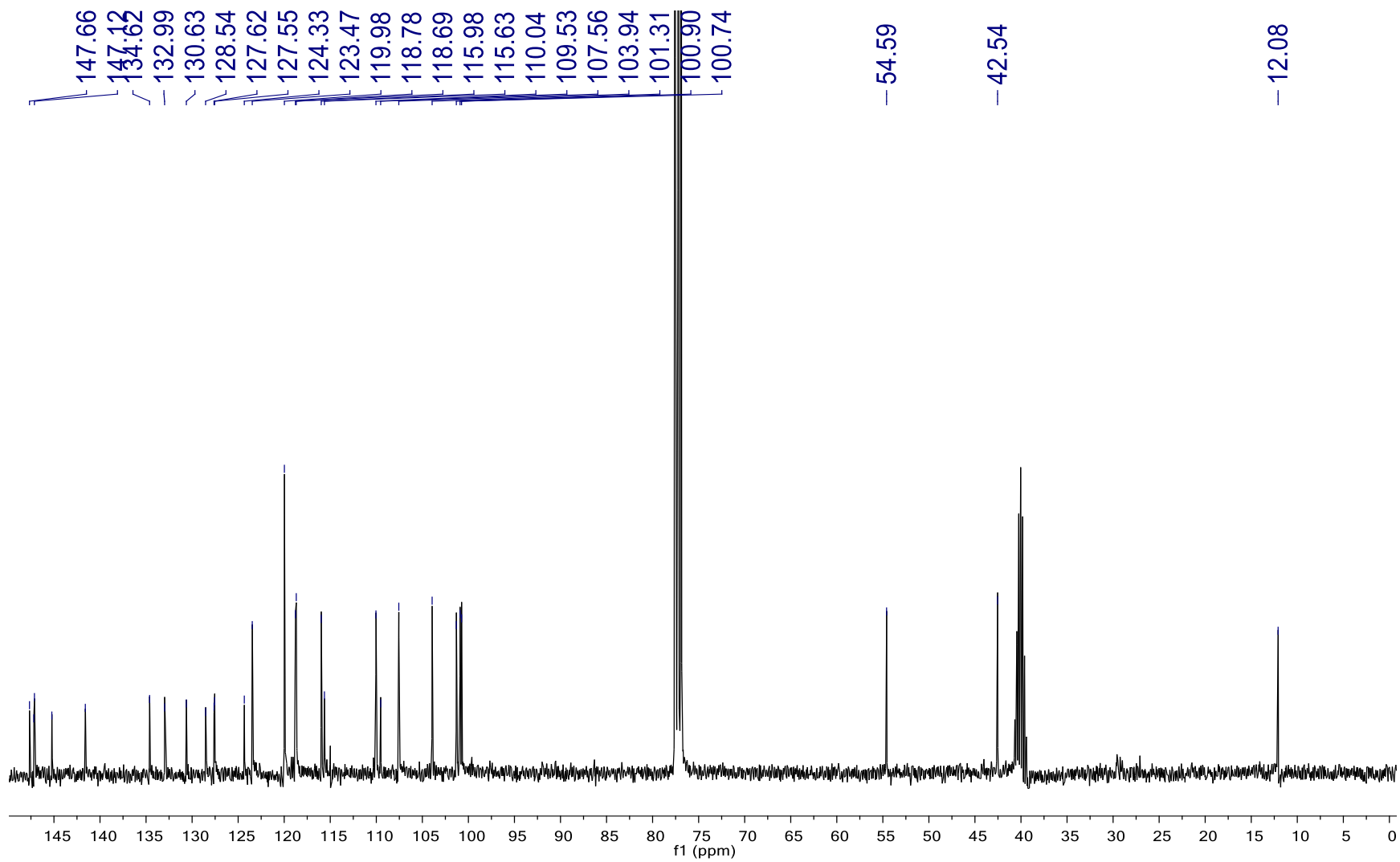


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del derivado **3b**

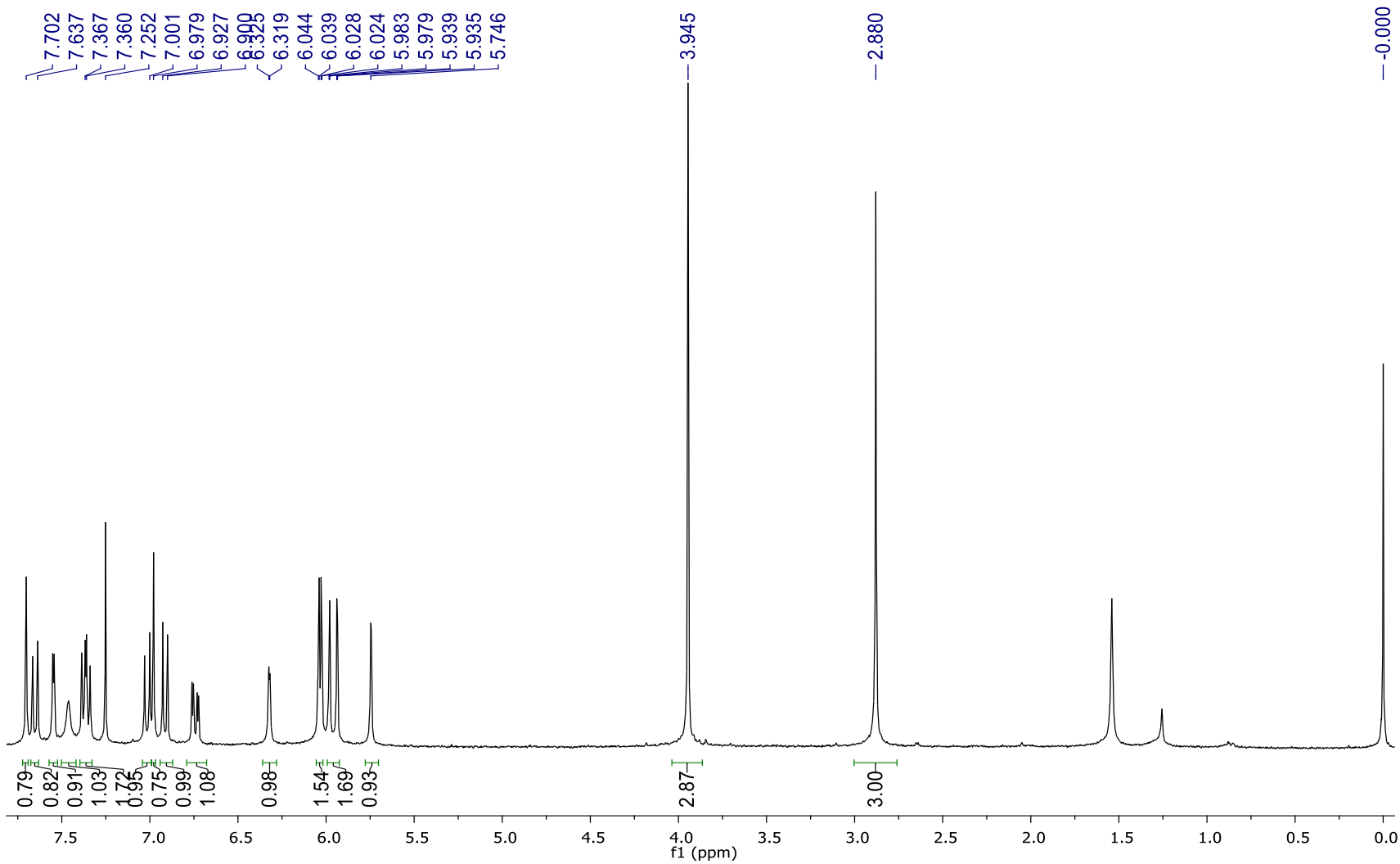




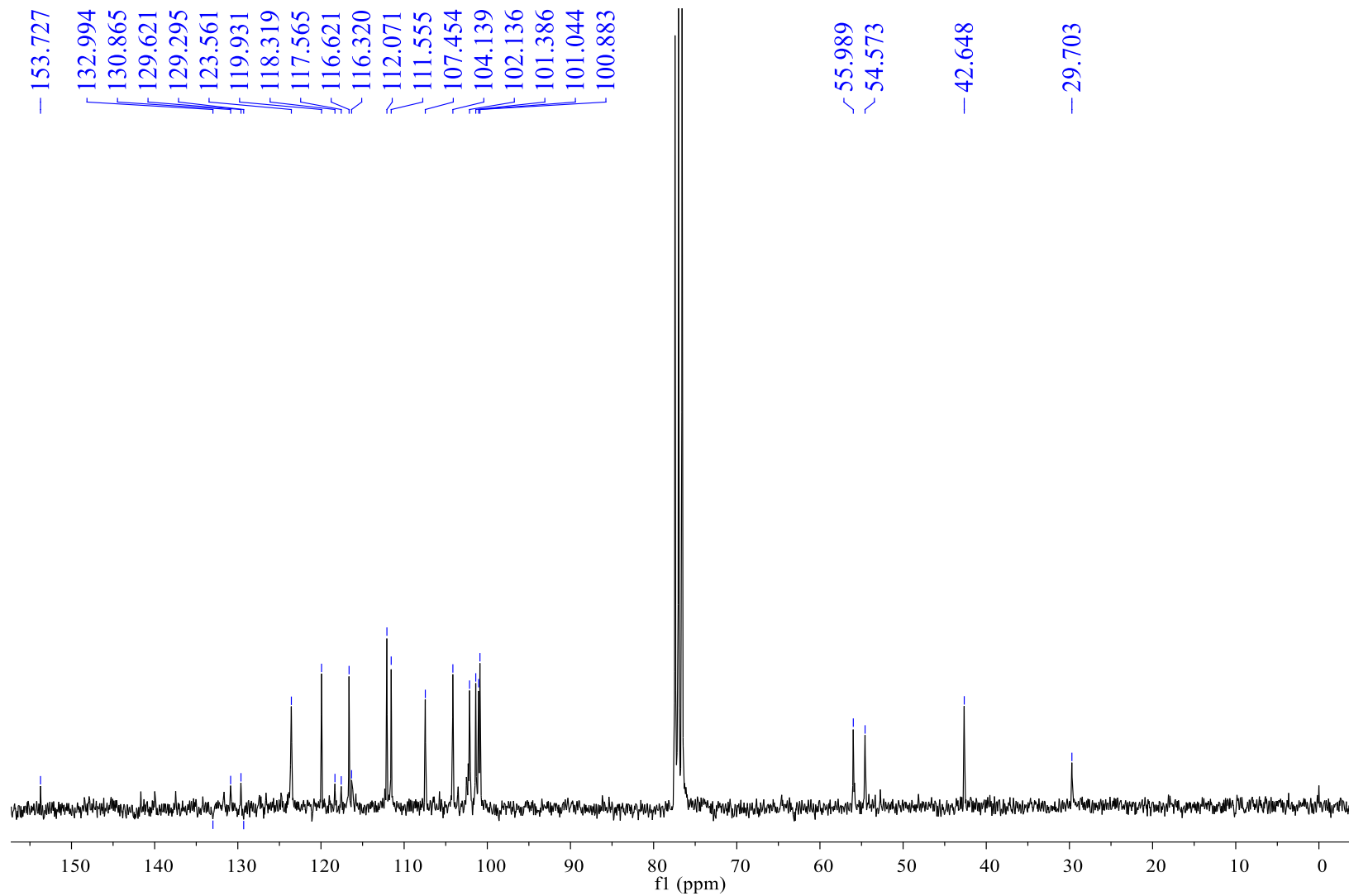
Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del derivado **3c**



