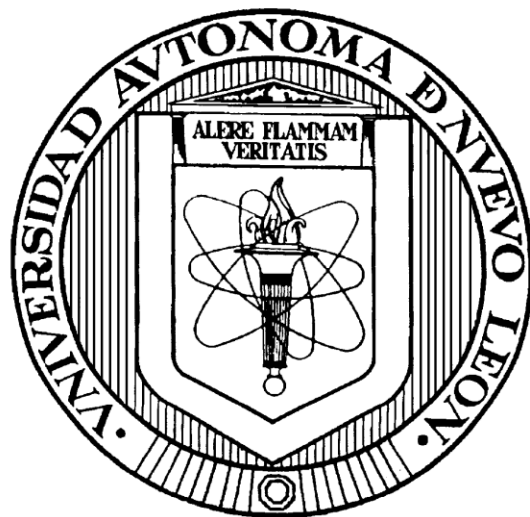


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESTUDIO DE LAS
PROPIEDADES ANTIMICOBACTERIANAS DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO
meso-DIHIDROGUAJARÉTICO**

**POR
MC KAREN GISELLE CHÁVEZ VILLARREAL**

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

FEBRERO 2018

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICOBACTERIANAS DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAIAARÉTICO

Aprobación de la tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Presidente

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño

Secretario

Dr. Francisco Guadalupe Avalos Alanís

Primer vocal

Dra. Elvira Garza González

Segunda vocal

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Tercer vocal

Dra. Ma. Aracely Hernández Ramírez

Subdirectora de estudios de posgrado

Revisión y aprobación de la tesis:

“SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESTUDIO DE LAS
PROPIEDADES ANTIMICOBACTERIANAS 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. Patricia Esquivel Ferriño
Comité tutorial

Dra. Susana Thelma López Cortina
Comité tutorial

Dr. Francisco Ávalos Alanís
Comité tutorial

Dra. Elvira Garza González
Comité tutorial

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Comité tutorial

<<El conocimiento es patrimonio de la humanidad, no es solo tuyo,
transmítelo para beneficio de toda la humanidad>>

Con mi más profundo amor.

A mis seres queridos, que con su apoyo y amor me motivan a crecer.

Para mis amados padres y hermana, que siempre me alientan a superarme, otro
logro suyo, mío y nuestro.

A mi novio, que va de mi mano en este camino de la vida para que crezca cada
día más.

A mis queridos profesores que con su experiencia enriquecen mi formación.

DEDICATORIA

Primeramente gracias a Dios, por esta experiencia de vida, por tu guía y apoyo y amor incondicional a cada paso.

A mis padres y hermana. Amiguitos gracias por ser siempre mis motores, los que me impulsan a seguir adelante cada día y que me apoyan moral, física, espiritual y hasta económicamente, gracias a ustedes sigo avanzando. Los amo y les doy mi cuatro siempre.

A mi novio, flaco te agradezco por tu paciencia y apoyo, porque aunque siempre le dediqué más tiempo y energía a mi trabajo estuviste conmigo y lo seguirás haciendo siempre tomando mi mano. Te amo.

A mi directora de tesis, Dra. Rayito con usted he aprendido más allá de su amplio conocimiento científico, la rigurosidad por el trabajo y el compromiso por él. Como usted me lo dijo, nuestro trabajo es el que habla por nosotros. Muchas gracias.

Dr. Abraham gracias por su guía con esta inexperta de la química orgánica, por sus buenos comentarios, palabras de aliento y las charlas de la vida.

Dra. Elvira gracias por toda la disposición y apoyo en su laboratorio, de usted me llevo el mejor ejemplo de trabajo en equipo. Siempre recordaré las juntas de los miércoles como una de las mejores maneras de crecer y aprender del trabajo propio y en equipo.

Dr. Antonio Romo muchas gracias por sus acertados comentarios y su apoyo en la revisión y corrección de la tesis y el artículo. Un gusto trabajar con usted.

A mi comité tutorial y predoctoral, Dra, Paty Esquivel, Dr. Francisco Ávalos, Dra. Susana López. Gracias por su atención y comentarios en las reuniones tutoriales y seminarios, siempre es grato aprender un poco más de los que tienen experiencia.

Dra. Verónica Rivas, por ayudarme en la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear, siempre voy a recordar su sonrisa enorme y la calidez cada vez que llegaba a su laboratorio.

A las doctoras y compañeros del laboratorio de Gastroenterología del Hospital Universitario. Lucy, Dra. Samantha, Dra. Paola, Dra. Soraya, Laura, Hugo, Vero, Jessy, Gregorio, Adrián, Flora, Carlos, gracias por sus comentarios y atención en el laboratorio y las juntas.

A mis amigos y compañeros de QPN, que pasamos por penurias y alegrías juntos, los quiero mucho bebés. Adri Romo, mi chatita linda, siempre llevo conmigo esa hora del veneno y tantas experiencias de vida y de ciencia invaluable. Erikita, siempre voy a recordar esas idas y venidas a medicina, los regaños y las alegrías. Adrianita mi amiga y única compañera de generación, siempre con una sonrisa. Caro, Lalo, Laura y el buen Memo llegaron al lab a hacerme sentir en familia. Deyani, mima me encantan tus relatos cubanos y toda esa gozadera que te cargas mujer. A mis compañeros que poco a poco se integraron al laboratorio y mis alumnos de veranos y servicio, gracias.

A mis amigos y roomies que conocí en posgrado y se volvieron mi familia, Yuri, Isaac, Gene y Jorge, nadie se conoce mejor que cuando viven juntos. Los quiero mucho chiquitines, gracias por dejarme ser su mamá Karen.

A mis queridas doctoras y amigos del laboratorio de bacteriología de la UEM, que no solo me abrieron las puertas de su laboratorio, sino me abrieron las puertas de sus casas y corazones, Dra. Kathiany, Dra Reggiane, Dra. Vera, Dra. Rossilene, Laíse, Vanessa, Sayuri, Nathaly, Hayalla, Andressa, Jea, Paty, Giovana, Eloísa, Aryadne, Paula, Beatriz, Lívia. Mis queridos brasileños los llevo siempre en el corazón.

Agradecimientos

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
Por el continuo asesoramiento y apoyo en la realización del proyecto de investigación

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
Por el apoyo brindado en la parte sintética de los derivados obtenidos.

Dra. Elvira Garza González

Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González,
Universidad Autónoma de Nuevo León
Por la infraestructura y el apoyo brindado en la parte de ensayos antimicobacterianos y comentarios en el examen predoctoral y reuniones.

Comité tutorial

Dra. Patricia Esquivel Ferriño

Dra. Susana Thelma López Cortina

Dr. Francisco Ávalos Alanís

Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Nuevo León
Por sus observaciones y sugerencias durante las reuniones tutoriales, seminarios departamentales y examen predoctoral.

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León
Por el apoyo en la realización de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear del producto natural y derivados semisintéticos.

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.
Por su apoyo en los estudios QSAR y comentarios en el examen predoctoral, tesis y artículo.

Dra. Rosa Esther Moo Puc

Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez, IMSS.

Por su apoyo en la evaluación de la citotoxicidad de los derivados semisintéticos.

Dr. Luis Demetrio Miranda

Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Por su apoyo en la obtención de los espectros de masas de alta resolución de los derivados semisintéticos.

Dra. Rosilene Fressati Cardoso y Dra. Katiany Caleffi-Ferracioli

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

Por su guía y apoyo para realizar los estudios de sinergismo y bombas de flujo.

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Por su motivación y apoyo en seminarios departamentales.

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

Laboratorio de Productos Naturales y Sintéticos

Por la infraestructura para la realización del presente proyecto.

CONACYT

Por la beca de manutención y el apoyo financiero al proyecto CB-237248

RESUMEN

Karen Giselle Chávez Villarreal

Fecha de graduación

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: **SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICOBACTERIANAS DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO.**

Número de páginas:

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y método de estudio:

La tuberculosis (TB) es considerada una de las 10 principales causas de muerte en el mundo. La enfermedad es originada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*. En 2015, 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.8 millones murieron a causa de ella. El régimen de tratamiento establecido para tratar la TB es largo y consta de una serie de fármacos antituberculosos. Si estos fármacos no se administran adecuadamente, puede presentarse la tuberculosis multifármacorresistente (TB-MFR) y en casos más agravados tuberculosis extremadamente resistente (TB-XFR). Por todo lo anterior, se requiere desarrollar nuevas alternativas terapéuticas como la obtención de productos naturales y sus derivados semi-sintéticos, capaces de mejorar la actividad farmacológica, acortar tiempos de tratamiento o actuar sobre un mecanismo de acción

diferente a los fármacos actualmente empleados. En previos estudios se demostró la actividad anti-TB del lignano ácido *meso*-dihidroguaierético (*AmDG*), metabolito secundario de la planta *Larrea tridentata* el cual posee concentración mínima inhibitoria (CMI) en un rango de 12.5 a 50 µg/mL contra aislados clínicos MFR de *Mtb*. Estudios adicionales sugieren que el lignano tiene un mecanismo de acción diferente al de los fármacos actuales para el tratamiento de TB. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se realizó la síntesis de análogos del *AmDG* y se evaluó la actividad antimicobacteriana en dos aislados clínicos MFR y una cepa sensible H37Rv de *Mtb*. Así mismo se evaluó la citotoxicidad de los análogos más activos sobre la línea celular Vero para determinar la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) y se calcularon sus índices de selectividad (IS). Posteriormente se realizó un análisis de la relación estructura química-actividad biológica cuantitativa de los derivados. Se evaluó la posible sinergia de los tres derivados más activos y menos citotóxicos en conjunto con varios fármacos para el tratamiento de la TB. Los análogos con mejor IS fueron evaluados como inhibidores de las bombas de eflujo de *Mtb*. H37Rv.

Conclusiones y contribuciones:

Se aisló y caracterizó el lignano *AmDG* a partir del extracto orgánico de *L. tridentata*. A partir del lignano puro se sintetizaron, purificaron y caracterizaron estructuralmente 20 nuevos derivados del *AmDG*, de los cuales 9 fueron carbamatos, 10 éteres y 1 aminoéter. Todos los derivados fueron probados contra la cepa sensible H37Rv y dos cepas MFR de *Mtb*. Diez de los derivados [(±)-1, *meso*-2, (±)-3, (±)-5, *meso*-6, (±)-7, (±)-10, (±)-12, (±)-14, (±)-18] presentaron buena y moderada actividad antimicobacteriana en al menos dos de las cepas probadas. Los carbamatos *meso*-2 y *meso*-6 presentaron CMI a 25 y 12.5

$\mu\text{g/mL}$ contra la cepa MFR G122, respectivamente. Dichos derivados disustituidos no fueron tóxicos contra la línea celular Vero ($\text{IC}_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$) y presentaron $\text{IS} > 10$. Por su parte, los éteres (\pm)-10, (\pm)-12, (\pm)-14 y (\pm)-18 presentaron CMI's en un rango de 50 a $6.25 \mu\text{g/mL}$ contra las cepas MFR y sensible. El éter (\pm)-14, fue el más activo con una CMI de $6.25 \mu\text{g/ml}$ contra las cepas H37Rv y MFR G122 y $12.5 \mu\text{g/mL}$ contra la cepa MFR G133. Este compuesto presentó menor citotoxicidad ($\text{IC}_{50} 13.91 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$) que el control positivo docetaxel ($\text{IC}_{50} 0.12 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$). La actividad de este compuesto contra la cepa G122 es comparable con la presentada por el control positivo levofloxacino (MIC $6.25 \mu\text{g/mL}$). El análisis QSAR mostró pocos acantilados de actividad, siendo la cepa H37Rv la que presentó mayor cantidad y la cepa G133 la de menor cantidad. En base a ello, se observó que la flexibilidad, el patrón de sustitución y los aceptores de puentes de hidrógeno influyen principalmente estas relaciones. Los modelos construidos a partir del QSAR-3D fueron útiles para encontrar tendencias estadísticas y posibles sitios de modificación estructural. El factor estérico fue el más importante para la actividad, donde si se aumentara la flexibilidad del sustituyente se obtendría una mejor actividad. El factor electrostático tiene influencia en el ligando entre el lignano y el grupo farmacofórico. En el ensayo de sinergia, únicamente el compuesto *meso-6* presentó sinergismo con el fármaco de primera línea rifampicina con una concentración fraccional inhibitoria (CFI) de 0.31 ($0.0015 \mu\text{g/mL}$ de RIF + $0.78 \mu\text{g/mL}$ de *meso-6*) que es $1/2$ y $1/16$ de la CMI presentada por cada uno de manera individual, respectivamente, para el caso de la cepa sensible de *M. tuberculosis* H37Rv. Esta misma combinación sinérgica se presentó para la cepa MFR 71A con CFI de 0.4 ($12.5 \mu\text{g/mL}$ de rifampicina y $6.25 \mu\text{g/mL}$ de *meso-6*). En el ensayo de inhibidores de bombas de eflujo, ambos carbamatos (*meso-2* y *meso-6*) fueron potentes inhibidores de bombas de eflujo presentaron una acumulación de Bromuro

de etidio comparable con el verapamil ($\frac{1}{2}$ CMI = 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El *meso-2* presentó la misma fluorescencia relativa final (FRF) de 0.47 ($\frac{1}{2}$ CMI 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que la presentada por verapamil FRF = 0.47. El compuesto *meso-2* presentó una CFI de 0.23 ($\frac{1}{2}$ CMI 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que es la mitad de la presentada por verapamil FRF = 0.47. Estos carbamatos son candidatos para desarrollarse como fármacos antituberculosos debido a su selectividad por la bacteria y poder como inhibidores de bombas de eflujo.

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Director de Tesis

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Co-Director de tesis

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Tuberculosis.....	1
1.1.1. Etiología.....	1
1.1.2. Epidemiología.....	2
1.1.3. Diagnóstico.....	3
1.1.4. Tratamiento.....	4
1.1.5. Nuevos fármacos antituberculosos.....	6
1.2. Mecanismo de resistencia antituberculosa.....	8
1.2.1. Bombas de eflujo.....	8
1.2.2. Inhibidores de Bombas de Eflujo (IBE).....	9
1.3. Diseño de Nuevos fármacos antituberculosos: Estudios QSAR.....	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1. Compuestos antimicobacterianos de <i>Larrea tridentata</i> : Ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético.....	12
2.2. Derivados semi-sintéticos del AmDG.....	13
2.3. Éteres y carbamatos como antimicobacterianos.....	16
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
3.1. Hipótesis.....	19
3.2. Objetivos.....	19
3.2.1. Objetivo General.....	19
3.2.2. Objetivos Específicos.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. Material y equipo.....	20
4.1.1. Técnicas cromatográficas.....	20
4.1.2. Elucidación estructural de los derivados del AmDG.....	20
4.2. Aislamiento y purificación del AmDG.....	21
4.3. Síntesis y purificación de los derivados del AmDG.....	21
4.3.1. Síntesis de carbamatos del AmDG.....	21
4.3.1.1. Síntesis de los derivados (\pm) 1 y <i>meso</i> -2.....	22

4.3.1.2. Síntesis de los derivados (\pm) 3 y <i>meso</i> -4.....	23
4.3.1.3. Síntesis de los derivados (\pm)-5 y <i>meso</i> -6.....	24
4.3.1.4. Síntesis de los derivados (\pm)-7 y <i>meso</i> -8.....	25
4.3.1.5. Síntesis del derivado KCV-9 (\pm)-9.....	26
4.3.2. Síntesis de éteres del <i>AmDG</i>	27
4.3.2.1. Síntesis de los derivados (\pm)-10 y <i>meso</i> -11.....	28
4.3.2.2. Síntesis de los derivados (\pm)-12 y <i>meso</i> -13.....	29
4.3.2.3. Síntesis de los derivados (\pm)-14 y <i>meso</i> -15.....	30
4.3.2.4. Síntesis de los derivados (\pm)-16 y <i>meso</i> -17.....	31
4.3.2.5. Síntesis de los derivados (\pm)-18 y <i>meso</i> -19.....	32
4.3.3. Síntesis de aminoéteres del <i>AmDG</i>	33
4.3.3.1. Síntesis del derivado <i>meso</i> -20.....	33
4.4. Ensayos biológicos.....	34
4.4.1 Actividad Antimicobacteriana.....	34
4.4.2. Citotoxicidad.....	37
4.4.3. Índice de selectividad (IS).....	38
4.4.4. Actividad sinergista con fármacos de primera línea.....	38
4.4.5. Agentes inhibidores de bombas de expulsión.....	40
4.5. Análisis de la relación estructura química-actividad biológica (QSAR).....	43
4.5.1. Búsqueda de acantilados de actividad y análisis de similitud.....	43
4.5.2. 3D-QSAR.....	44
4.6. Manejo de residuos.....	44
4.6.1. Aislamiento del <i>AmDG</i> , síntesis y purificación de análogos.....	44
4.6.2. Ensayos biológicos.....	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
5.1. Rendimiento, propiedades físicas y constantes espectroscópicas de los derivados del <i>AmDG</i>	46
5.1.1 Síntesis de carbamatos (1-9).....	46

5.1.2 Constantes espectroscópicas de carbamatos (1-9).....	47
5.1.3. Síntesis de éteres y aminoéteres (10-20).....	53
5.1.4. Constantes espectroscópicas de éteres y aminoéteres (10-20).....	54
5.2. Caracterización estructural.....	61
5.2.1 Caracterización del AmDG.....	61
5.2.1 Caracterización de los carbamatos del AmDG.....	63
5.2.1.1 Derivado (\pm)-1.....	64
5.2.1.2 Derivado <i>meso</i> -2.....	66
5.2.1.3 Derivado (\pm)-3.....	68
5.2.1.4 Derivado <i>meso</i> -4.....	69
5.2.1.5 Derivado (\pm)-5.....	71
5.2.1.6. Derivado <i>meso</i> -6.....	72
5.2.1.7. Derivado (\pm)-7.....	74
5.2.1.8. Derivado <i>meso</i> -8.....	75
5.2.1.9. Derivado (\pm)-9.....	77
5.2.2 Caracterización de los éteres del AmDG.....	78
5.2.2.1. Derivado (\pm)-10.....	78
5.2.2.2. Derivado <i>meso</i> -11.....	80
5.2.2.3. Derivado (\pm)-12.....	81
5.2.2.4. Derivado <i>meso</i> -13.....	83
5.2.2.5. Derivado (\pm)-14.....	85
5.2.2.6. Derivado <i>meso</i> -15.....	87
5.2.2.7. Derivado (\pm)-16.....	89
5.2.2.8. Derivado <i>meso</i> -17.....	91
5.2.2.9. Derivado (\pm)-18.....	92
5.2.2.9. Derivado <i>meso</i> -19.....	95

5.2.3. Caracterización del aminoéter del AmDG.....	96
5.2.3.1 Derivado <i>meso</i> -20	97
5.3. Actividad antimicobacteriana y citotóxica de los derivados del AmDG.....	99
5.5. Estudios de la estructura química-actividad biológica de derivados semisintéticos del AmDG.....	104
5.5. Actividad sinergista.....	115
5.6. Actividad de inhibición de bombas de eflujo.....	118
6. CONCLUSIONES.....	120
7. PERSPECTIVAS.....	123
8. REFERENCIAS.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	2
Figura 2. Compuestos Inhibidores de Bombas de Expulsión de fármacos (IBEs) provenientes de fuentes sintéticas y naturales.....	10
Figura 3. Estructura del Ácido meso-dihidoguaiarético (AmDG).....	12
Figura 4. Interacciones del AmDG con el sitio activo de la CoA-Mtb (tomado de Clemente-Soto <i>et al.</i> 2014 ⁴⁷).....	13
Figura 5. Análogos del AmDG de tipo aminoéter más activos	14
Figura 6. Estructura química de demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina	16
Figura 7. Derivados sintéticos de benzimidazoles con actividad antimicobacteriana	17
Figura 8. Dehidroesfingosina y sus derivados	18
Figura 9. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del AmDG	63
Figura 10. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) del AmDG.....	63
Figura 11. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de (±)-1.....	65
Figura 12. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de (±)-1.....	65
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de <i>meso</i> -2.....	67
Figura 14. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de <i>meso</i> -2.....	67
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de (±)-3.....	68
Figura 16. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de (±)-3.....	69
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de <i>meso</i> -4.....	70
Figura 18. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de <i>meso</i> -4.....	70
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 100 MHz) de (±)-5.....	72
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de (±)-5.....	72
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de <i>meso</i> -6.....	73

Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de <i>meso</i> -6.....	73
Figura 23. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-7.....	74
Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-7.....	75
Figura 25. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>meso</i> -8.....	76
Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de <i>meso</i> -8.....	76
Figura 27. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-9.....	77
Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-9.....	78
Figura 29. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-10.....	79
Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-10.....	79
Figura 31. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>meso</i> -11.....	80
Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de <i>meso</i> -11.....	81
Figura 33. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-12.....	82
Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-12.....	82
Figura 35. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>meso</i> -13.....	84
Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de <i>meso</i> -13.....	84
Figura 37. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-14.....	86
Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-14.....	86
Figura 39. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>meso</i> -15.....	88
Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de <i>meso</i> -15.....	88
Figura 41. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-16.....	90
Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-16.....	90
Figura 43. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>meso</i> -17.....	91
Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de <i>meso</i> -17.....	92
Figura 45. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-18.....	93

Figura 46. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de (±)-18. 0-100 ppm	94
Figura 47. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de (±)-18. 100-154 ppm.....	94
Figura 48. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de <i>meso</i> -19.....	96
Figura 49. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de <i>meso</i> -19.....	96
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de <i>meso</i> -20.....	98
Figura 51. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de <i>meso</i> -20.....	98
Figura 52. Citotoxicidad y actividad antimicobacteriana de carbamatos activos.	101
Figura 53. Citotoxicidad y actividad antimicobacteriana de éteres y aminoéter activos.....	103
Figura 54. Mapa SAS, análisis de similitud de los derivados del AmDG para la cepa H37Rv.	105
Figura 55. Mapa SAS, análisis de similitud de los derivados del AmDG para la cepa G122 ...	106
Figura 56. Mapa SAS, análisis de similitud de los derivados del AmDG para la cepa G133 ..	106
Figura 57. Relaciones de acantilados de actividad en la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i>	107
Figura 58. Relaciones de acantilados de actividad en la cepa G122 de <i>M. tuberculosis</i>	108
Figura 59. Relaciones de acantilados de actividad en la cepa G133 de <i>M. tuberculosis</i>	108
Figura 60. Superposición de la interacción de los campos moleculares de todos los compuestos. Campos electrostáticos: Positivos (azul), negativos (rojo); Campos estéricos: Positivo (verde), negativo (amarillo). Cepas: a) H37Rv, b) G122, c) G133.	112
Figura 61. Superposición de la interacción de los campos moleculares de todos los compuestos. Campos electrostáticos: Positivos (azul), negativos (rojo); Campos estéricos: Positivo (verde), negativo (amarillo). Cepas: a) H37Rv, b) G122, c) G133.	113
Figura 62. Acumulación de Bromuro de etidio por fluorimetría en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	119

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos antituberculosos y sus propiedades ⁹⁻¹²	5
Tabla 2. Nuevos fármacos antituberculosos	7
Tabla 3. Comparación del estudio QSAR entre las tres cepas de <i>M. tuberculosis</i>	15
Tabla 4. Rendimiento y características físicas de derivados del AmDG de tipo carbamato.....	47
Tabla 5. Rendimiento y características físicas de derivados del AmDG de tipo éter y aminoéter	53
Tabla 6. Actividad antimicobacteriana y citotoxicidad de derivados del AmDG	100
Tabla 7. Estadística de los mejores modelos encontrados por 3D-QSAR.....	110
Tabla 8. Perfil de susceptibilidad a fármacos y concentración mínima inhibitoria de cepas sensible y multifármacoresistentes de <i>M. tuberculosis</i>	116
Tabla 9. Actividad sinergista entre fármacos de primera línea y carbamatos del AmDG.....	118

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción general para análogos del AmDG de tipo carbamato.	22
Esquema 2. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-1 y <i>meso</i> -2	22
Esquema 3. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-3 y <i>meso</i> -4	23
Esquema 4. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-5 y <i>meso</i> -6	24
Esquema 5. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-7 y <i>meso</i> -8	26
Esquema 6. Reacción para la síntesis del análogo (\pm)-9.....	27
Esquema 7. Reacción general para análogos del AmDG de tipo éter.....	28
Esquema 8. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-10 y <i>meso</i> -11	28
Esquema 9. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-12 y <i>meso</i> -13	29
Esquema 10. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-14 y <i>meso</i> -15	30
Esquema 11. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-16 y <i>meso</i> -17	31
Esquema 12. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-18 y <i>meso</i> -19	32
Esquema 13. Reacción para la síntesis del análogo <i>meso</i> -20.....	34

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ANN	Redes neuronales artificiales
AmDG	Ácido <i>meso</i> -dihidroguaiaarético
ATC	Ácido tricloroacético
ATCC	American Type Culture Collection
CA	California
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCCP	Carbonilcianida <i>m</i> -clorofenilhidrazona
CFI	Índice de Concentración fraccional inhibitoria
CO ₂	Dióxido de Carbono
CoA-Mtb	Coenzima A de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CoMFA	Análisis comparativo de campos moleculares
CHCl ₃	Cloroformo
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMAP	Dimetil amino piridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
EMB	Etambutol
ESI	Ionización por Electro Spray Positivo
Et ₃ N	Trietilamina
FE	Fase estacionaria
FM	Fase móvil
FRF	Fluorescencia relativa final
g	Gramos
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico

Hex	Hexano
HU	Hospital Universitario
Hz	Hertz
IBE	Inhibidor de bombas de expulsión de fármacos
IC ₅₀	Media concentración inhibitoria máxima
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INF	Interferón
INH	Isoniazida
IS	Índice de selectividad
J	Constante de acoplamiento
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
Kg	Kilogramos
L	Litro
MeOH	Metanol
Meq	Miliequivalente
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
MLR	Regresión lineal múltiple
NaCl	Cloruro de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa
OMS	Organización mundial de la salud
pf	Punto de fusión
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
PZA	Pirazinamida
QSAR	Quantitative structure-activity relationships
REDCA	Ensayo en microplaca de combinación de fármacos con resazurina

RIF	Rifampicina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SAS	Mapas de similitud estructura-actividad
SFB	Sulforrodamina B
STR	Estreptomina
TB	tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis mutifarmacorresistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente resistente
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
USA	Estados Unidos de América
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Regresión de componentes principales
PIMs	Manósidos de fosfatidilinositol
PLS	Mínimos parciales cuadrados
μ L	Microlitro

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tuberculosis

1.1.1. Etiología

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa cuyo agente etiológico es la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Se considera un bacilo intracelular aerobio obligado, de lento crecimiento que se multiplica dentro de los macrófagos. *Mtb* es una bacteria ácido alcohol resistente debido a su pared celular que consiste en ácidos micólicos hidrofóbicos, así mismo se limita la entrada de los nutrientes, por lo cual el crecimiento es lento, pero a la vez incrementa la resistencia celular a la degradación a través de enzimas lisosomales.

Además de los ácidos micólicos, distribuidos en porciones externas de la pared celular, también se encuentran el arabinogalactano y manósidos de fosfatidilinositol (PIMs) en las capas internas¹. Su pared celular está constituida por un peptidoglicano, excepto que uno de sus componentes es el ácido *N*-glucolilmurámico unido a polisacáridos de cadenas ramificadas, proteínas y lípidos. Otros componentes incluyen el liporarabinomano, lipomanano, manoglicoproteínas, micósidos, sulfolípidos y lipoarabinomano (Figura 1).

La infección se transmite de persona a persona a través del aire. Cuando un enfermo de tuberculosis pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsa bacilos tuberculosos al aire². La infección inicia una vez que *Mtb* llega a los alveolos pulmonares, donde los invade y se replica dentro de los macrófagos alveolares. El comportamiento de la respuesta inmune determina el destino de la replicación micobacteriana. Durante las fases latente y temprana, la infección es principalmente intracelular, por lo cual la respuesta inmune va

estar mediada por células T CD8+ y CD4+ (Th1), a través de la producción de citosinas incluidos el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón (IFN)- γ e interleucina (IL)-2 que participan en el control de la replicación de *Mtb*. El desarrollo de la enfermedad es el resultado de un desbalance de la respuesta inmunitaria³ y de los mecanismos de resistencia y supervivencia de la bacteria, dentro de los cuales se encuentra el paso rápido de macrófagos infectados con *Mtb* a un proceso necrótico⁴.

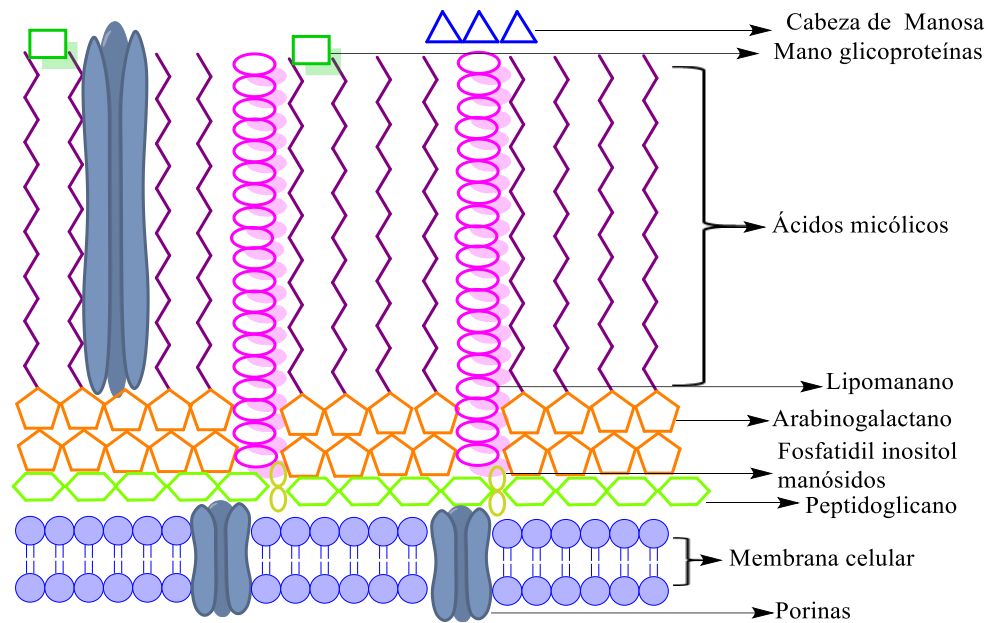


Figura 1. Estructura de la pared celular de *M. tuberculosis*

1.1.2. Epidemiología

De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tuberculosis (TB) es considerada una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. Tan solo en 2015, 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.8 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0.4 millones de personas con VIH). Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos⁵.

En México, más de la mitad de todos los municipios del país notifican casos de tuberculosis cada año, prácticamente hay TB en todo el territorio mexicano; sin embargo, las entidades federativas de mayor número de nuevos casos y muertes por esta causa son: Baja California, Veracruz, Guerrero, Sonora, Tamaulipas, Chiapas, Nuevo León y Tabasco⁶. Hasta la semana 41 del 2017, a nivel nacional se han registrado 13,150 nuevos casos de tuberculosis respiratoria, lo que es similar a la cifra presentada en la misma fecha del 2016⁷.

1.1.3. Diagnóstico

En México la detección, diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis en los servicios de salud gubernamentales son gratuitos y siguen los lineamientos del Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis y de la Norma Oficial Mexicana para el Control de la Tuberculosis⁸.

La confirmación de la presencia de *Mtb* se lleva a cabo mediante bacteriología, principalmente baciloscopía, cultivo y pruebas moleculares o mediante cultivo de fragmento de tejidos, fluidos o secreciones de órganos con pacientes con manifestaciones clínicas y radiológicas, así como con datos epidemiológicos compatibles con la enfermedad.

El uso de la prueba rápida Xpert MTB/RIF[®] se ha ampliado considerablemente desde 2010, cuando la OMS recomendó su empleo por primera vez. La prueba detecta de forma simultánea la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina, además permite obtener un diagnóstico en dos horas.

En 2016, la OMS recomendó cuatro pruebas diagnósticas para TB: una prueba molecular

rápida para la detección de la tuberculosis en centros de salud periféricos en los que no es posible emplear la prueba rápida Xpert MTB/RIF, y tres pruebas para detectar la resistencia a fármacos antituberculosos de primera y segunda línea. Además, se encuentra en desarrollo una siguiente generación de cartuchos Xpert Ultra y una plataforma diagnóstica llamada GeneXpert Omni⁵.

1.1.4. Tratamiento

Los agentes terapéuticos para la TB se pueden clasificar: 1) en base a su origen: producto natural o sintético; 2) situación/etapa del paciente: primera y segunda líneas; y 3) su mecanismo de acción: inhibidores de la enoil reductasa InhA, inhibidores de ADN girasa, etc (Tabla 1)⁹⁻¹².

En los regímenes terapéuticos se distingue una fase inicial (o intensiva) de 2 meses de duración y una fase de continuación que por lo general va de 4-6 meses donde se emplean los fármacos de primera línea: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) etambutol (EMB) y estreptomina (STR). En casos de retratamiento, donde se pudo adquirir farmacoresistencia o multifarmacoresistencia (TB-MDR), el tratamiento consiste en 5 medicamentos en la fase inicial y 3 en la fase de continuación que puede prolongarse hasta 24 meses¹³.

En 2015, entre los casos notificados de tuberculosis pulmonar hubo unos 480 000 casos de TB-MFR y 100 000 casos de monoresistencia a rifampicina (TB-RR). Se cree que aproximadamente un 9.0% de los casos de TB-MFR presentaban tuberculosis TB-XFR¹.

Tabla 1. Fármacos antituberculosos y sus propiedades⁹⁻¹²

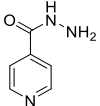
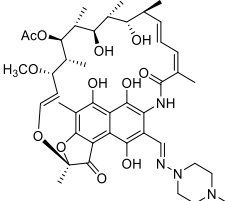
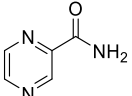
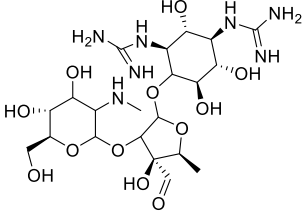
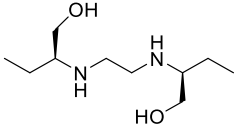
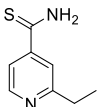
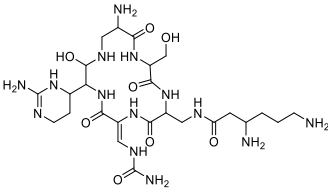
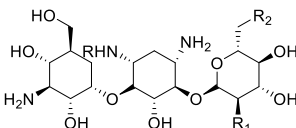
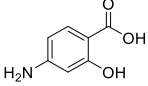
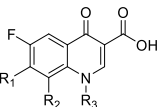






Fármaco/Estructura	Actividad	Mecanismo de acción	CMI (µg/mL)	Genes de Resistencia
Fármacos de primera línea				
Isoniazida 	Bactericida frente a los bacilos metabólicamente activos.	Inhibición de la síntesis de los ácidos micólicos	0.05–0.2	<i>katG, inhA</i>
Rifampicina 	Bactericida; bacilos metabólicamente activos. Actividad en los latentes y con crecimiento intermitente.	Inhibición de la transcripción, inhibe RNA polimerasa DNA dependiente.	<0.5	<i>rpoB</i>
Priazinamida 	Bactericida, bacilos en estado de latencia en el interior de los macrófagos	Altera la sintasa I de los ácidos grasos de la micobacteria, involucrados en la síntesis de ácidos micólicos.	20	<i>pncA</i>
Estreptomicina 	Bactericida, bacilos metabólicamente activos	Inhibidor de la síntesis proteica, disminuye la fidelidad de la transcripción y conduce a la producción de proteínas erróneas.	8	<i>rspL, rrs</i>
Etambutol 	Bacteriostático, bacilos metabólicamente activos	Inhibición de la síntesis de arabinogalactano y lipoarabino galactano.	1-5	<i>embB</i>
Fármacos de segunda línea				
Etionamida 	Bacteriostático, bacilos metabólicamente activos	Inhibe la síntesis de los ácidos micólicos	0.6-2.5	<i>mabA, inhA, ethA, etaA</i>

Tabla 1. Fármacos antituberculosos y sus propiedades. (Continuación)

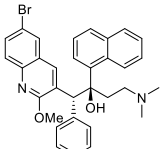
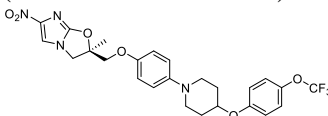
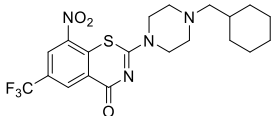
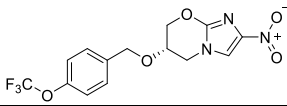
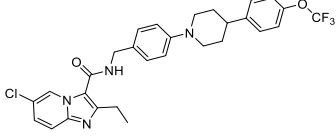
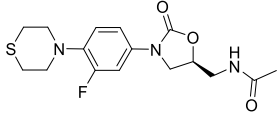
Fármaco/Estructura	Actividad	Mecanismo de acción	CMI (µg/mL)	Genes de Resistencia
<p>Capreomicina</p> 	Bactericida	Inhibición de la síntesis proteica	1-50	<i>rrs</i>
<p>Amikacina Kanamicina</p>  <p>R=H; Kanamicina A R=H; R₁=OH; R₂=NH₂ B R=H; R₁=R₂=NH₂ C R=H; R₁=NH₂; R₂=OH Amikacina R= COCH(OH)CH₂NH₂; R₁= OH; R₂=NH₂</p>	Bactericidas, bacilos metabólicamente activos	Inhibición de la síntesis proteica	1	<i>rrs</i> , <i>rpsL</i>
<p>Ácido para-aminosalicílico</p> 	Bacteriostático, bacilos metabólicamente activos	Antifólico	1	<i>thyA</i> <i>folC</i>
<p>Fluoroquinolonas:</p>  <p>Ciprofloxacino: R₁=  R₂=H; R₃=  Moxifloxacino: R₁=  R₂=OMe; R₃= Levofloxacino: R₁=  </p>	Bactericida	Inhibición de la subunidad A de la ADN-girasa	<3	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i> <i>lfrA</i>

1.1.5. Nuevos fármacos antituberculosos

El desarrollo de nuevos fármacos y regímenes para el tratamiento de la tuberculosis está en constante avance. En 2016, la OMS propuso 6 nuevos fármacos (bedaquilina,

delamanid, PBTZ169, pretomanid, Q203 y sutezolid) y 3 fármacos relanzados (linezolid, rifampicina en altas dosis y rifapentina) (Tabla 2) en fase I, II o III para TB sensible, TB-MDR o tuberculosis latente (LTBI)⁵, que es decir cuando no se presentan síntomas de tuberculosis, pero se encuentra o se presenta riesgo de infección a otras personas.

Tabla 2. Nuevos fármacos antituberculosos

Fármaco/Estructura	Mecanismo de Acción/ Fase de estudio	Resistencia	Referencia
Bedaquilina (TMC207) (diarilquinolina) 	Bactericida de bacilos replicantes y no replicantes. Inhibidor de ATP sintasa micobacteriana. Fase III y Fase III ^a	<i>atpE</i> Promotor <i>/mmpR</i>	14, 15
Delamanid (OPC-67683) (nitrodihidoimidaoxazol) 	Bactericida. Inhibidor de la síntesis de ácidos micólicos de tipo metoxi y ceto micólicos. Fase III	<i>Rv3547</i>	16
PBTZ169 (piperazin benzotiazinona) 	Bactericida. Inhibidor de la enzima DprE1 ^b suspendiendo la síntesis de arabinogalactano y arabinomanano. Fase I	<i>Cys387</i>	17, 18
Pretomanid (PA-824) (nitroimidazol) 	Bactericida. Inhibidor de la síntesis de ácidos micólicos. Fase II y III ^a	<i>ddn, fgd 1, fbiA, fbiB, fbiC</i>	19, 20
Q203 (imidazopiridin amida) 	Bacteriostático. Inhibidor del crecimiento. Actúa sobre la cadena respiratoria, su blanco es el complejo de citocromo <i>bc₁</i> . Fase I	<i>qcrB</i>	21
Sutezolid (PNU-1000480) (oxazolidinona) 	Tiene como blanco la subunidad 50s de los ribosomas. Inhibe la síntesis de proteínas. Fase II	<i>G2061T, G2576T</i> del gen 23S rRNA	22, 23
^a En combinación con otros fármacos para el tratamiento de TB-MDR; ^b DprE1: Decaprenilfosforil-β-D-ribosa'-epimerasa			

1.2. Mecanismo de resistencia antituberculosa

Los miembros del género *Mycobacterium* se han destacado por su resistencia intrínseca a una gran gama de antibióticos. La gran mayoría de los fenotipos resistentes son explicados por mutaciones cromosomales específicas y no por plásmidos de resistencia u otro elemento génico móvil²⁶⁻²⁸.

Luego de penetrar la envoltura celular, algunos antibióticos son atacados enzimáticamente o alterados estructuralmente (Ej. metilaciones, acetilaciones) para ser inefectivos²⁹. Otros mecanismos incluyen anular el desarrollo de los profármacos y la sobreexpresión de los blancos farmacológicos²⁸. Así mismo, diversos sistemas de expulsión de fármacos han sido identificados en *Mtb* y se expresan bajo diferentes condiciones³⁰. Estos sistemas han tomado gran relevancia como uno de los principales mecanismos de resistencia.

1.2.1. Bombas de eflujo

Los sistemas de bombas de eflujo, son constituyentes importantes de la fisiología bacteriana y eucarióticas. Estos transportadores están involucrados en la captación de nutrientes esenciales y iones, excreción de productos del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas, además de participar en procesos de comunicación entre células y el medio ambiente. Pueden ser activadas por el sistema inmune o inducción por fármacos, cuando *Mtb* entra en el macrófago humano. Una vez activadas, las bombas de eflujo tienen la capacidad de expulsar una amplia gama de antibióticos gracias a su especificidad a multi-sustratos, disminuyendo la acumulación de fármacos antimicobacterianos y reduciendo su concentración citoplasmática a niveles subinhibitorios, lo que conlleva a la adquisición de mecanismos de resistencia adicionales por la disminución de la

concentración intracelular de los antibióticos y promueven la acumulación de mutaciones³¹. En el caso de *Mtb*, se han reportado algunas capaces de expulsar casi todos los fármacos antituberculosos³².

1.22 Inhibidores de Bombas de Eflujo (IBE)

Actualmente, el papel de algunos compuestos como inhibidores de las bombas de eflujo (IBE) se han destacado, ya que pueden actuar: 1) en la unión, ensamblaje o función de la bomba, 2) en la disrupción de gradientes transmembrana utilizados por transportadores secundarios, 3) como inhibidores de la unión a los compuestos anti-TB a las bombas, 4) por competición con el eflujo, e incluso 5) bloqueando el eflujo de los antibióticos en los macrófagos, que llevan a un incremento intracelular de los fármacos, potencializando su efecto contra *Mtb*³³. Además, el uso de IBE afecta el crecimiento bacteriano, la resistencia a los fármacos y acorta el tratamiento³⁴.

Existen diferentes tipos de IBE que incluyen derivados sintéticos como: el **a)** carbonilcianida *m*-clorofenilhidrazona (CCCP), **b)** el dinitrofenol (DNP), **c)** la valinomicina, **d)** el verapamil y **e)** las fenotiazinas³⁵⁻³⁹. Igualmente, algunos derivados de fuentes naturales han demostrado su actividad como IBEs entre los que se destacan: **f)** la reserpina, **g)** la piperina y **h)** la berberina^{40, 41} (Figura 2).

Sin embargo, no solo el descubrimiento de nuevas entidades moleculares con actividad anti-TB es importante. Actualmente, como parte de los esfuerzos de la Organización Mundial de la Salud para tratamiento acertado de MDR/XDR TB se ha empezado con el uso de manera combinada de nuevos fármacos como bedaquilina y delamanid⁵. El efecto

sinergista entre fármacos empleados en el tratamiento de TB con fármacos que presentan un segundo mecanismo de acción ha sido demostrado empíricamente⁴²⁻⁴⁴.

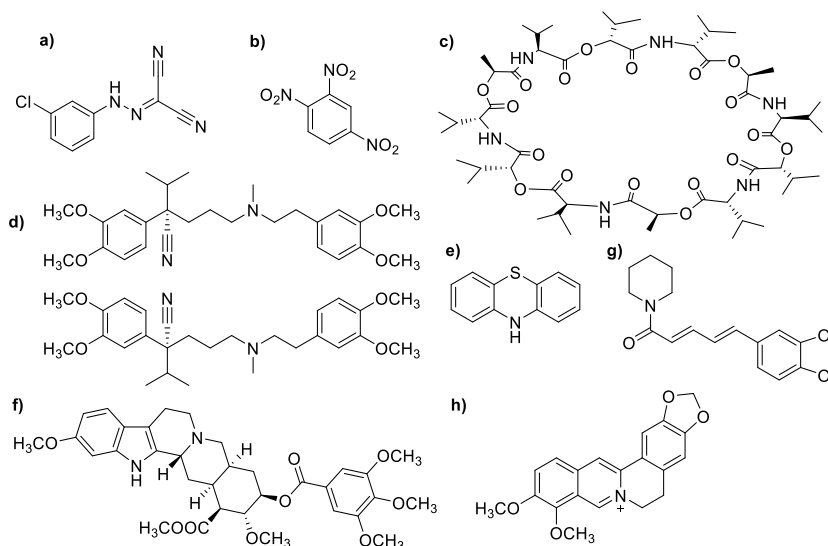


Figura 2. Compuestos Inhibidores de Bombas de Expulsión de fármacos (IBEs) provenientes de fuentes sintéticas y naturales

1.3. Diseño de Nuevos fármacos antituberculosos: Estudios QSAR.

El diseño de fármacos es un proceso que requiere de innovadoras técnicas y métodos computacionales avanzados. Hoy en día, las técnicas de diseño de fármacos son de suma importancia para la predicción del perfil biológico, identificación de moléculas bioactivas, generación de derivaciones y acelerar la optimización de cabezas de serie a fármacos candidatos.

Los estudios cuantitativos de la relación estructura-actividad (QSAR, *quantitative structure-activity relationships*) han funcionado como una herramienta valiosa en el diseño de fármacos. Por décadas los métodos QSAR han sido aplicados en el desarrollo de relaciones entre las propiedades químicas de las sustancias y sus actividades biológicas para obtener un modelo estadístico confiable capaz de predecir las actividades de nuevas entidades químicas²⁴.

El proceso de diseño de fármacos comienza cuando se considera la hipótesis que relaciona características moleculares de una serie de moléculas hacia una actividad biológica. Cuando no se tiene un conocimiento detallado del proceso biológico responsable de la actividad, la hipótesis generalmente es refinada examinando similitudes y diferencias estructurales entre las moléculas activas e inactivas. Luego, se realiza una selección basada en farmacóforos responsables de la actividad, con diferentes propiedades o descriptores moleculares, la interacción de energía en los campos, correspondiente a los valores de los experimentos biológicos o bioquímicos que incluyen la afinidad de unión y la toxicidad. Finalmente se puede realizar un modelado estadístico que sea capaz de predecir la actividad biológica de interés²⁴.

Los métodos quimiométricos incluyen: método de regresión lineal múltiple (MLR), mínimos cuadrados parciales (PLS), análisis de componentes principales (PCA), regresión de componentes principales (PCR) y el método no lineal de redes neuronales artificiales (ANN), entre otros²⁵. Basados en la forma en que los valores de los descriptores, o las representaciones son derivadas, los estudios QSAR pueden ser categorizados como: 1) 1D-QSAR, correlaciona actividad con propiedades globales de la molécula como *pKa*, *logP*, etc.; 2) 2D-QSAR, correlaciona actividad con patrones estructurales como índices de conectividad, farmacóforos 2-D, sin tomar en cuenta la forma 3D de estas propiedades; 3) 3D-QSAR, correlaciona la actividad con interacciones no covalentes en los campos alrededor de las moléculas; se considerará un nD-QSAR dependiendo de la consideración adicional, que puede incluir el ensamble del ligando, diferentes modelos inducidos, modelos de solvatación, estructura de la diana biológica, etc.

CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

2.1. Compuestos antimicrobianos de *Larrea tridentata*: Ácido *meso*-dihidroguaiarético.

Previamente, nuestro grupo de investigación reportó la actividad antimicrobiana del extracto clorofórmico obtenido de partes aéreas de *Larrea tridentata* (*Zyphyllaceae*)⁴⁵. Posteriormente, se aisló y caracterizó el lignano ácido *meso*-dihidroguaiarético (Figura 3) que posee actividad contra cepas TB-MFR con valores de CMI en el rango de 12.5-50 $\mu\text{g/mL}$ ⁴⁶.

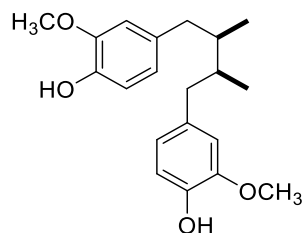


Figura 3. Estructura del Ácido *meso*-dihidroguaiarético (*AmDG*)

Adicionalmente se realizaron aportaciones sobre el mecanismo de acción del *AmDG* sobre *Mtb* señalando que el lignano tiene como blanco farmacológico la CoA transferasa que interfiere en las rutas de degradación del geraniol y el 2-metilnaftaleno. El *AmDG* inhibe a esta enzima, lo que provoca que geraniol no pueda ser degradado, provocando que este monoterpeno se acumule al interior de la micobacteria a altos niveles que llegan a ser tóxicos, ocasionando daño a nivel de la membrana celular, alteración de los procesos celulares y posterior muerte de la micobacteria⁴⁷.

