

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



TESIS

**Síntesis y caracterización de nuevas amidas y oxazolinas α,β -insaturadas:
determinación de su actividad antituberculosa *in vitro* y posible
mecanismo de acción del compuesto más activo.**

Presenta

M. C. Francisco Guadalupe Avalos Alanís

**Como requisito para la obtención del grado de
Doctorado en Ciencias con Orientación en Farmacia**

Diciembre de 2014



TESIS DE INVESTIGACIÓN

Síntesis y caracterización de nuevas amidas y oxazolininas α,β -insaturadas: determinación de su actividad antituberculosa *in vitro* y posible mecanismo de acción del compuesto más activo.

Presentado por

M. C. Francisco Guadalupe Avalos Alanís

**Como requisito para la obtención del grado de
Doctorado en Ciencias con Orientación en Farmacia**

Director de Tesis

Dr. Eugenio Hernández Fernández (FCQ-UANL)

Co-Directores de tesis

Dra. María del Pilar Carranza Rosales (CIBIN-IMSS)

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos (FCQ-UANL)

Lugar de Realización

- Laboratorio de Química Industrial-Facultad de Ciencias Químicas-UANL.
 - Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste-IMSS.
 - Laboratorio de Micobacterias. Laboratorio Estatal de Salud.
 - Instituto BIO5-Universidad de Arizona, E.U.

Diciembre de 2014

**Síntesis y caracterización de nuevas amidas y oxazolinas α,β -
insaturadas: determinación de su actividad antituberculosa *in vitro* y
posible mecanismo de acción del compuesto más activo.**

Aprobación de la tesis:

Dr. Eugenio Hernández Fernández.
Director de Tesis.

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas.
Comité Tutorial.

Dra. Susana Thelma López Cortina.
Comité Tutorial.

Dr. Víctor Rosas García.
Comité Tutorial.

Dra. Aracely Hernández Ramírez.
Subdirectora de Estudios de Posgrado.

RESUMEN

Francisco Guadalupe Avalos Alanís. Fecha de Graduación: Febrero, 2015
Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Ciencias Químicas.

Título del Estudio: **Síntesis y caracterización de nuevas amidas y oxazolininas α,β -insaturadas: determinación de su actividad antituberculosa *in vitro* y posible mecanismo de acción del compuesto más activo.**

Número de páginas: 138

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

Área de Estudio: Farmacia

□ **Propósito y Método de Estudio:** La síntesis orgánica asimétrica es una disciplina ampliamente utilizada para la preparación y desarrollo de moléculas con propiedades químicas y farmacológicas diversas. Por lo tanto, en el presente proyecto de tesis se propuso llevar a cabo el diseño, síntesis y caracterización química de amidas y oxazolininas α,β -insaturadas, con potencial aplicación como nuevos fármacos para el tratamiento de la tuberculosis. Utilizar la técnica de Alamar Azul para la determinación de la actividad antituberculosa, además de evaluar la actividad hepatotóxica sobre rebanadas de tejido de rata, así como realizar un microarreglo de ADN para determinar una posible vía de acción de este tipo de moléculas sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Contribuciones y Conclusiones: Se lograron sintetizar y caracterizar 8 hidroxiamidas α,β -insaturadas, así como 10 oxazolininas α,β -insaturadas, a partir del aminoácido (*S*)-fenilalanina, de las cuales se probaron 7 de cada una (análogos) ante *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, así como ante una cepa resistente a los fármacos de primera línea, resultando en CMI menores o iguales a 16 $\mu\text{g/mL}$ para todos los casos estudiados, además de que no presentaron actividad hepatotóxica relevante *ex vivo*, factor importante en el desarrollo de nuevo fármacos. Finalmente se determinó un posible mecanismo de acción resultando que este tipo de moléculas probablemente presentan actividad sobre la proteína HU-HNS (HU histona de unión a nucleóide), repercutiendo en la inhibición de la transcripción y por ende en la síntesis de proteínas.

FIRMA DEL ASESOR: _____

Dr. Eugenio Hernández Fernández

Síntesis y caracterización de nuevas amidas y oxazolinas α,β -insaturadas: determinación de su actividad antituberculosa *in vitro* y posible mecanismo de acción del compuesto más activo.

**Presentado por:
M.C. Francisco Guadalupe Avalos Alanís**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química Industrial del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Eugenio Hernández Fernández, en el Laboratorio del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste del IMSS con la asesoría de la Dra. María del Pilar Carranza Rosales, en el Laboratorio de Micobacterias del Laboratorio Estatal de Salud Pública de la Secretaría de Salud de Nuevo León con la asesoría del Q.B.P Víctor Velázquez Moreno y en BIO5 Institute University of Arizona con la asesoría del Dr. Xristo Zárate Kalfópulos y el Dr. David W. Galbraith; con el apoyo de una beca (**número de becario 229881**) y recursos proporcionados por el proyecto **CB-101898** otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

Para que fuera posible el desarrollo del presente proyecto fue de suma importancia las cooperaciones académicas y personales, que influenciaron en el proyecto o bien en mi persona, facilitando en gran manera el andar del proyecto durante estos 3 años.

Primeramente quisiera agradecer a Dios por permitirme hacer lo que más me gusta y disfrutar al máximo estos 3 años; a toda mi familia, por su gran apoyo, amor, comprensión, paciencia y confianza en mí. Principalmente a mi mamá Enedelia Alanís, mi papá Francisco Avalos y mi hermana Mariela Avalos, que son mí orgullo y mis ganas de seguir. Gracias por compartir conmigo las etapas buenas y las no tan buenas superadas durante el proyecto. Gracias por ser tan incondicionales. Los amo a los tres.

Me gustaría agradecer también a mi asesor el Dr. Eugenio Hernández Fernández, por su gran dedicación, respeto y paciencia, hacia mí persona, y hacia el proyecto. Por ser tan profesional y a la vez un buen amigo cuando se le necesitaba. Por no dejarme sólo y ayudarme siempre que se lo solicitaba.

Gracias por ser “Tan Positivo”.

Quisiera también agradecer, a todos los doctores que de alguna u otra manera estuvieron presentes apoyándome en este proyecto para enriquecerlo, como lo son: Dr. Mario Ordoñez, Dr. Oscar García, Dra. Nancy, QBP Víctor Velázquez, QBP Alejandro Morales, IQ Federico Gamboa, a los Técnicos Angi y Felipe, así como a la señora Rafis, pero de manera especial quiero agradecer a la Dra. Pilar Carranza por compartir todos sus conocimientos, área, material y todo lo que hizo falta para poder cumplir los

objetivos inicialmente planteados, sin su apoyo el proyecto no hubiera sido concluido, mi más sincero agradecimiento. Finalmente al Dr. Xristo Zárate por apoyarme en el proceso de la estancia de investigación en la Universidad de Arizona, que fue difícil, pero me permitió conocer personas realmente valiosas con las cuales estaré muy agradecido siempre (Dr. David Galbraith, Dra. Jana Jandova y el Dr. Jaroslav Janda). Gracias por compartir su amistad, tiempo y conocimientos.

Una parte muy importante para mí, son los amigos, y en esta etapa de mi vida, me di cuenta de lo afortunado que soy por contar con personas tan valiosas a mi alrededor, que siempre estuvieron ahí, cuando más los necesitaba, que no me dejaron solo en los malos momentos, que me incluyeron en su grupo de amistades muchas gracias, Mayra, Eder, Ilse, Andrea (Todo LSO), Edith, Nohemí, Chelo (Biomédicas).

Gracias Ana Laura Gómez Lara, por aparecer en mí vida y hacerla tan especial.
“Siempre en mi mente”

Quiero externar un agradecimiento especial a la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como a la Facultad de Ciencias Químicas y a sus autoridades, por todos los bienes proporcionados, así como el apoyo para la realización de este proyecto.

Además quiero agradecer a CONACYT por el apoyo financiero otorgado.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis, a TODA mí FAMILIA.

A DIOS POR PERMITIRME SEGUIR AQUÍ

A todas aquellas personas que confían en mí.

Todas aquellas personas, que me aman.

Todas aquellas personas que me aprecian.

Todas aquellas personas, que son mi ejemplo a seguir.

Todas aquellas personas que están cerca de mí.

A todos los que me han enseñado, ayudado a crecer y ser mejor cada día.

TABLA DE CONTENIDO.

Contenido	Página
CAPÍTULO 1	1
<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	1
1.1 Tuberculosis	1
1.1.1 Problemática de la Tuberculosis.	1
1.1.2 Mecanismos de Resistencia.	2
1.1.3 Clasificación de Fármacos Antituberculosos.	3
1.1.4 Tratamiento	4
CAPÍTULO 2	5
<i>2. ANTECEDENTES</i>	5
2.1 Amidas y Oxazolinas.	5
2.2 Amidas α,β-insaturadas.	6
2.3 Oxazolinas	8
CAPÍTULO 3	14
3.1 Justificación	14
3.2 Hipótesis	14
3.3 Objetivo General.	14
3.4 Objetivos Específicos.	15
3.5 Metas	15
3.6 Aportación Científica.	15
CAPÍTULO 4	16
<i>4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.</i>	16
4.1 Metodología Sintética.	16
4.1.1 Información General.	17
4.1.2 Preparación de (S)-2-(2-bromoacetamido)-3-fenilpropanoato de metilo.	18
4.1.3 Preparación de (S)-2-(2-(dimetoxifosforil)acetamido)-3 fenilpropanoato de metilo.	18
4.1.4 Preparación de (S)-2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)-fosfonato de dimetilo.	19

4.1.5 Preparación de (S)-((4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)metil) fosfonato de dimetilo.	19
4.1.6 Preparación del (S)-(2-((1-bromo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)-fosfonato de dimetilo.	20
4.1.7 Preparación del (S)-((4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)metil) fosfonato de dimetilo a partir de la fosfobromoamida 43 .	21
4.1.8 Preparación del (S,E)-4-bencil-2-estiril-4,5-dihidrooxazol.	22
4.1.9 Procedimiento general I para la preparación de las hidroxiamidas α,β -insaturadas.	23
4.1.9.1 Preparación de la (S)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)cinamamida.	23
4.1.9.2 Preparación de la (S,E)-3-(4-clorofenil)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-acrilamida.	24
4.1.9.3 Preparación de la (S,E)-3-(4-fluorofenil)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-acrilamida.	25
4.1.9.4 Preparación de la (S,E)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-3-(4-metoxifenil)-acrilamida.	25
4.1.9.5 Preparación de la (S,E)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-3-(tiofen-2-il)acrilamida.	26
4.1.9.6 Preparación de la (S,E)-3-(4-(benciloxi)fenil)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida.	26
4.1.9.7 Preparación de la (S,E)-3-(4-(difenilamino)fenil)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida.	27
4.1.9.8 Preparación de la (S,E)-3-(furan-2-il)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida.	28
4.1.10 Procedimiento general II para la preparación de oxazolinas α,β -insaturadas.	28
4.1.10.1 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-estiril-4,5-dihidrooxazol.	29
4.1.10.2 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-clorostiril)-4,5-dihidrooxazol.	29
4.1.10.3 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-fluorostiril)-4,5-dihidrooxazol.	30
4.1.10.4 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-metoxistiril)-4,5-dihidrooxazol.	30
4.1.10.5 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)-4,5-dihidrooxazol.	31
4.1.10.6 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-(benciloxi)stiril)-4,5-dihidrooxazol.	31
4.1.10.7 Preparación de la (S,E)-4-(2-(4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)vinil)-N,N-difenilnilina.	32
4.1.10.8 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(2-(furan-2-il)vinil)-4,5-dihidrooxazol.	32
4.1.10.9 Preparación de la (S,E)-4-(2-(4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)vinil)benzoato de metilo.	33
4.1.11 Ruta alterna para la obtención de β -hidroxiamidas.	34
4.1.11.1 Preparación de ácido 2-(dietoxifosforil) acético.	34

4.1.11.2 Preparación de (S)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol.	34
4.1.11.3 Preparación de (S)-(2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo.	35
4.1.11.4 Preparación de (S)-(2-((1-bromo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo.	36
4.1.11.5 Preparación de (S)-((4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)metil) fosfonato de dietilo.	36
4.1.12 Procedimiento general III para la preparación de oxazolinas α,β -insaturados a partir de la fosfo-oxazolina 52 .	37
4.1.12.1 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-stiril-4,5-dihidrooxazol.	38
4.1.12.2 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-clorostiril)-4,5-dihidrooxazol.	38
4.1.12.3 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-fluorostiril)-4,5-dihidrooxazol.	39
4.1.12.4 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-metoxistiril)-4,5-dihidrooxazol.	39
4.1.12.5 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(2-(furan-2-il)vinil)-4,5-dihidrooxazol.	39
4.1.12.6 Preparación de la (S,E)-4-(2-(4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)vinil)benzoato de metilo.	40
4.1.13 Procedimiento general IV para la preparación de oxazolinas α,β -insaturados a partir de la fosfobromoamida 51 .	40
4.1.13.1 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-stiril-4,5-dihidrooxazol.	41
4.1.13.2 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-clorostiril)-4,5-dihidrooxazol.	41
4.1.13.3 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-fluorostiril)-4,5-dihidrooxazol.	41
4.1.13.4 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-metoxistiril)-4,5-dihidrooxazol.	42
4.1.13.5 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-(benciloxi)stiril)-4,5-dihidrooxazol.	42
4.1.13.6 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(2-(furan-2-il)vinil)-4,5-dihidrooxazol.	42
4.1.13.7 Preparación de la (S,E)-4-(2-(4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)vinil)benzoato de metilo.	43
4.1.13.8 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-bromostiril)-4,5-dihidrooxazol.	43
4.2 Evaluaciones Biológica.	44
4.2.1 Evaluación de la Actividad Antituberculosa.	44
4.2.1.1 Selección de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	44
4.2.1.2 Preparación de Stocks.	44
4.2.1.3 Esterilización de los stocks.	44
4.2.1.4 Preparación de las placas de cultivo.	45
4.2.1.5 Preparación de la cepa bacteriana.	46

4.2.1.6 Inoculación de las placas de prueba con la cepa en estudio.	46
4.2.1.7 Revelado de la viabilidad con el Reactivo Azul Alamar.	47
4.2.2 Toxicidad Tisular.	48
4.2.2.1 Metodología de evaluación.	48
4.2.2.2 Preparación y esterilización de los compuestos a evaluar.	48
4.2.2.3 Preparación de Placas.	48
4.2.2.4 Preparación de rebanadas de hígado.	49
4.2.2.5 Fijación de las rebanadas tratadas.	50
4.2.2.6 Encapsulación de las muestras fijadas.	50
4.2.2.7 Tinción Hematoxilina-Eosina.	51
4.2.2.8 Montaje con resina sintética.	52
4.2.3 Evaluación del Posible Mecanismo de Acción.	53
4.2.3.1 Microarreglo de ADN.	53
4.2.3.2 Preparación del Compuesto 44D .	53
4.2.3.3 Preparación de las cajas de cultivo.	53
4.2.3.4 Preparación de la cepa bacteriana.	53
4.2.3.5 Proceso de colección, lisis y extracción del ARN total.	54
4.2.3.6 Proceso de síntesis y etiquetado del ARNa.	55
4.2.3.7 Lectura y cuantificación de los microarreglos.	62
4.2.3.8 Análisis Estadístico.	62
4.2.3.9 Análisis Bioinformático.	62
4.3 Materiales y Equipo (Infraestructura).	63
4.4 Seguridad en el laboratorio y disposición de residuos.	64
CAPÍTULO 5	65
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	65
5.1 Preparación de amidas y oxazolinas quirales α,β-insaturadas.	65
5.1.1 Análisis retrosintético propuesto.	65
5.1.2 Síntesis de compuestos.	66
5.1.2.1 Preparación de la bromoamida del éster metílico de la (S)-fenilalanina 39 .	66
5.1.2.2 Preparación de fosfonamida 40 .	68
5.1.2.3 Preparación de la fosfohidroxiamida 41 .	69
5.1.2.4 Reacción de O-alkilación.	71
5.1.2.5 Reacción de Horner-Wadsworth-Emmons.	74

