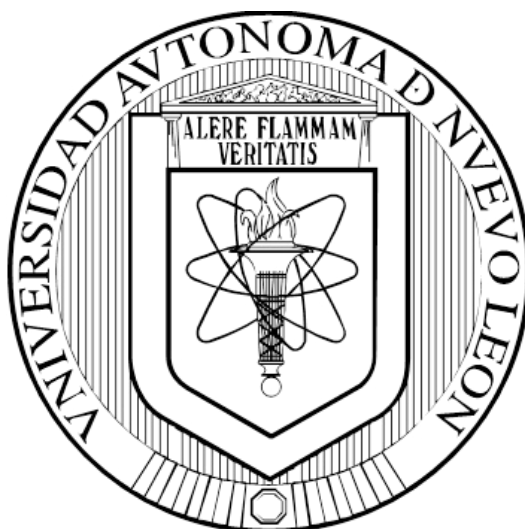


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE  
DERIVADOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS COMO AGENTES  
ANTI-TUBERCULOSOS**

**POR**

**Q.F.B. JORGE HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

**MAYO, 2018**

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE  
DERIVADOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS COMO AGENTES ANTI-  
TUBERCULOSOS**

Revisión de tesis:

---

**Dra. Susana Thelma López Cortina.  
Directora de Tesis.**

---

**Dr. Eugenio Hernández Fernández.  
Co-Director de Tesis.**

---

**Dra. Sandra Leticia Gracia Vázquez.  
Comité Tutorial.**

---

**Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza.  
Comité Tutorial.**

---

**Dr. Edgar Abraham García Zepeda.  
Comité Tutorial.**

---

**Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez.  
Subdirectora de estudios de Posgrado.**

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE  
DERIVADOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS COMO AGENTES ANTI-  
TUBERCULOSOS**

Aprobación de tesis:

---

**Presidente.**

---

**Secretario.**

---

**Vocal.**

---

**Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez.  
Subdirectora de estudios de Posgrado.**

## RESUMEN

**Jorge Hernández Fernández**

**Fecha de Graduación: Mayo, 2018**

**Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Facultad de Ciencias Químicas.**

**Título del Estudio:** Síntesis, caracterización y evaluación biológica de derivados de ácidos carboxílicos como agentes anti-tuberculosos.

**Número de páginas:** 106

Candidato para el grado de Maestría  
en Ciencias con orientación en Farmacia

**Área de Estudio:** Síntesis de compuestos con actividad biológica

**Propósito y Método del Estudio:** De acuerdo la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tuberculosis es la primera causa de muerte a nivel mundial por infecciones, reportando en el 2014, 9,6 millones de nuevos casos y 1,5 millones de defunciones. Existen diferentes grupos de fármacos que se usan para el tratamiento de esta enfermedad, entre las que destacan las del grupo 1 (Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etambutol), estos fármacos se usan en combinación por tiempos prolongados provocando efectos adversos tóxicos. Por este motivo, el paciente decide abandonar la terapia, esto conlleva a la aparición de cepas resistentes. Así que el objetivo de este proyecto es la síntesis de nuevos carboxilatos de potasio partiendo de ésteres incorporando en su estructura diferentes sustituyentes aromáticos y heterociclos, los cuales se hidrolizaran usando irradiación por microondas. La purificación de los compuestos se llevó a cabo por cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de disolventes como fase móvil. Para la caracterización estructural se utilizó Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y Espectrometría de Masas de Alta Resolución. Para la actividad antituberculosa se empleó la técnica de Azul Alamar utilizando la micobacteria H37Rv, y para su evaluación citotóxica se emplearon células de hígado de Chang mediante la técnica WST-1.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se sintetizaron 5 ésteres derivados de diferentes aldehídos aromáticos y 11 carboxilatos de potasio, todos estos compuestos fueron caracterizados mediante las técnicas antes mencionadas. Se evaluó la actividad antituberculosa de 10 moléculas (CP3c–CP12c), donde las moléculas CP3c, CP9c, y CP12c presentaron la mejor actividad anti-TB, a estas moléculas se les evaluó su citotoxicidad utilizando la línea célula Vero resultando ser no citotóxicas.

**FIRMA DEL ASESOR:** \_\_\_\_\_

# **SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS COMO AGENTES ANTI- TUBERCULOSOS**

Presentado por:

Q.F.B. Jorge Hernández Fernández.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Química Industrial del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección y co-dirección de la Dra. Susana Thelma López Cortina y el Dr. Eugenio Hernández Fernández, en el Laboratorio de Ingeniería Genética FCQ-UANL con la asesoría del Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza y en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina-UANL bajo la dirección de la Dra. Blanca Alicia Alanís Garza. Gracias a los recursos proporcionados por los proyectos CB-256359 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y CN367-15 del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT-UANL-2015) y por la beca otorgada 585371 de CONACYT.

## AGRADECIMIENTOS

# TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE ESQUEMAS .....	X
NOMENCLATURA .....	XI
LISTA DE ESTRUCTURAS .....	XIV
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 TUBERCULOSIS .....	1
1.2 ESTADÍSTICAS A NIVEL MUNDIAL .....	1
1.3 ESTADÍSTICAS EN MÉXICO .....	2
1.4 PROBLEMÁTICA DE LA TUBERCULOSIS .....	2
1.5 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....	3
1.5.1 Patogenia y respuesta inmune.....	4
1.5.2 Fármacos para la tuberculosis .....	6
1.5.3 Mecanismo de acción de los fármacos .....	9
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>11</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>11</b>
2.1 SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL ÁCIDO CINÁMICO .....	12
2.2 SÍNTESIS DE AMIDAS Y OXAZOLINAS .....	14
2.3 SÍNTESIS DE CARBOXILATOS COMO INHIBIDORES ENZIMÁTICOS .....	16
2.3.1 Inhibidores enzimáticos de la vía de la menaquinona.....	17
2.3.2 Inhibidores de DprE1 .....	25
2.3.3 Inhibidores de MmpL3.....	27
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>30</b>
3.1 HIPÓTESIS.....	30
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	30
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>32</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 INFORMACIÓN GENERAL .....	32
4.1.1 Forma de manejo y disposición de los residuos generados. ....	35
4.2 MÉTODOS SINTÉTICOS .....	37
4.2.1 Procedimiento general para la preparación de etil ésteres E1-E5.....	37
4.2.1.1 Preparación del compuesto E1.....	37
4.2.1.2 Preparación del compuesto E2.....	38
4.2.1.3 Preparación del compuesto E3.....	38
4.2.1.4 Preparación del compuesto E4.....	39
4.2.1.5 Preparación del compuesto E5.....	39
4.2.2 Procedimiento general para la preparación de cinamatos de potasio CP1 – CP5.....	39
4.2.2.1 Preparación del compuesto CP1. ....	40
4.2.2.2 Preparación del compuesto CP2. ....	41

4.2.2.3 Preparación del compuesto CP3. ....	41
4.2.2.4 Preparación del compuesto CP4. ....	41
4.2.2.5 Preparación del compuesto CP5. ....	41
4.2.3 <i>Procedimiento general para la preparación de carboxilatos de potasio en un solo paso CP3c – 12c.</i> ....	42
4.2.3.1 Preparación del compuesto CP3c.....	43
4.2.3.2 Preparación del compuesto CP4c.....	44
4.2.3.3 Preparación del compuesto CP5c.....	44
4.2.3.4 Preparación del compuesto CP6c.....	44
4.2.3.5 Preparación del compuesto CP7c.....	44
4.2.3.6 Preparación del compuesto CP8c.....	45
4.2.3.7 Preparación del compuesto CP9c.....	45
4.2.3.8 Preparación del compuesto CP10c.....	45
4.2.3.9 Preparación del compuesto CP11c.....	45
4.2.3.9 Preparación del compuesto CP12c.....	46
4.3 PRUEBAS DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTITUBERCULOSA. ....	46
4.3.1 <i>Evaluación de la actividad antituberculosa.</i> ....	47
4.3.1.1 Selección de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . ....	48
<b>LA CEPA DE ESTUDIO FUE H37RV SENSIBLE A LOS FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA</b> .....	<b>48</b>
4.3.1.2 Preparación de los compuestos de prueba. ....	48
4.3.1.3 Técnica de manipulación celular y evaluación de la densidad óptica. ....	49
4.3.1.4 Preparación de la suspensión de trabajo. ....	49
4.3.1.5 Ensayo de microdilución en placa de Alamar Azul. ....	49
4.3.2 <i>Estudios citotóxicos.</i> ....	52
4.3.2.1 Preparación de los compuestos de prueba. ....	52
4.3.2.3 Determinación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de los compuestos en estudio por la técnica WST-1.....	53
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>56</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>56</b>
5.1 SÍNTESIS ORGÁNICA.....	56
5.1.1 <i>Síntesis y purificación de etil ésteres E1-E5</i> .....	56
5.1.1.1 <i>Caracterización de etil ésteres E1-E5</i> .....	58
5.1.2 <i>Síntesis y purificación de cinamatos de potasio CP1 – CP5</i> .....	64
5.1.2.1 <i>Caracterización de cinamatos de potasio CP1 – CP5</i> .....	65
5.1.3 <i>Síntesis y purificación de carboxilatos de potasio en un solo paso CP3c – CP13c.</i> ....	70
5.1.3.1 Caracterización de carboxilatos de potasio CP3c – CP13c .....	70
5.2 EVALUACION BIOLÓGICA .....	73
5.2.1 <i>Evaluaciones de la actividad antituberculosa</i> .....	74
5.2.1 <i>Evaluaciones de la actividad citotóxica</i> .....	78
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	<b>83</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>85</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>90</b>
ANEXO 1. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL .....	90
ANEXO 2. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR PARA CP3C .....	101
ANEXO 3. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR PARA CP9C .....	101
ANEXO 4. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR PARA CP12C.....	102



## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Clasificación de los diferentes grupos de fármacos.....	7
Tabla 2. Reacciones adversas de los fármacos para la tuberculosis.....	8
Tabla 3. Mecanismo de acción de fármacos Antifímicos.....	9
Tabla 4. Actividad anti-TB de amidas y oxazolininas $\alpha,\beta$ -insaturadas.....	16
Tabla 5. Enzimas que catalizan la formación de menaquinona.....	18
Tabla 6. Resultados de la síntesis de los ésteres.....	57
Tabla 7. Elucidación estructural en RMN $^1\text{H}$ de E3.....	59
Tabla 8. Elucidación estructural en RMN $^{13}\text{C}$ de E3.....	61
Tabla 9. Resultados de la síntesis de los ésteres.....	65
Tabla 10. Elucidación estructural en RMN $^1\text{H}$ de CP3.....	66
Tabla 11. Elucidación estructural en RMN $^{13}\text{C}$ de CP3.....	68
Tabla 12. Elucidación estructural en RMN $^1\text{H}$ de CP13c.....	71
Tabla 13. Actividad antituberculosa de carboxilatos de potasio. AC= Ácido cinámico, I= Isoniazida.....	74
Tabla 14. Citotoxicidad de los compuestos en la línea celular Vero.....	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Composición de la pared celular de la micobacteria .....	4
Figura 2. Actividad anti-TB de derivados de ácido cinámico. ....	13
Figura 3. (A) Estructura de la menaquinona. (B) Función de la menaquinona en la respiración micobacteriana.....	18
Figura 4. Análogos de OSB-AMS. *Actividad enzimática (IC <sub>50</sub> , μM <sup>2</sup> ), **Actividad antituberculosa (MIC, μg/mL) .....	20
Figura 5. Estructura de rayos X de MenE: OSB-AMS.....	21
Figura 6. Actividad catalítica de MenB. ....	21
Figura 7. Estructuras de moléculas inhibitorias para MenE/menB con estructura OSB. ....	22
Figura 8. Estructura propuesta para la unión entre el carboxilato libre y MenB. ....	23
Figura 9. Síntesis y actividad antituberculosa de ácidos y ésteres parasustituidos (MIC= μg/mL) .....	24
Figura 10. Propuesta de modo de acción de ésteres de 4-oxo-4-fenil-2-butenoil de metilo .....	25
Figura 11. Actividad biológica de moléculas confirmadas con mejor actividad. ....	27
Figura 12. Transportador MmpL3 de MTB .....	28
Figura 13. Principales interacciones del compuesto 26 con MmpL3.....	29
Figura 14. Reducción de Resarzurina a Resafurina en células viables. ....	47
Figura 15. Diseño de placa para ensayo de Alamar Azul. ....	51
Figura 16. Estructuras de moléculas evaluadas. ....	52
Figura 17. Modelo para ensayos de citotoxicidad.....	54
Figura 18. Reducción del WST-1 .....	55
Figura 19. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto E3 .....	60
Figura 20. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto E3.....	62
Figura 21. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto CP3.....	67
Figura 22. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto CP3.....	69
Figura 23. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto CP3c.....	72
Figura 24. Estructura de las moléculas seleccionadas para su evaluación anti-TB. ....	73
Figura 25. Estructuras de compuestos más activos. ....	78
Figura 26. Comparación estructural de CP3c, CP12c vs 1.....	80
Figura 27. Comparación estructural de CP3c y CP12c vs 2, 3, 4, 5.....	81
Figura 28. Actividad biológica de benzotriazoles. ....	82

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Página
Esquema 1. Preparación de amidas, tioésteres y triazolftalazinas.....	12
Esquema 2. Preparación de oxazolinas. ....	14
Esquema 3. Síntesis de menaquinona, OSB, o-succinilbenzoato; AMP, adenosina monofosfato; DHNA-CoA, 1,4-dihidroxi-2-naftoil-CoA.....	20
Esquema 4. Biosíntesis de DPA .....	26
Esquema 5. Síntesis de ésteres .....	37
Esquema 6. Preparación de cinamatos de potasio. ....	40
Esquema 7. Síntesis de carboxilatos de potasio .....	42
Esquema 8. Síntesis de ésteres .....	56

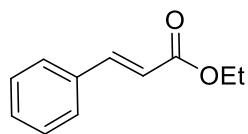
## NOMENCLATURA

AcOEt	Acetato de Etilo
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol Deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
Eq	Equivalentes
g	Gramos
h	Horas
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibición media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de potasio
<i>m</i>	meta
MeOH	Metanol

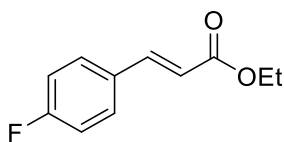
min	Minutos
mL	Mililitros
mmol	Milimol
MW	Microondas
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
nm	Nanómetros
<i>o</i>	orto
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p</i>	para
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
rpm	Revoluciones por minuto
TMS	Tetrametilsilano
WST-1	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2 <i>H</i> -tetrazolio
β	Beta
°C	Grados celsius

d	Desplazamiento químico
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{M}$	Micromolar

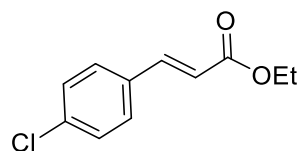
## LISTA DE ESTRUCTURAS



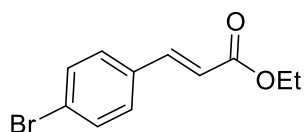
Cinamato de etilo



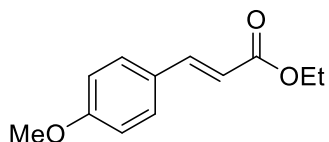
4-Fluorocinamato de etilo



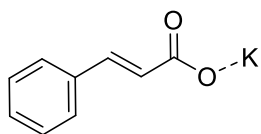
4-Clorocinamato de etilo



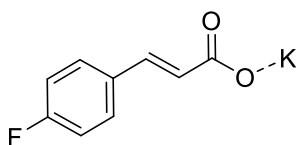
4-Bromocinamato de etilo



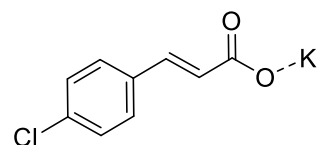
4-Metoxicinamato de etilo



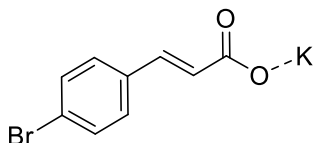
Cinamato de potasio



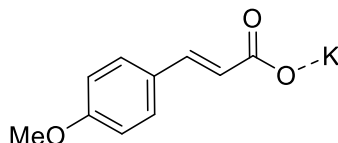
4-Fluorocinamato de potasio



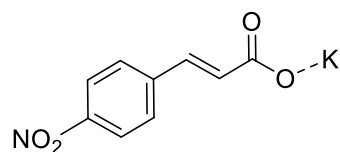
4-Clorocinamato de potasio



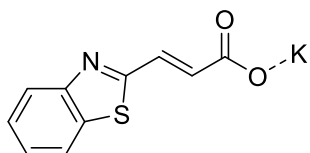
4-Bromocinamato de potasio



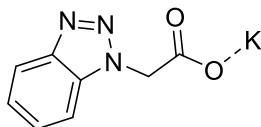
4-Metoxicinamato de potasio



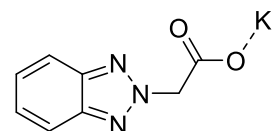
4-Nitrocinamato de potasio



2-Benzotiazol carboxilato de potasio



1H-Benzotriazolil-acetato de potasio



2H-Benzotriazolil-acetato de potasio

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Tuberculosis

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis (TB), la TB es una enfermedad infecciosa, sistémica, crónica, que afecta principalmente al sistema respiratorio, se adquiere principalmente por vía aérea. Aunque se trata principalmente de una enfermedad pulmonar (85%), afecta también a otros órganos y tejidos, siendo una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial.<sup>1,2</sup>

### 1.2 Estadísticas a nivel mundial

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, están infectadas por el bacilo, pero aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección. En el 2015, se reportaron 10,4 millones de nuevos casos de tuberculosis y 1,4 millones murieron por esta enfermedad.<sup>2</sup>

La tuberculosis es la causa principal de muerte de las personas infectadas por el VIH; en 2015, fue la causa de una de cada tres defunciones en este grupo, y se calcula que 480,000 personas desarrollaron tuberculosis multirresistente a nivel mundial en 2014.<sup>2</sup>



### 1.3 Estadísticas en México

De acuerdo con el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRE) de la Secretaría de Salud se ha calculado que, del total de la población estimada en el 2015 a nivel nacional, se han reportado 16,462 mil nuevos casos de Tuberculosis Pulmonar observándose una ascendencia de nuevos casos desde 1990 al 2015, es decir, por cada 100,000 habitantes, 13.6 adquieren la enfermedad. Es importante resaltar que el número de defunciones es elevado en comparación con otras infecciones. Tan solo en el año 2014 se reportaron 1733 defunciones, es decir, 1.4 por cada 100,000 habitantes.<sup>3</sup>

### 1.4 Problemática de la tuberculosis

La TB es considerada un problema de salud mundial, ya que continúa siendo la responsable del mayor número de casos de muertes al año debido a las especies de *Mtb*, *Mtb* resistente y extremadamente resistentes a los fármacos que se usan en la actualidad. La OMS estima que un tercio de la población está infectada con *Mtb* latente. El alto número de individuos infectados representa un reservorio del bacilo que, tras la recaída del sistema inmunológico, el individuo presentará la enfermedad activa, generando un nuevo ciclo de infección, ya que las bacterias latentes son menos susceptibles al tratamiento estándar; lo cual es ocasionado por el régimen terapéutico prolongado, el tratamiento incorrecto, las interacciones entre los fármacos y el abandono del tratamiento debido a los efectos adversos indeseables. Por tanto, se necesitan fármacos más eficientes contra *Mtb* latente

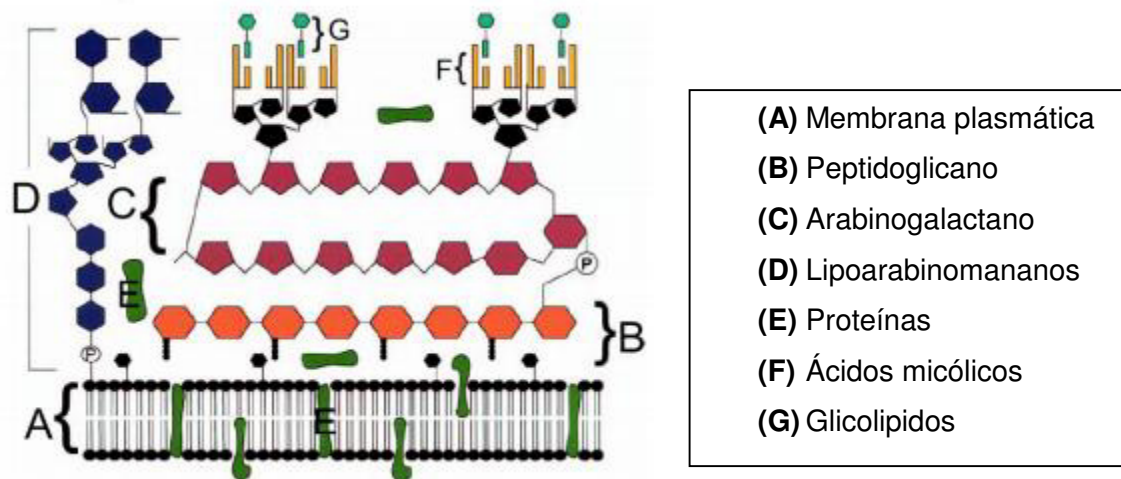
y que lleven a una reducción en los tiempos de las terapias. Además, la coinfección con el VIH ha causado que la TB y el SIDA progresen más rápido.<sup>2,4,5</sup>

### 1.5 *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo aerobio facultativo, sin movilidad, de crecimiento muy lento no esporulado, mide de 1-4  $\mu\text{m}$  de longitud y de 0.3-0.6  $\mu\text{m}$  de ancho. Las micobacterias son bacterias intracelulares facultativas cuyas células dianas son los fagocitos, particularmente los macrófagos y monocitos en donde se multiplican. A pesar de la existencia de muchas micobacterias ambientales, las patogénicas como *Mtb* son estrictamente parásitas.<sup>1,6</sup>

La *Mtb*, presenta una membrana citoplásmica cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con los ácidos micólicos (60% del peso de la pared celular), formados por lípidos libres, glucolípidos y peptidoglucolípidos; estructura que le brinda una apariencia cerosa, le confiere una alta hidrofobicidad, resistencia a detergentes, a un gran número de antibióticos, a las tinciones habituales y le da afinidad por la tinción ácido alcohol resistente de Ziehl Neelsen y Kinyoun (**Figura 1**).

**Figura 1.** Composición de la pared celular de la micobacteria



Por otra parte, las cadenas de péptidos son antígenos responsables de la estimulación de la respuesta inmune celular del hospedero. Los ácidos micólicos forman complejos con apariencia acordonada cuando se unen a carbohidratos. Los sulfolípidos presentes inhiben la fusión fago-lisosoma y a menudo se consideran indicadores de cepas virulentas.<sup>1</sup>

### 1.5.1 Patogenia y respuesta inmune

La infección primaria ocurre habitualmente por inhalación del microorganismo en aerosoles de una persona infectada el cual alcanza el alvéolo de otro huésped. Posteriormente, el bacilo es fagocitado rápidamente por macrófagos alveolares, que normalmente destruyen por mecanismos de respuesta inmune innata a los microorganismos fagocitados.<sup>7</sup>

Las citosinas proinflamatorias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) se producen en las etapas iniciales de la infección, atrayendo neutrófilos y macrófagos los cuales

fagocitarán los bacilos extracelulares y promoverán la inflamación a través de la liberación de citosinas.<sup>8</sup> Los monocitos inflamatorios se diferenciarán en macrófagos, quienes fagocitarán a las bacterias, pero no todas ellas serán destruidas. En esta fase de la infección, la micobacteria crece logarítmicamente y los macrófagos se acumulan, ocasionando daño tisular.<sup>9</sup>

La respuesta inmune adquirida en la tuberculosis se caracteriza por un infiltrado celular (linfocitos, macrófagos y fibroblastos) que formarán el granuloma. Éste tiene un papel dual, conteniendo la infección por una parte, la evasión y la persistencia de bacterias viables por otra.<sup>10</sup> Después de 2 a 3 semanas de la infección, la inmunidad mediada por linfocitos T se desarrolla y los linfocitos T antígenos específicos llegan, polarizándose principalmente a linfocitos TH1 y liberando citosinas tales como IFN- $\gamma$  (interferón gamma) activando macrófagos, favoreciendo la producción de especies reactivas del nitrógeno (RNS) para destruir la micobacteria intracelular. Subsecuentemente, el crecimiento bacteriano logarítmico se detiene y la necrosis en el granuloma inhibe el crecimiento extracelular de la micobacteria.<sup>9</sup> De manera adicional, reportes han demostrado que las células presentadoras de antígenos (APCs) pueden contribuir a un defecto en la estimulación de células T a través de la producción de citosinas inmunorreguladoras como TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) e IL-10 (interleucina-10).<sup>11</sup>

### 1.5.2 Fármacos para la tuberculosis

Para lograr un tratamiento exitoso de la tuberculosis pulmonar, los fármacos deben tener la capacidad de penetrar las lesiones pulmonares y permear la pared celular de la micobacteria para alcanzar sus dianas intracelulares.<sup>12,16</sup>

El tratamiento recomendado para TB sensible a los fármacos de primera línea (Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol) es de al menos 6 meses de duración con una tasa de curación mayor al 95%, esta combinación ha sido parte del régimen de tratamiento recomendado por la OMS desde 1980. Este tratamiento requiere de dos fases, 2 meses de esta combinación de cuatro fármacos, el tratamiento se continúa solo con Isoniazida y Rifampicina por un período adicional de 4 meses.<sup>13</sup>

Esta terapia multidrogas prolongada afecta dramáticamente el cumplimiento y la adherencia a la medicación. Si no se tiene vigilancia, los pacientes abrumados por la cantidad de píldoras y por los efectos secundarios, con el tiempo deciden abandonar el tratamiento antes de que la carga bacteriana haya sido eliminada. Esto provoca el fracaso en el tratamiento, recaída a la infección y evidentemente la aparición de resistencia a los fármacos de primera línea, dando como resultado un segundo tratamiento con fluoroquinonas y aminoglucósidos, fármacos de segunda y tercera línea aún más tóxicos.<sup>5</sup> Para el tratamiento de la TB-MDR se necesitan de 18-24 meses de terapia con cuatro-seis fármacos, incluyendo una fluoroquinolona y un agente inyectable (aminoglucósido o capreomicina).<sup>13</sup>

Los fármacos contra la tuberculosis (TB) se clasifican en cinco grupos<sup>14</sup> basándose en las pruebas de eficacia, potencia, clase de fármacos y experiencia de uso. Todos los nombres de fármacos anti-TB de primera línea tienen una abreviatura estándar de tres letras y/o una sola letra. Los fármacos antituberculosos de primera línea (Grupo 1) se recomiendan actualmente en una combinación de cuatro fármacos para el tratamiento de la tuberculosis susceptible a fármacos. Los fármacos antituberculosos de segunda línea (Grupos 2, 3 y 4) se reservan para la TB resistente a fármacos. Los fármacos antituberculosos de tercera línea (Grupo 5) tienen una eficacia poco clara o funciones no definidas (Tabla 1).<sup>12,13</sup>

**Tabla 1.** Clasificación de los diferentes grupos de fármacos<sup>13</sup>

<b>Clasificación de los fármacos usados en el tratamiento de la tuberculosis.</b>		
<b>Fármacos anti-TB de primera línea.</b>		
<b>Grupo 1.</b>	<b>Oral:</b>	Isoniazida (H/Inh), Rifampicina (R/Rif), Pirazinamida (Z/Pza), Etambutol (E/Emb).
<b>Fármacos anti-TB de segunda línea.</b>		
<b>Grupo 2.</b>	<b>Aminoglucósidos inyectables:</b>	Estreptomicina (S/Stm), Kanamicina (Km), Amikacina (Amk).
	<b>Polipéptidos inyectables:</b>	Capreomicina (Cm), Viomicina (Vim).
<b>Grupo 3.</b>	<b>Oral e inyectables fluoroquinolonas:</b>	Ciprofloxacino (Cfx), Levofloxacino (Lfx), Moxifloxacino (Mfx), Ofloxacino (Ofx), Gatifloxacino (Gfx).
<b>Grupo 4.</b>	<b>Oral:</b>	Ácido <i>p</i> -aminosalicílico (Pas), Cicloserina (Dcs), Terizidona (Trd), Etionamida (Eto), Protionamida (Pto), Tioacetazona (Thz), Linezolida (Lzd).
<b>Fármacos anti-TB de tercera línea.</b>		
<b>Grupo 5.</b>		Clofazimina (Cfz), Linezolida (Lzd), Amoxicilina/Clavulanato (Amx/Clv), Imipenem/Cilastatina (Ipm/Cln), Claritromicina (Clr).