Se sugirió mediante un *docking*, con una CoA transferasa hipotética de *Mtb* construida a partir de una glutaconato CoA-transferasa de *Acidaminococcus fermentans* y una acetato

CoA-transferasa de *E. coli*, que el lignano se une a la CoA transferasa de *Mtb* en su sitio activo, donde tiene interacciones con residuos de 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 4)⁴⁷.

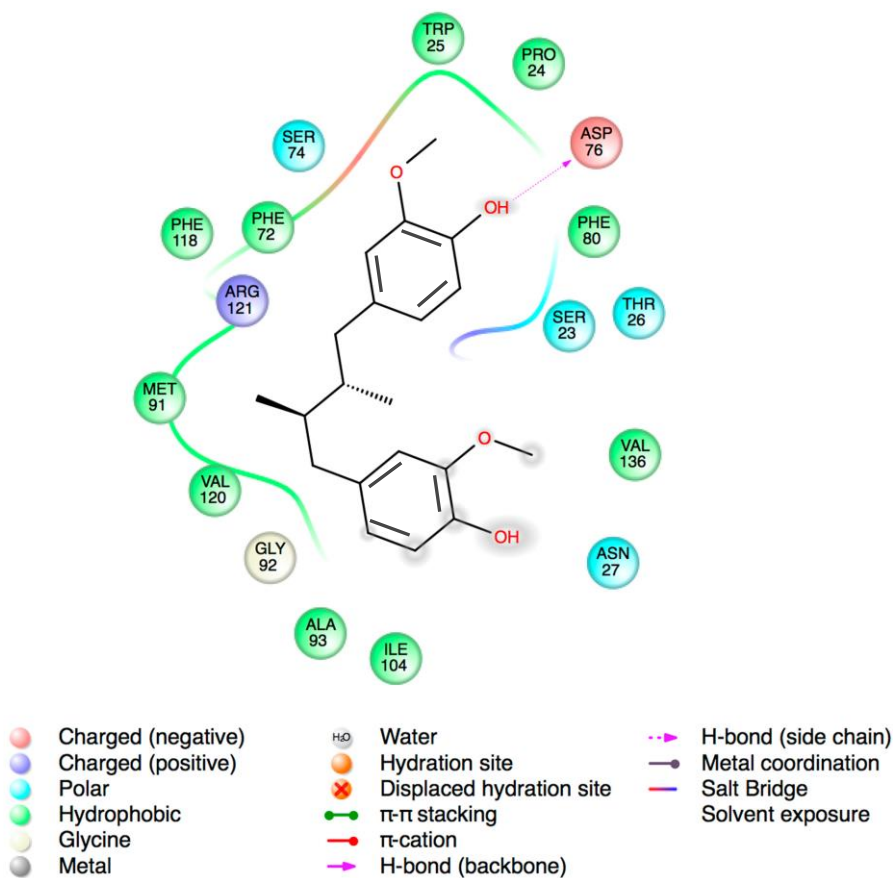


Figura 4. Interacciones del AmDG con el sitio activo de la CoA-Mtb (tomado de Clemente-Soto *et al.* 2014⁴⁷)

2.2. Derivados semi-sintéticos del AmDG.

Sabiendo que el *AmDG* presenta actividad antimicrobacteriana y que además presenta un blanco farmacológico diferente a los fármacos empleados en el tratamiento de TB, se obtuvieron 28 análogos del mismo con fragmentos de tipo éter, éster o aminoéter. De los análogos, 16 presentaron actividad antimicrobacteriana. Los ésteres del *AmDG* presentaron actividades moderadas (CMI 12.5-50 $\mu\text{g/mL}$) tanto para las cepas MDR 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 $\mu\text{g/mL}$) y moderada CMI (12.5-50 $\mu\text{g/mL}$), siendo los aminoéteres KRM-12d y KRM-15d los que presentaron mejor actividad e IS >10 (Figura 5)⁴⁸.

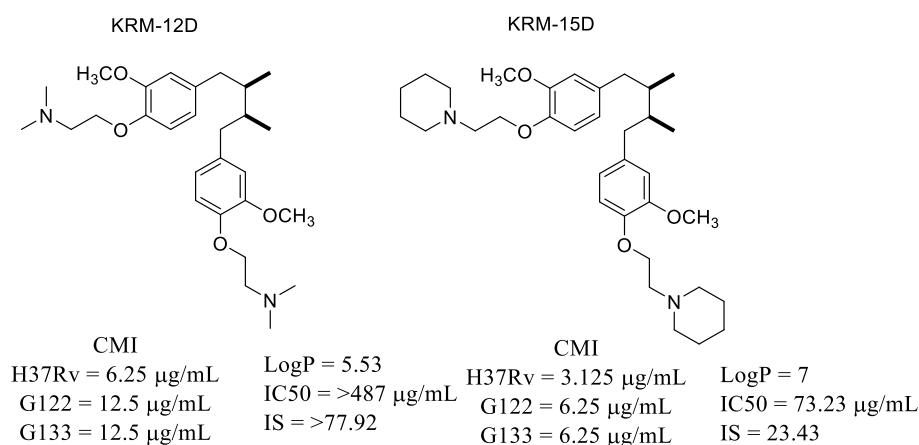


Figura 5. Análogos del *AmDG* de tipo aminoéter más activos

Haciendo un análisis de la estructura química-actividad biológica se observó que la importancia de los grupos hidrofóbicos y los grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, aumentan la actividad anti-TB de los derivados del *AmDG*⁴⁸. El análisis de campo molecular respalda la idea de que la hidrofobicidad es necesaria para incrementar la actividad. En la tabla 3 se muestra una comparación del análisis QSAR para las tres cepas de *Mtb*.

Tabla 3. Comparación del estudio QSAR entre las tres cepas de *M. tuberculosis*

<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> G122	<i>M. tuberculosis</i> G133
Cambios Dramáticos:		
Grupos aromáticos y anillos de 6 miembros que contienen nitrógeno.	Incorporación de heterociclos de 6 miembros y patrón de sustitución	Incorporación de heterociclos de 6 miembros
Análisis del farmacóforo		
<p>Disminuye actividad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incorporación de grupos aceptores de puentes de hidrógeno (éteres o amidas). <p>Aumenta actividad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupos precursores de grupos cargados positivamente (aminas). <p>Poca o nula influencia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupos hidrofóbicos, cargados negativamente o aromáticos. • En combinación estos grupos podrían producir actividad anti-TB. 	<p>Disminuye actividad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incorporación de grupos donadores de puentes de hidrógeno. <p>Aumenta Actividad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupos precursores de grupos cargados positivamente (aminas) y grupos hidrofóbicos (grupos alifáticos). <p>Poca o nula influencia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupos aromáticos y aceptores de puentes de hidrógeno. • En combinación asimétrica, podrían producir actividad anti-TB. 	<p>Disminuye actividad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incorporación inadecuada de grupos aceptores y donadores de puentes de hidrógeno y grupos aromáticos. <p>Aumenta actividad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupos precursores de grupos cargados positivamente (aminas) y grupos hidrofóbicos (grupos alifáticos).
Análisis del campo molecular		
<p>Factores estéricos e hidrofóbicos contribuyen principalmente a la actividad anti-TB (> 72%).</p> <p>Factores hidrofóbicos son más sensibles a un patrón mono-sustituido.</p> <p>Se puede aumentar la actividad si se agregan grupos hidrofóbicos y estéricos, fragmentos alicíclicos en un lado y aceptores de puentes de hidrógeno (aminas) en el lado opuesto.</p>	<p>Factores estéricos e hidrofóbicos contribuyen principalmente a la actividad anti-TB (> 80%).</p> <p>Factores hidrofóbicos son más sensibles a un patrón mono-sustituido con preferencia por sustituyentes hidrofóbicos como las aminas.</p> <p>Se puede aumentar la actividad si se agregan grupos voluminosos como aminas voluminosas de manera asimétrica con un balance de aceptores de puentes de hidrógeno.</p>	<p>Factores estéricos e hidrofóbicos contribuyen principalmente a la actividad anti-TB (> 83%).</p> <p>Factores hidrofóbicos son más sensibles a un patrón <i>meso</i>-sustituido.</p> <p>Se puede aumentar la actividad si se agregan grupos hidrofílicos, así como un balance cuidadoso de los donadores y aceptores.</p>

2.3. Éteres y carbamatos como antimicobacterianos

Previamente se ha reportado en la literatura la preparación de derivados semisintéticos o sintéticos como carbamatos⁴⁹, éteres⁵⁰, aminoalcoholes y aminoéteres⁵¹ los cuales se han diseñado para obtener moléculas anti-TB. A continuación, se describen algunos ejemplos de este tipo de reacciones y sus actividades anti-TB.

Agrawal y colaboradores, en el 2008, realizaron un estudio donde se evaluó la actividad anti-TB del extracto clorofórmico de *Curcuma longa* (CMI 1000 µg/mL) y se determinó que la desmetoxicurcumina (**i**) fue el compuesto responsable de la actividad (CMI 200 µg/mL) contra *M. tuberculosis* H37Rv. El derivado semisintético bisdemetoxicurcumina (**j**) presentó una actividad antituberculosa (CMI 7.812 µg/mL) 25 veces mayor que el producto natural, este derivado se sintetizó para incrementar la lipofilidad al agregar a la cadena ésteres de ácido graso a los grupos hidroxilo del fenol de la molécula original⁵⁰.

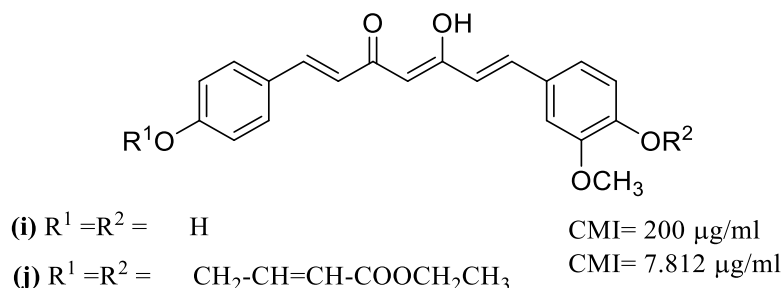
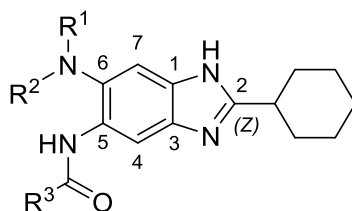


Figura 6. Estructura química de demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina

Kumar y colaboradores, en el 2011, sintetizaron derivados de benzimidazoles que presentaron CMI en un rango de 0.63-3.13 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* MFR. En la figura 7 se muestran derivados **k-m** con un grupo ciclohexilo en posición 2; con carbamatos en posición 5 y amino en posición 6⁵². Posteriormente, y debido al gran número de posibilidades promisoras ya analizadas tanto *in vitro* e *in vivo*,

se realizó una optimización por estudios de relación estructura química-actividad biológica cuantitativa (SAR, por sus siglas en inglés) con modificaciones estructurales en la posición 5 y 6. De los 63 compuestos ensayados, el derivado **(n)** con el carbamato en la posición 5 presentó la mejor actividad (CMI 0.06 $\mu\text{g/mL}$)⁵³.

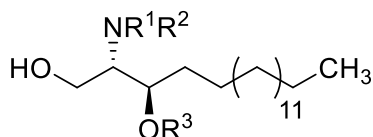


(k)	$R^1=R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$	$R^3 = \text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	CMI= 0.63 $\mu\text{g/mL}$
(l)	$R^1-R^2 = (\text{CH}_2)_4$	$R^3 = \text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	CMI= 0.39 $\mu\text{g/mL}$
(m)	$R^1-R^2 = (\text{CH}_2)_4$	$R^3 = \text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	CMI= 3.13 $\mu\text{g/mL}$
(n)	$R^1=R^2 = \text{CH}_3$	$R^3 = \text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	CMI= 0.06 $\mu\text{g/mL}$

Figura 7. Derivados sintéticos de benzimidazoles con actividad antimicobacteriana

En otro tipo de estudios con salicilanilidas y sus derivados, se observó que la incorporación de carbamatos resultaba en excelentes CMIs de 0.2 a 2.1 μM contra la cepa de *M. abscessus*, mientras que para la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv fueron de 0.2 μM , e incluso fueron activas en cepas MDR y XMDR de *M. tuberculosis* con MICs $\geq 1.0 \mu\text{M}$ ⁵⁴.

Del Olmo y colaboradores, en el 2009, sintetizaron la dihidroesfingosina **(o)** por su alta relación estructural con el etambutol y también obtuvieron sus derivados (Figura 8). El aminoéter **(p)** mostró potencial antituberculoso con CMI de 1.25 $\mu\text{g/mL}$ en contra de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y aislados clínicos MFR, mientras que el compuesto **(q)**, un aminoalcohol, presentó CMI de 0.78 $\mu\text{g/mL}$ contra cepas MFR⁵¹.



- (o) $R^1=R^2 = H$ $R^3 = H$
 (p) $R^1=R^2 = CH_2CH_3$ $R^3 = Bn$ CMI= 1.25 $\mu\text{g/mL}$
 (q) $R^1=R^2 = CH_2CH_3$ $R^3 = H$ CMI= 0.78 $\mu\text{g/mL}$

Figura 8. Dehidroesfingosina y sus derivados

Por otra parte, los éteres han resultado importantes en el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos, estudios con algunos diaril éteres han mostrado actividad inhibitoria importante tanto *in vitro* como *in vivo* sobre una enoil-ACP reductasa de *Mtb*⁵⁵⁻⁵⁹. En cambio, algunos carbamatos han sido reportados con buenas actividades antimicobacterianas, además de inhibir la proteína FtsZ involucrada en la división celular de la bacteria⁵².

Por todo lo mencionado anteriormente, el AmDG se posiciona como un candidato ideal para la obtención de derivados semi-sintéticos de tipo carbamato, éter y aminoéter. Dichos derivados del AmDG podrían dar lugar a nuevas moléculas con actividad antituberculosa mayor o igual a la del producto natural e incluso mayor a la de los fármacos anti-TB empleados actualmente y con un mecanismo de acción diferente a los ya reportados para los mismos.

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Al menos un derivado semisintético del *AmDG* presentará mayor actividad antimicobacteriana, menor citotoxicidad y un mecanismo de acción distinto en comparación con los estándares positivos etambutol o levofloxacina.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo General

Sintetizar y caracterizar estructuralmente análogos de tipo carbamato, éter y aminoéter del *AmDG*, determinar su actividad antimicobacteriana, citotoxicidad, relación estructura química-actividad biológica cuantitativa y algún probable mecanismo de acción del compuesto más activo.

3.2.2. Objetivos Específicos

1. Aislar y caracterizar el *AmDG* del extracto orgánico de *L. tridentata*.
2. Sintetizar, purificar y caracterizar estructuralmente análogos del *AmDG*.
3. Determinar la actividad antimicobacteriana de los análogos del *AmDG* contra *M. tuberculosis* H37Rv y dos aislados clínicos MFR.
4. Determinar la citotoxicidad de los análogos más activos.
5. Determinar la relación estructura química-actividad biológica cuantitativa de los análogos del *AmDG*.
6. Determinar un posible mecanismo de acción del análogo más activo del *AmDG*.

CAPÍTULO VI

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material y equipo

4.1.1. Técnicas cromatográficas

Para la cromatografía en columna (CC) se empleó gel de sílice (63-200 μm) (Sigma-Aldrich). Para la cromatografía en placa fina se emplearon cromatofolios de gel de sílice 60F-254 (Fluka Analytical). La cromatografía preparativa plana se realizó en cromatoplasmas preparativas de gel de sílice 60F-254 20 X 20 cm (Merck). Los eluyentes empleados en las cromatografías fueron: cloroformo pureza 98.8% (CHCl_3), metanol pureza 99.999 (MeOH), acetato de etilo pureza 99.99%(AcOEt), hexano (Hex) pureza 98.999% marca Baker, USA.

4.1.2. Elucidación estructural de los derivados del *AmDG*

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns. 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. Se empleó el programa MestRenova para procesar los FIDs. También se utilizó Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EMAR) con la técnica de Ionización por Electro Spray positivo (ESI +), 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.

4.2. Aislamiento y purificación del AmDG

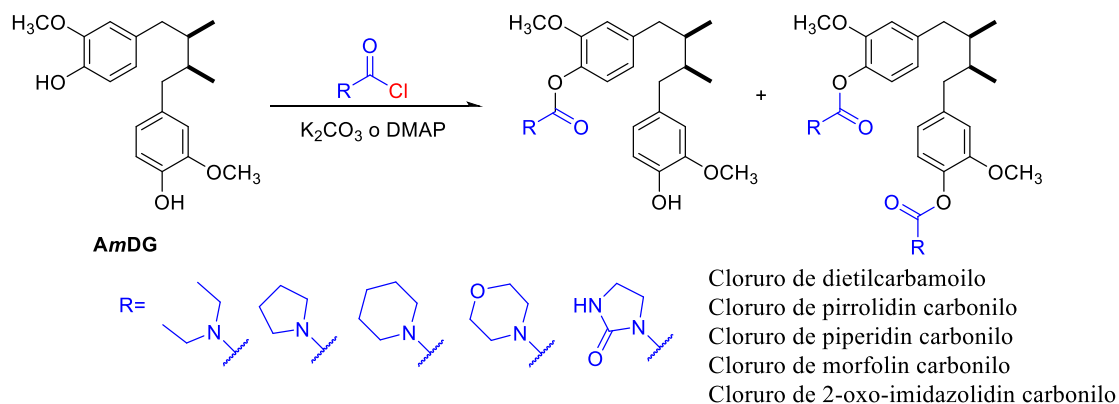
A partir de un extracto cloroformo/metanol 1:1 (223 gr) de hojas de *L. tridentata*, previamente obtenido por el grupo de trabajo, se realizó una cromatografía en columna (CC) usando como fase estacionaria (FE) gel de sílice y fase móvil (FM) un gradiente de hexano (Hex) /acetato de etilo (AcOEt), y AcOEt/metanol (MeOH) obteniéndose 330 fracciones. De las fracciones 124-168 eluidas con un gradiente de Hex/AcOEt 65:35 se obtuvo el lignano impuro, el cual se purificó por medio de sucesivas CC en gel de sílice eluidas con gradientes de Hex/AcOEt, Hex/acetona, Hex/CHCl₃ y CHCl₃100%. Luego se realizaron algunas cromatografías preparativas planas con mezclas de diclorometano (CH₂Cl₂)/AcOEt/Hex (99:0.5:0.5) y recristalizaciones con Hex/acetona para obtener 780 mg del AmDG puro, con un rendimiento de 0.35%.

4.3. Síntesis y purificación de los derivados del AmDG

Se sintetizaron 20 análogos del AmDG, de los cuales 9 son de tipo carbamato, 10 de tipo éter y 1 de tipo aminoéter.

4.3.1. Síntesis de carbamatos del AmDG

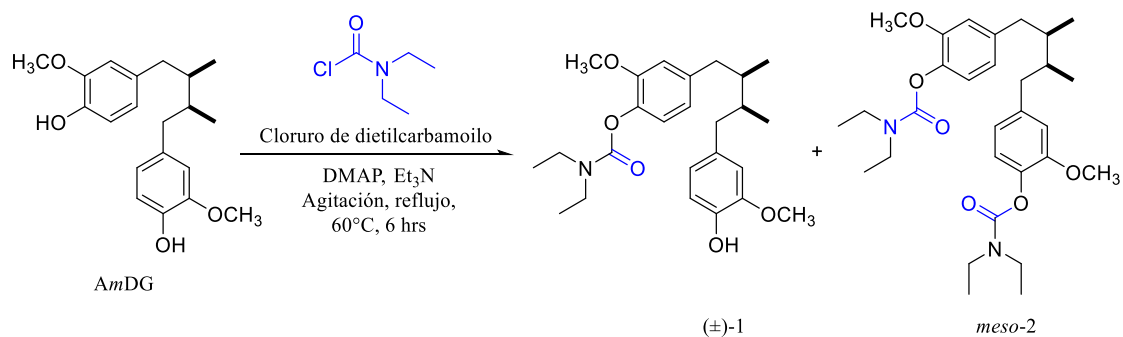
La síntesis de la serie de carbamatos del AmDG (Esquema 1) se realizó por medio de una reacción entre el lignano AmDG (1 equivalente) y diferentes cloruros de carbamoilo (1.5 – 2 equivalentes) en presencia de bases, en solvente aprótico, con agitación bajo reflujo.



Esquema 1. Reacción general para análogos del AmDG de tipo carbamato.

4.3.1.1. Síntesis de los derivados (\pm) 1 y *meso*-2

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de AmDG y 1.39 mg de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP, 15 mol%, 0.0113 mmol) en trietilamina anhidra (TEA, 2.5 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 20.5 mg del cloruro de dietil carbamoilo (2 meq, 0.1513 mmol) (Esquema 2). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a 60°C y monitoreada por 6 horas en CCF con un sistema de elución de Hex/acetona 7:3.



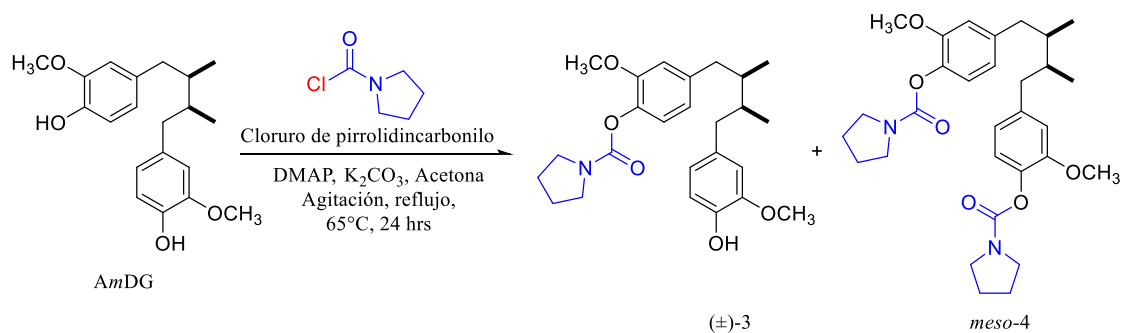
Esquema 2. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-1 y *meso*-2

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con HCl 10% (1 mL) y CHCl₃ (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de sulfato de sodio (Na₂SO₄) para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó por

cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de Hex/acetona realizando cambios de porcentaje de 5%, el volumen de las fracciones fue de 300 μ L. Tanto los productos de reacción como el producto natural se obtuvieron a una polaridad 85:15. El derivado disustituido se obtuvo en las fracciones 23-26, mientras que de las fracciones 27-37 se obtuvo una mezcla de los productos mono y di sustituidos. En las fracciones 38-48 se obtuvo el producto monosustituido y de la 49-58 una mezcla de producto natural y derivado monosustituido

4.3.1.2. Síntesis de los derivados (\pm) 3 y *meso*-4

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG*, 4.62 mg de DMAP (50 mol%, 0.04 mmol) y 17.78 mg de K_2CO_3 (1.7 meq, 0.1286 mmol) en acetona anhidra (2.5 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 17.18 mg del cloruro de pirrolidincarbonilo (1.7 meq, 0.1286 mmol) (Esquema 3). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a 65°C y monitoreada por 24 horas en CCF con un sistema de elución de Hex/AcOEt 6:4.



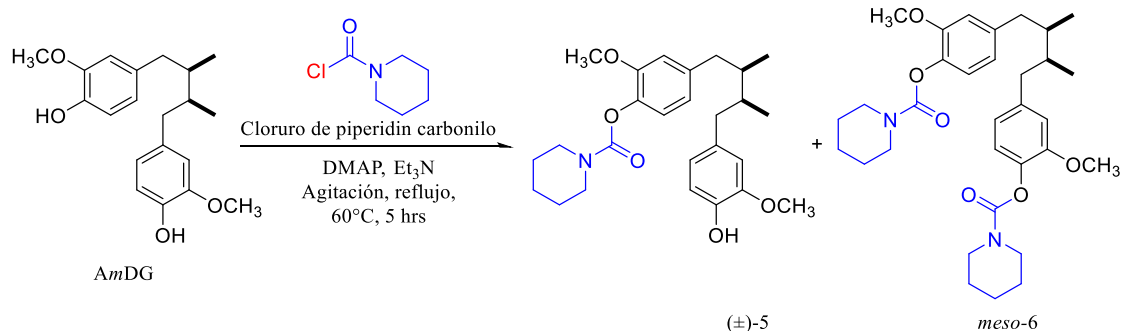
Esquema 3. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-3 y *meso*-4

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con HCl 10% (1 mL) y $CHCl_3$ (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de Na_2SO_4 para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó por cromatografía en

columna, la fase móvil fue un gradiente de Hex/AcOEt realizando cambios de porcentaje de 5%, el volumen de las fracciones fue de 3 mL. El derivado monosustituido se obtuvo en la polaridad 85:15, en las fracciones 71-100, una mezcla de derivados mono y disustituidos se observó en las fracciones 101-150, mientras que el derivado disustituido se obtuvo en la polaridad 70:30, en las fracciones 151-240.

4.3.1.3. Síntesis de los derivados (\pm)-5 y *meso*-6

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* y 5.55 mg de DMAP (60 mol%, 0.045 mmol) en Et₃N anhidra (2.5 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 18.98 mg (16.09 μ L) del cloruro de piperidincarbonilo (1.7 meq, 0.1286 mmol) (Esquema 4). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a 60°C y monitoreada por 5 horas en CCF con un sistema de elución de Hex/acetona 65:35.



Esquema 4. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-5 y *meso*-6

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con HCl 10% (1 mL) y CHCl₃ (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de Na₂SO₄ para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de Hex/acetona realizando cambios de porcentaje de 5%, el volumen de las fracciones fue de 300 μ L. El derivado disustituido se obtuvo en

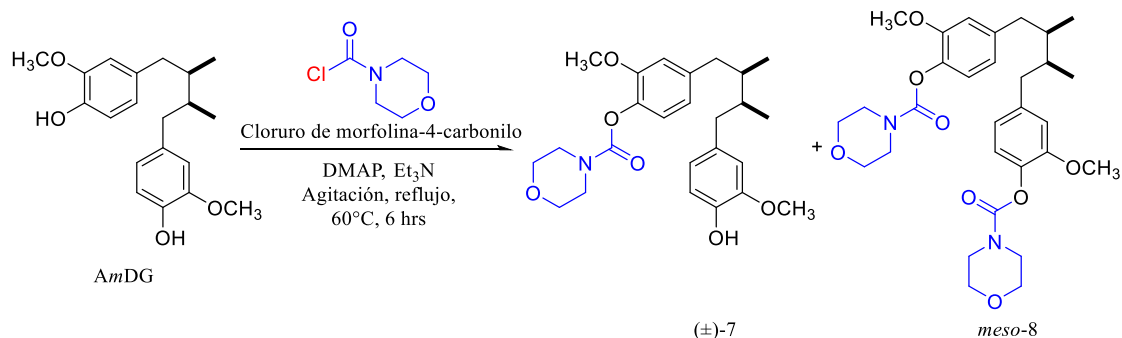
la polaridad 85:15, en las fracciones 25-42, seguido a una mezcla de los derivados mono y disustituidos de las fracciones 43-77, posteriormente en las fracciones 78-95 se encontraron la mezcla del producto disustituido y el producto natural.

Posteriormente se pasó a una semipurificación empleando como sistema hexano/acetato de etilo, con cambios de polaridad de 2% y fracciones de 300 μ L. Se encontró el producto disustituido de la fracción 19-24 en la polaridad 88:12, seguido a una mezcla de mono y disustituido de las fracciones 25-48 y finalmente el producto monosustituido en la polaridad 88:12 de la fracción 49-60.

Una última purificación con el sistema anterior, cambios de 5% y fracciones de 500 μ L. Ambos productos se encontraron en la polaridad hexano/AcOEt 95:5. El producto disustituido se encontró en las fracciones 64-82, mientras que el monosustituido se encontró en las fracciones 89-100.

4.3.1.4. Síntesis de los derivados (\pm)-7 y *meso*-8

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* y 4.62 mg de DMAP (50 mol%, 0.0378 mmol) y en Et₃N anhidra (2.5 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 16.98 mg (13.24 μ L) del cloruro de morfolin -4-carbonilo (1.5 meq, 0.1135 mmol) (Esquema 5). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a 60°C y monitoreada por 6 horas en CCF con un sistema de elución de Hex/AcOEt 6:4.

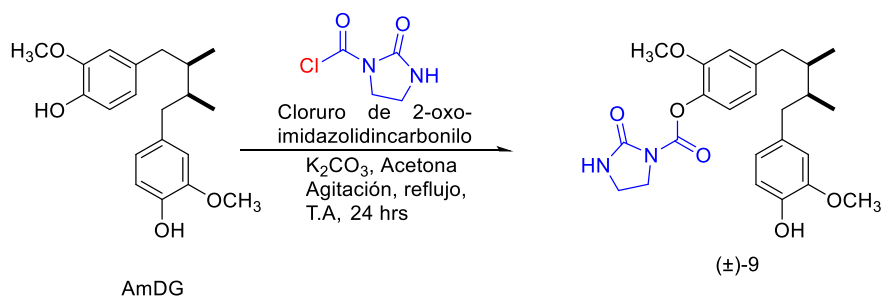


Esquema 5. Reacción para la síntesis de los análogos (±)-7 y *meso*-8

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con HCl 10 % (1 mL) y CHCl₃ (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de Na₂SO₄ para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de Hex/AcOEt realizando cambios de porcentaje de 5%, el volumen de las fracciones fue de 300 μ L. El derivado monosustituido se obtuvo en la polaridad 85:15, en las fracciones 202-264, mientras que el derivado disustituido se obtuvo en AcOEt 100% en las fracciones 300-312.

4.3.1.5. Síntesis del derivado (±)-9

Síntesis: Se disolvieron 20 mg (0.0605 mmol) de AmDG, 16.73 mg de carbonato de potasio K₂CO₃ (2 meq, 0.1210 mmol) en acetona anhidra (2 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 17.98 mg del cloruro de 2-oxo-imidazolidincarbonilo (2 meq, 0.1210 mmol) (Esquema 6). La mezcla de reacción fue colocada a temperatura ambiente y monitoreada por 24 horas en CCF con un sistema de elución de CHCl₃/MeOH 9:1.

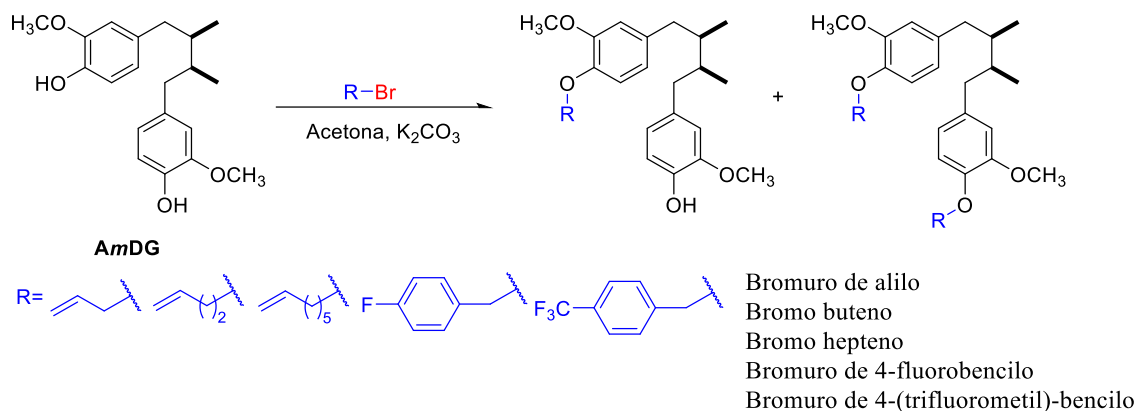


Esquema 6. Reacción para la síntesis del análogo (±)-9

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con solución saturada de NaCl (1 mL) y $CHCl_3$ (3 mL), repitiéndose el proceso dos veces. La purificación se realizó por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de $CHCl_3/MeOH$ realizando cambios de porcentaje de 2%, el volumen de las fracciones fue de 2 mL. El derivado monosustituido se obtuvo en la polaridad 98:2, en las fracciones 39-65, mientras que el derivado disustituido y una serie de subproductos se obtuvieron en la polaridad 96:4, en las fracciones 76-180.

4.3.2. Síntesis de éteres del AmDG

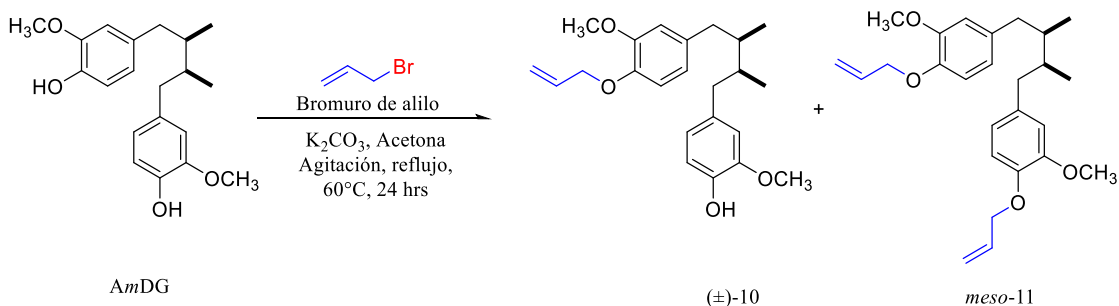
La síntesis de la serie de éteres del AmDG se realizó por medio de la reacción de Williamson entre el lignano AmDG (1 equivalente) y diferentes bromuros de alquilo y bencilo (2–3 equivalentes) en presencia de bases, en solvente aprótico, con agitación bajo reflujo (Esquema 7).



Esquema 7. Reacción general para análogos del AmDG de tipo éter.

4.3.2.1. Síntesis de los derivados (\pm)-10 y *meso*-11

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de AmDG y 31.37 mg K_2CO_3 (3meq, 0.2269 mmol) en acetona anhidra (2.5 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 27.46 mg de bromuro de alilo (3 meq, 0.2270 mmol) (Esquema 8). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a $60^\circ C$ y monitoreada por 24 horas en CCF con un sistema de elución de Hex/Acetona 7:3.



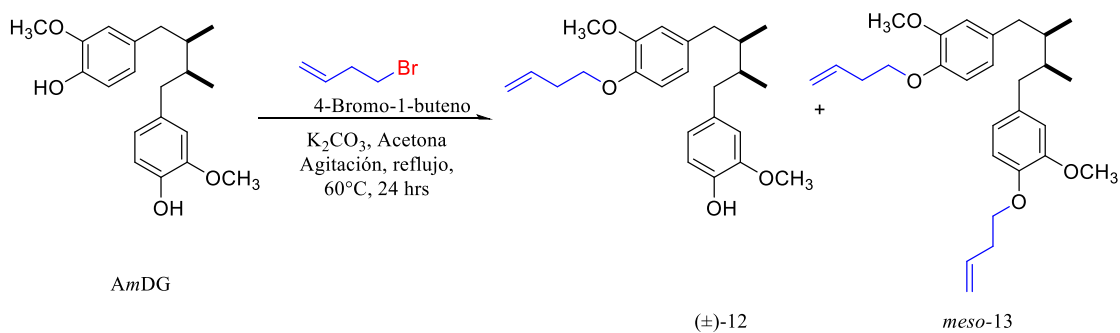
Esquema 8. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-10 y *meso*-11

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con una solución saturada de NaCl (1 mL) y $CHCl_3$ (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de Na_2SO_4 para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó

por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de hexano/acetona realizando cambios de porcentaje de 2%, el volumen de las fracciones fue de 400 μ L. El derivado disustituido se obtuvo en la polaridad 96:4, en las fracciones 41-55, mientras que el derivado monosustituido se obtuvo impuro en la misma polaridad en las fracciones 61-115, por lo que se realizó una CPP con un sistema de Hex/Acetona 7:3.

4.3.2.2. Síntesis de los derivados (\pm)-12 y *meso*-13

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *Am*DG y 20.91 mg de K_2CO_3 (2 meq, 0.1513 mmol) en acetona anhidra (2.5 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 20.43 mg (15.36 μ L) de 4-bromo-1-buteno (2 meq, 0.1513 mmol) (Esquema 9). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a 65°C y monitoreada por 24 horas en CCF con un sistema de elución de Hex/Acetona 7:3.



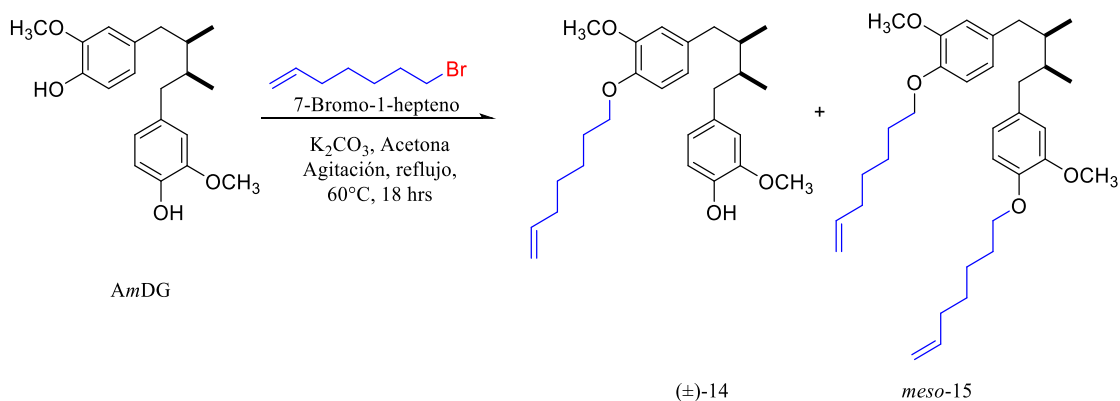
Esquema 9. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-12 y *meso*-13

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con una solución saturada de NaCl (1 mL) y CHCl₃ (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de Na₂SO₄ para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de Hex/Acetona realizando cambios de porcentaje de 2%, el volumen de las fracciones fue de 500 μ L. El derivado

disustituido se obtuvo en la polaridad 98:2, en las fracciones 21-44, mientras que el derivado monosustituido se obtuvo en la polaridad 98:2, en las fracciones 45-90, dicho derivado se encontraba con impurezas por lo que se realizó una CPP empleando un sistema Hex/Acetona 7:3.

4.3.2.3. Síntesis de los derivados (\pm)-14 y *meso*-15

Síntesis: Se disolvieron 20 mg (0.0605 mmol) de *AmDG* y 25.1 mg de K_2CO_3 (3 meq, 0.1816 mmol) en acetona anhidra (2 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 32.17 mg (27.67 μ L) de 7-bromo-1-hepteno (3 meq, 0.1816 mmol) (Esquema 10). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a 70°C y monitoreada por 18 horas en CCF con un sistema de elución de Hex/Acetona 7:3.



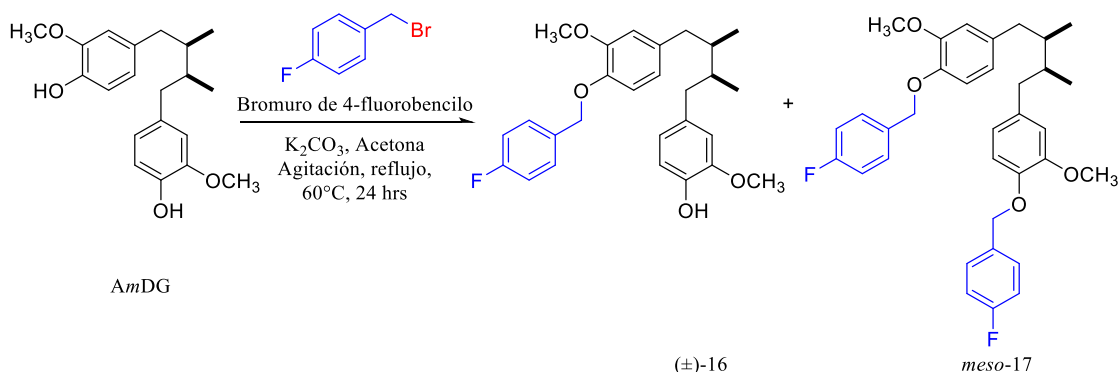
Esquema 10. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-14 y *meso*-15

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con una solución saturada de NaCl (1 mL) y CHCl₃ (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de Na₂SO₄ para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de Hex/AcOEt realizando

cambios de 5%, el volumen de las fracciones fue de 1 mL. El derivado disustituido se obtuvo en la polaridad 98:2, en las fracciones 16-30, mientras que el derivado monosustituido se obtuvo en la polaridad 98:2 en las fracciones 31-60.

4.3.2.4. Síntesis de los derivados (\pm)-16 y *meso*-17

Síntesis: Se disolvieron 25 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* y 31.37 mg de K_2CO_3 (3 meq, 0.2270 mmol) en acetona anhidra (2.5 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 42.90 mg (28.28 μ L) de bromuro de 4-fluorobencilo (3 meq, 0.2270 mmol) (Esquema 11). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a 65°C y monitoreada por 6 horas en CCF con un sistema de elución de Hex/Acetona 7:3.



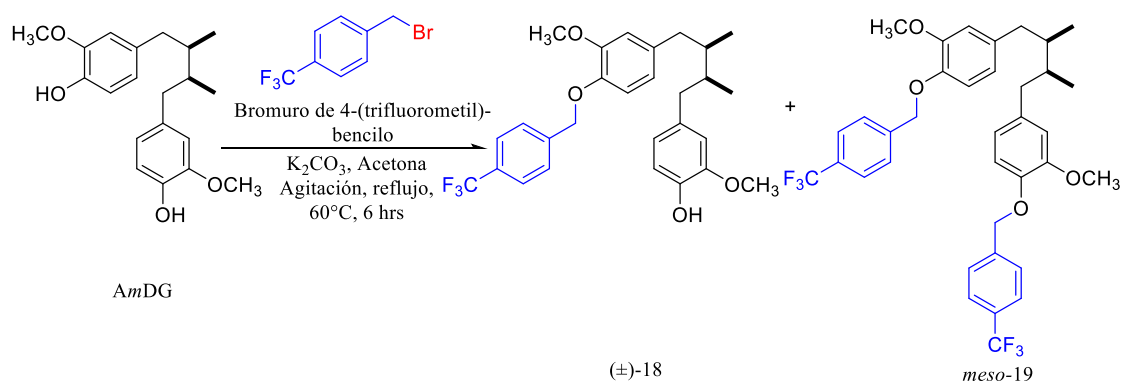
Esquema 11. Reacción para la síntesis de los análogos (\pm)-16 y *meso*-17

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con una solución saturada de NaCl (1 mL) y $CHCl_3$ (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de Na_2SO_4 para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de hexano/acetona realizando cambios de porcentaje de 2%, el volumen de las fracciones fue de 500 μ L. El

derivado disustituido se obtuvo en la polaridad 85:15, en las fracciones 101-116, mientras que en las fracciones 117-170 se observó la mezcla de los productos mono y disustituidos. Posteriormente en las fracciones 171-250 se obtuvo la mezcla de producto disustituido y producto natural. Se procedió a una semipurificación en CPP para las fracciones 117-170 empleando un sistema Hex/Acetona 7:3 para obtener el producto monosustituido. Por su parte las fracciones 211-250 se realizó una segunda columna con una fase móvil de Hex/CHCl₃ con cambios de 5% para obtener el derivado disustituido en una polaridad 9:1 en las fracciones 45-60.

4.3.2.5. Síntesis de los derivados (±)-18 y *meso*-19

Síntesis: Se disolvieron 20 mg (0.0605 mmol) de *AmDG* y 14.22 mg de K₂CO₃ (3 meq, 0.1029 mmol) en acetona anhidra (2 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 24.59 mg de bromuro de 4-(trifluorometil)-bencilo (3 meq, 0.1029 mmol) (Esquema 11). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a 70°C y monitoreada por 24 horas en CCF con un sistema de elución de Hex/Acetona 7:3.



Esquema 12. Reacción para la síntesis de los análogos (±)-18 y *meso*-19

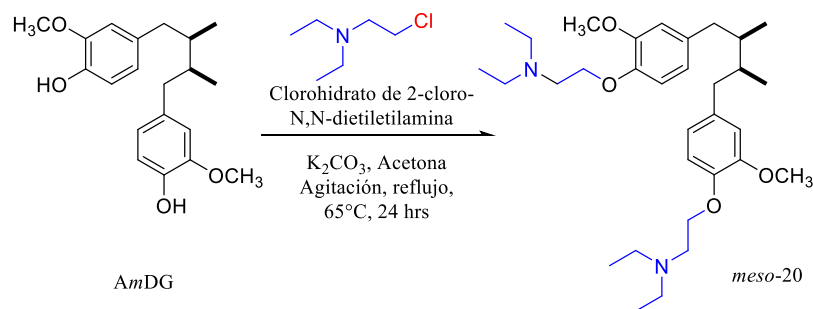
Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con una solución saturada de NaCl (1 mL) y cloroformo (CHCl₃) (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de Na₂SO₄ para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de Hex/CHCl₃ realizando cambios de porcentaje de 5%, el volumen de las fracciones fue de 2 mL. El derivado disustituido se obtuvo en la polaridad 8:2, en las fracciones 31-36, en las fracciones 37-52 se presentó la mezcla de los derivados mono y disustituidos, por lo cual se realizó una CCP con un sistema Hex/AcOEt 7:3 para obtener el derivado monosustituido.

4.3.3. Síntesis de aminoéteres del *AmDG*

Únicamente se sintetizó un aminoéter siguiendo la reacción de Williamson empleada para la síntesis de éteres (Esquema 13), donde se puso a reaccionar el lignano *AmDG* (1 equivalente) y un clorohidrato *N,N*-disustituido (2 equivalentes) en presencia de base, en solvente aprótico, con agitación bajo reflujo.

4.3.3.1. Síntesis del derivado *meso-20*

Síntesis: Se disolvieron 20 mg (0.0756 mmol) de *AmDG* y 25.09 mg K₂CO₃ (3 meq, 0.1815 mmol) en acetona anhidra (2.5 mL) por 5 minutos, posteriormente se agregaron 20.82 mg de clorohidrato de 2-cloro-*N,N*-dietilamina (2 meq, 0.121 mmol) (Esquema 13). La mezcla de reacción fue colocada bajo reflujo a 65°C y monitoreada por 24 horas en CCF con un sistema de elución de CH₂Cl₂/MeOH/Ácido acético 85:10:5.



Esquema 13. Reacción para la síntesis del análogo *meso-20*

Purificación: La mezcla de reacción cruda se secó y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con una solución saturada de NaCl (1 mL) y CHCl₃ (3 mL), repitiéndose el proceso tres veces. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada sobre una cama de Na₂SO₄ para eliminar cualquier resto de fase acuosa. La purificación se realizó por cromatografía en columna, la fase móvil fue un gradiente de hexano/acetona realizando cambios de porcentaje de 5%, el volumen de las fracciones fue de 1 mL. El derivado disustituido se obtuvo en la polaridad 70:30, en las fracciones 155-177.

4.4. Ensayos biológicos

4.4.1 Actividad Antimicobacteriana

El ensayo de actividad antimicobacteriana se llevó a cabo por medio de la técnica implementada por Franzblau y colaboradores, como se describe a continuación⁶⁰⁻⁶¹.

4.4.1.1. Cepas y cultivo

En el ensayo se empleó la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27794, que es sensible a los fármacos de primera línea: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida. Así mismo se emplearon dos aislados clínicos MDR obtenidos del cepario del Hospital Universitario de la UANL, identificados como G122 que es resistente a

isoniazida, rifampicina y etambutol, mientras que la cepa identificada como G133 es resistente a isoniazida, rifampicina y estreptomicina. Las tres cepas fueron cultivadas en medio sólido Lowenstein Jensen (DIBICO) por 3-4 semanas. Posteriormente se realizaron resiembras de 2 a 3 colonias en medio líquido Middlebrook con 10 % de OADC 7H9 (BD) por 15 días a 37°C, con el fin de tener la bacteria en fase logarítmica de crecimiento. El inóculo para el ensayo biológico fue preparado diluyendo el cultivo en fase logarítmica en medio de cultivo con 10% de OADC y ajustando la turbidez en referencia con el tubo No.1 de la escala de McFarland, posteriormente se realizó una dilución a 1:20 con medio 7H9 con 10% de OADC.

4.4.1.2. Soluciones de trabajo

Para la preparación de las soluciones de trabajo se pesaron 1 mg de cada análogo a evaluar y se adicionarán 500 µL de DMSO al 100% para disolver y obtener una concentración de 2,000 µg/mL (stock inicial). Posteriormente de esta solución se realizó la solución de trabajo 4X (25 µL del stock inicial + 225 µL de caldo 7H9). Una vez empleado el stock inicial el restante fue almacenado a -80°C). La solución de trabajo se preparó el día del ensayo.

4.4.1.3. Ensayo antimicobacteriano

El ensayo se realizó de acuerdo con lo descrito por Franzblau *et al.*, 1998⁶². El método se basa en la capacidad de los microorganismos en crecimiento de liberar deshidrogenasas al medio que reducen el colorante resazurina (de color azul) y que vira a resorufina (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 H1-3 y H10-12, dejando los pozos del centro sin agua. Al resto de los pozos de la placa se agregaron 100 μ L de medio Middlebrook 7H9 con 10% de OADC. Después se añadieron 100 μ L de la solución de trabajo 4X (200 μ g/mL) en la fila B. Se realizaron las diluciones seriadas 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 representa el 100%, 10% y 1% de la población bacteriana a ensayar.

Las placas fueron incubadas a 37°C por 5 días y pasado ese tiempo se agregaron 20 μ L de resazurina y 12 μ L de tween 80 al 10% a todos los pocillos control, se sometió nuevamente a incubación por 24 horas a 37°C. Si los controles muestran la coloración adecuada se agrega colorante y tween a el resto de los pocillos. La placa se incuba nuevamente 24 horas y posteriormente se realizó la lectura de manera visual, considerándose inhibición donde no hubo cambio de color, es decir permaneció azul, mientras que los pocillos donde hubo cambio a rosa se tomó como inactivo. Se emplearon como controles positivos los fármacos isoniazida, rifampicina, etambutol y levofloxacina. Se determinó la CMI como la concentración mínima del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria. Los experimentos se realizaron tres veces en diferentes días.

