

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**DISEÑO *IN SILICO* DE NUEVOS AMINOÉTERES DEL *AmDG*, SEMI-
SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS MÁS PROMISORIOS Y SU EVALUACIÓN
ANTIMICOBACTERIANA Y CITOTÓXICA**

POR

Q.F.B. Evelin Guadalupe Butanda Serrano

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

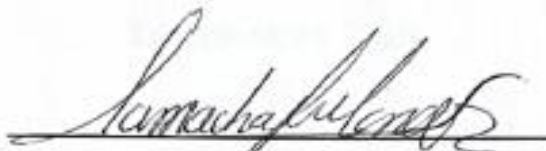
Febrero del 2026

DISEÑO IN SILICO DE NUEVOS AMINOÉTERES DEL AmDG, SEMI-SÍNTESIS

DE LOS DERIVADOS MÁS PROMISORIOS Y SU EVALUACIÓN

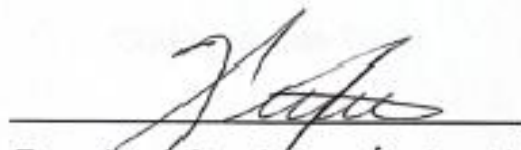
ANTIMICOBACTERIANA Y CITOTÓXICA

Aprobación de la Tesis



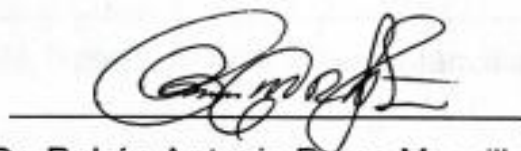
Dra. María del Rayo Camacho Corona

Presidenta



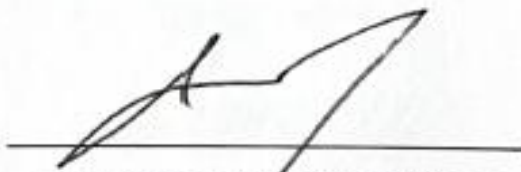
Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís

Secretario



Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Vocal

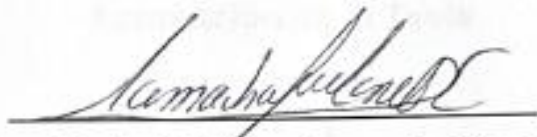


Dr. Javier Rivera de la Rosa

Subdirector de Posgrado

**DISEÑO *IN SILICO* DE NUEVOS AMINOÉTERES DEL *AmDG*, SEMI-SÍNTESIS
DE LOS DERIVADOS MÁS PROMISORIOS Y SU EVALUACIÓN
ANTIMICOBACTERIANA Y CITOTÓXICA**

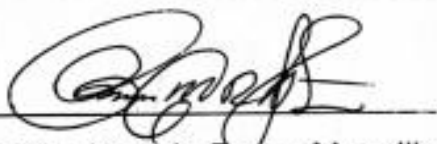
Revisión de la Tesis



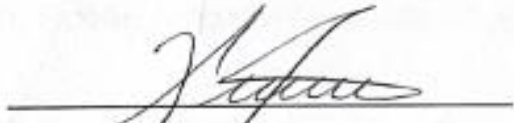
Dra. María del Rayo Camacho Corona
Directora de Tesis



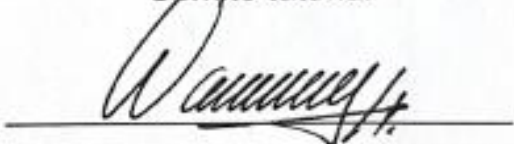
Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Codirector de Tesis



Dr. Rubén Antonio Remo Mancillas
Comité tutorial



Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís
Comité tutorial



Dr. Susana Thelma López Cortina
Comité tutorial

RESUMEN

Q.F.B. Evelin Guadalupe Butanda Serrano Fecha de graduación: 20/Feb/2026

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: **DISEÑO *IN SILICO* DE NUEVOS AMINOÉTERES DEL *AmDG*, SEMI-SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS MÁS PROMISORIOS Y SU EVALUACIÓN ANTIMICOBACTERIANA Y CITOTÓXICA.**

Número de páginas: 182

Candidata para el grado de
Maestra en Ciencias con Orientación
en Farmacia

Área de estudio: Farmacia.

Propósito y método de estudio: La tuberculosis es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Se estiman 10.8 millones de nuevas personas infectadas y un total de 10.25 millones de muertes en el año 2023, de las cuales 160, 000 muertes se debieron a tuberculosis multifármaco resistente. El **ácido meso dihidroguaiarético (*AmDG*)** un lignano de *Larrea tridentata*, mostró actividad significativa contra *M. tuberculosis* (CMI 50 µg/mL) al inhibir la enzima IpdAB CoA transferasa (genes Rv3551-Rv3552). La enzima 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR) también se identifica como un objetivo prometedor debido a que la vía del fosfato metileritriol (MEP) no forma parte del metabolismo humano, lo que sugiere que podría reducir la toxicidad de los fármacos dirigidos a ella. Del análisis QSAR de los 61 derivados de *AmDG* obtenidos hasta el momento se propusieron 16 nuevos aminoéteres derivados de *AmDG* y mediante el uso de herramientas computacionales se realizó un tamizaje *in silico* para elegir a aquellos más prometedores. En primer lugar, los derivados propuestos se sometieron a un acoplamiento molecular (*docking*) con las

enzimas IpdAB CoA transferasa (6CON) y DXR (4A03) y las moléculas con mejor calificación de acoplamiento se sometieron a un análisis farmacocinético en SWISSADME y toxicológico en Protox II para seleccionar a aquellas que presenten las mejores características. Posteriormente, se realizó la semisíntesis de los derivados más prometedores y se caracterizaron mediante RMN ¹H, RMN ¹³C y HRMS. Finalmente se evaluaron *in vitro* y se determinó la actividad antimicobacteriana mediante la determinación de CMI de los derivados frente a dos cepas de *M. tuberculosis* la cepa sensible HRv37 y la cepa G117 resistente a rifampicina, isoniazida, y etambutol, así como la citotoxicidad mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) y el Índice de Selectividad (IS).

Contribuciones y conclusiones: A partir del análisis *in silico* de dieciséis derivados del AmDG, se identificaron los compuestos con mayor potencial biológico y mejor perfil farmacocinético y toxicológico. Con base en estos resultados, se definieron las principales contribuciones y conclusiones del presente trabajo, las cuales se resumen a continuación. Las moléculas que presentaron mejor afinidad con la enzima IpdAB CoA transferasa (-10.13 a -13.05 kcal/mol) fueron **EBS-1A** y **EBS-1B** (Etilpirrolidina), **EBS-5B** (indol), **EBS-7A** y **EBS-7B** ((*N*-bencil-1*H*-benzimidazol), y **EBS-8B** (isoquinolina) y para la enzima DXR (-11.65 a -12.42 kcal/mol) fueron **EBS-6B** (dibencilamina), **EBS-7B** y **EBS-8B**. Se resalta la importancia de los derivados **EBS-6B** y **EBS-7B**, que muestran una mayor afinidad por la enzima DXR e IpdAB respectivamente, lo que sugiere una potencial actividad antimicobacteriana. El análisis

farmacocinético y toxicológico *in silico* mostró que los derivados **EBS-1A**, **EBS-1B** y **EBS-3A** y **EBS-7B**, tienen buena probabilidad absorción gastrointestinal, biodisponibilidad y bajo potencial de inhibición de citocromos y predicciones toxicológicas. Por lo tanto, se realizó la semisíntesis de seis derivados: **EBS-1B** (etilpirrolidina), **EBS-3A** (Azepina), **EBS-3B** (Azepina), **EBS-6B** (dibencilamina), **EBS-7B** (benzil benzimidazol) y **EBS-8B** (isoquinolina), los cuales fueron caracterizados mediante espectroscopía de RMN¹H, RMN¹³C y HRMS. Finalmente, las pruebas *in vitro* frente a *M. tuberculosis* confirmaron al derivado **EBS-8B** como el más activo con una CMI = 6.25–12.5 µg/mL para para la cepa H37Rv y G117 respectivamente, posicionándolo junto con **EBS-6B** y **EBS-7B** como los compuestos más prometedores para el desarrollo de nuevos agentes antituberculosos, al ser los derivados que mejor IS presentaron. En conjunto, los resultados evidencian la relevancia de combinar herramientas *in silico* e *in vitro* para el desarrollo racional de medicamentos para el tratamiento de la tuberculosos. Los derivados **EBS-6B**, **EBS-7B** y **EBS-8B** destacan como los compuestos más prometedores para estudios posteriores.

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Director de Tesis

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías

por la beca (CVU 1237372) otorgada para realizar estudios de Maestría en Ciencias en la UANL

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León - Laboratorio de Química Farmacéutica, Laboratorio de Química Industrial, Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos.

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León - Laboratorio de microbiología molecular del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”

Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro – Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos, Facultad de Química

Por las instalaciones e insumos del lugar de trabajo usados durante el desarrollo del proyecto de tesis.

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Directora de Tesis

Por la planeación y gestión de insumos, así como el asesoramiento y apoyo académico. Agradezco la paciencia y el tiempo que dedicó para que este trabajo pudiera ser finalizado.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Codirector de Tesis

Muchas gracias por su tiempo y la disposición ante cualquier duda relacionada con el proyecto, así como del asesoramiento para llevar a cabo la semisíntesis de los derivados y la elucidación estructural de los mismos.

A mi comité tutorial agradezco por la asesoría brindada y el tiempo que dedicaron a cada seminario, así como a la revisión de esta tesis.

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Muchas gracias Dr. Ruben por el apoyo para poder realizar el Acoplamiento molecular y porque en la distancia siempre resolvió todas las dudas.

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís

Por el apoyo y orientación durante las semisíntesis de los derivados y elucidación de los espectros.

Dr. Susana Thelma López Cortina

Muchas gracias por sus recomendaciones sobre la semisíntesis, y los comentarios en cada seminario, sin duda, su amabilidad fue muy reconfortante.

Agradezco infinitamente el apoyo y orientación del Dr. Eugenio Hernández Fernández y LQI. Diana Maricarmen González Cedillo, quienes además de compartirme su conocimiento, experiencia y un lugar en su laboratorio, donaron a mi proyecto NaH para poder llevar a cabo las semisíntesis de los derivados. Gracias por todo, "*Laboratorio de Cotorreo Industrial*".

Al Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza, Dr. Aldo Omar González Cruz y a Marbella Cristina Galán Sánchez, por los ensayos de citotoxicidad, gracias por compartirme su conocimiento y resolver todas mis dudas.

A la Dra. Flora Cruz, por la realización de los ensayos contra *M. tuberculosis*.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia; a mis papás Carlos y Tere, a mis hermanos Diana, Miriam, Carlitos y a Elizabeth; porque mis metas también son sus metas y mis logros son un reflejo de su apoyo incondicional.

A José Valencia Gaytan, porque no importan los kilómetros, sé que siempre estás conmigo. Mi *Pepe Grillo, dance it out!*

A Diana Anzures y Mari Carmen Cruz, las quiero mucho, gracias por escucharme y formar parte de mi vida.

A mis amigos regios, el mejor regalo que me dejó la maestría, gracias por su amistad y cariño durante esta etapa:

Camila Quezada Cervantes, *mi Cami sol de primavera...*

Enrique Contreras Vázquez, *mi Quique, mi luna llena en noche oscura...*

A Abi y Gustavo; gracias por todo lo que hicieron por mí y por ayudarme a adaptarme a Mty como foránea; aprendí mucho de ustedes.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Farmacéutica; MC. Karen Reyes, aún recuerdo cuando conocí a Reyes Melo, del “Reyes Melo *et al.*”. A Efrén, Juan Ma, Brisa, Ashley, Regina, Guevara y Mitzi; así como a mis chicos de servicio social, Christian, Melina y Pau. A mis roomies Melissa y Fer. A Luiscenciado. Gracias por todo el apoyo y momentos compartidos.

A mis chicas de la Tuna Femenil de la FCQ, por ser un lugar seguro; las quiero.

A Uriel, gracias por tu compañía durante la última parte de esta etapa.

¡Gracias Dios! ¡Lo logré!

Al cielo,

a la vida,

a las flores

y al viento...

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	La tuberculosis.....	1
1.1.1	Generalidades de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.1.2	Epidemiología.....	2
1.1.3	Etiología de la tuberculosis.....	3
1.1.3	Tratamiento para la tuberculosis	4
	Farmacorresistencia	4
1.2	Catabolismo del colesterol en <i>M. tuberculosis</i> : degradación de los anillos C y D	8
1.2.1	Vía del fosfato metileritriol: biosíntesis de isoprenoides	10
1.3	Diseño de fármacos asistido por computadora.....	12
1.3.1	Inhibición competitiva o no competitiva en el diseño de fármacos	14
1.3.2	Acoplamiento molecular - <i>docking</i>	14
1.3.3	Análisis de Relación Cuantitativa Estructura - Actividad (QSAR)	17
1.3.4	Perfil farmacocinético y toxicológico.....	18
1.3.4.1	SwissADME	19
1.3.4.2	Protox II. Predicción de toxicidad.....	22
2.	ANTECEDENTES	24
2.1	Ácido <i>meso</i> Dihidroguaiarético (<i>AmDG</i>): antimicobacteriano de <i>L. tridentata</i>	24
2.2	Mecanismo de acción de <i>AmDG</i>	24
2.3	IpdAB CoA transferasa como diana terapéutica	25
2.4	<i>AmDG</i> como molécula líder contra <i>M. tuberculosis</i> y análisis QSAR ..	25
2.5	Derivados de dihidrosfingosina y adamantano como antimicobacterianos.....	28
2.6	DXR como diana terapéutica; fosmidomicina y análogos antimicobacterianos.....	29
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
3.1	Hipótesis.....	33
3.2	Objetivo general.....	33
3.3	Objetivos específicos	33
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	34

4.1	Material y equipo	34
4.2	Diseño de 16 nuevos aminoéteres del <i>AmDG</i>	35
4.3	Preparación de los ligandos para el acoplamiento molecular	37
4.4	Acoplamiento molecular de los 16 aminoéteres con la enzima CoA transferasa.....	38
4.5	Acoplamiento molecular de los 16 aminoéteres con la enzima DXR...	39
4.6	Predicción de los parámetros farmacocinéticos y tóxicos de los derivados más prometedores	40
4.6.1	Predicción de propiedades farmacocinéticas de los ligandos	41
4.6.2	Propiedades toxicológicas de los ligandos	42
4.7	Aislamiento y purificación de <i>AmDG</i>	44
4.7.1	Primera columna de fraccionamiento de extracto crudo.....	44
4.7.2	Segunda columna de fraccionamiento del extracto crudo	45
4.7.3	Tercera columna de fraccionamiento del extracto crudo	47
4.8	Semisíntesis y purificación de amino éteres derivados de <i>AmDG</i>	50
4.9	Procedimiento general para las semisíntesis de los aminoéteres EBS- 1B, EBS-3A, EBS-3B, EBS-7B, y EBS-8B derivados del <i>AmDG</i>	50
4.9.1	Semisíntesis del derivado EBS-1B.....	51
4.9.2	Semisíntesis del derivado EBS-3A y EBS-3B	52
4.9.3	Semisíntesis del derivado EBS-6B	53
4.9.4	Semisíntesis del derivado EBS-7B	54
4.9.5	Semisíntesis del derivado EBS-8B.....	55
4.10	Determinación de la actividad antimicobacteriana de los derivados obtenidos.....	56
4.10.1	Preparación de las cepas	56
4.10.2	Preparación del inóculo	56
4.10.3	Preparación de la solución Stock inicial y soluciones de prueba.	56
4.10.4	Ensayo contra <i>M. tuberculosis</i>	57
4.11	Determinación de actividad citotóxica	58
4.11.1	Preparación de soluciones de los derivados a evaluar.....	59
4.11.2	Cultivo de células Vero.....	59
4.11.3	Determinación de citotoxicidad mediante la técnica de MTT.....	60
4.11.3.1	Determinación del IC ₅₀	61

4.11.3.2	Determinación del IS	61
5.	Resultados y discusión	62
5.1	Acoplamiento molecular con la enzima IpdAB CoA transferasa	63
5.1.1	Análisis del acomodo de los ligandos en la cavidad del sitio activo	91
5.2	Acoplamiento molecular con enzima DXR.....	93
5.3	Perfil farmacocinético de los derivados más promisorios	107
5.4	Perfil toxicológico de los derivados más promisorios.....	114
5.5	Purificación de <i>AmDG</i> a partir de un extracto crudo	117
5.5.1	Propiedades físicas y espectroscópicas de <i>AmDG</i>	121
5.5.1.1	Elucidación estructural de <i>AmDG</i>	121
5.6	Propiedades físicas y espectroscópicas de los derivados de <i>AmDG</i>	125
5.6.1	Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-1B..	125
5.6.2	Elucidación estructural del derivado EBS-1B	127
5.6.3	Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-3A..	134
5.6.4	Elucidación estructural del derivado EBS-3A	134
5.6.5	Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-3B..	138
5.6.6	Elucidación estructural del derivado EBS-3B	138
5.6.7	Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-6B..	143
5.6.8	Elucidación estructural del derivado EBS-6B	144
5.6.9	Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-7B..	149
5.6.10	Elucidación estructural del derivado EBS-7B	149
5.6.11	Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-8B..	155
5.6.12	Elucidación estructural del derivado EBS-8B	155
5.7	Evaluación de la actividad antimicrobiana y citotóxica.....	160
5.8	Disposición de los residuos generados.....	166
6.	Conclusiones.....	167
7.	Perspectivas	169
8.	Referencias bibliográficas	170
9.	ANEXOS	179
9.1	Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-1B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 553.39869$ consistente con la formula molecular.....	179

9.2	Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-3A, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 556.31246$ consistente con la formula molecular.....	179
9.3	Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-3B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 581.42906$ consistente con la formula molecular.....	180
9.4	Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-6B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 777.45947$ consistente con la formula molecular.....	180
9.5	Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-7B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 771.39075$ consistente con la formula molecular.....	181
9.6	Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-8B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 649.40286$ consistente con la formula molecular.....	181
9.7	Divulgación	182

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Mecanismo de acción y resistencia de los fármacos de primera y segunda generación. Adaptada de Domínguez et al., 2016; R. Singh et al., 2020 y V. Singh & Chibale, 2021.	1
Tabla 2.	Actividad antimicobacteriana e índice de selectividad del Ácido meso dihidroguaiarético y los derivados más activos	27
Tabla 3.	Aminoéteres derivados de AmDG propuestos para el tamizaje <i>in sílico</i>	36
Tabla 4.	Identificación de los sitios evaluados en la enzima IpdAB CoA transferasa	38
Tabla 5.	Identificación de los sitios evaluados en la enzima DXR (A403) .	40
Tabla 6.	Fraccionamiento de extracto de <i>L. tridentata</i> por CC	45
Tabla 7.	Fraccionamiento de extracto de <i>L. tridentata</i> por CC	46
Tabla 8.	Purificación de fracciones ricas en AmDG	47
Tabla 9.	Fraccionamiento de una fracción rica en AmDG por CC.....	48
Tabla 10.	Purificación de una fracción rica en AmDG	49
Tabla 11.	Calificaciones (kcal/mol) de la simulación del acoplamiento molecular de los aminoéteres con la enzima IpdAB CoA transferasa de <i>M. tuberculosis</i>	70
Tabla 12.	Interacciones proteína- ligando de los mejores acoplamientos moleculares con la enzima IpdAB CoA transferasa	85
Tabla 13.	Calificación de acoplamiento (kcal/mol) de la simulación del acoplamiento molecular de los aminoéteres con la enzima DXR de <i>M. tuberculosis</i>	93
Tabla 14.	Interacción proteína-ligando de los mejores acoplamientos moleculares con la enzima DXR.....	103
Tabla 15.	Propiedades fisicoquímicas y reglas de Lipinski de los derivados más promisorios.....	108
Tabla 16.	Perfil farmacocinético de los derivados más promisorios	112
Tabla 17.	Perfil toxicológico de los derivados más promisorios	115
Tabla 18.	Purificación de AmDG (% de rendimiento).....	119
Tabla 19.	Desplazamientos químicos experimentales y comparación de los desplazamientos químicos calculados para los compuestos EBS-1Ba y EBS-1Bb.	133

Tabla 20.	Actividad antimicobacteriana de los aminoéteres derivados de <i>AmDG</i> en la cepa sensible H37Rv y resistente G117, citotoxicidad en la línea celular VERO e índice de selectividad.....	164
Tabla 21.	Disposición de los residuos de acuerdo con la clasificación de la UANL.	166

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición de la envoltura celular de <i>M. tuberculosis</i> . Diaciltrealosa (DAT), lipoarabinomanano (LAM), poliaciltrealosa (PAT), dimicocerosato de tiocerol (PDIM), fosfatidil inositol manosido (PIM), trealosa 6, 6-dimicolato (TDM), monomicolato de trehalosa (TMM) y sulfolípidio -1 (SL-1), fosfatidil inositol manosido (PIM). La imagen se diseñó usando la plataforma en línea en Biorender.....	2
Figura 2. Degradación de los anillos C y D del colesterol en <i>M. tuberculosis</i>	10
Figura 3. Vía del fosfato metileritriol.	12
Figura 4. Derivados de dihidroesfingosina 3 y 4b derivados de 2-amino-1-alcanol, y 8b derivado de 1,2-alcano-diamina.....	28
Figura 5. Derivados de aminoéteres de adamantano.....	29
Figura 6. Estructura de fosmidomicina y su derivado FR-900098	31
Figura 7. Derivados de AmDG, (\pm) <i>mono</i> (clave A) o <i>meso</i> (clave B).	35
Figura 8. Plataforma en línea SwissADME.....	42
Figura 9. Plataforma en línea Prottox II	43
Figura 10. Esquema de reacción para la obtención del derivado EBS-1B ...	51
Figura 11. Esquema de reacción para la obtención de los derivados EBS-3A y EBS-3B	52
Figura 12. Esquema de reacción para la obtención del derivado EBS-6B ...	53
Figura 13. Esquema de reacción para la obtención de los derivados EBS-7B.	54
Figura 14. Esquema de reacción para la obtención del derivado EBS-8B. ..	55
Figura 15. Validación del sitio catalítico de la subunidad AB de la enzima IpdAB con COCHEA-CoA.....	65
Figura 16. Validación del sitio catalítico de la subunidad AB de la enzima IpdAB con MeDODA-CoA.....	66
Figura 17. Unión de AmDG en sitio ciego AB de la enzima IpdAB CoA transferasa.	67
Figura 18. Unión del AmDG al sitio catalítico AB de la enzima IpdAB CoA transferasa.	68
Figura 19. Unión de AmDG al sitio catalítico CD de la enzima IpdAB CoA transferasa.	68
Figura 20. Unión del derivado EBS-1A al sitio alostérico 1 de la enzima IpdAB CoA transferasa.....	71

Figura 21. Unión del derivado EBS-1A al sitio catalítico AB de la enzima IpdAB CoA transferasa.	72
Figura 22. Unión del derivado EBS-1A al sitio catalítico CD de la enzima IpdAB CoA transferasa.	73
Figura 23. Unión del derivado EBS-1B al sitio alostérico 2 de la enzima IpdAB CoA transferasa.	74
Figura 24. Unión del derivado EBS-1B al sitio catalítico AB de la enzima IpdAB Coa transferasa.	75
Figura 25. Unión del derivado EBS-E1B al sitio catalítico CD de la enzima IpdAB Coa transferasa.	76
Figura 26. Unión del derivado EBS-5B al sitio alostérico 2 de la enzima IpdAB CoA transferasa.	77
Figura 27. Unión del derivado EBS-5B con el sitio catalítico CD de la enzima IpdAB CoA transferasa.	78
Figura 28. Unión del derivado EBS-7A al sitio catalítico AB la enzima IpdAB CoA transferasa.	79
Figura 29. Unión del derivado EBS-7A al sitio catalítico CD en la enzima IpdAB CoA transferasa.	80
Figura 30. Unión del derivado EBS-7B al sitio alostérico 2 de la enzima IpdAB CoA transferasa.	81
Figura 31. Unión del derivado EBS-7B al sitio catalítico AB de la enzima IpdAB CoA transferasa.	82
Figura 32. Unión del derivado EBS-8B al sitio alostérico 2 de la enzima IpdAB CoA transferasa.	83
Figura 33. Unión del derivado EBS-8B al sitio catalítico CD de la enzima IpdAB CoA transferasa.	84
Figura 34. Análisis del acomodo de los ligandos en comparación con el sustrato natural COCHEA de la enzima IpdAB. a) COCHEA (amarillo), b) AmDG (azul), c) EBS-7B (verde), d) EBS-6B (violeta).	92
Figura 35. Unión de DXP al sitio en conformación cerrada con NADPH.	95
Figura 36. Unión de F98 al sitio en conformación cerrada con NADPH.	96
Figura 37. Unión del AmDG al sitio en conformación cerrada con NADPH. ..	97
Figura 38. Unión del AmDG al sitio en conformación relajada con NADPH. ..	97
Figura 39. Unión del derivado EBS-6B al sitio en conformación cerrada de la enzima DXR con NADPH.	98
Figura 40. Unión del derivado EBS-6B al sitio en conformación relaja de la enzima DXR con NADPH.	99

Figura 41.	Unión del derivado EBS-7B con la conformación cerrada de la enzima DXR con NADPH.	100
Figura 42.	Unión del derivado EBS-7B con la conformación relajada de la enzima DXR con NADPH.	101
Figura 43.	Unión del derivado EBS-8B con la conformación cerrada de la enzima DXR con NADPH.	102
Figura 44.	Unión del derivado EBS-8B con la conformación relajada de la enzima DXR con NADPH.	103
Figura 45.	Radar de biodisponibilidad de los derivados más promisorios del <i>AmDG</i> y los medicamentos de referencia, rifampicina, isoniacida y etambutol.	109
Figura 46.	Diagrama BOILED-Egg, permite identificar la permeabilidad de acuerdo con la lipofilia (WlogP) y el área de superficie polar topológica (TPSA). Los derivados EBS-6B, EBS-7B y EBS-8B quedaron fuera del rango. La zona amarilla indica absorción gastrointestinal, el área blanca indica permeabilidad de la BHE. El color azul indica que es sustrato de P-pg.	111
Figura 47.	Purificación del <i>AmDG</i> a partir de un extracto crudo de <i>L. tridentata</i> , primera columna.	117
Figura 48.	Purificación de <i>AmDG</i> a partir de un extracto crudo de <i>L. tridentata</i> , segunda columna.	118
Figura 49.	Purificación de <i>AmDG</i> a partir de un extracto crudo de <i>L. tridentata</i> , tercera columna.	119
Figura 50.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) de <i>AmDG</i>	123
Figura 51.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 Hz) de <i>AmDG</i>	124
Figura 52.	Predicción del espectro de RMN de ^1H de las estructuras de los derivados obtenidos EBS-1Ba y EBS-1Bb.	126
Figura 53.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-1B.	131
Figura 54.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-1B. ...	132
Figura 55.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-3A.	136
Figura 56.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-3A. ...	137
Figura 57.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-3B.	141
Figura 58.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400Hz) del derivado EBS-3B.	142
Figura 59.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-6B.	147
Figura 60.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-6B ...	148
Figura 61.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-7B.	153
Figura 62.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-7B ...	154

Figura 63.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-8B.....	158
Figura 64.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-8B ...	159
Figura 65.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en $\mu\text{g/mL}$ de los derivados sintetizados en las cepas de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> (sensible a medicamentos de primera línea) y <i>M. tuberculosis G117</i> (resistente a rifampicina, isoniazida y etambutol).	160

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La tuberculosis

1.1.1 Generalidades de *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Esta bacteria pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*, tiene forma bacilar, es aerobia, no móvil, resistente a ácidos y no forma esporas (Kanabalan et al., 2021). Esta bacteria posee una envoltura celular rica en lípidos que proporciona una barrera hidrofóbica impermeable que le permite sobrevivir a ambientes hostiles. Los componentes característicos de la envoltura celular son una membrana plasmática, un espacio periplásmico, un núcleo de la pared celular, membrana exterior y cápsula. El peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos forman la pared celular. La membrana externa está compuesta por varios acilípidos libres como la diaciltrealosa (DAT), lipoarabinomanano (LAM), poliaciltrealosa (PAT), dimicocerosato de tiocerol (PDIM), PG, glicolípido fenólico (PGL), fosfatidil inositol manosido (PIM), triasiltrealosa (TAT), trealosa 6, 6-dimicolato (TDM) y sulfolípidos - 1 (SL-1); que se intercalan con los ácidos micólicos. La capa exterior, llamada cápsula contiene principalmente polisacáridos y proteínas de superficie (Singh et al., 2018).

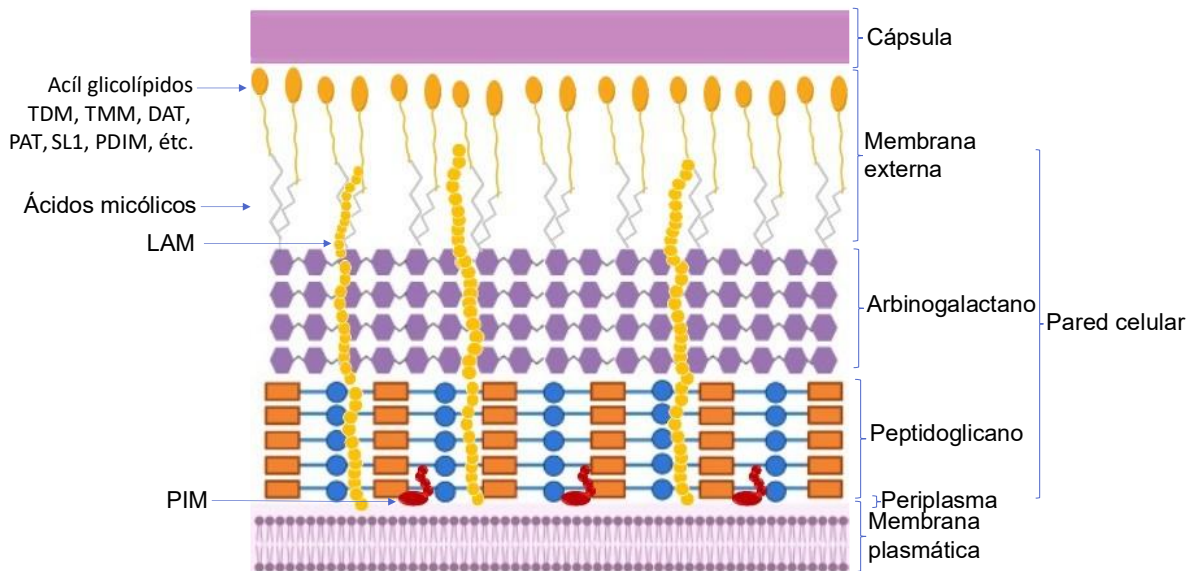


Figura 1. Composición de la envoltura celular de *M. tuberculosis*.

Diaciltrealosa (DAT), lipoarabinomanano (LAM), poliaciltrealosa (PAT), dimicocerosato de ticerol (PDIM), fosfatidil inositol manosido (PIM), trealosa 6, 6-dimicolato (TDM), monomicolato de trehalosa (TMM) y sulfolípid -1 (SL-1), fosfatidil inositol manosido (PIM). La imagen se diseñó usando la plataforma en línea en Biorender.

1.1.2 Epidemiología

De acuerdo con el Reporte Global de Tuberculosis de la Organización Mundial de la Salud del 2024, la tuberculosis es la primera causa de muerte por un agente infeccioso y se ubica en el décimo lugar en causas de muertes a nivel mundial. De acuerdo con los datos estadísticos del reporte, se estima que en 2023 fallecieron 1.25 millones de personas de las cuales 161 000 personas estaban coinfectadas con VIH siendo la enfermedad más mortífera para las personas con este padecimiento, también se menciona que alrededor de 10.8 millones de personas contrajeron la enfermedad, de las cuales 8.2 millones fueron diagnosticadas por primera vez, aumentando la cantidad de personas diagnosticadas respecto a las registradas en 2022. Por otra parte, los datos presentados por el perfil de

tuberculosis en México indicaron 36 mil casos nuevos y la incidencia de resistencia a rifampicina fue de aproximadamente 1300 pacientes (Global Tuberculosis Report, 2024).

1.1.3 Etiología de la tuberculosis

El contagio de la tuberculosis se da de persona a persona debido a que la *M. tuberculosis* contenida en las mucosas de las personas enfermas se dispersan como partículas en aerosol. El patógeno ingresa por la nasofaringe a la región traqueo bronquial hasta llegar a la orofaringe. Una vez en el tracto respiratorio bajo, la *M. tuberculosis* es fagocitada por los macrófagos y células dendríticas (Bussi Claudio et al, 2019) Normalmente ataca a los pulmones; sin embargo, puede llegar a causar daño a cualquier órgano o sistema del cuerpo.

La infección por *M. tuberculosis* puede ser primaria o secundaria; en la infección primaria, el paciente suele estar inmunocomprometido y desarrolla un cuadro clínico con meningitis, tuberculosis diseminada, tuberculosis miliar y granulomas extrapulmonares, por lo tanto, cuando el paciente contagiado está inmunocompetente le permite desarrollar inmunidad sistémica facilitando su recuperación, por otra parte, la tuberculosis secundaria o de reactivación se da cuando el microorganismo evade la respuesta inmune sistémica, permitiendo que la infección sea diseminada por el organismo (Kanabalan et al., 2021).

1.1.3 Tratamiento para la tuberculosis

Los medicamentos contra la tuberculosis se administran en diferentes combinaciones, los de primera línea son: la rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol. Los medicamentos de segunda línea se usan cuando hay resistencia a los medicamentos de primera línea (Kanabalan et al., 2021). Las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos debido a que algunos pacientes no logran culminar el tratamiento y en muchas ocasiones no reciben un diagnóstico oportuno o su tratamiento no es el adecuado, además de que la accesibilidad a los medicamentos es baja y la duración del tratamiento es de 6 hasta 24 meses (Velayati et al., 2018). El nuevo esquema oral de la OMS para el tratamiento de tuberculosis multirresistente es de seis meses que combine bedaquilina, pretomanid, linezolid y moxifloxacino (BPaLM) o bedaquilina, pretomanid y linezolid (BPaL) como tratamiento de elección para los pacientes que reúnan los requisitos establecidos (Global Tuberculosis Report, 2024).

Farmacorresistencia

La resistencia de la *M. tuberculosis* se clasifica en tres categorías: (a) tuberculosis resistente a un solo medicamento (SDR-TB), (b) tuberculosis multifármaco resistente (MDR-TB) a rifampicina y a isoniazida (c) tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB), esta es una combinación de MDR-TB más un medicamento de la segunda línea de tratamiento (V. Singh & Chibale, 2021).

La capacidad de manipular macrófagos, granulomas y el metabolismo celular del huésped se debe a la diferenciación genética en las diferentes etapas de la infección, por lo que adquiere mecanismos de resistencia (R. Singh et al., 2020).

Durante la formación de los granulomas de tuberculosis, los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* acumulan cuerpos lipídicos en su área citosólica, diferenciándose en macrófagos espumosos característicos de las lesiones de tuberculosis. Los cuerpos lipídicos acumulados en forma de burbujas contienen ésteres de colesterol y triglicéridos. Los macrófagos espumosos infectados con *M. tuberculosis* desempeñan un papel central en el desarrollo, el mantenimiento y la diseminación de la infección del granuloma. En los granulomas avanzados, la región central se caracteriza por necrosis caseosa, lo que conduce además a la formación de un entorno rico en lípidos. En los granulomas, *M. tuberculosis* puede crecer y persistir en macrófagos espumosos y en el núcleo necrótico. Cuando los macrófagos espumosos abandonan el granuloma original, se establece un granuloma secundario que promueve la diseminación (Shim et al., 2020).

Los factores de virulencia de *M. tuberculosis* se atribuyen a los genes que codifican vías de lípidos, proteínas y reguladores de sistemas de transducción de señales, así como proteínas de superficie celular. La resistencia también puede incluirse a los cambios en las bombas de la membrana, cambios en la interacción del fármaco o el objetivo y mutaciones cromosómicas. Otra razón puede incluir la baja permeabilidad de la pared celular de las micobacterias por su naturaleza lipídica, impidiendo la accesibilidad de los fármacos a los objetivos. En la Tabla 1 se mencionan las características de los medicamentos de primera y segunda línea, su mecanismo de acción, así como los mecanismos de resistencia adquiridos por la *M. tuberculosis*.

Tabla 1. Mecanismo de acción y resistencia de los fármacos de primera y segunda generación. Adaptada de Domínguez et al., 2016; R. Singh et al., 2020 y V. Singh & Chibale, 2021.

Fármaco	Genes objetivo del fármaco	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
Grupo-1: Primera línea (orales)			
Rifampicina (RIF) (Derivados de Ansamicina)	- <i>rpoA</i> que codifica la subunidad α de la RNA polimerasa - <i>rpoB</i> que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa - <i>rpoC</i> que codifica la subunidad β' de la RNA polimerasa	Bloquea la síntesis de proteínas mediante la inhibición de RNA al unirse a <i>rpoB</i> .	Disminución de la unión del fármaco a la polimerasa en: <i>rpoB</i> : Ser531Leu, Ser531Trp, His526Tyr, His526Asp, His426Pro
Isoniazida (INH) (Análogo de Hidrazida de ácido nicotínico)	- <i>katG</i> que codifica catalasa peroxidasa - <i>inhA</i> que codifica la proteína transportadora de anil acilo reductasa (ACP) específica de NADH. - <i>kasA</i> que codifica β cetoacil ACP sintasa - <i>ndh</i> que codifica NADH deshidrogenasa II.	La activación del profármaco por <i>katG</i> seguida de la activación de <i>inhA</i> y <i>kasA</i> por INH activado conduce a la inhibición de la síntesis de ácido micólico de la pared celular, pantotenato y coenzima-A, agotando la energía de la membrana e inhibiendo la trans-traducción.	Inhibición del producto de activación por <i>katG-katG</i> : Ser315Thr, Thr275Pro; disminuyendo la unión del fármaco con el promotor <i>inhA</i> (cl5t) <i>inhA</i> : Ile21Thr, Ser94Ala
Pirazinamida (PZA) (Análogo de Nicotinamida)	- <i>ahpC</i> que codifica a alquil hidroperoxidasa - <i>fabg</i> que codifica a 3-oxoacil reductasa (transportadora de proteínas acilo).	Activación del profármaco por <i>pncA</i> para formar ácido pirazinoico, al disminuir el pH inactiva la síntesis de ácidos grasos vitales.	Disminuye la actividad en la pirazinamidasas en: <i>pncA</i> : Asp8Asn, Cys138S, Cys138G IS6110

Tabla 1. Mecanismo de acción y resistencia de los fármacos de primera y segunda generación. Adaptada de Domínguez et al., 2016; R. Singh et al., 2020 y V. Singh & Chibale, 2021. (Continuación).

Fármaco	Genes objetivo del fármaco	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
<p>Pirazinamida (PZA) (Análogo de Nicotinamida)</p>	<p><i>-iniA</i> que codifica a genes inducibles de INH</p> <p><i>-fadE24</i> que codifica a acil CoA deshidrogenasa</p> <p><i>-pncA</i> que codifica a la enzima pirazinamidasa</p> <p><i>-rpsA</i> que codifica la proteína S1 30S ribosomal</p> <p><i>-panD</i> que codifica aspartato decarboxilasa</p> <p><i>-gpsI</i> que codifica proteínas bifuncionales, poliribonucleotido y nucleotidotransferasa (pnpasa)</p>	<p>La forma activa de PZA se une con el rpsA para inhibir la trans- traducción interrumpiendo la interacción del tmRNA.</p> <p>Ácido pirazinoico (POA), bloquea la síntesis de pantotenato o β- alanina un precursor de Coenzima A (CoA) importante para la energía del metabolismo.</p>	
<p>Etambutol (EMB) (Derivado de Etilen diamino -1- butanol)</p>	<p><i>-embC-embA-embB</i> codifican para tres homólogos de arabinosiltransferasas asociadas a membrana</p> <p><i>-embR</i> que codifica la regulación de la transcripción de proteínas</p> <p><i>-rmlD</i> que codifica Dtdp-4- dehidrorhamnosa reductasa</p>	<p>Interacciona con tres arabinosiltransferasas homologas asociadas a membrana afectando la síntesis de lípidos de la pared celular.</p> <p>También regula la expresión de proteínas codificadas por genes inducibles por INH, como las proteínas iniA y ACP.</p>	<p>Disminuye la unión al enlace del fármaco</p> <p><i>embB</i>: Met306Ile, Met306Val, Gly406Asp, Gly406Ala, Gln497Arg, Gln497Lys (Domínguez et al., 2016)</p>

Tabla 1. Mecanismo de acción y resistencia de los fármacos de primera y segunda generación. Adaptada de Domínguez et al., 2016; R. Singh et al., 2020 y V. Singh & Chibale, 2021. (Continuación).

Fármaco	Genes objetivo del fármaco	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
Grupo -2. Segunda línea: Grupo A (orales e inyectables)			
Levofloxacin (LFX) (Fluoroquinolonas)	- <i>gyrA</i> que codifica para la subunidad α de la DNA girasa.	Inhibición de la DNA girasa una Topoisomerasa II con subunidades α y β (Adnan Hameed et al., 2019).	Las mutaciones en genes <i>gyrA</i> afecta la susceptibilidad a los medicamentos (Adnan Hameed et al., 2019). Las mutaciones en el residuo D94 confieren resistencia clínica
Ciprofloxacina/ Ofloxacin (CIP/OFX) Moxifloxacina/gatifloxacina (MFX/OFX) (Nuevas fluoroquinolonas)	- <i>gyrB</i> que interviene la actividad de la ATPasa(Adnan Hameed et al., 2019). Codón D94 mut y A90mut		
Grupo2. Segunda línea: grupo B (inyectables)			
Kanamicina/Amikacina (KAN/AMY) (Aminoglucocidos)	<i>rrs</i> codifica a 16s RNA <i>WhiB7</i> Codifica la proteína reguladora transcripcional	Bloquea la síntesis de proteínas a través de la inhibición de la síntesis de la cadena peptídica	Mutaciones A1401G y A1484T en el gen <i>rrs</i>
Capreomicina/Viomicina (CAP/VIO)	<i>rrs</i> codifica a 16s RNA <i>tlyA</i> codifica 16S/23S RNA <i>eis</i> codifica a acetiltransferasa aminoglucósido <i>WhiB7</i> Codifica la proteína reguladora transcripcional	Inhibe la síntesis de proteínas	
Estreptomicina (SM)	<i>rpsL</i> codifica a la proteína ribosomal <i>rrs</i> codifica a 16s RNA <i>gidB</i> codifica a la 16S RNA metiltransferasa	Su objetivo es la subunidad 30S ribosomal. Se une a la proteína ribosomal 16S rRNA inhibiendo la síntesis de proteínas.	Mutaciones en K43R, K88R y K88Q del gen <i>rpsL</i>

Tabla 1. Mecanismo de acción y resistencia de los fármacos de primera y segunda generación. Adaptada de Domínguez et al., 2016; R. Singh et al., 2020 y V. Singh & Chibale, 2021. (Continuación).

Grupo C. Otros medicamentos básicos de segunda línea.			
Fármaco	Genes objetivo del fármaco	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
Etionamida/Protionamida (ETH/PTH)	ethA codifica a monoflavin monooxigenasa	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos	Regulación de mmpSL5 mediante MAB_2648c
Derivados del ácido isonicotínico	inhA codifica a la enoil ACP reductasa Ndh codifica a NADH dehidrogenasa II mshA codifica a glicosil ytransferasa ethR codifica a la proteína represora transcripcional kasA codifica a β -cetoacil ACP sintasa		(Rodriguez et al., 2023)
D-Cicloserina (CS)	Alr codifica a alanin racemasa	Inhibe la síntesis de	Mutaciones en rv3423c que
Terizidone (TRD) Derivados de cicloserina	ddl codifica a D-alanina-D-alanina ligasa cycA codifica a D-serina/L ald codifica el protón D-alanina /glicina/D-cicloserina simportador	peptidoglicano	codifica la alanina racemasa. (Chen et al., 2017)

Tabla 1. Mecanismo de acción y resistencia de los fármacos de primera y segunda generación. Adaptada de Domínguez et al., 2016; R. Singh et al., 2020 y V. Singh & Chibale, 2021. (Continuación).

Fármaco	Genes objetivo del fármaco	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
Clofazimina (CFZ) Derivados de iminoferacina	Rv0678 (mmpR) codifica al represor transcripcional de la bomba de eflujo MmpI5 Rv2535c codifica a aminopeptidasa citoplasmática Rv1979C codifica una permeasa	Interfiere con un balance redox, desbalance en la membrana y producción de ROS	Mutación intergénica del gen Rv1453 (Zhang et al., 2023)
Linezolida (LZD) Derivado de oxazolidina	rrl codifica a la 23S Rrna rplC codifica a 50S proteína ribosomal L3	Inhibe la síntesis de proteínas	
Grupo D. Medicamentos complementarios (no medicamentos básicos del régimen de tratamiento contra tuberculosis MDR).			
Subgrupo D1			
Pirazinamida Etambutol y altas dosis de isoniacida	Mencionado previamente	Mencionado previamente	Mencionado previamente
Subgrupo D2			
Bedaquilina (Diarilquinolina)	atpE codifica a la subunidad C de la ATP sintasa Rv0678(mmPR) codifica al represor transcripcional de la bomba de eflujo MmpI5	Inhibe la homeostasis de ATP	Mutación de RAV en RV0678, atpE o pepQ, expresan resistencia genotípica inicial (Mallick et al., 2022) Alteración de la unión al ADN

Tabla 1. Mecanismo de acción y resistencia de los fármacos de primera y segunda generación. Adaptada de Domínguez et al., 2016; R. Singh et al., 2020 y V. Singh & Chibale, 2021. (Continuación).

Fármaco	Genes objetivo del fármaco	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
Delamanid (nitroimidazol)	Genes de 5 coenzimas F420 Rv0407(fgd1) codifica la NADP- dependiente de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa FbiA/B/C codifica el cofactor de transferencia de dos electrones f420 Rv3547(Ddn) codifica deazaflavina dependiente de nitroreductasa	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos y proteínas	Mutación en los genes ddn, fbiA/B/C y fdg1, cuyos productos son las principales proteínas coenzimas para la biosíntesis de F420 (Khoshnood et al., 2021)
Subgrupo D3			
Ácido para amino salicílico (PAS)	thyA codifica a timidilato sintasa folC/ codifica dihidrofolato sintasa dfrA/ribD codifica a dihidrofolato reductasa ribD codifica a dihidrofolato reductasa	Inhibe la síntesis de folatos	Mutación en thyA, específicamente en el sitio de unión a dUMP, el sitio catalítico y el sitio de unión del cofactor de folato (Pandey et al., 2019)
Tienamicina (Imipenen/cilastatina (IMP/CLN)	Rv2163c (ftsI) codifica la proteína 3 fijadora de penicilina (pbpB)	Inhiben la síntesis de pared celular al unirse a las proteínas fijadoras de penicilina	
Amoxicilina/clavulanato lactamasa (AMX/CLA)	BlaC codifica a betalactamasa ponA/Pbp codifica las proteínas de unión a penicilina	Inhibe la síntesis de peptidoglicano y de la pared celular	

Tabla 1. Mecanismo de acción y resistencia de los fármacos de primera y segunda generación. Adaptada de Domínguez et al., 2016; R. Singh et al., 2020 y V. Singh & Chibale, 2021. (Continuación).

Fármaco	Genes objetivo del fármaco	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
Tiacetazona (TAC)	hadAB/CD codifica al complejo FAS-II dihidratasa compuesto por los genes hadABC	Inhibe la ciclopropanación de los ácidos micólicos de la pared celular	

Nota: Estos fármacos son bactericidas excepto el etambutol que es bacteriostático.

Aminoácidos: SER: Serina, LEU: Leucina, TRP: Triptófano, HIS: Histidina, TYR: Tirosina, PRO: Prolina, THR: Treonina, ASP: Aspartato, ASN: Asparagina, CYS: Cisteína. GLY:Glicina, VAL: Valina, MET: Metionina, GLN: Glutamina. GLU: Glutamato, ALA: Alanina, ARG: Arginina, PHE: Fenilalanina, ILE: Isoleucina, LYS: Lisina. El número que aparece a un costado del aminoácido indica el número de residuo que ocupa en la proteína.

1.2 Catabolismo del colesterol en *M. tuberculosis*: degradación de los anillos C y D

Se mencionó anteriormente que uno de los mecanismos de defensa de *M. tuberculosis* se debe a la adaptación genética que le permite sobrevivir dentro de los macrófagos. Algunos genes participes en la adaptación y supervivencia de *M. tuberculosis* en macrófagos se identificaron mediante la hibridación del sitio de transposones (TraSH), esta técnica es un ensayo de microarreglos que permite identificar de manera integral genes de grandes grupos de mutantes de transposones que son esenciales para el crecimiento en diferentes condiciones. Para este caso particular, permitió la detección de mutantes de transposones que no crecen dentro de los macrófagos primarios. Algunos genes de un grupo reducido comparten funciones y participan en vías comunes, por ejemplo, los genes Rv3551 y Rv3552 del locus *fadE28*, son críticos ya que participan en el transporte y degradación de lípidos exógenos de las membranas de las células huésped involucrados en la β -oxidación y degradación de ácidos grasos (Rengarajan et al., 2005). De la misma manera se reportó que el locus *fadE28* está relacionado con la degradación del colesterol mediante una β -oxidación de una fracción de propionato de ácido 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-ioco (DOHNAA) procedente de los anillos de esteroides C y D del colesterol (Van Der Geize et al., 2007) regulada por el operón *echA20* que codifica a una CoA transferasa de dos subunidades denominadas *lpdAB* (Miclo & Germain, 1990; Van der Geize et al., 2011).

Hasta el momento, el catabolismo del colesterol en *M. tuberculosis* se ha descrito en tres procesos:

1. β -oxidación de la cadena lateral alquílica,
2. Escisión oxigenolítica de los anillos A y B,
3. β -oxidación de los anillos C y D.

En la Figura 2 se describe la vía para la degradación de los anillos C y D. La ruta comienza con 3α -H- 4α (3'-propanoato)- $7\alpha\beta$ -metilhexahidro-1,5-indanodiona (HIP), que se tioesterifica a HIP-CoA y luego se somete a una serie de reacciones β -oxidativas para producir ácido 9,17-dioxo-1,2,3,4,5,6,10,19-octanorandrost-8(14)-en-7-oico (HIEC-CoA), en la que los anillos C y D todavía están intactos. El anillo D se hidroliza por CoA hidratasa (EchA20), para producir (R)-2-(2-carboxietil)-3-metil-6-oxociclohex-1-eno-1-carboxil-CoA (COCHEA-CoA). Posteriormente la enzima CoA transferasa IpdAB abre el último anillo C de esteroide del colesterol al catalizar la hidrólisis por una apertura retro-Claisen de COCHEA-CoA a 6-metilo. -3,7-dioxodecanodioil-CoA (MeDODA-CoA), finalmente FadA6 actúa sobre el tioéster de MeDODA-CoA para producir 4-metil-5-oxo-octanodioil-CoA (MOODA-CoA) (Crowe et al., 2018).

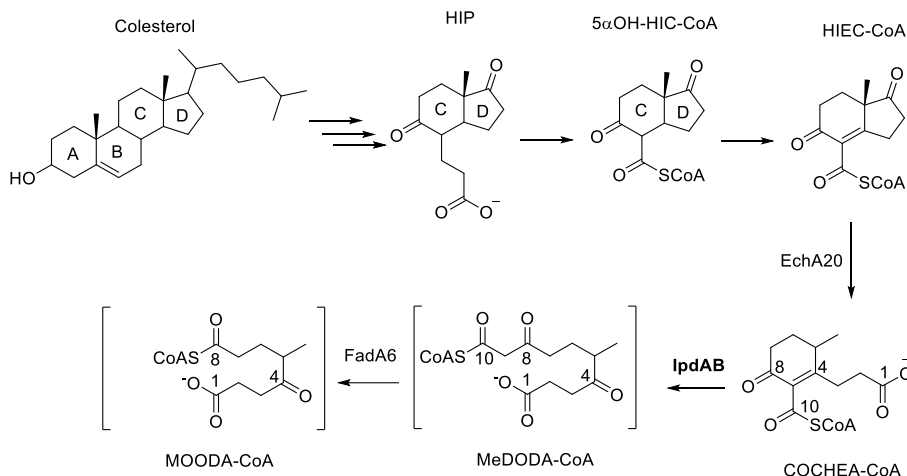


Figura 2. Degradación de los anillos C y D del colesterol en *M. tuberculosis*.
(Figura adaptada de Crowe *et al.* 2018)

1.2.1 Vía del fosfato metileritriol: biosíntesis de isoprenoides

La vía del fosfato metileritriol (MEP) o también conocida como vía de no mevalonato es una ruta alternativa propia de protozoos y eubacterias para la biosíntesis de isoprenoides esenciales que consta de ocho reacciones catalizadas por nueve enzimas (Figura 3).

Esta ruta comienza con la condensación de piruvato (Pyr) y gliceraldehído-3-fosfato (G3P) para formar 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) catalizada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato-sintasa (DXS) utilizando pirofosfato de tiamina como cofactor. El segundo paso en la vía es la conversión de DXP en 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) mediada por la enzima 1-desoxi-d-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR), comenzando por la isomerización de DXP en un intermediario metil eritrosa, posteriormente un reordenamiento α -cetol y luego el intermediario se reduce mediante hidruro. El tercer paso es la reacción de MEP con

citidina trifosfato (CTP) para producir 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritriol (CDP-ME) y libera pirofosfato en la reacción catalizada por 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritriol citidiltransferasa (CMS). El cuarto paso se da por un mecanismo asociativo para producir 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP) y ADP mediante la enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinasa (CMK) dependiente de ATP. El quinto paso se da por la enzima 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (MCS) al generar un estado de transición pentacoordinado y liberar CMP y 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP). El sexto y séptimo paso se describen juntos ya que son los menos comprendidos. El MEcPP sufre una reducción y eliminación a 4-hidroxi-3-metil-2(E)-butenil-4-difosfato y luego a IPP y DMAPP. El MEcPP es transformado en 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil-4-difosfato (HMB-PP) por la 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil-4-difosfato sintasa (HDS), posteriormente la 4-hidroxi-3-metil-2(E)-butenil-4-difosfato reductasa (HDR) termina con la formación de los precursores isoprenoides isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP). El octavo paso se da por la enzima isopentenil-difosfato isomerasa II (IDI-II), ya que ocurre una isomerización del enlace IPP C=C para formar DMAPP (Hunter, 2007; Proteau, 2004; Rohmer, 1999). Los patógenos importantes que utilizan esta vía son, por ejemplo, *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Esta vía no forma parte del metabolismo en mamíferos, hongos, arqueobacterias y la mayoría de las bacterias Gram positivas como estreptococos y algunos estafilococos, (Knak et al., 2022; Proteau et al, 2004).

