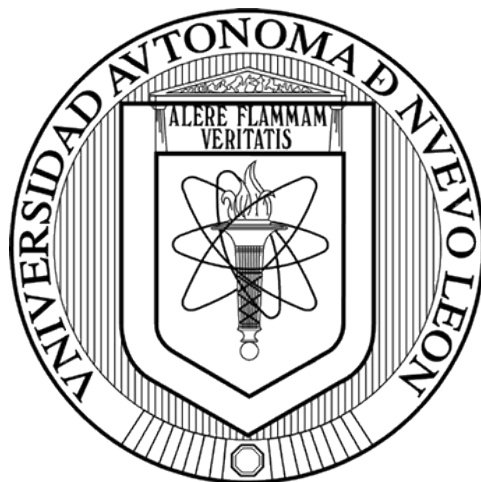


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS

Síntesis y caracterización de nuevas acrilamidas y oxazolinas metoxiaril sustituidas. Determinación de su actividad citotóxica y antituberculosa *in vitro*

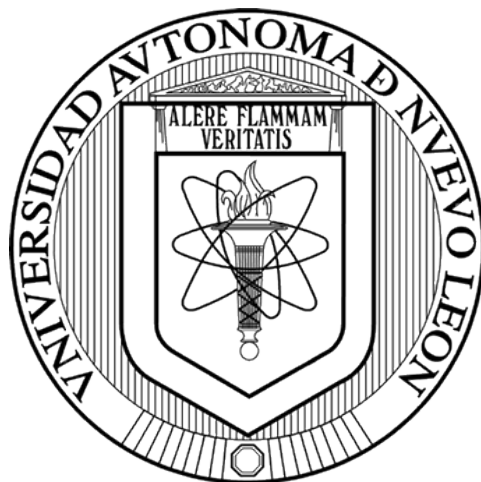
Presenta

L.Q.I. Jessé Abner Cabrera Gerardo

Como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Marzo, 2021

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



TESIS

Síntesis y caracterización de nuevas acrilamidas y oxazolinas metoxiaril sustituidas. Determinación de su actividad citotóxica y antituberculosa *in vitro*

Presenta

L.Q.I. Jessé Abner Cabrera Gerardo

Como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Marzo, 2021

Síntesis y caracterización de nuevas acrilamidas y oxazolinas
metoxiaril sustituidas. Determinación de su actividad citotóxica
y antituberculosa *in vitro*

Aprobación de la Tesis:

Dr. Francisco Guadalupe Avalos Alanís
DIRECTOR DE TESIS

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Co-DIRECTORA

Dr. Eugenio Hernández Fernández
COMITÉ TUTORIAL

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
COMITÉ TUTORIAL

Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez
COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

Jessé Abner Cabrera Gerardo

Graduación: Marzo 2021

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Síntesis y caracterización de nuevas acrilamidas y oxazolinas metoxiaril sustituidas. Determinación de su actividad citotóxica y antituberculosa *in vitro*.

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

Área de Estudio: Compuestos con Actividad Farmacológica y Biotecnología Farmacéutica.

➤ **Propósito y Métodos de Estudio:**

La síntesis orgánica es una herramienta valiosa en el descubrimiento de compuestos de relevante actividad farmacológica por lo que en este trabajo se han utilizado técnicas para sintetizar y caracterizar químicamente una serie de acrilamidas y oxazolinas, partiendo de derivados de ácidos cinámicos (*orto*, *meta* y *para* sustituidos) y los aminoácidos glicina y L-fenilalanina, con el fin de obtener compuestos con potencial aplicación como fármacos antifímicos. Cada uno de los compuestos fueron purificados mediante cromatografía en columna y caracterizados a través de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono. Posteriormente, cada uno de estos compuestos (acrilamidas y oxazolinas), fueron evaluados para determinar su actividad anti-TB *in vitro* (CMI < 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ante dos cepas de *M. tuberculosis*, una sensible y otra farmacorresistente, utilizando la técnica colorimétrica Alamar Azul. Los compuestos más activos (oxazolinas) fueron evaluados ante células de crecimiento normal mediante la técnica WST-1 para determinar su citotoxicidad.

➤ **Contribuciones y Conclusiones:**

Se logró sintetizar y caracterizar debidamente seis acrilamidas, seis β -hidroxiacrilamidas y seis oxazolinas a partir de los precursores planteados. Al llevar a cabo la evaluación anti-TB *in vitro* se pudo observar de manera general que las oxazolinas **10** y **11a-c** fueron compuestos más activos que sus análogos abiertos (acrilamidas y β -hidroxiacrilamidas **6-9a-c**) con CMI de 6.25 a 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ destacando particularmente los compuestos *para* sustituidos derivados de L-fenilalanina. En cuanto a la toxicidad de las oxazolinas, esta parece ser relevante, con porcentajes de viabilidad celular entre 20 a 30 % pudiendo tener una potencial aplicación como compuestos antifímicos y/o antineoplásicos.

FIRMA DEL DIRECTOR

Síntesis y caracterización de nuevas acrilamidas y oxazolinas metoxiaril sustituidas. Determinación de su actividad citotóxica y antituberculosa *in vitro*

Presentado por:

LQI. Jessé Abner Cabrera Gerardo

El trabajo presentado a continuación se realizó en el Laboratorio de Química Farmacéutica y en el Laboratorio Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León; así como dentro del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad e Infectología (LADIME) del servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Dicho proyecto fue dirigido por el Dr. Francisco Guadalupe Avalos Alanís, asesorado por la Dra. María del Rayo Camacho Corona y con evaluación constante de los doctores, Eugenio Hernández Fernández, Myrna Laura Yeverino Gutiérrez y Sandra Leticia Gracia Vásquez. Con apoyo económico tipo beca otorgados por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y recursos del proyecto FARMC-105526-FGAA-18/02 por parte de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

De todo corazón quiero agradecer a todas las personas involucradas en el desarrollo de este proyecto. Gracias a ustedes he logrado concluir con gran satisfacción una meta académica más para ponerla al servicio de Dios.

Primeramente, a mi Padre Dios por darme la oportunidad de ingresar y concluir este posgrado, por mantenerme firme a pesar de las pruebas y por llenarme de bendiciones a cada instante de estos dos años.

Agradezco a mis padres Lucio y Esbeydi que con gran esmero, dedicación y sacrificio me han conducido a no rendirme y a cumplir mis sueños responsablemente y con valores.

A mi asesor Dr. Francisco y co-asesora Dra. Ma. Del Rayo por su apoyo incondicional y constante, por permitirme desarrollar este proyecto y compartirme sus conocimientos; sobre todo por su paciencia. ¡Muchas gracias!

A mi futura (25-10-2020) esposa Carmen García por llenar de alegría este largo y cansado camino, creo que no hubiera podido sin tu compañía y ánimos constantes.

A todo el personal y equipo del laboratorio de Química Farmacéutica por su compañía y conocimientos intercambiados.

A la Dra. Elvira Garza por permitirme la estancia de investigación en su laboratorio y brindarme todo el apoyo a lo largo de tres meses de actividades.

A mi amigo, el LQI. Steve Alfaro por apoyarme y motivarme a seguir adelante, así como sus consejos en la escritura de este documento.

Al M.C. Saúl Aguirre, por facilitarme en gran manera el proyecto con tus conocimientos y todo el sacrificio que eso implicó.

A mi comité tutorial por las revisiones, consejos, regaños y conocimiento compartido para pulir este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado mediante la beca durante los dos años del posgrado.

A todos aquellos que de cierta manera contribuyeron a que esto fuera posible quiero agradecerles de todo el corazón.

DEDICATORIA

Con enorme gratitud dedico este proyecto a...

Mi Salvador

Mis padres y hermanos

Mi mejor amiga ♥JC♥ compañera de aventuras

Todos aquellos que siempre han puesto su confianza y apoyo en mi

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción.....	1
1.1	Tuberculosis.....	1
1.1.1	Problemática Mundial.....	4
1.1.2	Tratamiento anti-TB.....	6
1.2	Fármacos antituberculosos.....	8
1.2.1	Mecanismo de acción de los fármacos.....	8
1.3	Tendencia en investigación.....	9
2	Antecedentes.....	11
2.1	Antecedentes.....	11
2.1.1	Síntesis de acrilamidas.....	11
2.1.2	Síntesis de oxazolinas.....	12
2.1.3	Actividad antituberculosa y citotóxica.....	12
3	Justificación.....	19
3.1	Justificación.....	19
3.2	Hipótesis.....	19
3.3	Objetivo General.....	20
3.4	Objetivos Específicos.....	20
4	Materiales y Métodos.....	21
4.1	Metodología Sintética.....	21
4.1.1	Generalidades.....	22
4.1.2	Procedimiento general para la síntesis de los ésteres cinámicos.....	23
4.1.3	Procedimiento general para la síntesis de los ácidos cinámicos.....	24
4.1.4	Procedimiento general para la síntesis de los ésteres metílicos.....	25
4.1.5	Procedimiento general para la síntesis de acrilamidas 6 y 7.....	26
4.1.6	Procedimiento general para la síntesis de β -hidroxiacrilamidas 8 y 9.....	28
4.1.7	Procedimiento general para las síntesis de oxazolinas 10 y 11.....	29
4.2	Esayos biológicos.....	31

4.2.1	Generalidades	31
4.2.2	Actividad antituberculosa	33
4.2.3	Actividad citotóxica	35
4.3	Manejo y Disposición de los Residuos.....	37
5	Resultados y Discusión	38
5.1	Síntesis y caracterización de los compuestos	38
5.1.1	Preparación de los ésteres cinámicos 2a-c.....	38
5.1.2	Preparación de los derivados de los ácidos cinámicos 3a-c.....	40
5.1.3	Preparación de los ésteres metílicos de aminoácidos 4' y 5'	41
5.1.4	Preparación de acrilamidas 6 y 7a-c.....	43
5.1.5	Preparación de las β -hidroxiacrilamidas 8 y 9a-c.....	59
5.1.6	Preparación de las oxazolinas 10 y 11a-c.....	70
5.2	Determinación de la actividad biológica.....	83
5.2.1	Determinación de la actividad antituberculosa <i>in vitro</i>	83
5.2.2	Determinación de la actividad citotóxica.....	88
6	Conclusiones	92
6.1	Conclusiones	92
7	Bibliografía	94
8	Anexos.....	97
	Anexo 1.- Espectros de Resonancia Magnética Nuclear	99
	Ester cinámico 2c	99
	Ácido cinámico 3c.....	101
	Acrilamidas 6 y 7a-b	103
	β -hidroxiacrilamidas 8 y 9a-b.....	111
	Oxazolinas 10 y 11a-b.....	119
	Anexo 2.- Resumen Autobiográfico	127

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>M. tuberculosis</i>	2
Tabla 2. Fármacos anti-TB.....	8
Tabla 3. Actividad anti-TB de los derivados de ácidos cinámicos.....	15
Tabla 4. Actividad anti-TB de oxazolininas y oxazoles.....	17
Tabla 5. Colectores usados para la recolección de residuos.....	37
Tabla 6. Resultado de la síntesis de ésteres metílicos de aminoácido 4' y 5'.....	41
Tabla 7. Resultado de la síntesis de acrilamidas 6 y 7a-c.	43
Tabla 8. Resultado de la síntesis de β -hidroxiacrilamidas 8 y 9a-c.....	59
Tabla 9. Resultado de la síntesis de oxazolininas 10 y 11a-c.	70
Tabla 10. Comparativa de rendimientos de reacción por las oxazolininas.....	83
Tabla 11. Resultados de la actividad anti-TB <i>in vitro</i>	85
Tabla 12. Resultados de la actividad citotóxica.	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología macro (a) y microscópicas (b) de <i>M. tuberculosis</i>	2
Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	3
Figura 3. Relación de la estructura química-actividad antituberculosa.....	10
Figura 4. Diseño racional y sitios de interés molecular.	10
Figura 5. Síntesis de acrilamidas.....	11
Figura 6. Ruta de síntesis de oxazolinas.	12
Figura 7. Síntesis de oxazolinas usando Deoxo-Flúor®	12
Figura 8. Heterociclos derivados de dideoximicobactim.	13
Figura 9. Metodología general para la síntesis de derivados de ácido cinámico.....	14
Figura 10. Importancia en la instauración presente en la molécula.	15
Figura 11. Síntesis de oxazolinas-2-aril sustituidas.....	16
Figura 12. Síntesis de oxazolinas α,β -aril sustituidas.....	16
Figura 13. Oxazolinas y oxazoles α,β -insaturadas.	17
Figura 14. Reacción de la técnica Alamar Azul.....	32
Figura 15. Reacción de la técnica WST-1.	32
Figura 16. Éster cinámico 2c.....	39
Figura 17. Ácido cinámico 3c.....	40
Figura 18. Éster metílico 4'.....	41
Figura 19. Éster metílico 5'.....	42
Figura 20. Acrilamida 6a.....	45
Figura 21. Acrilamida 6b.....	46
Figura 22. Acrilamida 6c.....	47
Figura 23. Espectro de RMN ^1H para acrilamida 6c.	48
Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C para acrilamida 6c.....	49
Figura 25. Acrilamida 7a.....	50
Figura 26. Acrilamida 7b.....	51
Figura 27. Acrilamida 7c.....	52
Figura 28 Espectro de RMN ^1H para acrilamida 7c.	54
Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C para acrilamida 7c.....	55
Figura 30. Acrilato 7d.....	56
Figura 31. Espectro de RMN ^1H para el acrilato 7d.....	57

Figura 32. Espectro de RMN ¹³ C para el acrilato 7d.....	58
Figura 33. β-hidroxiacrilamida 8a.	60
Figura 34. β-hidroxiacrilamida 8b.	61
Figura 35. β-hidroxiacrilamida 8c.....	62
Figura 36. Espectro de RMN ¹ H para β-hidroxiacrilamida 8c.....	63
Figura 37. Espectro de RMN ¹³ C para β-hidroxiacrilamida 8c.	64
Figura 38. β-hidroxiacrilamida 9a.	65
Figura 39. β-hidroxiacrilamida 9b.	66
Figura 40. β-hidroxiacrilamida 9c.....	67
Figura 41. Espectro de RMN ¹ H para β-hidroxiacrilamida 9c.....	68
Figura 42. Espectro de RMN ¹³ C para β-hidroxiacrilamida 9c.	69
Figura 43. Oxazolina 10a.	71
Figura 44. Oxazolina 10b.	72
Figura 45. Oxazolina 10c.....	73
Figura 46. Espectro de RMN ¹ H para la oxazolina 10c.	74
Figura 47. Espectro de RMN ¹³ C para la oxazolina 10c.	75
Figura 48. Oxazolina 11a.	76
Figura 49. Oxazolina 11b.	77
Figura 50. Oxazolina 11c.....	78
Figura 51. Espectro de RMN ¹ H para la oxazolina 11c.	80
Figura 52. Espectro de RMN ¹³ C para la oxazolina 11c.	81
Figura 53. Reacción general para la síntesis de oxazolinas usando Deoxo -Flúor®.	82
Figura 54. Moléculas ensayadas para la actividad antituberculosa.	84
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H para el éster cinámico 2c.....	99
Figura 56. Espectro de RMN ¹³ C para el éster cinámico 2c.....	100
Figura 57. Espectro de RMN ¹ H para el ácido cinámico 3c	101
Figura 58. Espectro de RMN ¹³ C para el ácido cinámico 3c.....	102
Figura 59. Espectro de RMN ¹ H para la acrilamida 6a.....	103
Figura 60. Espectro de RMN ¹³ C para la acrilamida 6a.....	104
Figura 61. Espectro de RMN ¹ H para la acrilamida 6b.....	105
Figura 62. Espectro de RMN ¹³ C para la acrilamida 6b.....	106
Figura 63. Espectro de RMN ¹ H para la acrilamida 7a.....	107

Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C para la acrilamida 7a.....	108
Figura 65. Espectro de RMN ^1H para la acrilamida 7b.....	109
Figura 66. Espectro de RMN ^{13}C para la acrilamida 7b.....	110
Figura 67. Espectro de RMN ^1H para la β -hidroxiacrilamida 8a	111
Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C para la β -hidroxiacrilamida 8a.....	112
Figura 69. Espectro de RMN ^1H para la β -hidroxiacrilamida 8b	113
Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C para la β -hidroxiacrilamida 8b.....	114
Figura 71. Espectro de RMN ^1H para la β -hidroxiacrilamida 9a	115
Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C para la β -hidroxiacrilamida 9a.....	116
Figura 73. Espectro de RMN ^1H para la β -hidroxiacrilamida 9b	117
Figura 74. Espectro de RMN ^{13}C para la β -hidroxiacrilamida 9b.....	118
Figura 75. Espectro de RMN ^1H para la oxazolina 10a	119
Figura 76. Espectro de RMN ^{13}C para la oxazolina 10a.....	120
Figura 77. Espectro de RMN ^1H para la oxazolina 10b	121
Figura 78. Espectro de RMN ^{13}C para la oxazolina 10b.....	122
Figura 79. Espectro de RMN ^1H para la oxazolina 11a	123
Figura 80. Espectro de RMN ^{13}C para la oxazolina 11a.....	124
Figura 81. Espectro de RMN ^1H para la oxazolina 11b	125
Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C para la oxazolina 11b.....	126

LISTA DE ESQUEMAS

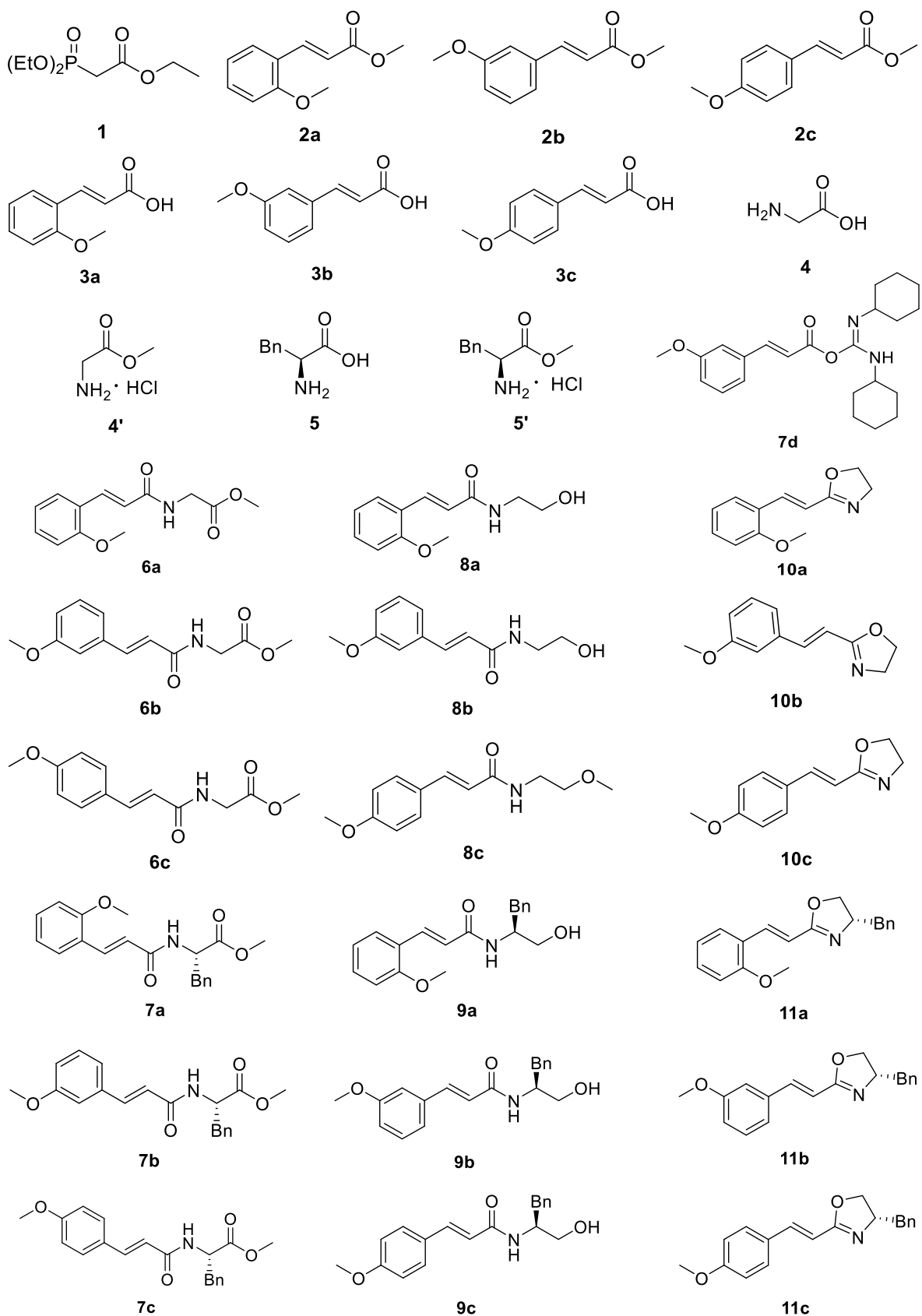
Esquema 1. Mecanismos de acción de los fármacos anti-TB.	9
Esquema 2. Ruta general de síntesis de acrilamidas y oxazolinas metoxiaril sustituidas.	21
Esquema 3. Reacción de síntesis de los ésteres cinámicos 2a-c.	23
Esquema 4. Reacción de síntesis de los ácidos cinámicos 3a-c.	24
Esquema 5. Reacción de síntesis de los clorhidratos de amino ésteres 4' y 5'.	25
Esquema 6. Reacción de síntesis de las acrilamidas 6 y 7a-c.	26
Esquema 7. Reacción de síntesis de las β -hidroxiacrilamidas 8 y 9a-c.	28
Esquema 8. Reacción de síntesis de las oxazolinas 10 y 11a-c.	29
Esquema 9. Llenado de la microplaca de la técnica de Alamar Azul.	35
Esquema 10. Comparativo de las estructuras activas ante TB por diversos autores.	87
Esquema 11. Porcentajes de viabilidad celular.	90

LISTA DE ABREVIATURAS

Å-Ángstrom	G-122-Cepa de <i>M. tuberculosis</i> resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol
Aa-Aminoácido	
Abs-Absorbancia	h-Hora
Ac-Acetona	H ₂ O-Agua
AcOEt-Acetato de etilo	Hex-Hexano
BAAR-Bacilo ácido-alcohol resistente	H37Rv-Cepa comercial de <i>M. tuberculosis</i>
Bn-Grupo bencilo	
CDCl ₃ -Cloroformo deuterado	KOH-Hidróxido de potasio
CH ₂ Cl ₂ -Cloruro de metileno	K ₂ CO ₃ -Carbonato de potasio
CHCl ₃ -Cloroformo	LiCl-Cloruro de litio
CMI-Concentración mínima inhibitoria	MeOH-Metanol
DCC-Diciclohexilcarbodiimida	MeOD-Metanol deuterado
DCU-Diciclohexilurea	mg-Miligramo
DMAP-Dimetilaminopiridina	mgL ⁻¹ -Miligramos por litro
Et ₃ N-Trietilamina	min-Minuto
Ec-Ecuación	mL-Mililitro
EMAR-Espectroscopia de Masas de Alta Resolución	MTT-Bromuro difeniltetrazolio
Eq-Equivalentes	NaBH ₄ -Borohidruro de sodio
Fr-Factor de retención	NaOH-Hidróxido de sodio
g-Gramos	Na ₂ SO ₄ -Sulfato de sodio
gL ⁻¹ -Gramos por litro	NH ₄ Cl-Cloruro de amonio
gmL ⁻¹ -Gramos por mililitro	nm-Nanómetros
g/mol-Gramos por mol	OMe- Metoxilo
	PAS-Ácido <i>p</i> -amino salicílico

PCR-Reacción en Cadena de la Polimerasa	TB XFR-Tuberculosis extremadamente resistente
pH -Potencial de hidrógeno	TB MFR-Tuberculosis multifarmacoresistente
Pf-Punto de fusión	THF-Tetrahidrofurano
PM-Peso molecular	UV-Vis-Espectrofotometría UV-Visible
PPD-Derivado proteico purificado	Vol.-Volumen
RMN ¹ H-Resonancia Magnética Nuclear de protón	μL-Microlitros
RMN ¹³ C-Resonancia Magnética Nuclear de carbono	δ-Densidad
rpm-Revoluciones por minuto	Δ-Calor
Rxn-Reacción	°C-Grados Celsius
SOCl ₂ -Cloruro de tionilo	%R-Porcentaje de rendimiento
TB-Tuberculosis	%Viab- Porcentaje de viabilidad celular

Índice de Estructuras



CAPÍTULO 1

1 Introducción

1.1 Tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria causante de la tuberculosis (TB), enfermedad que ha infectado aproximadamente a un cuarto de la población mundial por lo que se le considera como una problemática de salud pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y es una de las 10 principales causas de muerte [1].

Por parte de la población, esta enfermedad no ha adquirido la atención adecuada; debido a la falta de información, pues se cree que ya está erradicada, cuando en los datos se encuentra que ha cobrado la vida de millones de personas a lo largo de la historia, y lo sigue haciendo año con año debido a su patogenicidad y difícil tratamiento [2].

En 1882, el Dr. Robert Koch anunció el descubrimiento de dicha bacteria por lo cual también se le nombró bacilo de Koch y fue quien recibió el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1905 por sus importantes aportaciones [1].

Se trata de una bacteria perteneciente al orden de las actinomicetales y familia Micobacteriaceae (Tabla 1) que junto con *M. africanum*, *M. bovis* y *M. microti* constituyen el complejo de bacterias causantes de la TB. *M. tuberculosis* se distingue fácilmente del resto por su capacidad de sintetizar ácidos micólicos y ser el principal patógeno oportunista para infectar al huésped [3].

Tabla 1. Taxonomía de *M. tuberculosis*.

Taxonomía	
Dominio	Bacteria
Filo	Actinobacteria
Orden	Actinomycetales
Familia	Mycobacteriaceae
Género	<i>Mycobacterium</i>
Especie	<i>M. tuberculosis</i>

Como se observa en la Figura 1. *M. tuberculosis* presenta una morfología macroscópica de colonias redondeadas color blanco, cremosas, rugosas y opacas que varían de tamaño.



Figura 1. Morfología macro (a) y microscópicas (b) de *M. tuberculosis*. Imagen coloreada en SEM.

Por otro lado, en su morfología microscópica se puede observar bacilos de tamaños que varían entre 2 y 7 micrómetros (μm) de largo por 0.2 a 0.7 μm de ancho, ligeramente curvados [4].

Son bacilos gram-positivos, ácido-alcohol resistentes, aerobios estrictos, inmóviles, no formadores de esporas ni cápsulas y de crecimiento lento (aproximadamente 20 h), aunque en condiciones adversas pueden entrar en estado de latencia y retardar su replicación por varios días, incluso años.

Las características de su pared celular lo hacen ser un patógeno altamente resistente ya que presenta una envoltura impermeable de largas cadenas de ácidos micólicos (70-90 carbonos) enlazados a peptidoglicanos mediante cadenas de arabinogalactanos [5], como lo podemos observar en la Figura 2.

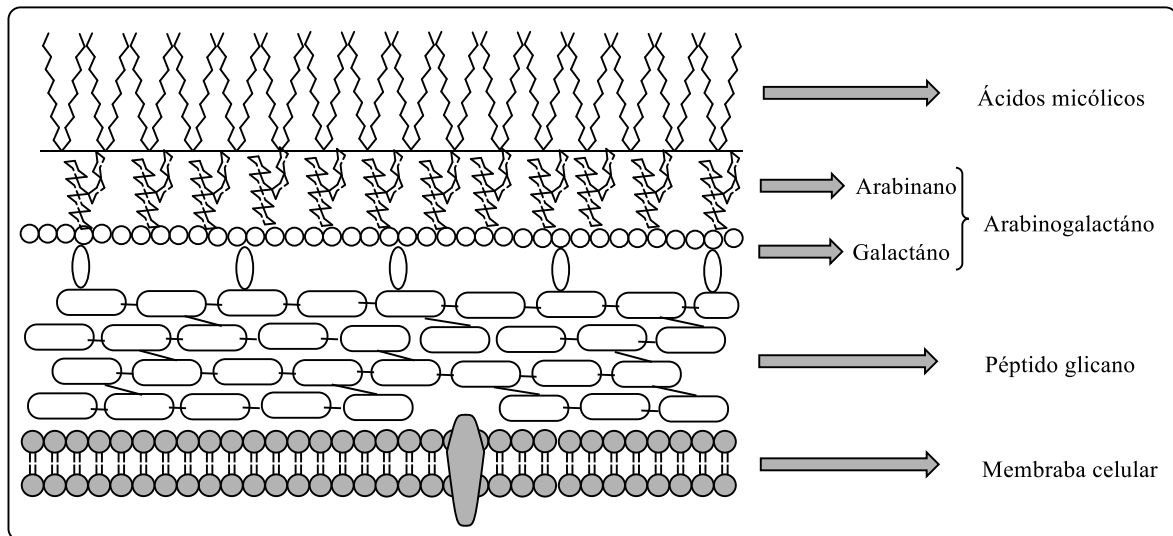


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*.

Esta barrera le es indispensable para subsistir ya que le confiere ciertas características especiales, como: el ser capaz de resistir frío, congelación y desecación, así mismo los aísla de ambientes hostiles y dificulta la entrada de fármacos antifímicos; con esto sobrevive durante semanas en materiales como alfombras, cadáveres, abonos, papel o ropa, o bien formando parte del polvo; durante meses en lugares frescos y oscuros. Por otro lado, es muy sensible al calor, a la luz solar y ultravioleta [5].

Este bacilo infecta principalmente a los pulmones, aunque puede progresar y propagarse a otras partes del cuerpo: al sistema nervioso central, sistema linfático y sistema circulatorio; solo por mencionar algunos, conociéndose en estos casos como tuberculosis extrapulmonar.

La tuberculosis pulmonar (la más común) usa la vía aérea como mecanismo principal de transmisión, contagiándose de persona a persona cuando el enfermo tose, estornuda o escupe de alguna manera, expulsando bacilos al aire que son inhalados por alguien más. Esta infección produce una sintomatología típica como: dolor torácico, tos severa y persistente con expectoraciones, acompañadas de sangre, pérdida de peso, fatiga, fiebre, escalofríos y sudores nocturnos; de no tratarse adecuadamente puede causar la muerte del paciente [4–6].

La replicación lenta del bacilo y respuesta inmune tardía ocasiona que generalmente se presenten estos síntomas varias semanas o meses después de que la infección activa está bastante avanzada, ocasionando que los pacientes tarden en buscar atención médica, pudiendo contagiar a otros, haciéndola aún más peligrosa ya que puede ser capaz de diseminarse de manera desapercibida entre la población y dificultando su erradicación [1, 2, 5].

1.1.1 Problemática Mundial

Datos de la OMS en el 2019 revelaron que esta infección es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y la primera en enfermedades infecciosas, aún por encima de personas enfermas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ocasionando que aproximadamente mueran 4,000 personas y 30,000 contraigan la enfermedad cada día [7, 8, 10].

Se estima que un cuarto de la población mundial se encuentra infectada de tuberculosis; sin embargo, su diagnóstico es difícil siendo detectada frecuentemente después de que se presentan los síntomas (5-10 % de los infectados) [9, 10].

En 2018, se registraron alrededor de 10 millones de casos de TB, siendo esta enfermedad una de las más mortales en el mundo, causando la defunción de aproximadamente 1.6 millones de personas (16 %). Afectando principalmente a pacientes enfermos con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) generando un estimado de 251,000 muertes adicionales [6, 11] por lo que con esta comorbilidad es 20 veces más probable enfermar y morir que un paciente VIH negativo [10, 11]. Por otro lado, en México, el año pasado se registraron más de 16,400 nuevos casos de tuberculosis siendo Nuevo León uno de los estados más afectados [6, 12].

Cuando un paciente inmunocompetente es infectado de TB, su sistema inmunológico se activa logrando contener a los bacilos en granulomas, los cuales son una masa de tejido celular cicatrizante de células gigantes, células T, células B y fibroblastos que rodean macrófagos y células infectadas.

Este mecanismo no logra destruir la infección ya que el bacilo tiene la capacidad de permanecer latente incluso por años dentro del huésped [13, 14].

Aun así, cuando los pacientes infectados por TB son asintomáticos y no pueden transmitir la enfermedad a otros, es probable desarrollarla en algún momento de sus vidas participando *M. tuberculosis* como un agente oportunista; especialmente cuando el sistema inmunológico del huésped se ve comprometido por otros padecimientos como SIDA, cáncer, diabetes, enfermedades pulmonares crónicas o por alguna enfermedad que por sí sola o por tratamiento farmacológico debiliten el sistema inmunológico. Así mismo, si el afectado se encuentra en algún grupo de riesgo, por ejemplo, personas con desnutrición severa, alcoholismo, problemas de drogadicción, fumadores, personas en situación de calle y/o personal de salud [15].

La tuberculosis multifarmacoresistente generada principalmente por el abandono del tratamiento farmacológico o desapego estricto del mismo, supone una crisis de salud pública ya que es una de las causas más importantes por las cuales los pacientes mueren, amenazando la seguridad sanitaria, el éxito de la lucha contra esta enfermedad y su erradicación completa para el año 2030, la OMS estima que hubo cerca de 484,000 nuevos casos resistentes a rifampicina (fármaco más activo) [11,14].

Las cifras son realmente alarmantes y existen diversos factores que han retrasado el cumplimiento exitoso del objetivo planteado por la OMS para el 2030:

- Desconocimiento de la patogenicidad, vías de contagio y prevención por parte de la población en general.
- Pobreza y falta de información principalmente en países en vía de desarrollo.
- Falta de infraestructura y profesionales de la salud para una detección oportuna.
- Tratamientos actuales ineficientes e insuficientes aunado a la mutagenicidad del bacilo y aparición de farmacoresistencia.
- Toxicidad de los fármacos actuales.

Aun así, es una enfermedad completamente prevenible y curable, pudiéndose evitar la muerte de los pacientes si son tratados de una manera efectiva y oportuna.

La tuberculosis no solo afecta a nivel salud, sino que deja consecuencias sociales y económicas puesto que los pacientes y sus familiares tienen que gastar en caros tratamientos por tiempo prolongado por lo que se necesitan desarrollar nuevos tratamientos más eficientes y menos tóxicos que los tratamientos actuales, para hacerle frente y cortar la cadena de transmisión [16].

1.1.2 Diagnóstico y Tratamiento anti-TB

Para un diagnóstico oportuno y efectivo de la tuberculosis se necesita realizar ciertos exámenes de laboratorio que puedan sugerir una TB activa o latente, la más común es la baciloscopía mediante la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen, técnica diferencial rápida y económica, usada para la identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR). También se puede hacer un sembrado en placa o tubo y/o detección por PCR siendo esta técnica más fiable y determinante [17].

Otra técnica utilizada es la tuberculina o prueba cutánea de derivado proteico purificado (PPD, por sus siglas en inglés), que nos indica si nuestro sistema inmune ha entrado alguna vez en contacto con el bacilo tuberculoso; es decir, si tenemos “memoria inmunológica” [17].

La OMS recomienda efectuar la prueba de la tuberculina o un análisis de liberación de interferón gamma (IGRA, por sus siglas en inglés) para detectar la infección por TB en cualquier paciente sospechoso o en algún grupo de riesgo, aunque no es necesaria antes de iniciar el tratamiento preventivo de la TB en personas con VIH y en niños menores de cinco años que estén en contacto con personas enfermas de TB activa. Ambas pruebas son útiles para detectar a las personas que tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento preventivo de la TB [18].

Así mismo, recomienda nuevas y más cortas opciones de tratamiento profiláctico contra TB latente además de los esquemas ya existentes, como: administración diaria de isoniacida durante seis meses; rifapentina con isoniacida durante un mes; rifapentina semanal en combinación con isoniacida durante tres meses; rifampicina e isoniacida diaria durante tres meses o rifampicina diaria durante cuatro meses.

El tratamiento farmacológico inicial de la TB activa, incluye tres de los fármacos más eficientes y con duración aproximada de seis meses. Dos meses con rifampicina, isoniacida y pirazinamida, sin embargo, se aconseja asociar un cuarto fármaco como el etambutol, debido a la resistencia inicial generada por el bacilo. Después se cambia el tratamiento a cuatro meses con rifampicina e isoniacida pudiéndose alargar hasta 10 meses [18].

Estas dos fases de tratamiento primario son bien toleradas y de baja toxicidad indicándose contra TB sensible y teniendo una eficacia cercana al 100 % en caso de un cumplimiento total del tratamiento [19].

Los pacientes con VIH están en riesgo de contraer TB por lo que necesitan tratamiento preventivo, el cual actúa de forma sinérgica con la terapia antirretroviral, sin embargo, existen interacciones con la rifampicina. Este fármaco es un fuerte inductor del citocromo P450 y acelera el metabolismo de muchos fármacos, disminuyendo así su efectividad. Por lo que es necesario modificar los esquemas establecidos para este tipo de pacientes [20].

En caso de presentar algún grado de farmacorresistencia o intolerancias graves a algún fármaco de primera línea, es necesario aumentar la dosis y prolongar por más tiempo los tratamientos o usar fármacos más “agresivos” modificando el tratamiento por alguno o varios de segunda línea, los que se incluyen agentes inyectables, fluoroquinolonas o agentes bacteriostáticos del grupo 4 y el grupo 5 en casos extremos (Tabla 2).

Los tratamientos con este tipo de fármacos conllevan a más efectos adversos al ser menos tolerables y también menos efectivos; que si bien logran curar, pueden provocar daño hepático o renal aunado a la afectación al aparato digestivo o la piel; además de ser de mayor costo que los de primera línea [20–22].

1.2 Fármacos antituberculosos

Los fármacos disponibles en el mercado se pueden clasificar de manera general como fármacos de primera y segunda línea [23]. Oficialmente se dividen en cinco grupos (Tabla 2) que cada uno cuentan con protocolos establecidos para su correcta administración [18, 19].

Tabla 2. Fármacos anti-TB.

Grupo	Grupo terapéutico	Fármacos
1	Primera línea	Isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol.
2	Inyectables	Estreptomina, kanamicina, capreomicina, etc.
3	Fluoroquinolonas	Ofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, etc.
4	Segunda línea	Cicloserina, etionamida, ácido <i>p</i> -amino salicílico, etc.
5	Mecanismo poco claro	Linezolid, amoxicilina, tiacetazona, claritromicina, etc.

Estos fármacos presentan cierta toxicidad y efectos adversos, principalmente los de segunda línea que son los más utilizados bajo esquemas contra tuberculosis farmacorresistente con el fin de atacar el bacilo por diferentes frentes para lograr contenerla. Entre más resistente sea el bacilo a estos fármacos más difícil será su eliminación y mayor será el riesgo de que se presenten efectos adversos por el tiempo prolongado y la baja selectividad contra TB [21].

La tuberculosis multifarmacoresistente (MDR, por sus siglas en inglés) es causada cuando el bacilo es resistente al menos a dos medicamentos, isoniacida y rifampicina, que son los más activos para el tratamiento de esa enfermedad.

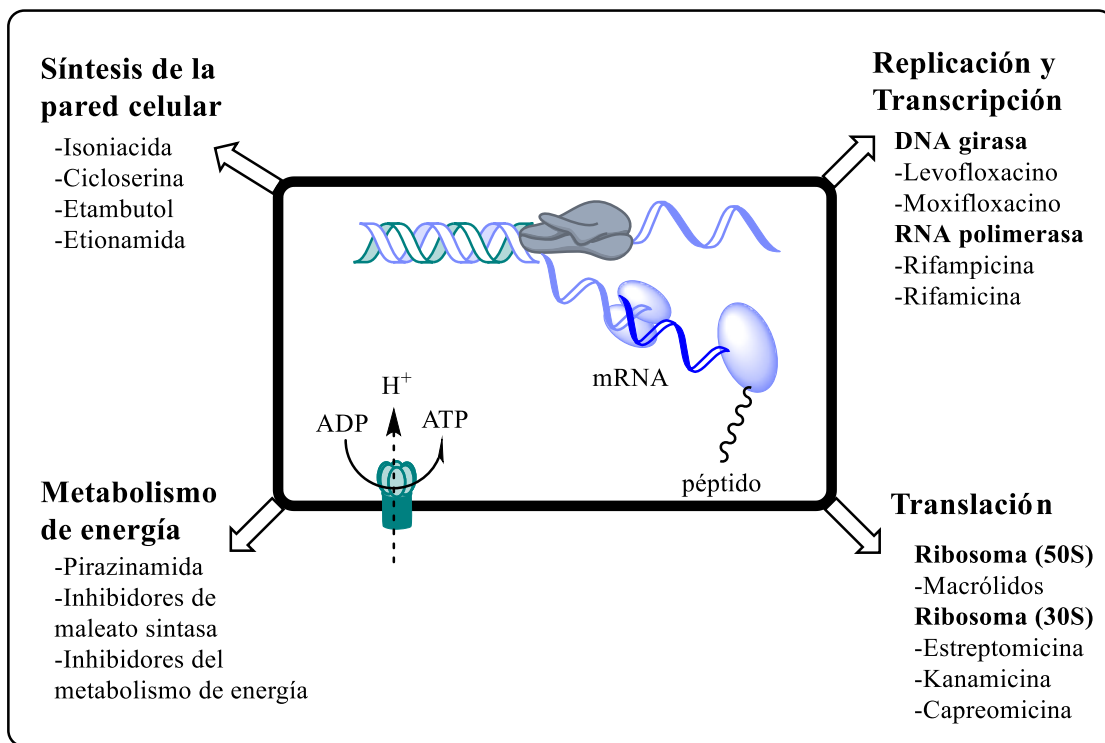
En caso de presentar tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB, por sus siglas en inglés) que es un tipo poco común de MDR -TB, resistente a la isoniacida y rifampicina, así como a todas las fluoroquinolonas y por lo menos a uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea, se usan fármacos de grupo 4 y 5 con el riesgo de que el paciente no obtenga una terapéutica efectiva [12].

1.2.1 Mecanismo de acción de los fármacos

Los medicamentos empleados para la enfermedad, atacan diversas dianas terapéuticas en la micobacteria, principalmente la síntesis de componentes en la pared celular como por ejemplo ácidos micólicos, arabinogalactanos o péptidos,

entre estos se encuentran la isoniacida, pirazinamida y etambutol, fármacos de primera línea [12, 23, 24].

Otro de los sitios blanco más atacados es la replicación y transcripción de material genético para su correcta reproducción y síntesis de componentes esenciales para su supervivencia. Entre los fármacos que usan esa vía se encuentran las fluoroquinolonas y rifamicinas. Otros fármacos afectan la transcripción del material genético mediante la inhibición de los ribosomas como lo son los fármacos del grupo 2; como está resumido en el Esquema 1.



Esquema 1. Mecanismos de acción de los fármacos anti-TB.

1.3 Tendencia en investigación

Como ya hemos visto, la prioridad para tratar de erradicar esta enfermedad es muy importante debido a la patogenicidad del bacilo y mortalidad que ocasiona.

La síntesis de nuevas moléculas con actividad anti-TB es esencial para poder hacerle frente a la enfermedad y combatir la infección de una manera más rápida, segura y eficiente que las terapias ya existentes.

Las oxazolininas y oxazoles constituyen buenas alternativas de investigación, puesto que, aunado a su relevante actividad anti-TB [25–27], logran tener una buena respuesta ante células sanas sin dañarlas presentando baja toxicidad en comparación con fármacos de referencia (isoniacida y levofloxacino). Incluso, el tener este tipo de moléculas con sistemas α,β -insaturados, Figura 3, mejoran la actividad contra cepas de *M. tuberculosis* en comparación con otras moléculas en investigación [25, 28].

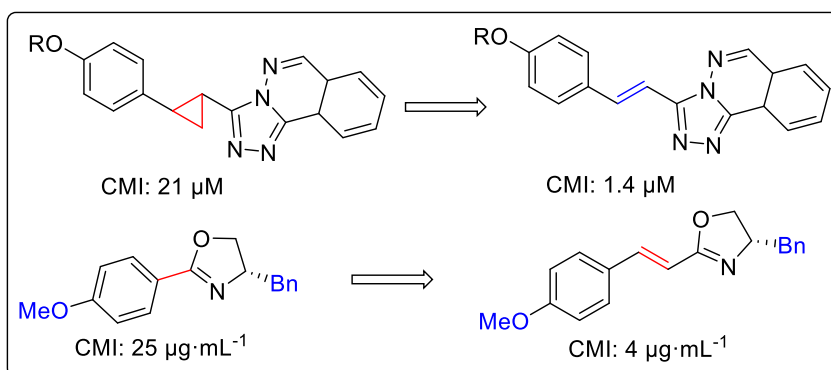


Figura 3. Relación de la estructura química-actividad antituberculosa.

Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto se ha centrado en desarrollar una serie de nuevas acrilamidas y oxazolininas, Figura 4, derivadas de ácidos cinámicos y aminoácidos, evaluar la actividad antituberculosa *in vitro* y determinar su citotoxicidad mediante las técnicas colorimétricas Alamar Azul y WST-1 respectivamente.