La larga duración del tratamiento está asociada con la manifestación de efectos secundarios (Tabla 2) que conlleva al abandono del tratamiento.<sup>5,14,15</sup>

**Tabla 2.** Reacciones adversas de los fármacos para la tuberculosis<sup>5</sup>

<b>Fármaco</b>	<b>Efecto</b>
<b>Fármacos de primera línea</b>	
<b>Isoniazida</b>	Neuritis, hepatitis, hipersensibilidad.
<b>Rifampicina</b>	Hepatitis, reacción febril, hipersensibilidad
<b>Pirazinamida</b>	Hiperuricemia, hepatitis, vómitos, artralgias, hipersensibilidad cutánea
<b>Etambutol</b>	Neuritis óptica,
<b>Fármacos de segunda línea</b>	
<b>Ácido <i>p</i>-aminosalicílico</b>	Trastornos gastrointestinales, hipersensibilidad, hepatotoxicidad, acumulación de sodio
<b>Estreptomicina</b>	Bloqueo neuromuscular, hipersensibilidad, nefrotoxicidad
<b>Etionamida</b>	Trastornos gastrointestinales, anorexia, hepatotoxicidad,
<b>Ofloxacino</b>	Trastornos gastrointestinales, vértigo, hipersensibilidad, cefalea
<b>Capreomicina</b>	Toxicidad auditiva, renal
<b>Kanamicina</b>	Toxicidad auditiva, renal
<b>Amikacina</b>	Toxicidad auditiva, renal
<b>Cicloserina</b>	Psicosis, convulsiones, depresión, cefalea

### 1.5.3 Mecanismo de acción de los fármacos

Desde el descubrimiento de la Estreptomicina, antibiótico obtenido de *Streptomyces griseus*, hace 70 años, el primer antibiótico con actividad anti-TB. Se fueron desarrollando y descubriendo fármacos con actividad, mostrando diferentes mecanismos de acción<sup>13,15</sup> (Tabla 3).

**Tabla 3.** Mecanismo de acción de fármacos antifímicos<sup>13</sup>

Fármaco	Diana terapéutica	Mecanismo
<b>Fármacos de primera línea</b>		
<b>Isoniazida</b>	Proteína transportadora enoil-acil reductasa	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos
<b>Rifampicina</b>	RNA polimerasa, subunidad beta.	Inhibe transcripción
<b>Pirazinamida</b>	Componente S1 de la subunidad 30S ribosomal	Inhibe la traducción y trans-traducción, acidifica el citoplasma
<b>Etambutol</b>	Arabinosil transferasa	Inhibe la biosíntesis del arabinogalactano
<b>Fármacos de segunda línea</b>		
<b>Ácido <i>p</i>-aminosalicílico</b>	Dihidropteroato sintasa	Inhibe la biosíntesis de folato
<b>Estreptomicina</b>	rRNA S12 y 16S, componentes de subunidad ribosomal 30S	Inhibe síntesis de proteínas
<b>Etionamida</b>	Proteína transportadora enoil-acil reductasa	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos
<b>Ofloxacino</b>	DNA girasa y ADN topoisomerasa	Inhibe el superenrollamiento de ADN
<b>Capreomicina</b>	Intermediario B2a ubicado entre las subunidades ribosómicas 30S y 50S	Inhibe síntesis de proteínas



<b>Kanamicina</b>	Subunidad ribosomal 30S	Inhibe síntesis de proteínas
<b>Amikacina</b>	Subunidad ribosomal 30S	Inhibe síntesis de proteínas
<b>Cicloserina</b>	D-alanina racemasa y ligasa	Inhibe síntesis de peptidoglicano

Cabe mencionar, la eficacia de los fármacos de primera línea es dependiente del crecimiento bacilar; Isoniazida, actúa en poblaciones bacilares con crecimiento rápido. Rifampicina, actúa en poblaciones bacilares con crecimiento intermitente. Pirazinamida, actúa en poblaciones bacilares con crecimiento lento y medio ácido y Etambutol, actúa en todas las poblaciones.<sup>5</sup>

## CAPÍTULO II

### ANTECEDENTES

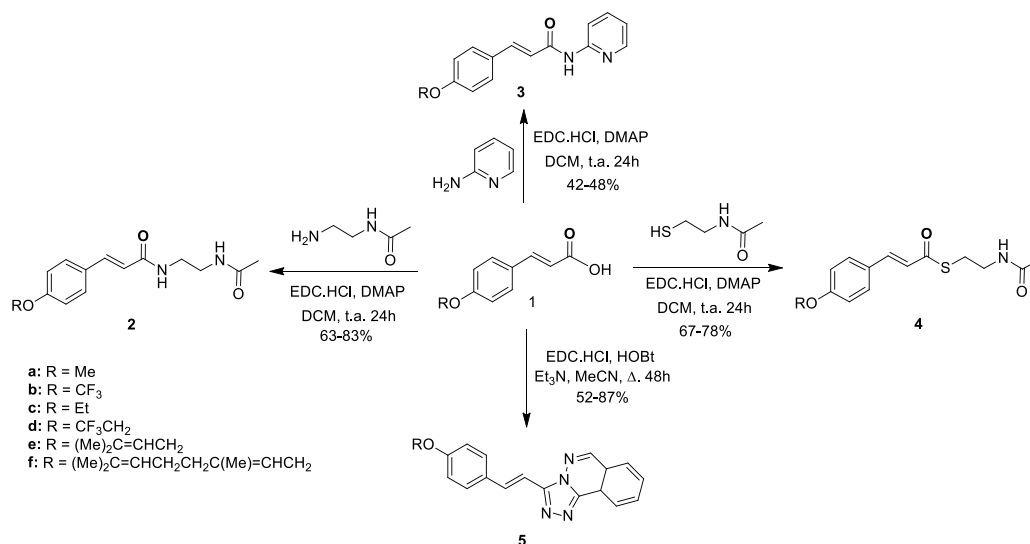
La actividad biológica de cualquier molécula depende generalmente de que tan capaz es el compuesto de permear la membrana celular con la finalidad de alcanzar y modificar el blanco biológico. La permeabilidad celular de cada molécula al examinar ciertas propiedades fisicoquímicas de cada compuesto.<sup>17</sup>

En este sentido, Lipinski y colaboradores<sup>17</sup> analizaron alrededor del 90% de posibles fármacos que han alcanzado la Fase II en ensayos clínicos, con la finalidad de entender que factores son los responsables para tal actividad. Los autores concluyeron que para que un compuesto llegue a ser un fármaco potencial, éste debe cumplir con ciertas propiedades fisicoquímicas: ser donador de enlaces de hidrógeno, aceptor de enlaces de hidrógeno, debe tener una masa molecular de 500 Da o menos, tener coeficientes de partición (LogP) igual y/o menor a 5 y poseer enlaces con rotación restringida. Estas características proporcionan a los químicos medicinales una guía para una mejor selección y diseño de nuevos compuestos y evitar el desgaste durante el desarrollo clínico debido a la farmacocinética insatisfactoria.

## 2.1 Síntesis de derivados del ácido cinámico

La síntesis de nuevos compuestos con las características antes mencionadas representa un área de oportunidad para la obtención de nuevos compuestos con aplicación potencial como agentes anti-TB. En 2011 Baltas y colaboradores<sup>18</sup> reportaron la síntesis de derivados del ácido cinámico y su evaluación como agentes anti-TB. En el esquema 1 se puede observar la preparación de amidas, tioésteres y triazolftalazinas a partir de ácido cinámico y aminas, utilizando reactivos de acoplamiento.

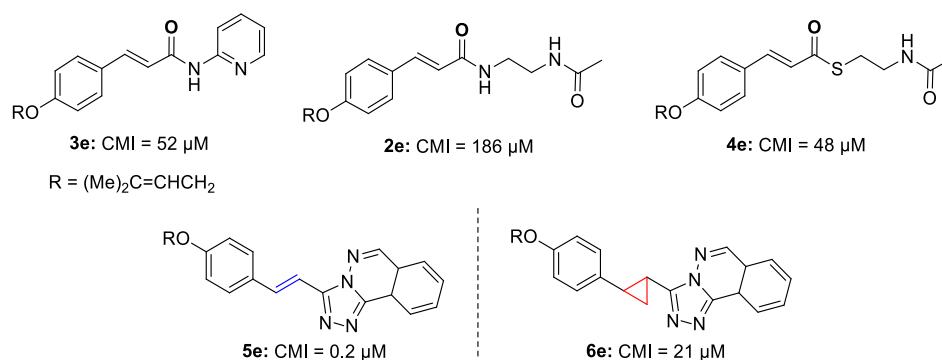
**Esquema 1.** Preparación de amidas, tioésteres y triazolftalazinas.



Los resultados de actividad anti-TB demuestran que varios compuestos exhiben actividad en contra de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Por ejemplo, los compuestos **2e-5e** presentan una CIM que va de 186  $\mu$ M para el compuesto **2e**, menos activo, a una CMI de 0.2  $\mu$ M para el compuesto **5e**, más

activo. Además, es importante notar que la presencia del doble enlace en la estructura de estos compuestos es esencial para la actividad biológica, ya que al pasar del compuesto **5e** que incorpora un enlace doble, al compuesto **6e** que incorpora un ciclopropilo, éste último presentó una menor actividad en contra de la cepa H37Rv (**Figura 2**). Por lo tanto, la incorporación de un sistema insaturado en los nuevos derivados de ácido cinámico resulta de gran interés al evaluar la actividad anti-TB.

**Figura 2.** Actividad anti-TB de derivados de ácido cinámico.

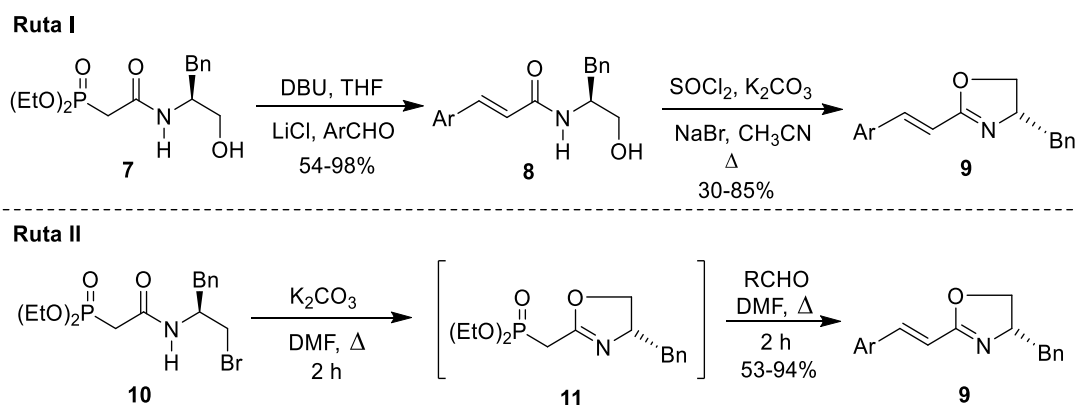


Además, es importante destacar que el compuesto **5e** resultó ser mucho más activo (CMI = 0.2  $\mu$ M) que la Isoniazida (CMI = 18  $\mu$ M) cuando fueron evaluados frente a una cepa de *Mtb* resistente a Isoniazida. Por lo tanto, el estudio de nuevos compuestos empleando diferentes cepas resulta de gran importancia para el descubrimiento de nuevos fármacos contra cepas de *Mtb* resistentes a los fármacos actualmente disponibles.

## 2.2 Síntesis de amidas y oxazolinas

Las características estructurales y la actividad farmacológica de los compuestos anteriormente mencionados han servido de base para el desarrollo de dos nuevas rutas de síntesis para la obtención de oxazolinas  $\alpha,\beta$ -insaturadas **9**, dentro de nuestro grupo de investigación. La ruta I consiste en la preparación de las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas **8**, mediante la reacción Horner-Wadsworth-Emmons (HWE), haciendo reaccionar la fosfohidroxiamida **7** con diferentes aldehídos aromáticos, obteniendo buenos rendimientos químicos (54-98%). Posteriormente, las hidroxiamidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas **8**, son tratadas con  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y  $\text{NaBr}$  en acetonitrilo a reflujo para generar las correspondientes oxazolinas **9**. La ruta II consiste en generar *in situ* la fosfo-oxazolona **11** a partir de la fosfobromoamida **10**. Obteniendo rápida y eficientemente las oxazolinas  $\alpha,\beta$ -insaturadas **9** (Esquema 2).

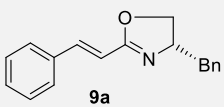
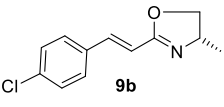
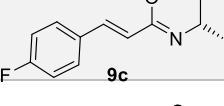
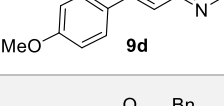
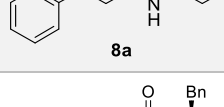
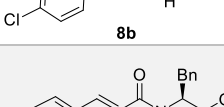
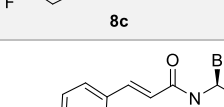
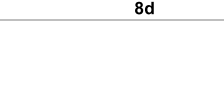
Esquema 2. Preparación de oxazolinas.



Por otra parte, Hernández-Fernández y colaboradores en 2017,<sup>19</sup> reportaron la evaluación de la actividad anti-TB de los diferentes compuestos sintetizados utilizando dos cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (una sensible a los fármacos de primera línea y una resistente a Etambutol). Para ello fueron seleccionadas hidroxiamidas **8** y oxazolinas **9**, (con el objetivo de estudiar la relación estructura-actividad en la actividad anti-TB) así como los fármacos de referencia Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Etambutol (EMB) y Ofloxacino (OFX) las cuales se probaron a nueve concentraciones diferentes 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 µg/mL.

Los resultados demostraron que todos los compuestos estudiados presentaron una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), menor o igual a 16 µg/mL (Tabla 4), tanto para la cepa sensible como para la resistente, destacando particularmente la oxazolina **9d**, con un CMI de 2 µg/mL para la cepa resistente. Las CMI de este tipo de moléculas son comparables con los fármacos actualmente utilizados (CMI: Cepa Sensible: INH = < 1 µg/mL, RIF = 4 µg/mL, EMB = 8 µg/mL, OFX = < 1 µg/mL. Cepa Resistente: INH = 8 µg/mL, RIF = 16 µg/mL, EMB = > 256 µg/mL, OFX = 2 µg/mL).

**Tabla 4.** Actividad anti-TB de amidas y oxazolinas  $\alpha,\beta$ -insaturadas.<sup>19</sup>

Estructura	Cepa Sensible ( <i>H37Rv</i> )	Cepa Resistente (Aislado clínico)
 9a	16 $\mu\text{g/mL}$ - (60.8 $\mu\text{M}$ )	8 $\mu\text{g/mL}$ - (30.4 $\mu\text{M}$ )
 9b	8 $\mu\text{g/mL}$ - (26.9 $\mu\text{M}$ )	8 $\mu\text{g/mL}$ - (26.9 $\mu\text{M}$ )
 9c	4 $\mu\text{g/mL}$ - (14.2 $\mu\text{M}$ )	16 $\mu\text{g/mL}$ - (56.9 $\mu\text{M}$ )
 9d	4 $\mu\text{g/mL}$ - (13.6 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{g/mL}$ - (6.8 $\mu\text{M}$ )
 8a	16 $\mu\text{g/mL}$ - (56.8 $\mu\text{M}$ )	16 $\mu\text{g/mL}$ - (56.8 $\mu\text{M}$ )
 8b	8 $\mu\text{g/mL}$ - (25.3 $\mu\text{M}$ )	16 $\mu\text{g/mL}$ - (50.6 $\mu\text{M}$ )
 8c	8 $\mu\text{g/mL}$ - (26.7 $\mu\text{M}$ )	16 $\mu\text{g/mL}$ - (53.4 $\mu\text{M}$ )
 8d	8 $\mu\text{g/mL}$ - (25.6 $\mu\text{M}$ )	16 $\mu\text{g/mL}$ - (51.3 $\mu\text{M}$ )

### 2.3 Síntesis de carboxilatos como inhibidores enzimáticos

En años recientes, la membrana bacteriana está recibiendo mayor atención como objetivo antimicrobiana basada en las siguientes afirmaciones. Primero, es necesario una funcionalidad intacta de la membrana bacteriana para su viabilidad; segundo, una tercera parte de las proteínas bacterianas se encuentran localizadas en la membrana, de las cuales muchas de ellas tienen

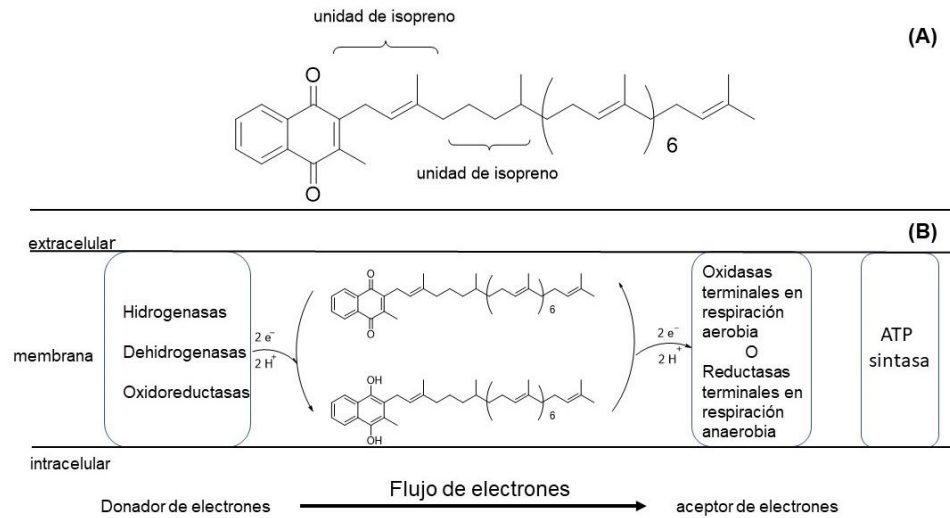
funciones importantes, como el transporte y generación de energía, eventos esenciales para el crecimiento de del organismo, por tanto, el daño a la membrana conducirá así a la perdida eventual de funciones esenciales y su consecuente muerte. En consecuencia, las nuevas moléculas enfocadas en las membranas bacterianas tienden a interrumpir múltiples enzimas implicadas en mantener las funciones homeostáticas.<sup>20</sup>

### **2.3.1 Inhibidores enzimáticos de la vía de la menaquinona.**

La menaquinona es una naftoquinona poliisoprenilada, tiene 9 unidades de isopreno, participa como cofactor de reducción en la cadena de transporte de electrones (Figura 3).<sup>21,22</sup> Se ha reportado que las micobacterias latentes consumen ATP para que permanezcan viables.<sup>23</sup> En la ruta biosintética de la menaquinona participan una serie de enzimas que catalizan la formación de menaquinona a partir del corismato (Tabla 5).<sup>22</sup>

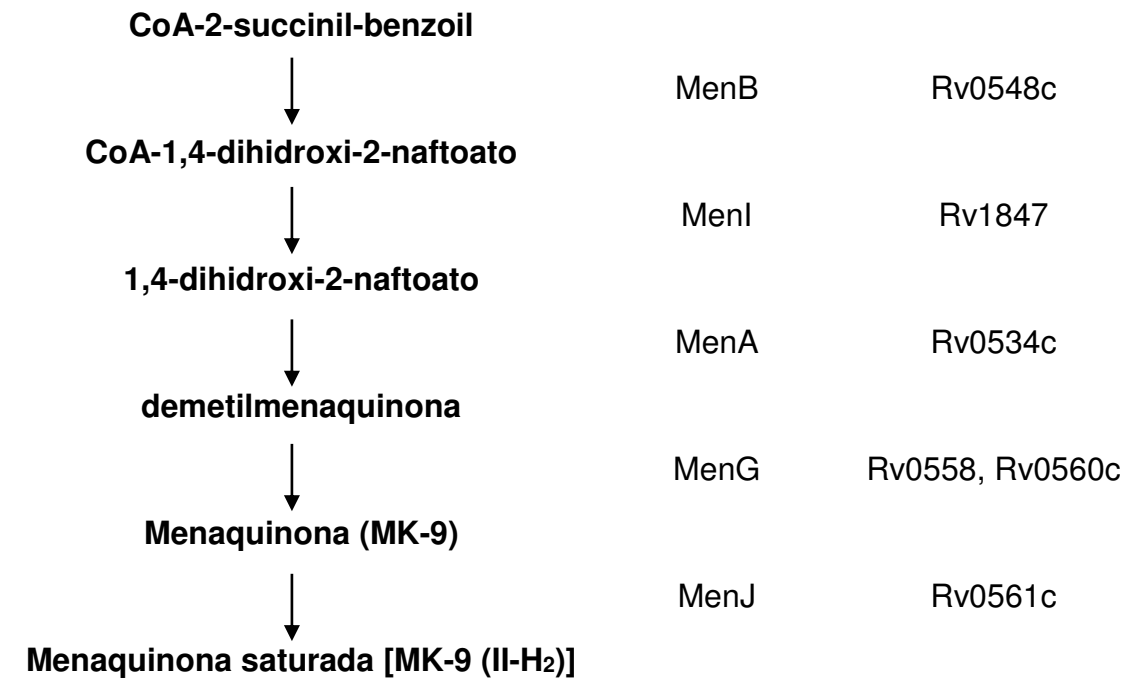


**Figura 3.** (A) Estructura de la menaquinona. (B) Función de la menaquinona en la respiración micobacteriana.<sup>22</sup>



**Tabla 5.** Enzimas que catalizan la formación de menaquinona.<sup>22</sup>

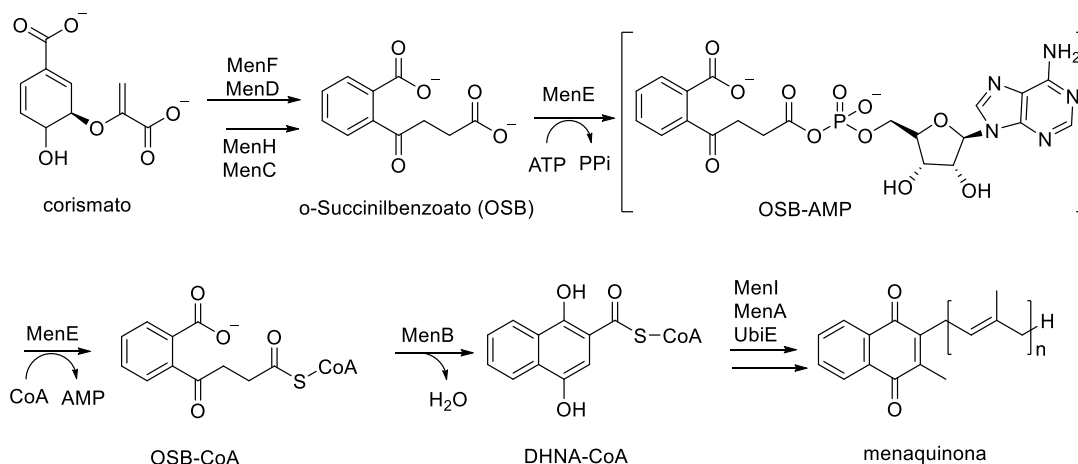
Ruta biosintética	Enzima	Gen	<i>M. tuberculosis</i>
Corismato			
↓			
Isocorismato	MenF	Rv3215	
↓			
Carboxilato-2-succinil-5-enoilpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexadieno-1	MenD	Rv055	
↓			
Carboxilato-2-succinil-6-hidroxi-2,4-ciclohexadieno-1	MenH	Rv2715	
↓			
Ácido 2-succinil-benzoico	MenC	RV0553	
↓			
	MenE	Rv0166	



Por tanto, moléculas que interfieran con la respiración bacteriana pueden dirigirse a población en replicación latente.

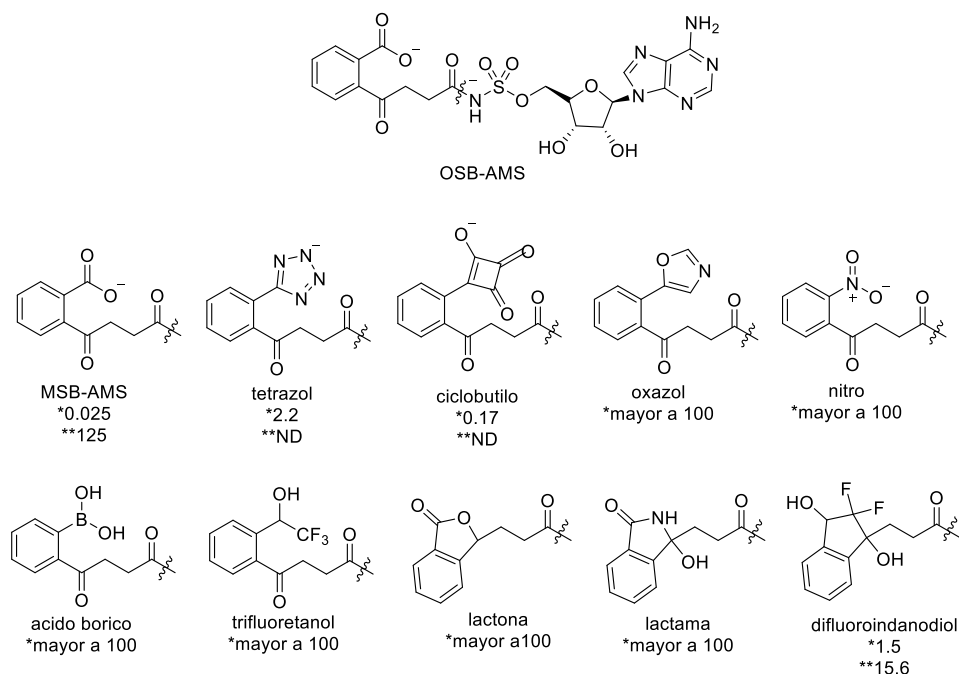
En el 2015. Matarlo *et al.*<sup>24</sup> sintetizaron análogos de acil-adenilato como inhibidores de la enzima MenE (Esquema 3), esta es una o-succinilbenzoil-CoA (OSB-CoA) sintetasa, cataliza la ligación de CoA a través de un acil-adenilato (OSB), con un intermediario OSB-AMP. MenE es un miembro de la superfamilia enzimática formadora de adenilato en la que se utiliza ATP para activar un carboxilato para el posterior ataque de un nucleófilo.

**Esquema 3.** Síntesis de menaquinona, OSB, o-succinilbenzoato; AMP, adenosina monofosfato; DHNA-CoA, 1,4-dihidroxi-2-naftoil-CoA



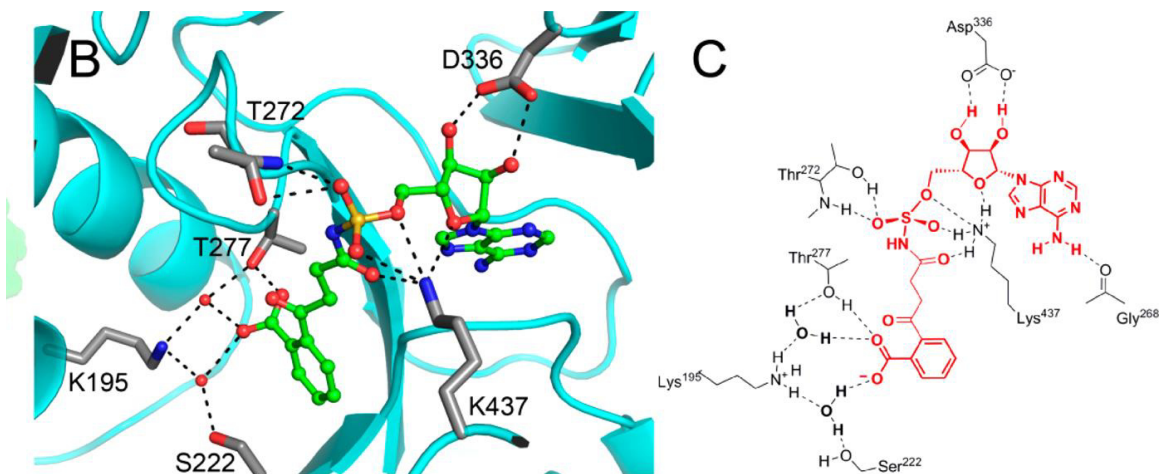
Para el estudio, diseñaron 10 análogos de acil-adenilato usando diferentes sustituyentes en posición *orto*. Determinaron su inhibición enzimática *in vitro* y la actividad antituberculosa sobre *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 4)<sup>24</sup> de los compuestos más activos.