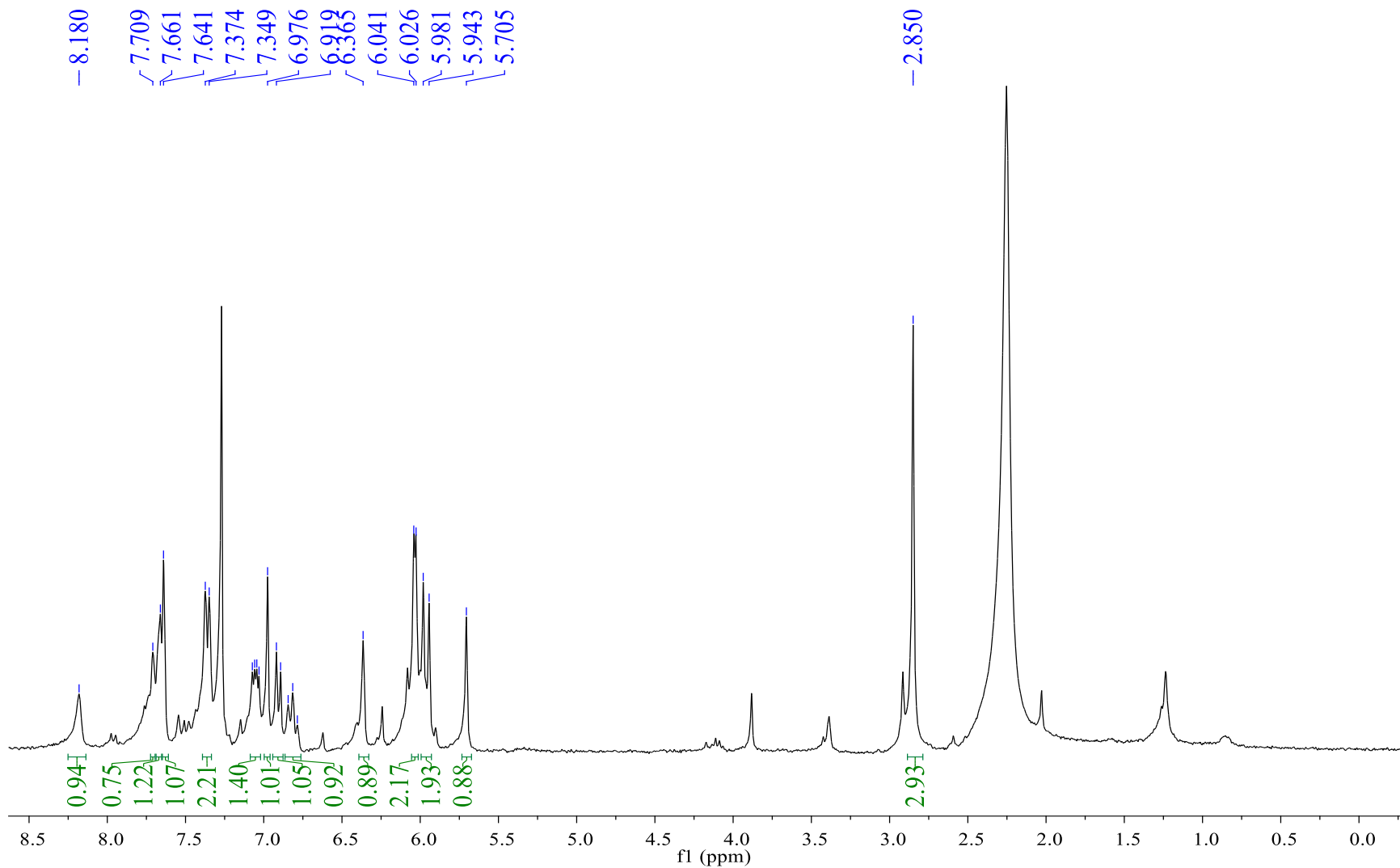
Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del derivado 3c



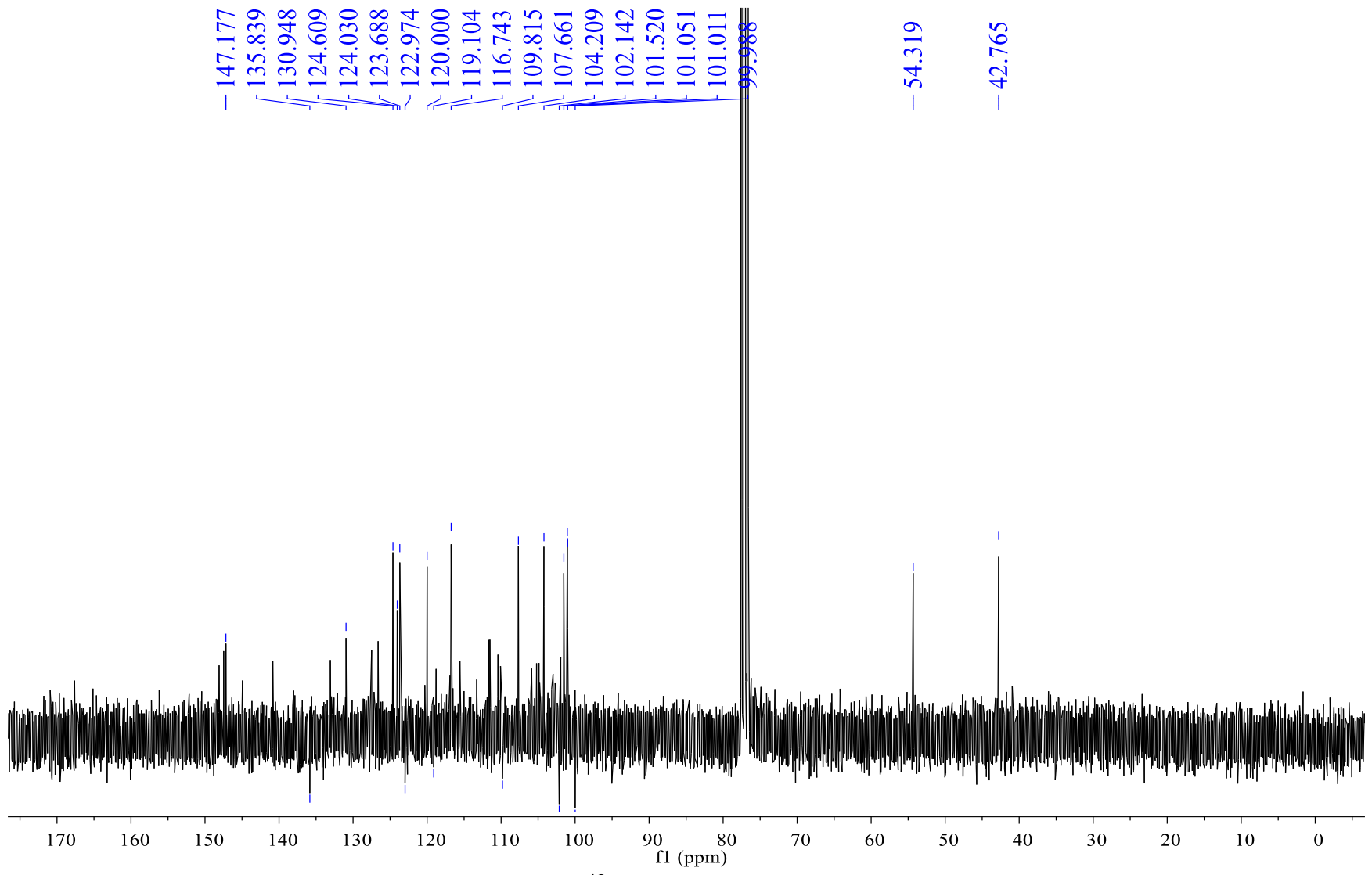
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **3e**



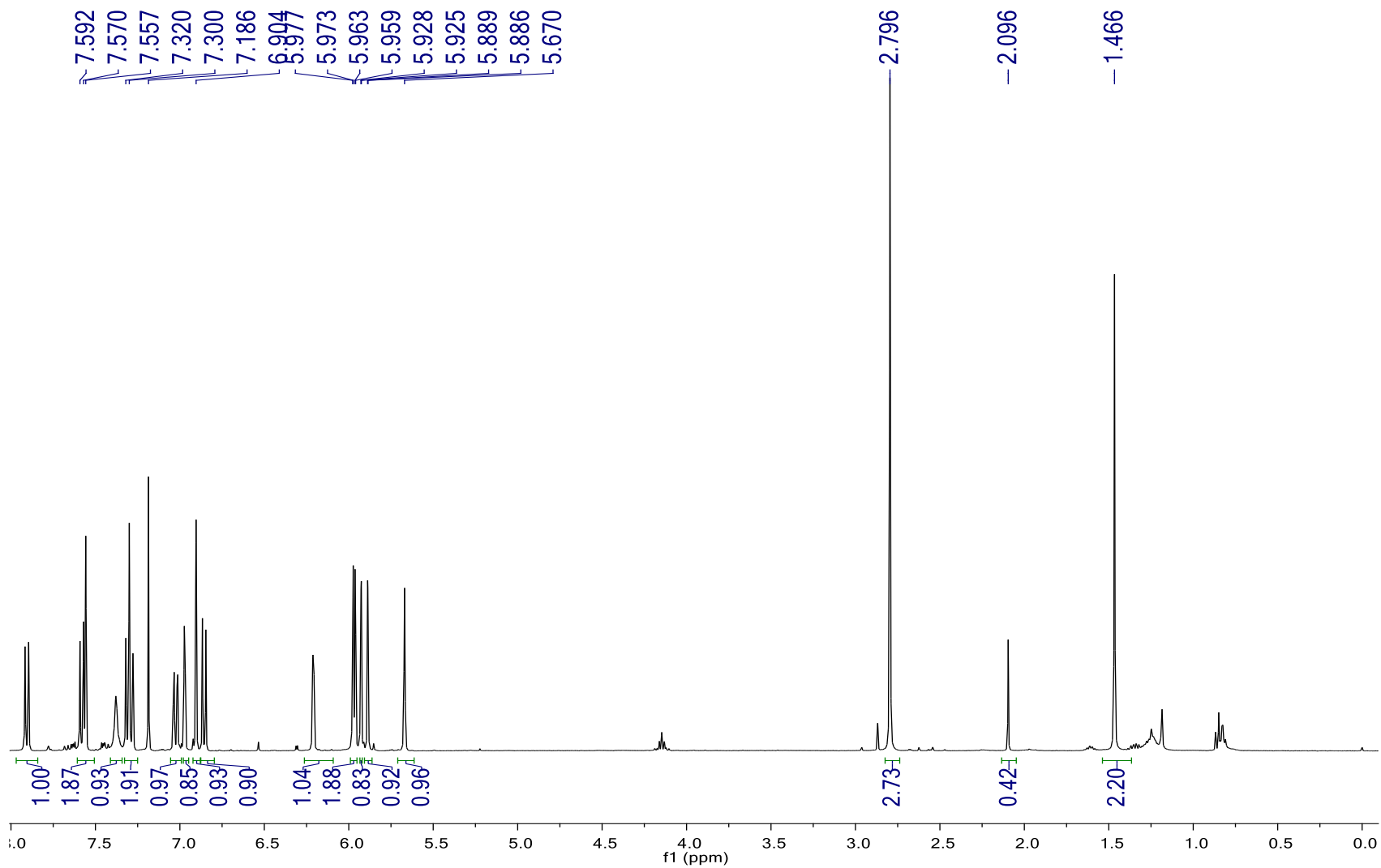
Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del derivado **3e**



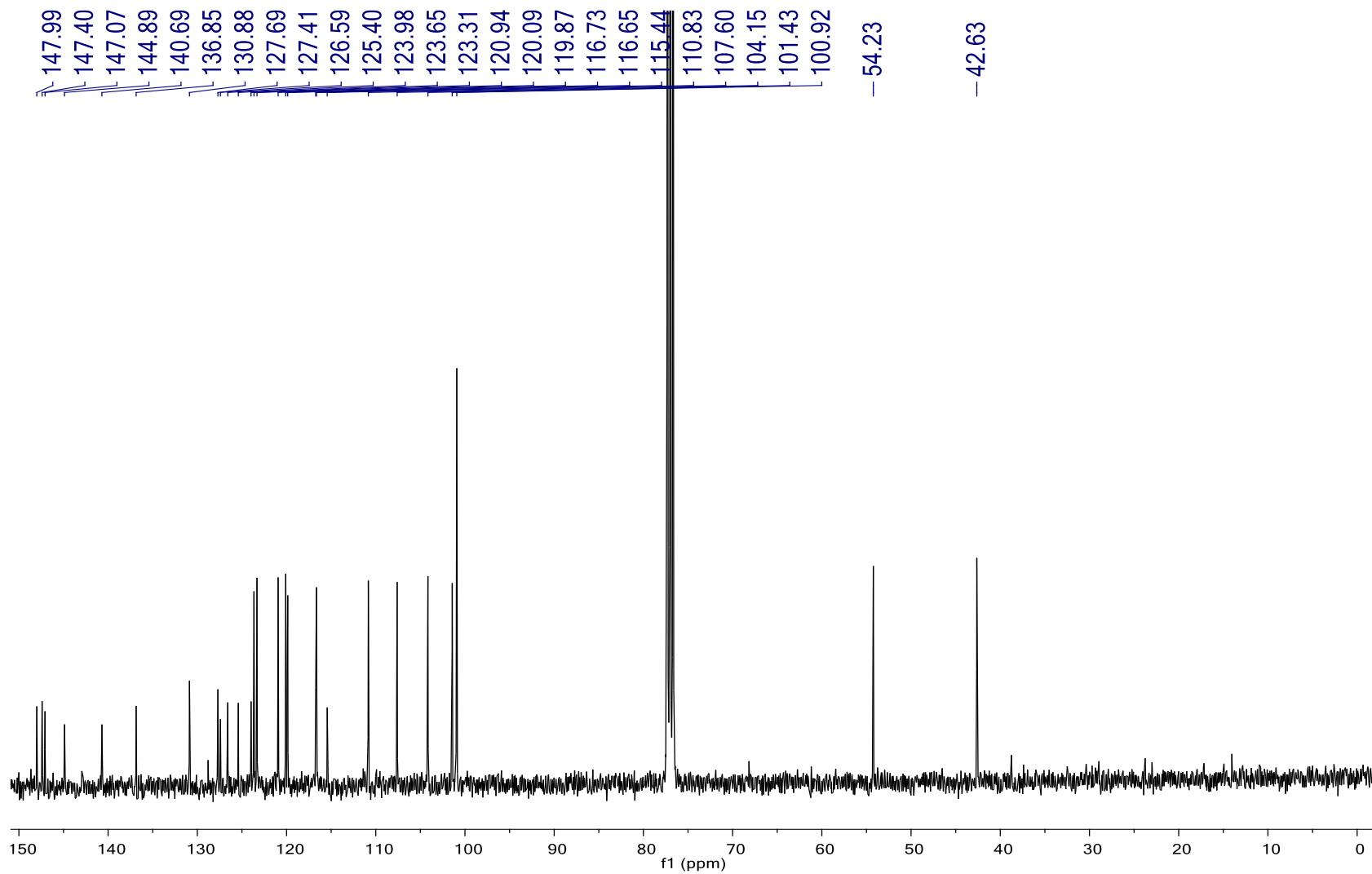
Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de **3f**