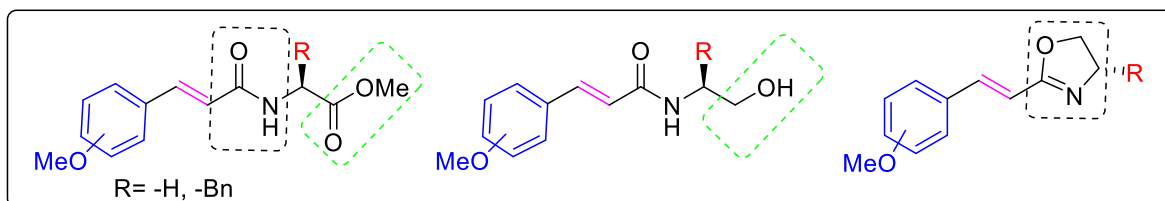


Figura 4. Diseño racional y sitios de interés molecular.

CAPÍTULO 2

2 Antecedentes

2.1 Antecedentes

En los últimos años ha sido mayor la investigación de compuestos más eficientes para tratar la tuberculosis. Dentro del grupo de investigación se planeó sintetizar y evaluar acrilamidas y sus respectivas oxazolininas para el mismo fin, he aquí algunas de las investigaciones consultadas:

2.1.1 Síntesis de acrilamidas

La síntesis de compuestos con potencial actividad anti-TB es de suma importancia como ya se mencionó, para encontrar fármacos efectivos y que disminuyan los efectos adversos en los pacientes. Las acrilamidas presentan la ventaja de una baja toxicidad para células sanas en estudios previos [27, 28].

En 2006, Hernández-Fernández *et al.* reportaron la síntesis de sistemas insaturados a partir de fosfonamidas y una variedad de aldehídos vía la reacción Horner-Wadsworth-Emmons (HWE), siguiendo la reacción de la Figura 5; reportando resultados de entre 90-96 % de rendimiento, atribuido principalmente a la selectividad generada debido al uso de aldehídos alifáticos y aromáticos, observando que cuando se utilizan estos últimos se obtiene una selectividad por el isómero *trans* 98:2 con respecto al isómero *cis*, información también reportada por Ordoñez *et al.* en 2007 [29, 30].

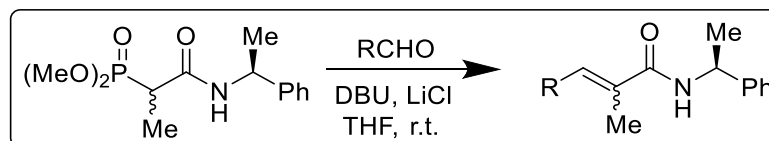


Figura 5. Síntesis de acrilamidas. Adaptada de Hernández-Fernández *et al.* 2006.

2.1.2 Síntesis de oxazolinas

En 2014 Avalos-Alanís *et al.* describieron la síntesis de diversos derivados de oxazolinas y amidas α,β -insaturadas partiendo del ácido fosfonoacético y aminoalcoholes para formar las correspondientes fosfohidroxiamidas, las cuales son usadas como precursores para la obtención de oxazolinas α,β -insaturadas mediante la reacción HWE, con buenos rendimientos (53 a 94 %), Figura 6 [31].

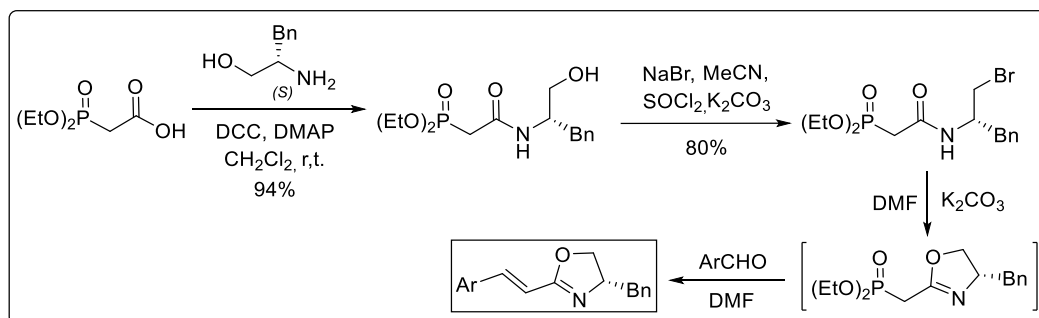


Figura 6. Ruta de síntesis de oxazolinas. Adaptada de Avalos-Alanís *et al.* 2014.

Por otro lado, Glöckner *et al.* en 2015 investigaron la síntesis de oxazolinas y respectivos oxazoles a partir de β -hidroxiamidas, utilizando el reactivo de fluoración Deoxo-Flúor[®] en diclorometano a temperatura ambiente, seguido de una reacción de oxidación con DBU y BrCCl₃, condiciones reportadas por D. Williams *et al.* en el año de 1997 [32]. Lo destacado de esta investigación es la importancia de este tipo de moléculas y el mecanismo en flujo continuo que reportan para su potencial escalado a nivel industrial. Dicho método presenta buenos rendimientos de reacción de hasta un 98 %. Reportaron que un ligero exceso de Deoxo-Flúor[®] junto a una correcta dosificación ayudaba a no tener subproductos y a no utilizar temperaturas muy bajas, Figura 7 [33].

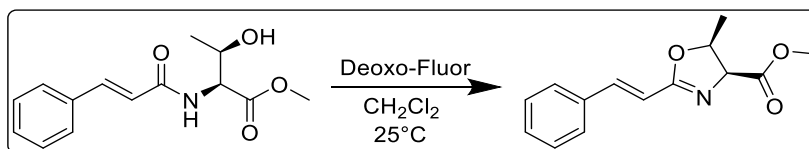


Figura 7. Síntesis de oxazolinas usando Deoxo-Flúor[®]. Adaptada de Glöckner *et al.* 2015.

2.1.3 Actividad antituberculosa y citotóxica

En los últimos años ha surgido el interés por estudiar y desarrollar moléculas heterocíclicas, ya que se les han reconocido diversas propiedades biológicas

importantes, dentro de las que destacan antiinflamatorias [34], analgésicas [34], antifúngicas [35], anticancerígenas [36], antibacterianas [37] y antituberculosos [38], entre muchas otras [39–42].

Las oxazolininas, en las que se enfoca este proyecto presentan relevante actividad antituberculosa, por lo que se publicaron diversos artículos en los que se evalúa la estructura-actividad para determinar que grupos influyen notablemente [25, 27, 43].

Moraski *et al.* reportaron en 2010 una amplia gama de oxazolininas y oxazoles bencil ésteres, evaluando su citotoxicidad (IC_{50}) y actividad anti-TB (CMI). Ellos sugieren una ruta de síntesis partiendo de β -hidroxiamidas y aminoácidos (serina y treonina), evaluándolos ante la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. El estudio de la estructura-actividad se realizó haciendo cambios en las porciones de la cabeza y cola de la molécula, para su posterior evaluación biológica, Figura 8 [25].

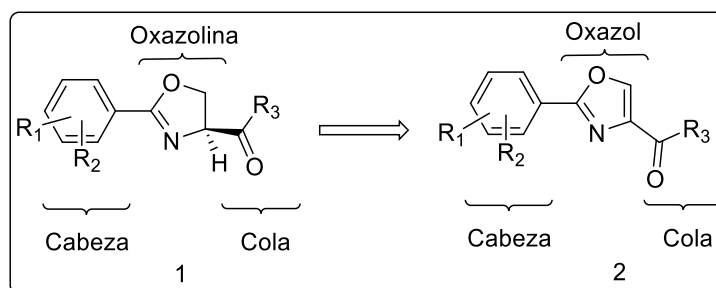


Figura 8. Heterociclos derivados de dideoximicobactim. Adaptada de Moraski *et al.* 2010.

Se reportó que la presencia, posición y tipo de sustituyente en el grupo fenilo afecta en gran manera la actividad antituberculosa, haciendo notar que el incluir grupos electroattractores, mejoran considerablemente la actividad anti-TB [25].

Moraski *et al.* dándole continuidad a su trabajo reporta en el año 2012, el análisis de relación estructura-actividad de los derivados de 10 moléculas heterocíclicas, entre ellas oxazolininas, oxazoles, tiazolininas, tiazoles, isoxazoles e imidazopiridinas, destacando estos últimos heterociclos con mayor actividad; sin embargo, se hace énfasis en las oxazolininas y oxazoles ya que presentan una relevante actividad y una baja citotoxicidad ante la línea celular de crecimiento normal (VERO) [38].

Aunado a estas pruebas, se les practicó una evaluación *in vivo* encontrando que las oxazolinas y oxazoles presentaron una estabilidad metabólica mayor que los otros heterociclos estudiados. Por lo que los autores concluyen que los compuestos heterocíclicos podrían ser un objetivo de mayor estudio, diversificando la estructura molecular y determinando una más amplia relación estructura-actividad [38].

En 2011, Baltas *et al.* compararon la actividad antituberculosa de compuestos heterocíclicos y derivados de ácidos cinámicos *para*-sustituídos. Primeramente, se utilizaron dos vías de síntesis para los compuestos insaturados, una vía la reacción HWE como se muestra a continuación en la Figura 9. Posteriormente se hidrolizaron los ésteres obtenidos para conseguir los ácidos correspondientes, que les fueron de utilidad para los demás pasos de síntesis [44].

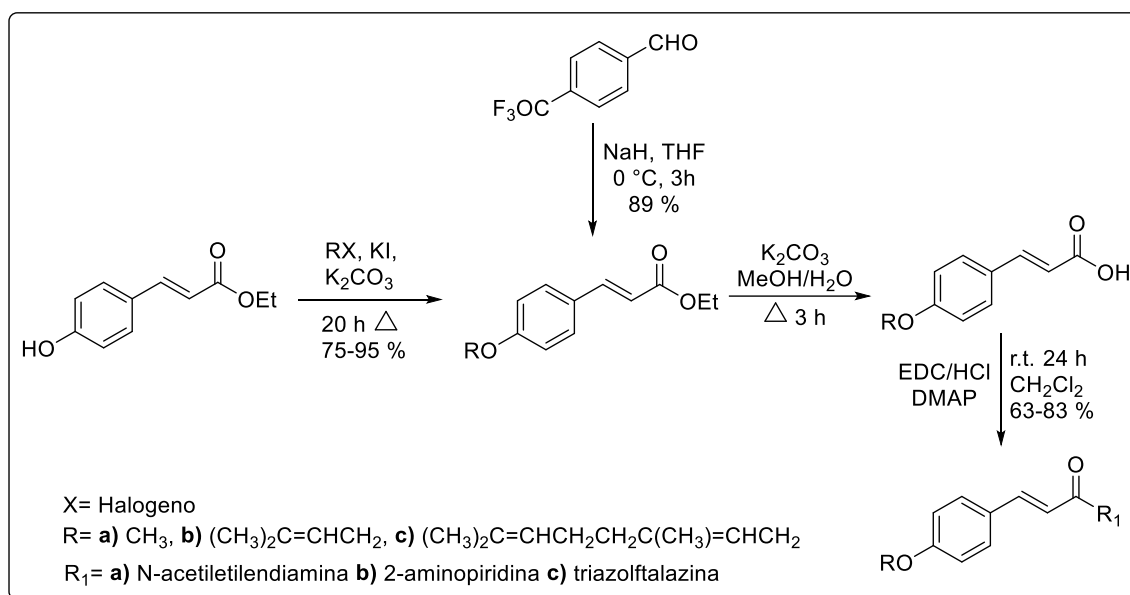


Figura 9. Metodología general para la síntesis de derivados de ácido cinámico.

Se demostró con esto la importancia de tener un doble enlace en configuración *trans*, Figura 10, pues los autores destacan una reducción significativa de la actividad anti-TB de los derivados, al sustituir el doble enlace por un ciclopropilo, isómero de este grupo [44].

Aunado también a esto la lipofilicidad de los compuestos es una consideración importante para el diseño de nuevos fármacos, aspecto que se reforzó con las oxazolinas reportadas con anterioridad por Moraski *et al.*, donde el grupo metil y bencil éster varió, conduciendo a una mejora en la actividad con el éster bencílico, puesto que le resulta más fácil atravesar la gruesa pared celular del bacilo [25, 38].

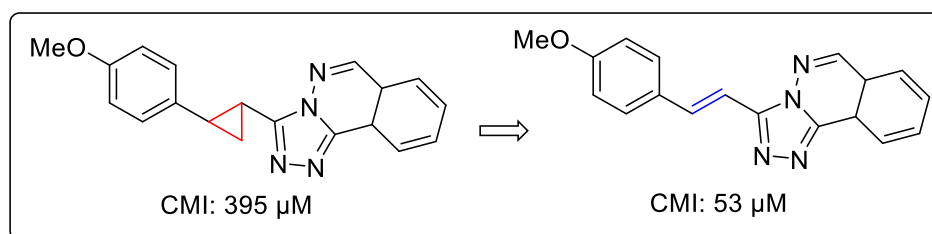


Figura 10. Importancia en la insaturación presente en la molécula.

La actividad anti-TB de los compuestos fueron evaluados contra la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv mediante la técnica colorimétrica con bromuro difeniltetrazolio (MTT), arrojando concentraciones mínimas inhibitorias considerablemente mejores en los compuestos insaturados como se aprecia en los ejemplos presentados en la Tabla 3 [44].

Tabla 3. Actividad anti-TB de los derivados de ácidos cinámicos.

Compuesto	Sustituyente aromático	*cLog P (I/C)	CMI (µM) H37Rv	
			Insaturación	Ciclopropilo
1	Metilo	3.20/2.63	53	395
2	Etilo	3.73/3.16	39	378
3	Isopentilo	4.91/4.33	1.4	21
4	Geranilo	6.94/6.36	19	28

*cLogP=Índice de lipofilicidad calculado (usando ChemDraw Professional 17.0)

Años más tarde en 2014 de Souza *et al.* reportó de manera similar la síntesis de oxazolinas aril-sustituidas, siguiendo la reacción de la Figura 11. Mediante un estudio de relación estructura-actividad se corroboró que los compuestos que presentaron mayor actividad fueron los aril-*para* sustituidos con grupos electrodonadores en comparación con sus análogos sustituidos en *orto* y *meta*; aunado a esto, se presentó una considerable mejora de la actividad con grupos bencílicos unidos a la oxazolina (grupos R1), esto asociado a su hidrofobicidad y

efecto estérico. Dichas estructuras presentaron una CMI=25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ también con grupos metoxilos o hidrógeno en los grupos R. Por otro lado, los grupos fenilos enlazados a la oxazolina presentaron una baja considerable en su actividad anti-TB así como una toxicidad moderada; por el contrario las demás moléculas no presentaron citotoxicidad [43].

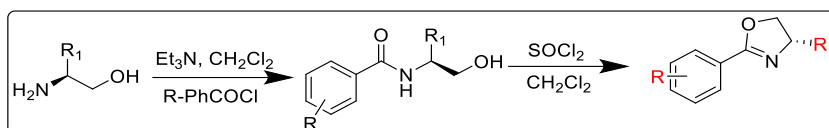


Figura 11. Síntesis de oxazolin-2-aryl sustituidas. Adaptada de Souza et al., 2014.

En el año 2017 Ávalos-Alanís *et al.* reportaron la síntesis y evaluación antimicobacteriana y citotóxica de compuestos de tipo amidas α , β -insaturadas y sus respectivas oxazolininas, estas sintetizadas mediante una *O*-alquilación a partir de las amidas insaturadas, Figura 12. Las oxazolininas mostraron una gran actividad anti-TB para la cepa sensible, en específico las sustituidas con grupos metoxi, y tiofenilo, presentando una actividad muy prometedora también para cepas farmacorresistentes dado a que presentaron mejor actividad que la isoniacida, etambutol, rifampicina y muy similar a levofloxacino (CMI: 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Respecto a la evaluación citotóxica de estos compuestos se encontró que ninguno de estos presentaba hepatotoxicidad puesto que, en los ensayos en rebanadas de hígado de rata, la morfología de las células no se vio alterada. Por lo que se ratificó que las oxazolininas presentan una potencial aplicación como nuevos fármacos. Al estudiar sus precursores (hidroxiamidas α,β -insaturada), se indicó que la posición de los sustituyentes (*p*-sustituidos, F, Cl y OMe) influyen en la respuesta ante la cepa sensible de *M. tuberculosis* mostrando CMI similares a las reportadas por etambutol (CMI: 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) [28].

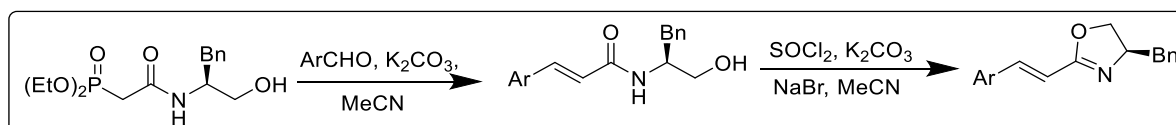


Figura 12. Síntesis de oxazolininas α,β -aryl sustituidas. Adaptada de Avalos et al., 2017.

Recientemente en 2019 Aguirre-Rentería *et al.* realizaron estudios previos con oxazolininas y oxazoles α,β -insaturados derivados de la L-serina (**5** y **6a-d**

respectivamente), Figura 13, evaluándolos contra la cepa sensible H37Rv y un aislado clínico resistente a fármacos de primera línea, Tabla 4 [45].

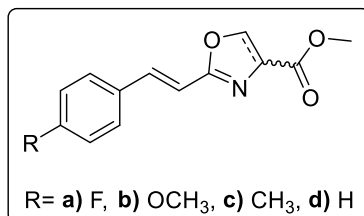


Figura 13. Oxazolininas y oxazoles α,β -insaturadas.

Tabla 4. Actividad anti-TB de oxazolininas y oxazoles.

Compuesto	Log P	<i>M. tuberculosis</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
		H37Rv	G-122
5a	2.25	12.5	25.0
5b	1.97	6.25	12.5
5c	2.58	6.25	12.5
5d	2.09	12.5	12.5
6a	2.65	3.125	12.5
6b	2.36	6.25	12.5
6c	2.98	0.781	6.25
6d	2.49	12.5	12.5
Etambutol	0.06	3.125	12.5
Levofloxacin	1.35	0.195	0.195

En general se percibe una relevante actividad contra las cepas de tuberculosis respecto a los fármacos antituberculosos empleados, presentando actividades anti-TB variables con valores que van de 12.5 a 0.781 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ siendo el compuesto más activo el oxazol **6c**.

Con base en los antecedentes y literatura consultada se encontró que los compuestos heterocíclicos presentan una prometedora actividad inhibitoria del bacilo de Koch tanto sensible como resistente a los fármacos de primera línea incluso igualando y en algunos casos superando la seguridad y actividad de estos antifímicos.

Particularmente, las oxazolininas en muchos de los estudios presentados son considerados como buenos candidatos para el tratamiento de la tuberculosis,

principalmente por la seguridad (baja citotoxicidad) y una alta actividad antituberculosa, reforzando lo mencionado en el párrafo anterior.

Con respecto a la obtención de este tipo de compuestos se reportan en la literatura múltiples rutas de síntesis tanto de acrilamidas como de oxazolininas insaturadas.

Visto de una manera proyectada a futuro, este tipo de compuestos podrían escalarse a nivel industrial dado a que se encuentra reportado que se pueden llevar dichas reacciones a temperatura ambiente en flujo continuo, obteniendo excelentes rendimientos de reacción [33].

De acuerdo a los reportes encontrados, es notorio observar la importancia de tener la base heterocíclica (oxazolinas u algún otro derivado), para mantener la actividad antituberculosa; sin embargo, se describe también la importancia de los sustituyentes aromáticos *p*-sustituidos (grupos formadores de puentes de hidrógeno) en posición 2 los cuales se recomienda estén separados por un doble enlace con respecto a la oxazolinas, mientras que en posición 5 existen gran variedad de sustituyentes desde porciones hidrofílicas hasta lipofílicas, destacando en esta posición la presencia de un grupo bencilo, modificaciones estructurales que favorecen la actividad antituberculosa, aumentando la seguridad y disminuyendo sus CMI.

Por otro lado, respecto a las acrilamidas y moléculas de β -hidroxiacrilamidas insaturadas no se encuentran muchos estudios para su efecto antituberculoso y citotóxico por lo que se planteó como un área de oportunidad para explorar dichas estructuras y buscar la relación estructura-actividad biológica entre acrilamidas y oxazolininas.

CAPÍTULO 3

3 Justificación

3.1 Justificación

La tuberculosis es una infección bacteriana con alto índice de transmisión, la cual se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial, dado a las características del agente infeccioso y su susceptibilidad a generar farmacoresistencia. Si ésta es mal tratada puede ocasionar la muerte del individuo; por lo que se trabaja año con año en la lucha por su control y erradicación completa. Los fármacos actuales presentan una buena actividad anti-TB, pero algunos son citotóxicos o presentan toxicidad debido a los largos tratamientos y dosis altas.

Por lo anterior, resulta de gran importancia el desarrollo de nuevos fármacos que presenten mejor actividad anti-TB y menor citotoxicidad. En estudios recientes, los compuestos heterocíclicos principalmente de la familia de las oxazolininas prometen ser potencialmente más activos y con menor citotoxicidad que fármacos anti-TB de primera línea (isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol).

Es por lo que en este proyecto se propone desarrollar la síntesis de nuevas acrilamidas y oxazolininas para su posible aplicación como fármacos anti-TB. Se espera con esto incrementar la actividad antituberculosa y disminuir la toxicidad en células sanas de crecimiento normal.

3.2 Hipótesis

Las nuevas acrilamidas y oxazolininas metoxiaril sustituidas presentan una mejor actividad antituberculosa *in vitro*, así como una menor citotoxicidad respecto a los fármacos de referencia rifampicina, etambutol y levofloxacino.

3.3 Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nuevas acrilamidas y oxazolinias metoxiaril sustituidas, evaluar su citotoxicidad en células VERO y su actividad antituberculosa *in vitro*, ante una cepa sensible (H37Rv) y una farmacorresistente (G-122).

3.4 Objetivos Específicos

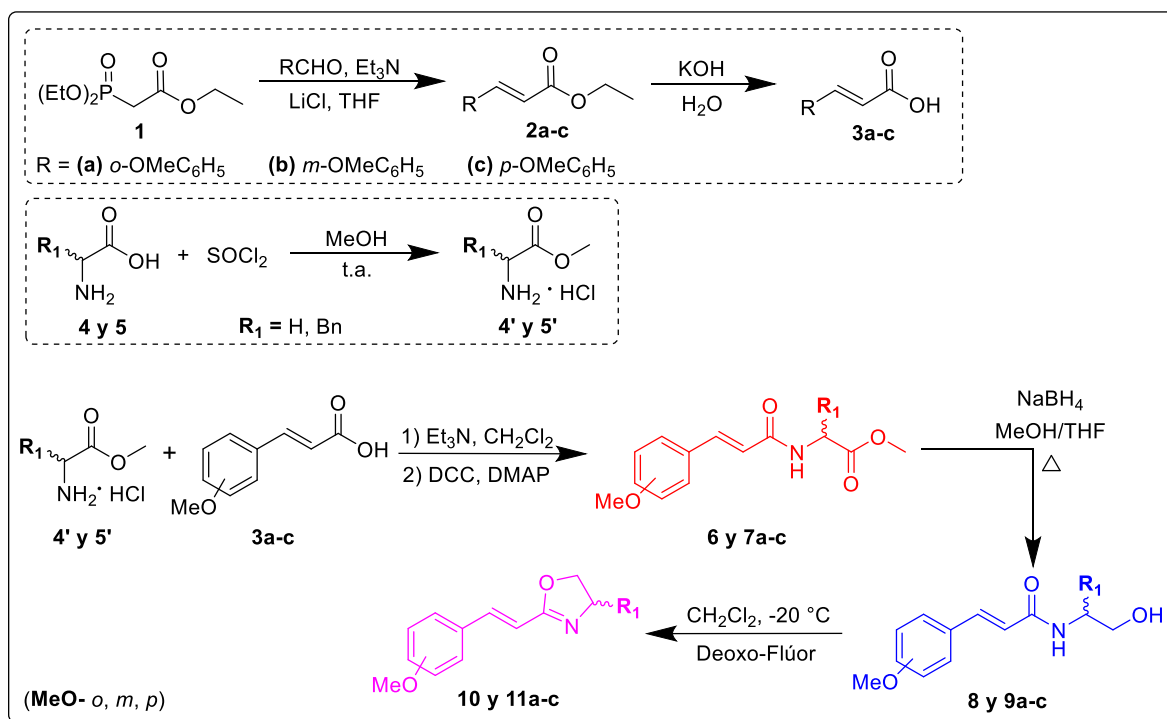
- ✓ Sintetizar nuevas acrilamidas y oxazolinias metoxiaril sustituidas.
- ✓ Purificar los compuestos obtenidos mediante cromatografía en columna.
- ✓ Caracterizar los derivados obtenidos de acrilamidas y oxazolinias mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono trece (RMN ^1H y ^{13}C).
- ✓ Evaluar la actividad antituberculosa *in vitro* de los compuestos ante una cepa sensible (H37Rv) y una farmacorresistente.
- ✓ Determinar su citotoxicidad en la línea celular VERO (riñón de mono verde).

CAPÍTULO 4

4 Materiales y Métodos

4.1 Metodología Sintética

Con base en los antecedentes y a los estudios realizados previamente en el grupo de investigación, se decidió implementar la siguiente ruta de síntesis para la preparación de las respectivas acrilamidas, β -hidroxiacrilamidas y oxazolinas metoxiaril sustituidas; se partió de los derivados de ácidos cinámicos **3 a-c** obtenidos comercialmente; y los aminoácidos glicina y L-fenilalanina para formar los ésteres **4 y 5**; pensando en primera instancia comenzar la síntesis con trietilfosonoacetato **1** por la facilidad de síntesis de los compuestos (Esquema 2).



Esquema 2. Ruta general de síntesis de acrilamidas y oxazolinas metoxiaril sustituidas.

4.1.1 Generalidades

La síntesis química de los compuestos se realizó en el Laboratorio de Química Farmacéutica ubicado en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

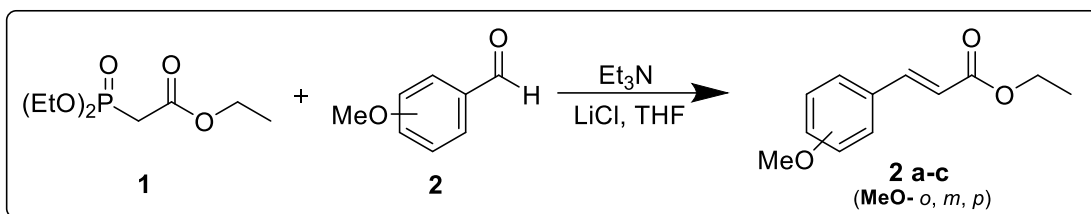
El material de vidrio, planchas de agitación, soportes, pinzas, tapones y demás material para los experimentos realizados, se tuvieron bajo las condiciones de limpieza adecuada, libres de polvo y humedad. Toda materia prima y solventes necesarios fueron adquiridos de Sigma-Aldrich por diversos distribuidores en grado reactivo.

Las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina con gel de sílice y usando como fase móvil mezcla de solventes (hexano, acetato de etilo y metanol), revelando con luz ultravioleta o yodo. Una vez que se obtuvo la mezcla del crudo de la reacción con el producto de interés, se llevó a cabo la purificación por cromatografía en columna utilizando gel de sílice con poro de 60 Å.

Se destiló al vacío las fases de interés mediante rotaevaporación; los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher-Johns. Los compuestos puros se caracterizaron mediante las técnicas espectrométricas, RMN ^1H y ^{13}C .

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , se obtuvieron en un equipo Bruker BioSpin de 400 MHz y 101 MHz respectivamente en el departamento de Química Analítica ubicado en la Facultad de Medicina de la UANL. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en los espectros como partes por millón (ppm) respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS) para ^1H ; las constantes de acoplamiento (J) están en Hertz (Hz) y la multiplicidad de las señales abreviadas como: *s* señal simple, *d* señal doble, *dd* señal doble de dobles, *t* señal triple, *dt* señal doble de triples, *q* señal cuádruple, *dc* señal doble de cuartetos y *m* para una señal múltiple. Los disolventes deuterados empleados fueron CDCl_3 y CD_3OD . La numeración presentada en la caracterización de los compuestos fue designada de manera arbitraria para la identificación de los protones y carbonos presentes en la molécula, siendo esta independiente a la numeración determinada en la nomenclatura según IUPAC.

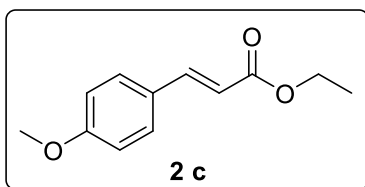
4.1.2 Procedimiento general para la síntesis de los ésteres cinámicos



Esquema 3. Reacción de síntesis de los ésteres cinámicos **2a-c**.

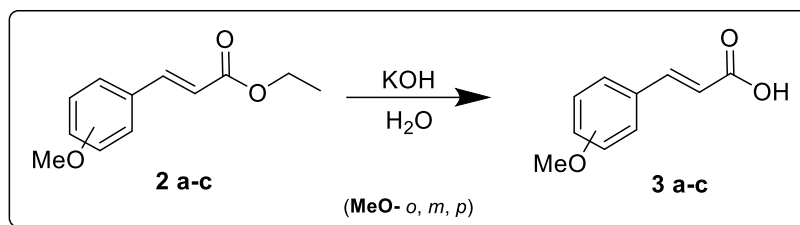
La síntesis de los acrilésteres **2a-c**, se llevó a cabo mediante la reacción presentada en el Esquema 3. En un matraz bola de 100 mL con tetrahidrofurano (THF) como disolvente, se añadieron 1.2 equivalentes (Eq) de cloruro de litio (LiCl). En seguida se adicionó 1.0 Eq de trietilfosfonoacetato (TEFA) **1** y 3.6 Eq de trietilamina (Et_3N) haciéndolo reaccionar con los *orto*, *meta* y *para* anisaldehídos, 0.8 Eq respectivamente; condiciones reportadas y adecuadas para realizar la reacción Horner-Wadsworth-Emmons [42]. El matraz se colocó en un baño de sonicación durante 40 min. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el solvente a vacío y se adicionó agua para lavar con acetato de etilo ($\text{AcOEt}:\text{H}_2\text{O}$); se separaron las fases, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), se filtró y evaporó a presión reducida; finalmente se purificó por cromatografía en columna.

4.1.2.1 Síntesis del éster (*E*)-3-(4-metoxifenil)acrilato de etilo **2c**



Siguiendo el procedimiento general se agregaron 20 mL de THF, 1.2 Eq (0.0567 g) de LiCl, 1.0 Eq (0.22 mL) de trietilfosfonoacetato **1** y 2.4 Eq (0.37 mL) de Et_3N con 0.8 Eq (0.11 mL) de *p*-anisaldehído. Se monitoreó el avance de la reacción mediante cromatografía en capa fina y después del tiempo de reacción se realizaron extracciones con $\text{AcOEt}:\text{H}_2\text{O}$. Finalmente, se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema de elución hexano:acetato de etilo en proporción 7:3.

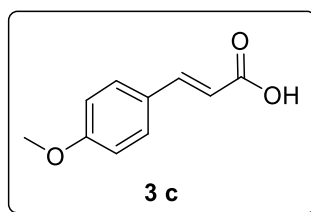
4.1.3 Procedimiento general para la síntesis de los ácidos cinámicos



Esquema 4. Reacción de síntesis de los ácidos cinámicos **3a-c**.

Los acrilésteres se sometieron a una reacción de hidrólisis básica utilizando hidróxido de sodio (NaOH) y agua (H₂O) para obtener los correspondientes ácidos carboxílicos **3a-c** (Esquema 4), materia prima para la síntesis de acrilamidas **6** y **7a-c**. Se necesitaron 2.0 Eq de NaOH, 10 mL de una mezcla de metanol/agua (MeOH/H₂O) en una relación 8:2 y 1.0 Eq del éster cinámico correspondiente **2a-c**. Se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, después se acidificó la mezcla de reacción a pH = 2.0 con ácido clorhídrico concentrado (HCl) gota a gota y se dejó en agitación por 30 minutos más. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el solvente a presión reducida y se adicionó AcOEt para hacer lavados con agua, se separaron las fases donde la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad hasta obtener el producto. Las impurezas se lavaron con hexano.

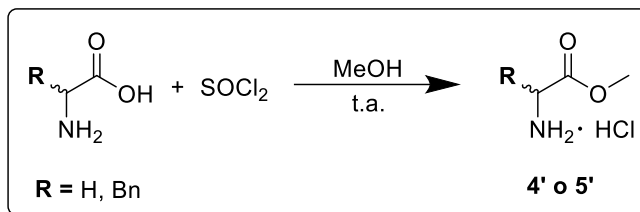
4.1.3.1 Síntesis del ácido (*E*)-3-(4-metoxifenil)acrílico **3c**



Siguiendo el procedimiento general; en un matraz bola de 100 mL se agregaron 2.0 Eq de NaOH (0.1127 g), 10 mL de MeOH/H₂O 8:2 y seguido de 1.0 Eq del éster cinámico **2c** (0.26 g). Se dejó reaccionar y después se acidificó a pH = 2.0 con HCl. Transcurrido el tiempo se realizaron extracciones AcOEt:H₂O. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se evaporó a sequedad y se obtuvo un sólido que se lavó con hexano y se dejó secar.

Nota: Los tres diferentes ácidos cinámicos (**3a-c**) que se necesitaron para las demás reacciones se adquirieron en Sigma-Aldrich por lo que solo se sintetizó **3c**.

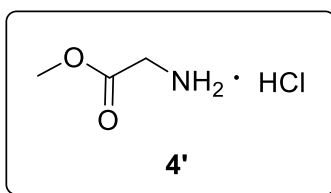
4.1.4 Procedimiento general para la síntesis de clorhidratos de ésteres metílicos



Esquema 5. Reacción de síntesis de los clorhidratos de amino ésteres **4'** y **5'**.

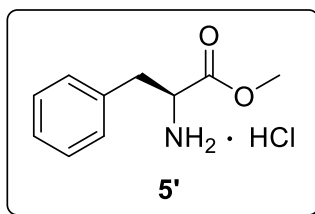
Se colocó en un matraz bola, la cantidad de aminoácido correspondiente a 1.0 Eq de glicina o L-fenilalanina. Se adicionaron 50 mL de MeOH y se puso en agitación. Se agregaron lentamente (gota a gota) 1.2 Eq de cloruro de tionilo (SOCl_2) como podemos verlo en el Esquema 5; se debe evitar el uso de material metálico. La mezcla se dejó reaccionar en agitación por 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida hasta obtener un sólido el cual se pasó a un embudo Büchner con papel filtro No. 42 y se lavó con THF y se dejó secar.

4.1.4.1 Síntesis del clorhidrato de 2-aminoacetato de metilo **4'**



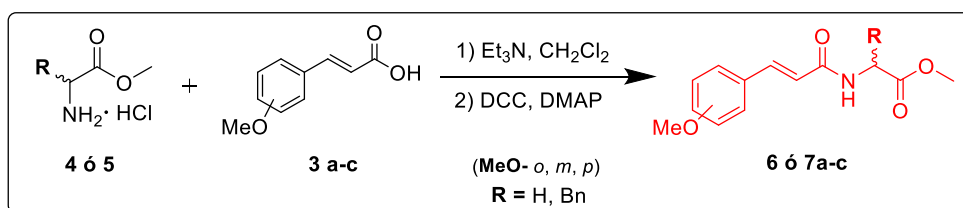
Siguiendo el procedimiento general se colocó 1.0 Eq glicina (2 g) en un matraz de 250 mL junto con 50 mL de MeOH. Se agregaron lentamente, 1.2 Eq de SOCl_2 (2.32 mL). La mezcla se dejó reaccionar y al finalizar, se evaporó el MeOH, el producto se lavó con 30 mL de THF y se dejó secar obteniéndose finalmente el clorhidrato del éster metílico de glicina para la reacción de acoplamiento.

4.1.4.2 Síntesis del clorhidrato de (S)-2-amino-3-fenilpropionato de metilo 5'



Siguiendo el procedimiento general se colocó 1.0 Eq L-fenilalanina (2 g) en un matraz de 250 mL, junto con 50 mL de MeOH. Se agregaron lentamente 1.2 Eq de SOCl_2 (1.05 mL). La mezcla se dejó reaccionar y al finalizar, se evaporó el MeOH, el producto se lavó con 30 mL de THF y se dejó secar obteniéndose finalmente el clorhidrato del éster metílico de L-fenilalanina para la reacción de acoplamiento.

4.1.5 Procedimiento general para la síntesis de acrilamidas 6 y 7



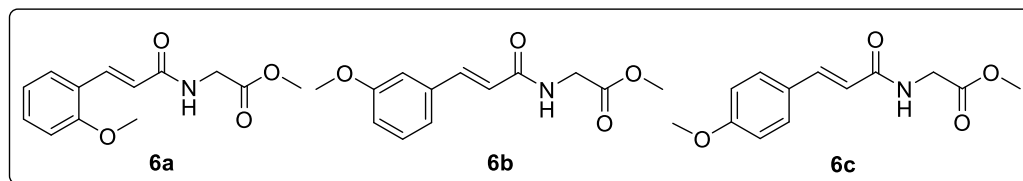
Esquema 6. Reacción de síntesis de las acrilamidas **6** y **7a-c**.

Las reacciones de acoplamiento se realizaron con los aminoácidos metil esterificados de glicina o L-fenilalanina **4'** y **5'** y los correspondientes ácidos cinámicos **3a-c**, esto en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), dimetilaminopiridina (DMAP) disueltos en diclorometano (CH_2Cl_2) obteniéndose con esto las correspondientes seis acrilamidas **6** y **7a-c** (Esquema 6).

Primero, en un matraz bola (**A**) de 250 mL provisto de un agitador magnético, se disolvieron 2.4 Eq del clorhidrato del éster metílico correspondiente, **4'** o **5'** en 40 mL de CH_2Cl_2 , se tapó y agitó manualmente, se llevó al congelador por 30 min e inmediatamente después se agregaron 2.4 Eq de Et_3N gota a gota y se puso en agitación y reflujo (40 °C) sobre una plancha de calentamiento por 2 h; al concluir el tiempo, se preparó en un matraz Erlenmeyer (**B**) una solución con CH_2Cl_2 , 1.0 Eq de ácido cinámico **3a-c** y agitando mientras se agregaron 1.0 Eq de DCC seguido de 0.2 Eq de DMAP. Posteriormente se vertió inmediatamente la solución al matraz bola aun tibio y se dejó solo con agitación por 24 h a temperatura ambiente. Al

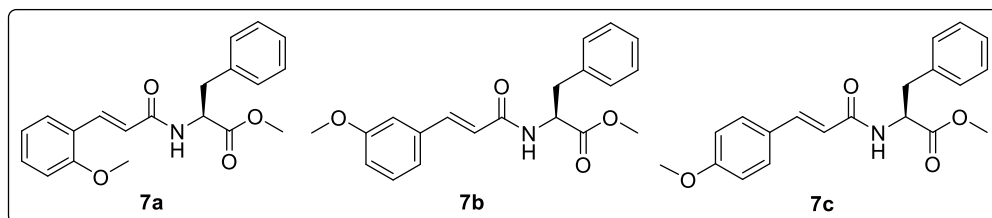
finalizar el tiempo de reacción, se filtró la solución al vacío y enfrió el filtrado por 30 min para volver a filtrarla; se le hicieron lavados con AcOEt/H₂O y se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y finalmente ser purificado mediante cromatografía en columna utilizando un sistema de elución en gradiente partiendo de Hex/AcOEt en proporciones 8:2, 7:3, 6:4 y 1:1 a 4 volúmenes muertos por cada etapa.

4.1.5.1 Síntesis de las acrilamidas 6a-c



Siguiendo el procedimiento general, en el matraz **A** se adicionaron 2.4 Eq (1.5 g) del éster metílico de glicina **4'** y 2.4 Eq (1.67 mL) de Et₃N en 40 mL de CH₂Cl₂. Se dejó en agitación y reflujo. Después de hora y media, en un matraz **B** se agregó 1.0 Eq (0.89 g) de los compuestos **3a-c**, 1.0 Eq (1.0306 g) de DCC y 0.2 Eq (0.122 g) de DMAP en 20 mL de CH₂Cl₂. Después se quitó de reflujo el matraz **A** y se le agregó el contenido del matraz **B** dejándole reaccionar en agitación. Posteriormente se filtró al vacío. Se le realizaron lavados AcOEt/H₂O y se evaporó el solvente ya seco a presión reducida para ser purificado por cromatografía en columna utilizando un sistema de elución en gradiente hasta obtener cada uno de los productos **6a-c**.

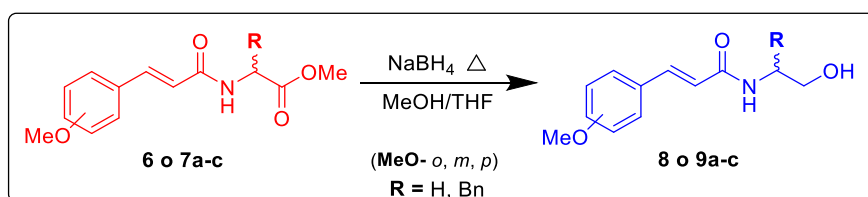
4.1.5.2 Síntesis de las acrilamidas 7a-c



Siguiendo el procedimiento general, en el matraz **A** se adicionaron 2.4 Eq (1.5 g) del éster metílico de L-fenilalanina **5** y 2.4 Eq (0.97 mL) de Et₃N en 30 mL de CH₂Cl₂. Se dejó en agitación y reflujo. Después de hora y media, en un matraz **B** se agregó 1.0 Eq (0.5163 g) de los compuestos **3a-c**, 1.0 Eq (0.5979 g) de DCC y 0.2 Eq (0.0708 g) de DMAP en 30 mL de CH₂Cl₂. Después se quitó de reflujo el matraz **A** y se le agregó el contenido del matraz **B** dejándole reaccionar en agitación.

Posteriormente se filtró al vacío. Se le realizaron lavados AcOEt/H₂O y se evaporó el solvente ya seco a presión reducida para ser purificado por cromatografía en columna utilizando un sistema de elución en gradiente hasta obtener cada uno de los productos **7a-c**.

4.1.6 Procedimiento general para la síntesis de β-hidroxiacrilamidas **8** y **9**

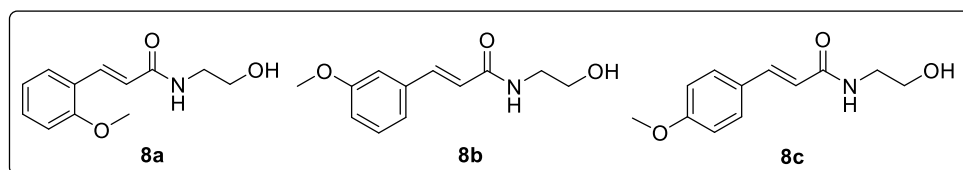


Esquema 7. Reacción de síntesis de las β-hidroxiacrilamidas **8** y **9a-c**.

A partir de las acrilamidas **6** y **7a-c** previamente sintetizadas, se formaron las respectivas hidroxiamidas α,β-insaturadas **8** y **9a-c**, mediante una reacción de reducción con borohidruro de sodio (NaBH₄) en MeOH (Esquema 7).

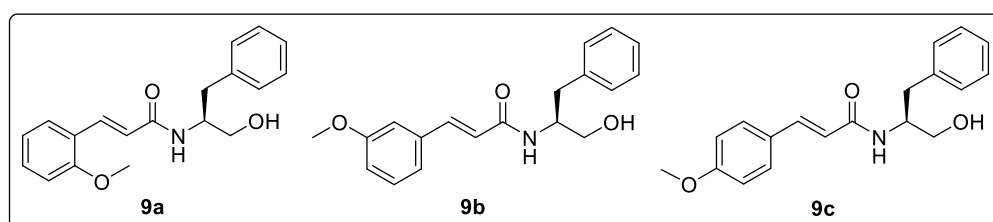
En un matraz bola de 100 mL provisto de un agitador magnético, se disolvió 1.0 Eq de la acrilamida correspondiente, **6** o **7a-c** en 30 mL de THF. La solución resultante se calentó a 60 °C por 5 minutos y enseguida se agregaron 8.0 Eq de borohidruro de sodio (NaBH₄) y se siguió calentando por 15 minutos más. Posteriormente, se agregaron 20 mL de MeOH gota a gota. Se dejó reaccionar a reflujo y agitación por 4 h. Al finalizar el tiempo de reacción, se lavó con AcOEt/H₂O haciendo énfasis en la fase acuosa, después, se separaron las fases y se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro, se evaporó hasta sequedad para finalmente ser purificado mediante cromatografía en columna utilizando un sistema de elución en gradiente partiendo de AcOEt/Hex en proporciones 1:1, 7:3 y 5:4:1 de Hex/AcOEt/MeOH a 4 volúmenes muertos por cada polaridad.

