

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

**SÍNTESIS, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTITUBERCULOSA *in vitro*
DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO**

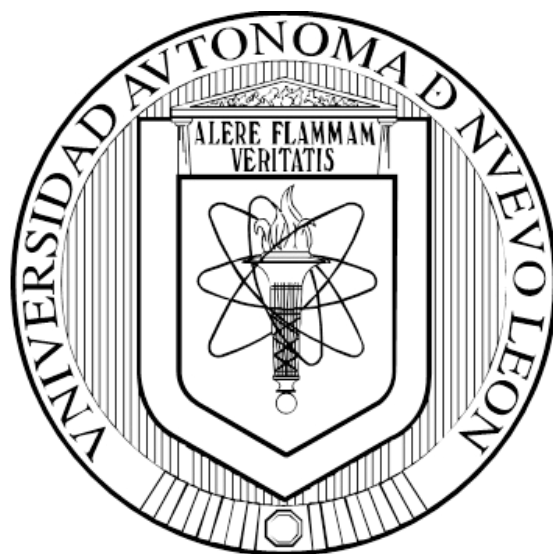
POR

Q.F.B. KAREN YUHAINA REYES MELO

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

NOVIEMBRE 2015

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



**SÍNTESIS, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTITUBERCULOSA *in vitro*
DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO**

POR

Q.F.B. KAREN YUHAINA REYES MELO

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

NOVIEMBRE, 2015

SÍNTESIS, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTITUBERCULOSA *in vitro*
DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO

Aprobación de la tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Dra. Ma. Aracely Hernández Ramírez
Subdirectora de estudios de posgrado

Revisión y aprobación de la Tesis:

“SÍNTESIS, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTITUBERCULOSA *in vitro* DE
ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO”

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Director de tesis

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Co-Director de tesis

Dra. Elvira Garza González

Comité tutorial

Dr. Omar González Santiago

Comité tutorial

Dra. Patricia González Barranco

Comité tutorial

RESUMEN

Karen Yuhaina Reyes Melo

Fecha de graduación: Noviembre 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: **SÍNTESIS, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTITUBERCULOSA *in vitro* DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAIARÉTICO**

Número de páginas:150

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia.

Área de estudio: Farmacia

Propósito y método de estudio:

Las infecciones de las vías respiratorias inferiores causaron 3.1 millones de muertes en todo el mundo en el año 2012, situándose así en el cuarto lugar dentro de las diez principales causas de muerte. A pesar de que existen terapias para combatir este tipo de enfermedades, nos encontramos ante el problema de la resistencia a diferentes antibacterianos. A partir de los años 70's este proceso se está acelerando debido a la presión selectiva ejercida por el amplio uso de los fármacos antibacterianos y las grandes empresas farmacéuticas en los últimos años no han invertido mucho en el desarrollo de nuevos antibacterianos. Es por estas razones que los grupos de investigación deben apoyar en la búsqueda de nuevas moléculas con potencial para desarrollarse como futuros fármacos antibacterianos. Una de las estrategias para el descubrimiento de nuevas moléculas con diferentes actividades es a través de la búsqueda de productos naturales bioactivos. Estas moléculas a su vez pueden modificarse a través de semi-síntesis orgánica, esto con la finalidad de mejorar su actividad y disminuir su toxicidad, y no solamente eso, si no que al obtener diferentes análogos, permite realizar un análisis de la relación estructura química-actividad biológica que permite posteriormente el diseño de fármacos de forma racional. Es por esto que en este proyecto se realizó la semi-síntesis de análogos del ácido meso-dihidroguaiarético (*AmDG*), un producto natural que se encuentra en muchas plantas, entre ellas *Larrea tridentata*, dicho producto natural posee actividad antibacteriana y antituberculosa *in vitro*. Los análogos del *AmDG* se evaluaron sobre cepas de diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas que son resistentes a diferentes antibacterianos. Se evaluó la actividad antituberculosa *in vitro* en cepas de aislados clínicos multifármaco resistentes y una cepa sensible a todos los fármacos antituberculosos de primera línea. Se evaluó la citotoxicidad de los análogos más activos sobre células Vero para determinar la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) y posteriormente se calcularon sus índices de selectividad (IS). Finalmente con todos estos datos se realizó un análisis de la estructura química-actividad biológica de los análogos obtenidos.

Conclusiones y contribuciones:

Se sintetizaron, purificaron y elucidaron estructuralmente 28 nuevos análogos del AmDG, de los cuales 18 fueron ésteres, 2 éteres y 8 aminoéteres. Ocho análogos de AmDG (KRM-3m, KRM-4m, KRM-5m, KRM-8m, KRM-10m, KRM-13d, KRM-15m y KRM-15d) presentaron actividad antibacteriana moderada solamente sobre cepas de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus haemolyticus* resistente a linezolid, *Staphylococcus epidermis* resistente a linezolid y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina) con valores de CMI en el rango de 25 a 50 µg/ml. Los aminoéteres KRM-15m y KRM-15d presentaron el mejor espectro de acción ya que fueron activos contra *S. aureus* RM, *S. haemolyticus* RL, y *E. faecium* RV., con CMI de 50 µg/ml. Estos análogos también presentaron mejor actividad sobre *E. faecium* RV que el fármaco de referencia levofloxacina (CMI >50 µg/l), aunque sus IS fueron menores de 10, indicando así que son citotóxicos y poco selectivos a las bacterias.

Por otro lado 16 análogos (KRM-1m, KRM-2m, KRM-3m, KRM-3d, KRM-4m, KRM-7m, KRM-8m, KRM-8d, KRM-10m, KRM-12m, KRM-12d, KRM-13d, KRM-14m, KRM-14d, KRM-15m y KRM-15d) presentaron actividad antituberculosa *in vitro*, con actividad entre moderada y buena. Los ésteres del AmDG presentaron actividades moderadas (CMI 12.5-50 µg/ml) tanto para las cepas MFR como para la cepa sensible H37Rv, además presentaron IS <10 siendo poco selectivos para las bacterias. Los aminoéteres presentaron actividades entre buena (CMI 3.125-6.25 µg/ml) y moderada CMI 12.5-50 µg/ml), siendo los aminoéteres KRM-12d y KRM-12d los que presentaron mejor actividad e IS>10. El aminoéter KRM-12d presentó una CMI de 6.25 µg/ml, lo que equivale a dos veces menos la potencia de etambutol, pero con un IS >77. El aminoéter KRM-15d presentó una CMI igual a la de etambutol (CMI 3.125 µg/ml) con un IS de 23.43. Estos aminoéteres son candidatos para desarrollarse como fármacos anti-tuberculosos debido a que son selectivos para la bacteria y no son citotóxicos.

Agradecimientos

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

Dra. Elvira Garza González

Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de
Nuevo León

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León

Dr. Juan Manuel de Jesús Favela Hernández

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango

Dr. Javier Vargas Villarreal

Centro de Investigación Biomédica del Noreste

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

Facultad de Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Autónoma de Nuevo León

CONACYT

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS	1
1.2.	LA RESISTENCIA A ANTIBACTERIANOS	2
1.3.	BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.....	6
2.	ANTECEDENTES	9
2.1.	BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES ANTIBACTERIANOS y ANTITUBERCULOSOS EN <i>Larrea tridentata</i>	9
2.2.	EL ÁCIDO <i>meso</i> -DIHIDROGUAIARÉTICO	10
2.3.	POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DEL <i>AmDG</i> SOBRE <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ..	11
2.4.	OBTENCIÓN DE DERIVADOS PARA MEJORAR LA ACTIVIDAD DE MOLÉCULAS DE INTERÉS.....	14
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
3.1.	HIPÓTESIS	17
3.2.	OBJETIVOS	17
3.2.1.	Objetivo general	17
3.2.2.	Objetivos específicos	17
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1.	SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE LOS DERIVADOS DEL <i>AmDG</i>	18
4.1.1.	Síntesis de ésteres del <i>AmDG</i>	18
4.1.2.	Síntesis de éteres y aminoéteres del <i>AmDG</i>	29
4.2.	ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS DERIVADOS DEL <i>AmDG</i>	35
4.3.	ENSAYOS BIOLÓGICOS	36
4.3.1.	Actividad antibacteriana	36
4.3.2.	Ensayo de actividad antituberculosa.....	38
4.3.3.	Actividad citotóxica.....	39
4.4.	MANEJO DE RESIDUOS.....	43
4.4.1.	Síntesis y purificación.....	43
4.4.2.	Ensayos biológicos.....	43
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
5.1.	RENDIMIENTO Y PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ANÁLOGOS DEL <i>AmDG</i>	44
5.1.1.	Síntesis de ésteres.....	44
5.1.2.	Síntesis de éteres y aminoéteres.....	46
5.2.	CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	47
5.2.1.	Caracterización de los ésteres del <i>AmDG</i>	50
5.2.2.	Caracterización de los éteres y aminoéteres del <i>Am-DG</i>	86
5.3.	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	106

5.4.	ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA <i>in vitro</i> DE LOS ANÁLOGOS DEL AmDG.	111
5.5.	CITOTOXICIDAD E ÍNDICE DE SELECTIVIDAD (IS).	118
6.	CONCLUSIONES	121
7.	PERSPECTIVAS	122
8.	REFERENCIAS	123
	APÉNDICE A	130
	APÉNDICE B	134

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies de bacterias que han adquirido resistencia a uno o más antibióticos.

Tabla 2. Principales clases de antibacterianos y sus mecanismos de acción.

Tabla 3. Fármacos de primera y segunda línea para TB y sus mecanismos de acción.

Tabla 4. Actividad del extracto clorofórmico de *L. tridentata* contra diferentes bacterias causantes de enfermedades de las vías respiratorias inferiores.

Tabla 5. Actividad antibacteriana y antituberculosa del AmDG.

Tabla 6. Derivados de productos naturales y sintéticos con mejor actividad que el producto de partida.

Tabla 7. Bacterias resistentes a diferentes fármacos utilizadas en el ensayo de actividad antibacteriana.

Tabla 8. Rendimientos y características físicas de los ésteres obtenidos.

Tabla 9. Rendimientos y características físicas de los éteres y aminoéteres obtenidos.

Tabla 10. Actividad antibacteriana y Log P de análogos del AmDG.

Tabla 11. Actividad antituberculosa y Log P de derivados del AmDG.

Tabla 12. Citotoxicidad e índice de selectividad de análogos del AmDG con actividad antibacteriana.

Tabla 13. Citotoxicidad e índice de selectividad de análogos del AmDG con actividad antituberculosa.

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Reacción general para los análogos obtenidos por alcoholisis.
- Esquema 2.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-1m y KRM-1d.
- Esquema 3.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-2m y KRM-2d.
- Esquema 4.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-4m y KRM-4d.
- Esquema 5.** Reacción general para los ésteres obtenidos por la metodología de Steglich.
- Esquema 6.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-3m y KRM-3d.
- Esquema 7.** Esquema de síntesis de los derivados KRM-5m y KRM-5d.
- Esquema 8.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-6m y KRM-6d.
- Esquema 9.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-9m y KRM-9d.
- Esquema 10.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-7m y KRM-7d.
- Esquema 11.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-8m y KRM-8d.
- Esquema 12.** Reacción general para la síntesis de éteres y aminoéteres.
- Esquema 13.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-10m y KRM-10d.
- Esquema 14.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-12m y KRM-12d.
- Esquema 15.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-13m y KRM-13d.
- Esquema 16.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-14m y KRM-14d.
- Esquema 17.** Reacción para la síntesis de los análogos KRM-15m y KRM-15d.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Proceso general de resistencia a antibacterianos.
- Figura 2.** Enfoque multidisciplinario de la química medicinal.
- Figura 3.** Ácido meso dihidroguaiarético.
- Figura 4.** Rutas en las que interviene CoA transferasa.
- Figura 5.** Posible modo de unión de la molécula AmDG en la CoA-Mt unida al sitio activo.
- Figura 6.** Predicción de las interacciones de la molécula AmDG en la Co-At uniendo al sitio por estudios de acoplamiento molecular (docking).
- Figura 7.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) de Am-DG.
- Figura 8.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de Am-DG.
- Figura 9.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-1m.
- Figura 10.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-1m.
- Figura 11.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-1d.
- Figura 12.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-1d.
- Figura 13.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-2m.
- Figura 14.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-2m.
- Figura 15.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-2d.
- Figura 16.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-2d.
- Figura 17.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-3m.
- Figura 18.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-3m.
- Figura 19.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-3d.
- Figura 20.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-3d.
- Figura 21.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-4m.
- Figura 22.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-4m.
- Figura 23.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-4d.
- Figura 24.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-4d.

Figura 25. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-5m.
Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-5m.
Figura 27. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-5d.
Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-5d.
Figura 29. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-6m.
Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-6m.
Figura 31. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-6d.
Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-6d.
Figura 33. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-9m.
Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-9m.
Figura 35. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-9d.
Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-9d.
Figura 37. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-7m.
Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-7m.
Figura 39. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-7d.
Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-7d.
Figura 41. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-8m.
Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-8m.
Figura 43. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-8d.
Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-8d.
Figura 45. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-10m.
Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-10m.
Figura 47. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-10d.
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-10d.
Figura 49. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-12m.
Figura 50. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-12m.

- Figura 51.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-12d.
- Figura 52.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-12d.
- Figura 53.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-13m.
- Figura 54.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-13m.
- Figura 55.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-13d.
- Figura 56.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-13d.
- Figura 57.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-14m.
- Figura 58.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-14m.
- Figura 59.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-14d.
- Figura 60.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-14d.
- Figura 61.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-5m.
- Figura 62.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-15m.
- Figura 63.** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) KRM-15d.
- Figura 64.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) KRM-15d.
- Figura 65.** Estructura química de derivados del *AmDG* que presentaron actividad antibacteriana y del control positivo.
- Figura 66.** Ésteres de heterociclos aromáticos con actividad antibacteriana.
- Figura 67.** Ésteres y éter con diferente longitud de cadena y que poseen actividad antibacteriana.
- Figura 68.** Aminoéteres con actividad antibacteriana.
- Figura 69.** Estructura química de análogos del *AmDG* que presentaron actividad antituberculosa *in vitro* y de los controles positivos.
- Figura 70.** Ésteres activos sobre cepas de *M. tuberculosis*.
- Figura 71.** Aminoéteres con actividad antituberculosa
- Figura 72.** Comparación entre aminoéter más activo y etambutol.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
<i>Am</i> DG	Ácido meso dihidroguaiarético
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CoA	Coenzima A.
<i>d</i>	Doble
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCU	Diciclohexilurea
<i>dd</i>	Doble de doble
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPS	Derivado de Producto Sintético
<i>dt</i>	Doble de triples
Eq.	Equivalente
h	Horas
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MFR	Multifármaco Resistente
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min.	Minutos
mmol	Milimol
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
NDM-1+	New Delhi Metallo-beta-lactamasa positiva

OMe	Metoxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXA-48	Oxacilinas-48
P.F.	Punto de fusión
PIN	Producto inspirado en producto natural
PN	Producto Natural
PS	Producto Sintético
RL	Resistente a Linezolid
RM	Resistente a Meticilina
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RV	Resistente a Vancomicina
<i>s</i>	Singulete
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SS	Semi sintético
<i>t</i>	Triplete
TB	Tuberculosis
TB-MFR	Tuberculosis Multifármaco Resistente Tuberculosis Extremadamente fármaco
TB-XFR	resistente
Temp.	Temperatura
THF	Tetrahidrofurano
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Desplazamiento químico
$\mu\text{g/ml}$	Microgramo por mililitro
μL	Microlitro

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Las enfermedades infecciosas son causadas por diferentes agentes patógenos como virus, bacterias, hongos y parásitos. Estas enfermedades son un problema de salud importante a nivel mundial, sobre todo en países con ingresos bajos. Las enfermedades de las vías respiratorias inferiores, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), las enfermedades diarreicas, la malaria y la tuberculosis (TB) en conjunto representan casi un tercio de las causas de muerte en estos países. Mientras que en países con altos ingresos las enfermedades infecciosas que causan más muertes son las de las vías respiratorias inferiores. Las infecciones de las vías respiratorias inferiores causaron 3.1 millones de muertes en todo el mundo en el año 2012, situándose así en el cuarto lugar dentro de las diez principales causas de muerte.¹⁻² A pesar de que existen terapias para combatir la mayoría de este tipo de enfermedades, queda claro que no es un problema resuelto y es importante que los grupos de investigación contribuyan con la solución de este problema.

1.2. LA RESISTENCIA A ANTIBACTERIANOS

Por más de 60 años los fármacos antibacterianos se han considerado la cura para casi todas las infecciones bacterianas, y aunque sí lo han sido durante un tiempo, nos encontramos que, tras el desarrollo de un nuevo fármaco antibacteriano le sigue la aparición de cepas resistentes a éste. El desarrollo de la resistencia es un proceso evolutivo normal de los microorganismos (Figura 1).³⁻⁴ A partir de los años 70's este proceso se está acelerando debido a la presión selectiva ejercida por el amplio uso de los fármacos antibacterianos.

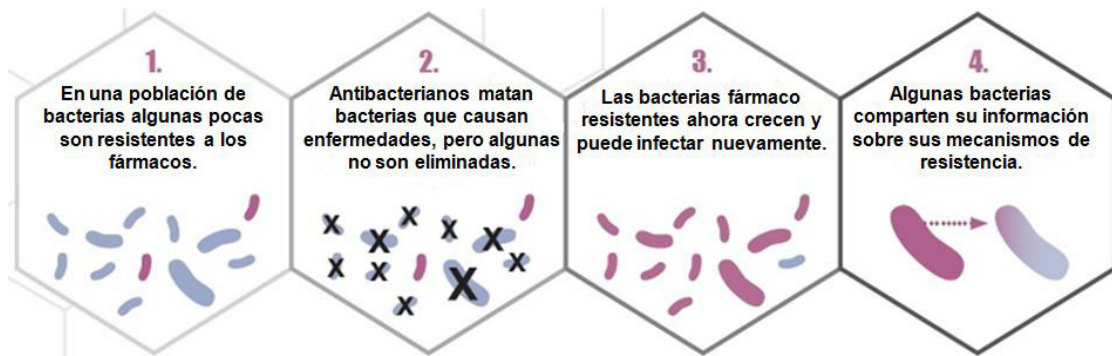


Figura 1. Proceso general de resistencia a antibacterianos.

El uso inadecuado de los antimicrobianos es uno de los factores determinantes para la resistencia, a ello contribuyen el uso excesivo, insuficiente e inapropiado de los mismos. En la ganadería al utilizarse dosis sub-terapéuticas de antibióticos para fomentar el crecimiento o prevenir enfermedades en los animales, se favorece la aparición de microorganismos resistentes que se transmiten al ser humano.⁵ La cantidad de microorganismos que han desarrollado resistencia a diferentes antibacterianos va cada vez en incremento

y pueden contraerse en hospitales, en la comunidad o incluso de animales (ver Tabla 1).⁶

Tabla 1. Especies de bacterias patógenas que han adquirido resistencia a uno o más antibióticos (OMS).

Medio de adquisición	Bacterias
Extrahospitalario	<i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Hospitalario	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .
Zoonosis	<i>Campylobacter spp.</i> y <i>Salmonella spp.</i>

En el año 2014, el primer reporte de la OMS sobre la resistencia a los antimicrobianos, remarca algunas bacterias como de importancia internacional: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Salmonella* no tifoidea, especies de *Shigella*, *N. gonorrhoeae* y *M. tuberculosis*. Estas bacterias tienen un impacto significativo en la salud pública en todo el mundo debido a que comúnmente son adquiridas en hospitales, en la comunidad, o ambos.

Sin lugar a dudas es de suma importancia la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antibacteriana y de ser posible con mecanismos de acción diferentes a los ya conocidos⁷ (Tabla 2), para así poder hacer frente a este problema de salud mundial.⁸

En 1993, la OMS consideró a la TB una emergencia a nivel mundial debido a que esta enfermedad se ha asociado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)/SIDA y a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a

los fármacos de primera y segunda línea (Tabla 3). Actualmente, la TB se ubica como la segunda causa de muerte por enfermedad infecciosa en todo el mundo. Tan solo en el año 2013 se estima que hubo 9 millones de casos de TB y 1.4 millones de muertes por TB. En 2013 se estimó que 480,000 personas desarrollaron TB resistente a fármacos (TB-MFR). En la TB-MFR, se presenta resistencia a los dos fármacos que son actualmente los más efectivos, isoniazida y rifampicina y por lo tanto, requiere de un tratamiento que es costoso y puede tener graves efectos secundarios.⁹⁻¹⁰

Tabla 2. Principales clases de antibacterianos y sus mecanismos de acción.

Clase	Ejemplo	Mecanismo de acción
Aminoglucósidos	Gentamicina	Inhibición de la síntesis de proteínas.
Inhibidores de beta-lactamasas	Ácido clavulánico	Inhibición de la síntesis de la pared celular.
Carbapenémicos	Imipenem	Inhibición de la síntesis de la pared celular.
Cefalosporinas	Cefepima, Ceftriaxona	Inhibición de la síntesis de la pared celular.
Fluoroquinolonas	Levofloxacina	Inhibición de la síntesis de DNA
Glicopéptidos	Vancomicina	Inhibición de la síntesis de la pared celular.
Cetólidos	Teletromicina	Inhibición de la síntesis de proteínas.
Lincosaminas	Clindamicina	Inhibición de la síntesis de proteínas.
Oxazolidinonas	Linezolid	Inhibición de la síntesis de proteínas.
Macrólidos	Eritromicina, Azitromicina.	Inhibición de la síntesis de proteínas.
Beta-lactamas monocíclicas	Aztreonam	Inhibición de la síntesis de la pared celular.
Penicilinas	Ampicilina	Inhibición de la síntesis de la pared celular.
Fenicoles	Cloramfenicoles	Inhibición de la síntesis de proteínas.
Estreptograminas	Dalfopristina	Inhibición de la síntesis de proteínas.
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Inhibición de la síntesis de ácido fólico.

Tabla 3. Fármacos de primera y segunda línea para TB y sus mecanismos de acción.

Fármacos de primera línea	Mecanismo de acción
Isoniazida	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos.
Rifampicina	Inhibición de la RNA polimerasa, inhibiendo el proceso de transcripción
Pirazinamida	Disminución de los niveles óptimos de pH celular, inhibiendo así la ácido graso sintasa y el transporte de membrana
Etambutol	Inhibición de la síntesis de arabinogalactanos y arabinomananos
Estreptomina	Inhibición de la síntesis de proteínas uniéndose a un sitio activo de rRNA 16S en la subunidad ribosomal 30s.
Fármacos de segunda línea	Mecanismo de acción
Levofloxacino Monofloxacino Ofloxacino	Inhibición de la replicación y transcripción, al inhibir la DNA girasa.
Kanamicina Amikacina	Interferencia en la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad ribosomal 30s .
Cicloserina	Inhibición de la síntesis de pared celular.

Otros datos preocupantes son los reportes de *M. tuberculosis* extremadamente resistente a fármacos (XFR-TB), que se define como la TB-MFR con resistencia adicional a cualquier fluoroquinolona y cualquier medicamento inyectable de segunda línea como la kanamicina y amikacina. La XFR-TB se destacó como una amenaza global para la salud pública en el año 2006, especialmente en los países de alta prevalencia del VIH. Estas cepas ya han sido identificadas en 100 países.¹¹

En México durante el año 2014 se reportaron 18, 793 casos nuevos de TB, de los cuales 15, 714 corresponden a TB pulmonar, mientras que se reportaron

2,531 defunciones en 2011 por esta causa. El número de casos prevalentes de TB-MFR fue de 161 casos hasta 2012.¹²

1.3. BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.

En la búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas con diferentes actividades farmacológicas se pueden tomar en cuenta tres objetivos importantes, que son buscar y desarrollar fármacos más potentes, más selectivos y menos tóxicos.

En el intento por encontrar o mejorar estas propiedades en los fármacos se consideran cuatro estrategias de investigación:

1. **Estudio u observación fortuita de los efectos biológicos de productos de origen natural o sintético.** Como ejemplo de esto tenemos el descubrimiento de la penicilina en 1928.
2. **Cribado sistemático de familias de compuestos generalmente elegidas al azar, en determinados ensayos biológicos o bioquímicos.** Consiste en someter moléculas de origen natural o sintético a ensayos biológicos de actividad, sin una hipótesis previa sobre su posible potencial terapéutico o farmacológico.
3. **Mejora de los fármacos ya existentes.** Esta estrategia tiene como finalidad mejorar el perfil terapéutico o toxicológico de un fármaco y mejorar sus propiedades fisicoquímicas. Para ello hay tres estrategias principales:
 - a. Estudio de los efectos secundarios.
 - b. Estudio de los metabolitos del fármaco.

- c. Estudio de intermediarios de síntesis.
- d. Modificación estructural de fármacos conocidos.

4. Diseño racional, basado en la analogía estructural de un ligando endógeno o en la generación de colecciones de compuestos a partir de una diana terapéutica determinada. Es necesario el conocimiento del proceso bioquímico responsable de la disfunción que se pretende combatir. Así también se pueden proponer diseños a partir de datos estructurales del propio receptor.¹³⁻¹⁴

Una de las estrategias que nos pueden dar resultados más rápidos es la mejora de moléculas de las cuales ya se conoce su actividad. La molécula que tiene cierta propiedad farmacológica y a partir de la cual se realizarán las modificaciones se le llama **cabeza de serie** o **compuesto líder**. Al modificar estructuralmente al compuesto líder también estará cambiando su efecto farmacológico ya sea potenciándose o atenuándose, así como su solubilidad, reactividad química, estabilidad, o su metabolismo *in vivo*, entre otras propiedades.

Modificaciones como la homologación en las cadenas alquílicas, cambios en el tamaño del anillo e isómeros de posición en anillos son algunas de las modificaciones más frecuentes, ya que cuando no se conoce el sitio activo del compuesto líder, este tipo de modificaciones generales pueden indicarnos qué tipo de cambios mejoran la actividad o la disminuyen y así ir dirigiendo la síntesis de análogos a modificaciones más específicas que finalmente nos

harán llegar a la obtención de una molécula o serie de moléculas con las propiedades deseadas.

Como ya se había mencionado, uno de los objetivos de la química medicinal es lograr que los fármacos sean menos tóxicos. Así tenemos que si una molécula presenta una actividad muy buena pero es muy tóxica, no cumplirá con el objetivo de ser un fármaco seguro y por tanto no llega a ser un candidato potencial para desarrollarse como medicamento. Es por esto que el conocimiento de la citotoxicidad es importante para el desarrollo de moléculas que brinden un efecto terapéutico deseado y sean seguras.

CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

2.1. BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES ANTIBACTERIANOS y ANTITUBERCULOSOS EN *Larrea tridentata*.

En estudios previos nuestro grupo de investigación evaluó los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso de las partes aéreas de *L. tridentata*, y se encontró que el extracto clorofórmico presentó actividad hacia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* H37Rv fármaco-resistentes (Tabla 4).¹⁵

En un estudio posterior se observó que el extracto clorofórmico de *L. tridentata* también presentó actividad hacia diferentes bacterias responsables de infecciones en las vías respiratorias inferiores (Tabla 4).¹⁶

Tabla 4. Actividad del extracto clorofórmico de *L. tridentata* contra diferentes bacterias causantes de enfermedades de las vías respiratorias inferiores.

Bacteria	Clave	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en µg/ml
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ATCC 27294	200
<i>M. tuberculosis</i> resistente a rifampicina	ATCC 35838	100-200
<i>M. tuberculosis</i> resistente a isoniazida	ATCC 35822	100-200
<i>M. tuberculosis</i> resistente a estreptomycin	ATCC 35820	100
<i>M. tuberculosis</i> resistente a etambutol	ATCC 35837	100-200
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 49619	31.25
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	250
<i>S. aureus</i>	ATCC BAA-44	125

2.2. EL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAIARÉTICO

Favela-Hernández y colaboradores basándose en los antecedentes de actividad antibacteriana y antituberculosa que presentaba *L. tridentata*, reportaron en el año 2012 el aislamiento y caracterización estructural de tres lignanos y cuatro flavonoides de esta planta, los cuales fueron evaluados para su actividad antibacteriana y antituberculosa, encontrándose que el ácido meso-dihidroguaiarético (AmDG) presentó actividad hacia *S. aureus* resistente a metilicina (RM), *M. tuberculosis* H37Rv y aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR (Tabla 5).¹⁷

Tabla 5. Actividad antibacteriana y antituberculosa del ácido *meso*-dihidroguaiarético

Bacteria	CMI µg/ml
<i>S. aureus</i> RM ATCC (BAA-44)	50
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC (27294)	50
Aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> MFR	12.5-50 (n=3)

El AmDG es un lignano obtenido de la planta *L. tridentata* así como de otras plantas como *Machilus thunbergii*¹⁸, *Beilshmiedia tsangii*¹⁹, *Machilus wangchiana*²⁰, *Myristica fragans*²¹⁻²², *Saurus chinensis*²³, *Schisandra sphenanthera*²⁴⁻²⁵, entre otras. Presenta un peso molecular de 330.41 g/mol.²⁶ Su estructura consiste en dos anillos aromáticos disustituidos con un grupo hidroxilo y un metoxilo, estos anillos a su vez están unidos por una cadena alifática de cuatro carbonos y dos grupos metilo centrales (Figura 3).

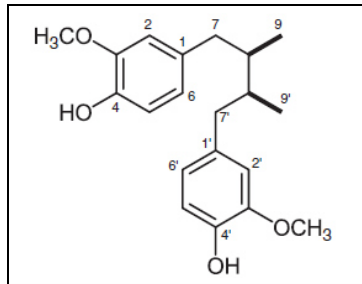


Figura 3. Ácido *meso*-dihidroguaiarético

2.3. POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DEL *AmdG* SOBRE *M. tuberculosis* H37Rv

En otro trabajo realizado por nuestro equipo de investigación se realizaron aportaciones al posible mecanismo de acción del *AmdG*. Mediante el uso de microarreglos se buscó determinar qué genes estaban siendo afectados por el *AmdG*.

Los resultados obtenidos mostraron la sobre-expresión de genes que codifican para la enzima Coenzima A transferasa (CoA transferasa-Mt) que participa principalmente en dos rutas. Una de ellas es la ruta de la degradación del geraniol donde la CoA transferasa tiene la función de convertir el ácido geránico a *trans*-geranil-CoA. Por otro lado en la ruta del 2-metilnaftaleno, la CoA transferasa cataliza dos reacciones, una es la conversión del ácido naftil-2-metilsuccínico a naftil-2-metil succinil-CoA y la otra es la transformación de 2-naftoil-CoA a 2-naftoato.²⁷

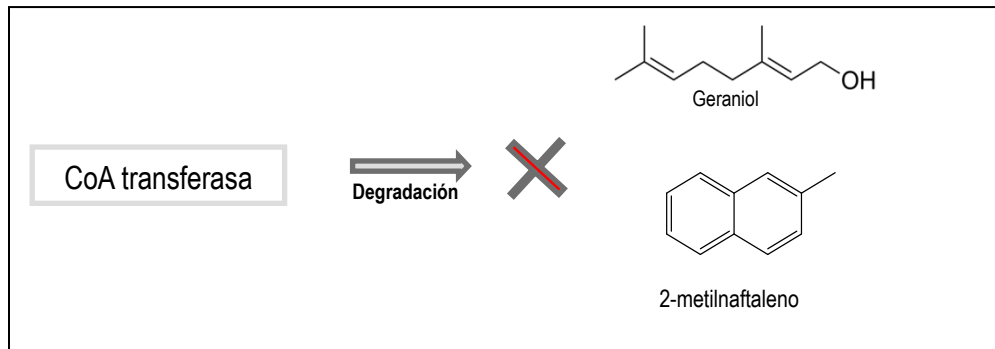
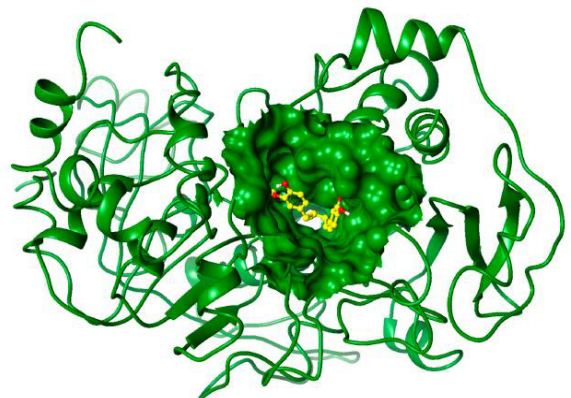


Figura 4. Rutas en las que interviene CoA transferasa

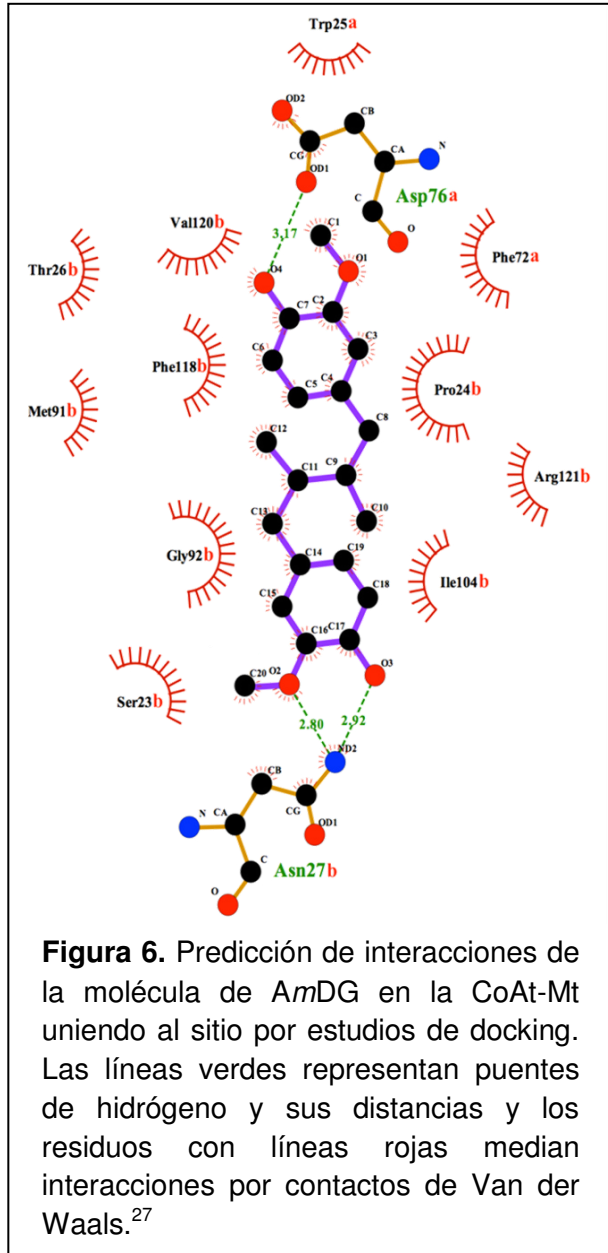
Se sugirió que el *AmDG* actúa sobre *M. tuberculosis* teniendo como blanco farmacológico la CoA transferasa del gen Rv3551. El *AmDG* inhibe a esta enzima, lo que provoca que geraniol no puede ser degradado, haciendo que este último se acumule en el interior de la micobacteria a altos niveles que llegan a ser tóxicos. Altas concentraciones de este monoterpene ocasionan daño a nivel de membrana celular generando alteración en los procesos celulares y la posterior muerte del microorganismo.

Se evaluó el posible modo de unión del *AmDG* en Coenzima A transferasa de *M. tuberculosis* (CoAt-Mt). (Figura 5).²⁸

Figura 5. Posible modo de unión de la molécula de *AmDG* en la CoA-Mt unida al sitio activo.²⁸



Los resultados del docking muestran que la molécula de *AmDG* se une a la



cavidad de la CoAt-Mt que pertenece a su sitio activo. Los resultados mostraron que *AmDG* interactúa con residuos Trp25, Phe72, y Asp76 de la subunidad alfa (a), y Pro24, Thr26, Asn27, Met91, Gly92, Ile104, Phe 118, Val120 y Arg121 de la subunidad beta (b). Las uniones en los residuos de Asp76a y Asn27b con el *AmDG* son mediadas por puentes de hidrógeno, mientras que las otras se dan por interacciones de van der Waals (Figura 6).²⁷

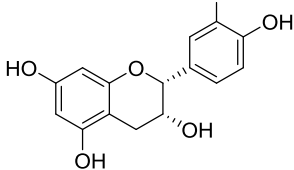
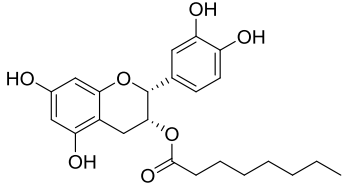
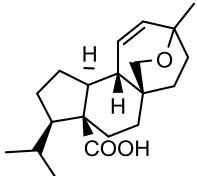
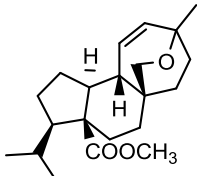
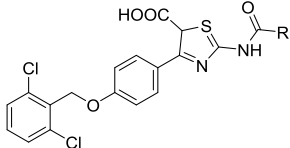
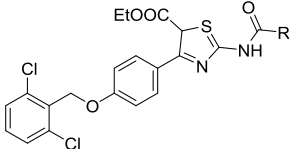
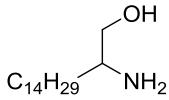
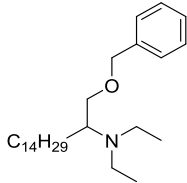
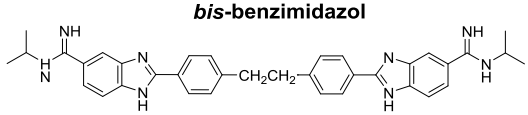
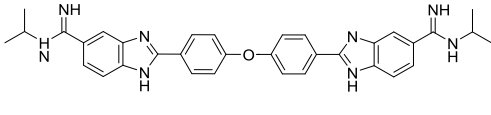
Conociendo que el *AmDG* presenta actividad antibacteriana y antituberculosa y que además propone un nuevo mecanismo de acción, hace suponer que la obtención de nuevos

análogos derivados de este producto natural podrían presentar mejor actividad antibacteriana y/o antituberculosa y a su vez nos puede indicar el camino para la generación de nuevos fármacos para combatir esta problemática mundial.

2.4. OBTENCIÓN DE DERIVADOS PARA MEJORAR LA ACTIVIDAD DE MOLÉCULAS DE INTERÉS.

La resistencia a antibacterianos va en aumento de forma acelerada provocando preocupación alrededor de todo el mundo. Una de las formas de ayudar a combatir este problema es a través del descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas con actividad antibacteriana que presenten un mecanismo de acción diferente a los ya conocidos. En este sentido se investiga en la obtención de derivados a partir de productos naturales o de moléculas de origen sintético. Algunos derivados de interés son los ésteres y adición de grupos alquilo y alquilamina, los cuales cambian las propiedades originales de la molécula y a su vez los diferentes grupos funcionales que se pueden introducir por sus características pueden favorecer la actividad aumentando o disminuyendo la toxicidad de alguna molécula con una actividad ya conocida. Como ejemplo tenemos la obtención de ésteres a partir de (-)-epicatequina, dicho producto natural no presentaba actividad a 200 µg/ml contra *S. aureus* resistente a metilina (RM) y *E. faecalis* resistente a vancomicina (RV), al obtener los ésteres de este producto natural mejoró la actividad de forma significativa logrando actividades menores a 200 µg/ml.²⁹ Otro ejemplo es la obtención de derivados del ácido mulínico encontrándose que el éster de metilo tuvo mejor actividad antituberculosa que el producto natural.³⁰ En el caso de los derivados esterificados de una molécula sintética del tipo 4-(4-(2,6-diclorobenciloxi)fenil)tiazol-5 carboxilato, estos presentaron una mejor actividad antituberculosa que la molécula original (ver Tabla 6).³¹

Tabla 6. Derivados de productos naturales y sintéticos con mejor actividad que el producto de partida

Producto de partida	Derivado obtenido
<p>(-)-Epicatequina.</p>  <p>PN: CMI >200 µg/mL para <i>S. aureus</i> RM CMI > 200 µg/mL para <i>E. faecalis</i> RV</p>	<p>3-O-octanoil(-)-epicatequina.</p>  <p>SS: CMI 50 µg/mL para <i>S. aureus</i> RM. CMI 100 µg/mL para <i>E. faecalis</i> RV</p>
<p>Ácido mulinélico. (<i>Mulinum crassifolium</i>).</p>  <p>PN: CMI 100 µg/ml para <i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI 50 µg/ml para aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> MFR</p>	<p>Éster de metilo del ácido mulinélico</p>  <p>SS: CMI 12.5 µg/ml para <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> MFR</p>
<p>Ácido 4-(4-(2,6-diclorobenciloxi)fenil)tiazol-5-carboxílico</p>  <p>PS: Ácidos carboxílicos: CMI >128 µM para <i>M. tuberculosis</i> H37Rv</p>	<p>Ésteres de etilo de 4-(4-(2,6-diclorobenciloxi)fenil)tiazol-5-carboxilato.</p>  <p>DPS: Ésteres de etilo: CMI 1-7.6 µM para <i>M. tuberculosis</i> H37Rv</p>
 <p>PIN: Aminoalcohol: CMI= 24 µM para <i>M. tuberculosis</i> H37Rv</p>	 <p>Aminoéter: CMI= 3.1 µM para <i>M. tuberculosis</i> H37Rv</p>
<p>bis-benzimidazol</p>  <p>PS: CMI = 0.12 µg/mL para <i>S. aureus</i> RM. CMI = 0.12-0.5 µg/mL para <i>E. faecium</i> RV</p>	 <p>DPS: CMI <0.06 µg/mL para <i>S. aureus</i> RM. CMI = <0.06-0.12 µg/mL para <i>E. faecium</i> RV</p>

PN: Producto natural, **SS:** Producto semi-sintético, **PS:** Producto sintético, **DPS:** Derivado de producto sintético, **PIN:** Producto inspirado en producto natural.

Otro tipo de moléculas que han presentado buena actividad son los aminoéteres. Como ejemplo de esto tenemos que se obtuvo una molécula de este tipo a partir de un amino alcohol, el cual presentó actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv, posteriormente se obtuvo una serie de derivados entre los cuales un aminoéter presentó mejor actividad que el producto de partida.³²

La formación de éteres también ha mostrado mejorar algunas moléculas como es el caso de la molécula del tipo bis-benzimidazol la cual tenía como puente de unión central un grupo etil, dicha molécula presentó buena actividad hacia *S. aureus* RM y *E. faecium* RV, posteriormente se realizó una modificación en el puente de unión cambiando el grupo etilen por un oxígeno para formar un éter el cual presentó mejor actividad que la molécula líder.³³

La característica del AmDG de poseer dos alcoholes fenólicos permite obtener ésteres y éteres con diferentes grupos funcionales así como la sustitución con alquilaminas para formar aminoéteres.