**Figura 4.** Análogos de OSB-AMS. \*Actividad enzimática (IC<sub>50</sub>, μM<sup>2</sup>), \*\*Actividad antituberculosa (MIC, μg/mL)



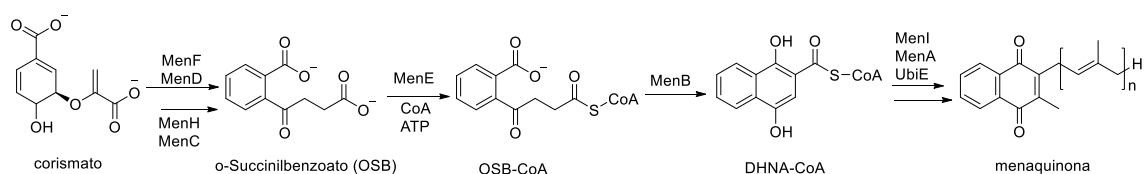
En este estudio determinaron, que se requiere un carboxilato libre en la cadena OSB para una inhibición potente de MenE. El análisis de rayos X (Figura 5) muestra que el carboxilato-OSB interacciona con K195 (R195) formando un puente iónico mediado por agua (B), (C) un análisis de mutagénesis mostró que existe una interacción directa entre R195 y el carboxilato-OSB.

**Figura 5.** Estructura de rayos X de MenE: OSB-AMS



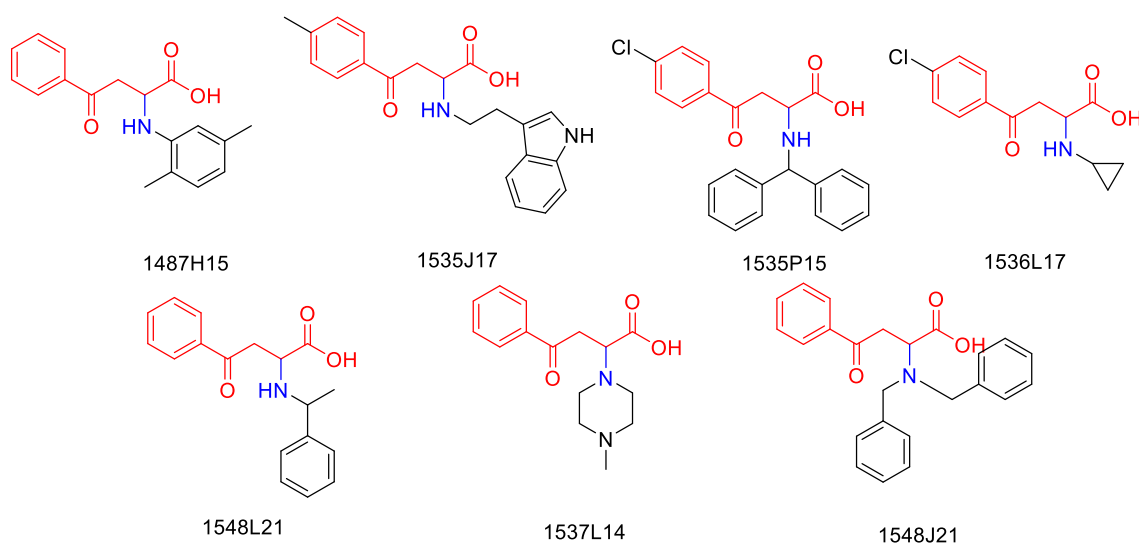
Conociendo la importancia de esta ruta biosintética para las micobacterias, en el 2011, Matarlo y *colaboradores*<sup>25,26</sup> reportaron la inhibición de 1,4-dihidroxi-2-naftoil-CoA sintasa (MenB) (Figura 6), la cual cataliza una reacción de condensación intramolecular del tipo Claisen (Dieckmann), para la formación de 1,4-dihidroxi-2-naftoil-CoA (DHNA-CoA) a partir de *o*-succinilbenzoato (OSB).

**Figura 6.** Actividad catalítica de MenB.



Realizaron un cribado de una biblioteca molecular identificando a siete compuestos con actividad inhibitoria para MenE o MenB (Figura 7)<sup>25</sup>, estos compuestos poseen la estructura base de OSB, substrato para MenE, de estos el 1548L21 no presenta actividad contra menE y si para MenB, por tanto, ellos sintetizaron análogos a este compuesto y evaluaron su capacidad para inhibir menB.

**Figura 7.** Estructuras de moléculas inhibitorias para MenE/menB con estructura OSB.

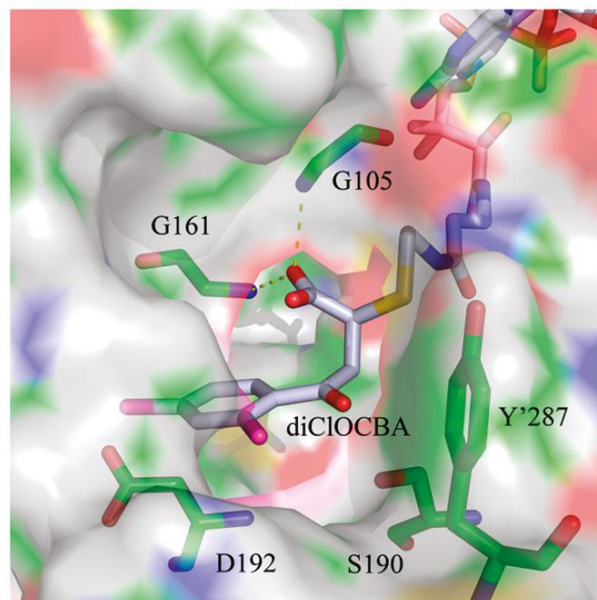
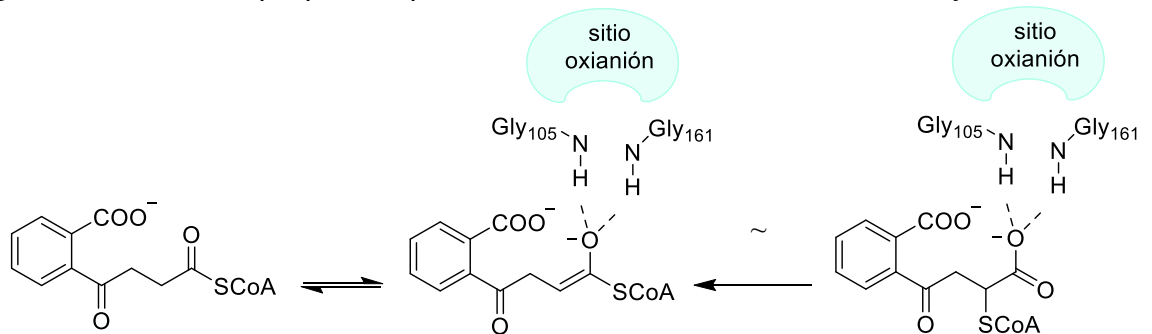


Por otro lado, encontraron que los compuestos son inestables en solución a pH 7, lo que conduce a la formación de ácido benzoilacrílico y a la amina. Estos datos los llevó a realizar otros análisis estructurales, obteniendo datos que sugieren que la inhibición se da por un aducto entre el ácido benzoilacrílico y

CoA. Para validar esta hipótesis, realizaron una incubación del ácido benzoilacrílico y CoA a pH 7 durante 2 horas, el producto final se purificó y los datos analíticos confirmaron que la CoA se agrega al C2 del ácido benzoilacrílico.<sup>25</sup>

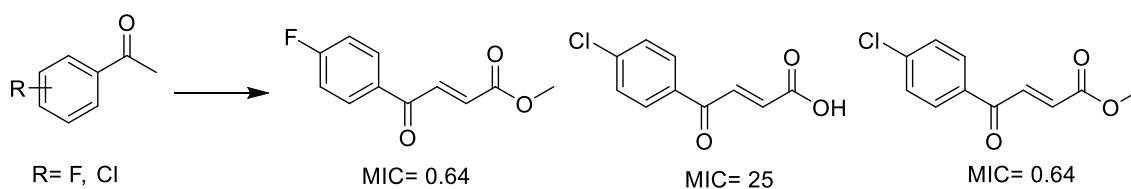
Estos datos los llevó a proponer un mecanismo catalizado por MenB (Figura 8), donde se sugiere la importancia del carboxilato, ya que se propone la formación de un aducto entre el carboxilato libre y residuos de aminoácidos, Gly-105 y Gly-161, presentes en el sitio catalítico de la enzima.

**Figura 8.** Estructura propuesta para la unión entre el carboxilato libre y MenB.



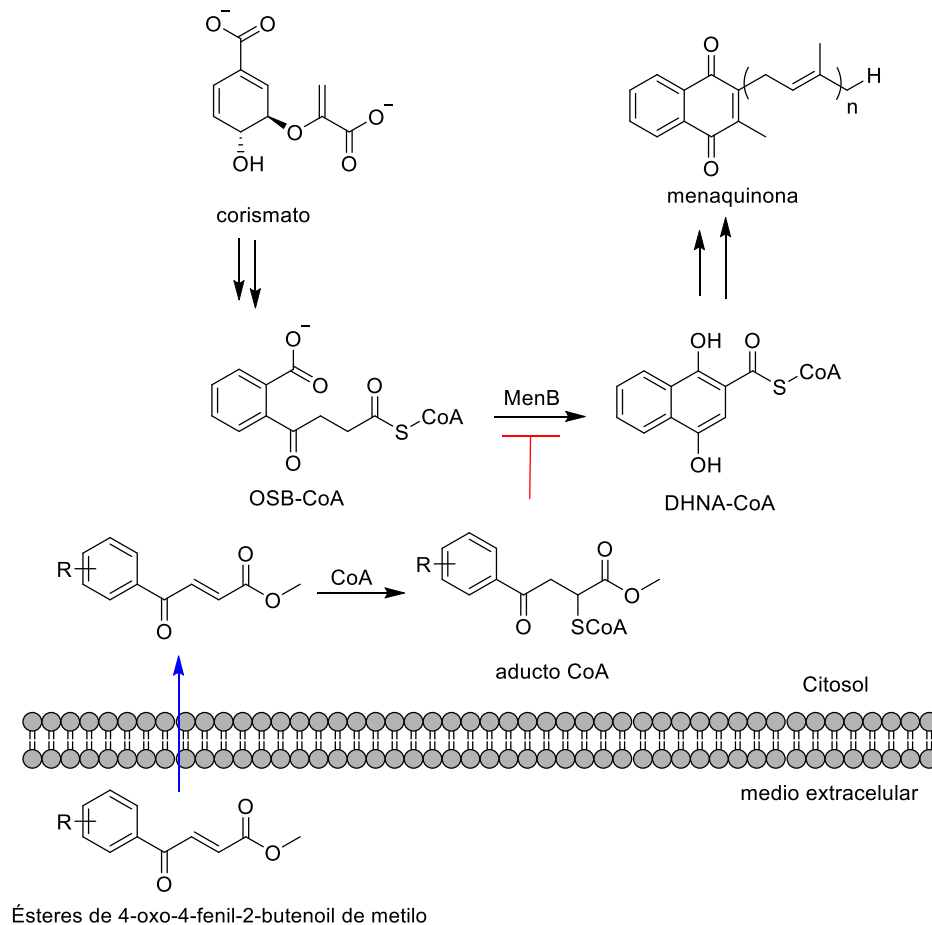
Posteriormente, sintetizaron 4-oxo-4-fenilbut-2-enoatos y determinaron su actividad antituberculosa sobre la cepa H37Rv de *Mycobacterium* (Figura 9). Para la síntesis de estos compuestos, partieron de diferentes ácidos y ésteres los cuales hicieron reaccionar en presencia de acetofenona, ácido glioxílico monohidratado y ácido acético a reflujo durante toda la noche, en este ensayo las moléculas presentaron buena actividad y baja citotoxicidad.<sup>25</sup>

**Figura 9.** Síntesis y actividad antituberculosa de ácidos y ésteres p-sustituídos (MIC=  $\mu\text{g/mL}$ )



En este estudio los autores encontraron que las moléculas con el grupo éster presenta mayor actividad en comparación con los ácidos. Por tanto, en el 2016 el grupo de Matarlo <sup>26</sup> sugieren que la protección del carboxilato es importante ya que ayuda a la penetración celular, esto llevará a una disminución de los niveles de DHNA y MK (Figura 10)<sup>26</sup>, al reducir los niveles de manaquinona y/o sus precursores, los procesos homeostáticos se alterarán y la micobacteria eventualmente morirá.

**Figura 10.** Propuesta de modo de acción de ésteres de 4-oxo-4-fenil-2-butenoil de metilo



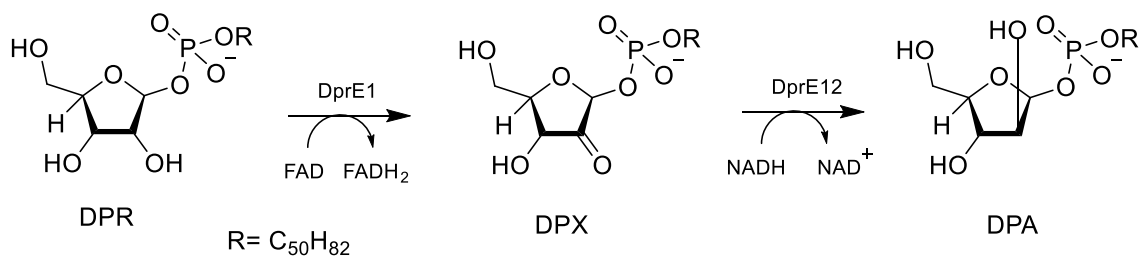
### 2.3.2 Inhibidores de DprE1

La enzima heterodimeérica, decaprenilfosforil- $\beta$ -D-ribosa-2'-epimerasa (DprE), está formada por dos proteínas, DprE1 y DprE2, estas enzimas son claves en la biosíntesis de decaprenilfosforil- $\beta$ -D-arabinofuranosa (DPA). El DPA es un precursor de arabinosa en la pared de la micobacteria, es uno de los componentes esenciales de la pared de *Mtb*.<sup>27</sup>



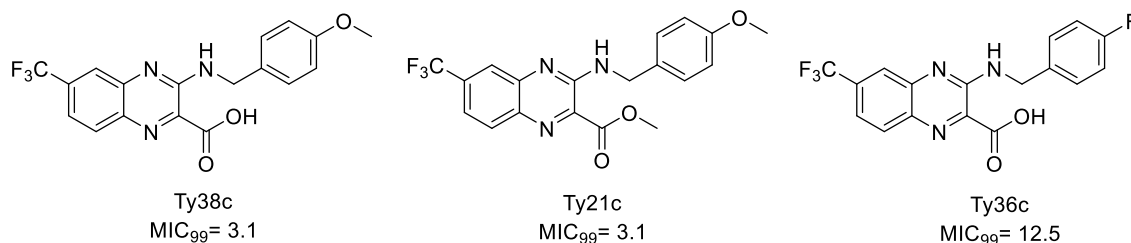
La biosíntesis de DPA se realiza en dos pasos de reacción: la oxidación y la reducción respectivamente de decaprenilfosforil-β-D-ribose (DPR). El primer paso es la oxidación de DPR para obtener una cetona intermedia, decaprenilfosforil-2-ceto-β-D-eritro-pentofuranosa (DPX), se lleva a cabo mediante un cofactor de reducción, flavina adenina dinucleótido (FAD) y DprE1 como catalizador. El segundo paso es la reducción estereoespecífica de la cetona DPX, esta reacción involucra, nicotinamida adenina dinucleótido como cofactor de reducción (NADH) en presencia de DprE2 como catalizador, obteniendo así DPA<sup>27</sup> (Esquema 4).

**Esquema 4. Biosíntesis de DPA**



En el 2015 Stewart T. Cole. *et al.*<sup>28</sup> realizaron un cribado molecular de 266 quinoxalinas para probar su actividad antituberculosa usando el ensayo de reducción de la resazurina sobre la cepa H37Rv de *Mtb*. En este cribado encontraron tres moléculas candidatas a modificaciones estructurales<sup>28</sup> (Figura 11).

**Figura 11.** Actividad biológica de moléculas confirmadas con mejor actividad.



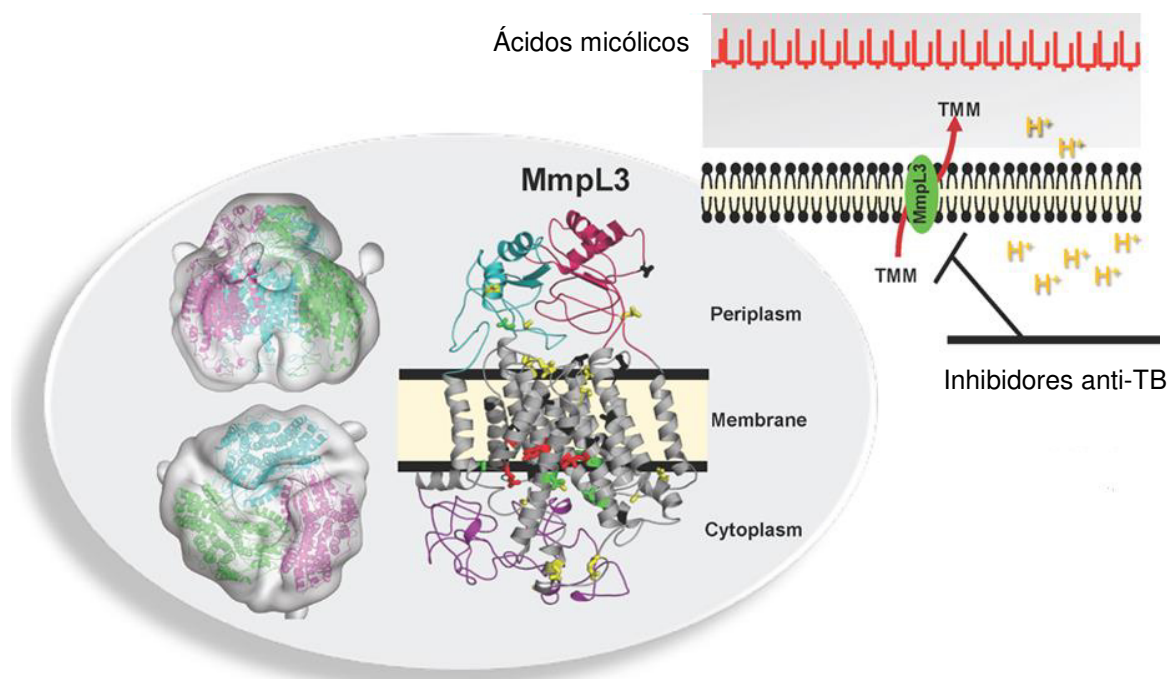
Los resultados del análisis de estructura actividad para Ty38c muestran que los puentes de hidrógeno clave formados se dan entre la cadena lateral de Lys 418, residuo catalítico esencial,<sup>29</sup> y el grupo carboxilato y el nitrógeno 1 del anillo de quinoxalina, el grupo hidroxilo de Tyr 60 también forma puentes de hidrogeno con el carboxilato.<sup>28</sup>

Los autores en este estudio concluyen que el grupo carboxilato forma interacciones cruciales electrostáticas y puentes de hidrógeno con los residuos Lys418, Tyr60 y posiblemente con Arg325.<sup>28</sup>

### 2.3.3 Inhibidores de MmpL3

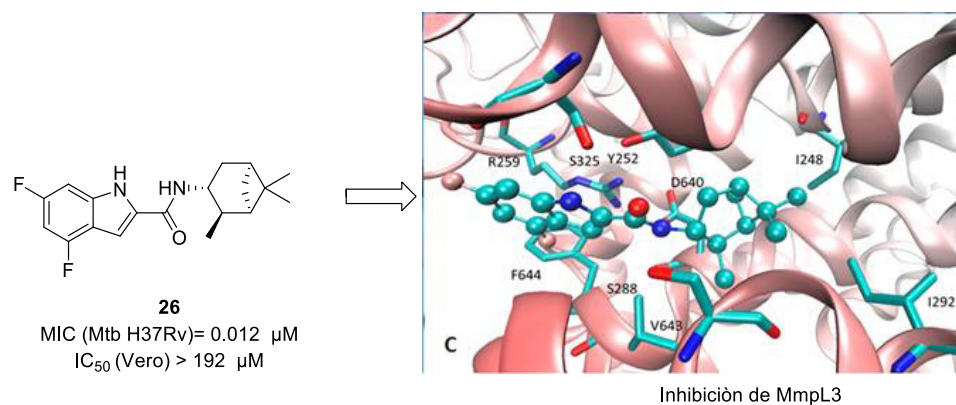
MmpL3 es un transportador de membrana interna de *Mtb* (Figura 12)<sup>30</sup> responsable de la exportación de trehalosa-6-monomicolato (TMM), TMM es un precursor para la biosíntesis de trehalosa 6-6'-dimicolato (TDM), siendo TDM una estructura importante en la pared de la micobacteria. Por tanto, este transportador es clave en el diseño de nuevos fármacos anti-TB.

**Figura 12.** Transportador MmpL3 de MTB.<sup>31</sup>



En el 2016 Kozikowski *et al.*<sup>32</sup> diseñaron una serie de moléculas basadas en indol-2-carboxiamida. Se diseñaron 42 moléculas, a las cuales se analizó su actividad antituberculosa sobre la cepa sensible H37Rv, de las cuales la molécula que presento una mayor actividad fue la etiquetada con el número 26. En este mismo trabajo los autores realizaron un análisis computacional para conocer las interacciones que podría formar la enzima MmpL3, sus análisis mostraron que el átomo de oxígeno del carbonilo interacciona con Tyr252, Ser288 y Ser325. Tyr252 está altamente conservada en todas las isoformas MmpL, por tanto, juega un rol importante en la actividad de este transportador, figura 13.<sup>32</sup>

**Figura 13.** Principales interacciones del compuesto 26 con MmpL3.



Con el análisis de literatura realizado, los enfoques actuales sobre el diseño de nuevas moléculas con potencial actividad biológica se basan en la combinación de análisis computacional y síntesis orgánica con su posterior evaluación biológica. Por tanto, la síntesis orgánica sigue siendo un método mayormente usado para la obtención de compuestos, y los investigadores han evidenciado que conociendo la rutas metabólicas clave en la homeostasis de *Mtb* se pueden diseñar moléculas con átomos específicos que favorezcan la interacción de la molécula con la diana celular, como se ha descrito anteriormente, siendo un ejemplo de esto el átomo de oxígeno del grupo carboxilo. Por lo anteriormente mencionado, en este proyecto se propuso la síntesis de nuevos derivados de ácidos carboxílicos.

## CAPÍTULO III

### 3.1 Hipótesis

La actividad anti-tuberculosa *in vitro* de nuevos derivados de ácidos carboxílicos es mejor que la actividad mostrada por el antifímico Isoniazida frente a la cepa sensible H37Rv.

### 3.2 Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nuevos derivados de ácidos carboxílicos y evaluar su actividad anti-tuberculosa *in vitro*, en comparación con el antifímico Isoniazida frente a la cepa sensible H37Rv.

### 3.3 Objetivos Específicos

- Sintetizar etil ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados.
- Sintetizar carboxilatos de potasio usando irradiación de microondas.
- Caracterizar cada uno de los compuestos obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), Espectroscopia de infrarrojo (IR) y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EMAR).

- Evaluar la actividad antituberculosa de los carboxilatos de potasio sintetizados utilizando la técnica colorimétrica de Alamar Azul y comparar su actividad con el fármaco Isoniazida.
  
- Determinar la capacidad hepatotóxica en células de hígado de Vero de los compuestos más activos.
  
- Realizar el análisis de datos obtenidos de la actividad antituberculosa.

## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe la metodología experimental utilizada para la síntesis de los derivados de ácidos carboxílicos, las estrategias de purificación, las técnicas de caracterización estructural a utilizar y los ensayos para la determinación de la actividad antituberculosa y citotóxica de las nuevas moléculas.

#### 4.1 Información general

Las actividades del proyecto se realizaron en el Laboratorio de Química Industrial, ubicado en el Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Autónoma de Nuevo León, en el Laboratorio de Ingeniería Genómica ubicado en la Escuela de Graduados de la FCQ-UANL y en Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para la síntesis orgánica de los carboxilatos se utilizaron los siguientes reactivos:

- SIGMA ALDRICH: 4-clorobenzaldehído 97%, 4-fluorobenzaldehído 97 %, 4-bromobenzaldehído 97%, benzaldehído 97%, 4-nitrobenzaldehído 97%, 4-metoxibenzaldehído, 4-benciloxibenzaldehído, benzotriazol 97%.

- Desarrollo de Especialidades Químicas: disolventes, acetato de etilo, hexano, metanol (grado industrial) se destilaron para su uso y etanol grado reactivo.

Las reacciones se realizaron en un equipo de microondas Monowave 300 (marca Anton Paar) y en un Ultrasonido 2510 (marca Branson®)

La purificación de los productos se realizó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice Merck 60 (230-400 nm) como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de disolventes.

La caracterización de los compuestos por Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina-UANL. El análisis por Espectrometría de Masas de Alta resolución (EMAR) se realizó en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM) en Cuernavaca. Los espectros de RMN se obtuvieron de un espectrómetro Bruker de 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100MHz para  $^{13}\text{C}$  y para los espectros de masas de alta y baja resolución, se utilizó el método de ionización  $\text{FAB}^+$ , con un espectrómetro de Masas de Alta Resolución MStation 700 JEOL.

El trabajo correspondiente a las pruebas biológicas se realizó en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y en el Laboratorio de Ingeniería Genómica ubicado en la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



Para el ensayo de Alamar Azul y citotoxicidad se empleó lo siguiente:

- Cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 sensible a los fármacos de primera línea para tuberculosis (Isoniazida, Rifampicina, Estreptomycin, Etambutol y Piracinamida).
- Células Vero (ATCC® CCL-81™)

Los materiales, reactivos y equipos que se emplearon se describen a continuación:

➤ Reactivos y disolventes

Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), Acytsa®

Dimetilsulfóxido grado analítico, Fermont®

Enriquecimiento para medio de cultivo OADC, Becton Dickinson®

Glicerol, Analytyka®

Glutaraldehído al 2%, Degasa SA de CV, Dermo Dex®

Hidróxido de sodio (NaOH), Sigma®

Indicador de crecimiento celular Resazurin, Probiotek®

Isoniazida, Sigma®

Medio de cultivo líquido DMEM, Sigma®

Medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9, Difco®

Medio de cultivo sólido Lowenstein-Jensen, Merck®

➤ Equipos

Agitador Hidolth instrument Unimax 1010

Agitador Vortex, Ika Works, Inc. Mod. MS1 S1

Balanza analítica, BP2215, SARTORIUS®

Bomba de vacío GAST 1HAB-25-M100X

Bomba peristáltica Mod EP-1Econo pump, Bio-RAD

Campana de bioseguridad tipo II en cuarto de contención, Labconco

Campana de flujo laminar, environmental air control, AECI ENVIRCO

➤ Material.