4.1.6.1 Síntesis de las β-hidroxiacrilamidas **8a-c**



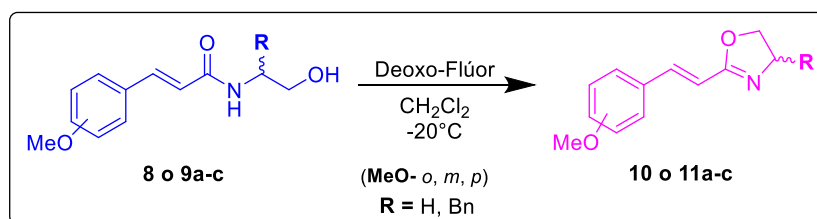
Siguiendo el procedimiento general, en un matraz se disolvió 1.0 Eq (0.5 g) de la acrilamida correspondiente, **6a-c** en 30 mL de THF; a la solución se le agregaron 8.0 Eq (0.6071 g) de NaBH₄. Posteriormente, se agregaron 20 mL de MeOH y se dejó reaccionar por 4 h. Al finalizar se lavó con AcOEt/H₂O y después de secar la fase orgánica y evaporar el solvente se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un sistema de elución en gradiente para obtener las respectivas β-hidroxiacrilamidas **8a-c**.

4.1.6.2 Síntesis de las β-hidroxiacrilamidas **9a-c**



Siguiendo el procedimiento general, en un matraz se disolvió 1.0 Eq (0.5 g) de la acrilamida correspondiente, **7a-c** en 30 mL de THF; a la solución se le agregaron 8.0 Eq (0.4459 g) de NaBH₄. Posteriormente, se agregaron 20 mL de MeOH y se dejó reaccionar por 4 h. Al finalizar se lavó con AcOEt/H₂O y después de secar la fase orgánica y evaporar el solvente se purificó mediante cromatografía en columna utilizando un sistema de elución en gradiente para obtener las respectivas β-hidroxiacrilamidas **9a-c**.

4.1.7 Procedimiento general para las síntesis de oxazolinas **10** y **11**

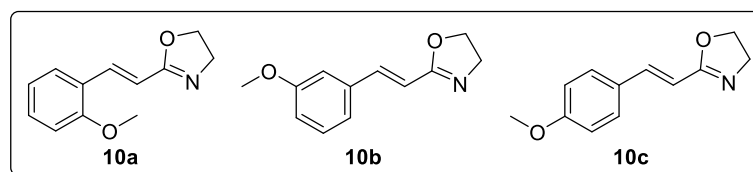


Esquema 8. Reacción de síntesis de las oxazolinas **10** y **11a-c**.

Posterior a la reducción le siguió una reacción de O-alkilación de cada uno de estos derivados, utilizando el reactivo de fluoración, Deoxo-Fluor[®] en CH₂Cl₂ a -20 °C (Esquema 8).

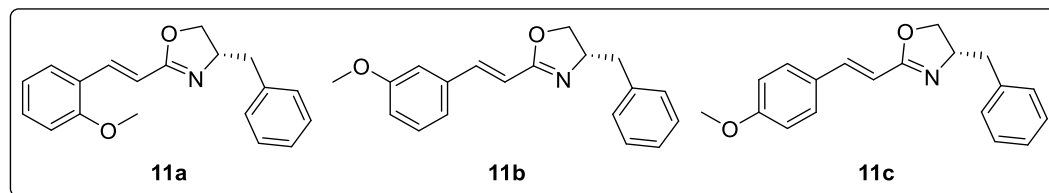
En un matraz bola de 100 mL provisto de un agitador magnético, se disolvió 1.0 Eq de las correspondientes β -hidroxiacrilamidas **8** o **9a-c** en 30 mL de CH_2Cl_2 . Se enfrió la mezcla a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ con un baño frío de MeOH/CO_2 dejándose en agitación durante 10 min. Posteriormente se agregaron 3.0 Eq de Deoxo-Flúor[®] gota a gota con agitación constante por 20 min. Se verificó el progreso de la reacción con cromatografía en capa fina y dejó en agitación por 15 min más; después de este tiempo se terminó la reacción con 10 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos. Después se realizó una extracción con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a presión reducida y finalmente se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema de elución en gradiente de Hex:AcOEt en proporciones 9:1, 8:2 y 7:3 a 4 volúmenes muertos por cada polaridad.

4.1.7.1 Síntesis de las oxazolininas 10a-c



Siguiendo el procedimiento general, en un matraz se disolvió 1.0 Eq (0.25 g) de las β -hidroxiacrilamidas **8a-c** en 30 mL de CH_2Cl_2 . Se enfrió la mezcla a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se agregaron 3.0 Eq (0.63 mL) del reactivo Deoxo-Flúor[®]; después de reaccionar se agregaron 10 mL de una solución saturada de NaHCO_3 para detener la reacción. Se lavó con una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ secando la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro. Finalmente se purificó por cromatografía en columna en gradiente de Hex:AcOEt para obtener las respectivas β -hidroxiacrilamidas **10a-c**.

4.1.7.2 Síntesis de las oxazolininas 11a-c



Siguiendo el procedimiento general, en un matraz se disolvió 1.0 Eq (0.25 g) de las β -hidroxiacrilamidas **9a-c** en 30 mL de CH_2Cl_2 . Se enfrió la mezcla a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se agregaron 3.0 Eq (0.44 mL) del reactivo Deoxo-Flúor[®]; después de reaccionar se agregaron 10 mL de una solución saturada de NaHCO_3 para detener la reacción. Se lavó con una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ secando la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro. Finalmente se purificó por cromatografía en columna en gradiente de Hex:AcOEt para obtener las respectivas β -hidroxiacrilamidas **11a-c**.

4.2 Esayos biológicos

De los compuestos sintetizados, purificados y caracterizados se tomaron los de interés biológico, que fueron las acrilamidas esterificadas **6** y **7a-c**, hidroxiladas **8** y **9a-c**, y las correspondientes oxazolinas α,β -insaturadas metoxiaril sustituidas **10** y **11a-c** las cuales, con base en los antecedentes, tendrían una potencial actividad antituberculosa *in vitro* y/o una relevante seguridad ante células sanas, por lo que se procedió a evaluarlas.

4.2.1 Generalidades

La evaluación antituberculosa fue llevada a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad del departamento de Gastroenterología del Hospital Universitario de la UANL. Las placas ELISA, los reactivos, medios, gasas, algodón, micropipetas, puntillas, guantes, cubrebocas, y diverso material de vidrio utilizado para estas determinaciones fueron proporcionados por este departamento. Cada uno de los insumos fueron sometidos a limpieza y esterilización debida y hechos con todas las medidas necesarias de bioseguridad nivel II, en una campana especial para manejo de micobacterias, se utilizó doble guante, bata de laboratorio y bata quirúrgica usando conjuntamente cubrebocas y mascarilla N95 desechando los residuos en las bolsas rojas y contenedores exclusivos para desechos con *M. tuberculosis*.

La actividad antituberculosa se determinó sobre los dieciocho compuestos de interés contra dos cepas de estudio, una de referencia (H37Rv) y la otra de un aislado clínico farmacoresistente (G-122), haciendo uso de la técnica colorimétrica Alamar Azul, la cual se fundamenta en la reacción de la resazurina, Figura 14, que

se transforma en resorufina produciendo un cambio de color de azul a rosa debido a la acción de las enzimas deshidrogenasas de los bacilos activos de la TB, reacción que nos permitió visualizar la viabilidad celular de *M. tuberculosis*, ya que, si la bacteria se encuentra viva, se presenta un vire de color y por el contrario permanece azul.

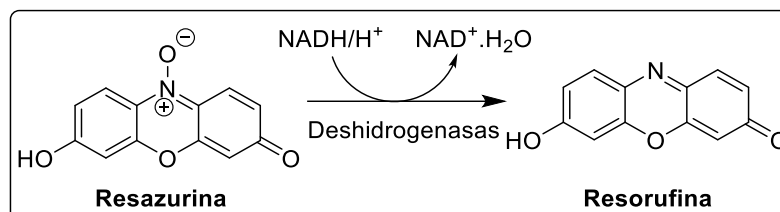


Figura 14. Reacción de la técnica Alamar Azul.

La evaluación citotóxica fue llevada a cabo en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos ubicado en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Las líneas celulares, los buffers, medios de cultivo, puntillas, pipetas, canaletas, gases y desinfectantes fueron provistos por el mismo laboratorio.

La actividad citotóxica de los compuestos sintetizados se determinó utilizando la línea celular de crecimiento normal, VERO, mediante la técnica WST-1, la cual se basa en la reducción de las sales de tetrazolio por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales, Figura 15, reacción que nos permitió calcular el porcentaje de células vivas (deshidrogenasas activas) que es proporcional a la intensidad y cambio de color del reactivo, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con un lector de ELISA.

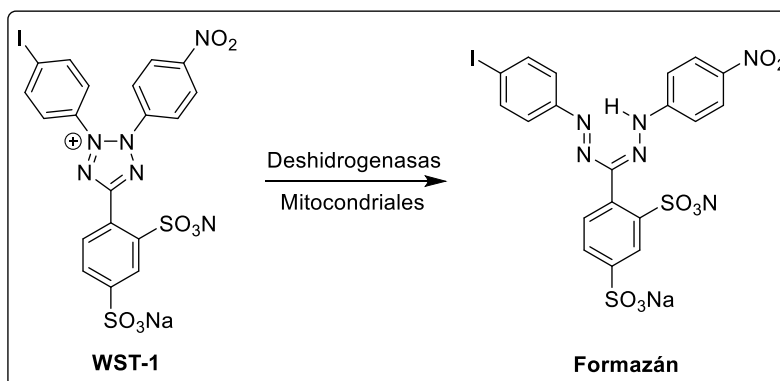


Figura 15. Reacción de la técnica WST-1.

4.2.2 Actividad antituberculosa

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad antituberculosa, se utilizó la técnica colorimétrica de Alamar Azul, técnica previamente mencionada empleando el protocolo descrito por Camacho Corona *et al.*, 2008., siendo esta una de las metodologías más utilizadas para determinar esta actividad y que además permite tener una correlación aceptable en la detección de la resistencia a los fármacos antifímicos [46, 47].

4.2.2.1 Selección de la cepa de *M. tuberculosis*

Para llevar a cabo la determinación de la actividad anti-TB, inicialmente se partió de dos cepas de *M. tuberculosis*, una cepa de referencia sensible a los fármacos de primera línea, H37Rv y otra aislada clínicamente, G122, resistente a los fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina y etambutol).

4.2.2.2 Preparación de medio Middlebrook-7H9

El medio Middlebrook 7H9 se preparó pesando 4.7 g de base caldo Middlebrook 7H9 al cual se le agregaron 18 mL de glicerina al 10 % v/v en 882 mL de agua para preparar 900 mL de medio. Se esterilizó a 121 °C y 15 psi de presión por 15 minutos. Posteriormente cuando se atemperó, se agregaron 100 mL de suplemento de crecimiento OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) para enriquecerlo.

4.2.2.3 Preparación de los compuestos a evaluar

Los compuestos a evaluar se prepararon partiendo de un stock de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hecho a partir de 1 mg de cada compuesto en 500 μL de DMSO en un tubo Eppendorf.

A partir de este stock se realizaron los cálculos necesarios para preparar las soluciones de trabajo a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ usando Caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC y teniendo en cuenta que la concentración final en el pocillo fue de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ estando dos veces diluida (debido al medio e inóculo de trabajo agregados) en un volumen total de 200 μL por pocillo.

A los compuestos que se dificultó su disolución en el medio de cultivo Middlebrook 7H9 se le agregaron 100 μL de Tween 80, tomados en cuenta en los cálculos.

4.2.2.4 Preparación del inóculo bacteriano

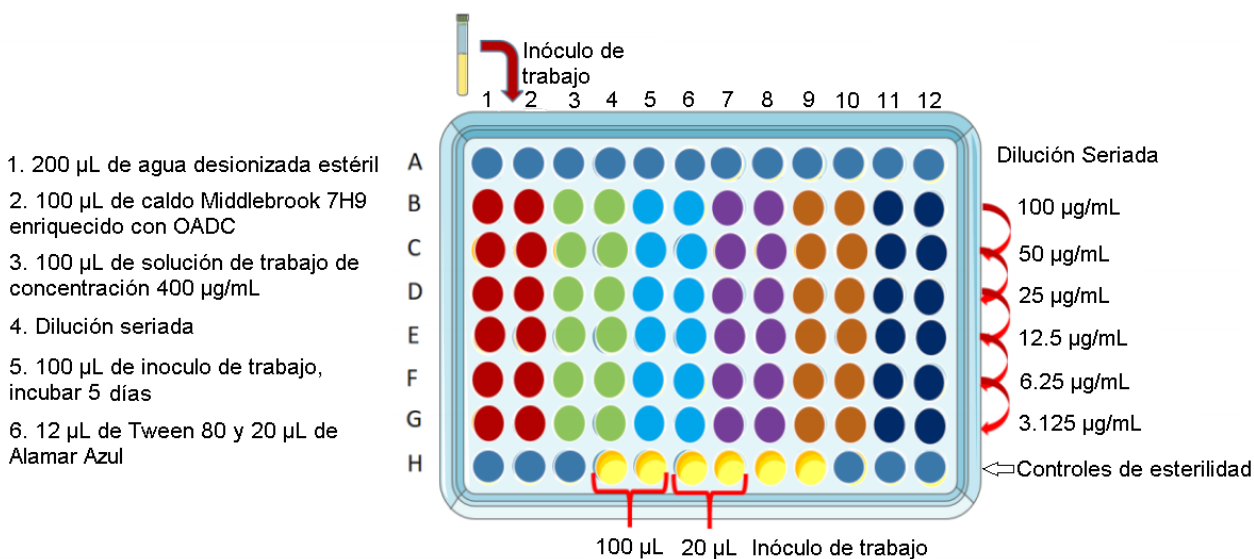
Previo a la evaluación anti-TB y junto a la preparación de todos los insumos es muy importante cultivar con tiempo las cepas de *M. tuberculosis* debido a su lento crecimiento. Las cepas de referencia y fármaco resistente fueron sembradas en medio sólido (Lowenstein-Jensen) e incubadas a 37 °C por 20 días, donde a posterior crecimiento se tomaron colonias para pasarlas a incubar en caldo Middlebrook 7H9 suplementado, previamente preparado, incubándose a 37 °C por 15 días para ser llevada a una turbidez igual al tubo de McFarland No. 1 (correspondiente a 3×10^8 células). De este tubo se tomaron 0.5 mL y se adicionaron a 9.5 mL de medio Middlebrook 7H9 suplementado, formando así el inóculo de trabajo con la concentración bacteriana necesaria para la evaluación en la microplaca.

4.2.2.5 Ensayo en microplaca Alamar Azul

El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos de fondo plano en donde se evaluaron seis compuestos por placa a seis concentraciones seriadas distintas ($3.125-100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por duplicado. Se preparó la placa con 200 μL de agua desionizada estéril en los pozos de la periferia para evitar deshidratación (A 1-12 y H 1-3 y 10-12) y con 100 μL de medio de cultivo Middlebrook 7H9 a cada uno del resto de los pozos. Posteriormente en la fila B se añadieron 100 μL de la solución de trabajo por duplicado para realizarse una serie de diluciones 1:2 verticalmente. Al final se agregaron 100 μL del inóculo de trabajo en cada pocillo y en la fila H sobrantes (H 4-9) se prepararon tres controles de medio e inóculo en proporciones: H4-100:100, H6-180:20 y H8-200 μL , Esquema 9.

Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 5 días, después se adicionaron a los controles 12 μL de Tween 80 al 10 % y 20 μL de Alamar Azul, en ese orden, incubándose a 37 °C por 24 horas más. Se determinó que los colores concuerdan con lo esperado en la fila control y se procedió a adicionar el Tween 80 y Alamar Azul en los pocillos restantes, incubando a 24 y 72 horas. Después de este tiempo se realizó una lectura visual, interpretándose como crecimiento si existió un cambio de color de azul a rosa. Se determinó como la concentración mínima inhibitoria (CMI) en el pocillo anterior al del vire de color.

Cabe señalar que cada compuesto se midió por duplicado y repitiendo el ensayo en dos días diferentes bajo las mismas condiciones de estudio. Se contó como controles el medio de cultivo (negativo), rifampicina y etambutol (positivo para cepa sensible) y levofloxacin (positivo para cepa MFR).



Esquema 9. Llenado de la microplaca de la técnica de Alamar Azul.

4.2.3 Actividad citotóxica

La citotoxicidad de los compuestos sintetizados se determinó utilizando la técnica WST-1, la cual se basa en la reducción de las sales de tetrazolio que nos permite calcular el porcentaje de células vivas, midiendo la absorbancia a una longitud de onda a 450 nm con un lector de ELISA.

4.2.3.1 Descongelamiento de células VERO

Inicialmente se partió de un cultivo confluyente de la línea celular VERO por lo que se procedió a descongelarlas siguiendo el protocolo establecido, colocando el vial con la línea celular en un baño de agua a 37 °C. Posteriormente el vial se descontaminó por aspersion de etanol al 70 % y se suspendió el sedimento celular con medio esencial mínimo de Eagle's (MEM) atemperado en una caja de cultivo celular posteriormente se incubó a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ hasta la formación de una monocapa. El medio MEM fue previamente preparado, con suero fetal bovino al 10 % y 1 % de antibiótico el cual se esterilizó por filtración por membrana de 0.22 µm.

4.2.3.2 Conteo celular

Cuando se observó aproximadamente un 80 % de confluencia en la monocapa, se lavó dos veces con 3 mL de solución de buffer de fosfatos (PBS), posteriormente se adicionaron 500 μL de tripsina-EDTA al 0.25 % para lograr una suspensión celular y se dejó actuar por 6 minutos en incubación con las condiciones antes mencionadas. Después se añadió 1 mL de medio para inactivar la tripsina y se centrifugó a 1300 rpm durante 10 minutos a 25 °C. Se retiró el sobrenadante y al botón celular que quedó en el fondo se le agregaron otros 4 mL de medio MEM. De esta suspensión se tomaron 10 μL para realizar un conteo celular en una cámara de Neubauer. A partir de la suspensión celular se calculó la cantidad necesaria para generar una suspensión celular con una densidad de 500,000 células en 1 mL y por lo tanto 5,000 células por pocillo.

4.2.3.3 Ensayo en microplaca WST-1

Se colocaron 100 μL de la suspensión celular en cada uno de los pozos de una microplaca de 96 pocillos para tener 5,000 células por pocillo. La placa así preparada, se incubó por 24 horas a 37 °C, en una atmósfera de CO_2 al 5 %. Por otro lado, se prepararon los compuestos a evaluar (**6-11a-c**) a dos concentraciones (50 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). Ya listos se agregaron a la placa en un volumen de 100 μL . Se empleó Tritón X100 al 1 % como control negativo y células sin tratamiento como control positivo y se volvió a incubar la caja a las mismas condiciones. Después de 24 horas se retiró el medio y se adicionaron 100 μL de medio con WST-1 al 5 % por pocillo; se incubó nuevamente la placa por 2 horas y se leyó a 450 nm en un lector de ELISA. Cada compuesto se midió por cuadruplicado en dos repeticiones diferentes bajo las mismas condiciones. Como blanco se tomó al medio con WST-1. Con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de viabilidad celular, siendo este la resta de la absorbancia obtenida menos el blanco, dividido entre el control negativo y multiplicado por cien, Ecuación 1.

$$\text{Viabilidad Celular (\%)} = \frac{\text{Abs. de Mta.} - \text{Bco.}}{\text{Control Neg.}} \times 100 \quad (1)$$

4.3 Manejo y Disposición de los Residuos

La recolección y disposición adecuada de los residuos peligrosos que derivaron del proyecto de investigación se llevó a cabo conforme al reglamento de seguridad e higiene de la Facultad de Ciencias Químicas, así como del Hospital Universitario para residuos biológico-infecciosos; mostrándose a continuación los contenedores específicos más utilizados durante el proyecto.

Tabla 5. Colectores usados para la recolección de residuos.

Colector	Residuo
A	Soluciones salinas, ácidos y bases orgánicas e inorgánicas.
B	Sólidos inorgánicos.
C	Tóxicos, inflamables, aminas y solventes orgánicos no halogenados.
D	Tóxicos, inflamables, aminas y solventes orgánicos halogenados.
E	Muy tóxico, cancerígeno y orgánico.
G	Combinaciones orgánicas sólidas.
RPBI	Residuo Peligroso Biológico infeccioso.
Basura industrial	
Vidrio impregnado	

CAPÍTULO 5

5 Resultados y Discusión

5.1 Síntesis y caracterización de los compuestos

A continuación, se describen los resultados obtenidos en la etapa de síntesis orgánica y caracterización; además, de la discusión de algunos espectros relevantes en cada etapa del proceso de síntesis.

5.1.1 Preparación de los ésteres cinámicos 2a-c

Para obtener los ésteres cinámicos se recurrió a la reacción de HWE (Horner-Wadsworth-Emmons) antes mencionada, se partió de trietilfosfonoacetato (TEFA), empleando LiCl, Et₃N como base y los anisaldehídos *orto*, *meta* y *para*-sustituidos en tetrahidrofurano como disolvente, usando un baño de sonicación. Esto permitió mejorar los rendimientos y disminuir los tiempos de reacción en comparación con una metodología de síntesis convencional. Al monitorear la reacción en cromatografía en capa fina se encontró que el aldehído y el éster cinámico presentaron un factor de retención muy similar en Hex/AcOEt 7:3, por lo que se buscó que el aldehído se consumiera en su totalidad ajustando los equivalentes al doble de trietilfosfonoacetato para propiciar la formación del producto y con esto facilitar la purificación.

Debido a que se logró conseguir de manera comercial los derivados de ácido cinámico, solo se llevó a cabo una reacción, correspondiente al éster cinámico **2c**; el cual, dadas las condiciones de síntesis antes mencionadas se obtuvo en forma de un líquido viscoso amarillento con un rendimiento de reacción del 92 % y R_f: 0.67 en un sistema de solventes Hex/CH₂Cl₂/CH₃OH en proporción 65:30:5.

5.1.1.1 Elucidación estructural del éster cinámico **2c**

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **2c**, Figura 16, se describen a continuación (Nota: algunos espectros se presentarán junto con la asignación a manera de ejemplo, los demás se podrán consultar en el **Anexo II**).

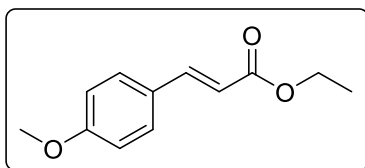


Figura 16. Éster cinámico **2c**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)] para el acrilato **2c**: en un desplazamiento químico (δ) de 1.33 ppm se observó un triplete, con una constante de acoplamiento (J) de 7.1 Hz que integra para tres protones, correspondientes al grupo metilo del éster (CH_3CH_2); a 3.83 ppm se muestra un singulete que integra para tres protones, asignado al grupo metoxilo (OCH_3); en 4.25 ppm se aparece un cuarteto, con una $J=7.1$ Hz que integra para dos protones, que corresponde al metileno del éster (CH_2CH_3); a 6.31 ppm se observa un doblete con una $J_{trans}=15.9$ Hz que integra para un protón vinílico correspondiente ($\text{CH}=\text{CH}$); a un desplazamiento de 6.90 ppm se observó un doblete, con una $J=8.8$ Hz que integra para dos protones, correspondientes a los protones aromáticos por ser un anillo *p*-sustituido; a un desplazamiento de 7.47 ppm vuelve a aparecer otro doblete con una constante similar de $J=8.7$ Hz que integra para dos protones que corresponden a los otros dos protones aromáticos; finalmente a 7.64 ppm aparece una señal doble con una $J_{trans}=15.9$ Hz, que integra para el otro protón vinílico.

El espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)] presentó las siguientes señales: a 14.45 ppm, correspondiente al metilo del éster (CH_3CH_2); a 55.44 ppm, correspondiente al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$), a 60.41 ppm, correspondiente al metileno del éster (CH_3CH_2); de 114 a 161 ppm, señales correspondientes a los carbonos aromáticos y vinílicos; finalmente se observó en 167.43 ppm el carbono carbonílico del éster.

5.1.2 Preparación de los derivados de los ácidos cinámicos 3a-c

De los tres diferentes derivados de ácido cinámico que se planteó sintetizar, se obtuvo solo el ácido *p*-metoxicinámico, a partir del acriléster **2c** el cual fue sometido a una reacción de hidrólisis básica utilizando hidróxido de sodio (NaOH) y agua (H₂O). Así se obtuvo la materia prima **3c** para la síntesis de acrilamidas **6 y 7c**. Los demás ácidos cinámicos fueron obtenidos comercialmente.

El ácido *p*-metoxicinámico fue un sólido blanco, con rendimiento de reacción del 75 % y Rf: 0.17 en un sistema de solventes, Hex/AcOEt 70:30.

5.1.2.1 Elucidación estructural del ácido cinámico 3c

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del análogo de ácido cinámico **3c**, Figura 17, se describen a continuación.

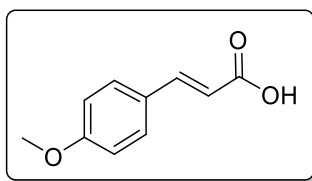


Figura 17. Ácido cinámico **3c**.

En el espectro de protón [RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)] se observaron las siguientes señales: a un desplazamiento de 3.85 ppm se observó un singulete que integra para tres protones, correspondientes al grupo metoxilo (OCH₃); a campo más bajo a 6.38 ppm aparece un doblete con una $J_{trans}=15.9$ Hz que integra para un protón, asignado a un hidrógeno vinílico (CH=CH); a un desplazamiento de 6.93 y 7.53 ppm se muestran dos dobletes con constantes de acoplamiento de $J=8.8$ Hz que integran cada uno para dos protones, los cuales corresponden al anillo aromático; a campo más bajo a 7.80 ppm se observó un doblete con una $J_{trans}=15.9$ Hz, que integra para un protón, igualmente para otro de los protones vinílicos.

El espectro de carbono [RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)] presentó las siguientes señales: en 55.55 ppm, correspondiente al carbono del grupo metoxilo (OCH₃C₆H₄), de 114.26 a 162.28 ppm, aparecen los carbonos aromáticos y vinílicos; finalmente a 163.13 ppm, correspondiente al carbono del éster.

5.1.3 Preparación de los ésteres metílicos de aminoácidos 4' y 5'

Los clorhidratos esterificados de los respectivos aminoácidos, glicina y L-fenilalanina (4' y 5'), se sintetizaron haciendo reaccionar una solución metanólica de ellos con cloruro de tionilo. Se obtuvieron sólidos blancos cristalinos con altos rendimientos de reacción, superiores al 95 %, Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la síntesis de ésteres metílicos de aminoácidos 4' y 5'.

Compuesto	Aspecto físico	Punto de Fusión (°C)	% Rendimiento
 4'	Sólido blanco cristalino	183-185	98
 5'	Sólido blanco opaco	155-157	95

Los aminoácidos metil esterificados y los derivados de ácidos cinámicos **3a-c** se usaron para cumplir con el objetivo de sintetizar las acrilamidas **6** y **7a-c**.

5.1.3.1 Elucidación estructural del éster metílico de glicina 4'

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto 4', Figura 18, se describen a continuación.

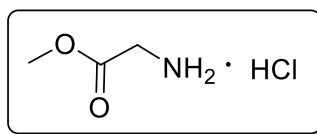


Figura 18. Éster metílico 4'.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, MeOD)] se observaron las siguientes señales: a un desplazamiento químico de 3.84 ppm se observó un singulete que integra para tres protones correspondiente al grupo metoxilo del éster (OCH_3); así mismo, en 3.85 ppm otra señal sencilla que integra para dos protones que corresponden al metileno de la molécula (COCH_2NH_2).

El espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, MeOD)] presentó, por la sencillez de la molécula, solo tres señales: a 40.89 ppm el carbono del grupo metoxilo; a 53.43 ppm el carbono del metileno y a 168.97 ppm la señal del carbonilo del éster.

5.1.3.2 Elucidación estructural del éster metílico de L-fenilalanina 5'

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **5'**, Figura 19, se describen a continuación.

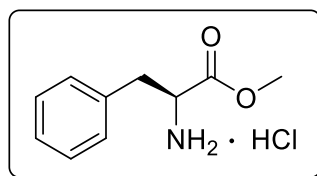


Figura 19. Éster metílico **5'**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico de 3.41 ppm aparecen dos dobles de dobles que integran para dos protones, correspondientes al metileno unido al anillo aromático ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), este tipo de señales debido al centro quiral que ocasiona que los dos protones sean diferentes; en 3.68 ppm se observó un singulete que integra para tres protones correspondiente al metoxilo del éster (CH_3O), seguido se encontró un multiplete entre 4.37 y 4.42 ppm que integra para un protón asignado al metino del carbono quiral (CHBn); entre 7.32 y 7.22 ppm se observó otra señal múltiple que integra para cinco protones correspondientes a los aromáticos ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$); finalmente en 8.74 ppm se alcanzó a observar el acoplamiento de los protones del grupo amino como una señal sencilla y ancha.

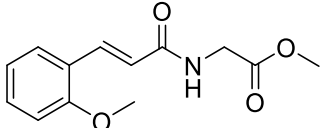
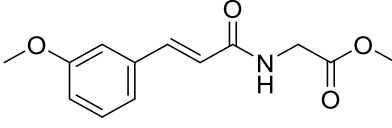
El espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, MeOD)] presentó las siguientes señales: en 37.40 ppm el carbono del metileno ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); a 53.59 ppm la señal del metoxilo (CH_3O); a 55.21 ppm la señal del metino quiral (CHBn); de 129 a 135 ppm los carbonos aromáticos (C_6H_5); por último, en 170.45 ppm se observó el carbono del carbonilo del éster ($\text{C}=\text{O}$).

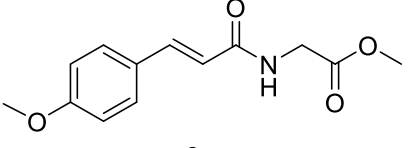
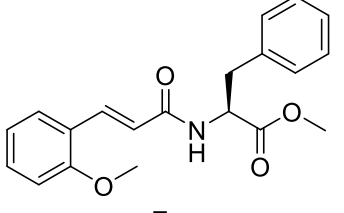
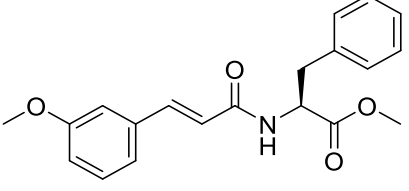
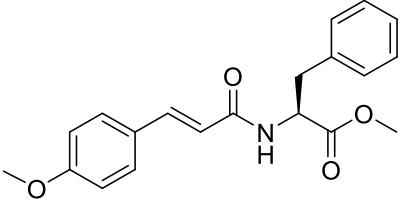
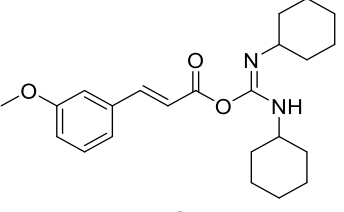
5.1.4 Preparación de acrilamidas 6 y 7a-c

Para la formación de las acrilamidas **6** y **7a-c** se llevó a cabo una reacción de acoplamiento entre el clorhidrato del éster metílico y el derivado del ácido cinámico correspondiente, **3a-c**; reacción que se realizó en dos etapas, la primera consistió en la liberación de los clorhidratos **4'** y **5'** a reflujo en presencia de carbonato de potasio (K_2CO_3); sin embargo, no fue posible obtener el producto deseado utilizando esta base, ya que si el clorhidrato no es liberado no es posible que se lleve a cabo el ataque nucleofílico por el grupo amino y con esto formar el enlace amida; es por lo que se cambió la base utilizada por trietilamina (Et_3N) como agente liberador, permitiendo la liberación y por ende la formación del producto de acoplamiento.

La segunda etapa consistió en hacer reaccionar el éster liberado con los derivados de ácidos cinámicos (*orto*, *meta* y *para* metoxi-sustituidos) utilizando DCC y DMAP como agentes activantes en el mecanismo propio de la reacción, dejando en agitación a temperatura ambiente por 24 h. Bajo las condiciones dadas se logró la liberación, aunque, inicialmente se obtuvieron bajos rendimientos, entre un 15 y 50 % debido a la formación de subproductos (acrilatos) [48]. Por lo que se procedió a realizar un ajuste en las proporciones de los reactivos a utilizar, encontrando que la presencia del éster metílico y el ácido cinámico en una proporción 2.4:1 mejoraba considerablemente los rendimientos, alcanzando valores mayores al 70 %, Tabla 7.

Tabla 7. Resultado de la síntesis de acrilamidas **6** y **7a-c**.

Compuesto	Aspecto físico	Punto de Fusión (°C)	% Rendimiento
 6a	Sólido blanco cristalino	162-164	85
 6b	Sólido blanco cristalino	82-84	89

 <p>6c</p>	Sólido blanco cristalino	107-109	85
 <p>7a</p>	Sólido blanco cristalino	95-97	78
 <p>7b</p>	Sólido blanco cristalino	83-85	70
 <p>7c</p>	Sólido blanco cristalino	114-116	91
 <p>7d</p>	Sólido beige cristalino	144-146	20

Los acrilatos formados impidieron un mayor rendimiento en las reacciones, por lo que se decidió aislarlos, logrando obtener de forma pura el acrilato **7d**, derivado del ácido *m*-metoxicinámico **3b**.

5.1.4.1 Elucidación estructural de la acrilamida **6a**

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **6a**, Figura 20, se describe a continuación.

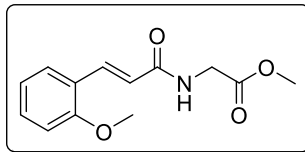


Figura 20. Acrilamida **6a**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)] se obtuvieron las siguientes señales: en un desplazamiento químico de 3.78 ppm se observó un singulete que integra para tres protones, correspondientes al grupo metoxilo del éster (OCH_3); a 3.86 ppm aparece otro singulete que integra para tres protones asignado al grupo metoxilo en posición *orto* del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); a 4.19 ppm se muestra una señal doble con una $J=5.2$ Hz que integra para dos protones y que corresponde a los protones del metileno adyacente a la amida (CONHCH_2) con la que alcanza a acoplarse, esto se corrobora con la señal a campos bajos en 6.36 ppm siendo esta un triplete ancho con $J=5.3$ Hz que integra para un protón el cual corresponde a la amida (CONHCH_2); en 6.62 y 7.90 ppm se encuentran dos dobletes con una $J_{\text{trans}}=15.8$ Hz que integra cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); de 6.86 a 6.99 ppm se observó un multiplete que integra para dos protones aromáticos, correspondientes en posición 3 y 5 del anillo; entre 7.25 y 7.37 ppm se encuentra otro multiplete que integra para un protón aromático en posición 4 y finalmente a 7.47 ppm un doble de dobles con $J=7.7$ Hz que integran para otro protón aromático en posición 6.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)] presentó las siguientes señales: a 41.57 ppm, correspondiente al metoxilo del éster (OCH_3) a 52.49 ppm, al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); en 55.50 ppm, corresponde al carbono del metileno (CH_2) entre la amida y el éster; entre 111 y 137 ppm encontramos los carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente tres señales características de las acrilamidas, a 158.42 ppm el carbono en posición 2 del sistema aromático, adyacente al grupo metoxilo y en 166.73 y 170.78 ppm las señales que corresponden carbonilos de amida y éster respectivamente.

5.1.4.2 Elucidación estructural de la acrilamida 6b

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **6b**, Figura 21, se describe a continuación.

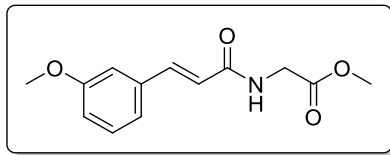


Figura 21. Acrilamida **6b**.

En el espectro de protón [RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico de 3.77 ppm se observó un singulete que integra para tres protones, correspondientes al grupo metoxilo del éster (OCH₃); a 3.80 ppm aparece otro singulete que integra para tres protones que corresponde al grupo metoxilo en posición *meta* del anillo aromático (C₆H₄OCH₃); a 4.19 ppm se muestra una señal doble con una constante de acoplamiento de $J=5.3$ Hz que integra para dos protones asignada al metileno adyacente a la amida (CONHCH₂), con la que alcanza a acoplarse, esto se corrobora con la señal que se encontró a campos más bajos en 6.55 ppm siendo esta un triplete ancho con $J=5.3$ Hz que integra para un protón correspondiente a la amida (CONHCH₂); en 6.49 y 7.61 ppm se encontró señales dobles con $J_{trans}=15.6$ Hz que integra cada uno a un protón vinílico (CH=CH); en 6.89 ppm se observó un doble de dobles con $J=7.7$ y 2.1 Hz que integra para un protón aromático en posición 4; entre 6.99 y 7.01 ppm se observó un multiplete que integra para un protón aromático en posición 2 del anillo; a 7.08 ppm una señal doble con $J=7.5$ Hz que integra para un protón correspondiente al protón aromático en posición 6 y finalmente a 7.26 ppm un triplete con $J=7.9$ Hz que integra para otro protón aromático en posición 5.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)] presentó las siguientes señales: a 41.47 ppm, correspondiente a la señal del metoxilo del éster (OCH₃) a 52.44 ppm, señal que corresponde al metoxilo del anillo aromático (OCH₃C₆H₄); en 55.26 ppm, al carbono del metileno (CH₂) entre la amida y el éster; entre 112 y 142 ppm se encontró los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente tres señales, a 159.84 ppm el carbono en posición 3 del

sistema aromático, adyacente al grupo metoxilo, en 166.04 y 170.62 ppm las señales que corresponden a los carbonilos de amida y éster respectivamente.

5.1.4.3 Elucidación estructural de la acrilamida 6c

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **6c**, Figura 22, se describen a continuación.

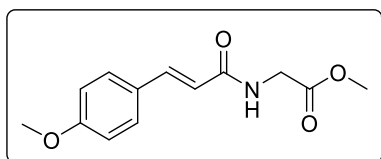


Figura 22. Acrilamida **6c**.

En el espectro de protón [RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)] se observaron las siguientes señales, Figura 23: en un desplazamiento químico de 3.78 ppm aparece un singulete que integra para tres protones, correspondientes al grupo metoxilo del éster (OCH₃); a 3.82 ppm se observó otro singulete que integra para tres protones que corresponden al grupo metoxilo en posición *para* del anillo aromático (C₆H₄OCH₃); a 4.19 ppm se muestra una señal doble con una *J*=5.2 Hz que integra para dos protones asignada al metileno adyacente a la amida (CONHCH₂) con el que alcanzó a acoplarse, esto se comprobó con la señal a 6.36 ppm, señal doble ancha en donde se traslapó (CONHCH₂) con el doblete del protón vinílico; esta señal a 6.36 y 7.61 ppm con *J*_{trans}=15.6 Hz integran cada una para un protón vinílico (CH=CH); en 6.88 y 7.44 ppm se observaron dos dobletes con *J*=8.7 Hz que integran cada uno para dos protones aromáticos al tener el anillo simétrico.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)] presentó las siguientes señales: a 41.47 ppm, correspondiente al metoxilo del éster (OCH₃), Figura 24, a 52.44 ppm, corresponde al metoxilo del anillo aromático (OCH₃C₆H₄); en 55.36 ppm, corresponde al metileno entre la amida y el éster; entre 114 y 142 ppm se encontró los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente tres señales, a 161.03 ppm el carbono en posición 4 del sistema aromático,

adyacente al grupo metoxilo, en 166.35 y 170.69 ppm las señales que corresponden a los carbonilos de la amida y el éster respectivamente.

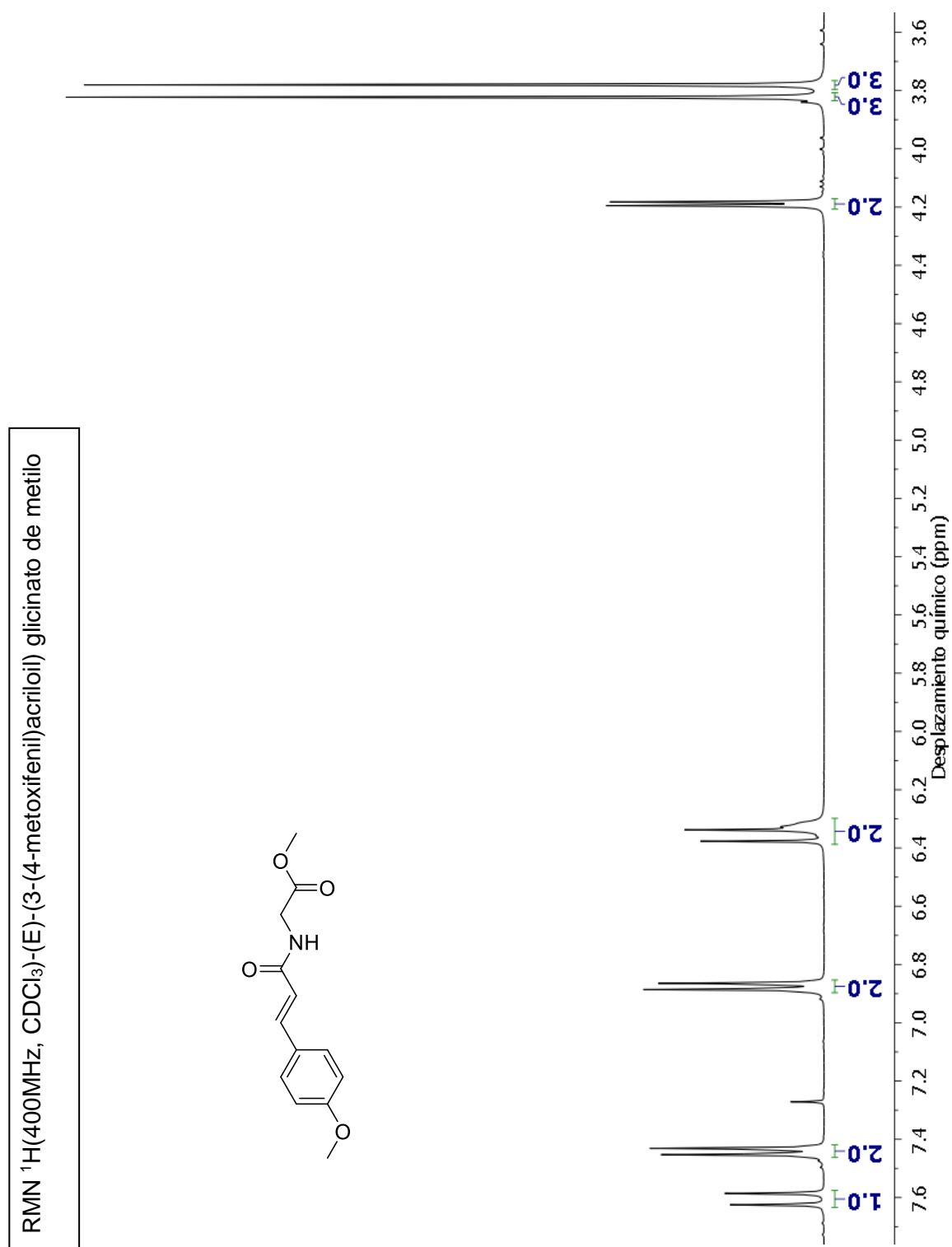


Figura 23. Espectro de RMN ^1H para acrilamida **6c**.