5.1.2.6 Reacción de O-alkilación de hidroxiacrilamidas 45 para generar 44A-H .	78
5.1.2.7 Ruta de síntesis alterna para la preparación de oxazolinas α,β -insaturada.	82
5.1.2.8 Preparación del ácido 2-(dietoxifosforil) acético 47 .	82
5.1.2.9 Preparación del (S)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol 49 .	83
5.1.2.10 Preparación del (S)-(2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo 50 .	84
5.1.2.11 Preparación del (S)-(2-((1-bromo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo 51 .	86
5.1.2.12 Preparación del (S)-((4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)metil) fosfonato de dietilo 52 .	87
5.1.2.13 Reacción <i>HWE</i> de la fosfo-oxazolina 52 , utilizando NaH.	89
5.1.2.14 Síntesis de oxazolinas insaturadas a partir de la fosfobromoamida 51 .	89
5.2 Evaluación de la actividad antituberculosa, hepatotóxica y determinación de un posible mecanismo de acción.	92
5.2.1 Actividad Antituberculosa.	92
5.2.1.1 Selección de los compuestos a probar.	92
5.2.2 Evaluación de la Actividad Hepatotóxica y Nefrotóxica <i>Ex-Vivo</i> sobre rebanadas de tejido.	96
5.2.2.1 Selección de los compuestos a evaluar.	96
5.2.2.2 Observaciones Histopatológicas.	96
5.2.3 Microarreglo de ADN.	100
5.2.3.1 Extracción del ARN total.	100
5.2.3.2 Síntesis ARNa.	101
5.2.3.3 ARNa etiquetado con las cianinas Cy3 y Cy5.	101
5.2.3.4 Proceso de hibridación.	102
5.2.3.5 Lectura y cuantificación de los microarreglos.	102
5.2.3.6 Análisis Estadístico.	103
5.2.3.7 Análisis Bioinformático.	103
5.2.3.8 Posible mecanismo de acción.	106
CAPÍTULO 6	111
6. CONCLUSIONES	111
Anexos 1. DIVULGACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.	113
Anexo 2. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.	115
REFERENCIAS	116

LISTA DE TABLAS.

Tabla	Página
1. Mecanismos de resistencia a fármacos por <i>M. tuberculosis</i> .	2
2. Fármacos antifímicos.	3
3. Preparación de amidas α,β -insaturadas.	7
4. Actividad antituberculosa de 18 (A-F).	10
5. Actividad antituberculosa de oxazolinas y oxazoles.	11
6. Actividad antituberculosa de heterociclos.	12
7. Master Mix de Poliadenilación.	56
8. Master Mix para primera cadena.	56
9. Master Mix para segunda cadena.	57
10. Master Mix para transcripción.	58
11. Etiquetado con cianinas (Cy3-Cy5).	60
12. Datos de RMN de ^1H para la bromoamida 39 .	67
13. Datos de RMN de ^1H para la fosfonamida 40 .	69
14. Datos de RMN de ^1H para la fosfohidroxiamida 41 .	70
15. Datos de RMN de ^1H para la fosfobromoamida 43 .	72
16. Datos de RMN de ^1H para la oxazolina 42 .	74
17. Preparación de hidroxiamidas α,β -insaturadas.	75
18. Datos de RMN de ^1H para la hidroxiamida α,β -insaturada 45D .	76
19. Síntesis de oxazolinas α,β -insaturadas.	78
20. Datos de RMN de ^1H para la oxazolina insaturada 44D .	80
21. Datos de RMN de ^1H para el ácido dietilfosfonoacético 47 .	83
22. Datos de RMN de ^1H para el aminoalcohol 49 .	84
23. Datos de RMN de ^1H para la fosfohidroxiamida 50 .	85
24. Datos de RMN de ^1H para la fosfobromoamida 51 .	87
25. Datos de RMN de ^1H para la oxazolina 52 .	88
26. Preparación de oxazolinas α,β -insaturadas utilizando NaH.	89
27. Oxazolinas α,β -insaturadas a partir de la fosfobromoamida 51 .	90
28. Actividad antituberculosa.	93
29. Extracción de ARN total de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	100
30. Síntesis de ARNa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	101
31. Síntesis de ARNa etiquetado con cianinas.	101
32. Genes sobreexpresados con valores mayores de coef. C Vs T de 2.0.	104
33. Genes reprimidos con valores menores de coef. C Vs T de -1.0.	105
34. Porcentaje de genes sobreexpresados e inhibidos.	106

LISTA DE FIGURAS.

Figura	Página
1. Agentes antihipertensivos.	5
2. Fármaco estimulante de células.	5
3. Metodologías de síntesis de amidas α,β -insaturadas.	6
4. Metodologías de síntesis de oxazolininas.	8
5. Moléculas con actividad anti-Tb.	9
6. Actividad antituberculosa de sistemas heterocíclicos.	13
7. Diseño de placa para pruebas de actividad anti-Tb.	45
8. Distribución de placas para pruebas de hepatotoxicidad.	49
9. Espectro de RMN de ^1H para la amida α,β -insaturada 45D .	77
10. Espectro de RMN de ^1H para la oxazolina α,β -insaturada 44D .	81
11. Imagen ORTEP de la estructura de rayos X de la oxazolina 44B .	90
12. Espectro de RMN de ^1H para la oxazolina α,β -insaturada 44B .	91
13. Compuestos seleccionados para evaluar la actividad anti-Tb.	92
14. Compuestos seleccionados para evaluar la actividad hepatotóxica.	96
15. Fotografías de controles a 40X; Tiempo cero (a), Medio de cultivo (b), Disolvente (c).	96
16. Fotografías a 40X de los compuestos probados sobre hígado.	97
17. Fotografías a 40X de 44D e isoniacida sobre rebanadas de hígado.	98
18. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de ARN total.	100
19. Imagen de los microarreglos para cada una de las 3 muestras analizadas.	102
20. Histograma de la relación de los valores p	103
21. Inhibidores de HU-ADN derivados de estilbeno.	108
22. Interacción de HU-ADN.	108
23. Representación de las interacciones entre HU y derivados de estilbeno.	109
24. Oxazolina 44D .	109
25. Posible mecanismo de acción del compuesto 44D .	110

LISTA DE ESQUEMAS.

Esquema	Página
1. Compuesto análogo de la pseudosparsumisina.	6
2. Síntesis de derivados de la 1,3-oxazolo[4,5 c]quinolina.	9
3. Rutas de síntesis para la preparación de amidas y oxazolinas α,β -insaturadas.	16
4. Técnica de Alamar Azul para evaluación de la actividad antituberculosa.	47
5. Técnica de evaluación de la toxicidad tisular.	52
6. Análisis retrosintético para la preparación de amidas y oxazolinas α,β -insaturadas.	65
7. Preparación de la bromoamida 39 .	66
8. Preparación de la fosfonamida 40 .	68
9. Preparación de la fosfohidroxiamida 41 .	69
10. Preparación de la fosfo-oxazolina 42 .	71
11. Preparación de la fosfobromoamida 43 .	71
12. Preparación de la fosfo-oxazolina 42 .	73
13. Preparación de la oxazolina α,β -insaturada 44A .	74
14. Preparación de hidroxiamidas α,β -insaturadas 45A-H .	75
15. Preparación de las oxazolinas α,β -insaturadas 44 .	78
16. Preparación de la fosfohidroxiamida 50 .	82
17. Preparación de la fosfo-oxazolina 52 .	85
18. Preparación de oxazolinas α,β -insaturadas 44A-D, 44H y 44J .	89
19. Preparación de fosfo-oxazolinas α,β -insaturadas 44A-D, 44F, 44H, 44J y 44K .	90

Lista de Abreviaturas.

En el transcurso de este trabajo se utilizaron las siguientes abreviaturas

AcOEt	Acetato de Etilo
AcOH	Ácido acético
PAS	Ácido <i>p</i> -aminosalicílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico circular
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa
PPA	Ácido polifosfórico
ARNa	Ácido ribonucleico amplificado
RCHO	Aldehído
α	Alfa
ATCC	American Type Culture Collection
Tf ₂ O	Anhídrido trifluorometansulfónico
Bn	Bencilo
β	Beta
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
CIBIN	Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CC	Control de crecimiento
δ	Desplazamiento químico
DBU	1,8-Diazabicycloundec-7-eno
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEAD	Dietilazodicarboxilato
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
CO ₂	Dióxido de carbono
MABA	Ensayo de Azul de Alamar en Microplaca
Eq	Equivalentes
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
STR	Estreptomina
EMB	Etambutol
Hex	Hexano
LiHMDS	Hexametildisililamiduro de litio
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
TMSF	Fluoruro de trimetil silano
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
INDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social

INH	Isoniacida
KB	Krebs-Bicarbonato
GAS	Medio de sales-alanina-glicerol-hierro
GAST	Medio de sales-alanina-glicerol-tween-sin hierro
MHz	Mega Hertz
Me	Metilo
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mL	Militros
Min	Minutos
ng	Nanogramos
NOM	Norma Oficial Mexicana
OFX	Ofloxacino
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
PBS	Phosphate Buffered Saline
p.f.	Punto de fusión
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
REA	Relación Estructura Actividad
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ³¹ P	Resonancia Magnética Nuclear de Fósforo 31
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RIF	Rifampicina
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNC	Sistema Nervioso Central
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
Tb	Tuberculosis
XDR-Tb	Tuberculosis Extremadamente resistente
MDR-Tb	Tuberculosis Multidrogo resistente
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UA	Universidad de Arizona
BCG	Vacuna de Bacillus Calmette-Guerin
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis

1.1.1 Problemática de la Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que convive con la humanidad desde hace varias décadas, causando graves problemas de salud, siendo considerada como la segunda causa de muerte por infección sólo por detrás del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).¹ Normalmente afecta a los pulmones (TB pulmonar), pero puede afectar también a otros sitios (TB extrapulmonar). La enfermedad se propaga de una manera muy sencilla, a través del aire cuando las personas que están enfermas con TB pulmonar expulsan las bacterias al toser.¹ Es por ello que desde el año 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha catalogado a esta enfermedad como de emergencia global.¹ La tuberculosis es causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch),² bacteria alcohol-ácido resistente, aerobia estricta, descrita por Robert Koch en el año de 1882. Este microorganismo es causante de una gran cantidad de infecciones y muertes al año, de manera general en todo el mundo. Según datos reportados por la OMS, es más común que se dé la infección entre los hombres que entre las mujeres, y afecta principalmente a los adultos en edad productiva,¹ además en años recientes ha surgido un especial temor debido a su asociación como enfermedad oportunista en los pacientes que padecen el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), siendo un problema sanitario muy grave. De acuerdo a las estimaciones realizadas por la OMS en el año 2012, 8.6 millones de personas desarrollaron tuberculosis y 1.3 millones murieron debido a esta causa, siendo aproximadamente 320,000 pacientes con VIH-positivo.¹

El gran problema de este padecimiento, es la gran complejidad estructural de la pared celular que posee el *Mycobacterium*,³ además de su gran capacidad de mutación, generando sus propios mecanismos de sobrevivencia y resistencia a sustancias antibióticas. De acuerdo a esta capacidad, *Mycobacterium tuberculosis* ha sido clasificado en tres grupos:⁴ sensible a los fármacos de primera línea, multidrogoresistente (MDR-TB, primera línea, isoniacida y rifampicina) y extremadamente resistente (XDR-TB, primera línea, a todas las fluoroquinolonas y resistencia demostrada a por lo menos un fármaco parenteral de segunda línea, capreomicina, kanamicina y amikacina) (Figura 1).⁵

Según estimaciones de la OMS, en el año 2012 se detectaron 84,000 personas con tuberculosis MDR, además de que se han reportado por lo menos un caso de tuberculosis XDR en 92 países a finales del 2012.¹

En México, esta enfermedad es de gran importancia ya que en el año 2012 (datos de la Secretaría de Salud) se reportaron alrededor 19,735 nuevos casos de tuberculosis en todas sus formas, siendo la de mayor incidencia la de tipo pulmonar, participando con un 80.7%.⁶ Además se registraron 395 casos de fármacorresistencia, convirtiéndose en un problema de salud muy grave y por ende se debe poner especial interés.

Esta problemática se debe a la falta de infraestructura material, económica y profesional, principalmente en los países en vías de desarrollo. Estos países no cuentan con lo mínimo necesario para realizar el diagnóstico temprano de la enfermedad y mucho menos para llevar a cabo el tratamiento adecuado. Esto ha originado que se generen cepas resistentes a los fármacos de primera línea, lo cual nos lleva a la necesidad de desarrollar nuevas terapias para enfrentar este problema.⁷

1.1.2 Mecanismos de Resistencia.

Como otros microorganismos, la base de la resistencia del bacilo de Koch es la selección de bacterias mutantes con resistencia innata a las drogas antituberculosas existentes.

La generación de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* puede deberse a tres mecanismos:

- a) conversión de cepas salvajes durante el tratamiento (**resistencia adquirida**).
- b) quimioterapia inapropiada (**resistencia amplificada**).
- c) transmisión de cepas mutantes a personas susceptibles (**resistencia transmitida**).^{2,8}

Actualmente se sabe con certeza qué genes son los afectados en los procesos de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* ante fármacos antituberculosos, como se puede observar en la tabla 1.^{2,8}

Tabla 1. Mecanismos de resistencia a fármacos por *M. tuberculosis*.^{2,8}

Fármaco	Gen / proteína	Mecanismo de Resistencia
Rifampicina	RpoB/ <i>RNA pol</i>	Reducción del efecto de inhibición.
Isoniacida	KatG, inhA/ <i>reductasas</i>	Disminución de síntesis de reductasas.
Pirazinamida	pncA/ <i>pirazinamidasa</i>	Conversión a ácido pirazínico.
Etambutol	embB/ <i>proteína de membrana</i>	Disminución del etambutol a la EmbB.
Estreptomina	rpsL, rrs/ <i>proteínas ribosomales</i>	Interacción ribosomal.
Quinolonas	gyr A/ <i>DNA Girasa bacteriana</i>	Inactivación de la DNA girasa.

Debido a la resistencia generada sobre los fármacos actualmente utilizados, existe la necesidad de desarrollar nuevas moléculas que presenten actividad antituberculosa, así como nuevos regímenes terapéuticos eficaces.

1.1.3 Clasificación de Fármacos Antituberculosos.

Los fármacos para el tratamiento de la tuberculosis se dividen en cinco grupos:²

- 1) Fármacos de primera línea orales: Isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida y rifabutina.
- 2) Agentes inyectables: kanamicina, amikacina, capreomicina, viomicina, estreptomina.
- 3) Fluoroquinolonas: moxifloxacino, levofloxacino, ofloxacino.
- 4) Agentes de segunda línea orales y bacteriostáticos: etionamida, protionamida, cicloserina, terizidone, ácido para-amino-salicílico (PAS).
- 5) Agentes con un rol no claro en el tratamiento de TB MDR: clofazimina, linezolid, amoxicilina clavulanato, tiocetazona, imipenem/cilastatina, altas dosis de isoniacidab y claritromicina.