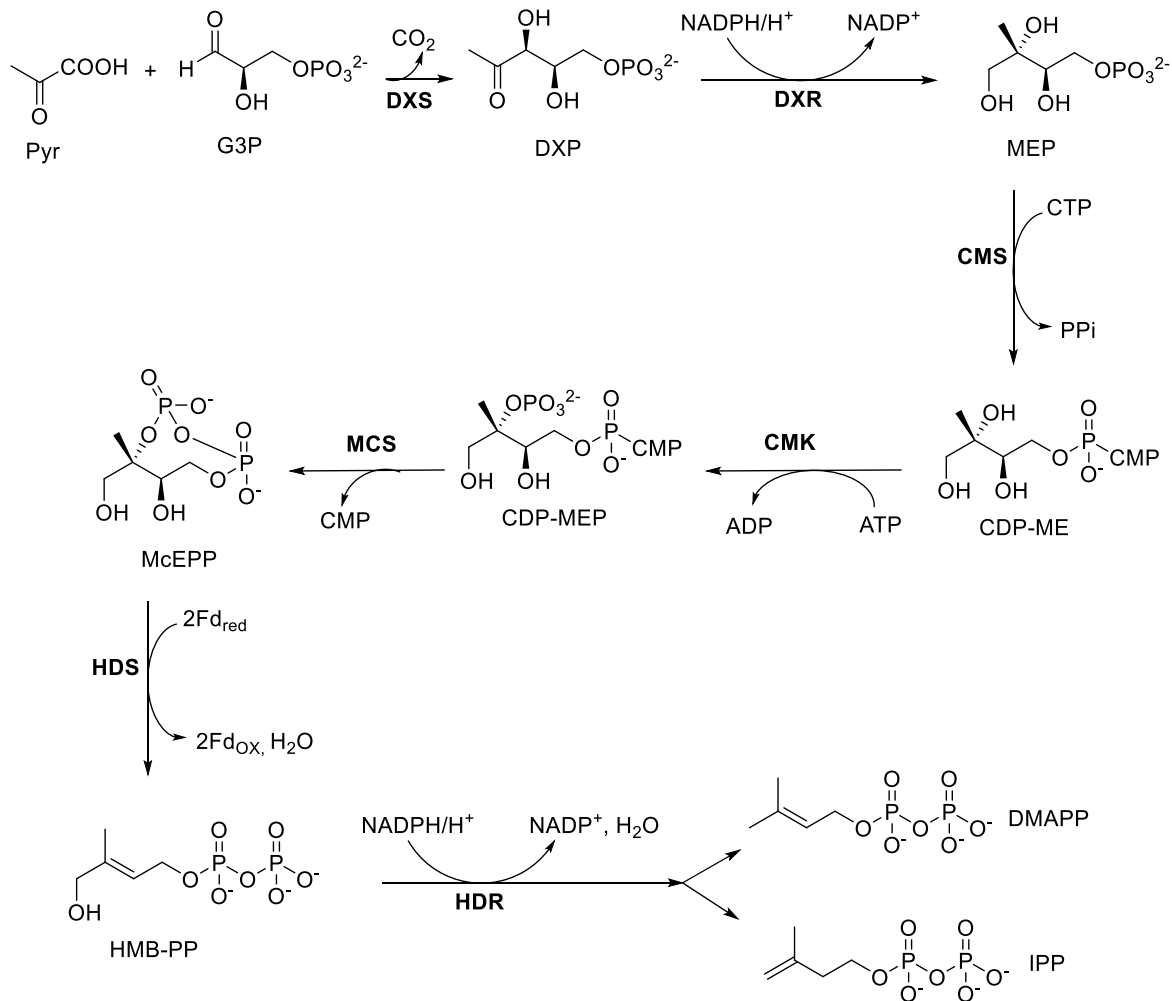


Figura 3. Vía del fosfato metileritriol.
(Figura adaptada de Hunter, 2007)

1.3 Diseño de fármacos asistido por computadora

Los avances científicos y tecnológicos han logrado mejorar las estrategias para el descubrimiento y/o mejoramiento de nuevos fármacos, así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas, identificar el mecanismo de acción, la evaluación farmacocinética y dinámica de las moléculas más promisorias.

En la actualidad la eficiencia de los dispositivos electrónicos y digitales permiten su exploración y categorización rápida para un objetivo determinado permitiendo el enfoque en aquellas moléculas prometedoras, de forma que las limitaciones como el tiempo, costo y almacenamiento no sea un impedimento para alcanzar el objetivo planteado (Bender et al., 2021).

El desarrollo farmacéutico es un reto importante en la industria farmacéutica debido a que se necesita una cantidad enorme de tiempo y dinero para que un fármaco pueda ser aprobado siguiendo fases del diseño de un fármaco. Un método ampliamente utilizado para minimizar estos costos es el Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DFAC). La técnica permite la simulación y predicción de varios factores esenciales, como toxicidad, actividad, biodisponibilidad y eficacia incluso antes de que el compuesto se someta a pruebas *in vitro* permitiendo así una mejor planificación y dirección de la investigación, es decir, menos experimentos *in vitro* e *in vivo* (Maia et al., 2020). El diseño de fármacos puede tener dos enfoques: técnicas basadas en estructuras y técnicas basadas en ligandos. (Tosco & Balle, 2011).

Las estrategias basadas en estructuras se enfocan en proteínas objetivo con estructuras tridimensionales (3D) de alta resolución y la identificación de sitios de unión. El dato experimental permite evaluar la interacción entre la proteína objetivo y el ligando. Por otra parte, el diseño enfocado en ligandos es un método indirecto basado en un conjunto de ligandos activos con determinadas características estructurales. Las similitudes estructurales permiten descubrir compuestos potencialmente bioactivos sin conocer la estructura tridimensional de la proteína

objetivo. Un Análisis Cuantitativo Estructura-Actividad (QSAR) es un algoritmo crucial en la búsqueda ya que convierte la estructura química de la molécula en descriptores para realizar operaciones estadísticas y análisis cuantitativos (G. Wang et al., 2022).

1.3.1 Inhibición competitiva o no competitiva en el diseño de fármacos

El desarrollo de fármacos convencional se dirige al importante sitio de unión (ortostérico o catalítico) para evitar la unión natural al sustrato, reconocido como una inhibición competitiva (Ejalonibu et al., 2021a). Sin embargo, se han descubierto sitios no catalíticos de las proteínas de *M. tuberculosis*, Shi et al., 2016 identificaron un segundo sitio de unión (alostérico) en la UDP-galactopiranososa (UGM), clasificando al compuesto MS-208 como un inhibidor no competitivo/mixto debido a que se une a otra ubicación en la proteína y afecta el sustrato de la enzima natural al reconocer también el sitio catalítico, estos sitios alostéricos se predijeron mediante acoplamiento molecular con Autodock Vina.

1.3.2 Acoplamiento molecular - *docking*

El acoplamiento molecular o *docking* es una de las herramientas que nos permiten hacer diseño de fármacos mediante estructuras, este método permite analizar la conformación y orientaciones (“poses”) de las moléculas en el sitio de unión de un objetivo para predecir el mecanismo de acción identificando el complejo ligando-receptor mediante procedimientos informáticos (Torres et al., 2019).

La búsqueda de la proteína y los ligandos es esencial para realizar el *docking*. Las proteínas se pueden descargar de bases de datos como Protein Data Bank (PDB) o Swiss UniProt y la búsqueda de un posible sitio de unión se puede lograr mediante

dos enfoques, a) primero se identifica el sitio de enlace y después se acopla el ligando o b) se acopla al ligando mediante un acoplamiento ciego. Los parámetros que se consideran para que el acoplamiento sea exitoso son los algoritmos de búsqueda que se clasifican de la siguiente manera:

- Método sistemático o directo

Búsqueda conformacional: Los parámetros estructurales del ligando cambian gradualmente, los grados de libertad torsional, traslacional y rotacional.

Fragmentación: Se acoplan varios fragmentos durante el proceso de acoplamiento molecular para formar enlaces entre ellos o acoplándose por separado.

Búsqueda de bases de datos: Permite crear muchas conformaciones de una molécula ya registrada para acoplarla con una diana objetivo.

- Métodos estocásticos o métodos aleatorios

Monte Carlo: Este enfoque permite colocar libremente al ligando en el sitio de unión del receptor para puntuarlo y generar una nueva configuración.

Algoritmo genético: Busca la solución óptima simulando el proceso de evolución natural. El algoritmo genético Lamarckiano combina la búsqueda local y algoritmo genético basado en la optimización de un grupo de partículas diseñado para el acoplamiento flexible con el objetivo de identificar la conformación acoplada a la energía más baja (Guan et al., 2016).

- Búsqueda Tabú

Esta búsqueda evita que las áreas previamente expuestas al espacio conformacional sean examinadas nuevamente.

La selección virtual de los ligandos se evalúa según su afinidad de unión, lo que ayuda a evaluar a la estructura y rotación del ligando que es más ventajosa con respecto al receptor, este concepto se conoce como función de puntuación y los parámetros que evalúa son los siguientes:

Basado en campos de fuerza: Se refiere a interacciones no enlazadas como fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno y electrostática de Coulomb, así como la interacción en ángulo similar a un enlace y desviación torsional para determinar la afinidad de enlace.

Función empírica: Se basa en el análisis de un conjunto de estructuras complejas que utilizan complejos proteína-ligando con afinidades de unión conocidas, que comprenden grupos funcionales y algún tipo de interacción. Algunos ejemplos son la interacción del enlace de hidrógeno con el N-O y O-O, enlace de una sal, apilamiento de anillos aromáticos, etc.

Basado en conocimiento: Evalúa estadísticamente una colección de estructuras complejas, proporciona elementos, átomos, y agrupaciones funcionales con la posibilidad de separarlos por pares.

Consenso: Fusiona en diversas disposiciones las evaluaciones u órdenes adquiridas a través de múltiples métodos de evaluación. (Agu et al., 2023; Das et al., 2020)

1.3.3 Análisis de Relación Cuantitativa Estructura - Actividad (QSAR)

El análisis de Relación Cuantitativa Estructura-Actividad, es una técnica de ligandos basado únicamente en actividades biológicas y estructuras químicas de una serie de moléculas (Asakawa et al., 2012); dispone de un conjunto de compuestos que muestran diferentes grados de afinidad de unión, potencia funcional o potencia inhibidora enzimática en el objetivo. Esta información se puede transmitir a modelos cuantitativos que pueden guiar el desarrollo de ligandos con un perfil farmacológico mejorado y también proporcionar información directa sobre las características estructurales complementarias del objetivo (Tosco et al., Balle, 2011)

El método de Análisis Comparativo de Campos Moleculares (CoMFA) propuesto por Cramer et al., 1988 se refiere a la interacción calculada no covalente que rodea las moléculas, también conocido como campos de interacción molecular (FOMIN),(Ragno, 2019) este método propició un avance importante en el campo de análisis QSAR-3D.

El servidor web llamado Cloud 3D-QSAR, permite a los usuarios enviar fácilmente su propio conjunto de datos y realizar automáticamente el modelo CoMFA, incluidos todos los pasos necesarios tales como la alineación molecular y el cálculo del campo de interacción molecular (MIF). Además, este servidor proporciona una función de predicción; con esta función, los usuarios pueden realizar una predicción QSAR con un modelo CoMFA seleccionado. A menudo, las investigaciones de QSAR-3D van acompañadas de estudios de acoplamiento molecular de proteína ligando y esta combinación funciona sinérgicamente (Y.-L. Wang et al., 2021).

1.3.4 Perfil farmacocinético y toxicológico

Se pueden utilizar técnicas *in silico* para analizar las estructuras de nuevos fármacos sintéticos y obtener perfiles preliminares, lo que puede ayudar en la identificación y clasificación de sustancias. Estos métodos ofrecen ventajas como la obtención de parámetros fisicoquímicos, toxicológicos y espectrales de un gran grupo de compuestos en un periodo corto de tiempo. Al no requerir estándares, puede ser usado para predecir compuestos aún no sintetizados, prescindiendo de muestreo físico, sin necesidad de autorización de agencias reguladoras (Lopes et al., 2024).

Los métodos computacionales identifican características comunes entre grandes conjuntos de datos, que se encuentran en bibliotecas “*on-line*”, lo que ayuda en la predicción de la actividad compuesta y las propiedades físicas. Estas técnicas ofrecen un enfoque rentable para el desarrollo de fármacos, ya que, al utilizar datos no clínicos, proporcionan información sobre la farmacocinética de posibles candidatos a medicamentos, lo que reduce la necesidad de estudios *in vivo* costosos y lentos, por lo tanto, aceleran el cronograma para la comercialización de nuevos medicamentos (Hiroaki Iwata, 2023).

La farmacocinética se debe tomar en cuenta en el desarrollo de nuevos fármacos, ya que para que éstos sean efectivos, la molécula de interés debe alcanzar su diana en el cuerpo en concentraciones adecuadas, y permanecer en su forma bioactiva el tiempo suficiente para que ocurran los eventos biológicos esperados. Asimismo, prevenir la toxicidad mediante estudios *in silico* disminuyen los ensayos en animales con moléculas que potencialmente pueden tener efectos adversos significativos tanto en animales de estudio como en humanos. En resumen, las moléculas deben

mostrar una alta actividad biológica combinada con baja toxicidad, así como asegurar que tras su administración la molécula acceda al sistema y alcance su objetivo con la concentración administrada (Daina et al., 2017).

Entre los softwares y plataformas en línea utilizadas para el estudio de moléculas nuevas, las páginas web SwissADME y Protox-II, son dos herramientas confiables para la predicción de la farmacocinética y toxicidad.

1.3.4.1 SwissADME

SwissADME se ha utilizado en el descubrimiento de nuevos agentes anticancerígenos, antituberculosos y antimicrobianos. La herramienta es popular debido a su simplicidad, resultados rápidos y confiables, y acceso abierto a todos los usuarios (Bakchi et al., 2022).

De acuerdo con lo descrito por Daina A. *et al.* 2017 la plataforma de SwissADME es una herramienta de software gratuita y fácil de usar para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos de moléculas pequeñas que ofrece diversos métodos *in silico* para predecir propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de moléculas potenciales, incluso incluye herramientas para acoplamiento molecular y simulaciones de dinámicas moleculares.

Los parámetros evaluados con esta herramienta web en este estudio comprenden las propiedades fisicoquímicas tales como peso molecular, fórmula molecular, lipofilidad y solubilidad en agua. También se analiza si las moléculas semi-sintetizadas cumplen las reglas de Lipinski junto con los parámetros farmacocinéticos como la absorción gastrointestinal, permeación de la barrera

hematoencefálica y si estas moléculas actúan como sustratos o inhibidores de proteínas importantes como los citocromos o la glicoproteína P. Asimismo, se evalúa el puntaje de biodisponibilidad. Las propiedades fisicoquímicas analizadas están ampliamente relacionadas con el perfil ADME (Absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de los fármacos, así como con su forma farmacéutica (Daina & Zoete, 2019).

Las propiedades fisicoquímicas dan una descripción global de la estructura. La lipofilidad y la solubilidad en agua están relacionados con la distribución o la eliminación de un fármaco puesto que estos descriptores dictaminan la absorción a través de membranas y si tienden a acumularse en depósitos grasos corporales. Tanto la lipofilidad como la solubilidad en agua se relacionan con la naturaleza química de la molécula incluyendo el tipo de grupos funcionales y su peso molecular. Por ejemplo, una molécula con más grupos funcionales polares tiende a ser más soluble en agua en comparación con compuestos de cadena hidrocarbonada o regiones hidrófobas. El peso molecular también es un parámetro relevante, ya que influye en la biodisponibilidad oral y es uno de los criterios descrito por las Reglas de Lipinski. Las reglas de Lipinski se utilizan para el desarrollo de fármacos como el éxito efectivo durante del descubrimiento del cribado de alto rendimiento y optimizar sistemáticamente los compuestos líderes para mejorar su potencia manteniendo la especificidad y selectividad (Roskoski, 2023). Los criterios de Lipinski indican la probabilidad de una biodisponibilidad oral inferior a la ideal cuando el Log P calculado basado en átomos (ALogP) es mayor que 5, cuando hay más de 5 donadores de enlaces de hidrógeno, cuando hay más de 10

aceptores de enlaces de hidrógeno y cuando el peso molecular es mayor a 500 g/mol. El valor P está relacionado con la hidrofobicidad, entre mayor sea el valor P mayor será la hidrofobicidad. El número de donadores de enlaces de hidrógeno representa la suma de los grupos NH y OH. Para el caso de los aceptores de enlaces de hidrógeno únicamente se consideran los nitrógenos y oxígenos; no se consideran los heteroátomos sin carga como los halógenos, el oxígeno y azúfre heteroaromáticos, ni tampoco el nitrógeno del pirrol (Lipinski et al., 2001).

La lipofilicidad, descrita clásicamente como el coeficiente de partición entre n-octanol y agua ($\log P_{o/w}$) tiene una sección dedicada en SwissADME debido a su importancia en los parámetros farmacocinéticos, ya que está muy relacionada con la absorción de la molécula de interés. La plataforma hace cálculos de $\log P_{o/w}$ a través de diferentes modelos computacionales, y promedia los resultados en un solo descriptor denominado “consensus $\log P_{o/w}$ ” para una mayor exactitud. Este “consensus $\log P_{o/w}$ ” es el parámetro que se reporta en las tablas de resultados del estudio farmacocinético, dicho descriptor se reporta como el más exacto.

El estudio de la solubilidad en agua es importante por varias razones, por ejemplo, la baja solubilidad en agua puede limitar severamente la eficacia de un fármaco al no poder alcanzar las concentraciones sistémicas deseadas para el efecto farmacológico. Los fármacos solubles en agua tienen mejor biodisponibilidad y pueden ser fácilmente absorbidos y distribuidos en el organismo, ya que pueden disolverse fácilmente en los fluidos gastrointestinales, lo que permite una absorción eficiente a través de la pared intestinal y en el torrente sanguíneo (Karajgi et al., 2022). En segundo lugar, la solubilidad de los fármacos en agua es crucial para

diversos procesos farmacéuticos, incluyendo el desarrollo de formulaciones, como los preparados para inyecciones, por esta razón muchos fármacos novedosos no llegan al mercado debido a su escasa solubilidad en agua, a pesar de tener propiedades farmacocinéticas prometedoras (Arun Kumar Ms et al., 2023).

1.3.4.2 Protox II. Predicción de toxicidad

Uno de los pasos principales para el diseño de fármacos es la determinación de la toxicidad de las sustancias químicas y la identificación de efectos nocivos en los seres humanos. La toxicología *in silico* es un tipo de evaluación de la toxicidad que utiliza métodos computacionales para analizar, simular, visualizar o predecir la toxicidad de las sustancias químicas. Su objetivo es complementar las pruebas tradicionales, facilitando la predicción de toxicidad, la priorización de sustancias químicas, la orientación de las pruebas experimentales y la reducción de fallos en las etapas finales del desarrollo de fármacos. Las herramientas útiles para la predicción de toxicidad *in silico* incluyen una base de datos para almacenar información sobre sustancias químicas, su toxicidad y propiedades químicas; un software para generar descriptores moleculares; herramientas de simulación para biología de sistemas y dinámica molecular; métodos de modelado para la predicción de la toxicidad; paquetes estadísticos y softwares para generar modelos de predicción; así como modelos prediseñados para estimar la toxicidad, y por último herramientas de visualización (Raies & Bajic, 2016)

Protox II incluye similitud molecular, farmacóforos, tendencias a fragmentos, y modelos de aprendizaje automático para la predicción de diversos criterios de valoración de toxicidad, tales como toxicidad aguda, hepatotoxicidad, citotoxicidad,

carcinogenicidad, mutagenicidad, inmunotoxicidad, vías de respuestas adversas (Tox 21) y objetivos de toxicidad. Los resultados se generan instantáneamente, mostrando la dosis letal media prevista (LD_{50}) en mg/kg de peso, la clase de toxicidad y la precisión de la predicción, así como la similitud promedio junto con los tres compuestos tóxicos más similares del conjunto de datos con el valor conocido de toxicidad oral en roedores, estos datos se toman de la base de datos interna SuperToxic (Banerjee et al., 2018).

Las toxicidad hepática o hepatotoxicidad es una de las razones por las cuales algunos medicamentos se retiran del mercado, por esta razón, es importante hacer la determinación de la lesión hepática inducida por fármacos (DILI). Estos datos se toman del DILIRank y de la base de datos de NIH liverTox (Mayr et al., 2016).

El daño celular o citotoxicidad se determina para identificar aquellas moléculas que podrían causar daño celular deseado o no; se basa en los datos extraídos de la base de datos de un Laboratorio Europeo de Biología Química (ChEMBL) (Bento et al., 2014) .

2. ANTECEDENTES

2.1 **Ácido meso Dihidroguaiarético (AmDG): antimicobacteriano de *L. tridentata***

Siete metabolitos secundarios se aislaron e identificaron a partir de un extracto clorofórmico de *L. tridentata*, de los cuales el AmDG mostró actividad significativa contra *M. tuberculosis* sensible (cepa H37Rv) con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 50 µg/mL y contra tres cepas multirresistentes (M15, M20 y M26) con una CMI que osciló entre 12.5 – 50 µg/mL concluyendo que el AmDG es el fitoquímico de *L. tridentata* que contribuye a la actividad antimicobacteriana (Favela-Hernández et al., 2012).

2.2 **Mecanismo de acción de AmDG**

El mecanismo de acción de AmDG se determinó mediante un ensayo de microarreglos validado por un ensayo molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-RT), demostrando que se une a la subunidad α de una Coenzima A transferasa de la *M. tuberculosis* H37Rv cepa sensible a los antibióticos de primera línea. Esta enzima codificada por el gen Rv3551 participa en las rutas de degradación del geraniol y 1- y 2-metilnaftaleno, causando una desestabilización de la membrana celular seguido de la muerte de la micobacteria. Esta suposición se confirmó mediante el estudio *in silico* de acoplamiento molecular observando la interacción entre el AmDG y la proteína Coenzima A transferasa (CoAt) simulada por homología (Clemente-Soto et al., 2014).

2.3 IpdAB CoA transferasa como diana terapéutica

En estudios más recientes, se elucidó el mecanismo de *IpdAB_{Mtb}* la Coenzima A transferasa cristalizada de *M. tuberculosis*, en la degradación de colesterol del huésped y su virulencia. Se identificó que *IpdAB_{Mtb}* cataliza una reacción de apertura de anillo C similar a retro-Claisen, siendo una reacción única para este miembro de la superfamilia CoAt. Este estudio se apoyó de ensayos bioquímicos y cristalografía de rayos X para elucidar el mecanismo de acción de *IpdAB_{Mtb}* y al proporcionar información sobre el catabolismo esteroide bacteriano se facilitó el desarrollo de posibles terapias antituberculosas dirigidas a *IpdAB_{Mtb}* (Crowe et al., 2018).

2.4 AmDG como molécula líder contra *M. tuberculosis* y análisis QSAR

El mecanismo de acción de AmDG en *M. tuberculosis* se ha identificado como la inhibición de la CoA transferasa, una diana terapéutica distinta a las reportadas para este patógeno. A partir de este hallazgo, se propusieron modificaciones estructurales en el lignano con el propósito de optimizar su actividad. Como resultado, se han obtenido 33 derivados semisintéticos de AmDG incluidos ésteres, éteres y aminoéteres, entre de los que destacaron dos aminoéteres con los mejores valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). El derivado **meso-31** (*meso-1,4-Bis[3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) fenil]-(2R,3S)-dimetilbutano*, Tabla 2), con una CMI de 3.125 µg/mL para la cepa H37Rv, siendo una concentración similar al etambutol, una CMI 6.25 µg/mL para las cepas G122 y G133 de *M. tuberculosis* MDR. Por otro lado, el derivado **meso-26** (*meso-1,4-Bis[4-(2-(dimetilamino) etoxi)-3-metoxifenil]-(2R,3S)-dimetilbutano*, Tabla 2), presentó una CMI de 6.25 µg/mL

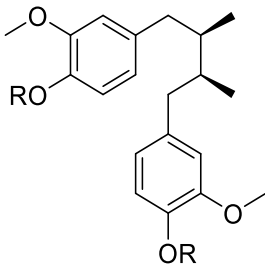
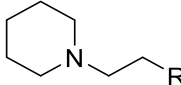
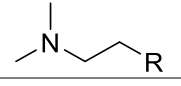
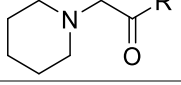
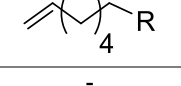
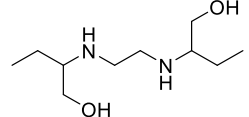
para la cepa H37Rv y de 12.5 µg/mL para las líneas G122 resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol y G133 resistente a isoniazida, rifampicina y estreptomicina, respectivamente. Por otra parte, se determinó el perfil de bioseguridad con el Índice de Selectividad (IS) evaluado con la línea celular Vero, resultando de 23.43 y >77.92 para los derivados **meso-31** y **meso-26** respectivamente. La conclusión de este trabajo fue que el compuesto más activo y seguro es el **meso-31**.

En el análisis de QSAR se observó que las principales contribuciones a la actividad antituberculosa se deben a la incorporación de grupos aceptores de hidrógeno como aminas que posean propiedades hidrofóbicas y estéricas. Estudios QSAR de campos moleculares permitieron deducir que los factores estéricos e hidrofóbicos contribuyen a la actividad contra la cepa H37Rv, favoreciendo a los derivados monosustituídos del *AmDG*. Lo anterior también se observó para la cepa G122, mientras que esos factores resultaron importantes en los derivados disustituídos de *AmDG* contra la cepa G133. Los estudios computacionales de grupo farmacológico y QSAR de campo indican que se podrían obtener derivados *mono* y *meso* sustituídos de *AmDG* mediante la incorporación de aminas terciarias, con impedimento estérico e hidrofóbicas (Reyes-Melo et al., 2017).

Posteriormente se realizaron derivados de éteres y carbamatos del *AmDG* y evaluaron su actividad antituberculosa e IS. De estos derivados los más activos fueron el **meso-6** (4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil] bis-(2-metoxi-4,1-fenileno) bi(piperidina-1-carboxilato, Tabla 2) con una CMI de 12.5 µg/mL para la cepa G122 y el **mono-14** ((±)-4-[(2R,3S)-4-(4-(hept-6-eniloxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil]-2-metoxifenol, Tabla 2) con 6.5 µg/mL para la cepa H37Rv y G122, así

como un IS de >10 y <3 para los derivados **meso-6** y **mono-14** respectivamente. También realizaron un análisis de QSAR con sus derivados y los reportados previamente por Reyes Melo *et al.* (2017) para identificar el comportamiento de los sustituyentes, llegaron a la conclusión de que los sustituyentes con más grado de impedimento estérico son los más sobresalientes y se pueden mejorar colocando sustituyentes flexibles ya que son más activos que los carbamatos y ésteres con impedimento estérico así como el grado de lipofilicidad, debido a que a mayor lipofilicidad, impedimento estérico y flexibilidad se presenta mayor actividad antituberculosa, es por eso que las características del derivado **meso-31** se deben seguir mejorado para encontrar el compuesto más selectivo y activo (Chávez-Villarreal *et al.*, 2018).

Tabla 2. Actividad antimicobacteriana e índice de selectividad del Ácido *meso* dihidroguaiarético y los derivados más activos

Compuesto	R	CMI ($\mu\text{g/mL}$) H37Rv	CMI ($\mu\text{g/mL}$) G122	CMI ($\mu\text{g/mL}$) G133	IS ($\text{IC}_{50}/\text{CMI}$) H37Rv	
	AmdG Meso-31	H	50	> 50	>50	--
	Meso-26		3.12	6.25	6.25	23.43
	Meso-6		6.25	12.5	12.5	>77.92
	Meso-6		50	12.5	>50	>10
	Mono-14		6.25	6.25	12.5	<3
	Etambutol	-	3.12	6.25	3.12	--

2.5 Derivados de dihidrosfingosina y adamantano como antimicobacterianos

E. del Olmo *et al.* (2009) sintetizaron derivados de dihidroesfingosina y probaron su actividad contra *M. tuberculosis*, de estos derivados, dos éteres y una diamina (Figura 4), mostraron la mejor actividad con una CMI de 1.25 µg/mL frente a la cepa H37Rv, el mejor compuesto fue el **4b** con una CMI de 0.78 µg/mL en el ensayo con la cepa No.332 resistente a estreptomycin, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida. La relevancia de estos derivados es que la estructura base es similar al etambutol por lo que se reconoce que el enlace de la etilendiamina es necesario para la actividad contra *M. tuberculosis* para inhibir la biosíntesis del arabinogalactano (del Olmo *et al.*, 2009).

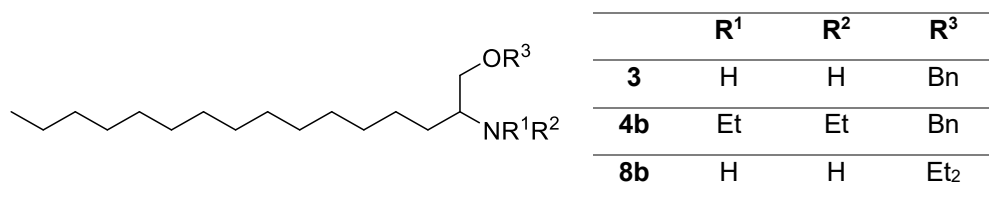
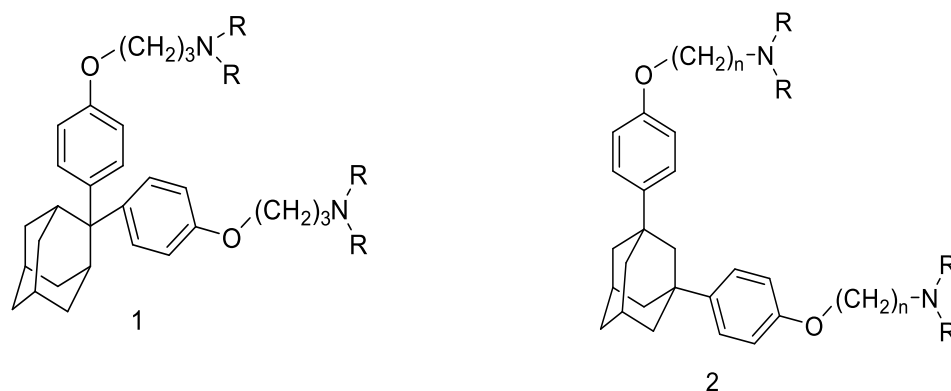


Figura 4. Derivados de dihidroesfingosina **3** y **4b** derivados de 2-amino-1-alcanol, y **8b** derivado de 1,2-alcano-diamina.

Por otra parte, M. Vlachou *et al.* (2017) y A. Foscolos *et al.* (2017) realizaron la síntesis de derivados de aminoéteres de adamantano bajo el fundamento de que al introducir un residuo 1,2-etilendiamina su longitud y la naturaleza del extremo amino de la cadena lateral del aminoéter, además de la doble sustitución fenólica del adamantano y el aminoéter con un espaciador de tres metilenos entre el grupo fenoxi y el amino, exhiben la mejor actividad contra *M. tuberculosis*, la eficiencia se le atribuye principalmente al aminoéter de la cadena lateral que proporciona un

carácter dipolar, por lo que le permite una mejor interacción con la membrana celular de la micobacteria. En este trabajo las mejores CMI fueron de 1.6 µg/mL, para los compuestos **1f** (*N,N,N',N'*- Tetrametil-4,4'- [tríciclo[adamantil 1,2-diamino] decan-2,2-diil]-bis (fenoxipropanamina)), **1g** (1,1'-[4,4'- [Tríciclo[adamantil 1,2-diamino] decan-2,2-diil] bis (fenoxi propil] dipiperidina y **2e** (*N,N,N',N'*-Tetrametil-4,4'- [tríciclo [adamantil 1,2 -diamino] decan-1,3-diil] bis (fenoxipropanamina) (Foscolos et al., 2017; Vlachou et al., 2017)



	R
1f	metil
1g	piperidinil
2e	metil

Figura 5. Derivados de aminoéteres de adamantano.

2.6 DXR como diana terapéutica; fosmidomicina y análogos antimicobacterianos

La enzima DXR fue identificada como un objetivo terapéutico prometedor para el desarrollo de nuevos fármacos antimicobacterianos, debido a que la vía del MEP no

forma parte del metabolismo humano, lo que sugiere que los fármacos dirigidos a esta enzima podrían tener una toxicidad reducida relacionada con el huésped. La fosmidomicina (Figura 6), un producto natural aislado de *Streptomyces lavendulae*, representa una nueva clase de ácidos fosfónicos que inhiben la biosíntesis de la pared celular. Se caracteriza por ser un ácido fosfónico conectado a un hidroxamato a través de un espacio de *n*-propil. La fosmidomicina inhibe a la enzima DXR de algunos microorganismos patógenos como, por ejemplo, *E. coli* y *P. falciparum*, sin embargo, es inactiva para *M. tuberculosis* ya que la naturaleza lipofílica de su pared impide que la molécula altamente polar pueda atravesarla por difusión pasiva, además de que sus propiedades farmacocinéticas son desfavorables debido a su impermeabilidad a la membrana debido al fosfonato cargado, al resto de hidroxamato polar y a su corto tiempo de vida media (Chofor et al., 2014; Jackson & Dowd, 2012; Knak et al., 2022).

La fracción del ácido hidroxámico de la fosmidomicina imita la estructura del hidroxil cetona y el ácido fosfónico en la estructura de monoalquilfosfonato de DXP. Por lo tanto, el análogo del sustrato fosmidomicina se une al sitio activo con un modo de unión comparable con DXP, actuando como un inhibidor competitivo lento y de fuerte unión con el sustrato mientras actúa de manera no competitiva hacia el cofactor Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato (NADPH) (Koppisch et al., 2002).

La proteína 4A03 es una proteína cristalizada de la enzima DXR (*M. tuberculosis* Rv2870c) en complejo con el antibiótico **FR900098** y el cofactor NADPH y Manganeso (Mn), esta enzima flexible está compuesta por tres dominios: un

dominio de unión de *N*-terminal NADPH, un dominio catalítico central y un dominio helicoidal *C*-terminal. El dominio *C*-terminal empuja el sitio activo hacia el dominio *N*-terminal donde se ubica el sitio de unión a cofactores, sustratos o inhibidores. Una forma más cerrada de la enzima representa la forma activa de la enzima, que se observa solo después de que ambos sustratos se han unido (Henriksson et al., 2006). Los sitios activos de esta proteína se encuentran en conformaciones cerradas, es decir, ambos sitios de unión (cofactor y sustrato) están ocupados. Cuando hablamos de conformaciones abiertas nos referimos a proteínas que solamente tienen el cofactor o el sustrato unidos al sitio de unión (Björkelid et al., 2012).

En un inicio se propuso que la estructura de la fosmidomicina se podría modificar para desplazar el anillo de la nicotidamina de NADPH o elegir una conformación relajada de DXR (Mac Sweeney et al., 2005) o por otra parte dirigir al sitio de unión de NADPH como objetivo de nuevos inhibidores.



Figura 6. Estructura de fosmidomicina y su derivado FR-900098

Además, se presentaron estrategias de diseño para optimizar el perfil del inhibidor y, por tanto, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, con el fin de mejorar la permeabilidad aplicando varios conceptos de profármacos de fosfonato

incluidos los ésteres lipófilos y los profármacos de fosforamidato *N*-alcoxi (Courstens et al., 2019; Knak et al., 2022).

Considerando los antecedentes expuestos y la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas contra *M. tuberculosis* así como de los hallazgos previos que evidencian el potencial terapéutico del AmDG y sus derivados identificados mediante en el análisis de QSAR, el grupo de investigación ha implementado estrategias innovadoras, como el diseño de fármacos asistido por computadora, utilizando un enfoque basado en estructuras. A través de un análisis QSAR de Chavez Villarreal *et al*, permitió identificar las características fisicoquímicas de las moléculas más prometedoras contra *M. tuberculosis*. Con base en ello, en este trabajo se propusieron 16 nuevas moléculas que fueron evaluadas mediante un enfoque basado en ligandos dirigido a las enzimas IpdAB y DXR. Las moléculas que demostraron afinidad de los estudios de acoplamiento molecular y un perfil farmacocinético y toxicológico prometedor fueron seleccionadas para su semisíntesis y evaluación biológica, lo que permitió identificar el derivado con mejor actividad antimicobacteriana y menor toxicidad, así como la proponer su posible mecanismo de acción. Estos elementos, junto con el contexto de la problemática actual de la tuberculosis, fundamentan la hipótesis y los objetivos que orientan este trabajo.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Al menos uno de los 16 derivados propuestos a partir del *AmDG* demostrará una actividad antimicobacteriana *in vitro* igual o superior a los fármacos de referencia levofloxacina, etambutol, isoniacida o rifampicina, y exhibirá una actividad citotóxica menor o igual en comparación con etopósido como control positivo, sugiriéndolo como candidato promisorio para el desarrollo de nuevos fármacos contra la tuberculosis.

3.2 Objetivo general

Realizar un tamizaje *in silico* de 16 derivados aminoéteres del *AmDG*, seleccionar los más promisorios para su posterior semisíntesis y evaluación de su actividad antimicobacteriana y citotóxica.

3.3 Objetivos específicos

1. Realizar un tamizaje *in silico* de una serie de aminoéteres derivados del *AmDG* mediante acoplamiento molecular con las enzimas IpdAB CoA transferasa y DXR para seleccionar los derivados con mayor afinidad a las enzimas, así como también el análisis de una predicción de parámetros farmacocinéticos mediante el uso de las plataformas SwissADME y Protox II.
2. Aislar, purificar y caracterizar al *AmDG* de un extracto orgánico de *L. tridentata*
3. Realizar la semi-síntesis, purificación y caracterización estructural de los derivados seleccionados en el objetivo uno.
4. Determinar la actividad antimicobacteriana de los aminoéteres más promisorios en las cepas H37Rv y G117 y citotoxicidad con la línea celular VERO.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

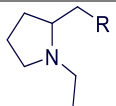
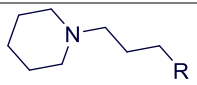
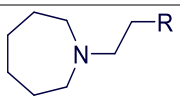
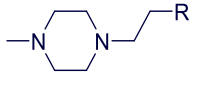
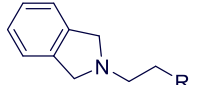
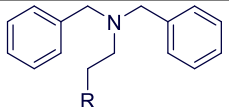
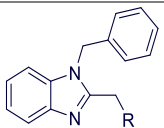
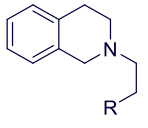
4.1 Material y equipo

Para realizar las Columnas Cromatográficas (CC) se usó gel de sílice (63-200 μm , Sigma Aldrich), para las Cromatografías en Capa Fina (CCF) se usaron cromatofolios de gel de sílice 60F₂₅₄ (Merk KGaA). Los solventes usados fueron hexano (Hex, 99% pureza,) Acetato de etilo (AcOEt 99.5% pureza,), Cloroformo (CHCl_3 , 99.9% pureza), Diclorometano (CH_2Cl_2 , 99% pureza,), Metanol (MeOH, 99% pureza,) Acetona (99% pureza,) Acetonitrilo (ACN, 99.9% pureza). Para revelar las CCF se usó una lámpara UV marca Spectroline (λ 254 y 365 nm), solución de sulfato cérico y vapores de yodo. Para concentrar las muestras a presión reducida se usaron rota evaporadores.

Para la semisíntesis de los derivados se usaron los siguientes reactivos: Clorhidrato de 2-(clorometil)-1-etilpirrolidina, clorhidrato de 1-(2-cloroetil)azepano, clorhidrato de N-(2-cloroetil)dibencilamina, clorhidrato de 2-(2-cloroetil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 1-bencil-2-clorometil-1H-benzoimidazol, carbonato de potasio (K_2CO_3) e hidruro de sodio (NaH), sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro de Sigma Aldrich, nitrógeno gas (N_2) de Infra.

La purificación del extracto de *L. tridentata*, así como de los derivados obtenidos se realizaron en el laboratorio de Química Farmacéutica de la FCQ de la UANL. La semisíntesis de los derivados se realizó en el laboratorio de Química Industrial de la FCQ de la UANL. Las pruebas contra *M. tuberculosis* se realizaron en el laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL. Los

Tabla 3. Aminoéteres derivados de *AmDG* propuestos para el tamizaje *in silico*

Derivado	Formula	Clave	R
± Mono	$C_{27}H_{39}NO_4$	EBS-1A	
Meso	$C_{34}H_{52}N_2O_4$	EBS-1B	
± Mono	$C_{28}H_{41}NO_4$	EBS-2A	
Meso	$C_{36}H_{56}N_2O_4$	EBS-2B	
± Mono	$C_{28}H_{41}NO_4$	EBS-3A	
Meso	$C_{36}H_{56}N_2O_4$	EBS-3B	
± Mono	$C_{28}H_{41}N_2O_4$	EBS-4A	
Meso	$C_{36}H_{56}N_4O_4$	EBS-4B	
± Mono	$C_{30}H_{37}NO_4$	EBS-5A	
Meso	$C_{40}H_{48}N_2O_4$	EBS-5B	
± Mono	$C_{36}H_{43}NO_4$	EBS-6A	
Meso	$C_{52}H_{60}N_2O_4$	EBS-6B	
± Mono	$C_{35}H_{38}N_2O_4$	EBS-7A	
Meso	$C_{50}H_{50}N_4O_4$	EBS-7B	
± Mono	$C_{31}H_{39}NO_4$	EBS-8A	
Meso	$C_{42}H_{52}N_2O_4$	EBS-8B	

Estos derivados denominados **EBS-1A, EBS-1B, EBS-2A, EBS-2B, EBS-3A, EBS-3B, EBS-4A, EBS-4B, EBS-5A, EBS-5B, EBS-6A, EBS-6B, EBS-7A, EBS-7B, EBS-8A y EBS-8B** (Tabla 3) se diseñaron considerando la presencia de grupos

aromáticos y anillos de cinco a siete miembros que proporcionan hidrofobicidad y factor estérico, así como aminas que permiten aceptar puentes de hidrógeno. Los derivados **EBS-1A**, **EBS-1B**, **EBS-2A**, **EBS-2B**, **EBS-3A**, **EBS-3B**, **EBS-4A**, **EBS-4B** son derivados que contienen heterociclos de 5 a 7 miembros y un patrón de sustitución asimétrico, por lo tanto, permitirán evaluar el impacto que tiene la flexibilidad y el factor estérico de dichos anillos. Por otra parte, los derivados **EBS-6A**, **EBS-6B**, **EBS-7A**, **EBS-7B**, **EBS-8A** y **EBS-8B** son derivados con grupos aromáticos y anillos de cinco o seis miembros que evalúan el factor estérico y la flexibilidad respectivamente. De la misma manera se consideraron los estudios previos que resaltan la importancia del enlace de la etilendiamina en la actividad contra *M. tuberculosis*, se sometieron los derivados **EBS-1A** y **EBS-1B** a limitar el movimiento en este enlace, mientras que los derivados **EBS-2A** y **EBS-2B** evaluaron el efecto de la flexibilidad al aumentar un carbono en la unión alquímica entre el oxígeno y el nitrógeno.

4.3 Preparación de los ligandos para el acoplamiento molecular

Los ligandos fueron construidos con estructura bidimensional con el software ChemDraw professional 16.0. Posteriormente, se minimizó su energía y adicionaron los hidrógenos con Schrödinger Maestro 12.2 y los ligandos se exportaron en formato mol2. En AutodockTools 1.5.6 se asignaron los enlaces rotables y ejecutaron las cargas Gasteiger, finalmente los ligandos se exportaron en formato pdbqt.

4.4 Acoplamiento molecular de los 16 aminoéteres con la enzima CoA transferasa.

La proteína cristalizada se tomó de las bases de datos de PDB (rcsb.org) con el número de acceso P9WPW1 y código 6CON de la proteína cristalizada en la conformación activa. (<https://www.rcsb.org/structure/6CON>)

En el servidor Molprobity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) se añadieron hidrógenos a la cristalografía 6CON y se realizó el control de calidad de la cristalografía para revisar la calidad del modelo con el que se realizarían los *dockings* obteniendo el gráfico de Ramachandran que nos permite analizar la geometría y contactos de todos los átomos. Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron en 5 diferentes sitios (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación de los sitios evaluados en la enzima IpdAB CoA transferasa

Sitio	Centro	Coordenadas	Aminoácidos o subestructura importante dentro del centro.
Sitio 1	Centrado en la subunidad AB	33.56, 3.48, 24.86	<i>Docking ciego</i>
Sitio 2	Centrado en la subunidad CD	-18.33, 5.19, 2.61	<i>Docking ciego</i>
Sitio 3	Centrado en todo el tetrámero	0.148, 0.029, -0.104	<i>Docking ciego</i>
Sitio catalítico subunidad AB	Centrado en el sitio catalítico subunidad AB	14.13, -10.95, -2.42	A29, A102, B50, B52
Sitio catalítico subunidad CD	Centrado en el sitio catalítico subunidad CD	-17.73, -2.15, 0.92	C29, C102, D50, D52

El tamaño de la caja fue de 47.25 Å en cada dimensión (x, y, z), los puntos de la cuadrícula fue separados por 127 Å y un espaciado de 0.375 Å. En los sitios Cat AB y CD, la caja se redujo a 25 Å de arista, para que fuera centrado en el sitio catalítico. Se realizaron 100 corridas, con 1×10^8 evaluaciones de energía, utilizando el algoritmo Solis-Wets de búsqueda local. Por último, se utilizó Autogrid 4.2.7 para generar las mallas electrostáticas, y Autodock-GPU 1.5.3 para realizar el *docking*.

4.5 Acoplamiento molecular de los 16 aminoéteres con la enzima DXR.

Para este análisis se consideraron las condiciones reportadas por Vázquez Ramírez Ana Laura et al., 2018. La proteína cristalizada se tomó de la base de datos de PDB con el número de acceso P9WNS1 y código 4A03 de la proteína cristalizada en la conformación activa. Previamente se realizó una dinámica molecular de 10 ns para relajar la estructura y para identificar las conformaciones en los sitios de unión en un estadio de acoplamiento molecular. El análisis se realizó mediante un ensamble isotérmico-isobárico utilizando el campo de fuerza Amber 99 con GROMACS 2016.4, usando los parámetros de manganeso y NADP adaptados para su uso en GROMACS usando Acypype, ya que la estructura está conformada por un dímero y posee dos sitios catalíticos que contienen NADP, se expulsó un NADP durante la simulación para realizar un análisis de cavidades y túneles de la estructura con Caver, indicando que el tamaño de las cavidades cambió durante la simulación. De este análisis se identificaron dos sitios de unión que coinciden con el sitio catalítico de la enzima cuando una de las cadenas tiene cofactor y cuando carece del mismo, por lo tanto, se definieron dos sitios de unión para dos conformaciones de la proteína. La conformación a 8.2 ns representa la estructura más relajada y a 6.1 ns

la conformación cerrada. El tamaño del Grid fue de 47.25 Å en cada dimensión (x, y, z), los puntos de la cuadrícula fueron separados por 127 Å y un espaciado de 0.375 Å. Se realizaron 100 corridas, con 1×10^8 evaluaciones de energía, utilizando el algoritmo Solis-Wets de búsqueda local. Por último, se utilizó Autogrid 4.2.7 para generar las mallas electrostáticas, y Autodock-GPU 1.5.3 para realizar el acoplamiento molecular. Los estudios de acoplamiento se realizaron de cuatro maneras (Tabla 5).

Tabla 5. Identificación de los sitios evaluados en la enzima DXR (A403)

Sitio	Centro	Coordenadas	Aminoácidos o subestructura importante dentro del centro.
Sitio 1-1	Sitio catalítico con NADPH en conformación cerrada	33.56, 3.48, 24.86	NADP y Mn^{2+}
Sitio 1-2	Sitio catalítico sin NADPH en conformación cerrada	33.56, 3.48, 24.86	Mn^{2+}
Sitio 2-1	Sitio catalítico con NADPH en conformación relajada	33.54, 3.49, 24.83	NADP y Mn^{2+}
Sitio 2-2	Sitio catalítico sin NADPH en conformación relajada	32.65, 47.42, 14.15	Mn^{2+}

4.6 Predicción de los parámetros farmacocinéticos y tóxicos de los derivados más prometedores

4.6.1 Predicción de propiedades farmacocinéticas de los ligandos

Se consultó la plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) el 29 de febrero de 2024. Se construyeron las estructuras de las moléculas elegidas y fármacos de referencia ingresando el SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) para obtener los datos y posteriormente realizar el análisis. El formato de la página en línea se ilustra en la figura 8. Las propiedades evaluadas son las siguientes:

1. Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular, número de aceptores y donadores de enlaces, Superficie Polar Topológica (TPSA) y coeficiente de partición lipofílico (Log P).
2. Farmacocinética y permeabilidad:
 - Absorción gastrointestinal (GI) estimada mediante el modelo BOILED-Egg, que clasifica las moléculas según su probabilidad de absorción intestinal y de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE)
 - Permeabilidad a BHE (si, no)
 - Sustrato de glicoproteína P (P-gp), indicador de susceptibilidad a ser expulsado por este transportador de eflujo.
 - Interacciones de isoenzimas CYP450, evaluación de la probabilidad de inhibición de las principales isoformas (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4).
3. Biodisponibilidad
 - Cumplimiento de reglas de Lipinsky

- Cálculo de puntaje de biodisponibilidad oral (valores de ≥ 0.55 se consideran indicativos de buena biodisponibilidad oral esperada).

Figura 8. Plataforma en línea SwissADME

4.6.2 Propiedades toxicológicas de los ligandos

Se consultó la plataforma Protox-II (https://tox.charite.de/prottox3/index.php?site=compound_input) el 22 de abril de 2024. Para estimar la toxicidad aguda (LD_{50} , Clase GHS), hepatotoxicidad,

carcinogenicidad, mutagenicidad, citotoxicidad e inmunotoxicidad, posteriormente se ingresaron los SMILES obtenidos en SwissADME. El formato de la página se ilustra en la figura 9.

Tox-Prediction

Here you can input a compound via pubchem search, smiles string or drawing:

Pubchem-Name: search e.g. [Tamoxifen](#) [Tolcapone](#) [Vorinostat](#) [Troglitazone](#) [Aspirin](#)

Canonical Smiles: smiles e.g. CCC(=C/C1=CC=CC=C1/C2=CC=C(C=C2)OCCN(C/C3=CC=CC=C3

Selected molecule : User defined

ChemDoodle®

To load a molecule click . The deletes clicked atoms and deletes everything on the canvas.

Please select any additional models to predict.

Acute Toxicity and binding to 16 toxicity targets is always computed, further models can take ~10s time each

<p>Organ Toxicity</p> <p><input type="checkbox"/> Hepatotoxicity <input type="checkbox"/> Neurotoxicity <input type="checkbox"/> Nephrotoxicity <input type="checkbox"/> Respiratory toxicity</p> <p><input type="checkbox"/> Cardiotoxicity</p> <p>Toxicity end points</p> <p><input type="checkbox"/> Carcinogenicity <input type="checkbox"/> Immunotoxicity <input type="checkbox"/> Mutagenicity <input type="checkbox"/> Cytotoxicity <input type="checkbox"/> BBB-barrier <input type="checkbox"/></p> <p>Ecotoxicity <input type="checkbox"/> Clinical toxicity <input type="checkbox"/> Nutritional toxicity</p> <p>Tox21 Nuclear receptor signalling pathways</p> <p><input type="checkbox"/> Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)</p> <p><input type="checkbox"/> Androgen Receptor (AR)</p> <p><input type="checkbox"/> Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)</p> <p><input type="checkbox"/> Aromatase</p> <p><input type="checkbox"/> Estrogen Receptor Alpha (ER)</p> <p><input type="checkbox"/> Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)</p> <p><input type="checkbox"/> Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)</p> <p>Tox21 Stress response pathways</p> <p><input type="checkbox"/> Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)</p> <p><input type="checkbox"/> Heat shock factor response element (HSE)</p> <p><input type="checkbox"/> Mitochondrial Membrane Potential (MMP)</p> <p><input type="checkbox"/> Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53</p> <p><input type="checkbox"/> ATPase family AAA domain containing protein 5 (ATAD5)</p>	<p>Molecular Initiating Events</p> <p><input type="checkbox"/> Thyroid hormone receptor alpha (THRa)</p> <p><input type="checkbox"/> Thyroid hormone receptor beta (THRβ)</p> <p><input type="checkbox"/> Transthyretin (TTR)</p> <p><input type="checkbox"/> Ryanodine receptor (RYR)</p> <p><input type="checkbox"/> GABA receptor (GABAR)</p> <p><input type="checkbox"/> Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)</p> <p><input type="checkbox"/> alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor (AMPA)</p> <p><input type="checkbox"/> Kainate receptor (KAR)</p> <p><input type="checkbox"/> Acetylcholinesterase (AChE)</p> <p><input type="checkbox"/> Constitutive androstane receptor (CAR)</p> <p><input type="checkbox"/> Pregnane X receptor (PXR)</p> <p><input type="checkbox"/> NADH-quinone oxidoreductase (NADHox)</p> <p><input type="checkbox"/> Voltage gated sodium channel (VGSC)</p> <p><input type="checkbox"/> Na⁺/I⁻ symporter (NIS)</p> <p>Metabolism</p> <p><input type="checkbox"/> Cytochrome CYP1A2 <input type="checkbox"/> Cytochrome CYP2C19 <input type="checkbox"/> Cytochrome CYP2C9</p> <p><input type="checkbox"/> Cytochrome CYP2D6 <input type="checkbox"/> Cytochrome CYP3A4 <input type="checkbox"/> Cytochrome CYP2E1</p> <p style="text-align: center;"><input type="button" value="All"/> <input type="button" value="None"/></p>
--	--

Figura 9. Plataforma en línea Prottox II

4.7 Aislamiento y purificación de *AmDG*

4.7.1 Primera columna de fraccionamiento de extracto crudo

El extracto crudo (10 g) obtenido de la maceración de las hojas de *L. tridentata* con diclorometano / metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) proporción 1:1, se fraccionó en una columna cromatográfica (CC) con 200 g de gel de sílice (relación 1:20) como fase estacionaria (FE) y como fase móvil (FM) un gradiente hexano (Hex)/acetato de etilo (AcOEt) y el volumen muerto fue de 425 mL. Se colectaron un total de 274 fracciones de 50 mL cada una. Cada fracción obtenida fue analizada por cromatografía en capa fina (CCF) y observada bajo luz ultravioleta de onda corta (λ 254 nm) y onda larga (λ 365 nm). Se seleccionaron aquellas fracciones con un factor de retención (RF) similar al *AmDG*, se reunieron, se eliminó el solvente por destilación al vacío y se pesaron. Para verificar la identidad del metabolito obtenido, se realizó un análisis de RMN ^1H de las fracciones 86-100 eluidas con una polaridad 80:20 Hex/AcOEt resultaron ricas en *AmDG* impuro (Tabla 6). El *AmDG* impuro de las fracciones 86-100 se cristalizaron en Hex/ CHCl_3 70:30. Primero se usó un baño maría para disolver las fracciones en CHCl_3 manteniendo una agitación mecánica constante y posteriormente se adicionó hexano frío, la mezcla se dejó en refrigeración durante 2 h y posteriormente se mantuvo a temperatura ambiente y al cabo de 5 días se recuperaron las perlas blanquecinas para someterlos a recristalización bajo las mismas condiciones. Se obtuvieron 50.6 mg (0.56 % rendimiento) de *AmDG* puro en forma de perlas blanquecinas con un punto de fusión (pf) 80-81 °C, solubles en CHCl_3 , CH_2Cl_2 , AcOEt, y acetona.

Tabla 6. Fraccionamiento de extracto de *L. tridentata* por CC

Fracciones reunidas	Polaridad de CC	Polaridad de CCF	Observaciones
1-65	Hex 100% Hex/AcOEt 95:05 Hex/AcOEt 90:10 Hex/AcOEt 85:15	Hex/AcOEt 80:20	-
66-70	Hex/AcOEt 80:20	Hex/AcOEt 80:20	RMN H ¹ AmDG impuro
71-75	Hex/AcOEt 80:20	Hex/AcOEt 80:20	RMN H ¹ AmDG impuro
76-80	Hex/AcOEt 80:20	Hex/AcOEt 80:20	RMN H ¹ AmDG impuro
81-85	Hex/AcOEt 80:20	Hex/AcOEt 80:20	RMN H ¹ AmDG impuro
86-90	Hex/AcOEt 80:20	Hex/AcOEt 80:20	RMN H ¹ AmDG impuro
91-95	Hex/AcOEt 80:20	Hex/AcOEt 80:20	RMN H ¹ AmDG impuro
96-100	Hex/AcOEt 80:20	Hex/AcOEt 80:20	RMN H ¹ AmDG impuro
101-274	Hex/AcOEt 80:20 Hex/AcOEt 75:25 Hex/AcOEt 70:30	Hex/AcOEt 80:20	-

4.7.2 Segunda columna de fraccionamiento del extracto crudo

10g de extracto crudo de *L. tridentata* en CH₂Cl₂/MeOH (1:1) fueron fraccionados en una CC usando como FE 180 g de gel de sílice y como FM un gradiente de Hex /AcOEt, teniendo un volumen muerto de 310 mL, por lo que se colectaron fracciones

de 50 mL cada una, obteniendo un total de 168 fracciones. Cada fracción obtenida fue analizada por CCF con una FM de Hex/CHCl₃/Acetona 65:20:15, observadas bajo luz ultravioleta de onda corta y onda larga y se seleccionaron aquellas fracciones con un RF similar al *AmDG* (Tabla 7).