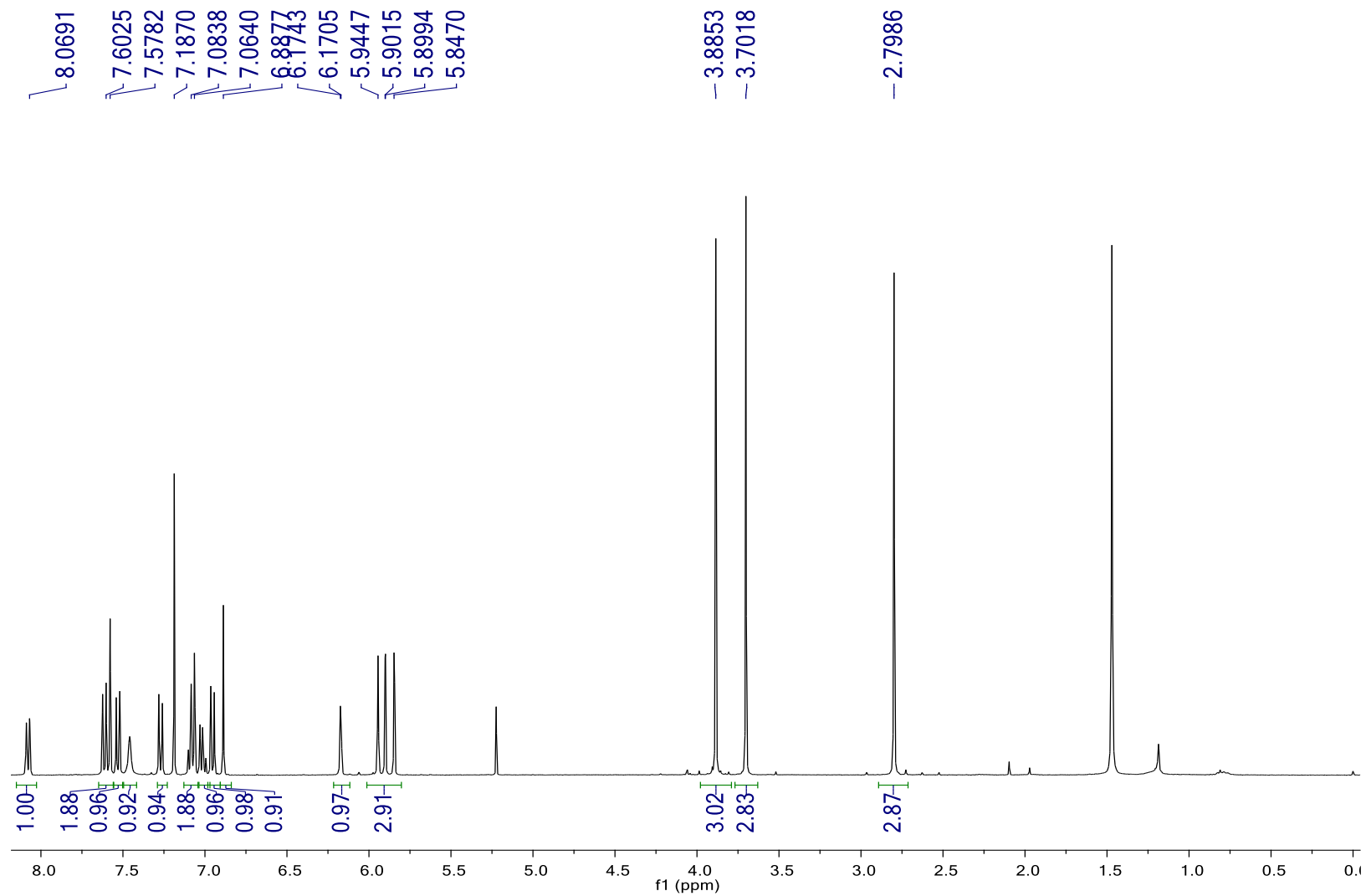
Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del derivado **3f**



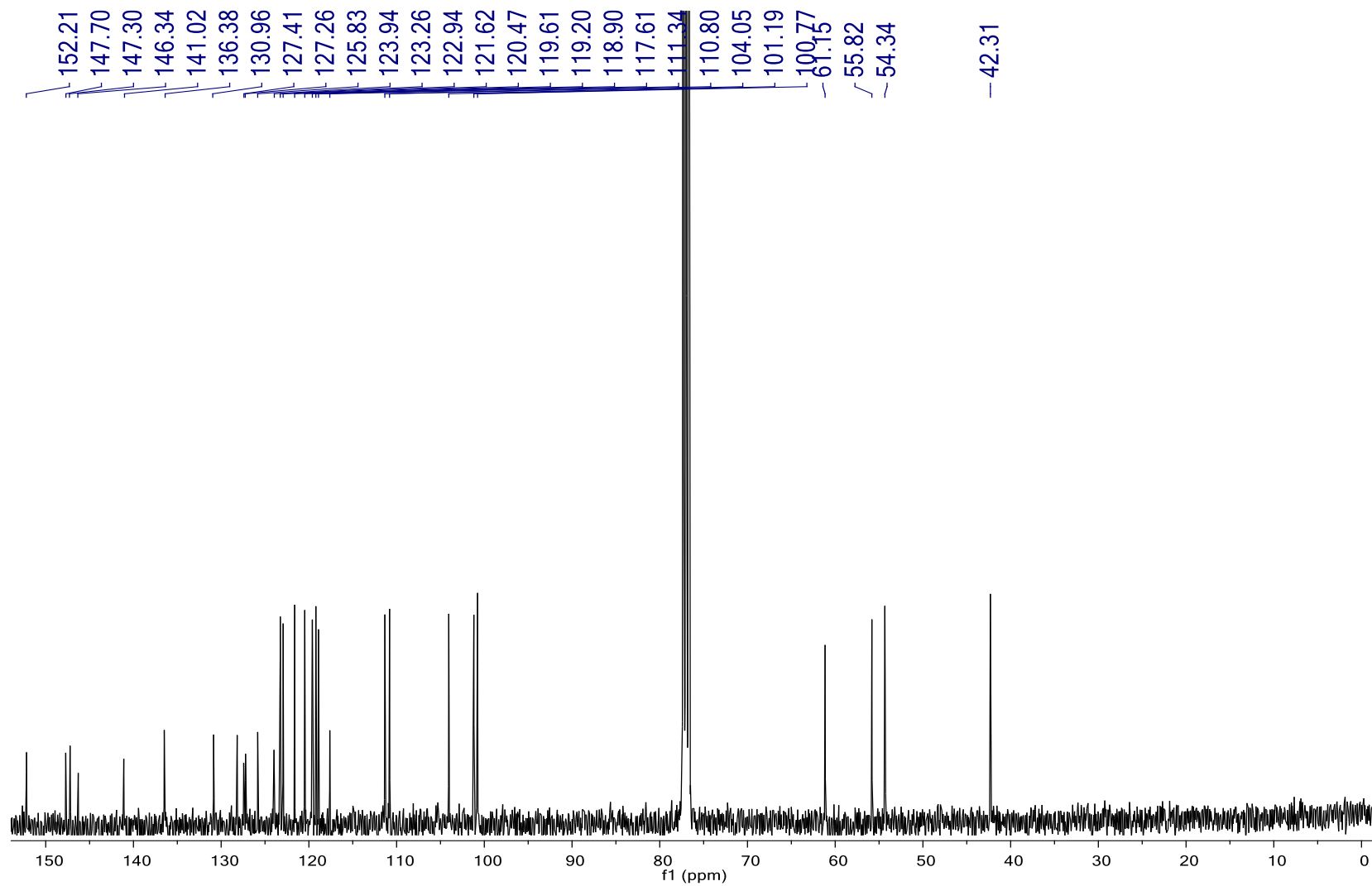
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **3g**



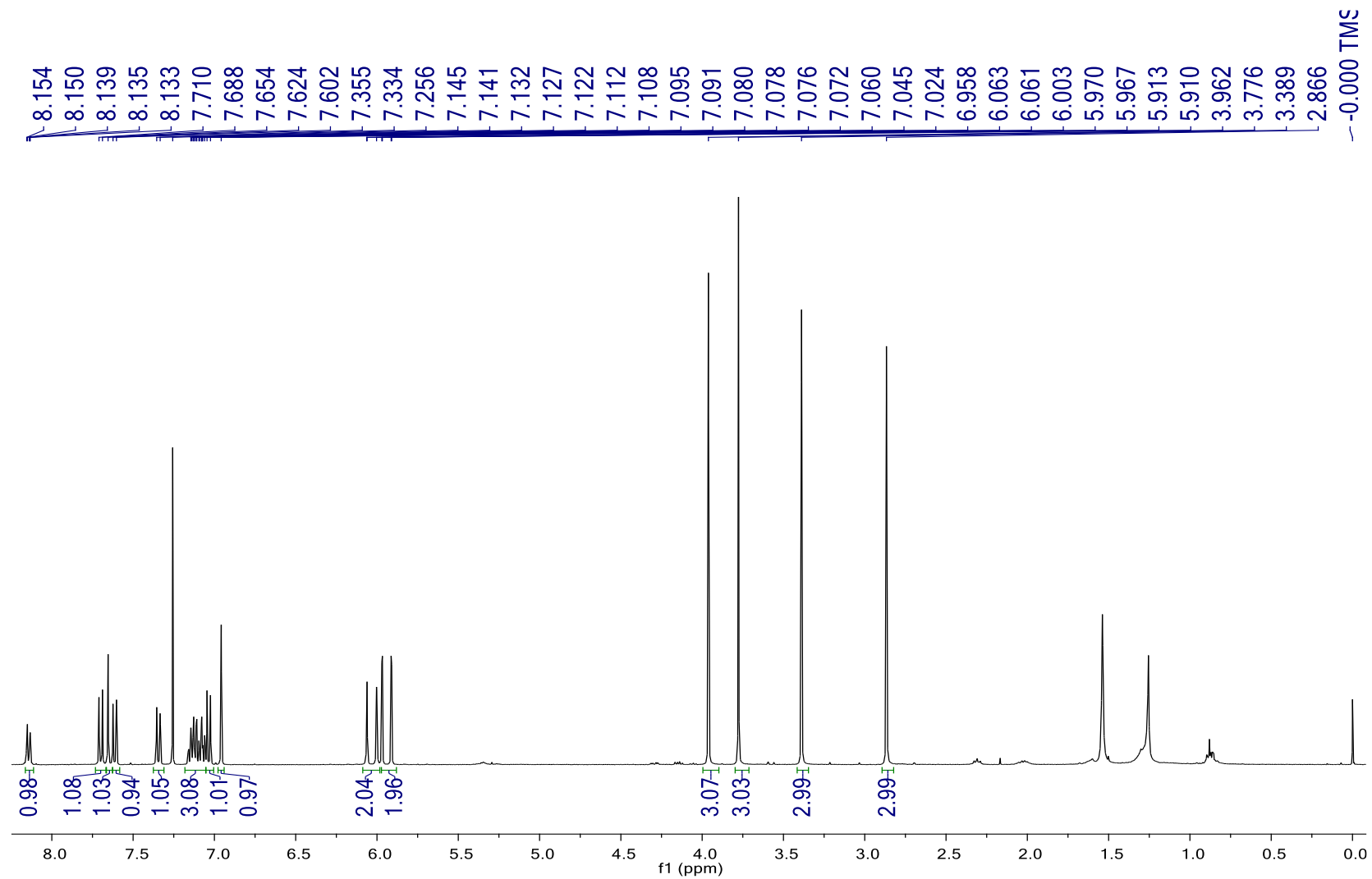
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del derivado **3g**