Tabla 2. Fármacos antifímicos.⁵

<i>Más Efectivo</i>		<i>Menos Tolerable</i>	
		Inyectables	Orales (Bacteriostáticos)
Rifampicina	<u>Fluoroquinolonas</u>	<u>Aminoglicósidos</u>	Etionamida
Isoniacida	Moxifloxacino	Estreptomina	Cicloserina
Pirazinamida	Levofloxacino	<u>Polipéptidos</u>	Ácido <i>p</i> -aminosalicílico
Etambutol	Gatifloxacino	Capreomicina	Terizidona
Primera Línea		Segunda Línea	

De manera general los fármacos de segunda línea son más agresivos, menos tolerables y menos efectivos causando mayor número de efectos adversos (Tabla 2), además de ser de mayor costo que los de primera línea.⁵

1.1.4 Tratamiento

El tratamiento farmacológico inicial para este padecimiento hace uso de tres de los fármacos más eficaces: isoniacida, rifampicina y pirazinamida, sin embargo se aconseja asociar un cuarto fármaco como el etambutol, debido a la resistencia inicial generada por el mycobacterium.^{1, 9, 10}

Los regímenes farmacológicos se han establecido en dos fases, siendo bien tolerados y de baja toxicidad:¹⁰

- a) Fase intensiva o bactericida: dos meses de isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol en forma diaria (60 tomas)
- b) Fase de consolidación (esterilizante): cuatro meses de isoniacida y rifampicina en forma diaria (120 dosis).

Estos esquemas terapéuticos tienen una eficacia cercana al 100% en el caso de pacientes con bacterias sensibles y con un cumplimiento total del tratamiento.

Cabe señalar que la gran problemática causada por la alta incidencia de casos de farmacorresistencia, es que desde 1995 la OMS ha promovido la estrategia TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado), con el objetivo de lograr el cumplimiento de los tratamientos y con ello elevar el índice de éxito.^{1,10}

A pesar de todos los esfuerzos que se han realizado en los últimos años, el contar con la vacuna Bacillus Calmette-Guerin (BCG), así como con regímenes terapéuticos efectivos ante cepas sensibles, la tuberculosis sigue jugando un papel preponderante en la salud pública mundial. Por lo tanto, es indispensable continuar con la búsqueda de nuevas estrategias para combatir esta infección, desde el punto de vista epidemiológico y farmacológico. Una de las estrategias importantes puede ser el desarrollo de nuevas moléculas que presenten actividad antituberculosa novedosa, así como regímenes de tratamiento más accesibles y efectivos para el paciente.

Por todo lo anterior, el presente proyecto se ha centrado en desarrollar nuevas moléculas de una manera sencilla y accesible, además de evaluar la actividad antituberculosa *in vitro*. Con la finalidad de desarrollar nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de la tuberculosis.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1 Amidas y Oxazolinas.

Las amidas y las oxazolinas son compuestos encontrados ampliamente como metabolitos primarios y secundarios en múltiples variedades de plantas.¹¹ Como por ejemplo las de la familia *Piperaceae*¹² y *Rutaceae*¹³ donde se han reportado presencia principalmente de alcaloides, amidas y oxazolinas, adjudicándoles tradicionalmente algunos efectos terapéuticos en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como: cardiopatías, disentería, diarrea, diabetes, fiebre, además de actividad desinflamatoria, analgésica,¹³ antioxidante,¹⁴ citotóxica,¹⁴ antimicrobiana¹⁵ y otras múltiples actividades biológicas,¹⁶⁻¹⁹ además de un amplio uso como insecticida.¹² Por ejemplo, los fármacos captopril²⁰ y enalapril²¹ (Figura 1) los cuales son compuestos del tipo amidas que presentan actividad sobre el sistema renina-angiotensina, el cual juega un papel muy importante en la regulación de la presión arterial.

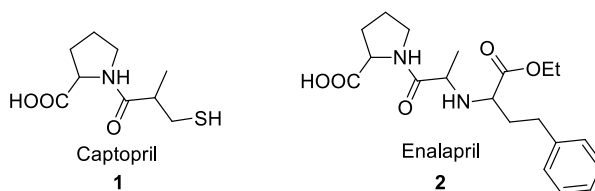


Figura 1. Agentes antihipertensivos.

El Dideoximicobactim, quien presenta una oxazolina en su estructura química (Figura 2) y que es utilizado como un potente estimulante de células T, factor importante para el estudio y tratamiento en pacientes con infecciones bacterianas, principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*.¹⁵

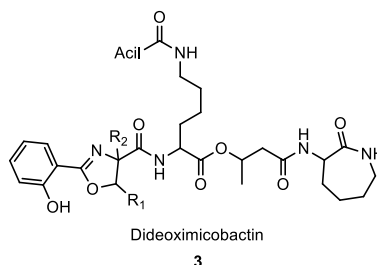


Figura 2. Fármaco estimulante de células.

2.2 Amidas α,β -insaturadas.

Hasta el momento se han reportado una gran cantidad de metodologías para lograr la síntesis de amidas α,β -insaturadas partiendo de diferentes materias primas, así como el uso de diferentes catalizadores para lograr su obtención de manera eficiente (Figura 3).²²⁻²⁸

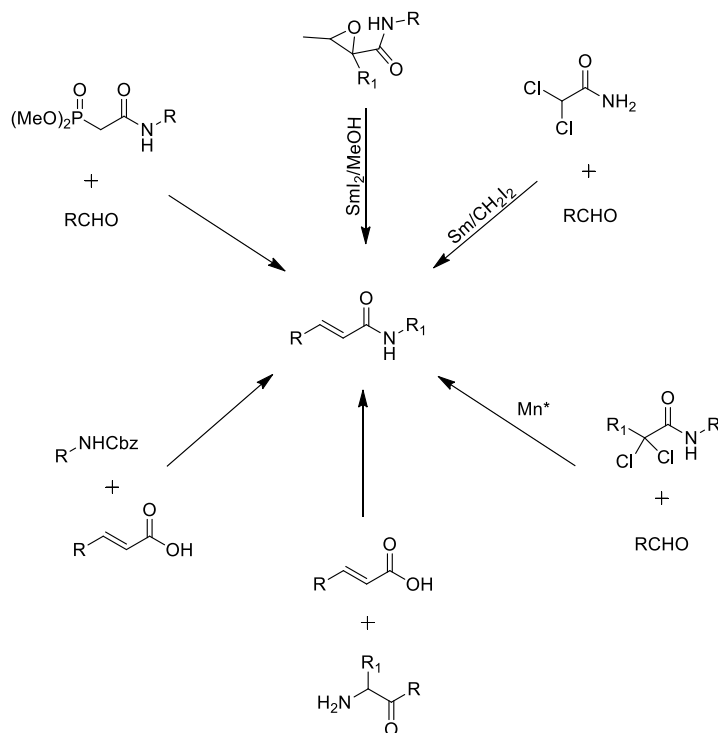
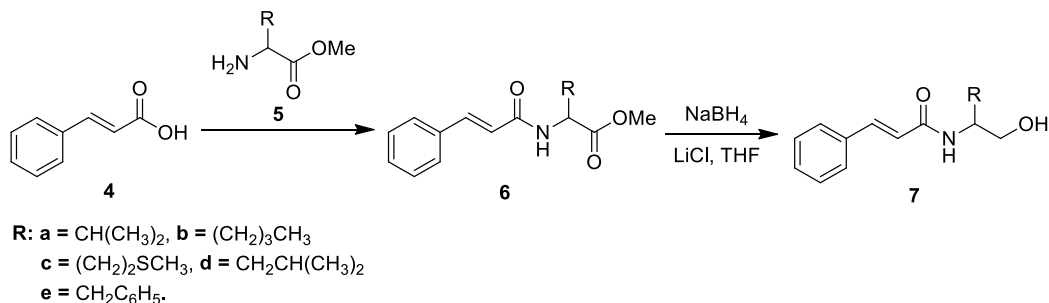


Figura 3. Metodologías para la síntesis amidas α,β -insaturadas.

En el año 1989, Arutyunyan y colaboradores²⁵ prepararon amidas α,β -insaturadas del tipo **6** y **7**, análogos de la pseudoparsomicina, la cual es utilizada como antibiótico natural (Esquema 1).

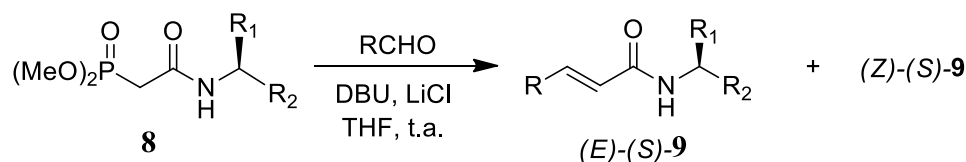


Esquema 1. Compuesto análogo de la pseudoparsomicina.

Estos análogos fueron preparados a partir del ácido cinámico **4** y un amino éster **5**, seguido de la reacción de reducción utilizando borohidruro de sodio (NaBH₄) y cloruro de litio (LiCl), obteniendo las β-hidroxiámidas correspondientes. Los compuestos obtenidos fueron sometidos a pruebas de actividad antitumoral, utilizando modelos de sarcomas, observándose que los *hidroxiderivados presentan una mejor actividad antitumoral además de presentar menos efectos tóxicos comparados con sus análogos esterificados.*

Por otro lado, Hernández y col.,^{27,28} en el 2006 y 2007 reportaron la preparación de sistemas α,β-insaturados **9** a partir de fosfonamidas quirales vía la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE),^{29,30} utilizando diferentes aldehídos aromáticos y alifáticos. Los autores describen la obtención de estos compuestos con buenos rendimientos químicos y una excelente selectividad E/Z cuando se *utilizan aldehídos voluminosos, mientras que para aldehídos menos impedidos la selectividad E/Z disminuyó considerablemente* (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de amidas α,β-insaturadas.



R	R ₁	R ₂	Rendimiento	(E) : (Z)
C ₆ H ₅	Ph	CH ₃	96	>98 : <02
<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	Ph	CH ₃	94	>98 : <02
<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	Ph	CH ₃	90	>98 : <02
<i>i</i> -Pr	Ph	CH ₃	92	55 : 45
<i>i</i> -Bu	Ph	CH ₃	92	73 : 27
<i>t</i> -Bu	Ph	CH ₃	93	>98 : <02

2.3 Oxazolinas.

De igual manera que las amidas, las oxazolinas han sido preparadas por diversas metodologías, dependiendo de las materias primas de partida (Figura 4).³¹⁻⁴⁶ Una de las metodologías más utilizadas es a partir de hidroxiamidas, las cuales se han hecho reaccionar con múltiples reactivos con el objetivo de lograr la *O*-alquilación como SOCl_2 , $\text{SOCl}_2\text{-AgOTf}$, PPh_3/DEAD , cloruro de sulfonilo, $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$, Tf_2O , $\text{Tf}_2\text{O}/\text{Ph}_2\text{SO}$, P_2O_5 , $\text{Et}_2\text{N-SF}_3$, $\text{Ph}_3\text{P}/\text{TEA}/\text{CCl}_4$, Bu_2SnCl_2 , POCl_3 , TMSF , 30% HBr , AcOH , *o*-clorofenilfosforo-bis-(1,2,4)-triazol y $\text{RN}_3/(\text{PhO})_3\text{P}$, lográndose obtener exitosamente; sin embargo, la eficiencia en su obtención dependerá de la hidroxiamida utilizada.³¹

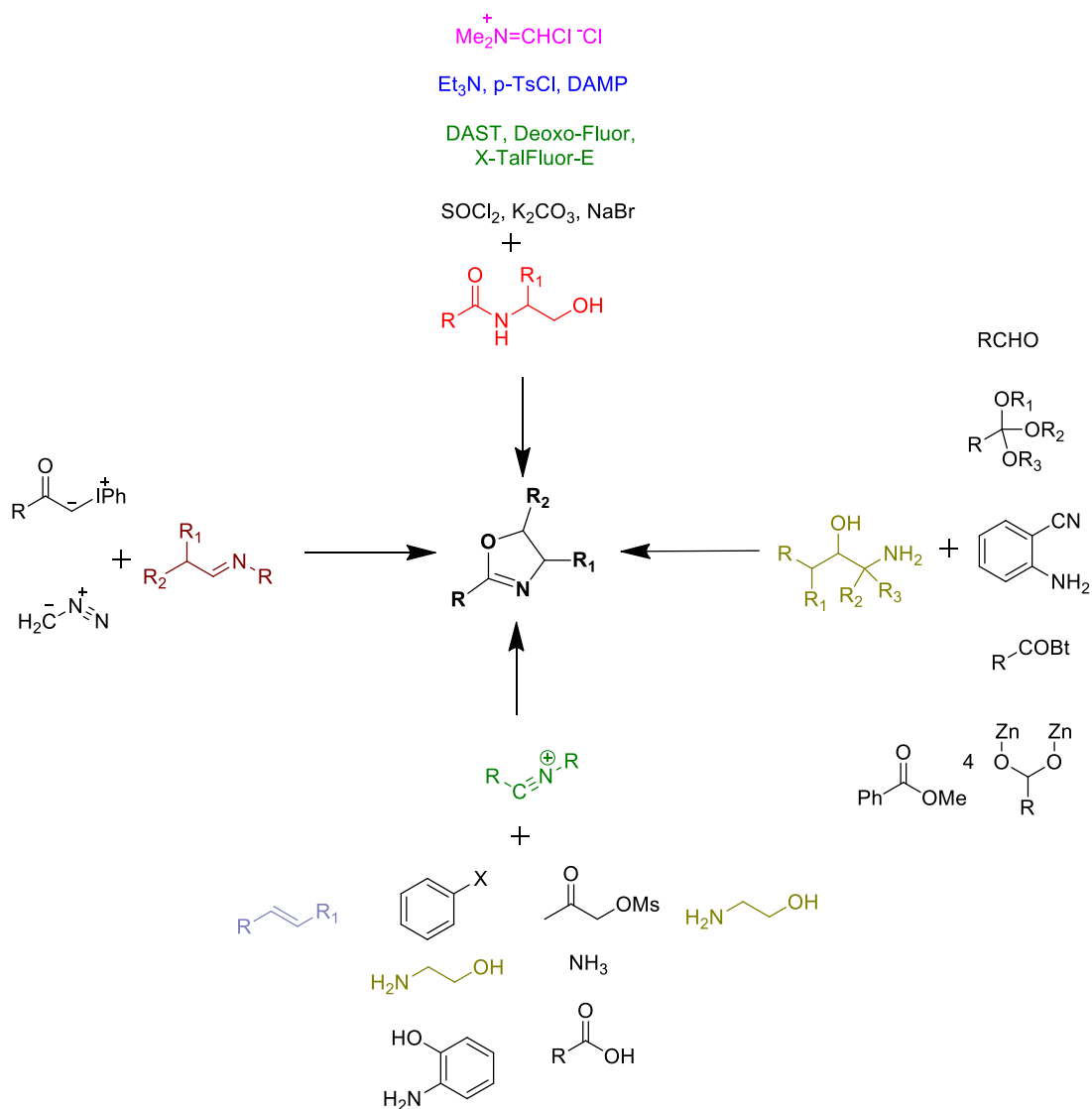


Figura 4. Metodologías para la síntesis de oxazolinas.

Actualmente existen múltiples reportes de moléculas que incorporan en su estructura química al menos una unidad de oxazolina y que presentan actividad anti *Mycobacterium tuberculosis* relevante, por ejemplo, para los compuestos **10**,⁴⁷ **11**,⁴⁸ **12**,⁴⁹ se han reportado concentraciones de actividad semejantes a los fármacos de primera línea (Figura 5).