Tabla 7. Fraccionamiento de extracto de *L. tridentata* por CC

Fracciones reunidas	Polaridad de CC	Polaridad de CCF	Observaciones
1-38	Hex 100%	Hex / CHCl ₃ /	
	Hex/AcOEt 95:05	Acetona	
	Hex/AcOEt 90:10	65:20:15.	
	Hex/AcOEt 85:15		
	Hex/AcOEt 85:15		
39-111	Hex/AcOEt 85:15		
112-129	Hex/AcOEt 85:15		<i>AmDG</i> impuro
130-150	Hex/AcOEt 85:15		<i>AmDG</i> impuro
151-168	Hex/AcOEt 85:15		

Las fracciones ricas de *AmDG* (353.6 mg) se sometieron a tratamiento con carbón activado en proporción 1:1 y 100 mL de CHCl₃ manteniendo en agitación constante durante 24 h. Posterior a esto se realizó una filtración a gravedad a través de un papel Whatman del 42 y se concentró mediante destilación a presión reducida. La resina recuperada (280 mg) se purificó nuevamente en una CC relación 1:30 montada con 5.880 g de gel de sílice como FE y como FM isocrática de Hex/CHCl₃/Acetona 65:20:15, con un volumen muerto de 8 mL. Se colectaron un total de 56 fracciones de 1 mL cada una. Se realizó un seguimiento de la CC por CCF eluida con Hex/CHCl₃/Acetona 65:20:15, se reunieron aquellas fracciones con

un RF similar al *AmDG*, se destilaron a presión reducida obteniendo (151 mg) (Tabla 8).

Se promovió la cristalización de las fracciones con *AmDG* impuro disolviendo en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 y posteriormente mezclando con hexano. Los cristales se recuperaron mecánicamente y se lavaron con una mezcla de Hex/ CH_2Cl_2 97:3. Tras varias cristalizaciones sucesivas se obtuvieron 95 mg (0.95 % de rendimiento) de *AmDG* puro como un sólido blanquecino y 78 mg de aguas madres como una resina verde.

Tabla 8. Purificación de fracciones ricas en *AmDG*

Fracciones reunidas	Polaridad de CC	Polaridad de CCF	Observaciones
1-6	Hex/ CHCl_3	Hex/ CHCl_3 /Acetona	Pigmento
7- 9	/Acetona	65:20:15.	<i>AmDG</i> impuro
10-15	65:20:15		<i>AmDG</i> impuro
16-27			<i>AmDG</i> impuro
28-56			Pigmento

4.7.3 Tercera columna de fraccionamiento del extracto crudo

10g de extracto crudo de *L. tridentata* en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) fueron fraccionados en una CC usando como FE 165 g de gel de sílice y como FM un gradiente de Hex /AcOEt, teniendo un volumen muerto de 300 mL, por lo que se colectaron fracciones de 100 mL cada una, obteniendo un total de 168 fracciones. Por cada polaridad se eluyeron 3 volúmenes muertos. Cada fracción obtenida fue analizada por cromatografía en capa fina (CCF) con una FM de Hex/ CHCl_3 /Acetona 65:20:15,

observadas bajo luz ultravioleta de onda corta y onda larga y se seleccionaron aquellas fracciones con un RF similar al *AmDG* (Tabla 9).

Las fracciones ricas de *AmDG* (541 mg) se sometieron a tratamiento con carbón activado en proporción 1:1 y 100 mL de CHCl_3 manteniendo en agitación constante durante 24 h. Posterior a esto se realizó una filtración a gravedad a través de un papel Whatman del 42 y se concentró mediante destilación a presión reducida.

Tabla 9. Fraccionamiento de una fracción rica en *AmDG* por CC

Fracciones reunidas	Polaridad de CC	Polaridad de CCF	Observaciones
1-15	Hex 100% Hex/AcOEt 95:05 Hex/AcOEt 90:10 Hex/AcOEt 85:15	Hex / CHCl_3 /acetona 65:20:15.	-
16-34	Hex/AcOEt 85:15		<i>AmDG</i> impuro
35-55	Hex/AcOEt 85:15		<i>AmDG</i> impuro
56-62	Hex/AcOEt 85:15		<i>AmDG</i> impuro
62-168	Hex/AcOEt 85:15		-

La resina recuperada (344 mg) se purificó nuevamente en una CC relación 1:50 montada con 17.2 g de gel de sílice como FE y como FM en gradiente hexano/diclorometano. Se colectaron un total de 171 fracciones de 3 mL cada una (Tabla 10).

Se realizó un seguimiento de la CC por CCF eluida con CH_2Cl_2 /MeOH 99:1, se reunieron aquellas fracciones con un RF similar al *AmDG*, se destilaron a presión reducida obteniendo (180 mg). Se promovió la cristalización de las fracciones con

AmDG puro disolviendo en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 y posteriormente mezclando con hexano. Los cristales se recuperaron mecánicamente. Tras varias cristalizaciones sucesivas se obtuvieron 102 mg (1.02 % de rendimiento) de *AmDG* puro como un sólido blanquecino y 78 mg de aguas madres como una resina verde.

Tabla 10. Purificación de una fracción rica en *AmDG*

Fracciones reunidas	Polaridad en la CC	Polaridad en CCF	Observaciones
1-46	Hex 100%	CH_2Cl_2 /MeOH	-
	Hex/ CH_2Cl_2 95:5	99:1	
	Hex/ CH_2Cl_2 90:10		
	Hex/ CH_2Cl_2 85:5		
	Hex/ CH_2Cl_2 80:20		
	Hex/ CH_2Cl_2 75:25		
	Hex/ CH_2Cl_2 70:30		
	Hex/ CH_2Cl_2 65:35		
	Hex/ CH_2Cl_2 60:40		
	Hex/ CH_2Cl_2 55:45		
	Hex/ CH_2Cl_2 50:50		
	Hex/ CH_2Cl_2 45:55		
	Hex/ CH_2Cl_2 40:60		
	Hex/ CH_2Cl_2 35:65		
47-117	Hex/ CH_2Cl_2 30:70		<i>AmDG</i> puro
118-146	Hex/ CH_2Cl_2 30:70		<i>AmDG</i> impuro
147-169	Hex/ CH_2Cl_2 25:75		-
170	CH_2Cl_2 100%		-
171	MeOH 100%		-

4.8 Semisíntesis y purificación de amino éteres derivados de AmDG

Se realizaron las semisíntesis de los aminoéteres más promisorios derivados del AmDG mediante la reacción de eterificación de Williamson (Cedraro et al. 2021).

4.9 Procedimiento general para las semisíntesis de los aminoéteres EBS-1B, EBS-3A, EBS-3B, EBS-7B, y EBS-8B derivados del AmDG

En un matraz redondo de 50 mL previamente secado se disolvió 1 equivalente de AmDG en 5 mL de acetonitrilo anhidro. El NaH se pesó en un vaso de precipitado previamente secado, una vez pesado se adicionó al matraz y se dejó reaccionando durante 5 min, una vez pasados los 5 min se adicionó el clorhidrato de alquilamina correspondiente. El matraz se tapó con un tapón de caucho y se colocó una atmósfera de N₂ y burbujeo. Las mezclas de reacción se colocaron en el sonicador a una temperatura de 50 °C y se realizó monitoreo de las reacciones cada hora con CCF y las fases móviles indicadas. Una vez finalizadas las reacciones se evaporó el solvente a presión reducida y se llevaron a sequedad. Al crudo de reacción se le hicieron lavados mediante una partición líquido-líquido con acetato de etilo y agua (10 mL cada una) tres veces, separando la Fase Orgánica (FO) y la Fase Acuosa (FA). La FO se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad mediante presión reducida, para posteriormente purificar los derivados mediante una Cromatografía Preparativa en Capa Fina (CPCF) con la FM indicada para cada derivado. Una vez eluida la CPCF se desadsorbieron las bandas mayoritarias y de interés usando una mezcla de AcOEt/MeOH 90:10 tres veces, los derivados se recuperaron concentrando la muestra al evaporar el solvente mediante presión

reducida. Para finalmente realizar las pruebas de caracterización mediante RMN ^1H , RMN ^{13}C y HRMS.

4.9.1 Semisíntesis del derivado EBS-1B

De acuerdo con el procedimiento general se mezclaron 20 mg (0.060 mmol) de AmDG, con 27.8 mg (0.151 mmol) de 2-(clorometil)-1-etilpirrolidina y 13.09 mg (0.546 mmol) de NaH en 5 mL de acetonitrilo anhidro durante siete horas. La reacción se monitoreo con CCF con FM hexano/ CHCl_3 /Acetona 60:20:20, 5% de Trietilamina (TEA) revelada con sulfato cérico. La fase orgánica (41 mg) se sometió a una CPCF eluyendo con una FM de hexano/ CHCl_3 /acetona 60:20:20, 5 % de TEA. La banda mayoritaria se recuperó y purificó bajo las condiciones del procedimiento general, obteniendo 21 mg de derivado EBS-1B. En la Figura 10 se describen las condiciones de reacción para el derivado EBS-1B.

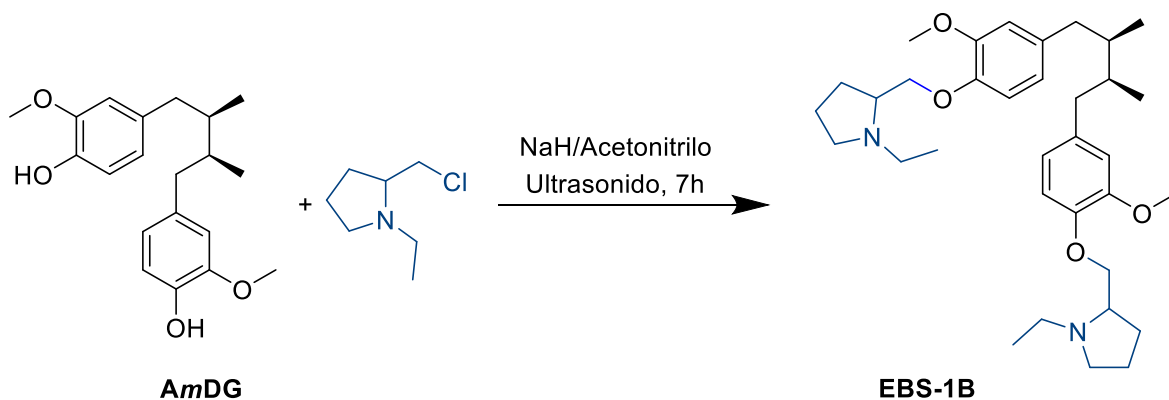


Figura 10. Esquema de reacción para la obtención del derivado EBS-1B

4.9.2 Semisíntesis del derivado EBS-3A y EBS-3B

De acuerdo con el procedimiento general se mezclaron 21.2 mg (0.064 mmol) de AmDG, con 31.3 mg (0.158 mmol) de clorhidrato de 1-(2-cloroetil) azepano y 13.16 mg (0.549 mmol) de NaH en 5 mL de acetonitrilo anhidro durante dos horas. La reacción se monitoreo con CCF con FM Hex/CH₂Cl₂/acetona 60:20:20, 5% de TEA revelada con sulfato cérico. La fase orgánica (46 mg) se sometió a una CPCF eluyendo con una FM de Hex/CH₂Cl₂/acetona 60:20:20, 5 % de TEA. Las bandas mayoritarias se recuperaron y purificaron bajo las condiciones del procedimiento general. Obteniendo 2.7 mg del derivado EBS-3A y 21 mg del derivado EBS-3B. En la Figura 11 se describen las condiciones de reacción para el derivado EBS-3A y EBS-3B.

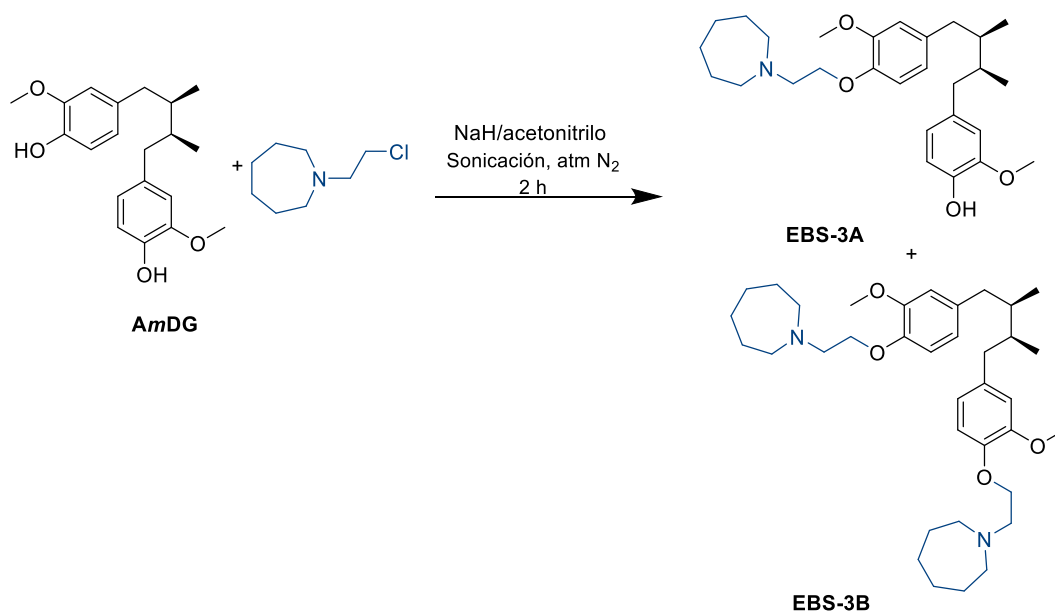


Figura 11. Esquema de reacción para la obtención de los derivados EBS-3A y EBS-3B

4.9.3 Semisíntesis del derivado EBS-6B

Se mezclaron 24.8 mg (0.075 mmol) de AmDG, con 68.7 mg (0.232 mmol) de clorhidrato de *N*-(2-cloroetil)dibencilamina y 72 mg (0.521 mmol) de K₂CO₃ en 1 mL de DMF previamente secada con malla molecular. El sistema se colocó en atmósfera de nitrógeno y agitación constante a 105 °C durante seis horas. La reacción se monitoreo con CCF con FM CHCl₃/Acetona 9:1, 5% de TEA. Posteriormente, la mezcla de reacción se filtró lavando con 2 mL de acetato de etilo y se separó mediante una extracción líquido-líquido con 4 mL de agua destilada y 3 mL de acetato de etilo tres veces. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro y se destiló a presión reducida. En la Figura 12 se describen las condiciones de reacción para el derivado EBS-6B.

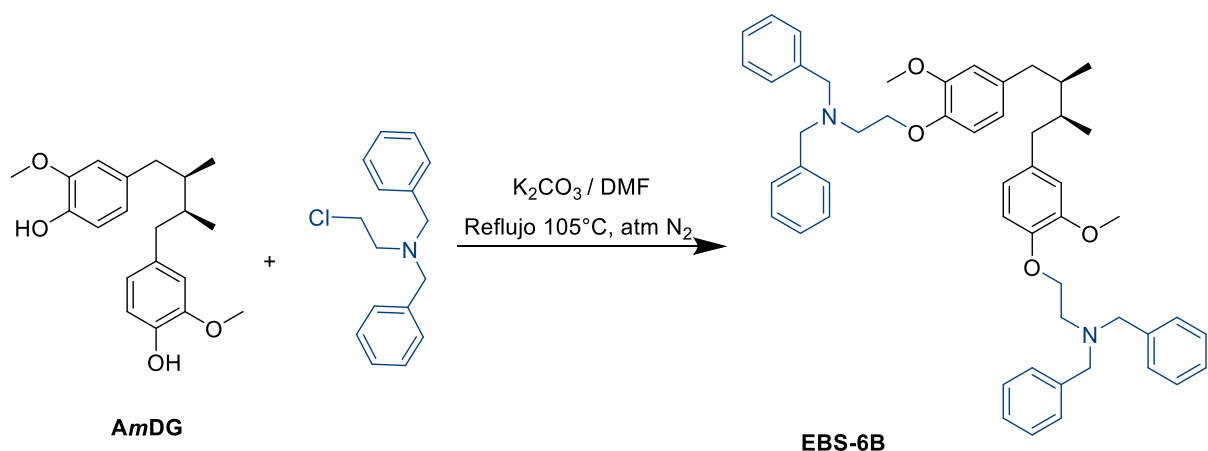


Figura 12. Esquema de reacción para la obtención del derivado EBS-6B

La fase orgánica se sometió a una CCF preparativa eluyendo con una FM de hexano/CHCl₃ 70:30, 5 % de TEA. La banda mayoritaria se recuperó y desadsorbió con CHCl₃ tres veces. El derivado se recuperó concentrando la muestra al evaporar el solvente mediante presión reducida.

4.9.4 Semisíntesis del derivado EBS-7B

De acuerdo con el procedimiento general se mezclaron 20 mg (0.060 mmol) de AmDG, con 35.4 mg (0.138 mmol) de 1-bencil-2-clorometil-1H-benzoimidazol y 13.3 mg (0.554 mmol) de NaH en 5 mL de acetonitrilo anhidro durante seis horas. La reacción se monitoreo con CCF con FM Hex/CH₂Cl₂/acetona 60:20:20, 5% de TEA revelada con sulfato cérico. La fase orgánica (55 mg) se sometió a una CPCF eluyendo con una FM de Hex/CH₂Cl₂/acetona 60:20:20, 5 % de TEA. Las bandas mayoritarias se recuperaron y desadsorbieron bajo las condiciones del procedimiento general. La banda del derivado disustituido resultó impura (21 mg) por lo que sometió a otra CPCF eluyendo con una FM Hex/CH₂Cl₂ 50:50, 5% TEA que nos permitió recuperar 5.6 mg del derivado EBS-7B puro. En la Figura 13 se describen las condiciones de reacción para el derivado EBS-7B.

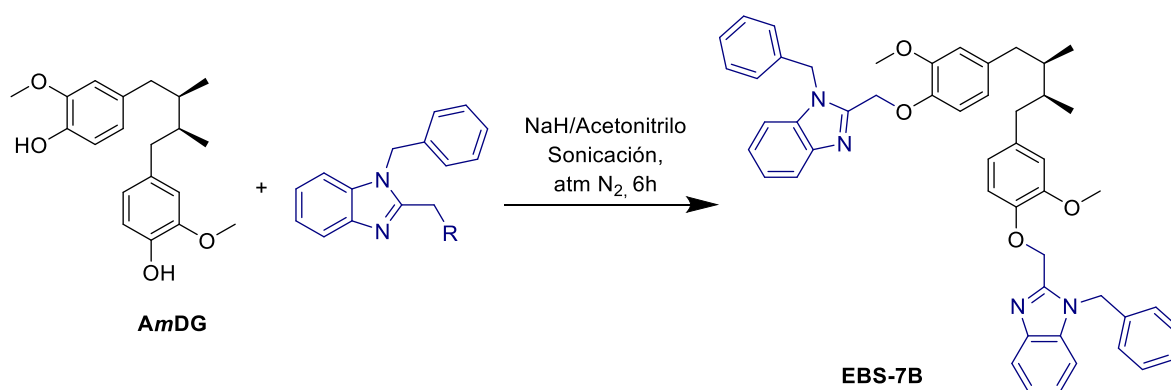


Figura 13. Esquema de reacción para la obtención de los derivados EBS-7B.

4.9.5 Semisíntesis del derivado EBS-8B

De acuerdo con el procedimiento general se mezclaron 19 mg (0.057 mmol) de AmDG, con 33 mg (0.142 mmol) de clorhidrato de 2-(2-cloroetil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina y 16.8 mg (0.700 mmol) de NaH en 5 mL de acetonitrilo anhidro durante 6.5 horas. La reacción se monitoreo con CCF con FM Hex/CHCl₃/acetona 60:20:20, 5% de TEA revelada con sulfato cérico. La fase orgánica (50 mg) se sometió a una CPCF eluyendo con una FM de FM Hex/CHCl₃/acetona 60:20:20, 5 % de TEA. Las bandas mayoritarias se recuperaron y purificaron bajo las condiciones del procedimiento general. Obteniendo 12.5 mg del derivado EBS-8B. En la Figura 14 se describen las condiciones de reacción para el derivado EBS-8B.

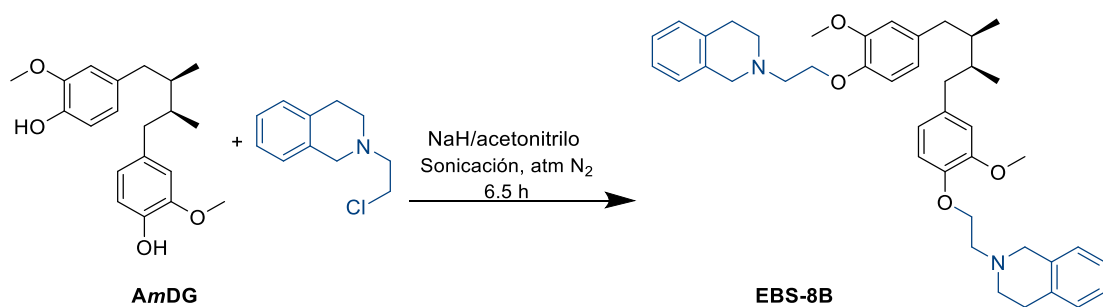


Figura 14. Esquema de reacción para la obtención del derivado EBS-8B.

4.10 Determinación de la actividad antimicobacteriana de los derivados obtenidos.

4.10.1 Preparación de las cepas

La determinación de la actividad antituberculosa se realizó usando la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 sensible a isoniacida, rifampicina, etambutol, y pirazinamida y la cepa G117 de aislados multifarmacorresistentes (DXR) resistentes a isoniacida, rifampicina y etambutol. Las dos cepas fueron cultivadas en medio Lowenstein – Jensen, una vez inoculados los tubos se incubaron a 37 °C con la tapa ligeramente floja y de manera horizontal. Luego de una semana se cerró la tapa de los tubos correctamente y se colocaron de manera vertical y se incubaron durante 4 semanas más. Posteriormente se realizó una resiembra de medio líquido Middlebrook-7H9 suplementado con 10% de OADC y se incubaron a 37°C durante dos semanas hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, para verificar que no hubiera contaminación se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen.

4.10.2 Preparación del inóculo

A partir del cultivo líquido se prepararon 10 mL de inóculo diluyendo con medio de cultivo hasta alcanzar una escala No. 1 de Mc Farland, posteriormente se realizó una dilución 1:20 con medio Middlebrook-7H9 (0.5 mL de muestra del tubo con inóculo a la escala No. 1 de Mc Farland más 9.5 mL de medio Middlebrook-7H9).

4.10.3 Preparación de la solución Stock inicial y soluciones de prueba.

Se preparó una solución stock de los derivados EBS-1B, EBS-3A, EBS-3B, EBS-6B, EBS-7A, EBS-7B, EBS-8A, EBS-8B a una concentración de 2000 µg/mL, con 1

mg de derivado y 500 μ L de DMSO. A partir de esta solución stock se prepararon soluciones a una concentración de 200 μ g/mL con 50 μ L de solución stock más 450 μ L de medio Middlebroock las cuales se llamaron soluciones 4X. Una vez preparadas las soluciones se resguardaron a -20 °C hasta su uso. Las concentraciones que se evaluaron fueron 50, 25, 12.5, 6.25, 3.1 y 1.6 μ g/mL de cada derivado. Los controles positivos se evaluaron en las siguientes concentraciones: rifampicina de 1 μ g/mL a 0.030 μ g/mL para H37Rv y de 10 μ g/mL a 0.312 μ g/mL para G117; isoniazida de 10 μ g/mL a 0.312 μ g/mL para H37Rv y G117; etambutol de 50 μ g/mL a 1.562 μ g/mL para H37Rv y G117; y levofloxacina de 1 μ g/mL a 0.030 μ g/mL para H37Rv y de 10 μ g/mL a 0.312 μ g/mL para G117.

4.10.4 Ensayo contra *M. tuberculosis*

En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 200 μ L de agua estéril en todos los pozos de la fila A y los pozos H1-3 y H10-11, al resto de los pozos de la placa se les adicionó 100 μ L de medio Middlebroock-7H9 suplementado con 10% de OADC, posteriormente se adicionaron 100 μ L de la solución de trabajo 4X (200 μ g/mL) en los pocillos como se indica a continuación; B1 (EBS-1B), B2 (EBS-3A), B3 (EBS-3B), B4 (EBS-6B), B5 (EBS-7A), B6 (EBS-7B), B7 (EBS-8B), B8 (rifampicina), B9 (isoniacida), B10 (etambutol), B11 (levofloxacina) y se realizaron diluciones seriadas 1:2 a lo ancho de la placa y posteriormente se adicionaron 100 μ L del inóculo bacteriano preparado en el punto 4.10.2. En los pocillos reservados de la fila H se prepararon los siguientes controles: 200 μ L de inóculo (100:100, representa el 100 % de la población bacteriana a ensayar), 20 μ L de inóculo más 180 μ L de medio Middlebroock-7H9 (100:10, representa el 10 % de la población bacteriana a

ensayar), 2 μ L de inóculo más 198 μ L de medio Middlebroock-7H9 (100:1), representa el 1 % de la población bacteriana a ensayar). Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 5 días. Una vez pasado el tiempo necesario se adicionaron 20 μ L de reactivo de resazurina y 12 μ L de Tween 80 al 10 % a los pocillos H de los controles sin tratar y se incubaron a 37 °C durante 24 h, una vez pasado el tiempo se observó un cambio de color azul a púrpura indicando el crecimiento adecuado de las micobacterias, por lo tanto, se pudo continuar con el experimento; se adicionó resazurina bajo las condiciones antes mencionadas y se volvieron a incubar a 37 °C durante 24 h. La interpretación de los resultados se realizó de forma visual identificando la Concentración Mínima Inhibitoria haciendo un corte en aquellos pocillos donde no se observó un cambio de coloración ya que el cambio de coloración indica crecimiento bacteriano. Los experimentos se realizaron dos o tres veces en días diferentes.

4.11 Determinación de actividad citotóxica

La actividad citotóxica se determinó usando la línea celular de crecimiento normal Vero (células epiteliales de riñón de *Cercopithecus aethiops* ATCC®: CCL-81™). Los ensayos fueron realizados bajo condiciones de asepsia y esterilidad, limpiando la campana de flujo laminar con etanol al 70% y exponiéndola a luz UV durante 15 min. Las condiciones de incubación fueron una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad a 37 °C, estas fueron las mismas durante todo el procedimiento.

4.11.1 Preparación de soluciones de los derivados a evaluar

Se prepararon soluciones stock de los derivados EBS-1B, EBS-3A, EBS-3B, EBS-6B, EBS-7B y EBS-8B con DMSO a una concentración 20 000 μM . Posteriormente se tomaron 8.8 μL de la solución stock de cada compuesto y se pasaron a otro tubo Eppendorf que contenía 431.2 μL de medio de cultivo para obtener un volumen final de 440 μL y una concentración de 400 μM , posteriormente se realizaron diluciones seriadas para alcanzar concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, y 6.25 μM , para todos los compuestos. Para los compuestos EBS-1B, EBS-3B y etopósido también se evaluaron las siguientes concentraciones 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 μM . Para el derivado EBS-7B se usó 5.8% de Tween 20 para terminar de disolver el compuesto en la solución stock quedando a una concentración de 0.03% de Tween 20 en la solución a 100 μM del derivado, esta cantidad se consideró para mantener las concentraciones necesarias a evaluar durante el experimento.

4.11.2 Cultivo de células Vero

La línea celular Vero fue cultivada en frascos de cultivo celular T25 (Corning, Inc, Corning) estériles con medio RPMI-1640 y suplementada con Suero Fetal Bovino al 10% (FBS; Gibco-Invitrogen). Para inhibir contaminación por crecimiento de microorganismos se añadieron penicilina-estreptomicina 1X (Sigma-Aldrich Corporation). Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 80%, se realizaron dos lavados con 1mL de PBS al 1X y se prosiguió con la disgregación usando 1 mL de tripsina-EDTA al 0.25% y se incubaron durante 5 min. Pasado el tiempo se observó al microscopio para verificar que las células se hayan separado de la superficie, una vez que se verificó la disgregación se colocaron 3 mL de medio

RPML para inactivar la tripsina y cambiar las células a tubos Corning de 15 mL estériles y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min a 25 °C, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron con 5 mL medio RPML. Posteriormente se contabilizaron las células en una cámara de Neubauer y se colocaron 5000 células por pocillo en 150 µL en una microplaca de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h.

4.11.3 Determinación de citotoxicidad mediante la técnica de MTT

Una vez terminado el tiempo de incubación se adicionaron 50 µL de las soluciones preparadas en el punto 4.11.1, como control negativo se utilizaron células sin tratamiento y células con 0.5% de DMSO, para el caso del derivado 7B se usó como control DMSO-tween al 0.5% y 0.03% respectivamente para evaluar el efecto del Tween 20 en las células y se incubaron durante 48 hrs, una vez terminado el tiempo de incubación se sustituyó el medio con 100 µL de medio nuevo con 10% de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a cada pocillo y se incubaron durante una hora. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionaron 100 µL de isopropanol para disolver los cristales de formazán y se realizó la lectura a 550 nm de absorbancia en un lector BioTek, Winooski de microplacas de ELISA. La cantidad de MTT-formazán es directamente proporcional al número de células vivas y para determinar el porcentaje de viabilidad se usó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{(\text{Densidad optica de las células tratadas} - \text{blanco})}{(\text{Densidad optica de las células no tratadas} - \text{blanco})} \times 100$$

Cada tratamiento se realizó por triplicado y se realizaron tres pruebas independientes en tres días diferentes.

4.11.3.1 Determinación del IC₅₀

La concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) se determinó para cada compuesto con ayuda del programa GraphPad Prism 8 haciendo un análisis de regresión lineal graficando la curva dosis-respuesta y analizando los datos con la función de *log (inhibidor) vs normalized response*, obteniendo el valor de IC₅₀ para cada derivado.

4.11.3.2 Determinación del IS

El Índice de Selectividad (IS) se determina con la siguiente formula:

$$IS = \frac{IC_{50}}{CMI}$$

Con estos datos podremos determinar el valor del Índice de Selectividad (IS), si este es >10 quiere decir que la molécula evaluada es más selectiva para las bacterias que para las células normales, en cambio, si es <10 sería más citotóxica para las células normales que para las bacterias (Alfonso *et al.*, 2023).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó una búsqueda basada en ligandos, considerando el análisis de QSAR previo (Chávez-Villarreal et al., 2018) que ha permitido mejorar la estructura de los compuestos para identificar el compuesto con mayor potencial terapéutico para *M. tuberculosis*. Además, el diseño de fármacos basado en ligandos puede combinarse con el diseño basado en estructuras, para que éste sea más eficiente. Por esta razón, se eligieron a las enzimas IpdAB (CoA transferasa) y DXR como proteínas blanco, ya que un fármaco contra *M. tuberculosis* eficaz debería tener la capacidad de inhibir múltiples dianas proteicas para retrasar la posibilidad de que la micobacteria adquiera resistencia durante un largo periodo de tratamiento (Ejalonibu et al., 2021b).

Con el objetivo de identificar la interacción entre los derivados propuestos con las enzimas de interés IpdAB CoA transferasa y DXR; se diseñó un modelo de interacciones proteína – ligando con los 16 derivados propuestos. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en los acoplamientos moleculares, así como los criterios que permitieron elegir a aquellos derivados más prometedores con miras a su semi síntesis y posterior evaluación biológica. La selección se realizó identificando la Calificación de acoplamiento estimada del sustrato natural en ambas enzimas y posteriormente se estableció un rango en cada enzima para poder filtrar aquellos derivados con la menor Calificación de acoplamiento expresada en kcal/mol, este parámetro nos permite hacer una estimación cuantitativa de la fuerza y estabilidad de la interacción proteína – ligando, entre más negativa sea una calificación indicará una interacción más favorable y por ende, mayor probabilidad

de que esta interacción suceda en condiciones fisiológicas (Morris & Lim-Wilby, 2008). Para la identificación de las interacciones no covalentes entre los ligandos y los residuos del sitio activo se empleó el software PLIP V2.2.2 permitiendo identificar interacciones fijas tales como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, puentes salinos, puentes de halógenos, e interacciones $\pi \rightarrow \pi$, entre otras, a partir de archivos de estructura tridimensional en formato .pdb, por otro lado, las representaciones tridimensionales de los complejos proteína-ligando fueron generadas mediante el software Maestro 12.2, del cual nos permite visualizar las interacciones (Maestro | Schrödinger, n.d.). Cabe mencionar que, en algunos casos, se observaron discrepancias entre las interacciones reportadas por PLIP y las visualizadas en Maestro. Esto se puede atribuir a los diferentes criterios geométricos y de visualización aplicados por cada herramienta de representación utilizados por cada software, Maestro filtra interacciones en función de parámetros tales como distancia, ángulo o representación espacial, lo que puede llevar a omitir algunas interacciones consideradas como débiles, pero que son reportadas en PLIP. Esta limitación fue considerada al interpretar los resultados utilizando ambas herramientas de manera complementaria.

5.1 Acoplamiento molecular con la enzima IpdAB CoA transferasa

La proteína cristalizada IpdAB CoA transferasa (6CON) se sometió a una prueba de calidad en el servidor web Molprobit y se obtuvo un diagrama de Ramachandran que indicó un 96 % de residuos en áreas favorecidas y 99.8 % de los residuos en regiones permitidas indicando que la calidad del modelo es aceptable y se puede usar para realizar el acoplamiento molecular. Primero se validó el sitio catalítico

tanto en la subunidad α y β con los sustratos de la enzima COCHEA-CoA (Figura 15), y MeDODA-CoA (Figura 16), de acuerdo con lo reportado por Crowe A. et al 2018, COCHEA-CoA se une mediante puentes de hidrógeno a los aminoácidos responsables de la actividad ARG89 y ASN128 y GLU102 en los sitios catalíticos, además de otras interacciones comunes con THR49, PHE77, VAL80, PHE81. Posteriormente se realizaron tres acoplamiento en ciego, así como un acoplamiento dirigido a los sitios catalíticos para identificar el sitio de unión más afín del *AmDG* y los derivados.

El *AmDG* muestra afinidad con las pruebas realizados en los sitios ciegos, especialmente hubo mayor afinidad al sitio donde se evaluó la subunidad AB con 8.74 kcal/mol interactuando de manera hidrofóbica con ALA85, GLN114, LEU116, LEU119, ILE12 y por puentes de hidrógeno con GLN 110, GLN114, ARG122, ALA123 y ASN131 (Figura 17).

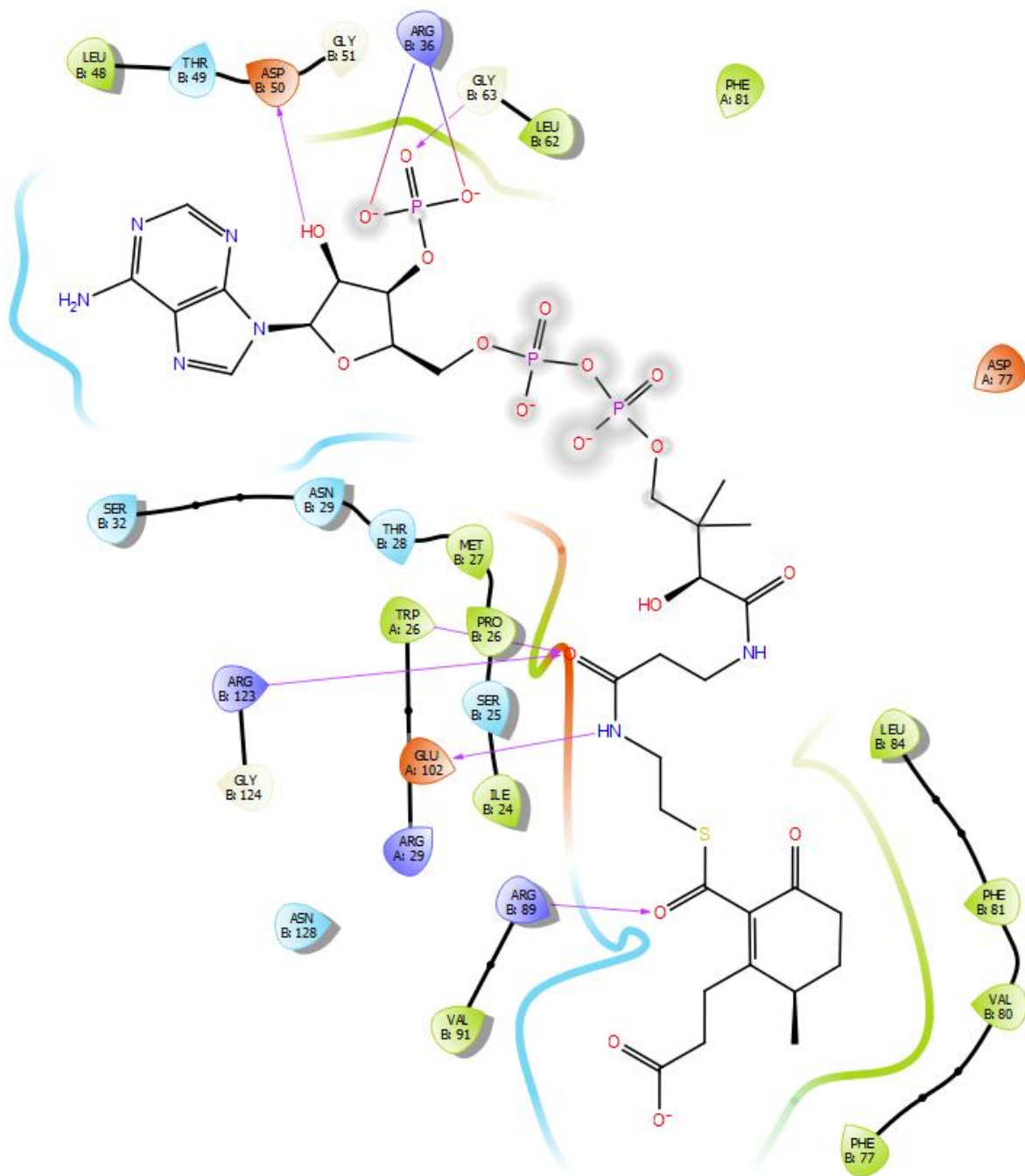


Figura 15. Validación del sitio catalítico de la subunidad AB de la enzima IpdAB con COCHEA-CoA

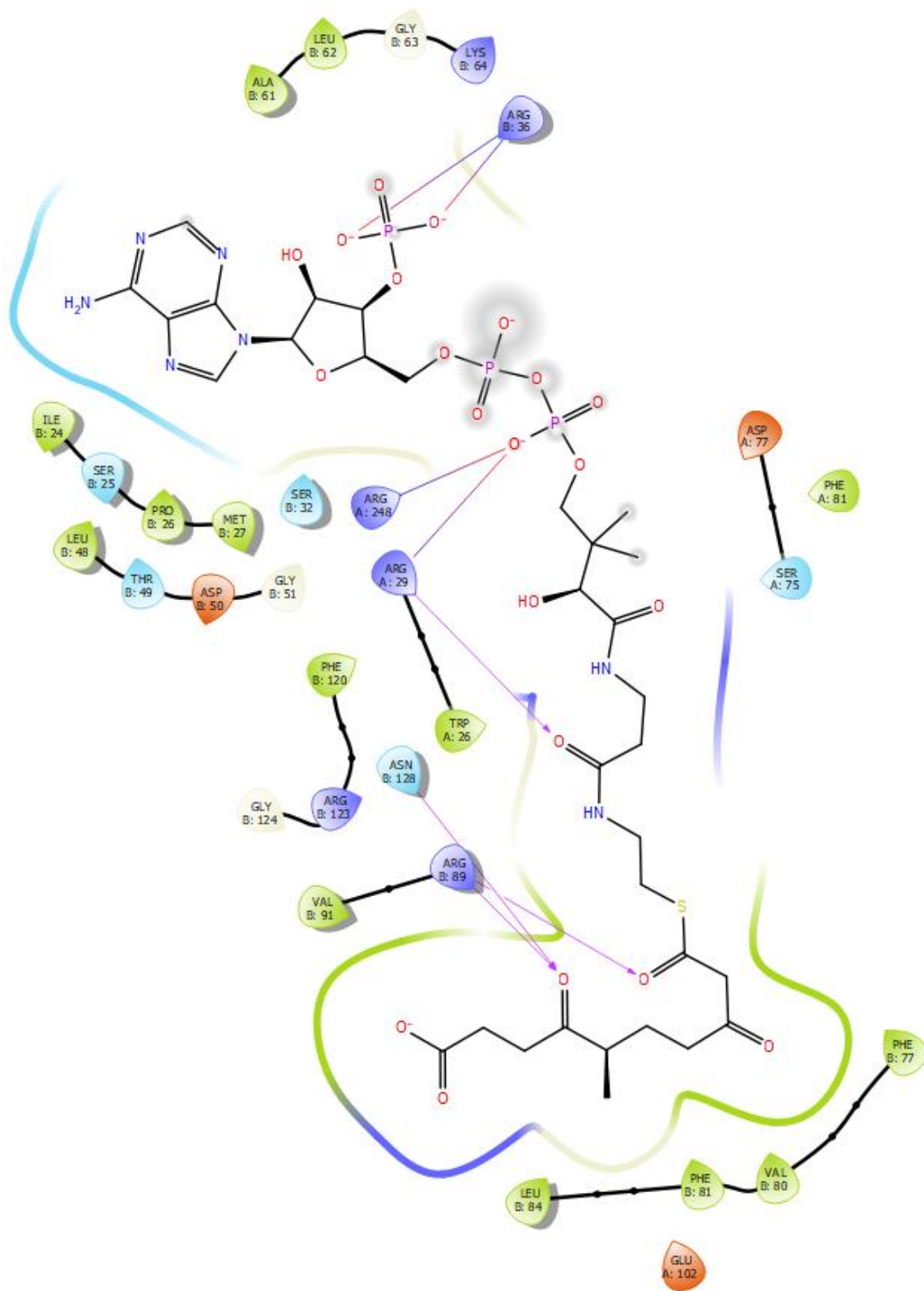


Figura 16. Validación del sitio catalítico de la subunidad AB de la enzima IpdAB con MeDODA-CoA.

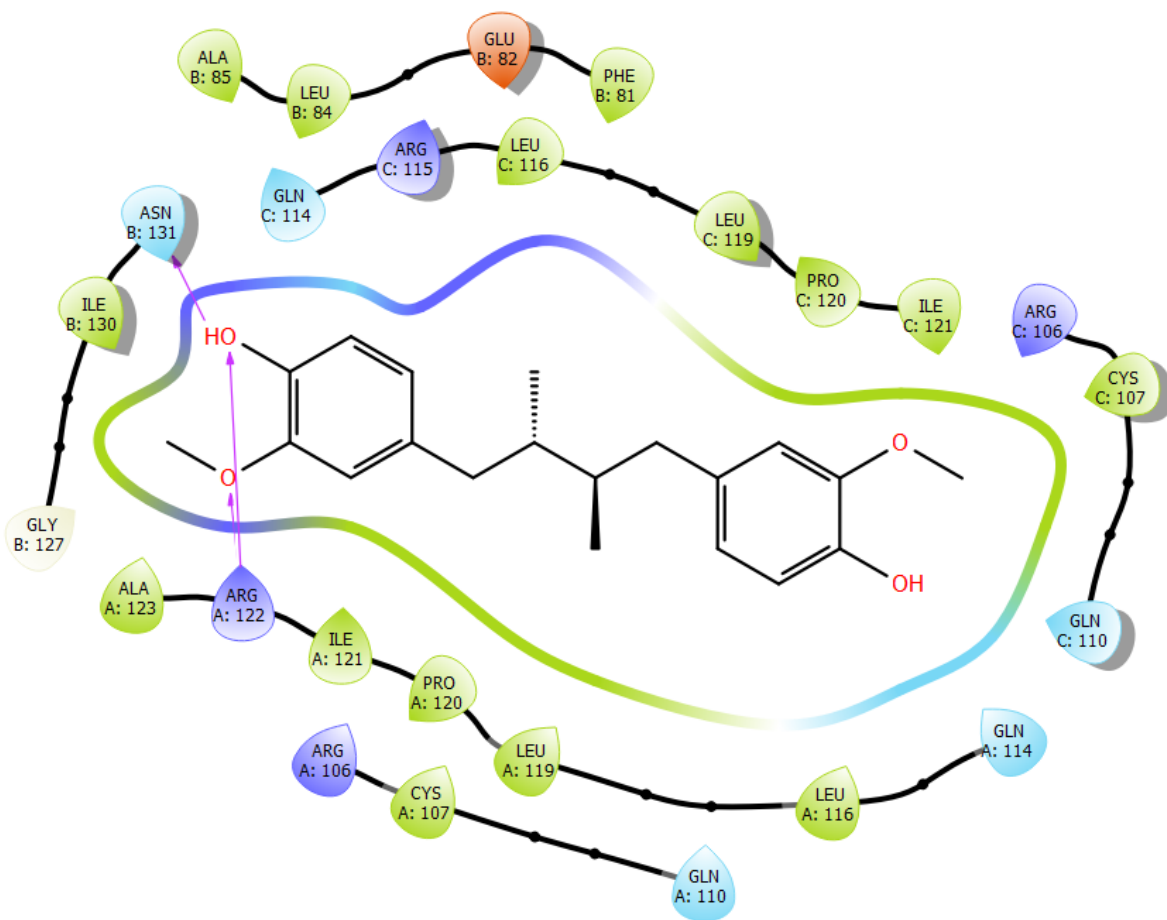


Figura 17. Unión de *AmDG* en sitio ciego AB de la enzima *IpdAB* CoA transferasa.

En el acoplamiento del *AmDG* con los sitios catalíticos de AB y CD la calificación de acoplamiento es de -7.61 y -7.33 kcal/mol respectivamente. Podemos ver que en sitio catalítico AB (Figura 18) las interacciones por puentes de hidrógeno son con ILE24, SER25, TRP26, ARG29, THR49, SER75, ASP 77, ARG123, en cambio en el sitio catalítico CD la interacción por puentes de hidrógeno es con los aminoácidos ILE24, THR49, ARG89, ASN128 (Figura 19).

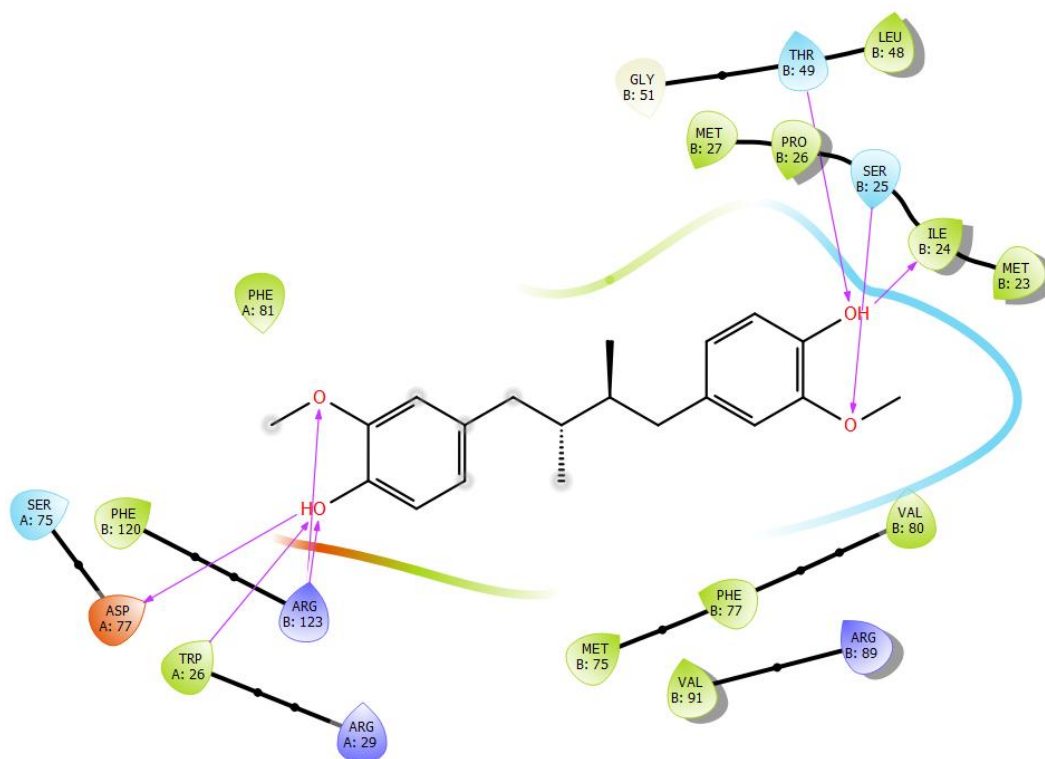


Figura 18. Unión del AmDG al sitio catalítico AB de la enzima IpdAB CoA transferasa.

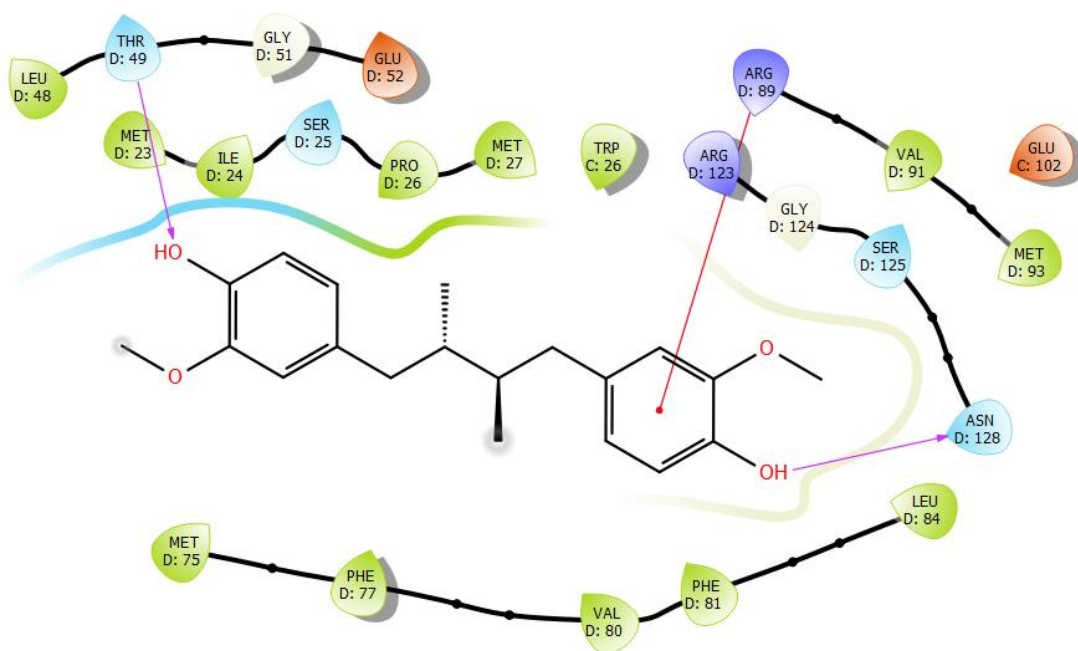


Figura 19. Unión de AmDG al sitio catalítico CD de la enzima IpdAB CoA transferasa.

En ambos sitios catalíticos el *AmDG* pudo interactuar con el sitio de unión al sustrato, sin embargo, la interacción del sitio catalítico AB no se da con los mismos aminoácidos importantes que con los que interactúa el sustrato, por otra parte, la interacción con el sitio catalítico CD hay interacción por puentes de hidrógeno con los aminoácidos ARG89 y ASN128.

De acuerdo con los datos de los acoplamientos ciegos y centrados a los sitios catalíticos con el *AmDG* se identificaron tres posibles sitios de unión del *AmDG* con la enzima IpdAB CoA transferasa: Al sitio ubicado en el ciego 1 (sitio alostérico 1), al sitio catalítico AB y al sitio catalítico CD.

Bajo esta suposición, los derivados propuestos fueron evaluados bajo las mismas condiciones. En la Tabla 11 se presentan las calificaciones de acoplamiento en kcal/mol de los ligandos con los cinco sitios evaluados, así como de los sustratos COCHEA-CoA y MeDODA-CoA.

De acuerdo con los datos obtenidos podemos observar que los aminoéteres derivados de *AmDG* se unen con una mayor afinidad a cualquiera de los centros en comparación con los sustratos de la enzima, inclusive con mejor afinidad que el *AmDG*. En general los derivados *meso* presentan mayor afinidad que los derivados \pm *mono*. Los derivados que presentaron una calificación de acoplamiento inferior a -10 kcal/mol son EBS-1A, EBS-1B, EBS-5B, EBS-7A, EBS-7B y EBS-8B, por lo tanto, son los que se consideran más prometedores.

Tabla 11. Calificaciones (kcal/mol) de la simulación del acoplamiento molecular de los aminoéteres con la enzima IpdAB CoA transferasa de *M. tuberculosis*

Derivado	Ciego 1	Ciego 2	Ciego 3	Sitio cat. AB	Sitio cat. CD
EBS-1A	-7.89	-8.31	-10.13	-8.2	-8.36
EBS-1B	-9.49	-8.77	-10.23	-9.04	-9.02
EBS-2A	-8.42	-8.61	-8.92	-8.67	-8.83
EBS-2B	-7.64	-8.63	-9.94	-8	-9.18
EBS-3A	-9.7	-8.21	-9.11	-8.36	-8.38
EBS-3B	-8.44	-9.88	-9.45	-8.78	-9.85
EBS-4A	-8.22	-8.48	-8.38	-8.79	-8.12
EBS-4B	-8.19	-8.7	-9.7	-8.88	-9.69
EBS-5A	-8.13	-9.39	-8.64	-8.01	-8.64
EBS-5B	-10.55	-10.14	-9.49	-9.32	-10.17
EBS-6A	-9.24	-9.38	-9.7	-9.59	-8.79
EBS-6B	-9.43	-8.46	-8.6	-9.27	-9.29
EBS-7A	-9.18	-8.8	-9.61	-10.2	-10.13
EBS-7B	-11.27	-10.14	-13.05	-11.89	-10.13
EBS-8A	-8.79	-8.26	-9.07	-9.19	-8.54
EBS-8B	-9.5	-9.18	-11.01	-8.93	-10.14
AmDG	-8.74	-7.49	-8.73	-7.61	-7.33
COCHEA-CoA	-5.46	-6.2	-5.48	-5.35	-5.19
MeDODA-CoA	-4.56	-4.47	-5.11	-4.35	-4.3

Ciego 1: Centrado a la subunidad AB

Ciego 2: Centrado a la subunidad CD

Ciego 3: Centrado en todo el tetrámero

SitioCatAB: Centrado en el sitio catalítico de la subunidad AB

SitioCatCD: Centrado en el sitio catalítico de la subunidad CD

Se resaltan en negritas los derivados con calificación de acoplamiento inferior a -10 kcal/mol

El derivado EBS-1A, mostró una calificación -10.13 kcal/mol con el sitio ciego 3 y las interacciones identificadas coinciden con las identificadas en el sitio alostérico 1 ya que forma puentes de hidrógeno con GLN110, GLN114, ARG122 y ASN131, así como interacciones hidrófobas con ALA85, LEU116, LEU119, ILE121 (Figura 20).