Con base en la propuesta del posible mecanismo de acción sobre *M. tuberculosis* H37Rv, resulta interesante la obtención de derivados mono-sustituidos y di-sustituidos en los alcoholes aromáticos de la molécula para aportar mayor información y confirmar si las interacciones se están dando en la diana molecular propuesta y de esta forma poder realizar en posteriores estudios un diseño racional de análogos del AmDG.

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Los análogos del ácido *meso*-dihidroguaiarético presentarán mayor actividad antibacteriana y antituberculosa *in vitro* que los controles positivos etambutol y levofloxacina.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

Sintetizar y caracterizar estructuralmente análogos del ácido *meso*-dihidroguaiarético y determinar sus propiedades antibacterianas y antituberculosas *in vitro*.

3.2.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar análogos del AmDG.
2. Purificar y caracterizar análogos del AmDG.
3. Determinar la actividad antibacteriana de los análogos obtenidos.
4. Determinar la actividad antituberculosa *in vitro* de los análogos obtenidos.
5. Determinar la citotoxicidad de los análogos que presentaron mayor actividad.
6. Analizar la relación estructura química-actividad biológica de los análogos obtenidos.

CAPÍTULO IV

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE LOS DERIVADOS DEL *AmDG*.

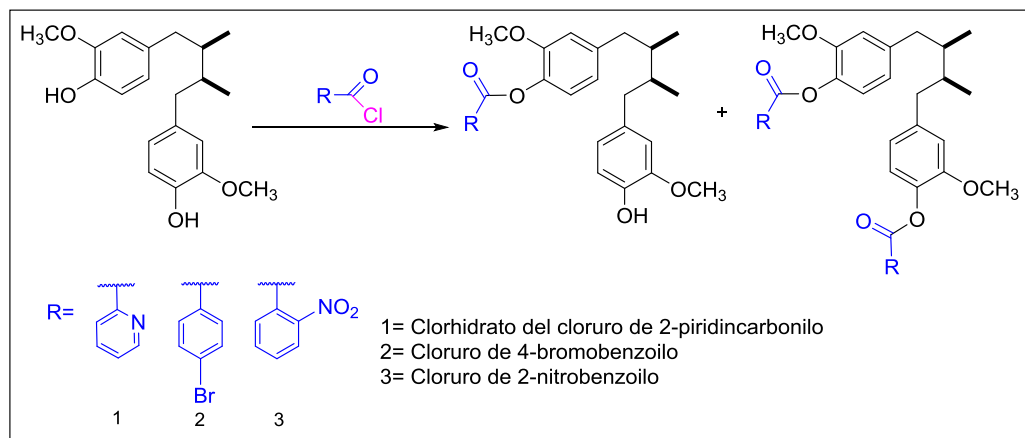
Se sintetizaron 28 análogos de *AmDG*, los cuales se dividieron en tres series diferentes: la serie de los ésteres, la serie de los éteres y la serie de aminoéteres.

4.1.1. Síntesis de ésteres del *AmDG*.

Para sintetizar la serie de ésteres del *AmDG* se realizaron dos metodologías distintas.

4.1.1.1. Metodología 1: Alcoholisis.³⁴

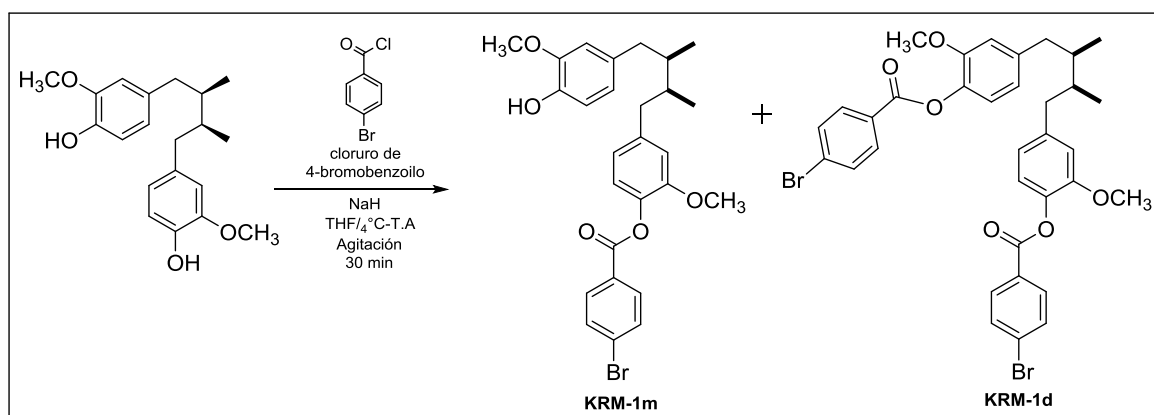
Consistió en hacer reaccionar el producto natural (1 equivalente) con diferentes cloruros de ácido (1.5 equivalentes) en presencia de una base (1.5 equivalentes), en un solvente aprótico, con agitación y a temperatura ambiente (Esquema 1).



Esquema 1. Reacción general para los análogos obtenidos por alcoholisis.

4.1.1.1.1. Síntesis de los derivados KRM-1m y KRM-1d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* en tetrahidrofurano (THF, 2 ml), se adicionó hidruro de sodio (NaH, 0.113 mmol, 4.52 mg, al 60%) y posteriormente el cloruro de 4-bromobenzoilo (0.113 mmol, 24.79 mg) a temperatura ambiente y con agitación. Se monitorizó la reacción por cromatografía en capa fina (CCF) a los 15 y a los 30 minutos, para verificar el progreso de la reacción. A los 30 minutos se adicionaron 2 ml de agua desionizada para detener la reacción (Esquema 2).

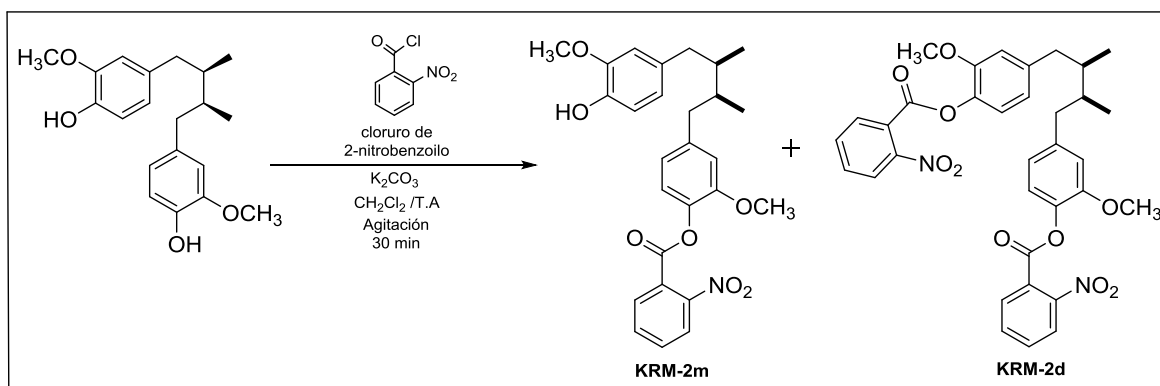


Esquema 2. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-1m y KRM-1d.

Purificación: Se realizaron dos extracciones lavando la fase acuosa con 2 ml de acetato de etilo. Se hizo pasar la fase orgánica por una cama de Na_2SO_4 anhidro para eliminar el agua y se concentró a vacío. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetato de etilo y realizando cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 400 μL . El derivado disustituido se obtuvo en la polaridad 90:10, en las fracciones 17-20, mientras que el derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 90:10, en las fracciones 25-28.

4.1.1.1.2. Síntesis de los derivados KRM-2m y KRM-2d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *Am*DG en diclorometano (CH_2Cl_2 , 2 ml) con cloruro de 2-nitrobenzoilo (0.113 mmol, 15 μl), carbonato de potasio (K_2CO_3 , 0.113 mmol, 15.61 mg), a temperatura ambiente y con agitación. Se monitorizó la reacción por CCF a los 15 y a los 30 minutos (Esquema 3).

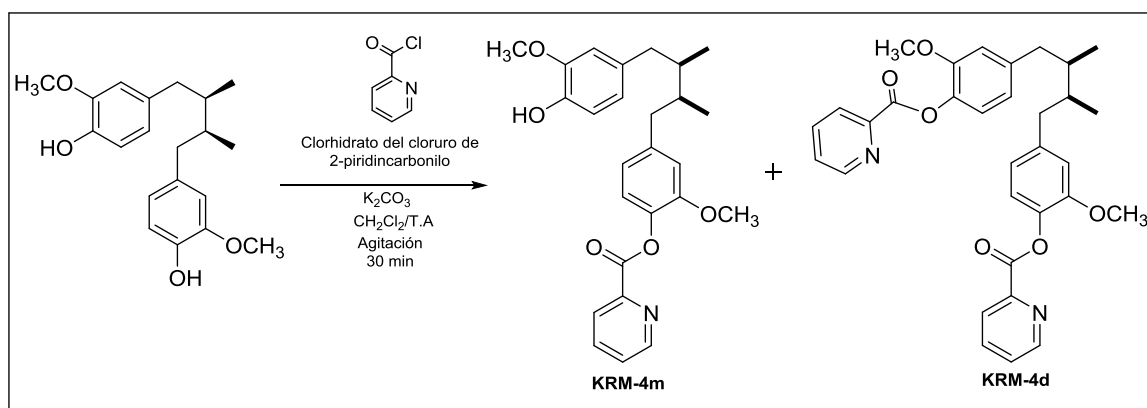


Esquema 3. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-2m y KRM-2d.

Purificación: Se purificó la mezcla de reacción cruda, sin pretratamiento. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetona, realizando cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 400 μL . El derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 70:30, en las fracciones 57-75, mientras que el derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 65:45 y 60:40, en las fracciones 105-150.

4.1.1.1.3. Síntesis de los derivados KRM-4m y KRM-4d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *Am*DG en CH₂Cl₂ (2 ml) con clorhidrato del cloruro de 2-piridincarbonilo (0.113 mmol, 20.11 mg) y K₂CO₃ (0.113 mmol, 15.61 mg), a temperatura ambiente y con agitación. Se monitorizó la reacción por CCF a los 15 y a los 30 minutos (Esquema 4).

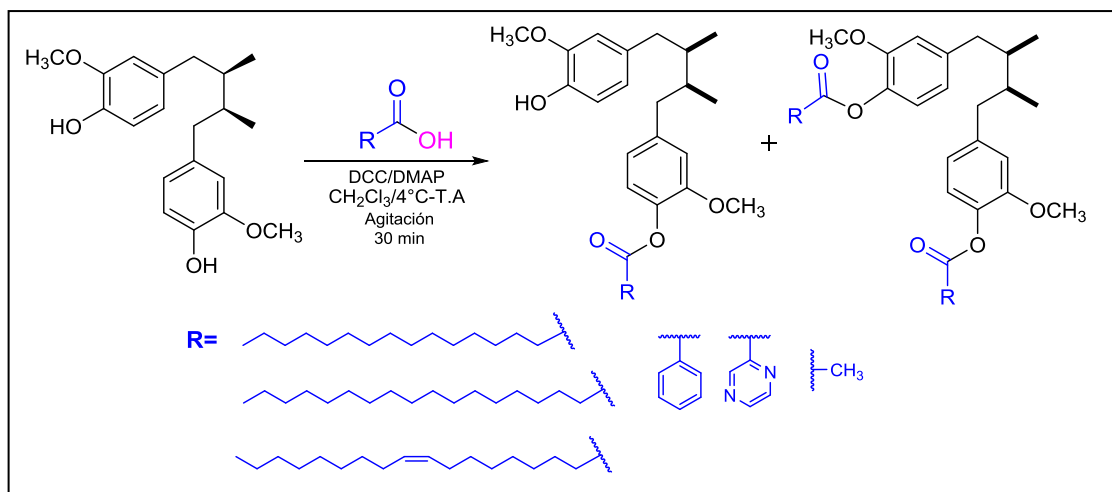


Esquema 4. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-4m y KRM-4d.

Purificación: Se adicionaron 2 ml de agua desionizada y se realizó una separación líquido-líquido con CH₂Cl₂. Se hizo pasar la fase orgánica por Na₂SO₄ para eliminar el agua y se dejó secar a vacío. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetona, realizando cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 400 µL. El derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 80:20, en las fracciones 67-90, mientras que el derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 70:30, en las fracciones 105-118.

4.1.1.2. Metodología 2: Reacción de Steglich

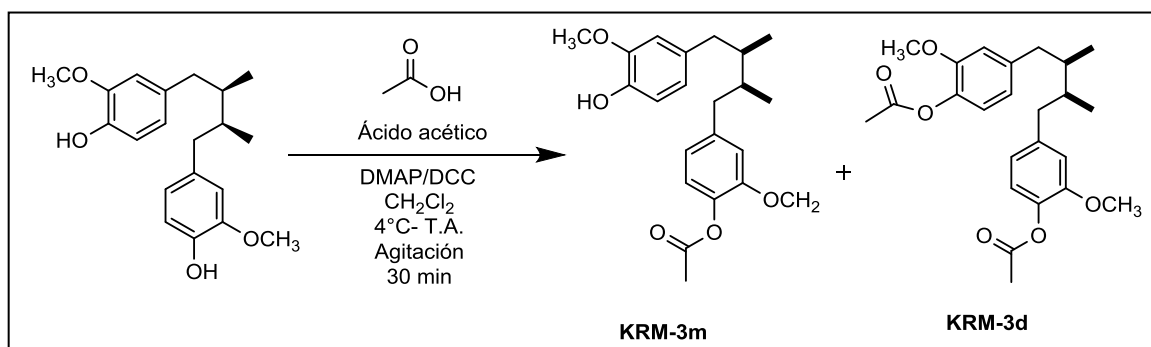
Esta metodología consiste en utilizar ácidos carboxílicos en presencia de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP), y diclorometano como solvente (DCM)³⁵ como se observa en el Esquema 5. A esta esterificación se le considera suave en comparación con la esterificación de Fisher.



Esquema 5. Reacción general para los ésteres obtenidos por la metodología de Steglich

4.1.1.2.1. Síntesis de los derivados KRM-3m y KRM-3d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* en DCM (2.5 ml) con DMAP (0.083 mmol, 10.14 mg) y DCC (0.1134 mmol, 23.39 mg) en baño de hielo, posteriormente se adicionó ácido acético (0.1134 mmol, 6.81 mg), después de 10 minutos se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo por CCF a los 15 y 30 minutos (Esquema 6).

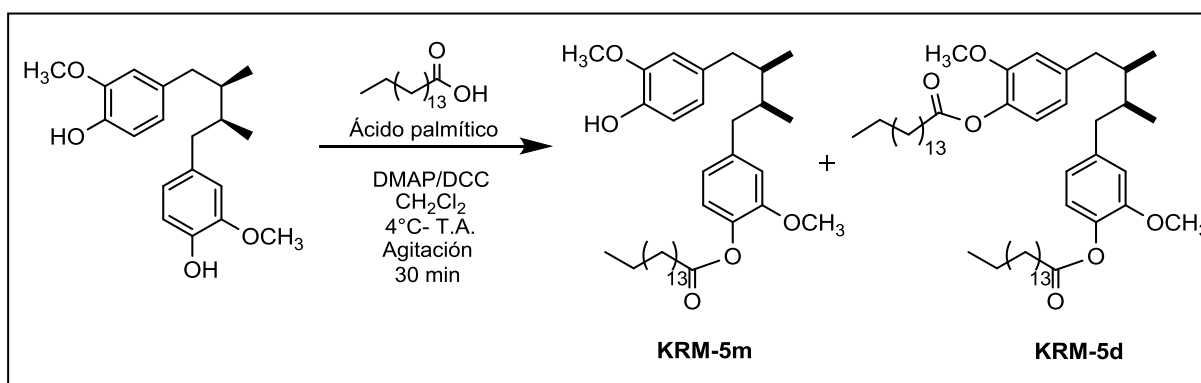


Esquema 6. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-3m y KRM-3d

Purificación: La mezcla de reacción se concentró a vacío y se adicionó acetato de etilo, se filtró para separar del subproducto diciclohexilurea (DCU) y posteriormente se hizo pasar la fase orgánica por una cama de Na₂SO₄ para eliminar el agua y se concentró nuevamente a vacío. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetona, haciendo cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 300 µL. El derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 85:15, en las fracciones 34-40, mientras que el derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 85:25, en las fracciones 45-55.

4.1.1.2.2. Síntesis de los derivados KRM-5m y KRM-5d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* en DCM (2.5 ml) con DMAP (0.1210 mmol, 14.78 mg) y DCC (0.1512 mmol, 31.19 mg) en baño de hielo, posteriormente se adicionó ácido palmítico (0.1512 mmol, 38.77 mg), después de 10 minutos se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo por CCF a los 15 y 30 minutos (Esquema 7).

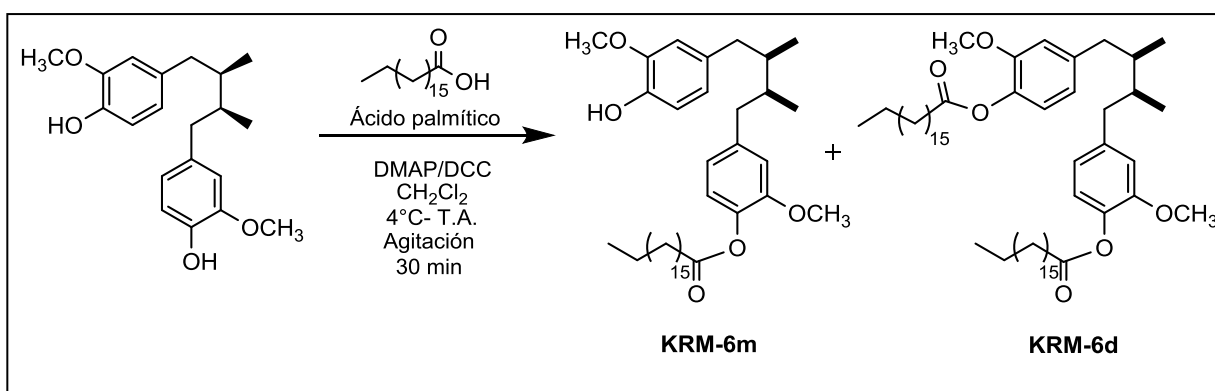


Esquema 7. Esquema de síntesis de los derivados KRM-5m y KRM-5d

Purificación: La mezcla de reacción se concentró a vacío y se adicionó acetato de etilo, se filtró para separar del subproducto DCU y posteriormente se hizo pasar la fase orgánica por una cama de Na₂SO₄ y se concentró nuevamente a vacío. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:20, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetato de etilo realizando cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 500 µL. El derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 90:10, en las fracciones 14-15, mientras que el derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 90:10, en las fracciones 17-19.

4.1.1.2.3. Síntesis de los derivados KRM-6m y KRM-6d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *Am*DG en DCM (2.5 ml) con DMAP (0.1210 mmol, 14.78 mg) y DCC (0.1512 mmol, 31.19 mg) en baño de hielo, posteriormente se adicionó ácido esteárico (0.1512 mmol, 43.01 mg), después de 10 minutos se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo por CCF a los 15 y 30 minutos (Esquema 8).

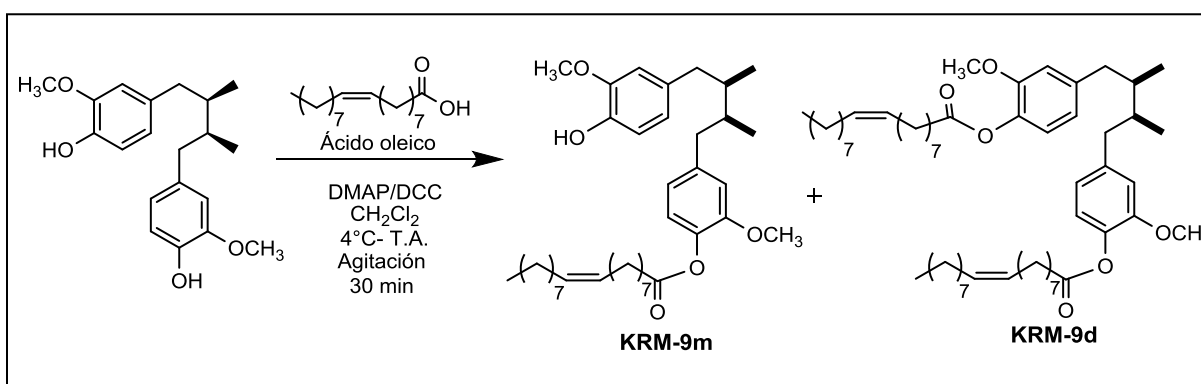


Esquema 8. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-6m y KRM-6d

Purificación: La mezcla de reacción se concentró a vacío y se adicionó acetato de etilo, se filtró para separar del subproducto DCU y posteriormente se hizo pasar la fase orgánica por una cama de Na₂SO₄ y se concentró nuevamente a vacío. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:20, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetato de etilo realizando cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 500 µL. El derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 95:5, en las fracciones 6-9, mientras que el derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 90:10, en las fracciones 11-13.

4.1.1.2.4. Síntesis de los derivados KRM-9m y KRM-9d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* en DCM (2.5 ml) con DMAP (0.1210 mmol, 14.78 mg) y DCC (0.1512 mmol, 31.19 mg) a temperatura de baño de hielo, posteriormente se adicionó ácido palmítico (0.1512 mmol, 39 μ l), después de 10 minutos se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo por CCF a los 15 y 30 minutos (Esquema 9).

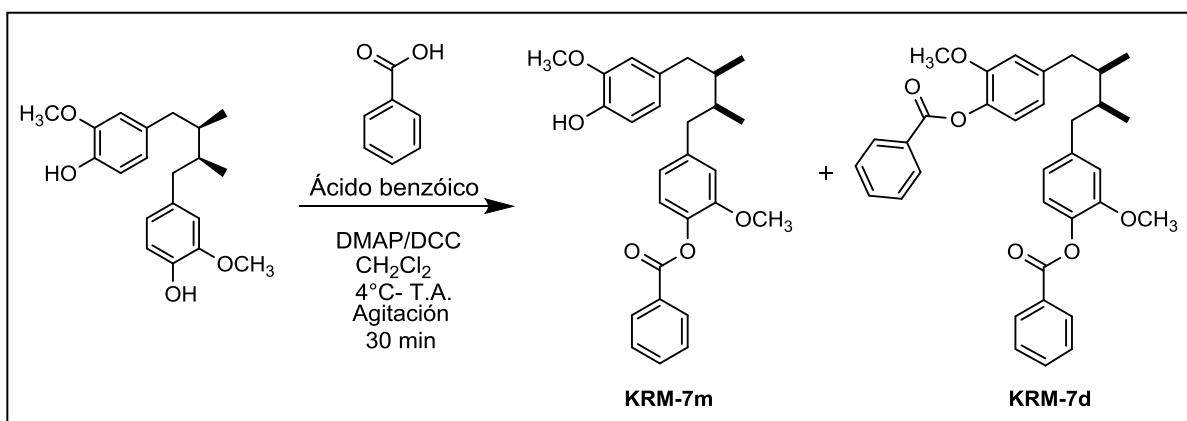


Esquema 9. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-9m y KRM-9d

Purificación: La mezcla de reacción se concentró a vacío y se adicionó acetato de etilo, se filtró para separar el subproducto DCU y posteriormente se hizo pasar la fase orgánica por una cama de Na₂SO₄ y se concentró nuevamente a vacío. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetona realizando cambios de proporción de 2%, el volumen de las fracciones fue de 500 μ L. El derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 90:10, en las fracciones 34-38, mientras que el derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 90:10, en las fracciones 40-51.

4.1.1.2.5. Síntesis de los derivados KRM-7m y KRM-7d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* en DCM (2.5 ml) con DMAP (0.083 mmol, 10.14 mg) y DCC (0.113 mmol, 23.4 mg) en baño de hielo, posteriormente se adicionó ácido benzóico (0.113 mmol, 13.85 mg), después de 10 minutos se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo por CCF a los 15 y 30 minutos (Esquema 10).

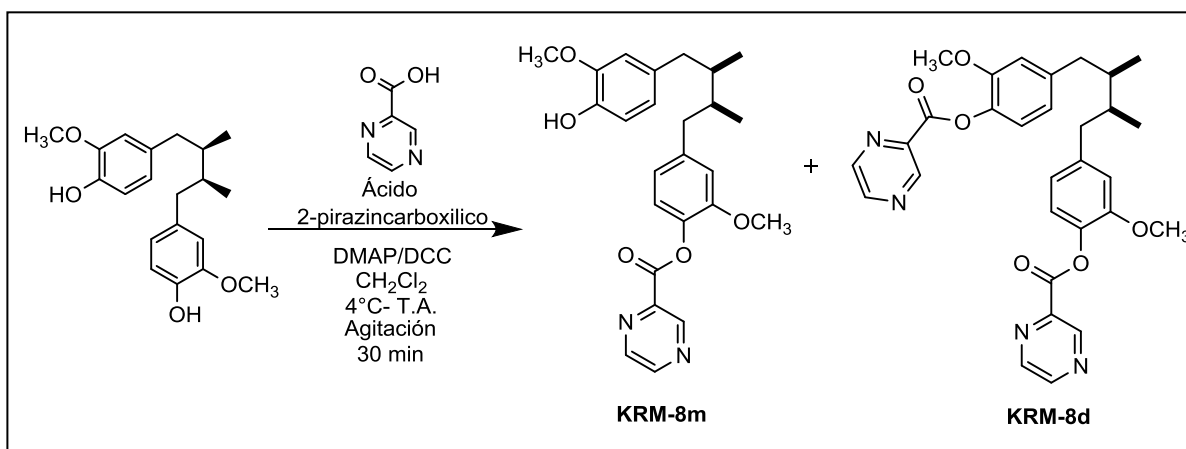


Esquema 10. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-7m y KRM-7d

Purificación: La mezcla de reacción se concentró a vacío y se adicionó acetato de etilo, se hizo pasar la fase orgánica por una cama de Na₂SO₄ y se concentró nuevamente a vacío. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de hexano: acetato de etilo, realizando cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 400 µL. El derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 85:15, en las fracciones 23-35, mientras que el derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 85:15, en las fracciones 41-48.

4.1.1.2.6. Síntesis de los derivados KRM-8m y KRM-8d

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* en DCM (2.5 ml) con DMAP (0.083 mmol, 10.14 mg) y DCC (0.113 mmol, 23.4 mg) en baño de hielo, posteriormente se adicionó ácido 2-pirazincarboxílico (0.113 mmol, 14.07 mg), después de 10 minutos se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo por CCF a los 15 y 30 minutos (Esquema 11).



Esquema 11. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-8m y KRM-8d.

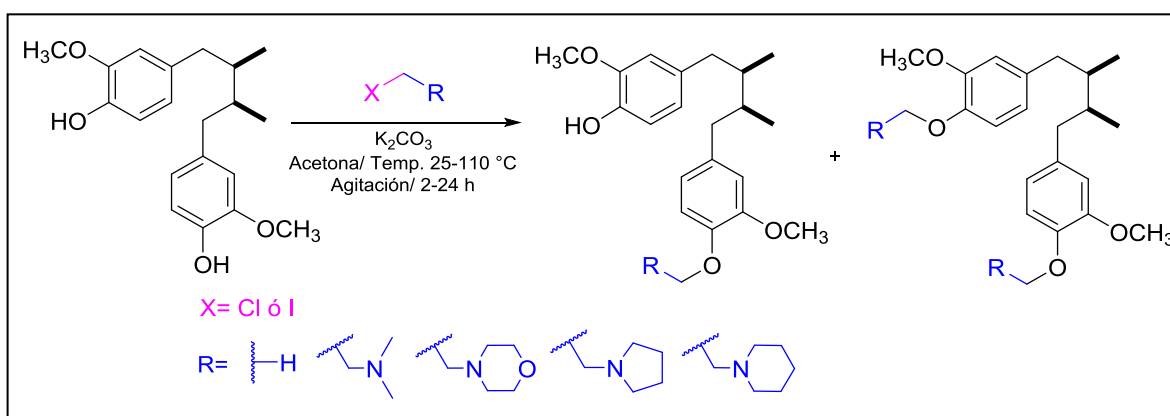
Purificación: La mezcla de reacción se concentró a vacío y se adicionó acetato de etilo, se filtró para separar del subproducto DCU y posteriormente se hizo pasar la fase orgánica por una cama de Na₂SO₄ y se concentró nuevamente a vacío. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetona realizando cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 500 µL. El derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad

80:20, en las fracciones 31-42, mientras que el derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 75:25, en las fracciones 13-16.

Se lograron cristalizar los derivados KRM-8m y KRM-8d. El derivado KRM-8m cristalizó disolviendo en acetona y posteriormente adicionando hexano hasta que se observó un cambio en la solución de transparente a turbia, mientras que el derivado KRM-8d cristalizó disolviéndose en acetato de etilo y posteriormente adicionando hexano hasta que se observó la formación de pequeñas partículas blancas. Se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente en ambos casos.

4.1.2. Síntesis de éteres y aminoéteres del *AmDG*

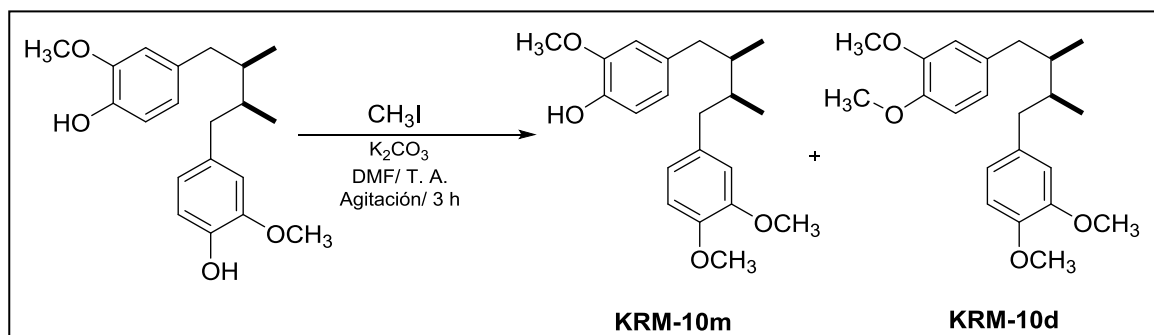
Se sintetizaron dos éteres y ocho aminoéteres. Las condiciones de reacción generales fueron disolver el *AmDG* (1 equivalente) en un solvente aprótico, en presencia de una base (K_2CO_3 , 1.5 equivalentes) y adicionando diferentes halogenuros de alquilo (Esquema 12).³⁶⁻³⁹



Esquema 12. Reacción general para la síntesis de éteres y aminoéteres.

4.1.2.1. Síntesis de los derivados KRM-10m y KRM-10d

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* en dimetilformamida (DMF, 2 ml) con CH_3I (0.113 mmol, 7 μl) y K_2CO_3 (0.113 mmol, 15.6 mg), a temperatura ambiente y con agitación. Se monitorizó la reacción por CCF a los 15, 30, 60, 120 y 180 minutos, se detuvo la reacción a los 180 minutos (Esquema 13).

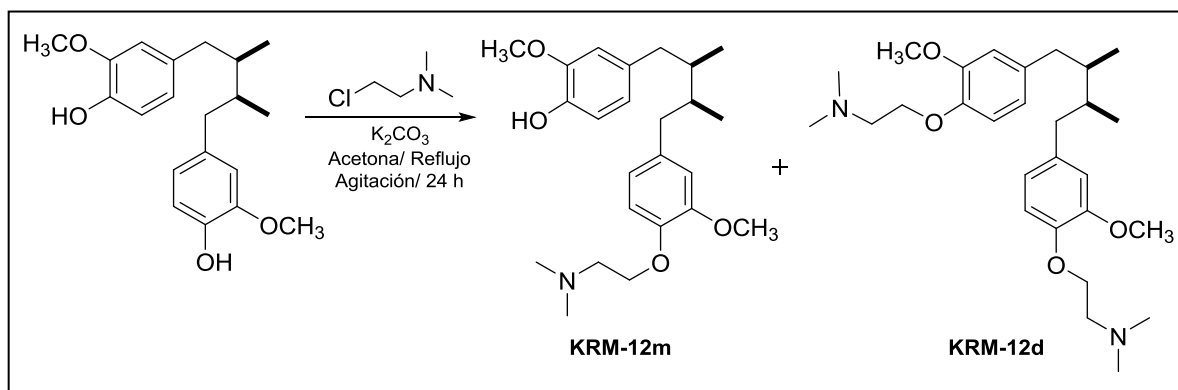


Esquema 13. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-10m y KRM-10d

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó a vacío. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetona, realizando cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 300 μL . El derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 85:15, en las fracciones 48-56, mientras que el derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 85:15, en las fracciones 58-64.

4.1.2.2. Síntesis de los derivados KRM-12m y KRM-12d

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* en acetona (2 ml) con clorhidrato de 2-cloro-*N,N*-dimetiletilamina (0.113 mmol, 16.3 mg) y K_2CO_3 (0.113 mmol, 15.6 mg), a reflujo y con agitación. Se monitorizó la reacción por CCF a los 15, 30, 60 min, 2, 4, 8 y 24 h, se detuvo la reacción a las 24 h (Esquema 14).

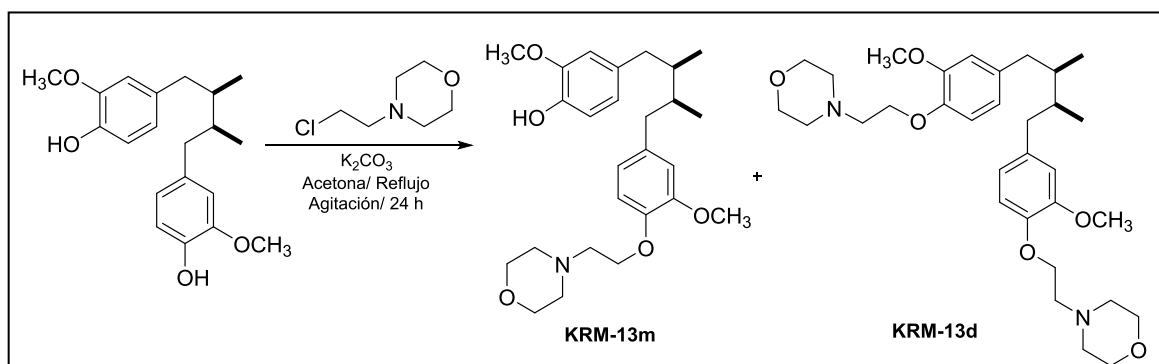


Esquema 14. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-12m y KRM-12d.

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó a vacío y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (3 ml) y agua desionizada (2 ml), repitiéndose el proceso dos veces. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de CH_2Cl_2 :MeOH realizando cambios de proporción de 1%, el volumen de las fracciones fue de 300 μ L. El derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 96:4, en las fracciones 59-70, mientras que el derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 95:5, en las fracciones 73-90.

4.1.2.3. Síntesis de los derivados KRM-13m y KRM-13d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *Am*DG en acetona (2 ml) con clorhidrato de 4-(2-cloroetil)morfolina (0.113 mmol, 21.1 mg) y K_2CO_3 (0.113 mmol, 15.6 mg), a reflujo y con agitación. Se monitorizó la reacción por CCF a las 2, 4, 8 y 24 h (Esquema 15).

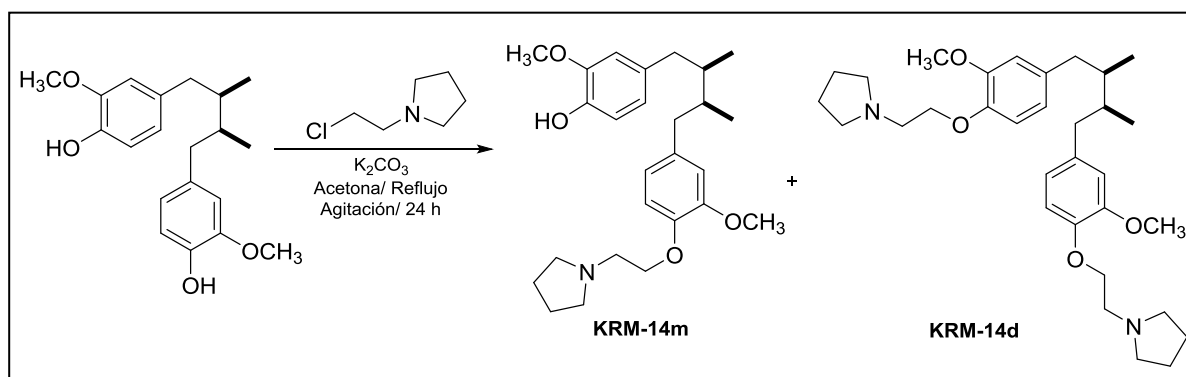


Esquema 15. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-13m y KRM-13d

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó a vacío y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (3 ml) y agua desionizada (2 ml), repitiéndose el proceso dos veces. La purificación se realizó por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetona, realizando cambios de proporción de 5%, el volumen de las fracciones fue de 500 μ L. El derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 75:25, en las fracciones 91-118, mientras que el derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 50:50, en las fracciones 130-140.

4.1.2.4. Síntesis de los derivados KRM-14m y KRM-14d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* en acetona (2 ml) con hidrocloreuro de 1-(2-cloroetil)pirrolidina (0.113 mmol, 24.79 mg) y K_2CO_3 (0.113 mmol, 15.6 mg), a reflujo y con agitación. Se monitorizó la reacción por CCF a las 2, 4, 8 y 24 h, se detuvo la reacción a las 24 h (Esquema 16).

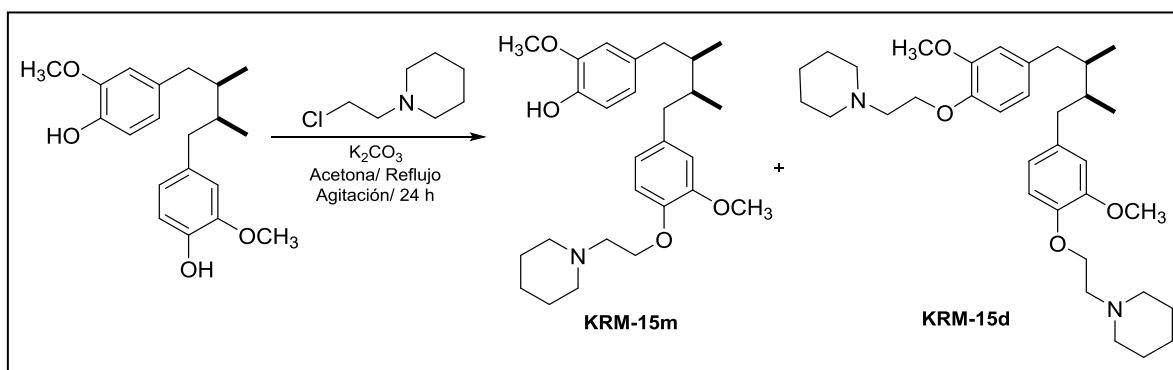


Esquema 16. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-14m y KRM-14d

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó a vacío y posteriormente se realizó una extracción líquido líquido con acetato de etilo (3 ml) y agua desionizada (2 ml), repitiéndose el proceso dos veces. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de CH_2Cl_2 :MeOH realizando cambios de proporción de 1%, el volumen de las fracciones fue de 500 μ L. El derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 95:5, en las fracciones 36-55, mientras que el derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 90:10, en las fracciones 61-75.

4.1.2.5. Síntesis de los derivados KRM-15m y KRM-15d.

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *Am*DG en acetona (2 ml) con clorhidrato de 1-(2-cloroetil)piperidina (0.113 mmol, 20.9 mg) y K_2CO_3 (0.113 mmol, 15.6 mg), a reflujo y con agitación. Se monitorizó la reacción por CCF a las 2, 4, 8 y 24 h (Esquema 17).



Esquema 17. Reacción para la síntesis de los análogos KRM-15m y KRM-15d

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó a vacío y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (3 ml) y agua desionizada (2 ml), repitiéndose el proceso dos veces. La purificación se realizó por cromatografía en columna, se utilizó como fase estacionaria sílica gel en una relación 1:30, la fase móvil fue un gradiente de hexano:acetona realizando cambios de proporción de 1%, el volumen de las fracciones fue de 500 μ L. El derivado mono-sustituido se obtuvo en la polaridad 85:15, en las fracciones 49-84, mientras que el derivado di-sustituido se obtuvo en la polaridad 70:30, en las fracciones 115-144.

4.2. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS DERIVADOS DEL *AmDG*.

La elucidación estructural de los análogos del *AmDG* ya purificados se realizó por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno y carbono trece (RMN ^1H y RMN ^{13}C). Para todos los derivados se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) en un equipo de BRUKER NMR400 de 400 MHz.

También se utilizó Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EMAR) con la técnica de Ionización por Electro Spray positivo (IES +). Se utilizó el equipo JEOL JMS-AX505HA. Para cada análogo se calculó su masa teórica y se confirmó con el resultado observado en el equipo.

4.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

4.3.1. Actividad antibacteriana

4.3.1.1. Cepas y cultivo.

Para la actividad antibacteriana se utilizaron las siguientes cepas de aislados clínicos resistentes a diferentes fármacos (Tabla 7).

Tabla 7. Bacterias resistentes a diferentes fármacos.

Gram negativas	Gram positivas
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos (12-666).	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (14-2095)
<i>Escherichia coli</i> (OXA-48) resistente oxacilinas.	<i>Staphylococcus epidermis</i> resistente a linezolid (14-583)
<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE (14-2081).	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> resistente a linezolid (2975)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos (13-1391).	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina (10-984)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NDM-1+ (14-3335) resistente a carbapenémicos, cefalosporinas de amplio espectro.	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE (14-2081).	
<i>Providencia rettgeri</i> NDM-1+ (NDM) resistente a carbapenémicos, cefalosporinas de amplio espectro.	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> resistente a trimetropima con sulfametoxazol.	

OXA-48: oxacilinas-48, **BLEE:** betalactamasas de espectro extendido, **NDM-1+:** New Delhi metalo-β-lactamasa-1.

Las cepas fueron inoculadas en placas preparadas con agar-sangre al 5% y cultivadas por 24 horas, a excepción de la cepa *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, que se dejó durante 48 horas. Para la preparación del inóculo para el ensayo, de tres a cinco colonias de cada cultivo fueron transferidas a tubos con solución salina estéril, y la turbidez se ajustó al tubo 0.5 de McFarland (1.5×10^8 Unidades formadoras de colonias (UFC)/ml).

Posteriormente se transfirieron 10 µL en 11 ml de caldo Mueller Hinton, para alcanzar una concentración de 5×10^5 UFC/ml.