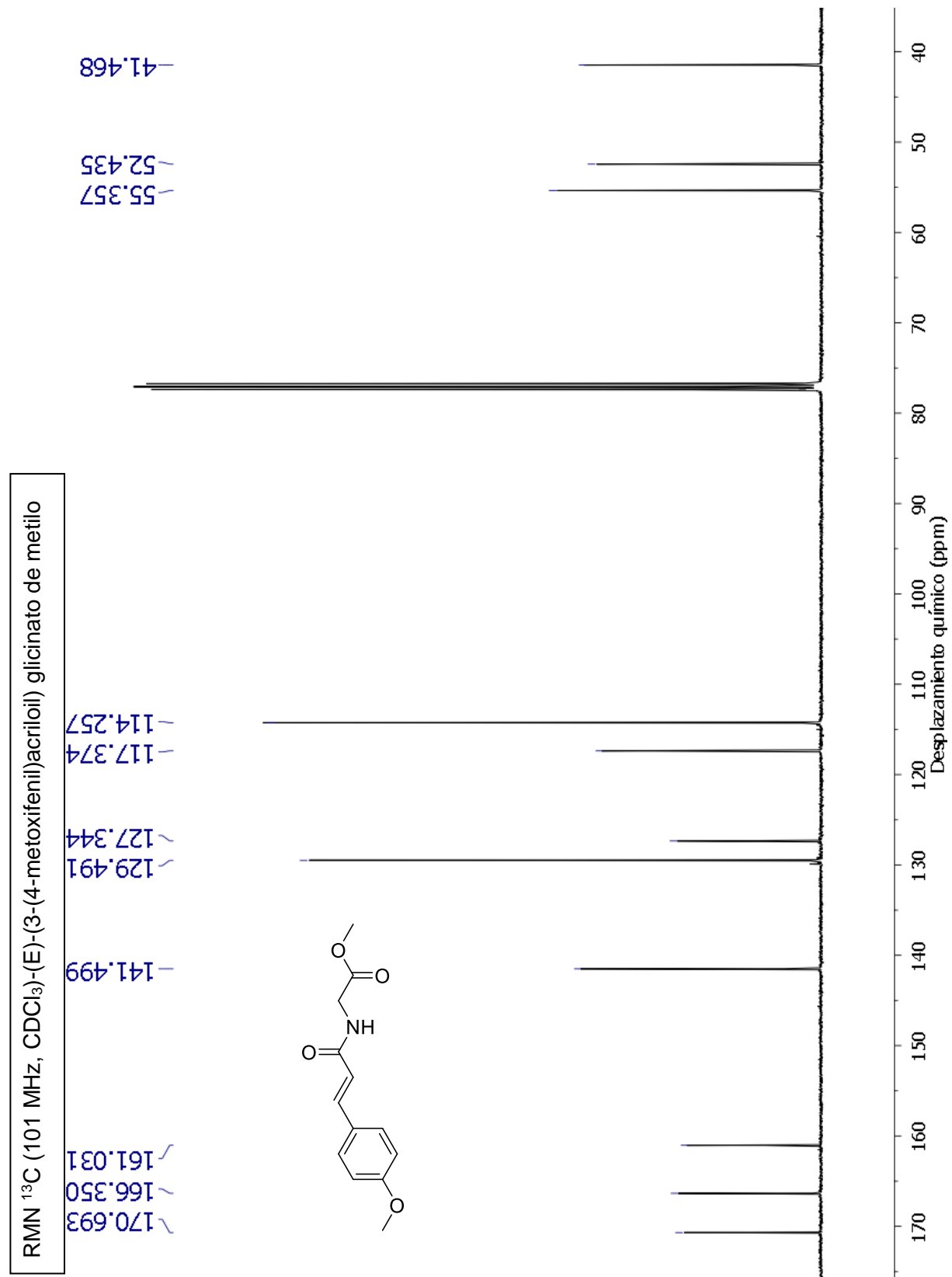


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C para acrilamida **6c**.

5.1.4.4 Elucidación estructural de la acrilamida 7a

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **7a**, Figura 25, se describen a continuación.

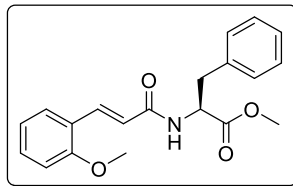


Figura 25. Acrilamida **7a**.

En el espectro de protón [RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)] se observaron las siguientes señales: en 3.20 ppm se observaron dos doble de dobles con $J=13.8$ y 5.6 Hz que integra para dos protones que corresponden al metileno del grupo bencílico (CH₂C₆H₅); a 3.74 y 3.86 ppm se muestran dos singuletes que integran cada uno para tres protones correspondientes a los metoxilos de la molécula (OCH₃/C₆H₄OCH₃); a 5.05 ppm se observó un doble de triples con $J=7.8$ y 5.6 Hz que integra para un protón asignado al metino en el centro quiral adyacente a la amida, con el que alcanza a acoplarse; por lo que se presentó una señal doble ancha en 6.18 ppm con $J=7.7$ Hz que integra para el protón de la amida (CONHCH₂); en 6.54 y 7.90 ppm se encontraron señales dobles con $J_{trans}=15.8$ Hz que integra cada uno a un protón vinílico (CH=CH); de 6.84 a 7.18 ppm se observaron dos multipletes que integran para dos protones aromáticos cada uno correspondientes al anillo *p*-sustituido y finalmente de 7.23 a 7.33 ppm un multiplete que integra para 5 protones correspondientes al anillo bencílico (C₆H₅).

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)] presentó las siguientes señales: a 38.05 ppm, correspondiente a la señal del metileno bencílico (CH₂C₆H₅); a 52.43 ppm, la señal del metoxilo del éster (OCH₃); a 53.43 ppm una señal que corresponde al metoxilo del anillo aromático (OCH₃C₆H₄); en 55.50 ppm, aparece el carbono del metino quiral; entre 111 y 138 ppm se encontró los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; a 158.43 ppm el carbono *orto*-sustituido y finalmente en 166.05 y 172.27 ppm las señales que corresponden a los carbonos carbonílicos de la amida y el éster respectivamente.

5.1.4.5 Elucidación estructural de la acrilamida 7b

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **7b**, Figura 26, se describen a continuación.

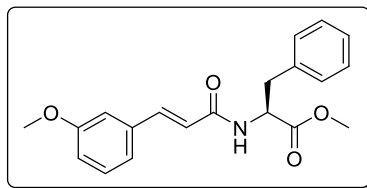


Figura 26. Acrilamida **7b**.

En el espectro de protón [RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico de 3.20 ppm aparecen dos doble de dobles con $J=13.9$ y 5.7 Hz que integran para dos protones, quienes corresponden al metileno bencílico (CH₂C₆H₅); a 3.75 y 3.81 ppm se muestran dos singuletes que integran cada uno para tres protones de los metoxilos de la molécula (OCH₃/C₆H₄OCH₃); a 5.04 ppm se observó un doble de triples con $J=7.8$ y 5.7 Hz que integra para un protón que corresponde al metino en el centro quiral adyacente a la amida, con el que alcanza a acoplarse, por lo que se presenta una señal sencilla y ancha en 6.22 ppm que integra para el protón de la amida (CONHCH₂); en 6.39 y 7.59 ppm se encuentran dobletes con $J_{trans}=15.6$ Hz que integra cada uno a un protón vinílico (CH=CH); en 6.90 ppm se observó un doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J=8.3$ y 2.6 Hz que integra para un protón aromático en posición 4; en 7.00 ppm se detecta un triplete ancho con constante de acoplamiento de $J=2.0$ Hz que integra para un protón del anillo *m*-sustituido; entre 7.05 y 7.13 ppm se observa un multiplete que integra para tres protones aromáticos traslapados de los dos anillos y finalmente de 7.22 a 7.32 ppm un multiplete que integra para 4 protones correspondientes al anillo bencílico (C₆H₅).

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)] presentó las siguientes señales: a 37.95 ppm, correspondiente al metileno bencílico (CH₂C₆H₅) en 52.52 ppm, corresponde a la señal del metoxilo del éster (OCH₃); a 53.42 ppm una señal asignada al metoxilo del anillo aromático (OCH₃C₆H₄); en 55.37 ppm aparece el carbono del metino quiral entre la amida y el éster; entre 112 y 142 ppm

se encontraron los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente las tres señales de las acrilamidas, a 159.93 ppm el carbono en posición 3 del sistema aromático, adyacente al grupo metoxilo, en 165.36 y 172.20 ppm las señales asignadas a los carbonos carbonílicos de amida y éster respectivamente.

5.1.4.6 Elucidación estructural de la acrilamida **7c**

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **7c**, Figura 27, se describen a continuación.

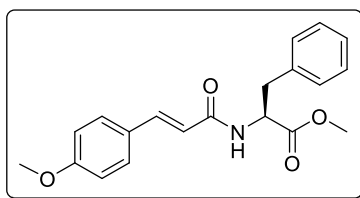


Figura 27. Acrilamida **7c**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)] se observaron las siguientes señales, Figura 28: en un desplazamiento químico de 3.19 ppm se muestran dos doble de dobles, con $J=13.9$ y 5.7 Hz que integra para dos protones que corresponden al metileno bencílico ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); a 3.74 y 3.81 ppm aparecen dos singuletes, cada uno integrando para tres protones asignados a los grupos metoxilo de la molécula ($\text{OCH}_3/\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); a 5.04 ppm se observó un doble de triples con $J=7.7$ y 5.7 Hz que integra para un protón que corresponde al metino quiral, adyacente a la amida con el que alcanza a acoplarse; por lo que se presenta una señal doble y ancha en 6.24 ppm con $J=7.5$ Hz y que integra para el protón de la amida (CONHCH_2); en 6.28 y 7.58 ppm se observaron dobletes de constante $J_{\text{trans}}=15.6$ Hz que integra cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); en 6.86 y 7.42 ppm aparecen dobletes con constantes de $J=8.52$ Hz que integran cada uno para dos protones aromáticos al tener el anillo *p*-sustituido simétrico; de 7.21 a 7.31 ppm y de 7.10 a 7.15 ppm se observaron dos multipletes que integran para dos y tres protones respectivamente, correspondientes a los protones aromáticos del anillo bencílico (C_6H_5).

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)], Figura 29, presentó las siguientes señales: a 37.93 ppm la señal del metileno del bencilo ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) a 52.38 ppm corresponde al metoxilo del éster (OCH_3); a 53.34 ppm aparece el metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); en 55.36 ppm corresponde al carbono del metino quiral; entre 114 y 142 ppm se encontraron los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente, a 161.03 ppm el carbono 4 del sistema aromático y en 165.75 y 172.23 ppm las señales asignadas a los carbonos carbonílicos de amida y éster respectivamente.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)-Metil (E)-(3-(4-metoxifenil) acrililoil)-D-fenilalaninato

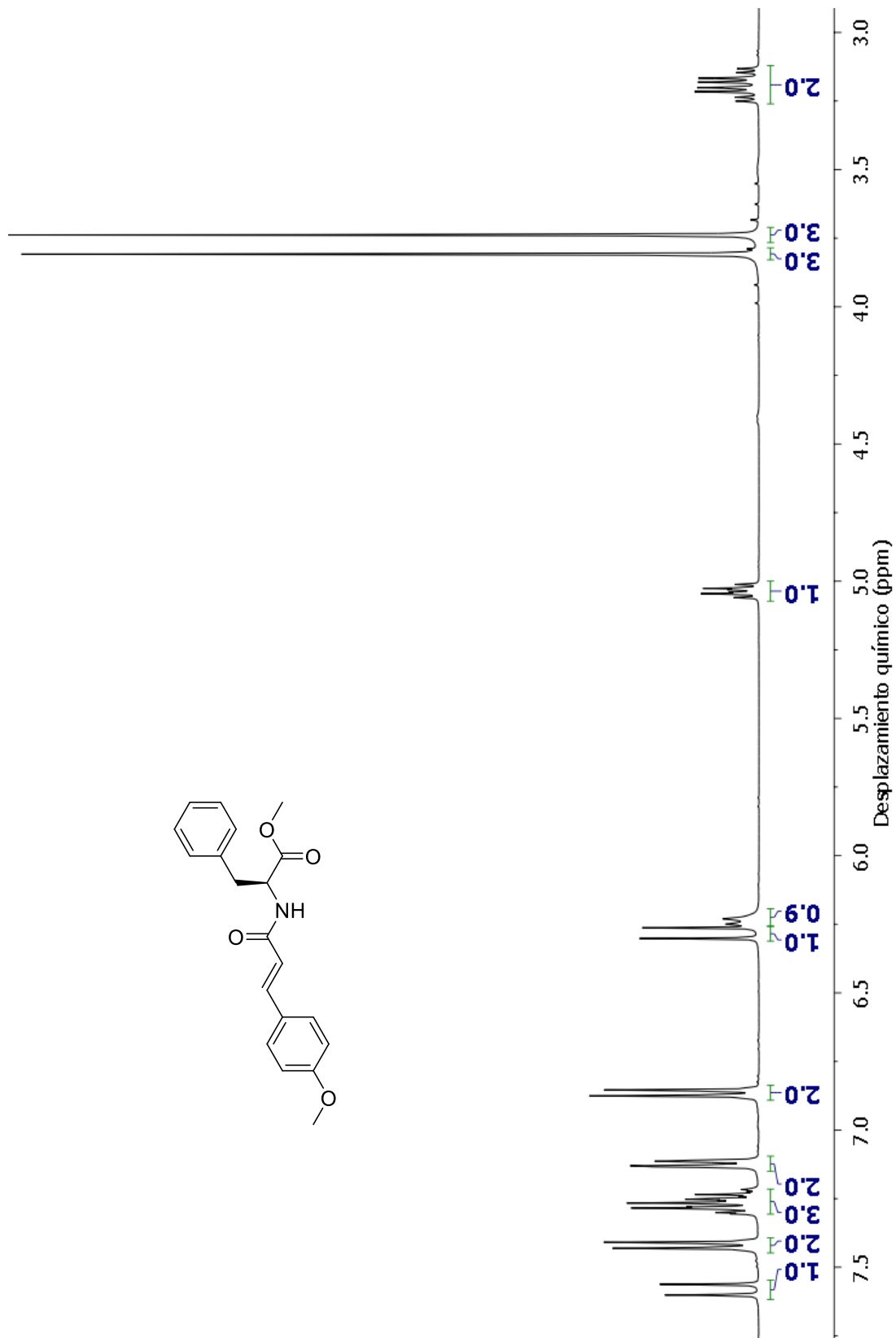


Figura 28 Espectro de RMN ¹H para acrilamida 7c.

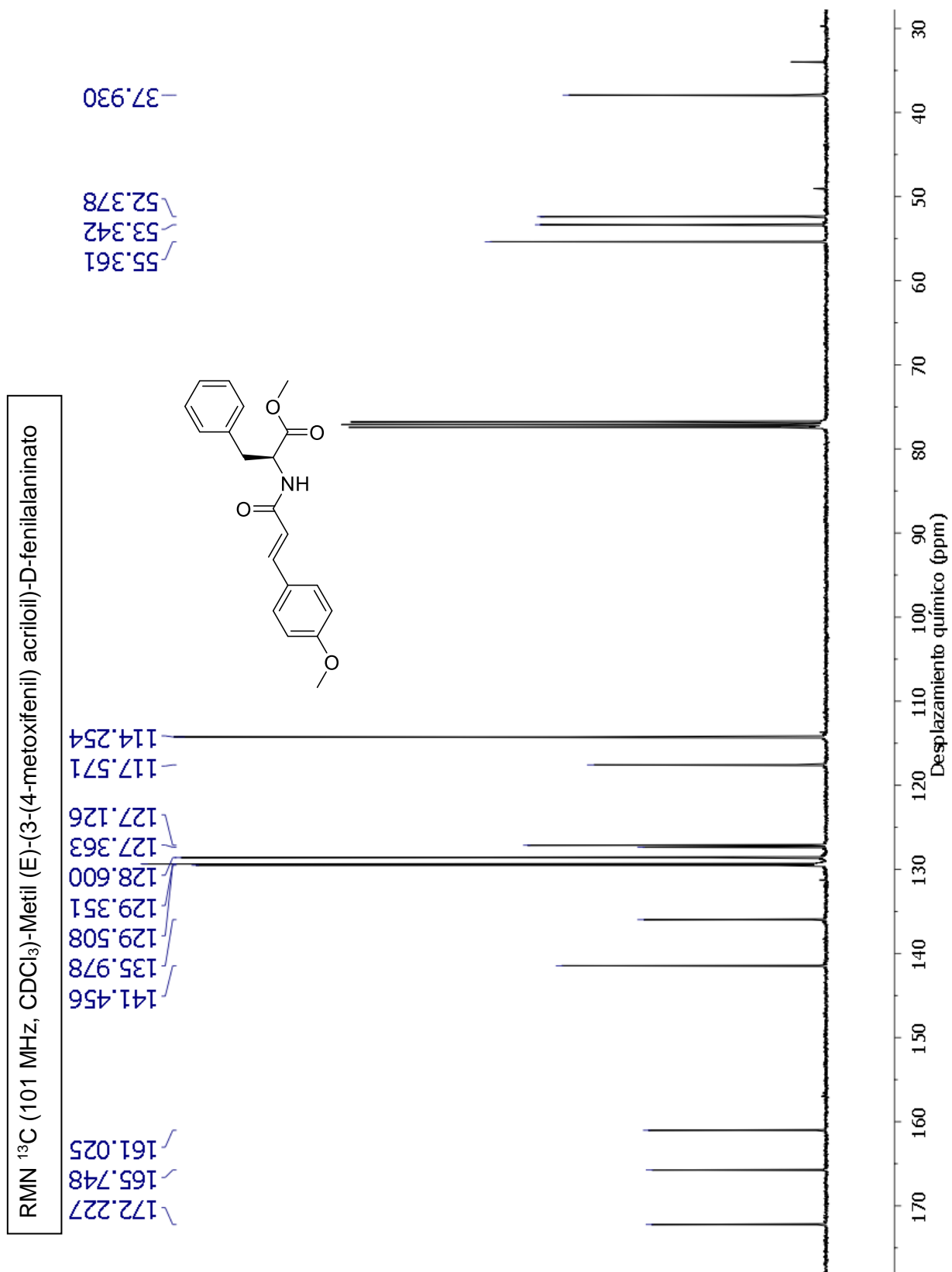


Figura 29. Espectro de RMN ¹³C para acrilamida 7c.

5.1.4.7 Elucidación estructural del acrilato 7d

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **7d**, Figura 30, se describen a continuación.

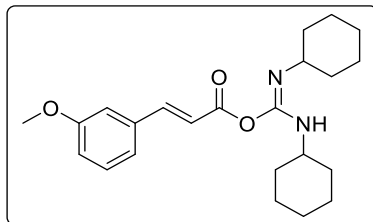


Figura 30. Acrilato 7d.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)], se observaron las siguientes señales, Figura 31: en un desplazamiento químico entre 1.09 y 2.10 ppm se observó un multiplete que integra para 20 protones atribuidos a los metilenos (CH_2) de los dos anillos del ciclohexano presentes en la molécula; a 3.82 ppm se muestra un singulete, que integra para tres protones del grupo metoxilo en posición *meta* del anillo aromático, dicha señal traslapada con otra señal múltiple correspondiente al metino de un anillo de ciclohexano de igual manera que el multiplete que se encuentra entre 4.06 y 4.20 ppm; a 6.72 y 7.62 ppm se observaron dos dobletes con $J=15.4$ Hz que integran cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); a 6.91 ppm aparece un doble de dobles con $J=8.2$ y 2.5 Hz que integra para un protón aromático en posición 4; entre 6.95 y 6.99 ppm se muestra un multiplete que integra para un protón aromático en posición 2; a 7.06 ppm una señal doble con $J=7.8$ Hz que integra para un protón aromático en posición 6 y finalmente a 7.28 ppm un triplete con $J=7.9$ Hz que integra para otro protón aromático en posición 5.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)], presentó las siguientes señales, Figura 32: de 24 a 33 ppm se observaron seis señales correspondientes a los metilenos del ciclohexano; en 50.06 y 56.10 ppm los dos metinos de los ciclohexanos; en 55.33 ppm corresponde la señal al metoxilo del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); entre 113 y 144 ppm los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; a 154.13 ppm se observó la señal del carbono imínico ($\text{C}=\text{N}$) y en 166.58 ppm la señal que corresponde al carbonilo del éster.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)- Anhídrido (E)-N, N'-díciclohexilcarbodimídico-(E)-3-(3-metoxifenil) acrilato

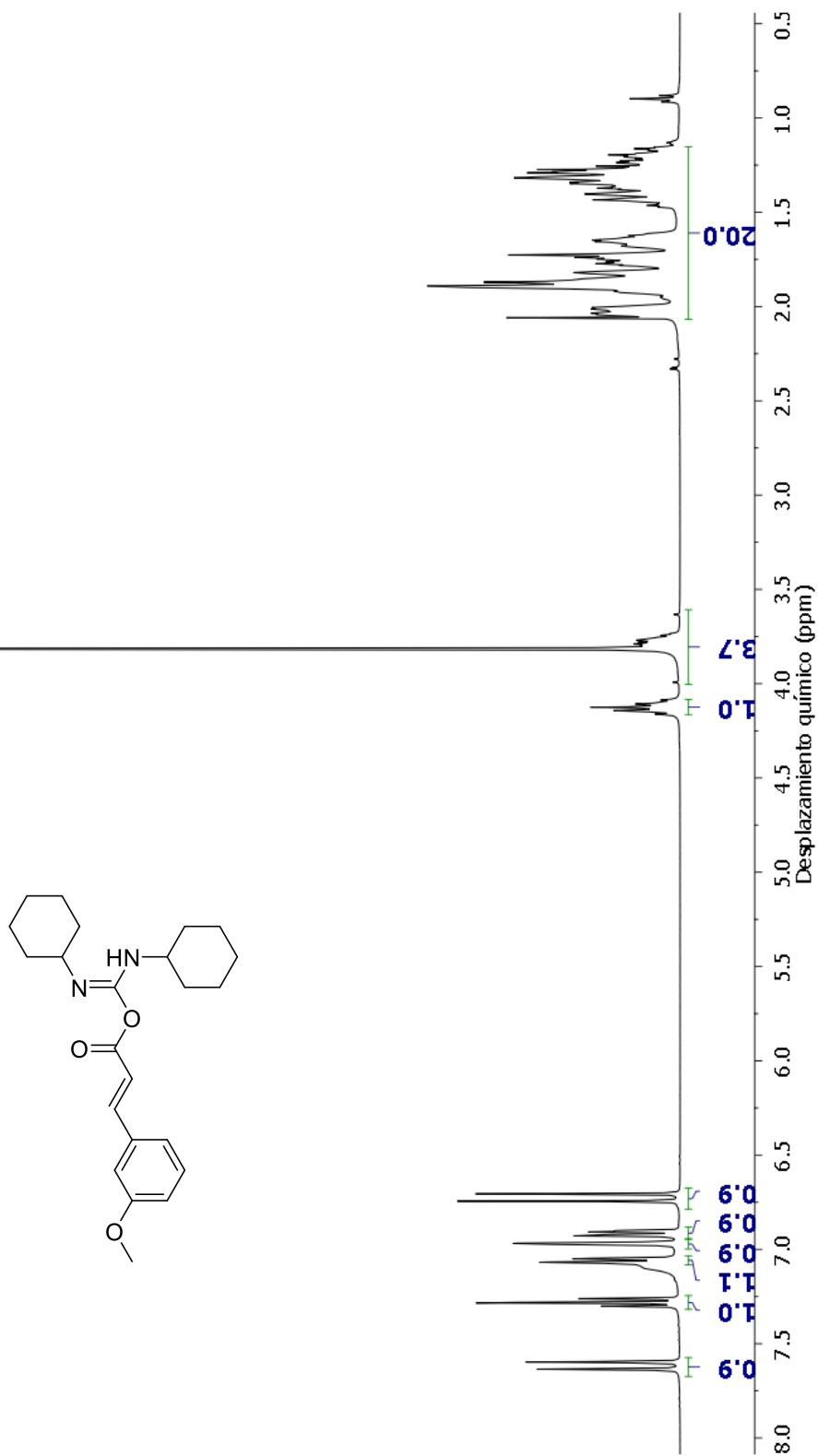


Figura 31. Espectro de RMN ¹H para el acrilato 7d.

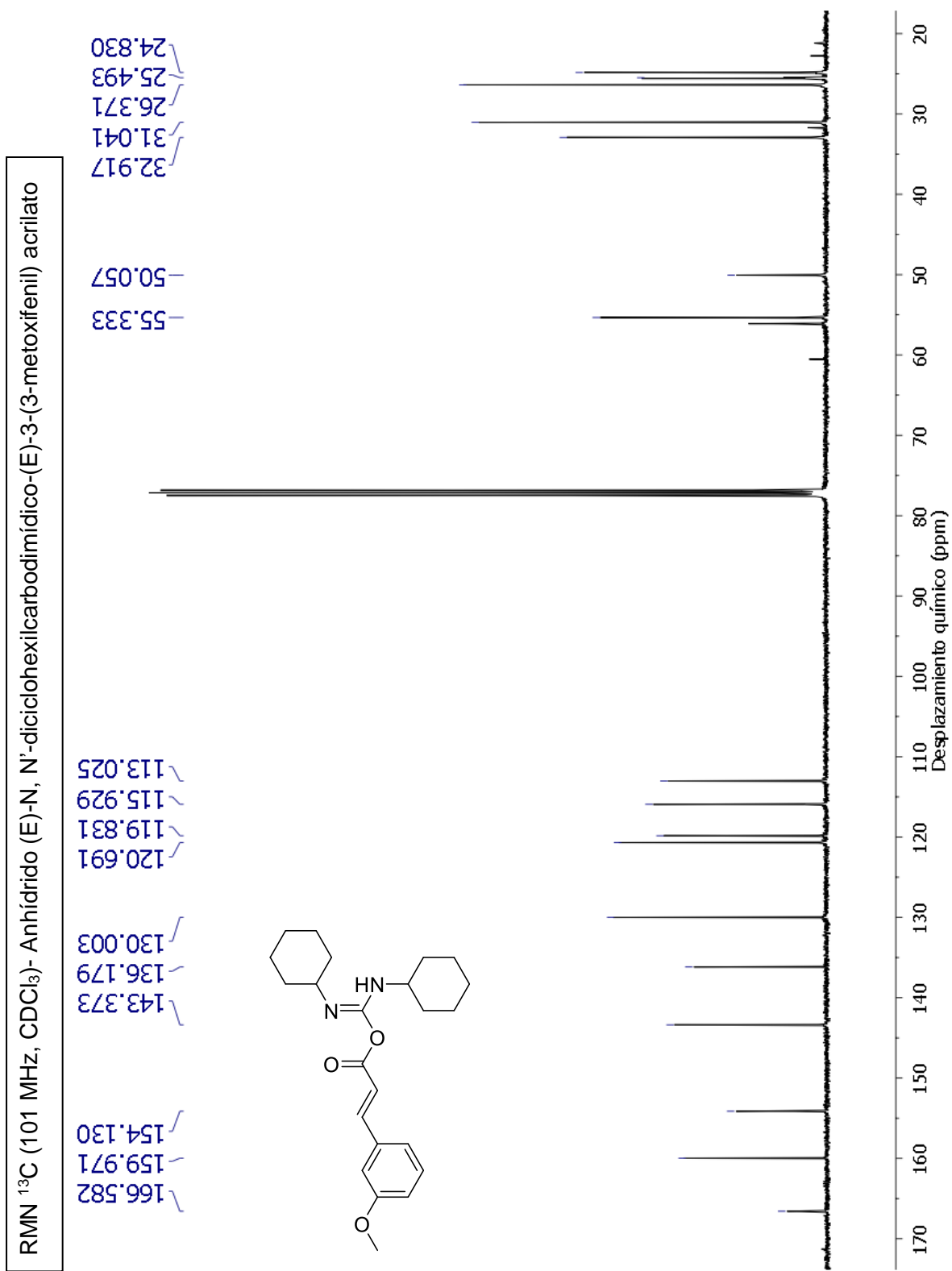
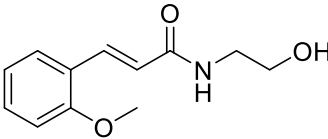
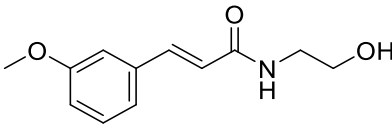
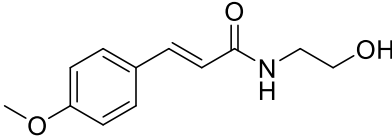
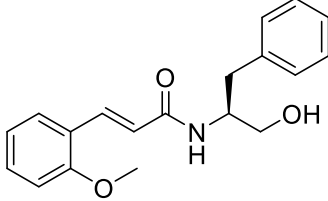


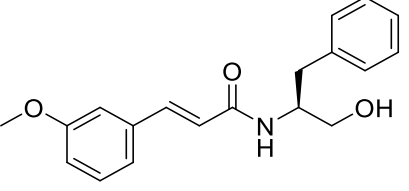
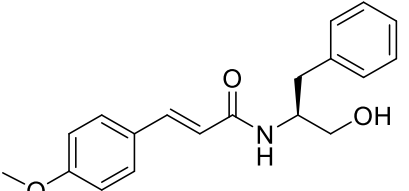
Figura 32. Espectro de RMN ¹³C para el acrilato 7d.

5.1.5 Preparación de las β -hidroxiacrilamidas **8** y **9a-c**

Con las acrilamidas **6** y **7a-c** en mano, se procedió a la obtención de las β -hidroxiacrilamidas **8** y **9a-c** mediante una reacción de reducción con borohidruro de sodio (NaBH_4) y metanol en tetrahidrofurano (THF) como disolvente, a reflujo por 4 h, reduciéndose así el grupo éster a un grupo hidroxilo; los rendimientos de reacción obtenidos fueron variados, desde un 56 hasta un 96 %, Tabla 8. siendo los más bajos los mostrados por los derivados de glicina (**8a-c**) debido a la dificultad para su purificación cromatográfica; por lo que se usó un sistema de elución en gradiente en vez de una columna isocrática; se partió de un sistema AcOEt/Hex en proporciones 1:1, 7:3 y 5:4:1 de Hex/AcOEt/MeOH a 4 volúmenes muertos por cada polaridad.

Tabla 8. Resultado de la síntesis de β -hidroxiacrilamidas **8** y **9a-c**.

Compuesto	Aspecto físico	Punto de Fusión ($^{\circ}\text{C}$)	% Rendimiento
 8a	Sólido blanco cristalino	99-101	96
 8b	Sólido blanco cristalino	49-51	57
 8c	Sólido blanco cristalino	126-128	77
 9a	Sólido blanco cristalino	116-118	62

 <p style="text-align: center;">9b</p>	Sólido blanco cristalino	122-124	91
 <p style="text-align: center;">9c</p>	Sólido blanco cristalino	138-140	80

5.1.5.1 Elucidación estructural de la β -hidroxiacrilamida **8a**

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **8a**, Figura 33, se describen a continuación.

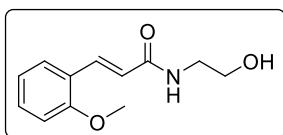


Figura 33. β -hidroxiacrilamida **8a**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, MeOD)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico de 3.42 y 3.66 ppm se observaron dos tripletes con constantes de acoplamiento $J=5.7$ y 5.8 Hz que integra para dos protones cada uno, correspondientes a los dos metilenos (CH_2); a 3.87 ppm se presenta un singulete que integra para tres protones asignado al grupo metoxilo en posición *orto* al anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); en 6.69 y 7.85 ppm se encontraron dos dobletes con $J_{trans}=15.9$ Hz que integra cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); a 6.49 ppm aparece un triple de dobles con $J=7.5$ Hz, que integra para un protón aromático en posición 5; en 7.00 ppm se observó un doble de dobles con $J=8.4$ Hz que integra para un protón que corresponde al protón aromático en posición 3; en 7.33 ppm se encontró un doble de dobles de dobles con $J=8.3$ y 7.3 Hz que integra para un protón aromático correspondiente a la posición 4 y finalmente a 7.52 ppm un doble de dobles con $J=7.7$ Hz para el protón aromático en posición 6.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, MeOD)] presentó las siguientes señales: a 43.16 ppm, correspondiente a la señal del metileno adyacente a la amida; a 55.98 ppm, señal que se asigna al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); a 61.68 ppm se encontró el metileno vecino al grupo hidroxilo; de 112 a 138 ppm los asignados a los carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente, en lugar de las tres últimas señales de las acrilamidas, se observaron solamente dos, esto por la reducción del éster a alcohol; a 159.59 ppm el carbono en posición 2 del sistema aromático, vecino al metoxilo y en 169.51 ppm la señal que corresponde al carbono carbonílico de la amida.

5.1.5.2 Elucidación estructural de la β -hidroxiacrilamida **8b**

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **8b**, Figura 34, se describen a continuación.

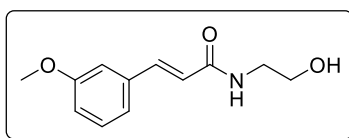


Figura 34. β -hidroxiacrilamida **8b**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, MeOD)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico de 3.45 y 3.69 ppm se observaron dos tripletes con constantes de acoplamiento de $J=5.7$ Hz que integra cada uno para dos protones, correspondientes a los dos metilenos; a 3.82 ppm se muestra un singulete que integra para tres protones que corresponden al grupo metoxilo en posición *meta* del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); en 6.64 y 7.51 ppm se encontraron dos dobletes de constante $J_{trans}=15.8$ Hz que integra cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); a 6.94 ppm se encontró un triple de dobles con $J=8.2$ y 2.6 Hz, que integra a un protón aromático en posición 4; en 7.10 ppm se observó un triplete con $J=2.1$ Hz que igualmente integra para un protón aromático en posición 2; en 7.14 ppm aparece un doblete con $J=7.6$ Hz que integra para un protón aromático en posición 6 y finalmente a 7.30 ppm otro triplete con $J=7.9$ para el protón aromático en posición 5.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, MeOD)] presentó las siguientes señales: a 41.81 ppm, corresponde a la señal del metileno adyacente a la amida; a 54.36 ppm, aparece el metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); a 60.26 ppm se encontró el metileno vecino al grupo hidroxilo; de 112 a 141 ppm los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente, solo se observan dos señales, a 160.12 ppm, el carbono en posición 3 del sistema aromático y en 167.50 ppm, la señal que corresponde al carbonilo de la amida.

5.1.5.3 Elucidación estructural de la β -hidroxiacrilamida **8c**

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **8c**, Figura 35, se describen a continuación.

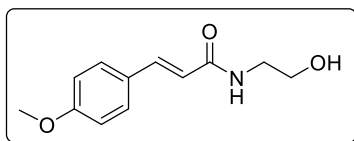


Figura 35. β -hidroxiacrilamida **8c**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, MeOD)], se observaron las siguientes señales, Figura 36: de 3.42 y 3.66 ppm se muestran dos tripletes con $J=5.7$ y 5.8 Hz que integra para dos protones cada uno, correspondientes a los dos metilenos; a 3.80 ppm se muestra un singulete que integra para tres protones asignado al grupo metoxilo en posición *para* del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); en 6.49 ppm se encontró un doblete de constante $J_{trans}=15.8$ Hz que integra para un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); de 6.92 ppm se presenta un doblete con $J=8.8$ Hz que integra para dos protones aromáticos; en 7.48 ppm otro multiplete que integra para dos protones aromáticos y un protón vinílico solapado.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, MeOD)], presentó las siguientes señales, Figura 37: en 41.78 ppm, corresponde a la señal del metileno vecino a la amida; a 54.43 ppm, el metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); a 60.32 ppm, se encontró el metileno vecino al hidroxilo; de 113 a 141 ppm, los carbonos

vinílicos y aromáticos; finalmente a 161.19 ppm, el carbono aromático en posición 4 y en 167.96 ppm, correspondiente a la amida.

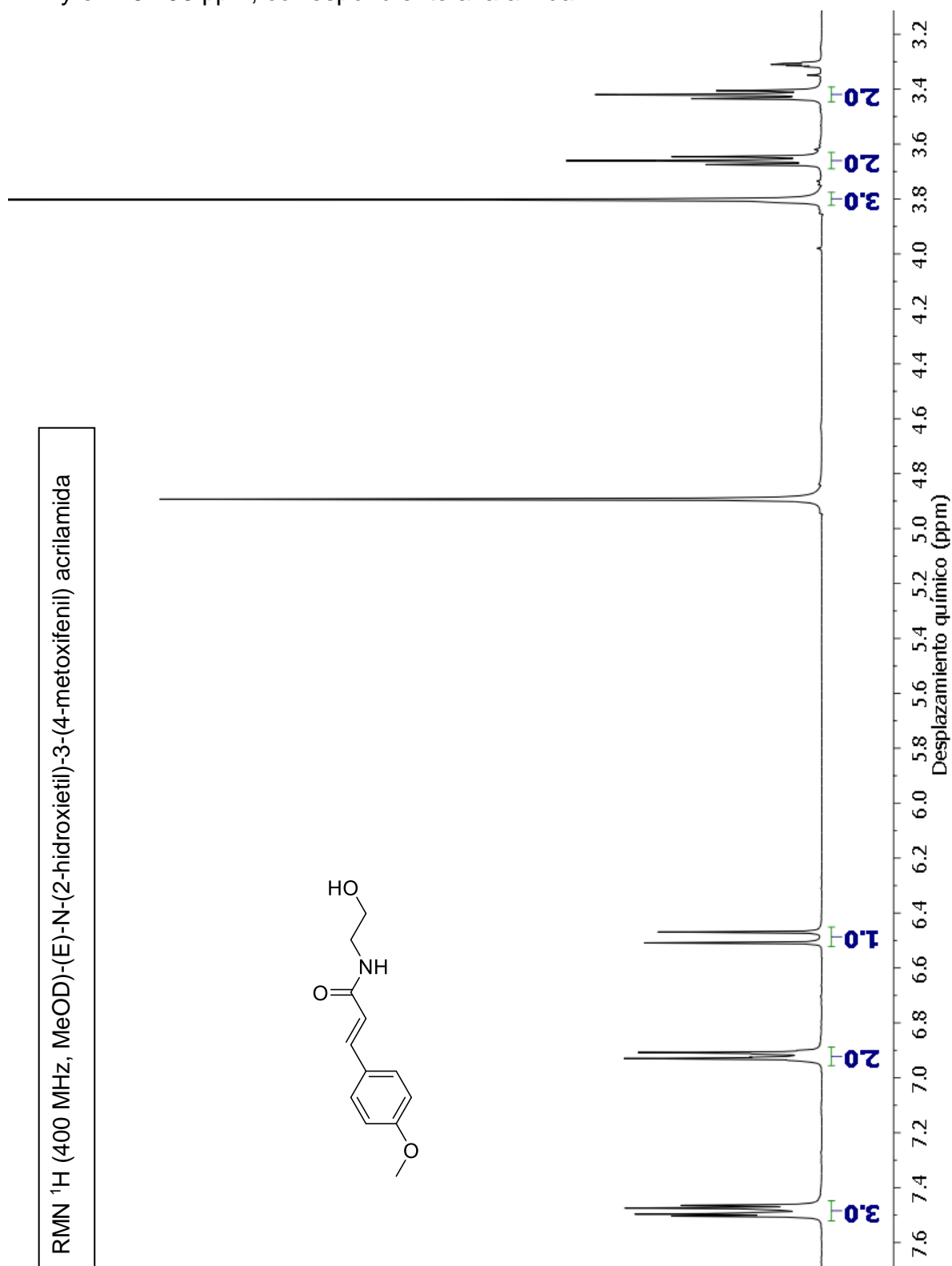


Figura 36. Espectro de RMN ¹H para β-hidroxiacrilamida 8c.

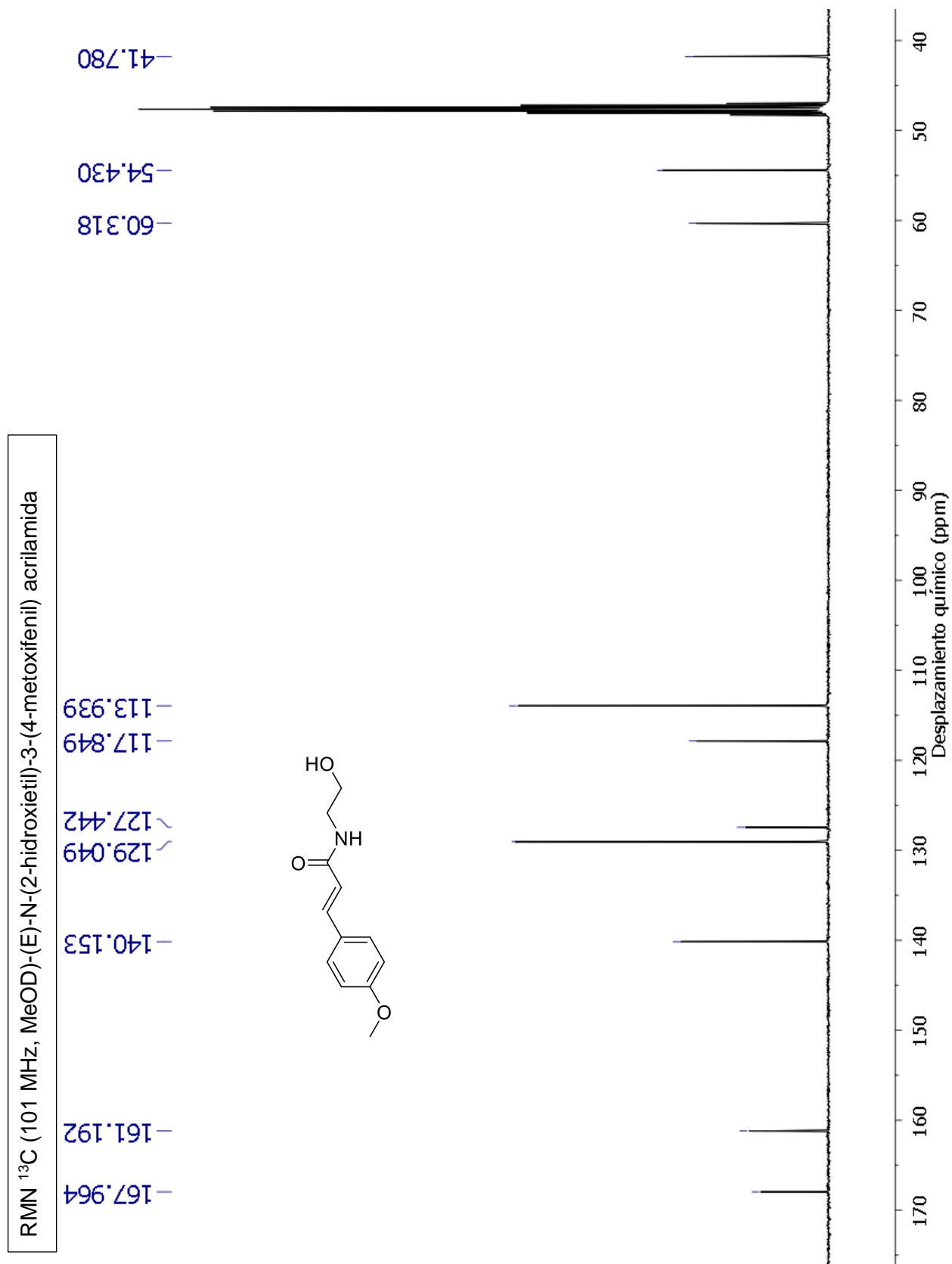


Figura 37. Espectro de RMN ¹³C para β-hidroxiacrilamida **8c**.

5.1.5.4 Elucidación estructural de la β -hidroxiacrilamida **9a**

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **9a**, Figura 38, se describen a continuación.

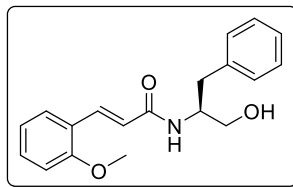


Figura 38. β -hidroxiacrilamida **9a**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, MeOD)] se observaron las siguientes señales: de 2.83 y 2.99 ppm se muestran dos dobles de dobles, con $J=13.8$, 8.0 y 6.4 Hz que integra para dos protones que corresponden al metileno bencílico ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); de 3.68 a 3.51 ppm aparece un multiplete que integra para dos protones asignado al metileno vecino al hidroxilo (CH_2OH); a 3.88 ppm se observó un singulete que integra para tres protones correspondientes al grupo metoxilo ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); de 4.33 a 4.19 ppm un multiplete que integra para un protón que corresponde al metino quiral (CHBn); a 6.68 y 7.82 ppm se observaron dos dobletes con $J_{trans}=15.9$ Hz, que integra cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); en 6.95 ppm un triple de dobles con constante de acoplamiento de $J=7.5$ Hz que integra para un protón aromático; en 7.01 ppm se muestra un doble de dobles con, $J=8.4$ Hz que integra para otro protón aromático; de 7.16 a 7.35 ppm se observó un multiplete correspondiente a señales aromáticas y finalmente en 7.52 ppm un doble de dobles con $J=7.7$ Hz, que integra para un protón aromático.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)] presentó las siguientes señales: a 38.01 ppm, correspondiente a la señal del metileno bencílico ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); a 54.37 ppm, el carbono del metino quiral; en 55.98 ppm, la señal asignada al metoxilo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); a 64.13 ppm, el carbono del metileno vecino al hidroxilo (CH_2OH); entre 112 y 140 ppm se encontraron los carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente dos señales, a 159.58 ppm el carbono en posición 2 del sistema aromático y a 169.02 ppm la señal que corresponde al carbono carbonílico de la amida.

5.1.5.5 Elucidación estructural de la β -hidroxiacrilamida **9b**

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **9b**, Figura 39, se describen a continuación.