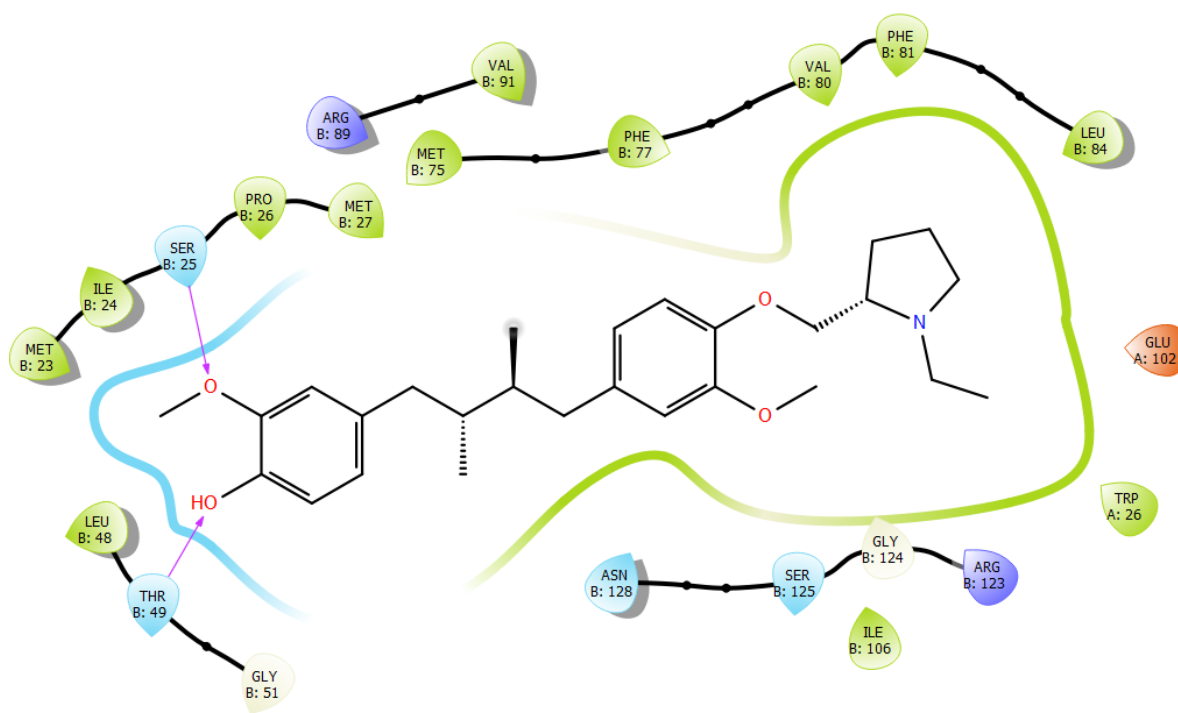


Figura 21. Unión del derivado EBS-1A al sitio catalítico AB de la enzima IpdAB CoA transferasa.

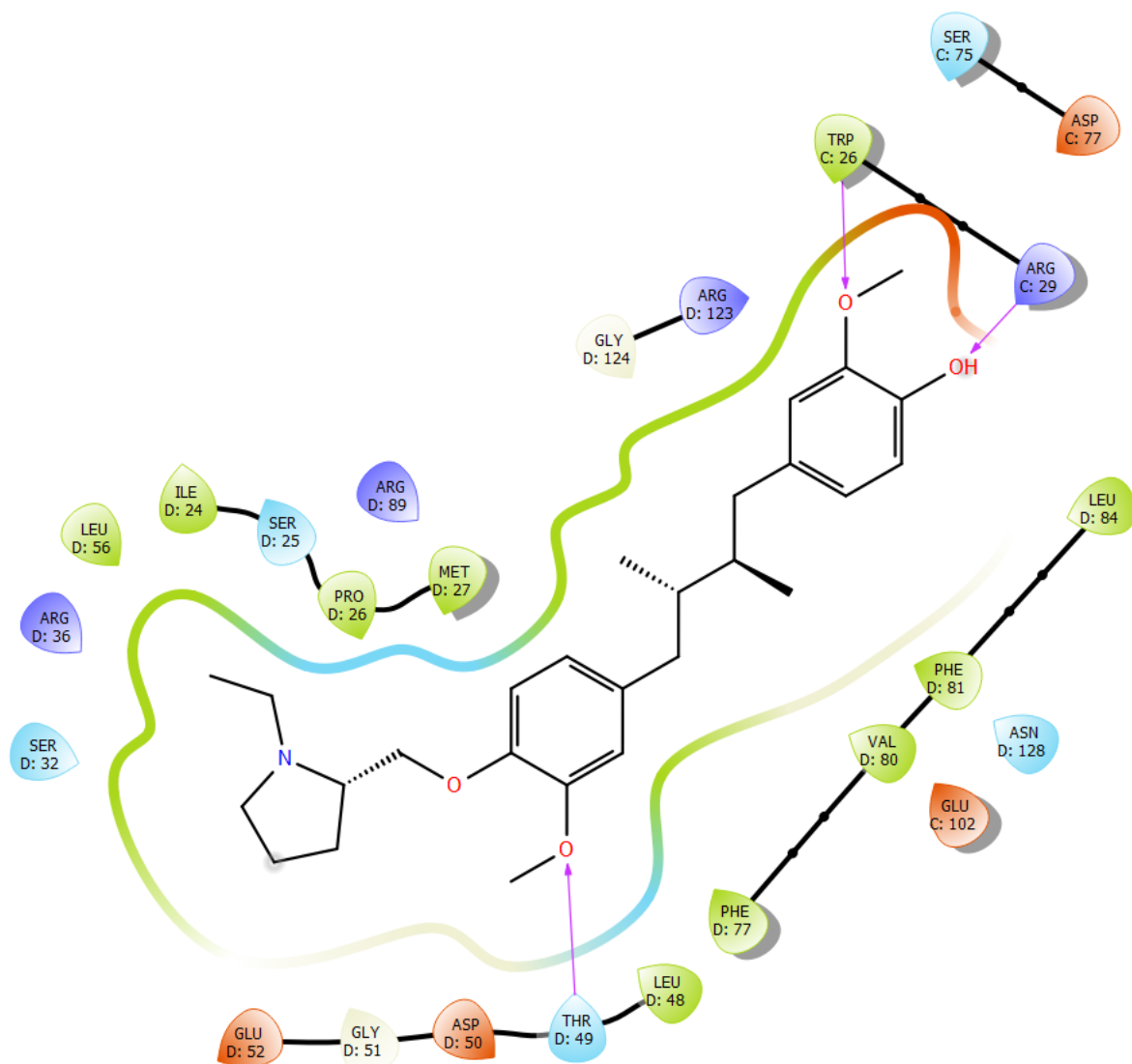


Figura 22. Unión del derivado EBS-1A al sitio catalítico CD de la enzima IpdAB CoA transferasa.

El derivado EBS-1B mostró una calificación de acoplamiento de -10.23 kcal/mol con el sitio ciego 3 y las interacciones identificadas son hidrofóbicas con ALA112, ARG115, GLU136, TYR 144, PRO147, PRO158, ALA159, ARG161, por puentes de hidrógeno con ARG161, interacciones $\pi \rightarrow \pi$ con TYR144 e interacciones pi-cación con ARG161, como podemos observar, estas interacciones son nuevas y tampoco coinciden con las interacciones del sitio alostérico 1, por lo tanto, cuando

identifiquemos estas interacciones nuevamente llamaremos sitio alostérico 2 (Figura 23).

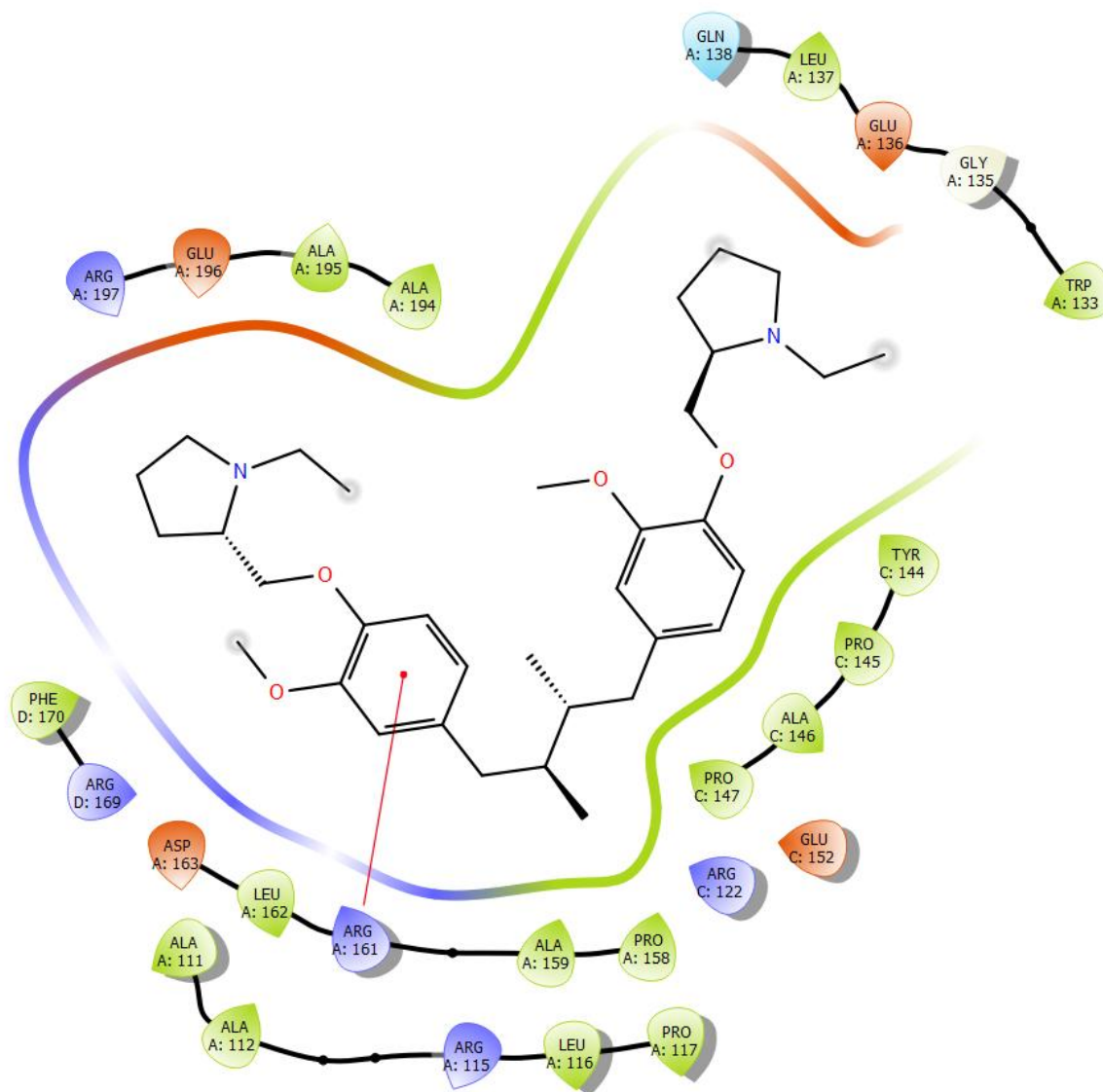


Figura 23. Unión del derivado EBS-1B al sitio alostérico 2 de la enzima IpdAB CoA transferasa.

Por otra parte, se analizaron las interacciones con los sitios catalíticos AB (Figura 24) y CD (Figura 25) identificando interacciones por puentes de hidrógeno con los aminoácidos importantes ARG 89 y ASN 128, por lo tanto, podemos decir que el

derivado EBS-1B se puede unir al sitio alostérico 2 y a los sitios catalíticos inhibiendo la interacción con los sustratos.

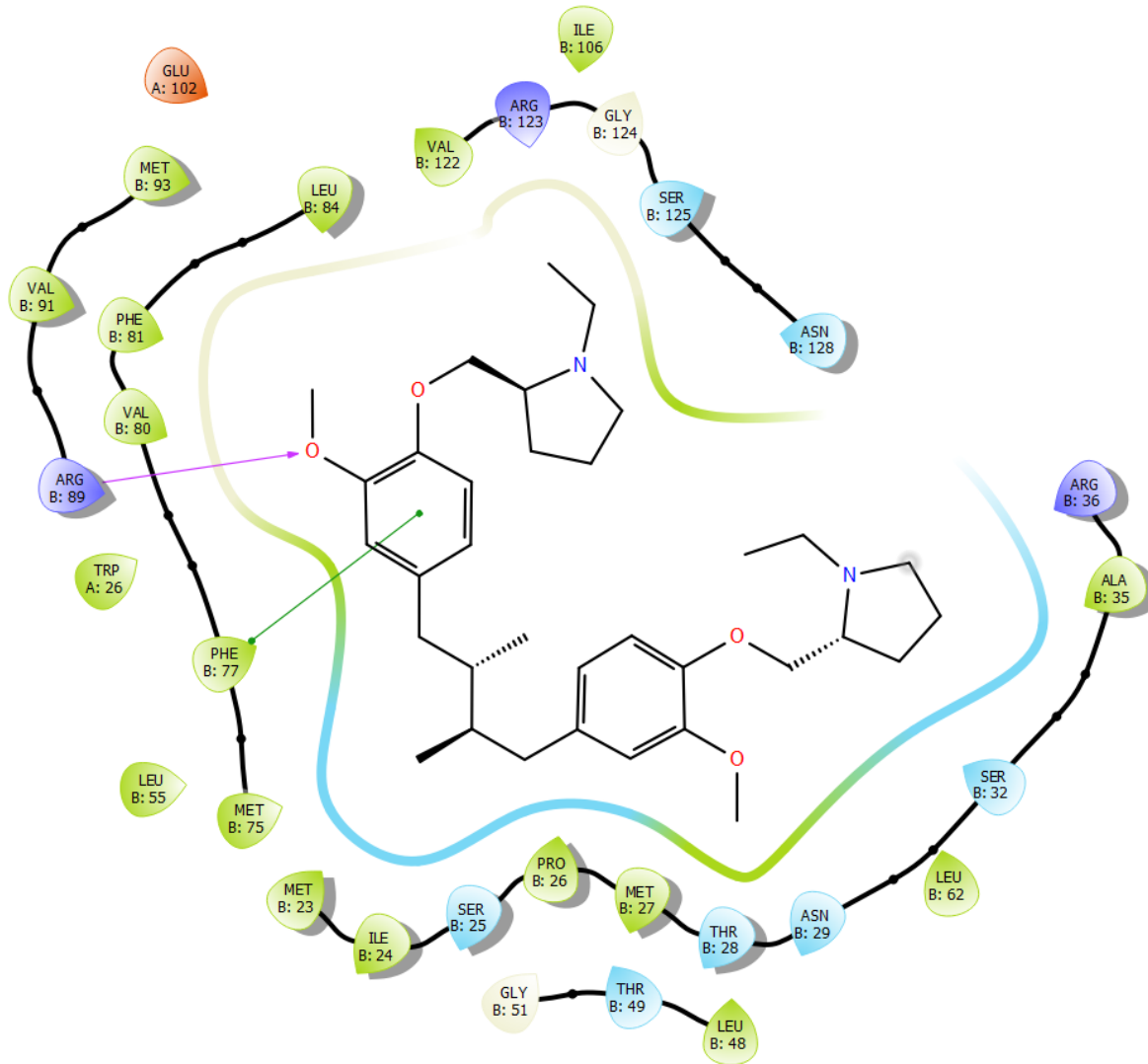


Figura 24. Unión del derivado EBS-1B al sitio catalítico AB de la enzima IpdAB Coa transferasa.

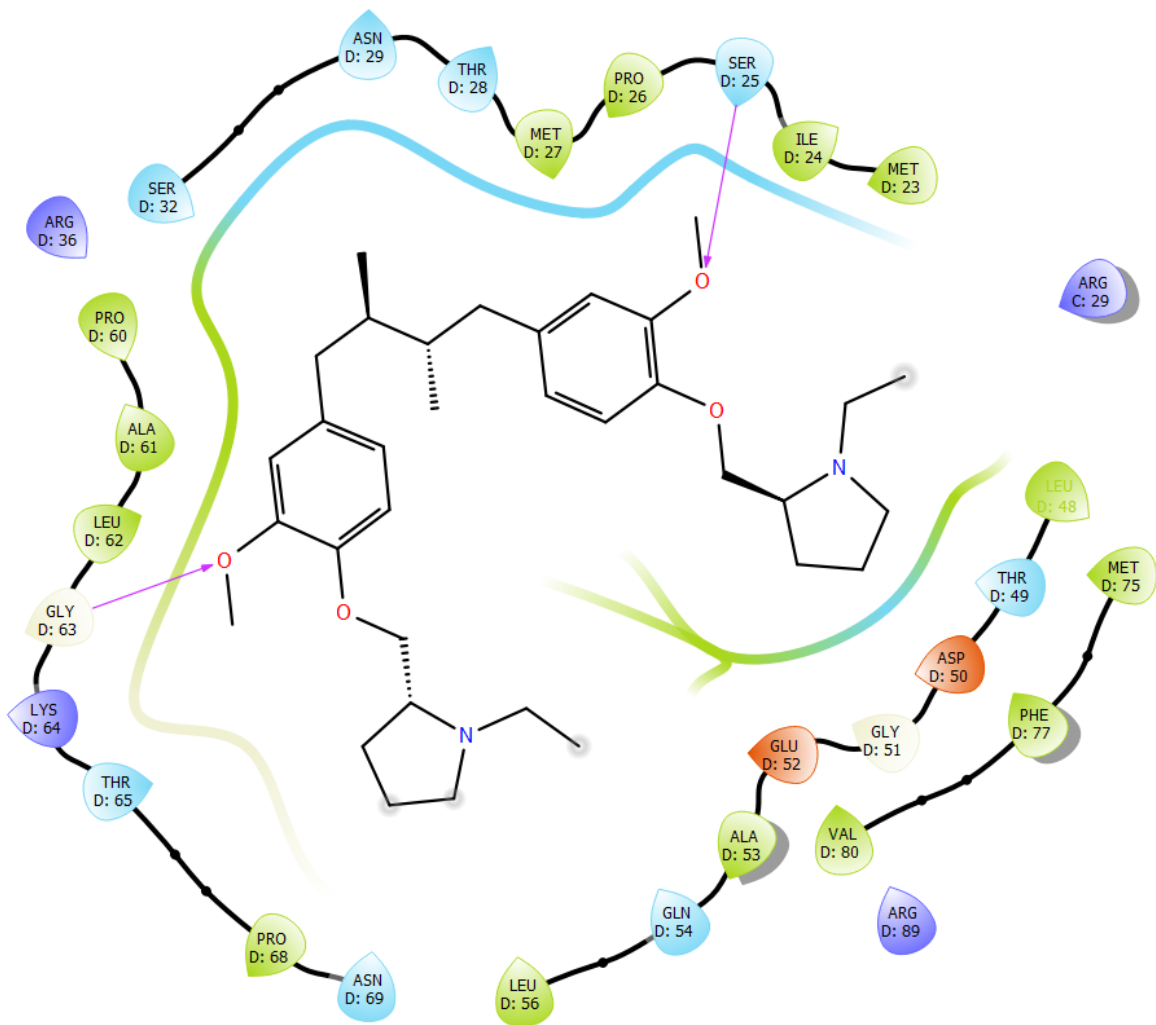


Figura 25. Unión del derivado EBS-E1B al sitio catalítico CD de la enzima IpdAB Coa transferasa.

El derivado EBS-5B se une con una calificación de acoplamiento de -10.55 kcal/mol al sitio 1, las interacciones que se observan coinciden con las identificadas en el sitio alostérico 2, identificando un puente de hidrógeno e interacción $\pi \rightarrow$ catión con el aminoácido ARG 161 (Figura 26).

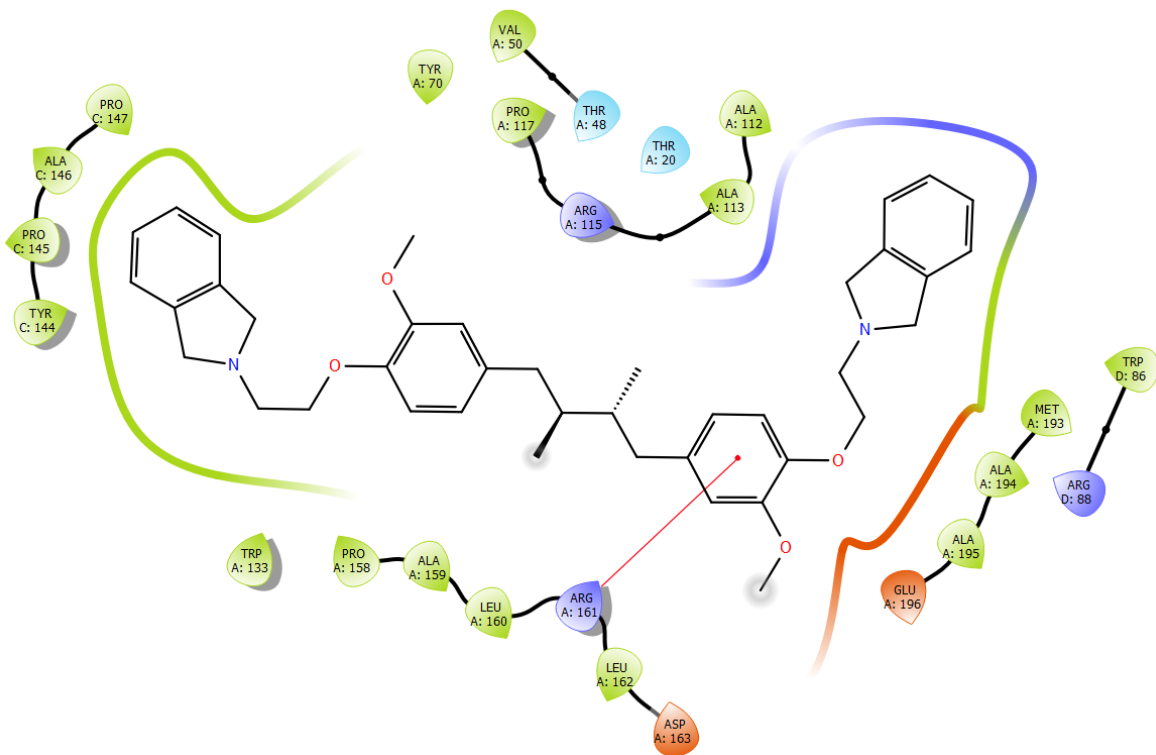


Figura 26. Unión del derivado EBS-5B al sitio alostérico 2 de la enzima IpdAB CoA transferasa.

Por otra parte, la unión al sitio catalítico CD con una calificación de acoplamiento de -10.17 kcal/mol, se observa formando puentes de hidrógeno con ARG89 y ASN128, los aminoácidos que se unen al sustrato, además, presentan otros puentes de hidrógeno con THR49 y GLY124 e interacciones hidrofóbicas esenciales del sustrato como TRP26, PHE77, VAL80, además de ILE106, PHE120, ARG123, (Figura 27).

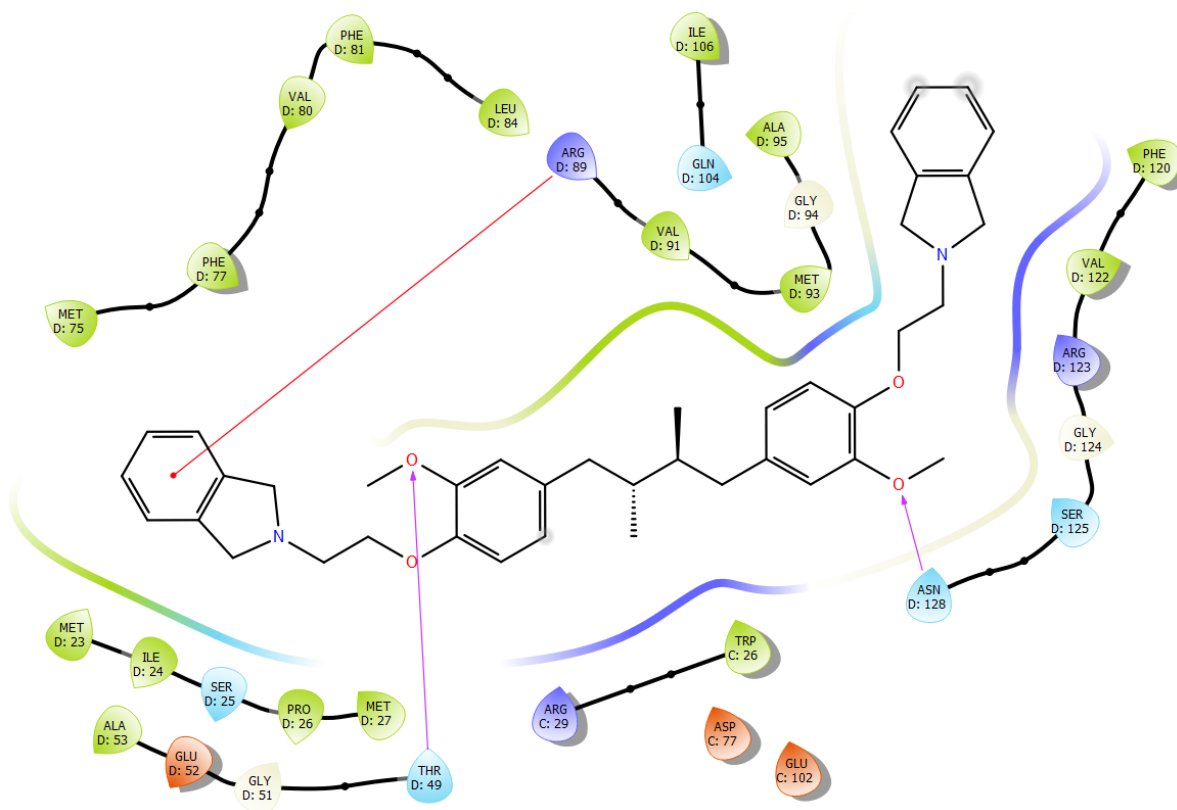


Figura 27. Unión del derivado EBS-5B con el sitio catalítico CD de la enzima IpdAB CoA transferasa.

Los derivados EBS-7A, EBS-7B y EBS-8B no presentan interacciones con ARG89 y ASN128, sin embargo, presentaron una buena calificación de acoplamiento formado más interacciones tanto hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, o de $\pi \rightarrow \pi$ como se describe a continuación.

El derivado EBS-7A mostró interacciones muy parecidas entre sí en ambos sitios catalíticos y con mejor calificación de acoplamiento que en los sitios ciegos, por lo tanto, se consideraran estos datos para el análisis. La interacción en el sitio catalítico AB (Figura 28) indicó una calificación de acoplamiento de -10.2 kcal/mol y la interacción en el sitio catalítico CD (Figura 29) indicó una calificación de

acoplamiento de -10.13 kcal/mol. Ambos acoplamientos indican interacción con TRP26, PRO26, LEU48, PHE77, VAL80, PHE81, SER25 y THR49. En el sitio catalítico CD además se presentaron interacciones de puente de hidrógeno con ARG29, e interacciones $\pi \rightarrow \pi$ con PHE77.

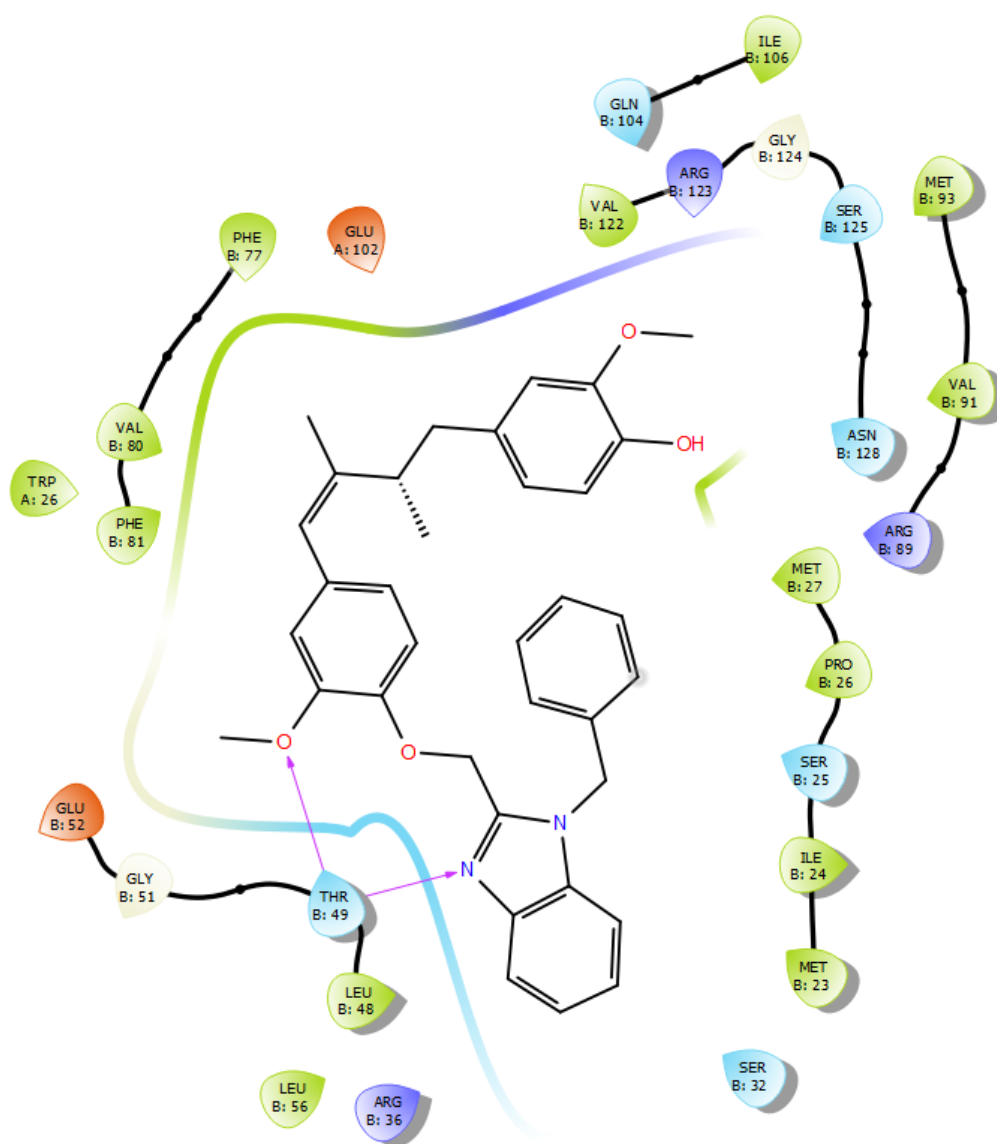


Figura 28. Unión del derivado EBS-7A al sitio catalítico AB la enzima IpdAB CoA transferasa.

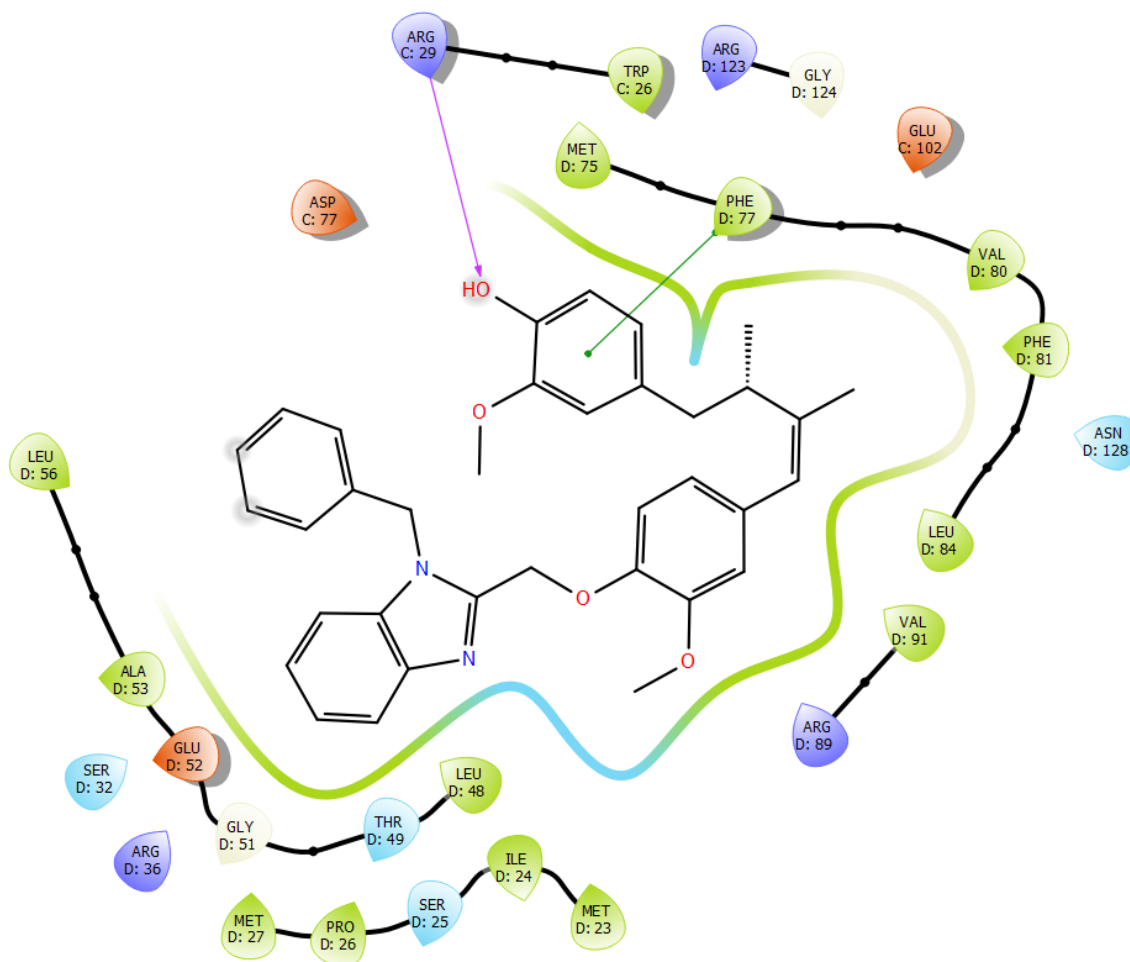


Figura 29. Unión del derivado EBS-7A al sitio catalítico CD en la enzima IpdAB CoA transferasa.

El derivado EBS-7B mostró calificaciones de acoplamiento inferiores a -10 kcal/mol en los 5 sitios evaluados, y se identificó la mejor calificación de todos los ligandos en el sitio ciego 3 con -13.05 kcal/mol, interactuando con los aminoácidos del sitio alostérico 2, además de un puente de hidrógeno con LEU 162 (Figura 30). Por otra parte, la unión al sitio catalítico AB con calificación de -11.89 kcal/mol no presentan interacciones con ARG89 y ASN128, de la misma manera que los acoplamientos con los sitios 1, 2, y sitio catalítico AB con menor afinidad, pero si con los

aminoácidos comunes del sitio de unión TRP26, PRO26, LEU48, PHE77, VAL80, PHE120, ARG123, y puentes de hidrógeno con SER25, THR49 (Figura 31).

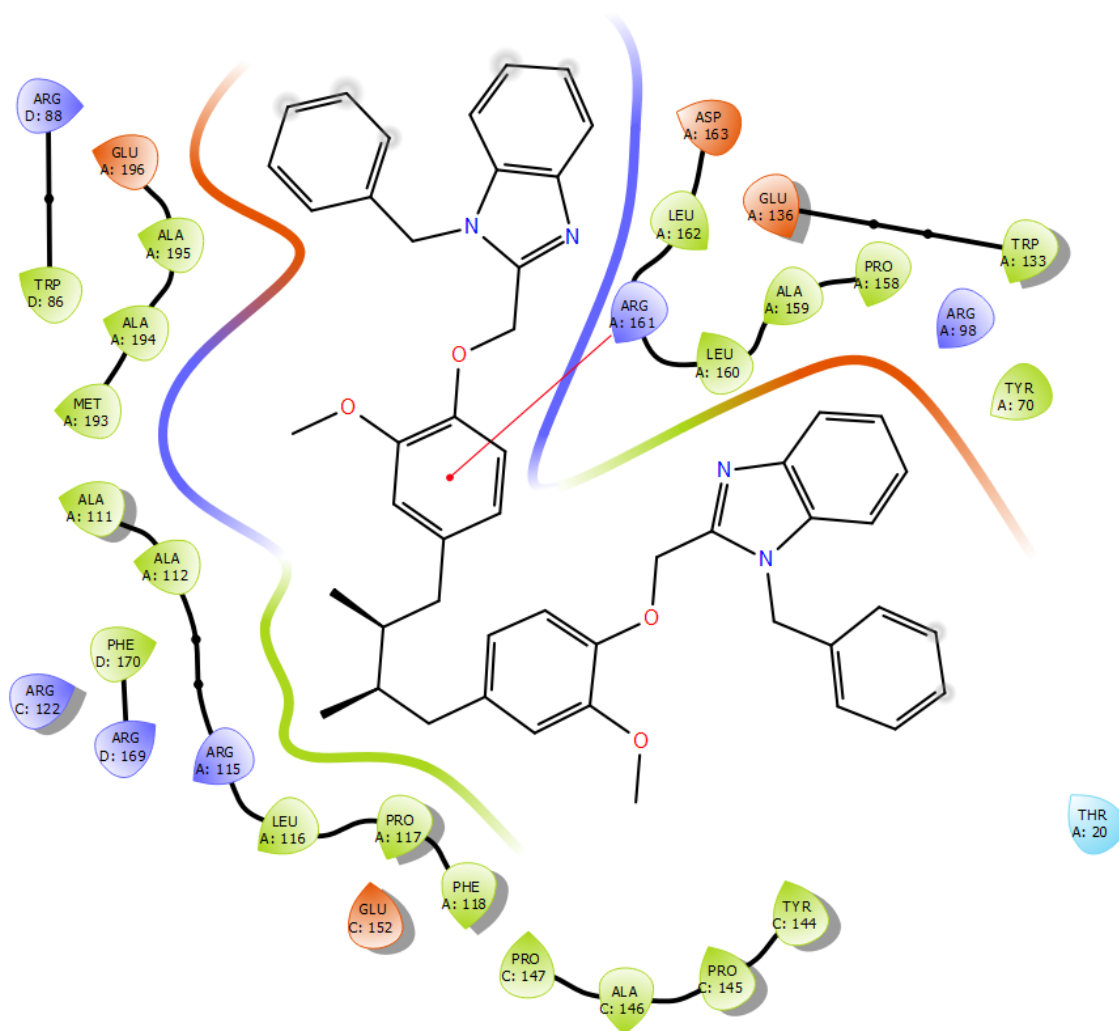


Figura 30. Unión del derivado EBS-7B al sitio alostérico 2 de la enzima IpdAB CoA transferasa.

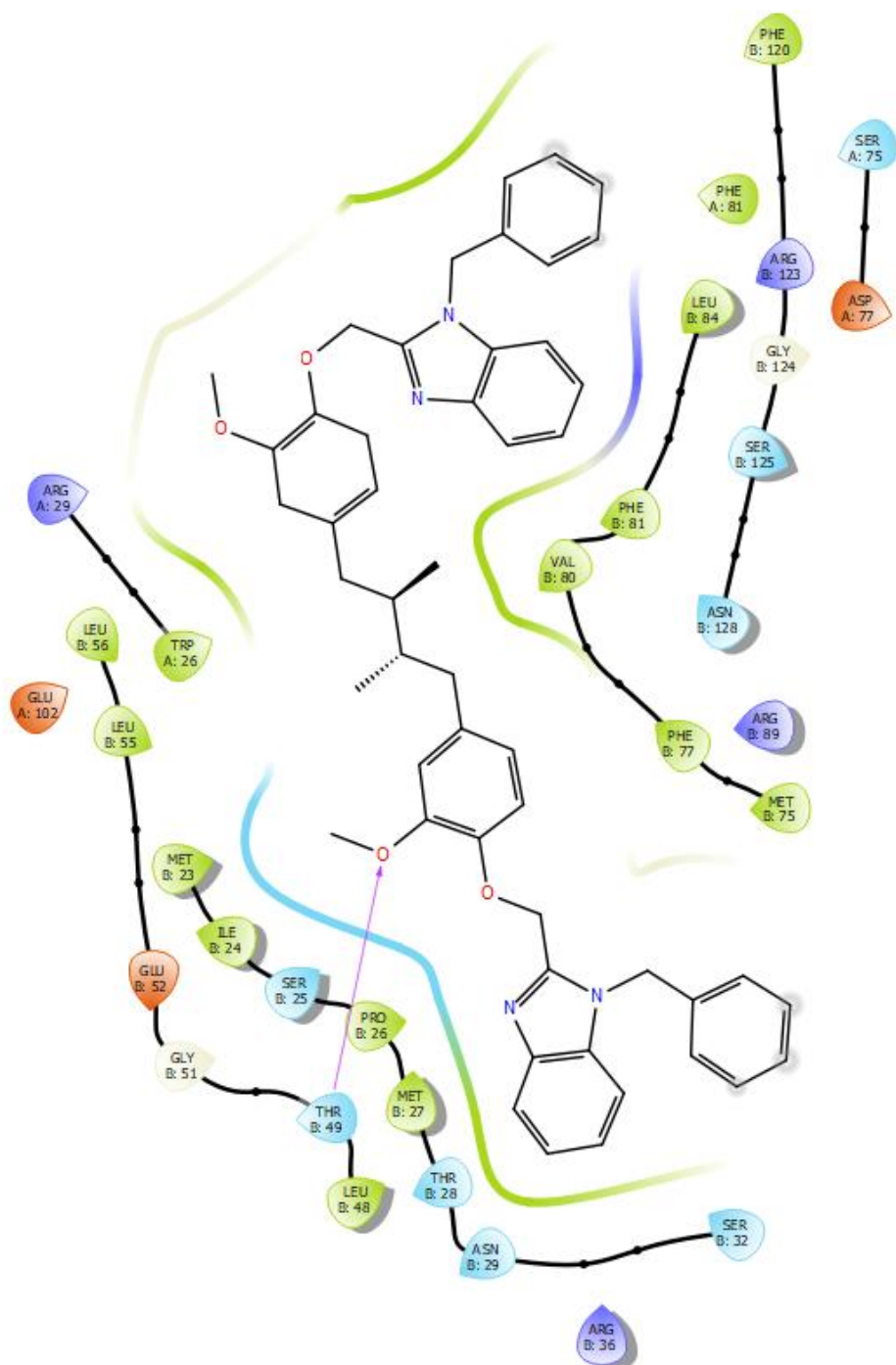


Figura 31. Unión del derivado EBS-7B al sitio catalítico AB de la enzima IpdAB CoA transferasa

El derivado EBS-8B se une al sitio ciego 3 con una calificación de -11.01 kcal/mol, interactuando con los aminoácidos del sitio alostérico 2, además de un puente de hidrógeno con ASP163 (Figura 32).

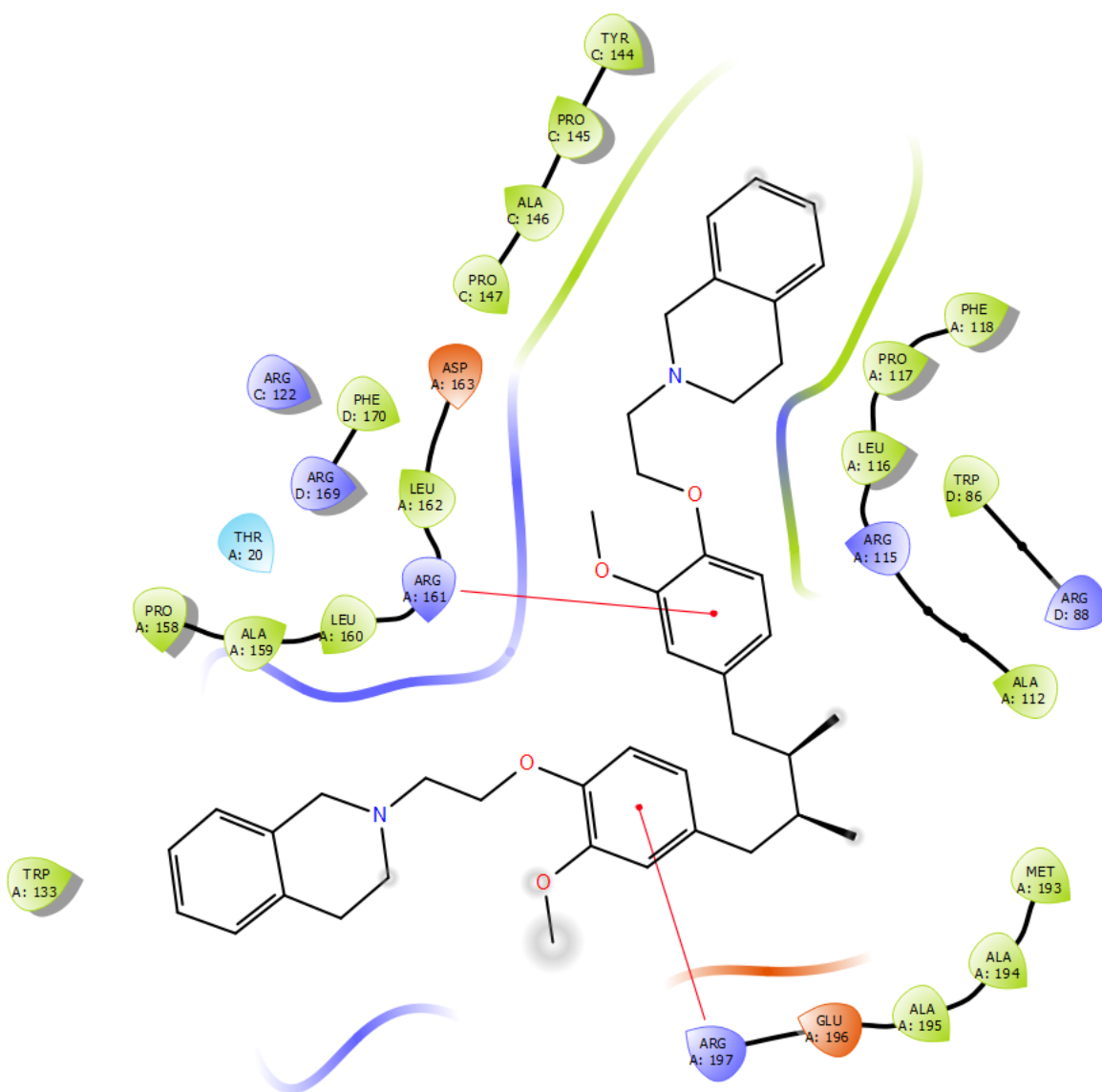


Figura 32. Unión del derivado EBS-8B al sitio alostérico 2 de la enzima IpdAB CoA transferasa.

Por otra parte, la unión al sitio catalítico CD con afinidad de -10.14 kcal/mol con el sitio catalítico CD interacciona con puentes de hidrógeno con ARG29, SER32, ARG36 e interacciones $\pi \rightarrow \pi$ con PHE77 (Figura 33).

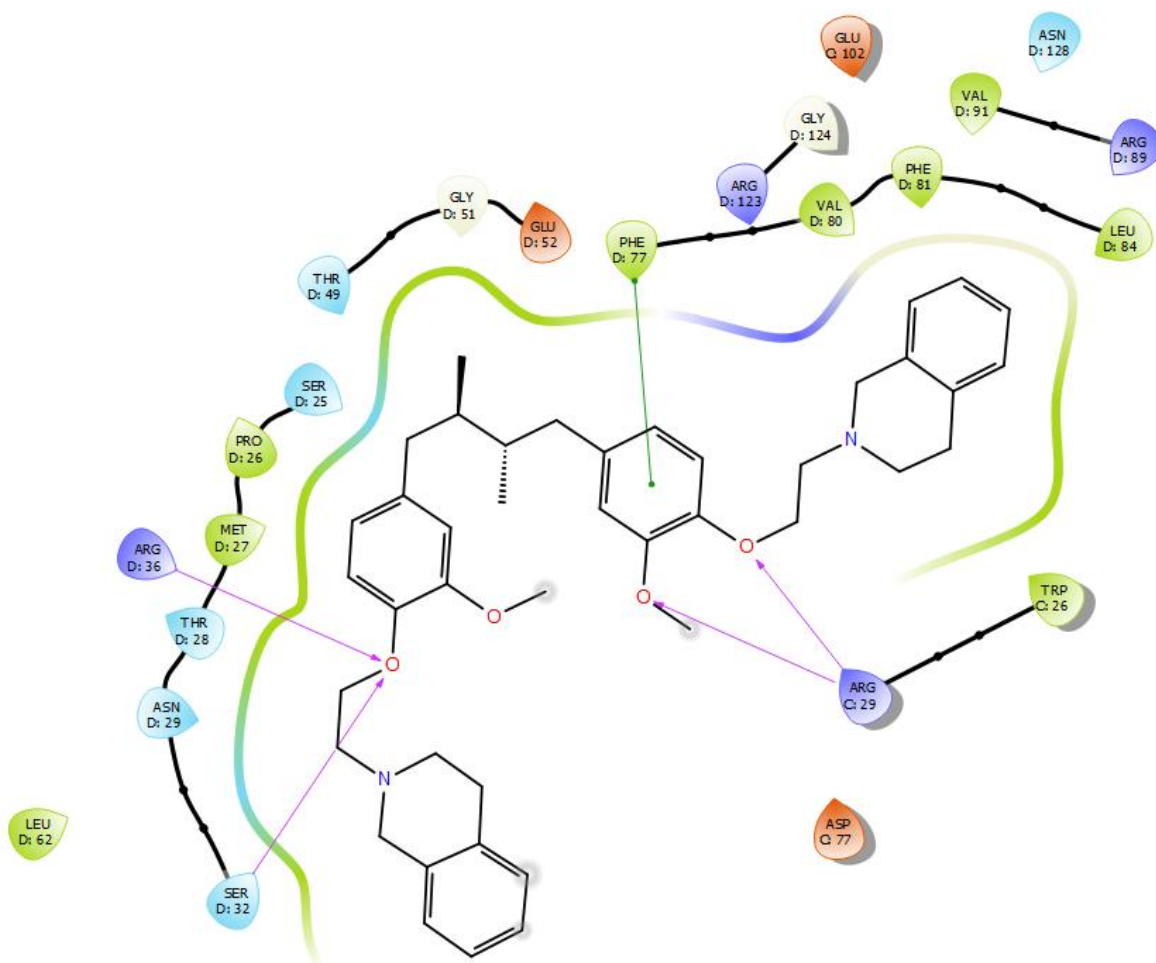


Figura 33. Unión del derivado EBS-8B al sitio catalítico CD de la enzima IpdAB CoA transferasa

En la Tabla 12 se describen todas las interacciones de los acoplamiento molecular con mejor Calificación de Acoplamiento.

Tabla 12. Interacciones proteína- ligando de los mejores acoplamiento moleculares con la enzima IpdAB CoA transferasa

Derivado	Sitio	Calificación de acoplamiento (kcal/mol)	de Interacción con los aminoácidos
EBS-1A	Ciego3	-10.13	Interacciones hidrofóbicas ALA85, LEU116, LEU119, ILE121 Puentes de hidrógeno ARG 106, GLN110, GLN114, ARG122, ASN131
EBS-1A	SitioCatAB	-8.2	Interacciones hidrofóbicas TRP26, VAL80, PHE81 Puentes de hidrógeno SER25, THR49, ARG89, ASN128
EBS-1A	SitioCatCD	-8.36	Interacciones hidrofóbicas TRP26, PRO26, LEU48, PHE77, VAL80, PHE81 Puentes de hidrógeno SER25, TRP26, ARG29, THR49, ARG123 Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ PHE77
EBS-1B	Ciego3	-10.23	Interacciones hidrofóbicas ALA112, ARG115, GLU136, TYR 144, PRO147, PRO158, ALA159, ARG161 Puentes de hidrógeno ARG161 Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ TYR144 Interacciones pi-cati3n ARG161

Tabla 12. Interacciones proteína- ligando de los mejores acoplamiento moleculares con la enzima IpdAB CoA transferasa (continuación)

Derivado	Sitio	Calificación de acoplamiento (kcal/mol)	de Interacción con los aminoácidos
EBS-1B	SitioCatAB	-9.04	Interacciones hidrofóbicas THR49, PHE77, VAL80, VAL91, ARG123 Puentes de hidrógeno SER32, ARG36, ARG89, ASN128 Puentes salinos GLU 102
EBS-1B	SitioCatCD	-9.02	Interacciones hidrofóbicas PRO26, THR49, GLU52, LEU62, PHE77, VAL80 Puentes de hidrógeno SER25, ARG36, GLY63, ARG89
EBS-5B	Ciego1	-10.55	Interacciones hidrofóbicas ALA112, ARG115, PRO117, TYR144, ALA159, ARG161, GLU196 Puentes de hidrógeno ARG161 Interacciones pi-cati3n ARG161
EBS-5B	SitioCatCD	-10.17	Interacciones hidrofóbicas TRP26, PHE77, VAL80, ILE106, PHE120, ARG123 Puentes de hidrógeno THR49, ARG89, GLY124, ASN128.
EBS-7A	SitioCatAB	-10.2	Interacciones hidrofóbicas TRP26, PRO26, LEU48, PHE77, VAL80, PHE81 Puentes de hidrógeno SER25, THR49,

Tabla 12. Interacciones proteína- ligando de los mejores acoplamiento moleculares con la enzima IpdAB CoA transferasa (continuación)

Derivado	Sitio	Calificación de acoplamiento (kcal/mol)	de Interacción con los aminoácidos
EBS-7A	SitioCatCD	-10.13	Interacciones hidrofóbicas TRP26, PRO26, LEU48, PHE77, VAL80, PHE81 Puentes de hidrógeno SER25, ARG29, THR49, Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ PHE77
EBS-7B	Ciego 1	-11.27	Interacciones hidrofóbicas PRO26, THR65, PHE77, PHE81, GLU102 Puentes de hidrógeno SER25, ARG36, THR49, GLY 63, ARG89,
EBS-7B	Ciego 2	-10.14	Interacciones hidrofóbicas TRP26, PRO26, THR49, ASP50, GLU 52, LEU62, PHE77, VAL80 Puentes de hidrógeno SER25, GLY63 Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ PHE77
EBS-7B	Ciego3	-13.05	Interacciones hidrofóbicas TYR70, ALA112, ARG115, PRO117, TRP133, GLU136, PRO147, PRO158, ALA159, ARG161, GLU196 Puentes de hidrógeno LEU162 Interacciones pi-cati3n ARG161

Tabla 12. Interacciones proteína- ligando de los mejores acoplamientos moleculares con la enzima IpdAB CoA transferasa (continuación)

Derivado	Sitio	Calificación de acoplamiento (kcal/mol)	Interacción con los aminoácidos
EBS-7B	SitioCat AB	-11.89	Interacciones hidrofóbicas TRP26, PRO26, LEU48, PHE77, VAL80, PHE120, ARG123, Puentes de hidrógeno SER25, THR49
EBS-7B	SitioCat CD	-10.13	Interacciones hidrofóbicas TRP26, PRO26, MET27, LEU48, THR49, LEU62, PHE77 Puentes de hidrógeno TRP26, ARG29, ARG123 Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ PHE77 Interacciones $\pi \rightarrow$ catión ARG123
EBS-8B	Ciego3	-11.01	Interacciones hidrofóbicas ALA112, ARG115, TYR144, PRO145, ALA159, LEU160, ARG161, GLU196 Puentes de hidrógeno ARG161, ASP163 Interacciones pi-catión <u>ARG161</u>
EBS-8B	SitioCatCD	-10.14	Interacciones hidrofóbicas PRO26, VAL80, LEU84 Puentes de hidrógeno ARG29, SER32, ARG36 Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ PHE77

Tabla 12. Interacciones proteína- ligando de los mejores acoplamiento moleculares con la enzima IpdAB CoA transferasa (continuación)

Derivado	Sitio	Calificación de acoplamiento (kcal/mol)	Interacción con los aminoácidos
AmDG	Ciego AB	-8.74	Interacciones hidrófobas ALA85, GLN114, LEU116, LEU119, ILE121 Puentes de hidrógeno GLN 110, GLN114, ARG122, ALA123, ASN131,
AmDG	Sitio_catsiteAB	-7.61	Interacciones hidrofóbicas PRO26, PHE77 Puentes de hidrógeno ILE24, SER25, TRP26, ARG29, THR49, SER75, ASP 77, ARG123,
AmDG	Sitio_catsiteCD	-7.33	Interacciones hidrofóbicas THR49, PHE77, VAL80, PHE81, LEU84 Puentes de hidrógeno ILE24, THR49, ARG89, ASN128
COCHEA- CoA	Sitio_catsiteAB	-5.35	Interacciones hidrofóbicas TRP26, PHE77, VAL80, PHE81 Puentes de hidrógeno SER25, TRP26, ARG29, SER32, THR49, ASP50, GLY63, ASP77, ARG89, GLU102, ARG123, ASN128,
COCHEA- CoA	Sitio_catsiteCD	-5.19	Interacciones hidrofóbicas TRP26, PHE77, VAL80, PHE81 Puentes de hidrógeno SER25, TRP26, ARG29, SER32, THR49, ASP50, GLY63, ASP77, ARG89, GLU102, ARG123, ASN 128

Tabla 12. Interacciones proteína- ligando de los mejores acoplamiento moleculares con la enzima IpdAB CoA transferasa (continuación)

Derivado	Sitio	Calificación acoplamiento (kcal/mol)	de Interacción con los aminoácidos
MeDODA- CoA	Sitio_catsiteAB	-4.35	Interacciones hidrofóbicas ASP77 Puentes de hidrógeno SER32, ARG36, THR49, GLY63, LYS64, ASP77, ARG89, ASN128
MeDODA- CoA	Sitio_catsiteCD	-4.3	Interacciones hidrofóbicas ASP77, Puentes de hidrógeno SER32, ARG36, THR49, GLY63, LYS64, ASP77, ARG89, ASN128

5.1.1 Análisis del acomodo de los ligandos en la cavidad del sitio activo

En la Figura 34 se presenta el acomodo de los ligandos *AmDG* (azul), derivado EBS-7B (verde) y derivado EBS-6B (violeta) en el sitio catalítico AB comparándolos con el sustrato COCHEA-CoA (amarillo). Podemos observar que COCHEA-CoA entra de forma que la cadena alifática queda por fuera de la superficie del sitio activo, por el contrario, el *AmDG* que es una estructura más pequeña entra y se ajusta dentro del sitio activo de manera que su acomodo le permite interactuar con mayor afinidad que COCHEA-CoA. De acuerdo con lo descrito por Clemente Soto *et al.* 2014 en la simulación de acoplamiento molecular con la coenzima A transferasa construida por homología se propuso la inhibición en el sitio activo por *AmDG* interviniendo en la posible degradación de geraniol y 2-metilnaftaleno, ocasionando inestabilidad en la pared celular de *M. tuberculosis*. Actualmente se conoce el funcionamiento y relevancia de la *lpdAB* CoA transferasa dentro del catabolismo del colesterol esencial para *M. tuberculosis*, en este acoplamiento molecular realizado con la enzima *lpdAB* cristalizada obtenida del PDB, se confirma la inhibición competitiva del sitio activo de la enzima, ya que como observamos en la figura 34, cuando se hace la superposición de COCHEA (amarillo) con *AmDG* (azul) vemos que este último impediría el acomodo de COCHEA en el sitio activo interviniendo en la escisión del anillo C del colesterol.