4.3.1.2. Ensayo biológico.

El ensayo se realizó en base al método de microdilución reportado por Zgoda *et al.*, 2001.⁴⁰ Consistió en utilizar microplacas de 96 pocillos estériles con tapa. Se adicionaron 100 µl de medio de cultivo en cada pocillo de toda la placa. Posteriormente, en el primer y segundo pocillo de la fila A se adicionaron 100 µl de la solución de trabajo (por duplicado) con la concentración de 4X (200 µg/ml), se mezcló utilizando la micropipeta multicanal y de esta mezcla se tomaron 100 µl y se transfirieron a la fila B para realizar una dilución 1:2, y se continuó así hasta la fila G, desechando los últimos 100 µL. Posteriormente, se tomaron 100 µl de la suspensión bacteriana ajustada al tubo 0.5 de McFarland y se adicionaron a los pozos con o sin muestra, así como los controles positivos y negativos, a la fila H no se le adicionó suspensión bacteriana, ya que esta fila sirve como control de esterilidad. La microplaca se sometió a incubación a 37 °C durante 16-24 horas, a excepción de la cepa *S. maltophilia* resistente a trimetropima con sulfametoxazol, la cual se incubó 48 horas. Al término de la incubación se evaluó de forma visual el crecimiento o inhibición de la bacteria, tomándose como inhibición los pocillos donde no se observó turbidez ni depósito de bacterias en el fondo. Cada concentración se evaluó por duplicado y el experimento se realizó dos veces en días diferentes. Se utilizó

Levofloxacin como control positivo de referencia. Se determinó la CMI como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria.

4.3.2. Ensayo de actividad antituberculosa.

4.3.2.1. Cepas y cultivo.

Para este ensayo se empleó *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27794, la cual es sensible a isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida. Esta cepa fue cultivada en medio Middlebrook 7H9 a 37 °C durante dos semanas, esto con el fin de que la bacteria se encontrara en su fase logarítmica de crecimiento. El inóculo para el ensayo biológico se preparó diluyendo el cultivo en fase logarítmica, ajustando al tubo No. 1 de McFarland, luego se diluyó a 1:20 con medio Middlebrook 7H9.

4.3.2.2. Ensayo biológico.

El ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por FranzBlau *et al.*, 2001.⁴¹ El método se basa en que los microorganismos en crecimiento liberan deshidrogenasas al medio que reducen la resazurina que es de color azul y que al oxidarse se convierte a resofurina que es de color rosa.

El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos. Cada derivado se evaluó a partir de 50 µg/mL, cada concentración se realizó por duplicado. Se colocaron 200 µL de agua estéril en todos los pozos de la fila A y en los pozos H1, H2, H3, H10, H11 y H12, dejando los pozos del centro sin agua. Al resto de

los pozos de la placa se agregó 100 μ L de medio Middlebrook. Después se añadieron 100 μ L de la solución de trabajo 4X (200 μ g/mL) en la fila B. Se realizaron las diluciones 1:2 a lo ancho de la placa y posteriormente se añadieron 100 μ L del inóculo bacteriano previamente preparado. En los pocillos que quedaron de la fila H se prepararon tres controles 100:100, 100:10 y 1:100, los cuales representan el 100%, 10% y 1% de la población bacteriana a ensayar.

Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días, después de este tiempo se le adicionaron 20 μ L de reactivo Alamar azul y 12 μ L de Tween 80 al 10% a todos los pocillos, se sometió nuevamente a incubación a 37 °C por 24 horas. Al término de la incubación se evaluó de forma visual el crecimiento o inhibición de la bacteria, tomándose como inhibición los pocillos donde no hubo cambio de color, mientras que en los pocillos donde hubo cambio a color rosa se tomó como no inhibición. Se utilizó Etambutol y Levofloxacina como control positivo de referencia. Se determinó la CMI como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria. Los experimentos se llevaron a cabo tres veces en días diferentes.

4.3.3. Actividad citotóxica.

4.3.3.1. Cultivo de células Vero.

Se hizo crecer las células Vero en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y se incubó a 37° C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

4.3.3.2. Preparación de soluciones de trabajo.

Para la preparación de las soluciones de trabajo se pesó de 1.1 a 1.5 mg de cada análogo a evaluar y se adicionó DMSO al 100% para disolver y obtener una concentración de 20, 000 µg/ml. Posteriormente de esta solución stock se tomaron 10 µL y se adicionaron a 10 µL de DMSO, realizándose una dilución 1:2 y quedando una concentración de 10, 000 µg/ml. Así se realizaron diluciones en serie hasta llegar a una concentración de 2, 500 µg/ml. Posteriormente de cada concentración se tomaron 5 µL y se adicionaron a 200 µL de suspensión celular quedando las concentraciones finales como: 487 µg/ml, 243.9 µg/ml, 121.95 µg/ml y 66.97 µg/ml.

4.3.3.3. Ensayo

Se despegaron las células adheridas a través de tripsinización adicionando 1 ml de tripsina-EDTA 0.25 % por caja, se dejó actuar la tripsina durante 30 minutos hasta que la mayoría de las células se despegaran, esto se confirmó por observación al microscopio. Pasados los 30 minutos se traspasaron las células a tubos Eppendorf estériles y se sometieron a centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró la tripsina y se adicionó 1 ml de medio RPMI a cada tubo Eppendorf para resuspender las células. Se realizó un conteo de la cantidad de células presentes en la suspensión con una cámara de Neubauer. La cantidad de células fue de 12.625×10^4 /ml. Posteriormente se adicionaron 200 µl de la suspensión celular a cada pocillo de las placas de 96 pocillos

quedando una cantidad de 25, 250 células por pocillo. Se sometieron las placas a incubación durante 24h a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Transcurridas las 24 horas de incubación se observó que las células estuvieran adheridas y se retiró el medio de cultivo. Se adicionó 200 µL de medio RPMI fresco y 5 µL de cada compuesto a sus diferentes concentraciones así como con controles positivo (SDS al 1%) y negativo (caldo de cultivo sólo). Cada concentración se evaluó por triplicado. Se sometieron nuevamente las placas a incubación en las condiciones ya mencionadas durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se retiró el medio de cada pocillo y se adicionaron 50 µL de tripsina-EDTA 0.25 % a cada pocillo y se dejó actuar durante 30 min. Se aspiró la tripsina junto con las células de cada pozo y se traspasó el contenido de cada pozo a tubos Eppendorf para centrifugar. Se retiró la tripsina y se adicionó 50 µL de medio RPMI para lavar, y se retiró el medio. Posteriormente se adicionó 200 µL para re-suspender las células en cada uno de los Eppendorf. Las células de cada uno de los tres pocillos del control negativo se contaron individualmente en la cámara de Neubauer dando un número promedio de 16.88×10^4 células/ml.

Se determinó el porcentaje de viabilidad de cada pocillo a través del método azul de tripano, para esto se tomaron 60 µL de cada tubo de Eppendorf y se adicionó 20 µL de azul de tripano al 0.2 %, se dejó transcurrir 15 minutos a temperatura ambiente, se tomaron 20 µL de esta mezcla y se colocó en un portaobjetos para realizar el conteo de células viables y no viables. Para lo cual se contó un total de 100 células por cada Eppendorff conteniendo las células de

cada pocillo. De estas 100 células las que se tiñeron color azul oscuro se contaron como células no viables (células muertas) y las que no se tiñeron y presentaban anillo de refractancia se contaron como células viables (células vivas).⁴²⁻⁴³

Se determinó el % de viabilidad de la siguiente forma:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{número de células teñidas}}{(\text{número de células vivas [control]})} * 100$$

4.3.3.4. Concentración inhibitoria media (CI₅₀)

Se determinó la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) a través del análisis estadístico Probit, el cual consiste en transformar la curva dosis-respuesta sigmoidea a una línea recta en dónde se puede analizar por regresión lineal dándonos una ecuación de la recta que nos permite determinar la Concentración Inhibitoria 50 de cada compuesto ensayado. Para los cual el % de viabilidad (eje Y) se transforma a unidades probit (ver apéndice C) y la concentración del compuesto evaluado (eje X) se transformó a su logaritmo (Log10), de esta forma obtenemos la línea recta de la cual podemos obtener la ecuación de la recta que nos permite conocer la concentración.

4.4. MANEJO DE RESIDUOS.

4.4.1. Síntesis y purificación.

La disposición de los residuos generados en la síntesis y purificación de los análogos del AmDG se realizó en los contenedores ubicados en el Laboratorio de Química de Productos Naturales en base al reglamento interno de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.4.2. Ensayos biológicos.

Los residuos generados en los ensayos de actividad antibacteriana y antituberculosa fueron dispuestos en base a lo establecido por el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico Especializado del Hospital Universitario. Los residuos generados en los ensayos de citotoxicidad fueron dispuestos en base a lo establecido por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. RENDIMIENTO Y PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ANÁLOGOS DEL AmDG

5.1.1. Síntesis de ésteres.

En todas las reacciones se presentó la formación del derivado mono-sustituido y di-sustituido, favoreciéndose principalmente la formación del derivado mono-sustituido. Particularmente en el caso de los ésteres obtenidos por la metodología de Steglich se presentó la formación de dicitclohexilurea (DCU), la cual fue eliminada principalmente por filtración. Los rendimientos obtenidos fueron en rango de 20.01 a 50.42% para los derivados mono-sustituidos y de 11.38 a 48.3 % para los derivados di-sustituidos. Los puntos de fusión de las resinas no se determinaron debido a la consistencia que presentaron, lo que impedía visualizar el punto de fusión, todos los ésteres fueron solubles en cloroformo (Tabla 8).

Tabla 8. Rendimiento y características físicas de los ésteres obtenidos.

Derivado	Rendimiento (% mmol)	Aspecto	Punto de fusión (°C)	Solubilidad
KRM-1m	35.32%	Resina transparente.	---	Cloroformo
KRM-1d	11.38 %	Sólido blanco.	147-149	Cloroformo
KRM-2m	26.26 %	Resina amarilla.	---	Cloroformo
KRM-2d	13.62 %	Sólido amarillo claro.	165-167	Cloroformo
KRM-3m	50.42%	Resina amarillo claro	---	Cloroformo
KRM-3d	21.3 %	Sólido amarillo claro	105-106	Cloroformo
KRM-4m	45.52%	Cristales blancos.	72-74	Cloroformo
KRM-4d	25.7 %	Sólido blanco.	132-135	Cloroformo
KRM-5m	25.71%	Sólido blanco	103-105	Cloroformo
KRM-5d	22.3 %	Sólido blanco	48-49	Cloroformo
KRM-6m	21.73%	Resina transparente	---	Cloroformo
KRM-6d	48.3 %	Sólido blanco	53-55	Cloroformo
KRM-7m	28.20%	Resina amarillo claro	---	Cloroformo
KRM-7d	17.2 %	Sólido blanco	113-115	Cloroformo
KRM-8m	28.20%	Sólido blanco	95-97	Cloroformo
KRM-8d	19.5 %	Sólido blanco	107-109	Cloroformo
KRM-9m	20.01%	Resina transparente	---	Cloroformo
KRM-9d	16.7 %	Resina transparente	---	Cloroformo

5.1.2. Síntesis de éteres y aminoéteres.

En todas las reacciones se presentó la formación del derivado mono-sustituido y di-sustituido, favoreciéndose principalmente la formación del derivado mono-sustituido en todos los casos. Los rendimientos obtenidos para estas reacciones fueron entre el 25.71% al 50.42% para los derivados mono-sustituidos y de 17.2 a 48.3% para los derivados di-sustituidos. Los puntos de fusión de las resinas no se determinaron debido a la consistencia que presentaron, lo que impedía visualizar el punto de fusión, todos estos derivados fueron solubles en cloroformo (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimiento y características físicas de los éteres y aminoéteres

Derivado	Rendimiento (% mmol)	Aspecto	Punto de fusión (°C)	Solubilidad
KRM-10m	50.42%	Resina transparente	---	Cloroformo
KRM-10d	21.3 %	Sólido blanco	104-106	Cloroformo
KRM-12m	25.71%	Resina amarillo claro	---	Cloroformo
KRM-12d	22.3 %	Sólido blanco	155-157	Cloroformo
KRM-13m	21.73%	Sólido blanco	124-125	Cloroformo
KRM-13d	48.3 %	Sólido blanco	165-168	Cloroformo
KRM-14m	28.20%	Resina amarillo claro	---	Cloroformo
KRM-14d	17.2 %	Resina transparente	---	Cloroformo
KRM-15m	28.20%	Resina amarillo claro	---	Cloroformo
KRM-15d	19.5 %	Sólido blanco	147-148	Cloroformo

5.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.

Para la caracterización estructural es importante discutir los espectros de RMN del producto natural sobre el cual se realizaron las modificaciones. Como se puede observar en el espectro de RMN ^1H (Figura 7), el AmDG presenta un patrón de señales simple, característica que le confiere su estructura simétrica, dicho patrón de señales consiste en un doblete a 6.83 ppm (d, $J = 8$ Hz, 2 H-Ar) de los protones H-5 y H-5' que se acopla con H6, H-6'; un doble de doble a 6.66 ppm (dd, $J = 8, 1.8$ Hz, 2 H-Ar) que corresponde a los protones H-6 y H-6' que se acoplan con los protones en posición *orto* (H-5 y H-5') y *meta* (H-2 y H-2'); un doblete a 6.62 ppm (d, $J = 1.81$ Hz, 2 H-Ar) de los protones aromáticos H-2, H2' que están *meta*-relacionados con H6, H6'; un singulete (s, 2 H) a 5.47 ppm correspondiente a los dos protones de los fenoles; un singulete (s, 6 H) 3.87 ppm correspondiente a los metoxilos aromáticos (OMe-3, OMe-3'), dos doble de dobles que corresponden a protones bencílicos a 2.73 ppm (dd, $J = 13.5$ Hz, H-7a, H-7a') y 2.29 ppm (dd, $J = 13.9$ Hz, H-7b, H-7b'); un multiplete a 1.75 ppm (m, 2 H) que corresponde a los protones de los metinos H-8 y H8'. Finalmente un doblete a 0.843 ppm (d, $J = 6.76$ Hz, 6 H) que corresponde a los metilos unidos a la cadena alifática (Me-9 y Me-9'). Una de las señales más importantes es la correspondiente a los hidroxilos ya que las reacciones de sustitución se realizarán en estos grupos funcionales. La presencia o ausencia de la misma nos confirman la obtención del análogo mono-sustituido o del análogo di-sustituido.

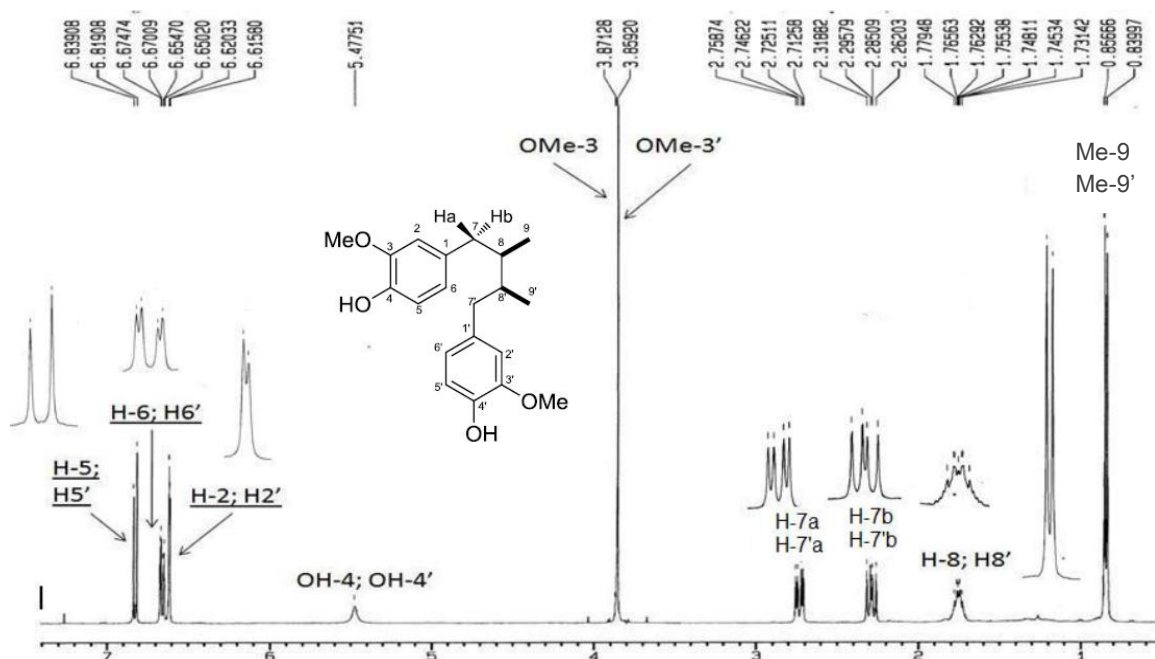


Figura 7. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de Am-DG

El espectro de RMN ¹³C (Figura 8) muestra diez señales correspondientes a los veinte carbonos del AmDG. Algunas de las señales que nos ayudaron a confirmar la sustitución de los diferentes grupos funcionales son las señales de los metilos Me-9 y Me-9'a 16.18 ppm y de los metoxilos OMe-3 y OMe-3'a 55.82 ppm, las cuales se presentan como singletes y que al momento de perderse la simetría de la molécula, cambiaron de un singlete a dos singletes.⁴⁴

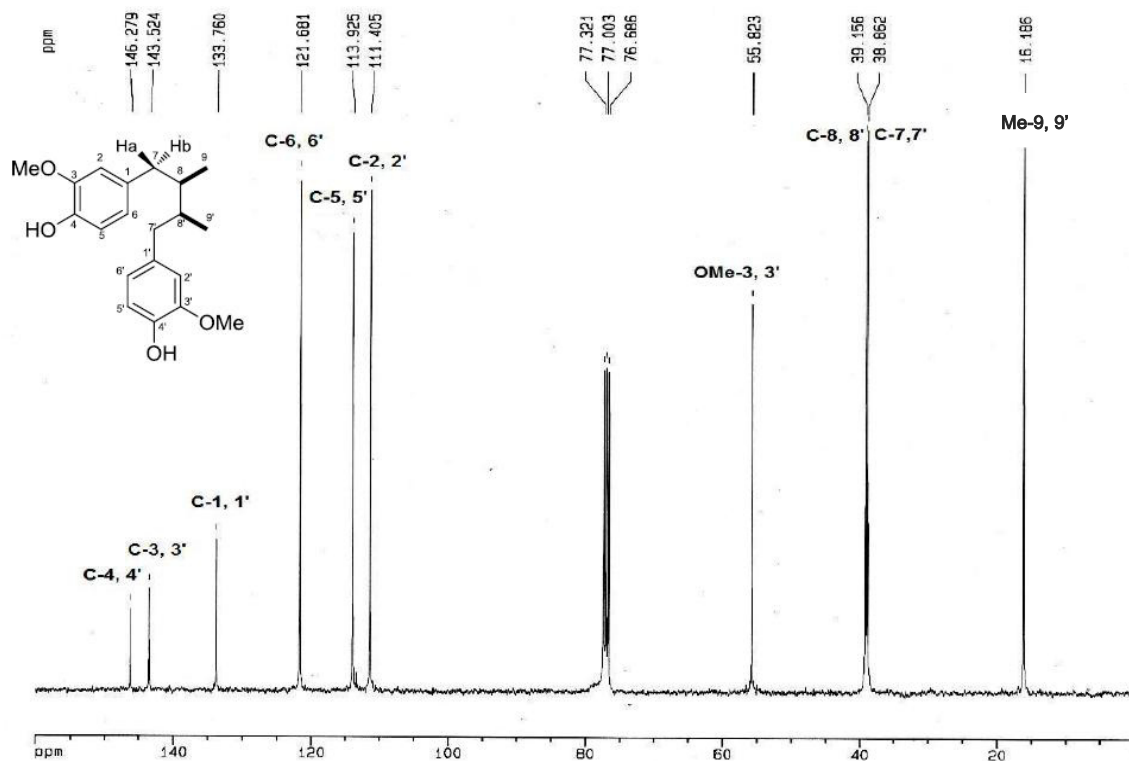


Figura 8. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de Am-DG

5.2.1. Caracterización de los ésteres del AmDG.

5.2.1.1. Derivado KRM-1m.

En la Figura 9 se muestra el espectro de RMN ^1H , donde se aprecia que a diferencia del espectro del AmDG (Figura 7), la cantidad de señales aumenta, esto se puede visualizar de forma muy clara en los singuletes de los metoxilos, así como en las señales de la región aromática, lo que está indicando que la molécula ha perdido la simetría por la sustitución del grupo *p*-bromobenzoilo en uno de los hidroxilos del AmDG. Otra señal importante que indica la sustitución en uno de los hidroxilos y que se obtuvo el análogo mono-sustituido, es la señal del hidroxilo a 5.47 ppm que integra para un protón. Finalmente otras de las señales que confirma la sustitución del grupo *p*-bromobenzoilo son los dobles a 8.06 ppm (d, $J = 6.8$, 2H, H-2'' y H-6'') y 7.64 ppm (d, $J = 6.8$, 2 H, H-3'' y H-5'') correspondientes a cuatro protones de un anillo aromático *para* sustituido.

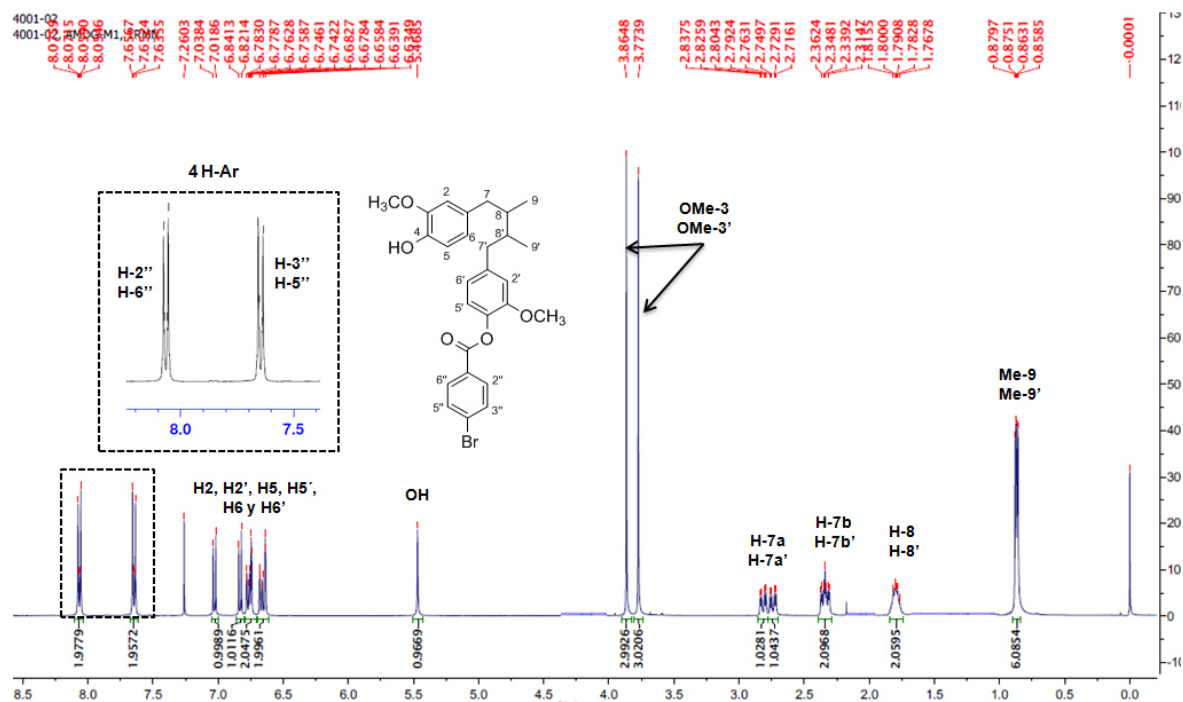


Figura 9. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-1m

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 10) se presentan un total de 25 señales que corresponden a los 27 carbonos del derivado KRM-1m, a diferencia del espectro del *AmDG* que presenta solamente diez señales; esto se debe a la pérdida de la simetría al momento que se realizó la sustitución por el grupo *p*-bromobenzoilo. Otra señal importante es la del carbonilo del éster, dicha señal la encontramos a 164.18 ppm.

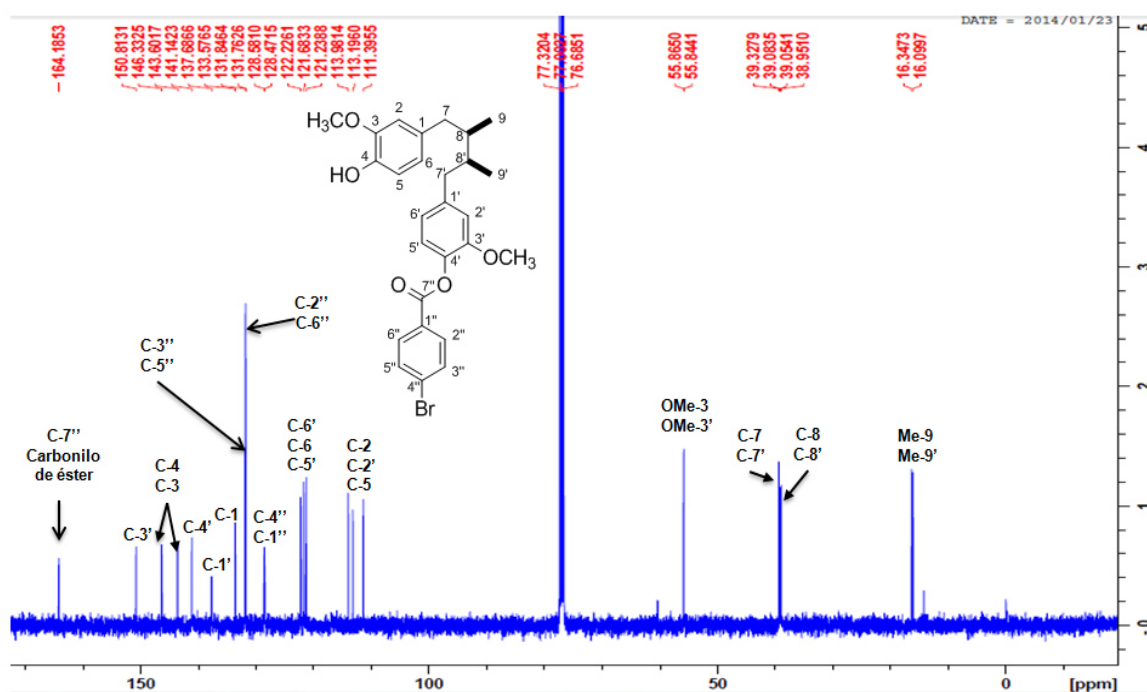


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl₃) de KRM-1m

5.2.1.2. Derivado KRM-1d.

En la Figura 11 se puede observar el espectro de RMN ^1H que a diferencia del espectro del derivado mono-sustituido (Figura 9), la cantidad de señales en este espectro disminuye, esto se puede visualizar en el singulete de los metoxilos, así como en las señales de la región aromática indicando que al sustituirse la molécula en los dos hidroxilos recuperó la simetría. A diferencia del derivado mono-sustituido aquí no se logra apreciar ninguna señal correspondiente a un protón de hidroxilo, confirmando así que la sustitución se realizó en ambos hidroxilos. La sustitución del grupo *p*-bromobenzoilo presenta de igual manera dos dobletes, uno a 8.064 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H, H-2'', H-2''', H-6'' y H-6''') y el otro a 7.64 ppm (d, $J = 6.8$ Hz, 4H, H-3'', H-3''', H-5'' y H-5''') correspondientes a ocho protones de los dos anillos aromáticos sustituidos en posición *para*.

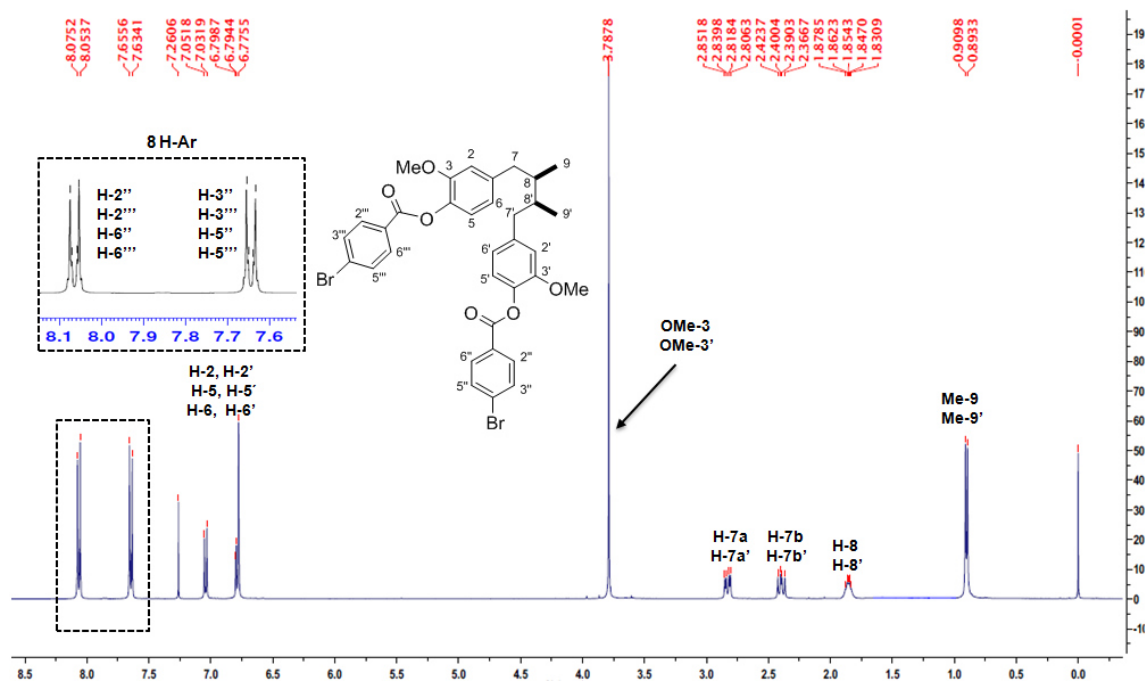


Figura 11. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-1d

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 12) se presentan un total de 15 señales que corresponden a los 34 carbonos del derivado KRM-1d, a diferencia del espectro del derivado mono-sustituido (Figura 10) que presenta 25 señales; esto vuelve a confirmar que al sustituir en los dos hidroxilos con el grupo *p*-bromobenzoilo, la molécula recupero la simetría. La señal a 164.16 ppm indica los carbonilos del éster que se formó.

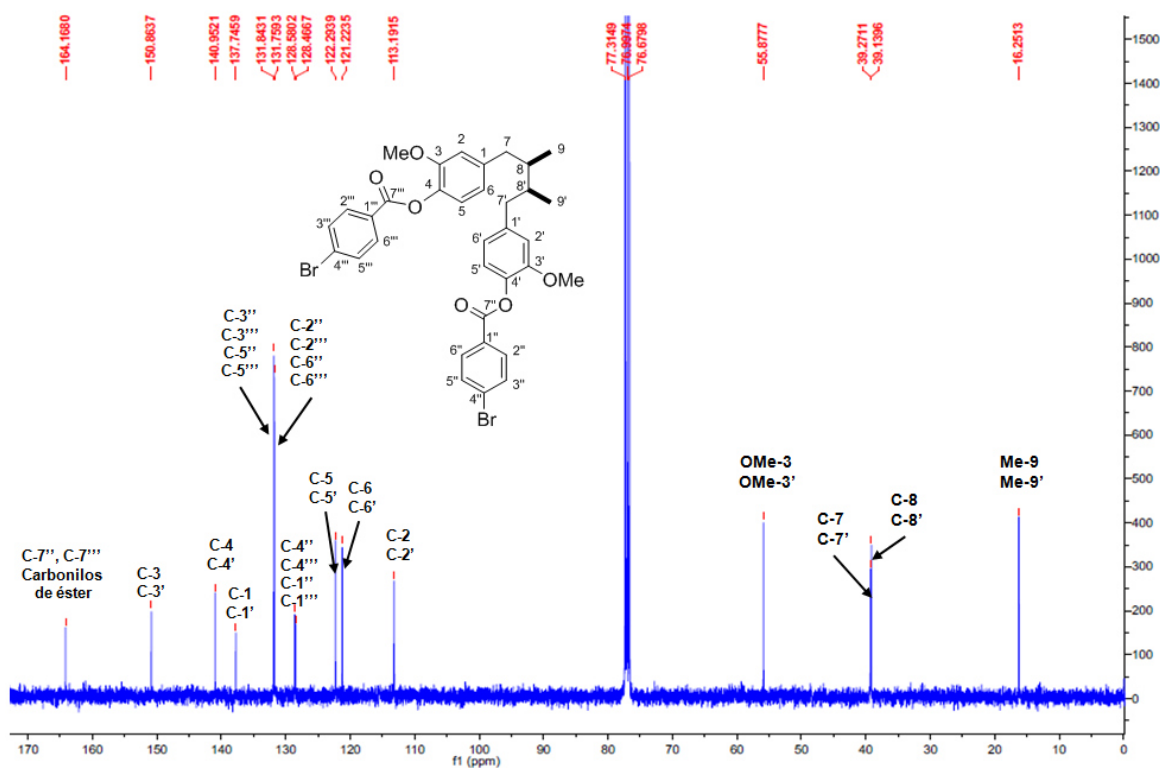


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) de KRM-1d

5.2.1.3. Derivado KRM-2m.

Del espectro de RMN ^1H de la figura 13 sólo se mencionaran las características más importantes que confirman la sustitución en uno de los hidroxilos con el grupo 2-nitrobenzoilo. En el espectro se observan dos doble de dobles para los protones H-3'' a 8 ppm (dd, $J = 7.96, 1.2$ Hz, 1 H-Ar) y H-6'' a 7.94 ppm (dd, $J = 7.6, 1.44$ Hz, 1 H-Ar), posteriormente dos tripletes dobleteados para los protones H-5'' (7.9 ppm, td, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1 H-Ar) y H-4'' (7.54 ppm, td, $J = 8, 1.5$ Hz, 1 H-Ar), así como el singlete del fenol a 5.48 ppm (s, 1H, -OH).

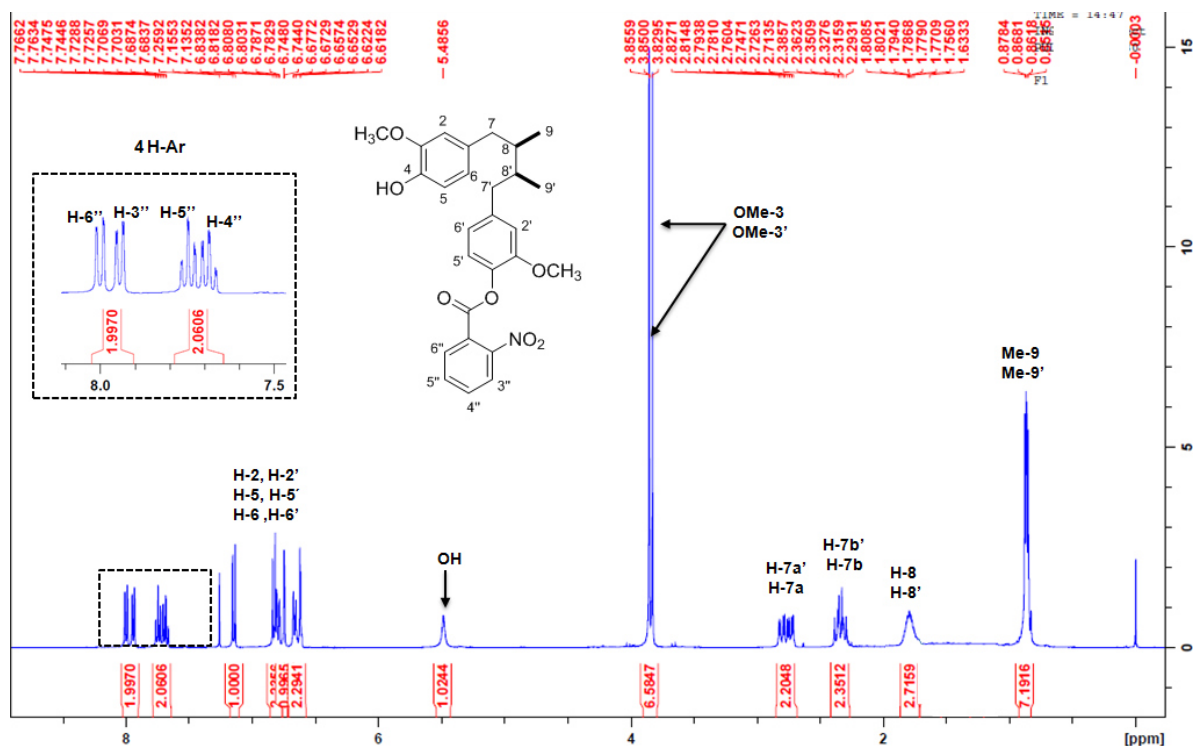


Figura 13. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-2m

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 14) se pueden observar 26 señales que corresponden a 27 carbonos de la molécula, así como el carbonilo del éster a 163.62 ppm.

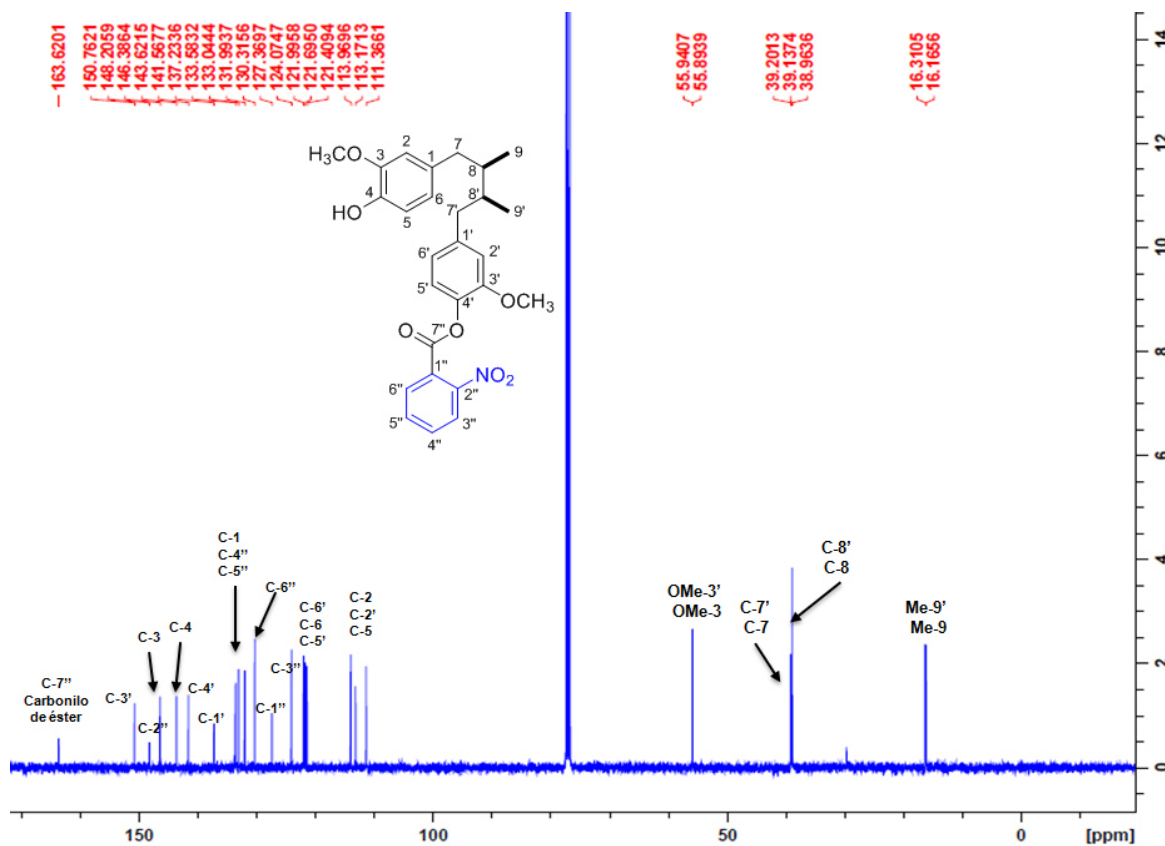


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-2m

5.2.1.4. Derivado KRM-2d.

En la figura 15 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observa un doble de doble a 8.0 ppm (dd, $J = 8, 1$ Hz, 2 H-Ar), correspondiente a los 2 protones aromáticos H-3'' y H-3'''. Posteriormente tenemos otro doble de dobles a 7.95 ppm (dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 2 H-Ar) correspondiente a los protones aromáticos H-6'' y H-6'''. A 7.75 ppm tenemos un triplete dobleteado (td, $J = 8, 1.2$ Hz, 2 H-Ar) que corresponde a los protones aromáticos H-5'' y H-5''' y a 7.68 ppm tenemos otro triplete dobleteado (td, $J = 8, 1.5$ Hz, 2 H-Ar) que corresponde a los protones aromáticos H-4'' y H-4''', todos estos desplazamientos corresponden al grupo sustituyente 2-nitrobenzoilo. Cabe remarcar la ausencia del singulete del fenol que indica que se obtuvo el análogo di-sustituido.

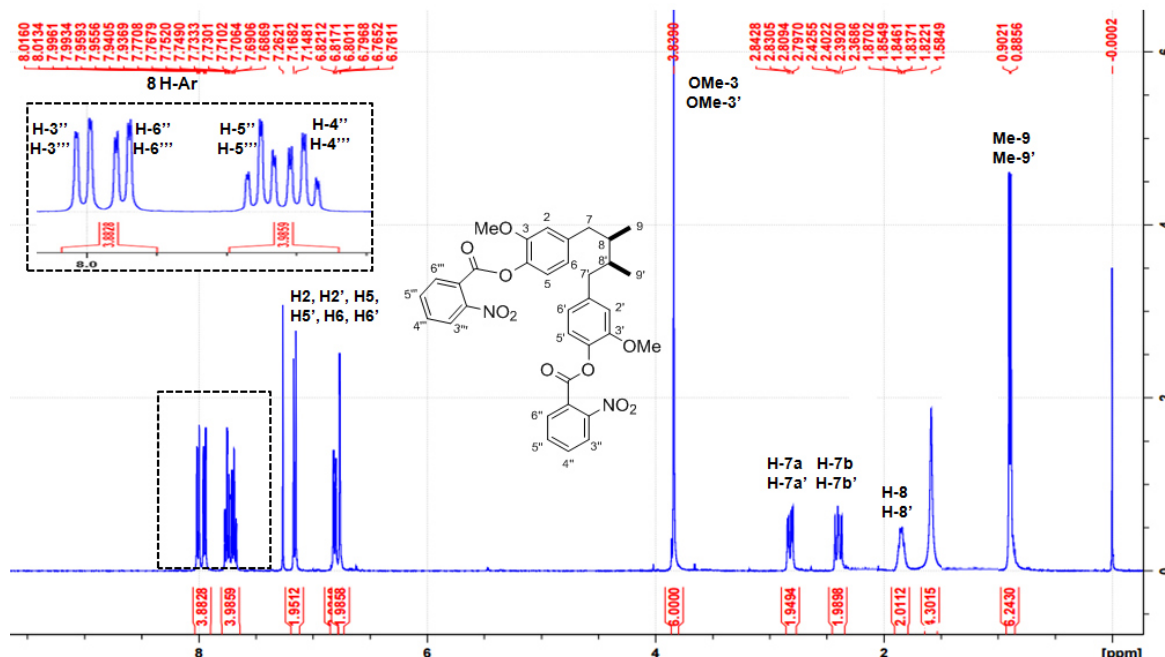


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-2d

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 16) se pueden observar 17 señales que corresponden a 34 carbonos de la molécula, así como el carbonilo del éster a 163.61 ppm.