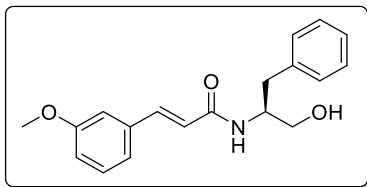


Figura 39. β -hidroxiacrilamida **9b**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, MeOD)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico de 2.82 y 2.99 ppm se observan dos dobles de dobles con $J=13.8$, 8.0 y 6.4 Hz que integran para dos protones, corresponden al metileno bencílico ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); de 3.56 a 3.65 ppm un multiplete que integra para dos protones asignado al metileno vecino al hidroxilo (CH_2OH); a 3.81 ppm se observó un singulete que integra para tres protones correspondientes al metoxilo ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); de 4.27 ppm un multiplete que integra para un protón que corresponde al metino quiral (CHBn); a 6.61 y 7.46 ppm se observaron dos dobletes con $J_{trans}=15.7$ Hz, que integra cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); en 6.93 ppm un triple de dobles con $J=8.3$ y 2.6 Hz que integra para un protón aromático; de 7.04 a 7.32 ppm se muestran diversos multipletes que integran para ocho protones aromáticos de los dos anillos.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)] presentó las siguientes señales: a 36.66 ppm, correspondiente a la señal del metileno bencílico ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); a 53.02 ppm, el metino quiral; en 54.33 ppm, la señal asignada al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); a 62.75 ppm al carbono del metileno vecino al hidroxilo (CH_2OH); entre 112 y 141 ppm se encontraron los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente dos señales, a 160.11 ppm el carbono en posición 3 del sistema aromático y a 166.98 ppm las señal que corresponde al carbono carbonílico de la amida.

5.1.5.6 Elucidación estructural de la β -hidroxiacrilamida **9c**

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **9c**, Figura 40, se describen a continuación.

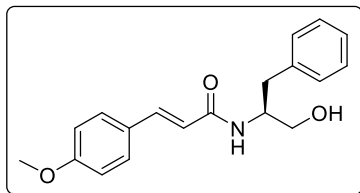


Figura 40. β -hidroxiacrilamida **9c**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)], se observaron las siguientes señales, Figura 41: en 2.94 ppm se muestra una señal doble con $J=7.2$ Hz que integra para dos protones correspondientes al metileno bencílico ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); en 3.64 y 3.74 ppm se observaron dos dobles de dobles, con $J=11.2$, 5.2 y 3.6 Hz que integran para un protón cada uno del metileno vecino al grupo hidroxilo (CH_2OH); a 3.80 ppm se presenta un singulete que integra para tres protones correspondientes al grupo metoxilo ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); de 4.31 ppm un multiplete que integra para el protón quiral (CHBn); a 6.10 ppm un doblete ancho con $J=7.7\text{Hz}$ que integra para el protón de la amida; en 6.23 y 7.54 ppm se observaron dobletes con $J_{\text{trans}}=15.6$ Hz, que integra cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); en 6.84 y 7.38 ppm una señal doble con $J=8.7$ Hz que integra cada una para dos protones aromáticos; de 7.21 a 7.33 ppm se muestra un multiplete que integran para cinco protones aromáticos.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)], Figura 42, presentó las siguientes señales: a 37.07 ppm correspondiente a la señal del metileno del grupo bencilo ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) a 53.15 ppm la señal correspondiente al carbono del metino (CH) en el centro quiral; en 55.35 ppm la señal asignada al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); a 64.25 ppm el carbono del metileno vecino al hidroxilo (CH_2OH); entre 114 y 142 ppm se encontraron los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente dos señales, a 160.99 ppm el carbono en posición 4 del sistema aromático, adyacente al grupo metoxilo y a 166.95 ppm las señal que corresponde al carbono carbonílico de la amida.

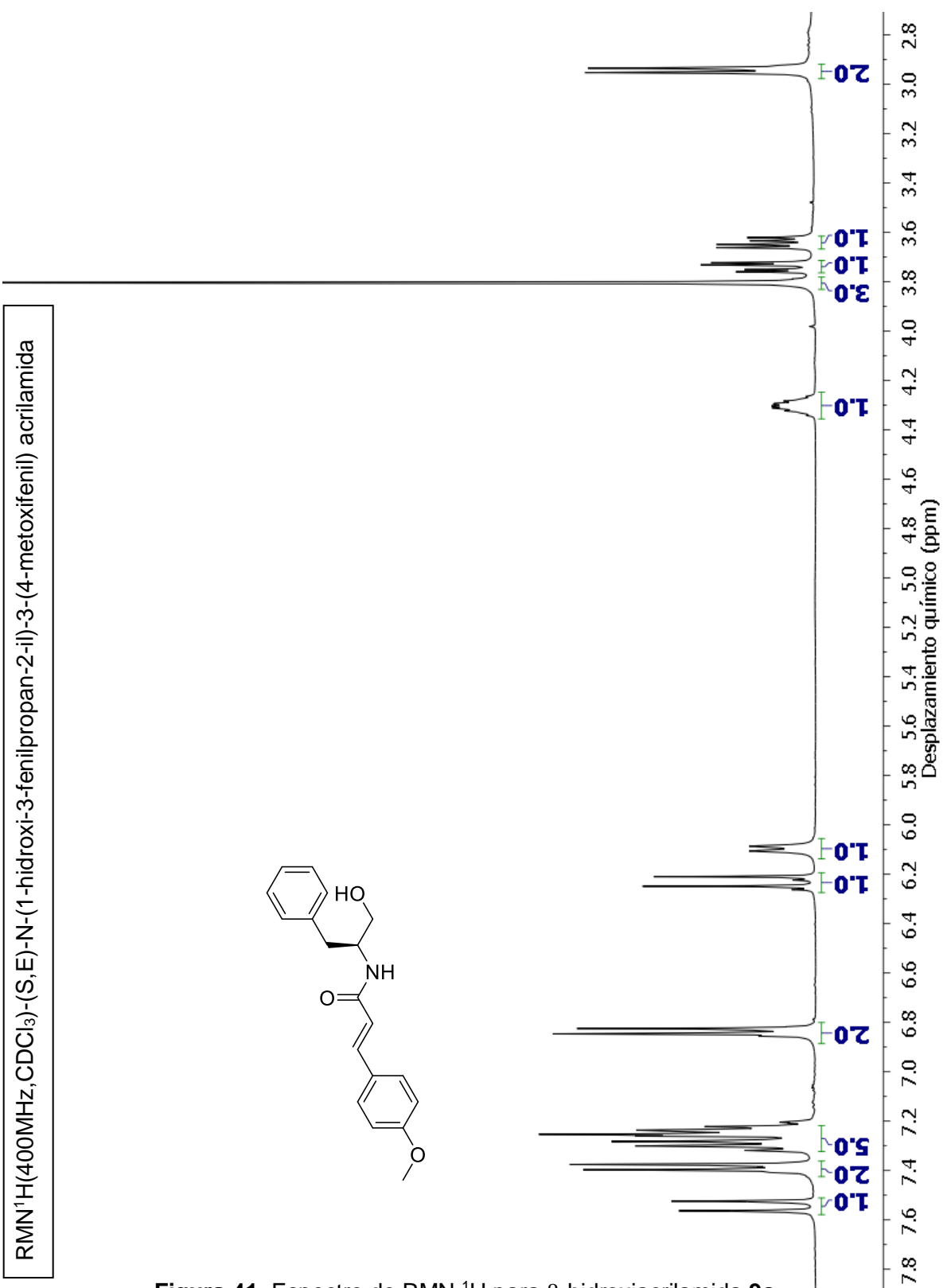


Figura 41. Espectro de RMN ¹H para β-hidroxiacrilamida **9c**.

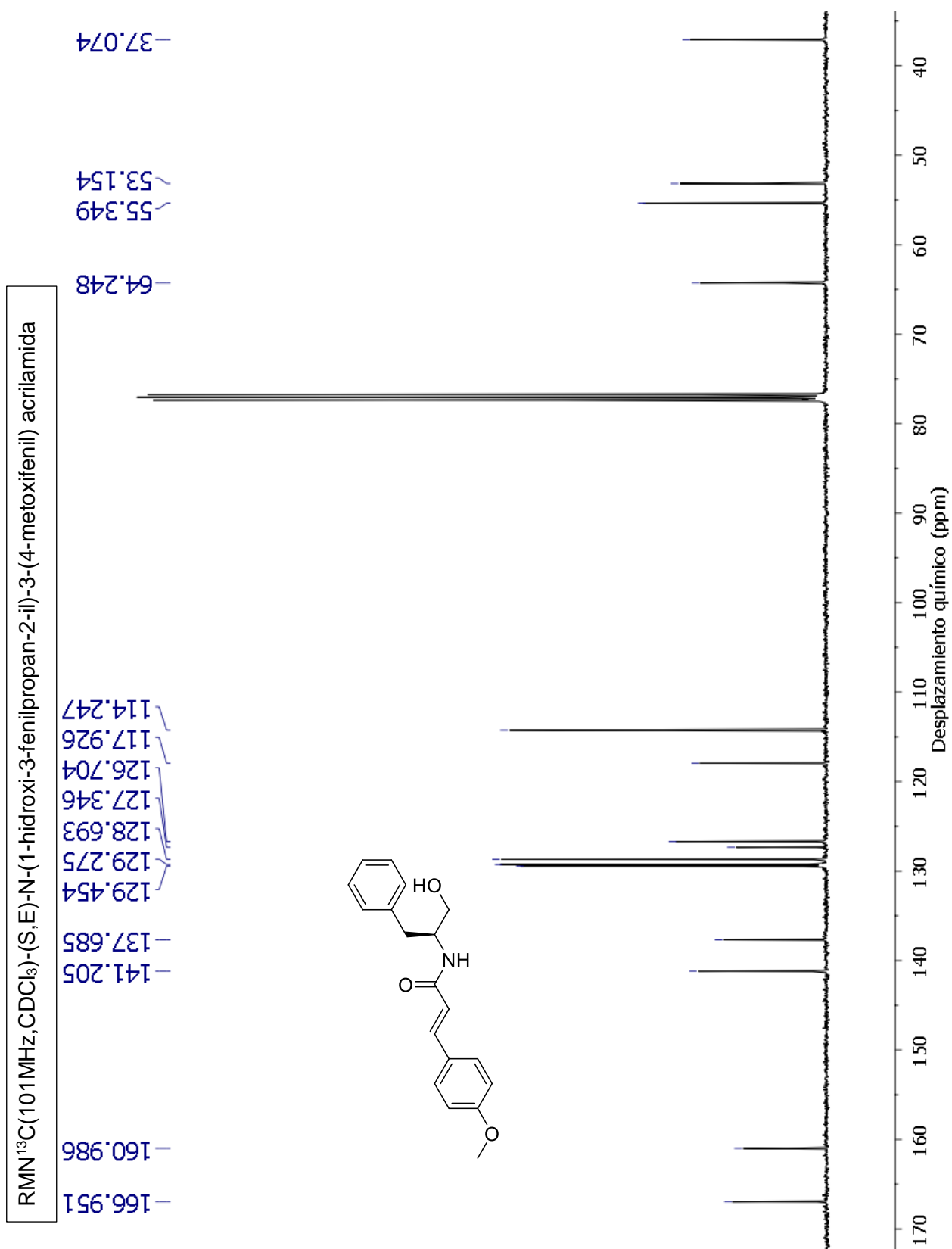
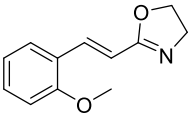
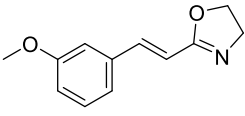
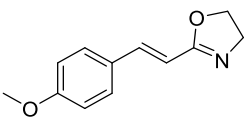
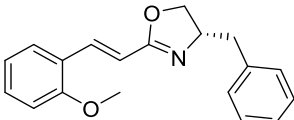


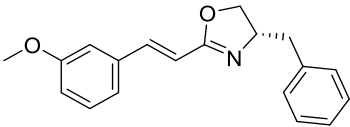
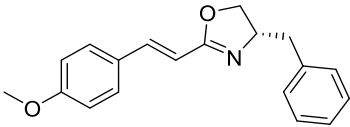
Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C para β -hidroxiacrilamida **9c**.

5.1.6 Preparación de las oxazolinas **10** y **11a-c**

Finalmente, las oxazolinas **10** y **11a-c** se obtuvieron mediante una O-alkilación utilizando el reactivo de fluorinización, Deoxo-flúor® por 30 minutos a -20 °C en diclorometano (CH₂Cl₂) como disolvente, obteniéndose rendimientos de bajos a moderados (20 a 81 %), Tabla 9, siendo de nuevo los derivados de glicina **10a-c** los que muestran rendimientos más pobres. Estos inconvenientes han sido reportados en la literatura por otros autores [28, 33, 43, 49] sin embargo, es observable que los derivados de la L-fenilalanina **11a-c** presentan una ligera mejoría en los rendimientos, lo cual se atribuye posiblemente a la estabilidad generada por el anillo de fenilo durante la reacción de ciclación y su efecto estérico; aunado a esto, al momento de purificar los respectivos productos en columna cromatográfica nos percatamos de que las oxazolinas, en especial las derivadas de glicina **10a-c** parecen ser más susceptibles a apertura del anillo oxazolínico, lo que se ve reflejado en un menor rendimiento.

Tabla 9. Resultado de la síntesis de oxazolinas **10** y **11a-c**.

Compuesto	Aspecto físico	Punto de Fusión (°C)	% Rendimiento
 10a	Sólido blanco cristalino	57-59	41
 10b	Sólido blanco cristalino	84-86	25
 10c	Sólido blanco cristalino	97-99	20
 11a	Resina naranja	ND	81

 <p style="text-align: center;">11b</p>	Resina rojiza	ND	61
 <p style="text-align: center;">11c</p>	Sólido amarillo cristalino	71-73	54

5.1.6.1 Elucidación estructural de la oxazolina 10a

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **10a**, Figura 43, se describen a continuación.

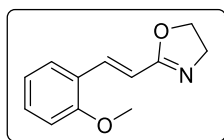


Figura 43. Oxazolina **10a**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico de 3.83 ppm se observó un singulete que integra para tres protones que corresponden al grupo metoxilo en posición *orto* del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); a 3.95 y 4.30 ppm aparecen dos tripletes con constante de acoplamiento $J=9.4$ Hz que integra para dos protones cada uno, correspondientes a los dos metilenos (CH_2) que conforman el heterociclo; en 6.73 y 7.67 ppm se muestran dos dobletes con $J_{\text{trans}}=16.4$ Hz que integran cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); a 6.87 ppm se encontró un doble de dobles con $J=8.3$ Hz, que integra para un protón, correspondiente al protón aromático en posición 5; en 6.93 ppm se observó un triple de dobles con $J=7.5$ Hz que integra para un protón asignado al protón aromático en posición 3; en 7.28 ppm un doble de doble de dobles con $J=8.8, 7.4$ Hz que integra para un protón aromático que corresponde a la posición 4 y finalmente a 7.48 ppm un doble de dobles con $J=7.7$ Hz para el protón aromático en posición 6.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)] presentó las siguientes señales: a 54.68 y 67.03 ppm corresponden los carbonos de los metilenos que conforman el heterociclo; a 55.27 ppm, señal asignada al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); de 110 a 136 ppm los carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente en 157.63 ppm se encontró la señal del carbono aromático en posición 2 y en 164.81 ppm el carbono imínico de la oxazolina ($\text{O}-\text{C}=\text{N}$).

5.1.6.2 Elucidación estructural de la oxazolina 10b

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **10b**, Figura 44, se describen a continuación.

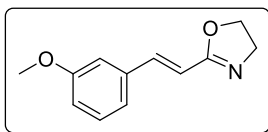


Figura 44. Oxazolina 10b.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico a 3.80 ppm se muestra un singulete que integra para tres protones que corresponden al grupo metoxilo en posición *meta* del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); a 3.97 y 4.32 ppm se muestran dos tripletes con $J=9.4$ Hz que integra para dos protones cada uno, asignados a los dos metilenos que conforman el heterociclo; en 6.63 ppm se encontró un doblete con $J_{trans}=16.2$ Hz que integra para un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$), el otro se encuentra traslapado con las señales aromáticas; a 6.87 ppm aparece un doble de dobles con $J=8.2$ y 2.6 Hz, que integra para un protón aromático; en 7.00 ppm se observó un triplete con $J=2.1$ Hz que integra para otro protón aromático; en 7.07 ppm una señal doble con $J=7.6$ Hz que integra para un protón aromático más; finalmente, entre 7.20 y 7.37 ppm se encontró un multiplete que integra para dos protones, uno aromático y el otro vinílico.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)] presentó las siguientes señales: a 54.92 y 67.23 ppm corresponden a los carbonos de los metilenos en el heterociclo; a 55.22 ppm, señal asignada al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); de 112 a 140 ppm los correspondientes carbonos vinílicos

y aromáticos; finalmente, en 159.87 ppm se encontró la señal del carbono aromático en posición 3 y a 164.30 ppm el carbono imínico de la oxazolina (O-C=N).

5.1.6.3 Elucidación estructural de la oxazolina 10c

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **10c**, Figura 45, se describen a continuación.

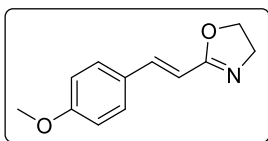


Figura 45. Oxazolina **10c**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)], se observaron las siguientes señales, Figura 46: en un desplazamiento químico a 3.82 ppm se muestra un singulete que integra para tres protones que corresponden al grupo metoxilo en posición *para* del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); a 3.97 y 4.32 ppm se observan dos tripletes con $J=9.3$ Hz que integran para dos protones cada uno, correspondientes a los dos metilenos que conforman el heterociclo; en 6.51 y 7.31 ppm se encontraron dos dobletes de constante $J_{\text{trans}}=16.2$ Hz que integra para un protón vinílico cada uno ($\text{CH}=\text{CH}$); a 6.89 y 7.43 ppm aparecen dos señales dobles con $J=8.76$ Hz, que integran cada señal para dos protones aromáticos.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)], Figura 47, presentó las siguientes señales: a 54.91 y 67.22 ppm, corresponden a los carbonos de los metilenos que conforman el heterociclo; a 55.39 ppm, señal asignada al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); de 112 a 140 ppm los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente en 160.76 ppm se encontró la señal del carbono aromático en posición 4 y a 164.70 ppm el carbono imínico de la oxazolina (O-C=N).

RMN¹H(400MHz, CDCl₃)-(E)-2-(4-metoxiestiril)-4,5-dihidrooxazol

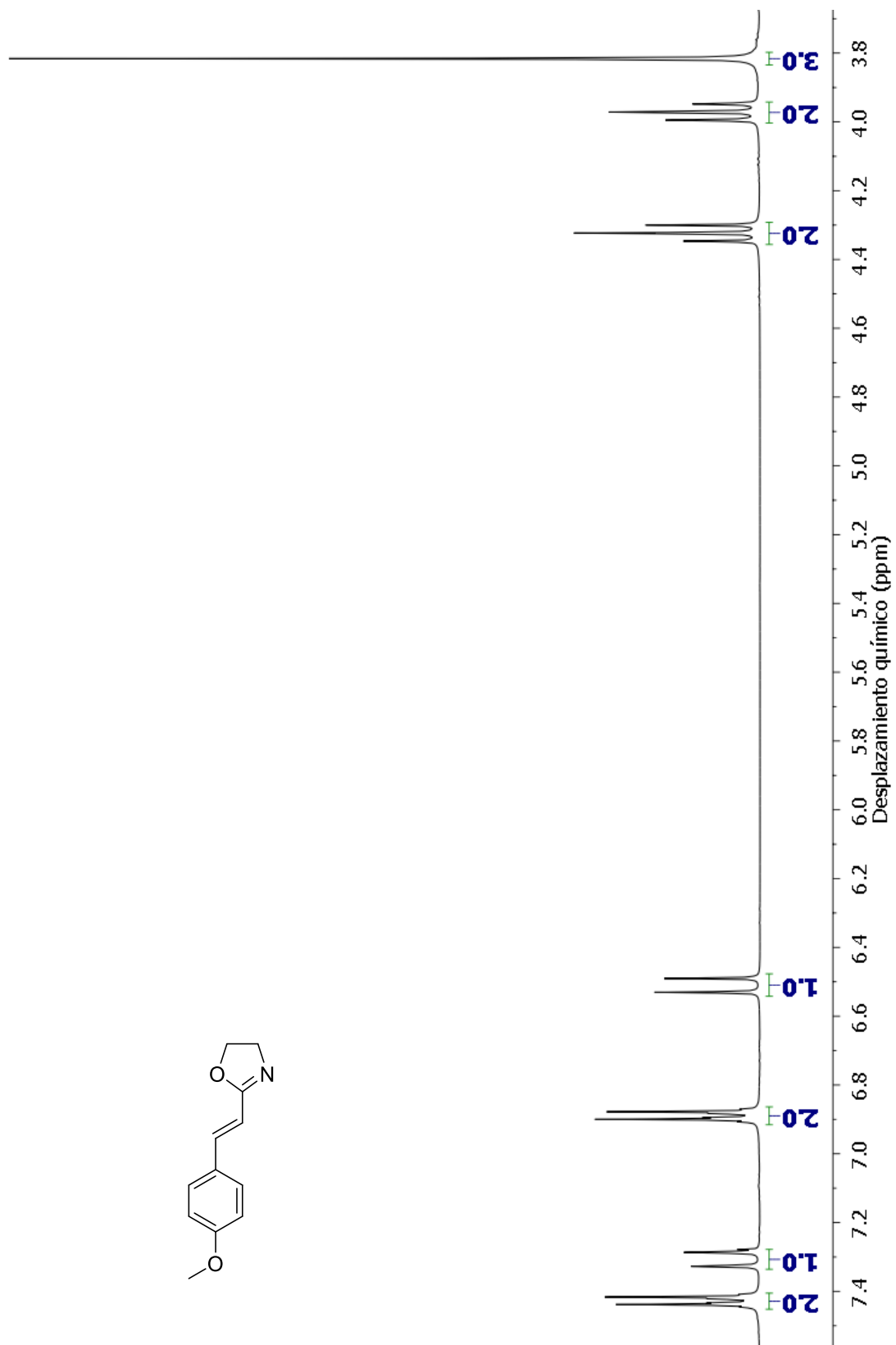
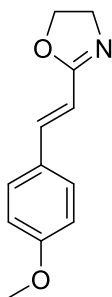


Figura 46. Espectro de RMN ¹H para la oxazolina 10c.

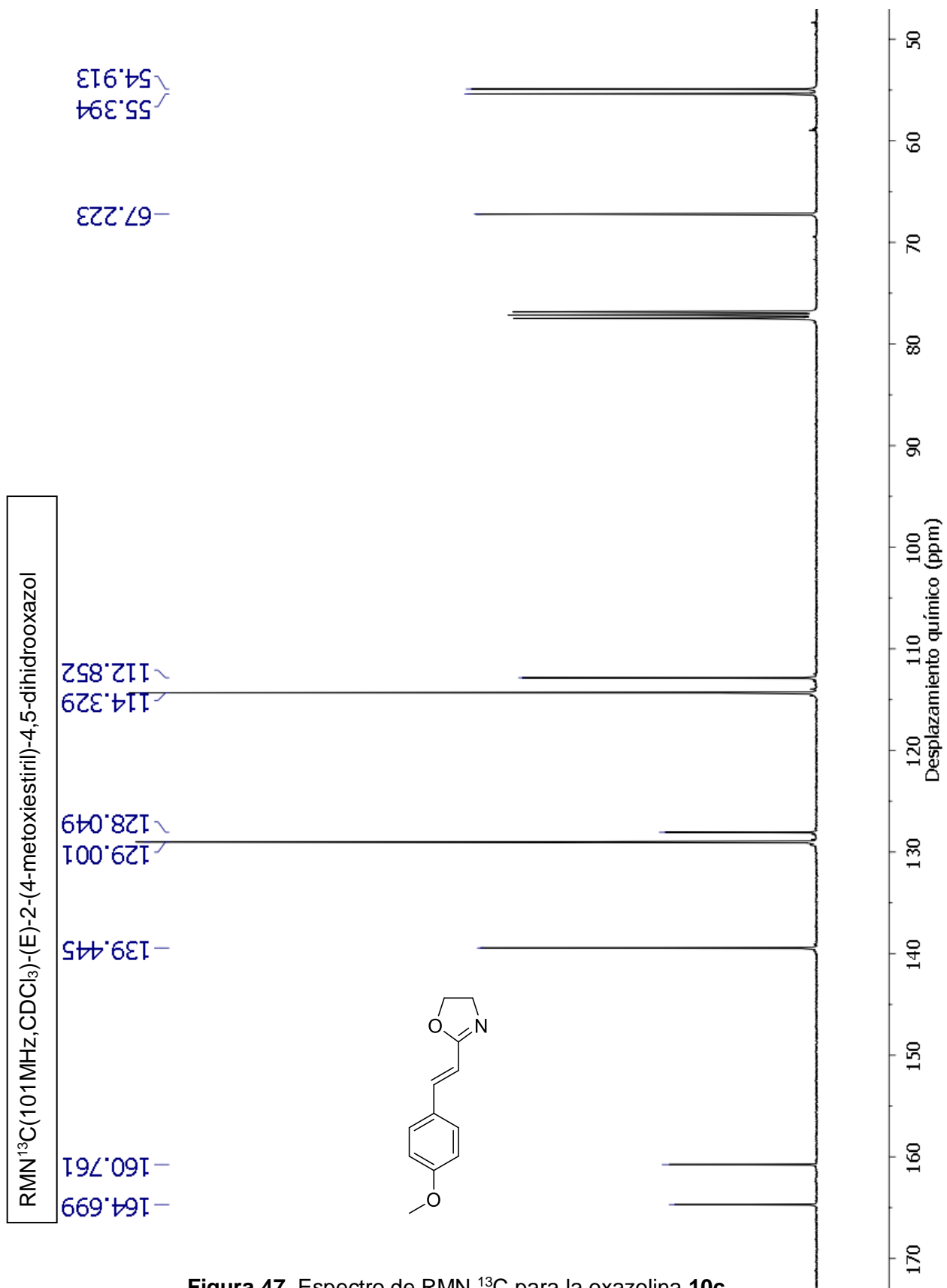


Figura 47. Espectro de RMN ¹³C para la oxazolina 10c.

5.1.6.4 Elucidación estructural de la oxazolina 11a

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **11a**, Figura 48, se describen a continuación.

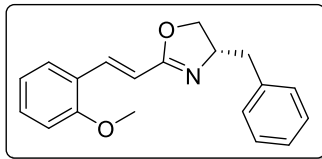


Figura 48. Oxazolina **11a**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico de 2.69 y 3.15 ppm se observaron dos dobles de dobles $J=13.75$, 8.6 y 5.5 Hz que integran cada uno para un protón, correspondientes al metileno del bencilo ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); en 3.82 ppm se muestra un singulete que integra para tres protones asignado al grupo metoxilo en posición *orto* del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); a 4.02 y 4.25 ppm aparecen dos dobles de dobles con $J=9.3$, 8.4 y 7.4 Hz que integran para un protón cada uno, correspondientes a los dos protones del metileno del heterociclo; a 4.49 ppm se encontró una señal múltiple que integra para un protón que corresponde al grupo metino quiral (CHBn); en 6.76 y 7.66 ppm aparecen dos dobletes con $J_{\text{trans}}=16.4$ Hz que integra cada uno a un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); a 6.86 ppm se encontró un doble de dobles con $J=8.4$ Hz, que integra para un protón correspondiente al protón aromático en posición 5; en 6.93 ppm se observó un triple de dobles con $J=7.5$ Hz que integra para un protón que corresponde al protón aromático en posición 3; de 7.14 a 7.35 ppm se muestra un multiplete que integra para 6 protones aromáticos y finalmente en 7.47 ppm un doble de dobles con $J=7.7$ y Hz, que integran para otro protón aromático.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)] presentó las siguientes señales: a 41.78 ppm, corresponden a la señal del metileno bencilico ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); a 55.35 ppm, señal asignada al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); en 67.59 ppm, correspondiente al carbono del metino quiral (CHBn); en 71.46 ppm se observó el carbono del metileno en el heterociclo; de 110 a 140

ppm los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente en 157.76 ppm se encontró la señal del carbono aromático en posición 2 y a 164.29 ppm el carbono imínico de la oxazolina (O-C=N).

5.1.6.5 Elucidación estructural de la oxazolina 11b

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **11b**, Figura 49, se describen a continuación.

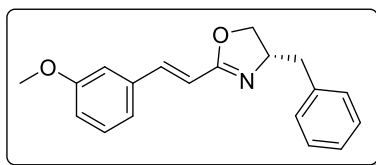


Figura 49. Oxazolina 11b.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)] se observaron las siguientes señales: en un desplazamiento químico a 2.68 y 3.12 ppm se muestran dos dobles de dobles con constantes de acoplamiento $J=13.75$, 8.4 y 5.7 Hz que integran cada uno para un protón, correspondientes a los protones del metileno del bencilo ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); en 3.73 ppm aparece un singulete que integra para tres protones que corresponde al grupo metoxilo en posición *meta* del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); a 3.99 y 4.2 ppm se observaron dos tripletes con constante de acoplamiento $J=8.8$ y 7.9 Hz que integran para un protón cada uno, correspondientes a los dos protones del metileno (CH_2CH) presente en el heterociclo; de 4.40 a 4.53 ppm se encontró una señal múltiple que integra para un protón asignada al grupo metino quiral (CHBn); a 6.65 ppm se encuentra un doblete de constante $J_{trans}=16.2$ Hz que integra para un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); a 6.84 ppm se encuentra un doble de dobles con $J=8.3$ y 2.6 Hz, que integra para un protón correspondiente al protón aromático; en 6.98 ppm se observó un triplete con $J=2.0$ Hz que integra para otro protón aromático; a 7.04 ppm se encontró una señal doble con $J=7.6$ Hz que integra igualmente para un protón aromático y finalmente de 7.14 a 7.38 ppm se muestra un multiplete para siete protones correspondientes al anillo aromático (C_6H_5) y traslapados con otros protones, tanto vinílicos como aromáticos.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)] presentó las siguientes señales: a 41.57 ppm corresponden a la señal del metileno en el bencilo ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); a 54.96 ppm, señal asignada al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); en 67.52 ppm correspondiente al carbono del metino quiral (CHBn); en 71.37 ppm se observó la señal referente al carbono del metileno en el heterociclo; de 112 a 140 ppm los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente en 159.70 ppm se encuentra la señal del carbono aromático en posición 3, y a 163.45 ppm el carbono imínico de la oxazolina ($\text{O}-\text{C}=\text{N}$).

5.1.6.6 Elucidación estructural de la oxazolina 11c

La asignación de las señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono del compuesto **11c**, Figura 50, se describen a continuación.

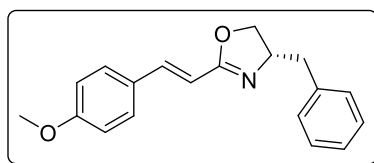


Figura 50. Oxazolina **11c**.

En el espectro de protón [RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)], se observaron las siguientes señales, Figura 51: en un desplazamiento químico a 2.70 y 3.17 ppm se observaron dos dobles de dobles con constantes de acoplamiento $J=13.75$, 8.6 y 5.5 Hz que integran cada uno para un protón, correspondientes a los protones del metileno del bencilo ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); en 3.82 ppm se muestra un singulete que integra para tres protones que corresponde al grupo metoxilo en posición *para* del anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$); a 4.03 y 4.27 ppm se observaron dos doble de dobles con constante de acoplamiento $J=9.2$, 8.4 y 7.4 Hz que integran para un protón cada uno, asignados a los dos protones del metileno (CH_2CH) presente en el heterociclo; de 4.46 a 4.55 ppm se encontró una señal múltiple que integra para un protón que corresponde al grupo metino quiral (CHBn); a 6.51 ppm aparece un doblete de constante $J_{trans}=16.3$ Hz que integra para un protón vinílico ($\text{CH}=\text{CH}$); a 6.89 y 7.43 ppm se encontró dos señales dobles con $J=8.7$ Hz, que integra para dos protones cada uno que corresponden a los protones aromático simétricos; de 7.21 a 7.34

ppm se observó un multiplete que integra para seis protones correspondientes al sistema aromático del grupo bencílico y un protón vinílico.

Así mismo, el espectro de carbono [RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)], presentó las siguientes señales, Figura 52: a 41.87 ppm corresponden a la señal del metileno en el bencilo ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); a 55.36 ppm, señal asignada al metoxilo del anillo aromático ($\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); en 67.72 ppm correspondiente al carbono del metino quiral (CHBn); en 71.53 ppm se observó la señal referente al carbono del metileno en el heterociclo; de 112 a 140 ppm los correspondientes carbonos vinílicos y aromáticos; finalmente en 160.76 ppm se encuentra la señal del carbono aromático en posición 4, y a 164.00 ppm el carbono imínico de la oxazolina (O-C=N).

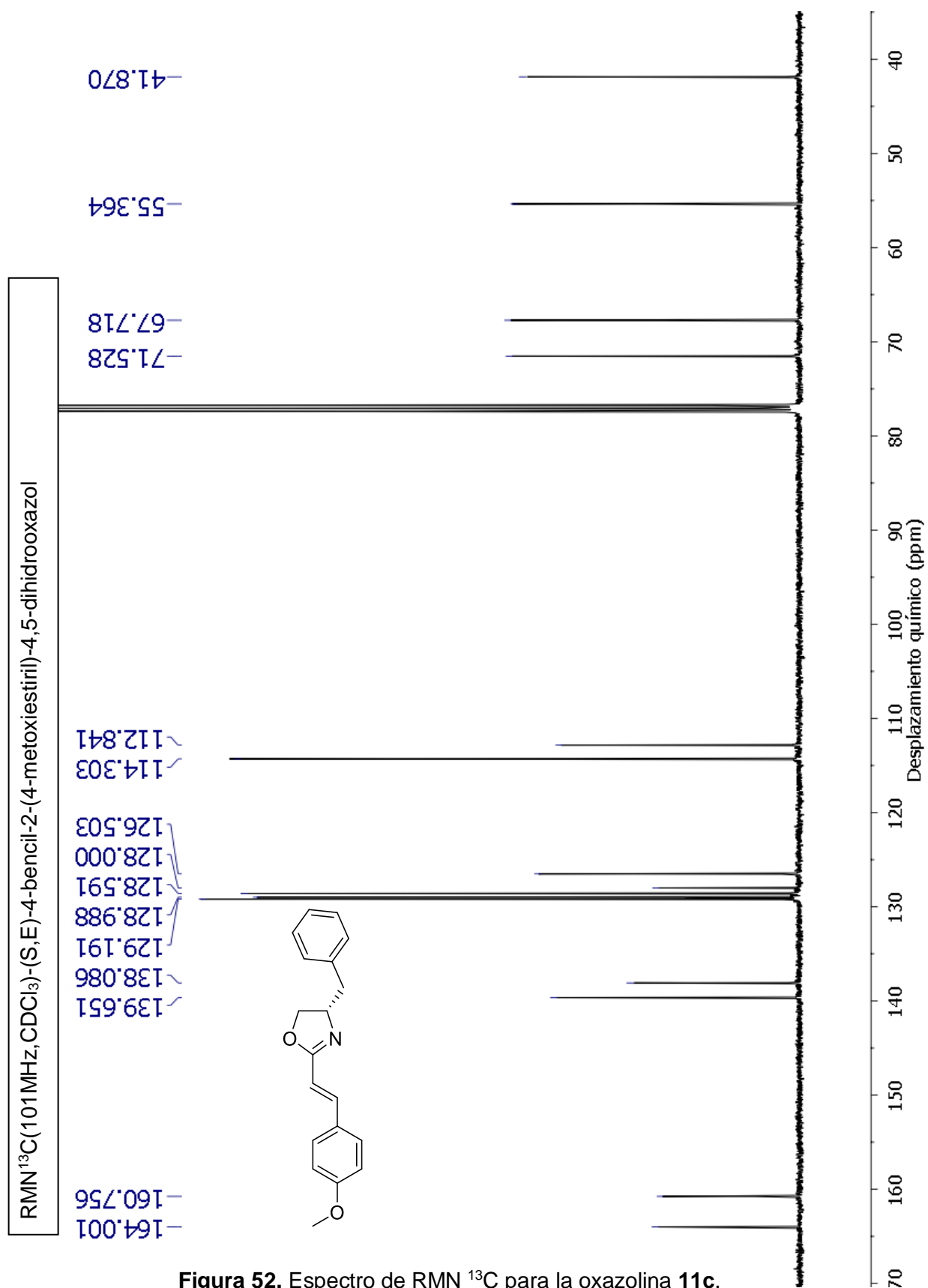


Figura 52. Espectro de RMN ¹³C para la oxazolina 11c.

5.1.6.7 Mejora del proceso sintético de las oxazolinas 10 y 11a-c

La reacción que se siguió para la síntesis de oxazolinas (Figura 53), de manera general tuvo resultados poco favorables con porcentajes de rendimiento que fueron del 20 a 81 % siendo las oxazolinas de glicina **10a-c** las que tuvieron rendimientos bajos.

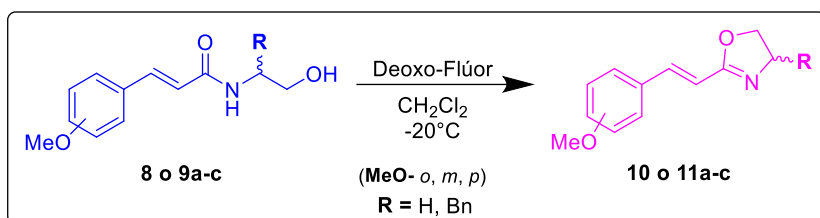


Figura 53. Reacción general para la síntesis de oxazolinas usando Deoxo -Flúor[®].

Los bajos rendimientos fueron atribuidos al reactivo utilizado para la fluoración de los alcoholes y su posterior ciclación (Deoxo-Flúor[®]), así como al proceso de purificación empleado, por lo que se decidió cambiar el Deoxo-Flúor[®] por otro reactivo similar que siguiera el mismo fundamento en cuanto al mecanismo de reacción, XtalFlúor-E[®]; basados en el artículo de Brandstätter y colaboradores del 2015 en el cual emplearon una metodología para la síntesis de 2-oxazolinas utilizando DAST y XtalFlúor-E[®] como reactivos para la ciclación, en el que reportaron que este reactivo puede sustituir al Deoxo-Flúor[®], principalmente debido a su estabilidad térmica y menor posibilidad de formar subproductos [50].

Con este cambio, se logró llevar a cabo la reacción con condiciones más suaves de temperatura, empleando un baño de hielo a 0 °C por 30 min; puesto que, anteriormente se ocupaban temperaturas de -20 °C siendo más difíciles de alcanzar y mantener. De esta forma se lograron resultados favorables para los dos tipos de compuestos, logrando aumentar los porcentajes de rendimiento de un 20 a un 70 % en el caso específico de la oxazolina **10c**, como se presentan a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Comparativa de rendimientos de reacción par las oxazolinas.

Compuestos	% de Rendimiento	
	Deoxo-Flúor	XtalFlúor-E
10a	41	84
10b	25	76
10c	20	70
11a	81	97
11b	61	66
11c	54	69

5.2 Determinación de la actividad biológica

Una vez teniendo cada uno de los dieciocho compuestos sintetizados, purificados y caracterizados se procedió a determinar tanto la actividad antituberculosa como la citotóxica, las cuales se llevaron a cabo mediante las técnicas Alamar azul y WST-1 respectivamente.

5.2.1 Determinación de la actividad antituberculosa *in vitro*

Los compuestos sometidos a la determinación de su actividad antituberculosa fueron: seis acrilamidas, **6** y **7a-c**, seis β -hidroxiacrilamidas, **8** y **9a-c** y seis oxazolinas, **10** y **11a-c**, así como el subproducto aislado de la reacción de acoplamiento, **7d**, (Figura 54) empleando tres fármacos como referencias: rifampicina, etambutol (Cepa H37Rv) y levofloxacino (Cepa G-122), evaluándolos a seis concentraciones (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Los ensayos se llevaron a cabo ante la cepa de referencia H37Rv y G-122 (aislado clínico), bajo la técnica colorimétrica Alamar Azul, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 11.

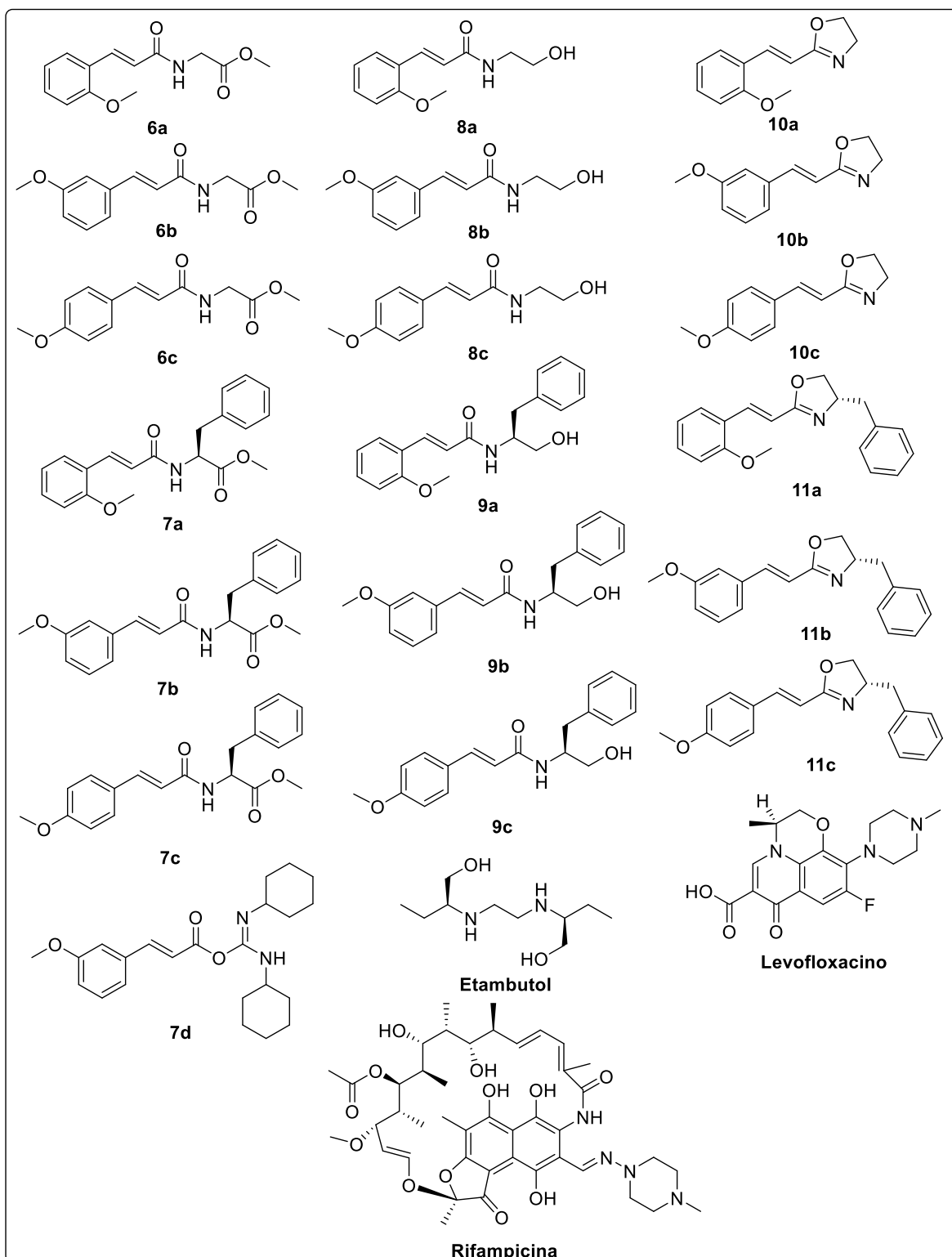
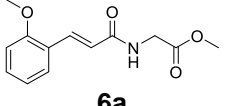
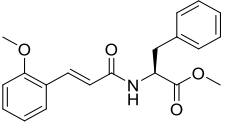
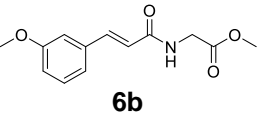
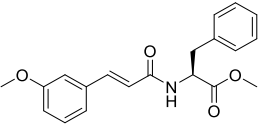
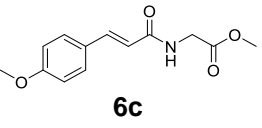
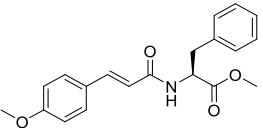
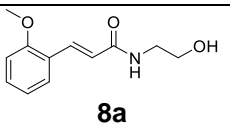
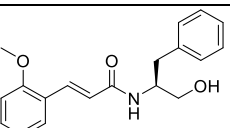
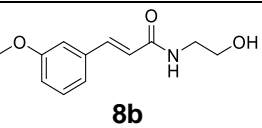
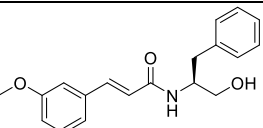
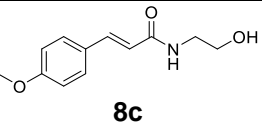
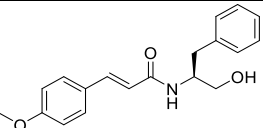
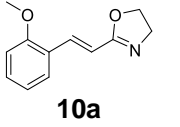
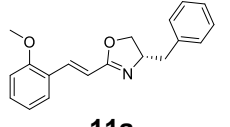
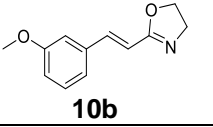
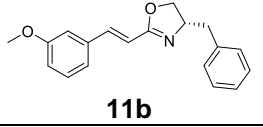
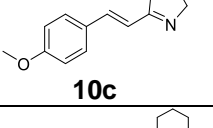
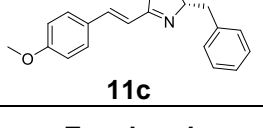
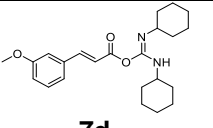


Figura 54. Moléculas ensayadas para la actividad antituberculosa.