Observando las estructuras de los derivados más afines EBS-7B y EBS-6B podemos notar que el tamaño de las estructuras podría competir con el de COCHEA, y, por lo tanto, pueden entrar al sitio activo sin ningún inconveniente.

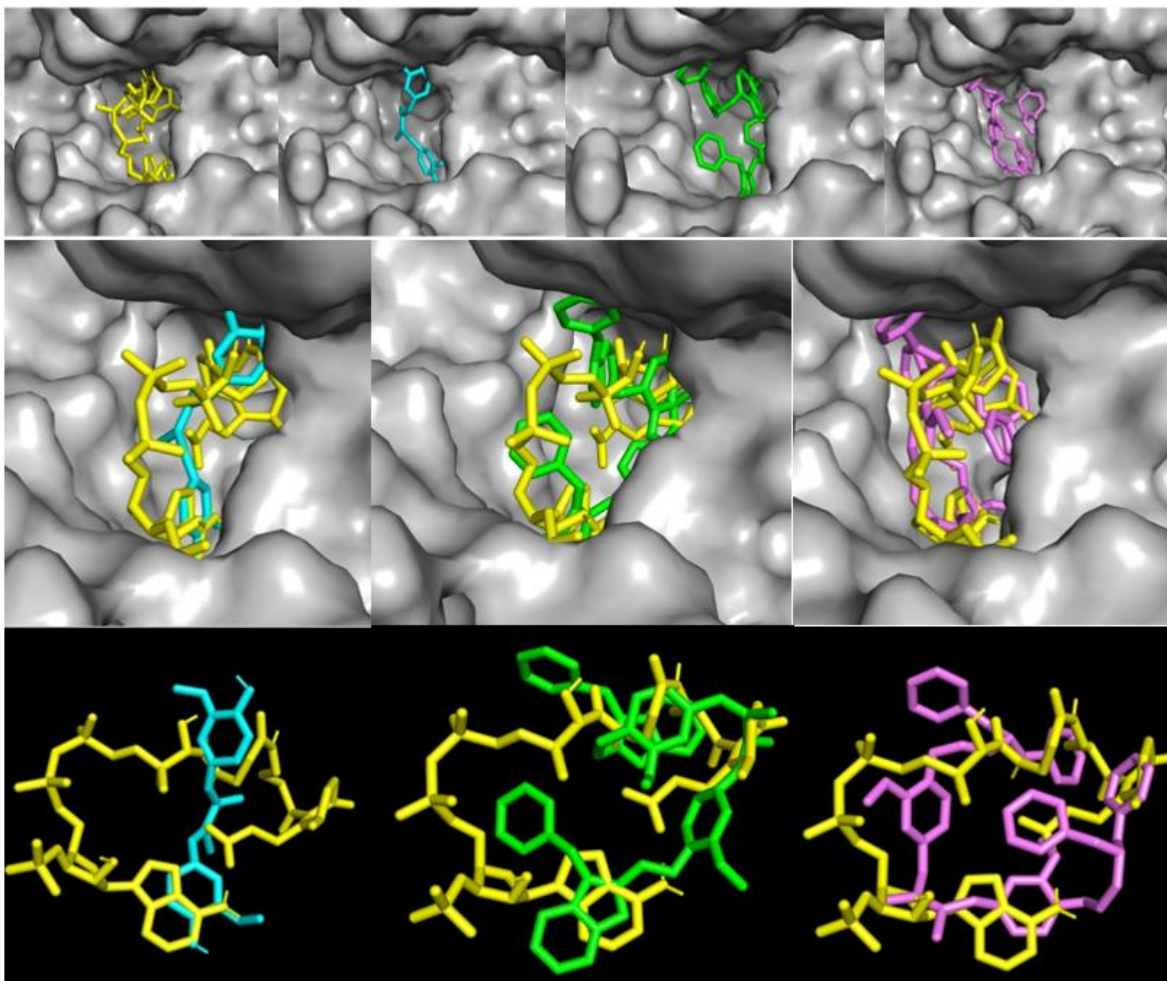


Figura 34. Análisis del acomodo de los ligandos en comparación con el sustrato natural COCHEA de la enzima IpdAB. a) COCHEA (amarillo), b) *AmDG* (azul), c) EBS-7B (verde), d) EBS-6B (violeta).

En cuanto al acomodo de los derivados EBS-7B y EBS-6B, vemos que EBS-7B (verde) entra de manera que la cadena alifática queda hacia adentro y el bencil benzimidazol queda acomodado hacia fuera del sitio activo, por el contrario, el derivado EBS-6B la cadena alifática queda hacia afuera y los bencilos quedan acomodados hacia dentro del sitio activo, de acuerdo con estas características, podemos decir que el adicionar sustituyentes con cierto grado de flexibilidad y con heterociclos voluminosos permitieron mejorar la afinidad del *AmDG* al sitio activo.

5.2 Acoplamiento molecular con enzima DXR

La proteína DXR fue sometida a una dinámica molecular identificando estabilidad en las estructuras a 6.1 ns (cerrada) 8.2 ns (relajada). Los ligandos se sometieron a un acoplamiento molecular simulando cuatro escenarios diferentes en el sitio catalítico de la enzima. En la Tabla 13 se presentan las Calificación de Acoplamiento (kcal/mol) de los ligandos con las cuatro pruebas de acoplamiento molecular.

Tabla 13. Calificación de acoplamiento (kcal/mol) de la simulación del acoplamiento molecular de los aminoéteres con la enzima DXR de *M. tuberculosis*

Derivado	Calificación de acoplamiento (kcal/mol)			
	1-1	1-2	2-1	2-2
EBS-1A	-10.81	-9.22	-11.68	-9.46
EBS-1B	-10.4	-10.1	-9.96	-10.2
EBS-2A	-9.58	-9.16	-10.89	-10.55
EBS-2B	-9.95	-10.07	-9.04	-9.74
EBS-3A	-9.24	-9.42	-12.4	-9.78
EBS-3B	-10.95	-9.52	-9.85	-10.71
EBS-4A	-9.96	-9.23	-11.52	-8.36
EBS-4B	-10.37	-9.56	-9.43	-9.82
EBS-5A	-9.62	-9.35	-9.15	-10.0
EBS-5B	-10.64	-10.09	-10.26	-10.24
EBS-6A	-9.64	-10.02	-10.22	-10.56
EBS-6B	-12.62	-10.7	-11.69	-11.04
EBS-7A	-10.04	-10.75	-10.27	-10.88
EBS-7B	-12.17	-11.98	-11.68	-11.18
EBS-8A	-11.28	-9.25	-9.5	-10.04
EBS-8B	-11.66	-10.58	-11.45	-10.74
AmDG	-10.5	-7.64	-10.52	-9.6
DXP	-11.21	-10.51	-13.21	-10.51
F98	-7.7	-7.31	-7.55	-7.5

Sitio 1-1: Cavidad del sitio catalítico con NADPH en conformación cerrada

Sitio 1-2: Cavidad del sitio catalítico sin NADPH en conformación cerrada

Sitio 2-1: Cavidad del sitio catalítico con NADPH en conformación relajada

Sitio 2-2: Cavidad del sitio catalítico sin NADPH en conformación relajada

Se marcan en negrita aquellas interacciones con una calificación de acoplamiento inferior a -11.0 kcal/mol.

Las presencia o ausencia de NADPH nos revelan la dependencia del ligando al cofactor ya que se modifica la conformación y estabilidad del sitio catalítico, por lo tanto, si el ligando presenta mejor calificación de acoplamiento en el sitio con NADPH indica que depende del cofactor ya que se acopla mejor con la presencia de NADPH, por otra parte, si existe una mejor calificación de acoplamiento del ligando a la proteína cuando no hay NADPH presente, el ligando será inhibidor competitivo del NADPH ya que ocuparía su sitio activo. Además, podemos evaluar la estabilidad de la unión a los ligandos, ya que si su calificación de acoplamiento es igual tanto en la conformación relajada como en la conformación cerrada se podría decir que la interacción es estable independientemente de la conformación, en cambio, si la calificación de acoplamiento varía podría ser inestable la interacción proteína ligando.

En la Tabla 13 podemos ver que DXP sustrato natural de la enzima DXR, es el ligando que mostró la mejor calificación de acoplamiento de todos los ligandos evaluados con -13.21 kcal/mol en el sitio con NADPH en conformación relajada indicando que es dependiente del cofactor además que requiere de la disposición del sitio catalítico de forma relajada. Como observamos en la Figura 35, DXP se acopla con el Mn^{2+} (gris) y a su vez tiene interacciones por puentes de hidrógeno SER152, SER177, ASN218 y LYS 219 y puentes salinos con LYS219. Por otra parte, se compara al ligando F98 que interactúa con una calificación de acoplamiento de -7.7 kcal/mol siendo menos afín que DXP y los derivados propuestos en esta tesis. En la figura 36 se observa a F98 en la conformación cerrada con NADPH y sus interacciones por puentes de hidrógeno LYS128,

SER152, GLU153, LYS219, GLU222, así como puentes salinos con ASP151, GLU153, GLU222.

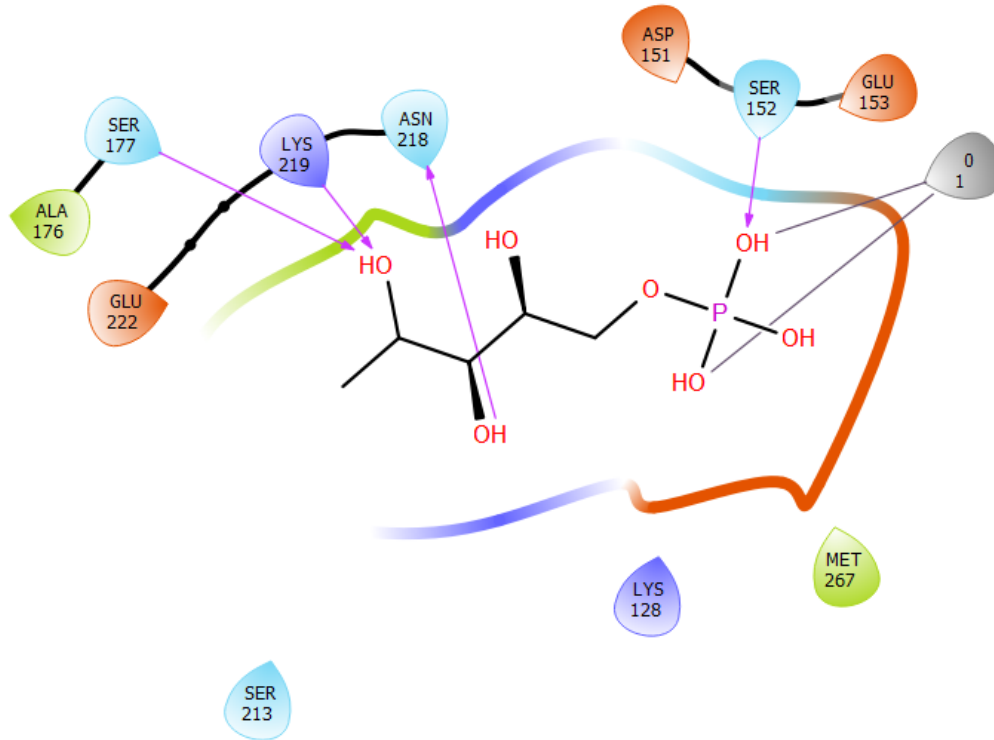


Figura 35. Unión de DXP al sitio en conformación cerrada con NADPH

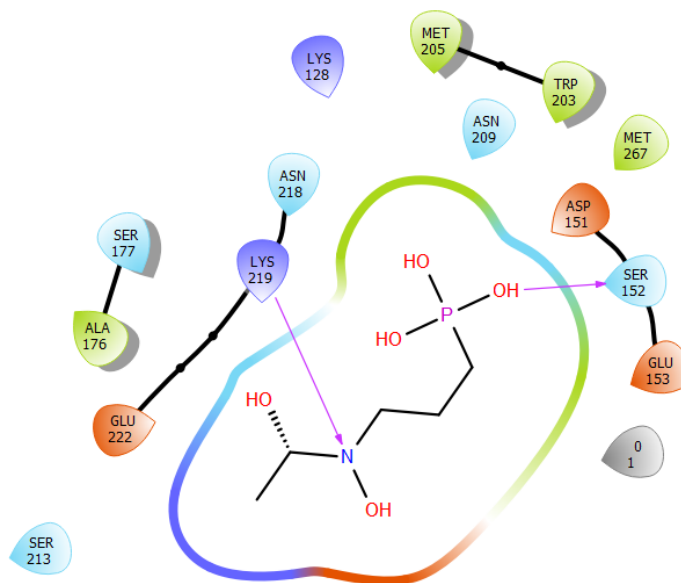


Figura 36. Unión de F98 al sitio en conformación cerrada con NADPH

Podemos observar que tanto el *Am*DG como los derivados evaluados se unen con mayor afinidad a los sitios catalíticos cuando estos tienen el cofactor (sitio 1-1 y sitio 2-1), independientemente si la simulación se realizó con el sitio catalítico en conformación cerrada o relajada, de esta manera se asocia la relevancia de NADPH en el sitio activo ya que mejora la estabilidad de la interacción. La calificación de acoplamiento del *Am*DG es de -10.5 kcal/mol, por lo tanto, consideramos aquellos derivados con energías de afinidad inferiores a -11 kcal/mol como los más prometedores. El *Am*DG interactúa de manera similar en ambas conformaciones, tanto en la conformación cerrada y relajada con una calificación de acoplamiento de -10.5 kcal/mol. En la Figura 37 observamos la unión del *Am*DG en conformación cerrada observando interacciones con el Manganeso (gris) e interacciones de $\pi \rightarrow \pi$ con TRP203 y $\pi \rightarrow \text{catión}$ con LYS219 (Figura 37).

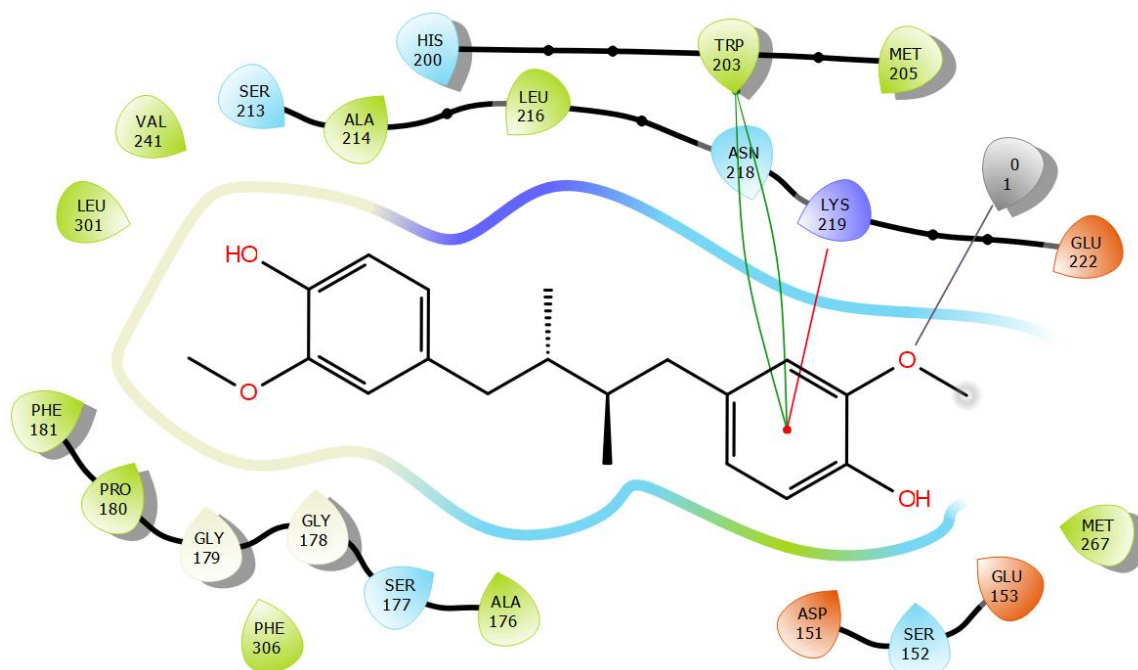


Figura 37. Unión del AmDG al sitio en conformación cerrada con NADPH

De la misma manera, en la conformación relajada el AmDG interactúa formando interacciones de $\pi \rightarrow \pi$ con PHE306 y $\pi \rightarrow$ catión con LYS219 (Figura 38).

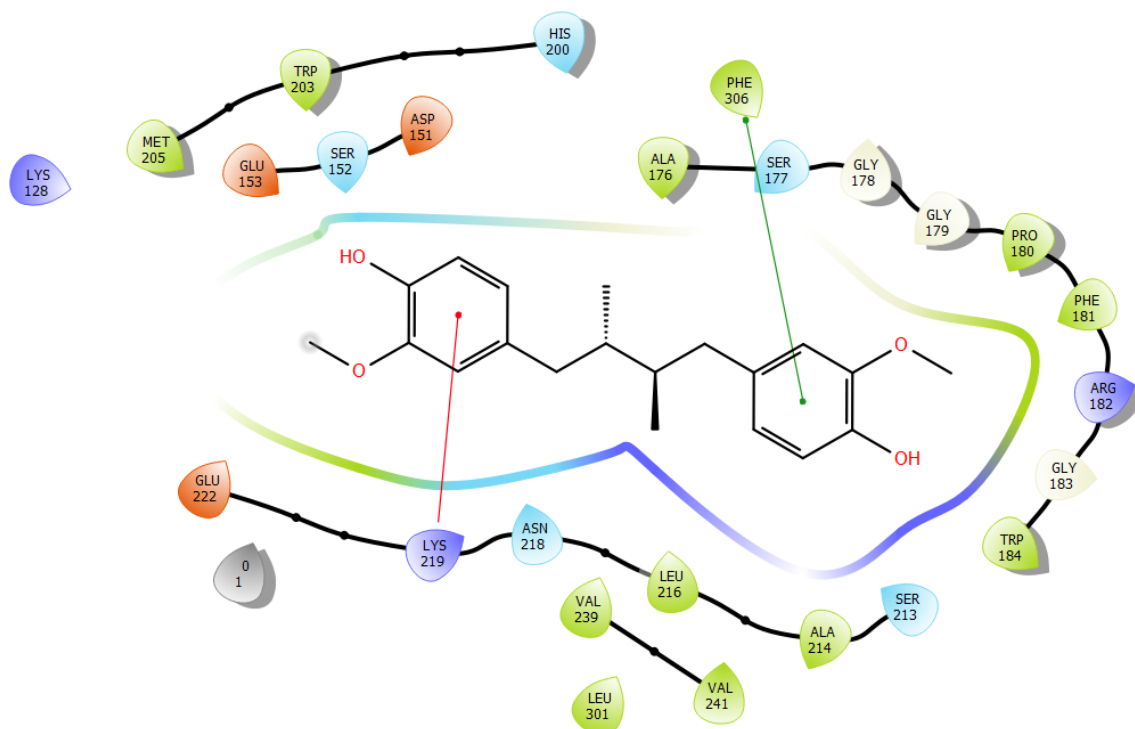


Figura 38. Unión del AmDG al sitio en conformación relajada con NADPH.

En la cavidad del sitio catalítico de conformación cerrada y con NADPH (1-1) se presenta una mejor calificación de acoplamiento para los derivados disustituidos EBS-6B, EBS-7B y EBS-8B. Por otra parte, cuando se hace la prueba con la conformación relajada con NADPH (2-1) se puede unir a los ligandos monosustituidos EBS-1A, EBS-3A, EBS-4A, y a los derivados disustituidos EBS-6B, EBS-7B y EBS-8B. Como se mencionó previamente, la estabilidad de la interacción proteína-ligando será más prometedora cuando sea similar en la mayoría de las

simulaciones, por lo tanto, para esta enzima se seleccionaron a aquellos ligandos que presenten las energías de afinidad inferiores a -11 kcal/mol en los dos sitios catalíticos con NADPH. Siguiendo esta consideración se seleccionaron los derivados EBS-6B, EBS-7B y EBS-8B, siendo el derivado EBS-6B el más afín con una calificación de acoplamiento de -12.62 kcal/mol, por otra parte, el derivado EBS-7B presenta una afinidad entre -11.18 y -12.17 kcal/mol para las cuatro simulaciones, siendo el más estable de todos los derivados evaluados.

El derivado EBS-6B interactúa (Figura 39) mediante interacciones hidrofóbicas con LEU139, ILE147, PRO149, ALA158, GLN159, ARG162, LEU229, PHE230, TRP277, PRO278, puentes de hidrógeno con GLY145 e interacciones $\pi \rightarrow \pi$ con TRP277.

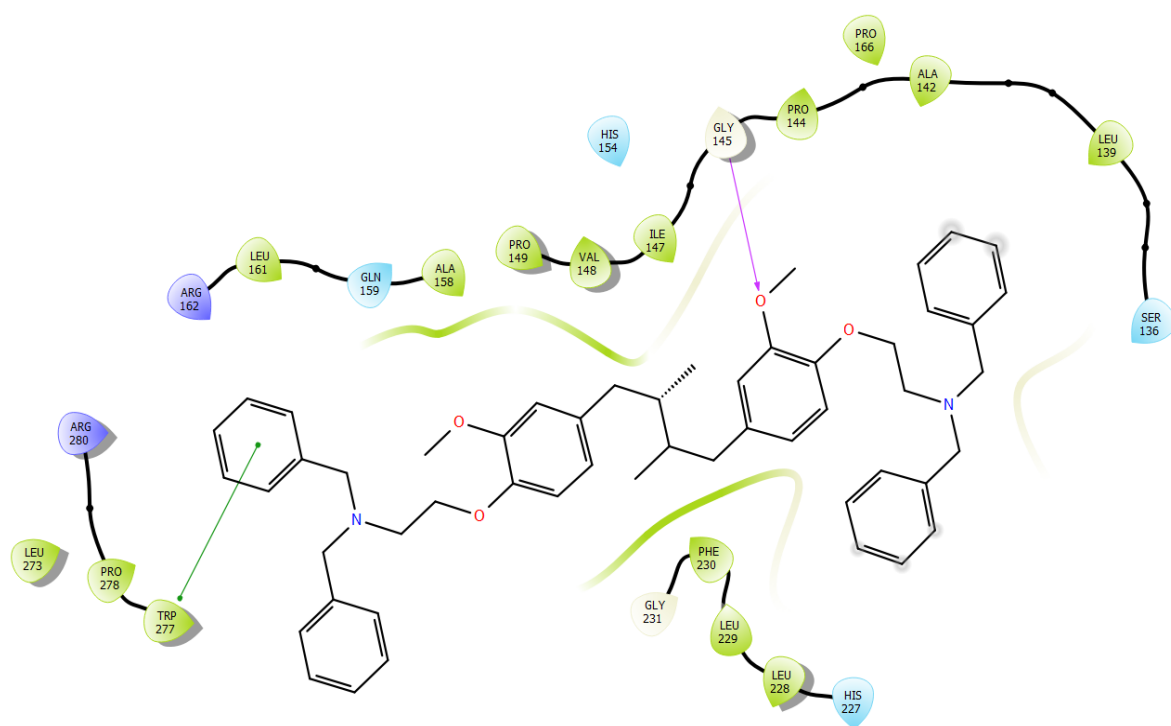


Figura 39. Unión del derivado EBS-6B al sitio en conformación cerrada de la enzima DXR con NADPH.

Por otra parte, el derivado EBS-6B al acoplarse con la conformación relajada (Figura 40) mantiene las interacciones hidrofóbicas con LEU139, ALA142, ILE147, VAL148, ALA158, LEU161, ARG162, PRO166, LEU229, PHE230, PRO278, puentes de hidrógeno con TRP277 e interacciones $\pi \rightarrow \pi$ con TRP277. Comparando las interacciones del derivado EBS-6B con ambas conformaciones, podemos darnos cuenta de que interactúan de manera muy similar variando únicamente en las interacciones hidrofóbicas, en la conformación cerrada podemos contar más interacciones, posiblemente debido a la estabilidad energética del sitio.

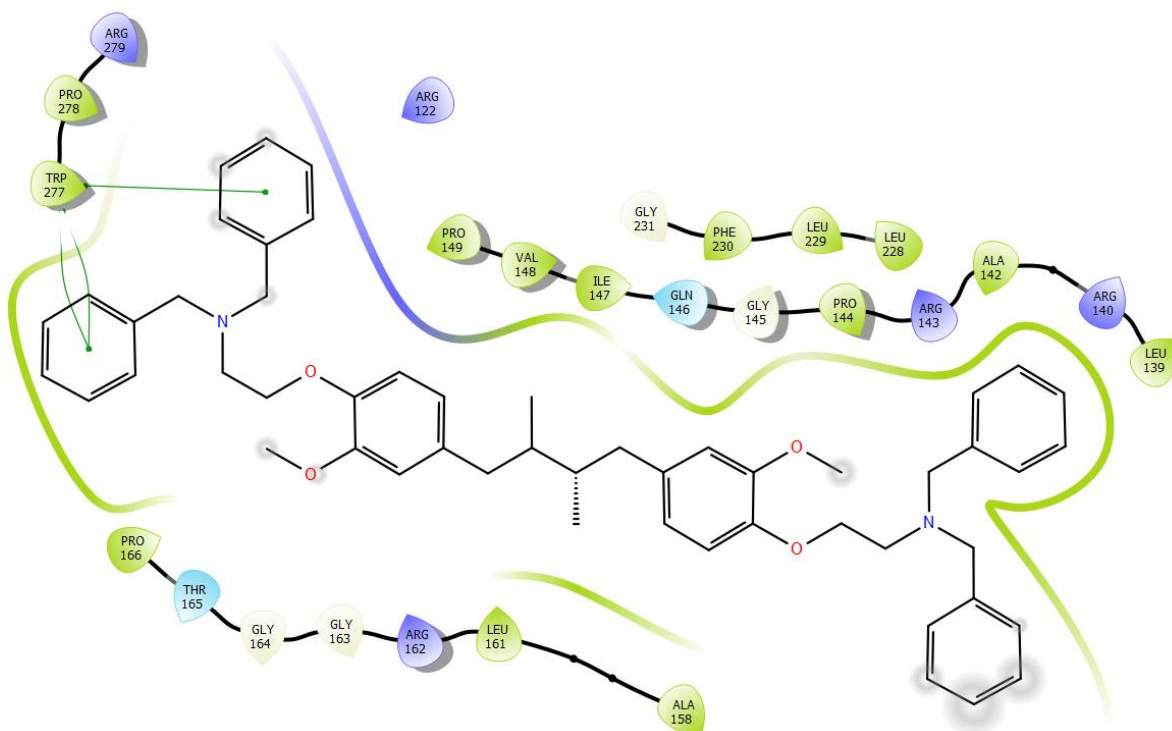


Figura 40. Unión del derivado EBS-6B al sitio en conformación relaja de la enzima DXR con NADPH.

El derivado EBS-7B interactúa con la conformación cerrada formando interacciones hidrofóbicas con LEU139, ILE147, LEU161, ARG162, PRO166, LEU228, PHE230

(Figura 41), la interacción con el sitio relajado además de las interacciones antes mencionadas también presenta interacciones por puentes de hidrógeno con GLY145, ARG162, TRP277 e interacciones $\pi \rightarrow \pi$ con TRP277 (Figura 40).

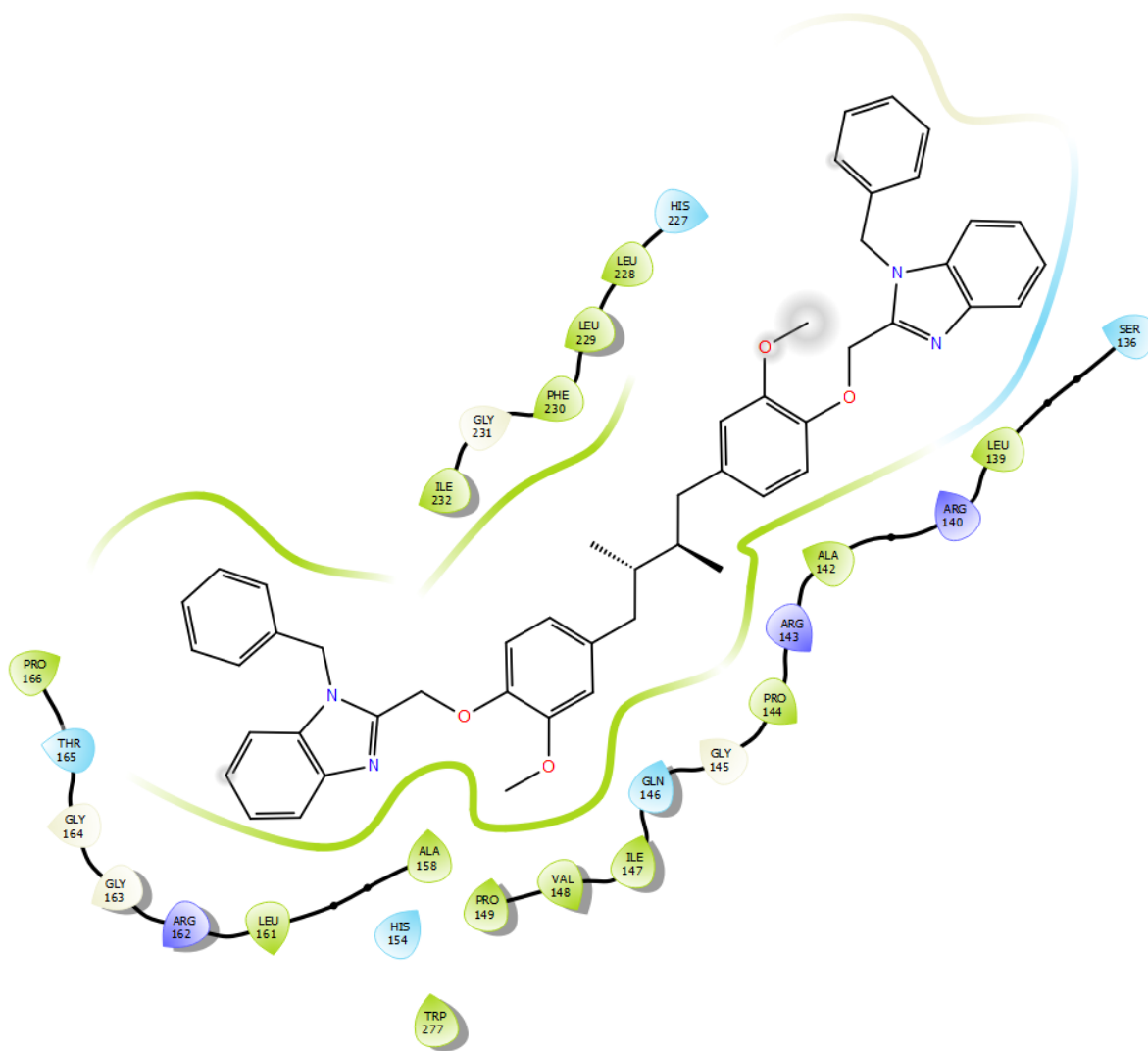


Figura 41. Unión del derivado EBS-7B con la conformación cerrada de la enzima DXR con NADPH.

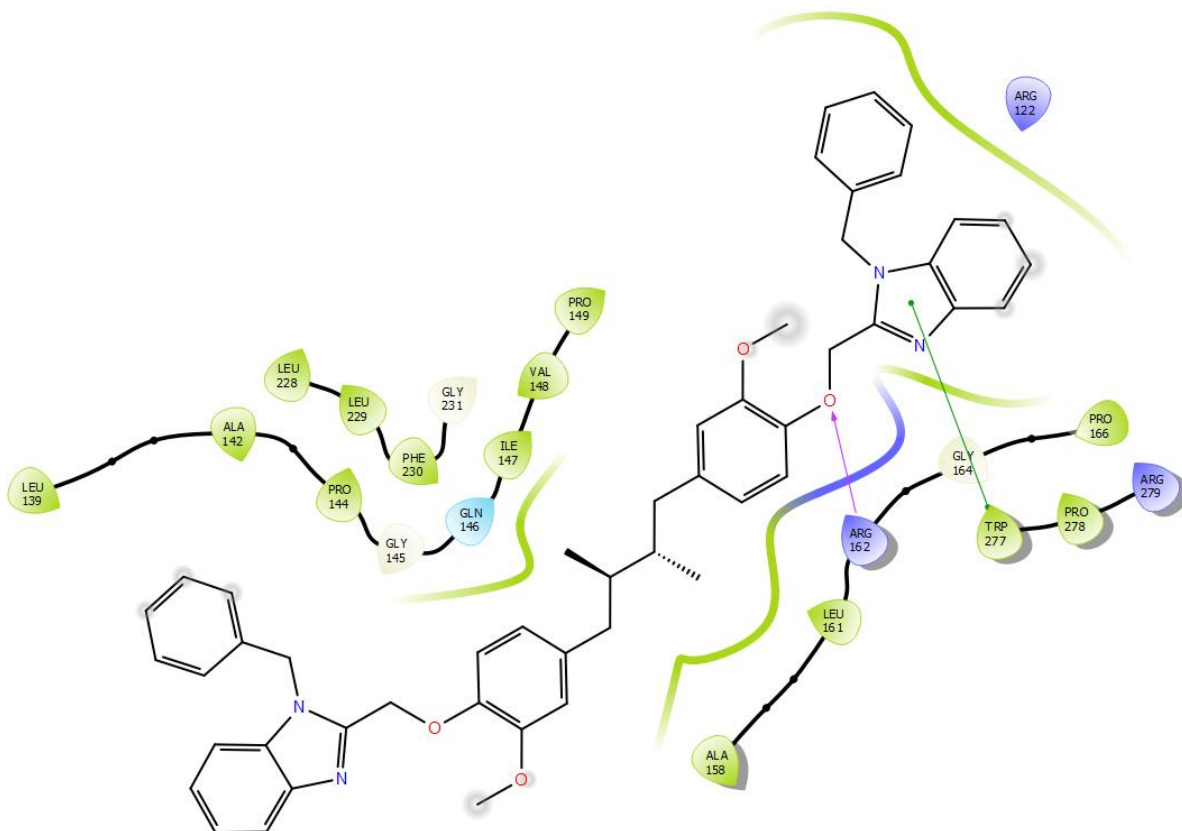


Figura 42. Unión del derivado EBS-7B con la conformación relajada de la enzima DXR con NADPH.

El derivado EBS-8B en la conformación cerrada mantiene interacciones hidrofóbicas con LEU139, ILE147, VAL148, PRO149, ALA158, LEU161, ARG162, PHE230, TRP277 y un puente de hidrógeno con GLY145 (Figura 43), la interacción con el sitio relajado solo presenta las interacciones hidrofóbicas (Figura 44).

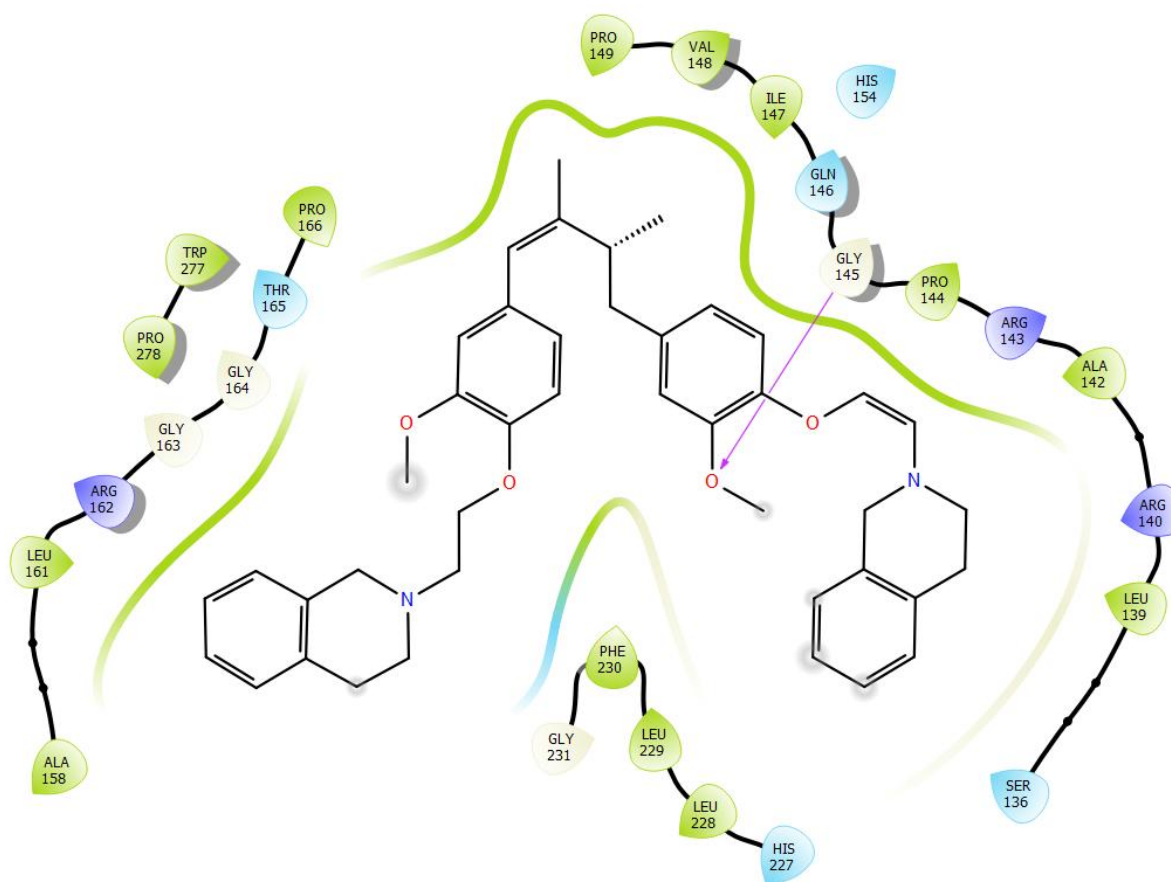


Figura 43. Unión del derivado EBS-8B con la conformación cerrada de la enzima DXR con NADPH.

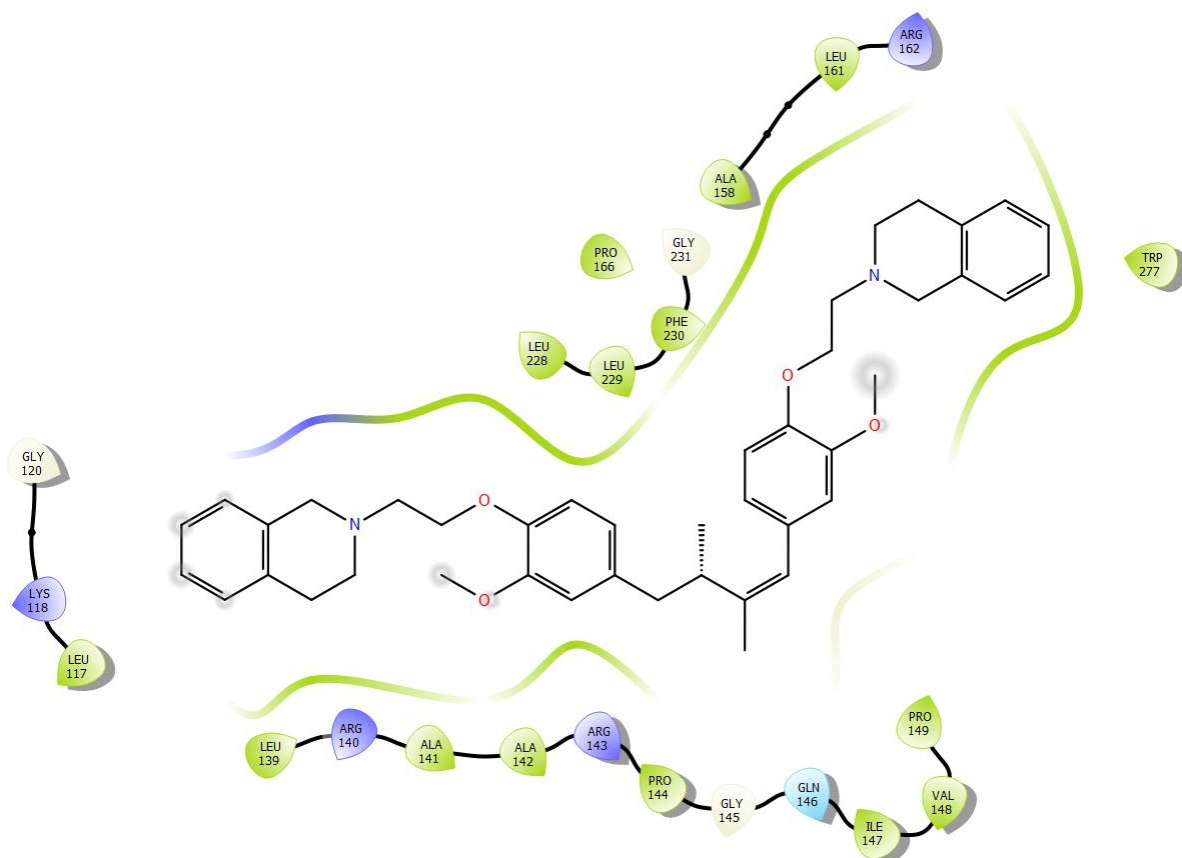


Figura 44. Unión del derivado EBS-8B con la conformación relajada de la enzima DXR con NADPH.

En la Tabla 14 se describen todas las interacciones de los acoplamiento moleculares con mejor Calificación de Acoplamiento.

Tabla 14. Interacción proteína-ligando de los mejores acoplamiento moleculares con la enzima DXR

Derivado	Sitio	Calificación de acoplamiento (kcal/mol)	Interacciones
EBS-6B	1-1	-12.62	Interacciones hidrofóbicas LEU139, ILE147, PRO149, ALA158, GLN159, ARG162, LEU229, PHE230, TRP277, PRO278 Puentes de hidrógeno GLY145 Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ TRP277

Tabla 14. Interacción proteína-ligando de los mejores acoplamiento moleculares con la enzima DXR (cont.)

Derivado	Sitio	Calificación acoplamiento (kcal/mol)	de Interacciones
EBS-6B	2-1	-11.69	Interacciones hidrofóbicas LEU139, ALA142, ILE147, VAL148, ALA158, LEU161, ARG162, PRO166, LEU229, PHE230, PRO278 Puentes de hidrógeno TRP277 Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ TRP277
EBS-7B	1-1	-12.17	Interacciones Hidrofóbicas LEU139, ILE147, LEU161, ARG162, PRO166, LEU228, PHE230
EBS-7B	2-1	-11.68	Interacciones hidrofóbicas LEU139, VAL148, ALA158, LEU161, ARG162, PRO166, PHE230, TRP277, Puentes de hidrogeno GLY145, ARG162, TRP277 Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ TRP277
EBS-8B	1-1	-11.66	Interacciones hidrofóbicas LEU139, ILE147, VAL148, PRO149, ALA158, LEU161, ARG162, PHE230, TRP277 Puentes de hidrógeno GLY145
EBS-8B	2-1	-11.45	Interacciones hidrofóbicas LEU139, ALA142, ILE147, VAL148, ALA158, LEU229, PHE230, TRP277
AmdG	1-1	-10.5	Interacciones hidrofóbicas ALA176, LEU216, VAL241 Puentes de hidrógeno ASP151, SER152 Interacciones $\pi \rightarrow \pi$ TRP203 Interacciones $\pi \rightarrow$ catión LYS219
AmdG	2-1	-10.5	Interacciones hidrofóbicas ALA176, LEU216, ANS218, LYS219 Puentes de hidrógeno ASP151, SER152, PHE181, GLY183, ASN218, LYS219 Interacciones $\pi \rightarrow$ catión LYS219

Tabla 14. Interacción proteína-ligando de los mejores acoplamientos moleculares con la enzima DXR (cont)

Derivado	Sitio	Calificación de acoplamiento (kcal/mol)	Interacciones
DXP	1-1	-11.21	Puentes de hidrógeno SER152, SER177, ASN218, LYS219 Puentes salinos LYS219
F98	1-1	-7.7	Puentes de hidrógeno LYS128, SER152, GLU153, LYS219, GLU22, Puentes salinos ASP151, GLU153, GLU222.

Los derivados seleccionados por la mejor interacción con la enzima IpdAB CoA fueron los derivados EBS-1A, EBS-1B, EBS-5B, EBS-7A, EBS-7B y EBS-E8B. De estos derivados el derivado EBS-1A podría unirse al sitio alostérico 1 y al sitio catalítico AB interactuando con los aminoácidos esenciales. El derivado EBS-1B podría unirse al sitio alostérico 2 y a ambos sitios catalíticos de las dos subunidades interactuando con los aminoácidos esenciales. El derivado EBS-E5B se une al sitio alostérico e interacciona en el sitio catalítico CD con los aminoácidos esenciales. El derivado EBS-7A se une a los dos sitios catalíticos interactuando con una buena afinidad, sin embargo, podría no inhibir de manera competitiva a los sustratos ya que no interactúa con todos los aminoácidos esenciales del sitio activo. El derivado EBS-7B mostró una buena interacción en las 5 evaluaciones destacando con la mejor calificación de acoplamiento de todos los acoplamientos en el sitio identificado como el sitio alostérico 2 de la misma manera interactúa en los dos sitios catalíticos de la enzima interactuando con los aminoácidos esenciales. Por último, el derivado EBS-8B se une a los aminoácidos del sitio alostérico 2, y al sitio catalítico CD,

uniéndose a los aminoácidos comunes. Como se mencionó anteriormente, la búsqueda de nuevos fármacos normalmente se basa en la búsqueda de una inhibición competitiva, para este caso se esperaría que una inhibición competitiva se diera con una buena interacción en los sitios catalíticos formando interacciones especialmente con los aminoácidos ARG89, ASN128, GLU102 debido a que se ha propuesto que estos aminoácidos son los responsables de llevar a cabo la conversión de COCHEA-CoA a MEDODA-CoA. Además de presentar una buena calificación de acoplamiento en los sitios catalíticos, estos derivados se han seleccionado porque también presentan buenas interacciones en otros sitios lo que nos podría sugerir algún tipo de inhibición alostérica y en su caso mixta ya que muestra buena calificación de acoplamiento para varios sitios evaluados. Con este enfoque damos oportunidad de la búsqueda de nuevos compuestos que nos permiten tener las dos opciones como inhibición del blanco seleccionado.

Por otra parte, los derivados con la mejor interacción con la enzima DXR fueron los derivados EBS-6B, EBS-7B y EBS-8B ya que presentan una buena calificación de acoplamiento con el sitio catalítico tanto en la conformación cerrada como relajada cuando estas conformaciones cuentan con NADPH, lo que indica que estaría actuando de competitiva para DXP y de forma no competitiva con NADPH (Koppisch et al., 2002). El derivado EBS-6B fue el que mostro mejor afinidad de todas las evaluaciones con esta enzima en las cuatro posibilidades evaluadas. Por otra parte, los derivados EBS-7B y EBS-8B también presentaron buenas energías de afinidad no solo a las evaluaciones que presentan NADPH como cofactor, sino también en las conformaciones que no lo presentan. Los derivados disustituidos fueron los que

mejores interacciones mostraron. El derivado EBS-7B fue el que presentó mejor afinidad con el acoplamiento a la enzima IpdAB. El derivado EBS-6B fue el que presentó mayor afinidad a la enzima DXR en la conformación cerrada coordinando con el Mn^{2+} en el sitio activo. Los derivados EBS-1A, EBS-1B, EBS-5B, EBS-7A, EBS-7B y EBS-8B presentan más afinidad por la enzima IpdAB, por otra parte, los derivados EBS-6B, y EBS-7B presentan mayor afinidad por la enzima DXR y los derivados que presentan mejor actividad para ambas enzimas son los derivados EBS-6B y EBS-7B.

5.3 Perfil farmacocinético de los derivados más promisorios

El análisis del perfil farmacocinético se realizó para los derivados EBS-1A, EBS-1B, EBS-5B, EBS-6B, EBS-7A, EBS-7B y EBS-8B, sumándose los derivados EBS-3A y EBS-3B obtenidos por semisíntesis, así como medicamentos de referencia rifampicina, isoniacida y etambutol. Se realizó un análisis mediante la plataforma SwissADME, identificando parámetros fisicoquímicos de acuerdo con los criterios de las reglas de Lipinski, criterios que predicen un perfil farmacocinético favorable tales como alta absorción intestinal, baja o nula inhibición de isoenzimas del citocromo p450, permeabilidad y biodisponibilidad. Los derivados que cumplen con los requisitos de dichas características podrían sugerir una adecuada biodisponibilidad oral y menor riesgo de interacciones medicamentosas o toxicidad metabólica. Los resultados presentados en la Tabla 15 ilustran los resultados obtenidos de la evaluación de las características fisicoquímicas y la relación con las reglas de Lipinski que nos permiten predecir si el derivado promete biodisponibilidad oral al cumplir o no con las reglas.

Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas y reglas de Lipinski de los derivados más promisorios

Clave	PM (g/mol)	Lipofilicidad (Log P o/w)	Núm. de aceptor de H	Núm. de donador de H	Solubilidad (mg/mL)	Reglas de Lipinski (Violaciones)
EBS-1A	441.6	5.09	5	1	Pobrementemente soluble	0 cumple
EBS-1B	552.79	6.19	6	0	Pobrementemente soluble	1 no cumple
EBS-3A	455.63	5.38	5	1	Pobrementemente soluble	0 cumple
EBS-3B	580.84	6.77	6	0	Pobrementemente soluble	2 no cumple
EBS-5B	620.82	6.76	6	0	Pobrementemente soluble	2 no cumple
EBS-6B	777.04	9.62	6	0	Insoluble	2 no cumple
EBS-7A	550.69	6.36	5	1	Pobrementemente soluble	2 no cumple
EBS-7B	770.96	8.85	6	0	Insoluble	2 no cumple
EBS-8B	648.87	7.2	6	0	Pobrementemente soluble	2 no cumple
Rifampicina	822.94	3.25	14	6	Pobrementemente soluble	3 no cumple
Isoniacida	137.14	-0.35	3	2	Muy soluble	0 cumple
Etambutol	204.31	0.6	4	4	Muy soluble	0 cumple

Los resultados de esta tabla se complementan con la Figura 45 que ilustra el radar de biodisponibilidad, esta herramienta se representa como un hexágono y en cada vértice se ubica cada uno de los parámetros evaluados tales como la lipofilicidad (LIP) relacionada con el Log P, tamaño (SIZE) relacionada con el peso molecular, polaridad (POLAR) relacionada con los aceptores y donadores de H, insolubilidad (INSOLU, Log S) relacionada con Log de Solubilidad (valores bajos indican menor solubilidad), insaturaciones (INSATU) relacionadas con los carbonos con hibridación sp^3 y flexibilidad (FLEX) relacionada con el número de enlaces rotables, un derivado con buena biodisponibilidad debería estar dentro de la zona sombreada.



Figura 45. Radar de biodisponibilidad de los derivados más promisorios del *AmDG* y los medicamentos de referencia, rifampicina, isoniacida y etambutol.

Los derivados EBS-1A y EBS-3A destacan como los únicos derivados que cumplen con las reglas de Lipinski así como un perfil balanceado cercano a la zona central en el radar de biodisponibilidad en comparación con los demás derivados indicando un perfil favorable en términos de absorción y permeabilidad intestinal ya que tienen un peso molecular menor a 500 g/mol, un valor de Log P cercano a 5 indicando lipofiliidad aceptable manteniéndose en el umbral de la zona sombreada indicando que tiene pobre solubilidad. Los derivados EBS-1B, EBS-3B, EBS-5B, EBS-6B, EBS-7A, EBS-7B y EBS-8B incumplen las reglas de Lipinski principalmente por el peso molecular superior a 500 g/mol y una lipofiliidad elevada con un log P superior

a 5, indicando insolubilidad o pobre solubilidad en agua, estas características limitantes podrían afectar su baja biodisponibilidad oral y, por lo tanto, tener baja absorción y distribución. Considerando los datos expuestos para los medicamentos de referencia, podemos observar que el etambutol y la isoniacida presentan buenas características hidrofílicas y de buena solubilidad, encontrándose dentro de los parámetros ideales, por otra parte, la rifampicina incumple varias reglas de Lipinski y por ende, algunas características se salen del radar de biodisponibilidad, sin embargo, esto no es un impedimento para que sea un fármaco actual, ya que aunque las reglas de Lipinski permiten guiar el desarrollo de un fármaco para que su vía de administración sea oral y permita la mayor biodisponibilidad, no excluye el potencial bioactivo de la molécula, por lo tanto, no se limita al diseño de otra alternativa como forma farmacéutica para la administración del medicamento.

Simultáneamente se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos presentados en la Figura 46. Diagrama BOILED Egg o del “Huevo cocido” que predice de manera visual la absorción gastrointestinal (GI) y la posibilidad de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) de los compuestos evaluados a partir de los parámetros de lipofiliidad (WLOGP) y el área polar superficial (TPSA), esta información se complementa con el perfil farmacocinético presentado en la Tabla 16 que describe además de estos datos la inhibición de isoenzimas del citocromo P450 (CYP), la permeabilidad dérmica estimada y la probabilidad de biodisponibilidad en porcentaje.