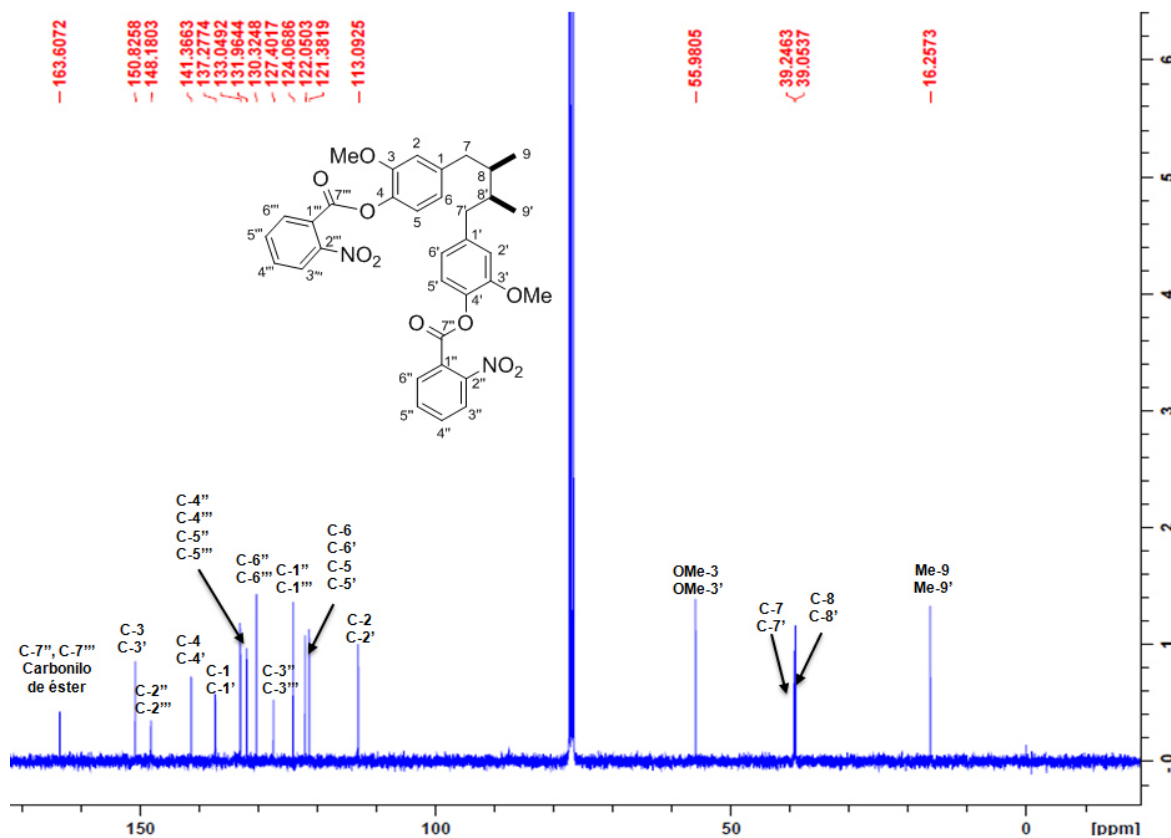


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-2d

5.2.1.5. Derivado KRM-3m.

En la figura 17 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observa un singlete a 2.31 ppm para los 3 protones del grupo acetilo. Como se puede apreciar, el singlete se solapa con la señal que corresponde al multiplete de los protones bencílicos H-7b y H-7b' dando una integración de 5 protones. Se observa el singlete del hidroxilo, lo que nos confirma que se obtuvo el análogo mono-sustituido.

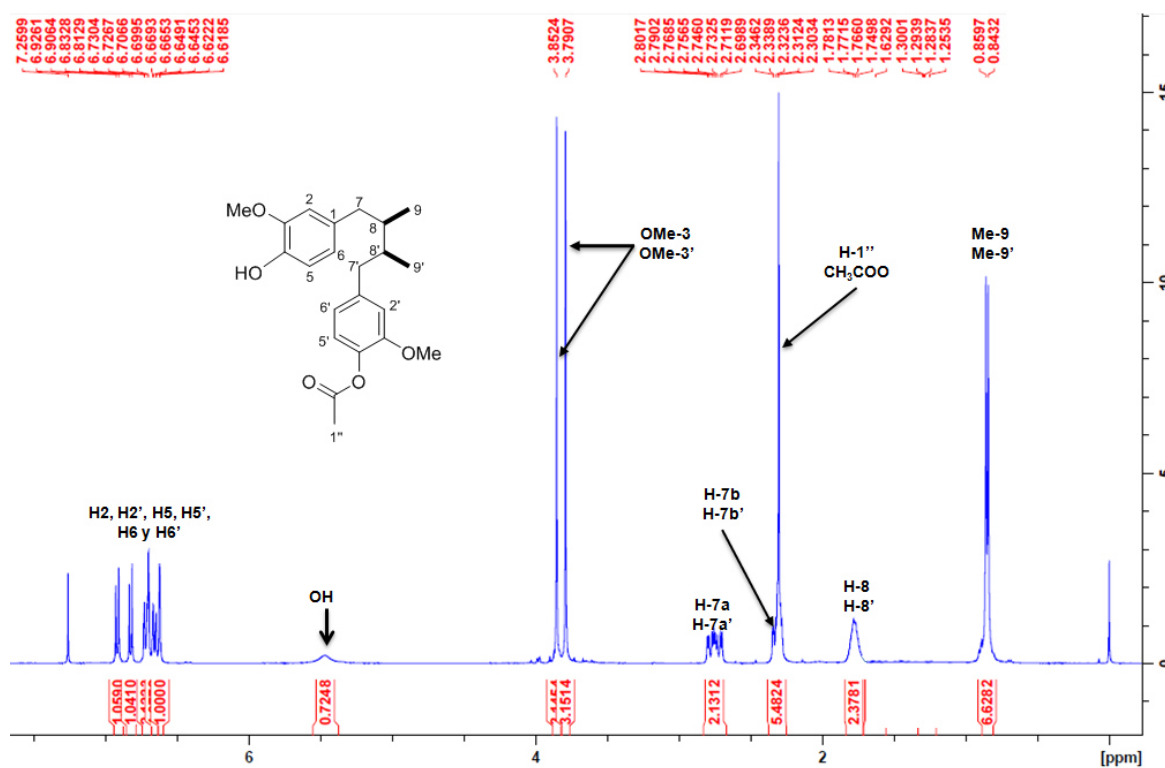


Figura 17. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-3m

En la Figura 18 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 22 señales correspondientes a los 22 carbonos de la molécula, de las cuales la señal a 20.70 ppm corresponde al metilo unido al carbonilo del éster y la señal a 169.23 ppm corresponde al carbonilo del éster.

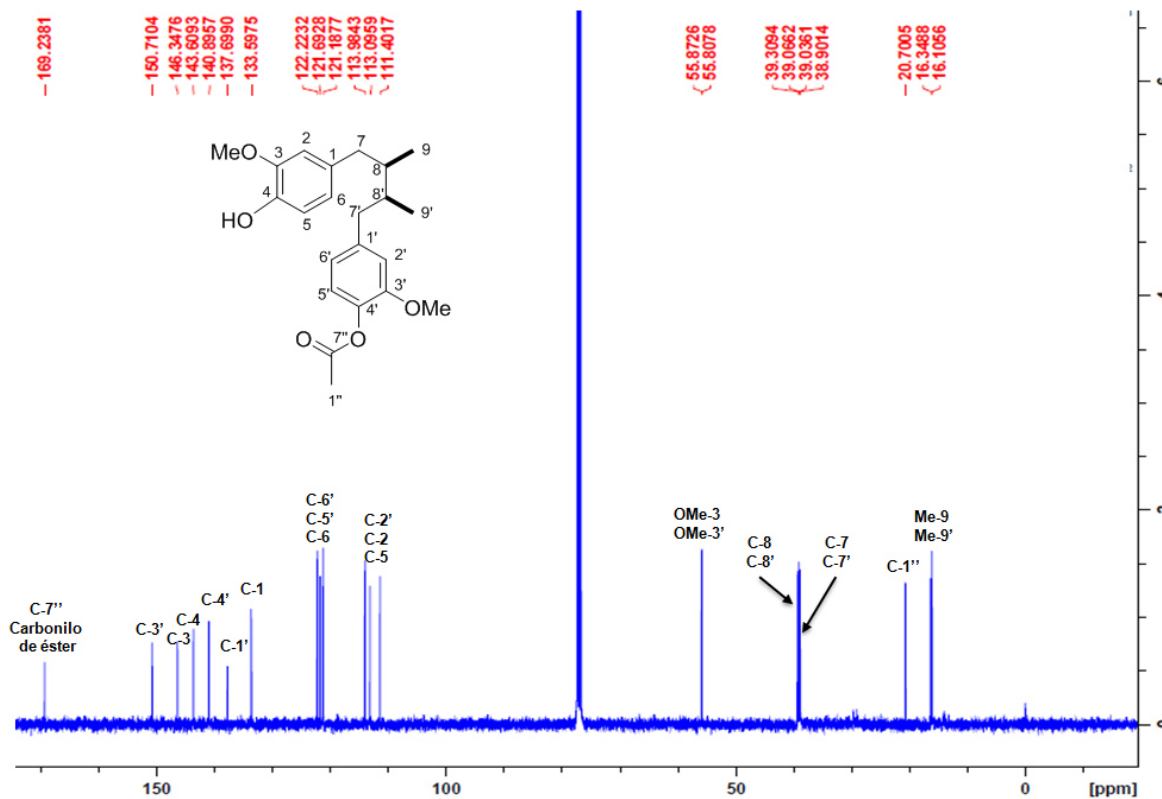


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-3m

En la Figura 20 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 12 señales correspondientes a los 24 carbonos de la molécula, de las cuales la señal a 20.70 ppm corresponde a los metilos unidos al carbonilo del éster y la señal a 169.22 ppm corresponde a los carbonilos del éster.

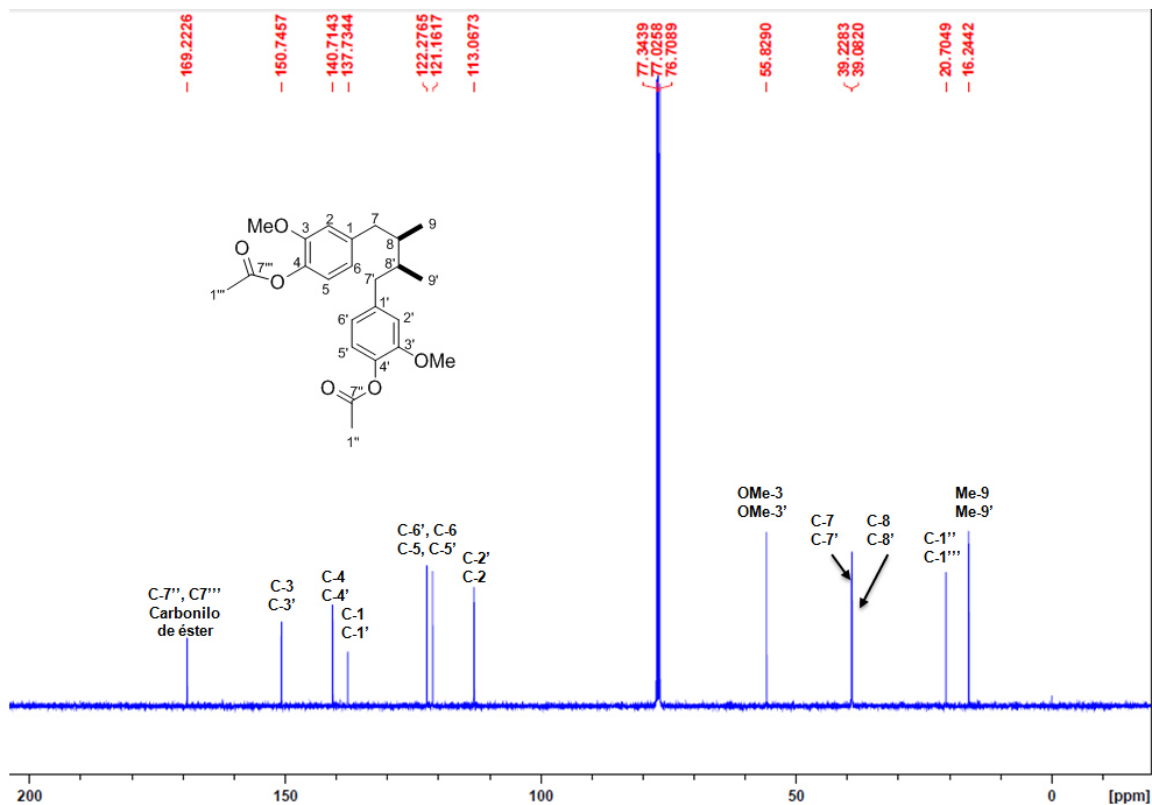


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) de KRM-3d

5.2.1.7. Derivado KRM-4m.

En la Figura 21 correspondiente al espectro de RMN ^1H se observan los 4 protones correspondientes al anillo de 2-piridincarbonilo en la región aromática a 8.85 ppm (d, $J = 4.12$ Hz, H-3''), 8.28 (d, $J = 7.84$ Hz, H-6''), 7.91 (td, $J = 7.8$, 1.7 Hz, H-4'') y 7.54 (ddd, $J = 7.6$, 4.8, 1 Hz, H-5''). También se aprecia el singulete del hidroxilo a 5.51 ppm, confirmando la obtención del análogo mono-sustituido.

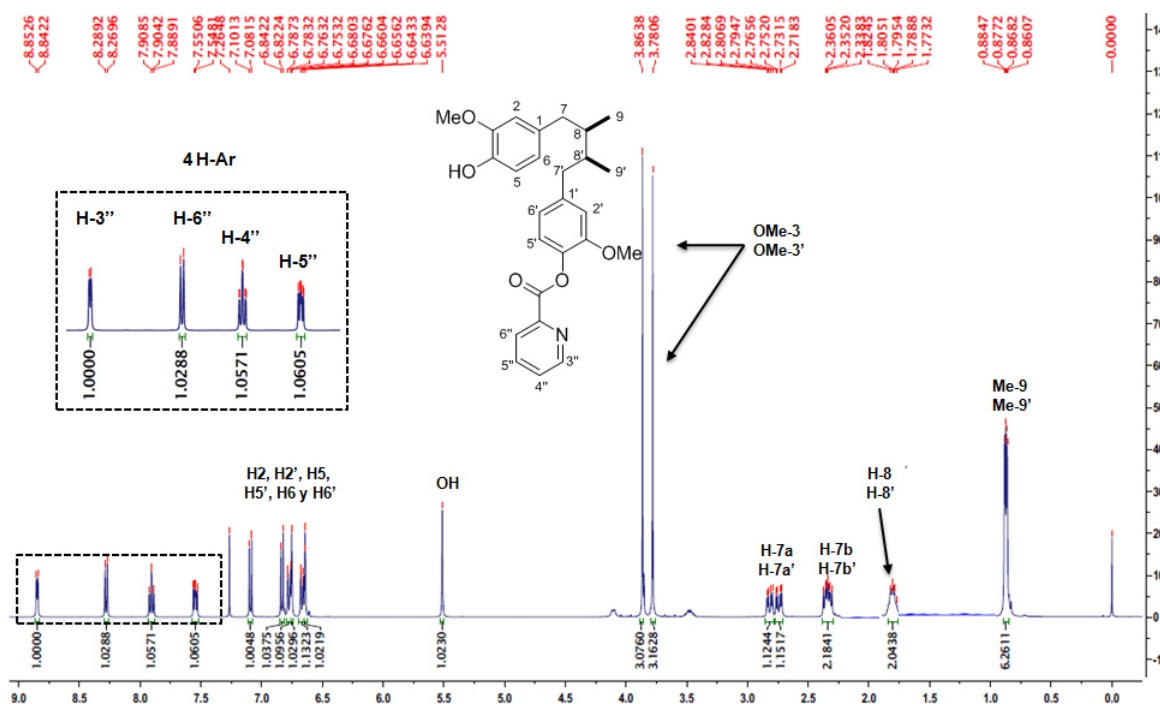


Figura 21. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-4m

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 22), podemos observar 25 señales que corresponden a los 26 carbonos de la molécula. También se observan las señales correspondientes al anillo de 2-piridincarbonilo en la región aromática, y la señal a 169.38 ppm corresponde al carbonilo del éster.

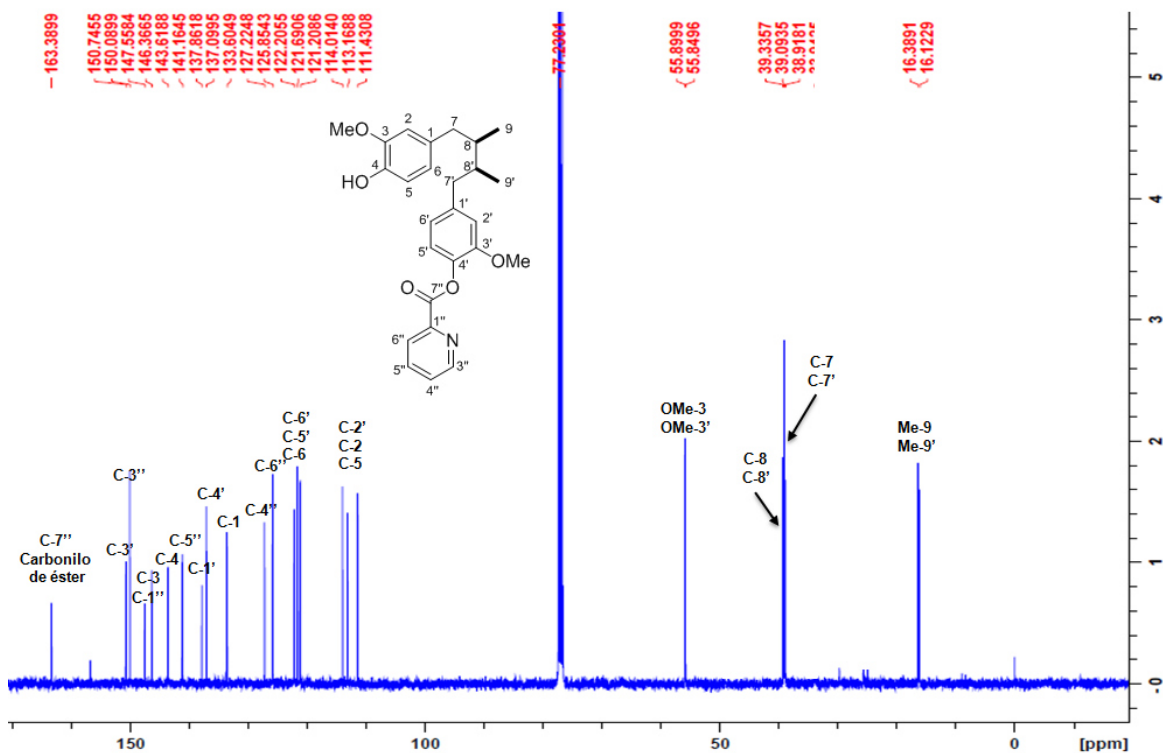


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-4m

5.2.1.8. Derivado KRM-4d.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 23) se logra apreciar en la región aromática 4 señales que integran para 8 protones correspondientes a los dos anillos de 2-piridincarbonilo, en 8.85 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, H-5'' y H-5'''), 8.28 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-6'' y H-6'''), 7.90 (td, $J = 7.6, 1.68$ Hz, 2 H, H-4'' y H-4''') y 7.54 ppm (td, $J = 7.6, 1.68$ Hz, 2 H, H-5'' y H-5''') y no se observa el singulete del protón del hidroxilo, confirmando así la obtención del análogo di-sustituido.

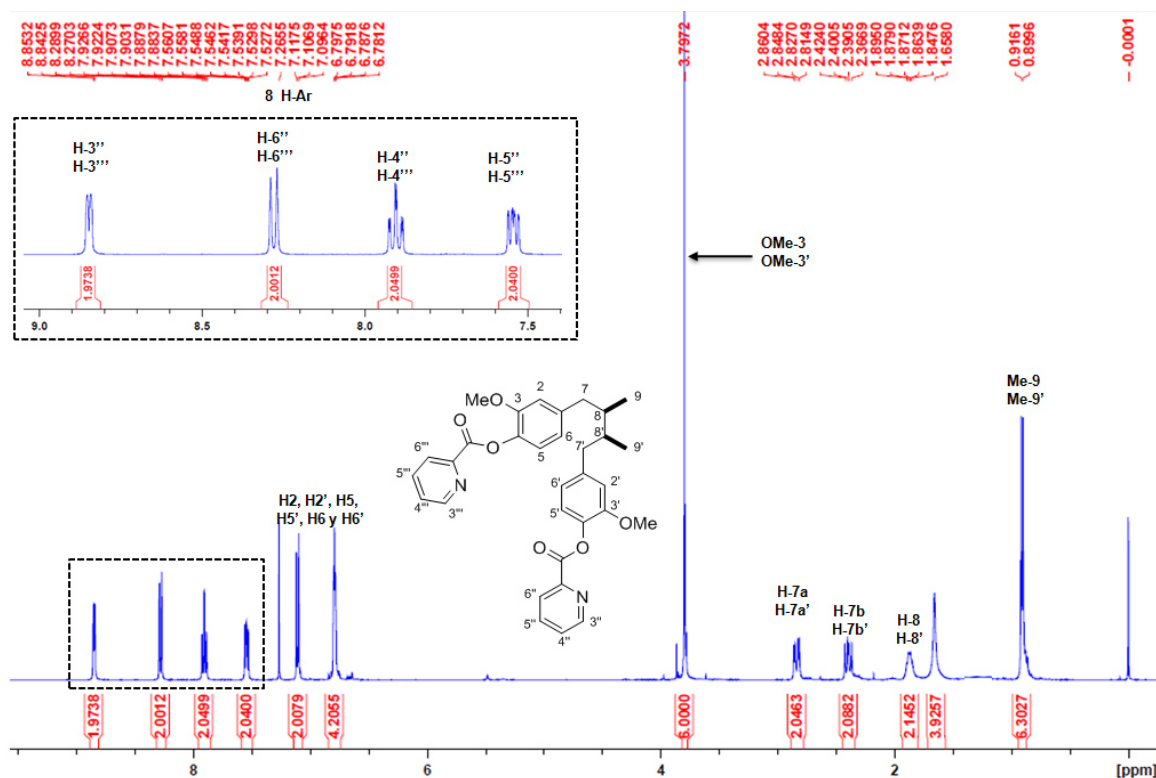


Figura 23. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-4d

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 24) se aprecian 16 señales que corresponden a los 32 carbonos de la molécula, lo que está indicando que es el derivado di-sustituido y la señal del carbonilo de éster a 163.37 ppm.

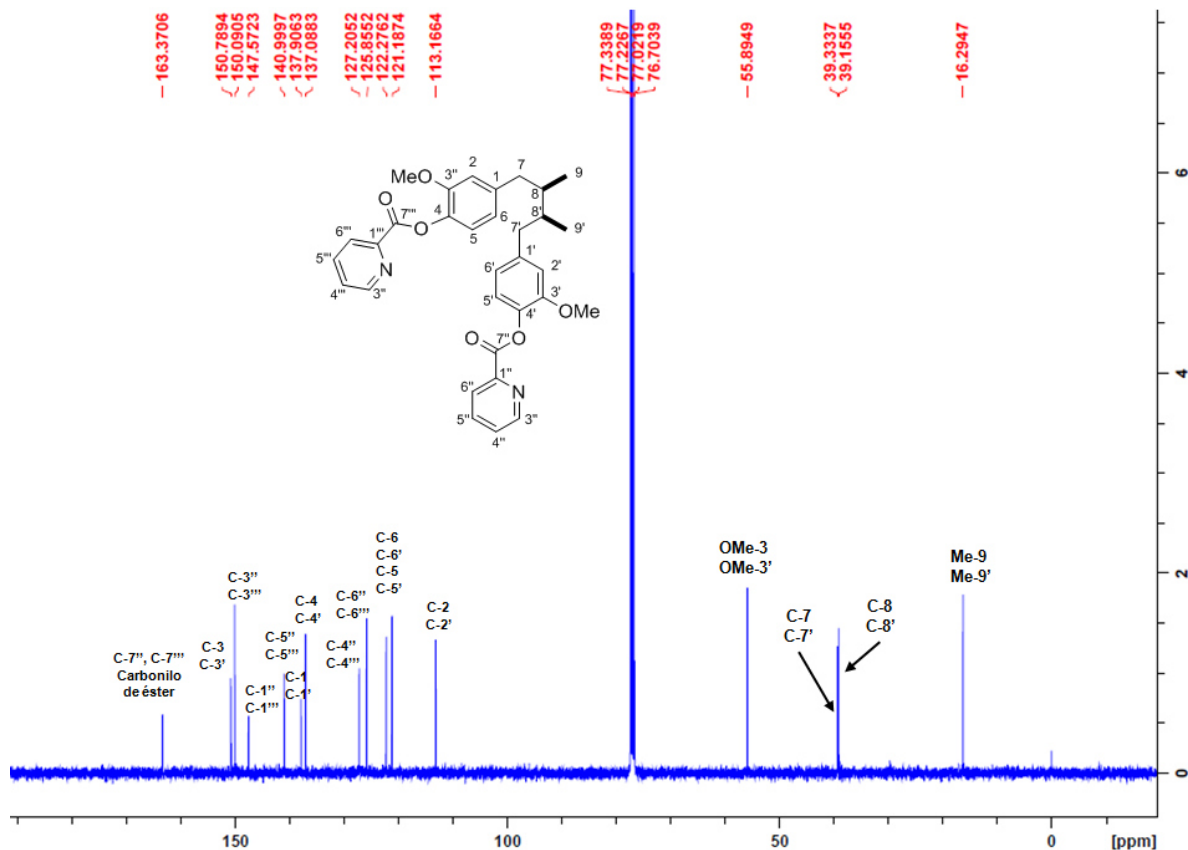


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) de KRM-4d

5.2.1.9. Derivado KRM-5m.

En la Figura 25 se observa el espectro de RMN ^1H dónde se puede ver la sustitución de un ácido graso de 16 carbonos (ácido palmítico) y se aprecian las señales características de éste, comenzando con los dos protones H-11 en el carbono α al carbonilo mostrando un triplete a 2.56 ppm, luego a 1.76 ppm un multiplete que corresponde a los dos protones H-12 del carbono β al carbonilo, esta señal se empalma con el multiplete que corresponde a los protones bencílicos del producto natural, H-8b y H-8b' dando una integración para cuatro protones. Posteriormente a 1.41 ppm se observa otro multiplete que corresponde a los dos protones de la posición H-13 del carbono γ al carbonilo. También a 1.26 ppm hay una señal intensa que integra para 22 protones unidos a los carbonos 13-24 del ácido graso y finalmente a 0.87 ppm un multiplete, el cual integra nueve protones de los cuales tres son del metilo terminal del ácido graso y los seis restantes corresponden a los 2 metilos del producto natural.

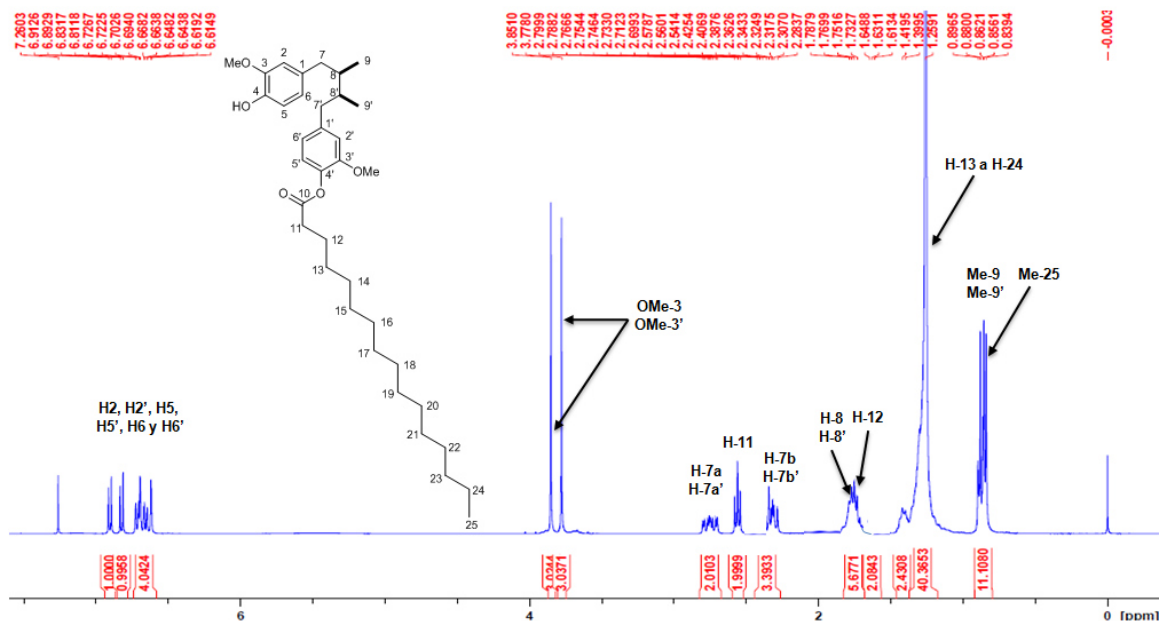


Figura 25. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-5m

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 26) se observan 34 señales correspondientes a los 36 carbonos de la molécula. Se observa la señal del carbonilo del éster a 172.09 ppm. Una gran cantidad de señales en la región alifática entre 34 y 22 ppm (13 señales) que corresponden a los 14 carbonos de la cadena del ácido palmítico y la señal a 14.12 ppm corresponde al metilo terminal del ácido palmítico.

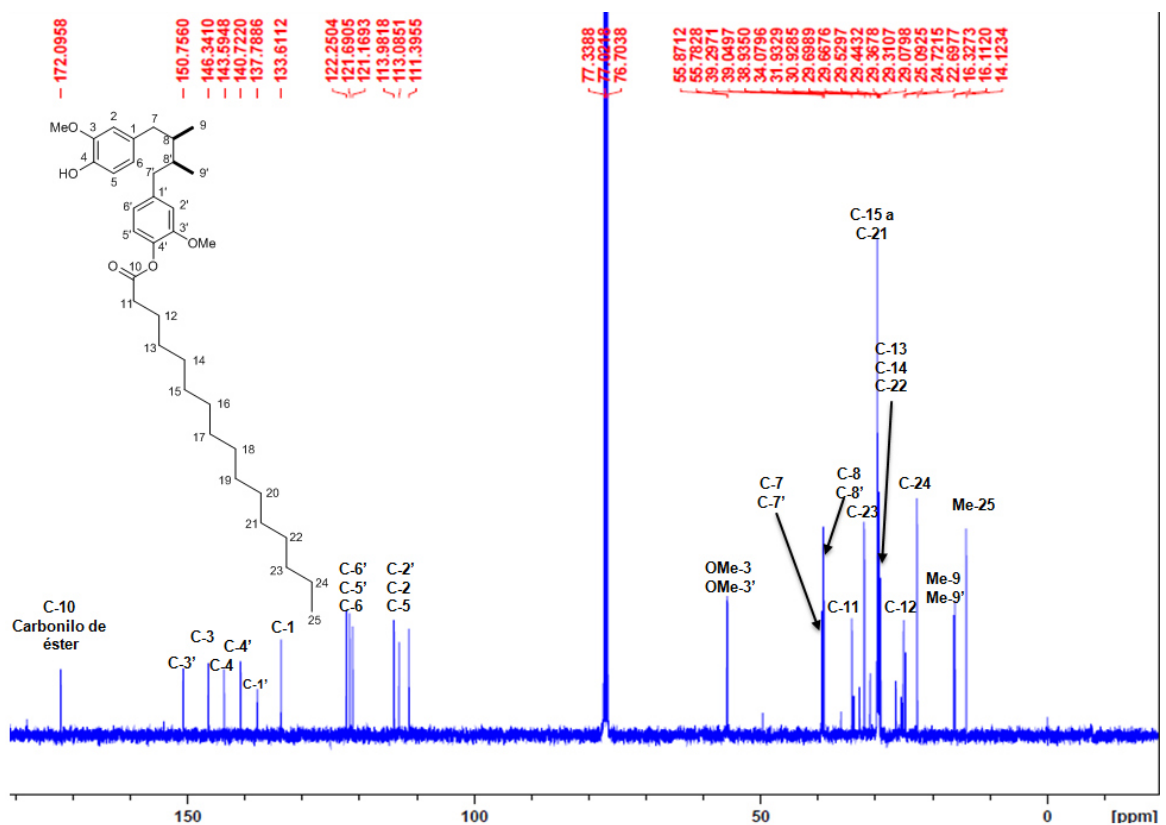


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-5m

5.2.1.10. Derivado KRM-5d.

En la Figura 27 se observa el espectro de RMN ^1H dónde se puede ver la sustitución de dos cadenas de un ácido graso de 16 carbonos (ácido palmítico) y se aprecian las señales características de estas cadenas, comenzando con los cuatro protones H-11 y H-11' en el carbono α al carbonilo mostrando un triplete a 2.56 ppm, luego a 1.75 ppm un multiplete que corresponde a los cuatro protones H-12 y H-12' del carbono β al carbonilo. Posteriormente a 1.41 ppm otro multiplete que corresponde a los cuatro protones de la posición H-13 y H-13' del carbono γ al carbonilo. También a 1.26 ppm hay una señal intensa que integra para 44 protones unidos a los carbonos 13-24 y 13'-24' del ácido graso y finalmente a 0.87 ppm un multiplete, el cual integra doce protones de los cuales seis son de los metilos terminales de las cadenas de ácido graso y los seis restantes corresponden a los 2 metilos del producto natural.

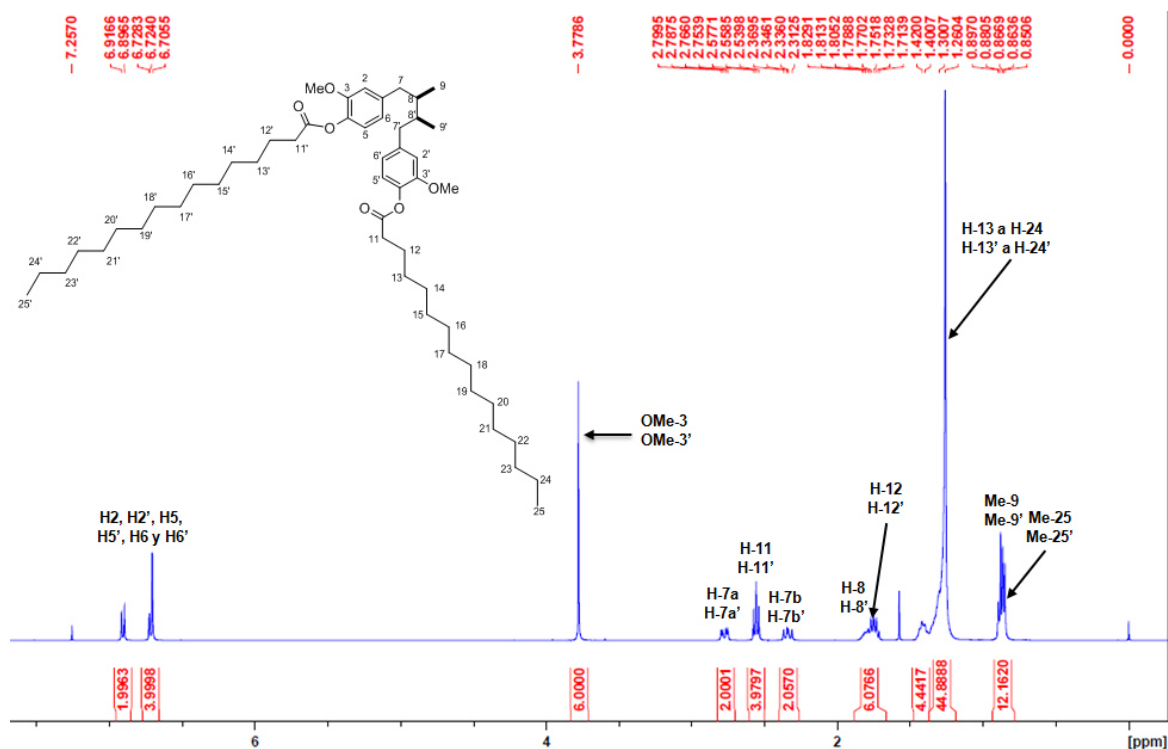


Figura 27. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-5d

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 28) se observan 23 señales correspondientes a los 52 carbonos de la molécula. Se observa la señal del carbonilo del éster a 172.09 ppm. Una gran cantidad de señales en la región alifática entre 34.08 y 22.70 ppm (11 señales) que corresponden a los 28 carbonos de las cadenas del ácido palmítico y la señal a 14.12 ppm corresponde a los metilos terminales del ácido palmítico.

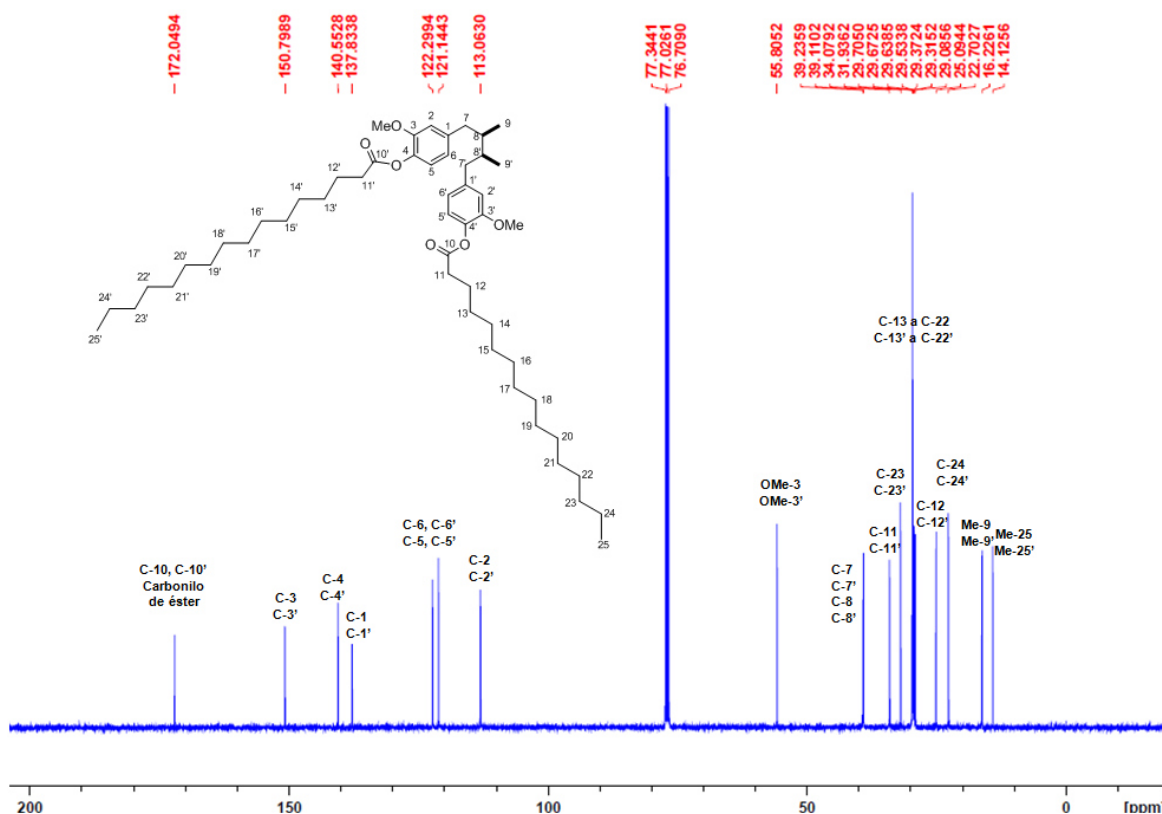


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) de KRM-5d

5.2.1.11. Derivado KRM-6m.

En la Figura 29 se observa el espectro de RMN ^1H dónde se puede ver la sustitución de un ácido graso de 18 carbonos (ácido esteárico) y se aprecian las señales características de éste, comenzando con los dos protones H-11 en el carbono α al carbonilo mostrando un triplete a 2.56 ppm, luego a 1.76 ppm un multiplete que corresponde a los dos protones H-12 del carbono β al carbonilo, esta señal se empalma con el multiplete que corresponde a los protones bencílicos del producto natural, H-8 y H-8' dando una integración para cuatro protones. Posteriormente a 1.41 ppm otro multiplete que corresponde a los dos protones de la posición H-13 del carbono γ al carbonilo. También a 1.26 ppm hay una señal intensa que integra para 26 protones unidos a los carbonos 14-26 del ácido graso y finalmente a 0.87 ppm un multiplete, el cual integra nueve protones de los cuales tres son del metilo terminal del ácido graso y los seis restantes corresponden a los 2 metilos del producto natural.