Tabla 11. Resultados de la actividad anti-TB *in vitro*.

Compuesto	cLog P	<i>M. tuberculosis</i> CMI [* $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ -(μM)]		Compuesto	cLog P	<i>M. tuberculosis</i> CMI [* $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ -(μM)]	
		H37Rv	G-122			H37Rv	G-122
 6a	0.92	*100 (401.2)	*>100 (>401.2)	 7a	3.09	*100 (294.6)	*100 (294.6)
 6b		*100 (401.2)	*>100 (>401.2)	 7b		*100 (294.6)	*>100 (>294.6)
 6c		*100 (401.2)	*>100 (>401.2)	 7c		*100 (294.6)	*100 (294.6)
 8a	0.87	*>100 (>452.0)	*>100 (>452.0)	 9a	2.87	*100 (321.1)	*>100 (>321.1)
 8b		*>100 (>452.0)	*>100 (>452.0)	 9b		*>100 (>321.1)	*>100 (>321.1)
 8c		*>100 (>452.0)	*>100 (>452.0)	 9c		*50 (160.55)	*>100 (>321.1)
 10a	2.28	*25 (123.0)	*50 (246.0)	 11a	4.27	*50 (170.4)	*25 (85.2)
 10b		*25 (123.0)	*50 (246.0)	 11b		*25 (85.2)	*25 (85.2)
 10c		*100 (492.0)	*50 (246.0)	 11c		*6.25 (21.3)	*12.5 (42.6)
 7d	5.54	*>100 (>260.1)	*>100 (>260.1)	Etambutol	0.06	*6.25 (30.6)	*50 (244.7)
				Rifampicina	3.71	*0.05 (0.06)	*0.39 (0.47)
				Levofloxacino	1.35	*0.19	*0.39

Con base en los resultados obtenidos podemos observar que las oxazolininas **10** y **11** son compuestos más activos que sus análogos abiertos (acrilamidas y β -hidroxiamidas), puesto que tanto las acrilamidas **6** y **7** y las β -hidroxiacrilamidas **8** y **9**, presentaron una baja actividad antituberculosa, con valores que rondan a los 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bajo nuestras condiciones de estudio; cabe señalar también la evaluación del acrilato **7d**, el cual de igual forma presenta una muy baja actividad anti-TB. Las oxazolininas derivadas de glicina **10a-c** y fenilalanina **11a-c**, presentaron actividad relevante con CMI cercanos a los 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, destacando particularmente el compuesto **11c** (oxazolinina de L-fenilalanina *para*-metoxi sustituida), el cual presentó una concentración mínima inhibitoria de 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para la cepa sensible (H37Rv) y de 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para la resistente (G-122), valor comparable con lo obtenido por el fármaco comercial etambutol.

Intentando encontrar una relación estructura actividad biológica de esta serie de compuestos evaluados se puede inferir y mencionar que es indispensable el contar con un sistema heterocíclico, ya que si no es así disminuye considerablemente la actividad, esto observado en nuestro estudio y constatado por diversos autores con anterioridad [28, 43, 44].

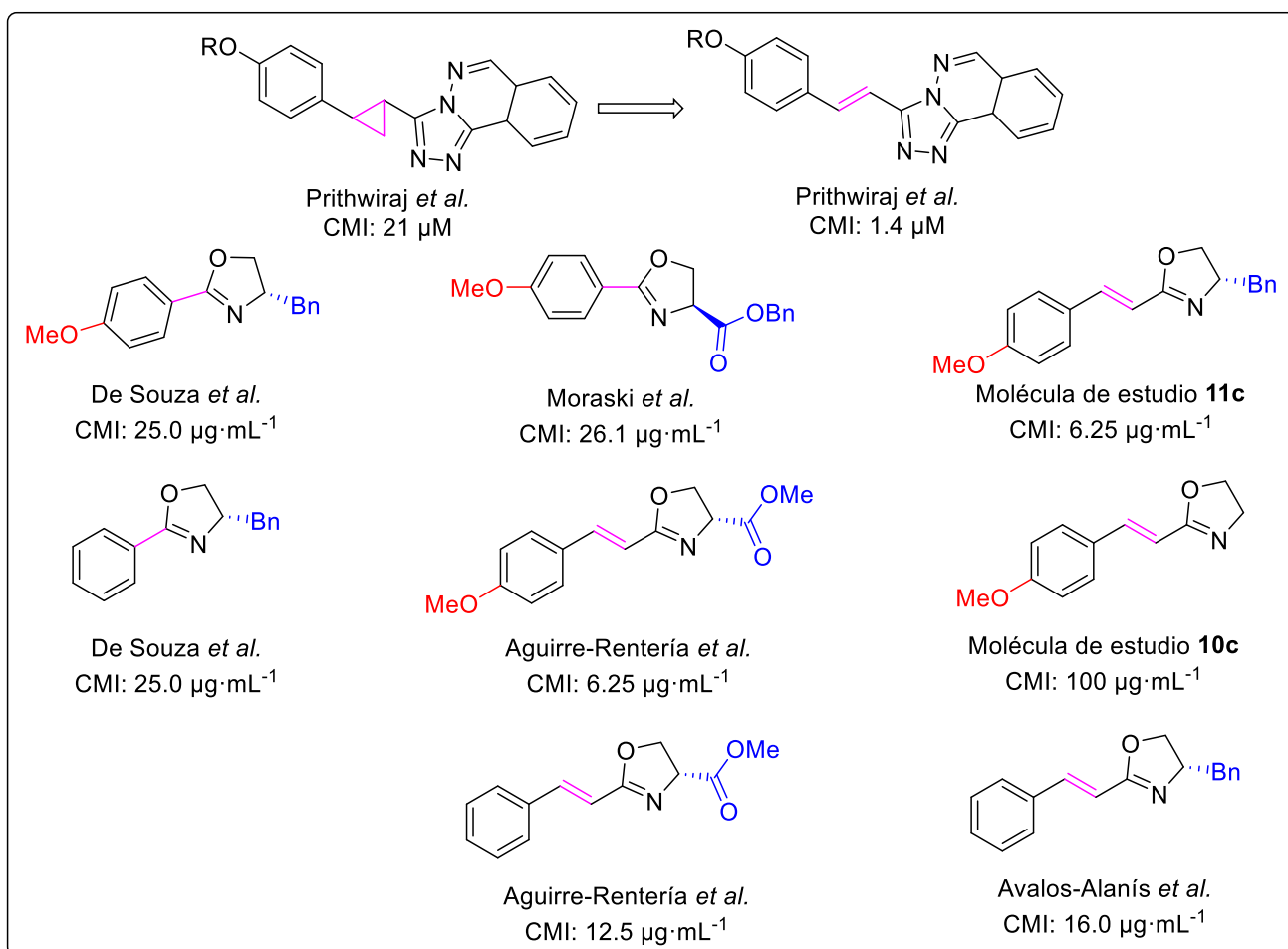
Por ejemplo, Aguirre-Rentería *et al.* en el 2019, quien presenta una serie de amidas α , β -insaturadas y oxazolininas derivadas de L-serina, de las cuales reportan que las amidas muestran una pobre actividad mientras que sus análogos cíclicos (oxazolininas) se presentan muy activos con valores de CMI de 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [45]

Así mismo, Avalos-Alanís *et al.* en 2017, había reportado el mismo caso para las acrilamidas y oxazolininas pero derivadas de la L-fenilalanina, donde se muestra que los heterociclos de oxazolininas (4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) son hasta 3 veces mejores que sus sistemas de libre torción (16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) [28].

Otro aspecto importante en la actividad observada es la presencia de la insaturación como medio de unión entre el sistema heterocíclico y el anillo fenílico en la molécula, de manera particular en posición *trans*, ya que si este doble enlace desaparece la

actividad desciende hasta tres veces, de acuerdo con lo mostrado por De Souza *et al.* en 2014. Mientras que si este es transformado a un grupo ciclopropilo la actividad disminuye cerca de veinte veces, de acuerdo, a lo reportado por Prithwiraj y colaboradores [43, 44].

Con respecto a la funcionalidad del anillo fenílico, podemos inferir la importancia de que se encuentre sustituido, ya que la actividad se ve aumentada (de 16.0 a 6.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) [45]. Si este sustituyente se ubica de manera particular en posición **para** los resultados son aún mejor, obteniéndose resultados de 6.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, comparado con los 50 y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la posición **orto** y **meta** respectivamente. Finalmente, si este sustituyente es un grupo electrodonador aumenta aún más su actividad, por ejemplo, de la molécula con sustituyente metoxilo (-OMe) se reporta una actividad de hasta 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Esquema 10) [28].



Esquema 10. Comparativo de las estructuras activas ante TB por diversos autores.

Otro aspecto importante a observar, aunque no determinante, es la lipofilicidad de los compuestos. La cual, a primera vista muestra que influye en la actividad de nuestros compuestos, ya que las oxazolininas **10** y **11a-c** con cLog P más alto (4.27), presentan una mayor actividad comparado con los precursores evaluados, sin embargo, nos damos cuenta de que por sí sola esta propiedad no es la causante del efecto antituberculoso ya que el compuesto **7d** (acrilato) a pesar de presentar un cLog P más elevado (5.54) que las oxazolininas, el efecto bactericida es muy bajo (CMI: $>100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Por lo que se concluye que la lipofilicidad realmente no influye en la actividad de las moléculas, sino que se asocia más a la presencia de un sustituyente en posición cinco como lo es el bencilo en el anillo oxazolínico visto esto claramente en la comparación de la actividad de la oxazolinina **10c** y **11c** (CMI: 100 y $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente).

Como se mencionó anteriormente, también es de gran importancia considerar la citotoxicidad de los fármacos, ya que ese es uno de los principales inconvenientes de las moléculas que actualmente se utilizan en el tratamiento de la tuberculosis, por lo que en base a los resultados anteriores es que se procedió a evaluar la citotoxicidad de los compuestos más activos contra tuberculosis (oxazolininas), ante la línea celular VERO (riñón de mono verde) *in vitro*.

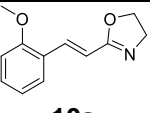
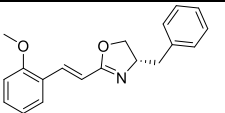
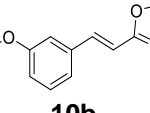
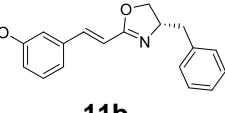
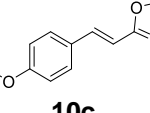
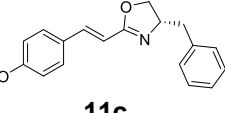
Cabe señalar que el compuesto **9c**, anteriormente se le fue evaluada su actividad citotóxica *Ex-vivo*, siendo muy baja para un tejido hepático de rata. Dato que aumenta la relevancia de la actividad antifímica en este compuesto específicamente [28].

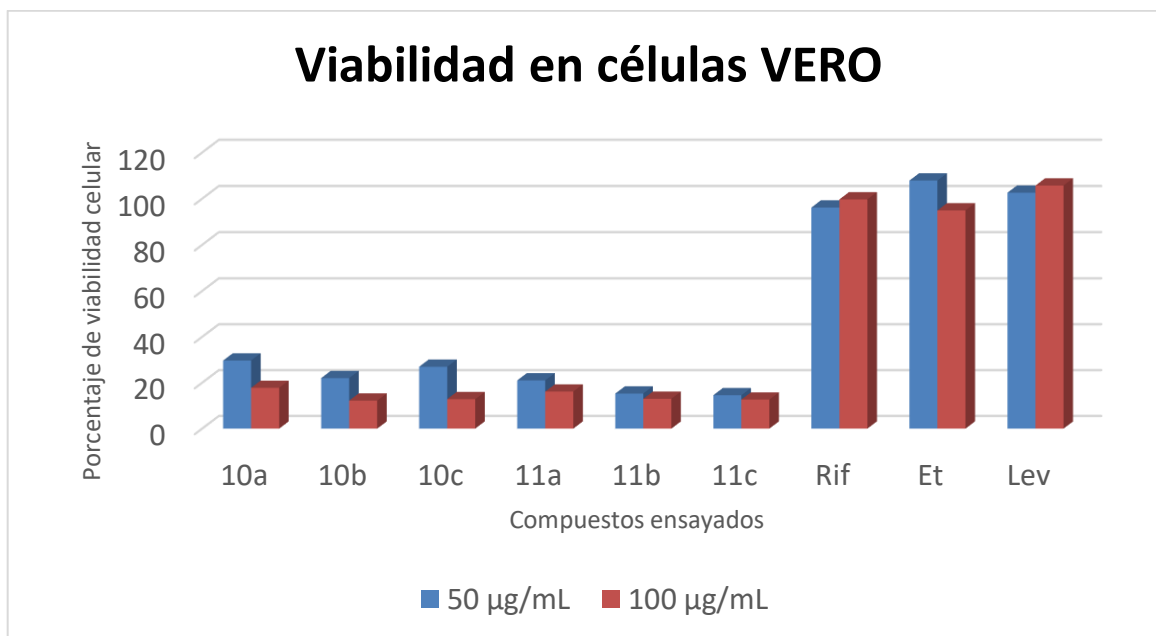
5.2.2 Determinación de la actividad citotóxica

Los compuestos sometidos a la determinación de su actividad citotóxica fueron las seis oxazolininas derivadas de glicina y L-fenilalanina, **10** y **11a-c**, debido a su mayor actividad ante las cepas tuberculosas, por lo que se les comparó su citotoxicidad ante los tres fármacos usados como referencias para tuberculosis: rifampicina, etambutol y levofloxacino; compuestos mostrados previamente en la Figura 54.

Los ensayos se llevaron a cabo con la línea celular de crecimiento normal VERO y se evaluaron dos concentraciones (100 y $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), bajo la técnica colorimétrica WST-1; cada uno de los compuestos se ensayó por cuadruplicado en dos días diferentes, obteniéndose los porcentajes de viabilidad celular promedio, los cuales se presentan en la Tabla 12 y Esquema 11.

Tabla 12. Resultados de la actividad citotóxica.

Compuesto	cLog P	Células VERO [% de viabilidad celular]		Compuesto	cLog P	Células VERO [% de viabilidad celular]	
		$50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			$50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
 10a	2.28	29.69 ± 5.06	17.79 ± 1.43	 11a	4.27	21.05 ± 0.97	16.16 ± 0.86
 10b		22.03 ± 1.23	12.21 ± 0.60	 11b		15.31 ± 0.69	13.01 ± 0.87
 10c		26.99 ± 2.10	12.87 ± 0.69	 11c		14.57 ± 0.50	12.66 ± 0.53
Etambutol	0.06	107.87 ± 6.40	94.92 ± 4.13	Levofloxacin	1.35	102.60 ± 6.09	105.71 ± 6.47
Rifampicina	3.71	96.18 ± 2.25	99.72 ± 8.71				



Esquema 11. Porcentajes de viabilidad celular.

Los compuestos evaluados presentaron valores de porcentaje de viabilidad celular muy similares entre ellos, siendo las oxazolinas **10a-c** ligeramente menos citotóxicas que las oxazolinas **11a-c**, mostrando valores de porcentaje de viabilidad celular por debajo del 30 % para la concentración de 50 µg·mL⁻¹ y debajo del 20 % a la concentración de 100 µg·mL⁻¹ valores que nos dicen de la alta citotoxicidad presentada por este tipo de compuestos a las concentraciones ensayadas. Con respecto a los resultados de viabilidad celular de los fármacos de referencia (etambutol, rifampicina y levofloxacino), estos muestran una citotoxicidad muy baja ante esta línea celular con porcentajes de viabilidad del 94 a 100 % en ambas concentraciones.

Cabe detallar que el principal impacto de los fármacos antituberculosos es su efecto hepatotóxico. Con respecto a las oxazolinas α,β -insaturadas, particularmente la molécula **11c**, se ha demostrado mediante ensayos *ex vivo* que a concentraciones menores a 30 µg·mL⁻¹, la actividad citotóxica disminuye considerablemente, por lo que es de esperarse que a concentraciones 25 y 6.125 µg·mL⁻¹ (CMI oxazolinas **10** y **11**) se mantenga el mismo patrón de citotoxicidad para las moléculas aquí reportadas. (80 % de viabilidad celular para la oxazolina de L-fenilalanina **11c**) [28].

Con respecto a esto, en el 2019, Aguirre-Rentería *et al.* reportaron que sus oxazolininas y oxazoles (metiléster en lugar de bencilo en posición 5) ante células VERO, presentan un 21 % de viabilidad celular a una concentración de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que a una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se observa una diferencia marcada, ya que el porcentaje de viabilidad aumenta hasta un 94 %. Estos resultados refuerzan lo mencionado en el párrafo anterior y nos permiten pensar que el factor que más afecta en la viabilidad celular es la concentración del compuesto y no tanto las diferencias funcionales del heterociclo [45].

Con base en este antecedente, podemos observar que sería interesante probar en un futuro la dilución seriada de los compuestos para encontrar el IC_{50} y comparar si fuese seguro trabajar este compuesto a la CMI vista contra *M. tuberculosis*. También se puede sintetizar los oxazoles derivados de nuestros compuestos y comprobar la efectividad de un sistema más plano en relación con su actividad, ya que en el antecedente consultado se observó mayor viabilidad celular (mayor seguridad) en los oxazoles que en las oxazolininas [45].

CAPITULO 6

6 Conclusiones

6.1 Conclusiones

- ✓ La liberación de los clorhidratos de amino ésteres **4** y **5** utilizando trietilamina es necesaria para que la reacción de acoplamiento se lleve a cabo.
- ✓ La reacción de acoplamiento utilizando DCC y DMAP proporciona rendimientos moderados (15 a 50 %) debido a la formación de acrilatos como subproductos [48].
- ✓ Al ajustar la relación de equivalentes del éster metílico/ácido cinámico/DMAP en la relación 2.4:1:0.2, disminuye considerablemente la formación de subproductos, mejorando así, los rendimientos de las acrilamidas **6** y **7** (70 a 91 %).

- ✓ Las acrilamidas **6** y **7** metilésteres, son capaces de ser reducidas a las correspondientes β -hidroxiacrilamidas **8** y **9** en presencia de borohidruro de sodio en una proporción de ocho equivalentes, con rendimientos de 56 a 96 %, valores similares a los reportados en referencias (51 a 86 %) [28].
- ✓ La reacción de O-alkilación de β -hidroxiacrilamidas **8** y **9** utilizando el reactivo de fluoración Deoxo-Flúor[®] a -20 °C procede con rendimientos de bajos a moderados (20 a 81 %), los cuales concuerdan con lo reportado en la literatura bajo estas condiciones de reacción [28].
- ✓ Realizar la reacción de O-alkilación de β -hidroxiacrilamidas **8** y **9** con el reactivo XtalFlúor-E[®] genera mejores rendimientos de reacción (66 a 97 %) que realizarlo con el reactivo Deoxo-Flúor[®].
- ✓ Las oxazolininas de glicina **10** son más susceptibles a una apertura del anillo oxazolinínico durante el procedimiento de purificación en columna cromatográfica, lo que se ve reflejado en un menor rendimiento.
- ✓ Bajo el esquema de síntesis propuesto en este trabajo, se logró sintetizar diecinueve compuestos, seis acrilamidas **6** y **7**, seis β -hidroxiacrilamidas **8** y **9**, seis oxazolininas **10** y **11** y un acrilato **7d**, siendo catorce moléculas nuevas y cinco ya reportadas en literatura hasta el día de hoy.
- ✓ Las oxazolininas **10** y **11** son más activas que sus análogos abiertos **6-9** ante la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y G-122.
- ✓ El compuesto más activo fue la oxazolinina **9c** con una CMI de **6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$** contra la cepa sensible (H37Rv) y de **12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$** para la cepa resistente (G-122).
- ✓ Sin la presencia del grupo metoxilo en posición **para** al fenilo, la actividad antituberculosa disminuye cerca de tres veces.

- ✓ Cambiar el grupo bencílico en posición cinco de la oxazolina no modifica la actividad, mientras que quitarlo por completo hace que pierda su actividad antituberculosa.
- ✓ La lipofilicidad de los compuestos no afecta de manera relevante la actividad antituberculosa.
- ✓ La citotoxicidad de las oxazolininas ante la línea celular VERO es de **78 a 86 %** a una concentración de 50 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.
- ✓ La citotoxicidad de las oxazolininas no se ve influenciada por la funcionalidad del heterociclo, sino que está relacionada más a la concentración del compuesto en sí.

7 Bibliografía

- [1] World Health Organization, *Global Tuberculosis Report-2019*. **2019**.
- [2] “OMS | ¿Qué es la tuberculosis y cómo se trata?,” *WHO*, **2016**.
- [3] A. Magnolia, “Historia natural de la tuberculosis. Fisiopatogenia de la Infección y la enfermedad en el niño.,” *Neumol Pediatr*, vol. 10, no. 4, pp. 155–159, **2015**.
- [4] Unión Internacional Contra La Tuberculosis Y Enfermedades Respiratorias and Médicos sin fronteras, “Medicamentos para la tuberculosis resistente: bajo el microscopio,” *MSFaccess*, pp. 1–48, **2012**.
- [5] C. Vilchèze, “Mycobacterial cell wall: A source of successful targets for old and new drugs,” *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 7, pp. 1–36, **2020**.
- [6] P. Cardona, “Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis,” *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol. 36, no. 1, pp. 38–46, **2018**.
- [7] Secretaria de Salud, “Prevención y Control de la Tuberculosis,” *Programa Accion Especif. Prev. y Control la Tuberc. 2013-2018*, pp. 1–88, **2013**.
- [8] “¿Qué es la tuberculosis y cómo se transmite? - Fundación Huésped.” .
- [9] “Tuberculosis resistente a los medicamentos | TB | CDC.” .
- [10] World Health Organization., *Global Tuberculosis Report 2018*. **2018**.
- [11] D. Alves, C. Bresani-salvi, *et al.*, “Use of the Coding Causes of Death in HIV in the classification of deaths in Northeastern Brazil,” *Rev. Saude Publica*, vol. 55, no. 88, pp. 1–9, **2017**.
- [12] E. A. Castellanos, M. A. Salazar, *at al.*, “Guía para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos,” *Gob. Fed. Mex.*, **2004**.

- [13] M. C. García-Sancho, "Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura," *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.*, vol. 14, no. 2, pp. 114–128, **2001**.
- [14] M. T. H. Barrios, M. T. Rojas, *et al.*, "Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana," *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.*, vol. 18, no. 4, pp. 327–336, **2005**.
- [15] World Health Organization; Panamerican Health Organization, "Día mundial de la tuberculosis 2019" **2019**.
- [16] T. B. Versi, "Guía clínica y programática endTB para el manejo del paciente con nuevas drogas antituberculosas," vol. 4, pp. 1–73, **2018**.
- [17] A. Iacobino, L. Fattorini, *et al.*, "Drug-resistant tuberculosis 2020: Where we stand," *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 6, pp. 1–17, **2020**.
- [18] R. Bansal, D. Sharma, *et al.*, "Tuberculosis and its Treatment: An Overview," *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 18, no. 1, pp. 58–71, **2016**.
- [19] M. Chhabria, M. Jani, *et al.*, "New Frontiers in the Therapy of Tuberculosis: Fighting with the Global Menace," *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 9, no. 4, pp. 401–430, Apr. **2009**.
- [20] J. González-Martín *et al.*, "Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 28, no. 5, pp. 1–20, **2010**.
- [21] R. Hurtado *et al.*, "Efectos adversos de consecuencia fatal por tratamiento con fármacos antituberculosos," *Rev Med Hered*, vol. 13, no. 4, pp. 148–152, **2002**.
- [22] M. T. Gutierrez-Lugo and C. A. Bewley, "Natural products, small molecules, and genetics in tuberculosis drug development," *J. Med. Chem.*, vol. 51, no. 9, pp. 2606–2612, **2008**.
- [23] L. Brunton; C. Björn; B. Knollmann; B. C. Goodman & Gilman "Bases Farmacológicas de la Terapéutica; Mexico, McGraw-Hill Interamericana, 13.ed, **2012**.
- [24] P. S. Jadhavar, M. D. Vaja, *et al.*, "Oxazolidinones as Anti-tubercular Agents: Discovery, Development and Future Perspectives," *Curr. Med. Chem.*, vol. 22, no. 19, pp. 4379–4397, **2015**.
- [25] G. C. Moraski, M. Chang, *et al.*, "Structure-activity relationship of new anti-tuberculosis agents derived from oxazoline and oxazole benzyl esters," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 5, pp. 1703–1716, **2010**.
- [26] J. A. Frump, "Oxazolines. Their preparation, reactions, and applications," *Chem. Rev.*, vol. 71, no. 5, pp. 483–505, **1971**.
- [27] H. Z. Zhang, Z. L. Zhao, *et al.*, "Recent advance in oxazole-based medicinal chemistry," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 144, pp. 444–492, **2018**.
- [28] F. G. Avalos-Alanís *et al.*, "Synthesis, antimycobacterial and cytotoxic activity of α,β -unsaturated amides and 2,4-disubstituted oxazoline derivatives," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 27, no. 4, pp. 821–825, **2017**.
- [29] E. Hernández-Fernández, M. Fernández-Zertuche, *et al.*, "Practical and efficient synthesis of (*E*)- α,β -unsaturated amides bearing (*S*)- α -methylbenzylamine from 2-phosphoramides via Horner-Wadsworth-Emmons reaction," *Synlett*, vol. 47, no. 3, pp. 440–444, **2006**.
- [30] M. Ordoñez, R. Bautista, *et al.*, "A convenient method for the preparation of

- chiral phosphonoacetamides and their Horner – Wadsworth – Emmons reaction,” *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 18, pp. 2427–2436, **2007**.
- [31] F. G. Avalos-Alanís *et al.*, “Practical and efficient synthesis of chiral 2,4-disubstituted oxazolines from β -phosphonoamides,” *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 25, no. 2, pp. 156–162, **2014**.
- [32] D. R. Williams, P. D. Lowder, *et al.*, “Studies of Mild Dehydrogenations in Heterocyclic Systems,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 38, no. 3, pp. 331–334, **1997**.
- [33] S. Glöckner *et al.*, “The rapid synthesis of oxazolines and their heterogeneous oxidation to oxazoles under flow conditions,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 13, no. 1, pp. 207–214, **2015**.
- [34] S. Faizi *et al.*, “Shahidine , a novel and highly labile oxazoline from Aegle marmelos: the parent compound of aegeline and related amides,” *Tetrahedron*, vol. 65, no. 5, pp. 998–1004, **2009**.
- [35] “Tecnología -Derivados de 2-oxazolinas: proceso de producción y actividad antifúngica.” **2010**.
- [36] D. Ondré, J. Wölfling, *et al.*, “Steroselective synthesis of some steroidal oxazolines, as novel potential inhibitors of 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase,” *Steroids*, vol. 74, no. 13–14, pp. 1025–1032, **2009**.
- [37] D. C. Young *et al.*, “Synthesis of dideoxymycobactin antigens presented by CD1a reveals T cell fine specificity for natural lipopeptide structures,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 37, pp. 25087–25096, **2009**.
- [38] G. C. Moraski *et al.*, “Generation and exploration of new classes of antitubercular agents: The optimization of oxazolines, oxazoles, thiazolines, thiazoles to imidazo[1,2-a]pyridines and isomeric 5,6-fused scaffolds,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 20, no. 7, pp. 2214–2220, **2012**.
- [39] D. Hauck *et al.*, “Discovery of two classes of potent glycomimetic inhibitors of pseudomonas aeruginosa LecB with distinct binding modes,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 8, no. 8, pp. 1775–1784, **2013**.
- [40] H. Greger, G. Zechner, *et al.*, “Bioactive amides from Glycosmis species,” *J. Nat. Prod.*, vol. 59, no. 12, pp. 1163–1168, **1996**.
- [41] G. I. Poos, J. R. Carson, *et al.*, “2-amino-5-Aryl-2-oxazolines. Potent New Anorectic Agents,” *J. Med. Chem.*, vol. 6, no. 3, pp. 266–272, **1963**.
- [42] M. A. Blanchette, W. Choy, *et al.*, “Horner-Wadsworth-Emmons reaction: use of lithium chloride and an amine for base-sensitive compounds,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 25, pp. 2183–2186, **1984**.
- [43] L. A. De Souza, E. Teixeira, *et al.*, “Synthesis and antitubercular evaluation of aryl substituted 2-oxazolines from L -amino acids,” vol. 2, no. 5, pp. 648–657, **2014**.
- [44] P. De *et al.*, “Design, synthesis, and biological evaluation of new cinnamic derivatives as antituberculosis agents,” *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 5, pp. 1449–1461, **2011**.
- [45] S. A. Aguirre-Rentería *et al.*, “Synthesis and in vitro evaluation of antimycobacterial and cytotoxic activity of new α,β -unsaturated amide, oxazoline and oxazole derivatives from L-serine,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, p. 127074, **2020**.
- [46] R. C. Corona and M. C. Guillermo, “Protocolo para la determinación de actividad antibacteriana mediante el uso de Microplaca,” *An. la Univ. Chile*,

- vol. 0, no. 18, p. Pág. 76-85-85, **1988**.
- [47] L. A. Collins and S. G. Franzblau, "Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high- throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, no. 5, pp. 1004–1009, **1997**.
- [48] A. B. Lutjen, M. A. Quirk, *et al.*, "Synthesis of (*E*)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 26, no. 19, pp. 5291–5298, **2018**.
- [49] R. H. Wiley and L. L. Bennett, "The Chemistry of the Oxazolines," *Chem. Rev.*, vol. 44, no. 3, pp. 447–476, **1949**.
- [50] M. Brandstätter, F. Roth, *et al.*, "Synthesis of 2-oxazolines by in situ desilylation and cyclodehydration of β -hydroxyamides," *J. Org. Chem.*, vol. 80, no. 1, pp. 40–51, **2015**.

8 Anexos

Anexo 1.- Espectros de Resonancia Magnética Nuclear
Ester cinámico **2c**

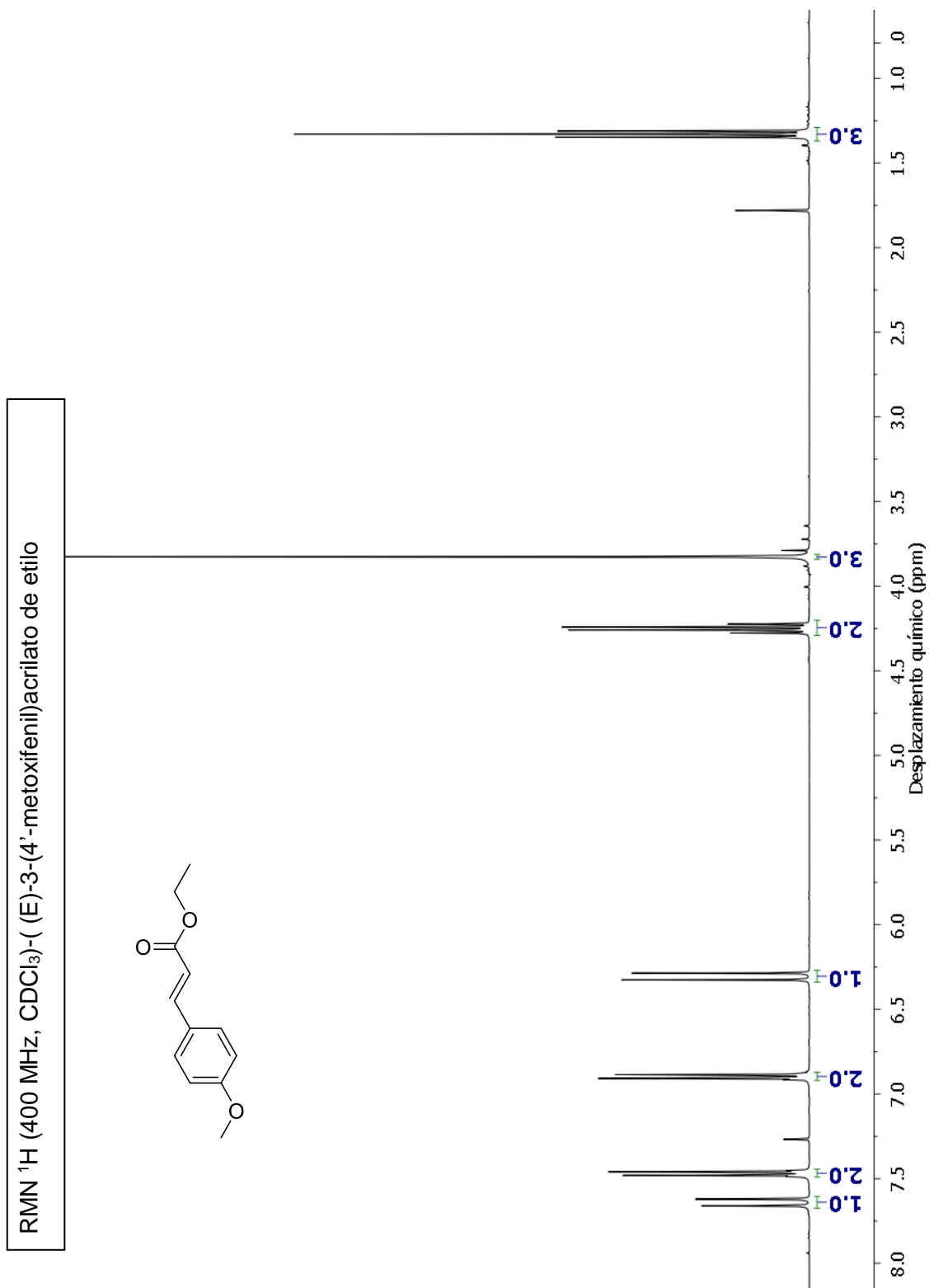


Figura 55. Espectro de RMN ^1H para el éster cinámico **2c**

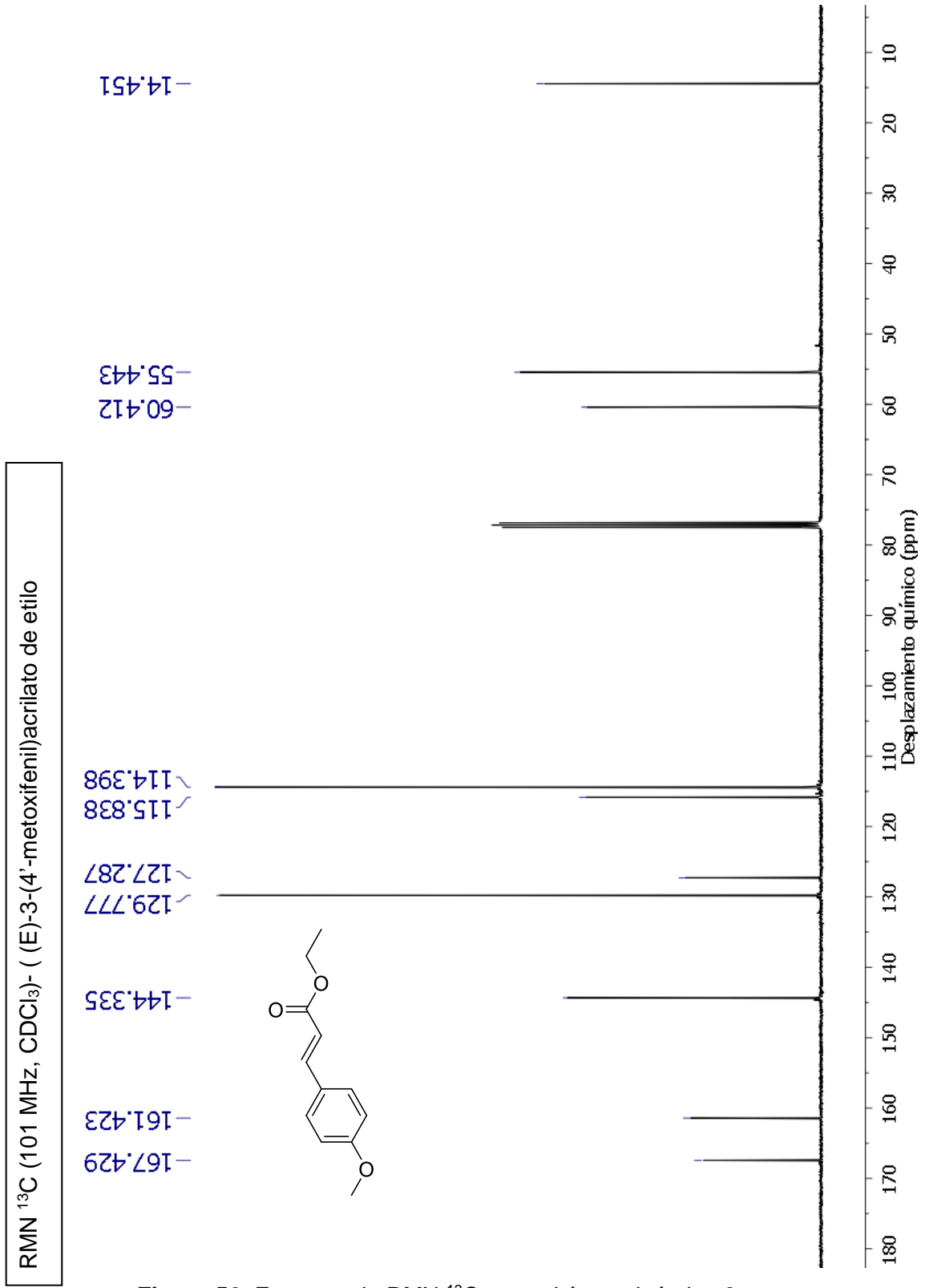


Figura 56. Espectro de RMN ¹³C para el éster cinámico 2c

Ácido cinámico **3c**

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD)- ácido (E)-3-(4-metoxifenil)acrilico

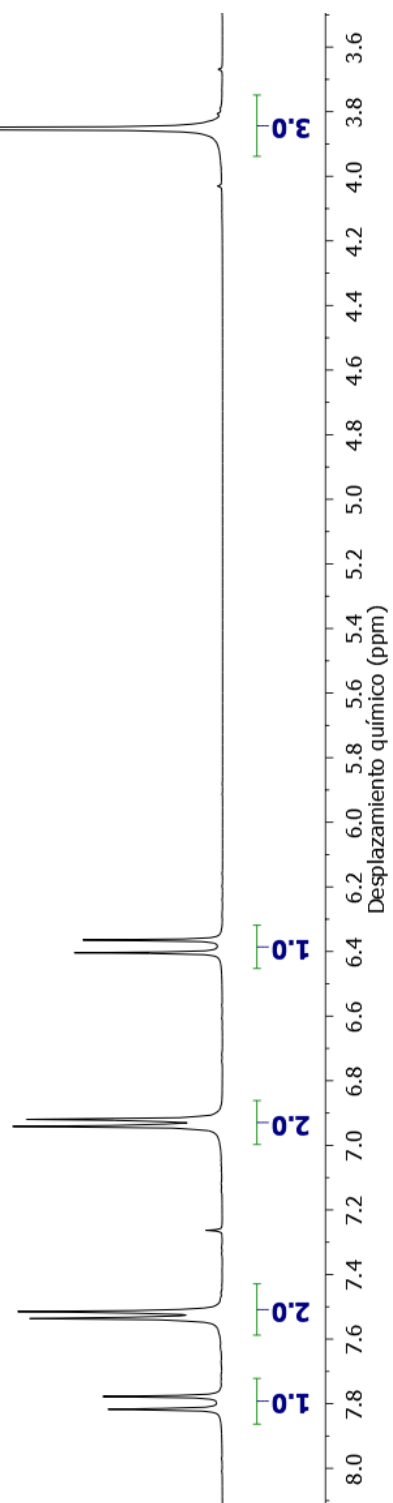
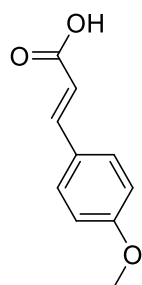