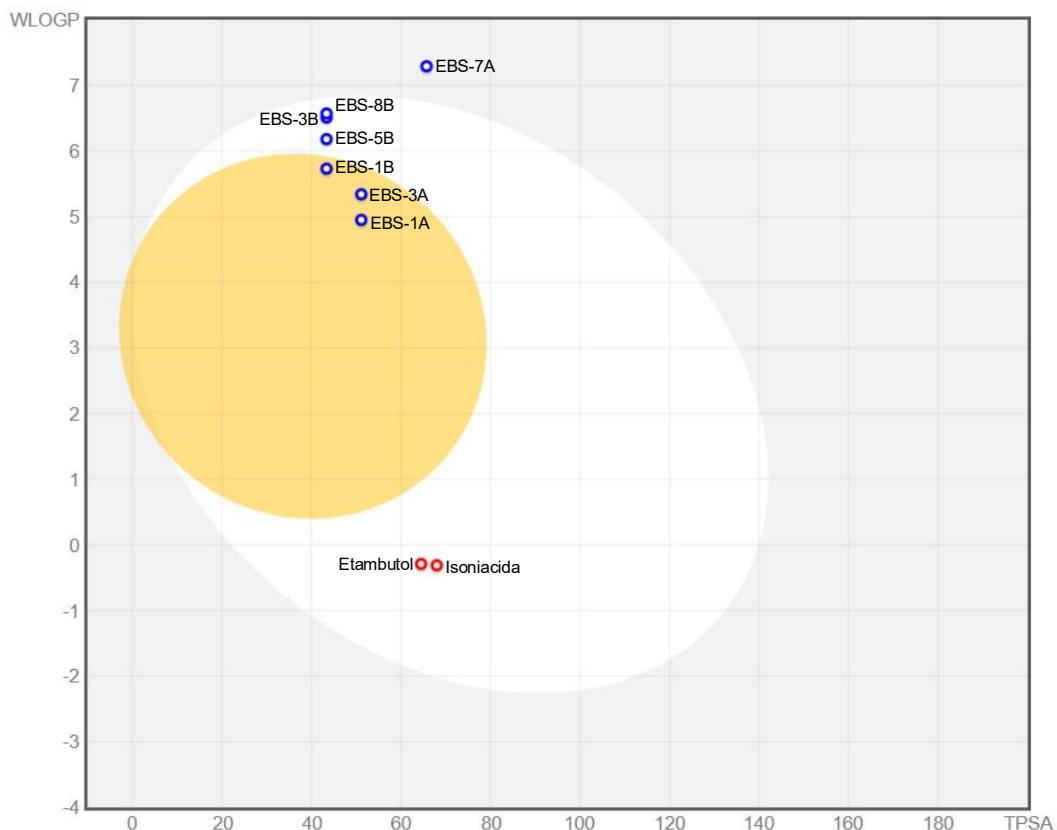


Figura 46. Diagrama BOILED-Egg, permite identificar la permeabilidad de acuerdo con la lipofilia (WlogP) y el área de superficie polar topológica (TPSA). Los derivados EBS-6B, EBS-7B y EBS-8B quedaron fuera del rango. La zona amarilla indica absorción gastrointestinal, el área blanca indica permeabilidad de la BHE. El color azul indica que es sustrato de P-gg.

Los derivados EBS-1A, EBS-1B y EBS-3A destacaron con alta absorción gastrointestinal al ubicarse en la clara o zona blanca del huevo y permeabilidad de la BHE al ubicarse en dentro de la yema o zona amarilla, sin embargo, se identificaron como sustrato de la P-gg, esta proteína de eflujo podría limitar su acumulación intracelular y por ende su absorción, pero no necesariamente limita su actividad, además, presentaron una puntuación de biodisponibilidad de 0.55 indicando una alta probabilidad de biodisponibilidad oral.

Tabla 16. Perfil farmacocinético de los derivados más promisorios

Clave	Absorción GI	Permeabilidad BHE	Sustrato P-gp	Inhibe a CYP1A2	Inhibe a CYP2C19	Inhibe a CYP2C9	Inhibe a CYP2D6	Inhibe a CYP3A4	Log Kp	Biodisponibilidad
EBS-1A	Alta	Si	Si	No	No	No	Si	No	-4.56	0.55
EBS-1B	Alta	Si	Si	No	No	No	Si	No	-4.33	0.55
EBS-3A	Alta	Si	Si	No	No	No	Si	No	-4.45	0.55
EBS-3B	Alta	No	Si	No	No	No	No	No	-4.10	0.17
EBS-5B	Alta	No	Si	No	Si	No	No	No	-4.53	0.17
EBS-6B	Baja	No	Si	No	No	No	No	No	-2.78	0.17
EBS-7A	Baja	No	Si	Si	No	No	Si	Si	-4.03	0.17
EBS-7B	Baja	No	No	No	No	No	No	Si	-3.27	0.17
EBS-8B	Alta	No	Si	No	Si	No	No	No	-4.05	0.17
Rifampicina	Baja	No	Si	No	No	No	No	No	-7.44	0.17
Isoniacida	Alta	No	No	No	No	No	No	No	-7.63	0.55
Etambutol	Alta	No	No	No	No	No	No	No	-7.60	0.55

Log Kp=Permeabilidad en piel cm/s
 GI= Gastrointestinal
 BHE=Barrera hematoencefálica
 P-gp= Proteína

Los derivados EBS-1A, EBS-1B y EBS-3A presentaron capacidad inhibitoria sobre la isoenzima CYP2D6, este dato es relevante ya que las enzimas CYP2D6 contribuyen al metabolismo de aproximadamente el 20 - 25 % de los medicamentos de prescripción clínica incluyendo betabloqueantes, analgésicos, anticonvulsivos, antidepressivos y antipsicóticos, antihipertensivos e inhibidores de la recaptación de noradrenalina, si la actividad de la CYP2D6 se reduce, podría generar toxicidad al paciente, al acumular compuestos tóxicos de los fármacos no metabolizados (Pratt et al., 2021) Por otra parte, los derivados EBS-5B, EBS-6B, EBS-7A y EBS-7B presentan una absorción gastrointestinal baja sin permeabilidad a BHE, así como una probabilidad de biodisponibilidad de 0.17, la cual es muy baja, coincidiendo con los resultados expuestos previamente, ya que están limitados principalmente por la lipofilia y poca solubilidad en agua. Algunos de estos derivados también inhiben enzimas CYP, por ejemplo, el derivado EBS-7A que destaca por inhibir a CYP1A2 (responsable del metabolismo del 10 al 15% de los fármacos que se metabolizan (Vuppalanchi, 2011)), CYP2D6 y CYP3A4 (enzima más abundante involucrada en el metabolismo de aproximadamente el 50% de los medicamentos clínicamente relevantes (Guttman & Kerem, 2022)), aumentando el potencial de interacciones medicamentosas relevantes. El derivado EBS-7B es el único que se presenta como no sustrato de proteína P-gp, sin embargo, su biodisponibilidad y absorción siguen siendo deficientes. El derivados EBS-6B presentan un log Kp de -2.78, reflejando baja permeabilidad dérmica y un perfil global poco favorable para administración oral, al ser el derivado más limitado. Comparando con los fármacos de referencia, se puede ver que la isoniacida y el etambutol presentan alta absorción GI, no son sustratos de P-gp, tampoco inhiben a las isoformas de CYP y exponen probabilidad

de biodisponibilidad de 0.55, siendo un parámetro alto, junto con valores de Log Kp significativamente negativos (-7.6 cm/s) indicando mayor permeabilidad dérmica, la rifampicina, en cambio, presenta baja GI y probabilidad de biodisponibilidad de 0.17 baja, explicando la necesidad de realizar formulaciones específicas para optimizar su biodisponibilidad oral.

Considerando los parámetros de las reglas de Lipinsky y los parámetros farmacocinéticos evaluados *in silico* los derivados que presenta mejores parámetros ADME son los derivados EBS-1A, EBS-1B y EBS-3A destacando por su alta absorción gastrointestinal, permeabilidad a la barrera hematoencefálica, probabilidad de biodisponibilidad aceptable (0.55) y un perfil metabólico con inhibición limitada a CYP2D6. Considerando los análisis de los acoplamientos moleculares y los parámetros farmacocinéticos se consideran a EBS-1A como el derivado más prometedor.

5.4 Perfil toxicológico de los derivados más promisorios

El análisis del perfil toxicológico se realizó para los derivados EBS-1A, EBS-1B, EBS-5B, EBS-6B, EBS-7A, EBS-7B, EBS-8B, EBS-3A y EBS-3B, así como medicamentos de referencia rifampicina, isoniacida y etambutol. Se realizó un análisis mediante la plataforma Protox II. Los resultados presentados en la Tabla 17 ilustran los resultados obtenidos de la evaluación de las características que nos permiten predecir si el derivado promete nula, baja o alta toxicidad de acuerdo con la clasificación GHS la LD₅₀ oral (mg/kg) I: ≤ 5; II: 5-50; III: >50-300; IV: >300-2000; V: >2000 -5000; VI: >5000, así como la probabilidad generar algún tipo de daño toxicológico en el organismo.

Tabla 17. Perfil toxicológico de los derivados más promisorios

Clave	LD₅₀ (mg/kg)	Clase GHS	Toxicidad	Probabilidad
EBS-1A	980	IV	Respiratoria	0.89
			Inmunotoxicidad	0.99
EBS-1B	980	IV	Respiratoria	0.84
			Inmunotoxicidad	0.98
EBS-3A	384	IV	Respiratoria	0.92
			Inmunotoxicidad	0.99
			Atraviesa BHE	0.81
EBS-3B	384	IV	Respiratoria	0.88
			Inmunotoxicidad	0.96
			Atraviesa BHE	0.79
			Acetilcolinesterasa (AChE)	0.72
EBS-5B	345	IV	Respiratoria	0.93
			Inmunotoxicidad	0.93
			Atraviesa BHE	0.78
			Acetilcolinesterasa (AChE)	0.74
EBS-6B	345	IV	Neurotoxicidad	0.74
			Respiratoria	0.90
			Inmunotoxicidad	0.97
			Acetilcolinesterasa (AChE)	0.73
EBS-7A	800	IV	Respiratoria	0.87
			Inmunotoxicidad	0.97
			Atraviesa BHE	0.74
EBS-7B	800	IV	Respiratoria	0.86
			Inmunotoxicidad	0.90
			Atraviesa BHE	0.76
EBS-8B	390	IV	Respiratoria	0.95
			Inmunotoxicidad	0.94
			Atraviesa BHE	0.85
			Acetilcolinesterasa (AChE)	0.81
Rifampicina	500	IV	Nefrotoxicidad	0.71
			Respiratoria	0.87
			Inmunotoxicidad	0.99
			Potencial de Membrana Mitocondrial	1
			Hepatotoxicidad	0.94
Isoniacida	133	III	Respiratoria	0.87
			Carcinogenicidad	0.96
			Atraviesa BHE	0.99
			Receptor de hidrocarburos aromáticos	1
			Acetilcolinesterasa (AChE)	0.94
Etambutol	998	IV	Respiratoria	0.80

GHS = Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals

De acuerdo con los datos obtenidos en la plataforma Protox II, se observa que los derivados y los medicamentos de referencia rifampicina y etambutol se clasifican en la categoría de toxicidad aguda con un nivel IV el cual indica un riesgo moderado, por otra parte, la isoniazida presenta un nivel III siendo una toxicidad alta. En cuanto a las toxicidades específicas, se observa que todos los derivados comparten toxicidad respiratoria e inmunotoxicidad. Algunos derivados como EBS-6B y EBS-8B presentan posible neurotoxicidad debido a la inhibición de la Acetilcolinesterasa y probabilidad de atravesar la BHE, indicando que estos derivados podrían generar posibles efectos secundarios neurológicos (Colovic et al., 2013); por lo tanto, estos candidatos se considerarían menos viables debido a su posible efecto toxicológico. Por otra parte, los medicamentos de referencia rifampicina e isoniazida reportan toxicidades conocidas como nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, neuropatía (Mereškevičienė & Danila, 2025). Finalmente, como se resume en las tablas 16 y 17, los derivados EBS-1A, EBS-1B, EBS-3A y EBS-7B, presentan un menor hallazgo de predicciones toxicológicas, lo que los posiciona como los candidatos más prometedores desde el punto de vista de seguridad *in silico*. Sin embargo, estos hallazgos requieren ser confirmados mediante ensayos experimentales adicionales.

5.5 Purificación de *AmDG* a partir de un extracto crudo

El primer fraccionamiento del extracto crudo de *AmDG* realizado conforme al procedimiento descrito en el numeral 4.7.1 de la primera columna, se muestra en la Figura 47, obteniéndose un 0.56 % de rendimiento.

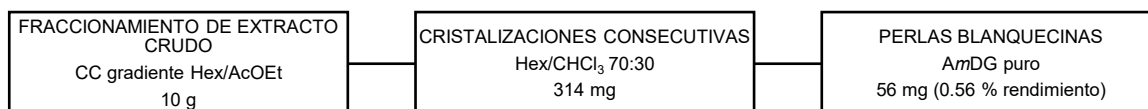


Figura 47. Purificación del *AmDG* a partir de un extracto crudo de *L. tridentata*, primera columna.

De la segunda CC que se realizó para la purificación de *AmDG* se obtuvo un 0.95 % de rendimiento. Se realizó un pretratamiento a las fracciones ricas en *AmDG* con el objetivo de retirar la mayor cantidad de pigmentos, encontrando que el tratamiento con carbón activado (relación 1:1) era el mejor procedimiento. Posteriormente, cuando las aguas madre dejaron de cristalizar por el aumento en la concentración de impurezas, se realizó una CC isocrática utilizando una FM Hex/CHCl₃/acetona que permitió purificar otra porción de *AmDG* por cristalización y, por último, las aguas madre se sometieron a una tercera columna en gradiente CH₂Cl₂/MeOH pudiendo retirar aquellas impurezas con RF similar a *AmDG* con las FM antes mencionadas. Cabe destacar que se encontró una mejor relación de solventes para la cristalización usando CH₂Cl₂ en lugar de CHCl₃ ya que el procedimiento resultó más efectivo. En la Figura 48 se describe el procedimiento general de esta segunda purificación.

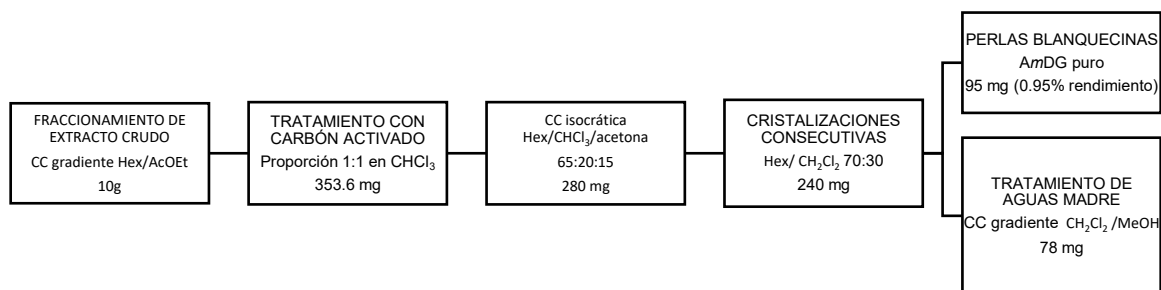


Figura 48. Purificación de *AmDG* a partir de un extracto crudo de *L. tridentata*, segunda columna.

De la tercera CC que se realizó para la purificación de *AmDG* se obtuvo un 1.02% de rendimiento. Del primer fraccionamiento se obtuvo mayor cantidad de muestra rica en *AmDG*, sin embargo, la muestra se obtuvo con mayor presencia de impurezas. Este resultado puede atribuirse a que la relación silica:muestra disminuyó y, por ende, disminuyó la relación de números de platos teóricos y en consecuencia, la eficiencia de separación durante el fraccionamiento. Por tal motivo, se realizó un pretratamiento a las fracciones ricas en *AmDG* con carbón activado con el objetivo de retirar la mayor cantidad de pigmentos antes de continuar con la cristalización. Debido a que las aguas madre dejaron de cristalizar por el aumento en la concentración de impurezas, se realizó una CC en gradiente Hex/CH₂Cl₂/MeOH, pudiendo retirar aquellas impurezas con RF similar a *AmDG* con las FM antes mencionadas. Cabe mencionar que las perlas recuperadas de esta última columna no requirieron lavados o recristalizaciones, por lo tanto, esta última metodología sugiere oportunidad para futuras purificaciones de este lignano de interés. En la Figura 49 se presenta el procedimiento general de esta tercera purificación.

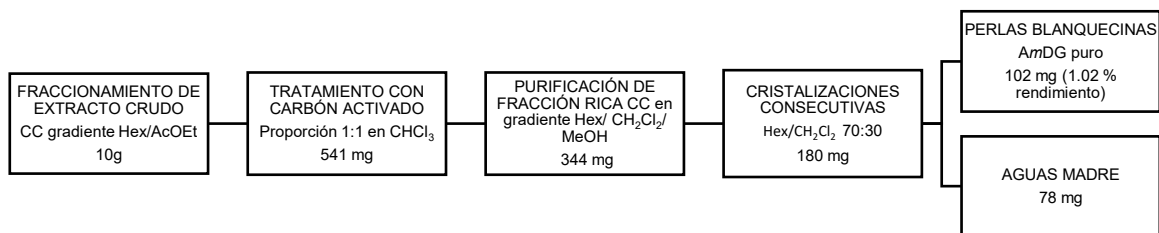


Figura 49. Purificación de AmDG a partir de un extracto crudo de *L. tridentata*, tercera columna.

Se realizó la purificación de AmDG a partir de un extracto clorofórmico de *L. tridentata* mediante tres técnicas diferentes con el objetivo de purificar de manera más eficiente y rápida el producto natural de interés. En la Tabla 18 se ilustran los porcentajes de rendimiento obtenido de cada metodología empleada.

Tabla 18. Purificación de AmDG (% de rendimiento)

Metodología	Cantidad (mg)	% de rendimiento
Primera columna	56	0.56
Segunda columna	95	0.95
Tercera columna	102	1.02

En la primera columna se obtuvo la menor cantidad de AmDG puro en forma de perlas blanquecinas, esto se atribuye a las condiciones empleadas desde el fraccionamiento hasta la cristalización, sin embargo, este procedimiento es muy prolongado debido a que cada cristalización tarda de 2-5 a días y cuando la fracción disminuye la concentración de AmDG (aguas madre), el proceso de la cristalización dejaba de avanzar, por lo tanto, se requiere emplear otro sistema de purificación.

En la segunda y tercera columna pudo haber un aumento en el porcentaje de rendimiento de las fracciones ricas en AmDG ya que se realizó el tratamiento de

aguas madre mediante otros procedimientos que permitieron eliminar impurezas que tienen un mismo *rf* en las FM empleadas previamente.

Por lo anterior, se hacen las siguientes recomendaciones para las condiciones experimentales que se deberían considerar para futuras purificaciones:

1. Mantener una relación sílica:muestra superior a 1:18 en el primer fraccionamiento del extracto y eluir de tres a cuatro volúmenes muertos por polaridad.
2. Realizar un tratamiento con carbón activado previo a la cristalización para retirar la mayor cantidad de pigmentos.
3. Realizar una CCF de prueba con las siguientes fases móviles para verificar pureza.
 - Hex/AcOEt 80:20 *rf* de *AmDG* 0.5, no permite la separación de los isómeros o impurezas con mismo *rf*.
 - Hex/CHCl₃/acetona 65:20:15 *rf* de *AmDG* 0.3, permite la separación del *AmDG* de impurezas y pigmentos.
 - CH₂Cl₂/MeOH 99:1 *rf* de *AmDG* (0.5), permite la separación del *AmDG* con otras impurezas y pigmentos que tienen *rf* similar con las anteriores FM. Además, permite separar a un compuesto que en las otras FM no se permite identificar, este compuesto tiene un *rf* de (0.37).
4. Identificar la FM que mejor separó su fracción rica en *AmDG* de los pigmentos, empleando condiciones óptimas de elución:
 - Para la FM Hex/CHCl₃/acetona (65:20:15) eluir de manera isocrática.

- Para la FM CH₂Cl₂/MeOH 99:1, se recomienda iniciar con un gradiente de Hex/CH₂Cl₂ haciendo cambios de 5 unidades por polaridad.
- Mantener una relación silica: muestra de 1:40 a 1:50 para aumentar el número de platos teóricos y, por ende, promover una mejor separación de cada componente de la fracción. Así como eluir de tres a cuatro volúmenes muertos por polaridad.

5.5.1 Propiedades físicas y espectroscópicas de *AmDG*

El metabolito secundario se obtuvo como un sólido en forma de perlas blanquecinas, soluble en CHCl₃, CH₂Cl₂, acetato de etilo, acetona y metanol. Con un punto de fusión de 80 – 81°C; C₂₀H₂₆O₄, PM: 330.42 g/mol. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6.82 (d, J = 7.9 Hz, 2H; H5, H5'), 6.65 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 2H; H6, H6'), 6.61 (d, J = 1.6 Hz, 2H; H2, H2'), 5.45 (s, 2H; -OH, -OH'), 3.85 (s, 6H; OMe, OMe'), 2.72 (dd, J = 13.5, 5.0 Hz, 2H; H7_α, H7_α'), 2.28 (dd, J = 13.5, 9.2 Hz, 2H; H7_β, H7_β'), 1.74 (m, 2H; H8, H8'), 0.84 (d, J = 6.6 Hz, 6H; H9, H9'). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 16.22 (C9, C9'), 38.89 (C7, C7'), 39.19 (C8, C8'), 55.85 (OMe, OMe'), 111.42 (C2, C2'), 113.94 (C5, C5'), 121.71 (C6, C6'), 133.80 (C1, C1'), 143.55 (C3, C3'), 146.31 (C4, C4').

5.5.1.1 Elucidación estructural de *AmDG*

Es importante verificar la identidad y pureza del analito purificados, por esta razón en la Figura 50 se observa el espectro de RMN ¹H, obtenido del sólido recuperado de la purificación. En la región de los aromáticos, la primera señal corresponde a

los hidrógenos 5 y 5', esta señal se ve como un doble con una constante de acoplamiento de 8 Hz ya que únicamente se acopla con los hidrógenos de la posición 6' respectivamente. Enseguida se ubica la señal de los hidrógenos 6 y 6' como un doble de dobles ya que se acopla con los hidrógenos de las posiciones 2, 2' y 5, 5' respectivamente, las constantes de acoplamiento serian de 1.6 Hz al acoplarse con los hidrógenos de la posición 2, 2' y de 8 Hz al acoplarse con los hidrógenos de las posiciones 5, 5'. En 6.61 se ubica los hidrógenos 2, 2' como un doblete ya que únicamente se acopla con el hidrógeno 6, 6' con una constante de acoplamiento de 1.6 Hz. En 5.45 ppm se observa un singulete que integra para dos hidrógenos, está señal corresponde a los hidrógenos de los fenoles (4-OH y 4'-OH) los cuales no presentan acoplamiento con otros hidrógenos. En 3.85 ppm encontramos un singulete que integra para seis hidrógenos, como no tiene hidrógenos vecinos y se encuentran desprotegidos asignamos está señal a los hidrógenos de los metoxilos aromáticos (3-OMe y 3'-OMe). En 2.72 ppm se observa un doble de dobles que integra para dos protones, asignado a 7 α y 7 α' , acoplados con 7 β y 8, y 7 β' y 8' ($J = 13.4, 5$ Hz), respectivamente. A 2.28 ppm se identifica otro doble de dobles que también integra para dos protones, correspondiente a 7 α y 7 α' (13.4, 9.2 Hz), que se acoplan con 7 β y 8, y 7 β' y 8', respectivamente. En 1.74 ppm se distingue un multiplete que integra para dos protones, asignado a los protones metínicos de 8 y 8', acoplados con los protones de las posiciones 7 y 9, y 7' y 9'. Finalmente, en 0.84 ppm se observa un doblete ($J = 6.8$ Hz) que integra para seis protones, correspondiente a los grupos metilo en las posiciones 9 y 9', los cuales se acoplan con los protones metínicos adyacentes.

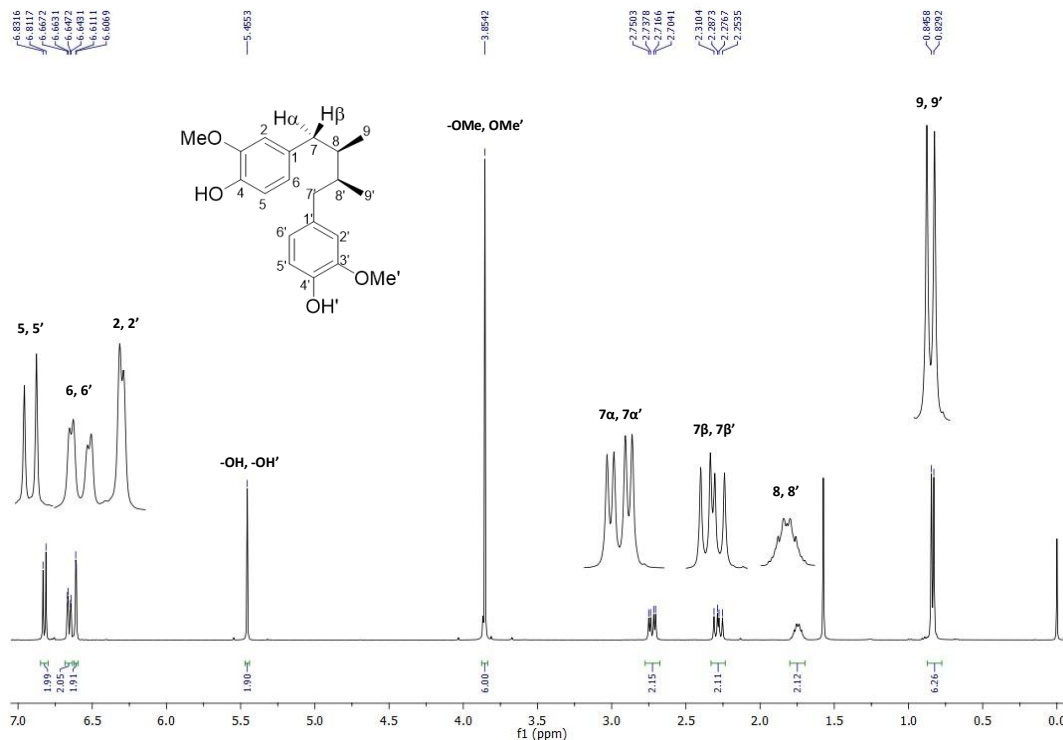


Figura 50. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) de AmDG.

En la Figura 51 se ilustra el espectro de RMN ^{13}C cada señal integra para dos carbonos debido a la simetría de la molécula, de esta manera únicamente observamos diez señales para los veinte carbonos de toda la molécula. En la región aromática a 146.31 ppm se observan las señales correspondientes a los carbonos (C4, C4'), en 143.55 ppm vemos a (C3, C3'), en 133.80 ppm vemos a (C1, C1'), en 121.71 ppm vemos a (C6, C6'), en 113.94 ppm vemos a (C5, C5'), en 111.42 ppm vemos a (C2, C2'). En la región alifática se identifican las señales de los carbonos de los grupos (-OMe y -OMe') en 55.85 ppm seguidas de las señales en 39.19 ppm que corresponden a (C8 y C8'), en 38.89 ppm vemos a (C7 y C7'), y por último en 16.22 ppm vemos a (C9 y C9').

La elucidación de la molécula coincide con lo previamente reportado por Favela-Hernández et al., 2012 ya que la distribución de las señales confirma la presencia de un sistema aromático y característico de los lignanos tipo dibencilbutano, identificando las señales de los grupos metoxilo y unidades alifáticas correspondiente con la estructura del *AmdG*.

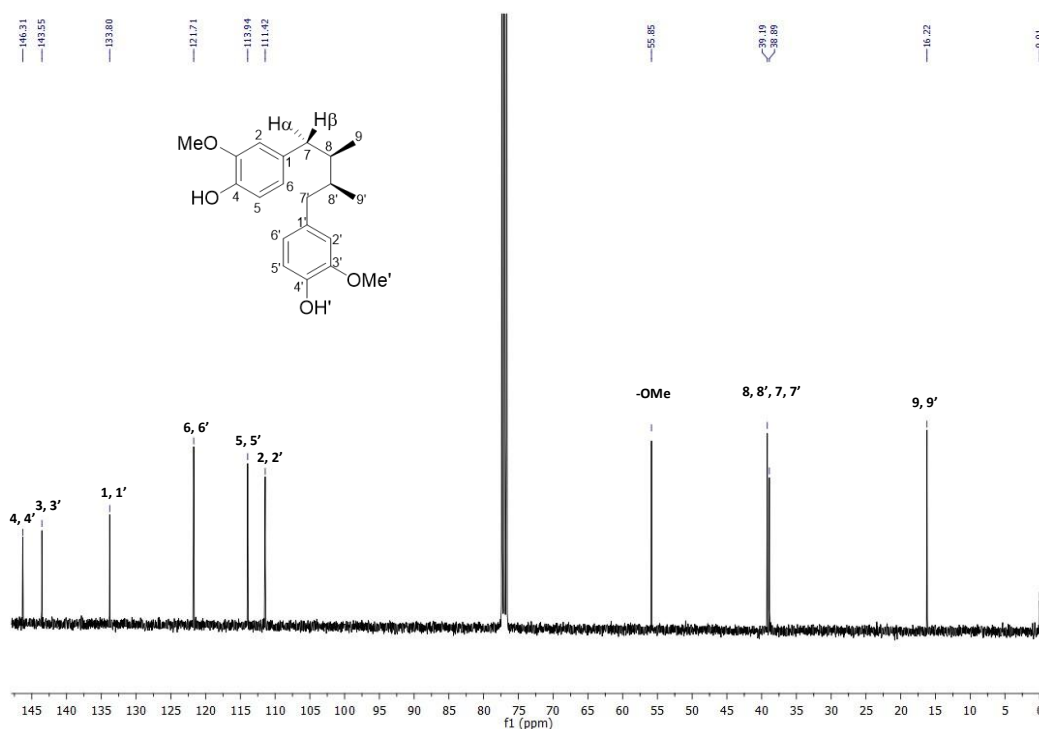


Figura 51. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de *AmdG*.

Como se mencionó previamente, el ***AmdG*** es una molécula con un plano de simetría, al presentar un eje de simetría entre en los enlaces de las posiciones 8 y 8' aunado a la simetría en el sustituyente el patrón de señales se simplifica. Para este trabajo se ha realizado la sustitución del H fenólico por el sustituyente de interés, obteniendo dos posibles derivados de cada reacción, la identificación de esta señal nos indicará si el derivado se obtuvo de manera \pm *mono* o *meso*

sustituido. En el caso de los derivados \pm *mono* sustituidos se observarán todas las señales de todos los hidrógenos en la molécula debido a que se perderá la simetría de está. En este caso se observará un singulete que integrará para un H fenólico ya que el otro H fenólico habrá sido sustituido. En el caso de los derivados *meso* se conserva la simetría de la molécula conservando un patrón de sustitución simplificado, se esperaría no observar la señal de los H fenólicos en los espectros de RMN ^1H . Considerando que ya se discutió la elucidación de la molécula de *AmDG* tanto con espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C , solo se hará énfasis en el patrón de los sustituyentes.

5.6 Propiedades físicas y espectroscópicas de los derivados de *AmDG*

Se realizó la semisíntesis de los derivados EBS-1B, EBS-3A, EBS-3B, EBS-6B, EBS-7B y EBS-8B y se caracterizaron mediante espectroscopia de RMN ^1H , RMN ^{13}C y HRMS.

5.6.1 Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-1B

El derivado **EBS-1B** se obtuvo como una resina verde; con un 63 % de rendimiento, soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano. El espectro de RMN ^1H mostró la presencia de una mezcla de estereoisómeros la cuál no fue posible separar, de manera tal que los datos espectroscópicos presentados son los correspondientes a la mezcla. Para la elucidación de las estructuras nos apoyamos del software MestReNova que permitió obtener una predicción de espectros de los cuatro estereoisómeros posibles. De estas, dos estructuras coincidieron con los espectros experimentales y se ilustran en la figura 52, mientras que los otros dos

corresponden a sus imágenes especulares, las cuales presentan espectros idénticos en un medio acuírico. Sin embargo, no fue posible realizar las asignaciones de manera inequívoca de todas las señales, debido al solapamiento de algunos multipletes correspondientes a hidrógenos químicamente similares. Para lograr una asignación completa y sin ambigüedad, sería necesario realizar experimentos bidimensionales de RMN tales como COSY y HSQC.

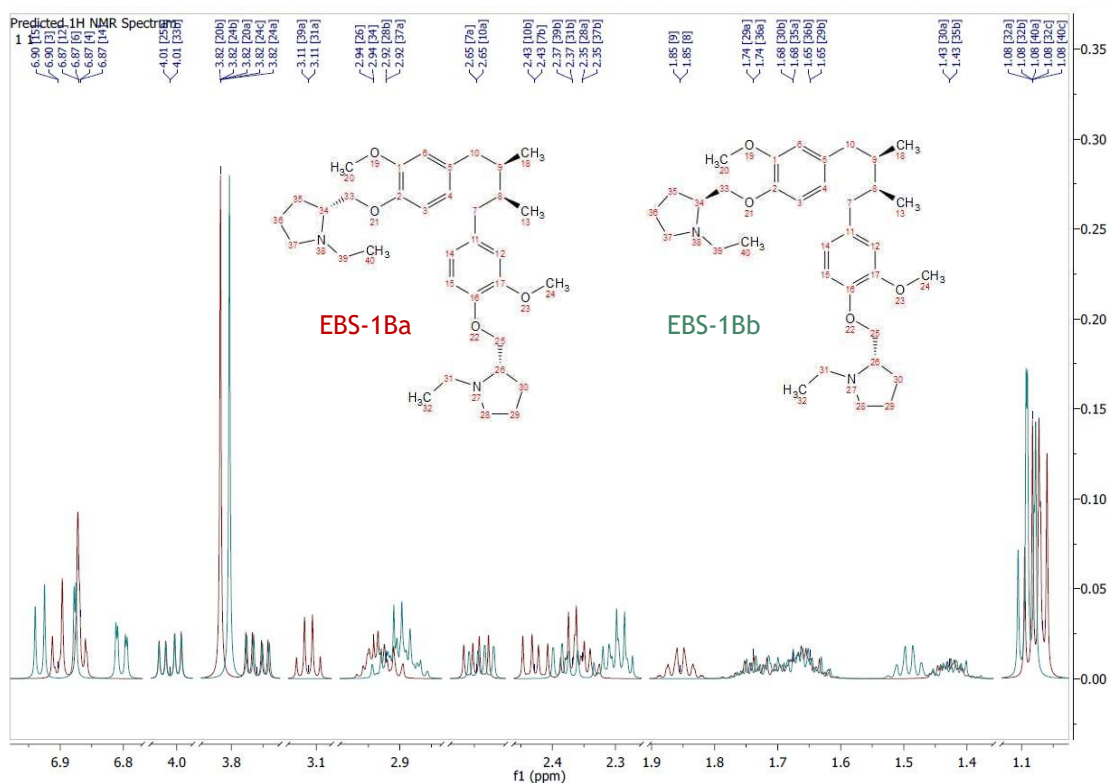


Figura 52. Predicción del espectro de RMN de ^1H de las estructuras de los derivados obtenidos **EBS-1Ba** y **EBS-1Bb**

Derivado EBS-1Ba: *(R)*-1-etil-2-((4-((2*R*,3*S*)-4-(4-(((*S*)-1-etilpirrolidin-2-il)metoxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenoxi)metil)pirrolidina.

Derivado EBS-1Bb: *(2S,2'S)*-2,2'-((((2*R*,3*S*)-2,3-dimetilbutan-1,4-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenilen))bis(oxi))bis(metilen))bis(1-etilpirrolidina).

$C_{34}H_{52}N_2O_4$. PM: 552.80 g/mol, RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 6.85 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H; 5b,5'b), 6.80 (d, $J = 8.7$ Hz, 3H; 5a, 5'a), 6.66 (m, 8H; 2a, 2'a, 2b, 2'b, 6a, 6'a, 6b, 6'b), 4.28 (sept, $J = 8.8, 4.2$ Hz, 2H; EBS-1Bb 5 α'' , 5 α'''), 4.01 (dd, $J = 4.6, 1.6$ Hz, 2H; 5 α'' a, 5 α''' a), 3.82 (s, 6H; OMe a), 3.81 (s, 6H; OMe b), 3.79 (d, 4H; 5 β'' a, 5 β''' a, 5 β'' b, 5 β''' b), 3.18 (m, 3H; 4 α'' a, 4 α''' a, 1''a, 1'''a), 2.99 (m, 3H; 4 α'' b, 4 α''' b, 1''b, 1'''b), 2.91 (m, 3H; 4 α'' b, 4 α''' b, 1''b, 1'''b, 6 α' a, 6 α'' a), 2.74 (dd, $J = 13.1, 4.6$ Hz, 5H; ; 7 $\alpha\alpha$, 7 $\alpha'a$, 7 αb , 7 $\alpha'b$), 2.43 (m, 6H; 4 β'' a, 4 β''' a, 6 β'' a, 6 β''' a, 6 α'' b, 6 α''' b), 2.27 (m, 8H; 4 β'' b, 4 β''' b, 6 β'' b, 6 β''' b, 7 βa , 7 $\beta'a$, 7 βb , 7 $\beta'b$), 2.03 (m, 4H; ; 2 α'' a, 2 α''' a, 3 α'' a, 3 α''' a), 1.91 (m, 4H; 2 α'' b, 2 α''' b, 3 α'' b, 3 α''' b), 1.78 (m, 12H; 2 β'' a, 2 β''' a, 3 β'' a, 3 β''' a, 2 β'' b, 2 β''' b, 3 β'' b, 3 β''' b, 8a, 8'a, 8b, 8'b), 1.13 (t, $J=7.2$, 6H; 7''a, 7'''a), 1.11 (t, $J = 7.2$, 6H; 7''b, 7'''b), 0.84 (d, $J = 6.7$ Hz, 12H; 9a, 9'a, 9b, 9'b). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 149.18 (CH3, CH3'), 146.64 (CH4, CH4'), 134.48 (CH1, CH1'), 121.06 (CH2, CH2'), 113.13 (CH6, CH6'), 72.42 (OCH₂ 5'', 5'''), 62.61 (OMe), 55.98 (NCH₂ 4'', NCH₂ 4'''), 53.95 (NCH₂ 1'', NCH₂ 1'''), 49.45 (NCH₂ 6'', NCH₂ 6'''), 39.04 (CH₂ 7, CH₂ 7'),), 38.46 (CH8, CH8'), 28.87 (CH2'', CH2'''), 23.01 (CH3'', CH3'''), 13.97 (CH7'', CH7'''), 11.67 (CH₃ 9, CH₃ 9'). HRMS (ESI+) m/z calculada para $C_{34}H_{52}N_2O_4$. [M+H]: 553.40053, masa obtenida [M+H]: 553.9869.

5.6.2 Elucidación estructural del derivado EBS-1B

En la Figura 53 se ilustra el espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de la mezcla de los derivados EBS-1Ba y EBS-1Bb. La numeración de la base de *AmDG* se mantiene como 1-9 y 1'-9' identificando las señales con color negro. Por otra parte, las señales de los sustituyentes etilpirrolidina se colorearon de rojo y verde para ayudar a identificar las similitudes de los desplazamientos tanto del espectro

simulado y el experimental y se numeraron del 1''- 7'' y del 1'''- 7''' aunado de la letra a o b según corresponda al estereoisómero asignado, es importante mencionar que debido a que los estereoisómeros no se encuentran en una proporción 1:1, las integrales podrían no coincidir con las integrales esperadas, sin embargo, el desplazamiento y constantes de acoplamiento nos permitieron asignar las señales de la siguiente manera. En 6.85 ppm podemos ver un d con $J = 8.6$ Hz, que integra para un hidrógeno de la posición 5 y 5' del estereoisómero EBS-1Bb que se acoplan con 6 o 6', en 6.80 podemos ver otro doblete con $J = 8.7$ Hz que integra para tres hidrógenos de las posiciones 5, 5' del estereoisómero EBS-1Ba que se acoplan con 6 o 6', en 6.66 vemos un multiplete que integra para ocho hidrógenos de las posiciones 2a, 2'a, 2b, 2'b, 6b, 6'a, 6b, 6'b ya que las señales se solapan. En 4.28 vemos un sept que integra para dos hidrógenos de la posición 5 α'' y 5 α''' del estereoisómero EBS-1Bb, con una constante de acoplamiento de $J = 8.8$ y 4.2 Hz que se acoplan con 1'' y 5 β . En 4.01 ppm vemos un dd con $J = 1.6$ y 4.6 Hz que integran para dos hidrógenos de las posiciones 5 α'' y 5 α''' del estereoisómero EBS-1Ba. En 3.82 y 3.81 ppm se observan dos singuletes, cada uno integra para 6 hidrógenos que corresponden a los metoxilos de cada derivado, en esa misma señal a 3.79 ppm se encuentra solapada una señal que integra para 4 hidrógenos de las posiciones 5 β'' a, 5 β''' a, 5 β'' b, 5 β''' b. En 3.18 ppm vemos un multiplete que integra para tres hidrógenos que corresponden a las posiciones 4 α'' a, 4 α''' a, 1''a, 1'''a. En 2.99 ppm vemos un multiplete que integra para tres hidrógenos que corresponden a las posiciones 4 α'' b, 4 α''' b, 1''b, 1'''b. En 2.91 ppm vemos un multiplete que integra tres hidrógenos de las posiciones 4 α'' b, 4 α''' b, 1''b, 1'''b, 6 α' a, 6 α'' a. En 2.74 ppm vemos un dd de los hidrógenos de las posiciones 7 α a, 7 α' a, 7 α b, 7 α' b ya que integra

para 4 hidrógenos con $J = 4.6, 13.1$ Hz. En 2.43 ppm observamos un multiplete que integran para seis hidrógenos de la posición $4\beta''a, 4\beta'''a, 6\beta''a, 6\beta'''a, 6\alpha''b, 6\alpha'''b$. En 2.27 ppm vemos un multiplete que integra para ocho hidrógenos de las posiciones $4\beta''b, 4\beta'''b, 6\beta''b, 6\beta'''b, 7\beta a, 7\beta'a, 7\beta b, 7\beta'b$. En 2.03 ppm vemos un multiplete que integra para cuatro hidrógenos de las posiciones $2\alpha''a, 2\alpha'''a, 3\alpha''a, 3\alpha'''a$. En 1.91 vemos un multiplete que integra para cuatro hidrógenos de las posiciones $2\alpha''b, 2\alpha'''b, 3\alpha''b, 3\alpha'''b$. En 1.78 ppm se observa un multiplete que integra para doce hidrógenos de las posiciones $2\beta''a, 2\beta'''a, 3\beta''a, 3\beta'''b, 2\beta''b, 2\beta'''b, 3\beta''b, 3\beta'''b, 8a, 8'a, 8b, 8'b$. En 1.13 y 1.11 vemos dos tripletes que integran para doce hidrógenos de las posiciones $7''a, 7'''a, 7''b, 7'''b$ con $J = 7.2$ Hz, que se acoplan con dos hidrógenos de la posición 6 y 6'' del nuevo sustituyente. En 0.84 vemos un doblete que integra para doce hidrógenos de las posiciones $9a, 9'a, 9b, 9'b$ con $J = 6.7$ Hz.

En la Figura 50, se presenta el espectro de RMN ^{13}C . Observamos 16 señales correspondientes a los 52 carbonos, ya que como recordamos la estructura tiene dos ejes de simetría, se conservan nueve señales de la base de *AmDG* y se observan ocho señales correspondientes a los sustituyentes. Se identificaron las señales pertenecientes los sustituyentes de azul y de negro las que corresponden al *AmDG*. Como las señales de la base de *AmDG* ya se discutieron previamente, solo se mencionará la identificación de las señales del sustituyente. Observando en campo alto los carbonos cerca de los heteroátomos, 72.42 ppm vemos a (OCH_2) de la $\text{C}5''$ y $\text{C}5'''$, le siguen los carbonos cerca de los nitrógenos, en 55.98 ppm los carbonos que se ubican en las posiciones $\text{C}4''$ y $\text{C}4'''$, en 53.95 ppm los carbonos

que se ubican en las posiciones C1'' y C1''', en 49.45 los carbonos que se ubican en las posiciones C6'' y 6''', continuando con carbonos que están lejos de heteroátomos en 28.87 ppm los carbonos de la posición C2'' y C2''', en 23.01 ppm los carbonos de la posición C3'' y C3''', y por último, en 13.97 ppm los carbonos de la posición C7'', C7'''. En la tabla 19 se comparan los datos espectroscópicos del espectro simulado (Figura 52) con el espectro obtenido experimentalmente (Figura 53), la cual, permitió asignar con mejor precisión las señales de los derivados obtenidos.

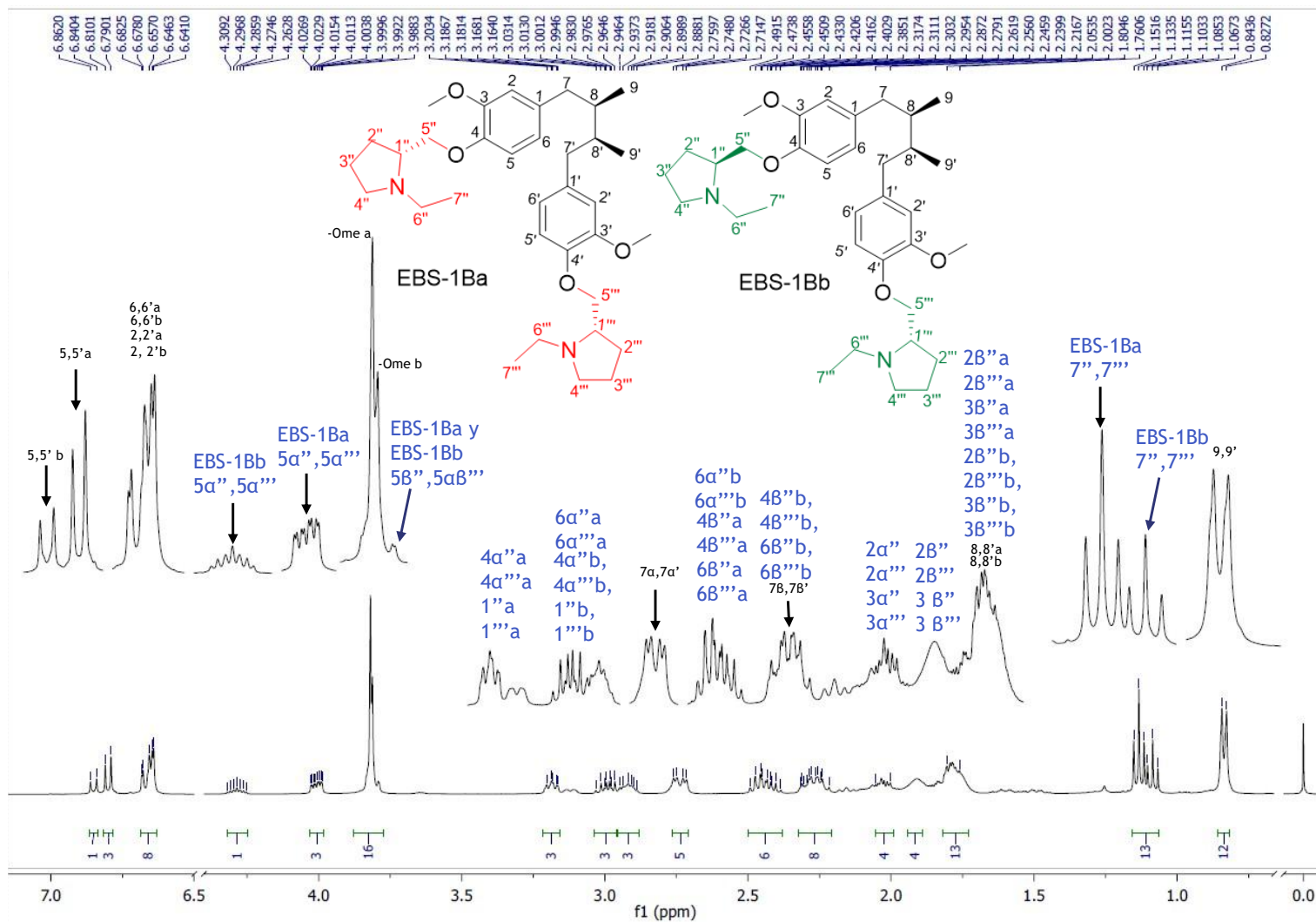


Figura 53. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) del derivado EBS-1B.

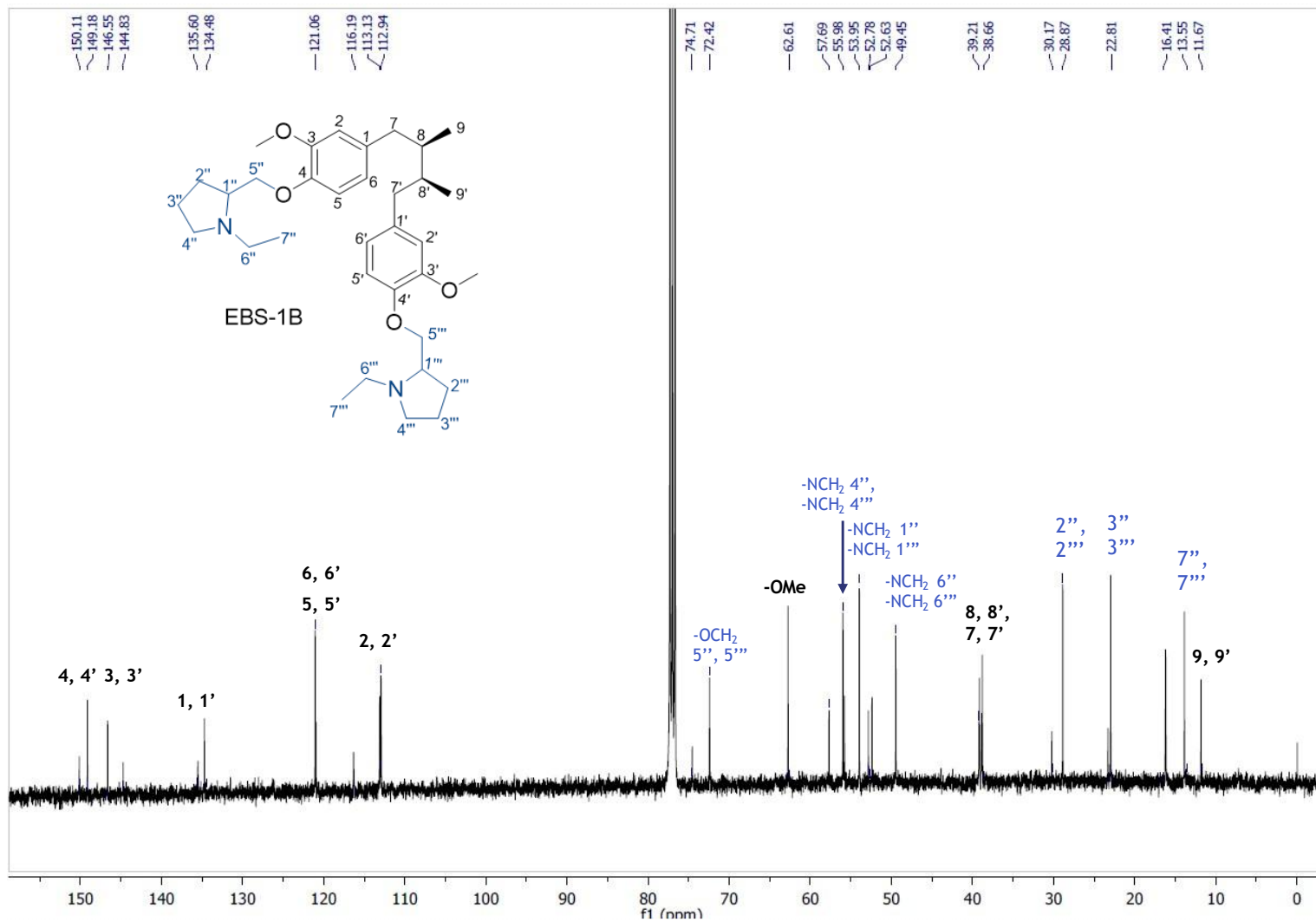


Figura 54. Espectro de RMN ¹³H (CDCl₃, 100 MHz) del derivado EBS-1B.

Tabla 19. Desplazamientos químicos experimentales y comparación de los desplazamientos químicos calculados para los compuestos EBS-1Ba y EBS-1Bb.

Posición	EBS-1Ba								EBS-1Bb							
	Exp δ (ppm)	Cal δ (ppm)	Exp M	Cal M	Exp J	Cal J	Exp J	Cal J	Exp δ (ppm)	Cal δ (ppm)	Exp M	Cal M	Exp J	Cal J	Exp J	Cal J
6, 6'	6.66	6.88	m	m	8	2	-	-	6.66	6.80	m	dd	8	2	-	-
5, 5'	6.80	6.90	d	m	1	2	8.7	-	6.85	6.93	d	d	3	2	8.6	-
2, 2'	6.66	6.88	m	m	8	2	-	-	6.66	6.88	m	d	8	2	-	-
5 α'' , 5 α'''	4.01	4.01	dd	dd	1	2	4.6 1.6	-	4.28	4.01	dd	dd	1	2	8.8	-
OMe	3.82	3.82	s	s	6	6	-	-	3.81	3.80	s	s	6	6	-	-
5 β' , 5 β''	3.79	3.76	dd	dd	3	2	-	-	3.79	3.76	dd	dd	3	2	-	-
6 α'' , 6 α'''	3.18	3.11	m	dd	3	2	-	-	3.18	2.90	m	m	3	2	-	-
7 α , 7 α'	2.74	2.65	dd	dd	4	2	13.1 4.6	-	2.74	2.64	dd	dd	4	2	13.1 4.6	-
7 β , 7 β'	2.44	2.43	m	dd	8	2	-	-	2.92	2.38	m	dd	8	2	-	-
4 α'' , 4 α'''	3.18	2.94	m	m	3	2	-	-	2.99	2.92	m	m	3	2	-	-
1'', 1'''	3.18	2.92	m	m	3	2	-	-	2.99	2.88	m	m	3	2	-	-
6 β'' , 6 β'''	2.44	2.36	m	m	4	2	-	-	2.28	2.29	m	m	4	2	-	-
4 β'' , 4 β'''	2.44	2.36	m	m	4	2	-	-	2.28	2.31	m	m	4	2	-	-
2 α'' , 2 α'''	1.91	1.66	m	m	4	2	-	-	1.91	1.68	m	m	4	2	-	-
2 β'' , 2 β'''	1.76	1.43	m	m	12	2	-	-	1.76	1.42	m	m	12	2	-	-
3 α'' , 3 α'''	1.91	1.74	m	m	12	2	-	-	1.91	1.74	m	m	4	2	-	-
3 β'' , 3 β'''	1.76	1.66	m	m	12	2	-	-	1.76	1.65	m	m	12	2	-	-
8, 8'	2.03	1.85	m	m	12	2	-	-	1.84	1.49	m	m	12	2	-	-
7'', 7'''	1.11	1.07	t	m	12	6	7.2	-	1.11	1.09	t	m	12	6	7.2	-
9, 9'	0.84	1.07	d	m	12	6	6.7	-	0.84	1.08	d	m	12	6	6.7	-

Exp= Valor experimental, Cal= Valor calculado

5.6.3 Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-3A

Derivado EBS-3A: *4-((2S,3R)-4-(4-(2-(azepan-1-il)etoxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenol*

El derivado EBS-3A se obtuvo como una resina verde con 9 % de rendimiento; $C_{28}H_{41}NO_4$. PM: 455.30 g/mol, RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 6.82 (d, J = 7.9 Hz, 1H; H5), 6.80 (d, J=7.9, 1H; H5'), 6.65 (m, 4H; H6, H6', H2, H2'), 4.15 (t, J = 6.2 Hz, 2H; H8''), 3.86 (s, 3H; H-OMe), 3.82 (s, 3H; H-OMe), 3.08 (t, J = 6.2 Hz, 2H; H7''), 2.89 (t, J= 5.3, 4H; H1'' H6''), 2.73 (m, 2H; H7 α , H7 α'), 2.29 (m, 2H, H7 β , H7 β'), 1.73 (m, 6H; H2'', H5'', H8, H8'), 1.63 (m, 4H; H3'', H4''), 0.84 (d, J = 6.4 Hz, H9), 0.83 (d, J=6.4Hz, H9'). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 149.22 (C3), 146.32 (C3'), 146.11 (C4), 143.59 (C4'), 135.19 (C1), 133.73 (C1'), 121.69 (C6), 121.09 (C6'), 114.01 (C5'), 113.41 (C5), 112.73 (C2), 111.47 (C2'), 66.74 (C8''), 56.19 (OMe), 55.86 (C1'', C6''), 55.63 (C7''), 39.33 (C7), 39.01 (C7'), 39.03 (C8), 38.75 (C8'), 27.02 (C3'', C4''), 26.91 (C2'', C5''), 16.28 (C9), 16.15 (C9'). HRMS (ESI+) *m/z* calculada para $C_{28}H_{42}N_1O_4$. [M+H]: 456.31138, masa obtenida [M+H]: 456.31246.