Membrana de nylon HNWP, 0.45  $\mu\text{m}$ , 50 mm diámetro, Millipore®

Pipeta lineal 10 mL (1/10), estéril, desechable, Falcón®

Pipeta serológica lineal 5 mL (1/10), estéril, desechable, VWR®

Pipetas automáticas, Eppendorf®

Placa de 96 pozos, Corning incorporated 3599, Costar®

Puntillas con filtro desechables para pipeta automática, 200  $\mu\text{L}$ , BIOzym budget line®

Puntillas desechables para pipeta automática, Probiotek®

Sistema de filtración con membrana de Nylon 0.45 mm, 500 mL, VWR®

Tubo cónico para centrifuga con tapa de rosca, estéril, 15 mL, CORNING®

Tubo, 1.5 mL, Eppendorf®

Tubos de vidrio de 150 x 18 con tapón de rosca

La esterilización del material se realizó en dos autoclaves marca All American modelo 75X y 25X. Se trabajó en una campana de flujo laminar modelo SG-303 marca The Baker Company. Se utilizó una incubadora con  $\text{CO}_2$  modelo 3403 marca Thermo SCIENTIFIC y una mini incubadora modelo I5110 marca LABNET. Se empleó una centrífuga modelo Sorvall ST 16R y un microscopio invertido modelo TLM400 marca LABOMED. La lectura de las placas se realizó en un lector de microplacas ELISA modelo ELX800 marca BIOTEK.

#### **4.1.1 Forma de manejo y disposición de los residuos generados.**

El mantenimiento de la seguridad en el laboratorio y la disposición de cada uno de los residuos generados en el presente proyecto de investigación se realizó de acuerdo con lo señalado en el Reglamento Interno de Seguridad e Higiene de la Facultad de Ciencias Químicas-UANL.

- **A:** soluciones de sales inorgánicas, ácidos y bases neutralizados.
- **B:** sólidos inorgánicos.
- **C:** compuestos y disolventes orgánicos no halogenados.
- **D:** compuestos y disolventes orgánicos halogenados.
- **E:** muy tóxico, cancerígeno orgánico.
- **G:** sólidos orgánicos.
- Vidrio impregnado de sustancias químicas.
- Plástico impregnado con sustancias químicas.
- Basura industrial.

Los residuos biológicos que se manejaron se dispusieron en diversos contenedores;

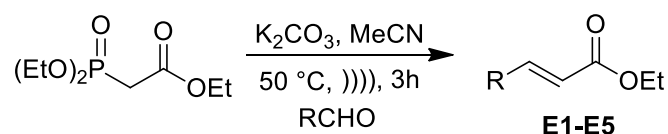
- Contenedor rojo: Residuos punzocortantes biológico-infeccioso
- Contenedor amarillo: Residuos patológicos (órganos, tejidos, células biológico-infecciosas).

El material físico restante reusable se esterilizó mediante calor húmedo.

## 4.2 Métodos sintéticos

### 4.2.1 Procedimiento general para la preparación de etil ésteres E1-E5.

Para la síntesis de etil ésteres se llevó a cabo la reacción Horner-Wadsworth-Emmons (Esquema 5) utilizando trietilfosfonoacetato de etilo y diferentes aldehídos aromáticos (benzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído, *p*-clorobenzaldehído, *p*-bromobenzaldehído, y *p*-metoxibenzaldehído), carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ) como base y acetonitrilo ( $CH_3CN$ ) como disolvente en un baño de ultrasonido como fuente de activación; obteniéndose así los compuesto **E1-E5**.

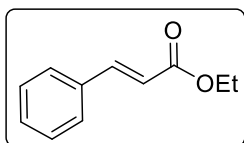


**Esquema 5.** Síntesis de ésteres

En un matraz redondo de 250 mL se colocó trietilfosfonoacetato (1.0 Eq), el aldehído aromático correspondiente (benzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído, *p*-clorobenzaldehído, *p*-bromobenzaldehído, *p*-nitrobenzaldehído y *p*-metoxibenzaldehído) (0.9 Eq),  $K_2CO_3$  (3.0 Eq) y  $CH_3CN$  (20 mL), se tapó y se colocó en el baño de ultrasonido durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo se agregaron de 15-20 mL de agua para eliminar el carbonato de potasio, posteriormente se realizaron extracciones con AcOEt (3 x 30 mL); la fase

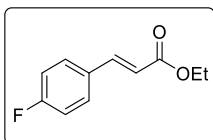
orgánica se secó utilizando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, posteriormente ésta se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla de disolventes Hex:AcOEt (9:1, v/v).

#### 4.2.1.1 Preparación del compuesto E1.



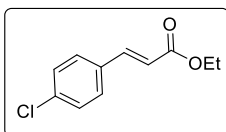
Siguiendo el procedimiento general, se hizo reaccionar 1 g (4.46 mmol) de trietilfosfonoacetato, 0.42 g (4.01 mmol) de benzaldehído y 1.84 g (13.4 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 20 mL de CH<sub>3</sub>CN. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna usando un sistema Hex:AcOEt (9:1).

#### 4.2.1.2 Preparación del compuesto E2.



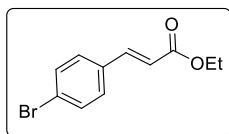
Siguiendo el procedimiento general, se hizo reaccionar 1g (4.46 mmol) de trietilfosfonoacetato, 0.49 g (4.01 mmol) de *p*-fluorobenzaldehído y 1.84 g (13.4 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 20 mL de CH<sub>3</sub>CN. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna usando un sistema Hex:AcOEt (9:1).

#### 4.2.1.3 Preparación del compuesto E3.



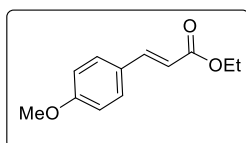
Siguiendo el procedimiento general, se hizo reaccionar 1g (4.46mmol) de trietilfosfonoacetato, 0.49 g (4.01 mmol) de *p*-clorobenzaldehído y 1.84 g (13.4 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 20 mL de CH<sub>3</sub>CN. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna usando un sistema Hex:AcOEt (9:1).

#### 4.2.1.4 Preparación del compuesto E4.



Siguiendo el procedimiento general, se hizo reaccionar 1g (4.46 mmol) de trietilfosfonoacetato, 0.74 g (4.01 mmol) de *p*-bromobenzaldehído y 1.84 g (13.4 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 20 mL de CH<sub>3</sub>CN. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna usando un sistema Hex:AcOEt (9:1).

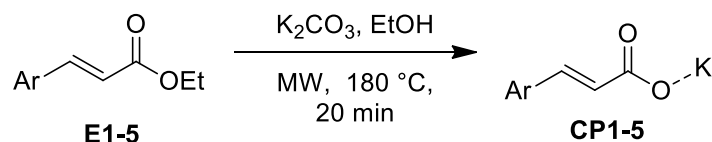
#### 4.2.1.5 Preparación del compuesto E5.



Siguiendo el procedimiento general, se hizo reaccionar 1g (4.46 mmol) de trietilfosfonoacetato, 0.54 g (4.01 mmol) de *p*-metoxibenzaldehído y 1.84 g (13.4 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 20 mL de CH<sub>3</sub>CN. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna usando un sistema Hex:AcOEt (9:1).

#### 4.2.2 Procedimiento general para la preparación de cinamatos de potasio CP1 – CP5

Para la obtención de los carboxilatos de potasio se realizó una hidrólisis básica asistida por microondas (Esquema 6) empleando carbonato de potasio como base, EtOH como disolvente a una velocidad de agitación (600 rpm), temperatura (180 °C) y tiempo (20 min).

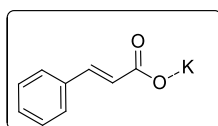


**Esquema 6.** Preparación de cinamatos de potasio.

En un vial de microondas de 10 mL provisto de un agitador magnético se adicionó el éster correspondiente (**E1-E5**) (1 Eq), carbonato de potasio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (1 Eq) como base y 4 mL de etanol (EtOH) como disolvente. El vial se llevó al equipo de microondas ajustándose los parámetros de reacción. Se monitoreó la reacción mediante cromatografía en capa fina para comprobar la formación del carboxilato usando una mezcla de AcOEt:Hex (1:1, v/v).

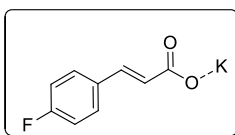
La mezcla de reacción se transfirió a un vaso de precipitado de 100 mL, enseguida se adicionaron 50 mL de metanol para solubilizar el carboxilato, se filtró a vacío usando tierra de diatomeas para retener el carbonato de potasio. El licor madre se concentró por evaporación a presión reducida hasta la formación de un sólido, el crudo de reacción se purificó por filtración a vacío realizando lavados con 30 mL de etanol.

#### 4.2.2.1 Preparación del compuesto CP1.



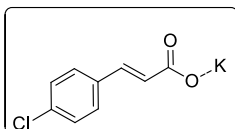
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.3 g (1.7 mmol) de cinamato de etilo; 0.28 g (1.7 mmol) de carbonato de potasio y 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.2.2 Preparación del compuesto CP2.



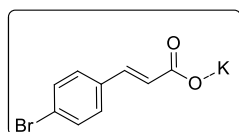
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.35 g (1.8 mmol) de 4-fluorocinamato de etilo; 0.25 g (1.8 mmol) de carbonato de potasio y 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.2.3 Preparación del compuesto CP3.



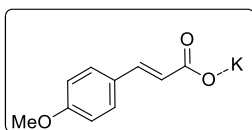
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.3 g (1.4 mmol) de 4-clorocinamato de etilo; 0.19 g (1.4 mmol) de carbonato de potasio y 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.2.4 Preparación del compuesto CP4.



Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.3 g (1.0 mmol) de 4-bromocinamato de etilo; 0.14 g (1.0 mmol) de carbonato de potasio y 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.2.5 Preparación del compuesto CP5.



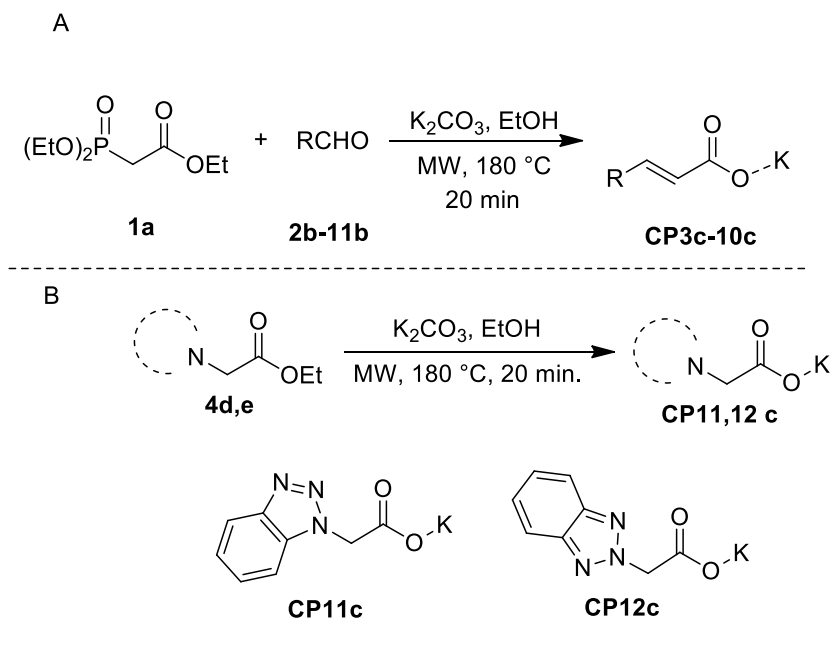
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.3 g (1.4 mmol) de 4-metoxicinamato de etilo; 0.2 g (1.4 mmol) de carbonato de potasio y 4 mL de etanol como disolvente.



### 4.2.3 Procedimiento general para la preparación de carboxilatos de potasio en un solo paso CP3c-12c.

Para la obtención de los carboxilatos de potasio en un solo paso (Esquema 7-A) se empleó trietilfosfonoacetato de etilo y diferentes aldehídos aromáticos (*p*-benzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído, *p*-clorobenzaldehído, *p*-bromobenzaldehído, *p*-nitrobenzaldehído, *p*-metoxibenzaldehído, *p*-benziloxibenzaldehído, 2-benzotiazolcarboxaldehído), mientras que para la obtención de carboxilatos de potasio en un solo paso (Esquema 7-B) se empleó ésteres de benzotriazolil. Para ambos casos se empleó carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ) como base y etanol (EtOH) como disolvente. La reacción se llevó a cabo por irradiación de microondas bajo las siguientes condiciones, velocidad de agitación (600 rpm), temperatura (180 °C) y tiempo (20 min); obteniéndose así los compuestos.

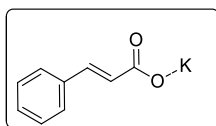
#### Esquema 7. Síntesis de carboxilatos de potasio



En un vial de microondas de 10 mL provisto de un agitador magnético se adicionó trietilfosfonoacetato (1 Eq), diferentes aldehídos aromáticos (0.9 Eq) o en su caso, éster de benzotriazolil, carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ) (3 Eq) como base y 4 mL de etanol (EtOH) como disolvente. El vial se llevó al equipo de microondas ajustándose los parámetros de reacción. Se realizó monitoreo de la reacción mediante cromatografía en capa fina para comprobar la formación del carboxilato usando una mezcla de AcOEt/Hex/MeOH (1:1:3, v/v).

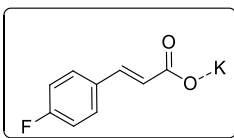
La mezcla de reacción se transfirió a un tubo cónico de 25 mL de capacidad usando 10 mL de metanol, posteriormente se dejó en refrigeración por 30 min para favorecer la precipitación del carbonato de potasio, enseguida se filtró a vacío usando tierra de diatomeas para retener el carbonato de potasio. El licor madre se concentró por evaporación a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por filtración a vacío realizando lavados con etanol y mediante purificación por cromatografía en columna (para algunos casos) usando un sistema AcOEt/Hex/MeOH (1:1:3, v/v) para obtener así los correspondientes carboxilatos de potasio.

#### 4.2.3.1 Preparación del compuesto CP3c.



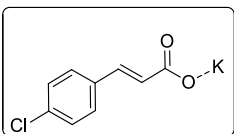
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (2.2 mmol) de trietilfosfonoacetato; 0.21 g (2.0 mmol) de benzaldehído; 0.92 g (6.6 mmol) carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.3.2 Preparación del compuesto CP4c



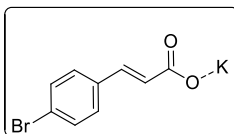
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (2.2 mmol) de trietilfosonoacetato; 0.25 g (2.0 mmol) de *p*-fluorbenzaldehído; 0.92 g (6.6 mmol) carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.3.3 Preparación del compuesto CP5c.



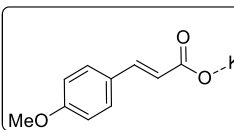
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (2.2 mmol) de trietilfosonoacetato; 0.28 g (2.0 mmol) de *p*-clorobenzaldehído; 0.92 g (6.6 mmol) de carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.3.4 Preparación del compuesto CP6c.



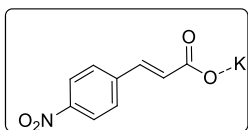
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (2.2 mmol) de trietilfosonoacetato; 0.37 g (2.0 mmol) de *p*-bromobenzaldehído; 0.92 g (6.6 mmol) de carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.3.5 Preparación del compuesto CP7c.



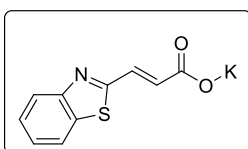
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (2.2 mmol) de trietilfosonoacetato; 0.27 g (2.0 mmol) de *p*-metoxibenzaldehído; 0.92 g (6.6 mmol) de carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.3.6 Preparación del compuesto CP8c.



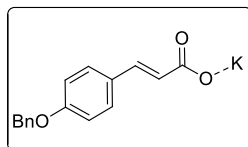
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (2.2 mmol) de trietilfosfonoacetato; 0.3 g (2.0 mmol) de *p*-nitrobenzaldehído; 0.92 g (6.6 mmol) de carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.3.7 Preparación del compuesto CP9c.



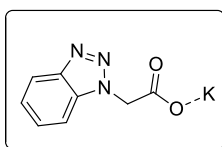
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.27 g (1.2 mmol) de trietilfosfonoacetato; 0.2 g (1.2 mmol) de 2-benzotiazolcarboxaldehído; 0.5 g (3.6 mmol) de carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.3.8 Preparación del compuesto CP10c.



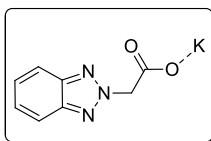
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (2.2 mmol) de trietilfosfonoacetato; 0.3 g (2.0 mmol) de *p*-beniloxibenzaldehído; 0.92 g (6.6 mmol) de carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.3.9 Preparación del compuesto CP11c.



Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (2.2 mmol) de 2H-benzotriazolil-acetato de etilo; 0.92 g (6.6 mmol) de carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

#### 4.2.3.9 Preparación del compuesto CP12c.

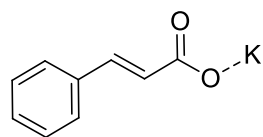


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (2.2 mmol) de 1H-benzotriazolil-acetato de etilo; 0.92 g (6.6 mmol) de carbonato de potasio en 4 mL de etanol como disolvente.

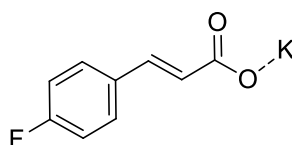
#### 4.3 Pruebas de actividad citotóxica y antituberculosa.

Para cumplir con este objetivo, se seleccionaron diez carboxilatos de potasio etiquetados como **CP3c-CP12c** (Figura 14), las diferencias estructurales radican en el anillo aromático, las cuales incluyen heteroátomos y sustituyentes en posición para.

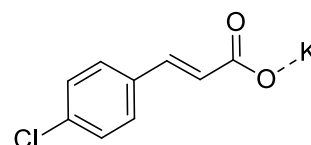
**Figura 14.** Estructuras de las moléculas seleccionadas para actividad antituberculosa.



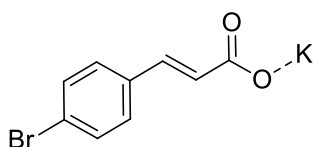
**CP3c**  
Cinamato de potasio



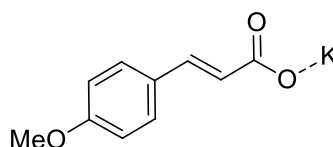
**CP4c**  
4-Fluorocinamato de potasio



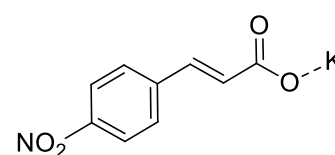
**CP5c**  
4-Clorocinamato de potasio



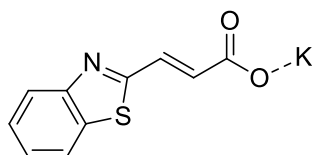
**CP6c**  
4-Bromocinamato de potasio



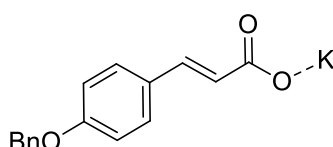
**CP7c**  
4-Metoxicinamato de potasio



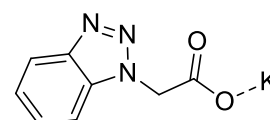
**CP8c**  
4-Nitrocinamato de potasio



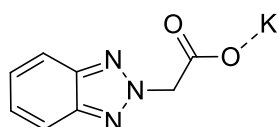
**CP9c**  
2-Benzotiazol carboxilato de potasio



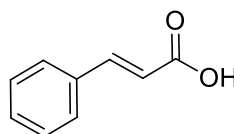
**CP10c**  
4-Benciloxicinamato de potasio



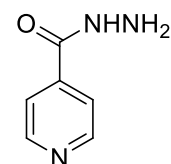
**CP11c**  
1H-Benzotriazol carboxilato de potasio



**CP12c**  
2H-Benzotriazol carboxilato de potasio



Ácido cinámico



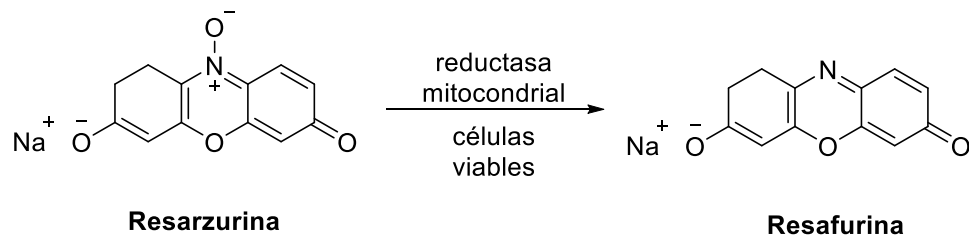
Isoniazida

### 4.3.1 Evaluación de la actividad antituberculosa.

La técnica de microdilución en placa de Alamar Azul (MABA) fue seleccionada para evaluar la actividad de las moléculas (Figura 15), el fundamento de esta técnica se basa en una reacción oxido-reducción bacteriana, a partir de

resazurina, el principal componente de Alamar Azul el cual cambia de color azul cuando se encuentra en su estado oxidado a un color rosa intenso cuando se reduce a resafurina en ambientes reductores como es el caso del metabolismo de *Mycobacterium*, indicándonos la viabilidad de la célula.

**Figura 145.** Reducción de Resazurina a Resafurina en células viables.



#### 4.3.1.1 Selección de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

La cepa de estudio fue H37Rv sensible a los fármacos de primera línea

#### 4.3.1.2 Preparación de los compuestos de prueba.

Se prepararon soluciones stock de 1 mg/mL para cada uno de los compuestos a evaluar.

1. Se pesaron 2 mg de compuesto en un vial de plástico.
2. Se adicionaron 50  $\mu$ L de DMSO para disolver los compuestos.
3. Se adicionaron 1950  $\mu$ L de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC.

Una vez esterilizados los compuestos como se describe más adelante, se preparó la concentración inicial de 250 µg/mL. En un vial de plástico de 2 mL se adicionaron 250 µL de la solución stock y 750 µL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC para completar un volumen de 1 mL, esta metodología se realizó en condiciones de esterilidad. Esta concentración se usó para las diluciones seriadas de cada uno de los compuestos respectivamente.

#### **4.3.1.3 Técnica de manipulación celular y evaluación de la densidad óptica.**

Los dos mL de solución stock se hicieron pasar a través de un filtro de PTFE con un diámetro de poro de 0.45 µm, el filtrado se colectó en un vial nuevo estéril, este procedimiento se realizó para cada uno de los compuestos de prueba.

#### **4.3.1.4 Preparación de la suspensión de trabajo.**

La cepa de trabajo fue *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv la cual se incubó de tres a cuatro semanas en el medio Lowenstein-Jensen a 37 °C.

Pasado el tiempo de incubación se tomaron colonias y se suspendieron en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC, se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una turbidez equiparable al estándar No. 1 de la escala de McFarland. Posteriormente se preparó la suspensión de trabajo a una concentración de  $6 \times 10^6$  UFC/mL (dilución 1:50).

#### **4.3.1.5 Ensayo de microdilución en placa de Alamar Azul.**

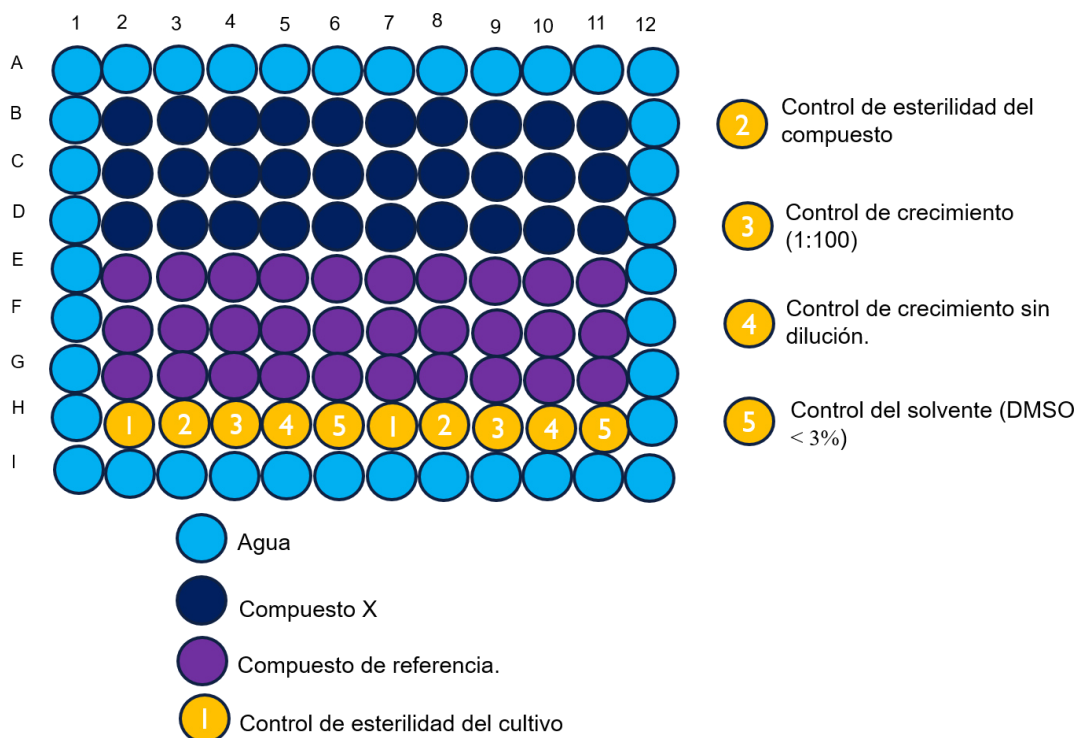
Se utilizaron placas de 96 pozos para la determinación de la susceptibilidad micobacteriana (Figura 16). Se probó un compuesto por placa y por triplicado, usando 10 concentraciones seriadas entre 125-0.24 µL para todos los compuestos, para el compuesto de referencia Isoniazida se usaron



concentraciones seriadas en un rango de 0.015-7.68  $\mu\text{L}$ . En la periferia de la placa se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de agua para evitar la deshidratación del medio. Al resto de los pozos se les colocó 100  $\mu\text{L}$  de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC, posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución de prueba al pozo marcado con la mayor concentración y a partir de este se realizaron las diluciones seriadas. Una vez completadas las diluciones se procedió a adicionar 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de trabajo de las micobacterias.

Para cada ensayo se utilizó un control de esterilidad del medio adicionando en un pozo 200  $\mu\text{L}$  de medio Middlebrook 7H9, un control de esterilidad de los compuestos adicionando 200  $\mu\text{L}$  del compuesto de mayor concentración (125  $\mu\text{L}$ ), un control de crecimiento adicionando 200  $\mu\text{L}$  del inóculo de trabajo sin antibiótico, un control de crecimiento al 1% de la población bacilar adicionado 200  $\mu\text{L}$  de inóculo diluido 1:100 y un control del DMSO adicionado 200  $\mu\text{L}$  de DMSO al 3%. Todos estos controles se realizaron por duplicado.

**Figura 156.** Diseño de placa para ensayo de Alamar Azul.

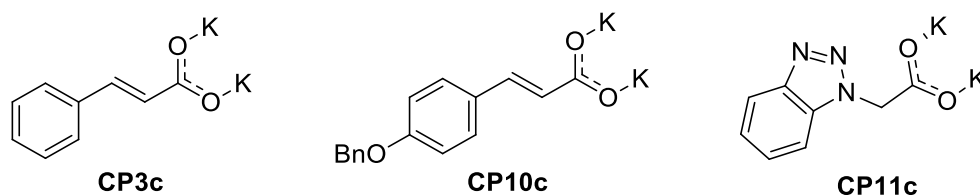


La placa se cerró, se selló con parafilm y se introdujo en una bolsa de plástico para su incubación a 37 °C durante 5 días, al término de este tiempo se adicionaron 20  $\mu$ L del reactivo Alamar Azul y 12  $\mu$ L de tween 80 al 20% v/v.

### 4.3.2 Estudios citotóxicos.

Para determinar la actividad citotóxica se seleccionaron los compuestos con mayor actividad antituberculosa (1.95  $\mu\text{g/mL}$ ), estos compuestos están etiquetados como **CP3c**, **CP10c**, **CP11c** los cuales se observan en la figura 17, se prepararon diluciones seriadas mayores a la concentración mínima inhibitoria, que abarcan concentraciones de 200  $\mu\text{g/mL}$  a 6.25  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 17.** Estructuras de moléculas evaluadas.