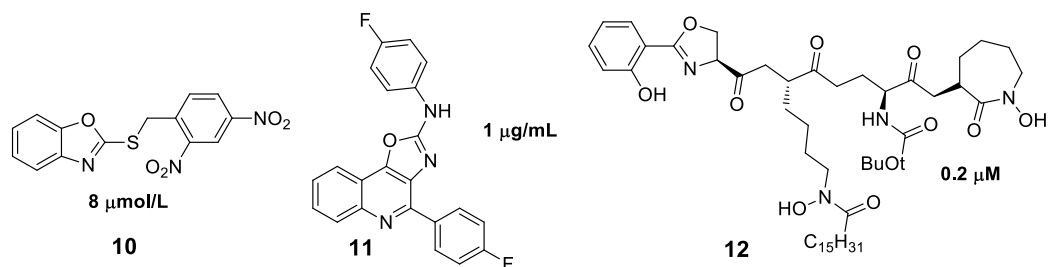
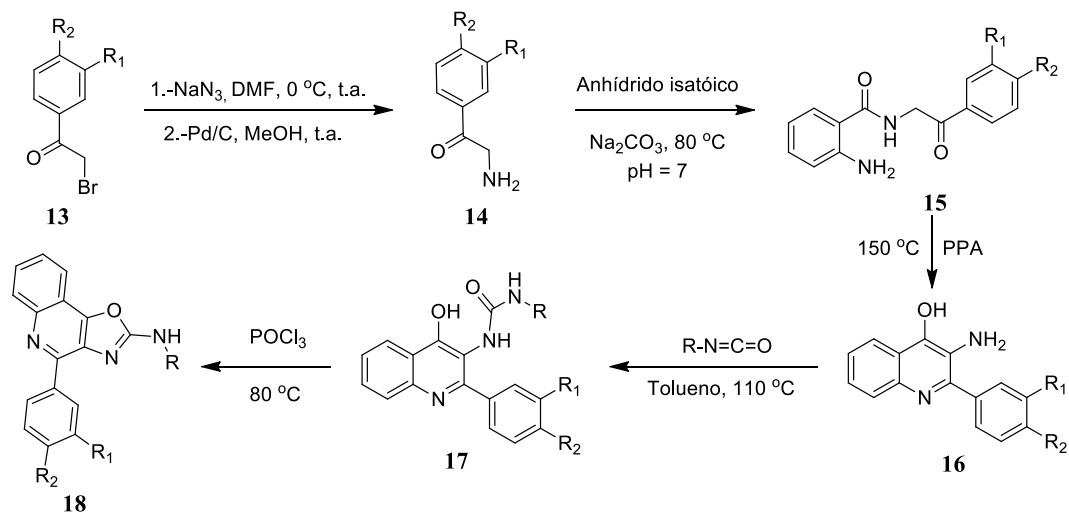


Figura 5. Moléculas con actividad anti-Tb.

En este sentido, Eswaran y col.,⁴⁸ en el 2010 prepararon nuevos derivados de la 1,3-oxazolo[4,5c]quinolina **18** (Esquema 2), y evaluaron su actividad antibacteriana *in vitro* contra *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC-27853), *Klebsiella pneumoniae* y contra *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* (ATCC 27294).

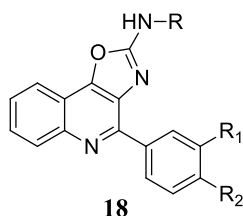


Esquema 2. Síntesis de derivados de la 1,3-oxazolo[4,5c]quinolina **18**.

Con respecto a la prueba *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*, los compuestos más activos fueron los derivados de la 1,3-oxazolo[4,5-c]quinolina, los cuales en todos los casos presentan un CMI de 1 $\mu\text{g/mL}$ y un valor de inhibición del 99%, siendo

superior al presentado por el fármaco de referencia isoniacida (CMI 1.5; 95%), como se muestra en la tabla 4.

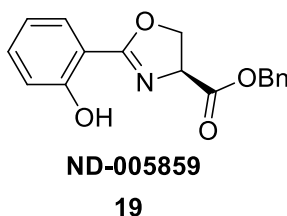
Tabla 4. Actividad antituberculosa de **18** (A-F).



COMPUESTO	R	R ₁	R ₂	CMI (µg/mL)	% Inhibición
A	2-metoxifenilo	F	H	1	99
B	Bencilo	F	H	1	99
C	4-fluorofenilo	F	H	1	99
D	4-fluorofenilo	H	F	1	99
E	2-metoxifenilo	H	F	1	99
F	3-clorofenilo	H	F	1	99
INH	--	--	--	1.5	95
RIF	--	--	--	0.5	99

En los años 2010 y 2012, Moraski y col. reportaron la preparación de diferentes sistemas heterocíclicos y realizaron un estudio de Relación Estructura-Actividad (REA), evaluando su actividad antibacteriana en contra de *Mycobacterium tuberculosis* y su actividad citotóxica sobre la línea celular Vero (células de riñón de mono verde).

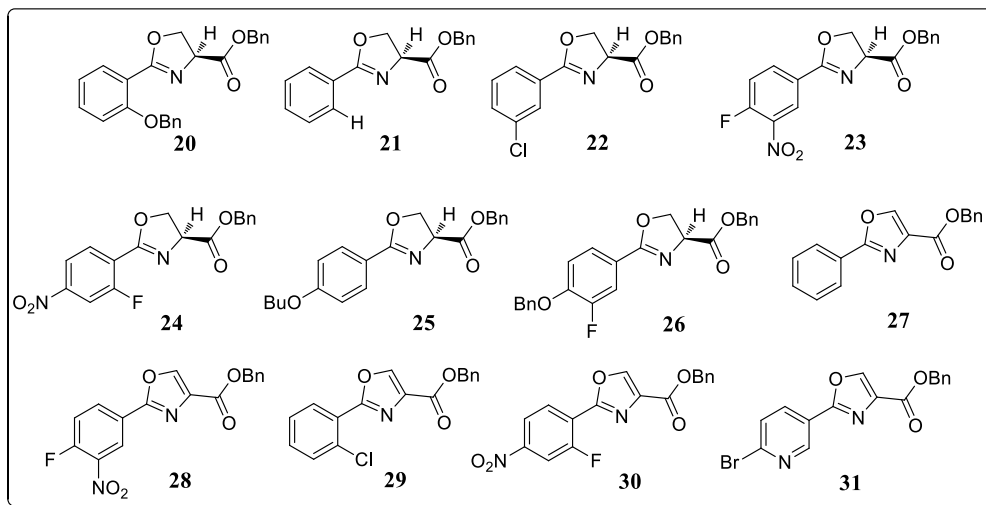
En este sentido, en el 2010⁴⁹ prepararon una gran variedad de oxazolininas y oxazoles análogos a **ND-005859**, porción importante en la estructura de derivados de mycobactim.



Los estudios de Relación Estructura-Actividad, demostraron que tanto las oxazolininas como sus análogos oxidados, presentan una importante actividad antituberculosis. Esta actividad puede estar influenciada por el tipo y la posición de los sustituyentes en el

grupo fenilo, viéndose aumentada con la presencia de grupos electroattractores como cloro y nitro, aunque las correlaciones requieren un estudio más detallado. De manera general los autores refieren que los oxazoles presentan una mejor actividad anti-Tb, comparada con sus correspondientes oxazolinas.

Tabla 5. Actividad antituberculosa de oxazolinas y oxazoles.
(GAS= Medio de sales-alanina-glicerol. GAST= Adicionado con hierro).



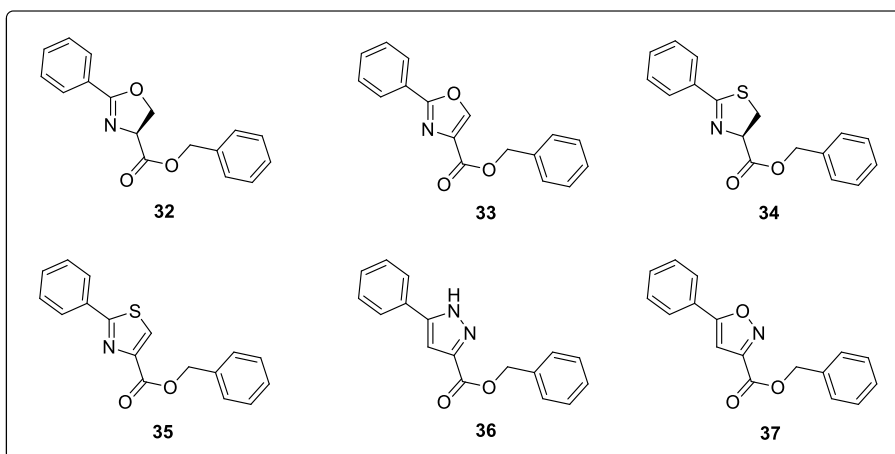
Compuesto	GAS (μM)	GAST (μM)	Vero IC ₅₀ (μM)
20	12.6	7.69	>128
21	7.2	4.42	>128
22	11.6	1.8	>128
23	6.24	0.95	>128
24	13	8.7	-----
25	2.72	5.11	-----
26	0.77	1.42	>128
27	0.47	0.49	121
28	1.10	0.48	>128
29	0.73	1.69	>128
30	0.7	1.65	>128
31	2.54	1.84	>128
Rifampicina	0.06	0.01	125

En su discusión proponen un posible mecanismo de acción de este tipo de moléculas, particularmente la presencia o ausencia del grupo éster. Se menciona que la actividad radica en que el grupo benciléster funciona como profármaco, permitiendo la entrada de éste a la bacteria, y posteriormente ya adentro, este grupo es metabolizado al

correspondiente ácido carboxílico, el cual es importante en la inhibición metabólica del microorganismo⁴⁹ (Tabla 5).

Mientras que en el año 2012⁴ los autores diversifican su síntesis, permitiéndose preparar diferentes sistemas heterocíclicos como oxazolinas, oxazoles, tiazolininas, tiazoles y derivados imidazo-piridina, evaluando de igual manera su actividad anti-Tb (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad Antituberculosa de heterociclos.
(GAS= Medio de sales-alanina-glicerol. GAST= Adicionado con hierro).



Compuesto	GAS (μM)	GAST (μM)	Vero IC ₅₀ (μM)
32	4.9	4.4	>129
33	5.7	0.49	121
34	12.9	3.5	>129
35	6.0	6.2	>129
36	3.5	>64	>129
37	2.2	NA	>50
Rifampicina	0.09	0.2	113

De manera general los autores concluyen que los sistemas heterocíclicos, presentan una actividad bastante relevante ante *Mycobacterium tuberculosis*, debido a que muestran concentraciones similares a la de los fármacos de primera línea. Hasta el momento los derivados de imidazol-piridina son los que presentan mejores resultados, como se puede observar en la figura 6. Sin embargo, el resto de los heterociclos estudiados son de gran importancia ya que son fuentes de futuras modificaciones químicas para mejorar los resultados.

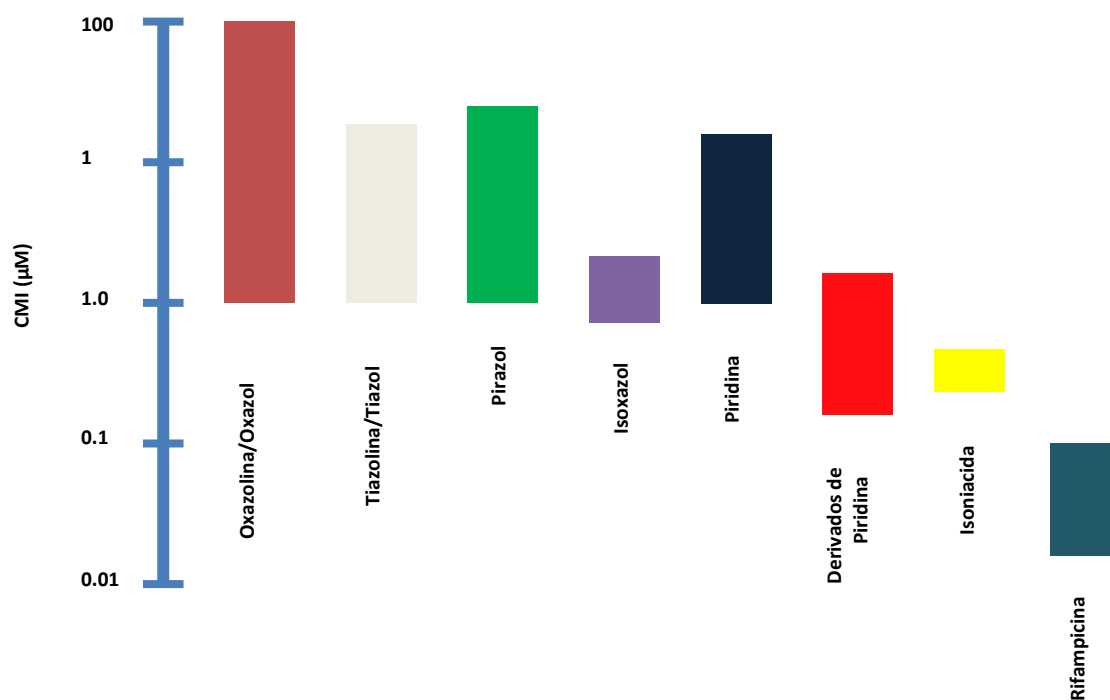


Figura 6. Actividad antituberculosa de sistemas heterocíclicos.

Con base a lo descrito previamente, se puede observar que existen diversos reportes de actividad biológica de compuestos que incorporan en su estructura los grupos amida y oxazolona. Además, se han publicado una gran variedad de estrategias sintéticas para su obtención, lo cual nos permitirá hacer uso de las mismas para sintetizar amidas y oxazolonas α,β -insaturadas con características estructurales capaces de presentar actividad antimicobacteriana, y de esta manera cumplir con los objetivos que se plantean en la presente propuesta.

CAPÍTULO 3

3.1 Justificación

Como ya se mencionó anteriormente, las enfermedades infecciosas representan un importante problema de salud a nivel mundial, destacando particularmente la tuberculosis, enfermedad causada por el *Mycobacterium tuberculosis* y catalogada como la segunda causa de muerte por infección en el mundo.¹ Esta enfermedad se consideraba “erradicada”, sin embargo ha resurgido de manera alarmante debido al uso descontrolado de los antibióticos. Por lo anterior, la OMS ha lanzado una alerta epidemiológica a nivel mundial, principalmente a causa de la aparición de cepas resistentes y multirresistentes a los fármacos disponibles.^{2,8} Entre las distintas estrategias propuestas para enfrentar a esta enfermedad infecciosa se ha propuesto la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Por esta razón diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de diseñar y sintetizar nuevos compuestos y evaluar su actividad antituberculosa, con la finalidad de encontrar nuevos y mejores fármacos que pudieran ser utilizados en el tratamiento contra este padecimiento.

Por todo lo anterior, en este proyecto de tesis se propone el desarrollo de una nueva ruta de síntesis para la preparación de amidas y oxazolininas α,β -insaturadas y la evaluación del efecto antituberculoso ante diferentes cepas clínicas tanto sensibles como resistentes a los fármacos de primera línea, buscando obtener moléculas con potenciales propiedades farmacológicas.

3.2 Hipótesis

La actividad antituberculosa *in vitro* de nuevas amidas y oxazolininas insaturadas es mejor que los antifímicos isoniazida, rifampicina, etambutol (primera línea) ante cepas sensibles a estos, así como al ofloxacino (segunda línea) ante cepas multidrogoresistentes (TB-MDR).