Figura 57. Espectro de RMN ¹H para el ácido cinámico **3c**

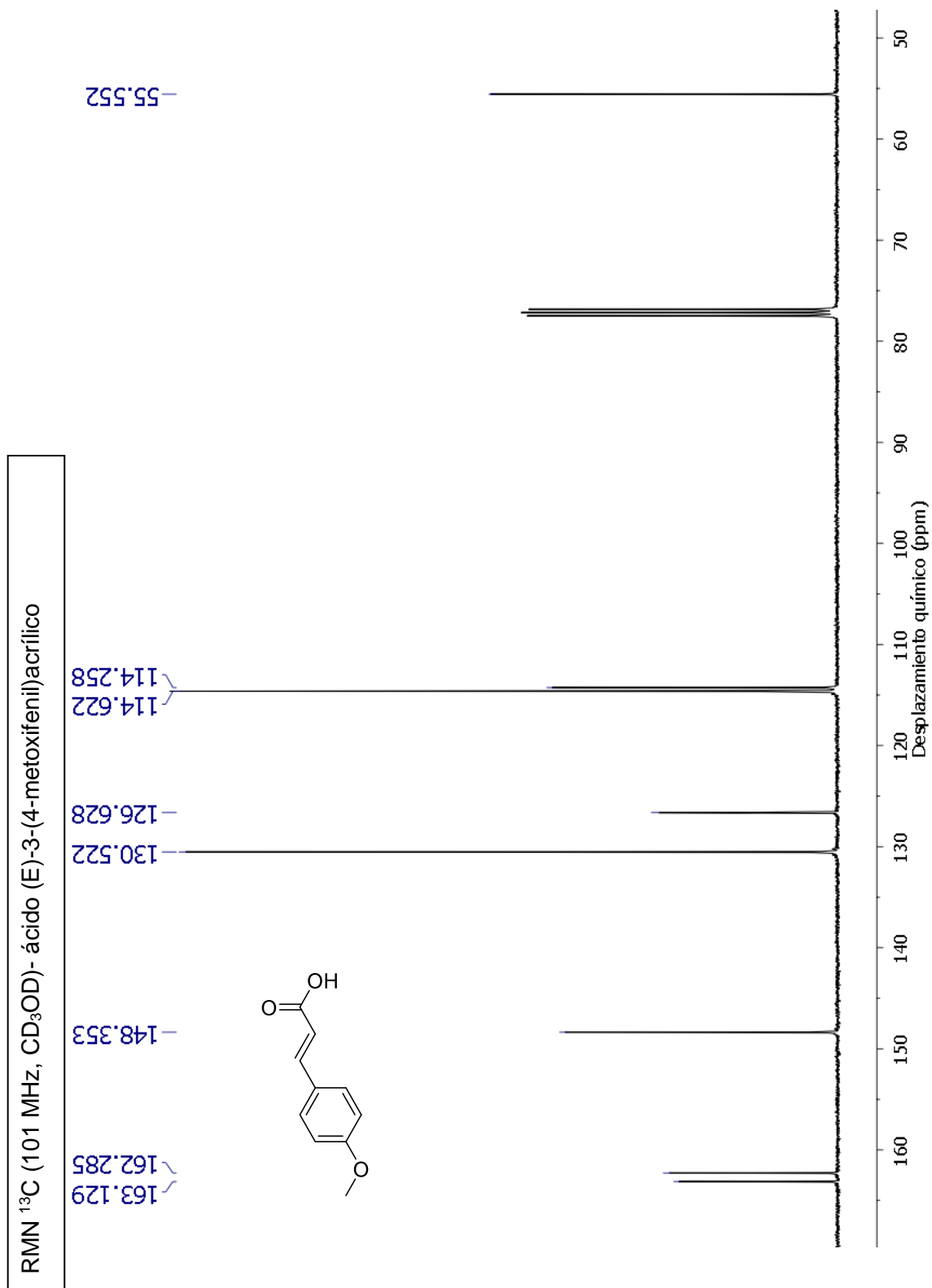


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C para el ácido cinámico 3c

Acrilamidas **6** y **7a-b**

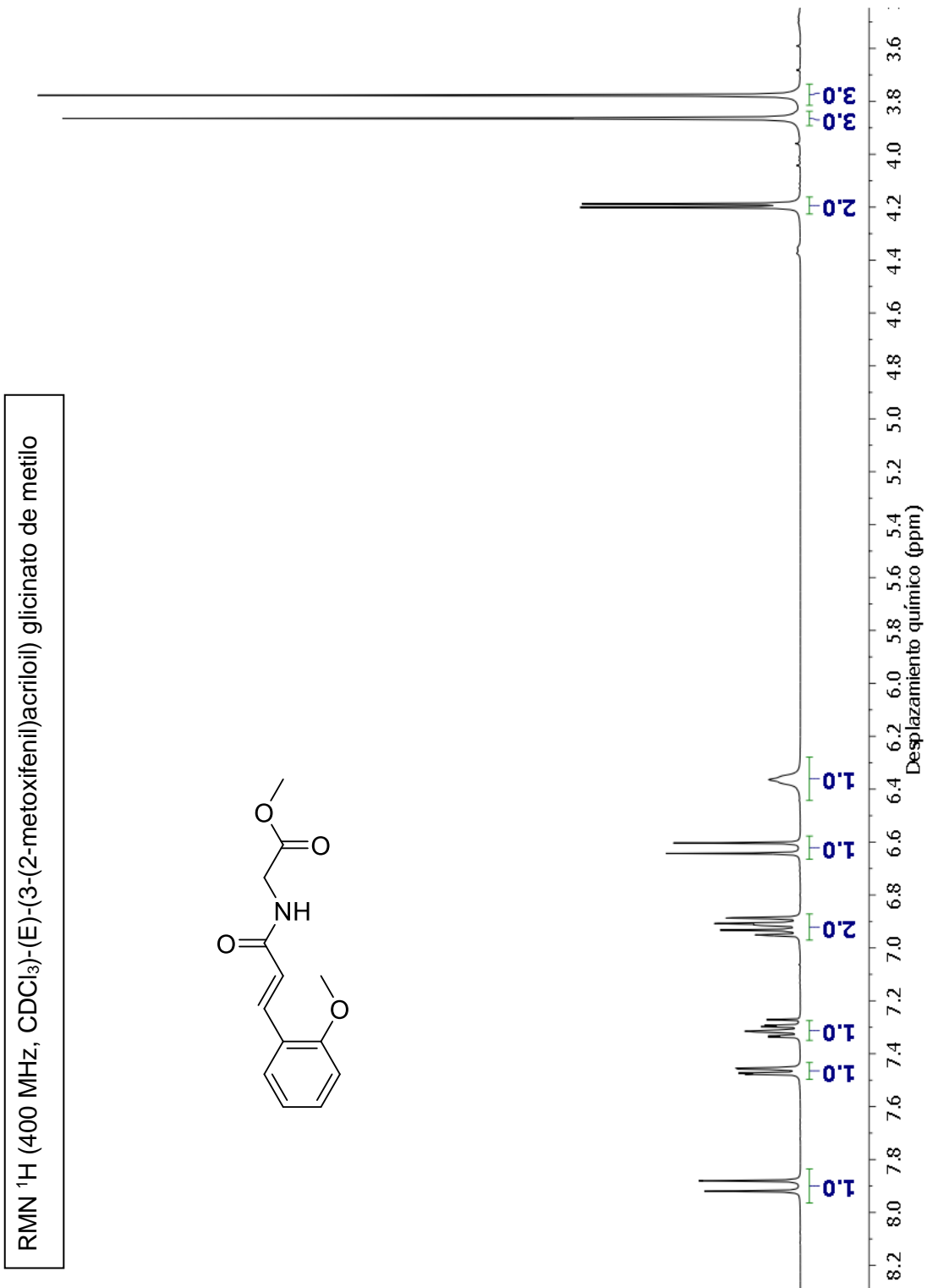


Figura 59. Espectro de RMN ^1H para la acrilamida **6a**

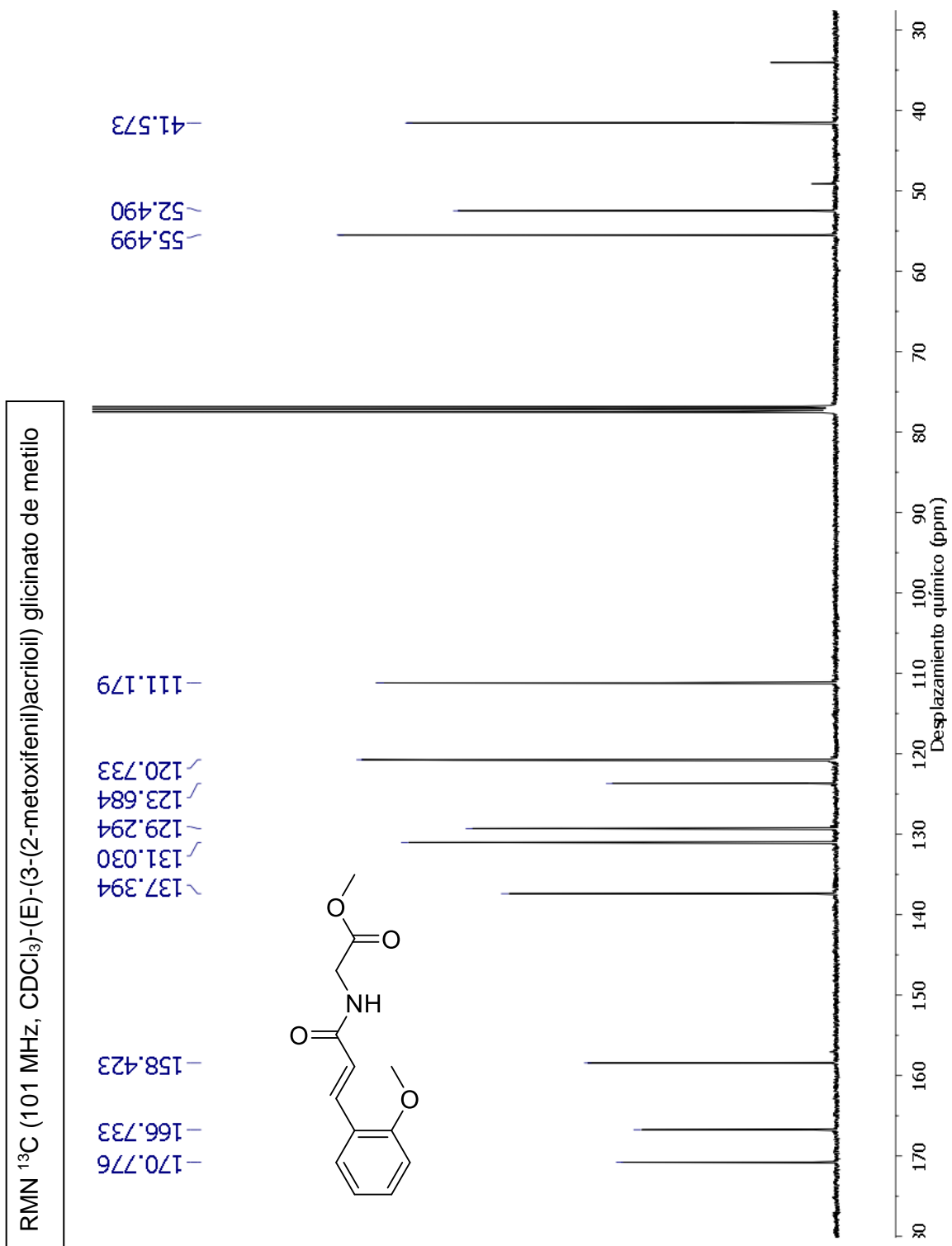


Figura 60. Espectro de RMN ¹³C para la acrilamida 6a

RMN ¹H(400 MHz, CDCl₃)-(E)-(3-(3-metoxifenil)acrililoil) glicinato de metilo

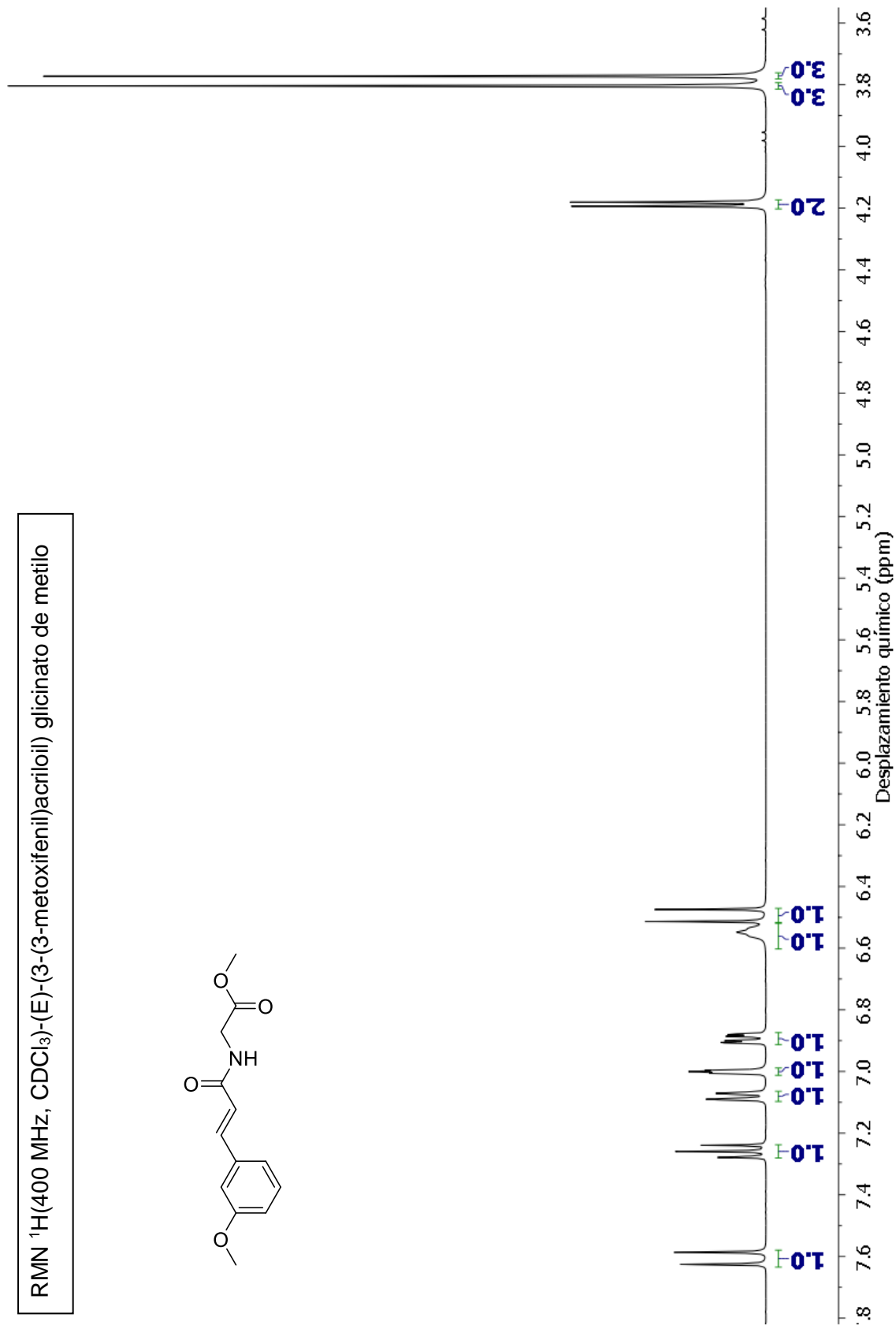
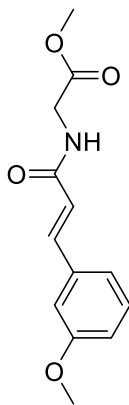


Figura 61. Espectro de RMN ¹H para la acrilamida **6b**

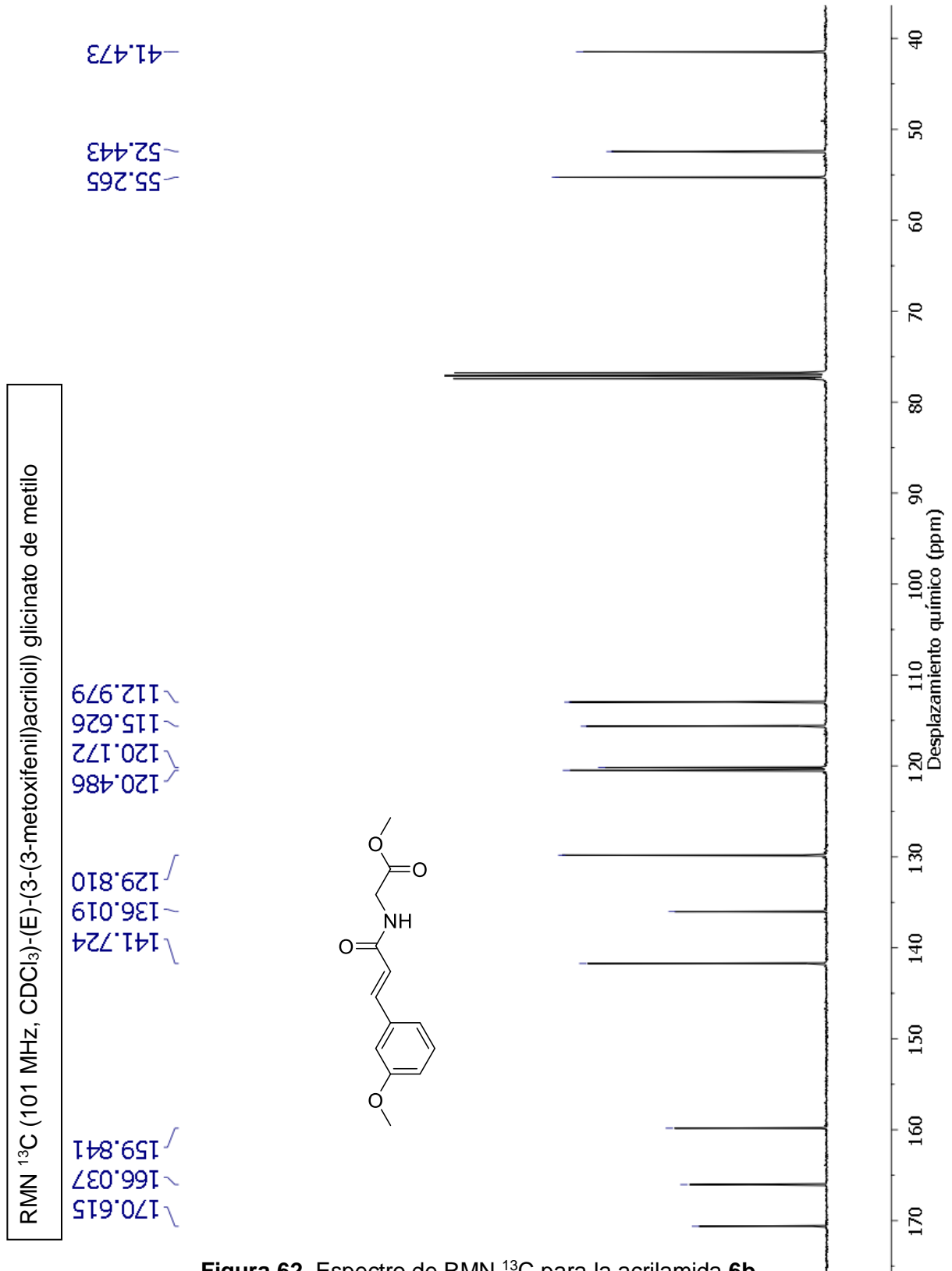


Figura 62. Espectro de RMN ¹³C para la acrilamida **6b**

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)-Metil (E)-(3-(2-metoxifenil) acrilil)-D-fenilalaninato

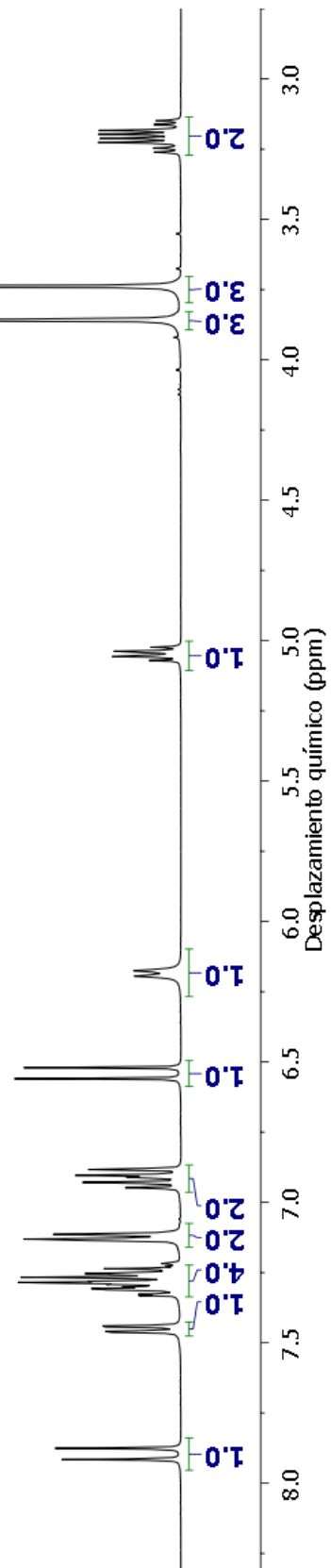
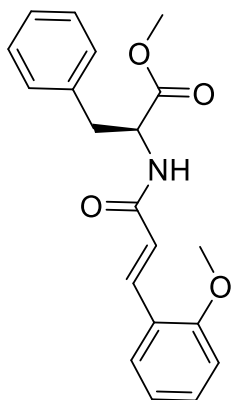


Figura 63. Espectro de RMN ¹H para la acrilamida 7a

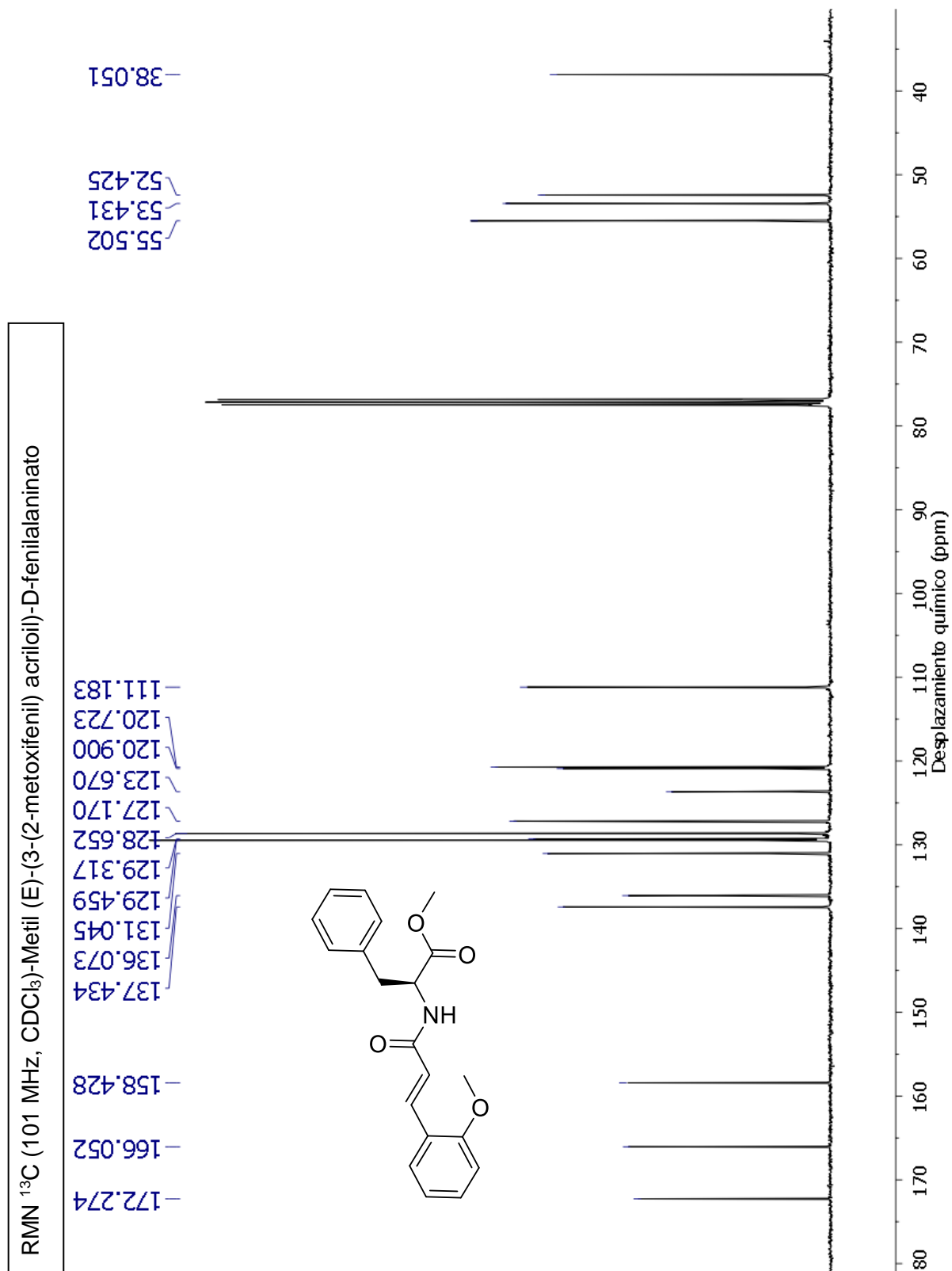


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C para la acrilamida 7a

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)-Metil (E)-(3-(3-metoxifenil) acrililoil)-D-fenilalaninato

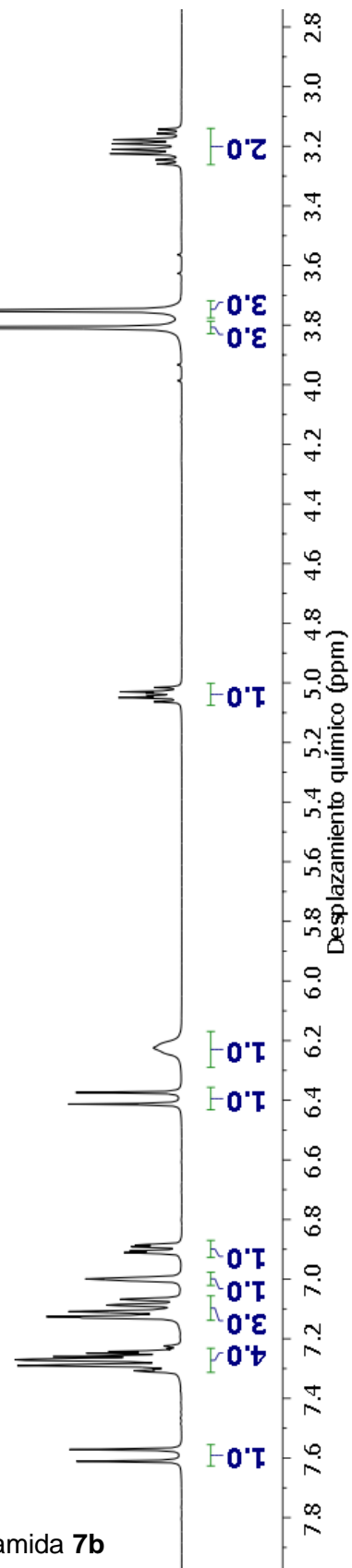
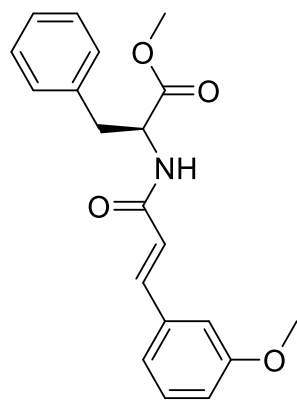


Figura 65. Espectro de RMN ¹H para la acrilamida 7b

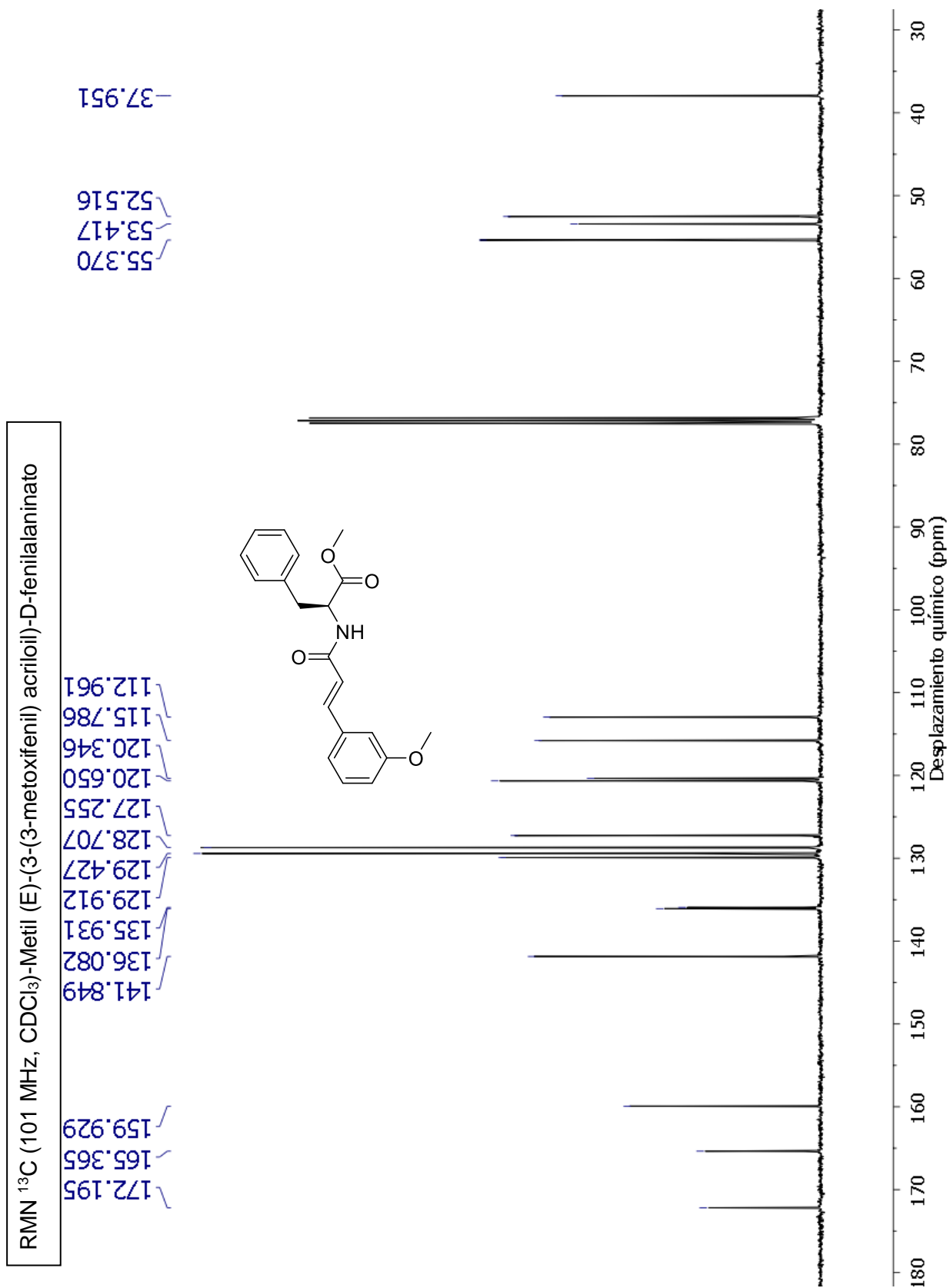


Figura 66. Espectro de RMN ¹³C para la acrilamida **7b**

β -hidroxiacrilamidas **8** y **9a-b**

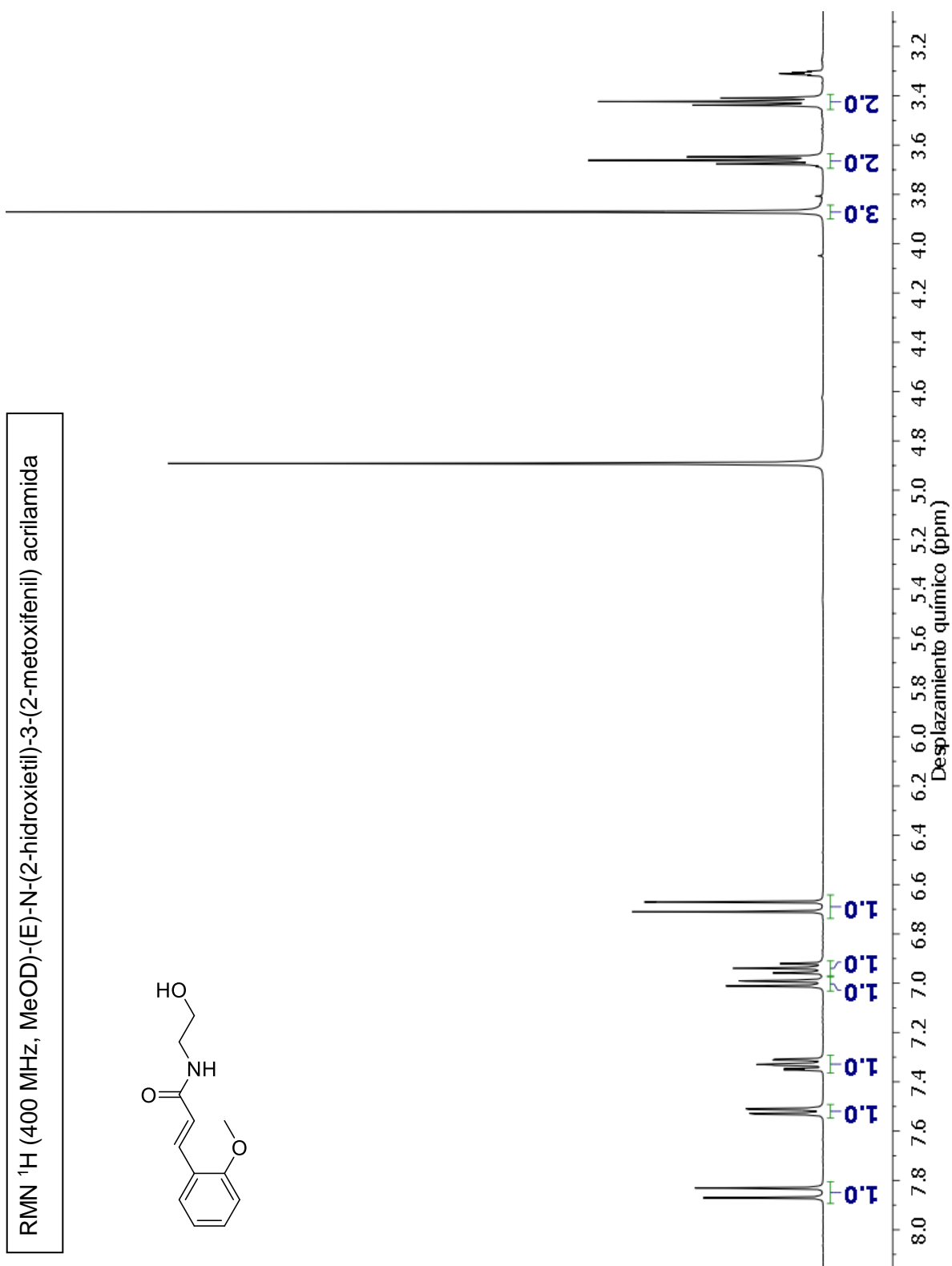


Figura 67. Espectro de RMN ^1H para la β -hidroxiacrilamida **8a**

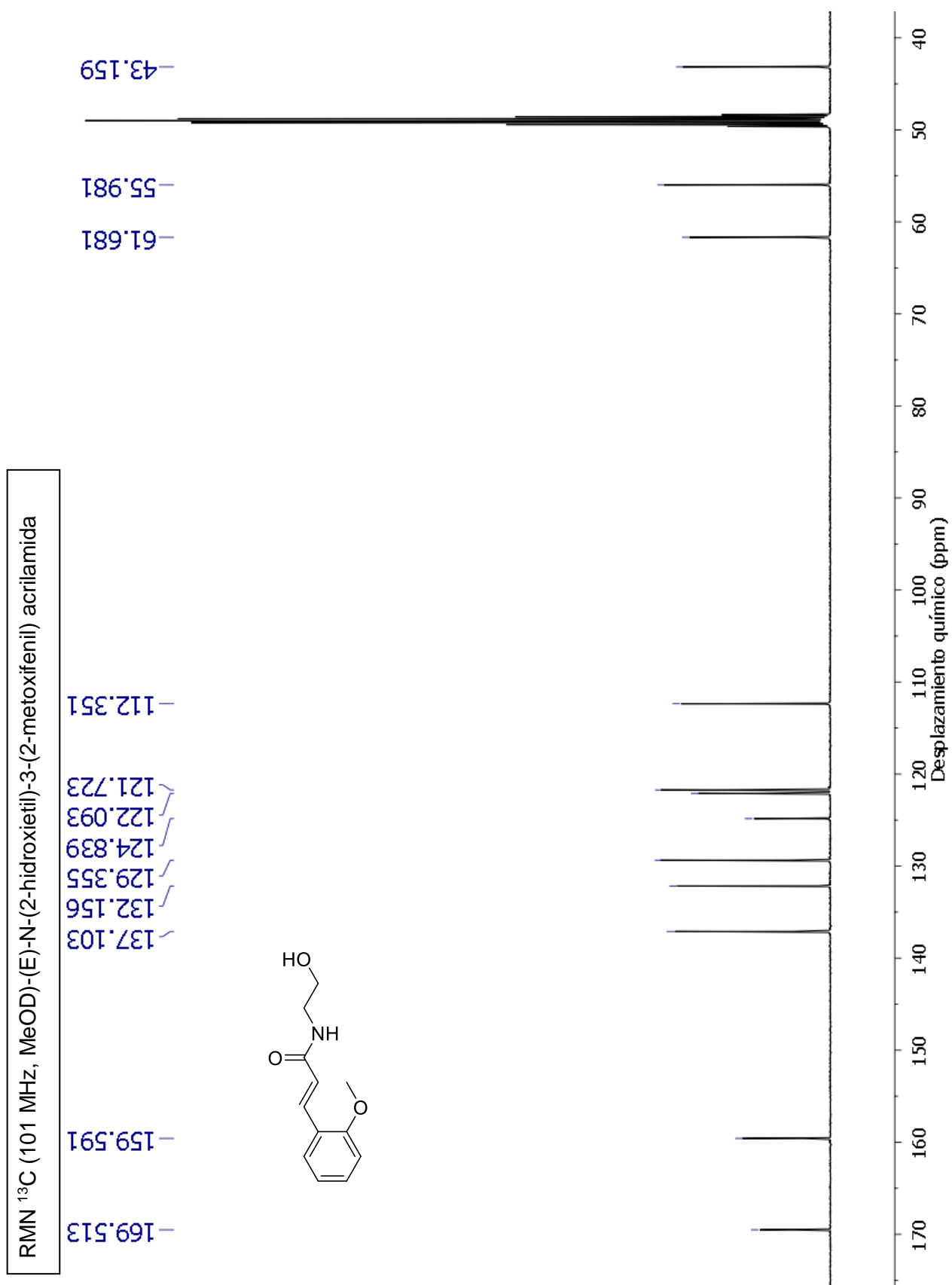


Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C para la β -hidroxiacrilamida **8a**

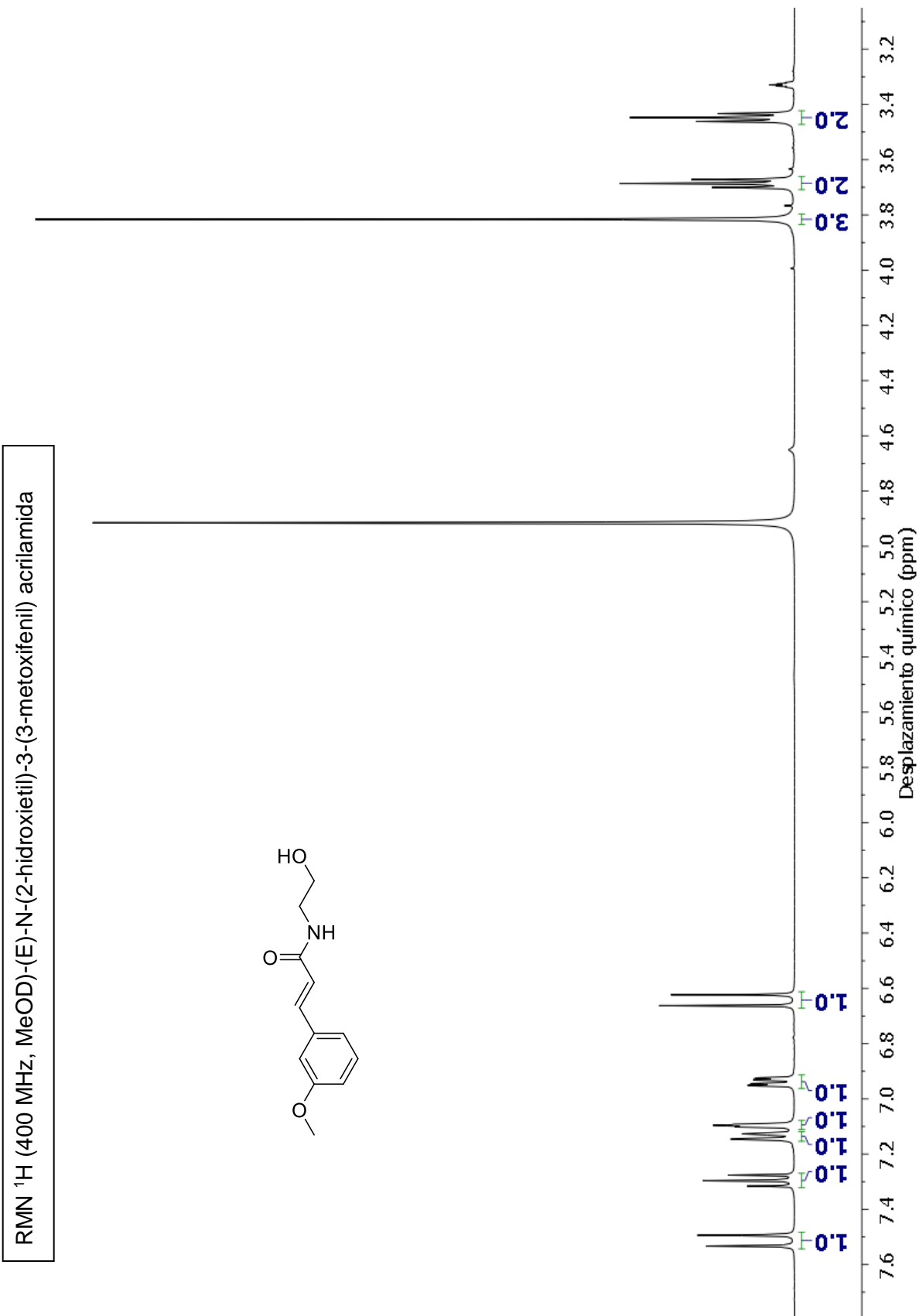


Figura 69. Espectro de RMN ¹H para la β-hidroxiacrilamida **8b**

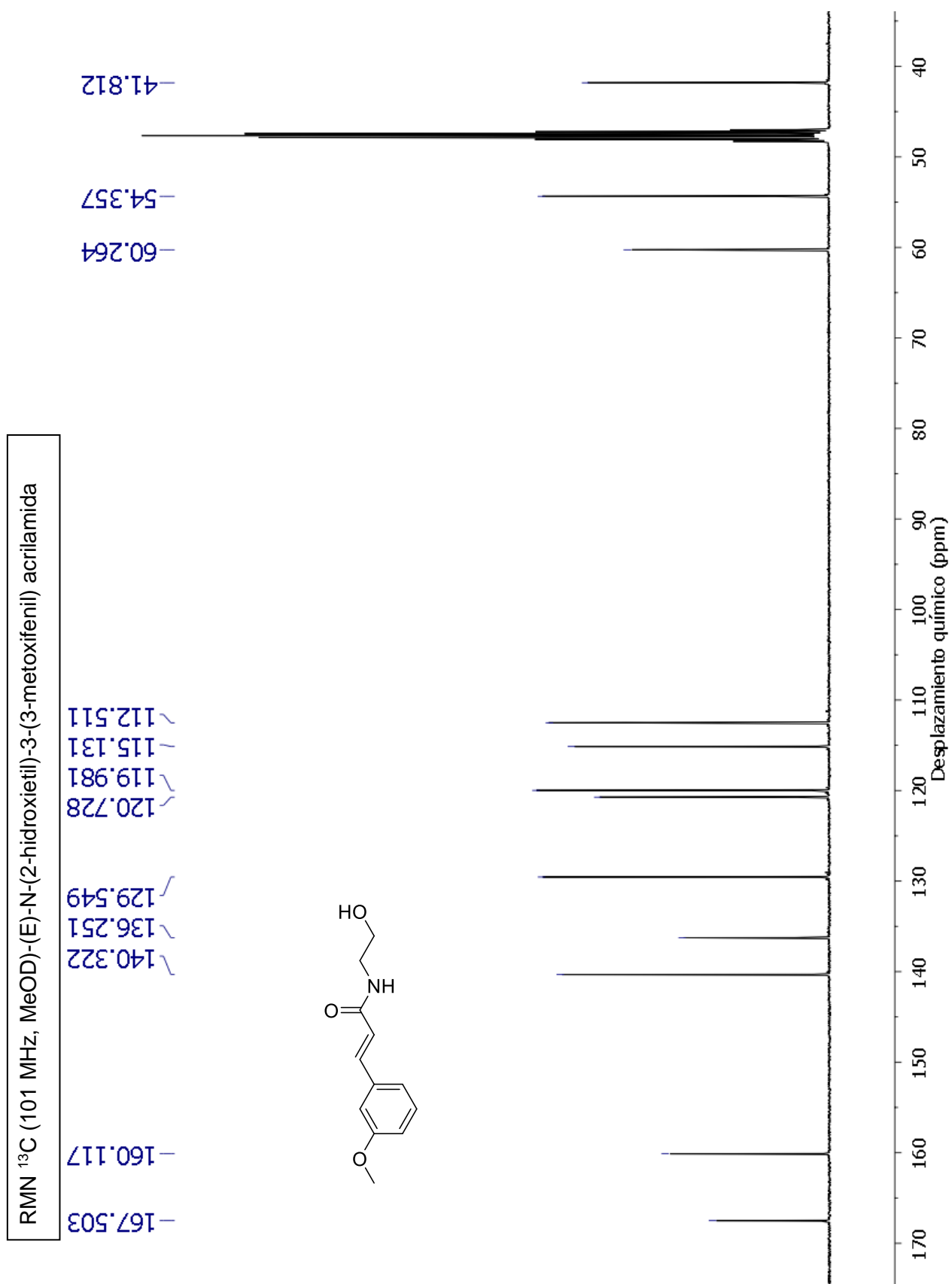


Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C para la β -hidroxiacrilamida **8b**