4.4.2. Citotoxicidad

4.4.2.1. Células y cultivo

La línea celular Vero (ATCC-CCL-81) fue cultivada en medio Dulbecco Eagle modificado (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco) y suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (SFB; Gibco), 100 U/mL de penicilina (InVitro), 100 µg/mL de estreptomicina (InVitro) y 2.5 µg/mL de anfotericina B (InVitro) en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

4.4.2.2. Soluciones de trabajo

Las soluciones stock se realizaron en medio de cultivo hasta obtener concentraciones finales de 7.8, 15.6, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 µg/mL con una concentración final de DMSO de 0.01%. Esta concentración de DMSO no causa ningún efecto en el crecimiento de las células.

4.4.2.3. Ensayo citotóxico

El ensayo con sulforrodamina B se realizó basado en la metodología descrita por Skehan *et al.*⁶². Las células en crecimiento exponencial fueron sembradas en placas de 96 pozos para cultivo celular, se agregaron 100 µL de la suspensión celular a una concentración de 5×10^4 células/mL y se incubó la placa a 37°C en incubadora con CO₂. Cuando las células alcanzaron 80-90% de confluencia se reemplazó el medio y las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos puros (500 -0.1 µg/mL) en medio sin SFB. Luego de 48 horas de exposición, el medio fue removido y las células fueron fijadas con una solución de ácido tricloracético (ATC) e incubadas a 4°C por 30 minutos. Pasado el tiempo, se retiró el ATC y se agregó la sulforrodamina B (SRB) a cada pocillo y se dejó

en contacto con las células por 30 minutos. Para solubilizar la SRB, se agregaron 100 μ L de Tris base 10 mM a todos los pocillos y las placas se agitaron suavemente por 10 minutos para finalmente medir la densidad óptica (DO) a 540 nm en un lector bioassay (BioRad, USA). Se empleó Docetaxel (Taxotere[®]; Sigma-Aldrich Co.) como control positivo y las células sin tratamiento como control negativo. Los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresaron como valores de la media concentración inhibitoria máxima (IC₅₀), empleando el software GraphPad Prism 4.

4.4.3. Índice de selectividad (IS)

El índice de selectividad fue calculado dividiendo los valores de IC₅₀ entre los valores de la CMI de cada compuesto.

4.4.4. Actividad sinergista con fármacos de primera línea

Una de las pruebas más utilizadas *in vitro* para estudiar el comportamiento de sistemas binarios de agentes antimicrobianos es la titulación de tablero de ajedrez. Una variación de este ensayo para evaluar el efecto sinergista sobre *Mtb* es el ensayo en microplaca de combinación de fármacos con resazurina REDCA (Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay), por sus siglas en inglés, que se realizó de acuerdo a lo descrito por Caleffi *et al.* 2013⁴³.

4.4.4.1. Cepas y cultivo

En el ensayo se empleó la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27794, que es sensible a los fármacos de primera línea. Así mismo se emplearon dos aislados MDR identificados como 3614 y 71A, ambos resistentes a isoniazida, rifampicina y

etambutol. Las tres cepas fueron resembradas en caldo 7H9 por 15 días a 37°C, con el fin de tener la bacteria en fase logarítmica de crecimiento. El inóculo para el ensayo biológico fue preparado diluyendo el cultivo en fase logarítmica y ajustando la turbidez en referencia con el tubo No.1 de la escala de McFarland, o bien ajustando a una densidad óptica de 0.16-0.20 a 625 nm utilizando como blanco agua destilada. Posteriormente se realizó una dilución a 1:20 con medio 7H9 con 10 % de OADC.

4.4.4.2. Soluciones de trabajo

En el caso de los ensayos combinatorios únicamente se trabajó con los compuestos *meso-2* y *meso-6* ya que fueron los que presentaron un mejor índice de selectividad. Para la preparación de las soluciones de trabajo se preparó el stock de la manera descrita previamente, una concentración de 2,000 (stock inicial). Posteriormente de esta solución se realizó la solución de trabajo 4X (800 µg/mL) en medio de cultivo 7H9. Los fármacos de referencia (INH, RIF, EMB) se prepararon en agua destilada estéril (stocks a 10 000 µg/mL) y posteriormente la solución de trabajo 4X en caldo 7H9. En el caso de los antibióticos las concentraciones de trabajo fueron: 0.1 µg/mL para INH, 0.01 µg/mL para RIF y 32 µg/mL para EMB. La concentración de compuesto y fármaco de referencia fue preparado a dos veces la concentración que se deseada en el primer pocillo de la microplaca, tomando en cuenta que la CMI del compuesto se debe encontrar en el tercer o cuarto pocillo en la columna (fármaco) o fila (compuesto semisintético).

4.4.4.3. Ensayo sinergista

Para el diseño de la placa se colocaron 200 µL de H₂O destilada en los pocillos de la columna 11 y 12, excepto en el pozo H1 donde se colocaron 200 µL de caldo 7H9

empleado como control negativo. Posteriormente se colocaron 100 μ L de caldo 7H9 con 10% de OADC en las columnas 2-11, excepto en el pozo A11. Luego se colocaron 100 μ L de compuesto en la columna 11, el pocillo A11 debe tener 200 μ L para posteriormente hacer la dilución seriada de la columna 11 hasta la 3. Seguido a ello, se colocaron 100 μ L del fármaco antituberculoso en la línea A y se hicieron las diluciones seriadas hasta la línea G. Después se colocaron 100 μ L de la suspensión bacteriana 1:20, previamente preparada, en todos los pocillos que contienen diluciones, excepto en la columna del control negativo. La placa es incubada por 7 días a 37°C. Posteriormente es revelada en el séptimo día con 30 μ L de resazurina al 0.02% en agua destilada estéril. Se incubó nuevamente la placa por 24 horas y se hace la lectura e interpretación de la placa.

La CMI correspondió al último pozo de la dilución que presenta coloración azul y enseguida tiene un pozo rosa. Para calcular la concentración fraccional inhibitoria (CFI) se empleó la fórmula:

$$CFI = \frac{\text{CMI de } A_1 \text{ en combinación con } A_2}{\text{CMI } A_1 \text{ solo}} + \frac{\text{CMI de } A_2 \text{ en combinación con } A_1}{\text{CMI } A_2 \text{ solo}}$$

Dónde A1 representa a los fármacos (INH, RIF y EMB) cuando se combina con el derivado semi-sintético A2. Los resultados se interpretan: $CFI \leq 0.5$ sinergismo, $CFI > 0.5-4$ indiferente y $CFI > 4$ antagonismo. Los ensayos se realizaron por duplicado en diferentes días.

4.4.5. Agentes inhibidores de bombas de expulsión

Para evaluar el efecto como inhibidor de bombas de expulsión de fármacos se emplea la técnica de acumulación del colorante bromuro de etidio siguiendo la técnica estandarizada por Caleffi *et al.*

4.4.4.1. Cepas y cultivo

En el ensayo se empleó la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv 27794, que es sensible a los fármacos de primera línea: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida.

El inóculo para el ensayo biológico fue preparado diluyendo un cultivo en fase logarítmica, aproximadamente 1 mL del cultivo bacteriano anterior y 5 mL de medio 7H9 enriquecido con OADC, con una densidad óptica a 600 nm de 0.6-0.8. Debe ser cultivado en tubos cónicos tipo Falcon de 15 mL, para facilitar la manipulación el día del experimento. Pasados 15 días de cultivo a 37°C se centrifugó el inóculo a 2880g por 10 minutos y se retiró el medio de cultivo. Posteriormente, se rompió el botón bacteriano y se lava con buffer de fosfatos pH 7.4 con 0.05% de tween 80 y se homogenizó en vórtex. Nuevamente se centrifuga la bacteria a 2880g por 10 minutos y se descarta el PBS, el botón bacteriano se resuspende en 1 mL de PBS y se ajusta el microorganismo a una densidad óptica de 0.44 a 600nm con PBS.

4.4.4.2. Soluciones de trabajo

Inicialmente fue necesario saber cuál era el volumen final (fueron utilizados 50 µL de cada compuesto a probar por pocillo) y la CMI de esos fármacos para la cepa a utilizar. El volumen final en los pocillos fueron 200 µL. Para calcular la CMI necesaria en cada pocillo de debe recalcular la CMI en base a la densidad óptica deseada. En el caso de los compuestos probados, la concentración final del compuesto a probar fue ½ de la CMI

(2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para esto se elaboró un stock inicial de 10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en DMSO y posteriormente la solución de trabajo a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS, para tener una concentración final de 2.5 % de DMSO en cada pocillo y evitar el daño de la bacteria por efecto del DMSO).

El bromuro de etidio es un compuesto fotosensible, por lo cual durante su manejo hasta el uso en la placa se mantuvo protegido de la luz. La concentración del BrEt también fue calculada en base a la mitad de la CMI, agregando también 50 μL de BrEt por pocillo (Solución de trabajo 0.225 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.4.4.3. Diseño de la placa y lectura

En el diseño de la placa se incluyeron cuatro controles, el primero que incluye 150 μL de PBS y 50 μL de BrEt (para descartar la fluorescencia de fondo), un control de bacteria, que incluye 50 μL de PBS, 50 μL de BrEt y 100 μL de bacteria ajustada (Control negativo) y como control positivo el verapamil un conocido inhibidor de bomba disponible de manera comercial. Tanto los pocillos que llevaron los controles positivos como los pocillos de los compuestos a probar se diseñaron colocando 50 μL del compuesto, 50 μL de BrEt y 100 μL de bacteria ajustada. Para ello es necesario colocar en el siguiente orden: 1) PBS, 2) Compuestos, 3) BrEt y 4) Bacteria. Después se colocó un papel plástico, teniendo cuidado de no dejar arrugas en la zona de lectura, se coloca en un recipiente seguro y protegido de la luz, para finalmente realizar la lectura en un tiempo de incubación no mayor a 15 minutos a temperatura ambiente. Todos los compuestos y controles se realizaron por triplicado.

La lectura se realizó en un fluorómetro VICTOR2 D (PerkinElmer, Santa Clara, CA, USA) a una longitud de onda de 530/25 nm con excitación de 590/20 nm. Se realizaron

lecturas cada 3 minutos durante 60 minutos. Finalmente, para la interpretación de los datos, se realiza el promedio de cada lectura y se restó la fluorescencia de fondo para cada lectura (Lectura- control de PBS), para así generar un gráfico de fluorescencia (eje de las Y) con relación al tiempo (eje de las X) que incluya los controles y los compuestos probados.

Para la interpretación de la actividad como inhibidor de bomba de eflujo se calculó la fluorescencia relativa final (FRF) de la siguiente manera:

$$FRF = \frac{\text{Fluorescencia 1} - \text{Fluorescencia 2}}{\text{Fluorescencia 1}}$$

Donde:

Fluorescencia 1: Fluorescencia relativa en 60 minutos con un inhibidor de bomba de eflujo

Fluorescencia 2: Fluorescencia relativa en 60 minutos sin inhibidor de bomba de eflujo

4.5. Análisis de la relación estructura química-actividad biológica (QSAR)

La estructura tridimensional de todos los compuestos fue diseñada en el programa Maestro 10.4 (Schrödinger Release 2015-4: Maestro v.10.4. Schrödinger, LLC, N.Y., 2015) optimizando su geometría usando la metodología DFT-B3LYP 6-31G con un modelo de agua como solvente implícito, disponible en el programa Jaguar⁶³. Posteriormente, los compuestos fueron alineados utilizando Open3DALIGN⁶⁴ que utiliza un algoritmo basado en el modelado del farmacóforo utilizando el AmDG como referencia. Todos los gráficos fueron hechos utilizando la interfaz de Maestro.

4.5.1. Búsqueda de acantilados de actividad y análisis de similitud.

Los gráficos de análisis de similitud (SAS) fueron realizados en base a las huellas dactilares moleculares MACCS en el panorama de actividad, disponible en el servidor web D-Tools (www.difacquim.com/d-tools), que es una implementación web basada en lenguaje de programación R, utilizando los paquetes Shiny y rcdk⁶⁵. Basado en una comparación por pares sistemática de la similitud estructural y actividad biológica de todos los compuestos. Los mapas SAS⁶⁶ de la actividad biológica fueron construidos para cada cepa de *Mtb*. Los gráficos de relaciones de acantilados de actividad fueron hechos utilizando Cytoscape⁶⁷.

4.5.2. 3D-QSAR

El análisis de las relaciones cuantitativas de la estructura-actividad basado en los campos moleculares fue realizada en Open 3DQSAR⁶⁸, que emplea parámetros de Van de Walls AMBER-FF99 y un campo electrostático basado en un modelo de punto de carga para calcular los campos moleculares⁶⁴, utilizando los datos de actividad antimicrobiana del presente trabajo y los previamente reportados por Reyes-Melo *et al.*⁴⁸. Para cada modelo, el 50 % de los compuestos fueron usados para la construcción y el otro 50% para el modelo de validación interna; estos grupos fueron asignados aleatoriamente, tomando en cuenta los patrones de mono o di sustitución. Los modelos fueron construidos utilizando PLS, y validado utilizando el algoritmo *leave-one-out*. Los campos moleculares calculados fueron el CoMFA para interacciones electrostáticas y estéricas en los campos moleculares⁶⁹.

4.6. Manejo de residuos.

4.6.1. Aislamiento del AmDG, síntesis y purificación de análogos.

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 y Sintéticos en base al reglamento interno de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.6.2. Ensayos biológicos.

Los residuos generados en los ensayos de actividad antibacteriana y antimicobacteriana fueron dispuestos en base a lo establecido por el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico Especializado del Hospital Universitario. Los residuos generados en los ensayos de sinergismo y acumulación de bromuro de etídeo se dispusieron de acuerdo a lo establecido por el laboratorio de Bacteriología Médica de la Universidade Estadual de Maringá en Brasil.

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Rendimiento, propiedades físicas y constantes espectroscópicas de los derivados del *AmDG*

5.1.1 Síntesis de carbamatos (1-9)

Esta serie de carbamatos fueron diseñados debido a que se ha observado que este grupo funcional puede aumentar la estabilidad a la hidrólisis enzimática y su permeabilidad a través de las membranas celulares⁵⁰ como se observa en diversos estudios SAR^{53, 70}. Además, se ha postulado que la incorporación de estos fragmentos en el compuesto natural *AmDG* que presenta actividad antimicobacteriana, podría aumentar su lipofilidad y favorecer la permeabilidad del mismo a través de la membrana micobacteriana y aumentando su habilidad de inhibir a la bacteria. En el presente trabajo se preparó una serie de nuevos derivados del *AmDG* con diversos cloruros de carbamoilo *N,N*-disustituídos: dietilcarbamoilo, pirrolidincarbonilo, piperidincarbonilo, 4-morfolincarbonilo y 2-oxo-imidazolidincarbonilo.

En las reacciones se sintetizaron la mezcla racémica de los derivados monosustituídos [(±)-1, (±)-3, (±)-5, (±)-7 y (±)-9] y los compuestos con simetría C_2 bis carbamoilados *meso* (*meso*-2, *meso*-4, *meso*-6, *meso*-8) únicamente en la reacción con el derivado de 2-oxo-imidazolidin carbonilo no fue posible obtener el derivado disustituído.

Los rendimientos obtenidos variaron entre el 2.7 y 57.9 % (Tabla 4).. Los puntos de fusión fueron determinados únicamente para los productos en forma sólida. Todos los compuestos fueron solubles en cloroformo.

Los bajos rendimientos de reacción, se deben primero a las condiciones de reacción establecidas, empleando un exceso pequeño de los cloruros de carbamoilo y aunque estas reacciones fueron planteadas para obtener tanto derivados mono como disustituidos, una gran cantidad de materia prima quedó sin reaccionar.

Tabla 4. Rendimiento y características físicas de derivados del AmDG de tipo carbamato

Derivado	Rendimiento (% mmol)	Aspecto	Punto de fusión	Solubilidad
(±)- 1	7.4 %	Resina incolora	-	Cloroformo
<i>meso</i> - 2	48.8 %	Resina incolora	-	Cloroformo
(±)- 3	18.6 %	Resina incolora	-	Cloroformo
<i>meso</i> - 4	21.2 %	Sólido blanco	156-158°C	Cloroformo
(±)- 5	2.7 %	Resina incolora	-	Cloroformo
<i>meso</i> - 6	33 %	Resina incolora	-	Cloroformo
(±)- 7	15.8 %	Resina incolora	-	Cloroformo
<i>meso</i> - 8	21%	Sólido blanco	158-160°C	Cloroformo
(±)- 9	57.9 %	Sólido blanco	102-105°C	Cloroformo

5.1.2 Constantes espectroscópicas de carbamatos (1-9)

(±)-**1** (±)-4-[(2*S*,3*R*)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenil

dietilcarbamato

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 6.82 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 6.71 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H, H-6), 6.68 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-6'), 6.66 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H, H-2), 6.62 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-2'), 5.47 (s, 1H, OH-4'), 3.86 (s, 3H, OMe-3'), 3.79 (s, 3H, OMe-3), 3.45 (c, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-2a'', CH₂N), 3.38 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H,

H-2b" CH₂N), 2.77 (dd, $J = 13.2, 4.6$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J = 13.2, 4.6$ Hz, 1H), 2.31 (dd, $J = 13.1, 9.3$ Hz, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.26 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, Me-3a"), 1.20 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H, Me-3b"), 0.84 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 154.5 (C=O, C-1"), 151.5 (C-4) 146.50 (C-4'), 143.7 (C-3), 140.2 (C-3'), 138.8 (C-1), 133.8 (C-1'), 122.9 (C-6), 121.9 (C-6'), 121.3 (C-5), 114.1 (C-5'), 113.3 (C-2), 111.6 (C-2'), 56.0 (OMe-3, OMe-3'), 42.4 (C-2"), 42.2 (C-2'), 39.5 (C-8), 39.2 (C-8'), 39.2 (C-7), 39.2 (C-7'), 16.4 (C-9), 16.3(C-9'), 14.2 (C-3"), 13.6 (C-3'). EMAR (ESI) m/z calculada para C₂₅H₃₆NO₅ [M+H]: 430.25935, encontrada [M+H]: 430.26019.

meso-2 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis(2-metoxi-4,1-fenileno-bis(dietilcarbamato))

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.97 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.72, (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 6.69 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H, H-2, H-2'), 3.79 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 3.45 (q, $J = 6.4$ Hz, 4H, H-2a", H-2a'''), 3.38 (q, $J = 6.6$ Hz, 4H, H-2b", H-2b'''), 2.78 (dd, $J = 13.3, 4.6$ Hz, 2H, H-7a, H-7a'), 2.33 (dd, $J = 13.2, 9.4$ Hz, 2H, H-7b,H-7b'), 1.79 (m, 2H, H-8, H-8'), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, Me-3a", Me-3a'''), 1.19 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H, Me-3b",Me-3b'''), 0.84 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ¹³C (CDCl₃,100 MHz): δ 154.5 (C=O, C-1", C-1'''), 151.5 (C-4, C-4'), 140.1 (C-3, C-3'), 138.8 (C-1, C-1'), 123.0 (C-6, C-6'), 121.3 (C-5, C-5'), 113.3 (C-2, C-2'), 56.1 (OMe-3, OMe-3'), 42.4 (C-2a", C-2a'''), 42.2 (C-2b", C-2b'''), 39.4 (C-7, C-7', C-8, C-8'), 16.3 (C-9, C-9'), 14.2 (C-3a", C-3a'''), 13.6 (C-3b", C-3b'''). EMAR (ESI) m/z calculado para C₃₀H₄₅N₂O₆ [M+H]: 529.32776, encontrado [M+H]: 529.32816.

(±)-3 (±)-4-[*(2S,3R)*-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenil

pirrolidina-1-carboxilato

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.82 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H-5'), 6.70 (dd, *J* = 7.8, 2.0 Hz, 1H, H-6), 6.69 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-2), 6.64 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H, H-6'), 6.62 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 5.47 (s, 1H, OH'), 3.86 (s, 3H, OMe-3'), 3.80 (s, 3H, OMe-3), 3.59 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-5'', CH₂N), 3.48 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-2'', CH₂N), 2.77 (dd, *J* = 13.3, 4.7 Hz, 1H, H-7a'), 2.73 (dd, *J* = 13.3, 5.1 Hz, 1H, H-7a), 2.31 (dd, *J* = 13.4, 9.3 Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.94 (m, 4H, H-3'', H-4''), 1.76 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 153.4 (C=O, C-1''), 151.5 (C-4), 146.5 (C-4'), 143.8 (C-3), 140.3 (C-3'), 138.6 (C-1), 133.8 (C-1'), 123.0 (C-6), 121.9 (C-6'), 121.3 (C-5), 114.2 (C-5'), 113.4 (C-2), 111.6 (C-2'), 56.2 (OMe-3'), 56.1 (OMe-3), 46.6 (C-5''), 46.5 (C-2''), 39.5 (C-8), 39.3 (C-8'), 39.2 (C-7), 39.2 (C-7'), 26.0 (C-3''), 25.2 (C-4''), 16.5 (C-9), 16.3 (C-9'). EMAR (ESI) *m/z* calculado para C₂₅H₃₄NO₅ [M+H]: 428.24370, encontrado [M+H]: 428.24417.

meso-4 4,4'-[*(2R,3S)*-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis(2-metoxi-4,1-fenileno)

bis(pirrolidina -1-carboxilato)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.72 (sa, 2H, H-6, H-6'), 6.70 (sa, 2H, H-2, H-2'), 3.80 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 3.59 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, CH₂N), 3.48 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, CH₂N), 2.78 (dd, *J* = 13.3, 4.7 Hz, 2H, H-7a, H-7a'), 2.33 (dd, *J* = 13.4, 9.4 Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.94 (m, 8H, H-3'', H-3''', H-4'', H-4'''), 1.81 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 153.4 (C=O, C-1'', C-1'''), 151.6 (C-4, C-4'), 140.2 (C-3, C-3'), 138.6 (C-1, C-1'), 123.0 (C-6, C-6'), 121.3 (C-5, C-5'), 113.4 (C-2, C-2'), 56.23 (OMe-3, OMe-3'), 46.6 (C-5'', C-5'''), 46.5

(C-2", C-2'''), 39.5 (C-8, C-8'), 39.4 (C-7, C-7'), 26.0 (C-3", C-3'''), 25.2 (C-4", C-4'''), 16.4 (C-9, C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{30}H_{41}N_2O_6$ [M+H]: 525.29646, encontrado [M+H]: 525.29633.

(±)-5 (±)-4-[(2*S*,3*R*)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenil
piperidina-1-carboxilato

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 6.96 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 6.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5'), 6.70 (dd, $J = 8.1, 1.3$ Hz, 1H, H-6), 6.68 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-2), 6.51 (dd, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H, H-6'), 6.63 (d, $J = 1.3$, 1H, H-2'), 5.47 (s, 1H, OH-4'), 3.86 (s, 3H, OMe-3), 3.80 (s, 3H, OMe-3'), 3.62 (sa, 2H, H-6'', CH_2N), 3.50 (sa, 2H, H-2'', CH_2N), 2.77 (dd, $J = 13.3, 4.4$ Hz, 1H, H-7a'), 2.73 (dd, $J = 13.5, 4.9$ Hz, 1H, H-7a), 2.31 (dd, $J = 13.1, 9.5$ Hz, 2H, H-7b', H-7b), 1.77 (m, 2H, H-8, H-8'), 1.64 (sa, 6 H, H-3'', H-4'', H-5'''), 0.84 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 154.0 (C=O, C-1'', C-1'''), 151.4 (C-4), 146.5 (C-4'), 143.7 (C-3), 140.3 (C-3'), 138.8 (C-1), 133.8 (C-1'), 122.9 (C-6), 121.9 (C-6'), 121.3 (C-5), 114.1 (C-5'), 113.3 (C-2), 111.6 (C-C'), 56.1 (OMe-3), 56.1 (OMe-3'), 39.5 (C-2'', C-6''), 39.2 (C-8, C-8'), 39.2 (C-7, C-7'), 24.6 (C-3'', C-4'', C-5'''), 16.5 (C-9), 16.3 (C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{26}H_{36}NO_5$ [M+H]: 442.25935, encontrado [M+H]: 442.26097.

meso-6 4,4'-[(2*R*,3*S*)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyi]bis(2-metoxi-4,1-fenileno)bis(*piperidina-1-carboxilato*)

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 6.96 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.71 (dd, $J = 8.6, 1.4$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 6.70 (d, $J = 1.4$ Hz, 2H, H-2, H-2'), 3.80 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 3.62 (sa, 4H, H-6'', H-6''', CH_2N), 3.50 (sa, 4H, H-2'', H-2''', CH_2N), 2.78 (dd, $J = 13.3, 4.6$ Hz,

2H, H-7a, H-7a'), 2.33 (dd, $J = 13.2, 9.5$ Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.80 (m, 2H, H-8, H-8'), 1.63 (sa, 12H, H-3'', H-3''', H-4'', H-4''', H-5'', H-5'''), 0.85 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 154.0 (C-1'', C-1''', C=O), 151.5 (C-4, C-4'), 140.2 (C-3, C-3'), 138.8 (C-1, C-1'), 122.9 (C-6, C-6'), 121.3 (C-5, C-5'), 113.3 (C-2, C-2'), 56.1 (OMe-3, OMe-3'), 45.9 (C-6'', C-6'''), 45.4 (C-2'', C-2'''), 39.4 (C-8, C-8'), 39.4 (C-7, C-7'), 24.6 (C-3'', C-3''', C-4'', C-4''', C-5'', C-5'''), 16.4 (C-9, C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_6$ [M+H]: 553.327765 encontrado [M+H]: 553.32497.

(±)-7-(±)-4-[(2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenil morfolina-4-carboxilato

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6.99 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 6.84 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5'), 6.74 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, H-6), 6.71 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-2), 6.68 (dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz, 1H, H-6'), 6.65 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-2'), 5.50 (s, 1H, OH-4'), 3.88 (s, 3H, OMe-3), 3.82 (s, 3H, OMe-3'), 3.77 (t, $J = 4.5$ Hz, 4H, H-3'', H-4'', CH₂O), 3.71 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H, H-5'', CH₂N), 3.59 (sa, 2H, H-2'', CH₂N), 2.77 (dd, $J = 13.4, 4.4$ Hz, 1H, H-7a), 2.75 (dd, $J = 13.6, 5.2$ Hz, 1H, H-7a'), 2.32 (dd, $J = 13.1, 9.1$ Hz, 1H, H-7b), 2.34 (dd, $J = 14.0, 8.8$ Hz, 1H, H-7b'), 1.80 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.87 (d, $J = 6.0$ Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 154.0 (C=O, C-1''), 151.3 (C-4), 146.5 (C-4'), 143.8 (C-3), 140.7 (C-3'), 138.4 (C-1), 133.8 (C-1'), 122.7 (C-6), 121.9 (C-6'), 121.3 (C-5), 114.2 (C-5'), 113.2 (C-2), 111.6 (C-2'), 6.8 (C-3'', C-4''), 56.1 (OMe-3, OMe-3'), 45.3 (C-5''), 44.5 (C-2''), 39.5 (C-8), 39.3 (C-8'), 39.2 (C-7), 39.2 (C-7'), 16.5 (C-9), 16.2 (C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{NO}_6$ [M+H]: 444.23861 encontrado [M+H]: 444.23648.

meso-8 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis(2-metoxi-4,1-fenileno)

bis(morfolina-4-carboxilato)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.73 (sa, 1H, H-6), 6.71 (sa, 3H, H-6', H-2, H-2'), 3.81 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 3.75 (t, *J* = 4.5 Hz, 8H, H-3", H-3"', H-4", H-4"', CH₂O), 3.69 (t, *J* = 4.0 Hz, 4H, H-5", H-5"', CH₂N), 3.57 (sa, 4H, H-2", H-2"', CH₂N), 2.78 (dd, *J* = 13.4, 4.6 Hz, 2H, H-7a, H-7a'), 2.34 (dd, *J* = 13.2, 9.5 Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.81 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.86 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 154.0 (C=O, C-1", C-1'''), 151.3 (C-4, C-4'), 140.5 (C-3, C-3'), 138.4 (C-1, C-1'), 122.8 (C-6, C-6'), 121.3 (C-5, C-5'), 113.2 (C-52, C-2'), 66.8 (C-3", C-3"', C-4", C-4'''), 56.1 (OMe-3, OMe-3'), 45.4 (C-5", C-5'''), 44.4 (C-2", C-2'''), 39.4 (C-8, C-8'), 39.4 (C-7, C-7'), 16.4 (C-9, C-9'). EMAR (ESI) *m/z* calculado para C₃₀H₄₁N₂O₈ [M+H]: 557.28629, encontrado [M+H]: 557.28667.

(±)-9 (±)-4-[(2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenil

morfolina-4-carboxilato

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 6.82 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 6.72 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.70 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-2), 6.65 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, H-6'), 6.62 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 6.25 (s, 1H, NH-5"), 5.55 (s, 1H, OH-4'), 4.07 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3", CH₂N), 3.85 (s, 3H, OMe-3), 3.80 (s, 3H, OMe-3'), 3.53 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-4", CH₂NH), 2.79 (dd, *J* = 13.3, 4.5 Hz, 1H, H-7a), 2.72 (dd, *J* = 13.5, 5.1 Hz, 1H, H-7a'), 2.31 (dd, *J* = 13.3, 9.4 Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.77 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.85 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, Me-9), 0.84 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, Me-9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.2 (C=O, C-6"), 151.1 (C-4), 150.2 (C=O, C-1"), 146.5 (C-4'), 143.8 (C-3), 141.3 (C-3'), 137.5 (C-1), 133.7 (C-1'), 122.5 (C-6), 121.8 (C-6'), 121.3 (C-5), 114.2

(C-5'), 113.3 (C-2), 111.6 (C-2'), 56.1 (OMe-3, OMe-3'), 43.7 (C-3''), 39.5 (C-8), 39.2 (C-8'), 39.2 (C-7), 39.1 (C-7'), 37.0 (C-4''), 16.5 (C-9), 16.2 (C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para C₂₄H₃₁N₂O₆ [M+H]: 443.21821, encontrado [M+H]: 443.21732.

5.1.3. Síntesis de éteres y aminoéteres (10-20)

Se sintetizaron una serie de 10 nuevos derivados (±) mono y *meso*-bis-carbamoylados del AmDG y un aminoéter empleando una clásica reacción de Williamson, para ello se sustituyó con diferentes haluros de alqueno y bencilo como: bromuro de alilo, 4-bromobuteno, 7-bromo-1-hepteno, bromuro de 4-fluorobencilo y bromuro de 4-(trifluorometil)bencilo y un clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietilamina. La reacción produjo la mezcla racémica de los compuestos mono-sustituídos [(±)-**10**, (±)-**12**, (±)-**14**, (±)-**16**, (±)-**18**], así mismo se obtuvieron los productos con simetría C₂ (*meso*-**11**, *meso*-**13**, *meso*-**15**, *meso*-**17**, *meso*-**19**, *meso*-**20**). Los rendimientos fueron de moderados a bajos en un rango de 15-53% (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimiento y características físicas de derivados del AmDG de tipo éter y aminoéter

Derivado	Rendimiento (% mmol)	Aspecto	Punto de fusión	Solubilidad
(±)- 10	25 %	Resina incolora	-	Cloroformo
<i>meso</i> - 11	36 %	Sólido blanco	55-56°C	Cloroformo
(±)- 12	24 %	Resina incolora	-	Cloroformo
<i>meso</i> - 13	24%	Resina incolora	-	Cloroformo
(±)- 14	34 %	Resina incolora	-	Cloroformo
<i>meso</i> - 15	16 %	Resina incolora	-	Cloroformo
(±)- 16	20%	Resina incolora	-	Cloroformo
<i>meso</i> - 17	53%	Sólido blanco	126-127°C	Cloroformo
(±)- 18	15%	Sólido blanco	72-74°C	Cloroformo
<i>meso</i> - 19	36%	Sólido blanco	122-123°C	Cloroformo
<i>Meso</i> - 20	16%	Resina incolora	-	Cloroformo

Estos rendimientos bajos y moderados se pueden explicar igualmente porque en cada reacción se busca obtener tanto derivados monosustituidos como disustituidos. Por otra parte, las bases empleadas y la reactividad de los reactivos a sustituir dejaban una cantidad importante de producto base sin reaccionar.

5.1.4. Constantes espectroscópicas de éteres y aminoéteres (10-20)

(±)-10 (±)-4-[(2R,3S)-4-(4-(alliloxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenol

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.8 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 6.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 6.67 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 2H, H-6, H-6'), 6.66 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-2), 6.62 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-2'), 6.09 (m, 1H, H-2''), 5.46 (s, 1H, OH-4'), 5.39 (dd, *J* = 17.2, 1.3 Hz, 1H, H-3a''), 5.27 (dd, *J* = 10.4, 0.9 Hz, 1H, H-3b''), 4.59 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, H-1'', OCH₂), 3.85 (s, 3H, OMe), 3.84 (s, 3H, OMe'), 2.74 (dd, *J* = 13.3, 4.8 Hz, 1H, H-7a'), 2.72 (dd, *J* = 13.4, 5.1 Hz, 1H, H-7a), 2.29 (dd, *J* = 13.3, 9.2 Hz, 1H, H-7b'), 2.28 (dd, *J* = 13.3, 9.4 Hz, 1H, H-7b), 1.76 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, Me-9), 0.83 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, Me-9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 149.4 (C-4), 146.5 (C-4'), 146.2 (C-3), 143.7 (C-3'), 135.1 (C-2''), 133.9 (C-1), 133.8 (C-1'), 121.9 (C-6), 121.1 (C-6'), 117.9 (C-3''), 114.1 (C-5), 113.6 (C-5'), 112.8 (C-2), 111.6 (C-2'), 70.2 (C-1''), 56.0 (OMe-3), 56.0 (OMe-3'), 39.5 (C-8), 39.2 (C-8'), 39.1 (C-7), 38.9 (C-7'), 16.4 (C-9), 16.3 (C-9'). EMAR (ESI) *m/z* calculado para C₂₃H₃₁O₄ [M+H]:371.22223, encontrado [M+H]:371.22099.

meso-11 (±)-4-[(2R,3S)-4-(4-(but-3-eniloxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenol

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.65 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H, H-2, H-2'), 6.66 (dd, *J* = 7.0, 1.7 Hz, 2H, H-6, H-6'), 6.09 (m, 2H, H-2'', H-2'''), 5.39

(dd, $J = 17.2, 1.4$ Hz, 2H, H-3a'', H-3a'''), 5.27 (dd, $J = 10.4, 1.2$ Hz, 2H, H-3b'', H-3b'''), 4.58 (d, $J = 5.4$ Hz, 4H, H-1'', H-1''', CH₂O), 3.84 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 2.74 (dd, $J = 13.4, 4.9$ Hz, 2H, H-7a, H-7a'), 2.29 (dd, $J = 13.4, 9.3$ Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.77 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 149.4 (C-4, C-4'), 146.2 (C-3, C-3'), 135.1 (C-2'', C-2'''), 133.8 (C-1, C-1'), 121.1 (C-6, C-6'), 117.9 (C-3'', C-3'''), 113.6 (C-5, C-5'), 112.9 (C-2, C-2'), 70.2 (C-1'', C-1'''), 56.0 (OMe-3, OMe-3'), 39.3 (C-8, C-8'), 39.0 (C-7, C-7'), 16.4 (C-9, C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para C₂₆H₃₅O₄ [M+H]: 411.25353, encontrado [M+H]: 411.25308.

(±)-12 (±)-4-[(2R,3S)-4-(4-(but-3-eniloxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenol

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 6.80 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5'), 6.67 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 6.64 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-2), 6.62 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-2'), 5.91 (ddt, $J = 17.1, 10.3, 6.7$ Hz, 1H, H-3''), 5.46 (s, 1H, OH-4'), 5.17 (dd, $J = 17.1, 1.4$ Hz, 1H, H-4a''), 5.10 (dd, $J = 10.1, 1.4$ Hz, 1H, H-4b''), 4.04 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-1'', CH₂O), 3.85 (s, 3H, OMe-3), 3.83 (s, 3H, OMe-3'), 2.74 (dd, $J = 13.3, 4.6$ Hz, 1H, H-7a), 2.73 (dd, $J = 13.4, 4.6$ Hz, 1H, H-7a'), 2.5 (q, $J = 6.93$ Hz, 2H, H-2''), 2.28 (dd, $J = 13.5, 9.1$ Hz, 1H, H-7b), 2.29 (dd, $J = 12.7, 9.2$ Hz, 1H), 1.76 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.85 (d, $J = 6.6$, 3H, Me-9), 0.83 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, Me-9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 149.5 (C-4), 146.6 (C-4'), 146.6 (C-3), 143.8 (C-3'), 135.1 (C-3''), 134.6 (C-1), 133.9 (C-1'), 121.9 (C-6), 121.2 (C-6'), 117.1 (C-4''), 114.2 (C-5), 113.7 (C-5'), 113.2 (C-2), 111.7 (C-2'), 68.7 (C-1''), 56.2 (OMe-3), 56.0 (OMe-3'), 39.5 (C-8), 39.3 (C-8'), 39.2 (C-7), 39.0 (C-7'), 33.9 (C-2''), 16.4 (C-9), 16.3 (C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para C₂₄H₃₃O₄ [M+H]: 385.23788, encontrado [M+H]: 385.23683.

meso-13 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[1-(but-3-eniloxi)-2-metoxibenzeno]

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.68 (sa, 2H, H-6, H-6'), 6.66 (sa, 2H, H-2, H-2'), 5.91 (m, 2H, H-3'', H-3'''), 5.17 (d, *J* = 17.2 Hz, 2H, H-4a'', H-4a'''), 5.10 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H, H-4b'', H-7b'''), 4.04 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H, H-1'', H-1''', CH₂O), 3.83 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 2.74 (dd, *J* = 13.4, 4.9 Hz, 2H, H-7a, H-7a'), 2.59 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H, H-2'', H-2'''), 2.29 (dd, *J* = 13.4, 9.3 Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.77 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.84 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, Me). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 149.5 (C-4, C-4'), 146.6 (C-3, C-3'), 135.1 (C-3'', C-3'''), 134.6 (C-1, C-1''), 121.2 (C-6, C-6'), 117.7 (C-4'', C-4'''), 113.7 (C-5, C-5'), 113.2 (C-5, C-5'), 68.7 (C-1'', C-1'''), 56.2 (OMe-3, OMe-3'), 39.4 (C-8, C-8'), 39.0 (C-7, C-7'), 33.9 (C-2'', C-2'''), 16.4 (C-9, C-9'). EMAR (ESI) *m/z* calculado para C₂₈H₃₉O₄ [M+H]: 439.2843, encontrado [M+H]: 439.28571.

(±)-14 (±)-4-[(2R,3S)-4-(4-(hept-6-eniloxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenol

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.82 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 6.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 6.67 (dd, *J* = 8.5, 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.66 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, H-6'), 6.65 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-2), 6.62 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-2), 5.82 (ddt, *J* = 17.0, 10.2, 6.7 Hz, 1H, H-6''), 5.45 (s, 1H, OH-4'), 5.01 (dd, *J* = 17.1, 1.8 Hz, 1H, H-7a''), 4.95 (dd, *J* = 10.2, 1.7 Hz, 1H, H-7b''), 3.99 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-1'', CH₂O), 3.86 (s, 3H, OMe-3), 3.84 (s, 3H, OMe-3'), 2.75 (dd, *J* = 13.5, 5.1 Hz, 1H, H-7a), 2.74 (dd, *J* = 13.5, 5.0 Hz, 1H, H-7a'), 2.30 (dd, *J* = 13.5, 9.1 Hz, 1H, H-7b), 2.29 (dd, *J* = 13.5, 9.2 Hz, 1H, H-7b'), 2.08 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-5''), 1.84 (pent, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-2''), 1.76 (m, 2H, H-8, H-8'), 1.47 (m, 4H, H-3'', H-4''), 0.86 (d, *J* = 6.6, 3H, Me-9), 0.84 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, Me-9'). RMN ¹³C

(CDCl₃, 100 MHz): δ 149.4 (C-4), 146.8 (C-4'), 146.5 (C-3), 143.8 (C-3'), 139.0 (C-6''), 134.8 (C-1), 133.9 (C-1'), 121.9 (C-6), 121.2 (C-6'), 114.6 (C-7''), 114.2 (C-5), 113.2 (C-5'), 113.1 (C-2), 111.7 (C-2'), 69.3 (C-1''), 56.2 (OMe-3), 56.0 (OMe-3'), 39.5 (C-8), 39.3 (C-8'), 39.2 (C-7), 39.0 (C-7'), 33.9 (C-5''), 29.3 (C-2''), 28.9 (C-4''), 25.0 (C-3''), 16.4 (C-9), 16.4 (C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para C₂₇H₃₉O₄ [M+H]: 427.28483, encontrado [M+H]: 427.28309.

meso-15 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[1-(hept-6-eniloxi)-2-metoxibenzeno]

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.78 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.67 (dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 6.65 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H-2, H-2'), 5.82 (ddt, $J = 16.9, 10.2, 6.6$ Hz, 2H, H-6'', H-6'''), 5.01 (dd, $J = 17.1, 1.6$ Hz, 2H, H-7a'', H-7a'''), 4.94 (dd, $J = 10.4, 0.7$ Hz, 2H, H-7b'', H-7b'''), 3.98 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H, H-1'', H-1''', CH₂O), 3.83 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 2.74 (dd, $J = 13.4, 4.8$ Hz, 2H, H-7a, H-7a'), 2.29 (dd, $J = 13.3, 9.3$ Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 2.08 (q, $J = 6.0$ Hz, 4H, H-5'', H-5'''), 1.84 (quint, $J = 6.9$ Hz, 4H, H-2'', H-2'''), 1.76 (m, 2H, H-8, H-8'), 1.47 (quint, $J = 3.6$ Hz, 8H, H-3'', H-3''', H-4'', H-4'''), 0.84 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 149.4 (C-4, C-4'), 146.8 (C-3, C-3'), 139.1 (C-6'', C-6'''), 134.7 (C-1, C-1'), 121.2 (C-6, C-6'), 114.6 (C-7'', C-7'''), 113.1 (C-5, C-5'), 113.0 (C-2, C-2'), 69.2 (C-1'', C-1'''), 56.1 (OMe-3, OMe-3'), 39.4 (C-8, C-8'), 39.0 (C-7, C-7'), 33.9 (C-5'', C-5'''), 29.3 (C-2'', C-2'''), 28.9 (C-4'', C-4'''), 25.7 (C-3'', C-3'''), 16.4 (C-9, C-9'). EMAR (ESI) m/z calculada para C₃₄H₅₁O₄ [M+H]: 523.37873, encontrada [M+H]: 523.37726.

(±)-16 (±)-4-[(2R,3S)-4-(4-(4-fluorobenciloxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenol

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7"), 7.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-3"), 7.05 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-4", H-6"), 6.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5), 6.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5'), 6.67 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H, H-2, H-2'), 6.63 (dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 5.45 (s, 1H, OH-4'), 5.07 (s, 2H, H-1", CH_2O), 3.85 (s, 6H, 2H, OMe-3, OMe-3'), 2.74 (dd, $J = 13.0, 5.0$ Hz, 1H, H-7a), 2.73 (dd, $J = 13.0, 5.5$ Hz, 1H, H-7a'), 2.30 (dd, $J = 13.4, 9.3$ Hz, 1H, H-7b), 2.28 (dd, $J = 13.5, 9.6$ Hz, 1H, H-7b'), 1.76 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.85 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, Me-9), 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, Me-9'). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 162.6 (d, $^1J_{\text{CF}} = 244.2$ Hz, C-5"), 149.8 (C-4), 146.5 (C-4'), 146.3 (C-3), 143.8 (C-3'), 135.7 (C-1), 133.9 (C-1'), 133.4 (d, $^4J_{\text{CF}} = 2.9$ Hz, C-2"), 129.4 (d, $^3J_{\text{CF}} = 8.2$ Hz, C-3", C-7"), 121.9 (C-6), 121.2 (C-6'), 115.6 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.41$ Hz, C-4", C-6"), 114.6 (C-5), 114.2 (C-5'), 113.2 (C-2), 111.7 (C-2'), 71.0 (C-1"), 56.2 (OMe-3), 56.1 (OMe-3'), 39.5 (C-8), 39.3 (C-7, C-7'), 39.0 (C-8'), 16.5 (C-9), 16.4 (C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{FO}_4$ [M+H]: 439.22846, encontrado [M+H]: 439.22636.

meso-17 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[1-(4-fluorobenciloxi)-2-metoxibenzeno]

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.42 (d, $J = 8.44$ Hz, 2H, H-7", H-7'''), 7.40 (d, $J = 8.36$ Hz, 2H H-3", H-3'''), 7.05 (t, $J = 8.68$ Hz, 4H, H-4", H-4''', H-6", H-6'''), 6.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-5', H-5'), 6.67 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H-2, H-2'), 6.63 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 5.07 (s, 4H, H-1", H-1''', CH_2O), 3.84 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 2.79 (dd, $J = 13.4, 4.8$ Hz, 2H, H-7a, H-7a'), 2.28 (dd, $J = 13.4, 9.3$ Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.75 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.84 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, Me-9, Me-9'). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 162.6 (d, $^1J_{\text{CF}} = 244.2$ Hz, C-5", C-5'''), 149.7 (C-4, C-4'), 146.2 (C-3, C-3'), 135.6 (C-1, C-1'), 133.3 (d, $^4J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, C-2", C-2'''), 129.4 (d, $^3J_{\text{CF}} = 8.1$ Hz, C-3", C-3''', C-7", C-7'''), 121.1 (C-

6, C-6'), 115.6 (d, $^2J_{CF} = 21.3$ Hz, C-4" C-4"', C-6" C-6'''), 114.4 (C-5, C-5'), 113.1 (C-2, C-2'), 70.8 (C-1", C-1'''), 56.1 (OMe-3, OMe-3'), 39.4 (C-8, C-8'), 39.1 (C-7, C-7), 16.4 (C-9, C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{34}H_{37}F_2O_4$ [M+H]: 547.26599, encontrado [M+H]: 547.26378.

(±)-18 (*±*)-2-metoxi-4-[(2R,3S)-4-(3-metoxi-4-(4-(trifluorometil)benciloxi)fenil)-2,3-dimetilbutil]fenol

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3", H-7"), 7.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-4", H-6"), 6.82 (d, $J = 7.9$, 1H, H-5), 6.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5'), 6.67 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-2), 6.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-2'), 6.64 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, 1H, H-6), 6.63 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H, H-6'), 5.45 (s, 1H, OH-4'), 5.17 (s, 2H, H-1", CH_2O), 3.86 (s, 3H, OMe-3), 3.85 (s, 3H, OMe-3'), 2.75 (dd, $J = 13.6, 4.4$ Hz, 1H, H-7a), 2.72 (dd, $J = 13.9, 4.9$ Hz, 1H, H-7a'), 2.30 (dd, $J = 13.9, 9.2$, 1H, H-7b), 2.27 (dd, $J = 13.9, 9.3$ Hz, 1H, H-7b'), 1.72 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.85 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, Me-9), 0.83 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, Me-9'). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 149.7 (C-4), 146.5 (C-4'), 143.8 (C-3), 146.1 (C-3'), 141.8 (C-2"), 136.0 (C-1), 133.9 (C-1'), 130.0 (q, $^2J_{CF} = 32.1$ Hz, C-5"), 127.4 (C-3", C-7"), 125.6 (q, $^3J_{CF} = 3.7$ Hz, C-4", C-6"), 123.0 (d, $^1J_{CF} = 269.2$ Hz, CF_3 -8"), 121.9 (C-6), 121.2 (C-6'), 114.5 (C-5), 114.2 (C-5'), 113.2 (C-2), 111.7 (C-2'), 70.7 (C-1"), 56.1 (OMe-3), 56.0 (OMe-3'), 39.6 (C-8), 39.3 (C-8'), 39.2 (C-7), 38.9 (C-7), 16.3 (C-9), 16.5 (C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{28}H_{32}F_3O_4$ [M+H]: 489.22527, encontrado [M+H]: 489.22564.

meso-19 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[2-metoxi-1-(4-(trifluorometil)benciloxi) benceno]

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.62 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H, H-3'', H-3''', H-7'', H-7'''), 7.56 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H, H-4'', H-4''', H-6'', H-6'''), 6.75 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.69 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H, H-2, H-2'), 6.63 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 5.16 (s, 4H, H-1'', H-1''', CH_2O), 3.86 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 2.74 (dd, $J = 13.4, 4.8$ Hz, 2H, H-7a, H-7a'), 2.29 (dd, $J = 13.4, 9.3$ Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.76 (m, 2H, H-8, H-8'), 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, Me-9', Me-9'). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 149.7 (C-4, C-4'), 146.0 (C-3, C-3'), 141.7 (C-2'', C-2'''), 135.9 (C-14, C-1'), 130.1 (d, $^2J_{\text{CF}} = 32.1$ Hz, C-5'', C-5'''), 127.4 (C-3'', C-3''', C-7'', C-7'''), 125.6 (q, $^3J_{\text{CF}} = 3.7$ Hz, C-4'', C-4''', C-6'', C-6'''), 123.0 (d, $^1J_{\text{CF}} = 270.6$ Hz, CF_3 -8'', CF_3 -8'''), 121.2 (C-6, C-6'), 114.4 (C-5, C-5'), 113.1 (C-2, C-2'), 70.7 (C-1'', C-1'''), 56.1 (OMe-3, OMe-3'), 39.4 (C-8, C-8'), 39.1 (C-7, C-7'), 16.4 (C-9, C-9'). EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{F}_6\text{O}_4$ [M+H]: 647.25960, encontrado [M+H]: 647.26218.

meso-20 2,2'-((((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenileno))bis(oxi))bis(N,N-diethyltan-1-amina)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 6.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.70 (dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 6.67 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, H-2, H-2'), 4.14 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H, H-1'', H-1''', CH_2O) 3.85 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 3.02 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H, H-2'', H-2''' CH_2N), 2.76 (m, 10H, H-7a, H-7a', H-3'', H-3'''), 2.31 (dd, $J = 13.4, 9.3$ Hz, 2H, H-7b, H-7b'), 1.78 (m, 2H, H-8, H-8'), 1.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 12H, Me-4'', Me-4'''), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6 H, Me-9, Me-9'). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 149.2 (C-4, C-4'), 146.2 (C-3, C-3'), 135.0 (C-1, C-1'), 121.0 (C-6, C-6'), 113.2 (C-5, C-5'), 112.8 (C-2, C-2'), 67.0 (C-1'', C-1'''), 55.8 (OMe-3, OMe-3'), 51.5 (C-2'', C-2'''), 47.7 (C-3'', C-3'''), 39.2 (C-8, C-8'), 38.8 (C-7', C-7'), 16.2 (C-9, C-9'), 11.4 (C-4'', C-4'''). EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_4$ [M+H]: 529.40053, encontrado [M+H]: 529.40194.