3.3 Objetivo General.

Sintetizar y caracterizar amidas y oxazolininas insaturadas y determinar su actividad antituberculosa *in vitro* utilizando la técnica de Alamar Azul.

3.4 Objetivos Específicos.

Sintetizar amidas y oxazolinas insaturadas y caracterizarlas por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H , ^{13}C , ^{31}P) y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EMAR).

Determinar:

- 1) **El efecto antituberculoso *in vitro*** de las nuevas amidas y oxazolinas.
- 2) **La capacidad hepatotóxica** sobre rebanadas de tejido de los compuestos más activos.
- 3) **El posible mecanismo de acción** del compuesto más activo, mediante la técnica de microarreglos de ADN.

3.5 Metas

En un periodo de tres años nos propusimos alcanzar las siguientes metas:

- Preparar nuevas amidas y oxazolinas insaturadas, partiendo del aminoácido (S)-fenilalanina.
- Presentar los resultados obtenidos en un congreso nacional y otro internacional.
- Publicar un artículo científico en una revista con arbitraje internacional.
- Llevar a cabo el examen pre-doctoral.
- Obtener el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Farmacia.

3.6 Aportación Científica.

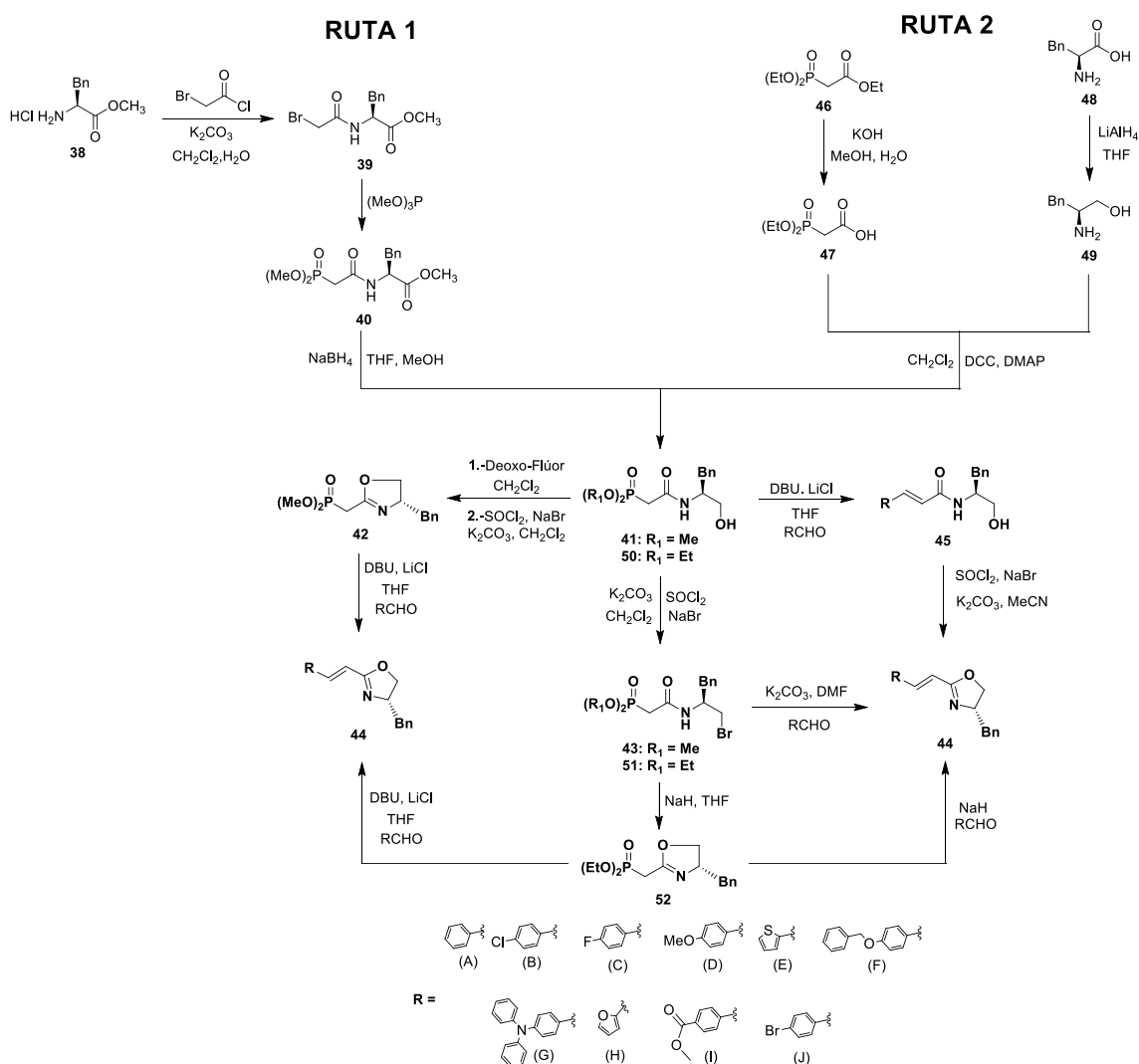
El presente trabajo de tesis consiste en la síntesis de nuevas amidas y oxazolinas insaturadas que pueden ser útiles como nuevos fármacos para el tratamiento de tuberculosis, debido a la necesidad actual por desarrollar nuevos principios activos más eficaces contra *Mycobacterium tuberculosis*.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

4.1 Metodología Sintética.

En base a estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, se decidió probar dos rutas de síntesis para la preparación de oxazolinas α,β -insaturadas; la primera partiendo del clorhidrato de la (*S*)-fenilalanina **38** y del cloruro de bromoacetilo y la segunda a partir de la (*S*)-fenilalanina **48** y el trietilfosfonoacetato **46** (Esquema 3).



Esquema 3. Rutas de síntesis para la preparación de amidas y oxazolinas α,β -insaturadas.

4.1.1 Información general.

El material de vidrio, barras de agitación magnética, cánulas, jeringas y agujas que se emplearon en las reacciones que requirieron condiciones anhidras, se secaron en una estufa a una temperatura de 120 °C. Todas las materias primas utilizadas fueron adquiridas en Aldrich, Fluka y otros distribuidores de materiales, reactivos y equipos de laboratorio.

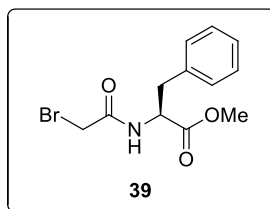
El tetrahidrofurano (THF) utilizado en las reacciones anhidras se destiló sobre sodio metálico y benzofenona bajo atmósfera inerte de N₂. El THF se calentó a reflujo hasta adquirir una coloración de azul intenso a morado, característica propia del radical cetilo, indicando con esto que el THF se encuentra libre de humedad.

Los puntos de fusión se determinaron en los equipos Fisher-Johns y Electrothermal 1101D.

Los espectros de RMN se obtuvieron de un espectrómetro Varian MERCURY 200 a 200MHz para ¹H, 81MHz para ³¹P y 50MHz para ¹³C, Varian MERCURY 300 a 300MHz para ¹H, 121MHz para ³¹P y 75MHz para ¹³C, Varian INOVA 400 a 400MHz para ¹H y 100MHz para ¹³C. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS) para ¹H; las constantes de acoplamiento (*J*) están dadas en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se denotaron con las siguientes abreviaturas: **s** para indicar una señal simple, **d** para indicar una señal doble, **dd** para indicar una señal doble de dobles, **t** para indicar una señal triple, **dt** para indicar un doble de triples, **c** para indicar una señal cuádruple, **dc** para indicar una señal doble de cuartetos, **m** para indicar una señal múltiple, **a** para indicar una señal ancha, **Sistema AB**; empleando en ocasiones combinaciones de ellas. Los disolventes deuterados empleados en las determinaciones fueron CDCl₃ y DMSO-d₆.

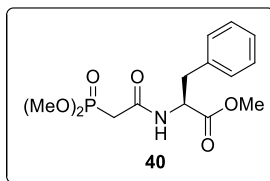
El curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina, empleando como fase estacionaria gel de sílice y como revelador se utilizó luz ultravioleta y vapores de yodo. La purificación de los productos obtenidos de las reacciones realizadas se llevó a cabo por cromatografía en columna utilizando sílica gel Merck 60 (230-400 mm). Los análisis de masas de alta resolución (EMAR) se llevaron a cabo en un equipo JEOL MStation JMS-700.

4.1.2 Preparación de (S)-2-(2-bromoacetamido)-3-fenilpropanoato de metilo.



En un matraz redondo de 500 mL con agitador magnético se colocaron 3.0 g, (14.877 mmol) del clorhidrato de éster metílico y se adicionaron 150 mL de una mezcla de diclorometano-agua (4:1). A la solución resultante se le adicionó 4.81 g, (37.192 mmol) de carbonato de potasio [2.5 Eq] y posteriormente se agregó lentamente 2.81 g, (16.364 mmol) de cloruro de bromoacetilo [1.1 Eq]. La mezcla de reacción se dejó en agitación contante y a reflujo por 4 horas. Transcurrido el tiempo, se llevó a cabo la separación de la fase orgánica, lavándose 2 veces la fase acuosa con acetato de etilo (15 mL cada vez). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta sequedad. Obteniéndose un sólido blanco, 90%, p.f. 82 °C, **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 3.15 (2dd, *J* = 14.0, 6.0 Hz, 2H, CH₂Ph), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.84 (Sistema AB, *J* = 13.6, 2H, CH₂Br), 4.85 (dt, *J* = 7.6, 6.0 Hz, 1H, CHBn), 6.85 (a, 1H, NH), 7.1-7.33 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 29.0 (CH₂Ph), 38.0 (CH₂Br), 53.0 (OMe), 54.0 (CHBn), 127.0, 128.9, 129.5, 135.0, 165.0 (CONH), 171.5 (CO₂Me). **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₂H₁₅BrNO₃ [M+H]⁺, *m/z* 300.0235; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 300.0301.

4.1.3 Preparación de (S)-2-(2-(dimetoxifosforil)acetamido)-3-fenilpropanoato de metilo.

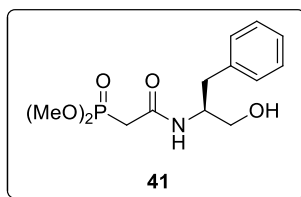


En un matraz redondo de 50 mL con agitador magnético y un sistema de destilación, se colocaron 3.0 g, (9.962 mmol) de la bromoamida del éster metílico de la (S)-fenilalanina **39** y se le adicionaron 3.71 g (29.887 mmol) de trimetilfosfita [(MeO)₃P]. El matraz se sumergió en un baño de aceite a una temperatura de 105 ± 5 °C y la mezcla de reacción se dejó en agitación por 5 horas. Transcurrido este tiempo, el matraz se colocó en el

Kugel-Rohr a 140 °C durante 5 horas para eliminar los compuestos volátiles [(MeO)₃P y (MeO)₂P(O)Me].

Obteniéndose un aceite amarillo, 99%, **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 2.87 (dd, *J* = 20.8, 4.8 Hz, 2H, CH₂P), 3.12 (2dd, *J* = 14.4, 5.6 Hz, 2H, CH₂Ph), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.69 y 3.76 (2d, *J* = 11.2 Hz, 6H, ((OCH₃)₃), 4.84 (dt, *J* = 9.2, 7.6 Hz, 1H, CHBn), 7.1 (a, 1H, NH), 7.16-7.32 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 34.0 (CH₂P), 38.0 (CH₂Ph), 52.0 (CHNH), 53.0 ((MeO)P), 54.0 (OMe), 127.0, 128.0, 129.0, 136.0, 164.0 (CONH), 172.0 (CO₂Me). **RMN ³¹P (81MHz, CDCl₃):** δ 25.66. **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₄H₂₁NO₆P [M+H]⁺, *m/z* 330.1106; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 330.1119.

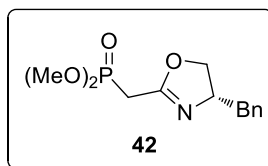
4.1.4 Preparación de (S)-(2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)-fosfonato de dimetilo.



En un matraz de 250 mL provisto con agitación magnética, se colocaron 2.92 g, (8.874 mmol) del éster metílico **40**, previamente disueltos en 30 mL THF. La solución resultante se calentó a 65 °C por 5 minutos y enseguida se adicionaron 2.01 g, (53.24 mmol) de borohidruro de sodio [6.0 Eq] de una manera lenta, evitando contacto con la boca del matraz, y se continuó con el calentamiento a esta temperatura por 15 minutos más. Posteriormente, se añadieron 15 mL de metanol grado reactivo gota a gota y se dejó reaccionar por 5 horas a reflujo. Después de este tiempo, se procedió a verificar el proceso de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Se separó la fase orgánica, adicionando aproximadamente 15 mL de agua destilada y se lavó la fase acuosa con acetato de etilo. Se secó con sulfato de sodio anhidro y evaporó hasta sequedad. Finalmente, se purificó por columna cromatográfica, utilizando un sistema de elución Acetato de etilo:Hexano:Metanol (5:4:1).

Obteniéndose un líquido viscoso transparente, 94%, **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 2.87 (d, *J* = 21.2, 2H, CH₂P), 2.88 (dd, *J* = 7.6, 2.4 Hz, 2H, CH₂Ph), 3.54 (dd, *J* = 11.2, 4.4 Hz, 2H, CH₂OH), 3.69 y 3.77 (2d, *J* = 11.6, 6H, (OCH₃)₃), 4.21 (m, 1H, CHBn), 7.1 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 7.18-7.30 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 35.0 (CH₂P), 37.0 (CH₂Ph), 53.0 (CH₂OH), 54.0 [(MeO)P], 63.0 (CHBn), 126.0, 128.6, 129.4, 138.0, 164.0 (CONH). **RMN ³¹P (81MHz, CDCl₃):** δ 26.585.

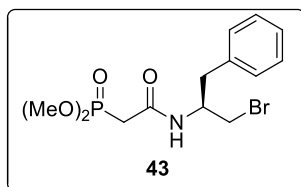
4.1.5 Preparación de (S)-((4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)metil) fosfonato de dimetilo.



En un matraz de 25 mL provisto con agitación magnética y en condiciones de sequedad, se colocaron 300 mg, (0.9958 mmol) de la fosfohidroxiamida **41** y se puso en un baño de temperatura a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, previamente disuelto en 10 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), seguido se adicionan 0.2423 g, 0.2019 mL, (1.0952 mmol) gota a gota el reactivo deoxo-flúor y se dejó reaccionar por 35 minutos. Después de este tiempo se le adicionaron 5 mL de una solución acuosa de bicarbonato de sodio saturada (NaHCO_3) y se deja a temperatura ambiente por 10 minutos, seguido se realizó la extracción con acetato de etilo en tres ocasiones. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se concentra a presión reducida. Finalmente, se purificó por columna cromatográfica, utilizando un sistema de elución Hexano:Acetato de etilo (1:1).

Obteniéndose un líquido viscoso amarillo, 32%, **RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 2.67 y 3.10 (2dd, $J = 13.6, 5.6$ Hz, 2H, CH_2P), 2.88 (dd, $J = 7.6, 2.4$ Hz, 2H, CH_2Ph), 2.94 (d, $J = 21.8$ Hz, 2H, CH_2P), 3.80 y 3.81 (2d, $J = 11.0$ Hz, 6H, $(\text{OCH}_3)_2\text{P}$), 4.10 y 4.25 (2dd, $J = 8.4$ Hz, 1H, CH_2O), 4.40 (m, 1H, $\text{CHN}=\text{)$, 7.12-7.40 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 25.0 y 28.0 (CH_2P), 42.0 (CH_2Ph), 53.0 [$(\text{MeO})\text{P}$], 67.0 (CHBn), 73.0 (CH_2O), 126.0, 129.0, 130.0, 138.0, 161.0 (CONH). **RMN de ^{31}P (81MHz, CDCl_3):** δ 24.93.