#### 4.3.2.1 Preparación de los compuestos de prueba.

Para obtener las diferentes diluciones de prueba de los compuestos, se preparó una solución stock de 2 mg/mL en medio de cultivo esencial (MEM). Se pesaron 2 mg del compuesto y se adicionaron a 1 mL de medio para su disolución, posteriormente se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de esta solución y se adicionaron a 900  $\mu\text{L}$  de medio para obtener una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$ , de la solución de 200  $\mu\text{g/mL}$  se tomaron 500  $\mu\text{L}$  y se adicionaron a 500  $\mu\text{L}$  de medio para obtener una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ , este procedimiento se repitió hasta obtener todas las concentraciones. Una vez obtenidas las concentraciones, estas fueron esterilizadas por filtración, se utilizó membranas de Millipore® con tamaño de poro de 0.02  $\mu\text{m}$ .

#### **4.3.2.3 Determinación de la citotoxicidad *in vitro* de los compuestos en estudio por la técnica WST-1.**

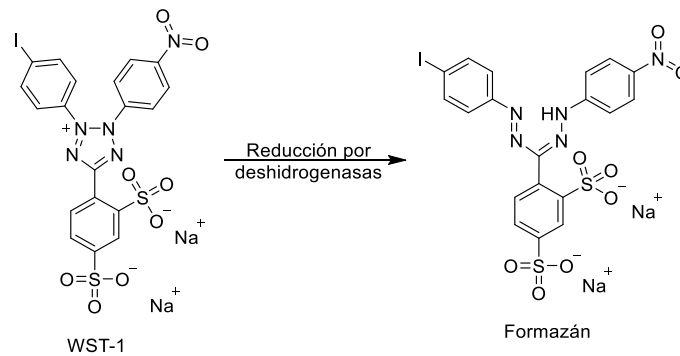
Se realizaron tres ensayos independientes (diferentes días) con cuatro replicas cada ensayo. Se utilizó un cultivo confluyente de la línea celular Vero (ATCC: CCL-81) para obtener la suspensión celular de trabajo utilizando tripsina al 0.5 %. Se preparó una suspensión celular para colocar 5,000 células (100  $\mu$ L/pozo) en cada pozo de la microplaca. La placa se incubó 24 horas a 37 °C, bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Pasado el tiempo de incubación, se adicionaron los compuestos en sus diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.2  $\mu$ g/mL) por triplicado para su posterior incubación por 24 horas a 37 °C, bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. En este ensayo se utilizaron como controles, medio de cultivo y Triton X (Figura 18).



El ensayo de WST-1 [2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio] fue seleccionado ya que nos permite analizar de forma directa la viabilidad celular a través de sus deshidrogenasas mitocondriales, ya que estas se producen de forma natural en células viables. Las sales de tetrazolium WST-1 son reducidas a sales de formazán por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, observándose un cambio de color, lo cual no ocurriría en células no viables (Figura 19).

**Figura 179.** Reducción del WST-1.



## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

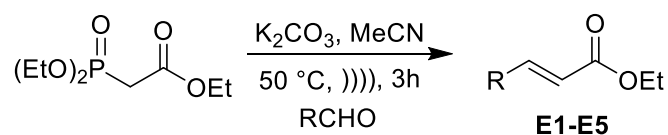
En este capítulo se muestran los resultados de la síntesis, caracterización y purificación de los etil ésteres (**E1–E5**), así como de los carboxilatos de potasio (**CP1–CP5**, **CP3c–CP12c**), y la respectiva evaluación biológica de los carboxilatos.

#### 5.1 Síntesis orgánica

##### 5.1.1 Síntesis y purificación de etil ésteres E1-E5

Para la síntesis de los etil ésteres se llevó a cabo la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (Esquema 8), haciendo reaccionar el trietilfosfonoacetato con el aldehído correspondiente (benzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído, *p*-clorobenzaldehído, *p*-bromobenzaldehído, y *p*-metoxibenzaldehído) en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base y acetonitrilo como disolvente, usando ultrasonido a 50 °C durante 3 horas.

**Esquema 8.** Síntesis de ésteres



La mezcla de reacción no mostró cambio de coloración al tiempo cero, eventualmente la mezcla de reacción fue tomando una coloración amarilla. Terminando las tres horas de reacción se realizó un monitoreo por cromatografía en capa fina usando una mezcla de disolventes Hex:AcOEt (9:1, v/v) para asegurarse que se hubiera formado el etil éster correspondiente.

En la tabla 6 podemos observar que los compuestos obtenidos se obtuvieron como líquidos amarillos, en donde los compuestos **E2 y E5** mostraron el mayor y menor porcentaje de rendimiento químico, respectivamente. Debido a que los productos presentan un factor de retención cercano a una de las materias primas (aldehído correspondiente) fue complicado aislarlos en su totalidad; es decir, el rendimiento mostrado se calculó considerando que el producto únicamente corresponde al compuesto puro, sin considerar la presencia del aldehído sin reaccionar.

**Tabla 6.** Resultados de la síntesis de los ésteres.

Compuesto	Aldehído	Rend. (%)	Apariencia
<b>E1</b>	Benzaldehído	49	Líquido amarillo
<b>E2</b>	<i>p</i> -Fluorbenzaldehído	83	Líquido amarillo
<b>E3</b>	<i>p</i> -Clorobenzaldehído	78	Líquido amarillo
<b>E4</b>	<i>p</i> -Bromobenzaldehído	62	Líquido amarillo
<b>E5</b>	<i>p</i> -Metoxibenzaldehído	18	Líquido amarillo

La purificación de estos compuestos se realizó por cromatografía en columna, usando una mezcla de disolventes Hex: AcOEt (9:1, v/v).



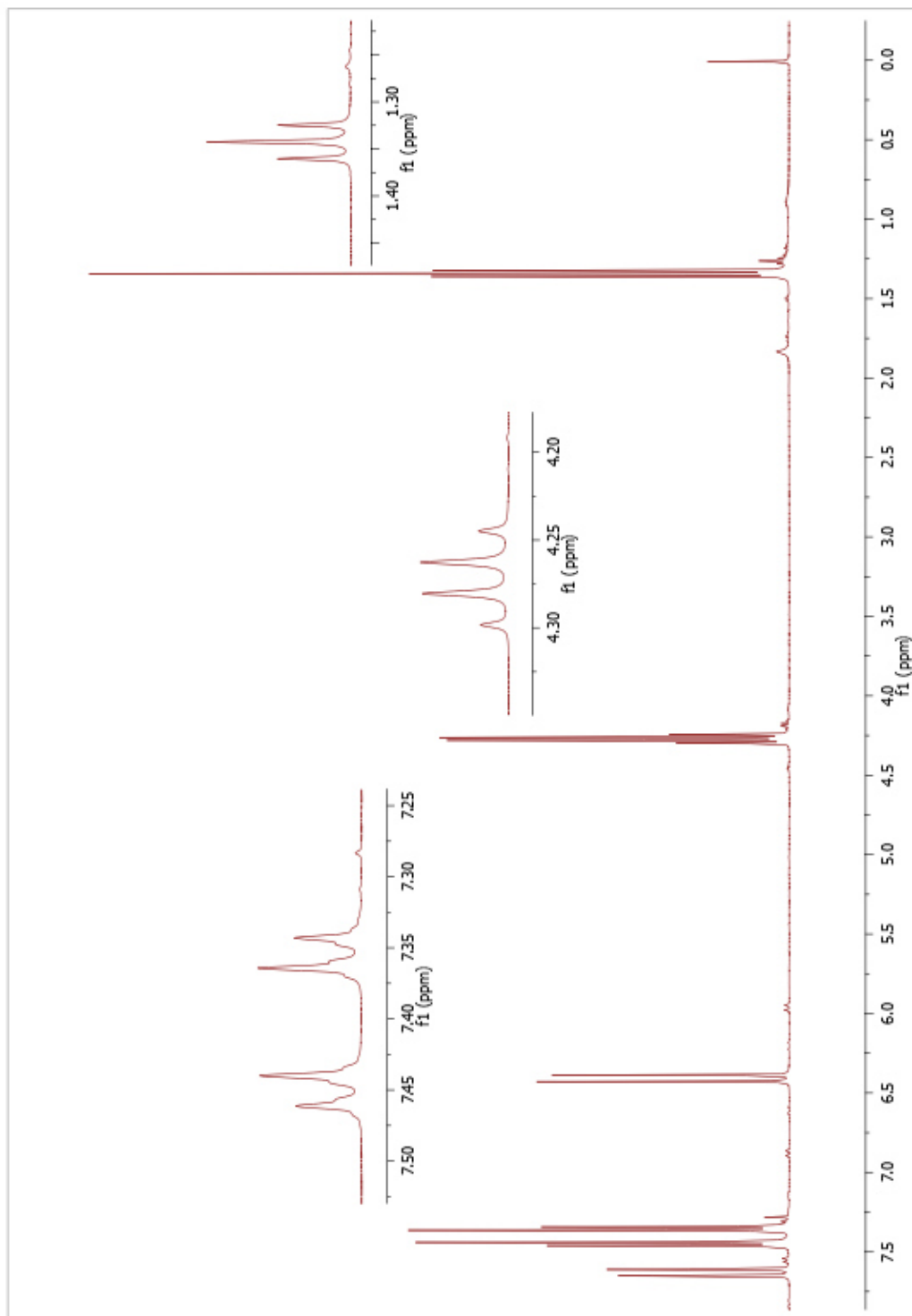
### 5.1.1.1 Caracterización de etil ésteres E1-E5

Los compuestos obtenidos se caracterizaron por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . A continuación, se muestra la asignación estructural del compuesto **E3** (Figura 20) y las diferencias que se presentaron en el resto de los compuestos.

Para el compuesto **E3**, en un desplazamiento químico de 1.34 ppm se observa una señal triple, con una constante de acoplamiento de 7.1 Hz que integra para tres protones (3H) que corresponde a los tres protones del metilo unido al metileno ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); en 4.27 ppm se observa un cuarteto, con una constante de acoplamiento de 7.1 Hz que integra para dos protones (2H) y corresponden a los protones de metileno unido al metilo ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); en 6.41 ppm se observa una señal doble, con una constante de acoplamiento de 16.0 Hz que integra para un protón (1H) que corresponde al metino en posición *trans* unido al carbonilo ( $\text{CHC}=\text{O}$ ); en 7.35 se observa una señal doble con constante de acoplamiento de 8.5 Hz la cual integran para dos protones (2H) que corresponden a los protones aromáticos en posición *meta* ( $\text{H}_{\text{arom } m\text{-CH}}$ ); en 7.45 ppm se observa una señal doble con constante de acoplamiento de 8.5 Hz la cual integra para dos protones (2H) que corresponden a los protones aromáticos en posición *orto* ( $\text{H}_{\text{arom } o\text{-CH}}$ ) y en 7.63 ppm observamos una señal doble con constante de acoplamiento de 16.0 Hz que integra para un protón del metino en posición *trans* unido al anillo aromático ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CH}$ ). El resumen de estos resultados se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Elucidación estructural en RMN  $^1\text{H}$  de **E3**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Integración	Asignación	$J$ (Hz)
1.34	t	3H	$\text{OCH}_2\text{CH}_3$	7.1
4.27	c	2H	$\text{OCH}_2\text{CH}_3$	7.1
6.41	d	1H	$\text{CHC}=\text{O}$	16.0
7.35	d	2H	$\text{H}_{\text{arom } m\text{-CH}}$	8.5
7.45	d	2H	$\text{H}_{\text{arom } o\text{-CH}}$	8.5
7.63	d	1H	$\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CH}$	16.0

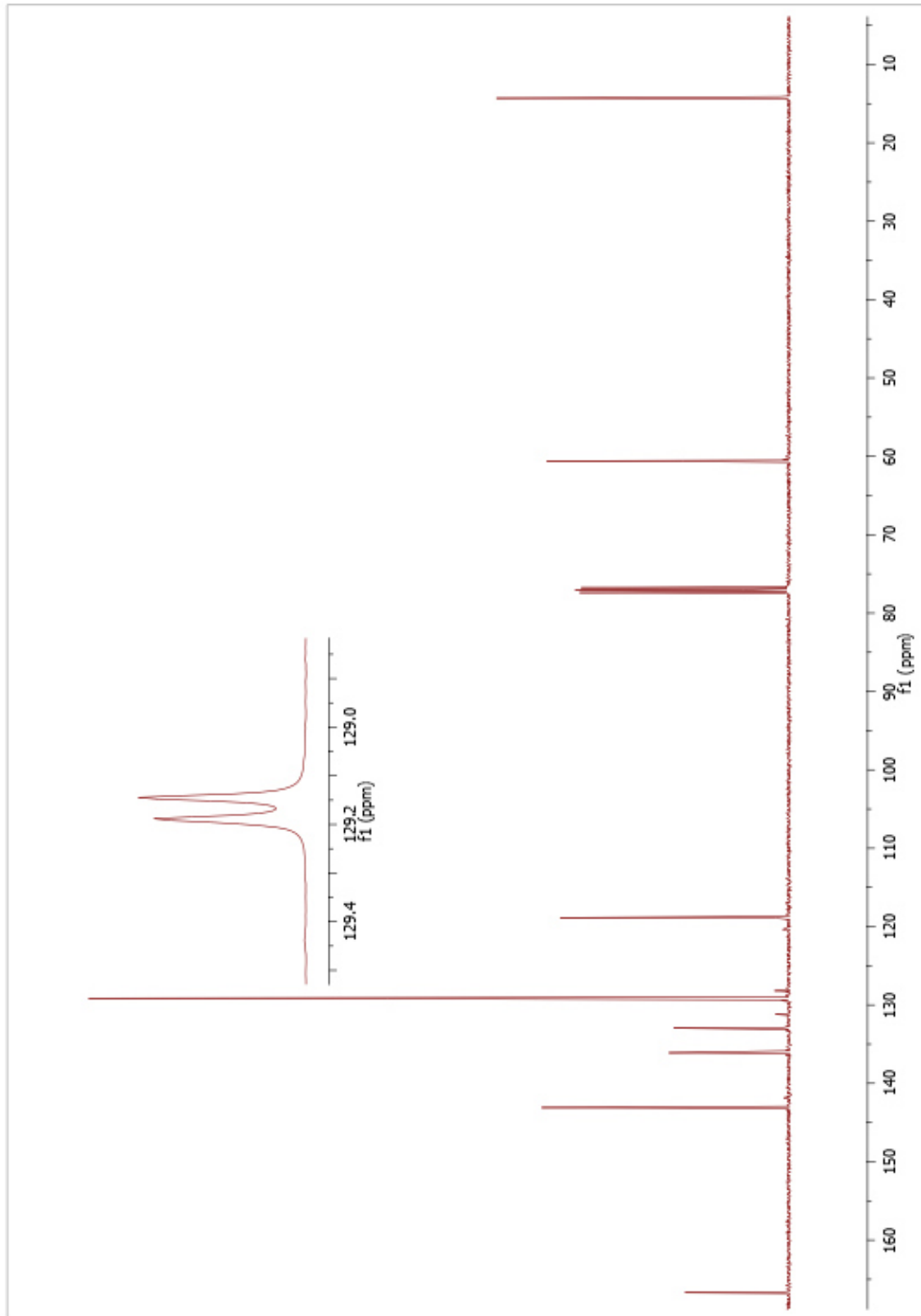


**Figura 18.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **E3**

Por otra parte, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 21) se observan las nueve señales de los carbonos correspondientes al compuesto **E3**. En un desplazamiento de 14.3 ppm la señal corresponde al carbono del metilo ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); en 60.6 ppm la señal corresponde al carbono del metileno ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); en 118.9 la señal pertenece al carbono vinílico unido al carbonilo ( $\text{CHC}=\text{O}$ ); en 129.1 ppm la señal corresponde a dos carbonos en posición *meta* ( $\text{C}_{\text{arom } m\text{-CH}}$ ); en 129.2 ppm la señal corresponde a dos carbonos aromáticos en posición *orto* ( $\text{C}_{\text{arom } o\text{-CH}}$ ); en 132.9 ppm la señal corresponde al carbono *ipso* ( $\text{C}_{\text{arom } i\text{-CH}}$ ); en 136.1 la señal corresponde a dos carbonos en posición *para* ( $\text{C}_{\text{arom } p\text{-CH}}$ ); en 143.1 ppm la señal corresponde al carbono vinílico unido al anillo aromático ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ ) y en 166.7 la señal corresponde al carbono del carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ). El resumen de estos resultados se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8.** Elucidación estructural en RMN  $^{13}\text{C}$  de **E3**

$\delta$ (ppm)	Asignación
14.3	$\text{OCH}_2\text{CH}_3$
60.6	$\text{OCH}_2\text{CH}_3$
118.9	$\text{CHC}=\text{O}$
129.1	$\text{C}_{\text{arom } m\text{-CH}}$
129.2	$\text{C}_{\text{arom } o\text{-CH}}$
132.9	$\text{C}_{\text{arom } i\text{-CH}}$
136.1	$\text{C}_{\text{arom } p\text{-CH}}$
143.1	$\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$
166.7	$\text{C}=\text{O}$



**Figura 191.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **E3**

A continuación, se presentan las diferencias estructurales para las moléculas **E1**, **E2**, **E4**, **E5**. Las señales que se conservan en los espectros son las que encontramos en un desplazamiento químico alrededor de 1.34 - 1.40 ppm que corresponde a una señal triple, con una constante de acoplamiento de 7.1 Hz que integra para tres protones (3H) que corresponde a los tres protones del metilo unido al metileno ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) y la que encontramos alrededor de 4.27 – 4.35 ppm correspondiente a un cuarteto, con una constante de acoplamiento de 7.1 Hz que integra para dos protones (2H) y corresponden a los protones de metileno unido al metilo ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). También se conserva las señales características de la parte vinílica, donde observamos señales dobles alrededor de 6.41 y 7.63 ppm.

Para la molécula **E1** se observa una señal múltiple y una señal doble en la región aromática ya que este no está para disustituido por lo que la señal doble integra para tres protones en comparación de las moléculas paradisustituidas, en la molécula **E2** se observan señales adicionales a las características de los aromáticos paradisustituidos ya que el Flúor, al tener un espín de  $\frac{1}{2}$ , los protones cercanos a este se acoplan generando estas nuevas señales, como lo es un doble de dobles alrededor de 7.10 y 7.60 ppm, este mismo fenómeno ocurrirá para  $^{13}\text{C}$ . Para **E4** y **E5**, conservan las señales para las moléculas paradisustituidas.

### 5.1.2 Síntesis y purificación de cinamatos de potasio CP1 – CP5

Para la obtención de los carboxilatos de potasio se realizó una hidrólisis básica de los ésteres **E1-E5** (Esquema 7). En un vial de microondas de 10 mL provisto de agitador magnético, se adicionó el etil éster correspondiente (cinamato de etilo, 4-fluorocinamato de etilo, 4-clorocinamato de etilo, 4-bromocinamato de etilo, 4-metoxicinamato de etilo) en presencia de  $K_2CO_3$  como base y etanol como disolvente. El vial se llevó al equipo de microondas ajustando los parámetros.

El etil éster fue soluble en etanol por lo que la mezcla inicial era una solución de color ligeramente amarilla-café, pasado el tiempo de reacción el vial se sacó del equipo observándose un sólido de color blanco. Se utilizaron 10 mL de metanol para solubilizar el compuesto y transferir todo el contenido del vial a un tubo cónico de 25 mL el cual se llevó a refrigeración por 30 min para promover la precipitación del carbonato de potasio. Trascurrido el tiempo se filtró a vacío usando tierra de diatomeas para retener los residuos de carbonato presentes, una vez filtrado el licor madre se evaporó a presión reducida hasta sequedad obteniéndose sólidos blancos.

En la tabla 9 podemos observar que los compuestos **CP4** y **CP1** muestran el mayor y menor porcentaje de rendimiento químico respectivamente.

**Tabla 9.** Resultados de la síntesis de los ésteres.

<b>Compuesto</b>	<b>Aldehído</b>	<b>Rend. (%)</b>	<b>Apariencia</b>
<b>CP1</b>	Cinamato de etilo	81	sólido blanco
<b>CP2</b>	4-Fluorocinamato de etilo	83	sólido blanco
<b>CP3</b>	4-Clorocinamato de etilo	93	sólido blanco
<b>CP4</b>	4 -Bromocinamato de etilo	97	sólido blanco
<b>CP5</b>	4-Metoxicinamato de etilo	95	sólido blanco

Para la purificación de los carboxilatos no se realizó cromatografía en columna ya que solo se realizaron lavados con etanol para eliminar el resto de etil éster que no se hidrolizó. Sin embargo, se realizó cromatografía en capa fina utilizando una mezcla de disolventes de AcOEt, Hex, MeOH (1:1:3, v/v). Para asegurar que el carboxilato estaba libre de etil éster, si aún se observaba presencia de etil éster se realizaban más lavados con etanol.

#### **5.1.2.1 Caracterización de cinamatos de potasio CP1 – CP5**

Los compuestos obtenidos se caracterizaron por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y EMAR (espectrometría de masas de alta resolución) A continuación, se muestran la asignación estructural del compuesto **CP3** y las diferencias que se presentaron en el resto de los compuestos.

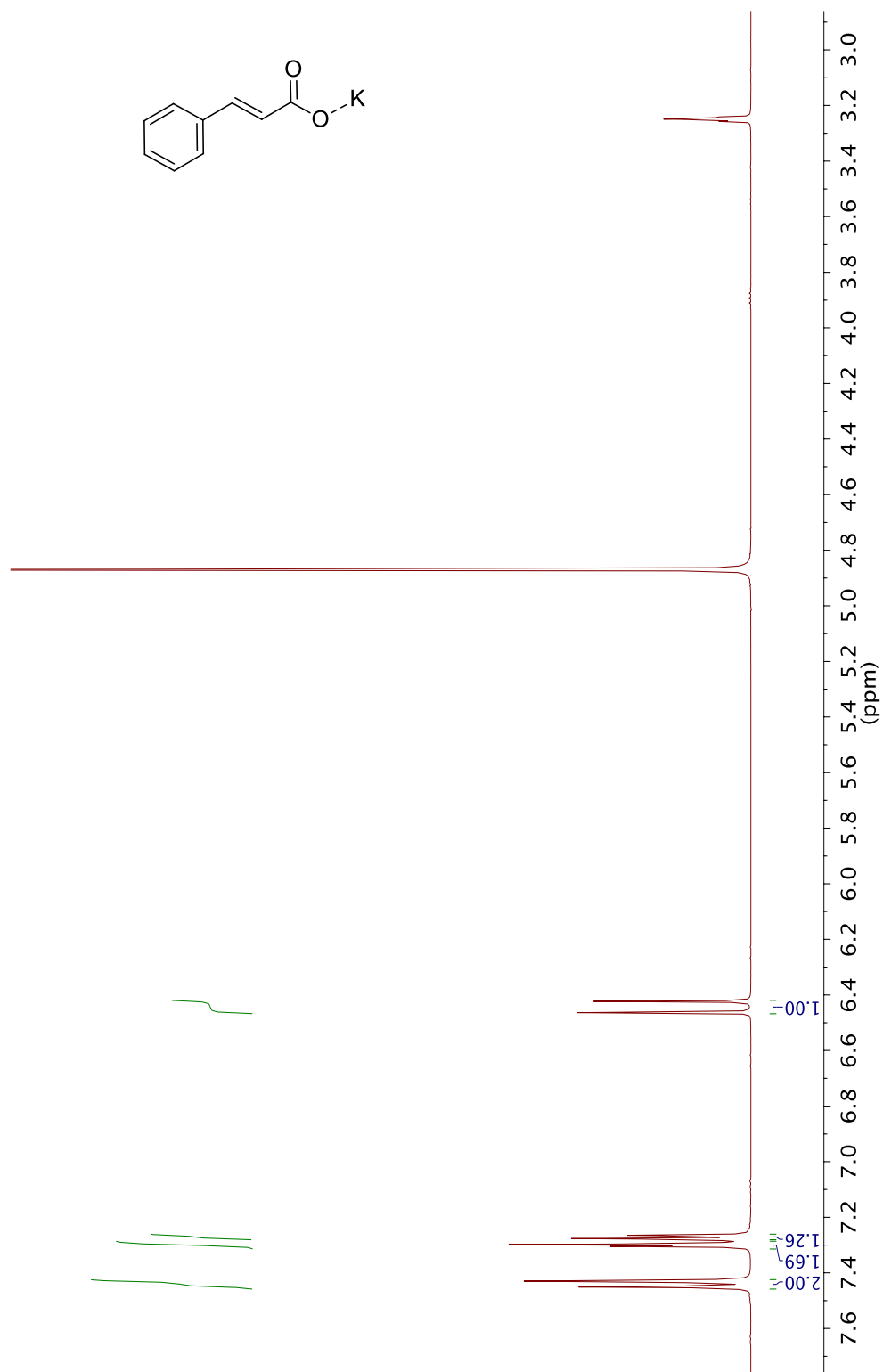
En la figura 22 se muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , donde se observan las señales correspondientes al compuesto **CP3**.



En un desplazamiento químico de 6.42 ppm se observa una señal doble, con una constante de acoplamiento de 16.0 Hz que integra para un protón (1H) que corresponde al metino en posición *trans* unido al carbonilo (**CHC=O**); en 7.26 se observa una señal doble con constante de acoplamiento de 16.0 Hz la cual integran para un hidrógeno (1H) que corresponde al protón del metino en posición *trans* unido al anillo aromático (**C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH**); en 7.30 ppm se observa una señal doble con constante de acoplamiento de 8.5 Hz la cual integra para dos protones (2H) que corresponden a los protones aromáticos (**H<sub>arom</sub>**) y en 7.43 ppm observamos una señal doble con constante de acoplamiento de 8.5 Hz que integra para dos protones del anillo aromático (**H<sub>arom</sub>**). El resumen de estos resultados se muestra en la tabla 10.