5.2. Caracterización estructural

5.2.1 Caracterización del AmDG

Dentro de la caracterización estructural es importante discutir los espectros de RMN del lignano puro sobre el cual se realizaron las modificaciones estructurales.

En la figura 9 se muestra el espectro de RMN ^1H , donde se observaron las señales características de lignano y concuerdan con lo previamente reportado por Hwu *et al.*⁷¹.

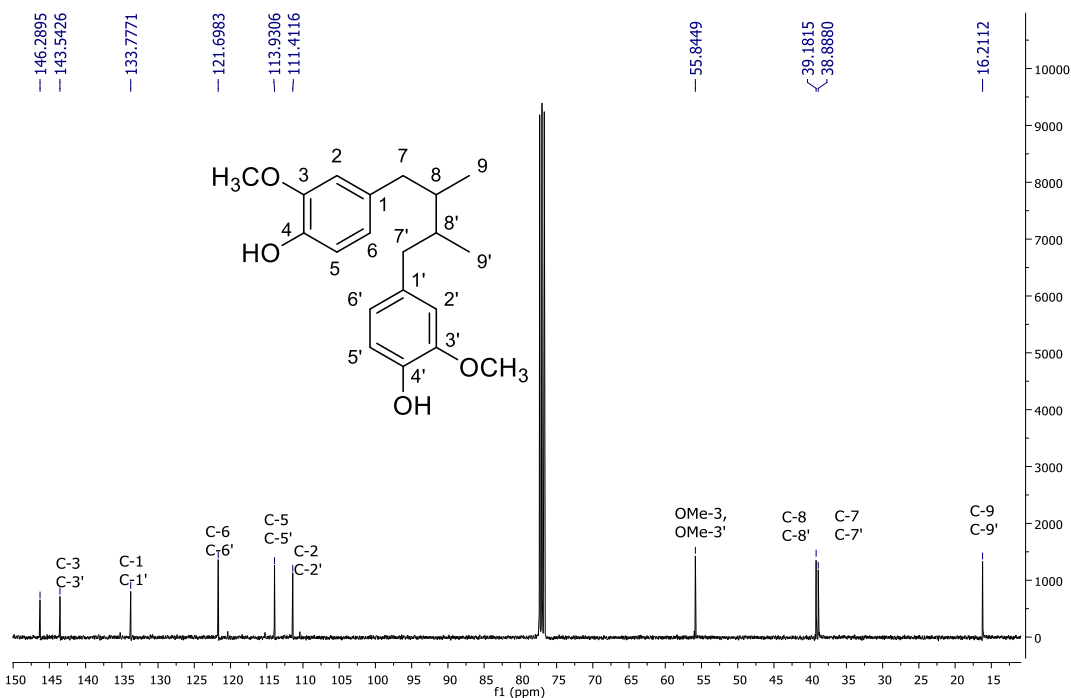
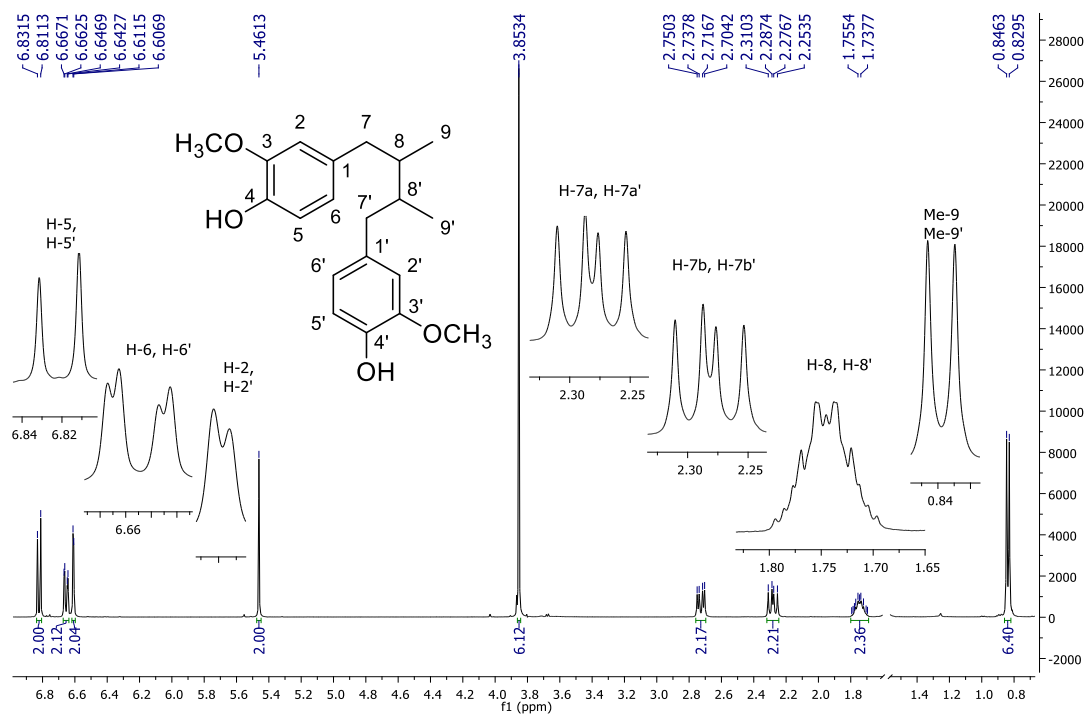
El AmDG es un compuesto que presenta una estructura simétrica, lo cual simplifica el patrón de señales. Inicialmente en la región aromática se presentan un doblete a 6.82 ppm (d, $J = 8.0$ Hz, 2H-Ar) de los protones H-5, H-5' que se acopla con los protones H-6, H-6', seguido a un doblete de doblete a 6.66 ppm (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 2H-Ar) que corresponden a los protones H-6, H-6' que presentan acoplamiento en *orto* con H-5 y H-5' y acoplamiento en *para* con H-2 y H-2'; y la última señal en esta región es otro doblete a 6.61 ppm (d, $J = 1.8$ Hz, 2H-Ar) de los protones H-2 y H-2' *meta* relacionados con H-6 y H-6'. A frecuencias medias encontramos dos singuletes, el primero a 5.46 ppm (s, 2H-OH) correspondiente a los protones fenólicos y el segundo a 3.85 ppm (s, 6H-OMe) correspondiente a los metoxilos. Por otra parte, en la región alifática encontramos dos dobletes de dobletes correspondientes a protones bencílicos, el primero a 2.73 ppm (dd, $J = 13.4, 5.0$ Hz, 2H, H-7a, H-7a') y el segundo a 2.28 ppm (dd, $J = 13.5, 9.2$ Hz, 2H, H-7b, H-7a'). Hacia campo más alto se encuentra un multiplete en 1.75 ppm (m, 2H, H-8, H-8') correspondiente a los metino. Finalmente, un doblete a 0.84 ppm (d, $J = 6.7$ Hz, 6H-Me) que corresponde a los grupos metílicos unidos a la cadena alifática (Me-9, Me-9').

Es importante destacar la señal de los hidroxilos ya que al realizar las reacciones de sustitución se efectuarán cambios en la intensidad o presencia de la señal, lo cual nos confirmará la obtención del derivado monosustituido o del disustituido.

Por su parte el espectro de RMN ^{13}C (Figura 10) muestra diez señales correspondientes a los veinte carbonos del *AmDG*. Inicialmente, a frecuencias altas observamos 6 señales de los 12 carbonos aromáticos δ (ppm): 146.29 (C-4, C-4'), 143.54 (C-3, C-3'), 133.76 (C-1, C-1'), 121.69 (C-6, C-6'), 113.93 (C5, C-5'), 111.41 (C-2, C-2'). Posteriormente, encontramos una señal en 55.85 ppm correspondiente a los dos carbonos metoxílicos (OMe-3, OMe-3') y finalmente en la región alifática tres señales a 39.18 ppm (C-8, C-8'), 38.89 ppm (C-7, C-7') y 16.21 ppm (C-9, C-9').

Algunas de las señales resultan de suma importancia para confirmar la sustitución de los diferentes grupos funcionales, entre ellos las señales de los metilos Me-9 y Me-9' y de los metoxilos. Dichas señales se presentan como singuletes y al momento de perderse la simetría de la molécula, cambian de un singulete a dos singuletes.

Ya que las señales de la molécula base se han descrito, en las siguientes discusiones de los espectros tanto de RMN ^1H como de RMN ^{13}C , sólo se hará énfasis en la discusión del patrón de sustitución de los fragmentos insertados.

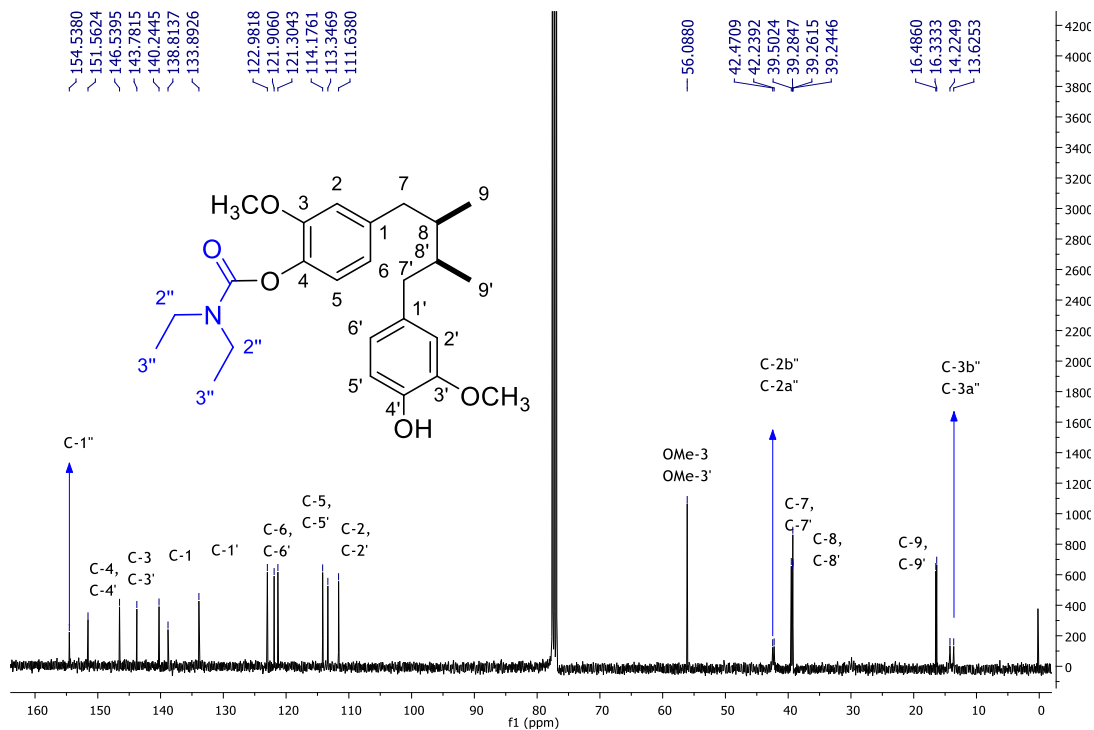
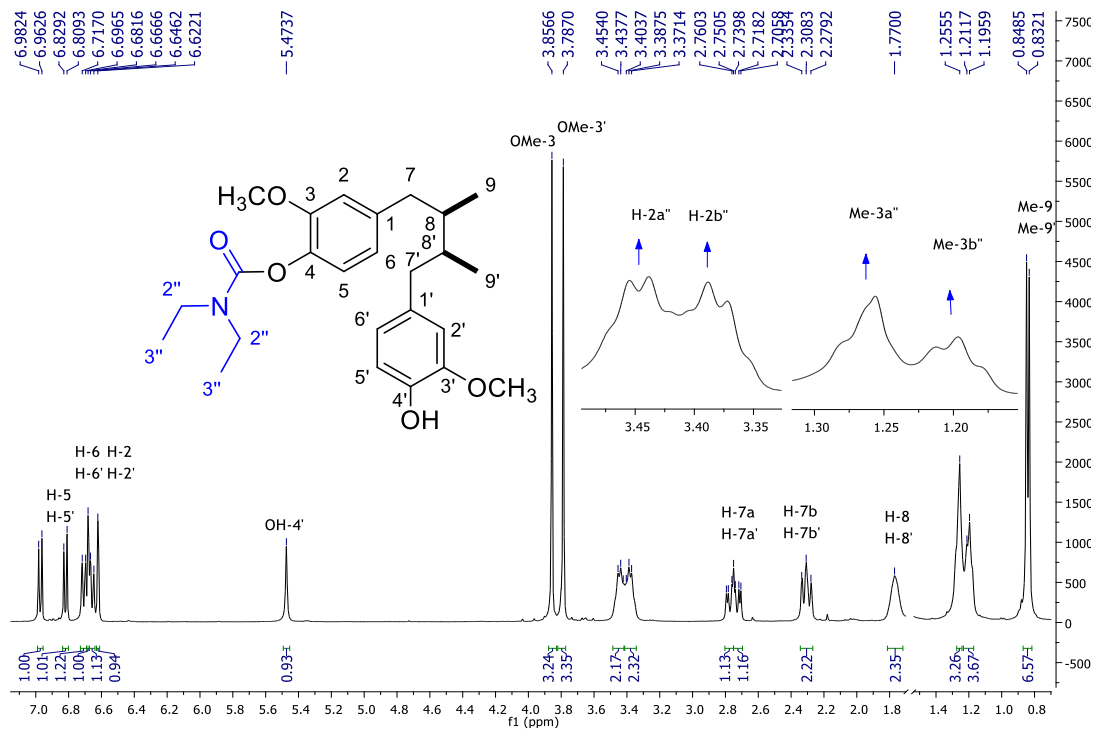


5.2.1 Caracterización de los carbamatos del AmDG

5.2.1.1 Derivado (\pm)-1

En la Figura 11 se muestra el espectro de RMN ^1H , donde se puede apreciar un aumento de las señales con respecto al espectro del *AmDG* (Figura 9), especialmente en los singuletes de los metoxilos (3.86 ppm y 3.78 ppm), así como en las señales de la región aromática, lo que indica la pérdida de simetría debida a la sustitución del grupo dietilcarbamoilo en uno de los hidroxilos del *AmDG*. Otra señal importante que indica la sustitución en uno de los hidroxilos es la señal del hidroxilo a 5.47 ppm que integra solamente para un protón.

En cuanto a las señales propias del sustituyente se observan a 3.45 ppm ($J = 6.5$ Hz, 2H) y 3.38 ppm ($J = 6.5$ Hz, 2H) dos cuartetos que integran para dos protones cada uno correspondientes a los etilos unidos al nitrógeno del carbamoilo. Finalmente, a 1.26 ($J = 6.6$ Hz, 3H) y 1.20 ppm ($J = 6.44$ Hz, 3H) se observan dos tripletes que integran para 3 protones cada uno, correspondientes a los dos grupos metilo del sustituyente dietilcarbamoilo. Por su parte en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 12) se presentan un total de 24 señales que corresponden a los 27 carbonos del derivado *meso-2*, a diferencia del espectro del *AmDG* que presenta solamente diez señales; esto se debe a la pérdida simetría por la sustitución con el grupo dietilcarbamoilo. Es importante destacar la señal en 154.54 ppm correspondiente al carbonilo del carbamato. Posteriormente en campo bajo encontramos las dos señales de los carbonos etílicos unidos al nitrógeno del sustituyente, 42.47 ppm (C-2b"), 42.24 ppm (C-2a") y finalmente las dos señales de los metilos del dietilcarbamoilo a 14.22 ppm (C-3b"), y 13.63 ppm (C-3a").



5.2.1.2 Derivado *meso*-2

En la Figura 13 se puede observar el espectro de RMN ^1H que a diferencia del espectro del derivado monosustituido (Figura 11), la cantidad de señales disminuye, esto se puede visualizar principalmente en el singulete de los metoxilos, así como en las señales de la región aromática, lo cual indica la simetría del derivado. En este espectro también se puede identificar la ausencia de la señal de los hidroxilos de la molécula base, con lo que se confirmó la sustitución en ambos hidroxilos.

En cuanto al sustituyente dietilcarbamoilo se presentaron igualmente los dos cuartetos a 3.45 ppm ($J = 6.4$ Hz, 4H) y 3.38 ppm ($J = 6.6$ Hz, 4H) correspondientes a los etilos unidos al nitrógeno del carbamoilo. Así mismo los dos tripletes metílicos a 1.26 ppm ($J = 6$ Hz, 6H) y 1.19 ppm ($J = 6.44$ Hz, 6H) correspondientes a los dos grupos metilo del sustituyente dietilcarbamoilo. A diferencia del producto monosustituido (Figura 11) la integración de estos fragmentos del sustituyente es para el doble de protones, por la sustitución en ambos hidroxilos del *AmDG*.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 14) se presentan un total de 14 señales que corresponden a los 30 carbonos del derivado *meso*-2, a diferencia del espectro del derivado monosustituido (Figura 12) que presenta 24 señales; esto confirma nuevamente la sustitución hidroxilos con el grupo dietilcarbamoilo y la consiguiente simetría del derivado. Igualmente se observó la señal a 154.53 ppm (C-1", 1") de los carbonilos del carbamato los cuatro carbonos de los etilos 42.44 ppm (C-2a", 2a"), 42.22 ppm (2b", 2b") y los cuatro carbonos de los metilos del carbamato a 14.23 ppm (C-3b", 3b") y 13.65 ppm (C-3a", 3a").

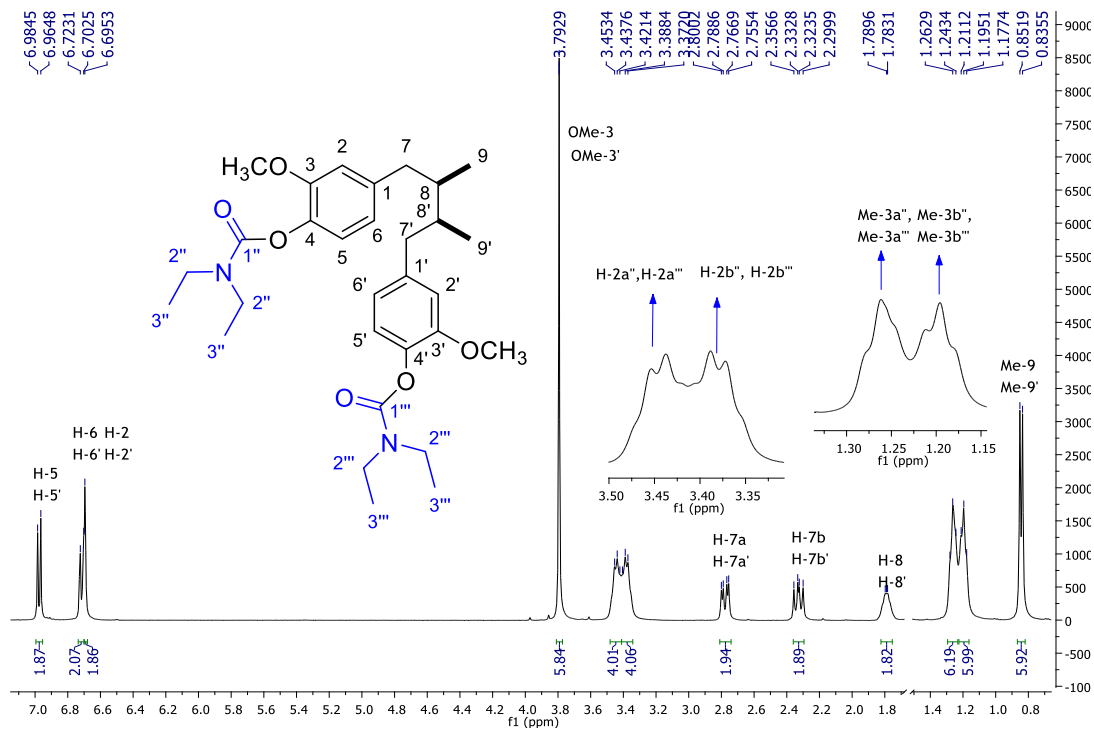


Figura 13. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de *meso*-2

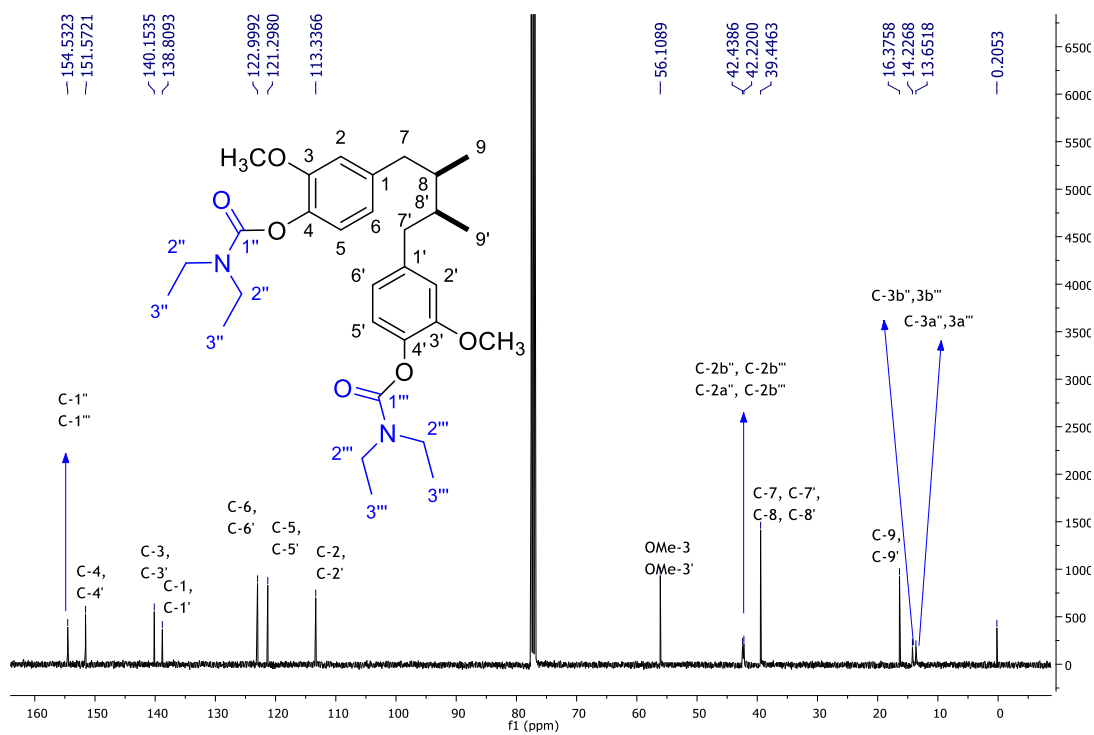


Figura 14. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de *meso*-2

5.2.1.3 Derivado (\pm)-3

En el espectro de RMN ^1H de la figura 15 únicamente se mencionarán las señales características del fragmento que confirman la sustitución de los hidroxilos con el grupo piperidincarbonilo. En el espectro se pueden observar a 3.59 ppm ($J = 6.5$ Hz, 2H, H-5'') y 3.48 ppm ($J = 6.5$ Hz, 2H, H-2'') dos tripletes que integran para 2 protones cada uno, correspondientes a los hidrógenos de unidos al nitrógeno del carbamato. Finalmente, a 1.94 ppm (4H, H-3'', H-4'') se encuentra un multiplete que corresponde a los cuatro protones restantes del fragmento piperidincarbonilo. En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 16) se pueden observar 25 señales que corresponden a cada uno de los carbonos de la molécula, donde destaca la señal del carbonilo en 153.42 ppm (C-1''), las señales de los dos carbonos unidos al nitrógeno de la pirrolidina en 46.6 ppm (C-5''), 46.5 ppm (C-2'') y finalmente los dos carbonos restantes del fragmento piperidincarbonilo en 26.0 ppm (C-3'') y 25.2 ppm (C-4'').

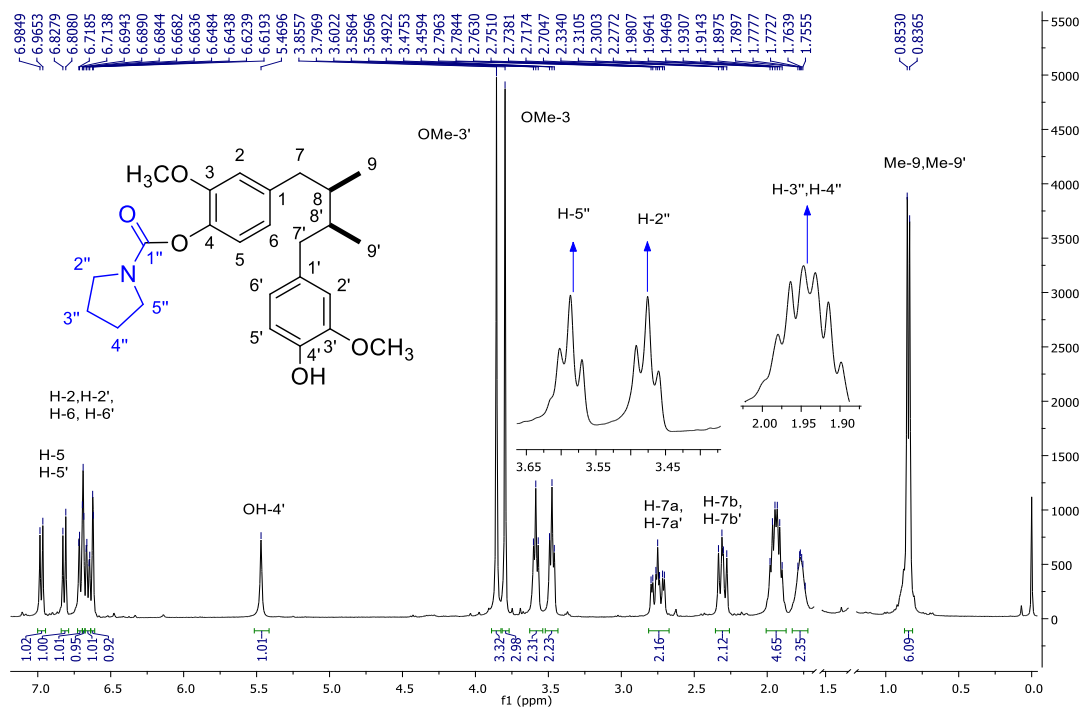


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-3

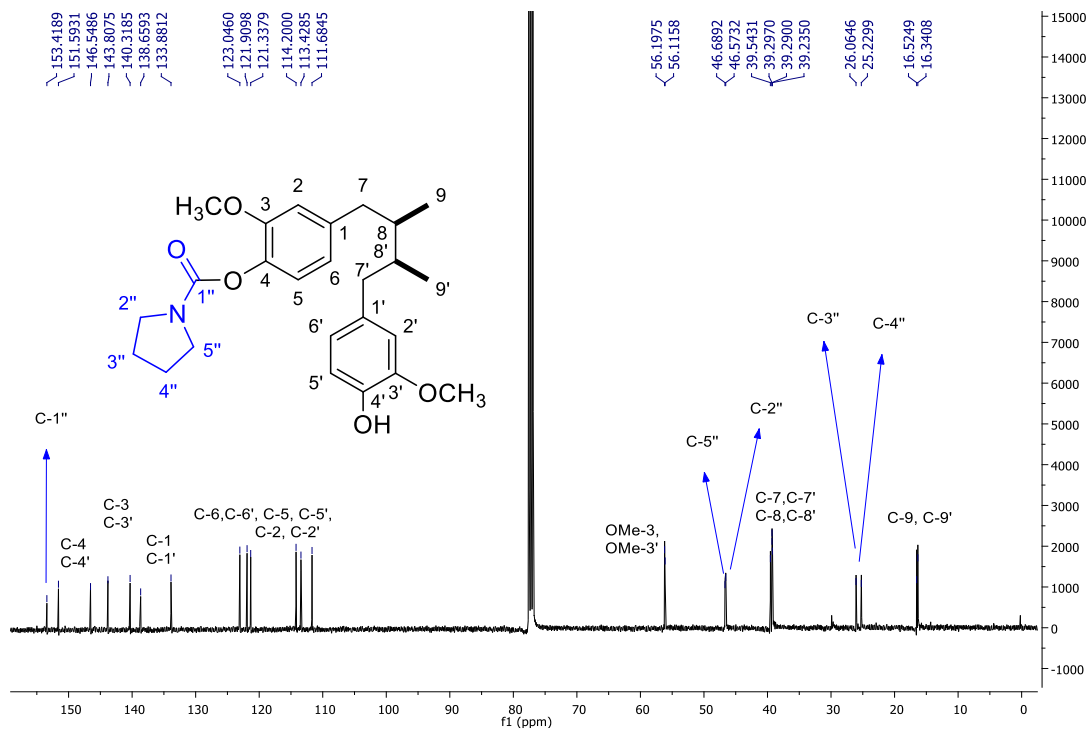


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm) -3

5.2.1.4 Derivado *meso*-4

En la Figura 17 se puede observar el espectro de RMN ^1H con las señales características del fragmento pirrolidincarbonilo presentadas en el espectro del derivado monosustituído (figura 15), los dos tripletes a 3.59 ppm ($J = 6.5$ Hz, 4H) y 3.48 ppm ($J = 6.5$ Hz, 4H) de los protones unidos directamente al nitrógeno y el multiplete a 1.94 ppm (8H, H-3'', H-3''', H-4'', H-4''') de los protones restantes en el fragmento. En este derivado la integración es para el doble de protones, lo que confirma la sustitución en ambos hidroxilos del *AmDG*. Por su parte, en el espectro de RMN ^{13}C (figura 18) se observan 15 señales correspondientes a los 30 carbonos de la molécula. Se observan cinco señales importantes que confirman la sustitución del fragmento en ambos hidroxilos de la molécula, la señal en 153.41 ppm (C-1'', 1''') de los carbonilos, las dos señales de los carbonos unidos a

nitrógeno 46.68 ppm (C-5'', 5'''), 46.57 ppm (C-2'', 2''') y las dos señales restantes del pirrolidincarbonilo a 26.07 ppm (C-3'', 3'''), y 25.23 ppm (C-4'', 4''').

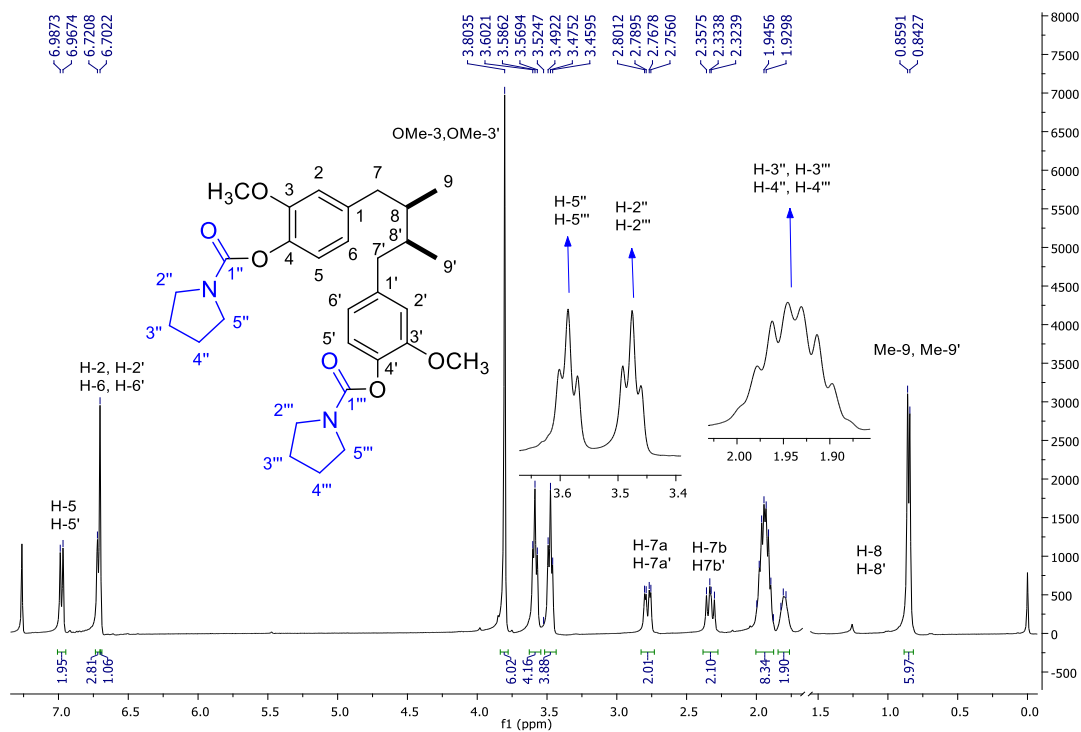


Figura 17. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de *meso*-4

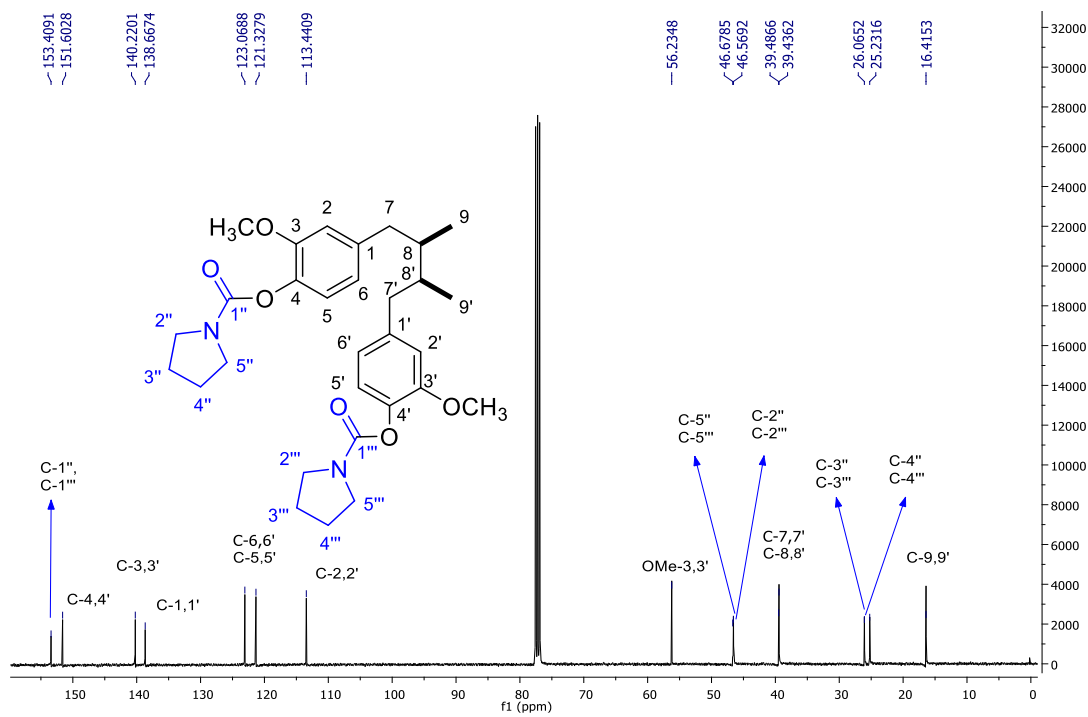


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de *meso*-4.

5.2.1.5 Derivado (\pm)-5

En la figura 19 se muestra el espectro de RMN ^1H del derivado monosustituido con un fragmento piperidincarbonilo. Dentro de las señales características del sustituyente encontramos a 3.62 ppm (2H, H-6'') y 3.50 ppm (2H, H-2'') dos singletes anchos que integran para dos protones cada uno de los protones cercanos al nitrógeno y un singlete ancho a 1.64 ppm (6 H, H-3'', H-4'', H-5'') correspondiente a los otros 6 protones del fragmento piperidincarbonilo.

En la figura 20 se muestra el espectro de RMN ^{13}C donde se observan 21 señales correspondientes a los 26 carbonos de la molécula a 154.06 ppm (C-1'') se observa el carbonilo del carbamato, posteriormente una señal a 39.54 ppm (C-2'', 6'') de los carbonos unidos al nitrógeno del carbamato y finalmente a 24.64 ppm (C-3'', 4'', 5'') la señal de los tres carbonos restantes del fragmento piperidincarbonilo.

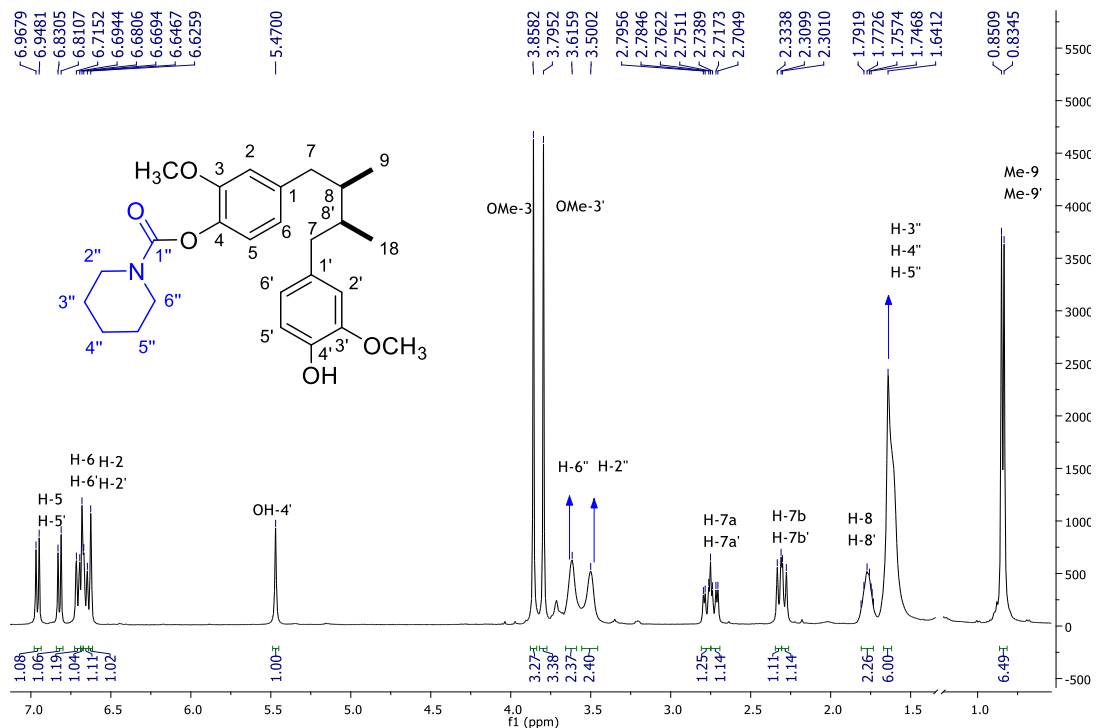


Figura 19. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-5

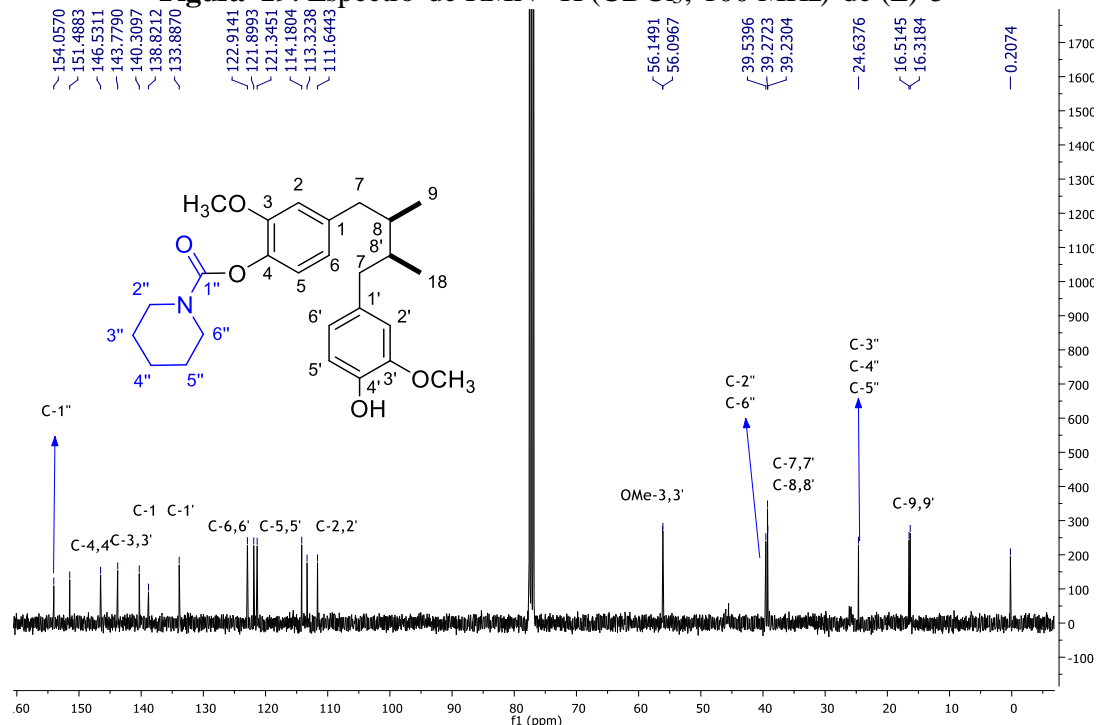
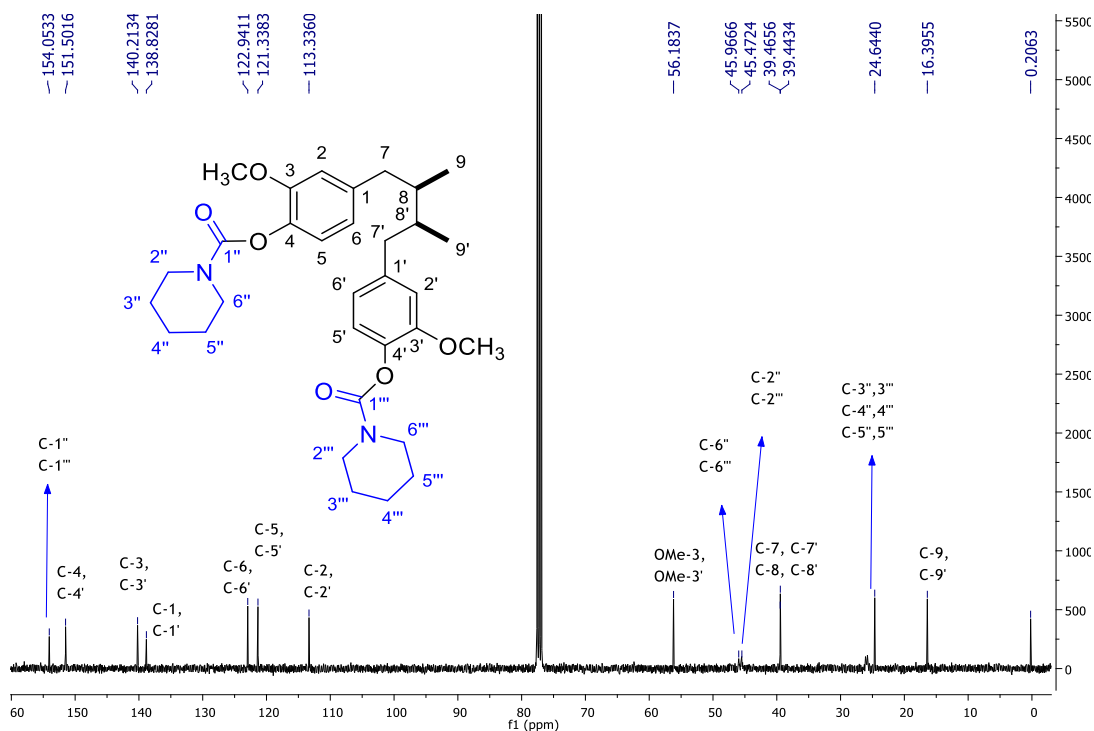
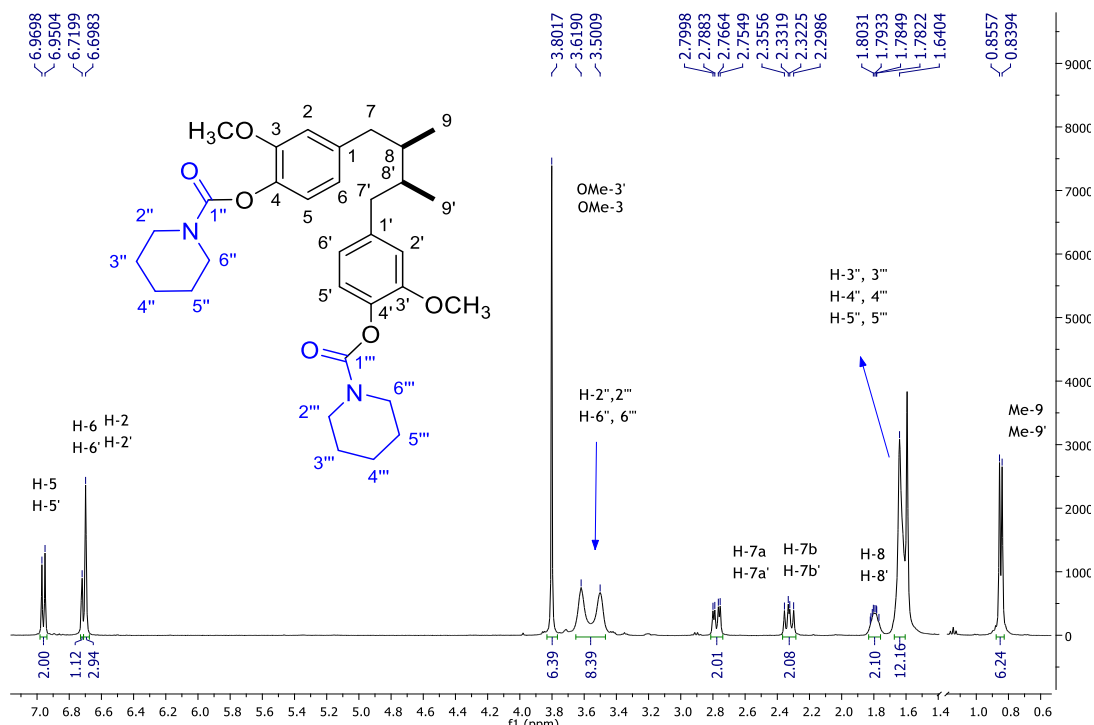


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-5

5.2.1.6. Derivado *meso*-6

En la Figura 21 se puede observar el espectro de RMN ^1H del derivado disustituido con dos fragmentos piperidincarbonilo. Al igual que en el espectro del derivado monosustituido presenta las señales características del sustituyente a 3.62 ppm (4H, H-6'', H-6''') y 3.50 ppm (4H, H-2'', H-2''') dos singletes anchos que integran para cuatro protones cada uno de los protones cercanos al nitrógeno y el singlete ancho a 1.64 ppm (12 H, H-3'', H-3''', H-4'', H-4''', H-5'', H-5''') correspondiente a los otros 12 protones del fragmento piperidincarbonilo. En la figura 22 se observa el espectro de RMN de ^{13}C donde se distinguen 14 señales correspondientes a los 32 carbonos del compuesto. En 154.0 ppm (C-1'', C-1''') observamos los carbonilos del sustituyente, seguido a dos señales en 45.9 ppm y 45.4 ppm correspondientes a los carbonos unidos al nitrógeno del fragmento

piperidincarbonilo y finalmente la señal correspondiente a los carbonos restantes del anillo de piperidincarbonilo.



5.2.1.7. Derivado (\pm)-7

En la Figura 23 se observa el espectro de RMN ^1H del derivado monosustituido con un fragmento morfolincarbonilo. Dentro de las señales características del sustituyente encontramos a 3.77 ppm ($J = 4.5$ Hz, 4H, H-3'', H-4'') un triplete que integra para los cuatro protones vecinos al oxígeno, un triplete a 3.71 ppm ($J = 4.0$ Hz, 2H, H-5'') y 3.59 ppm un singlete ancho (2H, H-2'') de los protones vecinos al nitrógeno del ciclo de morfolincarbonilo. Por su parte en el espectro de RMN ^{13}C (figura 24) se observan 23 señales que corresponden a los 25 carbonos de la molécula, donde se destacan las señales del sustituyente, a 154 ppm (C-1'') la señal del carbonilo, a 66.8 ppm (C-3'', C-4'') ppm la señal de los carbonos unidos al oxígeno y finalmente a 45.3 ppm (C-5'') y 44.5 ppm (C-2'') los carbonos unidos al nitrógeno del fragmento morfolincarbonilo.