5.6.4 Elucidación estructural del derivado EBS-3A

En la Figura 55 se ilustra el espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 Hz) del derivado **EBS-3A**. La numeración de la base de AmDG se mantiene como 1-9 y 1'-9' identificando las señales con color negro. Por otra parte, las señales de los hidrógenos de azepina se colorearon de azul y se numeraron del 1'' al 8''.

En el caso de este derivado observamos que se pierde la simetría de la molécula, por lo tanto, aparecen todas las señales correspondientes a la base de AmDG y

algunas se solapan evitando que se pueda distinguir la multiplicidad de algunas señales. En 6.82 y 6.80 ppm vemos las señales de los hidrógenos 5 y 5' como dos dobletes solapados, con constante de acoplamiento de 7.9 Hz, en 6.65 ppm vemos los dobles de doble de los hidrógenos de 6 y 6' solapados con el doblete de los hidrógenos 2 y 2', por tal razón identificamos esta señal como un multiplete que integra para los cuatro hidrógenos, en 4.15 ppm vemos la señal 8'' como un triplete con constante de acoplamiento de 6.2 Hz, ya que se acopla con los hidrógenos de la posición 7'', los cuales también vemos como un triplete en 3.08 ppm con una constante de acoplamiento de 6.2 Hz, en 3.86 ppm vemos un singulete que corresponde al metoxilo que se ubica en el mismo anillo aromático del sustituyente de azepina, en 3.82 ppm vemos otro singulete del otro metoxilo, en 2.89 vemos la señal de los hidrógenos de la posición 1'' y 6'' como un triplete con constante de acoplamiento de 5.3 Hz, en 2.73 ppm vemos la señal de los hidrógenos diastereotópicos de la posición 7 α y 7 α ' solapados, por lo tanto, se reportan como un multiplete, en 2.29 ppm vemos la señal de los hidrógenos 7 β y 7 β ' solapadas observándose también como un multiplete, en 1.73 ppm vemos la señal de los hidrógenos 2'', 5'', H8 y H8' integrando para 6 hidrógenos observándolo como un multiplete, en 1.63 ppm vemos la señal de los hidrógenos 3'', y 4'' como un multiplete, y por último, en 0.84 y 0.83 vemos dos dobles solapados de 9 y 9' con una constante de acoplamiento de 6.4 Hz.

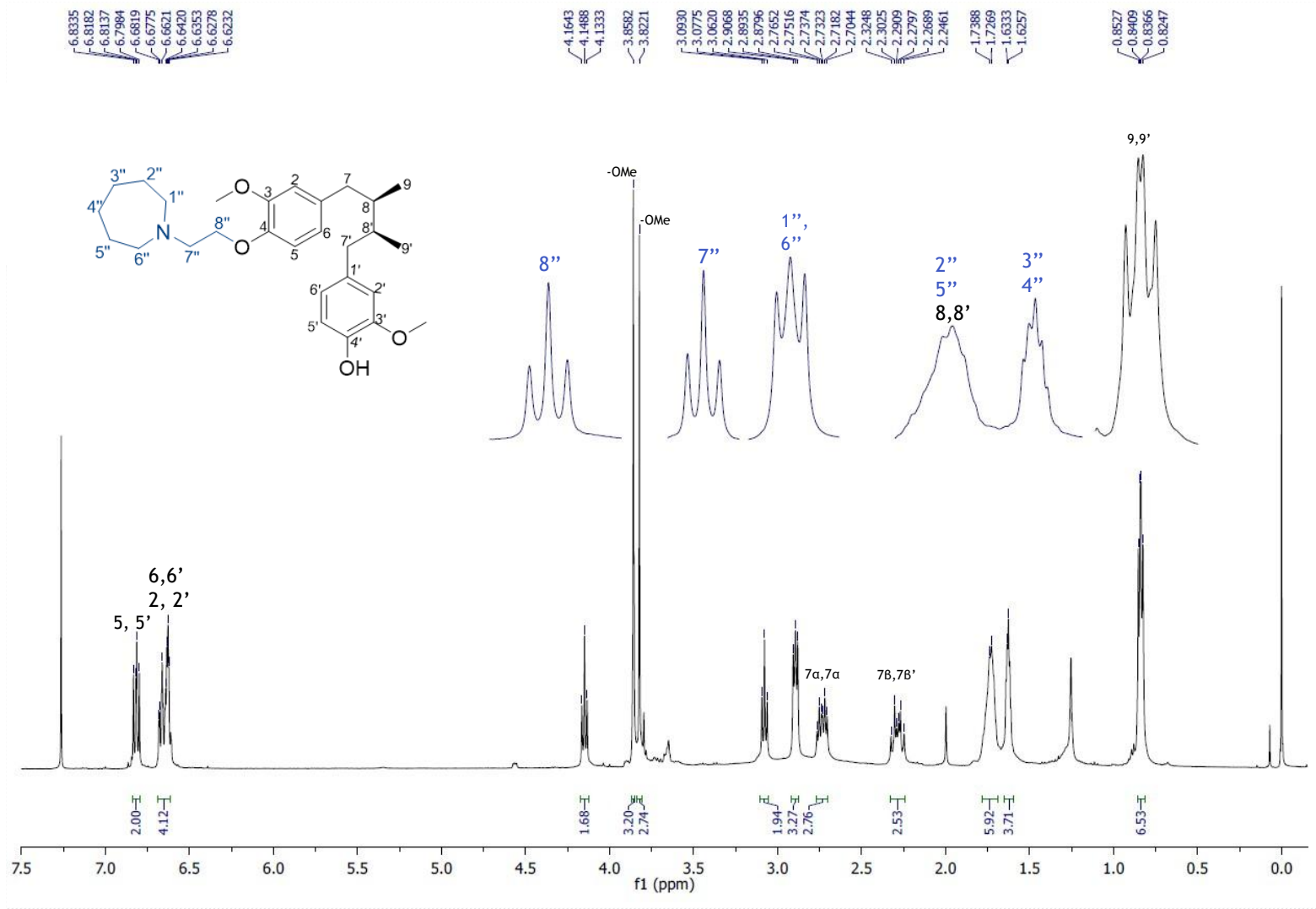


Figura 55. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-3A

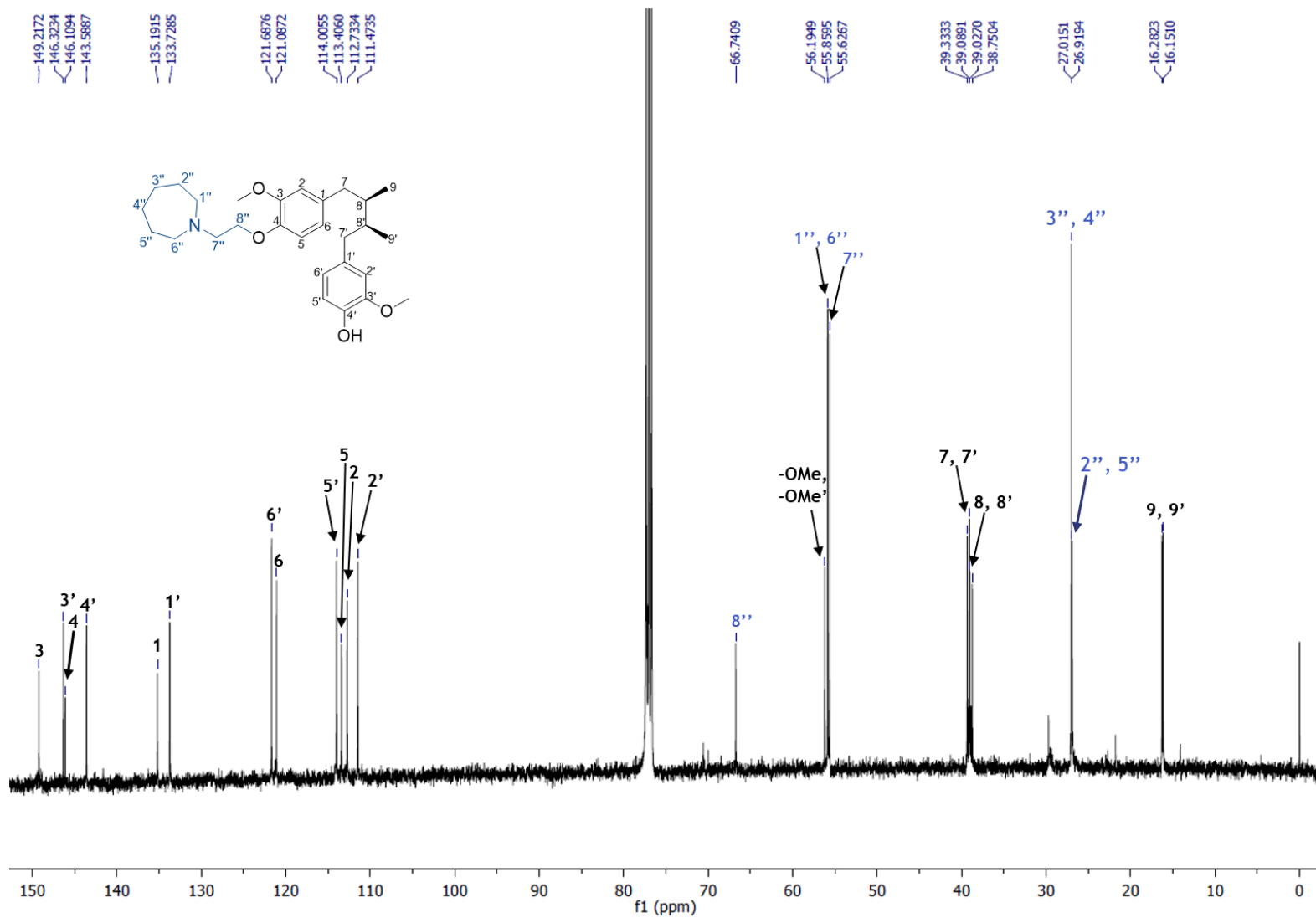


Figura 56. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) del derivado EBS-3A.

5.6.5 Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-3B

Derivado EBS-3B: 1,1'-((((2R,3S)-2,3-dimetilbutan-1,4-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenilen))bis(oxi))bis(etan-2,1-diil))bis(azepano)

El derivado **EBS-3B** se obtuvo como una resina verde con 56 % de rendimiento; $C_{36}H_{56}N_2O_4$. PM: 580.85 g/mol, RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.81 (d, J = 8.3 Hz, 2H; H5, H5'), 6.67 (dd, J = 8.3, 1.6 Hz, 2H; H6, H6'), 6.64 (d, J = 1.7 Hz, 2H; H2, H2'), 4.1 (t, J = 6.6 Hz, 4H; H8''), 3.83 (s, 6H; OMe), 2.99 (t, J = 6.5 Hz, 4H; H7''), 2.75 (t, J = 6.52 Hz, 8H; H1'', H6'') 2,74 (m, 2H, H7 α , H7 α'), 2.29 (dd, J = 13.4, 9.3, Hz, 2H; H7 β , H7 β'), 1.76 (m, 2H; H8, H8'), 1.67 (m, 8H; H2'', H5''), 1.60 (m, 8H; H3'', H4''), 0.83 (d, J = 6.6 Hz, 6H; H9, H9'). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 149.22 (C3, C3'), 146.44 (C4, C4'), 134.94 (C1, C1'), 121.04 (C6, C6'), 113.15 (C5, C5'), 112.77 (C2, C2'), 67.24 (C8''), 56.36 (OMe), 55.90 (C1'', C6'', C7''), 39.20 (C7, C7'), 38.86 (C8, C8'), 27.82 (C3'', C4''), 27.02 (C2'', C5''), 16.23 (C9, C9'). HRMS (ESI+) m/z calculada para $C_{36}H_{57}N_2O_4$. [M+H]: 581.43183 masa obtenida [M+H]: 581.42906.

5.6.6 Elucidación estructural del derivado EBS-3B

En la Figura 57 se ilustra el espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 Hz) del derivado **EBS-3B**. La numeración de la base de *AmDG* se mantiene como 1-9 y 1'-9' identificando las señales con color negro. Por otra parte, las señales de los hidrógenos de Azepina se numeraron del 1'' al 8''.

En esta molécula identificamos las señales y multiplicidad similar al derivado monosustituido, las diferencias principales radican en la integración de los hidrógenos en la región alifática, debido a ambos sustituyentes, como la molécula

es simétrica, las señales tienen la misma multiplicidad y desplazamiento, pero integran para el doble de señales. El desplazamiento, multiplicidad e integrales en la región aromática se mantienen similares, por esta razón continuaremos con la región alifática comenzando con los hidrógenos del sustituyente la posición 8'' cercanos al oxígeno, desplazados en 4.1 ppm viéndolos como un triplete que integra para 4 hidrógenos, después vemos los hidrógenos de los metoxilos como un singulete que integra para 6 hidrógenos, en 2.99 vemos un triplete que integra para 4 hidrógenos de la posición 7'', en 2.75 vemos un triplete de los hidrógenos de la posición 1'' y 6'', solapado con las señales, 7 α y 7 α' , ya que integra para 10 hidrógenos. En 2.29 ppm vemos un doble de doble que integra para 2 hidrógenos de la posición 7 β y 7 β' , en 1.76 ppm vemos un multiplete que integra para dos hidrógenos de la posición 8 y 8', en 1.67 vemos un multiplete que integra para 8 hidrógenos de las posiciones 2'' y 5'', en 1.60 ppm vemos un multiplete que integra para 8 hidrógenos de las posiciones 3'' y 4'', estos multipletes están muy cercanos, por esta razón se integraron juntos dando el total de los 16 hidrógenos, por último, en 0.83 ppm vemos los hidrógenos de los metilos de la posición 9 y 9' que integran para 6 hidrógenos.

En la Figura 58, se presenta el espectro de RMN ¹³C. Observamos 14 señales correspondientes a los 52 carbonos, se conservan 10 señales de la base de *AmDG* y se observan cuatro señales correspondientes a los sustituyentes. Se identificaron las señales pertenecientes a los sustituyentes de azul y de negro las que corresponden al *AmDG*. Como las señales de la base de *AmDG* ya se discutieron previamente, solo se mencionará la identificación de las señales del sustituyente.

Observando en campo alto las señales de los carbonos cerca de los heteroátomos, en 67.24 ppm vemos el OCH₂ de la posición 8'', en 55.90 ppm vemos los carbonos de la posición 1'', 6'' y 7'' que se encuentra cerca del nitrógeno, en 27.82 ppm vemos los carbonos de la posición 3'' y 4'', por último, en 27.02 ppm vemos las señales correspondientes a los carbonos de las posiciones 2'' y 5''.

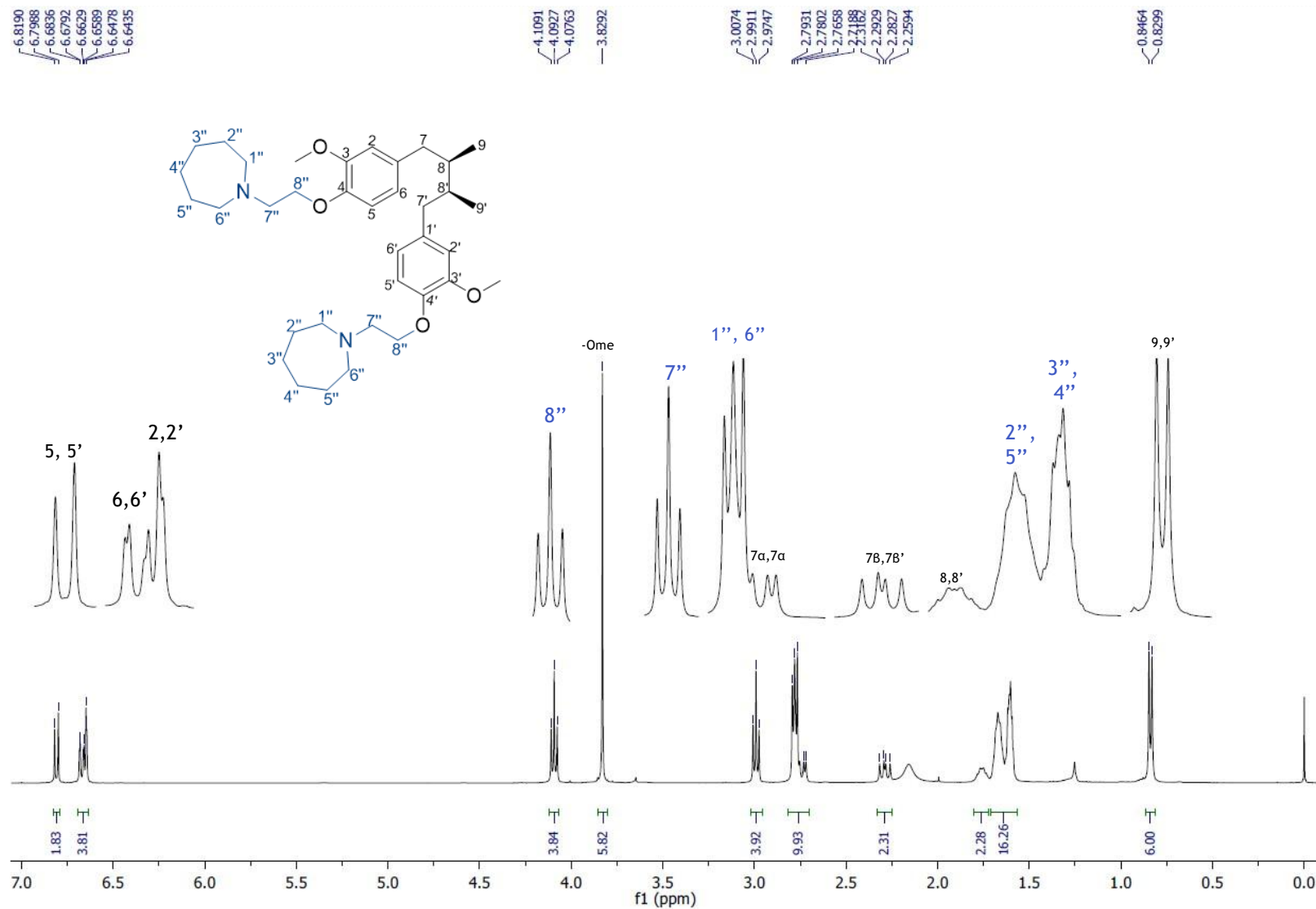


Figura 57. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del derivado EBS-3B

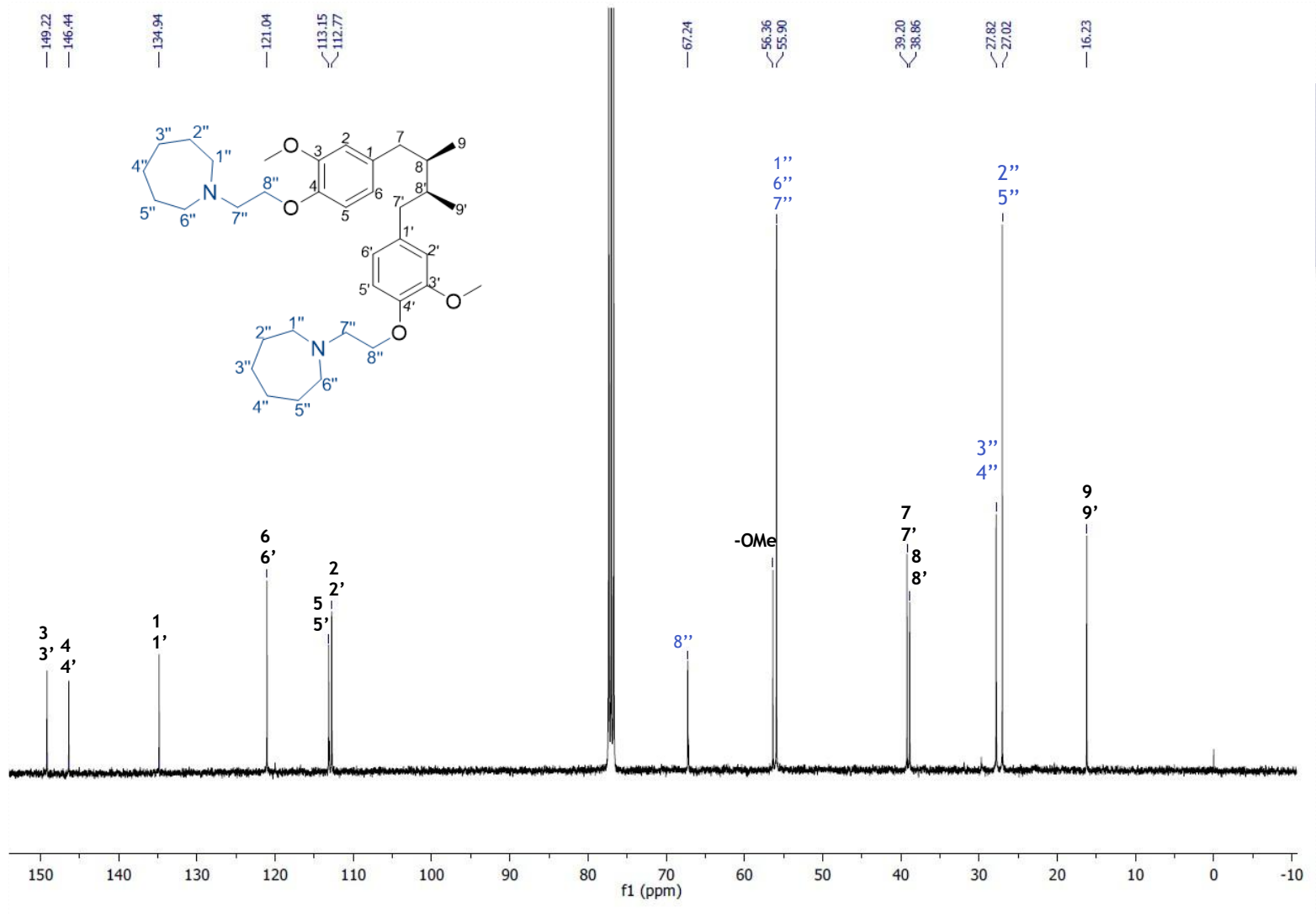


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del derivado EBS-3B

5.6.7 Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-6B

Este derivado se eligió como uno de los prometedores ya que cuando se realizó el acoplamiento molecular se observó el mejor DS de todos los ligandos al acoplarse con la enzima DXR pudiendo ser este su posible mecanismo de acción en caso de tener una buena MIC al ser evaluada contra *M. tuberculosis*. Además, al realizar las pruebas farmacocinéticas con Swiss ADME mostró ser uno de los mejores.

Derivado EBS-6B: *2,2'-((((2S,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyl) bis (2-metoxi-4,1-fenilen)) bis (oxi)) bis (N, N-dibenciletan-1-amina)*

El derivado **EBS-6B** se obtuvo como una resina verde; con un 63 % de rendimiento; C₅₂H₆₀N₂O₄. PM: 777.06 g/mol, RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.36 (d, J=7.4 Hz, 8H; H2'', H6'), 7.30 (t, J=7.4 Hz, 8H; H3'', H5''), 7.23 (td, J=7.0, 1.02 Hz, 4H; H4''), 6.61 (m, 6H; H5, H5', H6, H6', H2, H2'), 4.06 (t, J=6.4 Hz, 4H; H9''), 3.78 (s, 6H; OMe), 3.72 (s, 8H; H7''), 2.93 (t, J=6.4 Hz, 4H; H8''), 2.72 (dd, J=13.4, 4.8 Hz, 2H; H7α, H7α'), 2.27 (dd, J=13.4, 9.4 Hz, 2H; H7β, H7β'), 1.72 (m, 2H; H8, H8'), 0.83 (d, J=6.5 Hz, 6H; H9, H9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 149.02 (C3, C3'), 146.2 (C4,C4'), 139.86 (C1''), 134.57 (C1,C1'), 128.84 (C2'', C6''), 128.31 (C3'', C4'', C5''), 126.79 (C6, C6'), 120.94 (C5, C5'), 112.65 (C2, C2'), 67,65 (-OCH₂ 9''), 59.21 (-NCH₂ 7''), 55.93 (-NCH₂ 8''), 52.00 (-OMe), 39.17 (C7, C7'), 38.74 (C8, C8'), 16.01 (C9, C9'). HRMS (ESI+) *m/z* calculada para C₅₂H₆₁N₂O₄. [M+H]: 777.46313 masa obtenida [M+H]: 777.45947.

5.6.8 Elucidación estructural del derivado EBS-6B

En la Figura 59 se ilustra el espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado **EBS-6B**. Como podemos ver la estructura de la molécula tiene dos planos de simetría, un eje en el enlace de las posiciones 8 y 8' de la estructura base de *AmDG*, y otro eje de simetría justo en la posición del nitrógeno que enlaza a los bencilos que pueden rotar y no tienen sustituyentes, por lo tanto, los hidrógenos de los bencilos son química y magnéticamente idénticos. La numeración de la base de *AmDG* se mantiene como 1-9 y 1'-9' identificando las señales con color negro. Por otra parte, las señales de los sustituyentes dibencil etil amina se colorearon de azul y se numeraron del 1''-9'' para las posiciones ubicadas en el bencilo simétrico.

Una vez identificadas las señales tanto de la base de *AmDG* y el sustituyente, notamos la ausencia de la señal de los fenoles, por lo tanto, estamos seguros de que el derivado obtenido es disustituido.

En campo bajo observamos las señales de los hidrógenos aromáticos, comenzando con los hidrógenos bencílicos del sustituyente (azul). En 7.40 ppm identificamos un doblete que corresponde a los hidrógenos 2'', 6'', se están acoplando en orientación *orto* con un hidrógeno vecino y tienen una constante de acoplamiento de $J=7.4$ Hz. En 7.30 ppm vemos un triplete que corresponde a los hidrógenos 3'' y 5'' integra para 8 hidrógenos y se acoplan con un hidrógeno vecino en posición *orto* y tiene una constante de acoplamiento de $J=7.4$ Hz. En 7.23 ppm vemos un triplete dobleteado que integra para cuatro hidrógenos de las posiciones 4'', se acoplan en *orto* y *meta* con un vecino y vemos dos constantes de acoplamiento de $J=7.0$ y 1.02 Hz. En 6.61 vemos un multiplete que integra para los 6 hidrógenos (negro) 6, 6', 5,

5', 2, 2'. Continuamos con los hidrógenos alifáticos que se encuentran desprotegidos por la cercanía de los heteroátomos. En 4.06 ppm vemos un triplete que integra para los hidrógenos de la posición 9'' (azules) con una constante de acoplamiento de $J = 6.4$ Hz que se acopla con los hidrógenos de la posición 8''. En 3.78 ppm vemos un singulete que integra para 6 hidrógenos de los metoxilos. En 3.72 ppm vemos otro singulete que integra para 8 protones de la posición 7'' (azules) estos hidrógenos no se alcanzan a acoplar con ningún otro. Posteriormente en 2.93 se observan los 4 hidrógenos de la posición 8'' que se acoplan con los hidrógenos de la posición 9'' con dos constantes de acoplamiento de 6.4 Hz. Por último, en campo alto se encuentran los hidrógenos alifáticos de la base de *AmDG* que previamente se discutieron.

En la Figura 60, se presenta el espectro de RMN ^{13}C . Observamos 16 señales correspondientes a los 52 carbonos, ya que como recordamos la estructura tiene dos ejes de simetría, se conservan 10 señales de la base de *AmDG* y se observan seis señales correspondientes a los sustituyentes. Se identificaron las señales pertenecientes los sustituyentes de azul y de negro las que corresponden al *AmDG*. Como las señales de la base de *AmDG* ya se discutieron previamente, solo se mencionará la identificación de las señales del sustituyente. Observando en campo bajo las señales de los carbonos aromáticos, en 139.86 ppm a los C de la posición 1'', en 134.57 ppm a CH de las posiciones 2'' y 6'', en 128.53 ppm a CH de las posiciones 3'', 4'', y 5''; posteriormente a campos más bajos se ubican los carbonos cerca de los heteroátomos, a 67,65 ppm vemos los OCH_2 de las posiciones 9'', en 59.21 ppm vemos los carbonos de la posiciones 7'' que se encuentra entre el

nitrógeno y bencilo, en 55.93 ppm vemos los carbonos de las posiciones 8'' que se encuentra cerca del nitrógeno. Las señales ubicadas a campos más altos corresponden a los carbonos alifáticos de la base de *AmDG*.

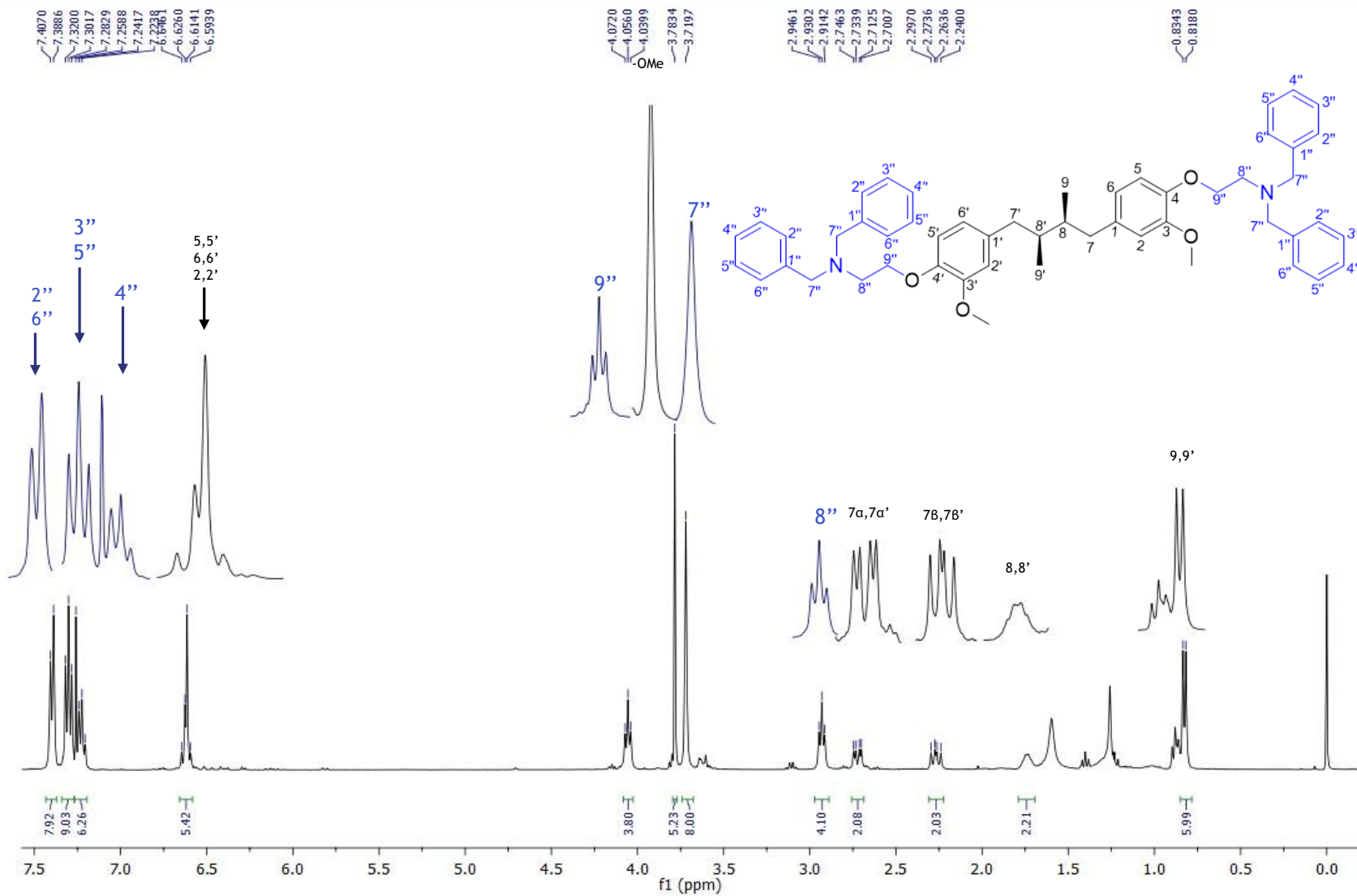


Figura 59. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 Hz) del derivado EBS-6B.

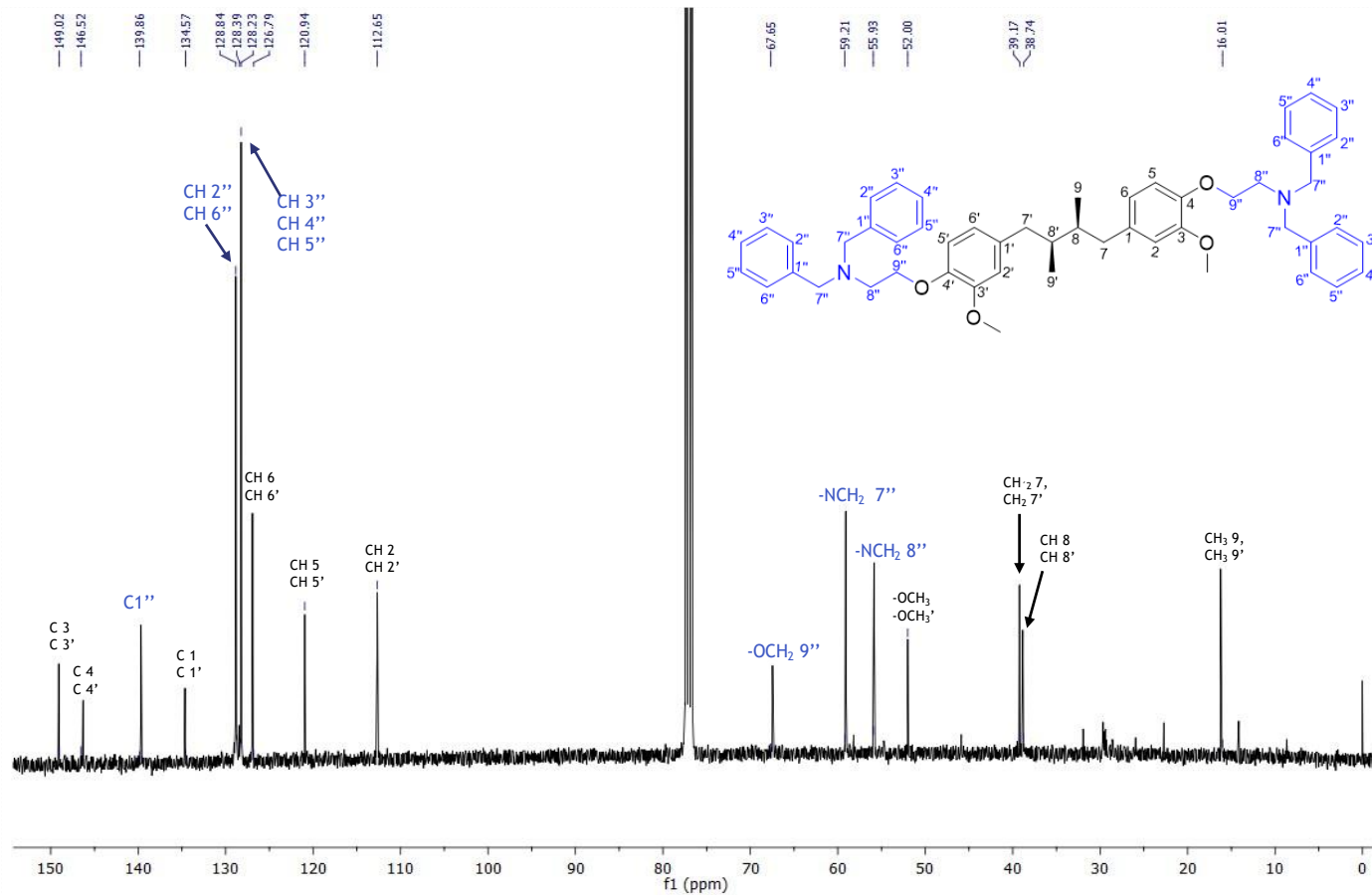


Figura 60. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) del derivado EBS-6B.

5.6.9 Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-7B

Derivado EBS-7B: *2,2'-((((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenilen))bis(oxi))bis(metilen))bis(1-benzil-1H-benzo[d]imidazol)*

El derivado **EBS-7B** se obtuvo como una resina verde con 12 % de rendimiento; $C_{50}H_{50}N_4O_4$. PM: 770.38 g/mol, RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H; H3''), 7.24 (m, 12H; H6'', H4'', H5'', H2''', H6''', H4'''), 7.08 (m, 4H; H3''', H5'''), 6.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H; H5, H5'), 6.62 (dd, $J = 8, 1.06$ Hz, 2H; H6, H6'), 6.61 (d, $J = 1.08$ Hz, H2, H2'), 5.64 (s, 4H; H8''), 5.34 (s, 4H; H7'''), 3.69 (s, 6H; OMe), 2.71 (dd, $J = 13.4, 4.7$ Hz, 2H; H7 α , H7 α'), 2.26 (dd, $J = 13.4, 9.4$ Hz, 2H; H7 β , H7 β'), 1.73 (m, 2H; H8, H8'), 0.82 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H; H9, H9'). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 149.83 (C1''), 149.66 (C3, C3'), 145.19 (C4, C4'), 142.33 (C7''), 136.41 (C1'''), 136.07 (C2''), 135.90 (C1, C1'), 128.70 (C3''', C5'''), 127.66 (C6'''), 126.62 (C4'''), 123.31 (C5''), 122.35 (C6, C6'), 121.07 (C4''), 120.13 (C6''), 115.19 (C5, C5'), 112.67 (C2, C2'), 110.17 (C3''), 65.15 (C8''), 55.59 (OMe), 47.57 (C7'''), 39.20 (C7), 38.89 (C8, C8'), 16.17 (C9, C9'). HRMS (ESI+) m/z calculada para $C_{50}H_{51}N_4O_4$. [M+H]: 771.39103 masa obtenida [M+H]: 771.39075.

5.6.10 Elucidación estructural del derivado EBS-7B

En la Figura 61 se ilustra el espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 Hz) del derivado **EBS-7B**. La numeración de la base de AmDG se mantiene como 1-9 y 1'-9' identificando las señales con color negro. Por otra parte, las señales de los sustituyentes se colorearon de azul y se numeraron del 1'' al 8'' para el benzimidazol y del 1''' al 6''' para el bencilo.

En campo bajo observamos las señales de los hidrógenos aromáticos, comenzando con los hidrógenos bencílicos del sustituyente (azul). En 7.80 ppm vemos un doblete que corresponde a los hidrógenos de la posición 3'' de del Benzimidazol con una constante de acoplamiento de 7.5 Hz, enseguida observamos un multiplete en 7.24 ppm que integra para 12 hidrógenos, los cuales corresponden a las posiciones 6'', 4'',5'', del benzimidazol y 2''',6''',4''' del bencilo, estas señales caen en el mismo desplazamiento solapándose y ocasionando que su multiplicidad no pueda ser definida, en este mismo multiplete se encuentra la señal del solvente CDCl_3 que es la que se observa con mayor intensidad. En 7.08 ppm vemos un multiplete que integra para los hidrógenos de las posiciones 3''' y 5''' del bencilo encontrándolo a campos más altos. En 6.99 ppm vemos un doblete con una constante de acoplamiento de 8.1 Hz para los hidrógenos de la posición 5, 5' de la base de *AmDG*, posteriormente en 6.62 ppm vemos un doble de doble de los hidrógenos de la posición 6 y 6' y el doblete de la posición 2 y 2'. En 5.64 ppm vemos un singulete de los hidrógenos de la posición 8'' vecinos al oxígeno y al benzimidazol, en 5.34 vemos otro singulete de los hidrógenos de la posición 7''' vecinos a la amina y al bencil. Las demás señales en la región alifática corresponden a la base de *AmDG* las cuales son similares a las explicadas previamente.

En la Figura 62, se presenta el espectro de RMN ^{13}C . Observamos 23 señales correspondientes a los 50 carbonos, se conservan diez señales de la base de *AmDG* y se observan trece señales correspondientes a los sustituyentes. Se identificaron las señales pertenecientes los sustituyentes de azul y de negro las que corresponden al *AmDG*. Como las señales de la base de *AmDG* ya se discutieron

previamente, solo se mencionará la identificación de las señales del sustituyente. En campo bajo vemos las señales de los carbonos aromáticos comenzando con aquellos más desprotegidos por la cercanía a un heteroátomo, en este caso, en 149.83 ppm vemos a C1'' del benzoimidazol ya que está entre los dos nitrógenos, en 149.66 ppm vemos a (C3, C3') que corresponden a los carbonos bencílicos unidos al oxígeno del metoxilo, en 145.19 ppm vemos a (C4, C4') que corresponden a los carbonos bencílicos que tienen como sustituyente al éter, en 142.33 ppm vemos a (C7'') que corresponde a los carbonos unidos a la imina del benzoimidazol, en 136.41 ppm vemos a (C1''') carbono que está entre la imina y la amina terciaria del imidazol, en 136.07 ppm vemos a (C2'') que une al benceno con el imidazol y está del lado de la amina terciaria, en 135.90 ppm vemos a (C1, C1') carbonos del benceno de la base de AmDG que están en posición *para* respecto al éter, en 128.70 ppm vemos a (C3''', C5''') que se ubican en posición *meta* respecto a la posición C1''' del bencilo, en 127.66 ppm vemos a (C6''') que se ubica en posición *orto* respecto a la posición C1''' del bencilo, en 126.62 ppm vemos a (C4''') que se ubica en posición *para* respecto a la posición C1''' del bencilo, en 123.31 ppm vemos a (C5'') del benzimidazol, en 122.35 ppm vemos a (C6, C6') que se ubican en posición *para* del metoxilo de la base de AmDG, en 121.07 ppm vemos a (C4'') del benzoimidazol, en 120.13 ppm vemos a (C6'') del benzoimidazol, en 115.19 ppm vemos a (C5, C5') y en 112.67 ppm vemos a (C2, C2') de los bencenos del AmDG, por último, en 110.17 ppm vemos a (C3'') del Benzoimidazol. Las señales identificadas en la región alifática corresponden en su mayoría a la base de AmDG manteniendo un desplazamiento similar, en esta región se suman las señales de los carbonos alifáticos C8'' que están unidos al oxígeno del éter y C7''' que está unido

a la amina terciaria del Benzimidazol, desplazados en 65.15 y 47.57 ppm, respectivamente.

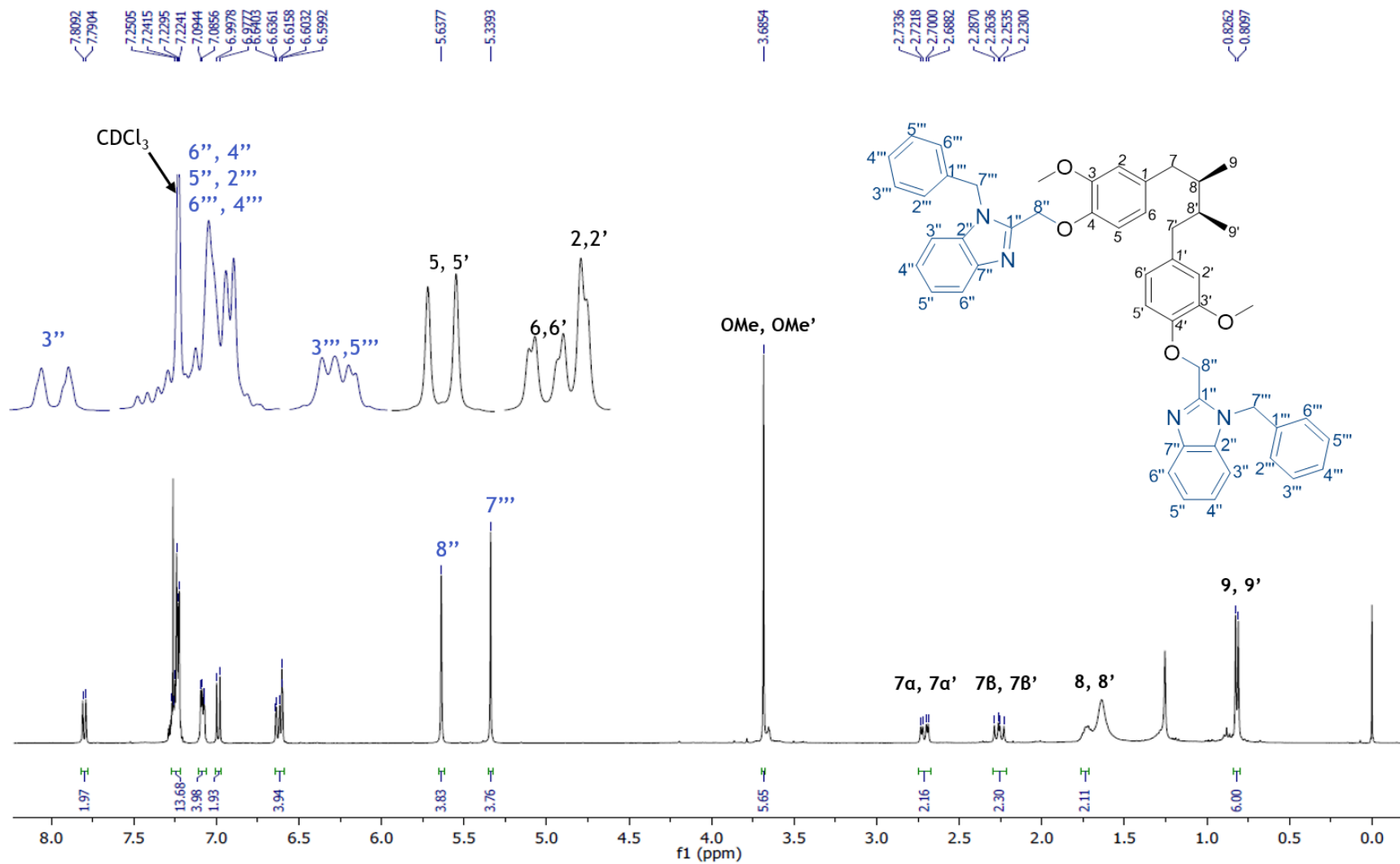


Figura 61. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del derivado EBS-7B.

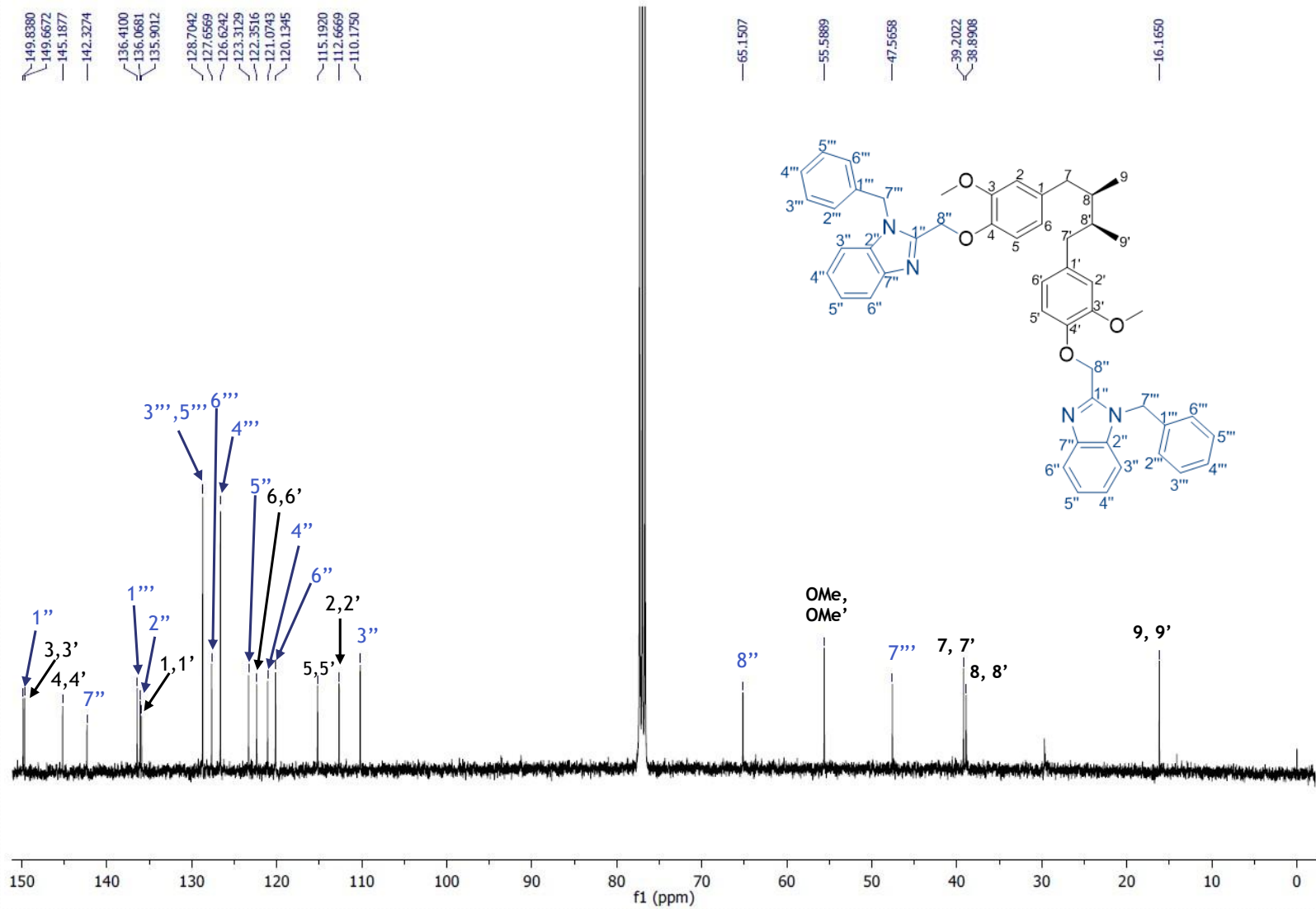


Figura 62. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) del derivado EBS-7B

5.6.11 Propiedades físicas y espectroscópicas del derivado EBS-8B

Derivado EBS-8B: *2,2'-((((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenilen))bis(oxi))bis(etano-2,1-diil))bis(1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina)*

El derivado **EBS-8B** se obtuvo como una resina verde; con un 33 % de rendimiento; $C_{42}H_{52}N_2O_4$. PM: 648.89 g/mol, RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.12 (m, 6H; H3'', H5'', H4''), 7.02 (m, 2H; H6''), 6.84 (d, J = 8.0 Hz, 2H; H5, H5'), 6.68 (m, 4H; H6, H6', H2, H2'), 4.23 (t, J = 6.2 Hz, 4H; H11''), 3.84 (s, 6H; OMe), 3.80 (s, 4H; H1''), 3.02 (t, J = 6.2 Hz, 4H; H10''), 2.90 (m, 8H; H9'', H8''), 2.75 (dd, J = 13.4, 4.8 Hz, 2H; 7 α , 7 α'), 2.30 (dd, J = 13.4, 9.4 Hz, 2H; 7 β , 7 β'), 1.77 (m, 2H; H8, H8'), 0.85 (d, J = 6.6 Hz, 6H; H9, H9'). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) 149.26 (C3, C3'), 146.27 (C4, C4'), 135.08 (C1, C1'), 134.53 (C7''), 134.06 (C2''), 128.68 (C6''), 126.59 (C3''), 126.17 (C4''), 125.63 (C5''), 121.04 (C6, C6'), 113.37 (C5, C5'), 112.77 (C2, C2'), 67.26 (C11'), 56.84 (C1'), 56.40 (OMe), 55.89 (C10'), 51.45 (C9''), 39.23 (C7, C7'), 38.87 (C8, C8'), 28.92 (C8''), 16.22 (C9, C9'). HRMS (ESI+) *m/z* calculada para $C_{42}H_{53}N_4O_4$. [M+H]: 649.40053 masa obtenida [M+H]: 649.40286.

5.6.12 Elucidación estructural del derivado EBS-8B

En la Figura 63 se ilustra el espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 Hz) del derivado **EBS-8B**. La numeración de la base de *AmDG* se mantiene como 1-9 y 1'-9' identificando las señales con color negro. Por otra parte, las señales de los sustituyentes se colorearon de azul y se numeraron del 1'' al 11'' para la isoquinolina. En campo bajo observamos las señales de los hidrógenos aromáticos, comenzando con los hidrógenos de la isoquinolina (azul). En 7.12 ppm vemos un multiplete debido al

solapamiento de las señales que integran para 6 hidrógenos correspondientes a las posiciones H3'', H5'', H4'', en 7.02 ppm vemos otro multiplete, que integra para 2 hidrógenos de la posición H6'', en 6.84 ppm vemos un doblete con constante de acoplamiento de 8.0 Hz para los hidrógenos H5, H5', en 6.68 ppm vemos un multiplete por solapamiento de las señales correspondientes a los hidrógenos H6, H6', H2 y H2', en 4.23 ppm vemos un triplete con constante de acoplamiento de 6.2 Hz, para los hidrógenos H11'', en 3.84 ppm vemos un singulete correspondiente a los hidrógenos del metoxilo, en 3.80 ppm vemos un singulete correspondiente a los hidrógenos H1'' de isoquinolina, en 3.02 ppm vemos un triplete con constante de acoplamiento de 6.2 Hz correspondientes a los hidrógenos H10'', las demás señales de la región alifática corresponden a la base de *AmDG* similares explicadas previamente.

En la Figura 64, se presenta el espectro de RMN ¹³C. Observamos 21 señales correspondientes a los 42 carbonos, ya que como recordamos la estructura tiene un plano de simetría, se conservan diez señales de la base de *AmDG* y se observan once señales correspondientes a los sustituyentes. Se identificaron las señales pertenecientes los sustituyentes de azul y de negro las que corresponden al *AmDG*. Como las señales de la base de *AmDG* ya se discutieron previamente, solo se mencionará la identificación de las señales del sustituyente. En campo bajo vemos las señales de los carbonos aromáticos comenzando con aquellos más desprotegidos por la cercanía a un heteroátomo, en este caso, en 149.26 ppm vemos a (C3, C3') y en 146.27 ppm a (C4, C4') ambos tipos de carbonos están directamente unidos a un éter, en 135.08 ppm vemos a (C1, C1'), en 134.53 ppm

vemos a (C7'') y en 134.06 ppm vemos a (C2''); en 128.68 ppm vemos a (C6''), en 126.59 ppm vemos a (C3''), en 126.17 ppm vemos a (C4'') y en 125.63 ppm vemos a (C5'') estos carbonos son metinos de la isoquinolina; en 121.04 ppm vemos a (C6, C6'), en 113.37 ppm vemos a (C5, C5') y en 112.77 ppm vemos a (C2, C2') estos metinos son de la base de *AmDG*, en 67.26 ppm vemos a (C11') es un metileno unido al oxígeno, en 56.84 ppm vemos a (C1'') es un metino de la isoquinolina que se encuentra unido a la amina y al benceno, en 56.40 ppm vemos a (OMe) metilo de la base de *AmDG*, en 55.89 ppm vemos a (C10') es un metileno unido a la amina, en 51.45 ppm vemos a (C9'') un metileno unido a la amina, en 28.92 ppm vemos a (C8''), un metileno de isoquinolina.