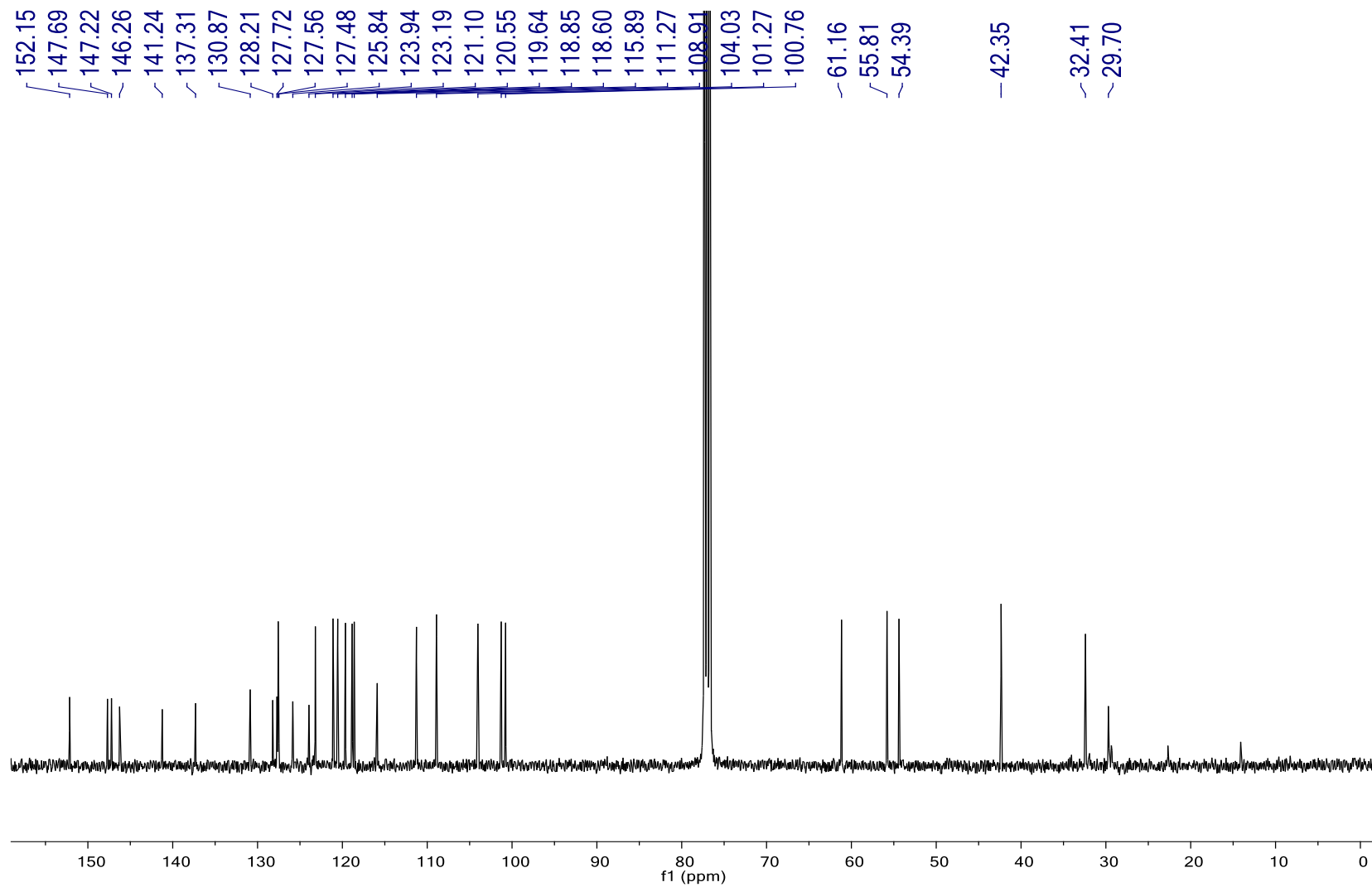
Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **4a**



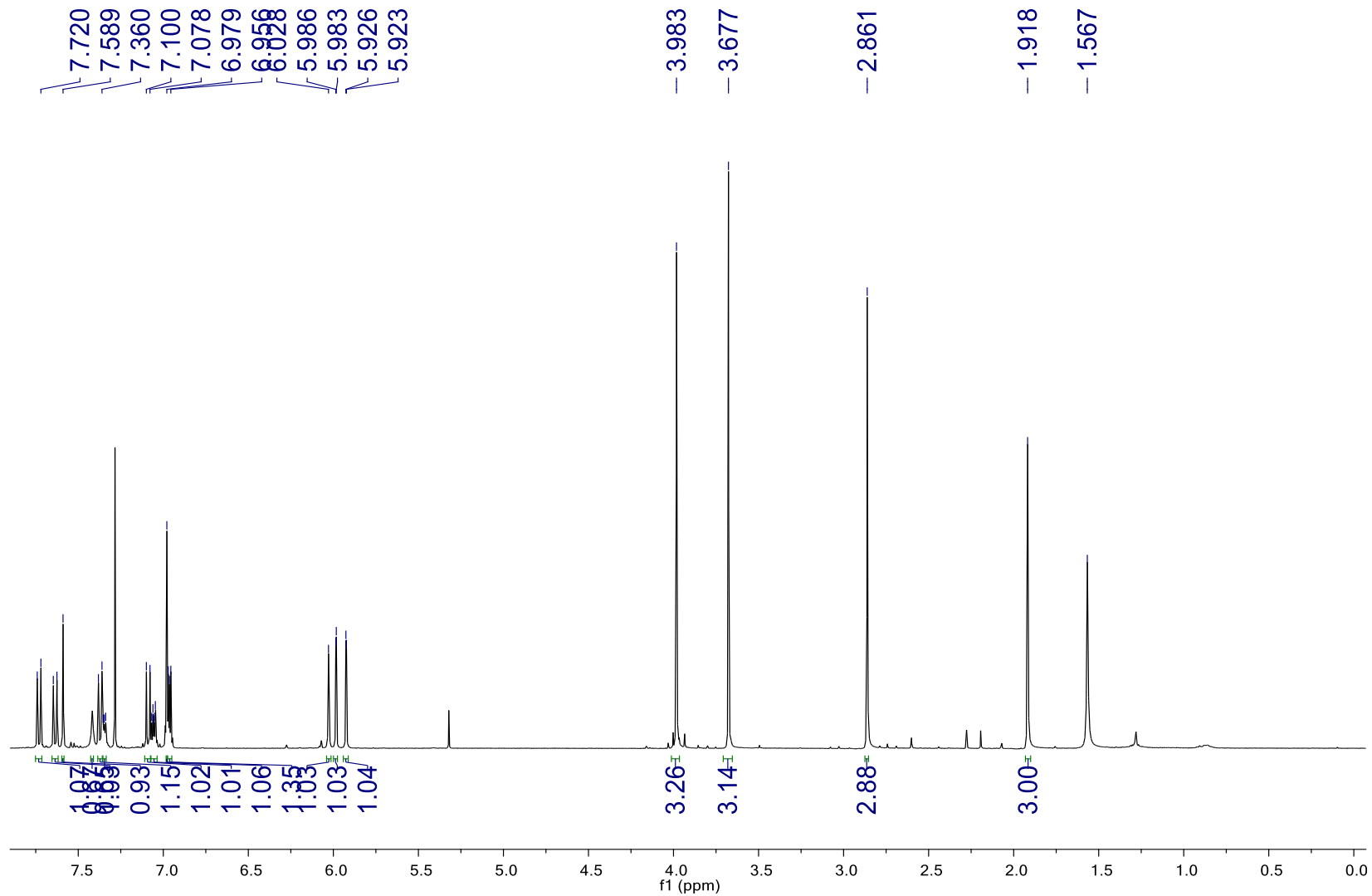
Espectro RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **4a**



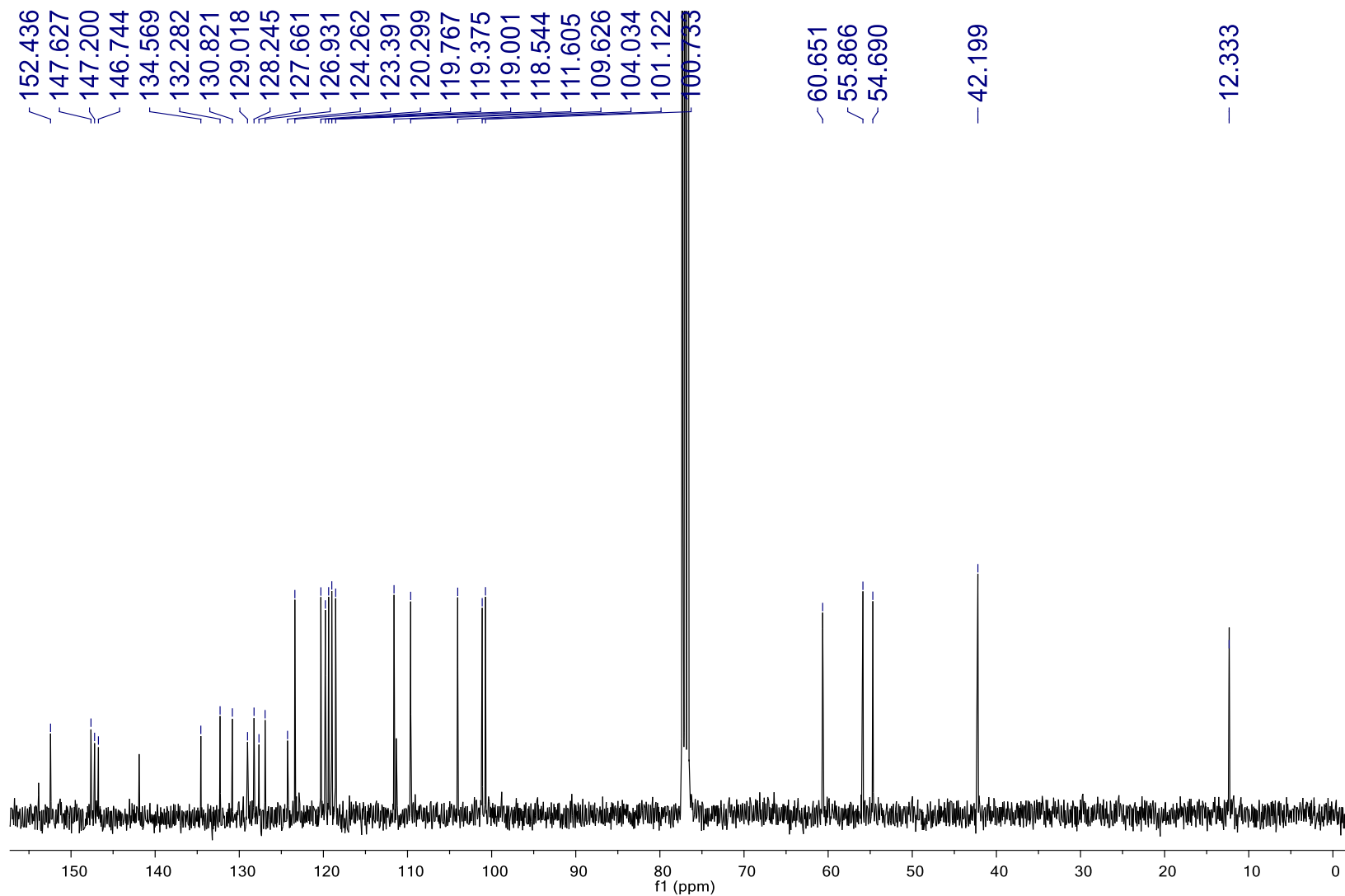
Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **4b**