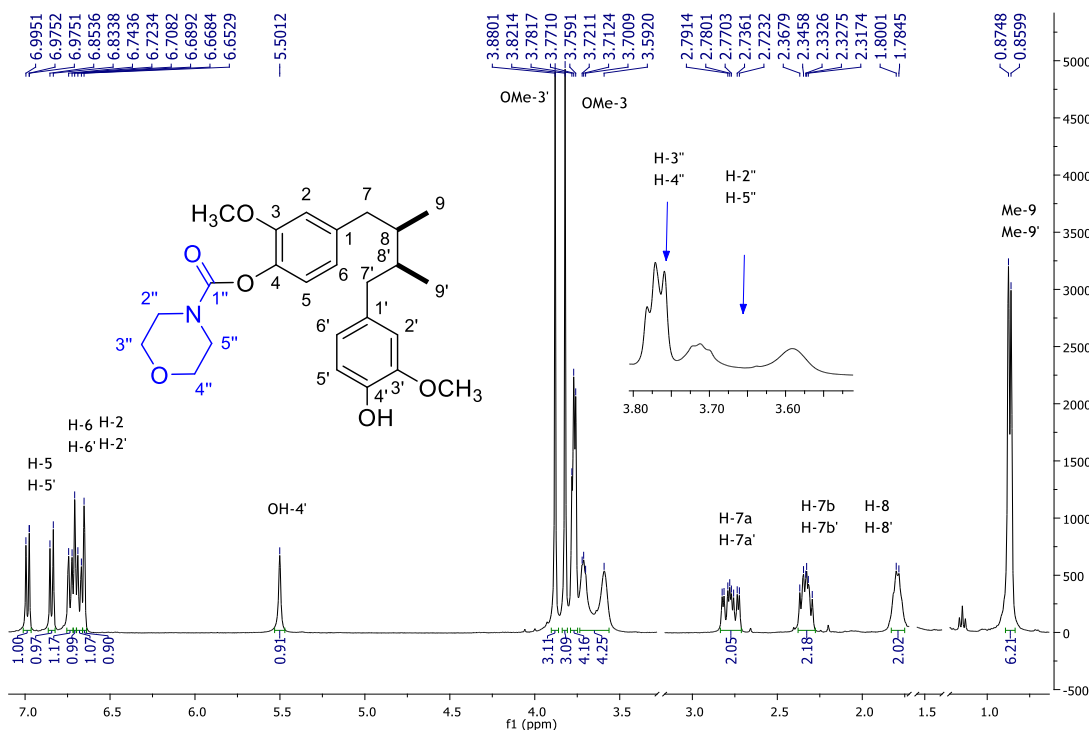


Figura 23. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-7

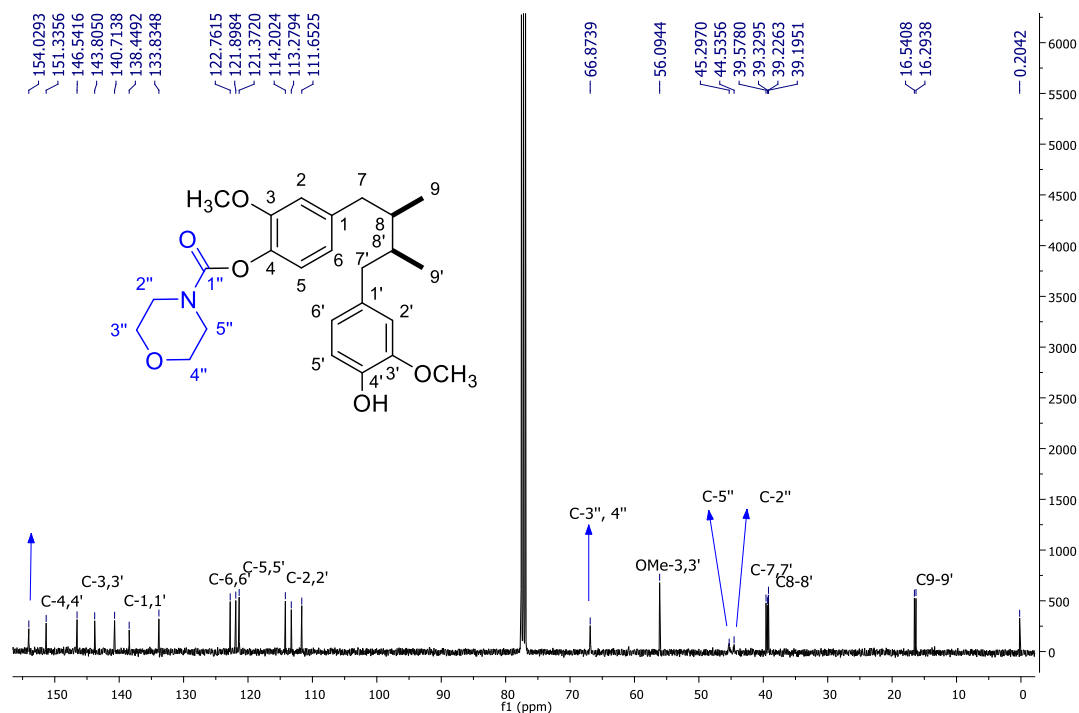


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm) -7

5.2.1.8. Derivado *meso*-8

En la Figura 25 se observa el espectro de RMN ^1H del derivado disustituido con el fragmento morfolinocarbonilo. Al igual que en el derivado monosustituido se presentaron las señales características del sustituyente a 3.75 ppm ($J = 4.5$ Hz, 4H, H-3'', H-4'') un triplete que integra para los cuatro protones vecinos al oxígeno, un triplete a 3.71 ppm ($J = 4.0$ Hz, 2H, H-5'') y 3.59 ppm un singulete ancho (2H, H-2'') de los protones vecinos al nitrógeno del ciclo de morfolinocarbonilo. Por otro parte en la figura 26 se presenta el espectro de RMN ^{13}C del producto disustituido donde se observan 14 señales que corresponden a los 30 carbonos de la molécula. Entre las señales del sustituyente, encontramos la señal de los carbonilos a 154 ppm (C-1'', C-1'''), posteriormente se observa una señal a 66.8 ppm (C-3'', C-3''', C-4'', C-4''') correspondiente a los carbonos unidos al

oxígeno y finalmente en 45.4 ppm (C-5'', C-5''') y 44.4 ppm (C-2'', C-2''') las señales de los carbonos unidos al nitrógeno del fragmento de morfolincarbonilo.

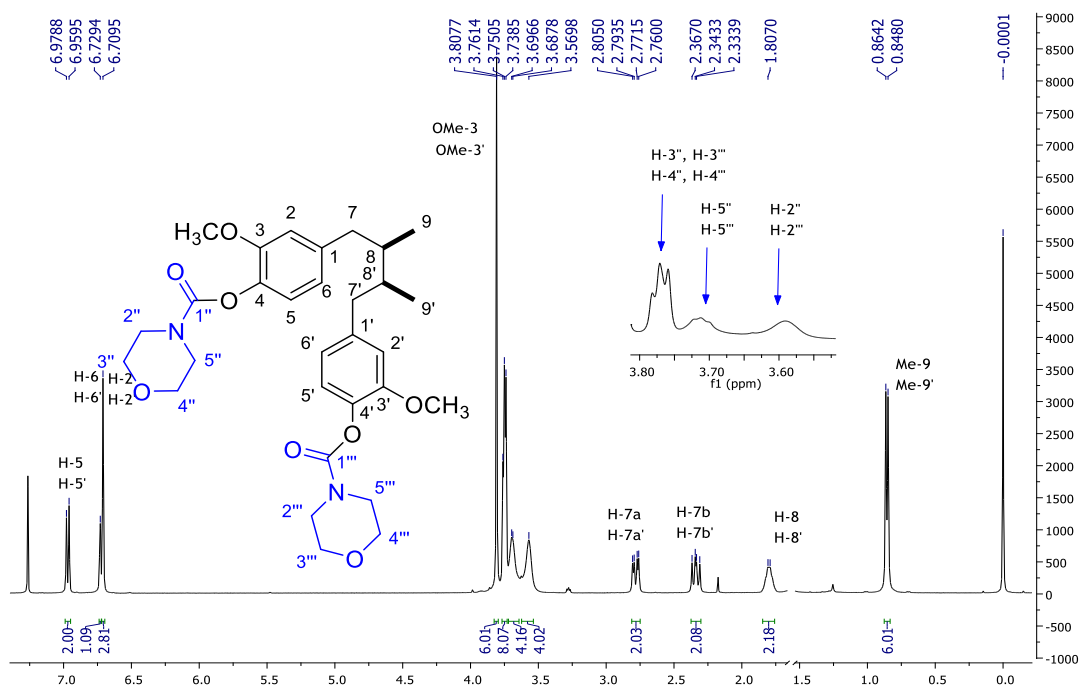


Figura 25. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de *meso*-8

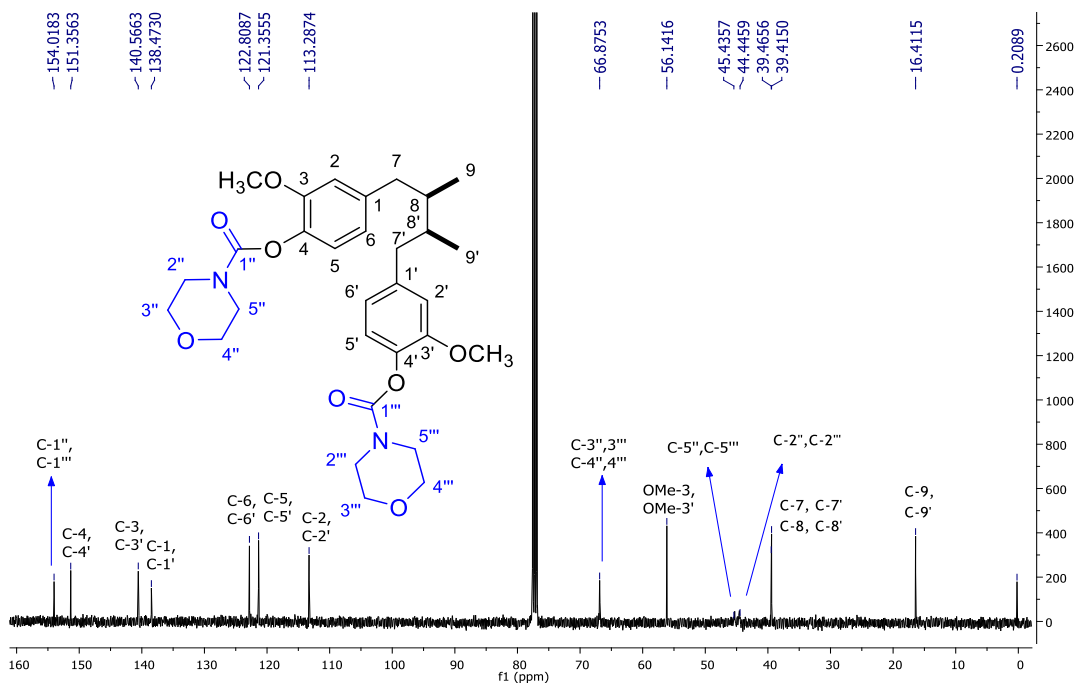


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de *meso*-8

5.2.1.9. Derivado (\pm)-9

En la Figura 27 se observa el espectro de RMN ^1H del derivado monosustituido con un fragmento 2-oxo-imidazolidincarbonilo, donde se observan las señales del sustituyente insertado. A 6.25 ppm (1H, NH-5'') un singlete correspondiente al protón del nitrógeno del anillo del sustituyente, seguido a dos tripletes a 4.07 ppm ($J = 7.9$ Hz, 2H, H-3'') y 3.53 ppm ($J = 8.06$ Hz, 2H, H-4'') que integran para 2 protones cada uno de los protones restantes del fragmento 2-oxo-imidazolidincarbonilo. Por su parte en el espectro de RMN ^{13}C del producto monosustituido con un fragmento 2-oxo-imidazolidincarbonilo donde se observan 23 señales correspondientes a los 24 carbonos de la molécula. Entre las señales características del fragmento, a 156.2 ppm (C-6'') la señal del carbonilo del anillo del fragmento, seguido al carbonilo del carbamato a 150.2 ppm (C-1''), seguidos las señales de los dos carbonos restantes del 2-oxo-imidazolidincarbonilo a 43.7 ppm (C-3'') y 37.0 ppm (C-4'')

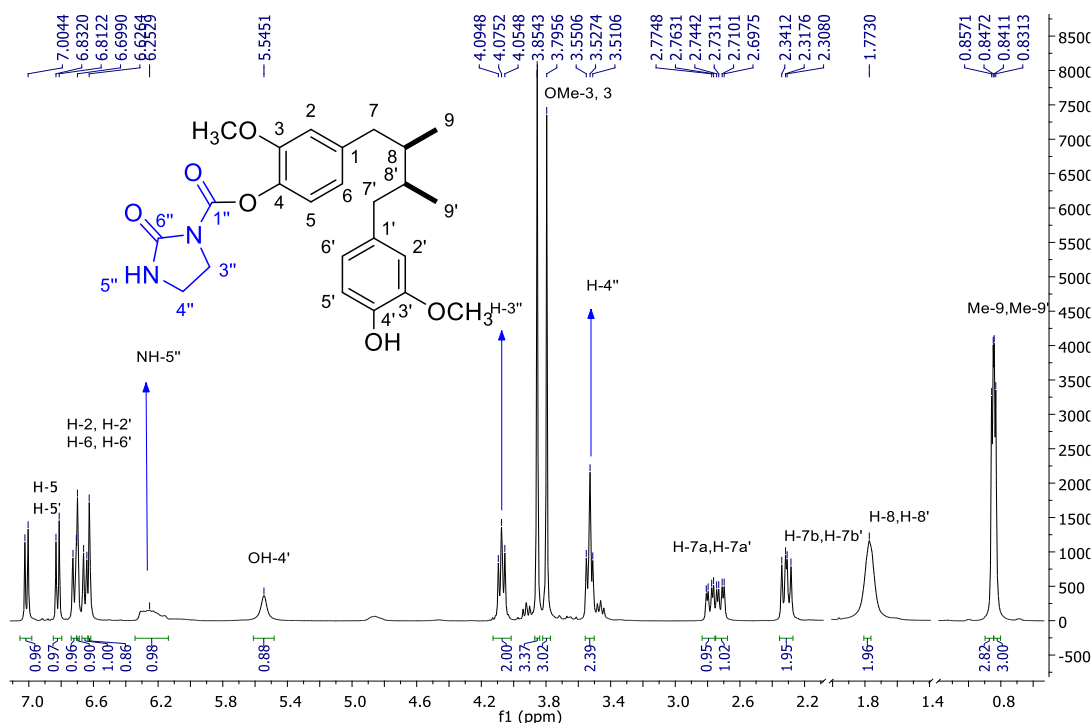


Figura 27. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-9

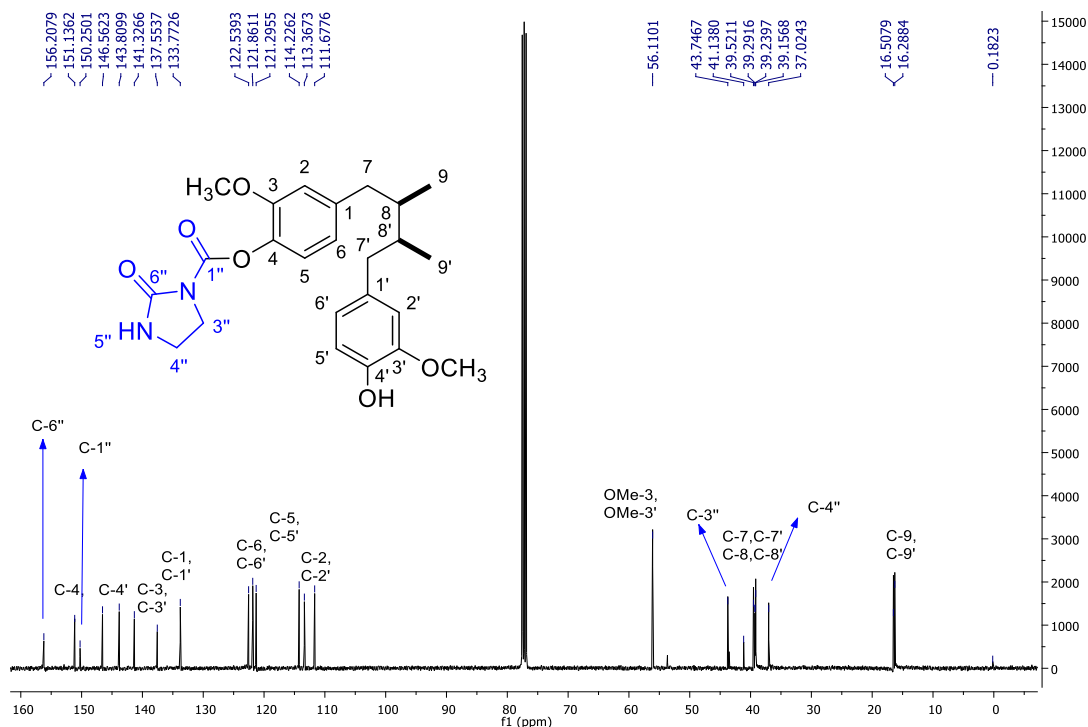


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm) -9

5.2.2 Caracterización de los éteres del AmDG

5.2.2.1. Derivado (\pm) -10

En la Figura 29 se muestra el espectro de RMN ^1H del éter monosustituido con un fragmento alilo. En el espectro se muestran las señales del fragmento, inicialmente a 6.09 ppm (1H, H-2'') un multiplete que integra para un protón vinílico, seguido a dos dobles de dobles a 5.39 ppm ($J = 17.24, 1.32$ Hz, 1H, H-3a'') y 5.27 ppm ($J = 10.46, 0.94$ Hz, 1H, H-3b'') que integran para los otros dos protones vinílicos. Finalmente se encuentra un doblete a 4.59 ppm ($J = 5.40$ Hz, 2H, H-1'') correspondiente a los protones unidos al oxígeno del fragmento alílico. Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{13}C de la figura 30 se muestran 23 señales correspondiente a cada uno de carbonos de la molécula. En él se destacan las señales del fragmento alílico, a 135.1 ppm (C-2'') y 117.96 ppm (C-3'') las

señales de los carbonos vinílicos y posteriormente a 70.2 ppm (C-1'') el carbono unido al oxígeno del éter.

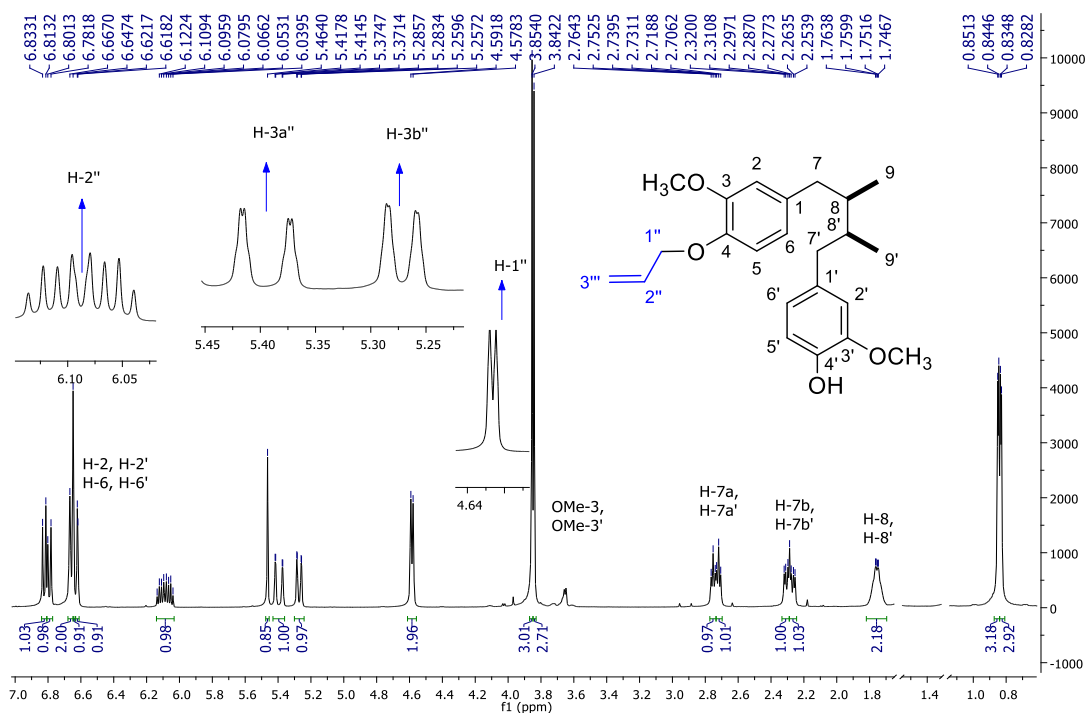


Figura 29. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-10

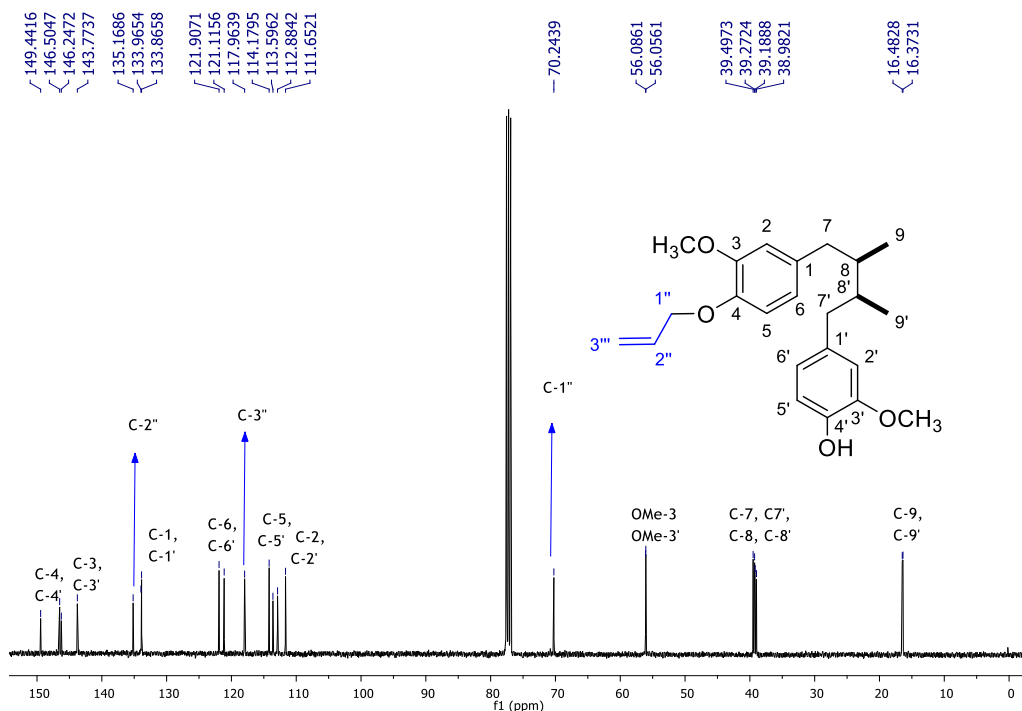


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-10

5.2.2.2. Derivado *meso*-11

En la figura 31 se observa el espectro de RMN ^1H se observan las mismas señales características del fragmento alilo a 6.09 ppm (2H, H-2'', H-2''') un multiplete que integra para los dos protones alílicos de las posiciones H-2'', H-2''', seguido a dos dobles de dobles a 5.39 ppm ($J = 17.24, 1.44$ Hz, 2H, H-3a'', H-3a''') y 5.27 ppm ($J = 10.48, 1.20$ Hz, 2H, H-3b'', H-3b''') de los protones vinílicos de las posiciones H-3'' y H-3'''. Finalmente se observa un doblete a 4.58 ppm ($J = 5.43$ Hz, 4H, H-1'', H-1''') de los protones unidos al oxígeno del fragmento alílico. En la figura 32 se observan 13 señales correspondientes a los 26 carbonos de la molécula, donde se observa a 135.14 ppm (C-2'', C-2''') y 117.95 ppm (C-3'', C-3''') los carbonos vinílicos y finalmente a 70.23 ppm (C-1'', C-1''') los carbonos unidos al oxígeno del fragmento alílico.

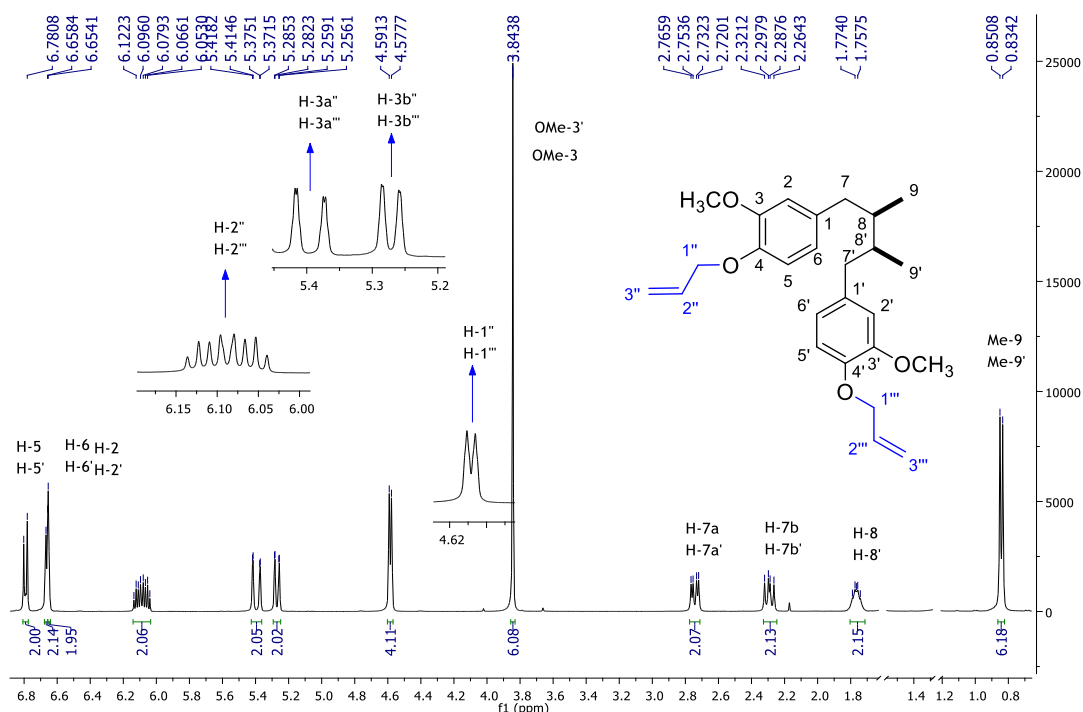


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de *meso*-11

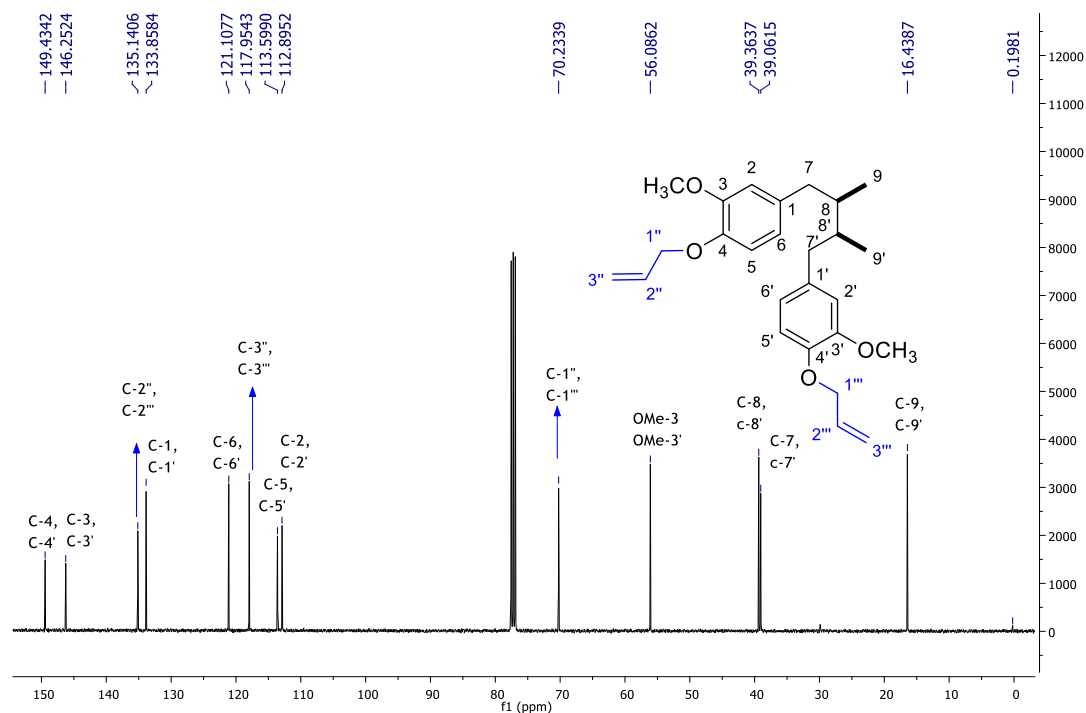


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de *meso*-11

5.2.2.3. Derivado (\pm)-12

En la Figura 31 se observa el espectro de RMN ^1H del derivado disustituido con el fragmento buteno. En el espectro se puede observar a 5.91 ppm ($J = 17.16, 10.32, 6.72$ Hz, 1H, H-3'') un doble de doble tripleteado que integra para uno de los protones vinílicos, posteriormente encontramos dos dobles de dobles a 5.17 ppm ($J = 17.18, 1.42$ 1H, H-4a'') y 5.10 ppm ($J = 10.18, 1.42$ Hz, 1H, H-4b'') de los dos protones vinílicos de la posición H-4''. Finalmente se observa un triplete que corresponde a los dos protones unidos al oxígeno del éter a 4.04 ppm ($J = 7.02$ Hz, 2H, H-1''). Por su parte en el espectro de RMN ^{13}C de la figura 34 se observan 24 señales correspondientes a cada una de las señales de la molécula. Dentro de las señales del fragmento alílico encontramos a 135.1 ppm (C-3'') y 117.1 ppm (C-4'') las señales de los carbonos vinílicos. Posteriormente, a 68.7 ppm (C-

1'') encontramos la señal del carbono unido al oxígeno del éter y finalmente a 33.9 ppm se encuentra la señal del carbono de la posición C-2'.

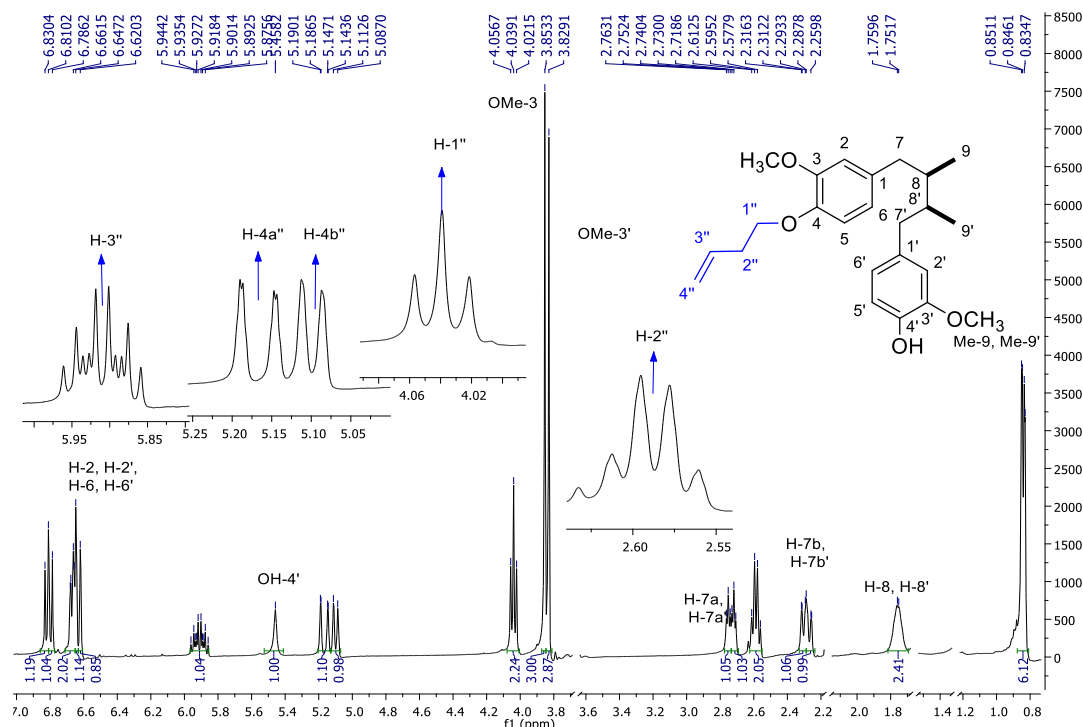


Figura 33. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-12

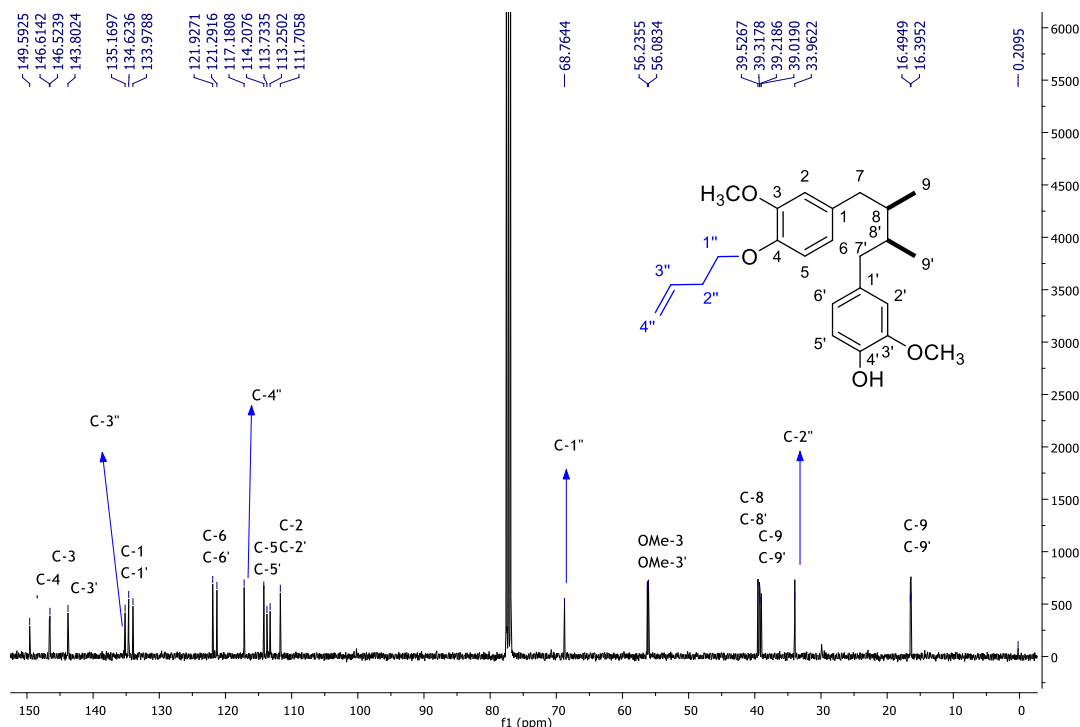


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-12

5.2.2.4. Derivado *meso*-13

En el espectro de RMN ^1H de la figura 35 se muestran las mismas señales que en el derivado monosustituido, pero que integran para el doble de protones. Se observa el multiplete a 5.91 ppm (2H, H-3'', H-3''') y los dos dobletes a 5.17 ppm ($J = 17.28$ Hz, 2H, H-4a'', H-4a''') 5.10 ppm ($J = 10.24$ Hz, 2H, H-4b'', H-4b''') correspondientes a los protones vinílicos. Posteriormente, el triplete 4.04 ppm ($J = 7.04$ Hz, 4H, H-1'', H-1''') de los protones unidos al oxígeno del éter. Y finalmente, a 2.59 ppm ($J = 7.02$ Hz, 4H, H-2'', H-2''') un cuarteto de los cuatro protones de la posición H-2'' y H-2'''. Por su parte, en el espectro de RMN ^{13}C del derivado disustituido de la figura 36 se observan 14 señales correspondientes a los 28 carbonos de la molécula. Se destacan las señales características del sustituyente a 135.1 ppm (C-3'', C-3''') y 117.7 ppm (C-4'', C-4''') los carbonos vinílicos, seguidos a la señal del carbono unido al oxígeno del éter a 68.7 ppm (C-1'', C-1''') y finalmente a 33.9 ppm (C-2'', C-2''') la señal de los carbonos de la posición C-2'' y C-3''' del fragmento de buteno.

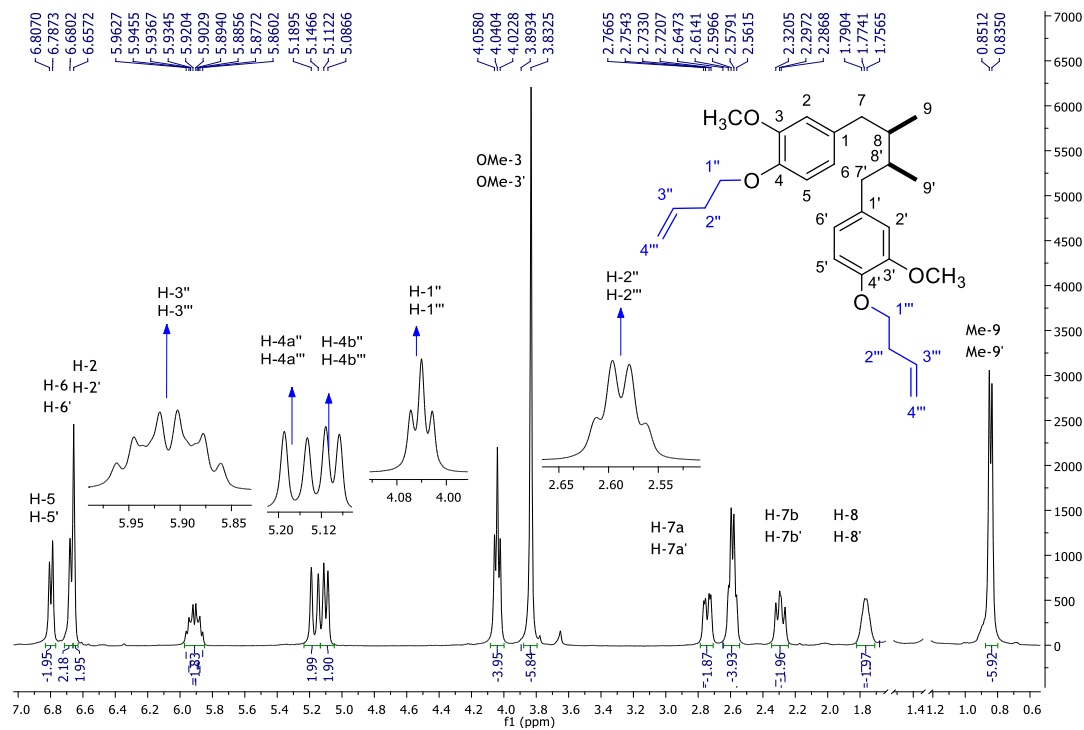


Figura 35. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de *meso*-13

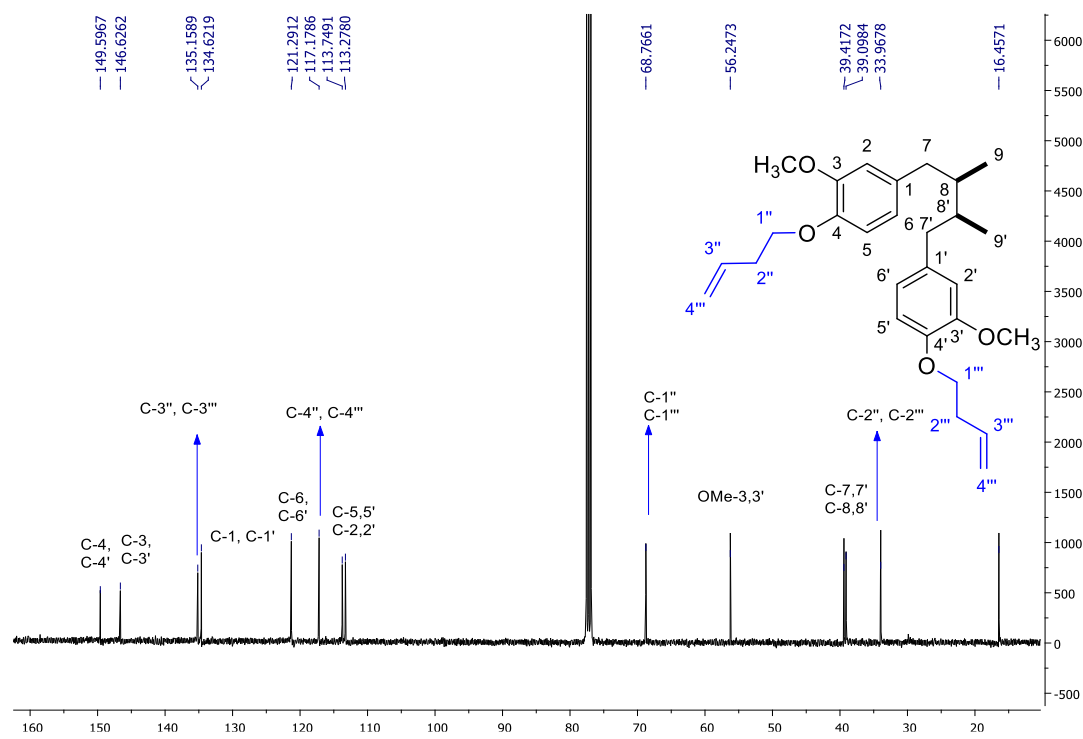


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de *meso*-13

5.2.2.5. Derivado (\pm)-14

En el espectro de RMN ^1H de la molécula monosustituida con un fragmento de hepteno (Figura .37), se observa a un doble de doble tripleteado 5.82 ppm ($J = 17.0, 10.2, 6.7$ Hz, 1H, H-6") correspondiente al protón vinílico 6", seguido a dos dobles de dobles a 5.01 ppm ($J = 17.14, 1.82$ Hz, 1H, H-7a") y 4.95 ppm ($J = 10.20, 1.76$ Hz, 1H, H-7b") de los protones vinílicos de la posición 7". Posteriormente se encuentra un triplete a 3.99 ppm ($J = 6.88$ Hz, 2H, H-1") de los protones unidos al oxígeno del éter. A frecuencias más bajas se encuentra un cuarteto a 2.08 ppm (q, $J = 6.67$ Hz, 2H, H-5"), un pentaplete a 1.84 ppm (p, $J = 7$ Hz, 2H, H-2") y un triplete a 1.47 ppm (t, $J = 3.79$ Hz, 4H, H-3", H-4") de los protones de la cadena alifática. Por su parte en la figura 38 se muestra el espectro de RMN ^{13}C del derivado monosustituido donde se observan 27 señales correspondientes a cada uno de los carbonos de la molécula. Entre las señales propias del sustituyente encontramos a 139.0 ppm (C-6") y 114.6 ppm (C-7") las señales de los carbonos vinílicos, seguida de la señal del carbono unido al oxígeno del éter en 69.3 ppm (C-1"). Posteriormente encontramos a las señales de los carbonos de la cadena alifática a 33.9 ppm (C-5"), 29.3 ppm (C-2"), 28.9 ppm (C-4") y 25.0 ppm (C-3").

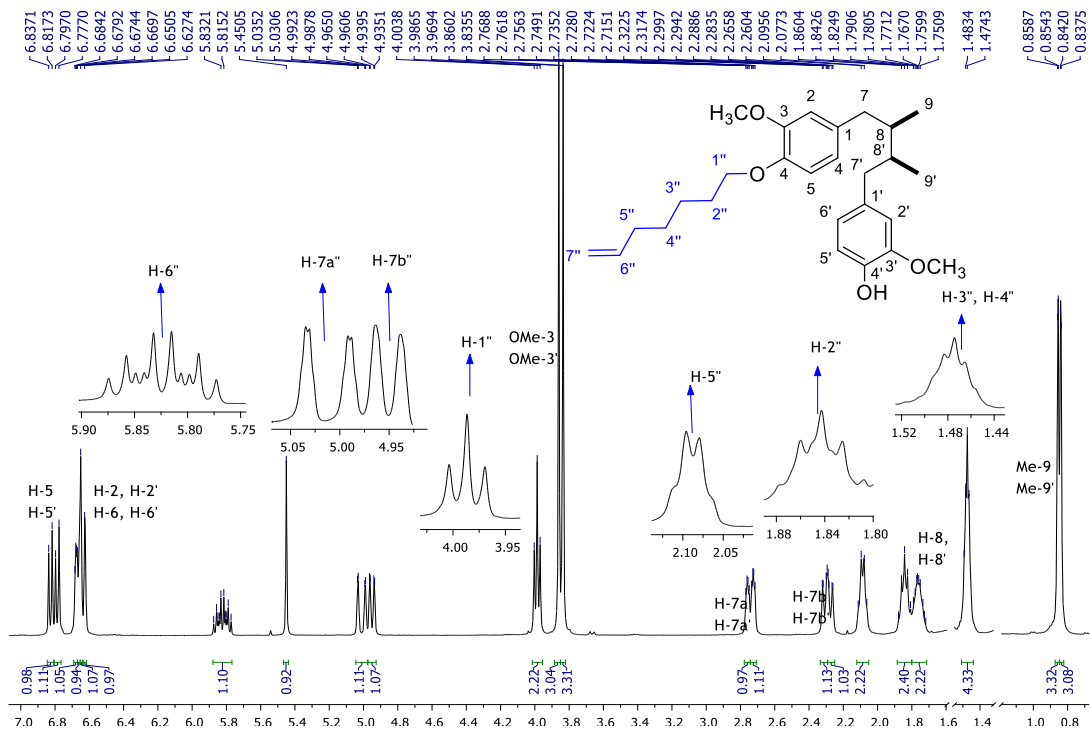


Figura 37. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-14

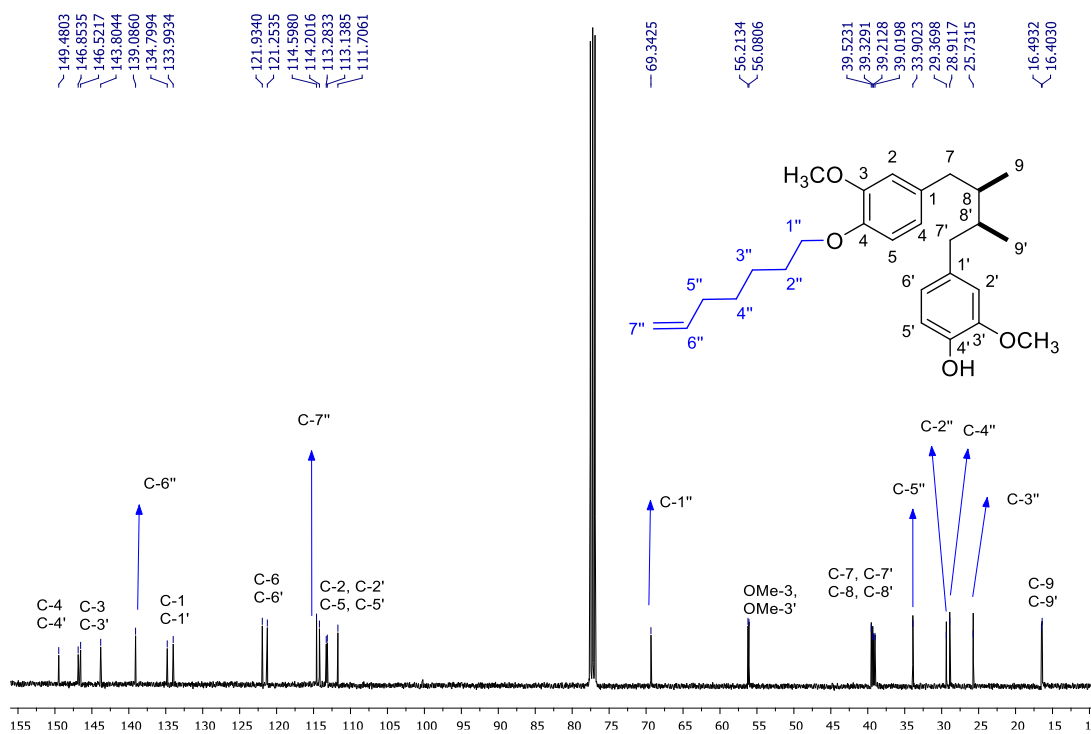
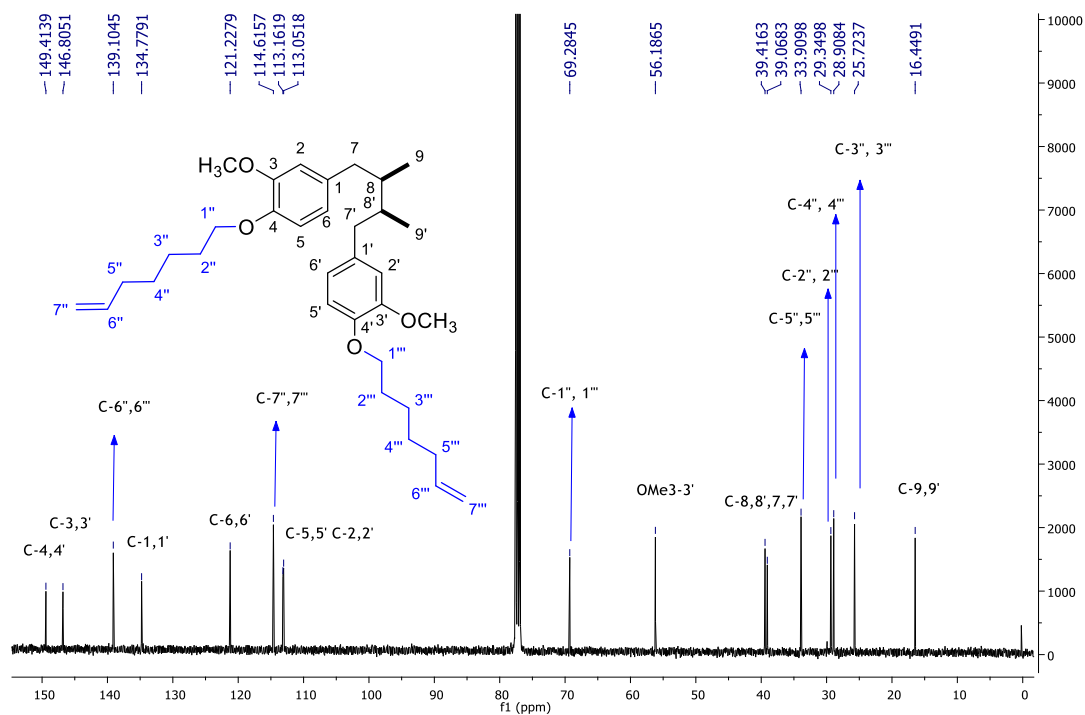
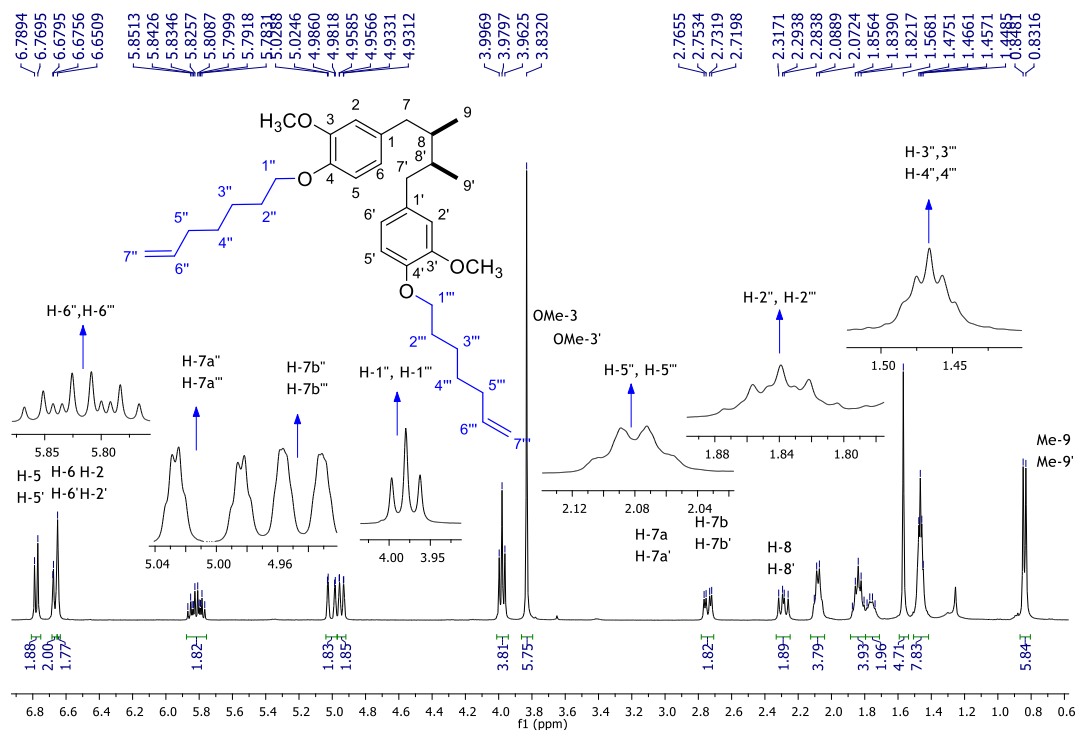


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-14

5.2.2.6. Derivado *meso*-15

En el espectro de RMN ^1H de la molécula disustituida con el fragmento de hepteno (figura .39), se observa el mismo patrón de señales del sustituyente que en el producto monosustituido (figura 37), pero que integran para el doble de protones. Se observa a el doble de doble tripleteado a 5.82 ppm ($J = 16.9, 10.2, 6.6$ Hz, 2H, H-6'', H-6''') correspondiente a los protones vinílicos 6'' y 6''', seguido a dos dobles de dobles a 5.01 ppm ($J = 17.1, 1.6$ Hz, 2H, H-7a'', H-7a''') y 4.94 ppm ($J = 10.4, 0.7$ Hz, 2H, H-7b'', H-7b''') de los protones vinílicos de la posición 7'' y 7'''. Posteriormente se encuentra un triplete a 3.98 ppm ($J = 6.8$ Hz, 4H, H-1'', H-1''') de los protones unidos al oxígeno del éter. A frecuencias más bajas se encuentra un cuarteto a 2.08 ppm ($J = 6.0$ Hz, 4H, H-5'', H-5'''), un quinteto a 1.84 ppm ($J = 6.9$ Hz, 4H, H-2'', H-2''') y otro quinteto a 1.47 ppm ($J = 3.6$ Hz, 8H, H-3'', H-3''', H-4'', H-4''') de los protones de la cadena alifática. Por su parte, en el espectro de RMN ^{13}C (figura 40) se observan 17 señales correspondientes a los 34 carbonos de la molécula. Entre las señales del fragmento hepteno se encuentran a 139.1 ppm (C-6'', C-6''') y 114.6 ppm (C-7'', C-7''') las señales de los carbonos vinílicos, seguidas de la señal de los carbonos unidos al oxígeno del éter a 69.2 ppm (C-1'', C-1'''). Finalmente, a frecuencias bajas aparecen las señales de la cadena alifática a 33.9 ppm (C-5'', C-5'''), 29.3 ppm (C-2'', C-2'''), 28.9 ppm (C-4'', C-4''') y 25.7 ppm (C-3'', C-3''').