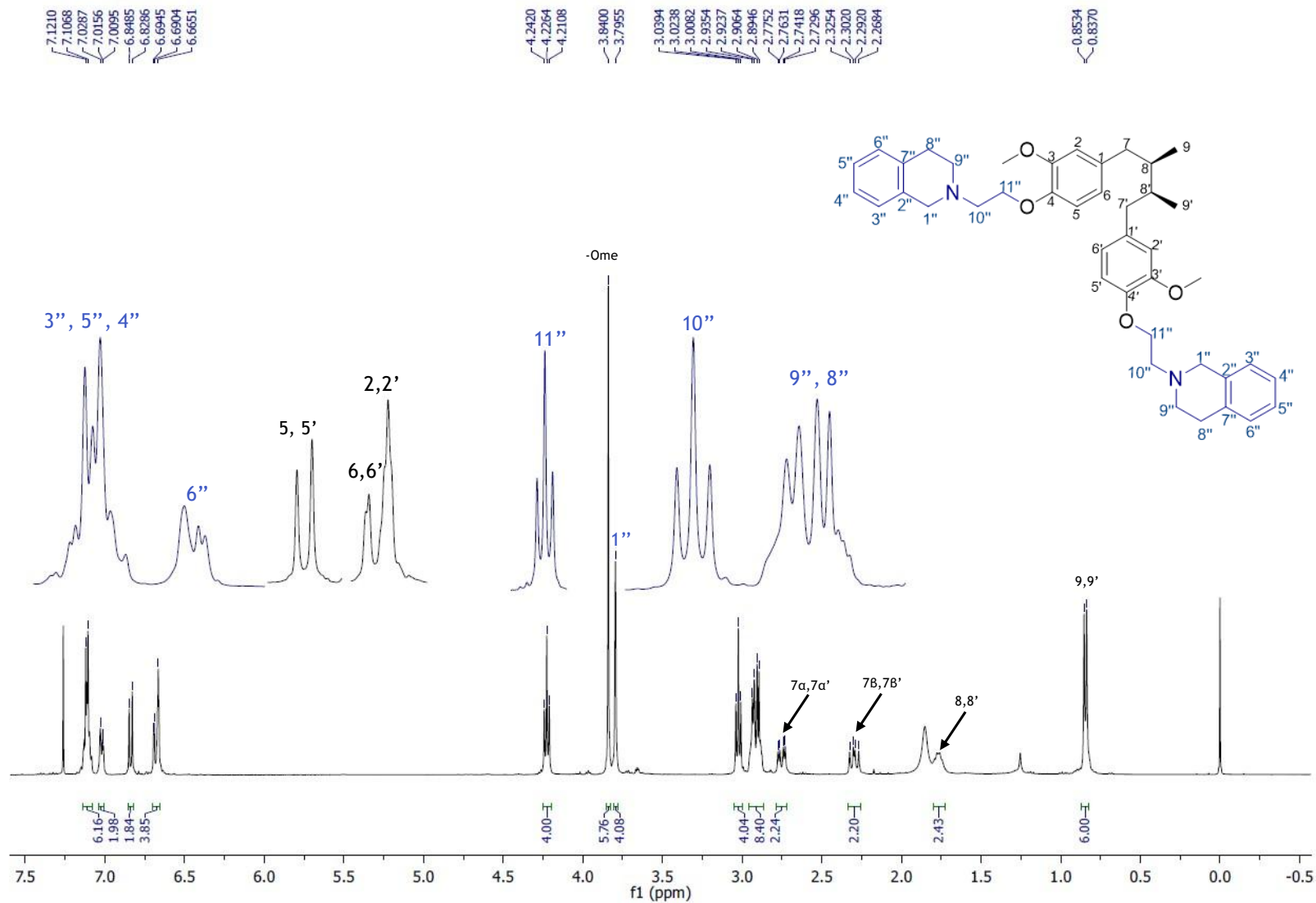


Figura 63. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del derivado EBS-8B.

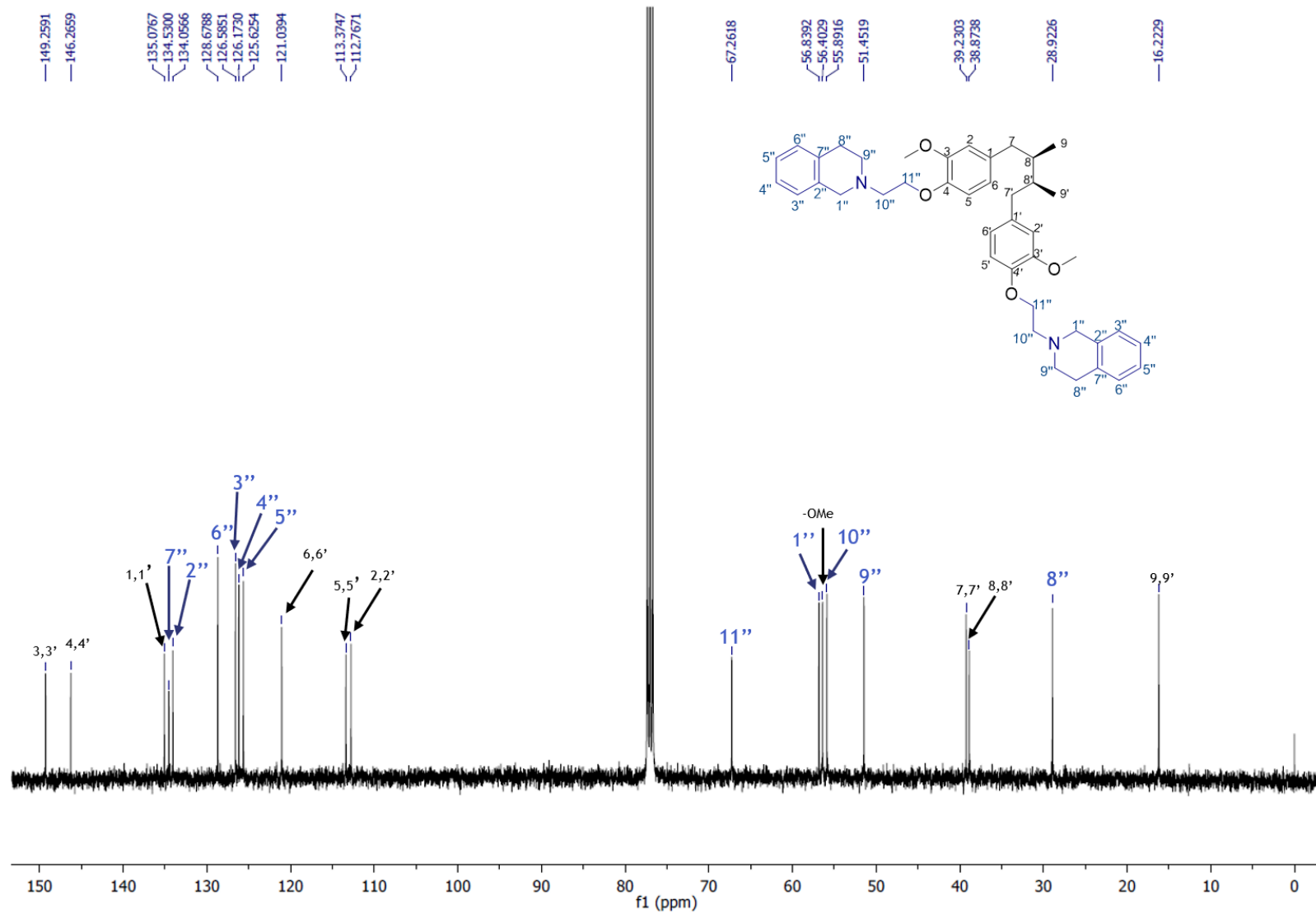


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del derivado EBS-8B.

5.7 Evaluación de la actividad antimicobacteriana y citotóxica

Se evaluaron seis derivados contra *M. tuberculosis* H37Rv sensible a fármacos de primera línea y G117 resistente a rifampicina, isoniazida y etambutol obteniendo los resultados presentados en la Figura 65.

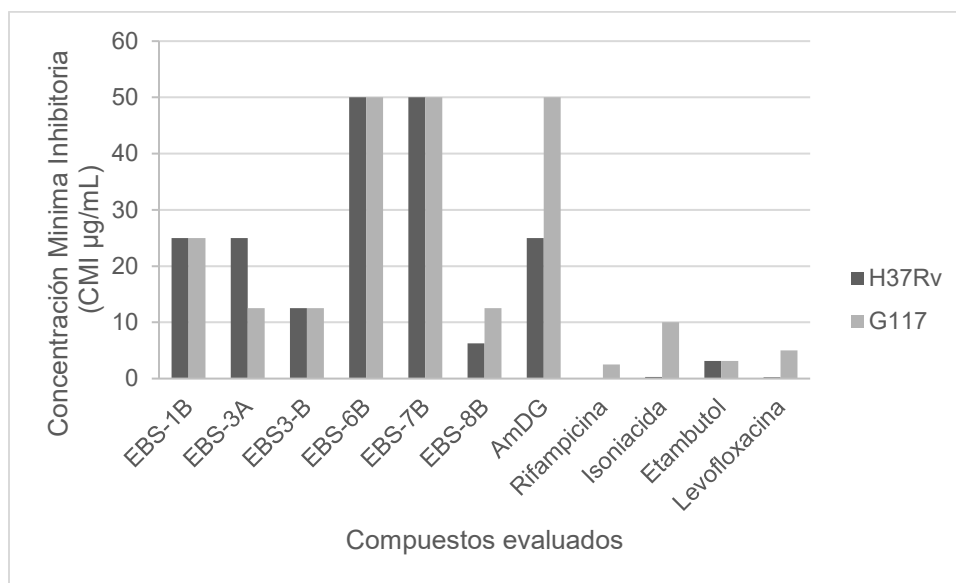


Figura 65. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en µg/mL de los derivados sintetizados en las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv (sensible a medicamentos de primera línea) y *M. tuberculosis* G117 (resistente a rifampicina, isoniazida y etambutol).

Se presentan los datos de menor a mayor actividad, de tal manera que observamos los derivados **EBS-6B** y **EBS-7B** presentaron una CMI > 50 µg/mL para ambas cepas siendo una concentración similar a la del AmDG, por lo tanto, podemos decir que los sustituyentes como el dibencilo y bencil benzimidazol no mejoraron la actividad contra las cepas evaluadas de *M. tuberculosis*, el derivado **EBS-1B** presenta una CMI de 25 µg/mL para ambas cepas, por lo tanto, podemos decir que el sustituyente de etilpirrolina mejora la actividad contra la cepa G117 respecto al

AmDG, pero no contra H37Rv ya que la CMI es similar, vemos que la actividad contra *M. tuberculosis* mejora con el sustituyente de Azepina debido a que la CMI del derivado monosustituido **EBS-3A** fue de 25 y 12.5 µg/mL para H37Rv y G117 respectivamente, por otra parte, el derivado disustituido presentó una CMI de 12.5 µg/mL para ambas cepas siendo mejor que la presentada por *AmDG*, continuando con el análisis vemos que el derivado **EBS-8B** que tiene como sustituyente isoquinolina presentó una CMI de 6.25 y 12.5 µg/mL para H37Rv y G117 respectivamente, mejorando la CMI respecto al *AmDG*. Por lo tanto, podemos decir que el derivado con mejor actividad contra las cepas H37Rv y G117 de esta serie es el derivado **EBS-8B**, ya que presenta una CMI menor que *AmDG* al momento de inhibir el crecimiento de las cepas evaluadas, sin embargo, al comparar los datos con el derivado *meso-31* (Reyes Melo *et al.* 2017) que tuvo una CMI de 3.125 µg/mL para la cepa H37Rv se puede observar que la actividad contra esta cepa no fue mejorada, por otra parte, si lo comparamos con el derivado *meso-26* que tuvo una CMI de 6.25 µg/mL para la cepa H37Rv podemos decir que tienen una actividad similar contra esta cepa. Si bien, no podemos hacer una comparación de la actividad de los derivados de Reyes Melo contra las cepas resistentes ya que son diferentes a la que se evaluó en este proyecto, es importante mencionar que las CMI de las cepas resistentes G122 y G133 en las que se valoraron el derivado *meso-30* fue de 6.25 µg/mL y para el derivado *meso-26* fue de 12.5 µg/mL para ambas, en este caso el derivado que tuvo mejor actividad contra la cepa resistente G117 evaluada fue el derivado **EBS-8B**. Considerando que el grupo funcional que mejoró la actividad del *AmDG* es una isoquinolina se considera importante mencionar la relevancia de este heterociclo ya que se ha asociado con actividad

antimicobacteriana significativa, ya que forma parte de compuestos naturales y sintéticos con actividad antituberculosa relevante, por ejemplo, los metabolitos secundarios de *Tiliacora trianda*, la tiliacorinina y la 2'-Nortiliacorinina presentan un núcleo un bisbenzilisquinolina ambos con una CMI de 0.7-6.2 µg/mL demostrando evidencia del núcleo de isoquinolina al presentar como mecanismo de acción la alteración de la pared celular y procesos metabólicos (Sureram *et al.* 2012).

Comparando con los fármacos de referencia vemos que el derivado que podría competir contra la actividad de algunos de los fármacos de referencia sería el derivado **EBS-8B** contra la isoniacida ya que es el que tiene una mayor CMI para la cepa resistente G117. Considerando la relación estructural con la bedaquilina, fármaco antituberculoso complementario para el tratamiento contra *M. tuberculosis*, multifármaco resistente ya que tienen núcleo aromático de quinolina el cual inhibe la homeostasis del ATP como mecanismo de acción ((Liu *et al.*, 2022) (Bellapukonda *et al.*, 2025). En cuanto a las características estructurales, la isoquinolina aporta una superficie aromática plana y un átomo de nitrógeno aromático capaz de interactuar como aceptor de hidrógenos favoreciendo interacciones $\pi-\pi$ y enlaces no covalentes con residuos del sitio activo de enzimas micobacterianas. En concordancia con estos antecedentes, los resultados de acoplamiento molecular obtenidos en este trabajo muestran que el derivado que contiene el sustituyente isoquinolina presenta una afinidad elevada por la enzima IpdAB CoA transferasa, acomodándose adecuadamente dentro de la bolsa hidrofóbica del sitio catalítico. Esta interacción sugiere un posible mecanismo de

acción asociado a la inhibición del metabolismo del colesterol, proceso esencial para la supervivencia y persistencia de *M. tuberculosis* en el hospedero.

En la tabla 20 se presentan los resultados de la actividad antituberculosa (CMI), citotoxicidad expresados en Concentración Inhibitoria Media (IC_{50}) y el Índice de Selectividad (IS). El Derivado **EBS-8B** mostró la mejor actividad antituberculosa frente a la cepa sensible H37Rv con una CMI de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una CMI de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a la cepa resistente G117, con IS de 2.93 y 1.46 para la cepa H37Rv y G117 respectivamente, este derivado es el único que presenta un IS mayor a 1 para ambas cepas, sugiriendo ser un derivado que favorece su selectividad frente a *M. tuberculosis*. Comparando con el AmDG (CMI de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IC_{50} de 11.84, IS=0.90) se observa que el derivado **EBS-8B** supera la actividad del AmDG, por lo tanto, las modificaciones estructurales en dicho derivado se consideran efectivas para el aumento en la potencia y selectividad antimicobacteriana.

Por el contrario, los derivados **EBS-1B**, **EBS-3B**, y **EBS-3A** presentaron actividad moderada (CMI de 12.5-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sin embargo, mostraron baja selectividad con un IS <0.5, considerando que su IC_{50} fue <6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ siendo un valor mayor al etopósido, el compuesto que se usó como control positivo presentó una IC_{50} = 11.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los derivados **EBS-6B** y **EBS-7B** fueron los menos activos contra ambas cepas ya que presentaron un CMI > 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de la misma manera fueron los derivados que presentaron menor efecto citotóxico con una IC_{50} = 77.71 y 24.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Tabla 20. Actividad antimicobacteriana de los aminoéteres derivados de *AmDG* en la cepa sensible H37Rv y resistente G117, citotoxicidad en la línea celular VERO e índice de selectividad

Derivado	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CMI (µg/mL)	<i>M. tuberculosis</i> G117 CMI (µg/mL)	Células Vero IC₅₀ (µg/mL)	IS (IC₅₀/CMI) <i>H37Rv</i>	IS (IC₅₀/CMI) <i>G117</i>
EBS-1B	25	25	1.53	0.06	0.06
EBS-3A	25	12.5	5.93	0.24	0.47
EBS-3B	12.5	12.5	1.39	0.11	0.11
EBS-6B	> 50	>50	77.71	1.55	1.55
EBS-7B	> 50	>50	24.46	0.49	0.49
EBS-8B	6.25	12.5	18.30	2.93	1.46
<i>AmDG</i>	25	>50	22.1	0.90	0.45
Rifampicina	0.0625	2.5	>82.29	1316.70	32.92
Isoniacida	< 0.3125	10	>13.71	43.88	1.37
Etambutol	3.125	3.125	--	--	--
Levofloxacina	0.25	5.0	--	--	--
Etopósido	--	--	11.84	--	--

Los fármacos de referencia rifampicina, isoniacida, etambutol y levofloxacin mostraron actividades superiores de CMI e IS, lo que valida las condiciones experimentales y permite realizar las comparaciones con la actividad de los nuevos derivados.

De acuerdo con los resultados de la actividad contra *M. tuberculosis*, así como de la evaluación citotóxica en la línea celular VERO, se identificó que la introducción de sustituyentes aromáticos nitrogenados como la isoquinolina mejoraron la actividad del AmDG reflejándose en la disminución de la CMI tanto para la cepa sensible como para la cepa resistente, por otro lado, el efecto en la potencia se relaciona con la afinidad con los blancos terapéuticos propuestos; la inhibición de las enzimas IpdAB CoA transferasa y DXR. No obstante, al no haber una mejora en la selectividad celular sugiere que estos nuevos grupos funcionales podrían favorecer interacciones con células eucarióticas. Este comportamiento podría explicarse debido a sus características físicoquímicas ya que como se observó previamente en el análisis *in silico*, los nuevos sustituyentes tienen un aumento en el log P favoreciendo la afinidad a membranas y las interacciones hidrofóbicas tales como $\pi \rightarrow \pi$ y $\pi \rightarrow \text{catión}$ las cuales permiten interacciones no específicas (Cappoen *et al.*, 2012). Aunado a esto, los resultados de SwissADME Protox II, advierten sobre la toxicidad de estos derivados, lo cual nos indica que, la introducción de estos nuevos sustituyentes mejoró la actividad contra *M. tuberculosis* no mejora la selectividad; sugiriendo la necesidad de optimizar los parámetros estructurales relacionados con la selectividad biológica, con el objetivo de conservar la actividad antimicrobiana y minimizar los efectos citotóxicos.

5.8 Disposición de los residuos generados

La disposición de residuos se realizará de acuerdo con la clasificación propuesta por la UANL, como se enlista a continuación.

Tabla 21. Disposición de los residuos de acuerdo con la clasificación de la UANL.

Recipiente Tipo A	Solución salina pH 6-8, soluciones de sales orgánicas, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y bases inorgánicas.
Recipiente Tipo B	Sólidos y sales inorgánicas.
Recipiente Tipo C	Sólidos tóxicos e inflamables.
Recipiente Tipo D	Tóxicos e inflamables, combinaciones orgánicas, halogenados líquidos, bases orgánicas y aminas, solventes orgánicos y halogenados.
Recipiente Tipo E	Muy tóxico cancerígeno inorgánico.
Recipiente Tipo F	Sales de metales preciosos.
Recipiente Tipo G	Combinaciones orgánicas sólidas.
Recipiente Tipo H	Oxidantes

6. CONCLUSIONES

1. Los estudios de diseño asistido de fármacos asistido por computadora permitieron identificar derivados del *AmDG* con afinidad relevante hacia las enzimas IpdAB CoA transferasa y DXR. Presentando al derivado **EBS-7B** como el derivado que podría tener dos blancos potenciales para *M. tuberculosis* inhibiendo a las enzimas CoA transferasa y DXR, siendo el derivado con mejor calificación de acoplamiento para ambas enzimas.
2. El análisis farmacocinético y toxicológico *in silico* mostró que los derivados **EBS-1A**, **EBS-1B** y **EBS-3A** presentan el mejor perfil de absorción, biodisponibilidad y menor riesgo toxicológico, siendo los derivados con modificaciones estructurales de menor tamaño y por ende menor lipofilicidad.
3. Se logró la semisíntesis de seis derivados **EBS-1B**, **EBS-3A**, **EBS-3B**, **EBS-6B**, **EBS-7B** y **EBS-8B** los cuales se caracterizaron mediante espectroscopia de RMN ¹H, RMN ¹³C y HRMS. Los derivados que tuvieron mayor porcentaje de rendimiento fueron los derivados **EBS-1B** y **EBS-6B** lo que sugiere buena viabilidad sintética.
4. Los ensayos biológicos *in vitro* demostraron que el derivado **EBS-8B** (isoquinolina) presentó mejor actividad antimicobacteriana de la serie presentando una CMI inferiores a las del *AmDG* 6.25 y 12.5 µg/mL para H37Rv (cepa sensible) y G117 (cepa resistente) respectivamente, además presenta un IS mayor a 1 en ambas cepas, sugiriendo ser un derivado que favorece su selectividad frente a *M. tuberculosis*. mejorando la actividad respecto al *AmDG*.

5. Por otra parte, el derivado que presentó mejor actividad *in vitro* fue el derivado **EBS-8B**, este derivado se encontraba dentro de los prometedores debido a la interacción con la enzima IpdAB CoA.
6. Las características de estos sustituyentes aromáticos nitrogenados como la isoquinolina contribuyeron a mejorar la actividad antimicobacteriana respecto al AmDG, sin embargo, hay que hacer mejoras en su estructura para mejorar parámetros como solubilidad, la biodisponibilidad y perfil de seguridad ya que los derivados que son de mayor tamaño, log P, y peso molecular, son aquellos que presentan menor biodisponibilidad mayor probabilidad de toxicidad con los derivados disustituídos como la dibencilamina, isoquinolina y bencilbenzimidazol, probablemente por la capacidad que tiene de formar mayor cantidad de interacciones $\pi \rightarrow \pi$ que si bien son interacciones débiles permiten la interacción por tamaño y acomodo dentro de un sitio activo.
7. Los resultados obtenidos permiten aceptar parcialmente la hipótesis planteada, ya que al menos uno de los derivados evaluados (**EBS-8B**) mostró una actividad contra *M. tuberculosis* y un perfil de citotoxicidad aceptable, sugiriéndolo como un candidato promisorio para el desarrollo de nuevos fármacos contra la tuberculosis.

7. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados de este trabajo se propone la optimización estructural del derivado **EBS-8B** para mejorar parámetros tales como solubilidad ajustando lipofilicidad para mejorar la biodisponibilidad y de esta manera reducir posibles riesgos toxicológicos.

Validar experimentalmente el mecanismo de acción propuesto confirmando la inhibición enzimática directa sobre IpdAB CoA transferasa y 1-deoxy-D-xilulosa-5-fosfato reducto isomerasa con el objetivo de relacionar de manera directa la afinidad teórica y el efecto biológico.

Así mismo, se propone realizar un análisis de relación estructura-actividad enfocado a comprender por qué, a pesar de las modificaciones estructurales introducidas, la citotoxicidad se mantiene. Este análisis permitirá identificar los elementos estructurales responsables del balance entre la actividad antimicobacteriana y selectividad.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2024 Global tuberculosis report. (n.d.).

Adnan Hameed, H. M., Tan, Y., Mahmudul Islam, M., Guo, L., Chhotaray, C., Wang, S., Liu, Z., Gao, Y., Tan, S., Wai Yew, W., Zhong, N., Liu, J., Zhang, T., Guangzhou, P., & Liu Guangzhou, J. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of levofloxacin-and moxifloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in southern China. *J Thorac Dis*, 11(11), 4613–4625. <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.11.03>

Agu, P. C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezeh, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., Ugwuja, E. I., & Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>

ARUN KUMAR MS, RAJESH M, & SUBRAMANIAN L. (2023). Solubility enhancement techniques: A comprehensive review. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*, 13(3), 414–149. <https://doi.org/10.30574/wjbphs.2023.13.3.0125>

Asakawa, N., Kobayashi, S., Goto, J., & Hirayama, N. (2012). AutoGPA: An Automated 3D-QSAR Method Based on Pharmacophore Alignment and Grid Potential Analysis. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/498931>

Bakchi, B., Krishna, A. D., Sreecharan, E., Ganesh, V. B. J., Niharika, M., Maharshi, S., Puttagunta, S. B., Sigalapalli, D. K., Bhandare, R. R., & Shaik, A. B. (2022). An overview on applications of SwissADME web tool in the design and development of anticancer, antitubercular and antimicrobial agents: A medicinal chemist's perspective. *Journal of Molecular Structure*, 1259, 132712. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132712>

Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018). ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W257–W263. <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>

Bender, B. J., Gahbauer, S., Lutgens, A., Lyu, J., Webb, C. M., Stein, R. M., Fink, E. A., Balius, T. E., Carlsson, J., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2021). A practical guide to large-scale docking. In *Nature Protocols* (Vol. 16, Issue 10, pp. 4799–4832). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00597-z>

Bento, A. P., Gaulton, A., Hersey, A., Bellis, L. J., Chambers, J., Davies, M., Krüger, F. A., Light, Y., Mak, L., McGlinchey, S., Nowotka, M., Papadatos, G., Santos, R., & Overington, J. P. (2014). The ChEMBL bioactivity database: an update.

Nucleic Acids Research, 42(D1), D1083–D1090.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1031>

- Björkelid, C., Bergfors, T., Unge, T., Mowbray, S. L., & Jones, T. A. (2012). Structural studies on *Mycobacterium tuberculosis* DXR in complex with the antibiotic FR-900098. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 68(2), 134–143. <https://doi.org/10.1107/S0907444911052231>
- Bussi Claudio, & Gutierrez Maximiliano G. (2019). *Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells in space and time. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 43, Issue 4, pp. 341–361). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz006>
- Cedraro, N., Cannalire, R., Astolfi, A., Mangiaterra, G., Felicetti, T., Vaiasicca, S., Cernicchi, G., Massari, S., Manfroni, G., Tabarrini, O., Cecchetti, V., Barreca, M. L., Biavasco, F., & Sabatini, S. (2021). From Quinoline to Quinazoline-Based *S. aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors by Coupling a Focused Scaffold Hopping Approach and a Pharmacophore Search. *ChemMedChem*, 16(19), 3044–3059. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100282>
- Chávez-Villarreal, K. G., García, A., Romo-Mancillas, A., Garza-González, E., de Torres, N. W., Miranda, L. D., Moo-Puc, R. E., Chale-Dzul, J., & del Rayo Camacho-Corona, M. (2018). Synthesis, antimycobacterial evaluation, and QSAR analysis of meso-dihydroguaiaretic acid derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 27(4), 1026–1042. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2125-1>
- Chofor, R., Risseuw, M., Pouyez, J., Johnny, C., Wouters, J., Dowd, C., Couch, R., & Van Calenbergh, S. (2014). Synthetic Fosmidomycin Analogues with Altered Chelating Moieties Do Not Inhibit 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase or *Plasmodium falciparum* Growth In Vitro. *Molecules*, 19(2), 2571–2587. <https://doi.org/10.3390/molecules19022571>
- Clemente-Soto, A. F., Balderas-Rentería, I., Rivera, G., Segura-Cabrera, A., Garza-González, E., & Del Rayo Camacho-Corona, M. (2014). Potential mechanism of action of meso-dihydroguaiaretic acid on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Molecules*, 19(12), 20170–20182. <https://doi.org/10.3390/molecules191220170>
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- Courtens, C., Risseuw, M., Caljon, G., Cos, P., Martin, A., & Van Calenbergh, S. (2019). Phosphonodiamidate prodrugs of N-alkoxy analogs of a fosmidomycin surrogate as antimalarial and antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(9), 1051–1053. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.03.008>

- Cramer, R. D., Patterson, D. E., & Bunce, J. D. (1988). Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 110(18), 5959–5967. <https://doi.org/10.1021/ja00226a005>
- Crowe, A. M., Workman, S. D., Watanabe, N., Worrall, L. J., Strynadka, N. C. J., & Eltis, L. D. (2018). IpdAB, a virulence factor in *Mycobacterium tuberculosis*, is a cholesterol ring-cleaving hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(15), E3378–E3387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717015115>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Daina, A., & Zoete, V. (2019). Application of the SwissDrugDesign Online Resources in Virtual Screening. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4612. <https://doi.org/10.3390/ijms20184612>
- Das, D. R., Kumar, D., Kumar, P., & Dash, B. P. (2020). Molecular docking and its application in search of antisickling agent from *Carica papaya*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(1), 105–116. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80117>
- del Olmo, E., Molina-Salinas, G. M., Escarcena, R., Alves, M., López-Pérez, J. L., Hernandez-Pando, R., Said-Fernández, S., & Feliciano, A. S. (2009). Simple dihydrospingosine analogues with potent activity against MDR-*Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(19), 5764–5768. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.147>
- Domínguez, J., Boettger, E. C., Cirillo, D., Cobelens, F., Eisenach, K. D., Gagneux, S., Hillemann, D., Horsburgh, R., Molina-Moya, B., Niemann, S., Tortoli, E., Whitelaw, A., & Lange, C. (2016). Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(1), 24–42. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0221>
- Ejalonibu, M. A., Ogundare, S. A., Elrashedy, A. A., Ejalonibu, M. A., Lawal, M. M., Mhlongo, N. N., & Kumalo, H. M. (2021a). Drug Discovery for *Mycobacterium tuberculosis* Using Structure-Based Computer-Aided Drug Design Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13259. <https://doi.org/10.3390/ijms222413259>
- Ejalonibu, M. A., Ogundare, S. A., Elrashedy, A. A., Ejalonibu, M. A., Lawal, M. M., Mhlongo, N. N., & Kumalo, H. M. (2021b). Drug Discovery for *Mycobacterium tuberculosis* Using Structure-Based Computer-Aided Drug Design Approach.

- International Journal of Molecular Sciences, 22(24), 13259.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413259>
- Favela-Hernández, J. M. J., García, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., & Camacho-Corona, M. R. (2012). Antibacterial and antimycobacterial lignans and flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytotherapy Research*, 26(12), 1957–1960. <https://doi.org/10.1002/ptr.4660>
- Foscolos, A.-S., Papanastasiou, I., Tsoinias, A., Kolocouris, N., Foscolos, G. B., Vocat, A., & Cole, S. T. (2017). Synthesis of Adamantane Aminoethers with Antitubercular Potential. *Medicinal Chemistry*, 13(7). <https://doi.org/10.2174/1573406413666170125112709>
- Guan, B., Zhang, C., & Ning, J. (2016). EDGA: A Population Evolution Direction-Guided Genetic Algorithm for Protein–Ligand Docking. *Journal of Computational Biology*, 23(7), 585–596. <https://doi.org/10.1089/cmb.2015.0190>
- Guttman, Y., & Kerem, Z. (2022). Dietary Inhibitors of CYP3A4 Are Revealed Using Virtual Screening by Using a New Deep-Learning Classifier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(8), 2752–2761. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.2C00237/ASSET/IMAGES/LARGE/JF2C00237_0005.JPEG
- Henriksson, L. M., Björkelid, C., Mowbray, S. L., & Unge, T. (2006). The 1.9 Å resolution structure of *Mycobacterium tuberculosis* 1-deoxy- β -D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a potential drug target. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 62(7), 807–813. <https://doi.org/10.1107/S0907444906019196>
- Hiroaki Iwata. (2023). Application of in Silico Technologies for Drug Target Discovery and Pharmacokinetic Analysis. *Chem. Pharm. Bull.* , 71(6), 398–405.
- Hunter, W. N. (2007). The Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Precursor Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21573–21577. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700005200>
- Jackson, E. R., & Dowd, C. S. (2012). Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase (Dxr): A Review of the Synthesis and Biological Evaluation of Recent Inhibitors. In *Current Topics in Medicinal Chemistry* (Vol. 12).
- Kanabalan, R. D., Lee, L. J., Lee, T. Y., Chong, P. P., Hassan, L., Ismail, R., & Chin, V. K. (2021). Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. In *Microbiological Research* (Vol. 246, p. 126674). *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674>
- Karajgi, S., Hajeri, S., & Potadar, S. (2022). Utilization of Hydrotropic Solubilisation Technique for Quantitative Studies of Dexamethasone in Pharmaceutical

- preparations. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 15(12), 5785–5788. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2022.00976>
- Knak, T., Abdullaziz, M. A., Höfmann, S., Alves Avelar, L. A., Klein, S., Martin, M., Fischer, M., Tanaka, N., & Kurz, T. (2022). Over 40 Years of Fosmidomycin Drug Research: A Comprehensive Review and Future Opportunities. In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph15121553>
- Koppisch, A. T., Fox, D. T., Blagg, B. S. J., & Poulter, C. D. (2002). E. coli MEP Synthase: Steady-State Kinetic Analysis and Substrate Binding. *Biochemistry*, 41(1), 236–243. <https://doi.org/10.1021/bi0118207>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- Lopes, K., Lucena, M., Lopes, T. I., da Silva, Á., da Silva, L., Monteiro, N., de Lima-Neto, P., & Ricardo, N. (2024). In silico and Experimental Assessments Applied to Preliminary Identification of New Illicit Substances Structures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230090>
- Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R. P. M., Schulz, H., Dale, G. E., Douangamath, A., Proteau, P. J., & Oefner, C. (2005). The Crystal Structure of E.coli 1-Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase in a Ternary Complex with the Antimalarial Compound Fosmidomycin and NADPH Reveals a Tight-binding Closed Enzyme Conformation. *Journal of Molecular Biology*, 345(1), 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.030>
- Maestro | Schrödinger. (n.d.). Retrieved June 6, 2025, from <https://www.schrodinger.com/platform/products/maestro/>
- Maia, E. H. B., Assis, L. C., de Oliveira, T. A., da Silva, A. M., & Taranto, A. G. (2020). Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. *Frontiers in Chemistry*, 8(343). <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00343>
- Mallick, J. S., Nair, P., Abbew, E. T., Van Deun, A., & Decroo, T. (2022). Acquired bedaquiline resistance during the treatment of drug-resistant tuberculosis: a systematic review. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 4(2), 1–13. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac029>
- Mayr, A., Klambauer, G., Unterthiner, T., & Hochreiter, S. (2016). DeepTox: Toxicity Prediction using Deep Learning. *Frontiers in Environmental Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00080>

- Mereškevičienė, R., & Danila, E. (2025). The Adverse Effects of Tuberculosis Treatment: A Comprehensive Literature Review. *Medicina*, 61(5), 911. <https://doi.org/10.3390/MEDICINA61050911>
- Miclo, A., & Germain, P. (1990). Catabolism of methylperhydroindanedione propionate by *Rhodococcus equi*: evidence of a MEPHIP-reductase activity. In *Appl Microbiol Biotechnol* (Vol. 32).
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular Docking (pp. 365–382). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Pandey, B., Grover, S., Kaur, J., & Grover, A. (2019). Analysis of mutations leading to para-aminosalicylic acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*, 9(1), 13617. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48940-5>
- Pratt, V. M., Cavallari, L. H., Del Tredici, A. L., Gaedigk, A., Hachad, H., Ji, Y., Kalman, L. V., Ly, R. C., Moyer, A. M., Scott, S. A., van Schaik, R. H. N., Whirl-Carrillo, M., & Weck, K. E. (2021). Recommendations for Clinical CYP2D6 Genotyping Allele Selection: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, College of American Pathologists, Dutch Pharmacogenetics Working Group of the Royal Dutch Pharmacists Association, and the European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy. *Journal of Molecular Diagnostics*, 23(9), 1047–1064. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.05.013>
- Proteau, P. J. (2004). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: An overview. In *Bioorganic Chemistry* (Vol. 32, Issue 6, pp. 483–493). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2004.08.004>
- Ragno, R. (2019). www.3d-qsar.com: A Portal to Build 3-D QSAR Models. The 2nd Molecules Medicinal Chemistry Symposium (MMCS): Facing Novel Challenges in Drug Discovery, 76. <https://doi.org/10.3390/proceedings2019022076>
- Raies, A. B., & Bajic, V. B. (2016). In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *WIREs Computational Molecular Science*, 6(2), 147–172. <https://doi.org/10.1002/wcms.1240>
- Rengarajan, J., Bloom, B. R., & Rubin, E. J. (2005). Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. In *PNAS* June (Vol. 7, Issue 23). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503272102
- Reyes-Melo, K., García, A., Romo-Mancillas, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., Miranda, L. D., Vargas-Villarreal, J., Favela-Hernández, J. M. J., & Camacho-Corona, M. del R. (2017). meso-Dihydroguaiaretic acid derivatives with antibacterial and antimycobacterial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(20), 5247–5259. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.047>

- Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports*, 16(5), 565–574. <https://doi.org/10.1039/a709175c>
- Roskoski, R. (2023). Rule of five violations among the FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacological Research*, 191, 106774. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106774>
- Shi, Y., Colombo, C., Kuttiyatveetil, J. R. A., Zalatar, N., van Straaten, K. E., Mohan, S., Sanders, D. A. R., & Pinto, B. M. (2016). A Second, Druggable Binding Site in UDP-Galactopyranose Mutase from *Mycobacterium tuberculosis*? *ChemBioChem*, 17(23), 2264–2273. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600469>
- Shim, D., Kim, H., & Shin, S. J. (2020). *Mycobacterium tuberculosis* Infection-Driven Foamy Macrophages and Their Implications in Tuberculosis Control as Targets for Host-Directed Therapy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00910>
- Singh, P., Rameshwaram, N. R., Ghosh, S., & Mukhopadhyay, S. (2018). Cell envelope lipids in the pathophysiology of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Future Microbiology* (Vol. 13, Issue 6, pp. 689–710). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0135>
- Singh, R., Dwivedi, S. P., Gaharwar, U. S., Meena, R., Rajamani, P., & Prasad, T. (2020). Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 128, Issue 6, pp. 1547–1567). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jam.14478>
- Singh, V., & Chibale, K. (2021). Strategies to Combat Multi-Drug Resistance in Tuberculosis. *Accounts of Chemical Research*, 54(10), 2361–2376. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00878>
- Torres, P. H. M., Sodero, A. C. R., Jofily, P., & Silva-Jr, F. P. (2019). Key topics in molecular docking for drug design. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20184574>
- Tosco, P., & Balle, T. (2011). Open3DQSAR: a new open-source software aimed at high-throughput chemometric analysis of molecular interaction fields. *Journal of Molecular Modeling*, 17(1), 201–208. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0684-x>
- van der Geize, R., Grommen, A. W. F., Hessels, G. I., Jacobs, A. A. C., & Dijkhuizen, L. (2011). The steroid catabolic pathway of the intracellular pathogen *rhodococcus equi* is important for pathogenesis and a target for vaccine development. *PLoS Pathogens*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002181>

- Van Der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M. H., Hara, H., Anderton, M. C., Sim, E., Dijkhuizen, L., Davies, J. E., Mohn, W. W., & Eltis, L. D. (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Vázquez Ramírez Ana Laura, García Zepeda Edgar Abraham, & Camacho Corona María del Rayo. (2018). SÍNTESIS DE NUEVOS ÉSTERES Y FOSFATOS DEL ÁCIDO meso-DIHIIDROGUAIARÉTICO; DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD CONTRA BACTERIAS RESISTENTES Y *Mycobacterium tuberculosis* ASI COMO SU INTERACCIÓN CON LA ENZIMA DXR in silico.
- Velayati, A. A., Farnia, P., & Hoffner, S. (2018). Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Epidemiology and role of morphological alterations. In *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 12, pp. 192–196). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.006>
- Vlachou, M., Siamidi, A., Diamantidi, E., Iliopoulou, A., Papanastasiou, I., Ioannidou, V., Kourbeli, V., Foscolos, A. S., Vocat, A., Cole, S. T., Karalis, V., Kellici, T., & Mavromoustakos, T. (2017). In vitro Controlled Release from Solid Pharmaceutical Formulations of two new Adamantane Aminoethers with Antitubercular Activity (I). *Drug Research*, 67(8), 447–450. <https://doi.org/10.1055/s-0042-121491>
- Vuppalanchi, R. (2011). Metabolism of Drugs and Xenobiotics. *Practical Hepatic Pathology: A Diagnostic Approach A Volume in the Pattern Recognition Series*, Expert Consult: Online and Print, 45–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06803-4.00004-6>
- Wang, G., Bai, Y., Cui, J., Zong, Z., Gao, Y., & Zheng, Z. (2022). Computer-Aided Drug Design Boosts RAS Inhibitor Discovery. *Molecules*, 27(17), 5710. <https://doi.org/10.3390/molecules27175710>
- Wang, Y.-L., Wang, F., Shi, X.-X., Jia, C.-Y., Wu, F.-X., Hao, G.-F., & Yang, G.-F. (2021). Cloud 3D-QSAR: a web tool for the development of quantitative structure–activity relationship models in drug discovery. *Briefings in Bioinformatics*, 22(4). <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa276>
- Afonso, R. C.; Yien, R. M. K.; de Oliveira de Siqueira, L. B.; Simas, N. K.; dos Santos Matos, A. P.; Ricci-Júnior, E. *Exp. Parasitol.* 2023, 251, 108554. DOI: 10.1016/j.exppara.2023.108554.
- Sureram, S.; Senadeera, S.; Hongmanee, P.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Tiliacora triandra* against multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.

- Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012, 22 (8), 2902–2905. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.02.053.
- Liu, C.; Zhao, X.; Wang, L.; Yang, Z. Quinoline Derivatives as Potential Anti-Tubercular Agents: Synthesis, Molecular Docking and Mechanism of Action. Microb. Pathog. 2022, 165, 105507. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105507.
- Bellapukonda, S. M.; Singothu, S.; Singampalli, A.; Bandela, R.; Kumar, P.; Yaddanapudi, V. M.; Bhandari, V.; Nanduri, S.; Enneymy, M. F. Exploring spirocyclic isoquinoline-piperidine compounds in tuberculosis therapy: ADMET profiling, docking, DFT, MD simulations, and MMGBSA analysis. Comput. Biol. Chem. 2025, 118, 108447. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2025.108447.
- Cappoen, D.; Jacobs, J.; Nguyen Van, T.; Claessens, S.; Diels, G.; Anthonissen, R.; Einarsdóttir, T.; Fauville, M.; Verschaeve, L.; Huygen, K.; De Kimpe, N. Straightforward Palladium-Mediated Synthesis and Biological Evaluation of Benzo[j]phenanthridine-7,12-diones as Anti-Tuberculosis Agents. Eur. J. Med. Chem. 2012, 48, 57–68. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.11.033.

9. ANEXOS

9.1 Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-1B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 553.39869$ consistente con la formula molecular.

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data:EBS-1B-

Sample Name:

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 1..1)

Acquired:10/9/2024 1:50:28 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:CAL_PEG_600_JEOL_8-OCT-2...

Created:10/9/2024 3:38:11 PM

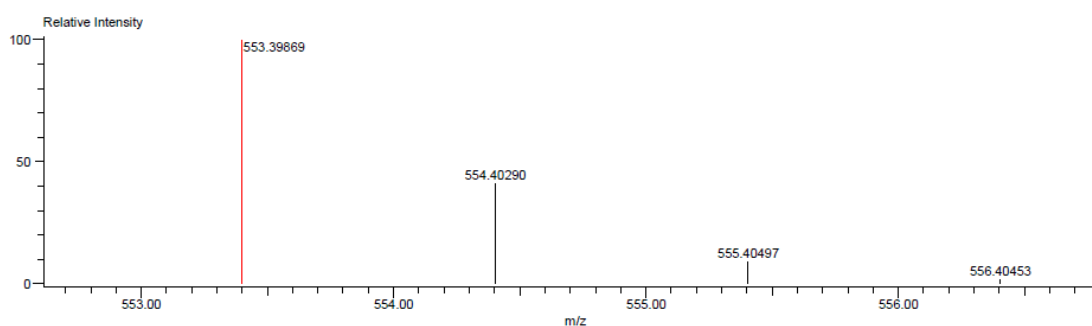
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:5.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu)

Unsaturation Number:-1.5 .. 100.0 (Fraction:Both)

Element:¹²C:0 .. 60, ¹H:0 .. 70, ¹⁴N:2 .. 2, ¹⁶O:0 .. 4



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
553.39869	379147.50	553.40053	-1.84	-3.32	¹² C ₃₄ ¹ H ₅₃ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₄	9.5

9.2 Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-3A, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 556.31246$ consistente con la formula molecular.

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data:EBS-3A-

Sample Name:

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 1..1)

Acquired:10/9/2024 1:37:14 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:CAL_PEG_600_JEOL_8-OCT-2...

Created:10/9/2024 2:25:30 PM

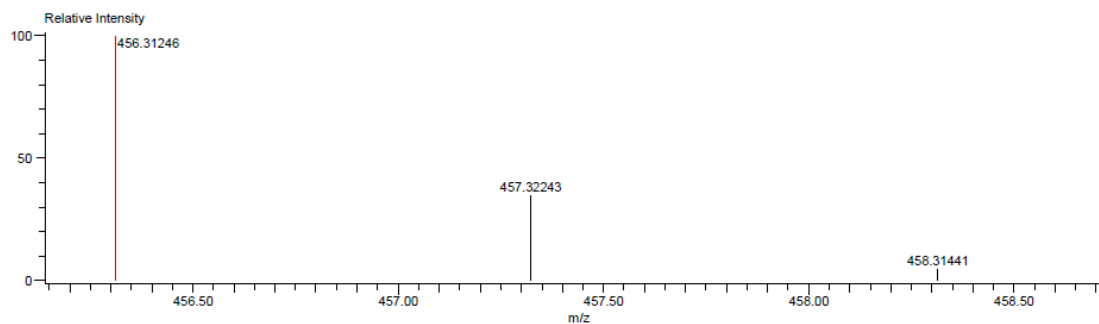
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:5.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu)

Unsaturation Number:-1.5 .. 100.0 (Fraction:Both)

Element:¹²C:0 .. 60, ¹H:0 .. 60, ¹⁴N:0 .. 1, ¹⁶O:0 .. 4



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
456.31246	8458.50	456.31138	1.08	2.36	¹² C ₂₈ ¹ H ₄₂ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₄	8.5

9.3 Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-3B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 581.42906$ consistente con la formula molecular.

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

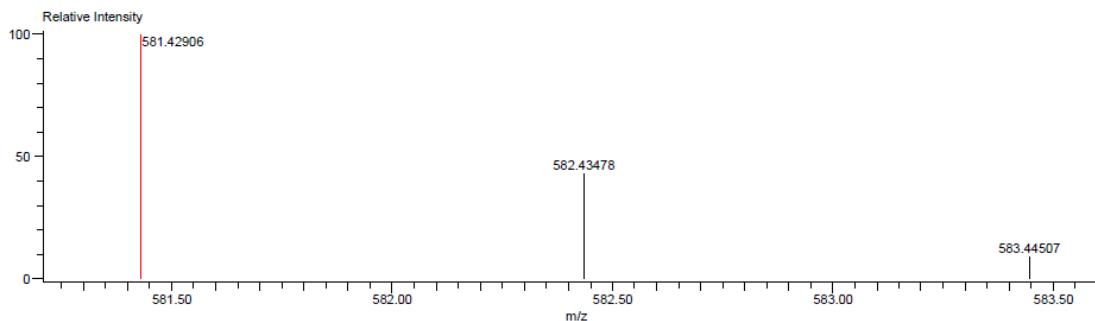
Data:EBS 3b
Sample Name:
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 2..2)

Acquired:10/10/2024 11:20:30 AM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:CAL_PEG_600_JEOL_8-OCT-2...
Created:10/10/2024 11:56:59 AM
Created by:

Charge number:1
Element: $^{12}\text{C}:0 \dots 50$, $^1\text{H}:0 \dots 70$, $^{14}\text{N}:0 \dots 2$, $^{16}\text{O}:0 \dots 6$

Tolerance:4.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu)

Unsaturation Number:-1.5 .. 100.0 (Fraction:Both)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
581.42906	60544.12	581.43183	-2.78	-4.77	$^{12}\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_4$	9.5

9.4 Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-6B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 777.45947$ consistente con la formula molecular.

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

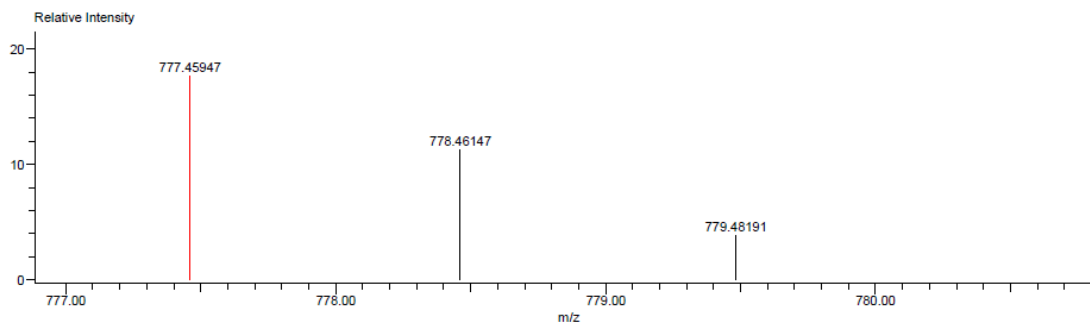
Data:EBS-6B-
Sample Name:
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 2..2)

Acquired:10/9/2024 1:55:58 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:CAL_PEG_600_JEOL_8-OCT-2...
Created:10/9/2024 3:35:22 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1
Element: $^{12}\text{C}:0 \dots 60$, $^1\text{H}:0 \dots 70$, $^{14}\text{N}:2 \dots 2$, $^{16}\text{O}:0 \dots 4$

Tolerance:5.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu)

Unsaturation Number:-1.5 .. 100.0 (Fraction:Both)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
777.45947	32886.51	777.46313	-3.66	-4.70	$^{12}\text{C}_{52}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}_4$	23.5

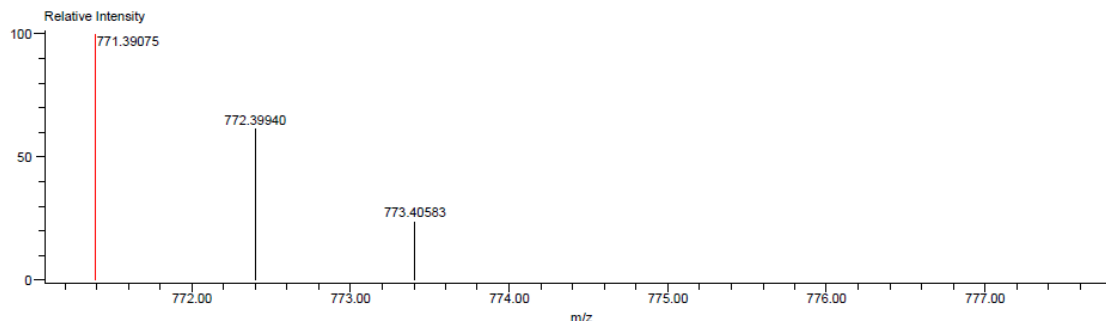
9.5 Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-7B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 771.39075$ consistente con la formula molecular.

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data: EBS-7B
Sample Name: DR Rodriguez Braulio / Operador: Carmen Garcia
Description:
Ionization Mode: ESI+
History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 30, Area]; Correct Base [5.0%]; Correct Base [5.0%]; Average (MS [1] 1..1)

Acquired: 10/9/2024 8:22:48 AM
Operator: AccuTOF
Mass Calibration data: CAL_PEG_600_JEOL_8-OCT-2...
Created: 10/11/2024 3:43:54 PM
Created by: AccuTOF

Charge number: 1 Tolerance: 1.00 (ppm), 5.00 .. 15.00 (mmu) Unsaturation Number: 0.0 .. 100.0 (Fraction: .5)
Element: ^{12}C : 0 .. 50, ^1H : 0 .. 60, ^{14}N : 0 .. 4, ^{16}O : 0 .. 4



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
771.39075	33603.00	771.39103	-0.28	-0.38	$^{12}\text{C}_{50}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_4$	27.5

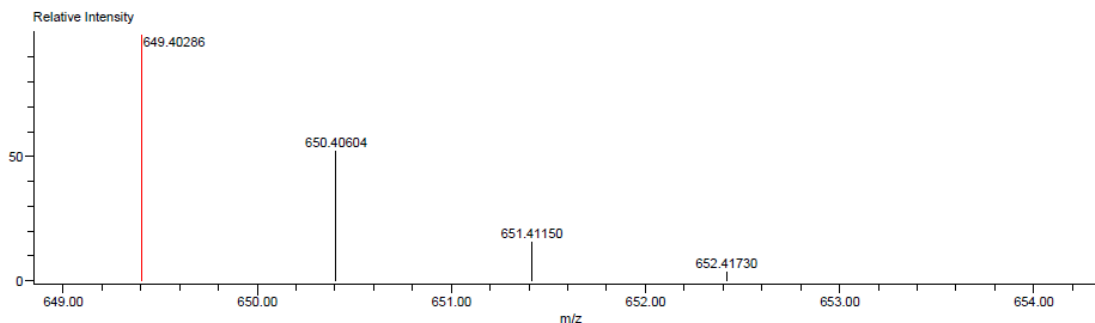
9.6 Espectro de masas (HRMS) del derivado EBS-8B, donde se observa el ion molecular $[M+H]^+$ en $m/z = 649.40286$ consistente con la formula molecular.

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data: EBS-8B
Sample Name: DR Rodriguez Braulio / Operador: Carmen Garcia
Description:
Ionization Mode: ESI+
History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 30, Area]; Correct Base [5.0%]; Correct Base [5.0%]; Average (MS [1] 1..1)

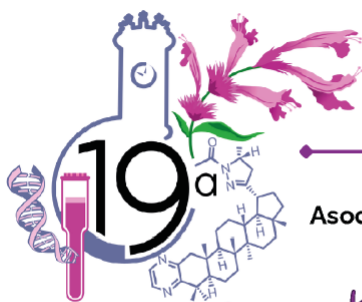
Acquired: 10/9/2024 8:16:19 AM
Operator: AccuTOF
Mass Calibration data: CAL_PEG_600_JEOL_8-OCT-2...
Created: 10/9/2024 1:18:34 PM
Created by: AccuTOF

Charge number: 1 Tolerance: 200.00 (ppm), 5.00 .. 15.00 (mmu) Unsaturation Number: -1.5 .. 100.0 (Fraction: Both)
Element: ^{12}C : 0 .. 42, ^1H : 0 .. 54, ^{14}N : 0 .. 2, ^{16}O : 0 .. 4



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
649.40286	214294.08	649.40053	2.32	3.58	$^{12}\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_4$	17.5

9.7 Divulgación



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Amipronat
Asociación Mexicana de Investigación
en Productos Naturales

La Universidad Autónoma del Estado de Morelos y la
Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, A. C.

Otorgan la presente

Constancia

A: Evelin Guadalupe Butanda Serrano, Rubén Antonio Romo Mancillas, Christian Jair Pérez Silva, Edgar Abraham García Zepeda, Verónica Rivas Galindo, María del Rayo Camacho Corona

Por su valiosa participación en la modalidad **CARTEL** con el trabajo:

"Diseño *in silico* de nuevos aminoéteres derivados del AmDG con potencial actividad contra *M. tuberculosis*"

durante la **19ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales** | **Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega;** que se llevó a cabo del **22 al 25 de mayo de 2024**.
Cuernavaca, Morelos, México.

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo
Presidenta de la AMIPRONAT

Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica
Presidenta del Comité Local Organizador