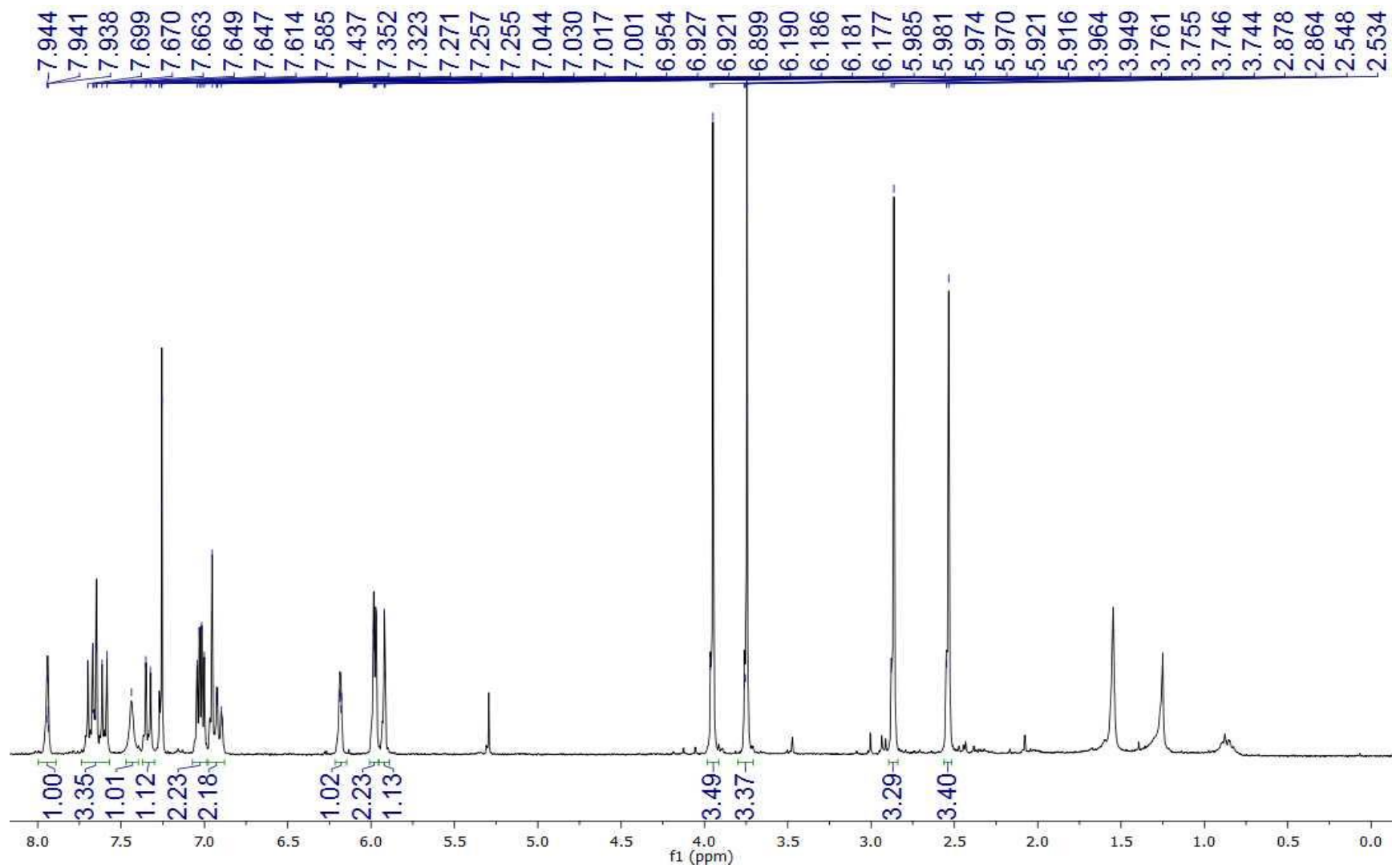
Espectro RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) de **4b**



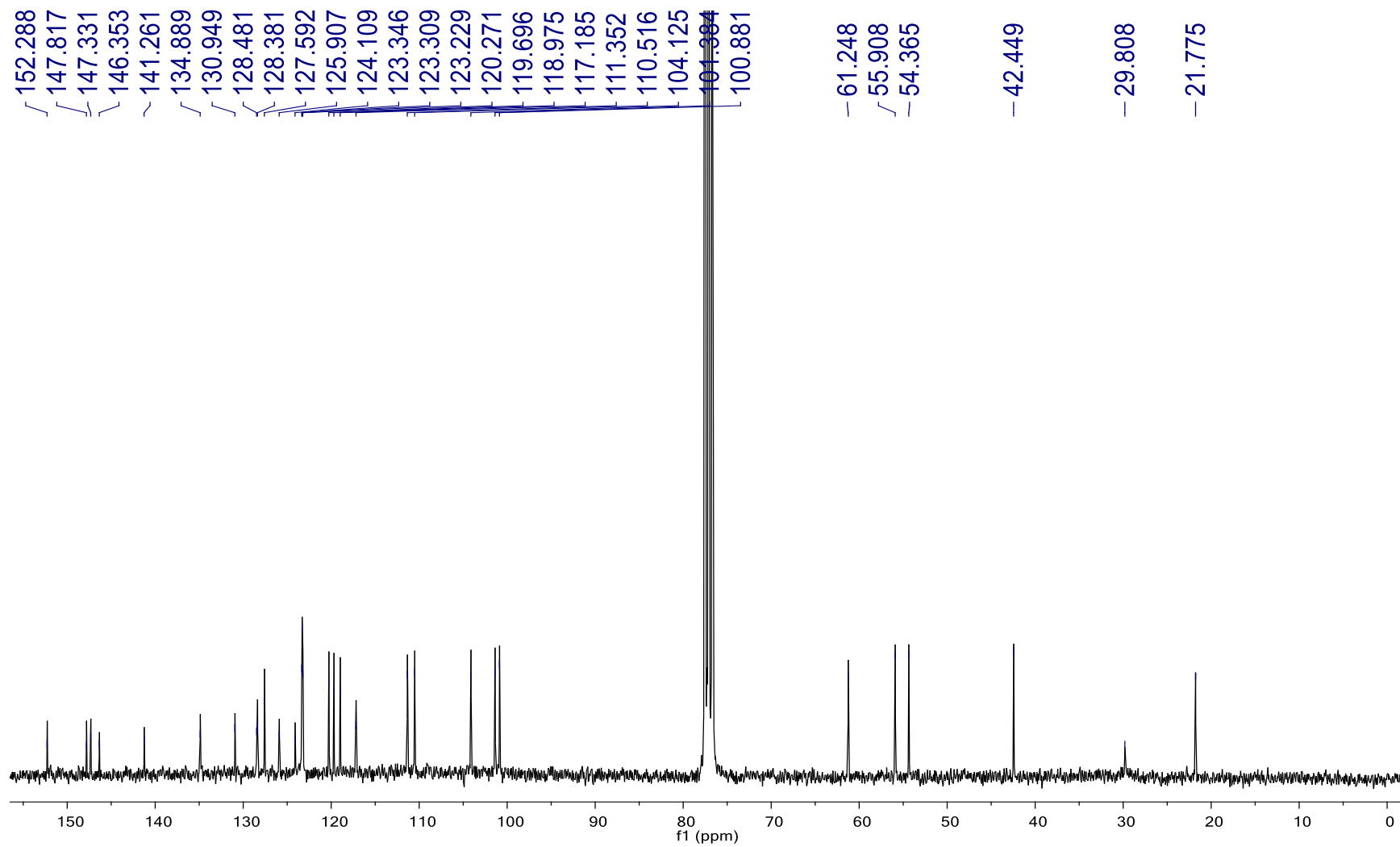
Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de **4c**



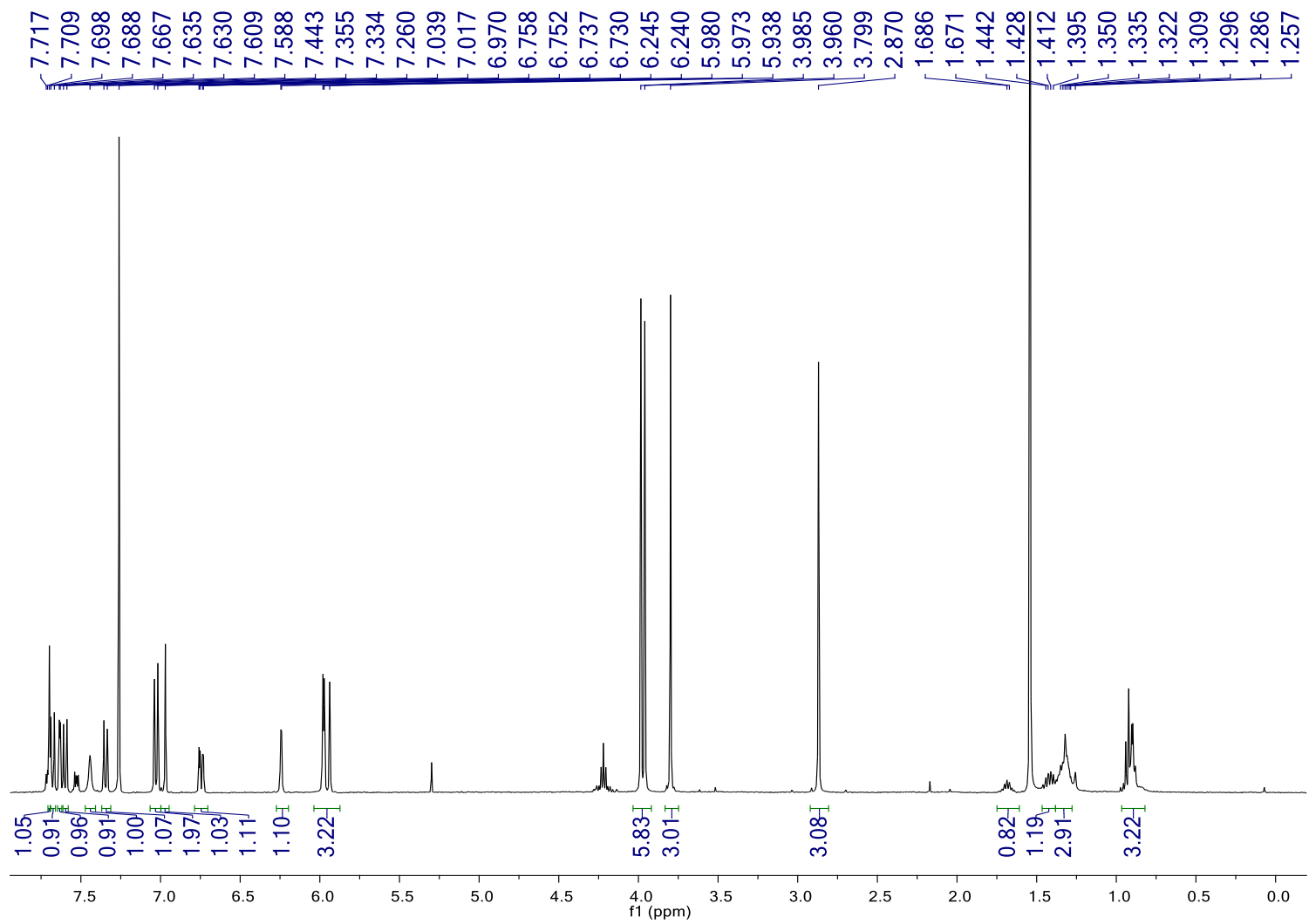
Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **4c**



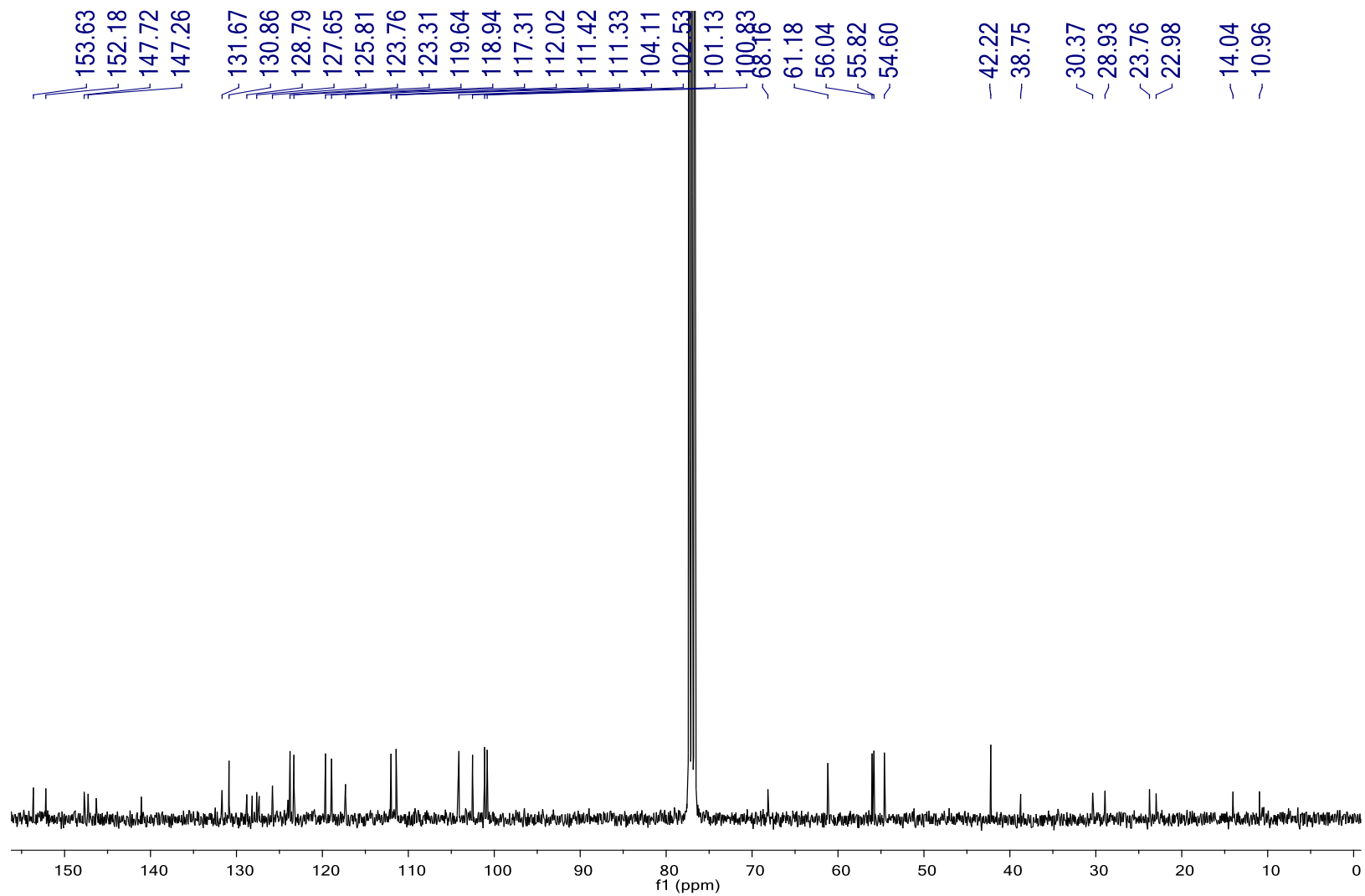
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **4d**