5.2.2.7. Derivado (\pm)-16

En la figura 41 se muestra el espectro de RMN ^1H del derivado monosustituido con un fragmento de *p*-fluorobencilo, donde en las señales propias del sustituyente observamos en la región aromática dos dobletes a 7.42 ppm ($J = 8.44$ Hz, 1H, H-7") y 7.40 ppm ($J = 8.52$ Hz, 1H, H-3"), seguido de un triplete a 7.05 ppm ($J = 8.68$ Hz, 2H, H-4", H-6") correspondientes a los 4 protones del anillo de fluorobencilo. Finalmente, a 5.07 ppm (2H, H-1") se observa un singulete de los protones unidos al oxígeno del éter. Por su parte en el espectro de RMN ^{13}C de la figura 42 se observan 28 señales correspondientes a los 27 carbonos de la molécula. En cuanto a las señales del sustituyente podemos observar a un cuatro dobletes, el primero a 162.6 ppm ($^1J_{\text{CF}} = 244.2$ Hz, C-5"), correspondiente al acoplamiento del carbono cuaternario C-5" con el flúor, posteriormente a 133.4 ppm (d, $^4J_{\text{CF}} = 2.9$ Hz, C-2"), correspondiente al acoplamiento del flúor con el otro carbono cuaternario del fragmento fluorobencilo, seguido a otro doblete a 129.4 ppm (d, $^3J_{\text{CF}} = 8.2$ Hz, C-3", C-7") y 115.6 ppm (d, $^2J_{\text{CF}} = 21.41$ Hz, C-4", C-6") del acoplamiento entre el flúor y los carbonos del anillo de fluorobencilo.

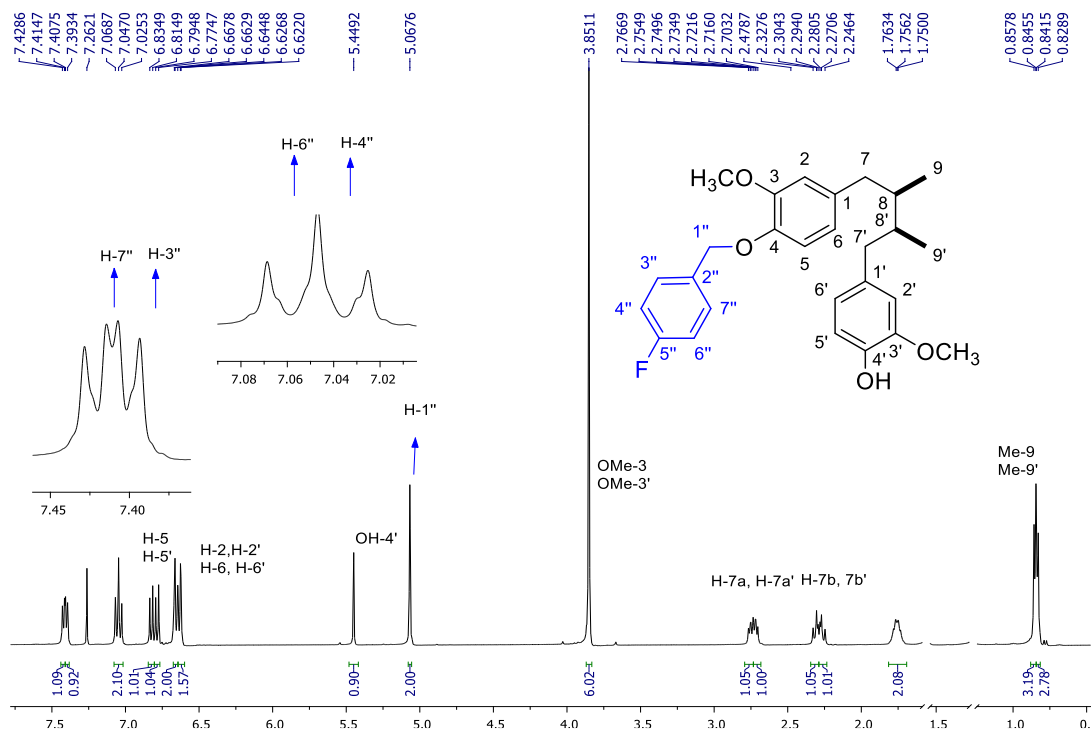


Figura 41. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de (\pm)-16

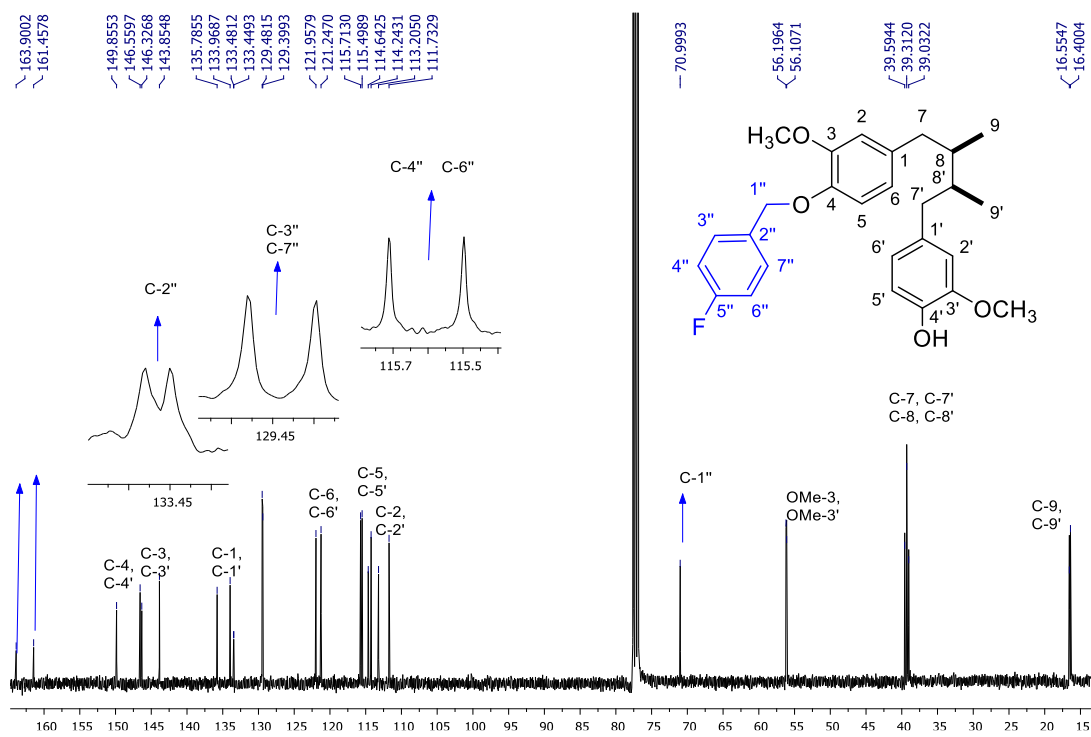


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-16

5.2.2.8. Derivado *meso*-17

En la figura 43 se muestra el espectro de RMN ^1H del derivado disustituido con un fragmento de *p*-fluorobencilo, donde al igual que en el derivado monosustituido (Figura 41) se observan las señales propias del sustituyente, en la región aromática dos dobletes a 7.42 ppm ($J = 8.44$ Hz, 1H, H-7'') y 7.40 ppm ($J = 8.52$ Hz, 1H, H-3''), seguido de un triplete a 7.05 ppm ($J = 8.68$ Hz, 2H, H-4'', H-6'') correspondientes a los 4 protones del anillo de fluorobencilo. Finalmente, a 5.07 ppm (2H, H-1'') se observa un singlete de los protones unidos al oxígeno del éter.

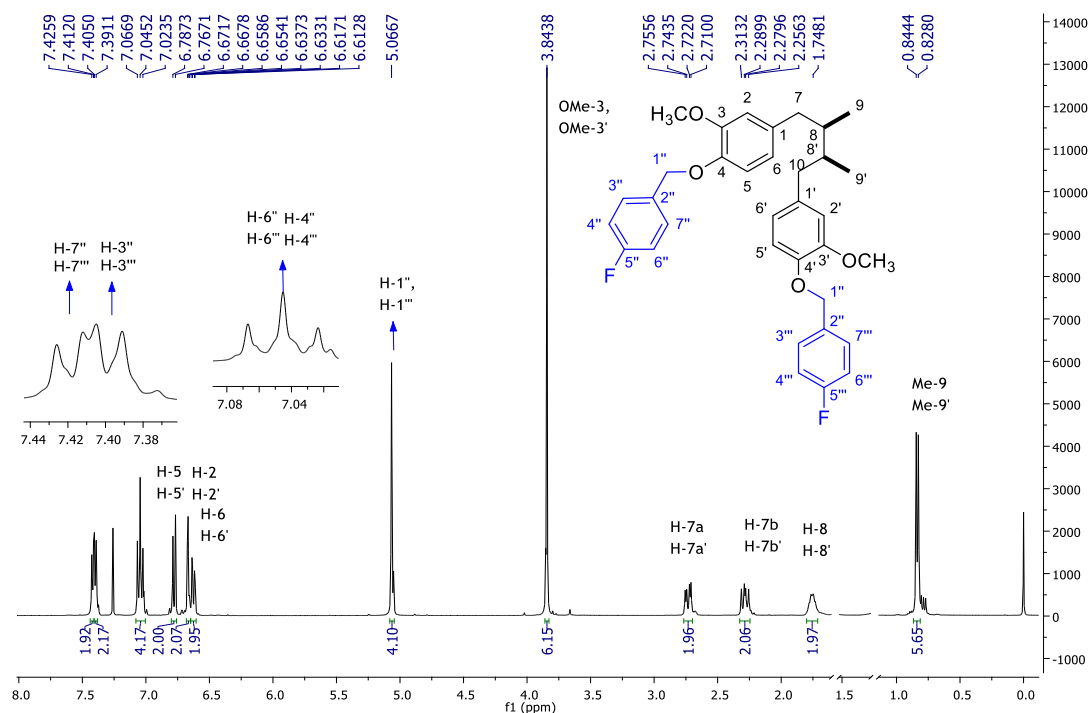


Figura 43. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de *meso*-17

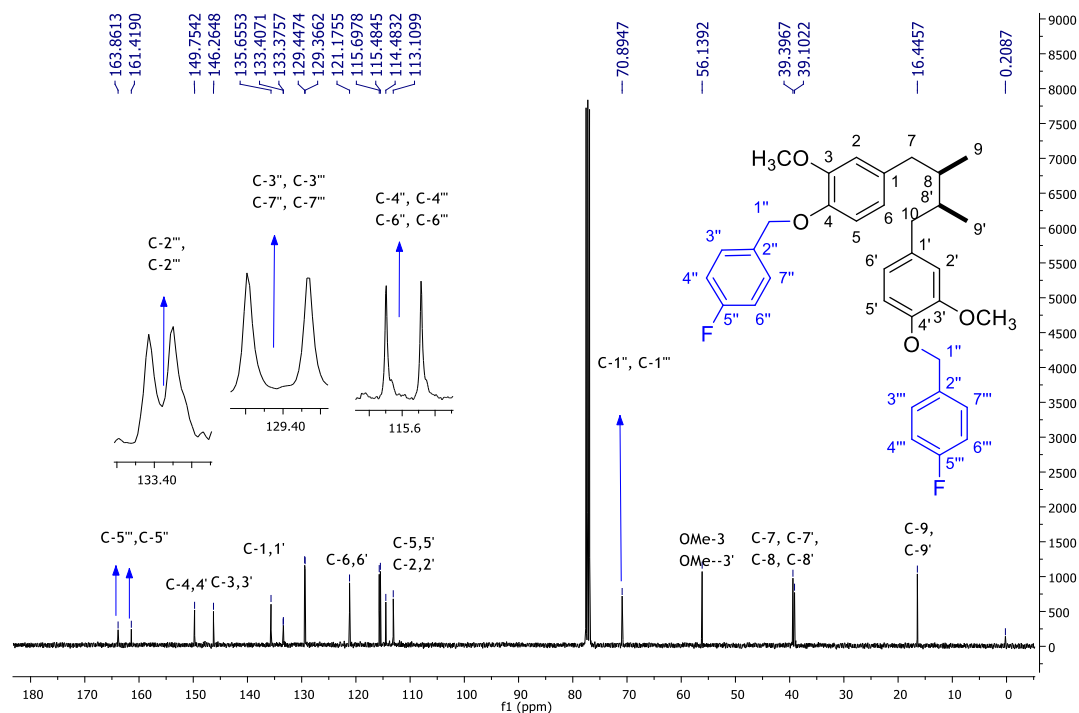


Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de *meso*-17

5.2.2.9. Derivado (\pm)-18

En la figura 45 se muestra el espectro de RMN ^1H del derivado monosustituido con un fragmento trifluorometilbencilo. Se pueden observar las señales características del fragmento, a campos bajos aparecen dos dobletes a 7.63 ppm ($J = 8.1$ Hz, 2H, H-3'', H-7''), 7.56 ppm ($J = 8.0$ Hz, 2H, H-4'', H-6'') de los protones bencílicos. Posteriormente se observa un singulete a 5.17 ppm (2H, H-1'') correspondiente a los protones del carbono unido al oxígeno del éter. Por su parte, en las figuras 46 y 47 se muestra el espectro de RMN ^{13}C del derivado monosustituido con el fragmento trifluorometilbencilo donde se observan 32 señales, correspondientes a los 28 carbonos de la molécula. Dentro de las señales características del fragmento encontramos a los dos carbonos cuaternarios, el primero a 141.84 ppm (C-2'') del carbono más cercano al oxígeno y el segundo a 130.0 ppm (q, $^2J_{\text{CF}} = 32.19$ Hz, C-5''), este último se presenta como un cuarteto por el

acoplamiento con la porción trifluorometilo dos enlaces. Posteriormente encontramos a 127.4 ppm (C-3'', C-7'') los carbonos de la posición C-3'' y C-7'', seguidos a un cuarteto de los carbonos bencílicos restantes a 125.6 ppm ($^3J_{CF} = 3.7$ Hz, C-4'', C-6''), correspondiente al acoplamiento C-F a tres enlaces. Seguida a esta señal encontramos un doblete a 123.0 ppm ($^1J_{CF} = 269.2$ Hz, CF₃-8'') correspondiente al acoplamiento del carbono del trifluorometilo.

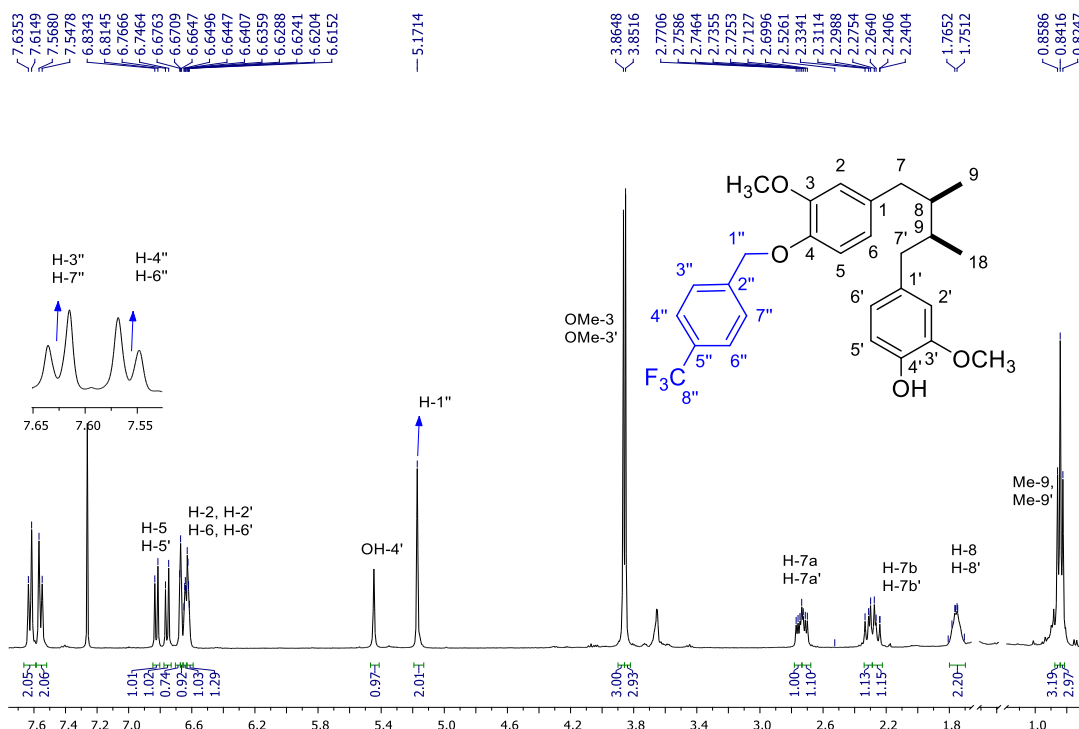


Figura 45. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de (±)-18

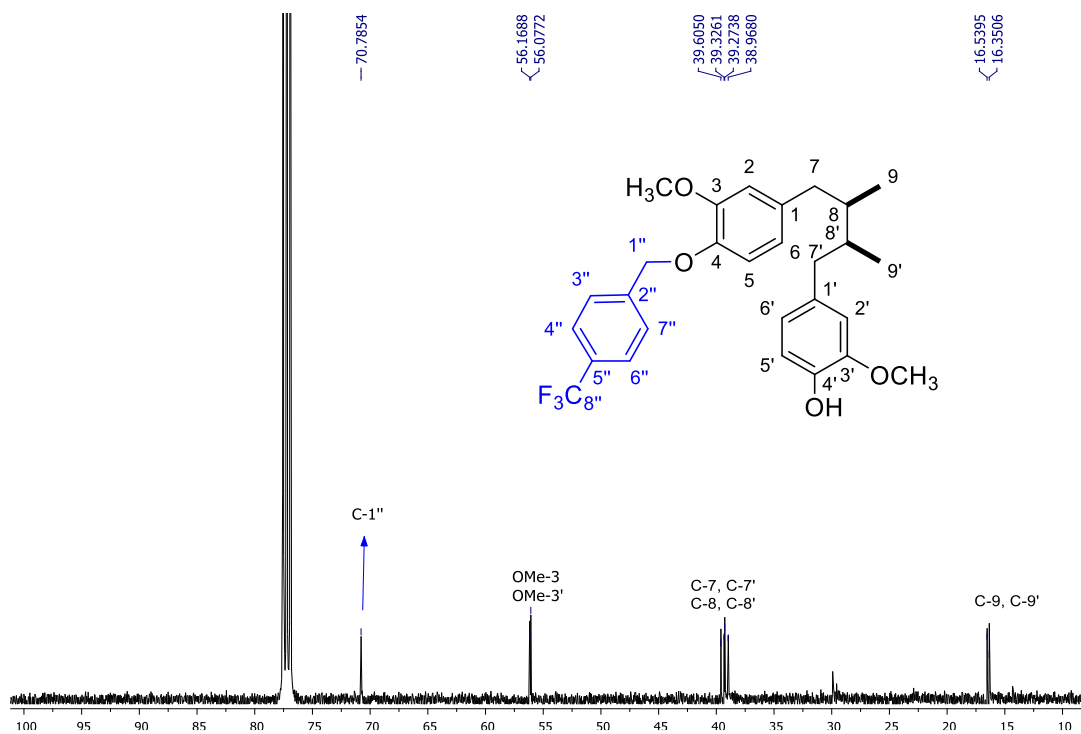


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-18. 0-100 ppm

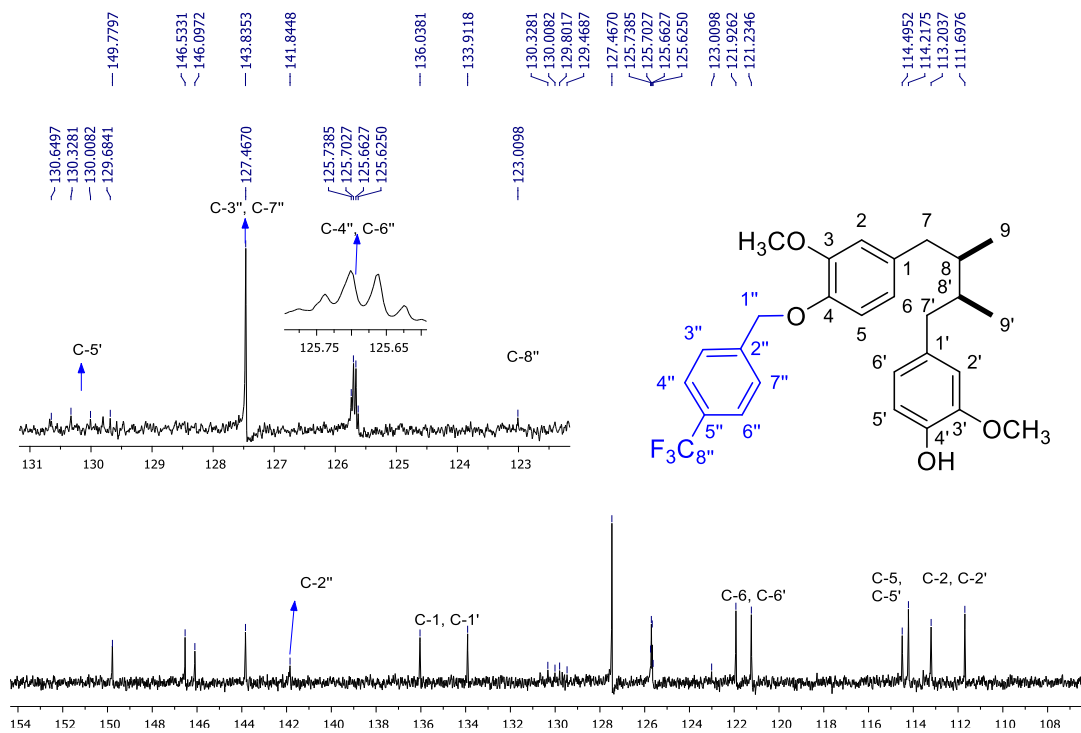


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de (\pm)-18. 100-154 ppm

5.2.2.9. Derivado *meso*-19

En la figura 48 se muestra el espectro de RMN ^1H del derivado disustituido con el fragmento trifluorometilbencilo. Se pueden observar las mismas señales características del fragmento presentadas en el espectro del derivado monosustituido (Figura 45) pero que integran para el doble de protones. A campos bajos aparecen los dos dobletes a 7.63 ppm ($J = 8.1$ Hz, 2H, H-3", H-7"), 7.56 ($J = 8.0$ Hz, 2H, H-4", H-6") de los protones bencílicos. Posteriormente se observa un singlete a 5.17 ppm (2H, H-1") correspondiente a los protones del carbono unido al oxígeno del éter. Por su parte en el espectro de RMN ^{13}C de la figura 49 se observan 20 señales correspondientes a los 36 carbonos de la molécula. Se observan las señales características del fragmento trifluorometilbencilo. Inicialmente a 141.7 ppm (C-2", C-2''') la señal de los carbonos cuaternarios cercanos al oxígeno, posteriormente se observa un doblete a 130.1 ppm ($^2J_{\text{CF}} = 32.1$ Hz, C-5", C-5''') del otro carbono cuaternario del anillo bencílico y que presenta acoplamiento a dos enlaces con el flúor. Posteriormente encontramos las señales de los carbonos del anillo bencílico a 127.4 (C-3", C-3''', C-7", C-7''') y 125.6 ppm ($^3J_{\text{CF}} = 3.7$ Hz, C-4", C-4''', C-6", C-6'''), esta última señal se presenta como un cuarteto por el acoplamiento C-F a tres enlaces. Finalmente encontramos un doblete a 123.0 ppm ($^1J_{\text{CF}} = 270.6$ Hz, CF₃-8", CF₃-8''') correspondiente al acoplamiento del carbono del trifluorometilo.

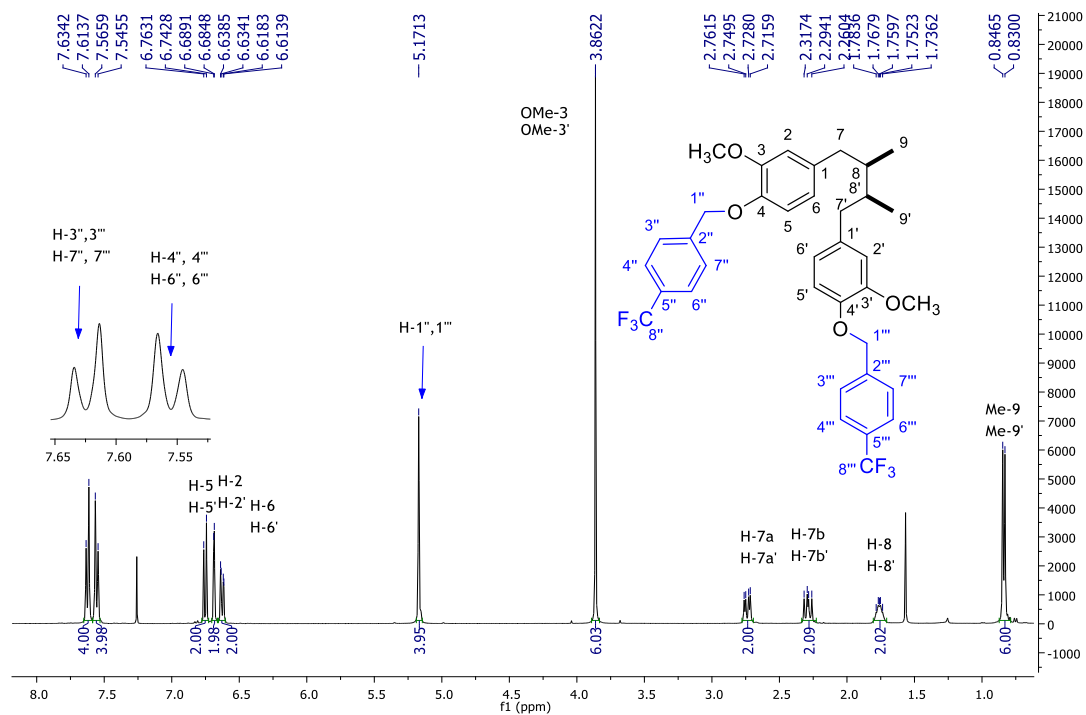


Figura 48. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de *meso*-19

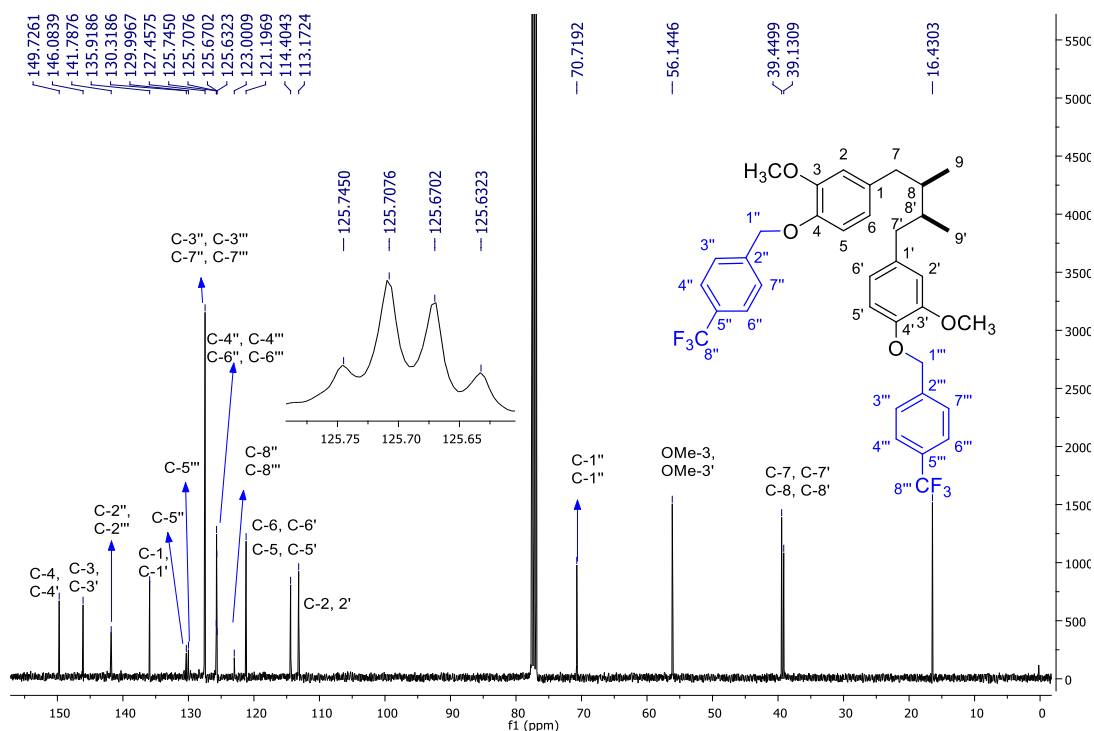


Figura 49. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de *meso*-19.

5.2.3. Caracterización del aminoéter del *AmDG*

5.2.3.1 Derivado *meso*-20

En la figura 50 se observa el espectro de RMN ^1H del derivado disustituido con el fragmento *N-N*-dietilamino. Dentro de las señales del sustituyente encontramos un dos triplete a 4.14 ppm ($J = 6.6$ Hz, 4H, H-1'', H-1''') correspondiente a los protones vecinos al oxígeno del éter, y el segundo a 3.02 ppm ($J = 6.6$ Hz, 4H, H-2'', H-2''') correspondiente a los protones etílicos de la posición H-2'' y H-2'''. Posteriormente encontramos un multiplete a 2.76 ppm (m, 10H, H-7a, H-7a', H-3'', H-3'''), donde se incluyen los 8 protones de la posición H-3'' y H-3'''. Finalmente, a 1.13 ppm ($J = 7.2$ Hz, 12H, Me-4'', Me-4''') se encuentra un triplete que corresponde a los metilos de las posiciones H-4'' y H-4'''.

Por su parte en el espectro de RMN ^{13}C de la figura 51 se observan 14 señales correspondientes a los 32 carbonos de la molécula. Entre las señales propias del sustituyente encontramos a 67.0 ppm (C-1'', C-1''') la señal de los carbonos unidos al oxígeno del aminoéter, posteriormente a 51.5 ppm (C-2'', C-2''') la señal del etilo cercano al nitrógeno del aminoéter. Finalmente encontramos las señales de los etilos 47.7 ppm (C-3'', C-3''') y metilos 11.4 ppm (C-4'', C-4''') de la porción *N-N*, dietilo.

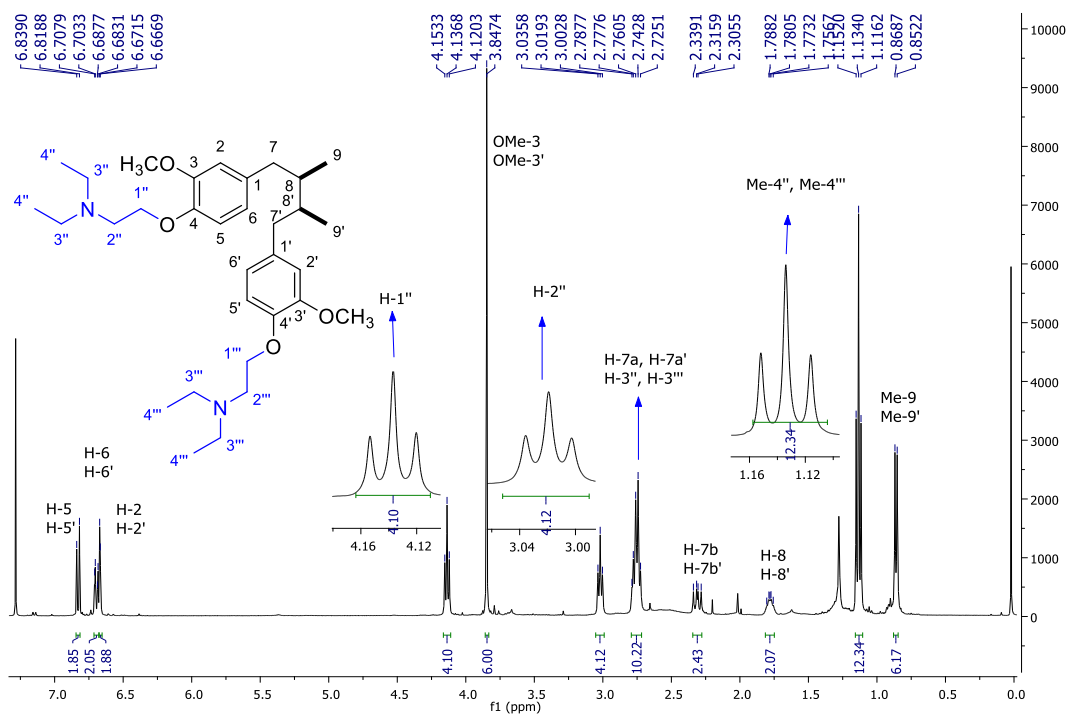


Figura 50. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de *meso*-20

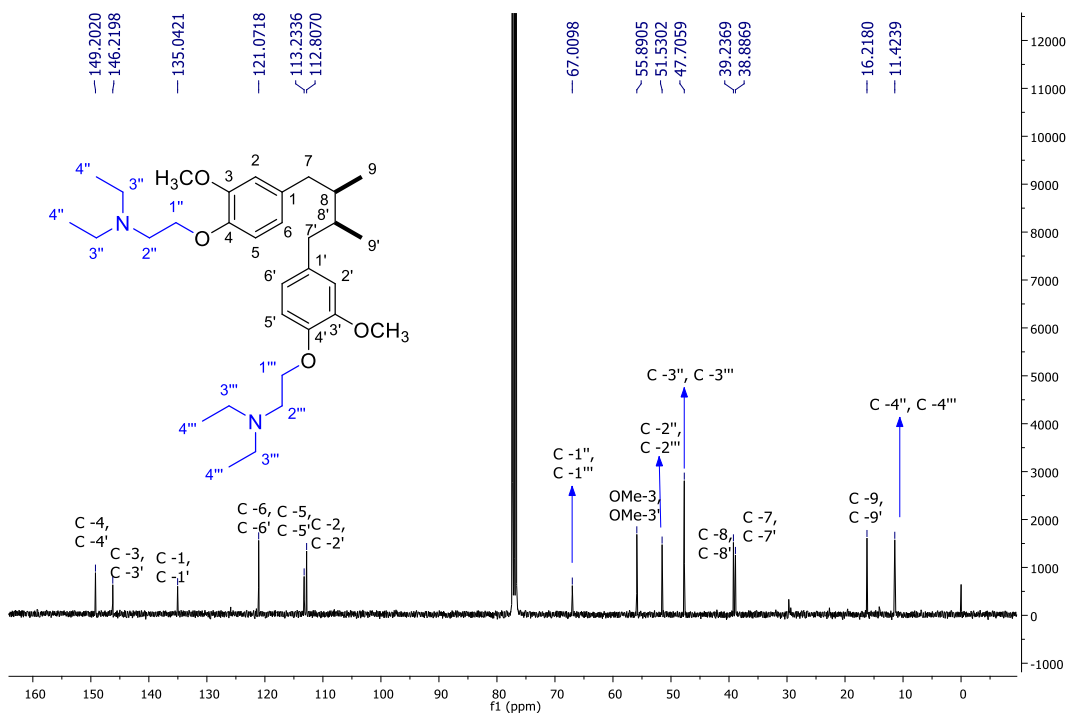


Figura 51. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 400 MHz) de *meso*-20

5.3. Actividad antimicrobiana y citotóxica de los derivados del AmDG

En la tabla 6 se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana de 20 derivados semisintéticos del AmDG contra tres cepas de *M. tuberculosis*, una sensible a fármacos de primera línea (H37Rv) y dos aislados MDR (G122 y G133).

Podemos observar que, entre los compuestos evaluados, los carbamatos *meso-4*, *meso-8* y (\pm) -**9** y los éteres *meso-11*, *meso-13*, *meso-15*, *meso-17* y *meso-19* no presentaron actividad antimicrobiana (CMI >50 $\mu\text{g/mL}$). Por su parte los análogos (\pm) -**1**, (\pm) -**7** y (\pm) -**10** presentaron baja actividad contra las tres cepas con CMIs de 50 $\mu\text{g/mL}$. En cambio, los carbamatos *meso-2*, (\pm) -**3** y (\pm) -**5** presentaron actividad moderada (25 $\mu\text{g/mL}$) contra la cepa resistente G122. De todos los carbamatos el compuesto *meso-6* que contiene el fragmento de piperidincarbonilo, mostró la mejor actividad con una CMI de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ contra la cepa MDR G122, mientras que el análogo monosustituido con piperidincarbonilo (\pm) -**5** resultó dos veces menos potente que los controles etambutol y levofloxacina (CMI 6.25 $\mu\text{g/mL}$) contra la cepa G122 y 16 veces menos potente que etambutol (CMI 3.125 $\mu\text{g/mL}$) para la cepa H37Rv (figura 51).

Tabla 6. Actividad antimicobacteriana y citotoxicidad de derivados del *AmDG*

Derivado	<i>Mtb</i>	<i>Mtb</i>	<i>Mtb</i>	Citotoxicidad Células Vero	Índice de Selectividad IC ₅₀ /CMI			cLogP ^d
	<i>H37Rv</i> ^a	<i>G122</i> ^b	<i>G133</i> ^c		CMI (µg/mL)			
	CMI (µg/mL)			IC ₅₀ ±DS (µg/mL)	<i>H37Rv</i> ^a	<i>G122</i> ^b	<i>G133</i> ^c	
(±)-1	50	50	50	4.0 ± 0.3	0.08	0.08	0.08	5.80
<i>meso</i> -2	>50	25	>50	500 ± 6.7	-	20	-	6.60
(±)-3	50	25	50	7.1 ± 0.04	0.14	0.23	0.14	5.44
<i>meso</i> -4	>50	>50	>50	ND	-	-	-	5.87
(±)-5	50	25	50	6.5 ± 0.1	0.13	0.26	0.13	5.86
<i>meso</i> -6	50	12.5	>50	>500	>10	>40	-	6.71
(±)-7	50	50	50	4.6 ± 0.05	0.09	0.09	0.09	4.73
<i>meso</i> -8	>50	>50	>50	ND	-	-	-	4.45
(±)-9	>50	>50	>50	ND	-	-	-	4.50
(±)-10	50	50	50	15.1 ± 0.01	0.30	0.30	0.30	5.96
<i>meso</i> -11	>50	>50	>50	ND	-	-	-	6.92
(±)-12	50	25	25	12.3 ± 0.02	0.25	0.49	0.49	6.24
<i>meso</i> -13	>50	>50	>50	ND	-	-	-	7.48
(±)-14	6.25	6.25	12.5	13.9 ± 0.1	2.23	2.23	1.11	7.49
<i>meso</i> -15	>50	>50	>50	ND	-	-	-	9.98
(±)-16	>50	>50	>50	ND	-	-	-	7.16
<i>meso</i> -17	>50	>50	>50	ND	-	-	-	9.31
(±)-18	>50	25	25	10.9 ± 0.03	-	0.44	0.44	7.92
<i>meso</i> -19	>50	>50	>50	ND	-	-	-	10.84
<i>meso</i> -20	25	25	25	36.20	1.45	1.45	1.45	6.88
AmDG	50	>50	>50	ND	-	-	-	5.01
EMB	3.125	6.25	3.125	ND	-	-	-	0.06
LEV	0.078	6.25	1.56	ND	-	-	-	1.35
Docetaxel	-	-	-	0.12 ± 0.2				

Cepas de M. tuberculosis: ^aH37Rv: sensible a isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomycin y pirazinamida; ^bG122: resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol; ^cG133: resistente a isoniazida, rifampicina, y estreptomycin. ^dValor predecido empleando ChemBioDraw Ultra 12.0. *AmDG*: ácido *meso*-dihidroguaiarético. EMB: Etambutol, LEV: Levofloxacin. CMI: Concentración mínima inhibitoria. IC₅₀: Concentración inhibitoria media máxima. ND: No determinado

Los resultados de la tabla 6 apoyan la idea inicial de incorporar algunos fragmentos carbamoiloxi que pudieran aumentar la lipofilicidad y que tuvieran flexibilidad restringida, modificando la actividad del compuesto de partida *AmDG*. Los derivados

semisintéticos que poseen grupos morfolina e imidazolidinona (*meso-8* y (\pm) -**9**) son de menor carácter lipofílico comparados con el *AmDG* y los carbamatos (\pm) **1**, *meso-2*, (\pm) -**3**, *meso-4*, (\pm) -**5** y *meso-6*, debido a ello no presentan actividad antimicobacteriana. Contrariamente, el carbamato más lipofílico, *meso-6* (*clogP* = 6.7), presentó la mejor actividad antimicobacteriana contra la cepa G122 mejorando la actividad presentada por el *AmDG* y el resto de los carbamatos

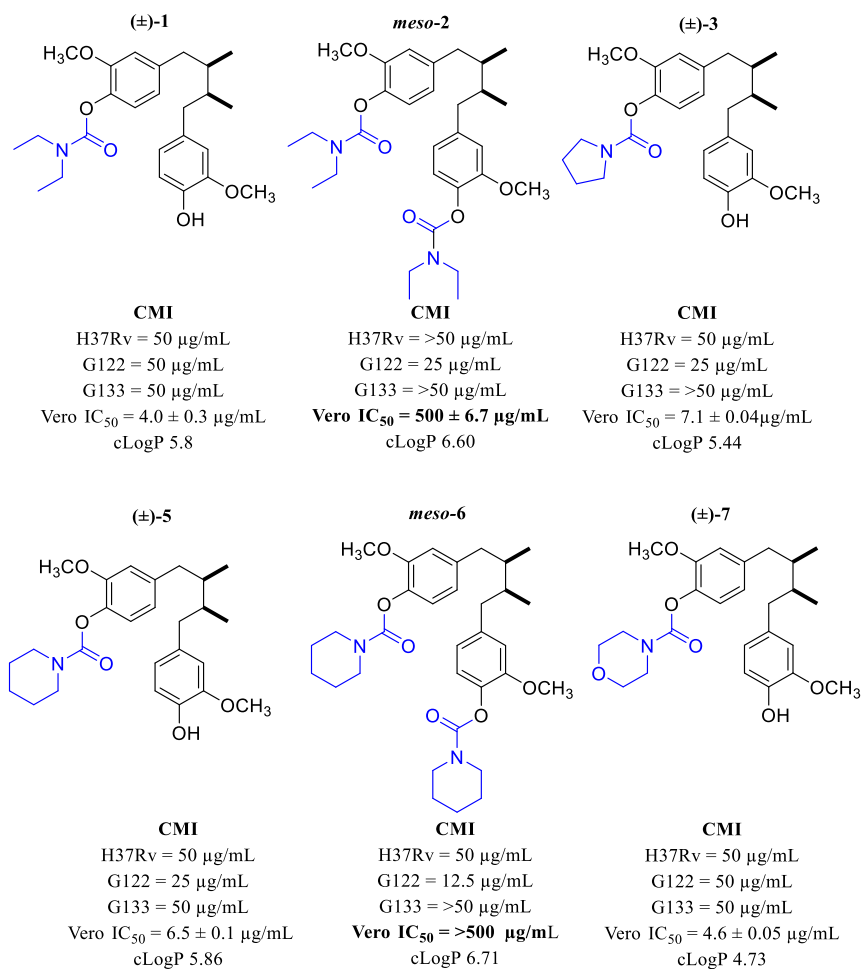


Figura 52. Citotoxicidad y actividad antimicobacteriana de carbamatos activos.