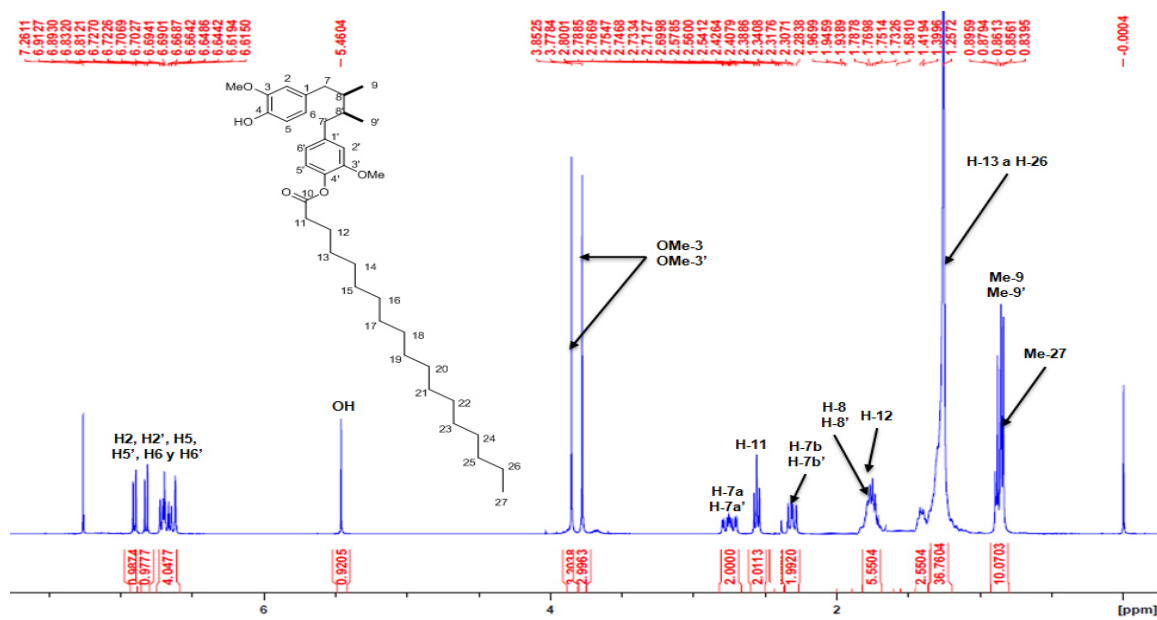


Figura 29. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-6m

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 30) se observan 34 señales correspondientes a los 38 carbonos de la molécula. Se observa la señal del carbonilo del éster a 172.08 ppm. Una gran cantidad de señales en la región alifática entre 34.08 y 22.70 ppm (13 señales) que corresponden a los 16 carbonos de la cadena del ácido palmítico y la señal a 14.12 ppm corresponde al metilo terminal del ácido palmítico.

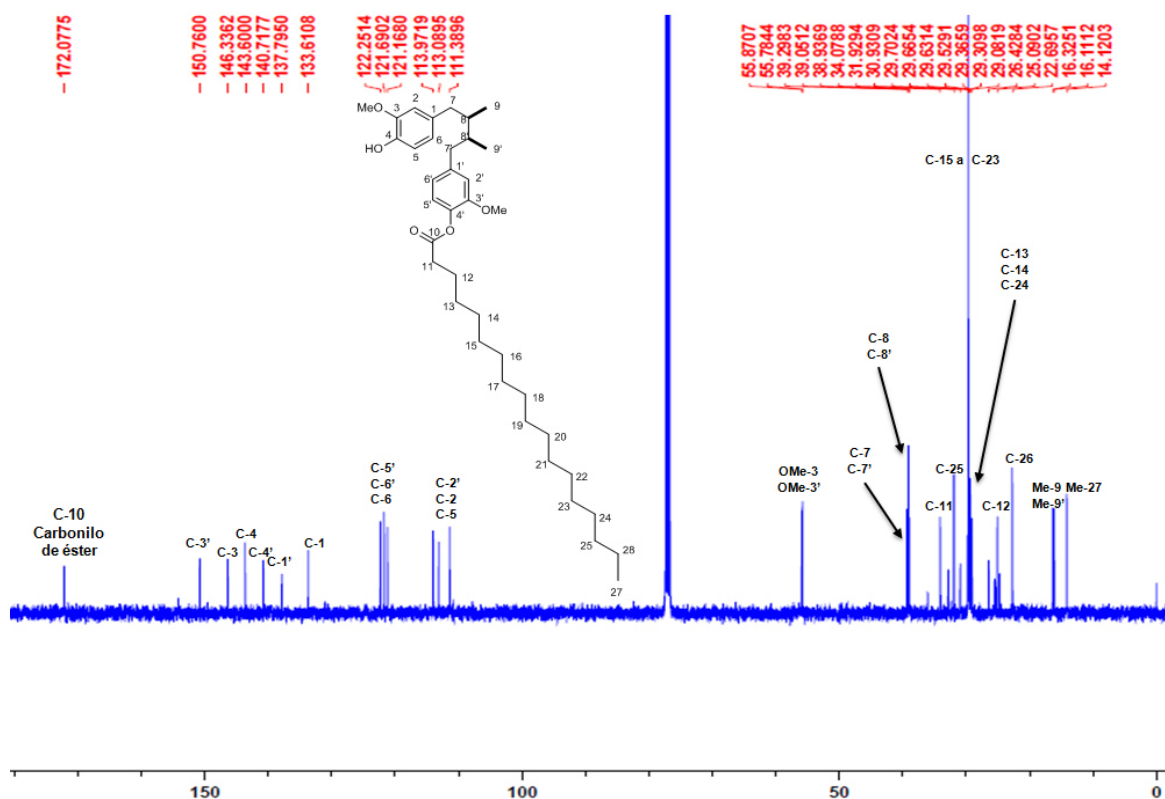


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-6m

5.2.1.12. Derivado KRM-6d.

En la Figura 31 se observa el espectro de RMN ^1H dónde se puede ver la sustitución de dos cadenas de un ácido graso de 18 carbonos (ácido esteárico) y se aprecian las señales características de estas cadenas, comenzando con los cuatro protones H-11 y H-11' en el carbono α al carbonilo mostrando un triplete a 2.56 ppm, luego a 1.75 ppm un multiplete que corresponde a los cuatro protones H-12 y H-12' del carbono β al carbonilo. Posteriormente a 1.41 ppm otro multiplete que corresponde a los cuatro protones de la posición H-13 y H-13' del carbono γ al carbonilo. También a 1.26 ppm hay una señal intensa que integra para 52 protones unidos a los carbonos 13-26 y 13'-26' del ácido graso y finalmente a 0.87 ppm un multiplete, el cual integra doce protones de los cuales seis son de los metilos terminales de las cadenas de ácido graso y los seis restantes corresponden a los 2 metilos del producto natural.

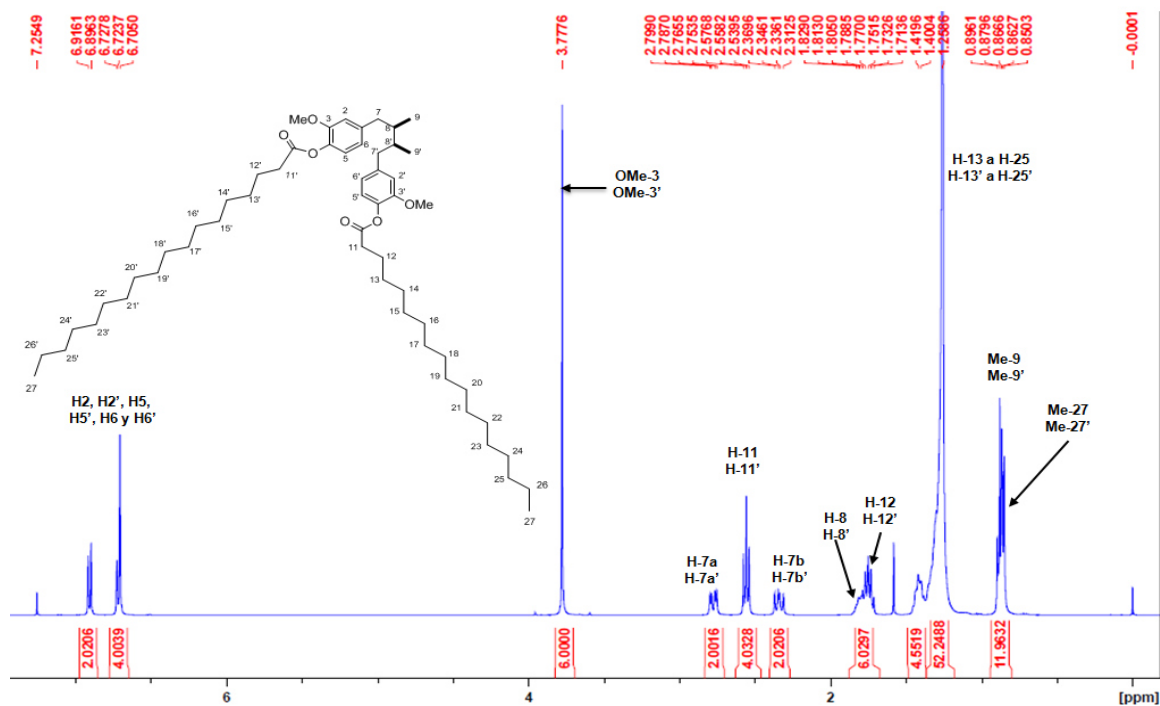


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-6d

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 32) se observan 23 señales correspondientes a los 56 carbonos de la molécula. Se observa la señal del carbonilo del éster a 172.04 ppm. Una gran cantidad de señales en la región alifática entre 34.08 y 22.70 ppm (11 señales) que corresponden a los 32 carbonos de las cadenas del ácido palmítico y la señal a 14.13 ppm corresponde a los metilos terminales del ácido palmítico.

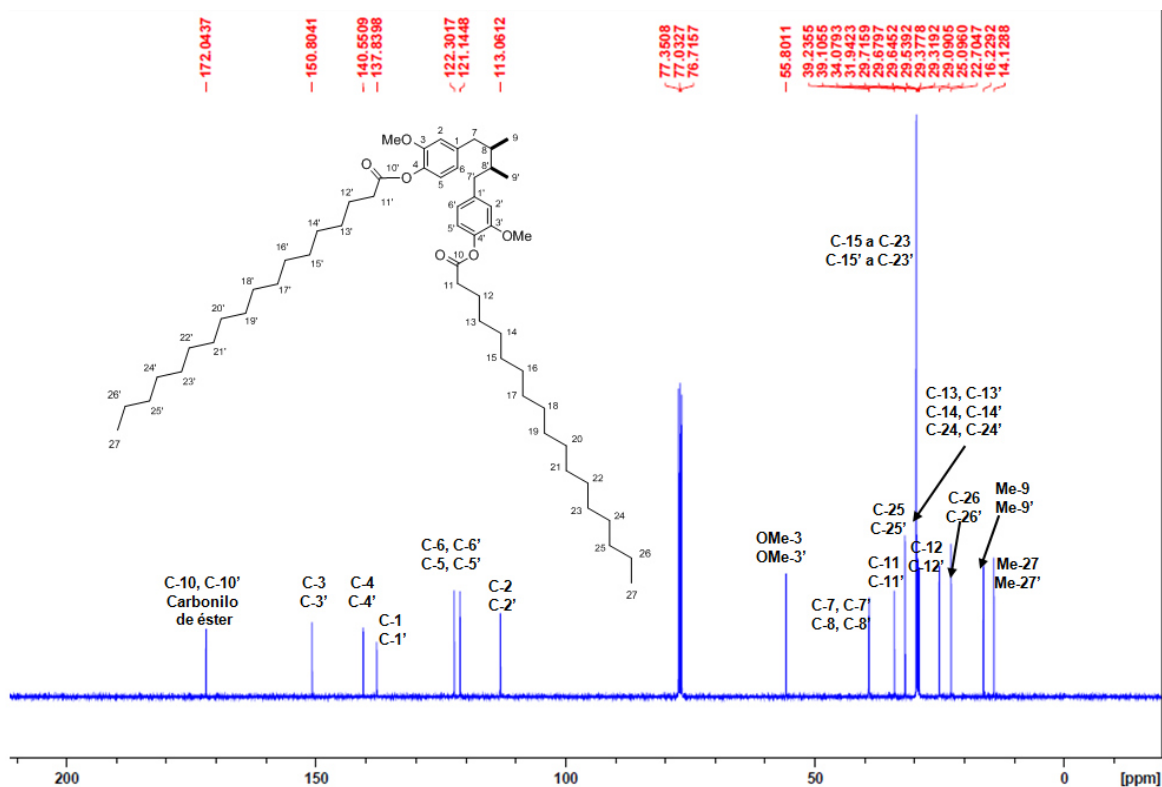


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-6d

5.2.1.13. Derivado KRM-9m.

La Figura 33 que corresponde al espectro de RMN ^1H dónde se visualiza la sustitución de un ácido graso insaturado de 18 carbonos de longitud (ác. oleico), y se pueden apreciar las señales características de este ácido graso comenzando con un multiplete a 5.35 ppm (m, 2 H) que integra para los dos protones vinílicos (H-18 y H-19) en posición *cis* del doble enlace. Luego se encuentra un triplete a 2.56 ppm (t, $J = 7.46$ Hz, 2H) que corresponde a los dos protones (H-11) en el carbono α al carbonilo. A 2.02 ppm (m, 4 H) tenemos un multiplete que integra para cuatro protones que corresponde a los protones alílicos H-17 y H-20. Otra señal importante es la de los protones en el carbono β (H-12) a 1.76 ppm (m, 4 H), esta señal se empalma con el multiplete que corresponde a los protones H-8 y H-8' del producto natural, dando una integración de 4 protones. Un multiplete a 1.41 ppm corresponde a los protones en el carbono γ al carbonilo. A 1.28 ppm una señal intensa que integra los 20 protones que unidos a los carbonos 13 a 16 y 21 a 26. Los protones correspondientes al metilo de la cadena del ácido graso, se encuentran en el multiplete a 0.87 ppm, el cual integra 9 protones de los cuales 3 son del ácido graso y los 6 restantes corresponden a los 2 metilos 9 y 9' del producto natural.

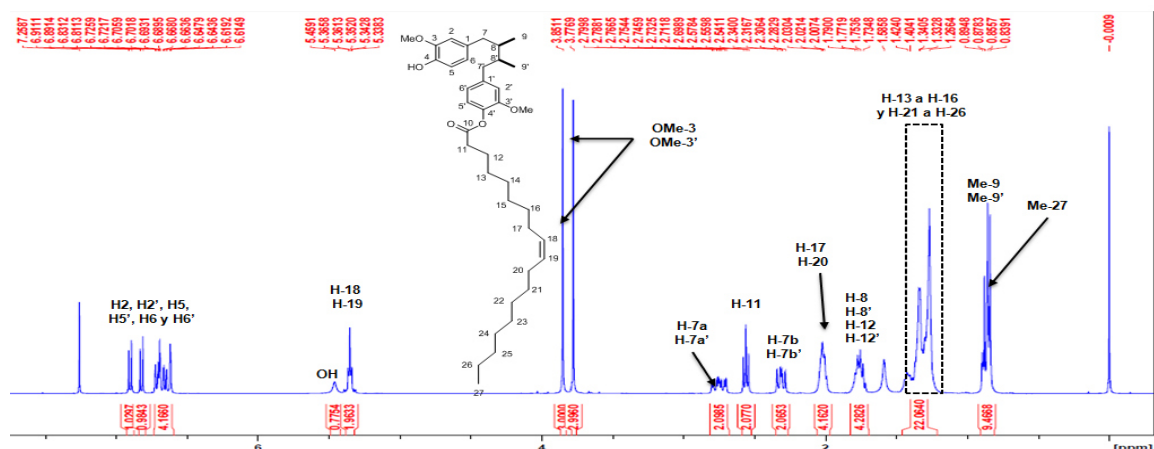


Figura 33. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-9m

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 34) observamos 36 señales de los 38 carbonos de la molécula. Primeramente se observa la señal que indica la formación del éster a 172.05 ppm. Posteriormente se encuentran las señales de los carbonos del doble enlace a 130.02 y 129.76 ppm, y 13 señales en la región alifática entre 34 y 22 ppm (34.06, 31.91, 29.78, 29.72, 29.53, 29.33, 29.21, 29.16, 29.05, 27.23, 27.18, 25.07, 22.68) que corresponden a los carbonos del ácido oleico. Finalmente a 14.11 ppm está la señal que corresponde al metilo terminal del ácido oleico.

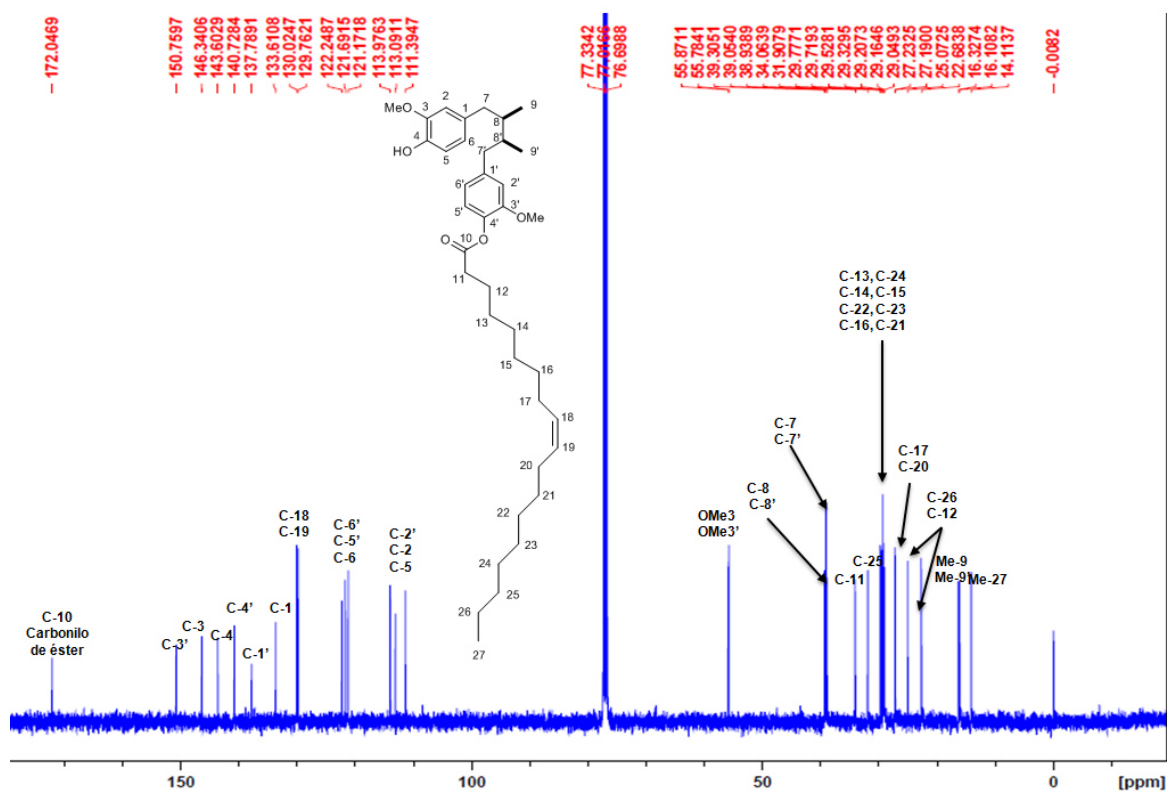


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-9m.

5.2.1.14. Derivado KRM-9d.

La Figura 35 que corresponde al espectro de RMN ^1H donde se visualiza la sustitución de un ácido graso insaturado de 18 carbonos de longitud (ác. oleico), y se pueden apreciar las señales características de este ácido graso comenzando con un multiplete a 5.35 ppm (m, 2 H) que integra para los dos protones vinílicos (H-18 y H-19) en posición *cis* del doble enlace. Luego se encuentra un triplete a 2.56 ppm (t, $J = 7.46$ Hz, 2H) que corresponde a los dos protones (H-11) en el carbono α al carbonilo. A 2.02 ppm (m, 4 H) tenemos un multiplete que integra para cuatro protones que corresponde a los protones alílicos H-17 y H-20. Otra señal importante es la de los protones en el carbono β (H-12) a 1.76 ppm (m, 4 H), esta señal se empalma con el multiplete que corresponde a los protones H-8 y H-8' del producto natural, dando una integración de 4 protones. Un multiplete a 1.41 ppm corresponde a los protones en el carbono γ al carbonilo. A 1.28 ppm una señal intensa que integra los 20 protones que unidos a los carbonos 13 a 16 y 21 a 26. Los protones correspondientes al metilo de la cadena del ácido graso, se encuentran en el multiplete a 0.87 ppm, el cual integra 12 protones de los cuales 6 son del ácido graso y los 6 restantes corresponden a los 2 metilos Me-9 y Me-9' del producto natural.

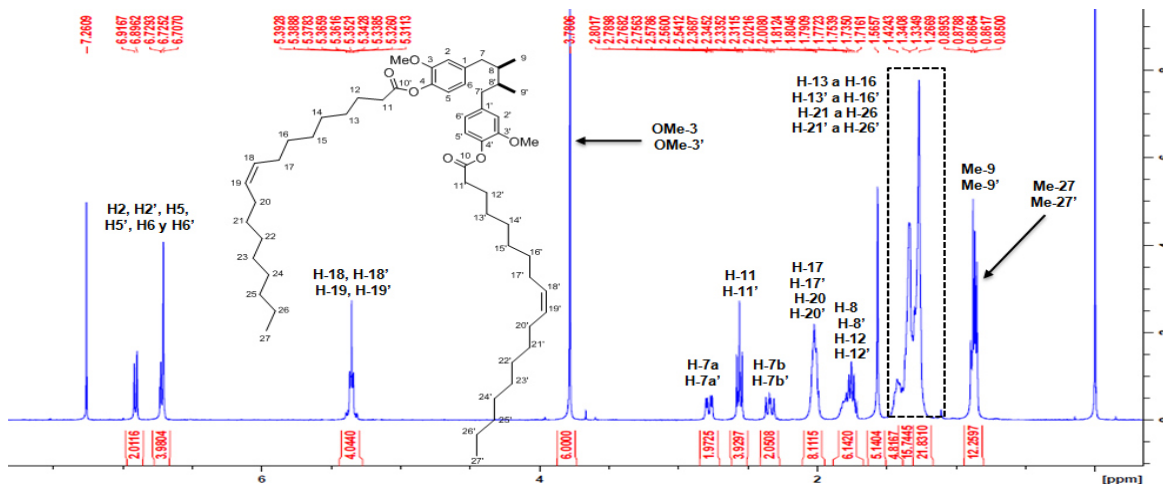


Figura 35. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-9d

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 36) observamos 28 señales de los 56 carbonos de la molécula. Primeramente se observa la señal que indica la formación del éster a 172.05 ppm. Posteriormente se encuentran las señales de los carbonos del doble enlace a 130.02 y 129.76 ppm, y 13 señales en la región alifática entre 34 y 22 ppm (34.06, 31.91, 29.78, 29.72, 29.53, 29.33, 29.21, 29.16, 29.05, 27.23, 27.18, 25.07, 22.68) que corresponden a los carbonos del ácido oleico. Finalmente a 14.11 ppm está la señal que corresponde al metilo terminal del ácido oleico.

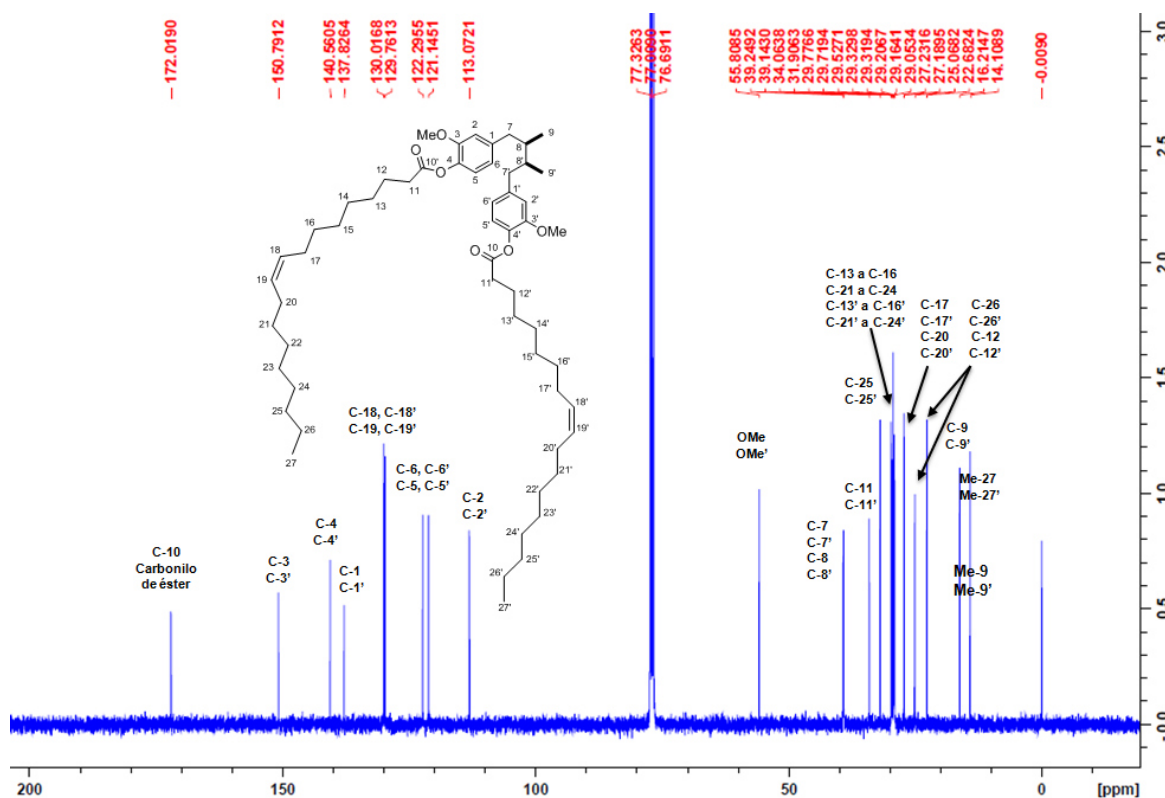


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-9d

5.2.1.15. Derivado KRM-7m.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 37) se observan 3 señales correspondientes a los protones del anillo de fenilo. La primera señal corresponde a un doble de doble a 8.21 ppm (dd, $J = 7.2, 1.2$ Hz, 2 H-Ar) que integra para 2 protones (H-2'' y H-6''), posteriormente a 7.62 ppm otro doble de doble (dd, $J = 4.4, 1.2$ Hz, 1 H-Ar) que integra para 1 protón (H-4'') y finalmente un doble de doble a 7.50 ppm (dd, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 2 H, H-3'' y H-5''). Otra señal importante es la del protón del hidroxilo a 5.47 ppm que integra para 1H y confirma la obtención del análogo mono-sustituido.

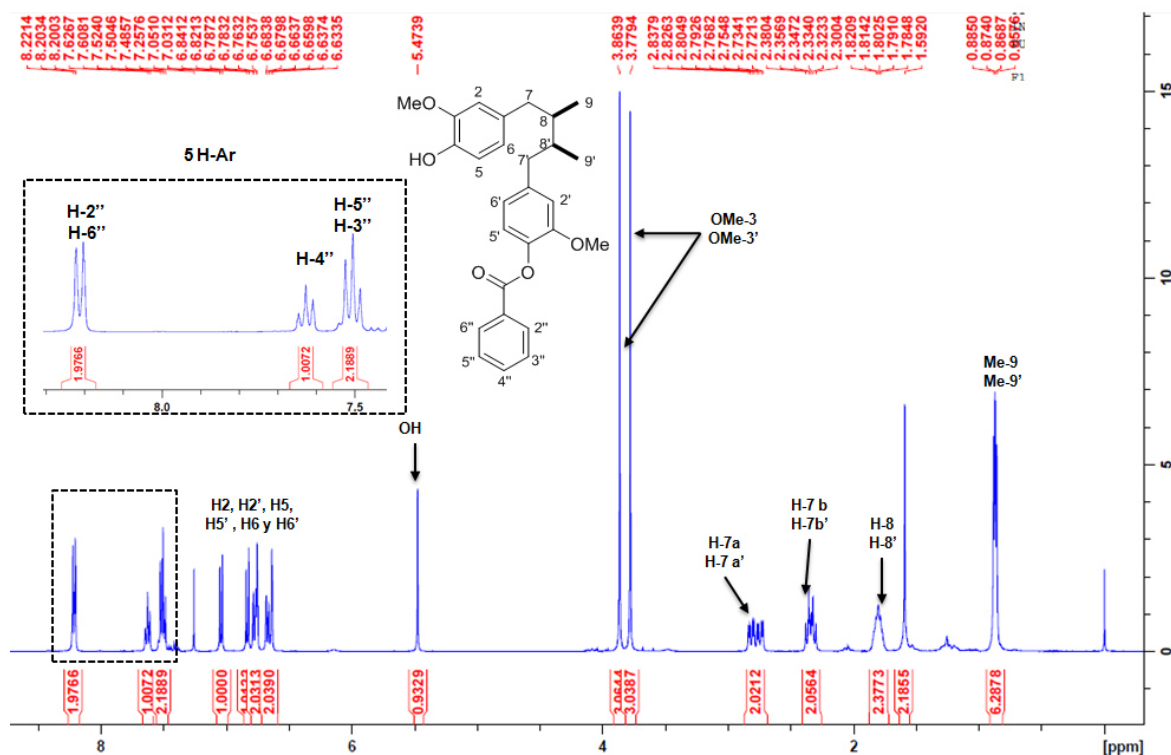


Figura 37. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-7m

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 38) se aprecian 26 señales que corresponden a los 27 carbonos de la molécula. La primer señal que confirma la obtención del éster es la de 164.90 ppm, posteriormente hay cuatro señales que corresponden a los 6 carbonos del fenilo (133.38, 130.28, 129.59, 128.49).

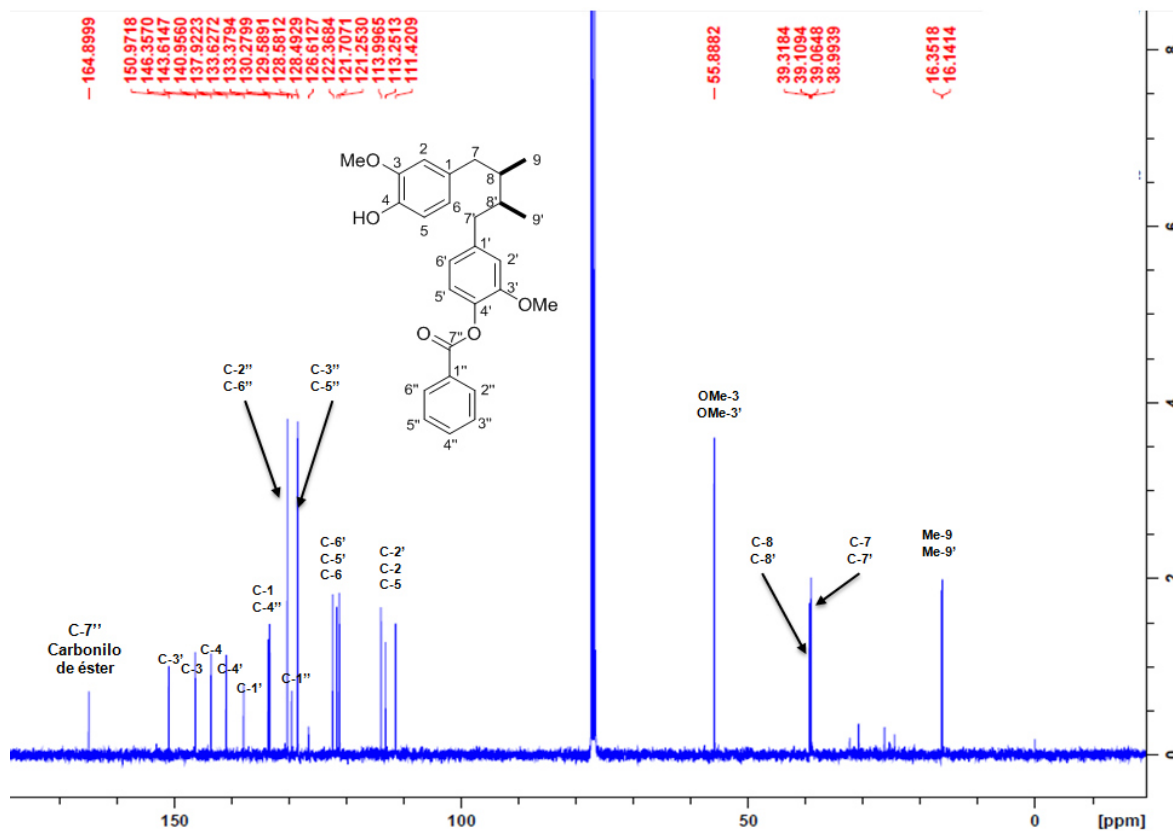


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-7m

5.2.1.16. Derivado KRM-7d.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 39) se observan 3 señales correspondientes a los protones de los anillos de fenilo. La primer señal corresponde a un doblete a 8.21 ppm (d, $J = 7.3$ Hz, 4 H-Ar) que integra para 4 protones (H-2'', H-2''', H-6'' y H-6'''), posteriormente a 7.63 ppm un triplete (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H-Ar) que integra para 2 protones (H-4'' y H-4''') y finalmente un triplete a 7.50 ppm (t, $J = 7.4$ Hz, 4 H-Ar) que integra para cuatro protones (H-3'', H-3''', H-5'' y H-5''').

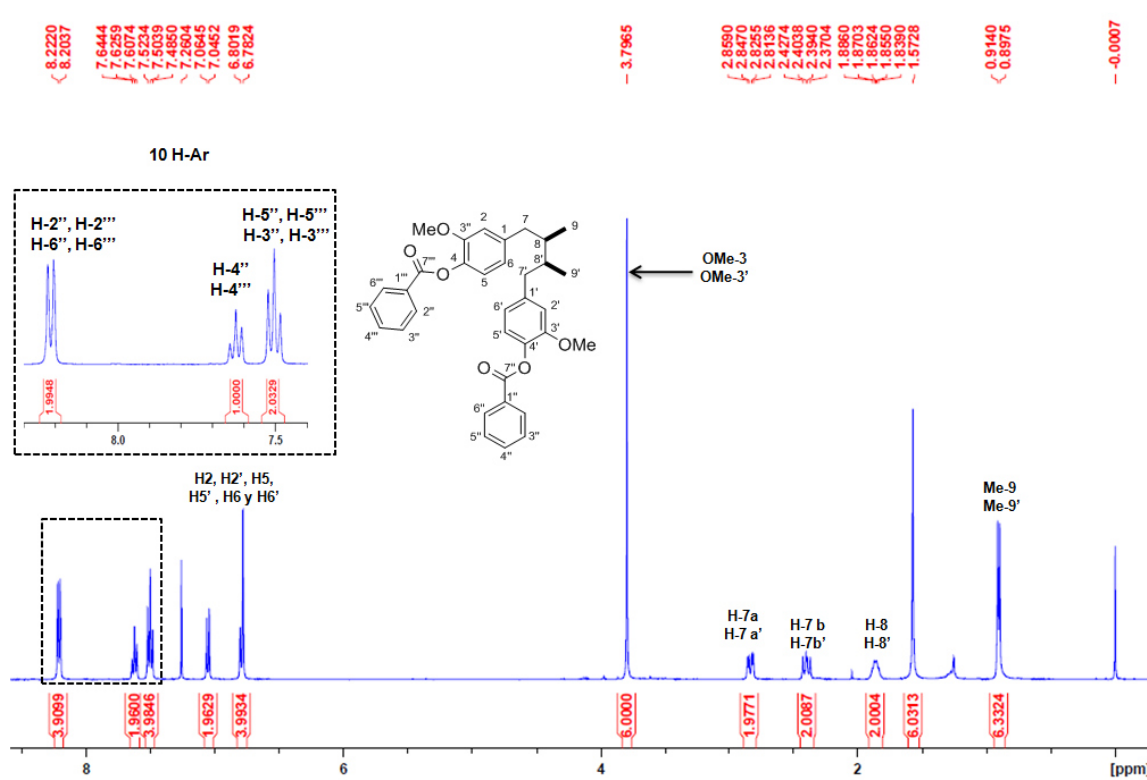


Figura 39. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-7d

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 40) se aprecian 15 señales que corresponden a los 34 carbonos de la molécula. La primer señal que confirma la obtención del éster es la de 164.88 ppm, posteriormente hay cuatro señales que corresponden a los 6 carbonos de los fenilos (133.36, 130.28, 129.60, 128.48).

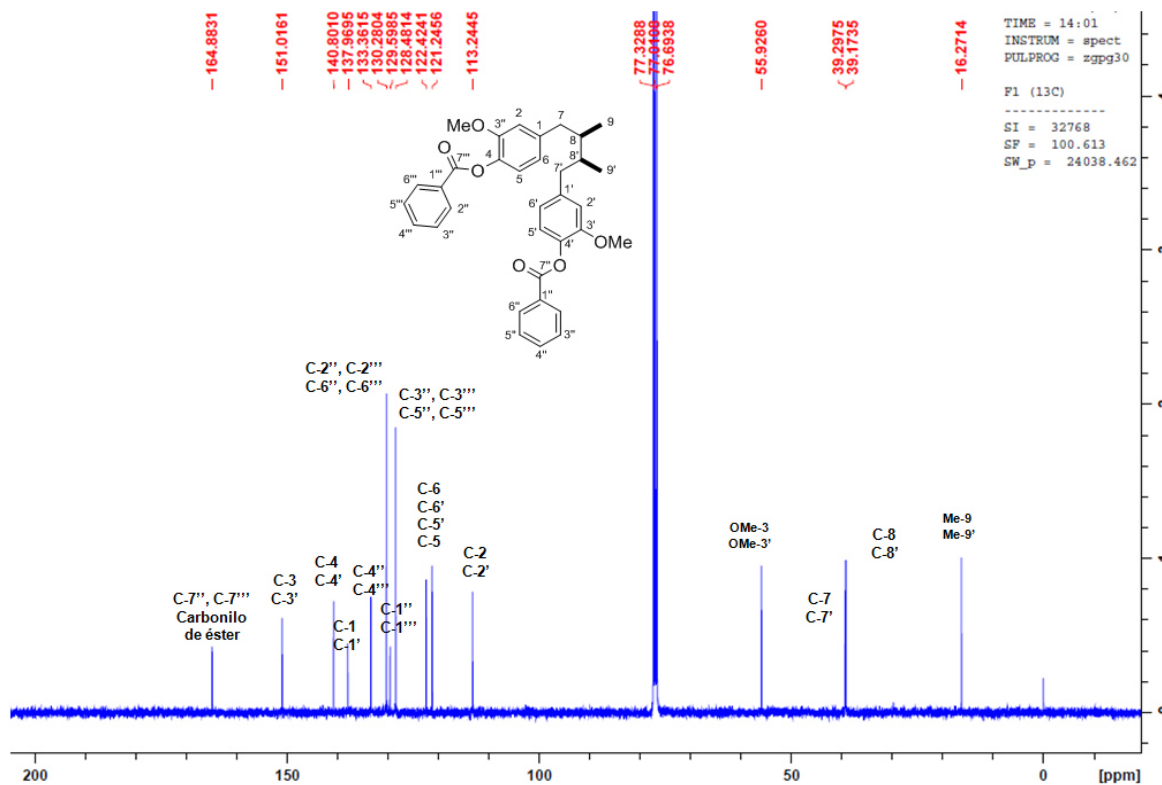


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-7d

5.2.1.17. Derivado KRM-8m.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 41) observamos 2 señales que corresponden a los protones del anillo pirazínico. La primer señal corresponde a un doblete a 9.46 ppm (d, $J = 1.4$ Hz, 1 H-Ar) que integra para 1 protón (H-6''), posteriormente a 8.83 ppm un multiplete que integra para 2 protones (H-3'' y H-4''). Otra señal importante es la del protón del hidroxilo a 5.50 ppm que integra para uno, lo que indica la obtención del análogo mono-sustituido.

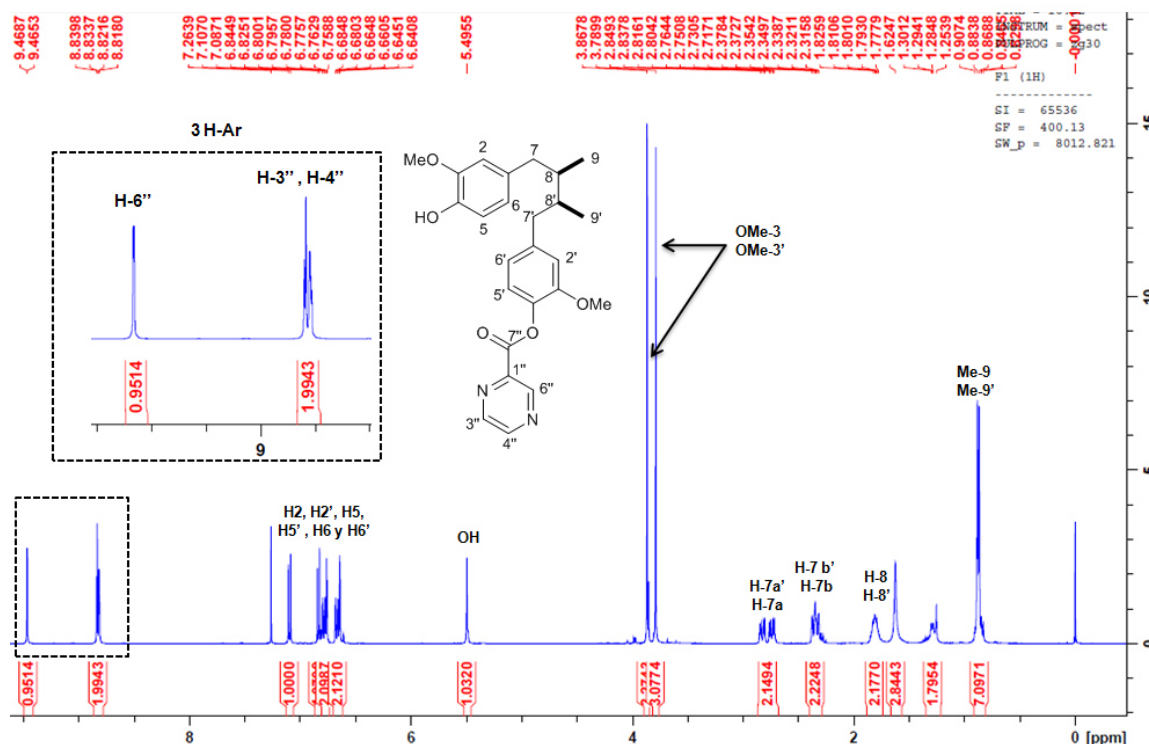


Figura 41. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-8m

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 42) se aprecian 25 señales que corresponden a los 25 carbonos de la molécula. La primer señal que confirma la obtención del éster es la de 162.10 ppm, posteriormente hay cuatro señales que corresponden a los 4 carbonos del anillo pirazínicos (146.83, 144.64, 143.63, 143.10).