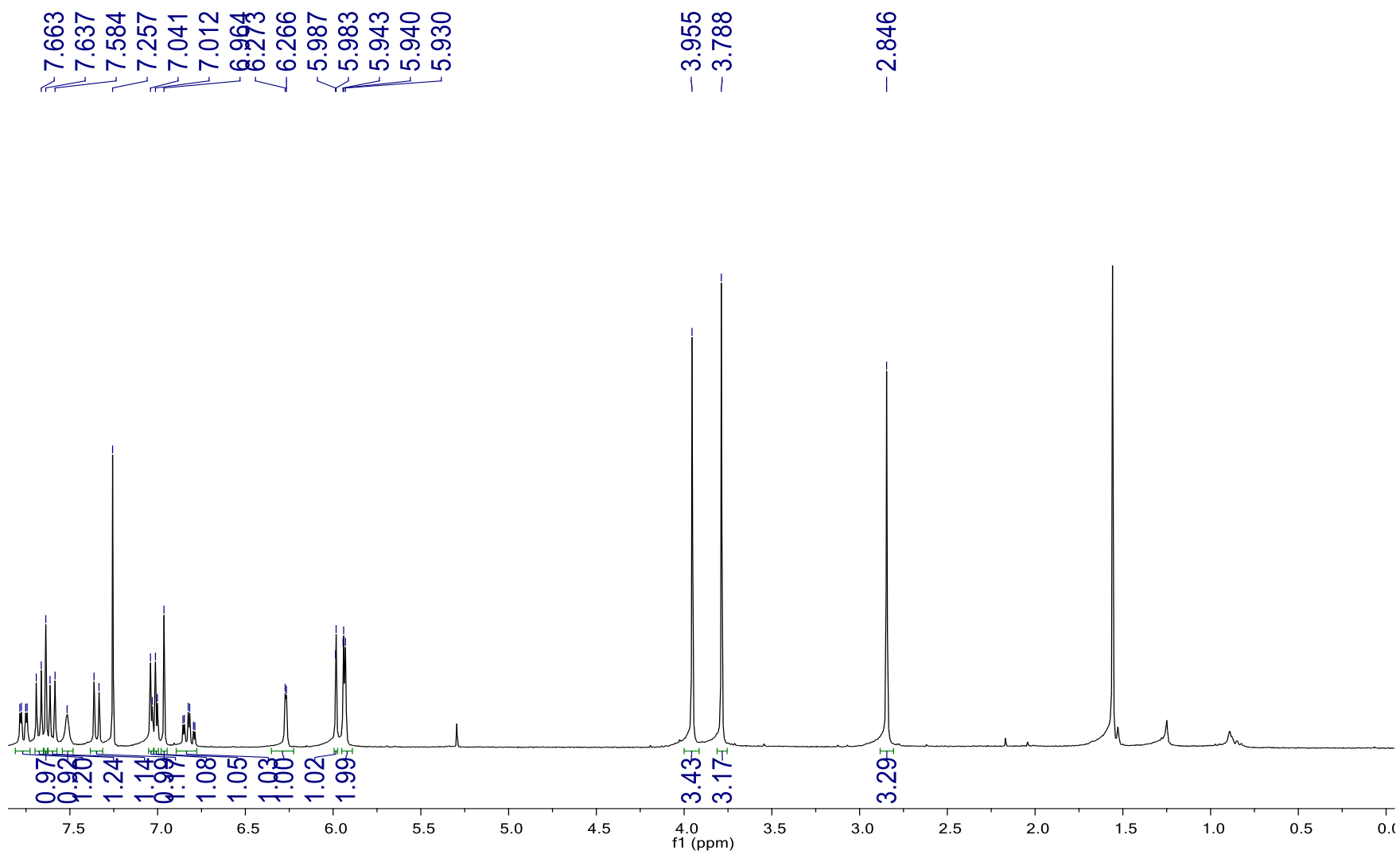
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **4d**



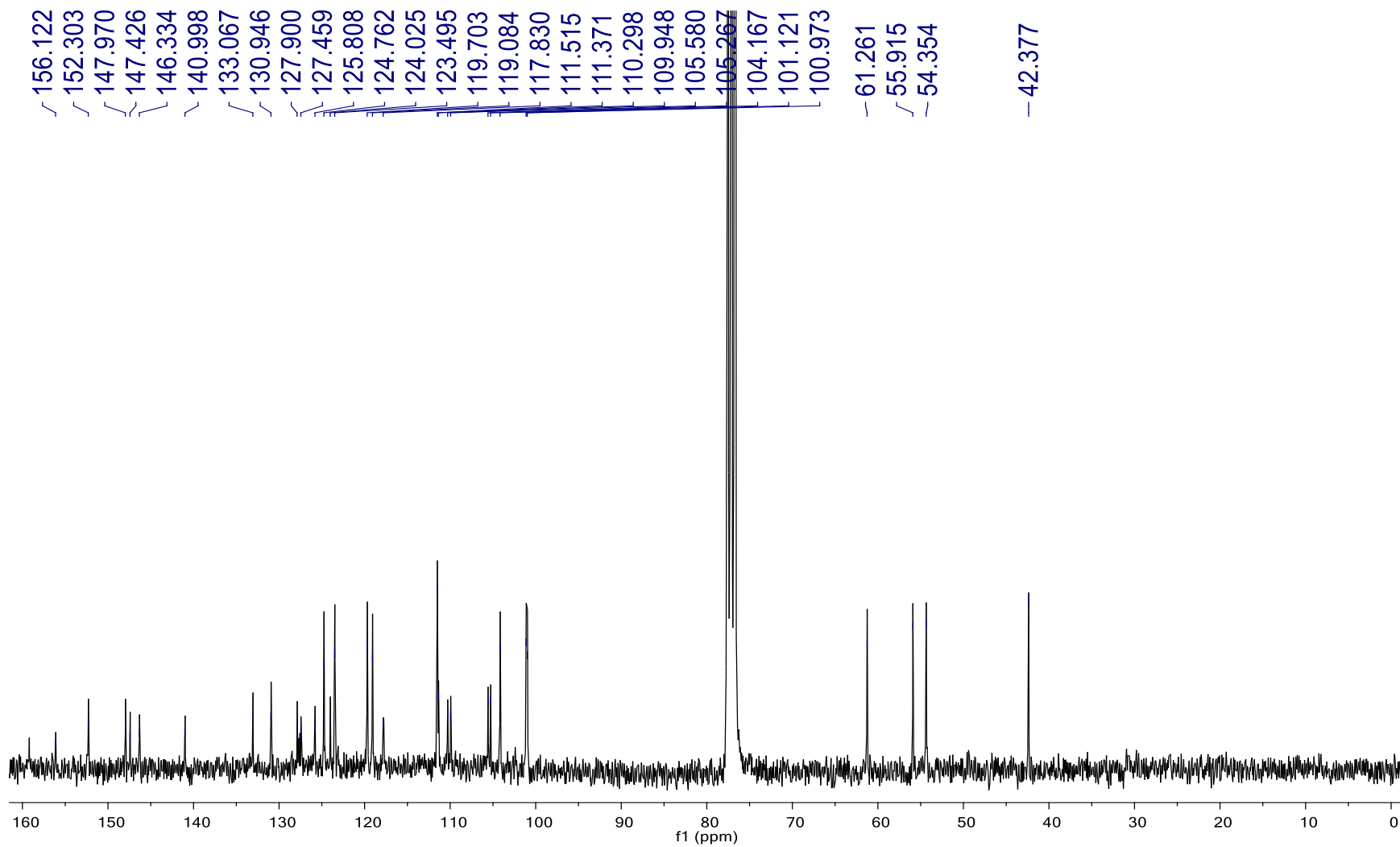
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **4e**



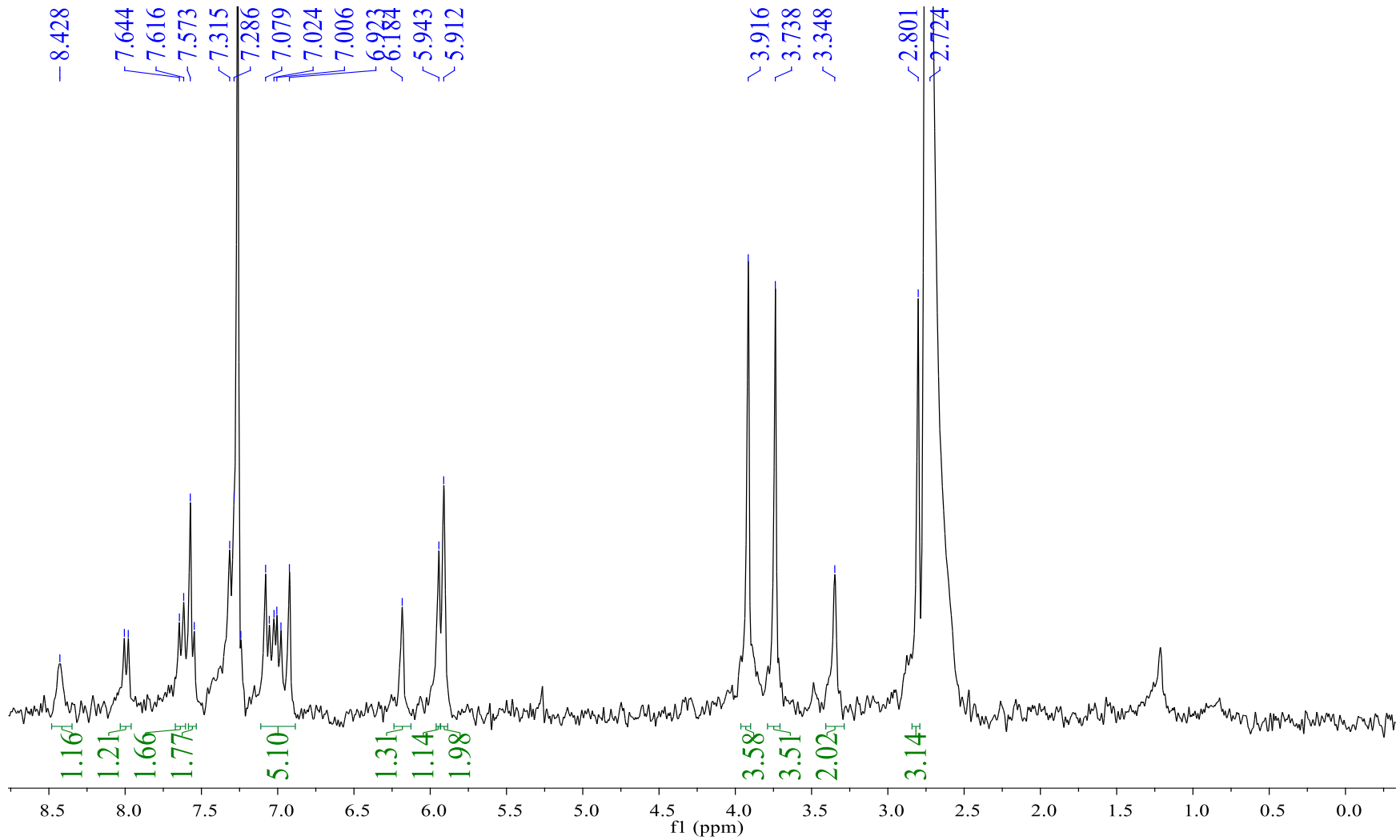
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **4e**