4.1.6 Preparación del (S)-(2-((1-bromo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)-fosfonato de dimetilo.

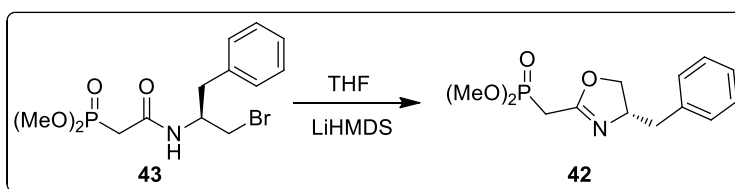


En un matraz de 250 mL se hicieron reaccionar 1.89 g, (6.273 mmol) de la fosfohidroxiamida de la (S)-fenilalanina **41** con 0.87 mL, 0.6348 g, (6.273 mmol) de trietilamina, posteriormente se adicionan 0.5 mL, 0.82 g, (6.9 mmol) de cloruro de

tionilo y finalmente 0.90 g, (7.528 mmol) de bromuro de sodio. La mezcla de reacción se deja reaccionando por 4 horas. Después de este tiempo, se procedió a verificar el proceso de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Se separó la fase orgánica, adicionando aproximadamente 15 mL de agua destilada y se lavó la fase acuosa con acetato de etilo. Se secó con sulfato de sodio anhidro y evaporó hasta sequedad. Finalmente, se purificó por columna cromatográfica, utilizando un sistema de elución Acetato de etilo:Hexano:Metanol (5:4:1).

Obteniéndose un sólido blanco, 80%, **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 2.84 (d, *J* = 20.7 Hz, 2H, CH₂P), 2.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂Ph), 3.49 y 3.64 (2dd, *J* = 11.4, 4.2 Hz, 2H, CH₂Br), 3.68 y 3.87 (2d, *J* = 11.4 Hz, 6H, (OCH₃)₂P), 4.45 (m, 1H, CHBn), 7.0 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 7.18-7.33 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 35.0 (CH₂P), 38.0 (CH₂Ph), 53.0 (CH₂OH), 54.0 [(MeO)P], 64.0 (CHBn), 126.0, 128.5, 129.4, 138.0, 164.0 (CONH).

4.1.7 Preparación del (S)-((4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)metil) fosfonato de dimetilo a partir de la fosfobromoamida 43.



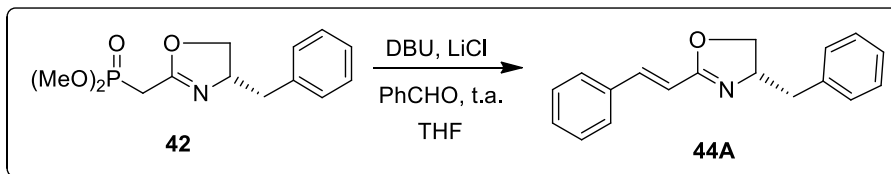
Se hicieron reaccionar 0.5 g, (1.37 mmol) de la fosfobromoamida de la (S)-fenilalanina **43** con 0.46 g, (2.74 mmol) de LiHMDS y se dejó a reflujo por 4 horas.

Después de este tiempo, se procedió a verificar el proceso de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Se separó la fase orgánica, adicionando aproximadamente 15 mL de agua destilada y se lavó la fase acuosa con acetato de etilo. Se secó con sulfato de sodio anhidro y evaporó hasta sequedad. Finalmente, se purificó por columna cromatográfica, utilizando un sistema de elución Acetato de etilo:Hexano:Metanol (5:4:1).

Obteniéndose un líquido viscoso amarillo, 17%, **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃):** δ 2.67 y 3.10 (2dd, *J* = 13.6, 5.6 Hz, 2H, CH₂P), 2.88 (dd, *J* = 7.6, 2.4 Hz, 2H, CH₂Ph), 2.94 (d, *J* = 21.8 Hz, 2H, CH₂P), 3.8 y 3.81 (2d, *J* = 11.0 Hz, 6H, (OCH₃)₂P), 4.10 y 4.25 (2dd, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH₂O), 4.4 (m, 1H, CHN), 7.12-7.40 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 25.0 y 28.0 (CH₂P), 42.0 (CH₂Ph), 53.0 [(MeO)P], 67.0

(CHBn), 73.0 (CH₂O), 126.0, 129.0, 130.0, 138.0, 161.0 (CONH). RMN de ³¹P (81MHz, CDCl₃): δ 24.930.

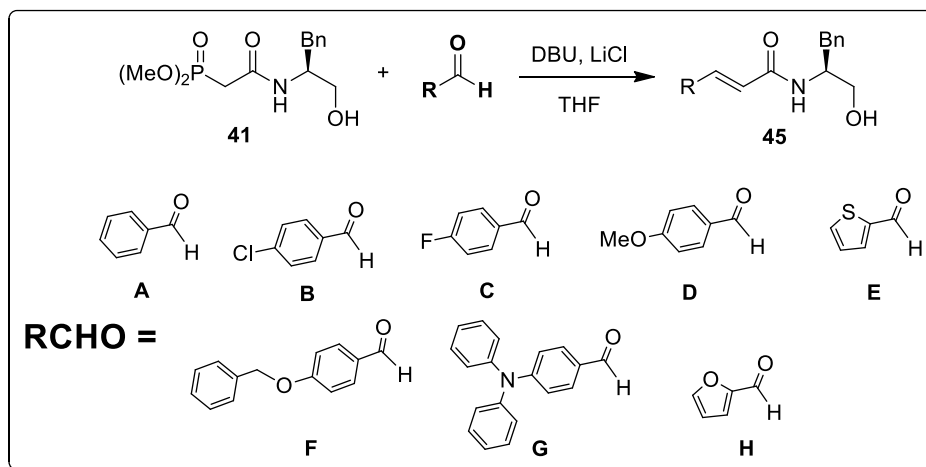
4.1.8 Preparación del (S,E)-4-bencil-2-stiril-4,5-dihidrooxazol.



Se hicieron reaccionar en un matraz de 25 mL, 0.070 g, (0.247 mmol) de la fosfooxazolina **42** con 0.11 mL, 0.11 g, (0.741 mmol) de DBU, 0.03 g, (0.741 mmol) de cloruro de litio y 0.025 mL, 0.026 g, (0.247 mmol) de benzaldehído, por 4 horas. Después de este tiempo, se procedió a verificar el proceso de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Se separó la fase orgánica, adicionando aproximadamente 15 mL de agua destilada y se lavó la fase acuosa con acetato de etilo. Se secó con sulfato de sodio anhidro y evaporó hasta sequedad. Finalmente, se purificó por columna cromatográfica, utilizando un sistema de elución Hexano:Acetato de etilo (7:3).

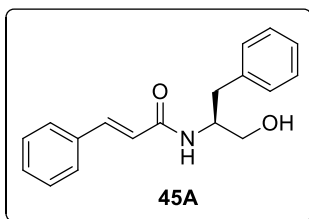
Obteniéndose un sólido blanco, 2-10%, p.f. 71-73 °C, [α]_D = -10.0 (c 1.0, MeOH).
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ δ 2.71 y 3.17 (2dd, *J* = 13.8, 8.7 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.05 y 4.29 (2dd, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 2H, CH₂OH), 4.52 (m, 1H, CHBn), 6.65 (d, *J*_{trans} = 16.2 Hz, 1H, CHC=N), 7.30-7.41 (m, 10H, H_{arom}), 7.32 (d, *J*_{trans} = 16.2 Hz, 1H, CH(C₆H₅)).
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 41.7 (CH₂Ph), 67.7 (CH₂O), 71.5 (CHBn), 115.1 (CH-C=N), 126.5, 127.5, 128.2, 128.5, 128.7, 128.7, 128.80, 128.9, 129.0, 129.1, 129.46, 137.92, 140.0 (CH=CH-CN), 163.7 (CH=N). **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₈H₁₈NO [M+H]⁺, *m/z* 264.1388; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 264.1400.

4.1.9 Procedimiento general I para la preparación de las hidroxiamidas α,β -insaturadas 45A-H.



En un matraz redondo de 100 mL provisto de agitación magnética, se colocaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno [1.0 Eq] de la fosfonoamida **41** y 30 mL de tetrahidrofurano seco. Posteriormente se adicionaron vía cánula [3.0 Eq] de cloruro de litio previamente disuelto en 5 mL de THF seco. Terminada la adición, se agregaron [3.0 Eq] de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU), la mezcla de reacción se dejó en agitación por 15 minutos y enseguida se adicionaron [1.2 Eq] del aldehído correspondiente. Terminada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 4 horas; transcurrido este tiempo, la reacción se terminó al adicionar una solución saturada de cloruro de amonio (10 mL) y se separaron las fases; la fase acuosa se lavó con acetato de etilo (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida y finalmente se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla Hexano:Acetato de Etilo (7:3) y Acetato de Etilo:Hexano:Metanol (5:4:1).

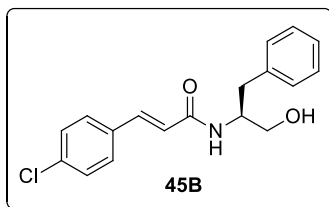
4.1.9.1 Preparación de la (S)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)cinamamida.



Siguiendo el procedimiento general I se hicieron reaccionar, 0.25 g, (0.85 mmol) de la fosfohidroxiamida **41**; 0.11 g, (2.55 mmol) de cloruro de litio; 0.37 mL 0.39 g, (2.55 mmol) de DBU y 0.086 mL, 0.09 g, (0.85 mmol) de benzaldehído.

Obteniéndose un sólido blanco, 96%, p.f. 144-146 °C, $[\alpha]_D = -100.0$ (c 1.0, MeOH). **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):** δ 2.95 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂Ph), 3.65 y 3.75 (2dd, $J = 11.1, 3.3$ Hz, 2H, CH₂OH), 4.30 (m, 1H, CHBn), 6.10 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 6.37 (2, $J_{trans} = 15.6$ Hz, H, CHC=O), 7.20-7.47 (m, 10H, H_{arom}), 7.60 (d, $J_{trans} = 15.6$ Hz, H, CH(C₆H₅)). **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₈H₂₀NO₂ [M+H]⁺, m/z 282.1494; encontrado para [M+H]⁺, m/z 282.1506.

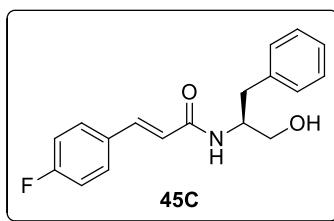
4.1.9.2 Preparación de la (S,E)-3-(4-clorofenil)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-acrilamida.



Siguiendo el procedimiento general I se hicieron reaccionar, 0.25 g, (0.847 mmol) de la fosfohidroxiamida **41**; 0.11 g, (2.543 mmol) de cloruro de litio; 0.37 mL, 0.39 g, (2.543 mmol) de DBU y 0.12 g, (0.847 mmol) de *p*-clorobenzaldehído.

Obteniéndose un sólido blanco, 98%, p.f. 132-134 °C, $[\alpha]_D = -1.3$ (c 3.0, MeOH). **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 2.88 (dd, $J = 13.9, 7.2$ Hz, 1H, CH₂Ph), 2.94 (dd, $J = 13.9, 7.3$ Hz, 1H, CH₂Ph) 3.56 (dd, $J = 11.3, 5.2$ Hz, 1H, CH₂OH), 3.64 (dd, $J = 11.3, 4.2$ Hz, 1H, CH₂OH), 4.19-4.34 (m, 1H, CHBn), 6.46 (d, $J_{trans} = 15.7$ Hz, 1H, CHC=O), 7.15-7.44 (m, 10H, H_{arom} y NH), 7.49 (d, $J_{trans} = 15.7$ Hz, 1H, CH(*p*-ClC₆H₄)). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 36.9 (CH₂Ph), 52.8 (CHBn), 63.0 (CH₂OH), 121.2, 126.4, 128.4, 129.0 (2), 129.2, 133.4, 135.5, 137.9, 139.6, 166.6 (C=O). **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₈H₁₉NO₂Cl [M+H]⁺, m/z 316.1104; encontrado para [M+H]⁺, m/z 316.1105.

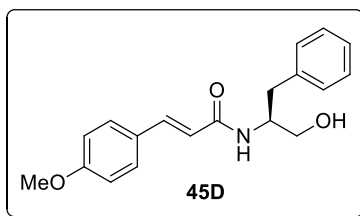
4.1.9.3 Preparación de la (S,E)-3-(4-fluorofenil)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-acrilamida.



Siguiendo el procedimiento general I se hicieron reaccionar, 0.49 g, (1.64 mmol) de la fosfohidroxiamida **41**; 0.21 g, (4.921 mmol) de cloruro de litio; 0.72 mL, 0.75 g, (4.921 mmol) de DBU y 0.18 mL, 0.20 g, (1.64 mmol) de *p*-fluorobenzaldehído.

Obteniéndose un sólido blanco, 96%, p.f. 75-77 °C, $[\alpha]_D = -88.3$ (c 1.6, MeOH). **RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 2.92 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2Ph), 3.62 (dd, $J = 11.2, 5.2$ Hz, 1H, CH_2OH), 3.72 (dd, $J = 11.2, 3.8$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.31 (m, 1H, CHBn), 6.28 (d, $J_{trans} = 15.6$ Hz, 1H, CHC=O), 6.38 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 6.90 (dd, $J = 8.8, 7.2$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.20-7.29 (m, 5H, H_{arom}), 7.37 (dd, $J = 8.4, 5.2$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.50 (d, $J_{trans} = 15.6$ Hz, 1H, $\text{CH}(p\text{-FC}_6\text{H}_4)$). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 37.2 (CH_2Ph), 53.2 (CHBn), 64.0 (CH_2OH), 116.0, 120.37 (CH), 126.8, 128.8, 129.4, 129.8, 131.0, 137.8, 140.4 (CH), 163.7, 166.6 (C=O). **EMAR (FAB^+):** calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 300.1400; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 300.1402.

4.1.9.4 Preparación de la (S,E)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-3-(4-metoxifenil)-acrilamida.

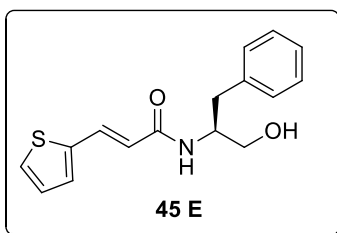


Siguiendo el procedimiento general I se hicieron reaccionar, 0.31 g, (1.015 mmol) de la fosfohidroxiamida **41**; 0.13 g, (3.045 mmol) de cloruro de litio; 0.45 mL 0.46 g, (3.047 mmol) de DBU y 0.12 mL, 0.14 g, (1.015 mmol) de *p*-metoxibenzaldehído.

Obteniéndose un sólido blanco, 95%, p.f. 128-130 °C, $[\alpha]_D = -95.7$ (c 1.0, MeOH). **RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):** δ 2.91 (dd, $J = 14.1, 7.6$ Hz, 1H, CH_2Ph), 2.98 (dd, $J = 14.1, 7.6$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3.60 (dd, $J = 11.2, 5.1$ Hz, 1H, CH_2OH), 3.67 (dd, $J = 11.2, 4.3$ Hz, 1H, CH_2OH), 3.78 (s, 3H, OMe), 4.26-4.34 (m, 2H, CHBn y NH), 6.40 (d, $J_{trans} = 15.7$ Hz, 1H, CHC=O), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.13-7.31 (m, 5H, H_{arom}), 7.42

(d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.51 (d, $J_{\text{trans}} = 15.7$ Hz, 1H, $\text{CH}(p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4)$). **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):** δ 36.6 (CH_2Ph), 52.5 (CHBn), 54.8 ($\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$), 62.6 (CH_2OH), 113.7, 117.7, 125.8, 126.9, 127.8, 128.7, 128.8, 137.6, 140.0, 160.3, 166.7 (C=O). **EMAR (FAB $^+$):** calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 312.1600; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 312.1587.