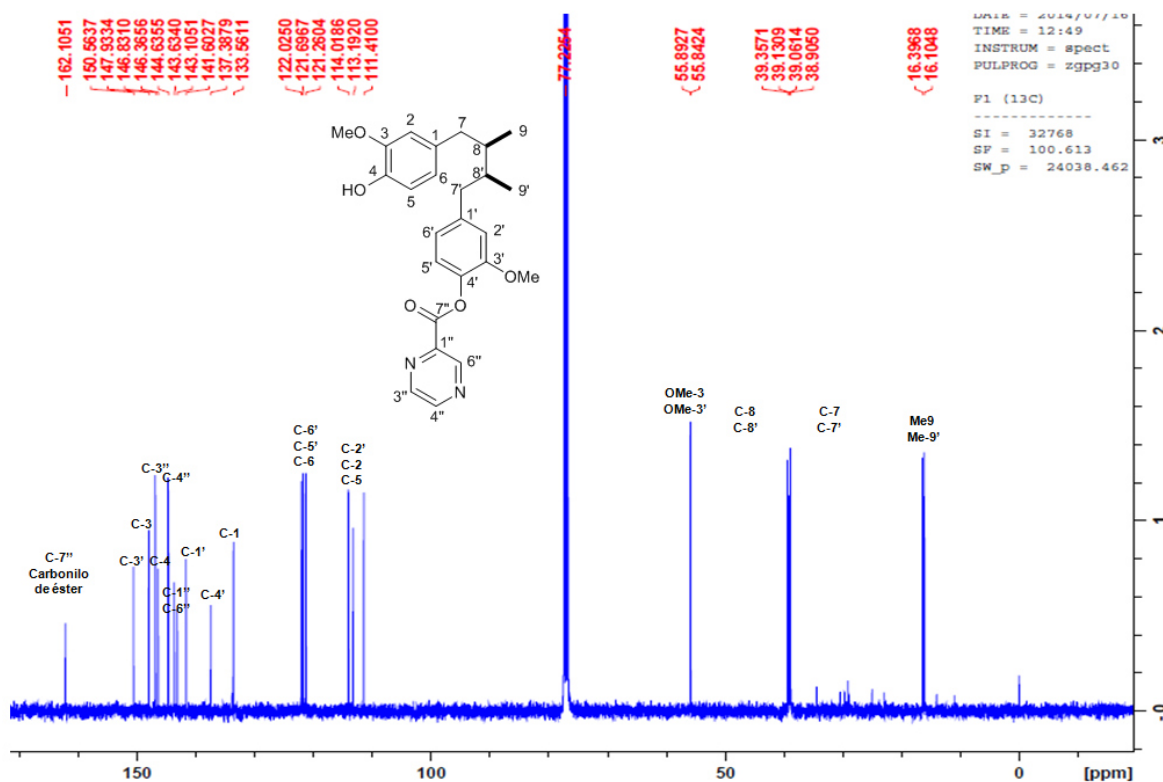


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-8m

5.2.1.18. Derivado KRM-8d.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 43) observamos 2 señales correspondientes a los protones de los anillos pirazínicos. La primera señal corresponde a un doblete a 9.46 ppm (d, $J = 1.2$ Hz, 2 H-Ar) que integra para 2 protones (H-6'' y H-6'''), posteriormente a 8.42 ppm un multiplete (m, 4 H-Ar) que integra para 4 protones (H-3'', H-3''', H-4'' y H-4''').

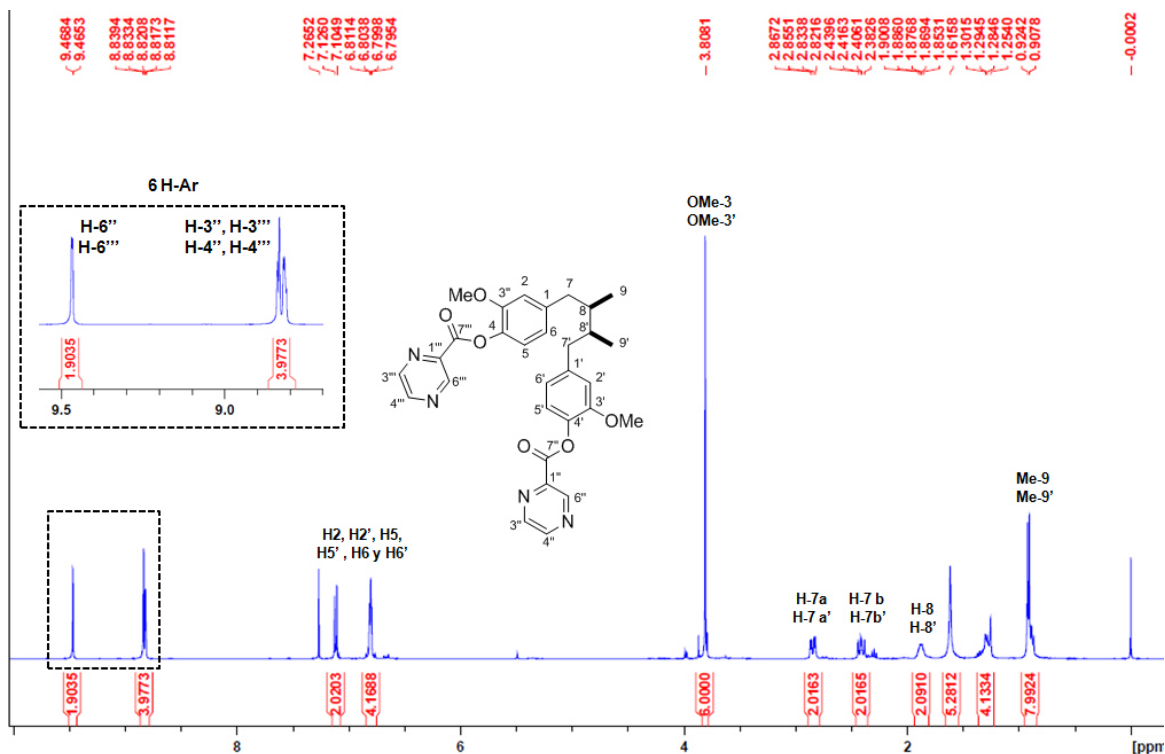


Figura 43. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-8d

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 44) se aprecian 15 señales que corresponden a los 30 carbonos de la molécula. Se puede observar la señal que corresponde a la formación de los ésteres a 162.09 ppm. Cuatro señales corresponden a los ocho carbonos de los anillos pirazínicos a 147.83, 146.83, 144.63, 143.10 ppm.

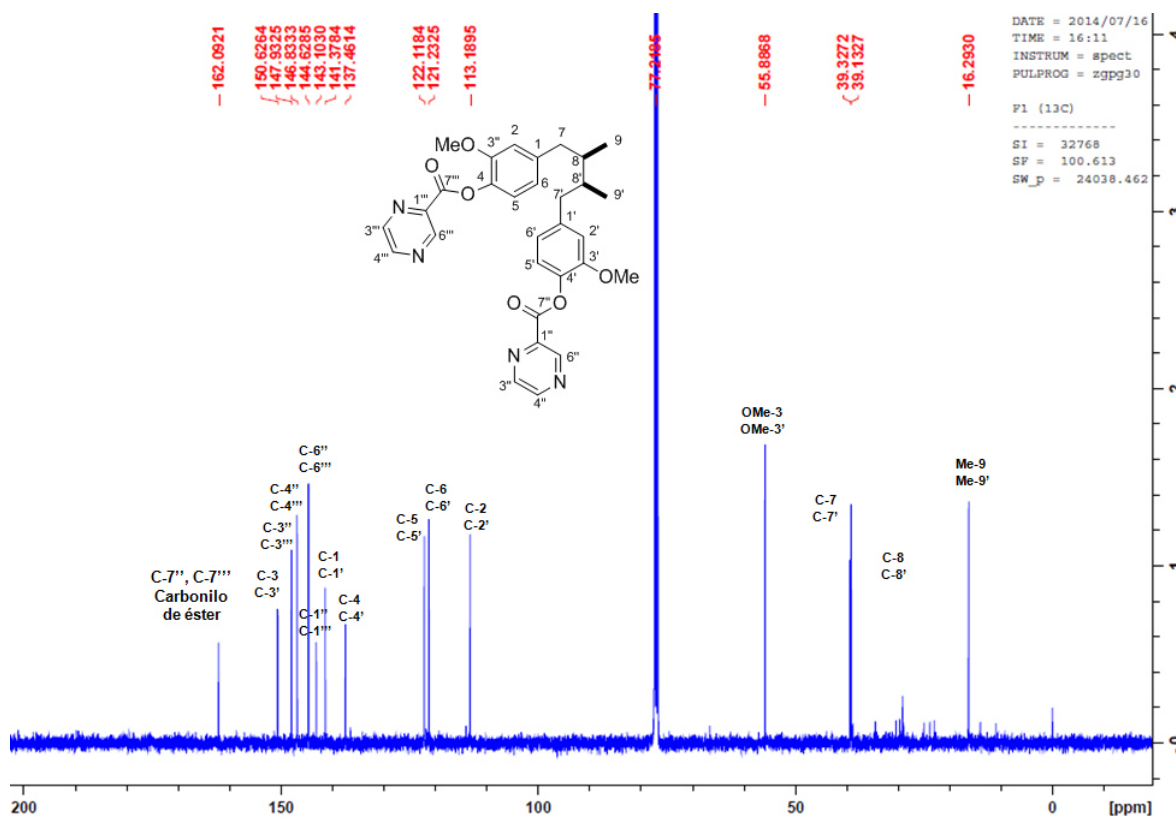


Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) de KRM-8d

5.2.2. Caracterización de los éteres y aminoéteres del Am-DG.

5.2.2.1. KRM-10m

En la Figura 45 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observa el singlete del hidroxilo a 5.47 ppm (s, 1 H, OH), lo que nos confirma que se obtuvo el derivado mono-sustituido. Posteriormente se observan tres singletes a 3.86 (s, 3 H, OMe), 3.854 (s, 3 H, OMe) y 3.849 (s, 3 H, OMe) ppm correspondientes a los 9 protones de los 3 metoxilos.

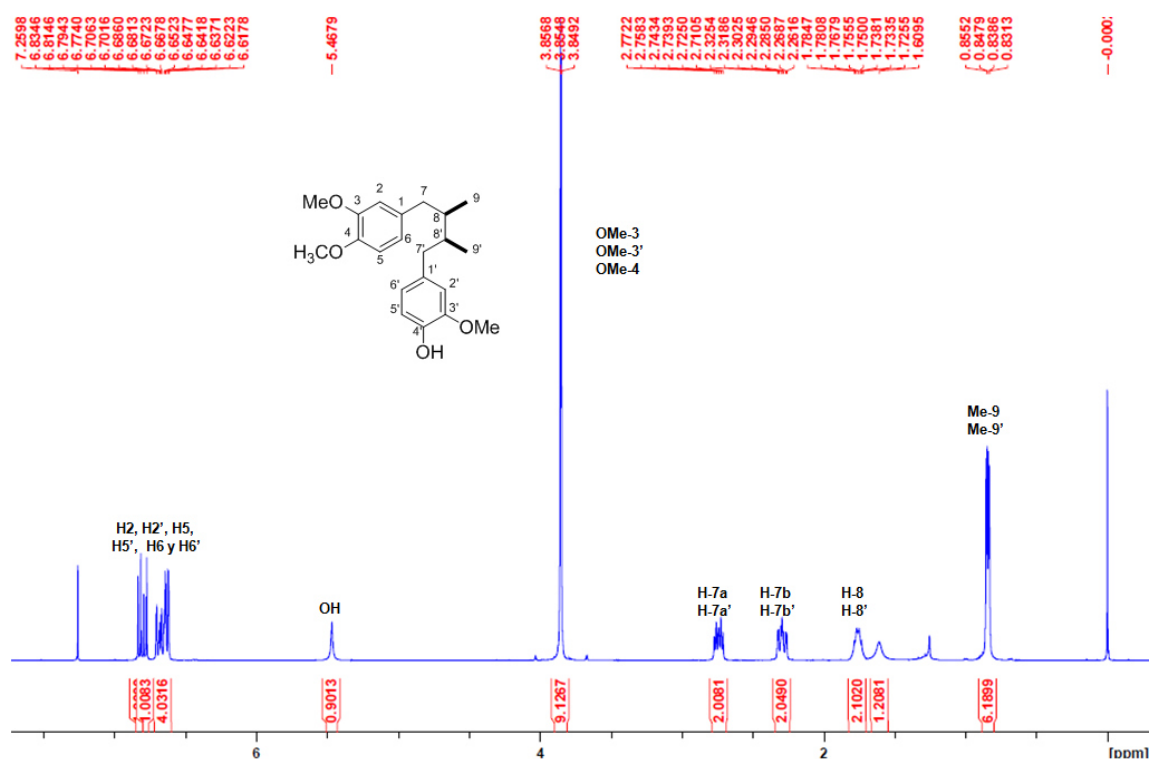


Figura 45. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-10m

En la Figura 46, que corresponde al espectro de RMN ^{13}C , se observan 21 señales correspondientes a los 21 carbonos de la molécula, de las cuales las señales a 55.92, 55.85 y 55.91 ppm corresponden a los 3 metoxilos de la molécula.

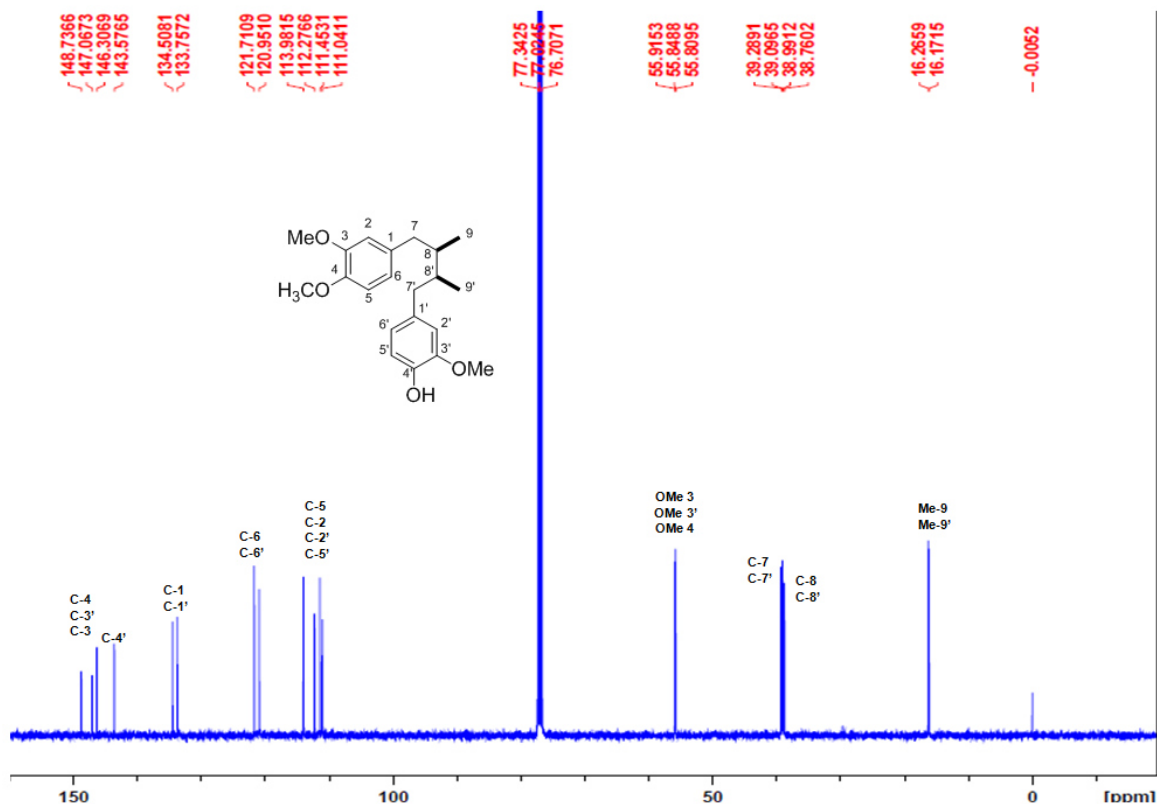


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-10m

5.2.2.2. KRM-10d.

En la Figura 47 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observan dos singuletes a 3.86 (s, 6 H, OMe) y 3.85 (s, 6 H, OMe) ppm correspondientes a los 12 protones de los 4 metoxilos.

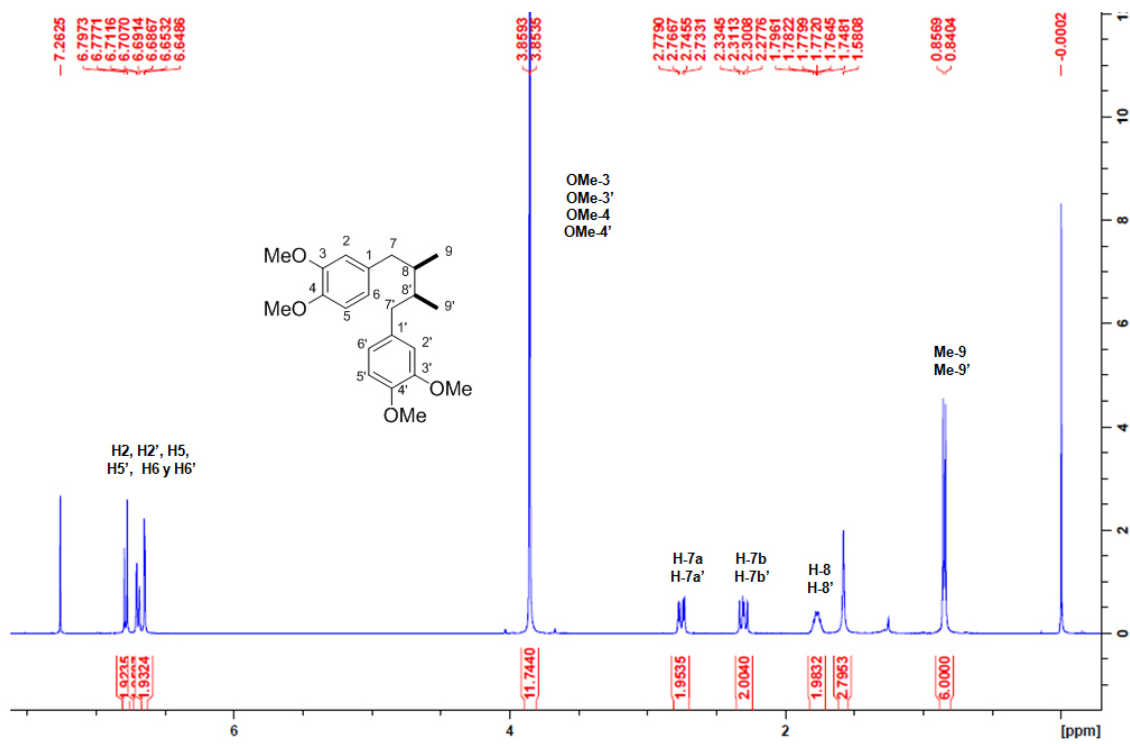


Figura 47. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-10d

En la Figura 48 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 12 señales correspondientes a los 22 carbonos de la molécula, de las cuales las señales a 55.90 y 55.80ppm corresponden a los 4 metoxilos de la molécula.

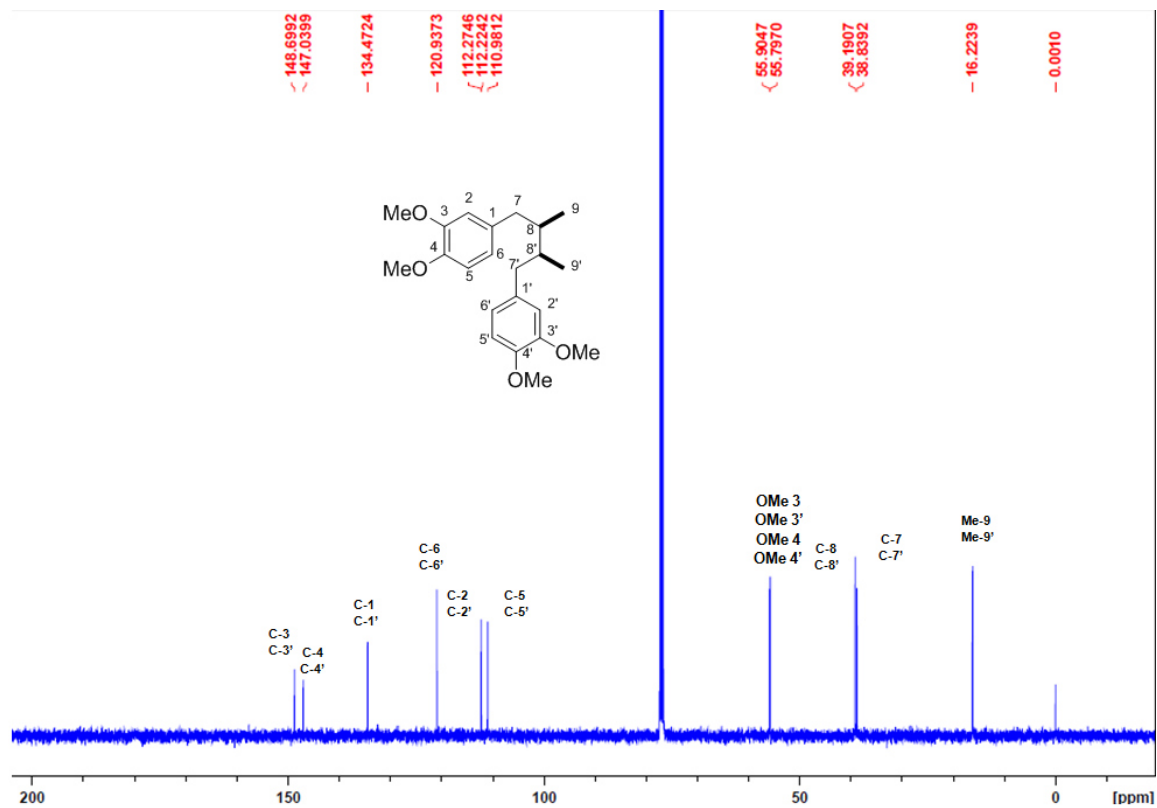


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-10d

5.2.2.3. KRM-12m

En la Figura 49 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observan 3 señales que confirman la unión del grupo *N,N*-dimetiletilamina, primeramente a 4.16 ppm un triplete (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{O}$) que corresponde a los protones H-10 del carbono unido al oxígeno del éter, posteriormente a 2.93 ppm otro triplete (t, $J = 5.6$ Hz, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{N}$) que corresponde a los protones H-11 del carbono unido al nitrógeno. También a 2.48 ppm se encuentra un singulete que integra para los 6 protones correspondientes a los dos metilos unidos al nitrógeno.

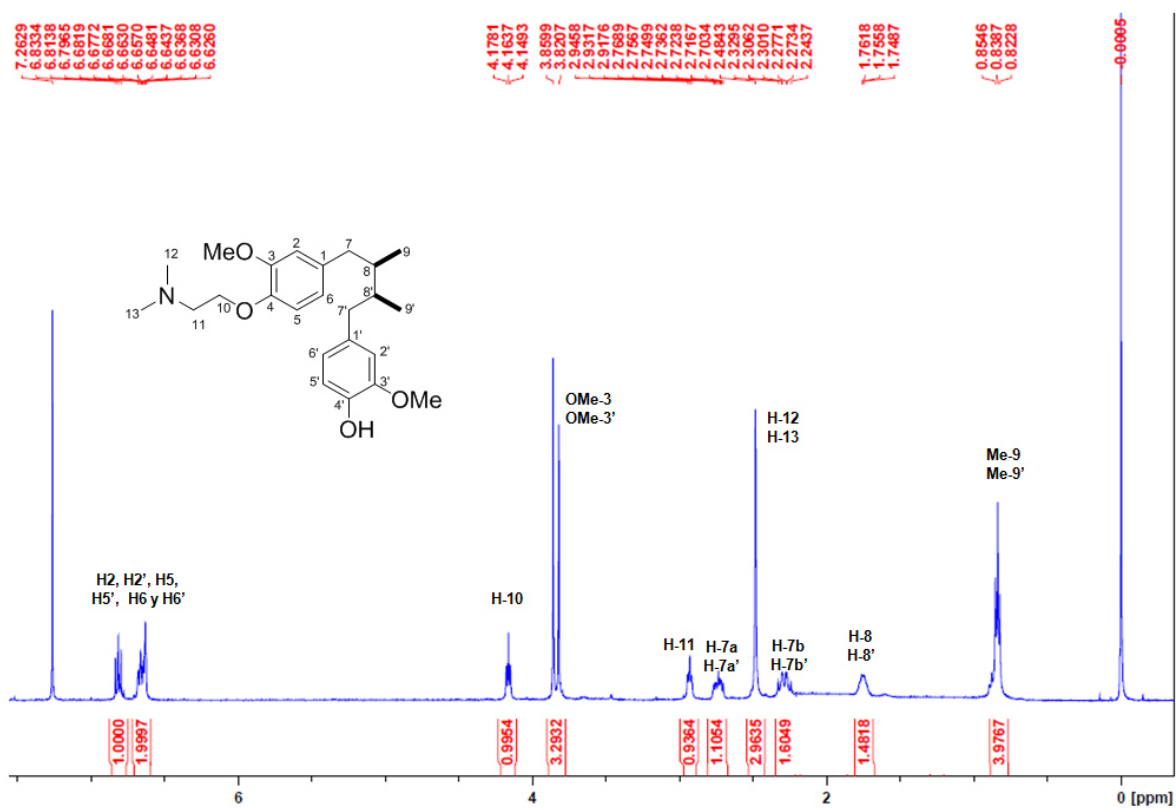


Figura 49. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-12m

En la Figura 50 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 22 señales correspondientes a los 24 carbonos de la molécula, de las cuales las señales a 66.50 (C-10), 57.66 (C-11) y 45.28 (C-12 y C-13) ppm corresponden a los 4 carbonos del grupo *N,N*-dimetiletilamina.

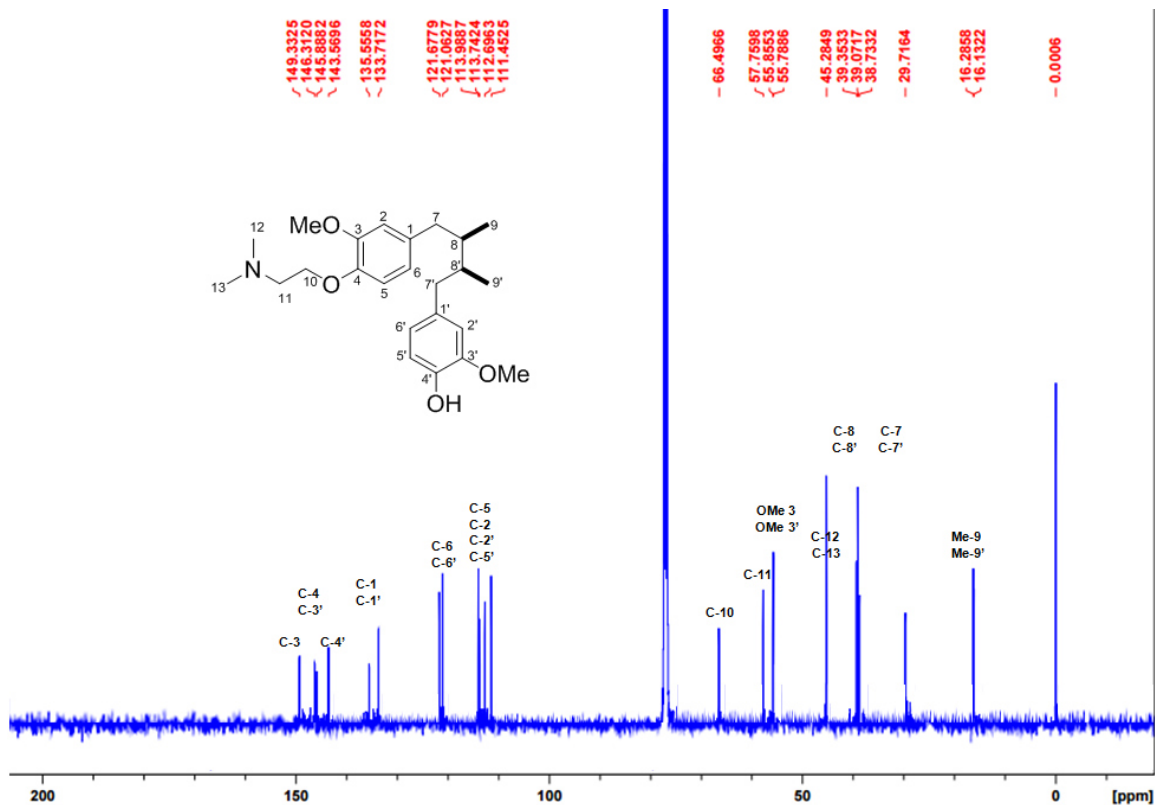


Figura 50. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-12m

5.2.2.4. KRM-12d.

En la Figura 51 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observan 3 señales que confirman la unión del grupo *N,N*-dimetiletilamina a los dos hidroxilos del producto natural, primeramente a 4.08 ppm un triplete (t, $J = 6.2$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{O}$) que corresponde a los protones H-10 y H-10' de los carbonos unidos a los oxígenos de los éteres, posteriormente vemos a 2.77 ppm otro triplete (t, $J = 6$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{N}$) que corresponde a los protones H-11 y H-11' de los metilenos unidos al nitrógeno. También a 2.48 ppm se encuentra un singulete que integra para los 12 protones correspondientes a los dos metilos unidos al nitrógeno.

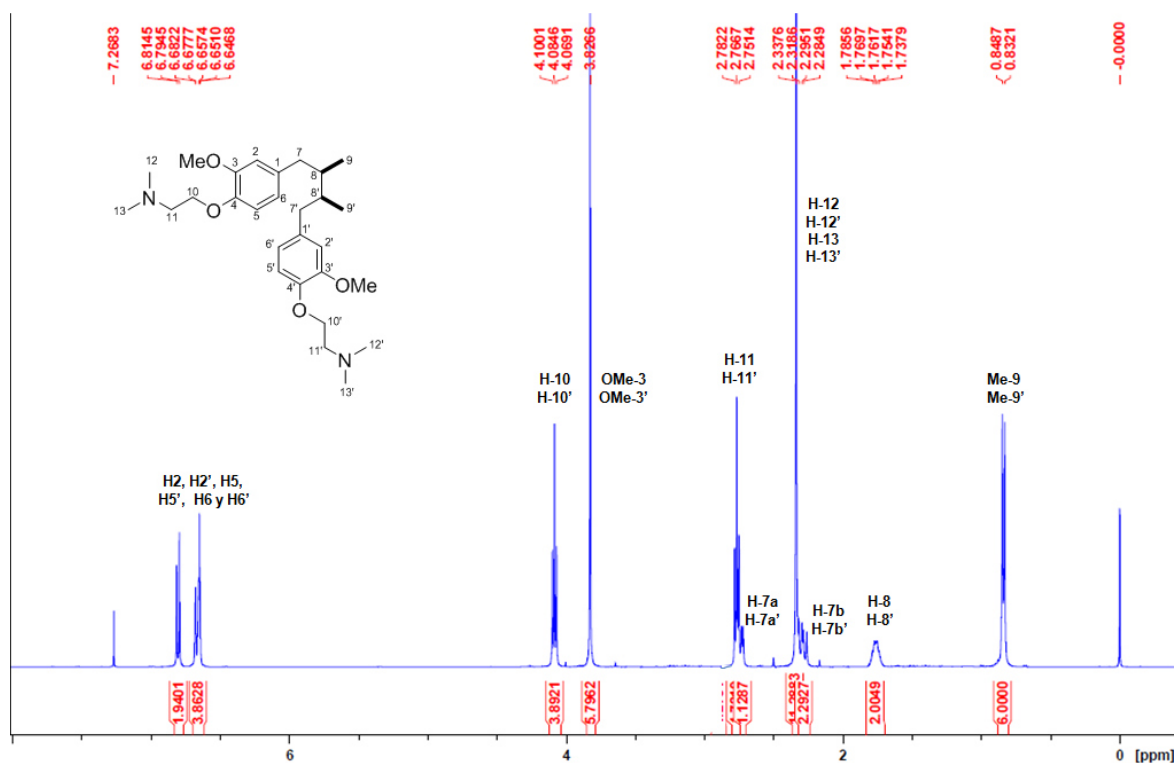


Figura 51. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-12d

En la Figura 52 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 13 señales correspondientes a los 28 carbonos de la molécula, de las cuales, las señales a 67.17 (C-10, C-10'), 58.22 (C-11, C-11') y 45.90 (C-12, C-12', C-13, C-13') ppm corresponden a los 8 carbonos de los grupos *N,N*-dimetiletilamina.

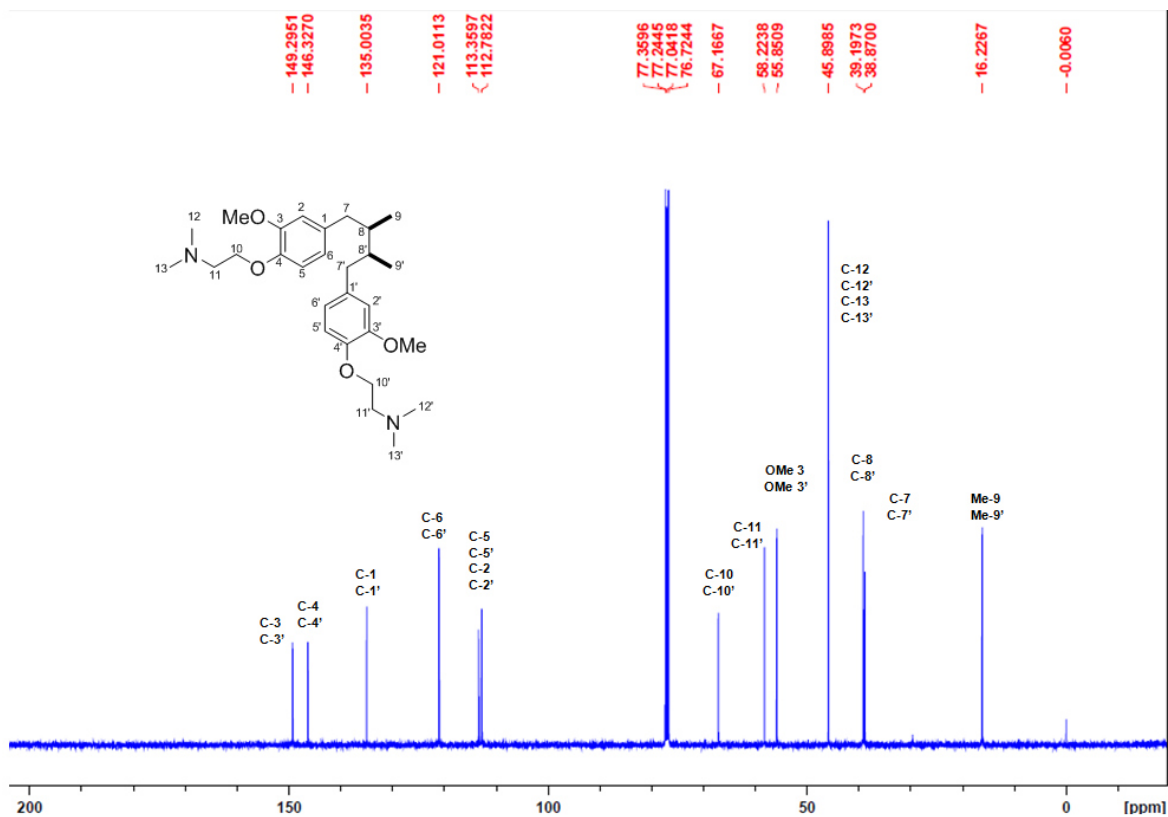


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-12d

5.2.2.5. KRM-13m.

En la Figura 53 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observan 4 señales que confirman la unión del grupo 4-etilmorfolina, primeramente a 4.13 ppm un triplete (t, $J = 6$ Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-O}$) que corresponde a los protones H-10 del carbono unido al oxígeno del éter, posteriormente a 3.74 otro triplete (t, $J = 4.6$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2\text{-O}$) que integra para 4 H que corresponden a protones H-13 y H-14 de los carbonos del anillo de morfolina y que están unidos al oxígeno, a 2.84 ppm hay un triplete (t, $J = 6$ Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-N}$) que corresponde a los protones H-11 del carbono unido al nitrógeno y finalmente a 2.60 ppm un triplete (t, $J = 4.3$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2\text{-N}$) que integra para 4 H que corresponden a protones H-12 y H-15 de los carbonos del anillo de morfolina y que están unidos al nitrógeno.

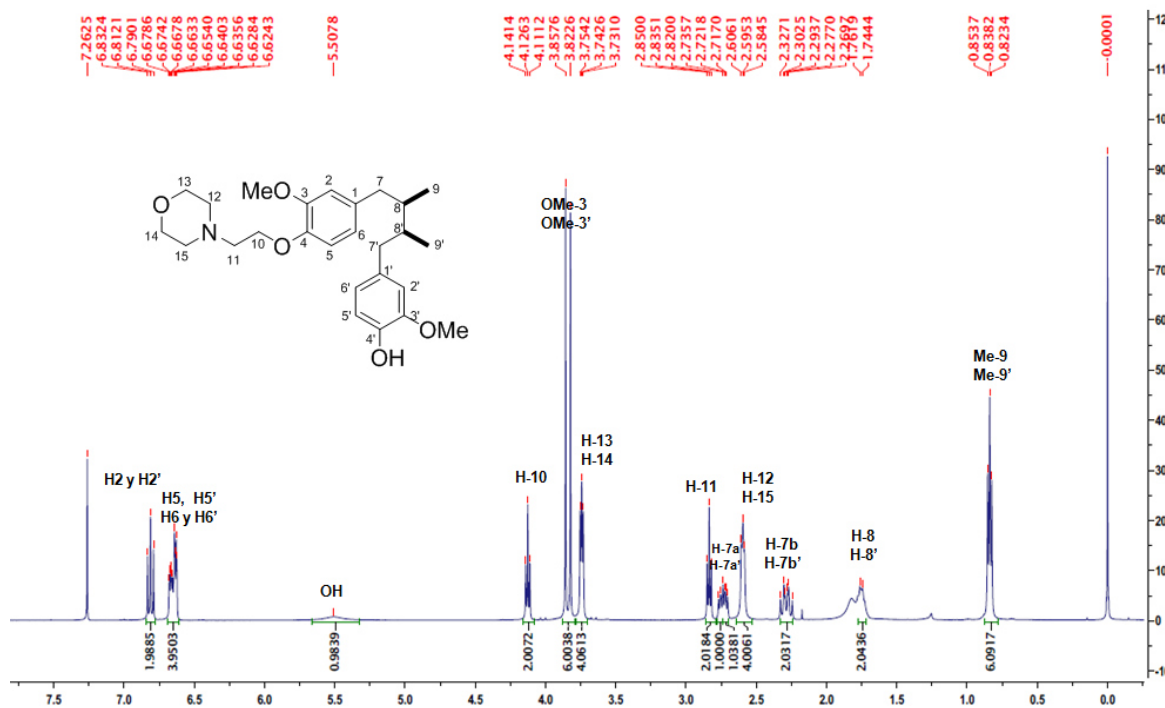


Figura 53. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-13m

En la Figura 54 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 24 señales correspondientes a los 26 carbonos de la molécula, de las cuales, las señales a 66.93 (C-10), 66.88 (C-13 y C-14), 57.65 (C-11) y 54.070 (C-12, C-15) ppm corresponden a los 6 carbonos del grupo 4-etilmorfolina.

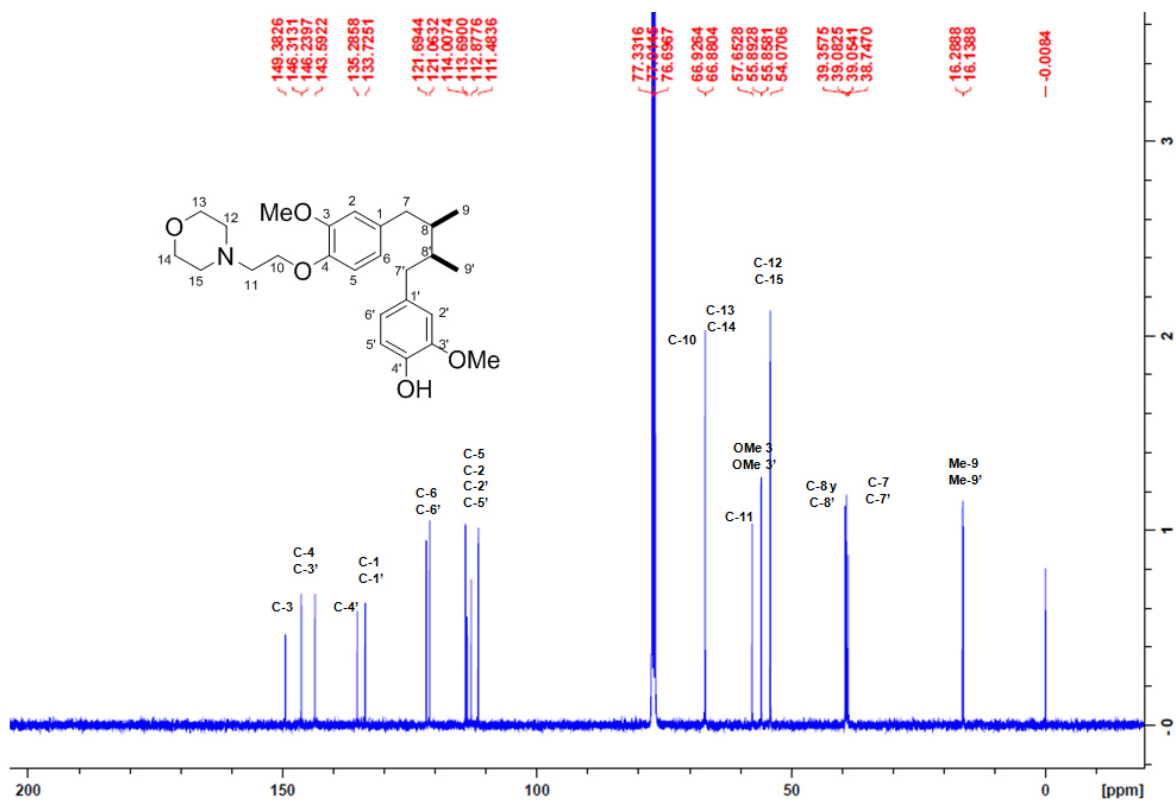


Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-13m

5.2.2.6. KRM-13d.

En la Figura 55 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observan 4 señales que confirman la unión de los dos grupos 4-etilmorfolina a los dos oxígenos del producto natural, primeramente a 4.13 ppm un triplete (t, $J = 6$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{O}$) que corresponde a los protones H-10 y H-10' de los carbonos unidos a los oxígenos de los éteres, posteriormente vemos a 3.73 otro triplete (t, $J = 4.6$ Hz, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{O}$) que integra para 8 H que corresponden a protones H-13, H-13', H-14 y H-14' de los carbonos de los anillos de morfolina y que están unidos al oxígeno. Posteriormente tenemos a 2.83 ppm un triplete (t, $J = 6$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{N}$) que corresponde a los protones H-11 y H-11' de los carbonos unidos al nitrógeno y finalmente tenemos a 2.59 ppm un triplete (t, $J = 4.5$ Hz, 8 H, $-\text{CH}_2-\text{N}$) que integra para 8 H que corresponden a protones H-12, H-12', H-15 y H-15' de los carbonos de los anillos de morfolina y que están unidos al nitrógeno.