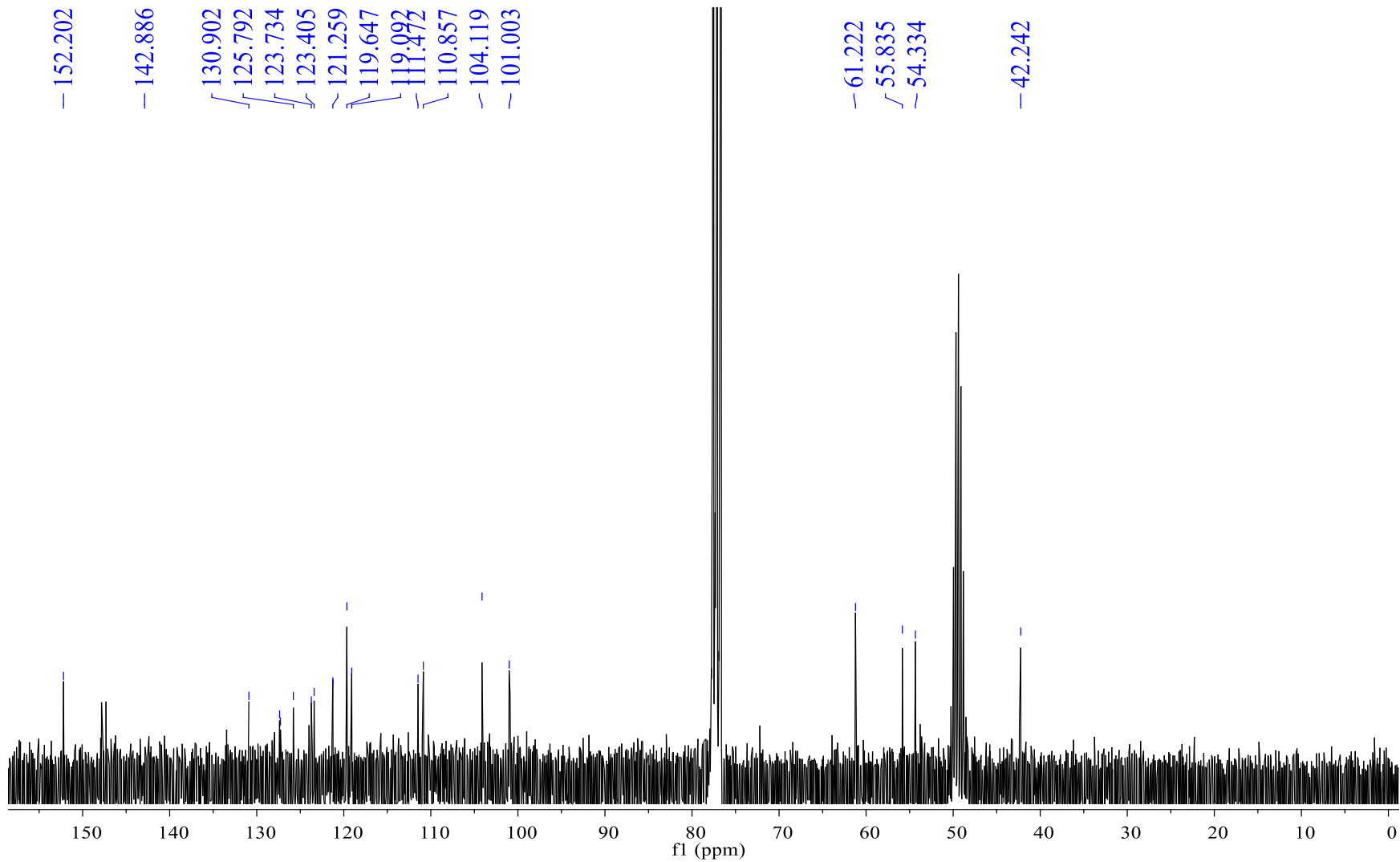
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **4f**



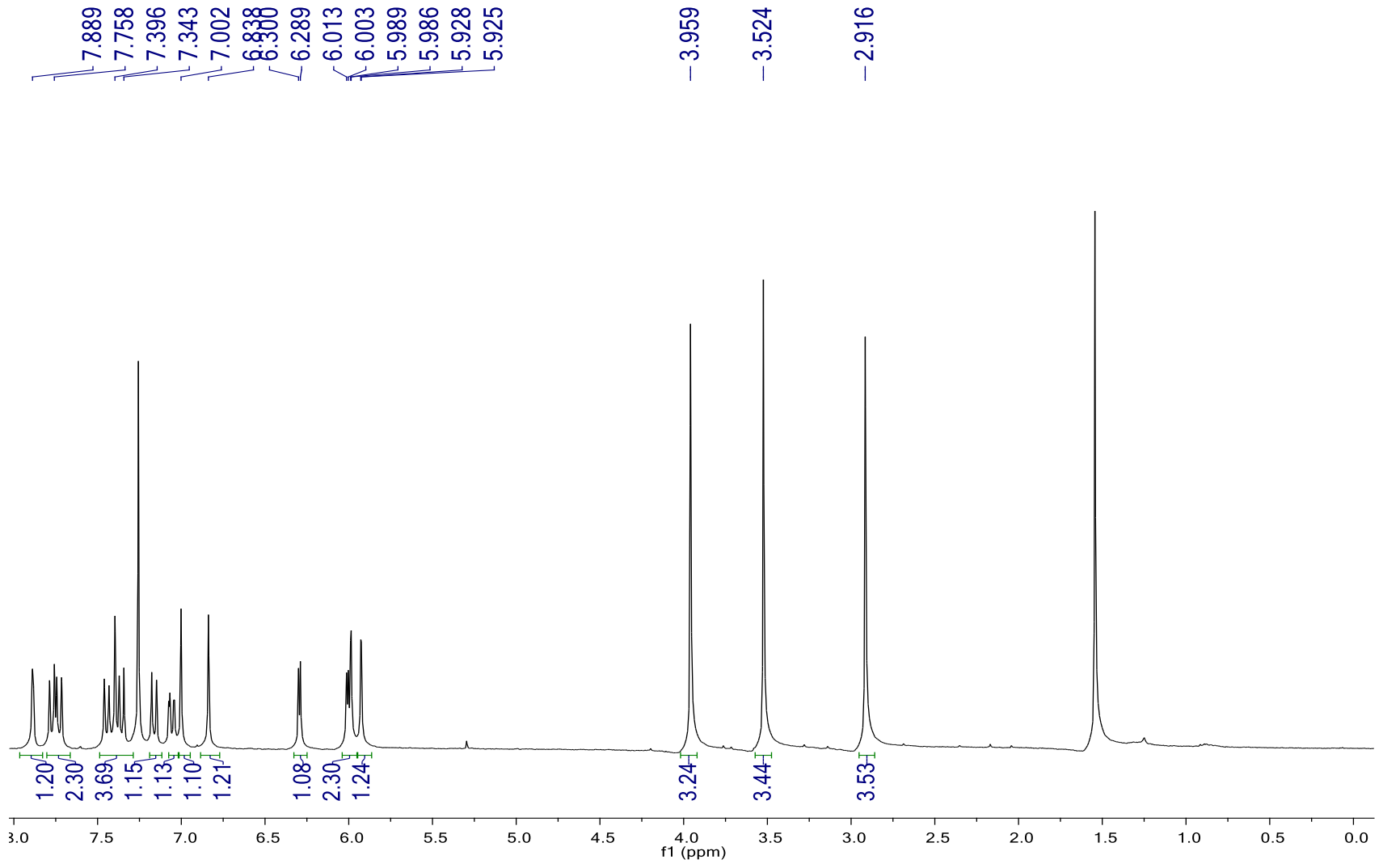
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **4f**



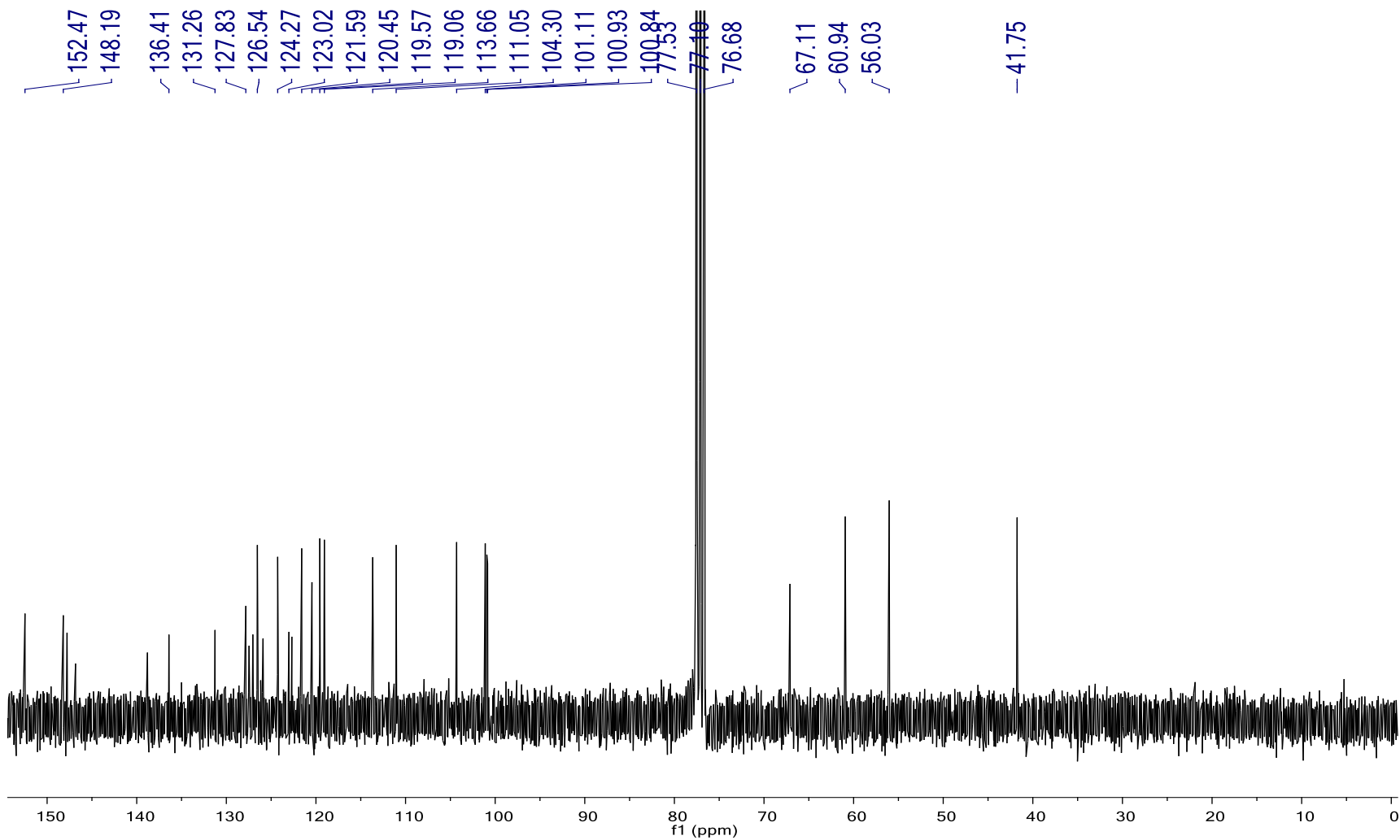
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-}d_6$) de **4g**



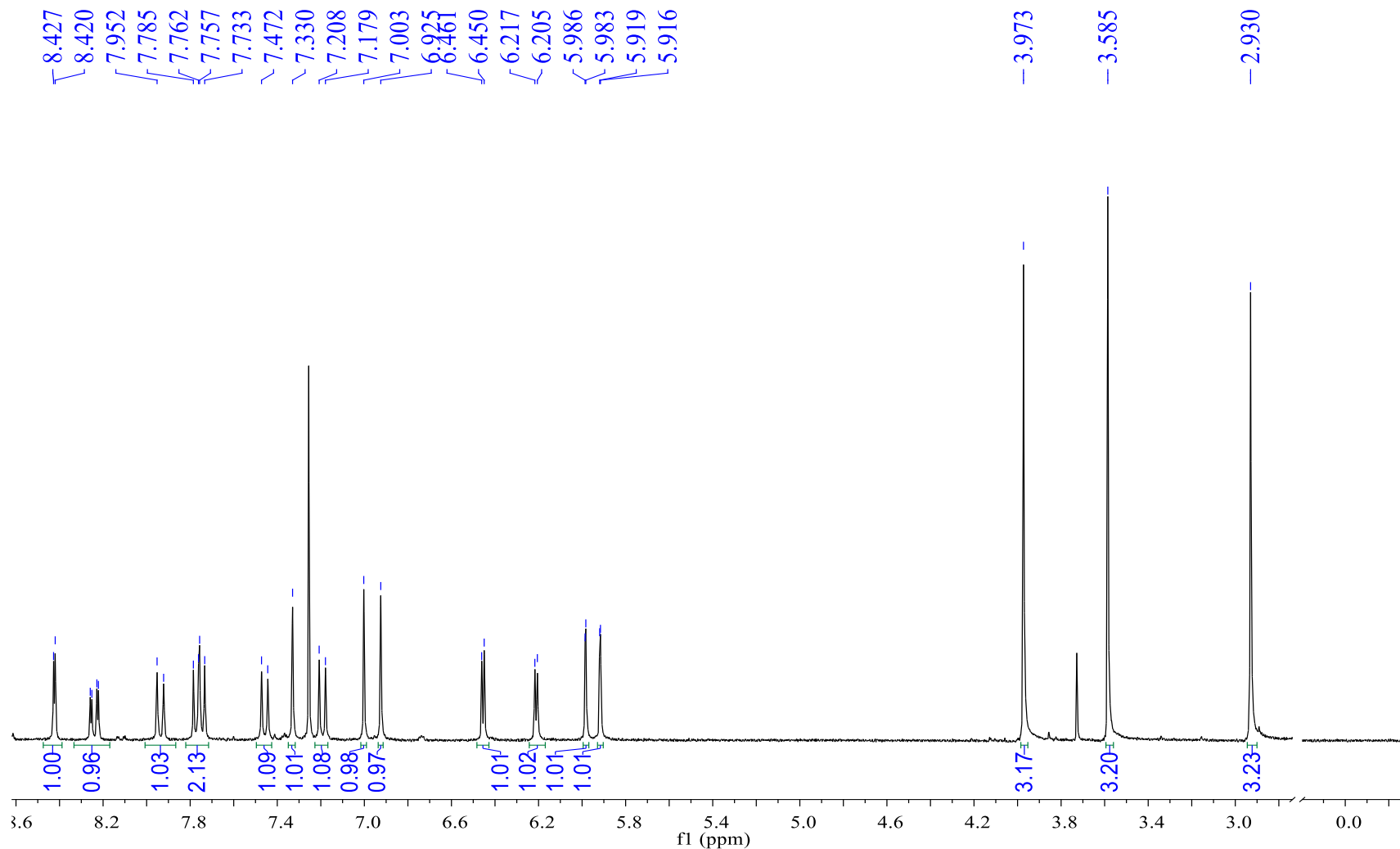
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) de **4g**