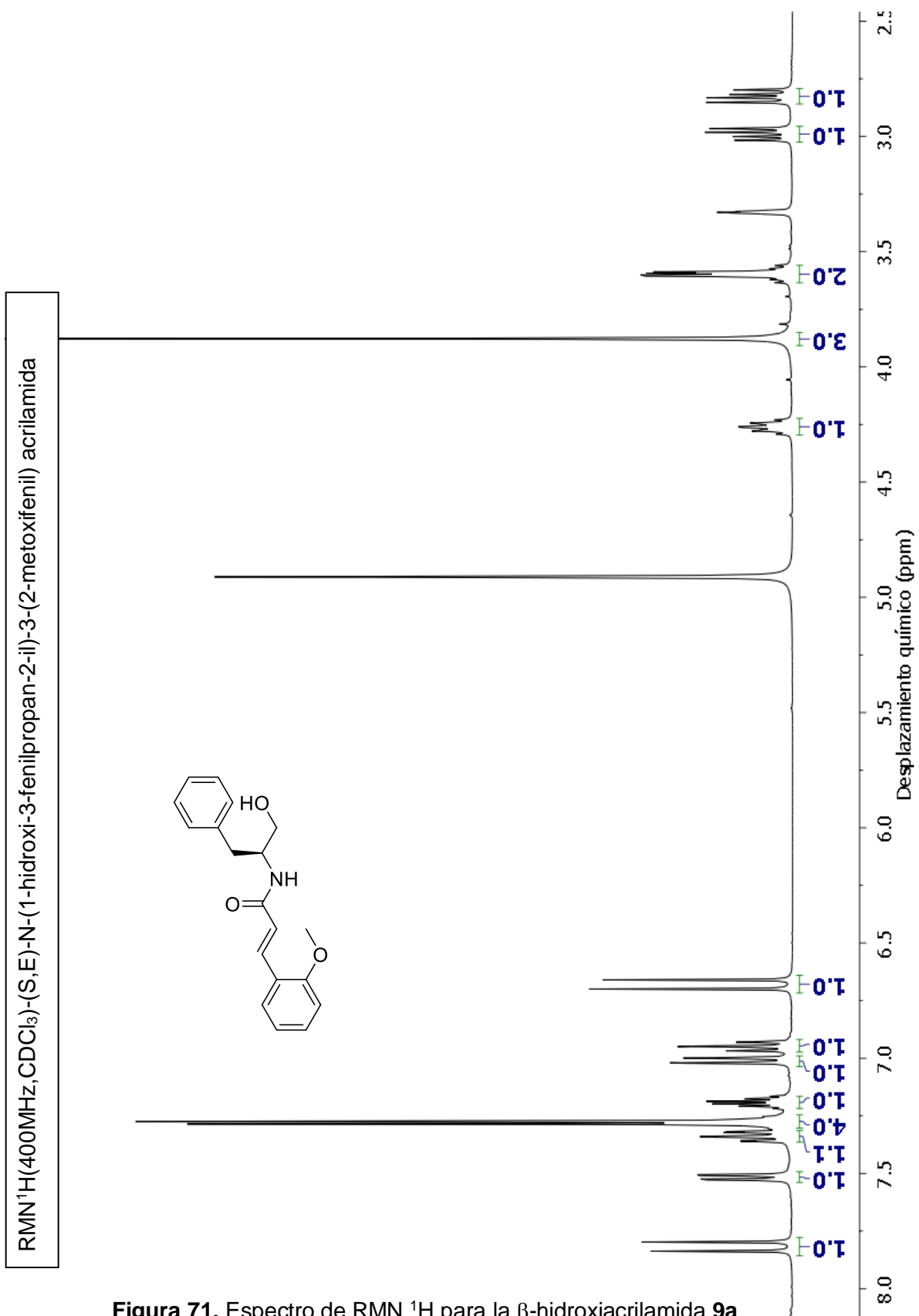


Figura 71. Espectro de RMN ¹H para la β-hidroxiacrilamida **9a**

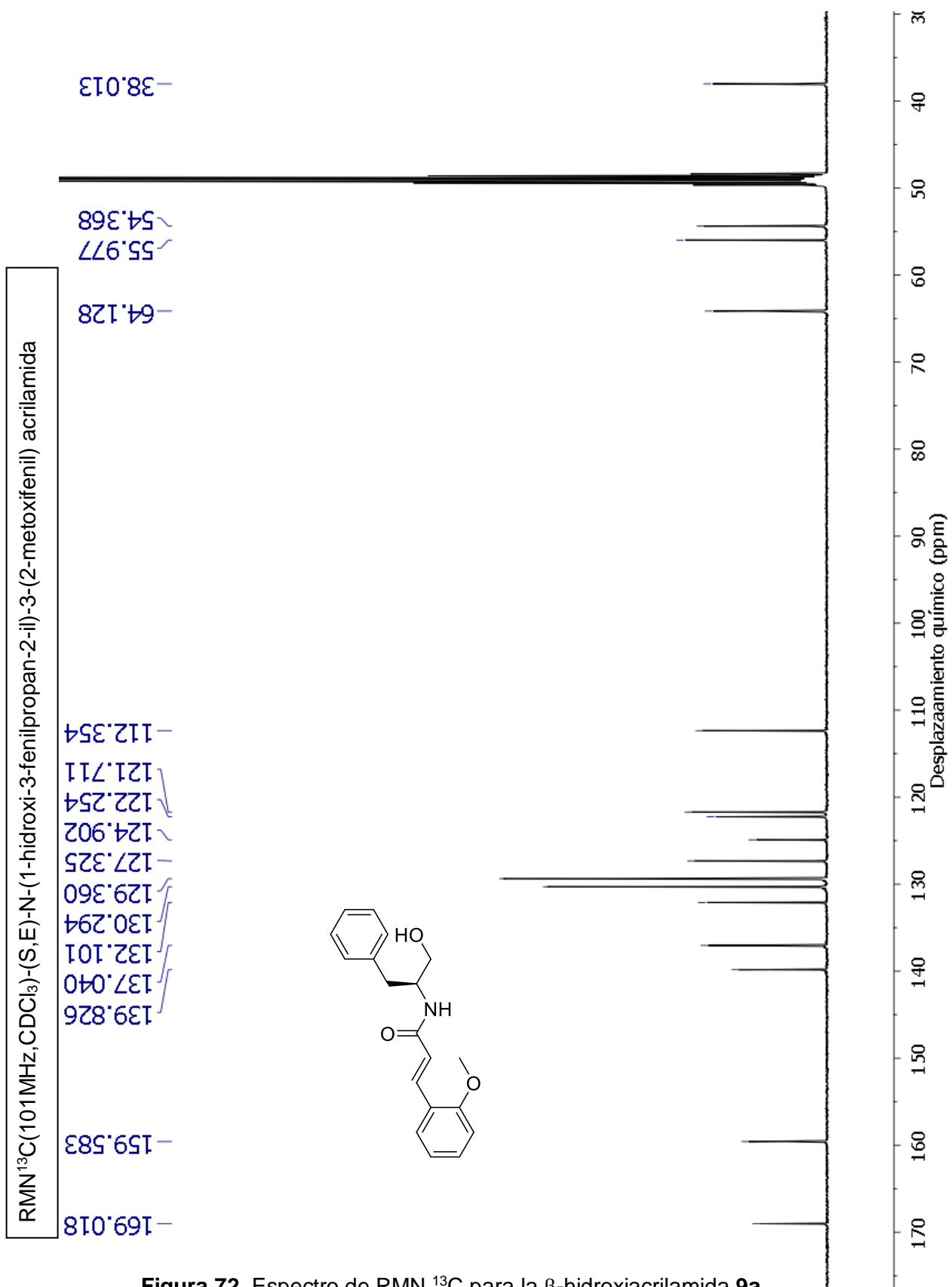


Figura 72. Espectro de RMN ¹³C para la β-hidroxiacrilamida **9a**

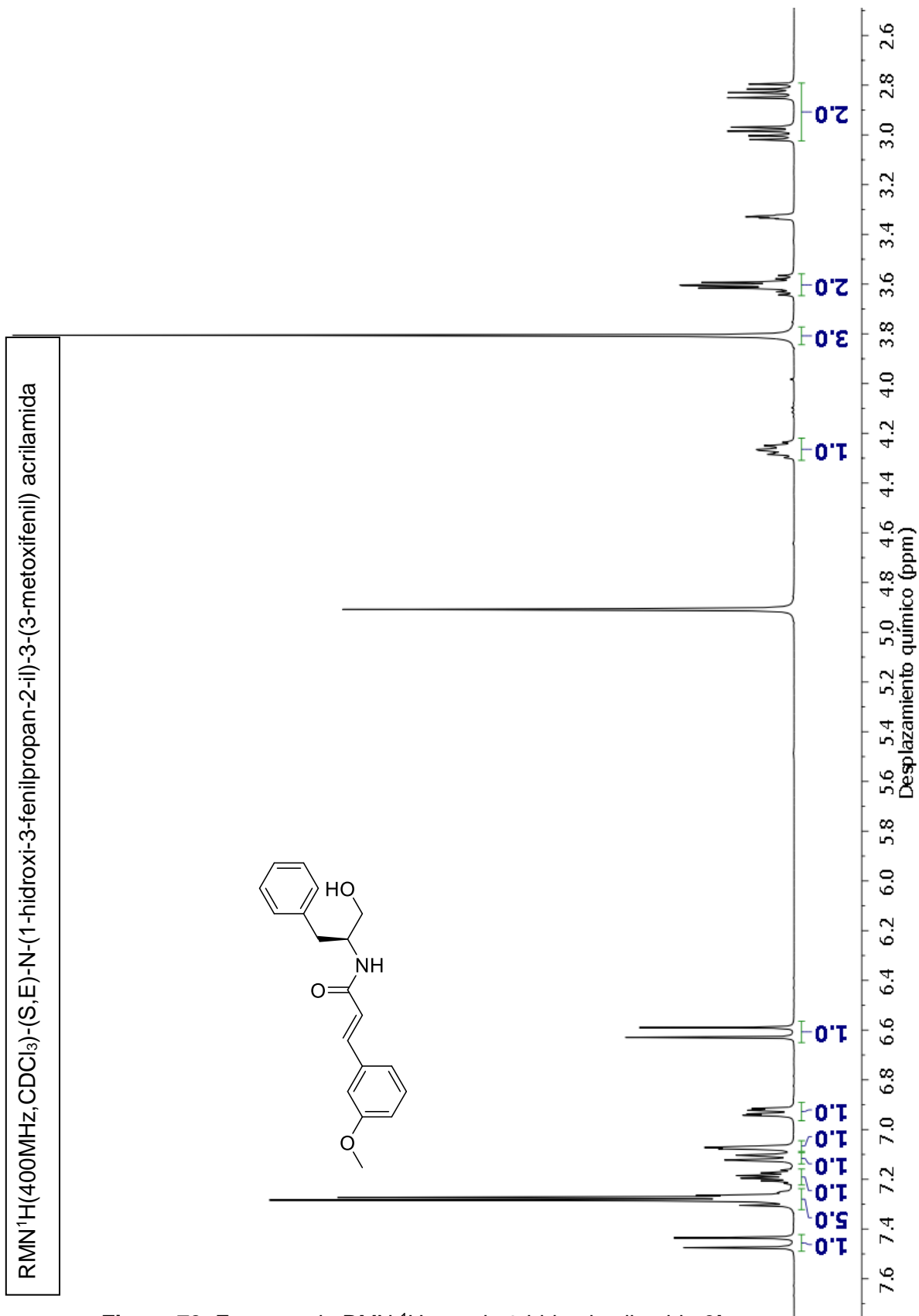


Figura 73. Espectro de RMN ¹H para la β-hidroxiacrilamida **9b**

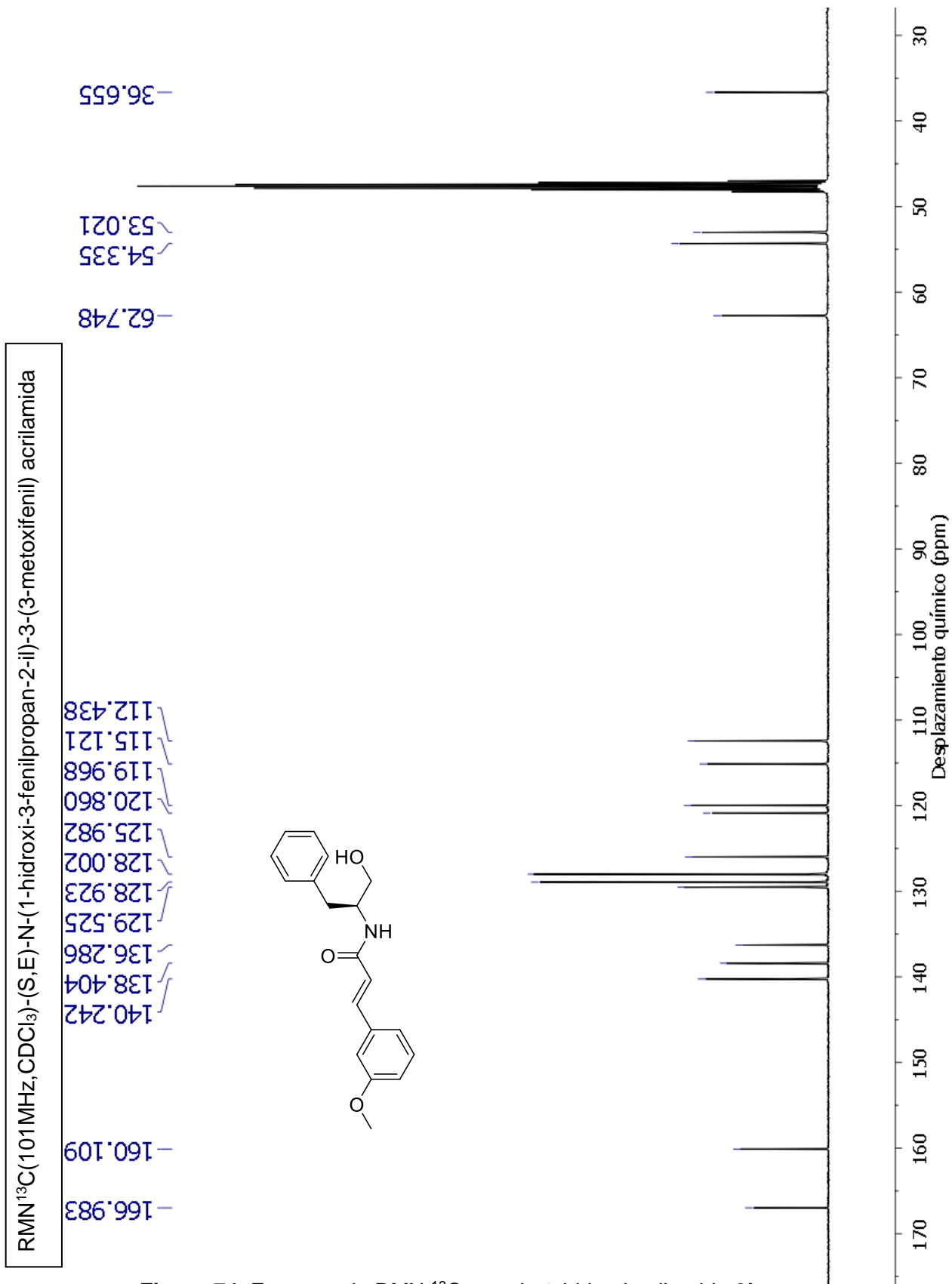


Figura 74. Espectro de RMN ¹³C para la β-hidroxiacrilamida **9b**

Oxazolinas **10** y **11a-b**

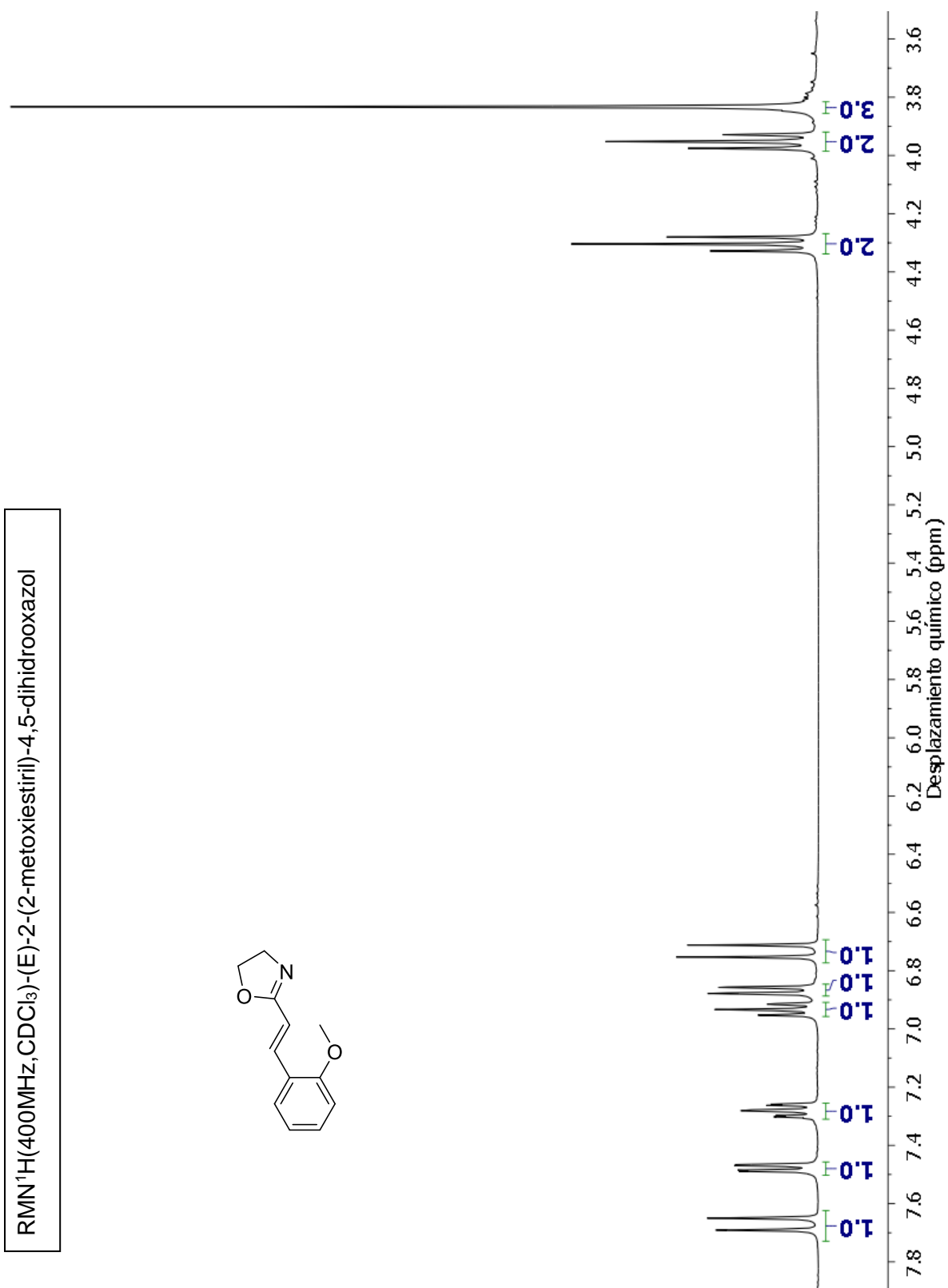


Figura 75. Espectro de RMN ¹H para la oxazolina **10a**

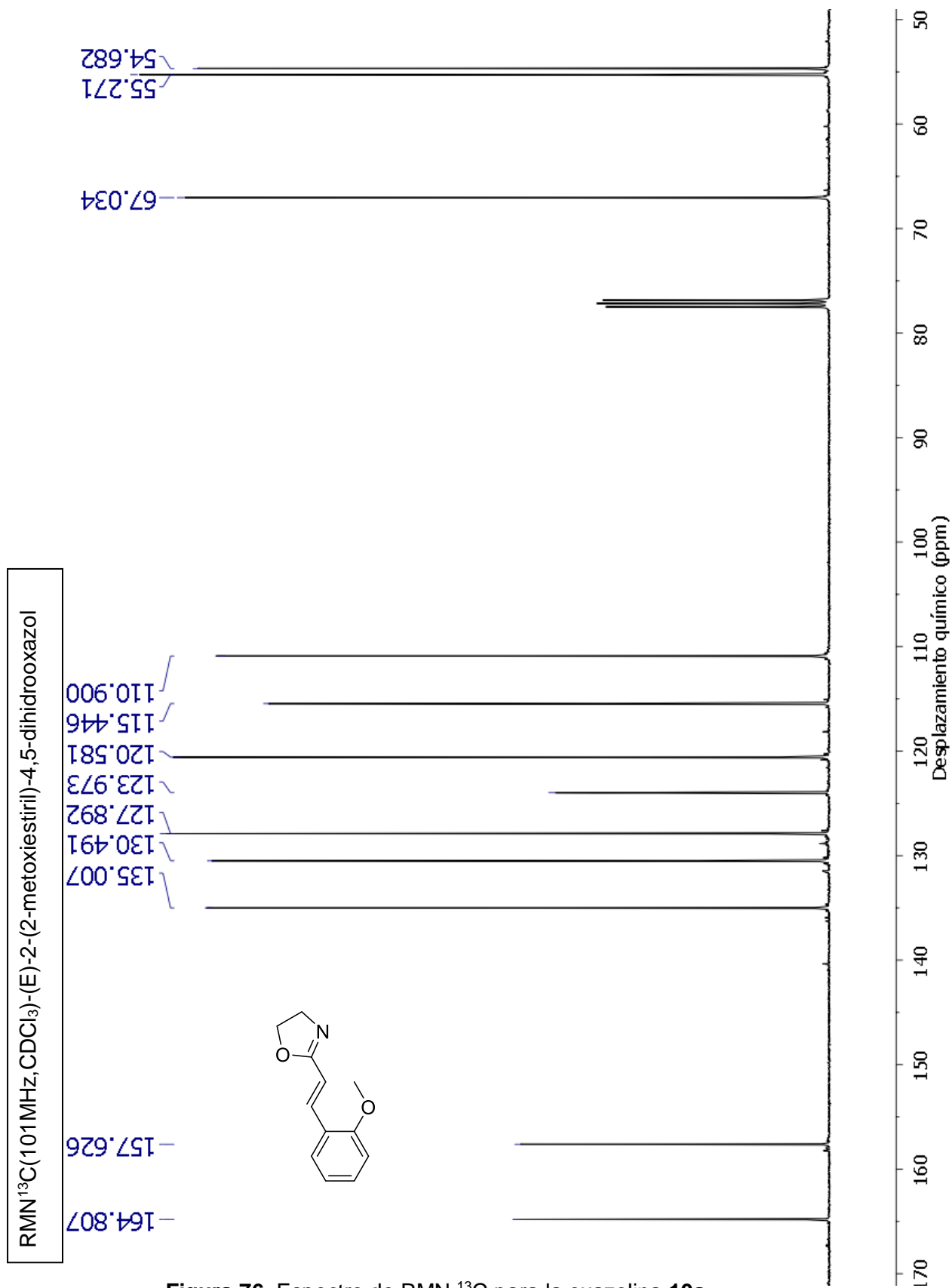


Figura 76. Espectro de RMN ¹³C para la oxazolina 10a

RMN¹H(400MHz,CDCl₃)-(E)-2-(3-metoxiestiril)-4,5-dihidrooxazol

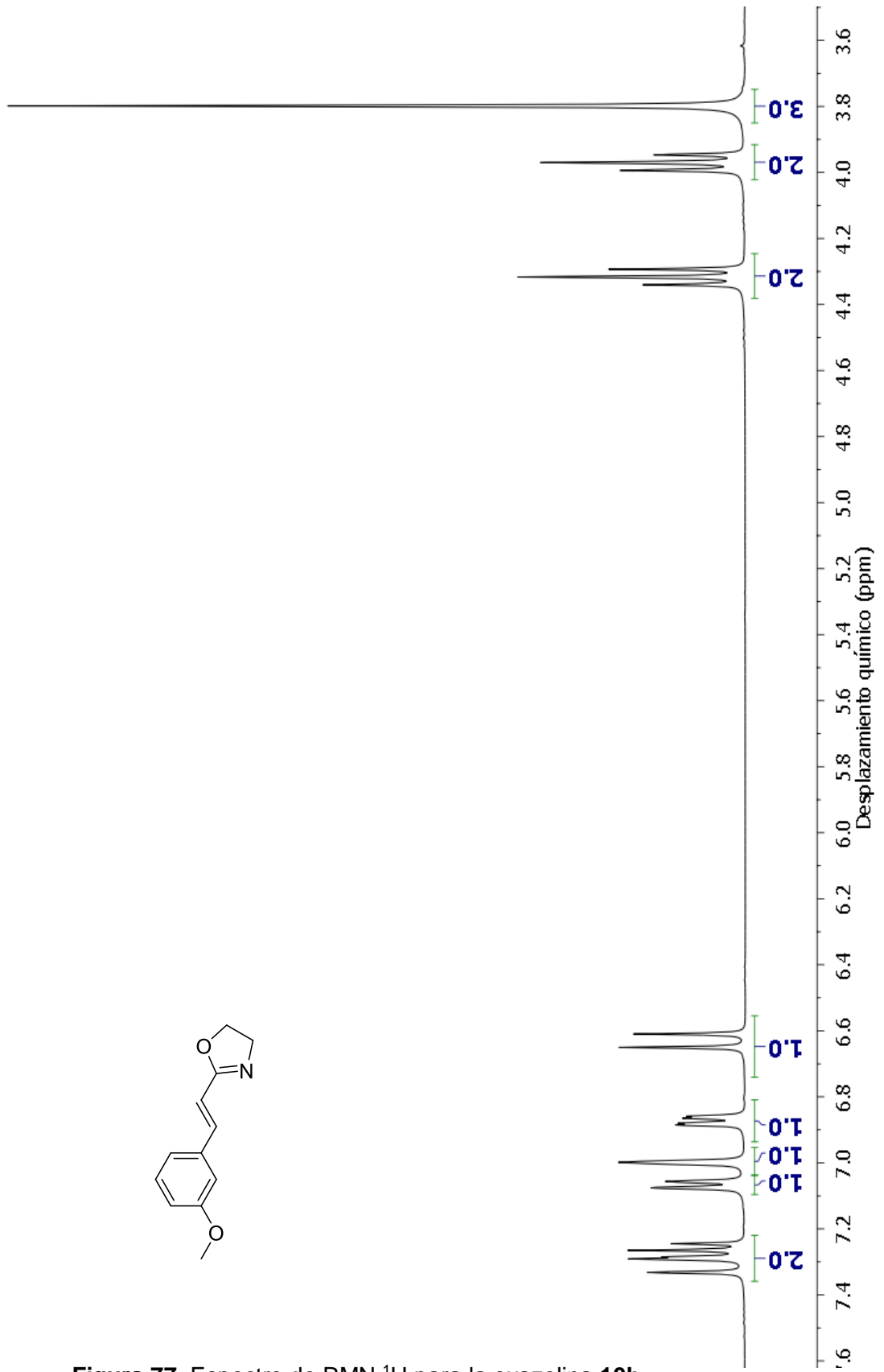
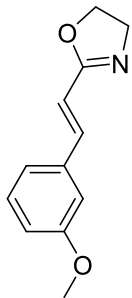


Figura 77. Espectro de RMN ¹H para la oxazolina 10b

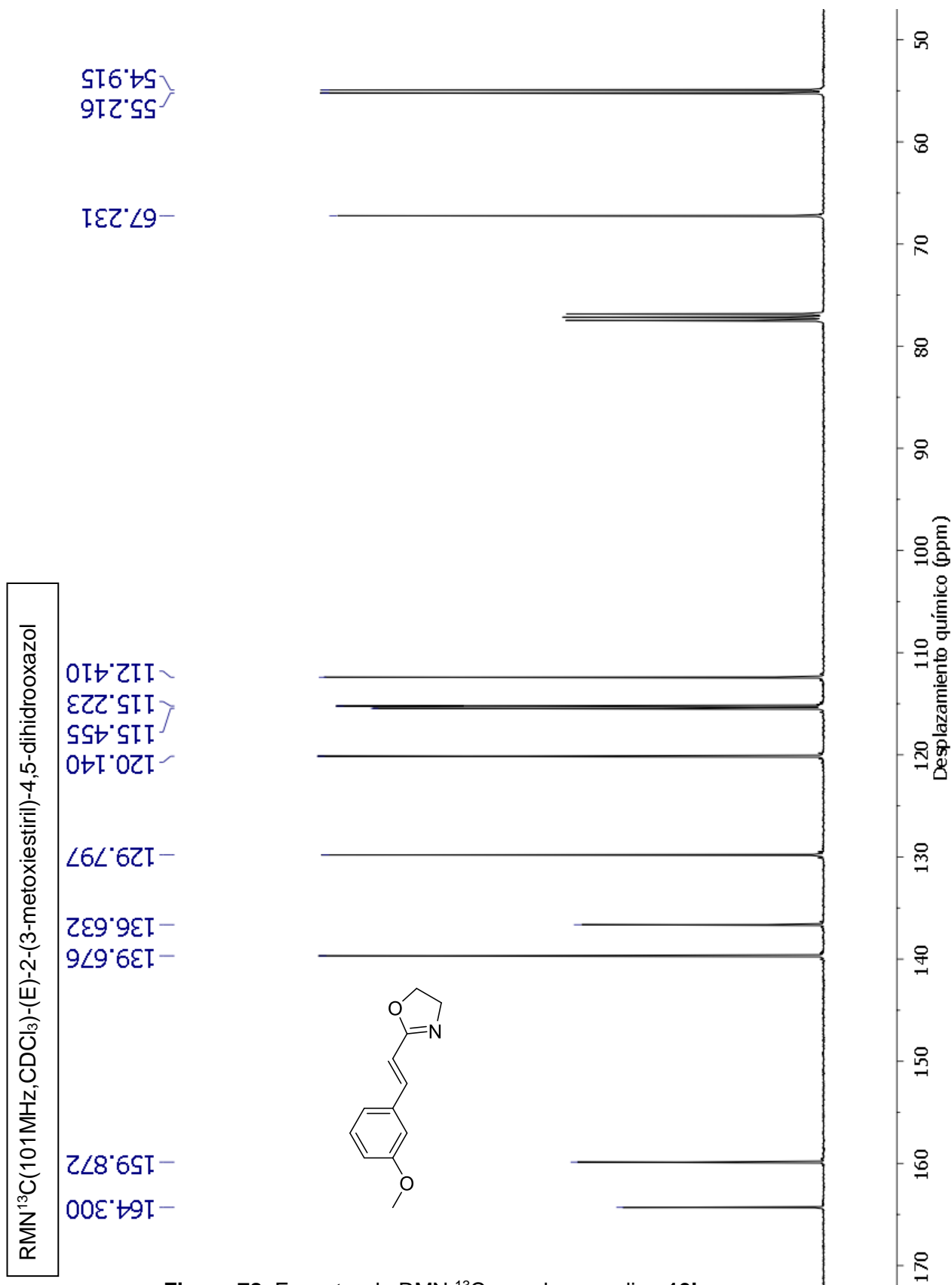


Figura 78. Espectro de RMN ¹³C para la oxazolina **10b**

RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) - (S,E)-4-bencil-2-(2-metoxiestiril)-4,5-dihidrooxazol

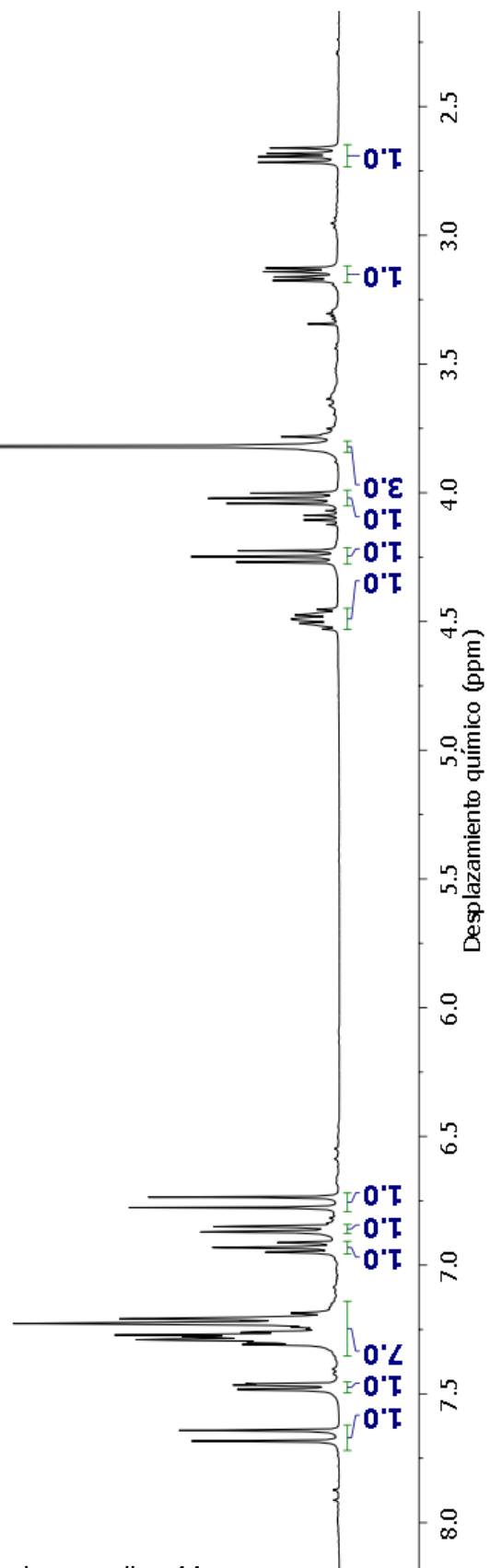
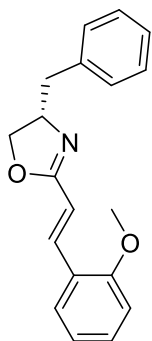


Figura 79. Espectro de RMN ¹H para la oxazolina 11a

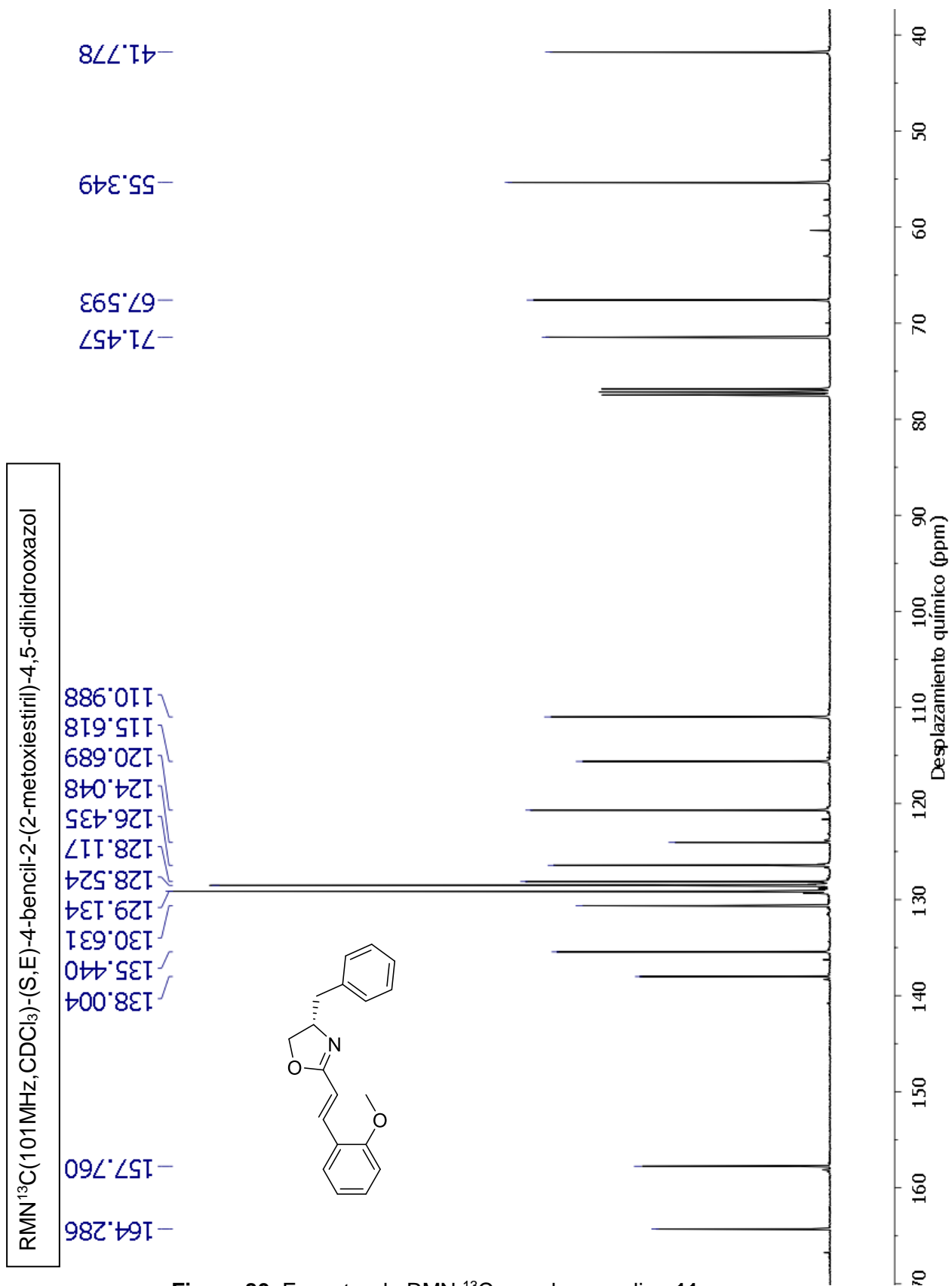


Figura 80. Espectro de RMN ¹³C para la oxazolina 11a

RMN¹H(400MHz, CDCl₃)-(S,E)-4-bencil-2-(3-metoxiestiril)-4,5-dihidrooxazol

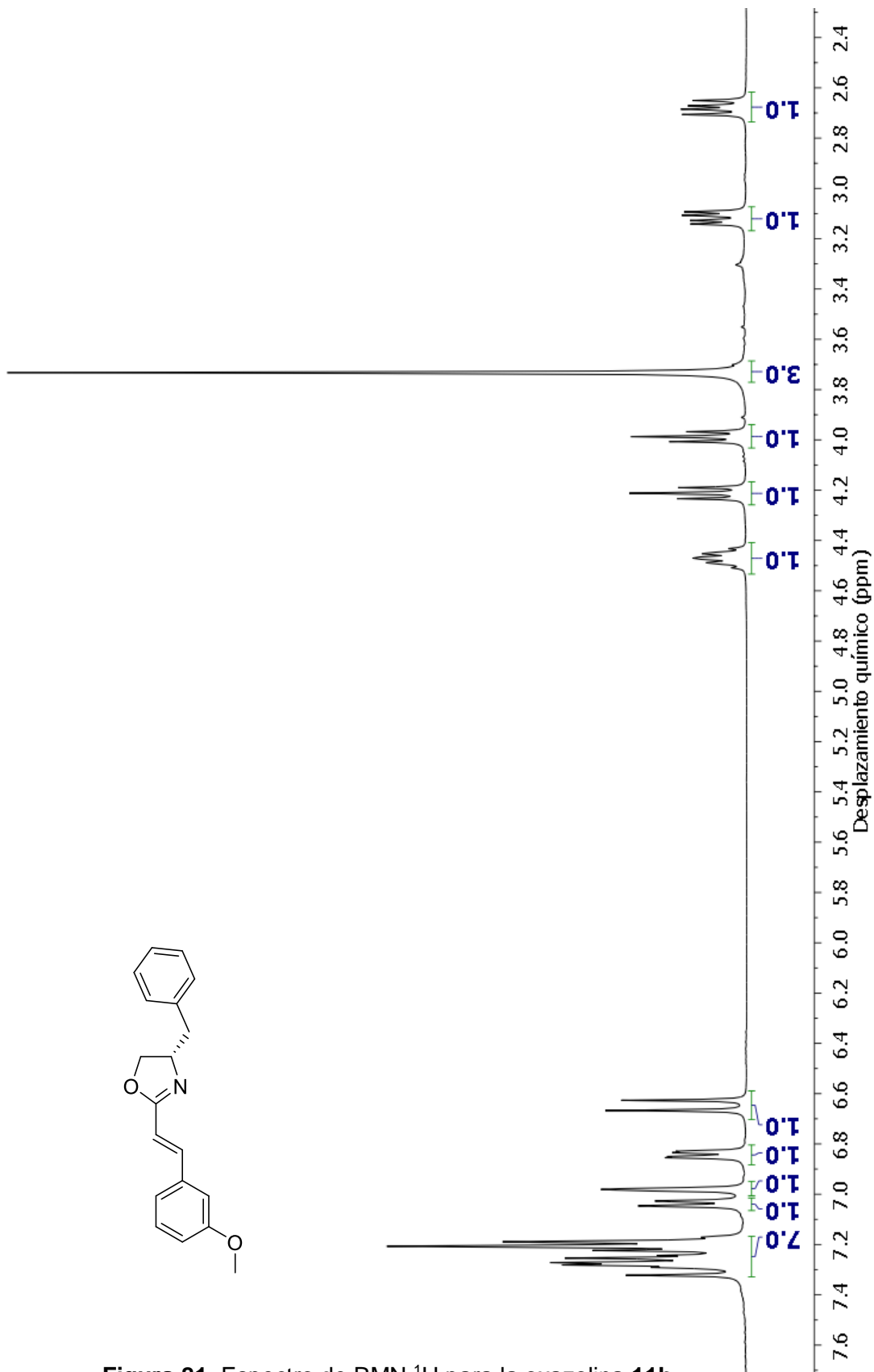
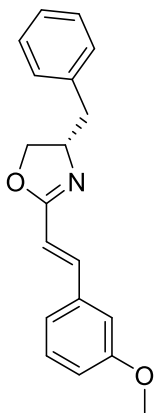


Figura 81. Espectro de RMN ¹H para la oxazolina 11b

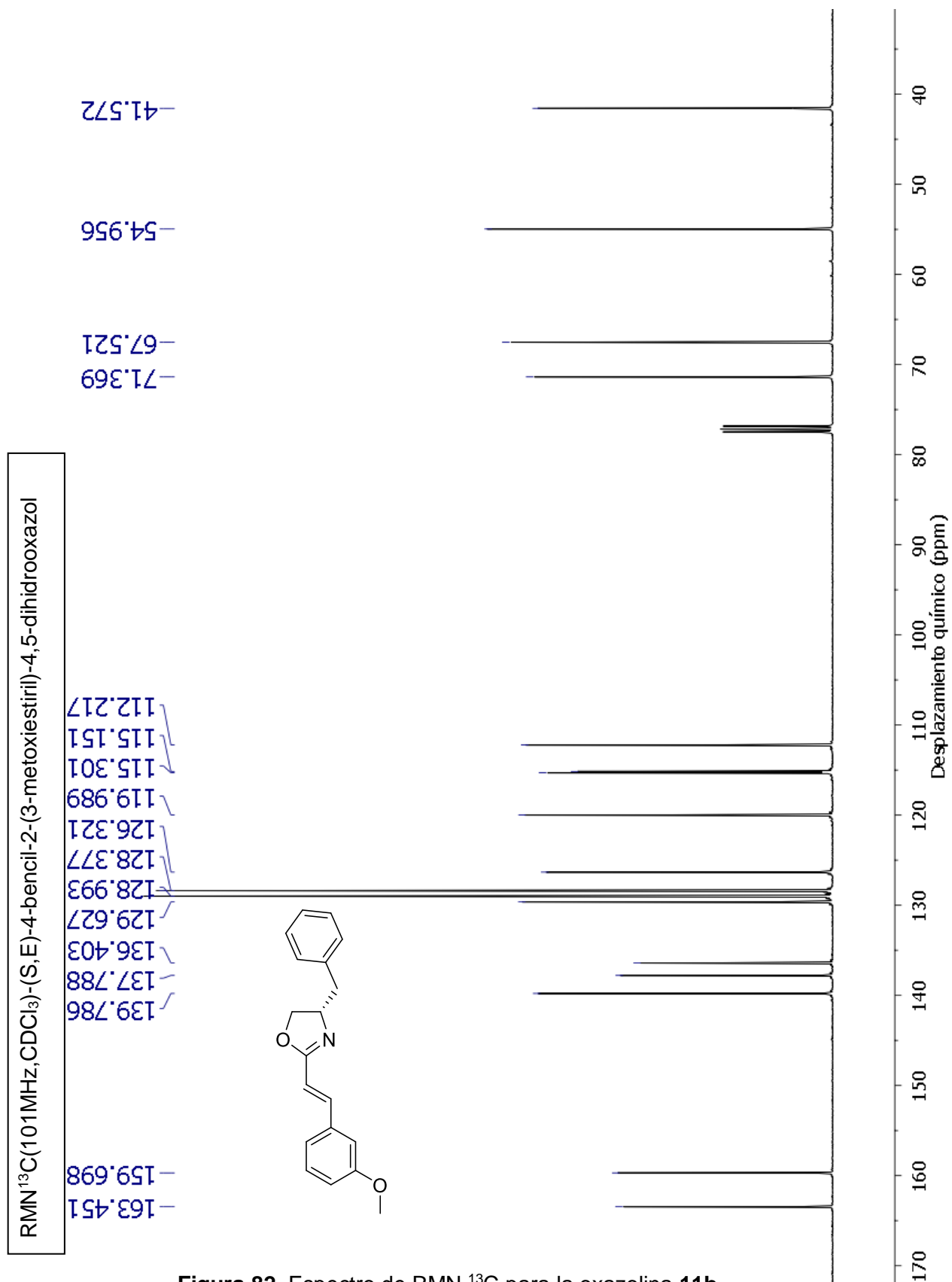


Figura 82. Espectro de RMN ¹³C para la oxazolina **11b**

Anexo 2.- Resumen Autobiográfico

Jessé Abner Cabrera Gerardo

25 años

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

Tesis: Síntesis y caracterización de nuevas acrilamidas y oxazolinas metoxiaril sustituidas. Determinación de su actividad citotóxica y antituberculosa *in vitro*

Campo de estudio: Estudio de compuestos con actividad farmacológica y biotecnología farmacéutica.

Biografía:

Nacido en Montemorelos, Nuevo León, México el 3 de diciembre de 1995, hijo de Esbeydi Gerardo Villarreal y Lucio Foret Cabrera Méndez.

Educación:

Egresado en 2018 de la carrera en Química Industrial en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.