**Tabla 10.** Elucidación estructural en RMN <sup>1</sup>H de **CP3**

<b>δ (ppm)</b>	<b>Multiplicidad</b>	<b>Integración</b>	<b>Asignación</b>	<b>J (Hz)</b>
<b>6.42</b>	d	1H	<b>CHC=O</b>	16.0
<b>7.26</b>	d	1H	<b>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH</b>	16.0
<b>7.30</b>	d	2H	<b>H<sub>arom</sub></b>	8.5
<b>7.43</b>	d	2H	<b>H<sub>arom</sub></b>	8.5

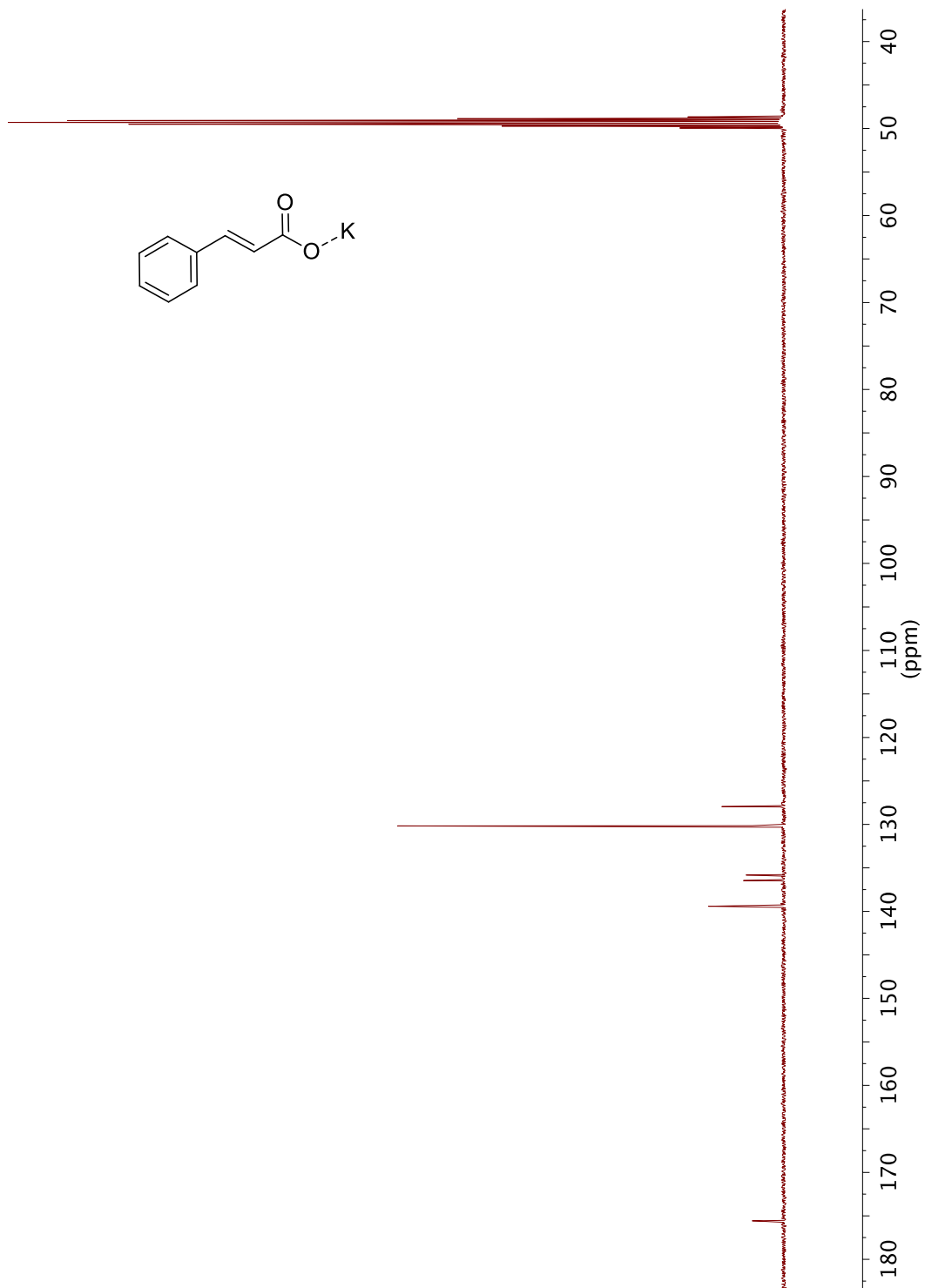


**Figura 202.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **CP3**

Por otra parte, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 22) se observan las seis señales de los carbonos correspondientes al compuesto **CP3**. En un desplazamiento de 128.0 la señal pertenece al carbono vinílico unido al carbonilo ( $\text{CHC}=\text{O}$ ); en 130.2, 135.8, 136.5, 139.4 ppm las señales corresponde a los carbonos aromáticos ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ ) y en 175.6 la señal corresponde al carbono del carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ). El resumen de estos resultados se muestra en la tabla 11.

**Tabla 11.** Elucidación estructural en RMN  $^{13}\text{C}$  de **CP3**

$\delta$ (ppm)	Asignación
128.0	$\text{CHC}=\text{O}$
130.2	$\text{C}_{\text{arom}}$
135.8	$\text{C}_{\text{arom}}$
136.5	$\text{C}_{\text{arom}}$
139.4	$\text{C}_{\text{arom}}$
175.6	$\text{C}=\text{O}$



**Figura 21.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto **CP3**

En el espectro de masas de alta resolución (ionización FAB<sup>+</sup>) para el compuesto **CP3** presentó un ion molecular [M+H]<sup>+</sup> con una relación  $m/z$  258.9334 y el calculado para la misma molécula fue de  $m/z$  258.9330 encontrando un porcentaje de error de +1.4, por lo tanto, el compuesto aislado corresponde al compuesto esperado.

### 5.1.3 Síntesis y purificación de carboxilatos de potasio en un solo paso **CP3c-CP12c**.

#### 5.1.3.1 Caracterización de carboxilatos de potasio **CP3c-CP12c**

Para la caracterización estructural de los compuestos **CP3c-CP7c**, se observa que esta serie de compuestos presentan las mismas señales que los compuestos **CP1-CP5** los cuales fueron preparados en dos pasos de reacción, para más detalle ver anexo 1.

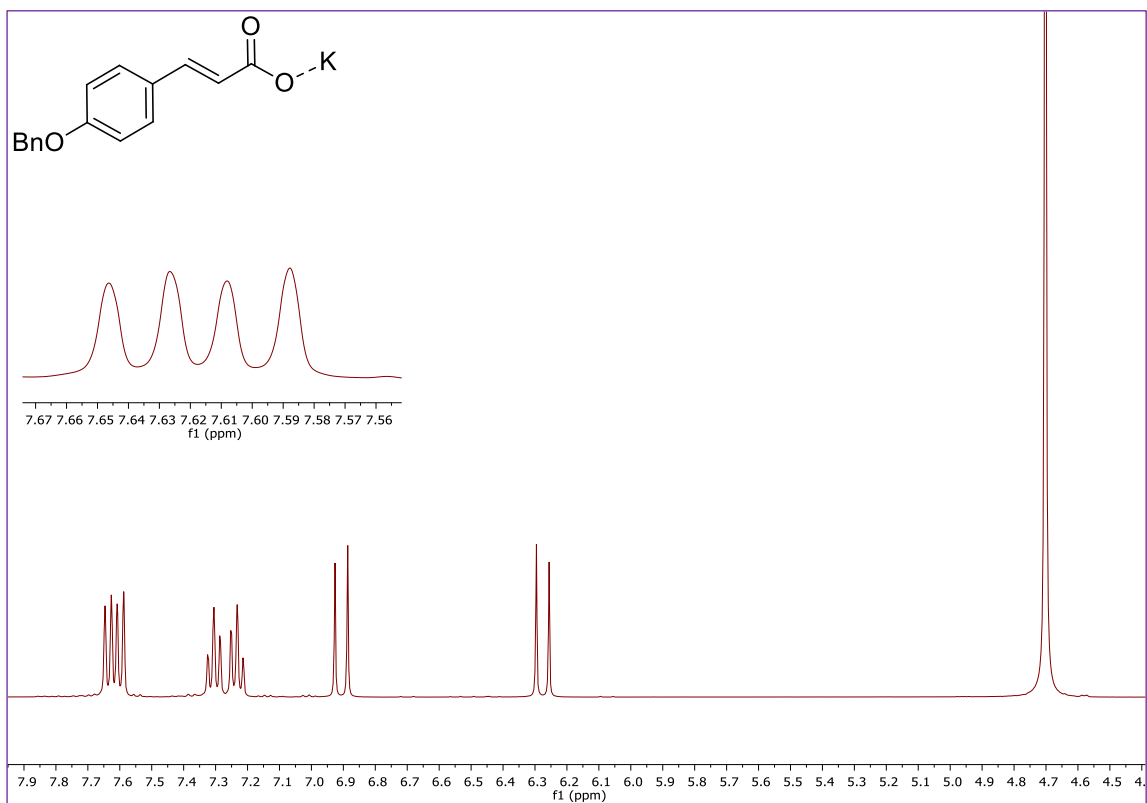
Para la caracterización estructural de los compuestos **CP8c-CP12c**, se presenta a modo de ejemplo, la asignación estructural del compuesto **CP10c**. En la figura 23 se muestra el espectro de RMN <sup>1</sup>H, donde se observan las señales correspondientes al compuesto **CP10c**.

En un desplazamiento químico de 6.28 ppm se observa una señal doble, con una constante de acoplamiento de 16.0 Hz que integra para un protón (1H) que corresponde al metino en posición *trans* unido al carbonilo (**CHC=O**); en 6.91 se observa una señal doble con constante de acoplamiento de 16.0 Hz la cual integran para un protón (1H) que corresponden a los protones del metino en

posición *trans* unido al anillo aromático (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH); en 7.34 – 7.20 ppm se observa una señal múltiple la cual integra para dos protones (2H) que corresponden al anillo aromático (H<sub>aromático</sub>) y en 7.60 y 7.64 ppm se observan dos señales dobles con constantes de acoplamiento de 8.1 Hz que integran para un protón cada una las cuales corresponde a protones aromáticos (H<sub>aromático</sub>). El resumen de estos resultados se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12.** Elucidación estructural en RMN <sup>1</sup>H de **CP12c**

<b>δ (ppm)</b>	<b>Multiplicidad</b>	<b>Integración</b>	<b>Asignación</b>	<b>J (Hz)</b>
<b>6.28</b>	d	1H	<b>CHC=O</b>	16.0
<b>6.91</b>	d	1H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH	16.0
<b>7.20-7.34</b>	m	2H	<b>H<sub>arom</sub></b>	--
<b>7.60</b>	d	1H	<b>H<sub>arom</sub></b>	8.1
<b>7.64</b>	d	1H	<b>H<sub>arom</sub></b>	8.1



**Figura 22.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **CP10c**

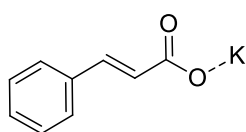
El análisis por Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y Espectrometría de Masas de Alta Resolución indican que los compuestos obtenidos corresponden a las a las estructuras propuestas.

De los compuestos sintetizados, se eligieron 10 carboxilatos de potasio para determinar su actividad antituberculosa, debido a que hay reportes en la literatura de compuestos que poseen grupos carboxilatos, y estos favorecen la interacción con enzimas celulares de las micobacterias, anteriormente descritas.

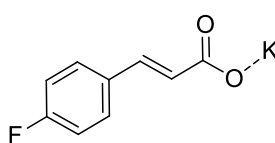
## 5.2 Evaluación Biológica

De los compuestos sintetizados se seleccionaron 10 moléculas identificadas como **CP3c-CP12c** para llevar a cabo los ensayos biológicos, además se utilizó Isoniazida como fármaco de referencia. Los compuestos seleccionados se muestran a continuación (Figura 24).

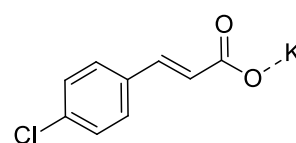
**Figura 23.** Estructura de las moléculas seleccionadas para su evaluación anti-TB.



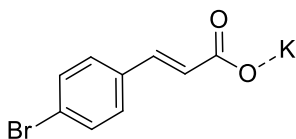
**CP3c**  
Cinamato de potasio



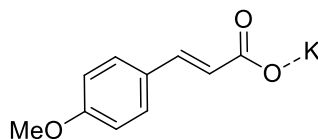
**CP4c**  
4-Fluorocinamato de potasio



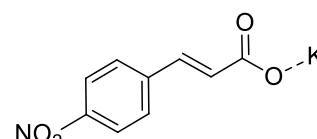
**CP5c**  
4-Clorocinamato de potasio



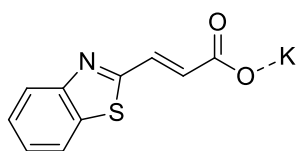
**CP6c**  
4-Bromocinamato de potasio



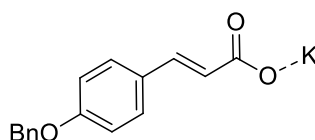
**CP7c**  
4-Metoxicinamato de potasio



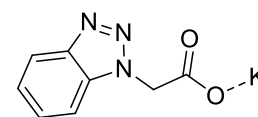
**CP8c**  
4-Nitrocinamato de potasio



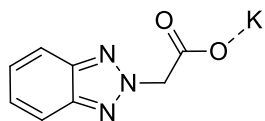
**CP9c**  
2-Benzotiazol carboxilato de potasio



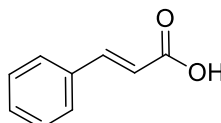
**CP10c**  
4-Benciloxicinamato de potasio



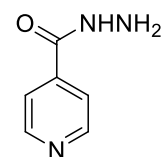
**CP11c**  
1H-Benzotriazol carboxilato de potasio



**CP12c**  
2H-Benzotriazol carboxilato de potasio



Ácido cinámico



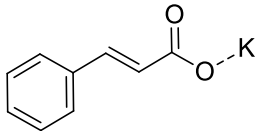
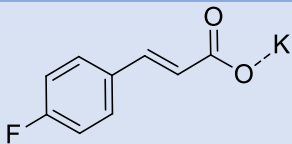
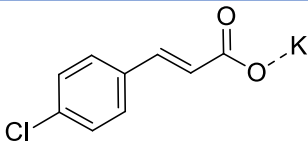
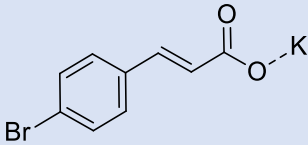
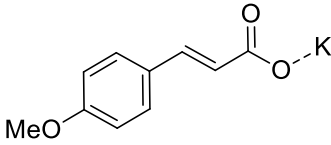
Isoniazida

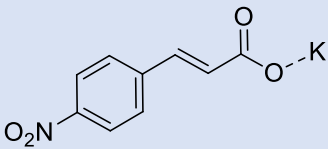
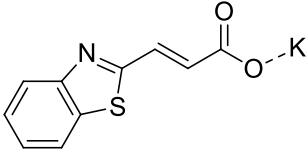
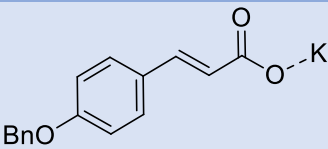
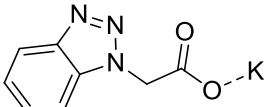
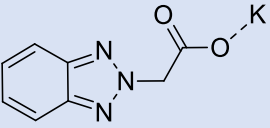
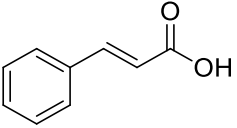
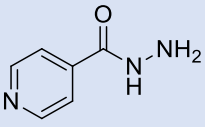


### 5.2.1 Evaluaciones de la actividad antituberculosa

Cada uno de los compuestos fue evaluado a 10 diferentes concentraciones (Tabla 13): 125, 62.51, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.95, 0.97, 0.48, 0.24  $\mu\text{g/mL}$  sobre la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv por duplicado, con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM).

**Tabla 13.** Actividad antituberculosa de carboxilatos de potasio. AC= Ácido cinámico, I= Isoniazida

ACTIVIDAD ANTI-TB DE LOS CARBOXILATOS DE POTASIO				
COMP.	Estructura	Masa molecular (g/mol)	CLogP	H37Rv CMI = $\mu\text{g/ml}$ ( $\mu\text{M}$ )
CP3c		186.24	1.95	1.95 (10.47)
CP4c		204.23	2.09	125 (612.05)
CP5c		220.69	2.66	125 (566.40)
CP6c		265.14	2.81	7.81 (29.45)
CP7c		216.75	1.87	31.2 (143.94)

<b>CP8c</b>		231.24	1.69	63.0 (272.44)
<b>CP9c</b>		243.32	1.89	15.6 (64.11)
<b>CP10c</b>		292.37	3.64	1.95 (6.66)
<b>CP11c</b>		215.25	0.50	1.95 (9.05)
<b>CP12c</b>		215.25	0.83	>125 (580.72)
<b>AC</b>		148.16	2.23	7.81 (52.7)
<b>I</b>		137.14	-0.668	0.06 (0.43)

Como se puede observar en la tabla anterior, los compuestos que mostraron la mejor actividad ante la cepa sensible fueron los etiquetados como **CP3c**, **CP10c**, y **CP11c** con una CMI = 1.95 µg/mL. La diferencia estructural entre los compuestos **CP3c** y **CP10c** radica en el sustituyente en posición *para* del anillo aromático siendo para **CP3c** un H y para **CP10c** un grupo benziloxi (BnO, grupo electrodonador), observándose que la diferencia estructural no modifica la actividad biológica.

Por otro lado, el compuesto **CP11c** con una estructura que difiere notablemente en comparación con los compuestos **CP3C** y **CP10C**; es decir el compuesto **CP11c** incorpora en su estructura un anillo de benzotriazol sin incluir el sistema insaturado, mostró también la misma actividad, por lo que resulta interesante diseñar moléculas que incorporen en su estructura este tipo de heterociclos.

También es importante notar que los compuestos **CP6c** (CMI = 7.81 µg/mL), **CP7c** (CMI = 31.2 µg/mL), **CP8c** (CMI = 63.0 µg/mL), y **CP9c** (CMI 15.6 µg/mL) también mostraron buena actividad biológica. Donde los compuestos **CP6c**, **CP7c** y **CP8c** presentan en su estructura un sustituyente bromuro (grupo electroattractor), metoxi (grupo electrodonador) y nitro (grupo electroattractor más fuerte en comparación con el sustituyente bromuro), siendo este último el de menor actividad biológica, lo que nos permite sugerir que grupos electroattractores fuertes en posición para disminuyen la actividad biológica en este tipo de moléculas. Mientras que para el compuesto **CP9c** el cual incorpora en su estructura un grupo benzotiazol presento una mejor actividad biológica en comparación con **CP8c** y **CP7c**, este último incorporando en su estructura un grupo electrodonador.

Por otro lado, los compuestos que presentaron baja actividad con una CMI = 125 µg/mL corresponden a los compuestos **CP4c** y **CP5c** los cuales incorporan en su estructura átomos de flúor y cloro, siendo estos resultados no comparables con el compuesto **CP6C** que incorpora en su estructura un átomo de bromo (CMI = 7.81 µg/mL). Estos resultados nos permite sugerir que átomos muy electronegativos en posición para disminuyen considerablemente la actividad.

En la tabla 13 también se puede observar que el compuesto que presento la más baja actividad anti-TB corresponde al compuesto **CP12c** con una CMI  $>125$   $\mu\text{g/mL}$ . Este resultado difiere notablemente en comparación con su isómero, compuesto **CP11c**, CMI =  $1.95$   $\mu\text{g/mL}$ , donde la diferencia estructural radica en la unión del anillo de benzotriazol, siendo el más activo el 1H-benzotriazol. Esta diferencia estructural demuestra la importancia que tienen los isómeros estructurales en la unión con los sitios de acción.

Con base al resultado obtenido para el compuesto **CP3c**, carboxilato derivado del ácido cinámico, se decidió evaluar la actividad anti-TB del ácido cinámico (**AC**) para comprobar la importancia de la sal de potasio presente en los compuestos. Podemos notar que la CMI para el ácido cinámico fue de  $7.81$   $\mu\text{g/mL}$  en comparación con su correspondiente carboxilato (CMI =  $1.95$   $\mu\text{g/mL}$ ), lo que sugiere que el carboxilato de potasio es de importancia para la interacción con los sitios de unión de la micobacteria.

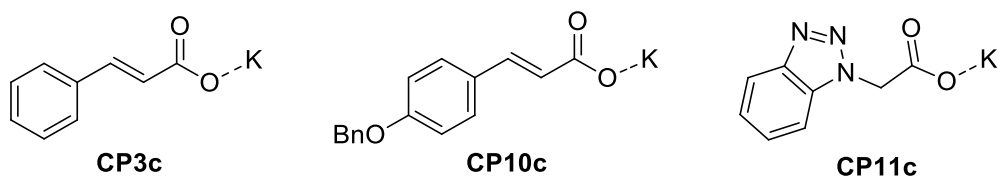
De forma general podemos proponer que las interacciones moleculares que se llegan a formar con las enzimas de las micobacterias no son lo suficiente fuertes para mantenerse, y que el sistema de eliminación de las micobacterias mantenga su homeostasis celular al expulsar a los carboxilatos de la célula, por tal razón se requiere mayor concentración de moléculas para tener un efecto antimicobacteriano. No obstante, las actividades mostradas por los compuestos representan un área de oportunidad para el diseño de nuevas moléculas, además de poder medir su relación estructura actividad con un mayor número de compuestos.

Es importante hacer notar que a pesar de que la actividad anti-TB no resultó mejor que el fármaco de referencia (Isoniazida) para la cepa sensible H37Rv, es importante evaluar este tipo de compuestos en cepas resistentes, ya que existen reportes en la literatura que demuestran que un compuesto puede no ser muy activo en una cepa sensible, pero sí serlo en una cepa resistente.

### 5.2.1 Evaluaciones de la actividad citotóxica

Una vez evaluada la actividad anti-TB, se seleccionaron 3 compuestos con mayor actividad (1.95  $\mu\text{g/mL}$ ) para determinar su toxicidad *in vitro* en células Vero (Figura 25) mediante la técnica de viabilidad celular WST-1.

**Figura 24.** Estructuras de compuestos más activos.



En la tabla 14 se observan los resultados de viabilidad celular, donde se observa el promedio del porcentaje de viabilidad de los tres ensayos, así como su desviación estándar (DE).

**Tabla 14.** Citotoxicidad de los compuestos en la línea celular Vero.

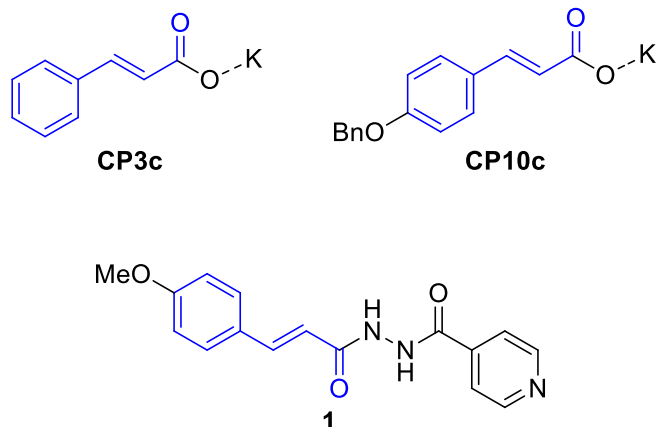
Compuesto	CP3c	CP12c	CP9c
$\mu\text{g/ml}$	% Viabilidad celular $\pm\text{DE}$		
200	64.09 $\pm$ 3.5	65.135 $\pm$ 8.4	62.044 $\pm$ 6.3
100	82.926 $\pm$ 4.7	95.254 $\pm$ 10.8	90.779 $\pm$ 6.1
50	90.320 $\pm$ 10.1	101.395 $\pm$ 7.6	95.582 $\pm$ 3.2
25	89.387 $\pm$ 9.5	95.756 $\pm$ 2.7	92.714 $\pm$ 0.7
12.5	90.436 $\pm$ 9.1	98.135 $\pm$ 8.0	90.912 $\pm$ 3.2
6.2	90.082 $\pm$ 9.6	96.594 $\pm$ 3.7	88.520 $\pm$ 4.9

Como se puede observar en la tabla anterior, a la concentración más alta los porcentajes de viabilidad van de 62.044 hasta 65.135%, este nos indica que el IC50 para los tres compuestos es mayor a 200  $\mu\text{g/mL}$ . Es importante señalar que moléculas con porcentajes de viabilidad mayor al 80% son consideradas no tóxicas, por tanto, las tres moléculas seleccionadas no presentan toxicidad a concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$ , concentración 50 veces mayor al CIM de los compuestos (1.95  $\mu\text{g/mL}$ ).

Es importante mencionar que durante este estudio se realizó la prueba estadística análisis de varianza de un factor (Anexo 2, 3 y 4). El resultado indica que a nivel de alfa = 0.005, no hay diferencia estadísticamente significativa. Por tanto, los resultados de la prueba muestran que los compuestos **CP3c**, **CP10c** y **CP11c** no presentan toxicidad a la concentración mínima inhibitoria.

Analizando las estructuras de los compuestos **CP3c** y **CP10c**, observamos que aunque ambas poseen el farmacóforo de las moléculas reportadas por Baltas,<sup>18</sup> (Figura 26) estas no son comparables en sus actividades biológicas, donde la mejor molécula presenta una actividad anti-TB de 0.3  $\mu\text{M}$  y un  $\text{IC}_{50}$  de 168  $\mu\text{g/mL}$  en monocitos, mientras que en este trabajo la mejor molécula presenta una actividad anti-TB de 6.6  $\mu\text{M}$  con un  $\text{IC}_{50}$  mayor a 200  $\mu\text{g/mL}$  en células Vero.

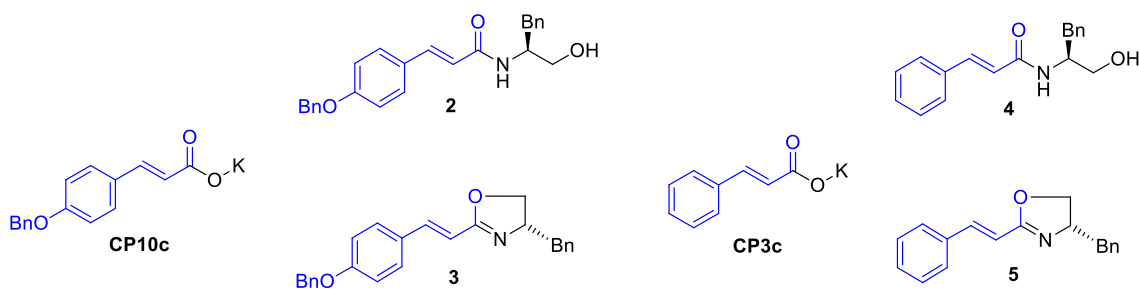
**Figura 25.** Comparación estructural de **CP3c**, **CP12c** vs **1**.



Sin embargo, la actividad biológica de **CP3c** y **CP10c** da pie a seguir realizando ensayos en modelos animales por su baja toxicidad y a realizar modificaciones estructurales que favorezcan la actividad anti-TB conservando su baja toxicidad.

Estas mismas moléculas, **CP3c** y **CP10c**, se compararon con las amidas y oxazolininas previamente reportadas por Avalos<sup>19</sup>, donde se puede observar que la actividad anti-TB de estos compuestos se mejora hasta 8 veces más (Figura 27).

**Figura 26.** Comparación estructural de **CP3c** y **CP10c** vs **2, 3, 4, 5**



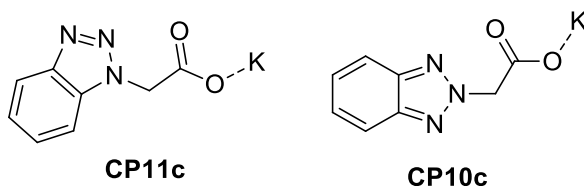
En esta comparación las moléculas en su forma de sal de potasio presentan una CMI de 1.95  $\mu\text{g/mL}$  tanto para **CP3c** y **CP10c**, mientras que las amidas **2, 4** y la oxazolina **5** presentan una actividad de 16  $\mu\text{g/mL}$ , y la oxazolina **3** una actividad de 4  $\mu\text{g/mL}$ .

Analizando el compuesto **CP11c**, aunque no presenta por completo el mismo farmacóforo que **CP3c** y **CP10c**, si no que conserva el carboxilato, lo cual en reportes de análisis computacional, enzimas que participan en la formación de la pared celular de *Mtb* muestran interacciones importantes entre residuos de aminoácidos clave en la actividad enzimática y los carboxilatos libres de las moléculas, ejemplos de estos son lo reportado por Matarlo<sup>24</sup> en el 2011 y 2015, Stewart T. Cole<sup>28</sup> en el 2015 y Kozikowski<sup>32</sup> en el 2016.

Cabe mencionar que la simetría de la molécula no favorece su actividad biológica (Figura 28), siendo la estructura de la molécula **CP11c** favorable para la interacción molecular con las enzimas de *Mycobacterium*.



**Figura 27.** Actividad biológica de benzotriazoles.



A pesar que las enzimas presenten una conformación fija, al hacer contacto el sitio activo con algún sustrato, la enzima sufre un re-arreglo para mantener el complejo enzima-sustrato, sin embargo, intervienen varios factores para que se pueda dar esta interacción, una de estos es, la conformación estructural del sustrato, si el sustrato tiene el tamaño adecuado, geometría deseable, por mencionar algunos, hay mayor posibilidad de interacción, de lo contrario no se dará esta interacción o se necesitará mayor concentración de moléculas para encontrar algún sitio activo con el cual pueda formar una interacción.