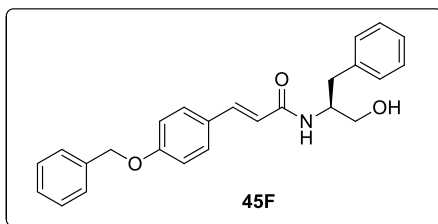
4.1.9.5 Preparación de la (*S,E*)-*N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-3-(tiofen-2-il)acrilamida.



Siguiendo el procedimiento general I se hicieron reaccionar, 0.84 g, (2.797 mmol) de la fosfohidroxiamida **41**; 0.36 g, (8.388 mmol) de cloruro de litio; 1.28 g, 1.23 mL, (8.388 mmol) de DBU y 0.31 g, 0.26 mL, (2.797 mmol) de tiofen 2-carbaldehído.

Obteniéndose un sólido amarillo, 93%, p.f. 110-113 °C, $[\alpha]_D = -161.45$ (c 3.0, MeOH). **RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 2.95 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2Ph), 3.65 (dd, $J = 11.1$, 5.1 Hz, 1H, CH_2OH), 3.75 (dd, $J = 11.1$, 3.6 Hz, 1H, CH_2OH), 4.32 (m, 1H, CHBn), 6.09 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH), 6.19 (d, $J_{\text{trans}} = 15.3$ Hz, 1H, CHC=O), 7.03 (dd, $J = 5.0$, 3.6 Hz, 1H, CH=C-S), 7.19-7.34 (m, 7H, H_{arom}), 7.73 (d, $J_{\text{trans}} = 15.3$ Hz, 1H, CHCS). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 37.0 (CH_2Ph), 53.1 (CHBn), 64.1 (CH_2OH), 119.2, 126.7, 127.5, 128.0, 128.7, 129.3, 130.5, 134.3, 137.6, 139.8, 166.3 (C=O). **EMAR (FAB $^+$):** calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 288.1058; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 288.1071.

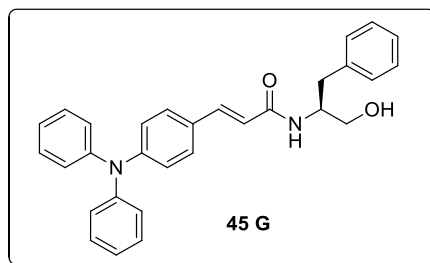
4.1.9.6 Preparación de la (*S,E*)-3-(4-(benciloxi)fenil)-*N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida.



Siguiendo el procedimiento general I se hicieron reaccionar, 0.69 g, (2.285 mmol) de la fosfohidroxiamida **41**; 0.29 g, (6.855 mmol) de cloruro de litio; 1.04 g, 1.0 mL, (6.8561 mmol) de DBU y 0.49 g, (2.285 mmol) de benciloxibenzaldehído.

Obteniéndose un sólido blanco, 64%, p.f. 171-173 °C, $[\alpha]_D = -83.35$ (c 1.0, DMSO). **RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 2.69 (dd, $J = 13.7, 8.5$ Hz, 1H, CH_2Ph), 2.90 (dd, $J = 13.7, 5.6$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3.36 (dd, $J = 10.7, 5.6$ Hz, 1H, CH_2OH), 3.42 (dd, $J = 10.8, 4.9$ Hz, 1H, CH_2OH), 3.94-4.12 (m, 1H, CHBn), 5.13 (s, 2H, PhCH_2O), 6.52 (d, $J_{trans} = 15.9$ Hz, 1H, $\text{CHC}=\text{O}$), 7.04 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.31 (d, $J_{trans} = 15.9$ Hz, 1H, $\text{CH}(p\text{-BnOC}_6\text{H}_4)$), 7.12-7.53 (m, 10H, H_{arom}), 7.48 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_{arom}), 8.03 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH). **RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6):** δ 36.7 (CH_2Ph), 52.5 (CHBn), 62.8 (CH_2OH), 69.9 (OCH_2Ph), 114.9, 118.0, 126.2, 127.3, 127.5, 127.8, 128.2, 128.4, 129.0, 129.1, 136.3, 137.8, 140.5, 159.9, 167.1. **EMAR (FAB $^+$):** calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 388.1913; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 388.1910.

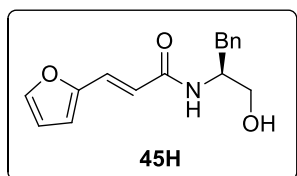
4.1.9.7 Preparación de la (S,E)-3-(4-(difenilamino)fenil)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida.



Siguiendo el procedimiento general I se hicieron reaccionar, 1.03 g, (3.11 mmol) de la fosfohidroxiamida **41**; 0.39 g, (9.35 mmol) de cloruro de litio; 1.37 mL, 1.42 g, (9.35 mmol) de DBU y 0.85 g, (3.11 mmol) de 4-(difenilamino)benzaldehído.

Obteniéndose un sólido verde, 64%, p.f. 70-74 °C, $[\alpha]_D = -161.78$ (c 3.0, MeOH). **RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 2.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2Ph), 3.66 (dd, $J = 11.1, 5.2$ Hz, 1H, CH_2OH), 3.76 (dd, $J = 11.1, 3.5$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.32 (m, 1H, CHBn), 6.05 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 6.24 (d, $J_{trans} = 15.5$ Hz, 1H, $\text{CHC}=\text{O}$), 6.99 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.07-7.13 (m, 6H, H_{arom}), 7.21-7.34 (m, 11H, H_{arom}), 7.54 (d, $J_{trans} = 15.5$ Hz, 1H, $\text{CH}(p\text{-C}_6\text{H}_4\text{-N}(\text{Ph})_2)$). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 37.1 (CH_2Ph), 53.2 (CHBn), 64.3 (CH_2OH), 117.7, 122.0, 123.8, 125.2, 126.7, 127.8, 128.7, 128.9, 129.3, 129.4, 137.7, 141.2, 147.0, 149.4, 167.0 (C=O). **EMAR (FAB $^+$):** calculado $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 449.2229; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 449.2227.

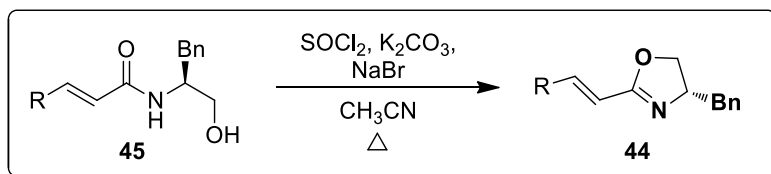
4.1.9.8 Preparación de la (S,E)-3-(furan-2-il)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida.



Siguiendo el procedimiento general I se hicieron reaccionar, 0.51 g, (1.54 mmol) de la fosfohidroxiamida **41**; 0.20 g, (4.63 mmol) de cloruro de litio; 0.67 mL, 0.71 g, (4.63 mmol) de DBU y 0.12 mL, 0.15 g, (1.54 mmol) de 2-furaldehído.

Obteniéndose un sólido blanco, 71%, p.f. 108-111 °C, $[\alpha]_D = -116.0$ (c 1.0, MeOH). **RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 2.91 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2Ph), 3.60 (dd, $J = 11.2, 5.3$ Hz, 1H, CH_2OH), 3.70 (dd, $J = 11.2, 3.8$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.29 (m, 1H, CHBn), 6.28 (d, $J_{trans} = 15.3$ Hz, 1H, $\text{CHC}=\text{O}$), 6.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 6.39 (dd, $J = 3.4, 1.8$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{O}$), 6.49 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 7.34 (d, $J_{trans} = 15.3$ Hz, 1H, CH -furilo), 7.14-7.37 (m, 6H, H_{arom} y $\text{CH}=\text{O}$). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 37.2 (CH_2Ph), 53.2 (CHBn), 64.0 (CH_2OH), 112.3, 114.2, 118.3, 126.8, 128.4, 128.7, 129.4, 137.8, 144.3, 151.3, 166.7 ($\text{C}=\text{O}$). **EMAR (FAB^+):** calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 272.1287; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 272.1282.

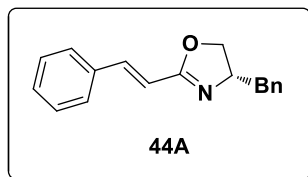
4.1.10 Procedimiento general II para la preparación de oxazolinas α,β -insaturadas.



En un matraz redondo de 250 mL provisto de agitación magnética se coloca [1.0 Eq] de la β -hidroxiamida α,β -insaturada **45** correspondiente en 30 mL de acetonitrilo. Enseguida se adiciona lentamente cloruro de tionilo (SOCl_2) [1.1 Eq], se deja en agitación por 10 minutos. Después de este tiempo se añade carbonato de potasio (K_2CO_3) [2.2 Eq] y se deja reaccionar por 20 minutos más, posterior a este tiempo se añade bromuro de sodio (NaBr) [1.0 Eq] y se mantiene a reflujo por otras 4 horas. La reacción se terminó mediante la adición de 5 mL de NH_4Cl y 10 mL de H_2O destilada, posteriormente se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), se filtró y se

evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna con gel de sílice usando como eluente una mezcla de Hex/AcOEt (7:3).

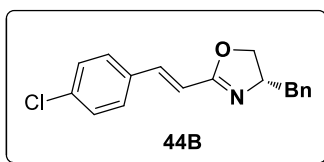
4.1.10.1 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-stiril-4,5-dihidrooxazol.



Siguiendo el procedimiento general II se hicieron reaccionar, 0.35 g, (1.229 mmol) de la (S)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)cinamamida **45A**; 0.16 g, 0.10 mL, (1.3521 mmol) de SOCl₂; 0.37 g, (2.705 mmol) de K₂CO₃ y 0.15 g, (1.229 mmol) de bromuro de sodio.

Obteniéndose un sólido blanco, 60%, p.f. 71-73 °C, [α]_D = -10.0 (c 1.0, MeOH). **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):** δ 2.71 y 3.17 (2dd, *J* = 13.8, 8.7 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.05 y 4.29 (2dd, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 2H, CH₂OH), 4.52 (m, 1H, CHBn), 6.65 (d, *J*_{trans} = 16.2 Hz, 1H, CHC=N), 7.30-7.41 (m, 10H, H_{arom}), 7.32 (d, *J*_{trans} = 16.2 Hz, 1H, CH(C₆H₅)). **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃):** δ 41.7 (CH₂Ph), 67.7 (CH₂O), 71.5 (CHBn), 115.1 (CH-C=N), 126.5, 127.5, 128.2, 128.5, 128.7, 128.7, 128.80, 128.9, 129.0, 129.1, 129.46, 137.92, 140.0 (CH=CH-CN), 163.7 (CH=N). **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₈H₁₈NO [M+H]⁺, *m/z* 264.1388; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 264.1400.

4.1.10.2 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-clorostiril)-4,5-dihidrooxazol.

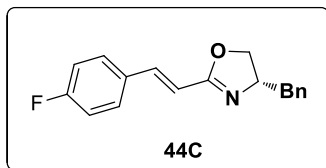


Siguiendo el procedimiento general II se hicieron reaccionar, 1.53 g, (4.851 mmol) de la (S,E)-3-(4-clorofenil)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida **45B**; 0.64 g, 0.39 mL, (5.336 mmol) de SOCl₂; 1.48 g, (10.672 mmol) de K₂CO₃ y 0.50 g, (4.851 mmol) de bromuro de sodio.

Obteniéndose un sólido blanco, 32%, p.f. 81-83 °C, [α]_D = +4.0 (c 1.0, MeOH). **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):** δ 2.70 (dd, *J* = 13.8, 8.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 3.14 (dd, *J* = 13.8, 5.4 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.04 (dd, *J* = 8.4, 7.8 Hz, 1H, CH₂OH), 4.27 (dd, *J* = 9.0, 8.4 Hz, 1H, CH₂OH), 4.48 (m, 1H, CHBn), 6.62 (d, *J*_{trans} = 16.2 Hz, 1H, CHC=N), 7.21-7.51 (m,

10H, H_{arom} y CH(*p*-ClC₆H₄)). **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃):** δ 41.7 (CH₂Ph), 67.7 (CHBn), 71.6 (CH₂O), 115.8 (CH), 123.6, 126.5, 128.6, 128.8, 129.1, 132.0, 134.1, 137.8, 138.7 (CH), 163.4 (C=N). **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₈H₁₇NOCl [M+H]⁺, *m/z* 298.0999; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 298.1002.

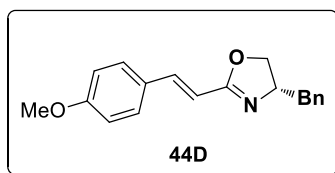
4.1.10.3 Preparación de la (*S,E*)-4-bencil-2-(4-fluorostiril)-4,5-dihidrooxazol.



Siguiendo el procedimiento general II se hicieron reaccionar, 0.69 g, (2.307 mmol) de la (*S,E*)-3-(4-fluorofenil)-*N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida **45C**; 0.30 g, 0.1841 mL, (2.536 mmol) de SOCl₂; 0.70 g, (5.074 mmol) de K₂CO₃ y 0.28 g, (2.307 mmol) de bromuro de sodio.

Obteniéndose un sólido blanco, 30%, p.f. 93-95 °C, [α]_D = +17.7 (c 1.0, MeOH). **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):** δ 2.91 (dd, *J* = 13.7, 8.5 Hz, 1H, CH₂Ph), 3.35 (dd, *J* = 13.7, 8.5 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.25 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH₂OH), 4.49 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH₂OH), 4.72 (m, 1H, CHBn), 6.75 (d, *J*_{trans} = 16.2 Hz, 1H, CHC=N), 7.20-7.24 (m, 1H, H_{arom}), 7.32 (d, *J*_{trans} = 16.2 Hz, 1H, CH(*p*-FC₆H₄)), 7.45-7.65 (m, 7H, H_{arom}), 7.67-7.68 (m, 1H, H_{arom}). **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃):** δ 41.7 (CH₂Ph), 67.7 (CH₂O), 71.6 (CHBn), 114.9 (CH-C=N), 115.8, 116.0 (CH-CH-F) 126.5, 128.5, 128.6, 129.1, 129.2, 129.3, 131.4, 137.9, 138.7, 161.7, 163.6, 165.1. **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₈H₁₇FNO [M+H]⁺, *m/z* 282.1294; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 282.1304.

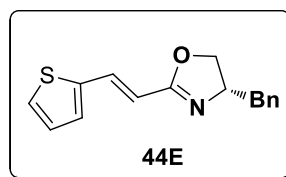
4.1.10.4 Preparación de la (*S,E*)-4-bencil-2-(4-metoxistiril)-4,5-dihidrooxazol.



Siguiendo el procedimiento general II se hicieron reaccionar, 0.26 g, (0.829 mmol) de la (*S,E*)-*N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-3-(4-metoxifenil)acrilamida **45D**; 0.15 g, 0.09 mL, (0.912 mmol) de SOCl₂; 0.25 g, (1.824 mmol) de K₂CO₃ y 0.10 g, (0.829 mmol) de bromuro de sodio.