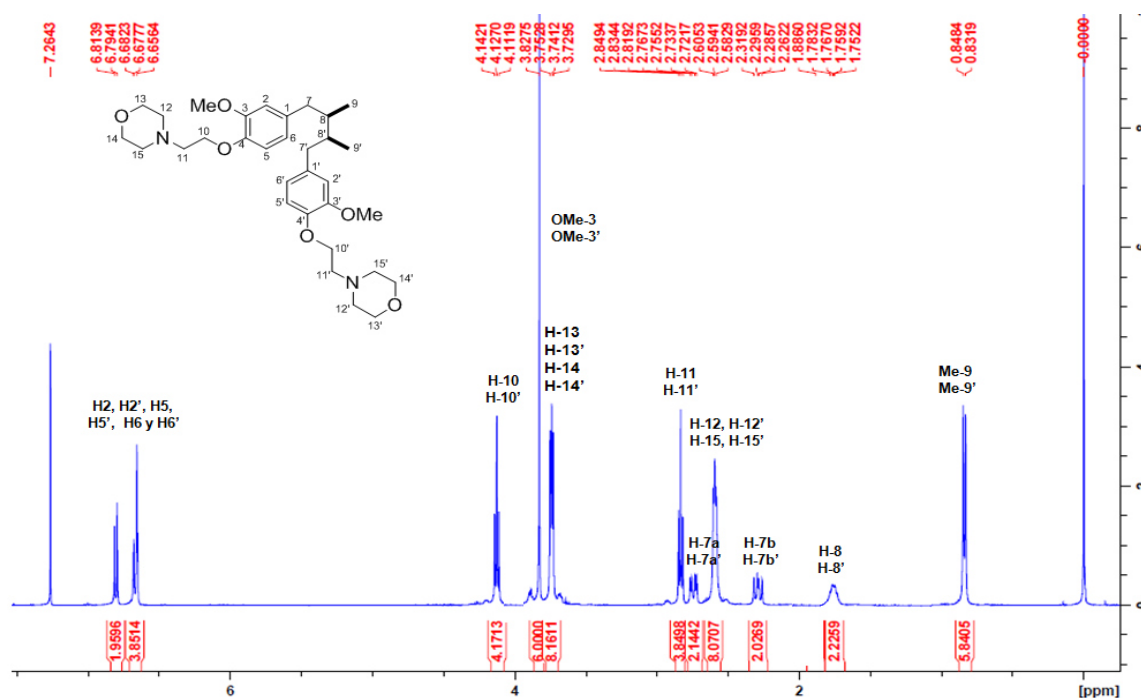


Figura 55. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-13d

En la Figura 56 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 13 señales correspondientes a los 32 carbonos de la molécula, de las cuales, las señales a 66.94 (C-13, C-13', C-14, C-14', C-10 y C-10'), 57.66 (C-11, C-11') y 54.05 (C-12, C-12', C-15, C-15') ppm corresponden a los 12 carbonos de los dos grupos 4-etilmorfolina.

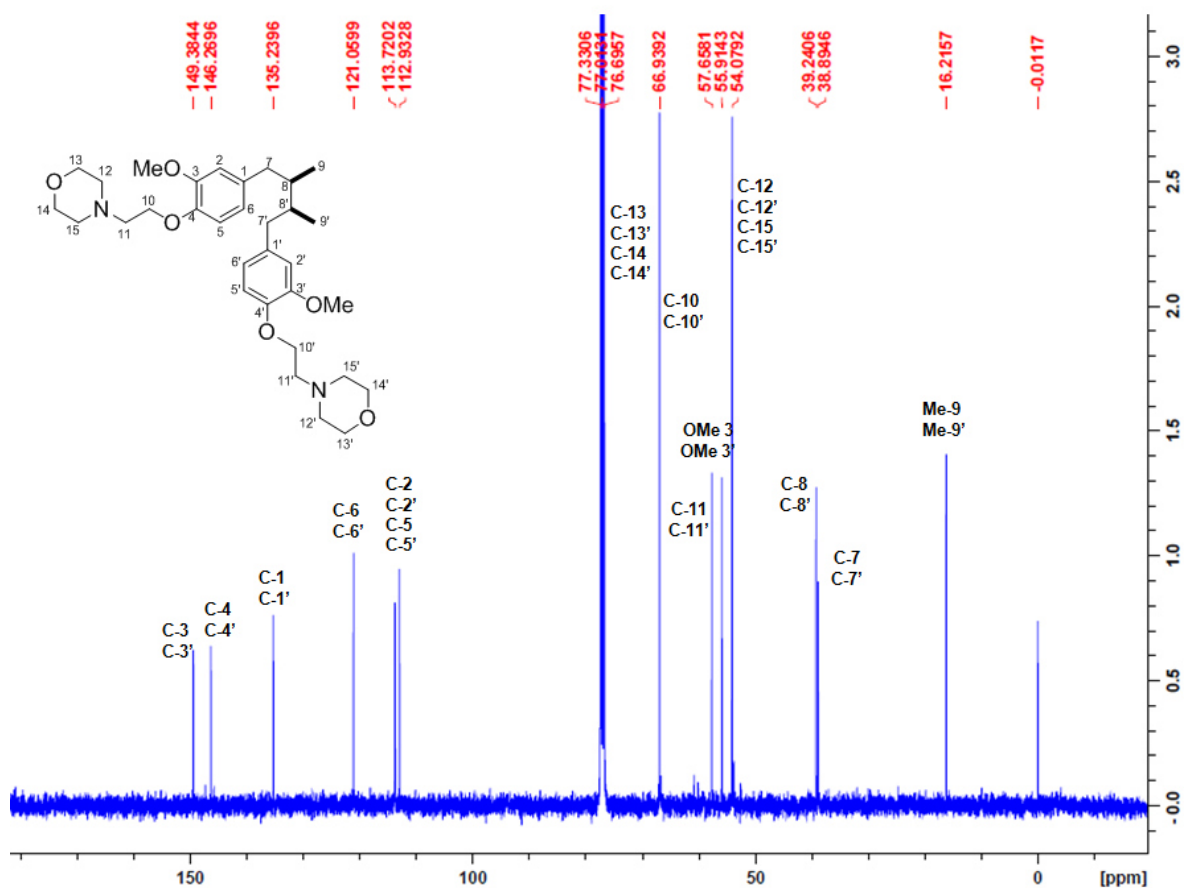


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-13d

5.2.2.7. KRM-14m.

En la Figura 57 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observan 4 señales que confirman la unión del grupo 1-etilpirrolidina, primeramente a 4.15 ppm un triplete (t, $J= 6.3$ Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-O}$) que corresponde a los protones H-10 del carbono unido al oxígeno del éter. Posteriormente a 3.0 ppm hay un triplete (t, $J= 6$ Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-N}$) que corresponde a los protones H-11 del carbono unido al nitrógeno. Luego en 2.73 ppm un multiplete que integra para 6 protones, de los cuales 4 corresponden a los protones H-12 y H-15 de los carbonos del anillo de pirrolidina y que están unidos al nitrógeno, está señal se empalma con la señal que integra para los dos protones H-7a y H-7a'. Finalmente a 1.84 ppm un multiplete (m, 4 H) que integra para 4 H que corresponden a protones H-13 y H-14 de los carbonos del anillo de pirrolidina.

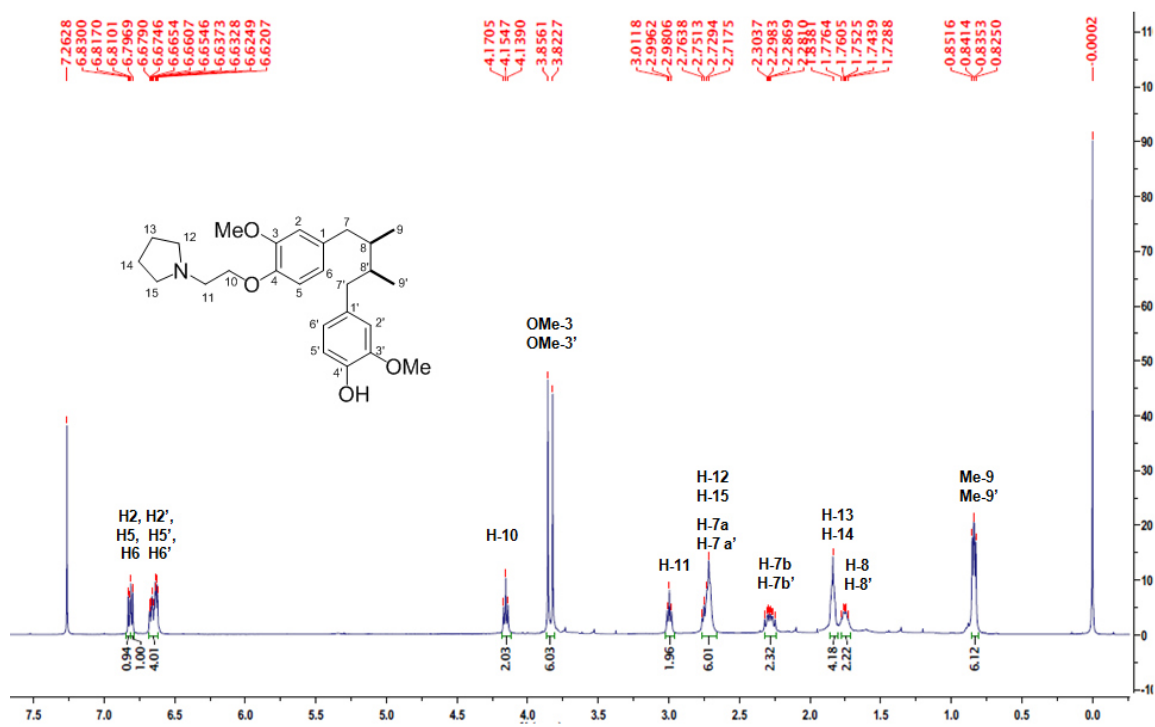


Figura 57. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-14m

En la Figura 58 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 26 señales correspondientes a los 26 carbonos de la molécula, de las cuales, las señales a 67.72 (C10), 54.54 (C-12, C-15), 50.86 (C-11) y 23.46 ppm (C-13, C-14) corresponden a los 6 carbonos del grupo 1-etilpirrolidina.

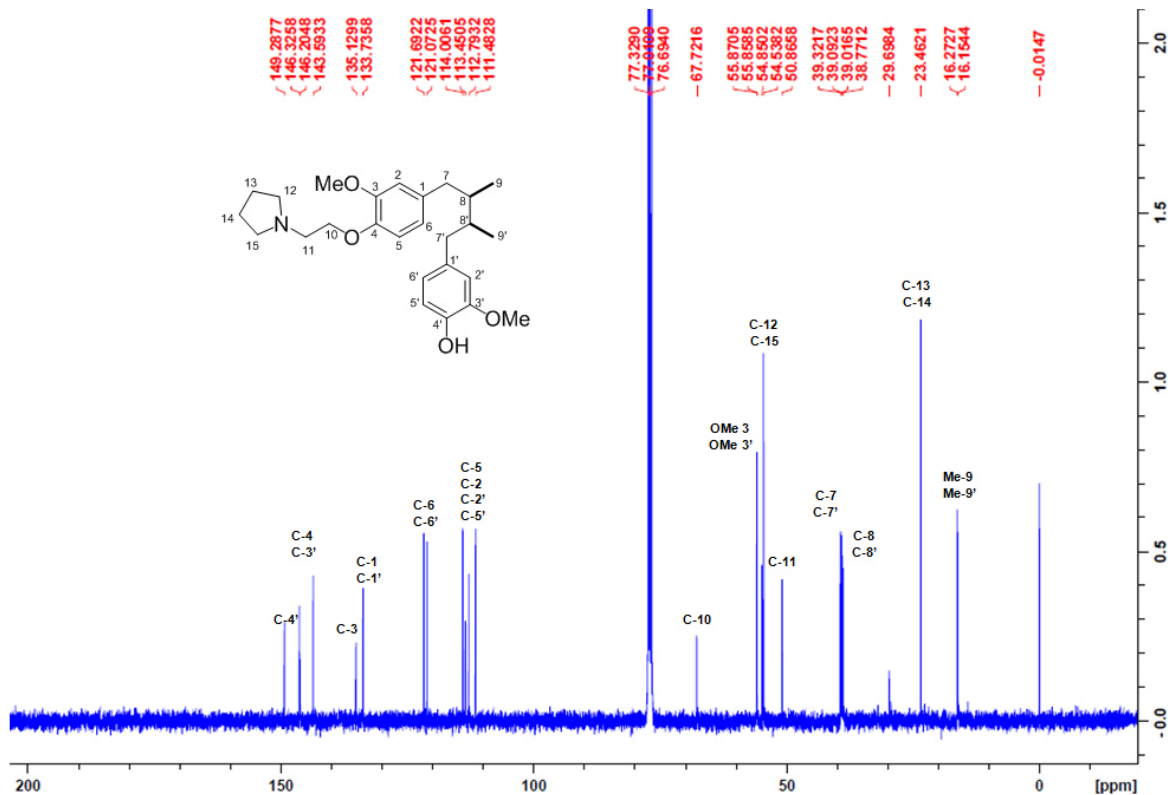


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) de KRM-14m

5.2.2.8. KRM-14d.

En la Figura 59 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observan 4 señales que confirman la unión del grupo 1-etilpirrolidina, primeramente a 4.14 ppm un triplete (t, $J = 6.4$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{-O}$) que corresponde a los protones H-10 y H-10' del carbono unido al oxígeno del éter. Posteriormente tenemos a 3.0 ppm un triplete (t, $J = 6$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-N}$) que corresponde a los protones H-11 del carbono unido al nitrógeno, luego tenemos un multiplete a 2.66 ppm que integra para 8 protones que corresponden a los protones H-12, H-12', H-15 y H-15' de los carbonos del anillo que están unidos al nitrógeno, y finalmente tenemos a 1.84 ppm un multiplete (m, 4 H) que integra para 4 H que corresponden a protones H-13 y H-14 de los carbonos del anillo.

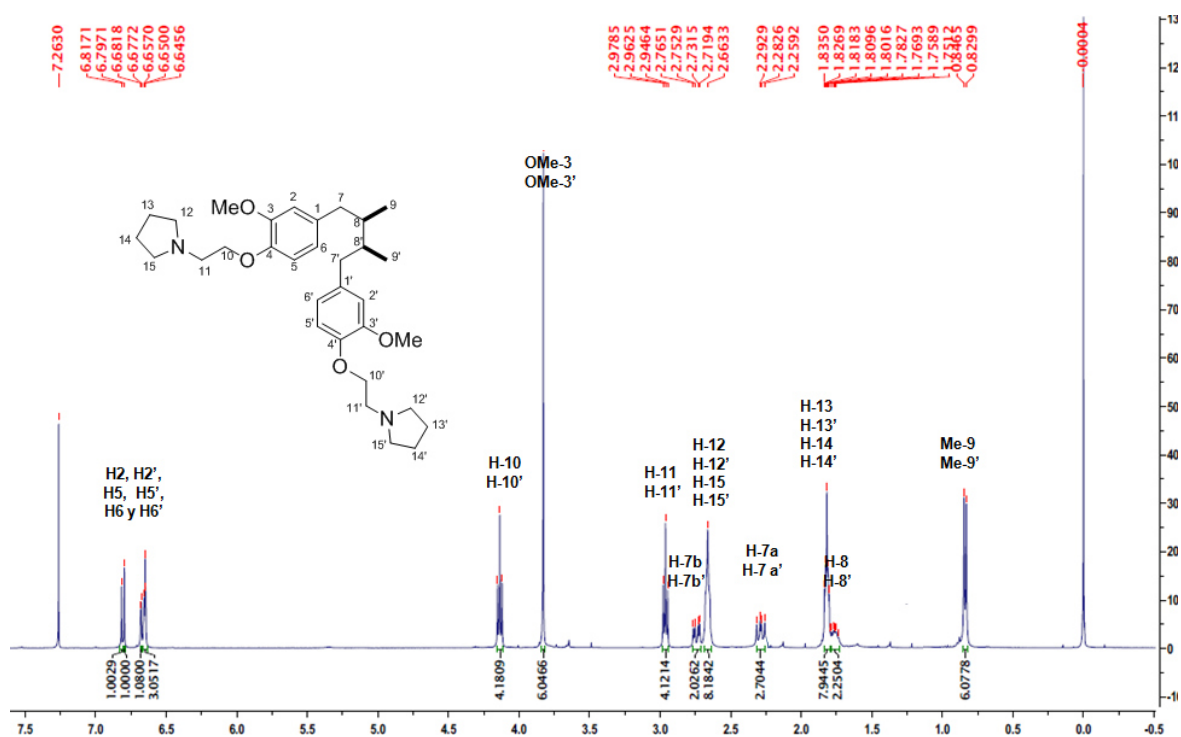


Figura 59. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-14d

En la Figura 60 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 14 señales correspondientes a los 26 carbonos de la molécula, de las cuales, las señales a 67.92 (C-10, C-10'), 54.94 (C-11, C-11'), 54.58 (C-12, C-12', C-15, C-15') y 23.50 ppm (C-13, C-13', C-14 y C-14') corresponden a los 12 carbonos de los dos grupos 1-etilpirrolidina.

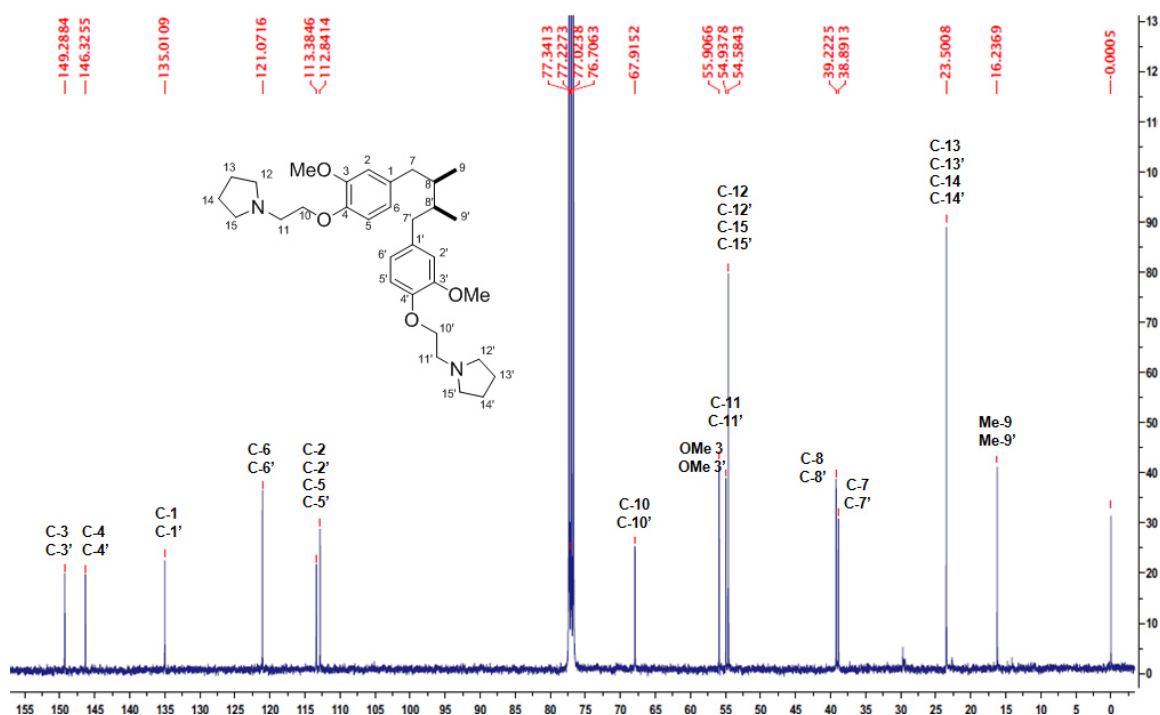


Figura 60. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-14d

5.2.2.9. KRM-15m.

En la Figura 61 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observan 5 señales que confirman la unión del grupo 1-etilpiperidina, primeramente a 4.16 ppm un triplete (t, $J = 6.18$ Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-O}$) que corresponde a los protones H-10 del carbono unido al oxígeno del éter. Posteriormente a 2.84 ppm hay un triplete (t, $J = 6.28$ Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-N}$) que corresponde a los protones H-11 del carbono unido al nitrógeno. Luego en 2.55 ppm un singulete que integra para 4 protones, los cuales corresponden a los protones H-12 y H-16 de los carbonos del anillo de piperidina y que están unidos al nitrógeno. A 1.63 ppm hay un multiplete que integra para 4 protones y que corresponde a los protones H-13 y H-15 del anillo. Finalmente a 1.46 ppm un multiplete (m, 2 H) que integra para 2 H que corresponden a protones H-14 del anillo de piperidina.

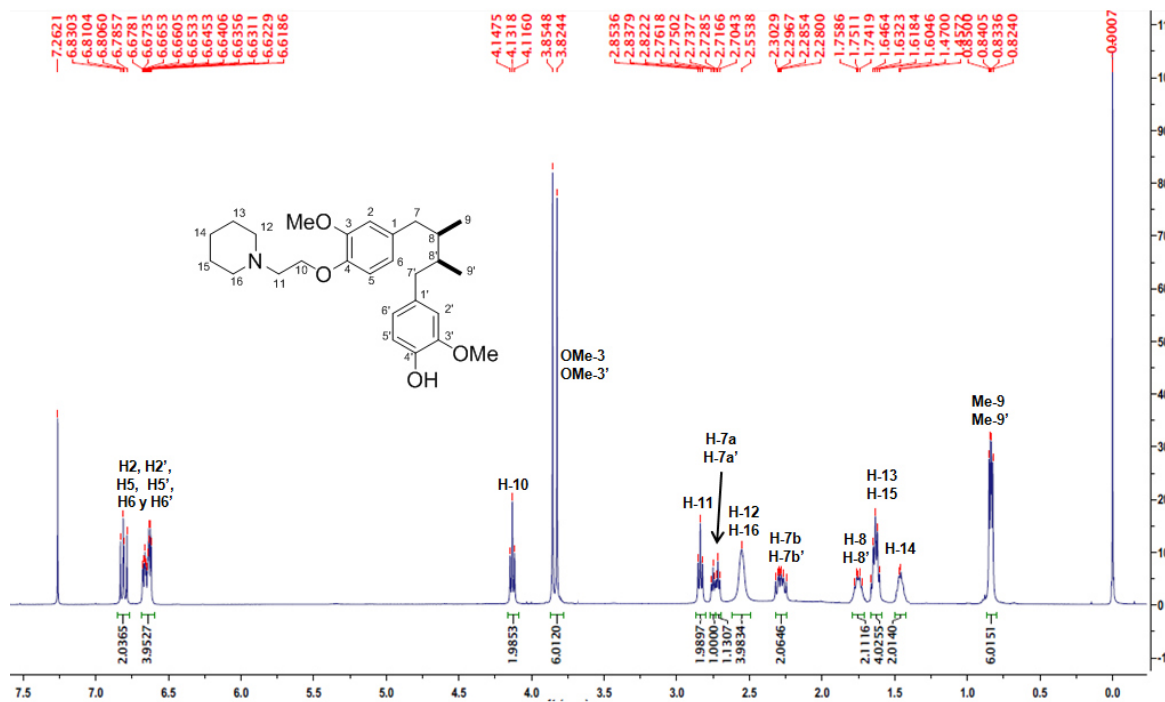


Figura 61. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-15m

En la Figura 62 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 26 señales correspondientes a los 27 carbonos de la molécula, de las cuales, las señales a 66.38 (C-10), 57.75 (C-11), 54.90 (C-12y C-16) 25.67 (C-13 y C-15) y 24.09 ppm (C-14) corresponden a los 7 carbonos del grupo 1-etilpiperidina.

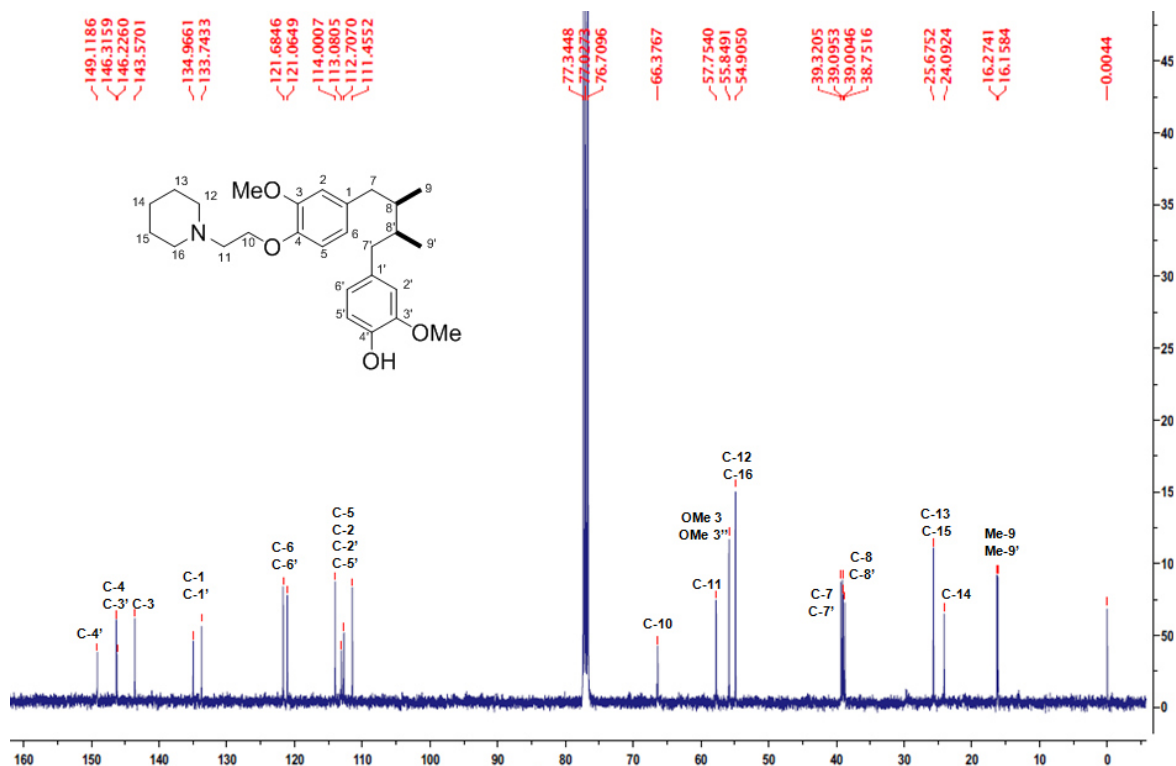


Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-15m

5.2.2.10. KRM-15d.

En la Figura 63 correspondiente al espectro de RMN ^1H , se observan 5 señales que confirman la unión del grupo 1-etilpiperidina, primeramente a 4.12 ppm un triplete (t, $J = 6.5$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2\text{-O}$) que corresponde a los protones H-10 y H-10' de los carbonos unidos al oxígeno del éter. Posteriormente a 2.80 ppm hay un triplete (t, $J = 6.5$ Hz, 4 H, $-\text{CH}_2\text{-N}$) que corresponde a los protones H-11 del carbono unido al nitrógeno. Luego en 2.51 ppm un singulete ancho que integra para 8 protones, los cuales corresponden a los protones H-12, H-12' y H-16, H-16' de los carbonos del anillo de piperidina y que están unidos al nitrógeno. A 1.61 ppm hay un multiplete que integra para 8 protones y que corresponde a los protones H-13, H-13' y H-15, H-15' del anillo. Finalmente a 1.46 ppm un multiplete (m, 4 H) que integra para 4 H que corresponden a protones H-14 y H-14' del anillo de piperidina.

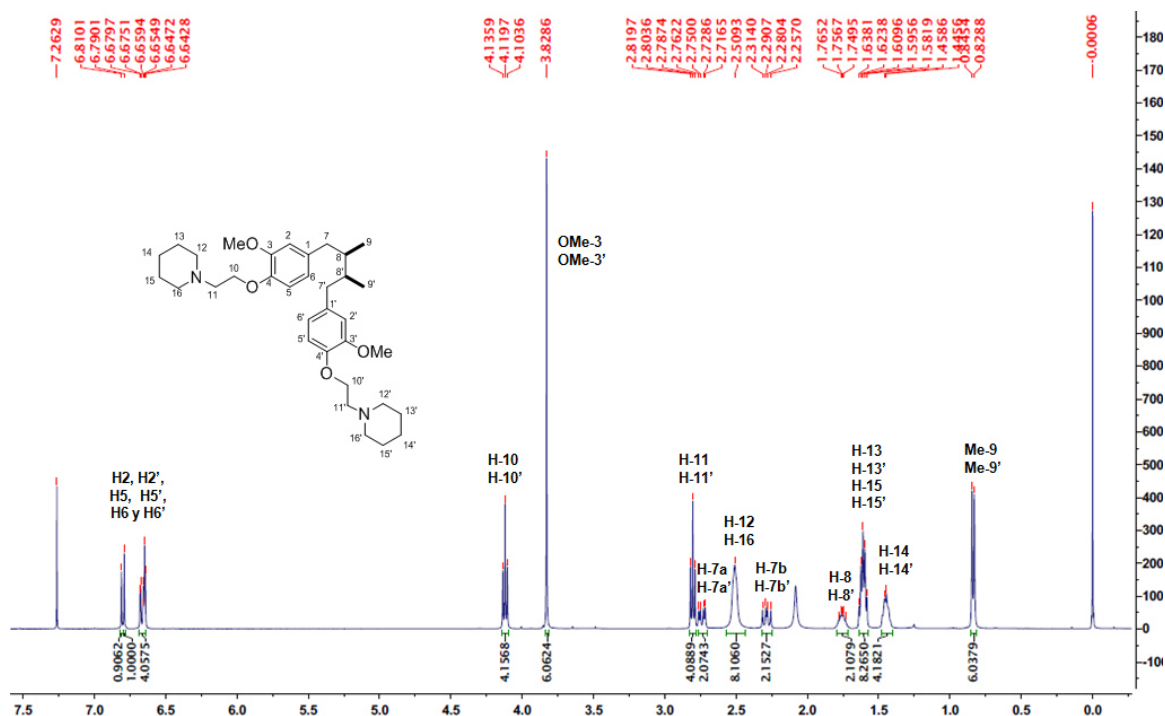


Figura 63. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de KRM-15d

En la Figura 64 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C se observan 15 señales correspondientes a los 34 carbonos de la molécula, de las cuales, las señales a 66.61 (C-10, C-10'), 57.87 (C-11, C-11'), 55.00 (C-12, C-12', C-16 y C-16') 25.89 (C-13, C-13', C-15 y C-15') y 24.22 ppm (C-14 y C-14') corresponden a los 14 carbonos del grupo 1-etilpiperidina.

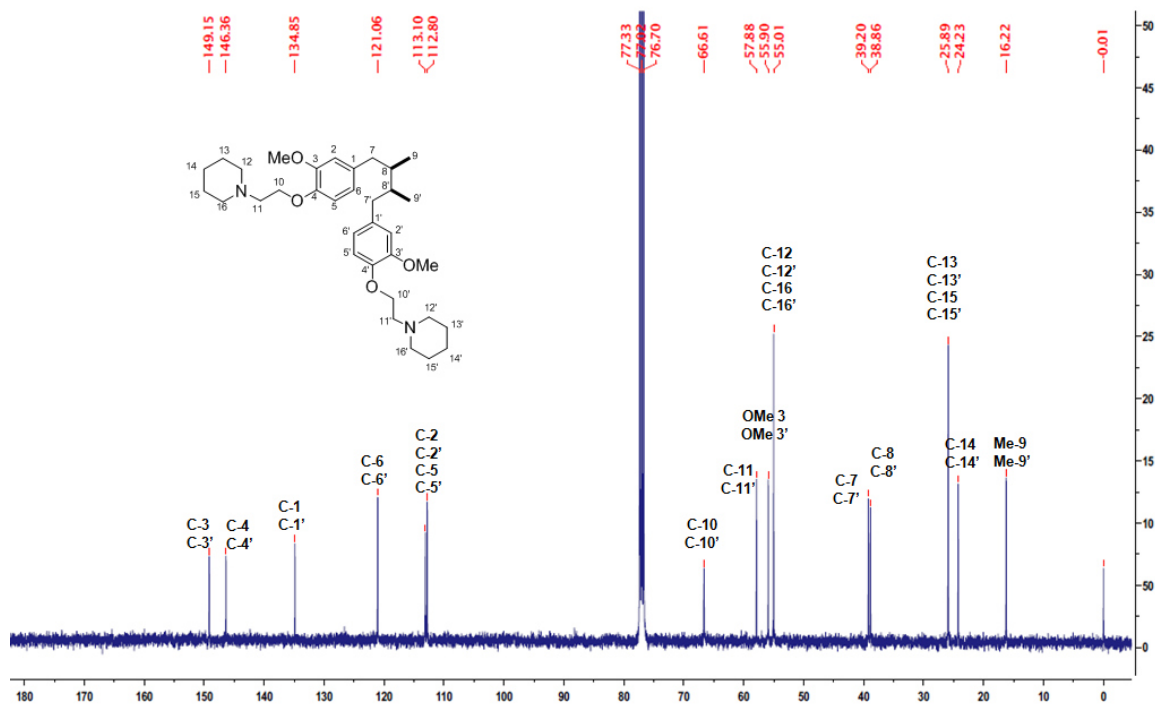


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de KRM-15d

5.3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Se evaluaron 28 derivados del AmDG contra 12 bacterias resistentes a antibióticos las cuales se mencionaron previamente en la sección de materiales y métodos (sección 4.1). Los resultados de la Tabla 10 indican que de los 28 derivados ensayados solo ocho derivados: KRM-3m, KRM-4m, KRM-5m, KRM-8m, KRM-10m, KRM-13d, KRM-15m y KRM-15d (Figura 65) presentaron una CMI en el rango de 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ contra cuatro bacterias resistentes (*E. faecium* RV, *S. aureus* RM, *S. epidermis* RL y *S. haemolyticus* RL), mientras que los otros derivados fueron inactivos a las concentraciones ensayadas (MIC > 50 $\mu\text{g/ml}$). Cabe resaltar que únicamente las bacterias Gram positivas se vieron afectadas por los análogos del AmDG.

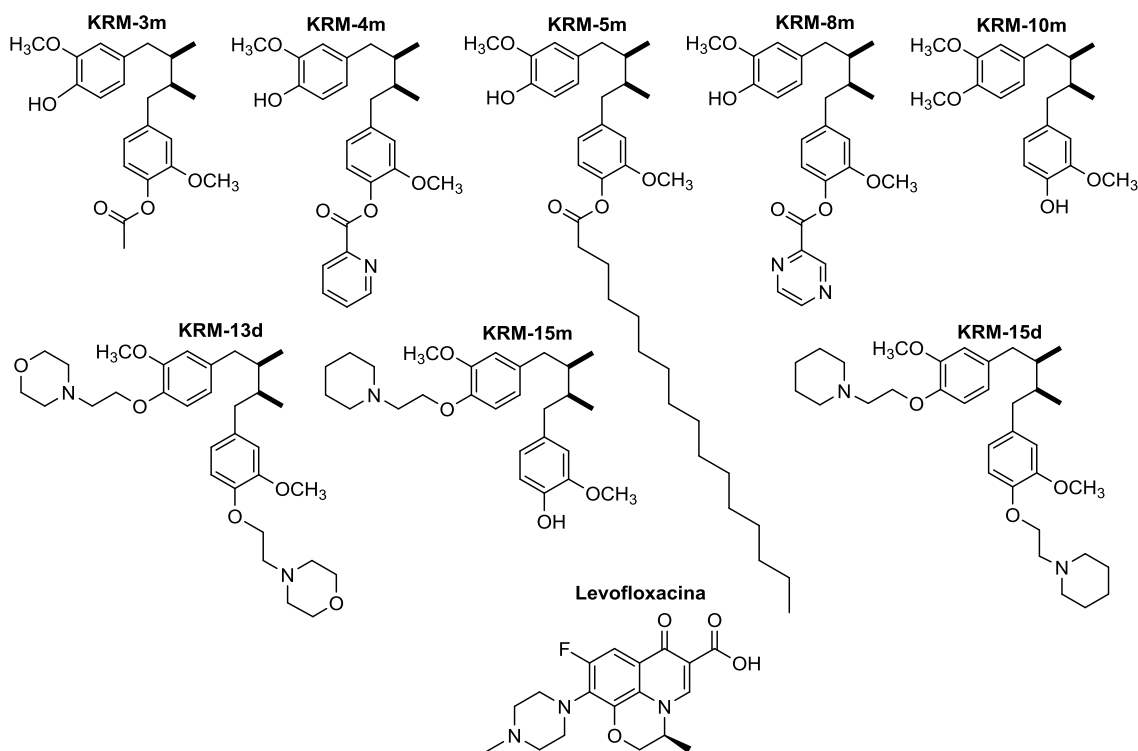


Figura 65. Estructura química de derivados del AmDG que presentaron actividad antibacteriana y del control positivo.

Tabla 10. Actividad antibacteriana y LogP de análogos del AmDG.

Derivado	<i>E. faecium</i> RV CMI µg/ml	<i>S. aureus</i> RM CMI µg/ml	<i>S. epidermis</i> RL CMI µg/ml	<i>S. haemolyticus</i> RL CMI µg/ml	LogP
KRM-1m	> 50	> 50	> 50	> 50	7.71
KRM-1d	> 50	> 50	> 50	> 50	10.41
KRM-2m	> 50	> 50	> 50	> 50	6.39
KRM-2d	> 50	> 50	> 50	> 50	7.76
KRM-3m	> 50	25	> 50	> 50	4.98
KRM-3d	> 50	> 50	> 50	> 50	4.96
KRM-4m	> 50	25	> 50	> 50	5.54
KRM-4d	> 50	> 50	> 50	> 50	6.08
KRM-5m	> 50	50	> 50	> 50	11.06
KRM-5d	> 50	> 50	> 50	> 50	>11.06
KRM-6m	> 50	> 50	> 50	> 50	>11.06
KRM-6d	> 50	> 50	> 50	> 50	>11.06
KRM-7m	> 50	> 50	> 50	> 50	6.88
KRM-7d	> 50	> 50	> 50	> 50	8.75
KRM-8m	> 50	50	> 50	> 50	4.63
KRM-8d	> 50	> 50	> 50	> 50	4.25
KRM-9m	> 50	> 50	> 50	> 50	>11.16
KRM-9d	> 50	> 50	> 50	> 50	>11.16
KRM-10m	> 50	25	> 50	> 50	5.27
KRM-10d	> 50	> 50	> 50	> 50	5.53
KRM-12m	> 50	> 50	> 50	> 50	5.27
KRM-12d	> 50	> 50	> 50	> 50	5.53
KRM-13m	> 50	> 50	> 50	> 50	4.87
KRM-13d	> 50	50	> 50	> 50	4.73
KRM-14m	> 50	> 50	> 50	> 50	5.58
KRM-14d	> 50	> 50	> 50	> 50	6.16
KRM-15m	50	50	50	50	6
KRM-15d	50	50	> 50	50	7
Levofloxacin	>50	3.125	12.5	12.5	1.35

De los resultados más relevantes podemos destacar la actividad antibacteriana de los derivados KRM-3m, KRM-4m y KRM-10m, los cuales incorporan un grupo éster (acetilo para el caso de KRM-3m y 2-piridincarbonilo para KRM-4m) o éter (metilo para KRM-10m) en su estructura. Cabe señalar que sólo los derivados mono-sustituídos presentaron actividad, mientras que sus análogos di-sustituídos resultaron inactivos. Es muy probable que la presencia del grupo hidroxilo, un grupo donador de puentes de hidrógeno, sea necesario para mantener interacciones con su diana molecular, tal como fue observado en la posible interacción del ácido *meso*-dihidroguaiarético con la Coenzima A transferasa para *M. tuberculosis*.²⁸

Comparando la actividad antibacteriana entre los ésteres que incorporan heterociclos aromáticos (Figura 66), como KRM-4m (heterociclo de piridina) y KRM-8m (heterociclo de pirazina), podemos deducir que la incorporación de dos heteroátomos en el anillo pirazínico conlleva a una disminución en sus propiedades lipofílicas y por ende a la pérdida de la actividad antibacteriana.

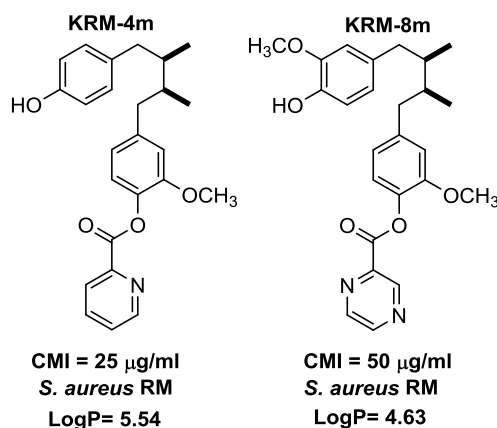


Figura 66. Ésteres de heterociclos aromáticos con actividad antibacteriana.

De entre la serie de ésteres, también se observa que la incorporación de largas cadenas hidrocarbonadas, como en el derivado KRM-5m que posee una cadena de 16 carbonos que además de aumentar drásticamente la lipofilidad, también propicia que la molécula pierda el doble de la actividad antibacteriana en comparación con su análogo KRM-3m que contiene un grupo acetilo y menos carácter lipofílico, y el éter KRM-10m que solamente incorporó un metilo lo que no aumentó mucho su Log P (Figura 67).

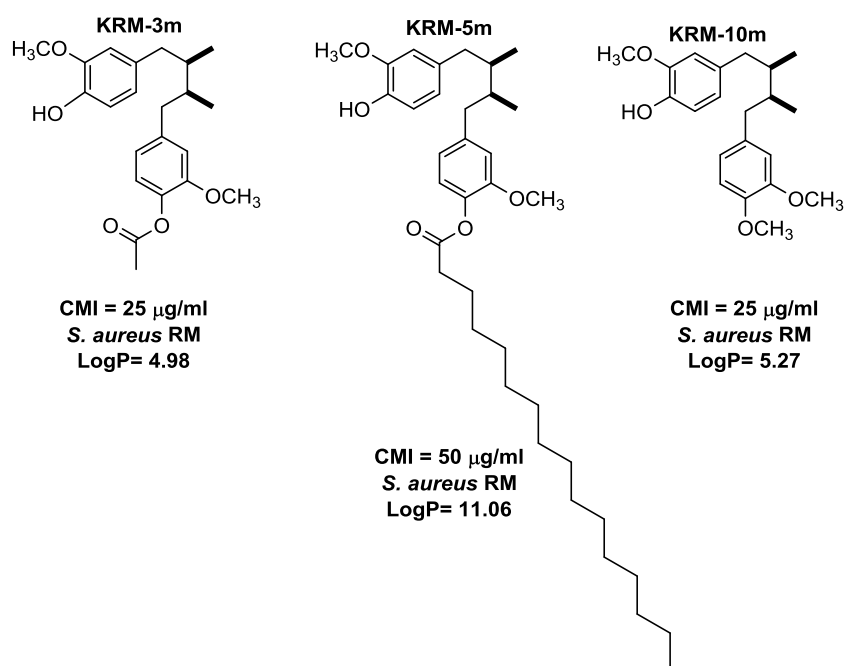


Figura 67. Ésteres y éter con diferente longitud de cadena y que poseen actividad antibacteriana.