Finalmente es importante mencionar que a pesar de que los compuestos no presentaron una mejor actividad anti-TB en comparación con la Isoniazida, estos presentan baja toxicidad a concentraciones elevadas en comparación con la Isoniazida, la cual resulta ser hepatotóxica a estas mismas concentraciones.<sup>33</sup> En este sentido, estos resultados marcan la pauta para seguir estudiando este tipo de compuestos mediante modificación estructural para un estudio más completo de Estructura-Actividad Biológica, o bien para ser probados con cepas de *MTb* resistentes a los fármacos de primera línea como lo describen otros autores.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

- 1.- Se diseñaron 2 metodologías de síntesis para la obtención de carboxilatos de potasio, la primera consiste en dos pasos de reacción partiendo del trietilfosfonoacetato y el aldehído correspondiente para así obtener los etil ésteres, los cuales se hidrolizaron usando carbonato de potasio. La segunda utiliza nuevamente el trietilfosfonoacetato y el aldehído correspondiente en presencia de carbonato de potasio, involucrando un paso de reacción, logrando obtener con éxito en ambos casos los carboxilatos esperados.
- 2.- Se lograron sintetizar 5 etil ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados y 10 nuevos carboxilatos de potasio.
- 3.- La segunda ruta sintética propuesta resultó ser más rentable y más amigable con el medio ambiente, ya que esta involucró un solo paso de reacción, hace uso de un menor volumen de disolventes y se evita la purificación por cromatografía en columna.
- 4.- La hipótesis planteada no se validó con los resultados obtenidos, ya que ninguno de los compuestos presentó mejor actividad en comparación con el antifímico Isoniazida, sin embargo, los compuestos con mayor actividad mejoraron hasta 8 veces la actividad biológica ante la cepa sensible (H37Rv) a los fármacos de primera línea.

5.- La orientación estructural modifica considerablemente la actividad biológica como se observó en el compuesto **CP11c**, favoreciendo la mejor actividad para la molécula asimétrica.

6.- La forma de carboxilatos de los compuestos favorece la actividad, esto se observa al comparar el compuesto **CP3c** con su correspondiente ácido carboxílico (ácido cinámico).

7.- Los resultados de la actividad citotóxica de los compuestos **CP3C**, **CP10c** y **CP11c** demostraron que estos compuestos no son tóxicos a concentraciones elevadas.

## REFERENCIAS

1. Müller B., Dürr S., Alonso S., Hattendorf J., Laisse C.J.M., Parsons S.D.C., Zoonotic Mycobacterium bovis–induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, **2013**; *19*(6); 899-908.
2. (a) The Top 10 Causes of Death; World Health Organization. Geneva, 2017 (consultado, 16 Feb, 2017)  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.  
(b) Global Tuberculosis Report 2016; World Health Organization: Geneva, 2017; (consultado 16 Feb, 2017).  
[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
3. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, cenapre. Consultado en enero 2017. ([http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras\\_oficiales.html](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html))
4. Dashti, Y.; Grkovic, T.; Quinn, R. J. *Nat. Prod. Rep.*, **2014**, *31*, 990-998.
5. Guía práctica para la atención de la tuberculosis en niños niñas y adolescentes. Consultado en octubre del 2017. ([https://www.ssaver.gob.mx/saludpublica/files/2011/10/guia\\_pediatica\\_ultimo.pdf](https://www.ssaver.gob.mx/saludpublica/files/2011/10/guia_pediatica_ultimo.pdf))
6. Sakamoto, K. *Veterinary pathology*. **2012**, *49*, 423-439.
7. Urdahl, K.B.; Shafiani, S.; Ernst, J.D. *Mucosal immunology*. **2011**, *4*, 288-293.
8. Adrián, G.; Rosas-Taraco, A. *RESPYN*. **2007**, *8*, 4-10.

9. VanCrevel, R.; Ottenhoff THM.; Van der Meer, J.W.M. *Clinical Microbiology Reviews*. **2002**, *15*, 294-309.
10. Court, N.; Rose, S.; Bourigault, M.L.; Front, S.; Martin, O.R.; Dowling, J.K. *PloS one*. **2011**, *6*, 24-31.
11. Rojas, R.E.; Balaji, K.N.; Subramanian, A.; Boom, W.H. *Infection and immunity*. **1999**, *67*, 6461-72.
12. Véronique D. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. *Nature reviews microbiology*, **2014**, *12*, 159-167.
13. Alimuddin Z., Payam N., Stewart T.C. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nature reviews drug discovery*, **2013**, *12*, 388-404.
14. Guidelines for the programmatic management of drugresistant tuberculosis. WHO. Consultado en noviembre 2016. ([http://www.who.int/tb/publications/2008/programmaticguidelines\\_for\\_mdrtb/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/2008/programmaticguidelines_for_mdrtb/en/index.html).)
15. DAILYMED. Consultado en noviembre del 2016. (<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm>)
16. Koul, A.; Arnout, E.; Lounis, N.; Guillemont, J.; Andries, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 2011, *469*, 483–490.
17. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1997**, *23*, 3-25
18. De, P.; Yoya, G.; Constant, P.; Bedos-Belval, F.; Duran, H.; Saffon, N.; Daffe, M.; Baltas, M. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1449–1461.

19. Avalos, F.G.; Hernandez, E.; Carranza, P.; López, S.T.; Hernandez, J.; Ordoñez, M.; Guzman, N.E.; Morales, A.; Velázquez, V.M.; Santiago, M.G., Synthesis, antimycobacterial and cytotoxic activity of  $\alpha,\beta$  unsaturated amides and 2,4-disubstituted oxazoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 821-825
20. Yang, T.; Moreira, W.; Nyantakyi, S.A.; Chen, H.; Aziz, D.; Go, M-L.; Dick, T., Amphiphilic Indole Derivatives as Antimycobacterial Agents: Structure–Activity Relationships and Membrane Targeting Properties., *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2745–2763.
21. Li, X.; Liu, N.; Zhang, H.; Knudson, S.E.; Li, H.; Lai, C.; Simmerling, C.; Slayden, R.A.; Tonge, P.T., CoA Adducts of 4-Oxo-4-phenylbut-2 enoates: Inhibitors of MenB from the *M. tuberculosis* Menaquinone Biosynthesis Pathway. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 818–823
22. Hupadhiay, A.; Fontes, F.L.; Juarrero, M.; McNeil, M.R.; Crans, D.C.; Jackson, M.; Crick, D.C., Partial Saturation of Menaquinone in *Mycobacterium tuberculosis*: Function and Essentiality of a Novel Reductase, MenJ. *ACS Cent. Sci.* **2015**, *1*, 292–302
23. Gengenbacher, M.; Rao, S. P.; Pethe, K.; Dick, T. Nutrientstarved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. *Microbiology* **2010**, *156*, 81–87
24. Matarlo, J.S.; Evans, C.E.; Sharma, I.; Lavaud, L.J.; Ngo, S.C.; Shek, R.; Rajashankar, K.R.; French, J.B.; Tan, D.S; Tonge, P.J., Mechanism

of MenE Inhibition by Acyl-Adenylate Analogues and Discovery of Novel Antibacterial Agents. *Biochemistry*, **2015**, *54*, 6514–6524.

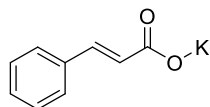
- 25.** Li, X.; Liu, N.; Zhang, H.; Knundson, S.E.; Li, H-J.; Lai, C-T.; Simmerling, C.; Slayden, R.A.; Tonge, P.J. CoA Adducts of 4-Oxo-4-phenylbut-2-enoates: Inhibitors of MenB from the M. tuberculosis Menaquinone Biosynthesis Pathway. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 818–823
- 26.** Matarlo, J.S.; Lu, Y.; Daryaei, F.; Daryaei, T.; Ruzsicska, B.; Walker, S.G.; Tonge, P.J., A Methyl 4-Oxo-4-phenylbut-2-enoate with in Vivo Activity against MRSA That Inhibits MenB in the Bacterial Menaquinone Biosynthesis Pathway. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 329–340
- 27.** Ahmed F. Abdel-Magid. Decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-ribose 20-Epimerase 1 (DprE1): A Novel Therapeutic Target for the Treatment of Tuberculosis. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 373–374
- 28.** Neres, J.; Hartkoorn, R.C.; Chiarelli, L.R.; Gadupudi, R.; Pasca, M.R.; Mori, G.; Venturelli, A.; Savina, S.; Makarov, V.; Kolly, G.S.; Molteni, E.; Binda, C.; Dhar, N.; Ferrari, S.; Brodin, P.; Delorme, V.; Landry, V.; Ribeiro, A.L.; Farina, D.; Saxena, P.; Pojer, F.; Carta, A.; Luciani, R.; Porta, A.; Zanoni, G.; Rossi, E.; Costi, M.P.; Riccardi, G.; Cole, S.T. 2-Carboxyquinoxalines Kill Mycobacterium tuberculosis through Noncovalent Inhibition of DprE1. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 705–714
- 29.** Neres, J., Pojer, F., Molteni, E., Chiarelli, L. R., Dhar, N., Boy-Roettger, S., Buroni, S., Fullam, E., Degiacomi, G., Lucarelli, A. P., Read, R. J., Zanoni, G., Edmondson, D. E., De Rossi, E., Pasca, M. R., McKinney,

- J. D., Dyson, P. J., Riccardi, G., Mattevi, A., Cole, S. T., and Binda, C. Structural Basis for Benzothiazinone-Mediated Killing of Mycobacterium tuberculosis. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 150ra121.
- 30.** Fujita, Y.; Naka, T.; Doi, T.; Yano, I. Direct molecular mass determination of trehalose monomycolate from 11 species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiology*, **2005**, *151*, 1443–1452.
- 31.** Belardinelli, J.M.; Yazidi, A.; Yang, L.; Fabre, L.; Li, W.; Jacques, B.; Angala, K.S.; Rouiller, I.; Zgurskaya, H.I.; Sygusch, J.; Jackson, M. Structure–Function Profile of MmpL3, the Essential Mycolic Acid Transporter from Mycobacterium tuberculosis. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 702–713.
- 32.** Stec, J.; Onajole, O.K.; Lun, S.; Guo, H.; Merenbloom, B.; Vistoli, G.; Bishai, W.R.; Kozikowski, A.P., Indole-2-carboxamide-based MmpL3 Inhibitors Show Exceptional Antitubercular Activity in an Animal Model of Tuberculosis Infection. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6232–6247.
- 33.** (a) Forget E.J.; Menzeis D.; *Expert Opin Drug. Saf.* **2006**; *5*; 231; (b) Tostman A.; Boeree M.J.; Aarnoutse R.E.; De Lange W. C. M.; Van Der Ven Ajam.; Dekhuijzen. R.J.; *Gastroenterol Hepatol*, **2008**, *23*. 192.



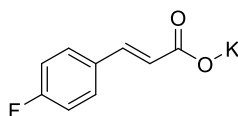
## ANEXOS

### Anexo 1. Elucidación estructural



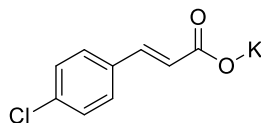
**CP3c**

Compuesto **CP3c**: Sólido blanco, 97% (194 mg),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  6.44 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{CHC}=\text{O}$ ), 7.31 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}$ ), 7.35-7.40 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.54-7.56 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  124.2 ( $\text{CHC}=\text{O}$ ), 127.7, 129.0, 129.6, 135.2, 140.7 ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}$ ), 175.7 ( $\text{C}=\text{O}$ ). HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_9\text{H}_7\text{K}_2\text{O}_2$  [ $\text{M}$ ] $^+$ ,  $m/z$  224.9720; encontrado para [ $\text{M}$ ] $^+$ ,  $m/z$  224.9740 (+8.6).



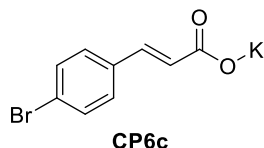
**CP4c**

Compuesto **CP4c**: Sólido blanco, 98% (250 mg),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.43 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{CHC}=\text{O}$ ), 7.07-7.12 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.35 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ ), 7.55-7.58 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  116.7 (d,  $J_{\text{C-F}} = 22$  Hz), 126.9 ( $\text{CHC}=\text{O}$ ), 130.7 (d,  $J_{\text{C-F}} = 8.3$  Hz), 134.0 (d,  $J_{\text{C-F}} = 3.3$  Hz), 140.0, 163.5 (d,  $J_{\text{C-F}} = 247.1$  Hz), 175.9 ( $\text{C}=\text{O}$ ). HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_9\text{H}_6\text{FK}_2\text{O}_2$  [ $\text{M}$ ] $^+$ ,  $m/z$  242.9626; encontrado para [ $\text{M}$ ] $^+$ ,  $m/z$  242.9621 (-2.2).

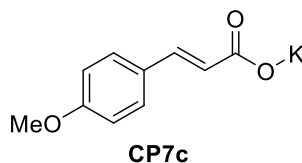


**CP5c**

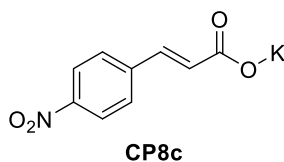
Compuesto **CP5c**: Sólido blanco, 89% (223 mg),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.42 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{CHC}=\text{O}$ ), 7.26 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ ), 7.30 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.43 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  128.0 ( $\text{CHC}=\text{O}$ ), 130.2, 135.8, 136.5, 139.4 ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ ), 175.6 ( $\text{C}=\text{O}$ ). HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_9\text{H}_6\text{ClK}_2\text{O}_2$  [ $\text{M}$ ] $^+$ ,  $m/z$  258.9330; encontrado para [ $\text{M}$ ] $^+$ ,  $m/z$  258.9334 (+1.4).



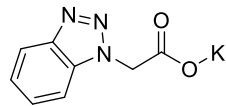
Compuesto **CP6c**: Sólido blanco, 87% (223mg),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.51 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{CHC}=\text{O}$ ), 7.32 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ ), 7.46 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.51 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  123.9 ( $\text{CHC}=\text{O}$ ), 127.9, 130.5, 133.2, 136.8, 139.6 ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ ), 175.6 ( $\text{C}=\text{O}$ ). HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrK}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  303.8904; encontrado para  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  303.8917 (+4.3).



Compuesto **CP7c**: Sólido blanco, 90% (221 mg),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  3.80 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 6.32 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{CHC}=\text{O}$ ), 6.93 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.28 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ ), 7.49 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  55.4 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 114.4, 122.0 ( $\text{CHC}=\text{O}$ ), 128.2, 129.3, 140.5 ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}$ ), 159.9, 176.0 ( $\text{C}=\text{O}$ ). HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{K}_2\text{O}_3$   $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  254.9826; encontrado para  $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  254.9858 (+12.5).

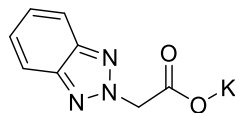


Compuesto **CP8c**: Sólido blanco, 89% (223 mg),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  6.53 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H,  $\text{CHC}=\text{O}$ ), 7.28 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H,  $\text{CHC}_6\text{H}_4$ ), 7.64 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 8.14 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  124.0 ( $\text{CHC}=\text{O}$ ), 128.3, 138.0, 142.1, 147.4, 162.5, 174.7 ( $\text{C}=\text{O}$ ). HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_9\text{H}_6\text{K}_2\text{NO}_4$   $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  269.9571; encontrado para  $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  269.9578 (+2.5).



**CP11c**

Compuesto **CP11c**: Sólido blanco, 80% (492 mg),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.25 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 7.38-7.42 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.50-7.54 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.66-7.68 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.94-7.96 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  52.8 ( $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 112.2, 119.9, 125.6, 128.7, 135.3, 146.9, 173.2 ( $\text{C}=\text{O}$ ). HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2\text{N}_3\text{K}_2$   $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  253.9734; encontrado para  $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  253.9732 (-0.9).

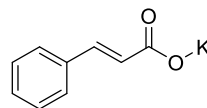


**CP12c**

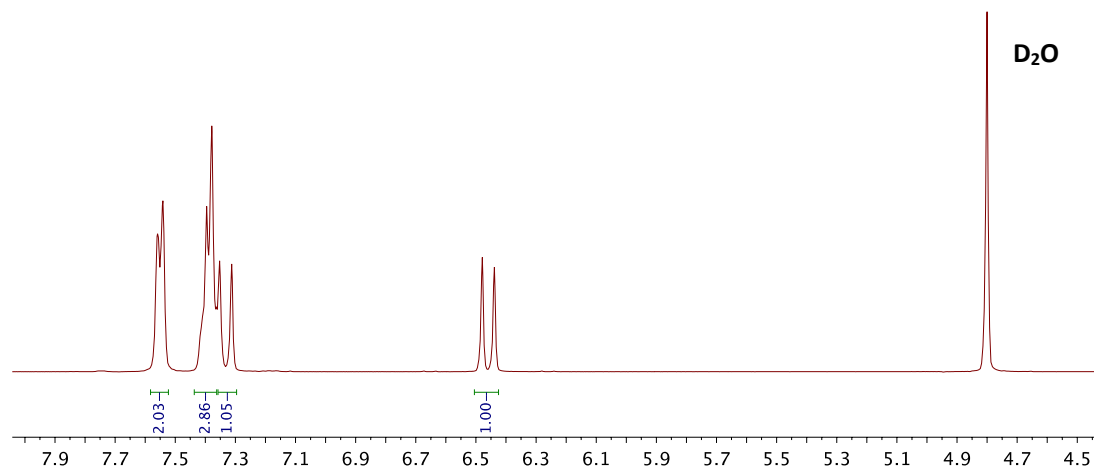
Compuesto **CP12c**: Sólido blanco, 87% (325mg),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.36 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 7.42-7.45 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.88-7.90 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  60.8 ( $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 118.9, 127.4, 145.6, 172.5 ( $\text{C}=\text{O}$ ). HRMS (FAB $^+$ ): calculado para  $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2\text{N}_3\text{K}_2$   $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  253.9734; encontrado para  $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  253.9727 (-2.8).