En la serie de los éteres, los derivados que contienen grupos alqueniloxi (*meso-11*, *meso-13* y *meso-15*) y benciloxi [(\pm) -**16**, *meso-17* y *meso-19*] no mostraron actividad a 50 µg/mL, mientras que el éter que contiene un fragmento mono alílico (\pm) -**10** resultó activo

solamente a 50 µg/mL. El resultado más notable se observó en el compuesto (±)-**14** que contiene un fragmento hepteniloxi, el cual mostró CMI de 6.25, 6.25 y 12.5 µg/mL contra las cepas H37Rv, G122 y G133, respectivamente. Así mismo, el alquenil éter (±)-**12**, el bencil éter (±)-**18** y el amino éter *meso*-**20** mostraron actividad moderada contra los dos aislados MDR y en el caso del amino éter también contra la cepa H37Rv (CMI 25 µg/mL). Es importante mencionar que el alquenil éter (±)-**14** fue dos y cuatro veces menos potente que el fármaco de primera línea etambutol contra las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y G133, respectivamente. Este compuesto resultó igualmente activo que el fármaco etambutol contra la cepa G122 (Figura 52).

De acuerdo con lo presentado en la tabla 6, es evidente que el largo de la cadena *O*-alquenilada y el patrón de sustitución están relacionados con el grado de inhibición de *M. tuberculosis*. Por otra parte, los éteres monoalquenilados (±)-**10**, (±)-**12** y (±)-**14** mostraron valores de CMI menores que sus análogos disustituídos *meso*-**11**, *meso*-**13** y *meso*-**15**. Además, a medida que el largo de la cadena aumenta en los éteres monoalquilados [(±)-**10**, (±)-**12** y (±)-**14**] se mejoran las CMI. Particularmente en el caso del éter (±)-**14** donde su cadena alquílica es de 7 carbonos, resultó ocho veces más potente contra la cepa H37Rv que los éteres (±)-**10** y (±)-**12** en donde la longitud de la cadena es de tres y cuatro carbonos respectivamente. Se observaron resultados similares contra las cepas resistentes, donde el derivado monosustituído (±)-**14** resultó ocho veces más activo contra la cepa G122, y cuatro veces más activo contra la cepa G133 que el derivado (±)-**10**. En comparación con el compuesto (±)-**12**, el derivado con el fragmento de hepteno resultó cuatro y dos veces más activos contra las cepas G122 y G133, respectivamente. Adicionalmente, el aumento en el carácter lipófilico de los éteres mono-alquenilados (±)-

10, (\pm)-**12** y (\pm)-**14** (valores de clogP de 5.9, 6.2 y 7.4, respectivamente) puede relacionarse con el aumento de la cadena alquénil y por lo tanto con el aumento de la actividad antimicobacteriana con un largo limitado, ya que como se demostró en trabajos previos, al sintetizar ésteres de cadenas largas se tenía una baja actividad⁴⁹.

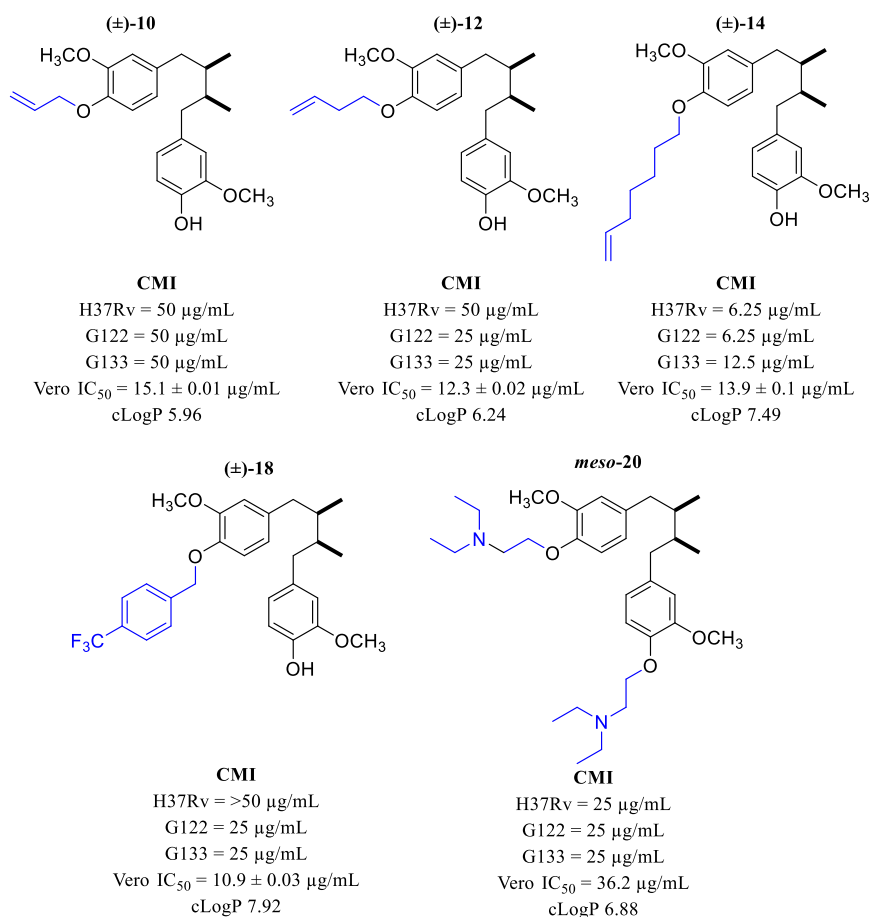


Figura 53. Citotoxicidad y actividad antimicobacteriana de éteres y aminoéter activos.

Entre los éteres bencílicos, aquél que poseía un grupo *p*-(trifluorometil) bencilo [(\pm)-**18**] presentó una CMI de 25 µg/mL contra las cepas MDR G122 y G133, mientras que su

análogo con dos fragmentos *p*-(trifluorometil) bencilo (*meso*-**19**) y uno o dos fragmentos *p*-fluorobencilo [(±)-**16** y *meso*-**17**] resultaron inactivos MIC >50 µg/mL.

Así mismo, se evaluó la citotoxicidad sobre la línea celular Vero de aquellos compuestos con CMI_s ≤50 µg/mL con el fin de investigar su perfil de seguridad. Los derivados del AmDG que contenían fragmentos dietilaminocarbonilo (*meso*-**2**) y piperidincarbonilo (*meso*-**6**) mostraron los mejores valores de concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀ ≥ 500 µg/mL). Debido a ello, su índice de selectividad (IS 20 y > 40, respectivamente) muestra que los compuestos son más tóxicos para la cepa de *M. tuberculosis* G122 que para las células mamíferas. Contrariamente, el éter que contiene el fragmento heptenil (±)-**14** resultó más tóxico para las células mamíferas que para las cepas sensible y resistentes de *M. tuberculosis* (IS < 3). Aunque el compuesto (±)-**14** no mostró selectividad hacia las micobacterias, presentó una citotoxicidad menor contra las células Vero que el agente anticancerígeno docetaxel (IC₅₀ = 0.12 ± 0.2 µg/mL), lo que le permitiría ser un candidato para futuros estudios.

5.5. Estudios de la estructura química-actividad biológica cuantitativa de derivados semisintéticos del AmDG

Este estudio se realizó empleando los datos experimentales de la actividad biológica de diversos derivados del AmDG, con lo cual se realizó la búsqueda de acantilados de actividad y el análisis de similitud, para realizar el estudio de las relaciones cuantitativas entre la estructura química-actividad biológica basada en los campos, esto para cada una de las cepas de *M. tuberculosis*.

Para el análisis, se tomaron adicionalmente otros derivados previamente sintetizados en el grupo de trabajo ⁴⁹ que se describirán con el prefijo KRM, mientras que los derivados sintetizados en el presente trabajo se describieron con el prefijo KGCV, teniendo en total 50 compuestos. El compuesto designado como KRM 27 corresponde al compuesto *meso*-20 del presente trabajo.

Se emplearon mapas SAS (por sus siglas en inglés, *Structure Activity Similarity*) para representar las relaciones estructura actividad basados en la comparación por pares de estructuras similares y actividades biológicas similares expresado como ΔpIC_{50} . En las figuras 54, 55 y 56 se muestran los mapas para cada una de las cepas de *M. tuberculosis*.

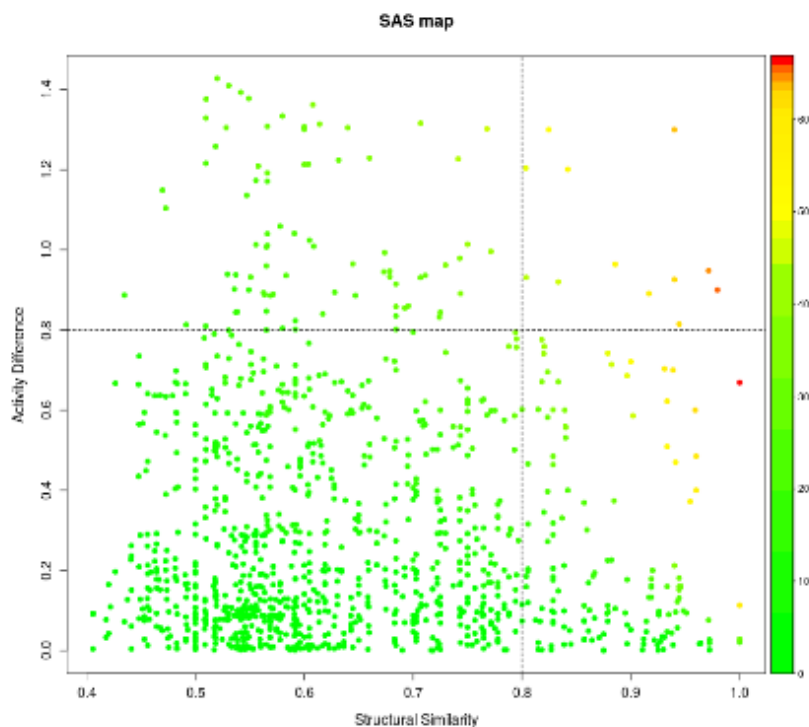


Figura 54. Mapa SAS, análisis de similitud de los derivados del *AmDG* para la cepa H37Rv

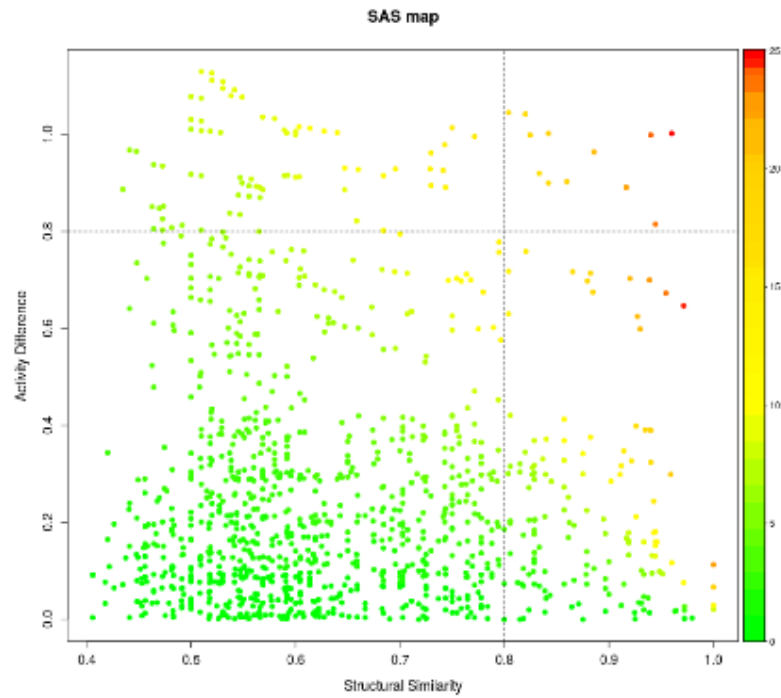


Figura 55. Mapa SAS, análisis de similitud de los derivados del *AmDG* para la cepa G122

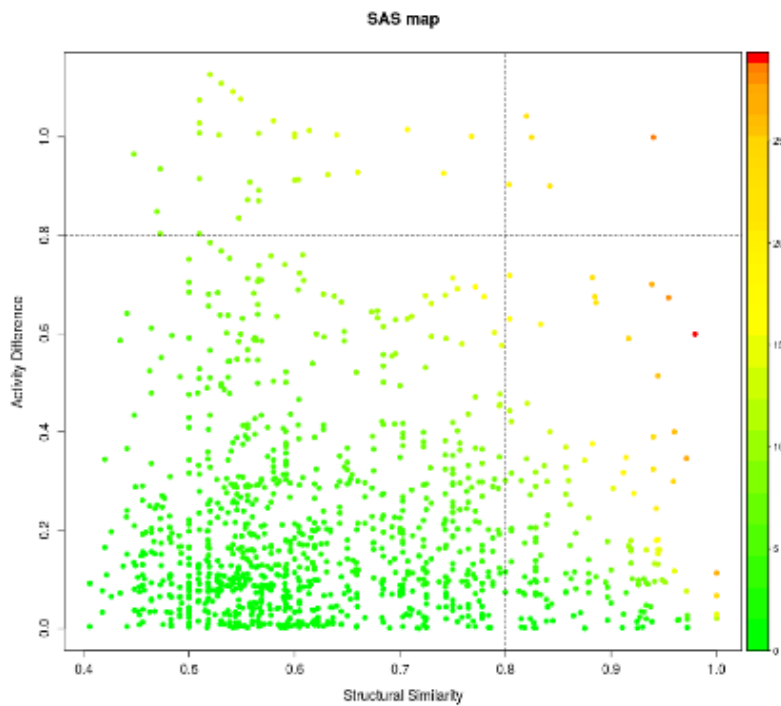


Figura 56. Mapa SAS, análisis de similitud de los derivados del *AmDG* para la cepa G133

Los mapas SAS se dividen en diferentes zonas: no significativo (superior izquierda), acantilados de actividad (superior derecha), acantilados de similitud o análogos funcionales (inferior izquierda), y poca relación SAR (inferior derecha). Los acantilados de actividad son pares de compuestos estructuralmente similares que poseen una diferencia significativa en potencia, así es posible la identificación de posibles acantilados de actividad que mejoren la calidad estadística de los modelos QSAR⁷².

Interesantemente, en todas las actividades antimicrobianas, la mayoría de las comparaciones por pares de la actividad biológica son acantilados de similitud, lo que probablemente se deba a que todos los compuestos tienen una estructura base en común. Además, dentro de todos los datos biológicos se encontraron pocos acantilados de actividad. La cepa G133 presentó la menor cantidad de acantilados de actividad antibacteriana y la cepa H37Rv fue la que presentó mayor cantidad. En las figuras 57-59 se muestra el análisis de acantilados de actividad para cada cepa.

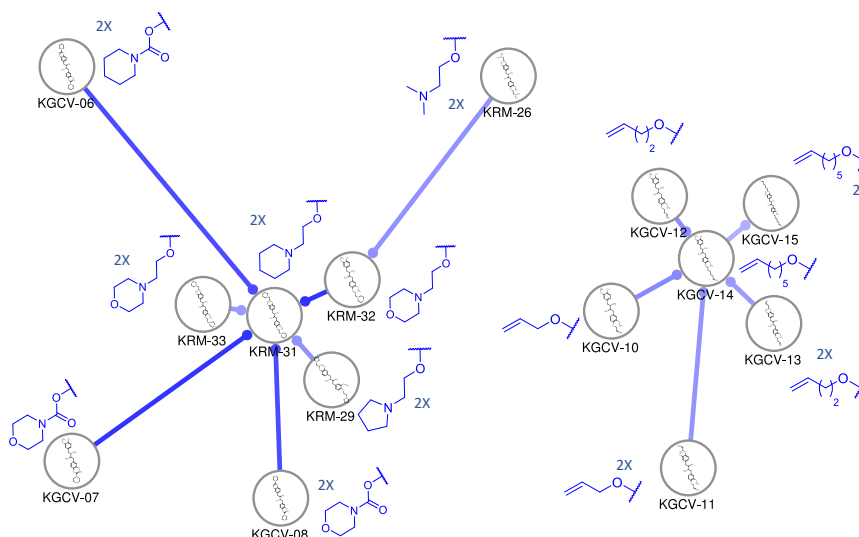


Figura 57. Relaciones de acantilados de actividad en la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

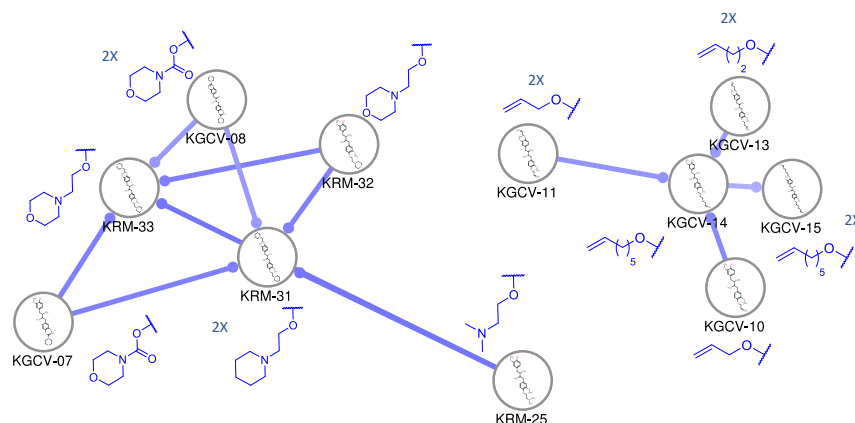


Figura 58. Relaciones de acantilados de actividad en la cepa G122 de *M. tuberculosis*.

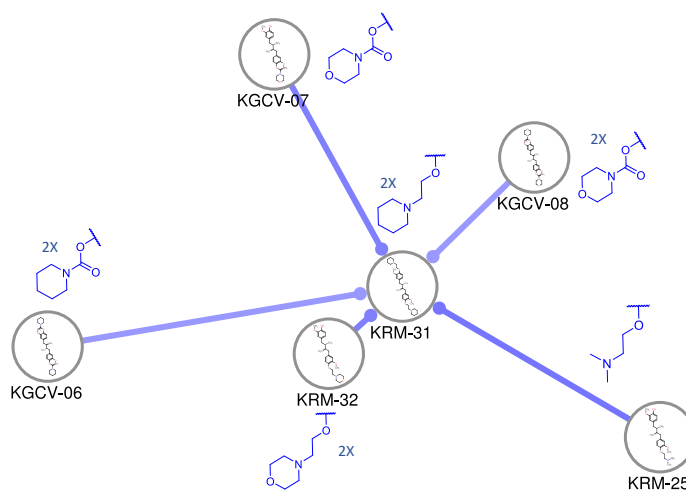


Figura 59. Relaciones de acantilados de actividad en la cepa G133 de *M. tuberculosis*.

El análisis de los acantilados de actividad para la cepa H37Rv mostró dos grupos diferentes de actividad antimicobacteriana: el primero proveniente de una mezcla de carbamatos KGCV y éteres KRM y el segundo exclusivamente de la serie de éteres KGCV, como se observa en la figura 57. El primer grupo consiste en siete relaciones estructurales centradas en el derivado más activo, el aminoéter bis sustituido KRM-31 que tiene como sustituyente el fragmento piperidina, que es más activo que su contraparte de

tipo carbamato KGCV-6, que es más rígido. Este mismo tipo de relaciones se pueden observar en los pares KRM-32-KGCV-7 y KRM-33-KGCV-8, con fragmentos de morfolina, lo cual refleja la importancia de la flexibilidad y el patrón de sustitución. También la presencia del enlace aceptor de puentes de hidrógeno es importante para la actividad antimicobacteriana en esta cepa, como se puede observar en los pares KRM-31-33, y KGCV-6-8. Por otra parte, el segundo grupo que consiste en cinco relaciones estructurales a partir del compuesto más activo de la serie KGCV, el éter 14, dentro de este grupo no existe mucha diferencia en la actividad biológica (comparado por su par molar pIC_{50} , denotado por diferencias de intensidad de color entre cada actividad antimicobacteriana, líneas coloreadas tenuemente cercana 0.5 y líneas azules coloreadas intensamente cercanas a 1.5). El grupo incluye tanto derivados monosustituídos (10, 12 y 14) y derivados disustituídos (11, 13 y 15). Para esta serie, los compuestos de tipo éter monosustituídos con alquénilos, el de cadena larga aumentó la actividad (14), mientras que los dos monosustituídos de cadena corta (10 y 12) y los disustituídos (11, 13 y 15), fueron los menos activos para acantilados de actividad. Las mismas consideraciones pueden hacerse para la actividad antimicobacteriana de la cepa G122, debido a su gran parecido con el análisis de acantilados de actividad con la cepa H37Rv, como se observa en la figura 58.

A diferencia de las cepas H37Rv y G122, la actividad antimicobacteriana de la cepa G133 presentó menor cantidad de relaciones de acantilados de actividad. El análisis muestra cinco relaciones centradas en el derivado más activo del *AmDG*, el aminoéter bis sustituido KRM-31 que tiene como sustituyente el fragmento piperidinetoxi (figura 59). Adicionalmente a lo que ya se describió para las cepas H37Rv y G122, la flexibilidad, el

patrón de sustitución y los aceptores de puentes de hidrógeno, el impedimento estérico también es importante para la actividad antimicrobiana, ya que sustituyentes voluminosos fueron más activos que sus homólogos, ejemplo de ello es el aminoéter KRM-25 que contiene un fragmento *N,N*,dimetiletilo que resulta inactivo contra las cepas G122 y G133.

Los cambios radicales en la actividad antimicrobiana encontrados en el análisis de acantilados de actividad podrían causar discontinuidad en las relaciones estructura-actividad y, por lo tanto, comprometer la importancia estadística de los modelos cuantitativos calculados con estos datos biológicos. Las estadísticas de los mejores modelos encontrados para las tres cepas se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Estadística de los mejores modelos encontrados por 3D-QSAR

	<i>M.</i> <i>tuberculosis</i> H37Rv	<i>M.</i> <i>tuberculosis</i> G122	<i>M.</i> <i>tuberculosis</i> G133
Modelo	5	5	2
Número de componentes principales(PLS)	5	5	5
Desviación estándar (SD)	0.0402	0.0423	0.0406
r ²	0.9833	0.9784	0.9726
Variabilidad (F)	212.3	163.3	127.6
Grupo de prueba SD	0.2993	0.2549	0.1466
Predictibilidad (<i>q</i> ²)	0.4250	0.8463	0.7048
R de Pearson de la actividad calculada	0.7298	0.7537	0.8808

Se obtuvieron modelos aceptables de acuerdo con la estadística de los mejores modelos. Los tres modelos muestran buena linealidad y de baja a aceptable predictibilidad ($r^2 > 0.7$, $q^2 > 0.4$). El rango de actividad estrecho (5-150 μ M) y la codificación asignada a la menor actividad de los compuestos (MIC > 50 μ g/mL) podría afectar la predictibilidad de los modelos, ya que la validación de los grupos de prueba tiene una desviación estándar de

15-30% de rango de actividad. Como se puede observar en la tabla, los peores modelos fueron los calculados para la cepa H37Rv, misma que también presentó una mayor cantidad de acantilados de actividad, y los mejores modelos fueron para las cepas G122 y G133. Sin embargo, la calidad de los modelos es adecuada para encontrar tendencias estadísticas y muestra posibles sitios de modificación estructural de los compuestos más activos para la optimización de la actividad antimicobacteriana. Las interacciones en los campos moleculares para cada bacteria se muestran en la figura 59.

a)

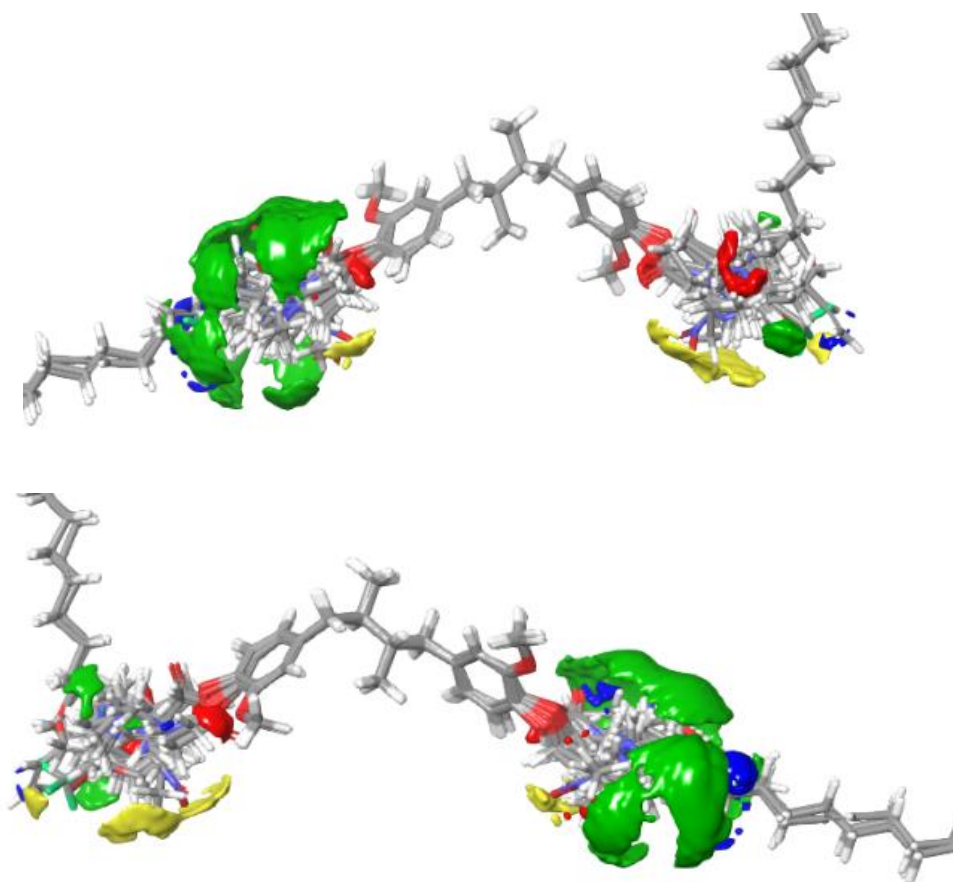


Figura 59. Superposición de la interacción de los campos moleculares de todos los compuestos. Campos electrostáticos: Positivos (azul), negativos (rojo); Campos estéricos: Positivo (verde), negativo (amarillo). Cepas: a) H37Rv, b) G122, c) G133.

b)

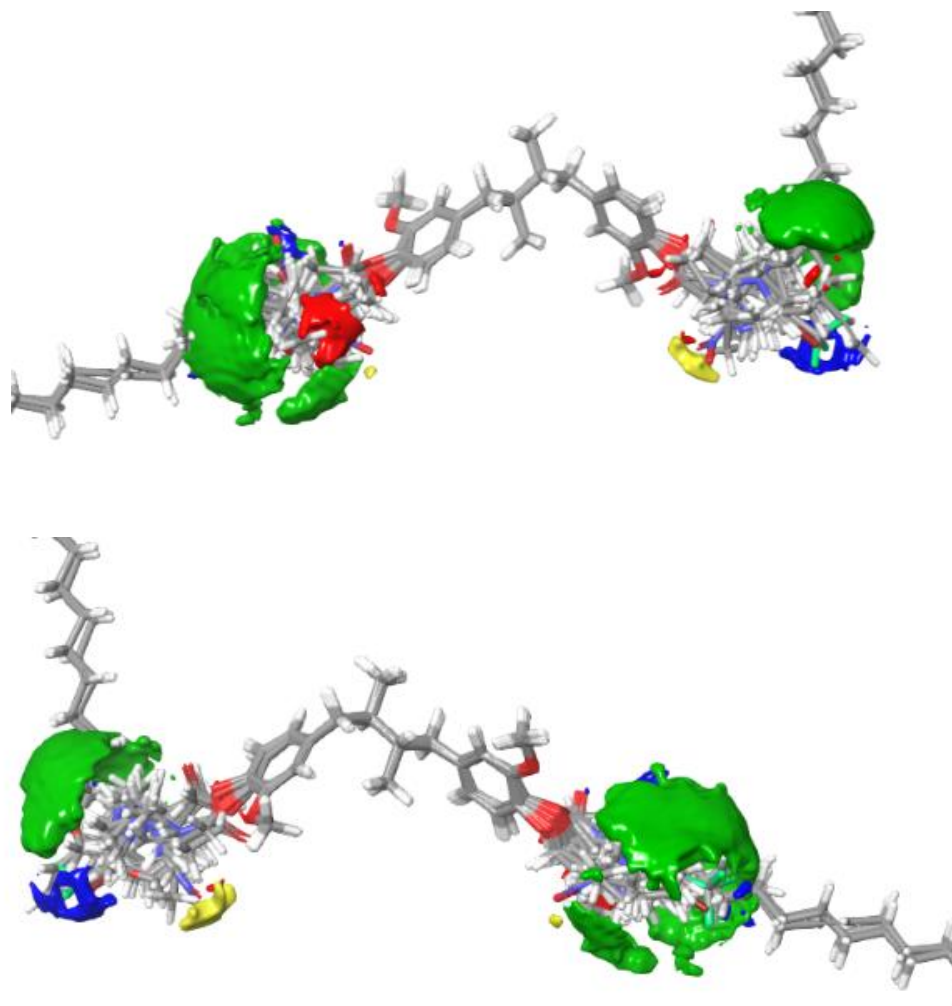


Figura 60. Superposición de la interacción de los campos moleculares de todos los compuestos. Campos electrostáticos: Positivos (azul), negativos (rojo); Campos estéricos: Positivo (verde), negativo (amarillo). Cepas: a) H37Rv, b) G122, c) G133.

c)

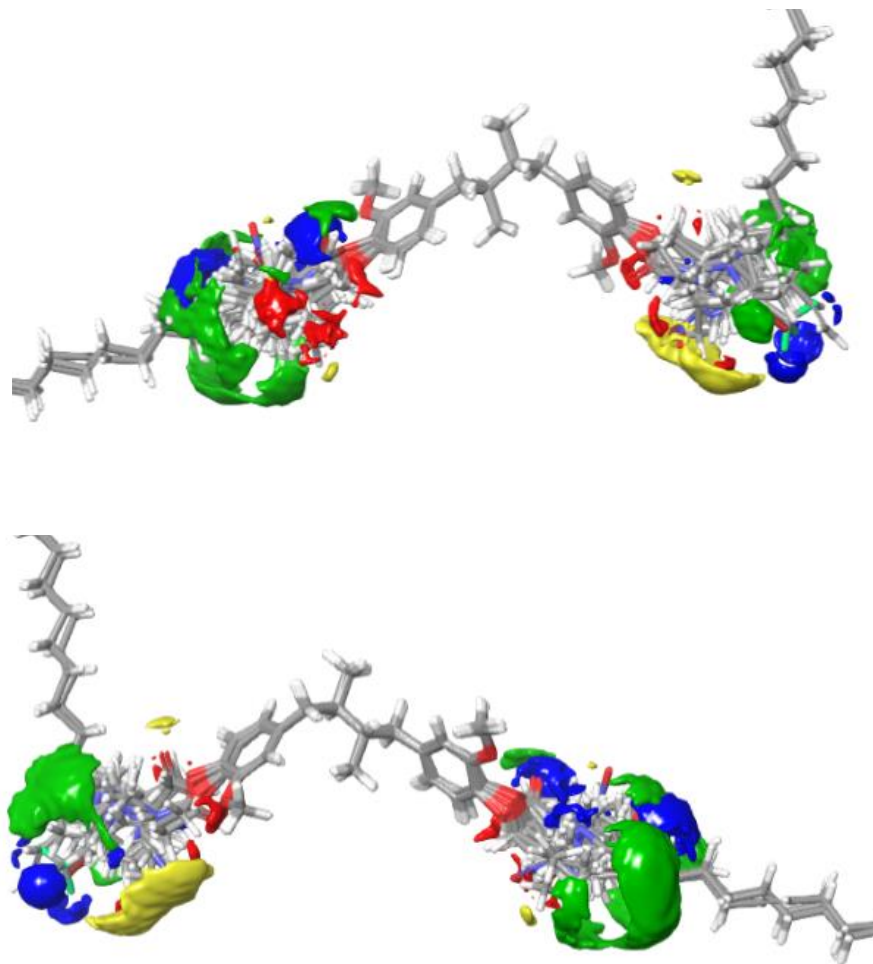


Figura 61. Superposición de la interacción de los campos moleculares de todos los compuestos. Campos electrostáticos: Positivos (azul), negativos (rojo); Campos estéricos: Positivo (verde), negativo (amarillo). Cepas: a) H37Rv, b) G122, c) G133.

En general, los campos estéricos son el factor más importante para la manifestación de la actividad antimicrobiana, se muestra en superficies verdes en el modelo; sobre todo en las cepas H37Rv y G122, este factor estérico positivo puede ser mejorado al aumentar la flexibilidad del sustituyente, ya que los éteres que son altamente flexibles son más activos que los carbamatos y ésteres que se encuentran estéricamente impedidos. Es importante mencionar la cercana relación entre el factor estérico y el factor lipofílico; sin embargo, dado que los compuestos altamente lipofílicos (KGCV-15, KGCV-17, KGCV-

17) fueron los menos activos y los compuestos con alto factor estérico y flexibilidad (KGCV-14, KRM-31) fueron los más activos, el factor estérico y la flexibilidad resultan como los más relevantes para la actividad antimicobacteriana. Por otra parte, el factor electrostático en general ejerce poca influencia en la actividad antimicobacteriana, aunque este factor es muy relevante en el fragmento que está unido al *AmDG* y en específico al patrón de sustitución. Los grupos funcionales ricos en electrones, como los ésteres, éteres o carbamatos pueden tener un efecto benéfico en la actividad biológica con ventajas sintéticas para la derivatización del *AmDG*.

El modelo para *M. tuberculosis* H37Rv mostró gran dependencia en el factor estérico, y la actividad biológica puede mejorarse por la presencia de sustituyentes voluminosos. La forma de interacción en los campos moleculares del factor estérico positivo sugiere que tanto la flexibilidad como el factor estérico son importantes para la actividad biológica. Con respecto al patrón de sustitución, la interacción en los campos moleculares sugiere que los derivados del *AmDG* podrían tener mejor actividad antimicobacteriana contra esta cepa cuando poseen sustituyentes con alto factor estérico y flexibilidad. Además, estos compuestos pueden ser asimétricos: en un extremo con la adición de un grupo funcional pobre en electrones (superficie azul), y en el otro extremo con un grupo rico en electrones con bajo factor estérico y flexibilidad (superficies amarilla y roja).

Comparada con la cepa H37Rv, el modelo de la cepa G122 mostró la misma dependencia hacia el factor estérico con sustituyentes con alto factor estérico y flexibilidad. Una diferencia relevante con los otros modelos es la ausencia de interacciones estéricas bajas (superficie amarilla), lo que apoya la aseveración anterior.

El modelo de actividad contra la cepa G133 mostró una balanceada dependencia entre los factores estéricos y electrónicos. El factor positivo estérico es importante en los dos posibles sustituyentes; sin embargo, este factor precisa ser balanceado con flexibilidad debido a la presencia de factor estérico pobre en uno de los sustituyentes. Con respecto al campo electrónico, un sustituyente voluminoso y flexible como un cicloalcano debería unirse al *AmDG* por medio de un enlazador pobre en electrones, mientras que el otro sustituyente debería poseer baja flexibilidad y un grupo funcional pobre en electrones opuesto a la estructura base del *AmDG*. Como se muestra en la figura 57, esta cepa requiere tener un diseño más cuidadoso que las otras bacterias, debido a la especificidad de las interacciones moleculares en los campos.

Finalmente, el amplio espectro de los compuestos antimicobacterianos podría ser diseñado utilizando la información de los campos moleculares. Como se muestra en los modelos de la figura 57, los derivados del *AmDG* activos contra los dos aislados MDR (G122 y G133) deben contar con grupos altamente estéricos con flexibilidad limitada sin menguar la actividad antimicobacteriana en la cepa sensible H37Rv. El factor electrónico debe ser cuidadosamente balanceado para conseguir un compuesto antimicobacteriano de amplio espectro ya que este factor es más relevante en las cepas MDR que en la cepa sensible.

5.5. Actividad sinergista

Para evaluar la actividad sinergista, primero se evaluaron las CMIs de los compuestos con mejor índice de selectividad (*meso-2* y *meso-6*) contra la cepa sensible de *M. tuberculosis* H37Rv y dos aislados MDR denominados como 71A y 3614, ambos resistentes a

isoniazida, rifampicina y etambutol. Para posteriormente realizar las combinaciones de dichos fármacos con los carbamatos (*meso-2* y *meso-6*).

En la tabla 8 se presentan las CMI de la cepa sensible y los aislados MDR de *M. tuberculosis*, donde se puede observar que a diferencia de lo anteriormente reportado en la actividad antimicobacteriana (sección 5.3) la actividad sobre la cepa sensible se mejoró en el caso del compuesto *meso-2* de >50 a 25 µg/mL y para el compuesto *meso-6* de 50 a 25 µg/mL, esto probablemente se deba a las condiciones de cultivo (incorporación de Tween 80 a medio de cultivo) y preservación de la bacteria que pudieran hacerla ligeramente más sensible a lo previamente ensayado. En cuanto al perfil de resistencia de las cepas MDR podemos observar valores de CMI muy elevados, por lo que en el caso de la bacteria 71A los carbamatos **2** y **6** resultan dos y cuatro veces más activos que el fármaco de primera línea rifampicina, respectivamente. Lo cual confirma que los derivados pueden ser moderadamente activos contra cepas MDR con diferentes patrones de resistencia, en especial el derivado bis sustituido con un fragmento piperidincarbonilo.

Tabla 8. Perfil de susceptibilidad a fármacos y concentración mínima inhibitoria de cepas sensible y multifármacoresistentes de *M. tuberculosis*

Cepa	Resistencia	CMI (µg/mL)						
		INH	RIF	EMB	<i>meso-2</i>	<i>meso-6</i>	BrEt	Verapamil
H37Rv	Sensible	0.06	0.003	2	25	25	1	125
71^a	INH, RIF, EMB	2.5	50	8	25	12.5	1	125
3614	INH, RIF, EMB	6.25	12.5	16	50	25	0.5	62.5

INH: isoniazida, RIF: rifampicina, EMB:etambutol, BrEt, Bromuro de etídeo CMI: concentración mínima inhibitoria

Una vez que se conocía el perfil de susceptibilidad a los fármacos de primera línea y carbamatos, se procedió a realizar los estudios de sinergismo.

En la tabla 9 se observa que la mayoría de los compuestos resultó con $CFI > 0.5$ y < 4 , lo cual indica un efecto aditivo o indiferente entre los fármacos de primera línea y los carbamatos ensayados. Únicamente se observaron dos relaciones sinérgicas, la primera para la cepa H37Rv, entre el fármaco rifampicina y el compuesto *meso-6* que se encuentra bis sustituido con el fragmento de piperidincarbonilo a una concentración de 0.0015 y 0.78 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde a un $1/2$ y $1/16$ de la CMI, respectivamente. La misma relación sinérgica se observó en el caso de la cepa MDR 71A, a una concentración de 12.5 y 6.2 $\mu\text{g/mL}$, que corresponden a $1/2$ y $1/8$ de las CMIs presentadas por el fármaco y compuesto de manera individual.

Este efecto sinérgico entre el carbamato *meso-6* ofrece una ventaja terapéutica, ya que actúa tanto en la cepa resistente como en la sensible, sobre todo en el fármaco que presenta más resistencia por parte de las micobacterias.

Tabla 9. Actividad sinergista entre fármacos de primera línea y carbamatos del AmDG

Cepa	Combinación de fármacos	CMI fármaco	CMI carbamato	CMIs (µg/mL) fármaco/carbamato	CFI
H37Rv	INH + <i>meso-2</i>	0.06	25	0.03/25	1
	RIF + <i>meso-2</i>	0.003	25	0.0015/12.5	1
	EMB + <i>meso-2</i>	0.5	50	0.5/50	2
	INH + <i>meso-6</i>	0.125	25	0.062/6.2	0.7
	RIF + <i>meso-6</i>	0.006	12.5	0.0015/0.78	0.3
	EMB + <i>meso-6</i>	0.125	50	0.125/50	2
71^a	INH + <i>meso-2</i>	5	>50	5/>50	>2
	RIF + <i>meso-2</i>	50	>100	25/100	>1.5
	EMB + <i>meso-2</i>	2	100	2/100	2
	INH + <i>meso-6</i>	5	25	25/5	2
	RIF + <i>meso-6</i>	50	50	12.5/6.2	0.4
	EMB + <i>meso-6</i>	4	50	2/25	1
3614	INH + <i>meso-2</i>	3.1	100	3.1/100	2
	EMB + <i>meso-2</i>	8	100	8/>100	>2
	INH + <i>meso-6</i>	3.1	100	3.1/100	2
	RIF + <i>meso-6</i>	25	25	25/25	2
	EMB + <i>meso-6</i>	16	50	8/50	1.5

CMI, Concentración mínima inhibitoria; **INH**, isoniazida; **RIF**, rifampicina; **EMB**, etambutol; **CFI**, Índice de concentración fraccional inhibitoria

5.6. Actividad de inhibición de bombas de eflujo

Una vez que se conocieron las CMIs de los carbamatos con mejor índice de selectividad y del BrEt, se trabajó con exposiciones de la mitad de la CMI de los carbamatos y se conservó una concentración final de 0.25 µg/mL de BrEt para no afectar la viabilidad celular y asegurar el equilibrio influjo-eflujo del bromuro. En la figura 60 se observa la gráfica de acumulación de BrEt con respecto al tiempo, donde los carbamatos presentaron una acumulación comparable con el verapamil ($1/2$ CMI = 62.5 µg/mL) que mostró una fluorescencia relativa final (FRF) de 0.47. En el caso del derivado *meso-2* ($1/2$ CMI = 12.5

$\mu\text{g/mL}$) la FRF fue de 0.47, lo que es igual a la presentada por verapamil, teniendo cinco veces menor cantidad de compuesto. Por su parte el carbamato *meso-6* ($1/2$ CMI =12.5 $\mu\text{g/mL}$) presentó una FRF de 0.23, lo que es la mitad de lo presentado por el verapamil y el derivado *meso-2* pero este compuesto también fue expuesto a la bacteria en una concentración cinco veces menor que la necesaria para verapamil. Por ello, los carbamatos bioseguros *meso-2* y *meso-6* se muestran como buenos inhibidores de bombas de expulsión de fármacos.

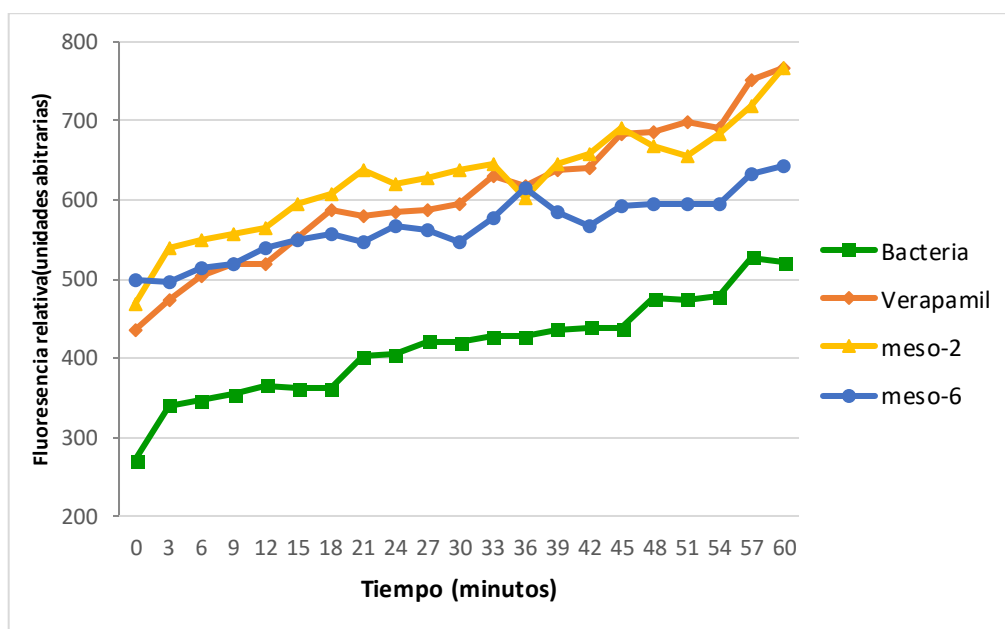


Figura 62. Acumulación de Bromuro de etidio por fluorimetría en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES

En el aislamiento y caracterización del lignano puro, a partir del extracto orgánico de *L. tridentata* se obtuvieron 780 mg del AmDG lo que representa un 0.35% de rendimiento. Una vez que se contaba con el compuesto base, se sintetizaron, purificaron y elucidaron estructuralmente 20 nuevos derivados semisintéticos del AmDG que incluyen: 9 carbamatos, 6 alquencil éteres, 4 *p*-bencil éteres y 1 aminoéter.

El ensayo antimicobacteriano contra la cepa sensible H37Rv y dos cepas MFR de *Mtb* mostraron que la mejor actividad se presentó en los carbamatos *meso-2* y *meso-6* con CMI a 25 y 12.5 µg/mL contra la cepa MFR G122, respectivamente. Dichos derivados disustituidos no fueron tóxicos contra la línea celular Vero ($IC_{50} \geq 500$ µg/mL) y presentaron IS >10. Por su parte, dentro de los éteres, el derivado monosustituido (\pm)-14, fue el más activo con una CMI de 6.25 µg/ml contra las cepas H37Rv y MFR G122 y 12.5 µg/mL contra la cepa MFR G133. Este compuesto presentó menor citotoxicidad (IC_{50} 13.91 \pm 0.15 µg/mL) que el control positivo docetaxel (IC_{50} 0.12 \pm 0.02 µg/mL). La actividad de este compuesto contra la cepa G122 es comparable con la presentada por el control positivo levofloxacino (MIC 6.25 µg/mL). Con lo anterior se puede aceptar la hipótesis, que en el caso del aislado MFR G122, el éter (\pm)-14 presentó una actividad igual que el fármaco de primera línea etambutol.

El análisis QSAR mostró pocos acantilados de actividad, siendo la cepa H37Rv la que presentó mayor cantidad y la cepa G133 la de menor cantidad. En base a ello, se observó que la flexibilidad, el patrón de sustitución y los aceptores de puentes de hidrógeno

influyen principalmente estas relaciones. Los modelos construidos a partir del QSAR-3D fueron útiles para encontrar tendencias estadísticas y posibles sitios de modificación estructural. En la interacción de los campos moleculares se observó que el factor estérico es el factor más importante para la actividad, donde si se aumentaba la flexibilidad del sustituyente se obtendría una mejor actividad. Por su parte, el factor electrostático es de poca influencia, aunque es relevante mencionar que este factor influye en el ligando entre el lignano y el grupo farmacofórico.

En el ensayo sinergista, únicamente el compuesto *meso-6* presentó sinergismo con el fármaco de primera línea rifampicina con una CFI de 0.31 (0.0015 µg/mL de RIF + 0.78 µg/mL de *meso-6*) que es 1/2 y 1/16 de la CMI presentada por cada uno de manera individual, esto para el caso de la cepa sensible de *M. tuberculosis* H37Rv. Esta misma combinación sinergista se presentó para la cepa MFR 71A con CFI de 0.4 (12.5 µg/mL de rifampicina y 6.25 µg/mL de *meso-6*).

Finalmente, en el ensayo de inhibidores de bombas de eflujo, ambos carbamatos fueron potentes inhibidores de bombas de eflujo presentaron una acumulación de BrEt comparable con el verapamil (1/2 CMI = 62.5 µg/mL). El *meso-2* presentó la misma fluorescencia relativa final (FRF) de 0.47 (1/2 CMI 12.5 µg/mL) que la presentada por verapamil FRF = 0.47. El compuesto *meso-6* presentó una CFI de 0.23 (1/2 CMI 12.5 µg/mL) que es la mitad la presentada por verapamil FRF = 0.47. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los carbamatos *meso-2* y *meso-6* poseen un mecanismo de acción como inhibidores de bombas de eflujo, que es diferente al presentado por los fármacos antimicobacterianos de primera y segunda línea.

Ya que el compuesto *meso-6* no tiene un efecto citotóxico en células mamíferas y que presentó un efecto sinergista con el fármaco de primera línea rifampicina, tanto en cepas resistentes como sensibles, y finalmente su poder como inhibidor de bomba de eflujo, resulta como un compuesto promisorio para tratar tuberculosis sensible y MFR.

Finalmente, debido a su bioseguridad y potente efecto como inhibidor de bombas de expulsión de fármacos, el compuesto *meso-2* se posiciona como un candidato promisorio en el tratamiento de *M. tuberculosis* sensible a fármacos de primera línea.

CAPÍTULO VII

7. PERSPECTIVAS

- Debido a que en el proceso de síntesis se obtienen tanto el compuesto *meso*-disustituído como la mezcla (\pm)-monosustituída, se podrían mejorar los rendimientos netos de reacción, principalmente en el caso de los carbamatos *meso*-2 y *meso*-6 y el éter (\pm)-14 favoreciendo la obtención del derivado bioactivo.
- En el caso del éter bioactivo (\pm)-14 que presentó buena actividad antimicobacteriana, pero una citotoxicidad elevada para las células mamíferas, se debería separar la mezcla racémica y evaluar cada uno de los compuestos para observar diferencias entre la actividad biológica.
- Realizar un diseño racional de nuevos derivados del *AmDG* basados en las consideraciones obtenidas en el ensayo QSAR. Se consideraría agregar un heterociclo de azepano para formar carbamatos, aminoéteres y éteres. Por otra parte, al anillo de piperidina de los carbamatos y ésteres se puede sustituir por piperazina.
- Evaluar el efecto de los carbamatos *meso*-2 y *meso*-6, que son inhibidores de bombas de eflujo, sobre genes específicos para identificar el blanco farmacológico. Además de realizar el estudio de estos compuestos en sinergismo con rifampicina y evaluar la inhibición de bombas de eflujo en cepas MFR de *Mtb*.
- Realizar estudios de estabilidad de los compuestos inhibidores de bombas de eflujo *meso*-2 y *meso*-6.
- Realizar finalmente, estudios *in vivo* de los carbamatos *meso*-2 y *meso*-6.