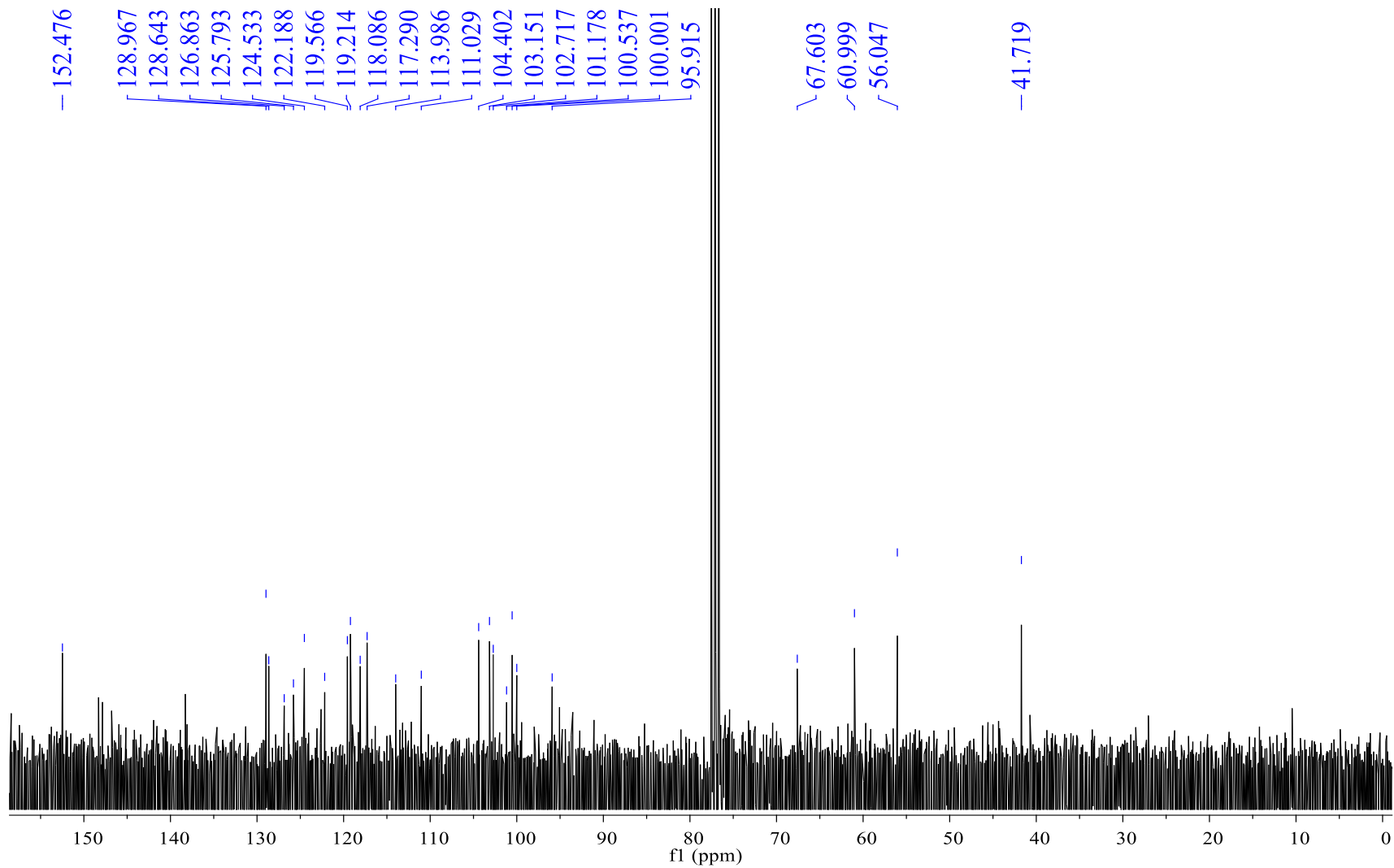
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **4i**



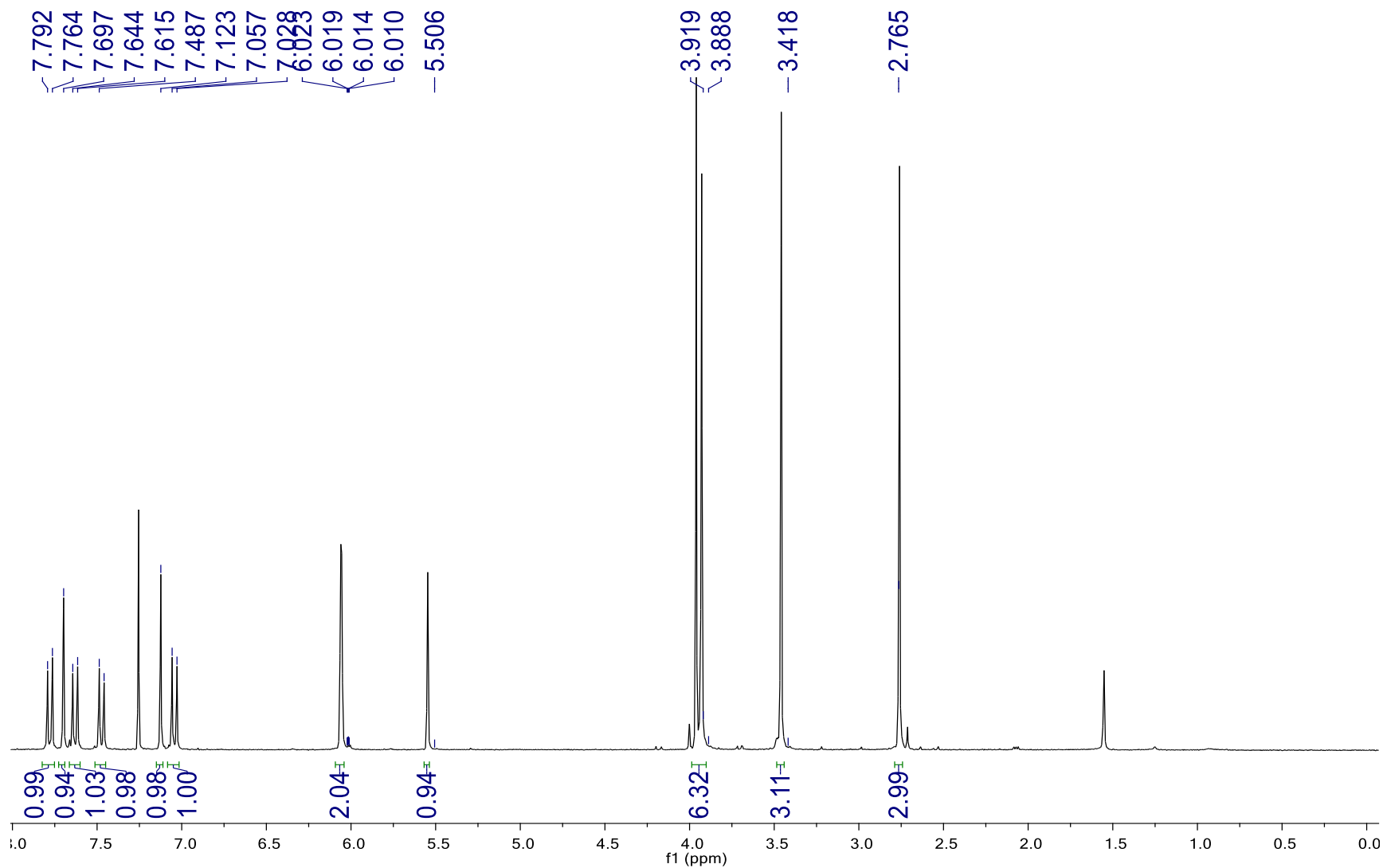
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **4i**



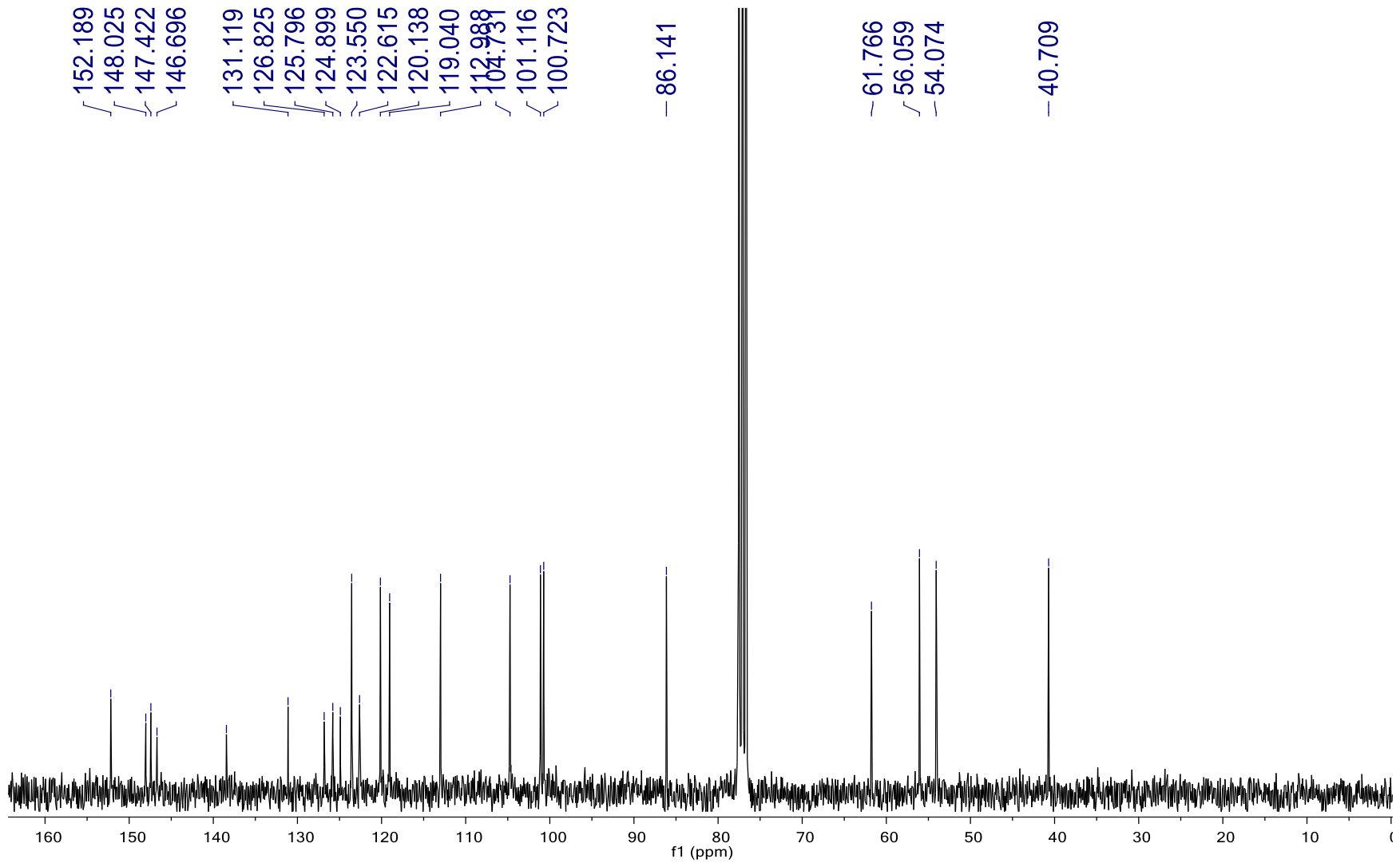
Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de **4j**



Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **4j**



Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **4k**



Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de **4k**