En cuanto a la serie de aminoéteres, se puede apreciar que el derivado KRM-15d presentó actividad contra *S. aureus* RM, *S. haemolyticus* RL y *E. faecium* RV mientras que el análogo KRM-15m presentó igual actividad contra estas tres bacterias, pero además mostró actividad contra *S. epidermis* RL (Figura 68).

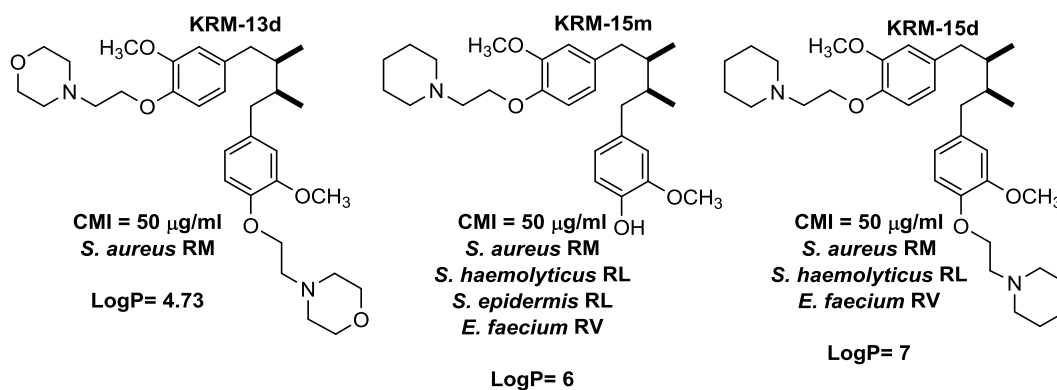


Figura 68. Aminoéteres con actividad antibacteriana.

Como se puede apreciar en la Figura 68, la incorporación de un grupo piperidinilo en el derivado KRM-15m le confirió modesta actividad antibacteriana la cual no fue alterada a pesar de la incorporación de un segundo grupo piperidinilo como en el derivado KRM-15d. Asimismo, se puede apreciar que la actividad antibacteriana se mantiene a pesar de la incorporación de un segundo heteroátomo en el anillo de piperidina tal como se observa para el derivado morfolínico KRM-13d.

5.4. ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA *in vitro* DE LOS ANÁLOGOS DEL *AmdG*.

En lo que respecta a los resultados de la actividad antituberculosa *in vitro*, 16 derivados del *AmdG* (Figura 69) presentaron actividad antituberculosa como se puede apreciar en la Tabla 11.

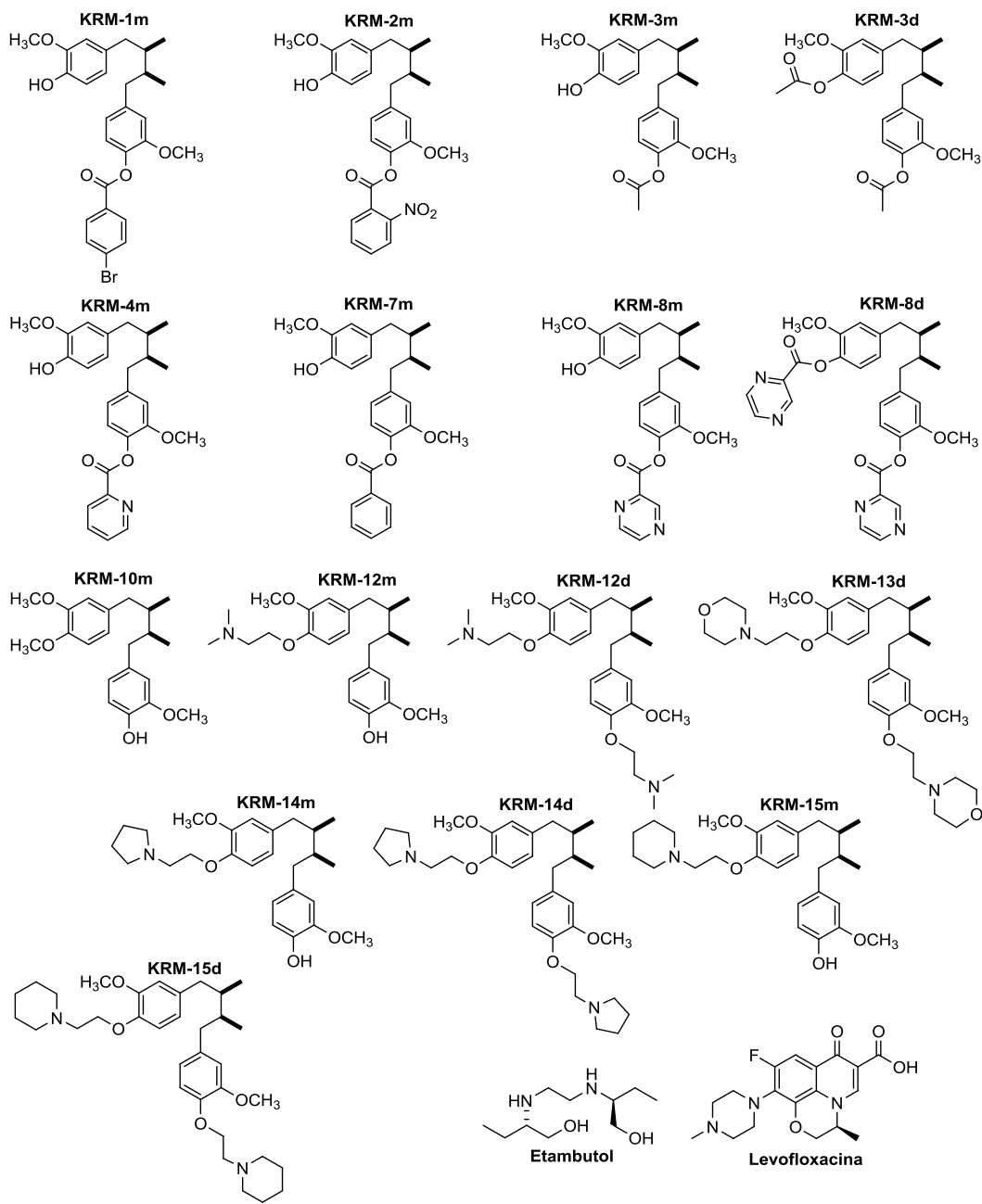


Figura 69. Estructura química de análogos del *AmdG* que presentaron actividad antituberculosa *in vitro* y de los controles positivos.

Tabla 11. Actividad antituberculosa y LogP de derivados del AmDG.

Derivado	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	LogP
	H37Rv	G122	G133	
	CMI µg/ml	CMI µg/ml	CMI µg/ml	
KRM-1m	12.5	50	> 50	7.71
KRM-1d	> 50	>50	> 50	10.41
KRM-2m	12.5	50	50	6.39
KRM-2d	>50	>50	> 50	7.76
KRM-3m	50	50	> 50	4.98
KRM-3d	50	>50	> 50	4.96
KRM-4m	50	25	50	5.54
KRM-4d	>50	>50	> 50	6.08
KRM-5m	> 50	> 50	> 50	11.06
KRM-5d	> 50	> 50	> 50	>11.06
KRM-6m	> 50	> 50	> 50	>11.06
KRM-6d	> 50	> 50	> 50	>11.06
KRM-7m	12.5	50	25	6.88
KRM-7d	> 50	> 50	> 50	8.75
KRM-8m	50	50	50	4.63
KRM-8d	50	> 50	50	4.25
KRM-9m	>50	> 50	> 50	>11.16
KRM-9d	> 50	> 50	> 50	>11.16
KRM-10m	50	50	50	5.27
KRM-10d	> 50	> 50	> 50	5.53
KRM-12m	12.5	50	50	5.27
KRM-12d	6.25	12.5	12.5	5.53
KRM-13m	> 50	> 50	> 50	4.87
KRM-13d	25	6.25	25	4.73
KRM-14m	12.5	25	50	5.58
KRM-14d	25	12.5	12.5	6.16
KRM-15m	12.5	25	25	6
KRM-15d	3.125	6.25	6.25	7
EMB	3.125	6.25	0.781	0.06
Lev.	---		0.3906	1.35
Iso.	0.3906	0.0976	0.0488	-0.64
Rif.	---	---	---	

H37Rv: Sensible a todos los fármacos de primera línea, **G122:** Resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol, **G133:** Resistente a isoniazida, rifampicina, estreptomicina.

EMB: etambutol, **Lev.:** levofloxacin, **Iso.:** isoniazida, **Rif.:** rifampicina.

La serie de ésteres (Figura 70) con actividad anti-TB (KRM-1m, KRM-2m, KRM-3m, KRM-3d, KRM-4m, KRM-7m, KRM-8m, KRM-8d) tuvieron valores de CMI's en el rango de 12.5 a 50 $\mu\text{g}/\text{m}$ sobre la cepa H37Rv, sin diferencias destacables de actividad entre los derivados mono-sustituídos y di-sustituídos, mientras que la actividad de estos ésteres sobre las cepas de TB-MFR decayó en la mayoría de los análogos o en algunos casos se perdió, a excepción del derivado KRM-4m el cual presentó una CMI de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la cepa G122, que fue mejor que la observada para la cepa H37Rv.

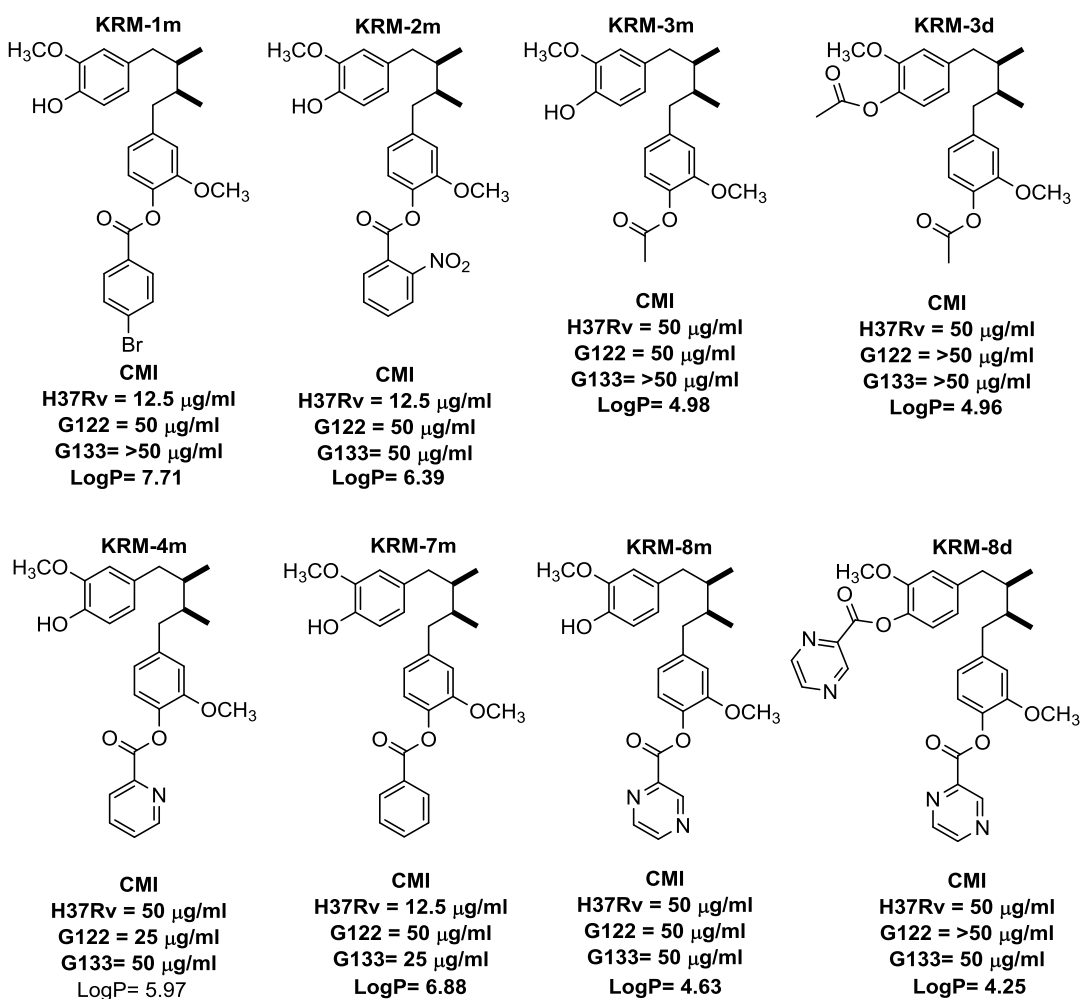


Figura 70. Ésteres activos sobre cepas de *M. tuberculosis*.

Hablando de este grupo de análogos se puede observar que la presencia de heteroátomos en anillos aromáticos confiere modesta actividad antituberculosa como es el caso de KRM-4m, KRM-8m y KRM-8d. Por el contrario, la incorporación de un anillo de benceno (sin heteroátomos presentes), como en los derivados KRM-1m, KRM-2m y KRM-7m, incrementa 4 veces la potencia con respecto a los análogos con heteroátomos en sus anillos aromáticos. Aparentemente, la presencia de un grupo electrodonador como el bromo o un grupo electroattractor como el nitro en el benceno, no es un factor determinante de la actividad antituberculosa ya que los análogos que presentaron estos sustituyentes en el anillo presentaron la misma CMI que el análogo con un anillo de benceno. La presencia del grupo benzoilo parece ser un factor determinante en la actividad, ya que estos mostraron una actividad 4 veces mayor que los análogos KRM-3m y KRM-3d que poseen grupos acetilo y KRM-5m, KRM-5d, KRM-6m y KRM-6d que incorporaron cadenas hidrocarbonadas de 16 (palmitoíl) y 18 (estearoil) carbonos, respectivamente. Es muy probable que este incremento en la actividad se deba a que el grupo benzoilo confiere mayor lipofilicidad⁴⁵ a la molécula que el grupo acetilo pero menor que las cadenas de ácidos grasos permitiendo que difundan de manera más fácil a través de la compleja pared celular de la micobacteria.

En lo que respecta a la serie de los aminoéteres, se puede apreciar que siete análogos (Figura 71) resultaron muy activos (KRM-12m, KRM-12d, KRM-13d, KRM-14m, KRM-14d, KRM-15m y KRM-15d) frente a *M. tuberculosis*.

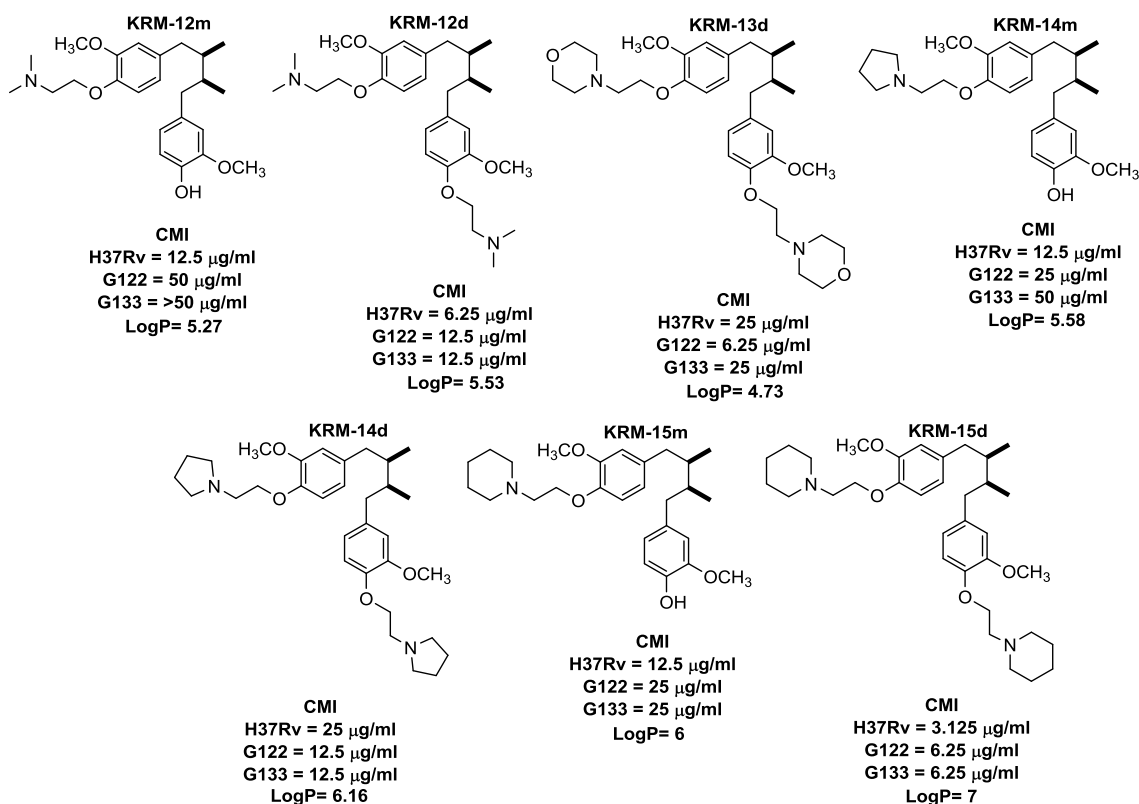


Figura 71. Aminoéteres con actividad antituberculosa

La incorporación de un grupo etildimetilamino como en KRM-12m confirió buena actividad anti-TB para la cepa H37Rv, pero la incorporación de dos grupos etildimetilamino como en su análogo KRM-12d incrementó 2 veces la potencia de la molécula. El mismo comportamiento se observa sobre las cepas multifármaco resistentes pero con una CMI mayor.

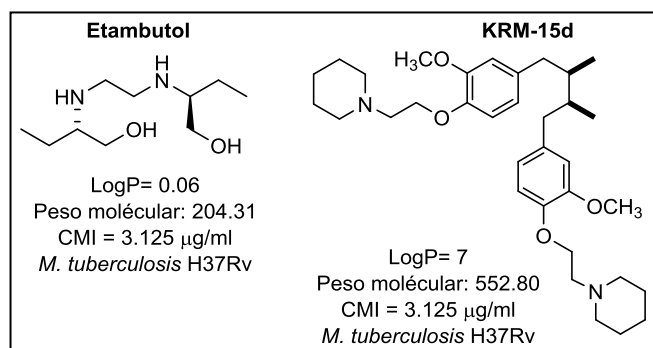
Una tendencia similar en la actividad anti-TB se puede observar para el caso de los aminoéteres KRM-15m y KRM-15d, donde el derivado disustituido mostró mayor potencia que el monosustituido. Con la incorporación de un grupo N-etilpiperidinilo se incrementó el LogP de los análogos KRM-15m y KRM-15d en aproximadamente un orden de magnitud con respecto de sus análogos KRM-12m y KRM-12d. Así, el derivado KRM-15d exhibió el mayor LogP y además mostró la mayor potencia de todos los aminoéteres, una potencia igual a la observada para el fármaco de referencia etambutol (MIC 3.125 µg/mL) el cual presenta un LogP de 0.06. La gran diferencia entre los LogP de KRM-15d y etambutol indica que la forma en que estas moléculas entran al interior de la micobacteria es distinta, ya que se conoce que etambutol por ser de un tamaño muy pequeño y de carácter hidrofílico es transportado a través de unas proteínas llamadas porinas, estas se encuentran en la pared celular de *M. tuberculosis*⁴⁶. El aminoéter KRM-15d posee un LogP de 7 y un tamaño mayor que el de etambutol, por lo que es presumible que esta molécula esté atravesando por difusión pasiva la pared celular de la micobacteria, la cual se caracteriza por su composición alta en ácidos micólicos dándole un carácter muy lipofílico y lo que permite que moléculas lipofílicas puedan difundir fácilmente.

Los análogos KRM-13m, KRM-13d, KRM-14m y KRM-14d presentan una tendencia distinta a los análogos KRM-12m, KRM-12d, KRM-15m y KRM-15d, ya que KRM-13m a diferencia del resto de los aminoéteres mono-sustituidos fue inactivo sobre *M. tuberculosis*. En el caso de los aminoéteres KRM-14m y KRM-

14d se esperaba que el análogo di-sustituido fuera más activo que el análogo mono-sustituido, lo que fue contrario ya que KRM-14m presentó una CMI de 12.5 µg/mL y KRM-14d una CMI de 25 µg/mL sobre la cepa H37Rv. En cuanto a la actividad sobre las cepas de TB-MFR los aminoéteres KRM-13d y KRM-14d también presentan una tendencia distinta ya que se esperaba que la actividad sobre estas cepas fueran menor que sobre la cepa sensible (H37Rv), pero se puede observar que para la cepa G122 estos aminoéteres di-sustituidos resultaron más activos en comparación con la cepa H37Rv. Estas diferencias importantes sugieren que el mecanismo por el cual actúan sobre la cepa H37Rv podría ser diferente al de los aminoéteres más activos (KRM-12m, KRM-12d, KRM-15m y KRM-15d), y que por la misma razón actúan de forma distinta frente cepas MFR.

Otro hallazgo importante es la similitud estructural que presenta la porción aminoéter de los aminoéteres, con la porción aminoalcohol del fármaco etambutol (Figura 72). Esta similitud estructural es importante tomarla en cuenta para futuras investigaciones sobre el mecanismo de acción de estos aminoéteres, ya que podría ayudar a saber si actúan sobre la misma diana molecular de etambutol o en una diferente.

Figura 72. Comparación entre aminoéter más activo y etambutol.



5.5. CITOTOXICIDAD E ÍNDICE DE SELECTIVIDAD (IS).

De los 28 análogos del AmDG, se evaluó la citotoxicidad de los análogos que presentaron mayor actividad antibacteriana y antituberculosa, siendo un total de 15 análogos los que se evaluaron sobre células Vero, las cuales son ampliamente usadas como un modelo para estimar la citotoxicidad de las moléculas.³⁵⁻³⁶ Conociendo su valor de CI_{50} se calculó el IS, considerándose selectivos para las bacterias los análogos con $IS > 10$.⁴⁷⁻⁴⁹

Con respecto a la actividad antibacteriana se tiene que los siete análogos evaluados (KRM-3m, KRM-4m, KRM-8m, KRM-10m, KRM-13d, KRM-15m Y KRM-15d) presentaron un $IS < 10$, lo que indica que son citotóxicos y poco selectivos a la bacteria, en comparación con el fármaco de referencia levofloxacina, el cual presentó un IS de 93.81 (Tabla 12).

Tabla 12. Citotoxicidad e índice de selectividad de análogos del AmDG con actividad antibacteriana.

Derivado	<i>E. faecium</i> RV CMI µg/ml	<i>S. aureus</i> RM CMI µg/ml	<i>S. epidermis</i> RL CMI µg/ml	<i>S. haemolyticus</i> RL CMI µg/ml	Células Vero CI_{50} µg/ml	IS (CI_{50}/CMI)
KRM-3m	> 50	25	> 50	> 50	111.58	4.46
KRM-4m	> 50	25	> 50	> 50	65.04	2.60
KRM-5m	> 50	50	> 50	> 50	NE	NC
KRM-8m	> 50	50	> 50	> 50	43.34	0.87
KRM-10m	> 50	25	> 50	> 50	47.75	1.91
KRM-13d	> 50	50	> 50	> 50	71.65	1.43
KRM-15m	50	50	50	50	62.57	1.25
KRM-15d	50	50	> 50	50	73.23	1.46
Levofloxacina	>50	3.125	12.5	12.5	293.16	93.81

RV: Resistente a vancomicina, **RM:** Resistente a meticilina, **RL:** Resistente a linezolid, **IS:** Índice de Selectividad, **NE:** No evaluado, **NC:** No calculado.

Cabe destacar que los aminoéteres KRM-15m y KRM-15d resultaron ser más activos que el fármaco de referencia levofloxacina contra *E. faecium* RV; sin embargo, estos derivados fueron más citotóxicos que levofloxacina ya que presentaron IS de 1.25 y 1.26 respectivamente.

En cuanto a la actividad antituberculosa, se determinó la CI_{50} de 15 de los 16 análogos que presentaron actividad anti-TB. Puede observarse una diferencia marcada entre el IS del grupo de los ésteres y aminoéteres, siendo los siete ésteres (KRM-1m, KRM-2m, KRM-3m, KRM-3d, KRM-4m, KRM-7m, KRM-8m) citotóxicos y poco selectivos para *M. tuberculosis* con $IS < 10$.

Tabla 13. Citotoxicidad e índice de selectividad de análogos del AmDG con actividad antituberculosa.

Derivado	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI $\mu\text{g/ml}$	<i>M. tuberculosis</i> G122 CMI $\mu\text{g/ml}$	<i>M. tuberculosis</i> G133 CMI $\mu\text{g/ml}$	Células Vero CI_{50} $\mu\text{g/ml}$	IS (CI_{50}/CMI_{H37Rv})
KRM-1m	12.5	50	> 50	111.58	8.93
KRM-2m	12.5	50	>50	97.07	7.76
KRM-3m	50	>50	> 50	102.73	2.05
KRM-3d	50	>50	> 50	95.13	1.90
KRM-4m	50	50	>50	65.04	1.30
KRM-7m	12.5	50	>50	124.62	8.04
KRM-8m	50	50	>50	43.34	0.86
KRM-8d	50	> 50	50	NE	NC
KRM-10m	50	50	>50	47.75	0.96
KRM-12m	12.5	>50	>50	326.59	26.13
KRM-12d	6.25	12.5	12.5	>487	>77.93
KRM-13d	25	6.25	25	71.65	2.87
KRM-14m	12.5	25	50	>487	>38.96
KRM-14d	25	12.5	12.5	>487	>19.48
KRM-15m	12.5	25	25	62.57	5.01
KRM-15d	3.125	6.25	6.25	73.23	23.43
EMB	3.125	6.25	--	390.93	183.53
Lev.	---		0.3906	293.16	750.54

H37Rv: Sensible a todos los fármacos, **G122:** Resistente a Isoniazida, rifampicina y etambutol, **G133:** resistente a isoniazida, rifampicina, estreptomycin. **EMB:** etambutol, **Lev.:** levofloxacina.

También se puede observar que dentro de los ésteres, los análogos que poseen anillos aromáticos sin heteroátomos presentes (Benceno, 4-bromo benceno, 2-nitrobenceno) presentaron los IS más altos (8.93, 7.76 y 8.04) aunque no lo suficiente para considerarse como selectivos para *M. tuberculosis*. En contraste se observa que los ésteres con heteroátomos en anillos aromáticos (piridina y pirazina) incrementó la citotoxicidad (IS 1.30, 0.86).

Por otro lado están los aminoéteres, de los cuales, cinco presentaron IS > 10, considerándose selectivos para *M. tuberculosis*: KRM-12m, KRM-12d, KRM-14m, KRM-14d, y KRM-15d. Los aminoéteres que presentaron los mejores IS fueron KRM-12d con un IS >77 y con una potencia dos veces menor a la del fármaco de referencia etambutol y KRM-15d con un IS de 23.43, teniendo una potencia igual a la de etambutol. Ambas moléculas son promisorias para el desarrollo de nuevos agentes antituberculosos ya que presentaron buenas actividades y un IS alto.⁵⁰

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES

1. Se sintetizaron, purificaron y elucidaron estructuralmente 28 nuevos análogos del ácido *meso*-dihidroguaiarético los cuales incluyen: 18 ésteres, 2 éteres y 8 aminoéteres.
2. Los análogos KRM-15M Y KRM-15d presentaron la mejor actividad antibacteriana con una CMI de 50 µg/ml contra *S. aureus* RM, *S. haemolyticus* RL y *E. faecium* RV. La actividad de estos análogos fue mejor que la de levofloxacina (CMI > 50 µg/ml) sobre la cepa *E. faecium* RV, sin embargo sus IS están por debajo de 10 indicando que son más tóxicos para células mamíferas que para la bacteria.
3. Los análogos KRM-12d y KRM-15d presentaron la mejor actividad antituberculosa *in vitro* con CMI de 6.25 y 3.125 µg/ml respectivamente contra *M. tuberculosis* H37Rv. Estos compuestos no fueron citotóxicos a las concentraciones ensayadas. El IS para KRM-12d y KRM-15d fueron >77 y 23.43, respectivamente indicando su selectividad hacia *M. tuberculosis*, lo que las hace moléculas promisorias para desarrollarse como fármacos antituberculosos.

CAPÍTULO VII

7. PERSPECTIVAS

- Optimizar síntesis para la obtención de aminoéteres del AmDG.
- Sintetizar nuevos aminoéteres inspirados en los análogos KRM-12d y KRM-15d para incrementar su actividad y mejorar la selectividad hacia *M. tuberculosis*.
- Realizar estudios sobre el mecanismo de acción de los aminoéteres del AmDG para conocer su blanco terapéutico y realizar un diseño racional de nuevos derivados.
- Realizar estudios de actividad anti-tuberculosa *in vivo*.

CAPÍTULO VIII

8. REFERENCIAS

1. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>] (Accesada el 06 de marzo de 2015).
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Las 10 principales causas de defunción en el mundo. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>] (Accesada el 13 de marzo de 2015)
3. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. 2014. ISBN 978 92 4 156474 8
4. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States 2013. 2013
5. World Health Organization (WHO). 10 Facts on antimicrobial resistance. [http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/] (Accesada 20 de octubre de 2015)
6. World Health Organization (WHO). Drug resistance. [http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/] (Accesada 20 octubre 2015)
7. Lawson, M. The antibiotic Resistance Problem Revisited. The American Biology Teacher. 70(7): 405-410.(2008)
8. Braine, T. Race against time to develop new antibiotics. Bull World Health Organ. 89:88-98. (2011)

9. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2014. (2014) pp. 17
10. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2014. (2014) pp 18
11. Organización Mundial de la Salud (OMS). Preguntas más frecuentes - La tuberculosis extremadamente drogoresistente (XDR-TB). [http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/] (Accesada Agosto 2015).
12. Secretaría de Salud. Vigilancia epidemiológica Semana 1, 2015. Boletín epidemiológico. 1:32:1. (2015)
13. Sriram, D, y Yogeewari, P. Medicinal Chemistry. Ed. Pearson, Delhi, 2010.
14. Gareth, T. Medicinal Chemistry an Introduction. Segunda edición. Wiley. (2007) ISBN 978-0-470-02598-7
15. Camacho-Corona, MR, Ramirez-Cabrera, MA, González-Santiago, O, Garza-González, E, Paz, I, y Luna-Herrera, J. Activity against Drugs Resistant-Tuberculosis Strains od Plants used in Mexican Traditional Medicine to treat Tuberculosis and Other Respiratory Diseases. *Phytother. Res.* 22:82-85. (2008)
16. Bocanegra-García, V, Camacho-Corona, MR, Ramírez-Cabrera, M, Rivera, G, y Garza-González, E. The bioactivity of plant extracts against representative bacterial pathogens of the lower respiratory tract. *BMC Research Notes.* 2:95. (2009).
17. Favela, JM, García, A, Garza-González, E, Rivas-Galindo, VM, y Camacho-Corona MR. Antibacterial and antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytother. Res.* 26: 1957-1960. (2012)

18. Ma, CJ, Lee, MK, y Kim, YC. *meso*-Dihydroguaiaretic acid attenuates the neurotoxic effect of staurosporine in primary rat cortical cultures. *Neuropharmacology*. 50: 733-740. (2006).
19. Chen, J, Chpu, E, Peng, C, Chen, I, Yang, S, y Huang, H. Novel epoxyfuranoid lignans and antitubercular constituents from leaves of *Beilschmiedia tsangii*. *Planta Med*. 73:567-571 (2007)
20. Cheng, W, Zhau, C, Xu, W, Fan, X, Yang, Y, Li, Y, Chen, X, Wang, W, y Shi, J. Chemical Constituents of the bark of *Machilus wangchiana* and their biological activities. *J. Nat. Prod*. 72: 2145-2152. (2009)
21. Thuong, PT, Hung, TM, Khoi, NM, Nhung, HTM, Chinh, NT, Quy, NT, Jang, TS y Na M. Cytotoxic and anti-tumor activities of lignans from the seeds of Vietnamese nutmeg *Myristica fragans*. *Arch. Pharm. Res*. 37: 399-403. (2014)
22. Gupta, A, Kumar, V, Babu, V, y Maithil, N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial potencial of nutmeg (*Myristica fragans* Houtt). *J. Gen. Engineering and Biotech*. 11:25-31. (2013)
23. Lee, Y, Seo, C, Lee, C, Kang, S, Jahng, Y, Chang, H, y Son, J. Inhibition of DNA topoisomerases I and II and citotoxicity by lignans from *Saururus chinensis*. *Archives of Pharmaceutical Research*. 10(32), 1409-1415. (2009)
24. Huang, H.; Lin, Y.; fazary, A.; Lo, I.; Liaw, C.; New and bioactive lignans from the fruits of *Schisandra sphenanthera*. *Food Chemistry*. 128(2): 348-357. (2011)
25. Lu, Y, y Chen DF. Analysis of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphennanthera*. *J. Chromatogr. A*. 1216: 1980-1990. (2009)
26. Salinas-Salazar, C, Camacho-Corona, M, Bernés, S, Waksman, N, 2,2'-Dimethoxy-4-4'-[rel-(2R,S3)-2,3-di-methylbutane-1,4-diyl]diphenol. *Acta Cryst. E65*, o1279. (2009).

27. Clemete, A. F.; Aportaciones al mecanismo de acción del ácido *meso*-dihidroguaiarético sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Tesis de Maestría. México. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León – Monterrey. (2013)
28. Clemente-Soto, AF, Balderas-Rentería, I, Rivera, G, Segura-Cabrera, A, Garza-González, E, y Camacho-Corona, MR. Potential Mechanism of Action of *meso*-Dihydroguaiaretic Acid on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Molecules*. 19:20170-20182. (2014)
29. Cushnie, TP, Taylor, PW, Nagaoka, Y, Uesato, S, Hara, y Lamb AJ. Investigation of the antibacterial activity of 3-*O*-octanoyl-(—)-epicatechin. *J. Appl. Microbiol.* 105 (5): 1461-1469 (2008)
30. Molina-Salinas, GM, Bórquez, J, Said-Fernández, S, Loyola, L, Yam-Puc, A, Becerril-Montes, P, Escalante-Erosa, F, y Peña-Rodríguez, L. Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*. 81: 219-222 (2010)
31. Lu, X, Liu, X, Wan, B, Franzblau, S, Chen, L, Zhou, C, y You, Q. Synthesis and evaluation of antitubercular and antibacterial activities of new 4-(2,6-dichlorobenzyloxy)phenyl thiazole, oxazole and imidazole derivatives. Part 2. *European Journal Medicinal Chemistry*. 49:164-171. (2012)
32. Olmo, E, Molina-Salinas, GM, Escarcena R, Alves, M, López-Pérez, JL, Hernández-Pando, R, Said-Fernández, S, y San-Feliciano, A. Simple dihydrosphingosine analogues with potent activity against MDR-*Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 19:5764–5768. (2009)
33. Hu, L, Kully, M.L., Boykin, D.W., Abood, N. Optimization of the central linker of dicationic *bis*-benzimidazole anti-MRSA and anti-VRE agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 19 3374–3377. (2009)

34. Griffin, RW. Química Orgánica Moderna. Ed. Reverté. Barcelona. 1891. Pp. 389-390.
35. Neises, B, y Steglich, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 17: 522-524 (1978)
36. Morrison, RT, y Boyd, RN. Química Orgánica. 5ta ed. Ed. Pearson, México. 1998. pp. 690-692.
37. Gellibert, F, Gouville, AC, Woolven, J, Mathews, N, Nguyen, VL, Bertho-Ruault, C, Patikis, A, Grygielko, E, Laping, N, y Huet, S. Discovery of 4-{4-[3-(Pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]pyridine-2-yl}-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)benzamide (GW788388): A potent, selective, and Orally Active transforming Growth Factor-B Type I receptor Inhibitor. *J. Med. Chem.* 49:2210-2221. (2006)
38. Detsi, A, Koufaki, M, y Calogeropoulou, T. Synthesis of (Z)-4-Hydroxytamoxifen and (Z)-2-[4-[1-(p-Hydroxyphenyl)-2-phenyl]-1-butenyl]phenoxyacetic acid. *J. Org. Chem.* 67: 4608-4611. (2002).
39. Dong, Y, Shi, Q, Pai, HC, Peng, CY, Pan, SL, Teng, CM, Nakagawa-Goto, K, Tu, D, Liu, YN, Wu, PC, Bastow, KF, Morris-Natschke, SL, Brossi, A, Lang, JY, Hsu, J, Hung, MC, Lee, EYHP, y Lee, KH. Antitumor Agents. 272. Structure- Activity Relationships and In vivo Selective Anti-breast cancer activity of Novel Neo-tanshinlactone Analogues. *J. Med. Chem.* 53: 2299-2308. (2010).
40. Zgoda, JR, y Porter, JR. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm Biol.* 39:221-225 (2001).
41. Franzblau, SG, Witzig RS, McLaughlin, JC, Torres, P, Madico, G, Hernandez, A, Degnan, MT, Cook, MB, Quenzer, VK, Ferguson, RM., y Gilman, RH. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using microplate Alamar Blue assay. *J.Clin.Microbiol.*36 (2): 362-366. (1998).

42. Uc-Cachón, A, Borges-Argaéz, R, Said-Fernández, S, Vargas-Villarreal, J, González-Salazar, F, Méndez-González, M, Cáceres-Farfán, y M, Molina-Salinas, G. Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 27:114-120 (2014).
43. Navarrete-Vázquez, G, Molina-Salinas, GM, Duarte-Fajardo, Z, Gargas-Villarreal, J, Estrada-Soto, S, González-Salazar, F, Hernández-Nuñez, E, y Said-Fernández, S. Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(55-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 5502-5508. (2007).
44. Favela, J.M.J.; Aislamiento y caracterización de los compuestos antibacterianos y antituberculosos de *Larrea tridentata*, determinación de su toxicidad y mecanismo de acción del compuesto más activo. Tesis de Doctorado. México. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León – Monterrey. (2012).
45. Doležal, R, Waisser, K, Petrlíková, E, Kuneš, J, Kubicová, L, Macháček, M, Kaustová, J, y Dahse, HM. *N*-benzylsalicylthioamides: Highly active potential antituberculotics. 242:2: 113-119. (2009) [Abstract].
46. Lambert, PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 92: Suppl:46S-54S. (2002)
47. Orme, I, Secrist, J, Anathan, S, Kwong, C, Maddry, J, Reynolds, R, Poffenberger, A, Michael, M, Miller, L, Krahenbuh, J, Adams, L, Biswas, A, Franzblau, S, Rouse, D, Winfield, D, y Brooks, J. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:7: 1943-1946. (2001).

48. Vicente, E, Pérez-Silanes, S, Lima, L, Ancizu, S, Burguete, A, Solano, B, Villar, R, Aldana, I, y Monge, A. Selective activity against *Mycobacterium tuberculosis* of new quinoxaline 1,4-di-N-oxides. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 385-389. (2009)
49. Ma, C, Case, R, Wang, Y, Zhang, HJ, Tan, GT, Hung, NV, Cuong, MC, Franzblau, SG, Soejarto, DD, Fong, HHS, y Pauli, GF. Anti-tuberculosis constituents from the stem bark of *Micromelum hirsutum*. *Planta Med.* 71:3: 261-267. (2005).
50. Naidu, KM, Suresh, A, Subbalakshmi, J, Sriram, D, Yogeeswari, P, Raghavaiah, P, Sekhar y KVGC. Design, synthesis and antimycobacterial activity of various 3-(4-(substitutedsulfonyl)piperazin-1-yl)benzo[d]isoxazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 87: 71-78 (2014).

APÉNDICE A
DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo
Cuerpo Académico de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina
Posgrado en Farmacia

OTORGAN EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A
*Karen Yuhaina Reyes Melo, Abraham Garcia,
Verónica M. Rivas Galindo, Elvira Garza González y
María del Rayo Camacho Corona*

POR SU DESTACADA PARTICIPACIÓN COMO PONENTES DEL TRABAJO LIBRE- ORAL

***“Síntesis y elucidación estructural de ésteres
del ácido meso-dihidroguaiarético como
posibles agentes antibacterianos”***

DENTRO DEL

**“Simposio Nacional de Ciencias
Farmacéuticas y Biomedicina”**

LLEVADO A CABO EN LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, U.A.N.L.

EL 21 Y 22 DE AGOSTO, 2014

Alere Flammam Veritatis

Dra. Yolanda Arce y Grecia Vázquez
JEFE DEL ÁREA DE Q.F.B.

Dr. Eduardo Soto Regalado
DIRECTOR



OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

QFB. Karen Yuhaina Reyes Melo, Dra. María del Rayo Camacho Corona, Dr. Edgar Abraham García Zepeda,
Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo, Jessica Lizeth Ruiz Ruiz

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL CARTEL

Síntesis y elucidación estructural de éteres y aminoéteres del ácido meso-dihidroguaiarético como
posibles agentes antibacterianos.

DENTRO DEL

III Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde

Desarrollo Sustentable, Salud y Ambiente



LLEVADO A CABO EL 22, 23 Y 24 DE ABRIL DE 2015

Alere Flammam Veritatis

Monterrey, N.L. 24 de Abril de 2015



Dr. Eduardo Soto Regalado
DIRECTOR



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

LA UNIVERSIDAD DE SONORA Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

extiende la presente

Constancia

a

**Karen Yuhaina Reyes Melo, Abraham García, Verónica M. Rivas Galindo,
Elvira Garza González, María del Rayo Camacho Corona**

Por su valiosa asistencia y presentación de la ponencia en Modalidad Oral
**SÍNTESIS, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO meso-DIHIIDROGUAIARÉTICO**

durante la 11ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales celebrada
del 20 al 22 de mayo de 2015 en San Carlos, Sonora, México.

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeca
Presidente del Comité Organizador

Dra. Noemi H. Waksman Minsky
Presidenta de Amipronat



Reunión Internacional
de Investigación en
Productos Naturales
Mayo del 2015
San Carlos, Sonora

Homenaje al
Dr. Manuel Jiménez
Estrada

Amipronat
ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES



CONACYT

Hacia una
Unison
Sustentable

APÉNDICE B

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Karen Yuhaina Reyes Melo

Candidato para el grado de:

Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis:

Síntesis, elucidación estructural y evaluación de la actividad antibacteriana y antituberculosa *in vitro* de análogos del ácido *meso*-dihidroguarético.

Campo de estudio:

Farmacia (Química Medicinal).

Biografía:

Datos personales: nacida en El Carmen Tequexquitla, Tlaxcala, el 18 de septiembre de 1990, hija de Victor Manuel Reyes Durán e Idalia Melo Huerta.

Educación:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León
Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 2013.