CAPÍTULO VIII

8. REFERENCIAS

1. Torrelles, J. B., Schlesinger, L. S., Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host, *Tuberculosis*, vol. 90, no. 2: 84–93. (2010).
2. World Health Organization, Fact sheet. WHO Tuberculosis, *WHO*, (2017).
3. Javan, M. R., Jalali nezhad, A., Shahraki, S., Safa, A., Aali, H., Kiani, Z., Cross-talk between the Immune System and Tuberculosis Pathogenesis; a Review with Emphasis on the Immune Based Treatment, *Int J Basic Sci Med*, vol. 1, no. 2: 40–47. (2016).
4. Orme, I. M. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis,” *Tuberculosis*, vol. 94, no. 1: 8–14, (2014).
5. World Health Organization, *WHO, 2016: Global Tuberculosis Report In Press*. In Press, (2016).
6. Secretaría de Salud, Tuberculosis. Información general de micobacteriosis, *Acciones y Programas*, 2016. [Online]. Available: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/tuberculosis?idiom=es>. [Accessed: 06-Dec-2016].
7. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, Boletín Epidemiológico. Vigilancia epidemiológica semana 47. 2017, (2017).
8. DOF, Diario Oficial de la Federación *NOM-006-SSA2-2013*.1–18. (2013)
9. Coll, P., Fármacos con actividad frente a Mycobacterium tuberculosis, *Enferm Infec Micr Cl*, vol. 27, no. 8: 474–480. (2009).
10. Green, K. D., and Garneau-Tsodikova, S., Resistance in tuberculosis: What do we know and where can we go?, *Front Microbiol*, vol. 4, 1–7. (2013).
11. de Souza, M. V. N. Promising candidates in clinical trials against multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) based on natural products. *Fitoterapia*, vol. 80, no. 8: 453–460, (2009).
12. Ahamad, S., Rahman, S., Khan, F. I., Dwivedi, N., Ali, S., Kim, J., Imtaiyaz Hassan, M. QSAR based therapeutic management of *M. tuberculosis*. *Arch Pharm Res*, vol. 40, no. 6, pp. 676–694, (2017).
13. WHO, World Health Organization. *Treatment of tuberculosis. Guidelines*, Forth. (2010).
14. Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H. W. H., Neefs, J.-M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de

- Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., Jarlier, V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, vol. 307, no. 5707: 223-227. (2005).
15. Chahine, E. B., Karaoui, L. R., Mansour, H. Bedaquiline. A Novel Diarylquinoline for Multidrug-Resistant Tuberculosis, *Ann Pharmacother*, vol. 48, no. 1: 107–115. (2013).
 16. Matsumoto, M., Hashizume, H., Tomishige, T., Kawasaki, M. Tsubouchi, H. OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis *In Vitro* and In Mice, *PLOS Med*, vol. 3:11. (2006).
 17. Makarov, V., Manina, G., Mikusova, K., Möllmann, U., Ryabova, O., Saint-Joanis, B., Dhar, N., Pasca, M. R., Buroni, S., Lucarelli, A. P., Milano, A., De Rossi, E., Belanova, M., Bobovska, A., Dianiskova, P., Kordulakova, J., Sala, C., Fullam, E., Schneider, P., McKinney, J. D., Brodin, P., Christophe, T., Waddell, S., Butcher, P., Albrethsen, J., Rosenkrands, I., Brosch, R., Nandi, V., Bharath, S., Gaonkar, S., Shandil, R. K., Balasubramanian, V., Balganes, T., Tyagi, S., Grosset, J., Riccardi, G., Cole, S. T. Benzothiazinones Kill *Mycobacterium tuberculosis* by Blocking Arabinan Synthesis, *Science*, vol. 324, no. 5928: 801–804. (2009).
 18. Makarov, V., Lechartier, B., Zhang, M., Neres, J., Sar, A. M., Raadsen, S. A., Hartkoorn, R. C., Ryabova, O. B., Vocat, A., Decosterd, L. A., Widmer, N., Buclin, T., Bitter, W., Andries, K., Pojer, F., Dyson, P. J., Cole, S. T. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones, *EMBO Mol Med*, vol. 6, no. 3:372–383. (2014).
 19. Stover, C. K. P. Warrenner, D. R. VanDevanter, D. R. Sherman, T. M. Arain, M. H. Langhorne, S. W. Anderson, J. A. Towell, Y. Yuan, D. N. McMurray, B. N. Kreiswirth, C. E. Barry, and W. R. Baker. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*, vol. 405, no. 6789, pp. 962–966, (2000).
 20. Haver, H. L., Chua, A., Ghode, P., Lakshminarayana, S. B., Singhal, A., Mathema, B., Wintjens, R., Bifani, P. Mutations in Genes for the F(420) Biosynthetic Pathway and a Nitroreductase Enzyme Are the Primary Resistance Determinants in Spontaneous *In Vitro*-Selected PA-824-Resistant Mutants of *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Ch*, vol. 59, no. 9: 5316–5323. (2015).
 21. Pethe, K., Bifani, P., Jang, Kang, J. S., Park, S., Ahn, S., Jiricek, J., Jung, J., Jeon, H. K., Cechetto, J., Christophe, T., Lee, H., Kempf, M., Jackson, M., Lenaerts, A. J., Pham, H., Jones, V., Seo, M. J., Kim, Y. M., Seo, M., Seo, J. J., Park, D., Ko, Y., Choi, I., Kim, R., Kim, S. Y., Lim, S., Yim, S.-A., Nam, J., Kang, H., Kwon, H., Oh, C.-T., Cho, Y., Jang, Y., Kim, J., Chua, A., Tan, B. H., Nanjundappa, M. B., Rao, S. P. S., Barnes, W. S., Wintjens, R., Walker, J. R., Alonso, S., Lee, S., Kim, J., Oh, S., Oh, T., Nehrbass, U., Han, S.-J., No, Z., Lee, J., Brodin, P., Cho, S.-N., Nam, K., Kim, J. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. *Nat Med*, vol. 19, no. 9: 1157–1160, (2013).
 22. Williams, K. N., Stover, C. K., Zhu, T., Tasneen, R., Tyagi, S., Grosset, J. H,

- Nuernberger, E., Promising Antituberculosis Activity of the Oxazolidinone PNU-100480 Relative to That of Linezolid in a Murine Model. *Antimicrob Agents Ch*, vol. 53, no. 4:–1319, (2009).
23. Alffenaar, J. W. C., Van der Laan, T., Simons, S., van der Werf, T. S., van de Kastele, P. J., de Neeling, H., van Soolingen, D. Susceptibility of Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates to a Potentially Less Toxic Derivate of Linezolid, PNU-100480. *Antimicrob Agents Ch*, vol. 55, no. 3: 1287–1289. (2011).
 24. Patel, H. M., Noolvi, M. N., Sharma, P., Jaiswal, V., Bansal, S., Lohan, S., Kumar, S. S., Abbot, V., Dhiman, S., Bhardwaj, V. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies as strategic approach in drug discovery. *Med Chem Res*, vol. 23, no. 12: 4991–5007. (2014).
 25. Norinder, U., Bergström, C. A. S. Prediction of ADMET Properties. *Chem Med Chem*, vol. 1, no. 9: 920–937. (2006).
 26. Palomino J., Martin, A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*, vol. 3, no. 3: 317–340. (2014).
 27. Hoagland, D. T., Liu, J., Lee, R. B., Lee, R. E. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Drug Delivery Rev*, vol. 102: 55–72. (2016).
 28. Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., Gagneux, S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives, *FEMS Microbiol Rev*, vol. 41, no: 354–373. (2017).
 29. Warriar, T., Kapilashrami, K., Argyrou, A., Ioerger, T. R., Little, D., Murphy, K. C., Nandakumar, M., Park, S., Gold, B., Mi, J., Zhang, T., Meiler, E., Rees, M., Somersan-Karakaya, S., Porras-De Francisco, E., Martinez-Hoyos, M., Burns-Huang, K., Roberts, J., Ling, Y., Rhee, K. Y., Mendoza-Losana, A., Luo, M., Nathan, C. F. N-methylation of a bactericidal compound as a resistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. *P of the Natl Acad Sci USA*, vol. 113, no. 31: E4523–E4530. (2016).
 30. Li, G., Zhang, J., Guo, Q., Jiang, Y., Wei, J., Zhao, L., Zhao, X., Lu, J., Wan, K. Efflux Pump Gene Expression in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates, *PLoS ONE*, vol. 10, no. 2: e0119013. (2015).
 31. Sun, J., Deng, Z., A. Yan, Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem and Bioph Res Co*, vol. 453, no. 2: 254–. (2014).
 32. Anthony Malinga, L., Stoltz, A. Efflux Pump Mediated Second-Line Tuberculosis Drug Resistance. *Mycobact Dis*, vol. 6, no. 3. (2016).
 33. Szumowski, J. D., Adams, K. N., Edelstein, P. H., Ramakrishnan, L. Antimicrobial efflux pumps and *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance: Evolutionary Considerations. *Curr top microbiol*, vol. 374. (2013).
 34. Gupta, S., Tyagi, S., Almeida, D. V., Maiga, M. C., Ammerman, N. C., Bishai, W.

- R. Acceleration of Tuberculosis Treatment by Adjunctive Therapy with Verapamil as an Efflux Inhibitor- *Am J Resp Crit Care*, vol. 188, no. 5: 600–607. (2013).
35. Zechini, B., Versace, I. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, vol. 4: 37–50. (2009).
 36. Ramon-Garcia, S. Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*,” *J Antimicrob Chemoth*, vol. 57, no. 2: 252–259. (2006).
 37. Van Bambeke, F., Pagès, J.-M., Lee, V. J. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibiotic Treatments and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux,” *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, vol. 1: 157–175. (2006).
 38. Rodrigues, L., Sampaio, D., Couto, I., Machado, D., Kern, W. V., Amaral, L., Viveiros, M. “The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex,” *Int J Antimicrob Ag*, vol. 34, no. 6:529–533. (2009).
 39. Rodrigues, L., J. Ainsa, A., Amaral, L., Viveiros, M. Inhibition of drug efflux in mycobacteria with phenothiazines and other putative efflux inhibitors. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* vol. 6, no. 2: 118. (2011).
 40. Sharma, S., Kumar, M., Sharma, S., Nargotra, A., Koul, S., Khan, I. A. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemoth*, vol. 65, no. 8: 1694–1701.(2010).
 41. Stavri, M., Piddock, L. J. V., Gibbons, S., Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources, *J Antimicrob Chemoth*, vol. 59, no. 6.: 1247–1260. (2007).
 42. Bhusal, Y., Shiohira, C. M., Yamane, N. Determination of *in vitro* synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Ag*, vol. 26, no. 4: 292–297. (2005).
 43. Caleffi-Ferracioli, K. R., Maltempe, F. G., Siqueira, V. L. D., Cardoso, R. F. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis*, vol. 93, no. 6: 660–663. (2013).
 44. Amaral L., Viveiros, M. Why thioridazine in combination with antibiotics cures extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Int J Antimicrob Ag*, vol. 39, no. 5: 376–380. (2012).
 45. Camacho-Corona, M. del R., Ramírez-Cabrera, M. A., Santiago, O., Garza-González, E., Palacios, I. de P., Luna-Herrera, J. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytother Res*, vol. 22, no. 1: 82–85. (2008).
 46. Favela-Hernández, J. M. J., García, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., Camacho-Corona, M. R. Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytother Res*, vol. 26, no. 12: 1957–1960. (2012).

47. Clemente-Soto, A., Balderas-Rentería, I., Rivera, G., Segura-Cabrera, A., Garza-González, E., Camacho-Corona, M. R. Potential Mechanism of Action of *meso*-Dihydroguaiaretic Acid on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv,” *Molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 20170–20182. (2014).
48. Reyes-Melo, K., García, A., Romo-Mancillas, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., Miranda, L. D., Vargas-Villarreal, J., Favela-Hernández, J. M. J., Camacho-Corona, M. R. *meso*-Dihydroguaiaretic acid derivatives with antibacterial and antimycobacterial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2017).
49. Ghosh, A. K. & Brindisi, M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry,” *J Med Chem*, vol. 58, no. 7, pp. 2895–2940, (2015).
50. Agrawal, D. K., Saikia, D., Tiwari, R., Ojha, S., Shanker, K., Kumar, J. K., Gupta, A. K., Tandon, S., Negi, A. S., Khanuja, S. P. S. Demethoxycurcumin and its semisynthetic analogues as antitubercular agents. *Planta Med*, vol. 74, no. 15: 1828–1831, (2008).
51. del Olmo, E., Molina-Salinas, G. M., Escarcena, R., Alves, M., López-Pérez, J. L., Hernandez-Pando, R., Said-Fernández, S., Feliciano, A. S. Simple dihydrosphingosine analogues with potent activity against MDR-*Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 19, no. 19: 5764–5768. (2009).
52. Kumar, K., Awasthi, D., Lee, S.-Y., Zanardi, I., Ruzsicska, B., Knudson, S., Tonge, P. J., Slayden, R. A., Ojima, I. Novel Trisubstituted Benzimidazoles, Targeting Mtb FtsZ, as a New Class of Antitubercular Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 54, no. 1: 374–381. (2011).
53. Awasthi, D., Kumar, K., Knudson, S. E., Slayden, R. A., Ojima, I. SAR Studies on Trisubstituted Benzimidazoles as Inhibitors of Mtb FtsZ for the Development of Novel Antitubercular Agents. *J Med Chem*, vol. 56, no. 23: 9756–9770. (2013).
54. Baranyai, Z., Krátký, M., Vinšová, J., Szabó, N., Senoner, Z., Horváti, K., Stolaříková, J., Dávid, S., Bősze, S. Combating highly resistant emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium tuberculosis* with novel salicylanilide esters and carbamates. *Eur J Med Chem*, vol. 101: 692–704. (2015).
55. Inturi, B., Pujar, G. V., Purohit, M. N. Recent Advances and Structural Features of Enoyl-ACP Reductase Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Pharm*, vol. 349, no. 11: 817–826, (2016).
56. Kanetaka, H., Koseki, Y., Taira, J., Umei, T., Komatsu, H., Sakamoto, H., Gulten, G., Sacchettini, J. C., Kitamura, M., Aoki, S. Discovery of InhA inhibitors with anti-mycobacterial activity through a matched molecular pair approach. *Eur J Med Chem*, vol. 94: 378–385 (2015).
57. Gautham, G., Sankar Kar, S., Bhat, V., Rao P. N., Shenoy, V. P., Bairy, I. Rational design and synthesis of novel diphenyl ether derivatives as antitubercular agents. *Drug Des Devel Ther*, vol. Volume 10: 2299–2310, (2016).

58. Pan, P., Knudson, S. E., Bommineni, G. R., Li, H.-J., Lai, C.-T., Liu, N., Garcia-Diaz, M., Simmerling, C., Patil, S. S., Slayden, R. A., Tonge, P. J. Time-Dependent Diaryl Ether Inhibitors of InhA: Structure-Activity Relationship Studies of Enzyme Inhibition, Antibacterial Activity, and *in vivo* Efficacy. *Chem Med Chem*, vol. 9, no. 4: 776–791.(2014).
59. B. Merget and C. A. Sotriffer. Slow-Onset Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* InhA: Revealing Molecular Determinants of Residence Time by MD Simulations. *PLOS One*, vol. 10, no. 5. (2015).
60. Collins L. A., Franzblau, S.G. Microplate Almar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Ch*, vol. 41, no. 5:1004–1009.(1997).
61. Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M. T., Cook, M. B., V. K. Quenzer, Ferguson, R. M., Gilman, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol*, vol. 36, no. 2: 362–366. (1998).
62. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening, *J Natl Cancer Inst*, vol. 82, no. 13: 1107–1112. (1990).
63. Bochevarov, A. D., Harder, E., Hughes, T. F., Greenwood, J. R., Braden, D. A., Philipp, D. M., Rinaldo, D., Halls, M. D., Zhang, J., Friesner, R. A. Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences. *Int J Quantum Chem*, vol. 113, no. 18: 2110–2142. (2013).
64. Tosco, P., Balle, T., Shiri, F. Open3DALIGN: an open-source software aimed at unsupervised ligand alignment. *J Comput Aided Mol Des*, vol. 25, no. 8:777. (2011).
65. González-Medina, M., Méndez-Lucio, O., Medina-Franco, J. L. Activity Landscape Plotter: A Web-Based Application for the Analysis of Structure–Activity Relationships. *J Chem Inf Model*, vol. 57, no. 3: 397–402. (2017).
66. Medina-Franco, J. L. Scanning Structure–Activity Relationships with Structure–Activity Similarity and Related Maps: From Consensus Activity Cliffs to Selectivity Switches. *J Chem Inf and Model*, vol. 52, no. 10: 2485–2493. (2012).
67. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res*, vol. 13, no. 11: 2498–2504. (2003).
68. Tosco P., Balle, T. Open3DQSAR: a new open-source software aimed at high-throughput chemometric analysis of molecular interaction fields. *J Mol Model*, vol. 17, no. 1:201–208. (2011).

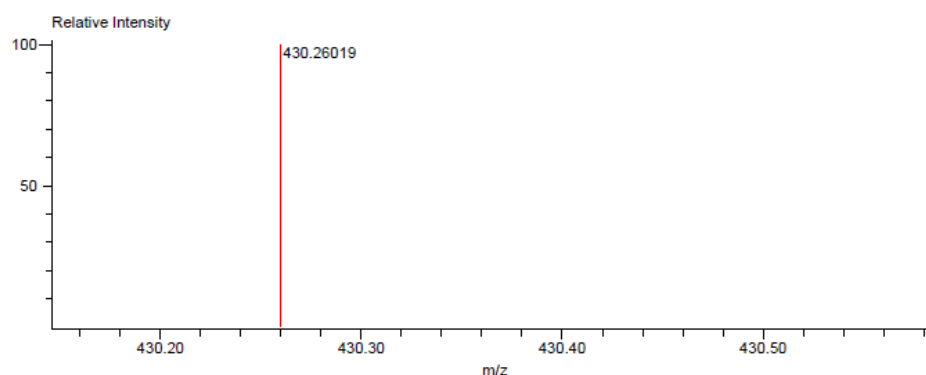
69. Cramer, R. D., Patterson, D. E., Bunce, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc*, vol. 110, no. 18: 5959–5967, (1988).
70. B. Park, D. Awasthi, S. R. Chowdhury, E. H. Melief, K. Kumar, S. E. Knudson, R. A. Slayden, and I. Ojima, Design, synthesis and evaluation of novel 2,5,6-trisubstituted benzimidazoles targeting FtsZ as antitubercular agents, *Bioorgan Med Chem*, vol. 22, no. 9: 2602–2612. (2014).
71. Hwu, J. R., Tseng, W. N., Gnabre, J., Giza, P., Huang, R. C. C. Antiviral Activities of Methylated Nordihydroguaiaretic Acids. 1. Synthesis, Structure Identification, and Inhibition of Tat-Regulated HIV Transactivation. *J Med Chem*, vol. 41, no. 16: 2994–3000. (1998).
72. Stumpfe, D., Hu, Y., Dimova, D., Bajorath, J. Recent Progress in Understanding Activity Cliffs and Their Utility in Medicinal Chemistry. *J Med Chem*, vol.57: 18-28. (2016).

APÉNDICE A

Espectros de masas

(±)-1

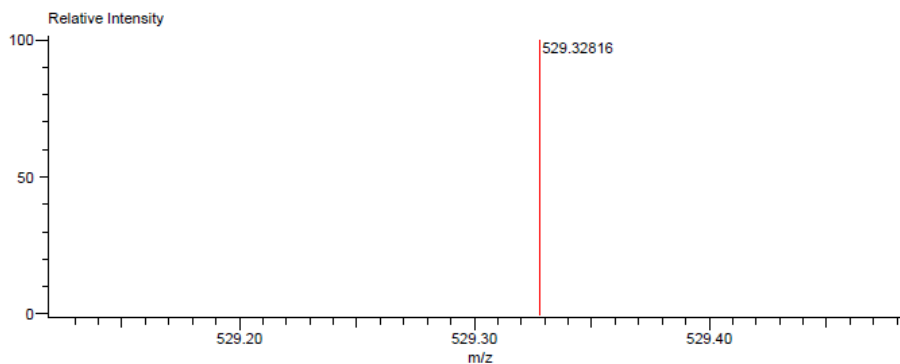
Data: U-105-ARP-KCV-1M	Acquired: 1/27/2017 1:32:06 PM
Sample Name: Estefania icelo avila	Operator: AccuTOF
Description:	Mass Calibration data: Cal Peg 600
Ionization Mode: ESI+	Created: 1/31/2017 12:18:25 PM
History: Determine m/z [Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...	Created by: AccuTOF
Charge number: 1	Tolerance: 3.00 (mmu)
Element: ¹² C: 24 .. 25, ¹ H: 1 .. 36, ¹⁴ N: 0 .. 1, ¹⁶ O: 4 .. 5	Unsaturation Number: 0.0 .. 30.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
430.26019	1216687.81	430.25935	0.84	1.96	¹² C ₂₅ ¹ H ₃₆ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₅

meso-2

Data: U-154-ARP-KCV-1D	Acquired: 2/1/2017 2:28:17 PM
Sample Name: Estefania Icelo Avila	Operator: AccuTOF
Description:	Mass Calibration data: Cal Peg 600
Ionization Mode: ESI+	Created: 2/2/2017 10:39:30 AM
History: Determine m/z [Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...	Created by: AccuTOF
Charge number: 1	Tolerance: 10.00 (mmu)
Element: ¹² C: 1 .. 30, ¹ H: 1 .. 45, ¹⁴ N: 1 .. 2, ¹⁶ O: 1 .. 6	Unsaturation Number: 1.0 .. 20.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
529.32816	694277.88	529.32776	0.40	0.75	¹² C ₃₀ ¹ H ₄₅ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₆

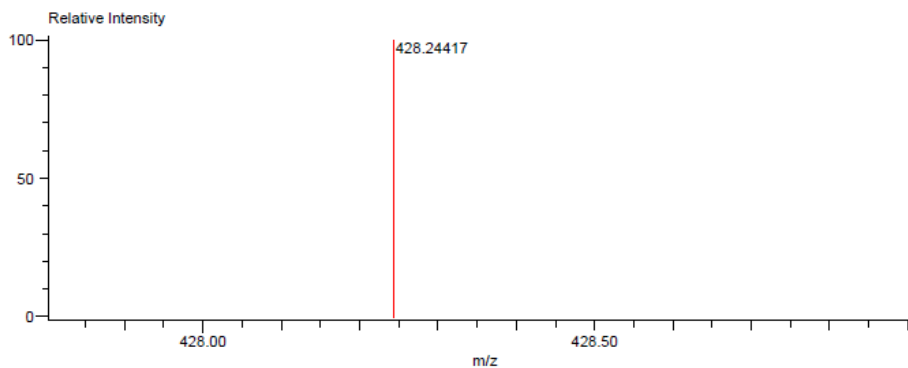
(±)-3

Data:U-104-ARP-KCV-5M
Sample Name:Estefania icelo avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:1/27/2017 1:29:01 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:1/31/2017 12:13:55 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu)
Element:¹²C:24 .. 25, ¹H:0 .. 34, ¹⁴N:1 .. 1, ¹⁶O:4 .. 5

Unsaturation Number:0.0 .. 30.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
428.24417	1101673.77	428.24370	0.47	1.11	¹² C ₂₅ ¹ H ₃₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₅

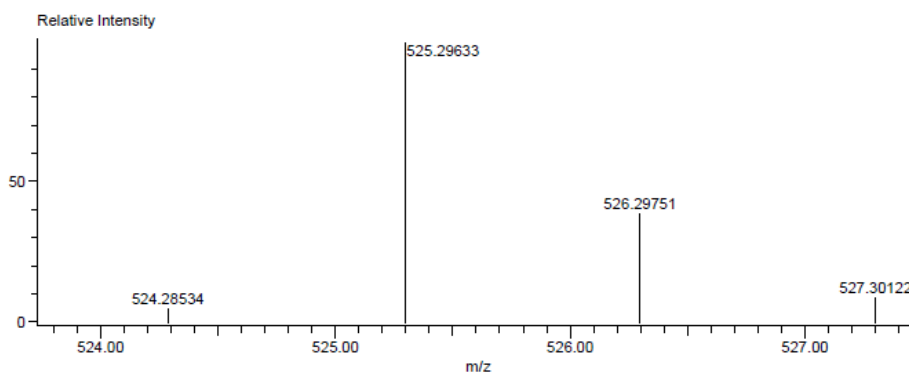
meso-4

Data:U-103-ARP-KCV-5D
Sample Name:Estefania icelo avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:1/27/2017 1:26:14 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:1/30/2017 2:56:48 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:10.00(mmu)
Element:¹²C:15 .. 30, ¹H:20 .. 41, ¹⁴N:1 .. 2, ¹⁶O:3 .. 6

Unsaturation Number:8.0 .. 15.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
525.29633	1194754.70	525.29646	-0.13	-0.24	¹² C ₃₀ ¹ H ₄₁ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₆

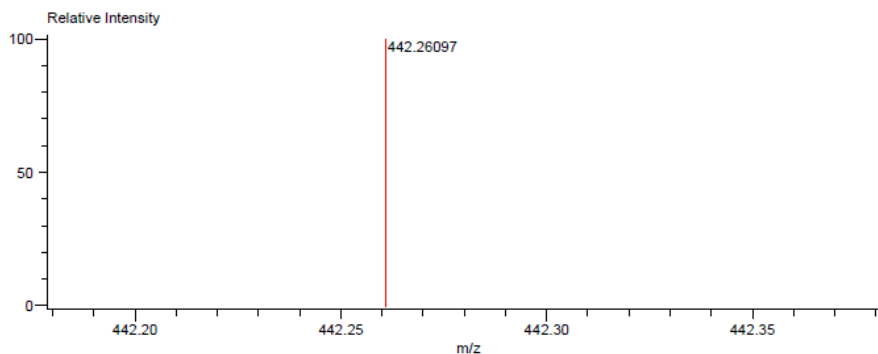
(±)-5

Data:U151-ARP-KCV-2M
Sample Name:Estefania Icelo Avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:2/1/2017 2:16:18 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/2/2017 10:23:02 AM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu)
Element:¹²C:1 .. 26, ¹H:1 .. 36, ¹⁴N:1 .. 1, ¹⁶O:1 .. 5

Unsaturation Number:1.0 .. 20.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
442.26097	744339.19	442.25935	1.62	3.67	¹² C ₂₆ ¹ H ₃₆ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₅

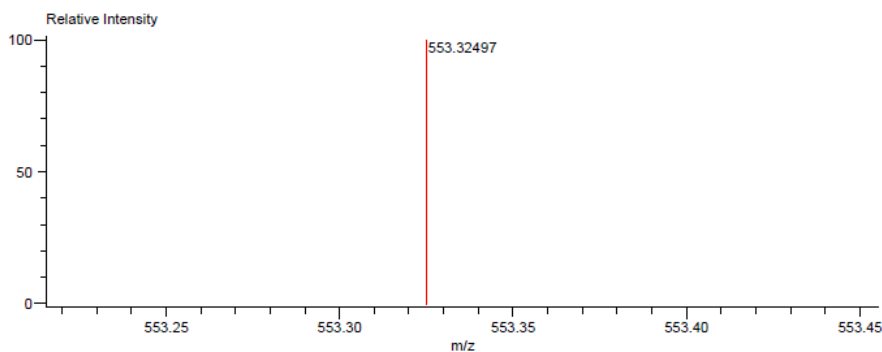
meso-6

Data:U-99-ARP-KCV-2D
Sample Name:miranda luis 2017 JAV16
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:2/13/2017 12:09:10 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/13/2017 12:22:44 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu)
Element:¹²C:1 .. 32, ¹H:1 .. 45, ¹⁴N:1 .. 2, ¹⁶O:1 .. 6

Unsaturation Number:1.0 .. 30.0 (Fracti...

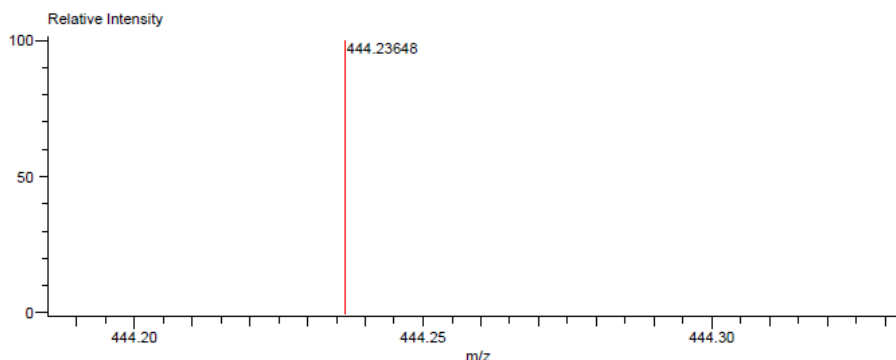


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
553.32497	9335.62	553.32776	-2.79	-5.05	¹² C ₃₂ ¹ H ₄₅ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₆

(±)-7

Data:U-155-ARP-KCV
Sample Name:Estefania Icelo Avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...
Acquired:2/1/2017 2:30:57 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/2/2017 10:43:26 AM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:10.00(mmu) Unsaturation Number:1.0 .. 20.0 (Fracti...
Element:¹²C:1 .. 25, ¹H:1 .. 34, ¹⁴N:1 .. 1, ¹⁶O:1 .. 6

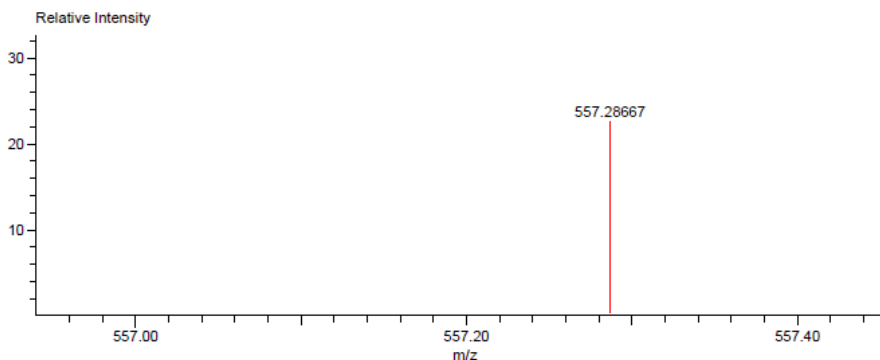


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
444.23648	489901.13	444.23861	-2.14	-4.81	¹² C ₂₅ ¹ H ₃₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₆

meso-8

Data:U-106-ARP-KCV-3D
Sample Name:Estefania icelo avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...
Acquired:1/27/2017 1:34:50 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:1/31/2017 12:53:03 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 30.0 (Fracti...
Element:¹²C:20 .. 30, ¹H:1 .. 41, ¹⁴N:1 .. 2, ¹⁶O:3 .. 8



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
557.28667	93561.20	557.28629	0.39	0.69	¹² C ₃₀ ¹ H ₄₁ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₈

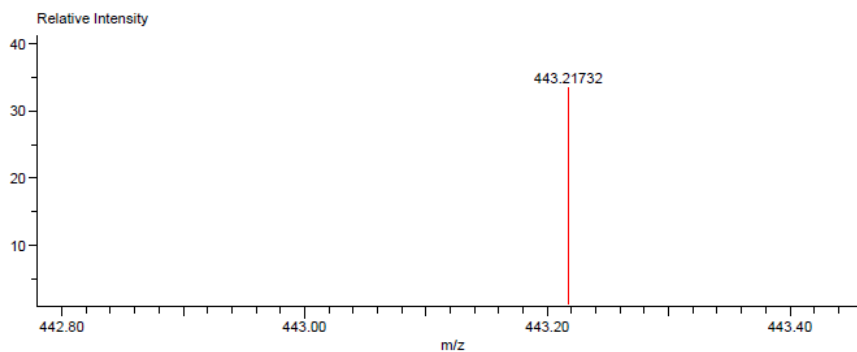
(±)-9

Data:U-152-ARP-KCV-4M
Sample Name:Estefania Icelo Avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:2/1/2017 2:19:09 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/3/2017 11:24:34 AM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:10.00(mmu)
Element:¹²C:1 .. 24, ¹H:1 .. 31, ¹⁴N:1 .. 2, ¹⁶O:1 .. 6

Unsaturation Number:1.0 .. 30.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
443.21732	133856.50	443.21821	-0.89	-2.01	¹² C ₂₄ ¹ H ₃₁ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₈

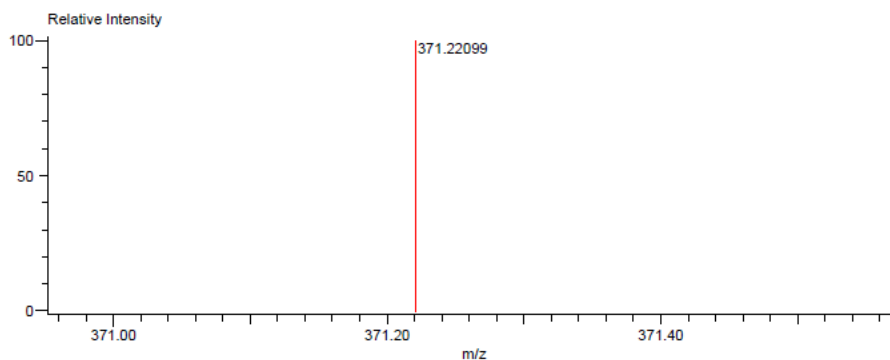
(±)-10

Data:U-156-ARP-KCV-6M
Sample Name:Estefania Icelo Avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:2/1/2017 2:33:33 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/2/2017 10:45:12 AM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu)
Element:¹²C:1 .. 23, ¹H:1 .. 31, ¹⁶O:1 .. 4

Unsaturation Number:1.0 .. 20.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
371.22099	1305084.50	371.22223	-1.25	-3.36	¹² C ₂₃ ¹ H ₃₁ ¹⁶ O ₄

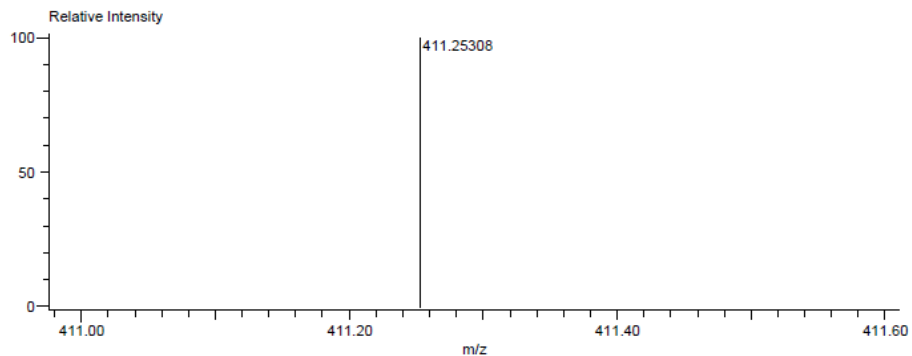
meso-11

Data:U-100-ARP-KCV-6D
Sample Name:Estefania icelo avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:1/27/2017 1:17:25 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:1/30/2017 2:32:32 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1
Tolerance:10.00(mmu)
Element:¹²C:15 .. 26, ¹H:20 .. 35, ¹⁴N:0 .. 0, ¹⁶O:3 .. 4

Unsaturation Number:8.0 .. 15.0 (Fracti..



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
411.25308	332174.48	411.25353	-0.45	-1.10	¹² C ₂₆ ¹ H ₃₅ ¹⁶ O ₄

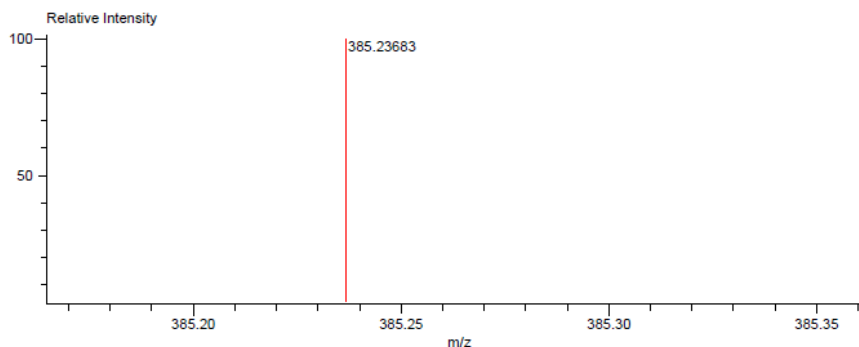
(±)-12

Data:U-101-ARP-KCV-7M
Sample Name:Estefania icelo avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:1/27/2017 1:20:43 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:1/31/2017 12:39:38 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1
Tolerance:10.00(mmu)
Element:¹²C:20 .. 24, ¹H:1 .. 33, ¹⁶O:3 .. 4

Unsaturation Number:0.0 .. 30.0 (Fracti..



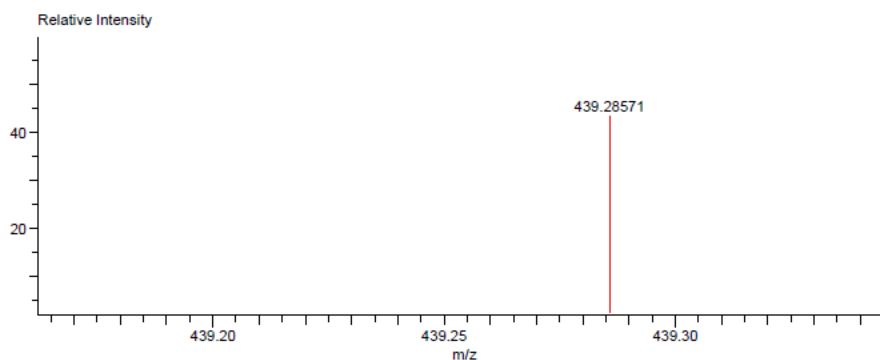
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
385.23683	1758854.00	385.23788	-1.05	-2.73	¹² C ₂₄ ¹ H ₃₃ ¹⁶ O ₄

meso-13

Data:U-152-ARP-KCV-7D
Sample Name:Estefania Icelo Avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:2/1/2017 2:22:23 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/2/2017 10:25:52 AM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu) Unsaturation Number:1.0 .. 20.0 (Fracti...
Element:¹²C:1 .. 28, ¹H:1 .. 39, ¹⁶O:1 .. 4



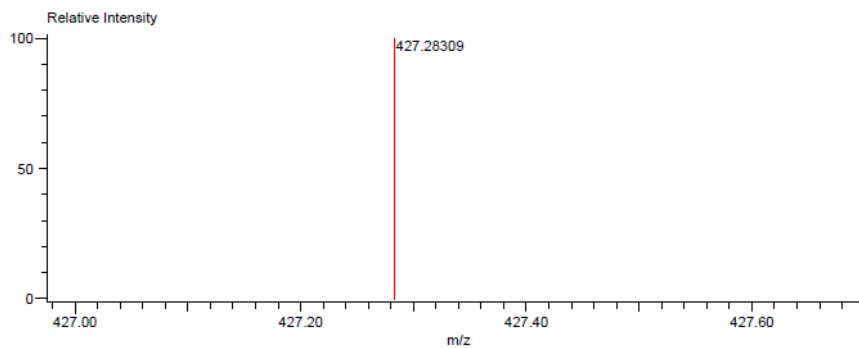
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
439.28571	28848.00	439.28483	0.88	2.01	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₉ ¹⁶ O ₄

(±)-14

Data:U-102-ARP-KCV-8M
Sample Name:Estefania icelo avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:1/27/2017 1:23:44 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:1/31/2017 12:47:42 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 30.0 (Fracti...
Element:¹²C:20 .. 27, ¹H:1 .. 39, ¹⁶O:3 .. 4



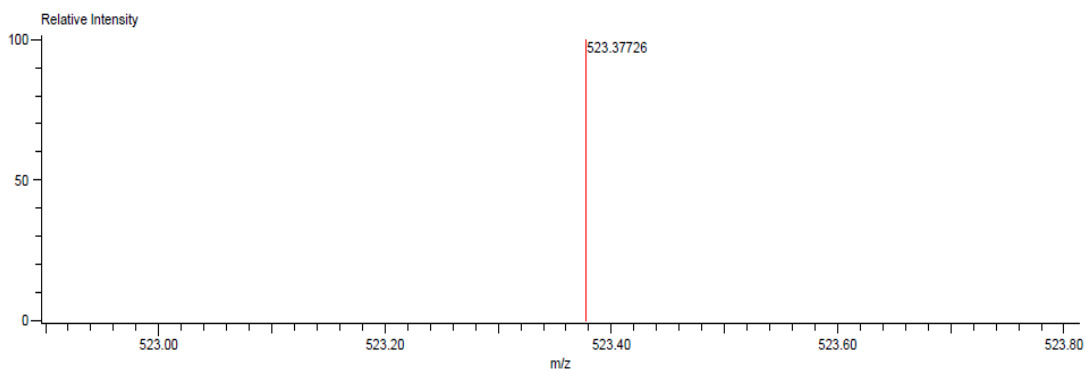
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
427.28309	573315.50	427.28483	-1.74	-4.08	¹² C ₂₇ ¹ H ₃₉ ¹⁶ O ₄

meso-15

Data: u150-arp-kcv-8D
 Sample Name: Estefania Icelo Avila
 Description:
 Ionization Mode: ESI+
 History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 50, Area]; Correct Base [50.0%]]; Correct Base [5.0%]; Average (MS [1] 0.0)

Acquired: 2/1/2017 2:13:41 PM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: Cal Peg 600
 Created: 2/2/2017 10:18:23 AM
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1
 Element: ¹²C: 1 .. 34, ¹H: 1 .. 51, ¹⁶O: 1 .. 4
 Tolerance: 3.00 (mmu)
 Unsaturation Number: 1.0 .. 20.0 (Fraction: Both)



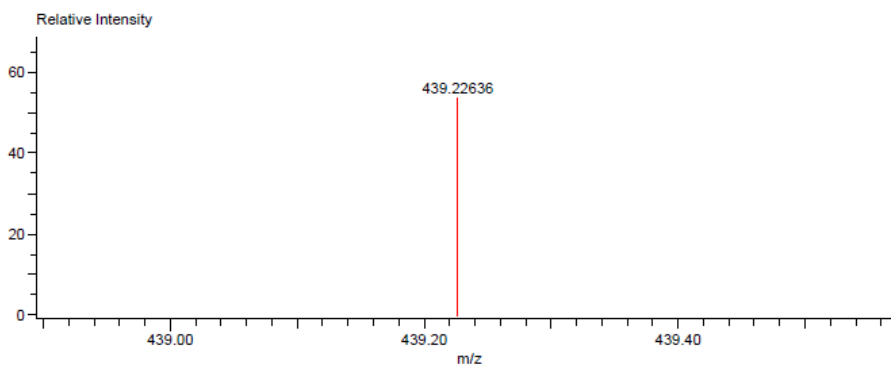
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
523.37726	786993.38	523.37873	-1.47	-2.81	¹² C ₃₄ ¹ H ₅₁ ¹⁶ O ₄	9.5

(±)-16

Data: U-169-ARP-KCV-11M
 Sample Name: Estefania Icelo Avila
 Description:
 Ionization Mode: ESI+
 History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 50, Area]; Correct Base [50.0%]]; Corre...

Acquired: 2/3/2017 11:31:17 AM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: Cal Peg 600
 Created: 2/9/2017 11:33:26 AM
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1
 Element: ¹²C: 1 .. 27, ¹H: 1 .. 32, ¹⁹F: 1 .. 1, ¹⁶O: 2 .. 4
 Tolerance: 10.00 (mmu)
 Unsaturation Number: 1.0 .. 30.0 (Fracti...)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
439.22636	20402.92	439.22846	-2.10	-4.79	¹² C ₂₇ ¹ H ₃₂ ¹⁹ F ₁ ¹⁶ O ₄

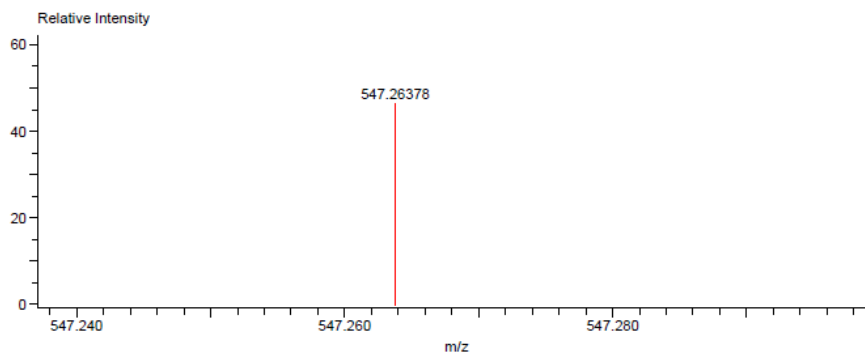
meso-17

Data:U-171-ARP-KCV-11D
Sample Name:miranda luis 2017 JAV16
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:2/13/2017 12:06:03 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/13/2017 12:38:39 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu)
Element:¹²C:1 .. 34, ¹H:1 .. 37, ¹⁹F:1 .. 2, ¹⁶O:1 .. 4

Unsaturation Number:1.0 .. 30.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
547.26378	21257.44	547.26599	-2.21	-4.03	¹² C ₃₄ ¹ H ₃₇ ¹⁹ F ₂ ¹⁶ O ₄

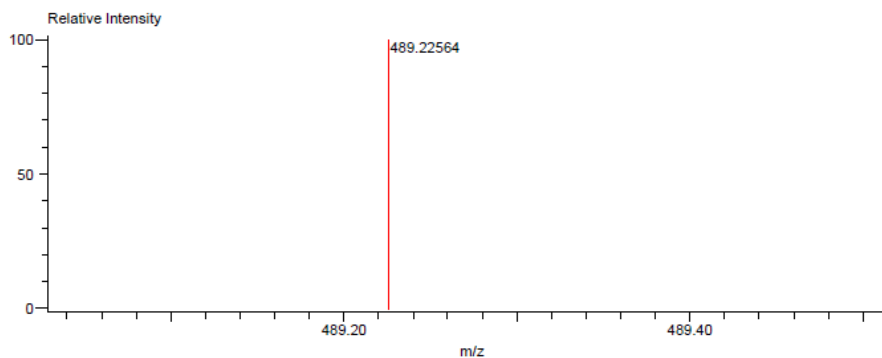
(±)-18

Data:U-153-ARP-KCV-9M
Sample Name:Estefania Icelo Avila
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:2/1/2017 2:25:24 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/3/2017 11:21:13 AM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:10.00(mmu)
Element:¹²C:1 .. 28, ¹H:1 .. 32, ¹⁹F:1 .. 3, ¹⁶O:1 .. 4

Unsaturation Number:1.0 .. 30.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
489.22564	775476.75	489.22527	0.37	0.77	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₂ ¹⁹ F ₃ ¹⁶ O ₄

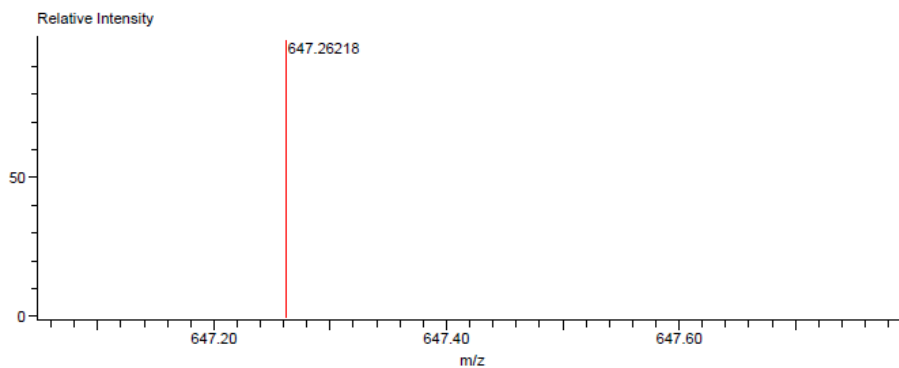
meso-19

Data:U-170-ARP-KCV-9D
Sample Name:miranda luis 2017 JAV16
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Corre...

Acquired:2/13/2017 12:15:53 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/13/2017 12:26:50 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu)
Element:¹²C:1 .. 36, ¹H:1 .. 37, ¹⁹F:1 .. 6, ¹⁶O:1 .. 4

Unsaturation Number:1.0 .. 30.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
647.26218	25729.53	647.25960	2.58	3.99	¹² C ₃₆ ¹ H ₃₇ ¹⁹ F ₆ ¹⁶ O ₄

APÉNDICE B

Presentaciones en congresos



SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.
"La Química nos une"
otorga la presenta

CONSTANCIA
a

KAREN GISELLE CHÁVEZ VILLARREAL

por haber asistido al
51º Congreso Mexicano de Química &
35º Congreso Nacional de Educación Química
28 de septiembre - 1º de octubre, 2016
"Ciudad del Conocimiento, UAEH"
Pachuca de Soto, Hidalgo, México.


Dr. Benjamín Velasco Bejarano
Presidente Nacional
Sociedad Química de México, A.C.


Dra. Marra de Jesús Rosales Hoz
Presidente de Congresos Sociedad
Química de México, A.C.



APÉNDICE C

Publicaciones

Dear Dr. Camacho-Corona:

We are pleased to inform you that your manuscript, "Synthesis, antimycobacterial evaluation, and QSAR analysis of meso-Dihydroguaiaretic acid derivatives" has been accepted for publication in Medicinal Chemistry Research.

Please remember to always include your manuscript number, #MCRE-D-17-00793R2, whenever inquiring about your manuscript. Thank you.

Best regards,

Francisco Leon, Ph.D
Editor-in-Chief
Medicinal Chemistry Research