Compuesto **CP3c**

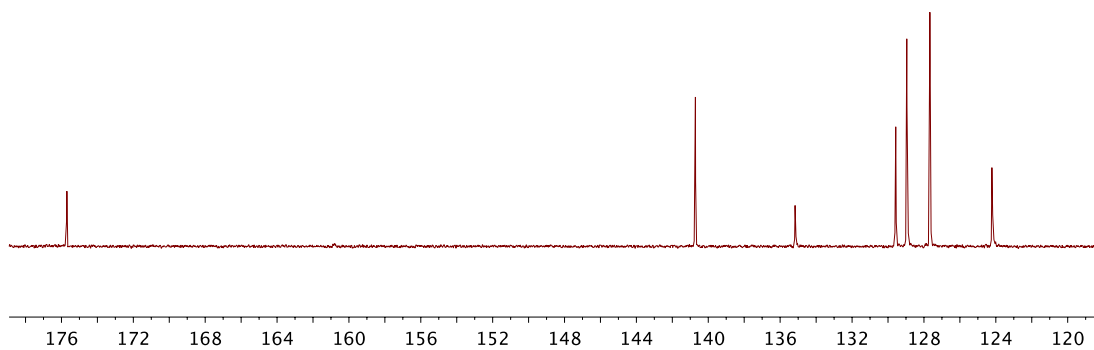
$^1\text{H}$  NMR



**CP3c**

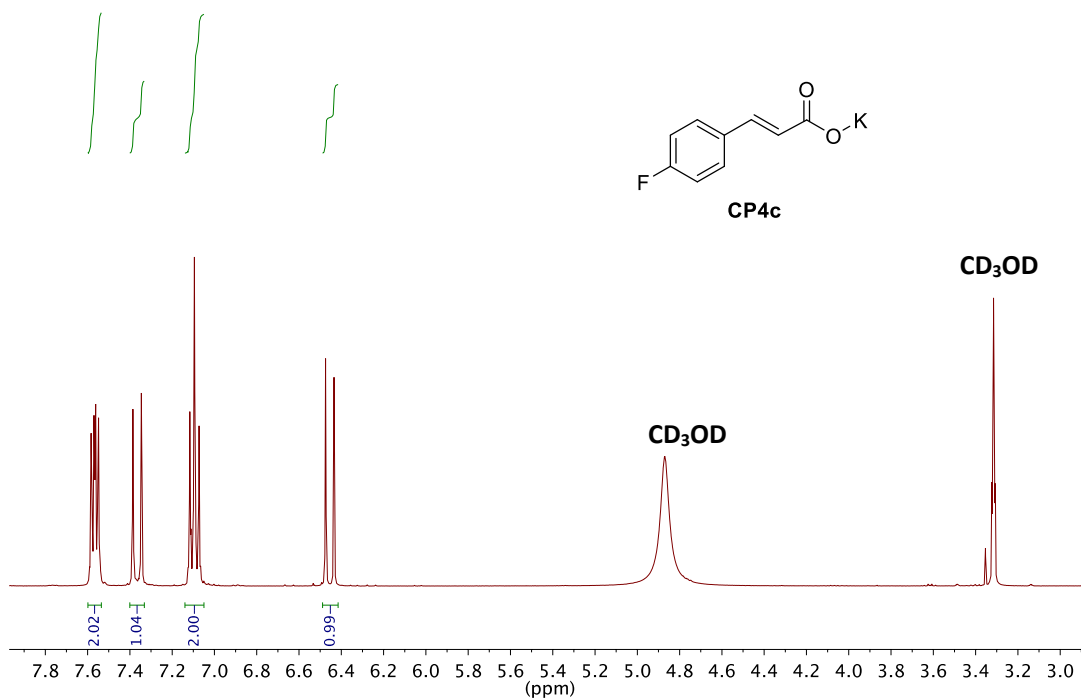


$^{13}\text{C}$  NMR

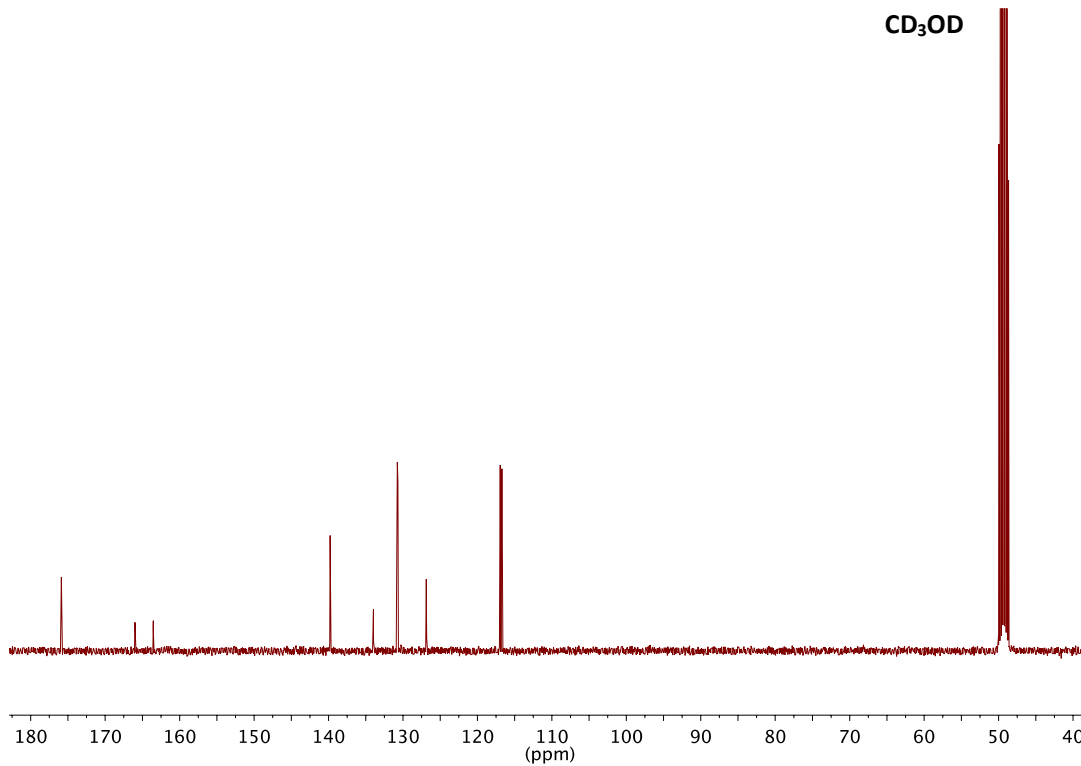


Compuesto **CP4c**

$^1\text{H}$  NMR

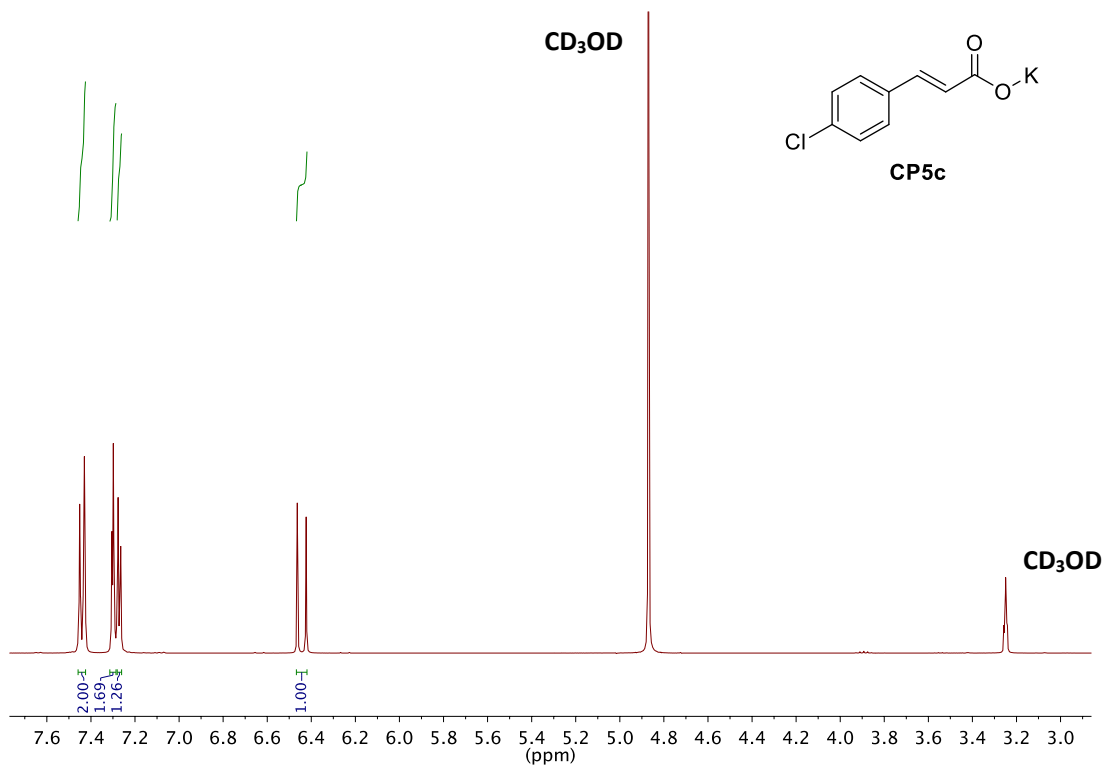


$^{13}\text{C}$  NMR

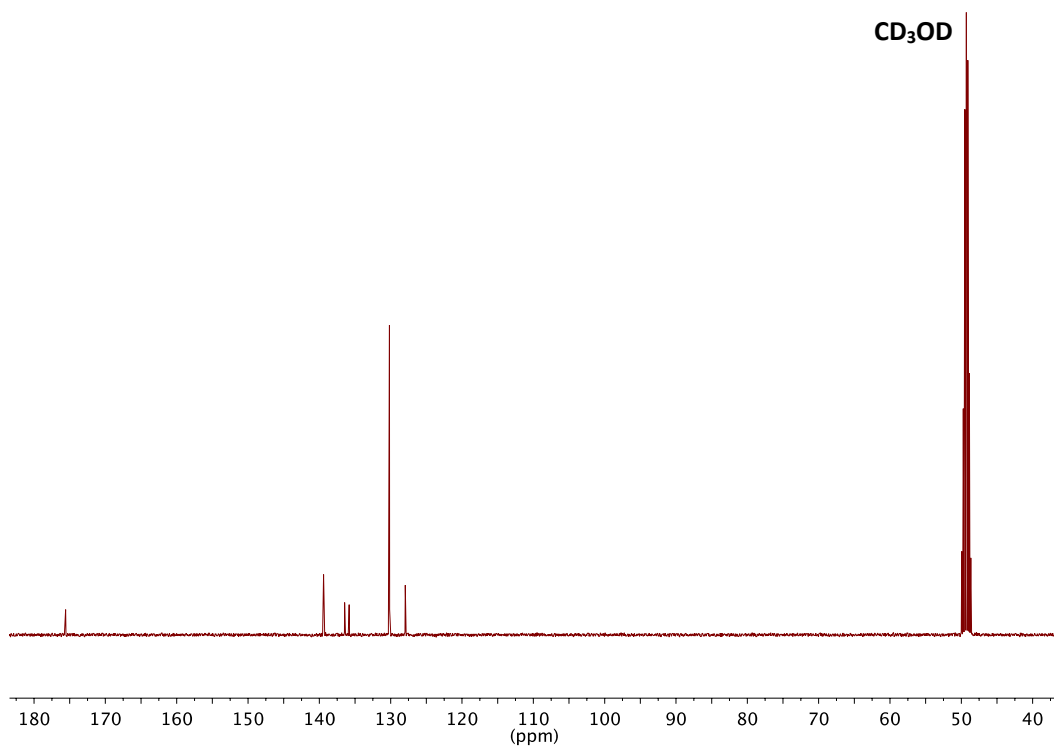


Compuesto CP5c

<sup>1</sup>H NMR

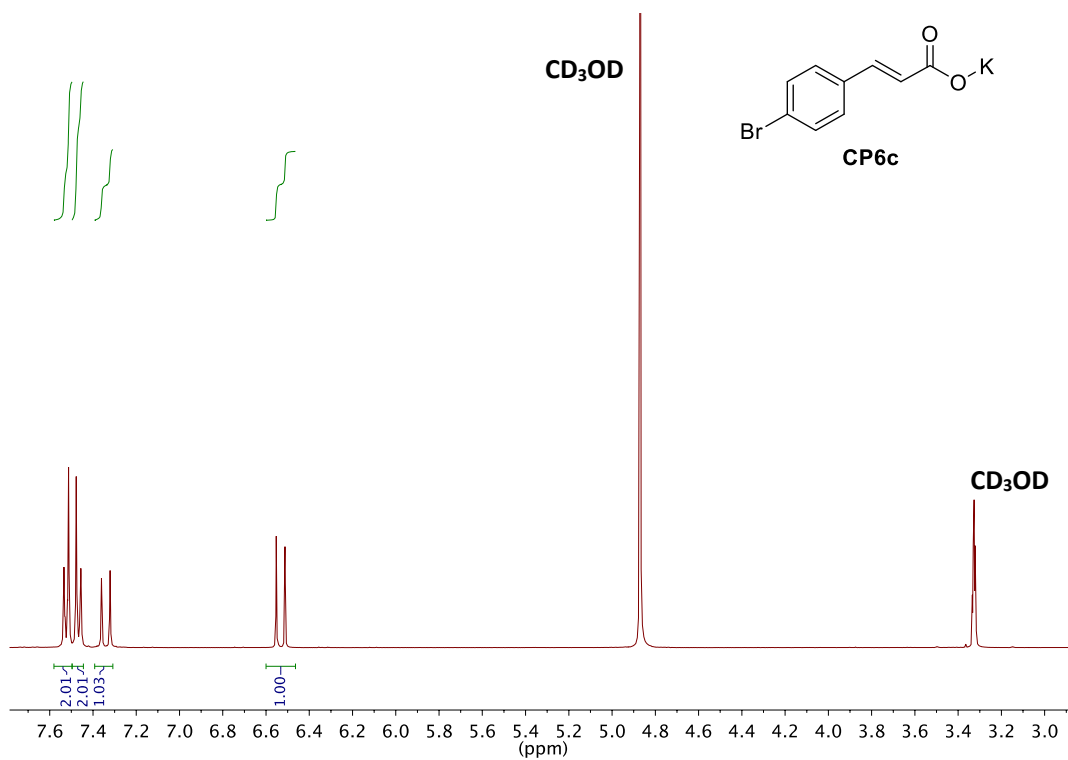


<sup>13</sup>C NMR

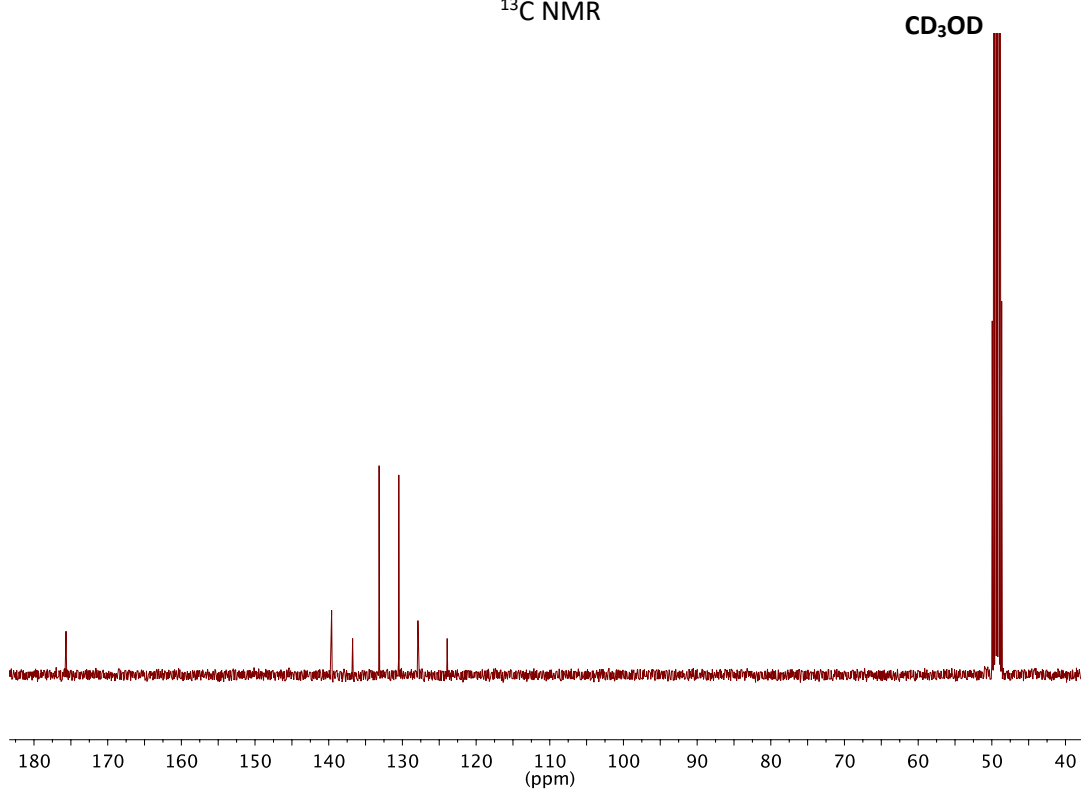


Compuesto CP6c

<sup>1</sup>H NMR

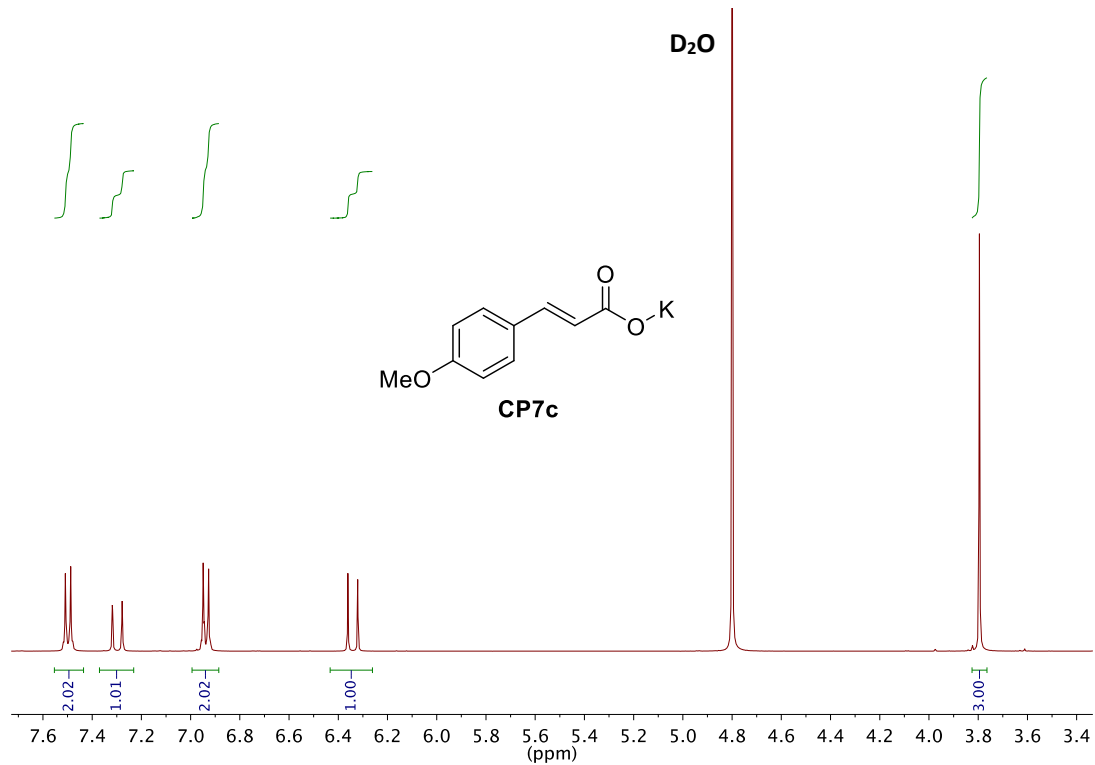


<sup>13</sup>C NMR

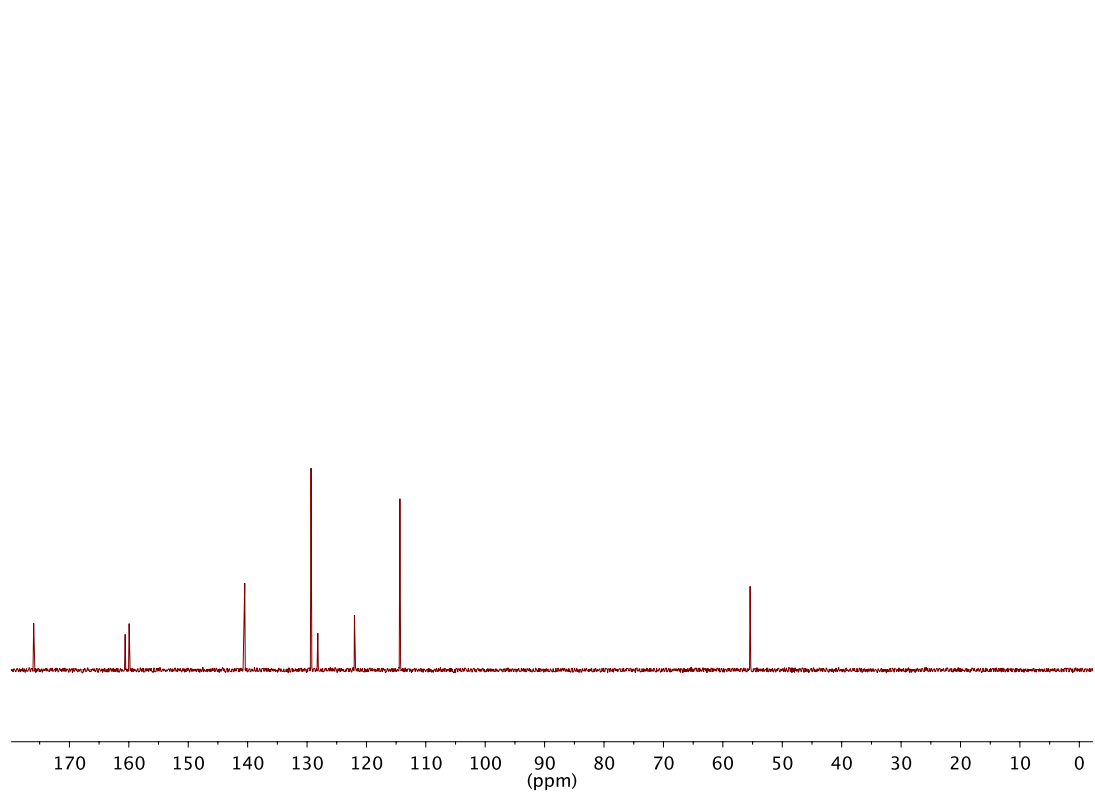


Compuesto **CP7c**

$^1\text{H}$  NMR



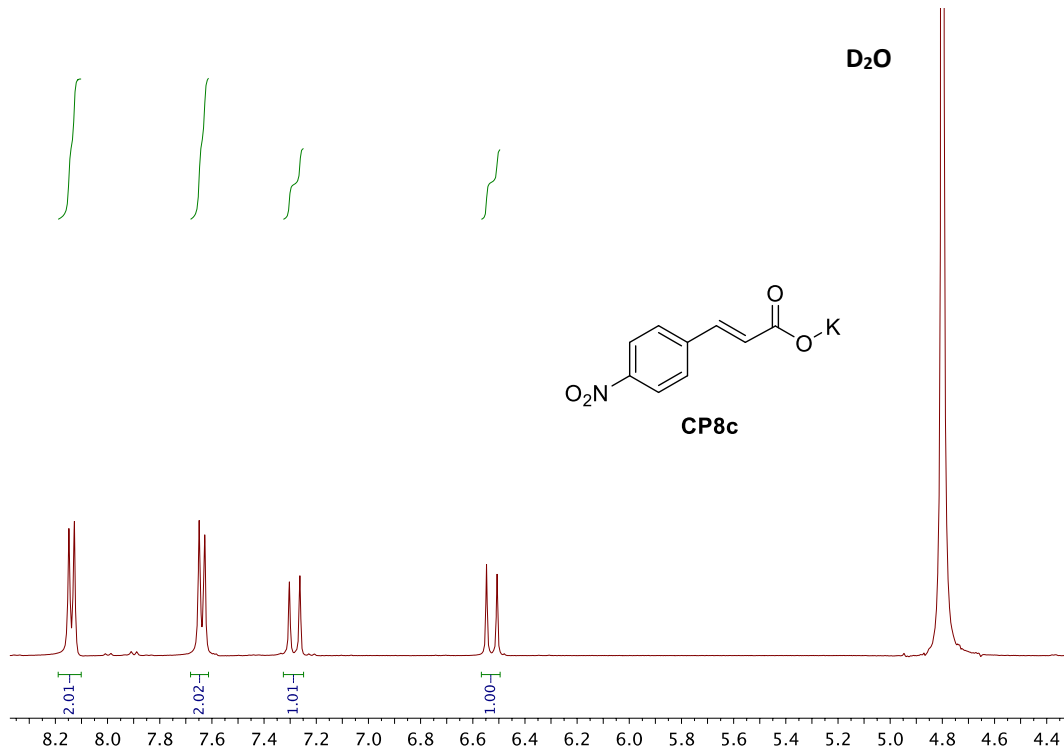
$^{13}\text{C}$  NMR



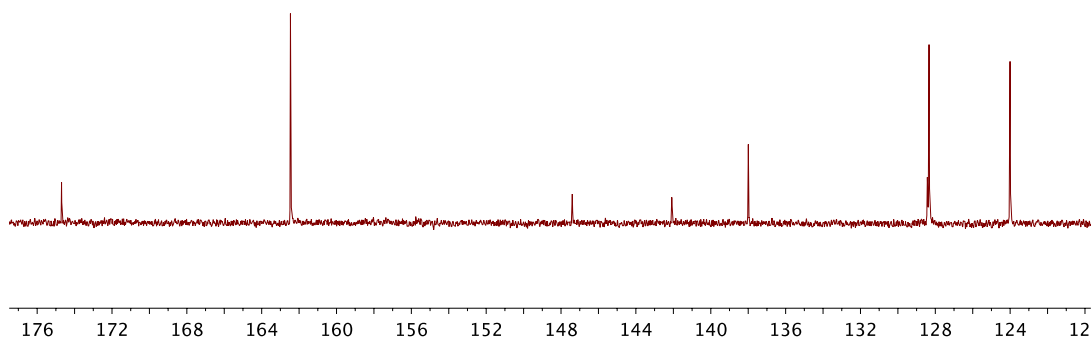


Compuesto **CP8c**

$^1\text{H}$  NMR

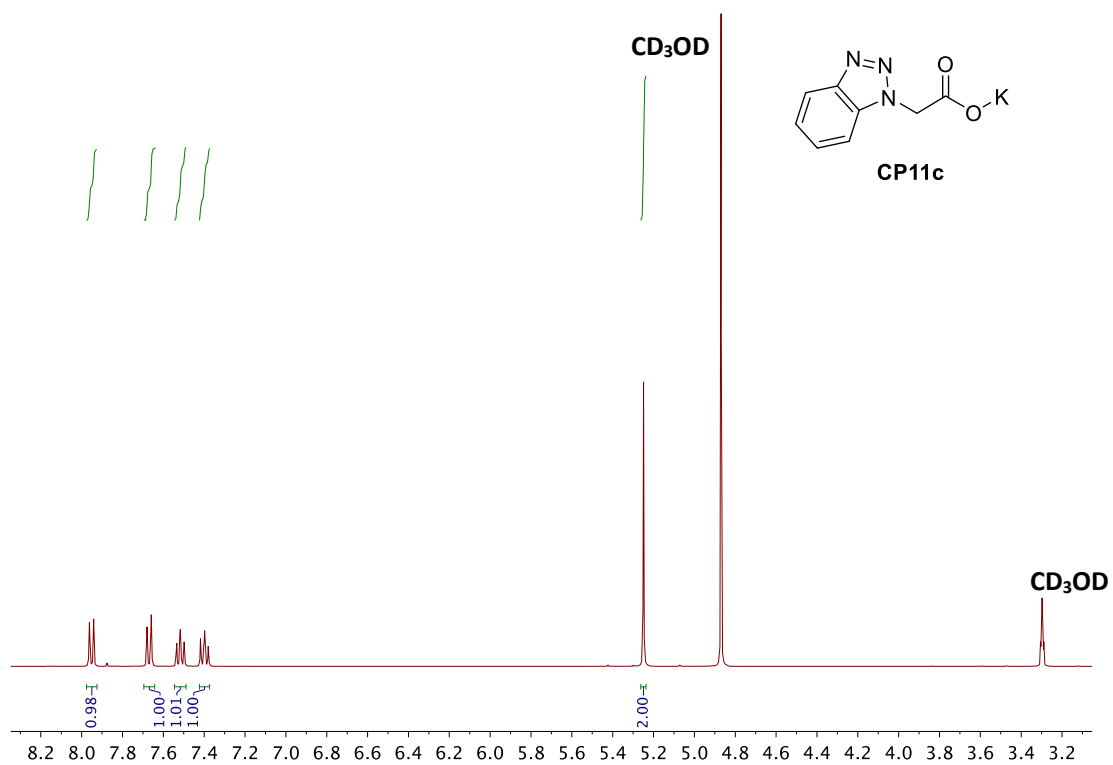


$^{13}\text{C}$  NMR

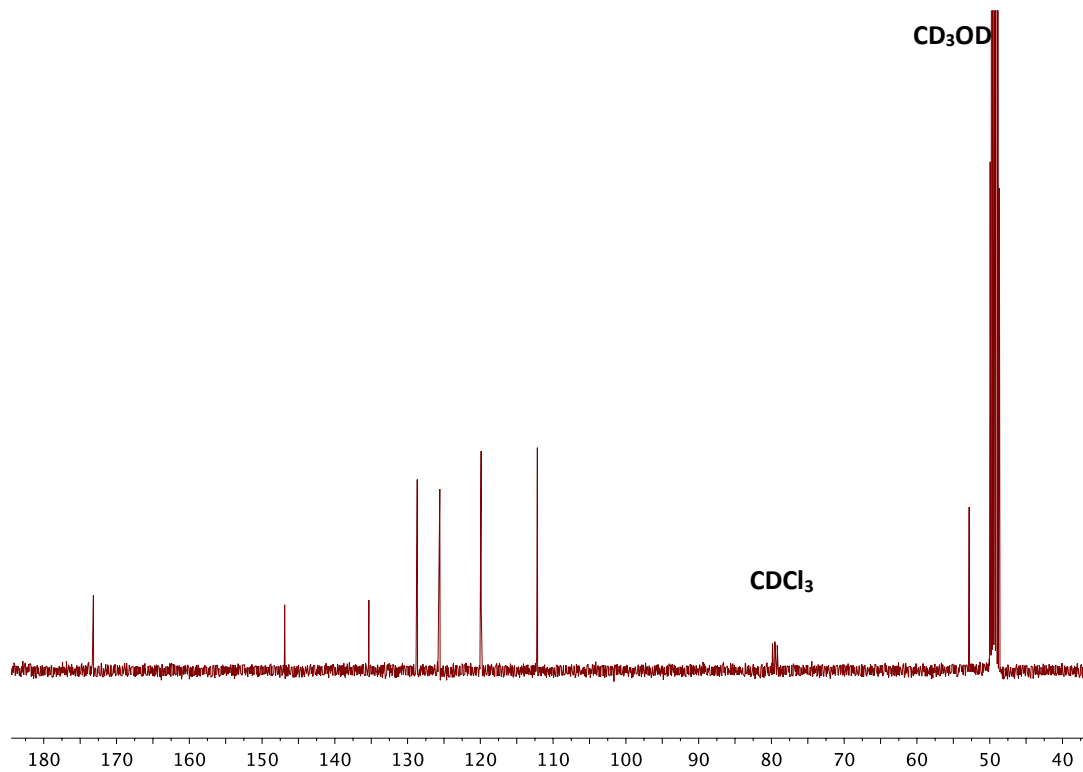


Compuesto **CP11c**

$^1\text{H}$  NMR

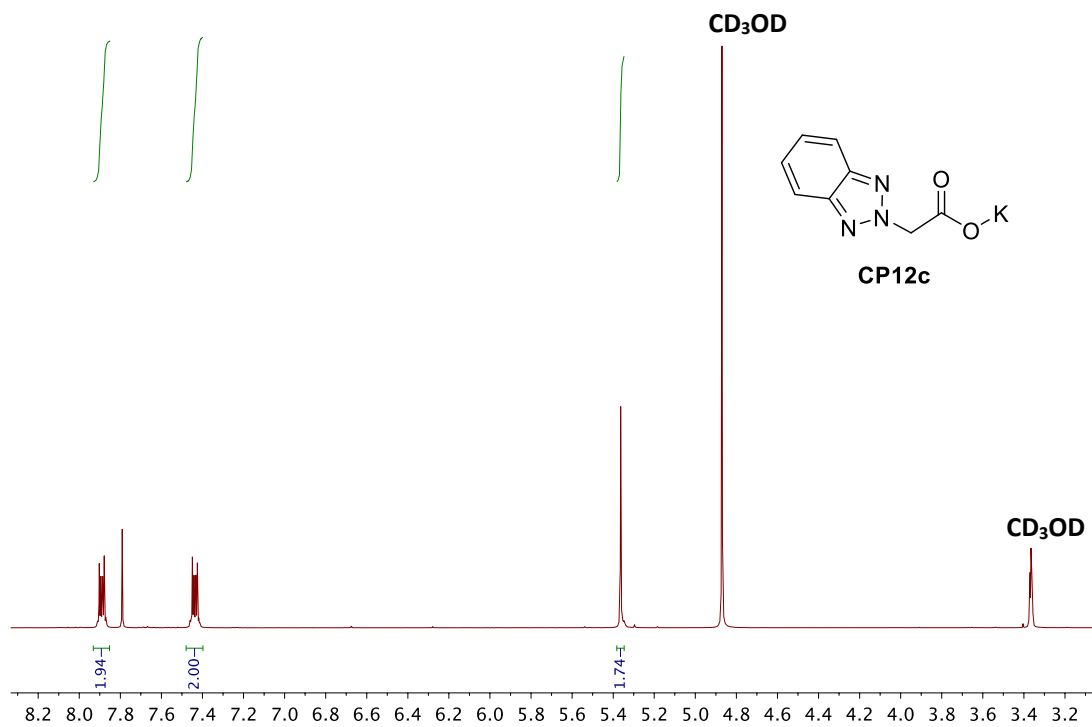


$^{13}\text{C}$  NMR

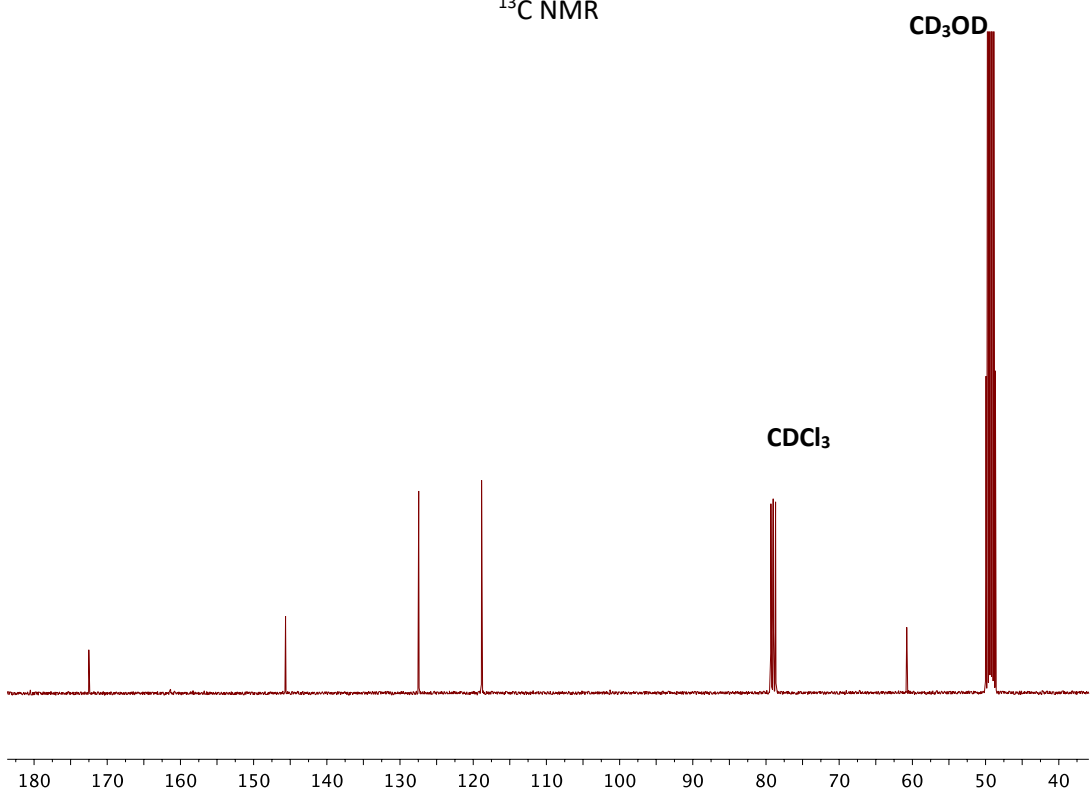


Compuesto **CP12c**

$^1\text{H}$  NMR



$^{13}\text{C}$  NMR



## Anexo 2. Análisis de varianza de un factor para CP3c

### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
200	3	192.284372	64.09479065	12.25951113
100	3	248.7768174	82.9256058	21.82362905
50	3	270.9614161	90.32047204	101.7857818
25	3	268.1623653	89.38745509	89.44780356
12.5	3	271.3073358	90.4357786	82.22822255
6.25	3	270.246751	90.08225033	93.06053537

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1629.003807	5	325.8007614	4.88	0.0115	3.11
Dentro de los grupos	801.2109669	12	66.76758058			
Total	2430.214774	17				

## Anexo 3. Análisis de varianza de un factor para CP9c

### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	186.1334547	62.04448489	39.56345672
Fila 2	3	272.3375585	90.77918615	37.14899236
Fila 3	3	286.7445411	95.58151372	10.38172548
Fila 4	3	278.1426664	92.71422214	0.581791275
Fila 5	3	272.7354495	90.9118165	10.09053427
Fila 6	3	265.5607115	88.52023716	24.09677753

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2281.85524	5	456.3710479	22.47	0.0000	3.11
Dentro de los grupos	243.7265553	12	20.31054627			
Total	2525.581795	17				

## Anexo 4. Análisis de varianza de un factor para CP12c

### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	195.405894	65.135298	71.08666109
Fila 2	3	285.760539	95.25351302	117.583277
Fila 3	3	304.1837848	101.3945949	58.41152236
Fila 4	3	287.2677455	95.75591518	7.439048503
Fila 5	3	294.4041161	98.13470536	64.50409359
Fila 6	3	289.7822449	96.59408164	13.37367416

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2680.173266	5	536.0346533	9.68	0.0007	3.11
Dentro de los grupos	664.7965534	12	55.39971278			
Total	3344.96982	17				