Obteniéndose un sólido blanco, 34%, p.f. 68-70 °C, $[\alpha]_D = +16.3$ (c 1.0, MeOH). **RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):** δ 2.72 (dd, $J = 13.8, 8.7$ Hz, 1H, CH_2Ph) 3.16 (dd, $J = 13.8, 4.8$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3.80 (s, 3H, CH_3O), 4.03 (dd, $J = 8.1, 7.5$ Hz, 1H, CH_2O), 4.26 (dd, $J = 8.7, 8.1$ Hz, 1H, CH_2O), 4.50 (m, 1H, CHBn), 6.52 (d, $J_{trans} = 16.2$ Hz, 1H, $\text{CHC}=\text{N}$), 7.32 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.22- 7.43 (m, 8H, H_{arom} y $\text{CH}(p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4)$). **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):** δ 41.8 (CH_2Ph), 55.3 (CH_3O), 67.6 (CHBn), 71.5 (CH_2O), 112.7 (CH), 114.2, 126.5, 127.9, 128.5, 128.9, 129.1, 138.0, 139.7, 160.7, 164.0 ($\text{C}=\text{N}$). **EMAR (FAB $^+$):** calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 294.1494; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 294.1490.

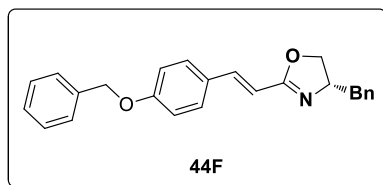
4.1.10.5 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)-4,5-dihidrooxazol.



Siguiendo el procedimiento general II se hicieron reaccionar, 0.44 g, (1.547 mmol) de la (S,E)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-3-(tiofen-2-il)acrilamida **45D**; 0.20 g, 0.12 mL, (1.701 mmol) de SOCl_2 ; 0.47 g, (3.404 mmol) de K_2CO_3 y 0.16 g, (1.547 mmol) de bromuro de sodio.

Obteniéndose un sólido café, p. f. 62-64, 63%, **RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 2.73 (dd, $J = 13.8, 8.5$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3.18 (dd, $J = 13.7, 5.5$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.06 (dd, $J = 8.2, 7.6$ Hz, 1H, CH_2O), 4.29 (dd, $J = 9.6, 8.5$ Hz, 1H, CH_2O), 4.53 (m, 1H, CHBn), 6.47 (d, $J_{trans} = 16.0$ Hz, 1H, $\text{CHC}=\text{N}$), 7.05 (dd, $J = 5.0, 3.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH-S}$), 7.17-7.36 (m, 7H, H_{arom}), 7.46 (d, $J_{trans} = 16.0$ Hz, 1H, CH-C-S). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 41.8 (CH_2Ph), 67.8 (CH_2O), 71.6 (CHBn), 114.2, 126.5, 127.3, 127.9, 128.6, 129.2 (2C), 132.7, 138.0, 140.5, 163.4 ($\text{C}=\text{N}$).

4.1.10.6 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-(benciloxi)stiril)-4,5-dihidrooxazol.

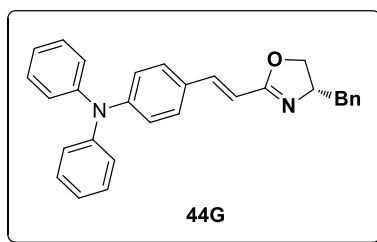


Siguiendo el procedimiento general II se hicieron reaccionar, 0.51 g, (1.326 mmol) de la (S,E)-3-(4-(benciloxi)fenil)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida **45F**; 0.17 g,

0.11 mL, (1.458 mmol) de SOCl_2 ; 0.40 g, (2.918 mmol) de K_2CO_3 y 0.14 g, (1.326 mmol) de bromuro de sodio.

Obteniéndose un sólido blanco, 64%, p.f. 141-143 °C, $[\alpha]_{\text{D}} = +23.4$ (c 1.0, CHCl_3). **RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):** δ 2.70 (dd, $J = 13.8, 9.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3.16 (dd, $J = 13.5, 5.1$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.03 (dd, $J = 8.2, 7.5$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.27 (dd, $J = 9.3, 8.2$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.49 (m, 1H, CHBn), 5.08 (s, 2H, CH_2O), 6.51 (d, $J_{\text{trans}} = 16.2$ Hz, 1H, $\text{CHC}=\text{N}$), 6.97 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.22-7.43 (m, 13H, H_{arom} y $\text{CH}(p\text{-BnOC}_6\text{H}_4)$). **RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6):** δ 41.8 (CH_2Ph), 67.7 (CHBn), 70.0 (CH_2Ph), 71.5 (CH_2O), 112.9, 115.1, 126.5, 127.4, 128.1, 128.5, 128.6, 129.0 (2), 129.1, 136.5, 138.0, 139.6, 159.9, 164.0 ($\text{C}=\text{N}$). **EMAR (FAB^+):** calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 370.1807; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 370.1820.

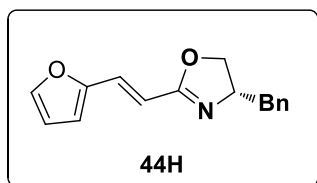
4.1.10.7 Preparación de la (*S,E*)-4-bencil-2-(4-defenilaminostiril)-4,5-dihidrooxazol.



Siguiendo el procedimiento general II se hicieron reaccionar, 0.44 g, (0.974 mmol) de la (*S,E*)-3-(4-(difenilamino)fenil)-*N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida **45G**; 0.17 g, 0.11 mL, (1.462 mmol) de SOCl_2 ; 0.30 g, (2.144 mmol) de K_2CO_3 y 0.12 g, (1.169 mmol) de bromuro de sodio.

Obteniéndose un sólido amarillo, 38%, p.f. 151-153 °C.

4.1.10.8 Preparación de la (*S,E*)-4-bencil-2-(2-(furan-2-il)vinil)-4,5-dihidrooxazol.

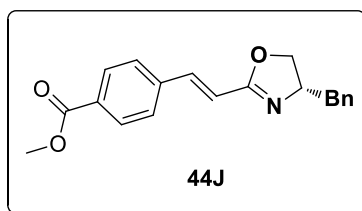


Siguiendo el procedimiento general II se hicieron reaccionar, 0.20 g, (0.73 mmol) de la (*S,E*)-3-(furan-2-il)-*N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)acrilamida **45H**; 0.10 g, 0.06 mL,

(0.81 mmol) de SOCl_2 ; 0.22 g, (1.62 mmol) de K_2CO_3 y 0.08 g, (0.73 mmol) de bromuro de sodio.

Obteniéndose un sólido café, 41%, p.f. 72-74 °C, $[\alpha]_D = +16.0$ (c 1.0, MeOH). **RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):** δ 2.90 (dd, $J = 13.8, 8.4$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3.16 (dd, $J = 13.8, 5.2$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.01 (dd, $J = 8.5, 7.5$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.24 (dd, $J = 9.0, 8.5$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.49 (m, 1H, CHBn), 6.42-6.44 (m, 1H, H_{arom}), 6.48 y 6.57 (m, 2H, H_{arom} y $\text{CHC}=\text{O}$), 7.07-7.45 (m, 7H, H_{arom} y CH-furfuril). **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):** δ 41.6 (CH_2Ph), 67.6 (CHBn), 71.4 (CH_2O), 112.0, 112.7, 112.8, 126.4, 127.0, 128.5, 129.1, 137.8, 144.0, 151.3, 163.6 ($\text{C}=\text{N}$). **EMAR (FAB^+):** calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 254.1181; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 254.1187.

4.1.10.9 Preparación de la (S,E)-4-(2-(4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)vinil)benzoato de metilo.

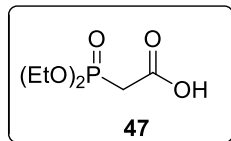


Siguiendo el procedimiento general II se hicieron reaccionar, 0.23 g, (0.68 mmol) de la (S,E)-4-(3-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-oxoprop-1-en-1-il) benzoato de metilo **45J**; 0.09 g, 0.05 mL, (0.75 mmol) de SOCl_2 ; 0.21 g, (1.51 mmol) de K_2CO_3 y 0.07 g, (0.68 mmol) de bromuro de sodio.

Obteniéndose un sólido blanco, 47%, p.f. 114-115 °C, $[\alpha]_D = +4.0$ (c 1.0, MeOH). **RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):** δ 2.70 (dd, $J = 13.8, 8.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3.16 (dd, $J = 13.8, 5.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3.92 (s, 3H, MeO), 4.06 (dd, $J = 8.5, 7.5$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.30 (dd, $J = 9.3, 8.5$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.52 (m, 1H, CHBn), 6.72 (d, $J_{\text{trans}} = 16.2$ Hz, 1H, $\text{CHC}=\text{N}$), 7.21-7.38 (m, 6H, H_{arom} y $\text{CH}(p\text{-CH}_3\text{O}_2\text{CC}_6\text{H}_4)$), 7.52 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{arom}), 8.03 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{arom}). **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):** δ 41.7 (CH_2Ph), 52.2 (CH_3O), 67.8 (CHBn), 71.6 (CH_2O), 117.6, 126.5, 127.3, 128.6, 129.1, 130.0, 130.6, 137.8, 138.7, 139.5, 163.3 ($\text{C}=\text{N}$), 166.6 ($\text{C}=\text{O}$). **EMAR (FAB^+):** calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 322.1443; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 322.1430.

4.1.11 Ruta alterna para la obtención de β -hidroxiamidas.

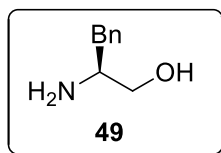
4.1.11.1 Preparación de ácido 2-(dietoxifosforil) acético.



En un matraz redondo de 200 mL provisto de agitación magnética, se colocaron 5.0 g, 4.42 mL (22.3 mmol) de trietilfosfonoacetato, 2.50 g, (44.6 mmol) de hidróxido de potasio y 100 mL de una mezcla de MeOH:H₂O (80:20). La mezcla de reacción se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la reacción se terminó adicionando gota a gota aproximadamente 14 mL de ácido clorhídrico al 20% en metanol hasta ajustar a pH= 2. Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 10 min, se filtró y lavó con 20 mL de metanol. El residuo obtenido se evaporó a presión reducida y posteriormente se le adicionaron 15 mL de acetato de etilo y se enfrió a 0 °C por 20 minutos para precipitar sales remanentes. El sólido resultante se filtró y lavó con 20 mL de acetato de etilo, se evaporó a presión reducida y enseguida se separaron las fases, la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida.

Obteniéndose un líquido viscoso transparente, 99%, **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):** δ 1.34 (t, J = 6.8 Hz, 6H, CH₃CH₂OP), 2.07 (a, 1H, HO), 2.99 (d, J = 21.7 Hz, 2H, CH₂OOH), 4.18 (m, 4H, CH₃CH₂OP). **RMN de ³¹P (121 MHz, CDCl₃):** δ 21.86.

4.1.11.2 Preparación de (S)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol.

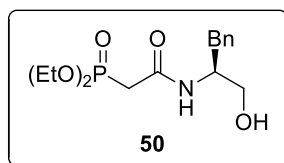


En un matraz redondo de 500 mL provisto de agitación magnética se colocaron 5.58 g, (33.8 mmol) de (S)-fenilalanina en 100 mL de THF. El matraz de reacción se agitó y se sumergió en un baño de hielo a 0 °C. Posteriormente, se adicionaron lentamente 2.69 g, (70.9 mmol) de LiAlH₄. Terminada la adición, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 horas con agitación constante. Transcurrido ese tiempo, el matraz de reacción se enfrió a 0 °C y entonces se adicionaron lenta y cuidadosamente 10 mL de agua destilada. Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó por 10 minutos a

temperatura ambiente y enseguida se adicionó gota a gota una solución de hidróxido de sodio al 10 % (NaOH: H₂O). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos más y posteriormente se filtró y se lavó con 20 mL de acetato de etilo. El residuo obtenido se evaporó a presión reducida, se disolvió en 10 mL de AcOEt y se enfrió a 0 °C durante 12 horas para su cristalización. El sólido obtenido se filtró y se lavó con éter etílico.

Obteniéndose un sólido blanco, 72%, p.f 90-92 °C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):** δ 2.31 (a, 1H, OH), 2.52 y 2.79 (2dd, *J* = 8.7, 13.4 Hz, 2H, CH₂Ph), 3.11 (m, 1H, CHBn), 3.40 y 3.63 (2dd, *J* = 10.7, 3.8 Hz, 2H, CH₂OH), 7.25 (m, 5H, H_{arom}).

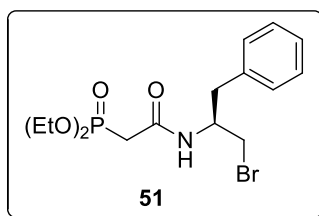
4.1.11.3 Preparación de (*S*)-2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil fosfonato de dietilo.



En un matraz redondo de 250 mL provisto de agitación magnética, se colocaron bajo atmósfera inerte de N₂ 4.37 g, (22.3 mmol) del ácido 2-(dietoxifosforil) acético **47**, 3.1 g, (20.2 mmol) del (*S*)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol **49** y 30 mL de cloruro de metileno seco. En otro matraz de 100 mL se colocaron bajo atmósfera inerte de N₂ 4.15 g, (20.2 mmol) de DCC, 0.49 g (4.02 mmol) de DMAP y 30 mL de cloruro de metileno seco. Posteriormente, la mezcla de reacción del primer matraz se agitó por 10 minutos para favorecer la disolución y enseguida se adicionó vía cánula la mezcla del segundo matraz. Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó por 20 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró y se lavó con 20 mL de AcOEt, el residuo orgánico se evaporó a presión reducida, obteniéndose un líquido viscoso amarillo. El líquido viscoso resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluente una mezcla de AcOEt:Hex:MeOH (5:4:1).

Obteniéndose un aceite viscoso, 94%, [α]_D = -16.5 (c 1.7, MeOH). **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):** δ 1.28 y 1.31 (2t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃CH₂O), 2.82 (2d, *J* = 21.0 Hz, 4H, CH₂CO y CH₂Ph), 3.50- 3.69 (m, 2H, CH₂OH), 3.98-4.14 (m, 4H, CH₃CH₂O), 4.16-4.25 (m, 1H, CHNH), 6.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 7.16-7.31 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ³¹P (121 MHz, CDCl₃):** δ 23.89. **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₅H₂₅NO₅P [M+H]⁺, *m/z* 330.1470; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 330.1467.

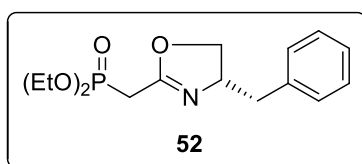
4.1.11.4 Preparación de (S)-2-((1-bromo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo.



En un matraz redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se colocaron 2.02 g (6.1 mmol) del (S)-2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo **50** y 30 mL de diclorometano seco. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 10 minutos y posteriormente se adicionaron 0.85 mL (6.1 mmol) de Et₃N. Enseguida se adicionó gota a gota 0.88 mL (12.3 mmol) de SOCl₂. Terminada la adición, la mezcla de reacción se calentó a reflujo por 20 minutos con agitación constante. Posteriormente, se adicionó al matraz 0.94 g (9.2 mmol) de NaBr y la mezcla de reacción se calentó a reflujo por 2 horas. La reacción se terminó mediante la adición de 5 mL de NH₄Cl y 10 mL de H₂O destilada, posteriormente se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna con gel de sílice usando como eluente una mezcla de AcOEt/Hex/MeOH (5:4:1).

Obteniéndose un sólido blanco, 80%, p.f. 89-91 °C, [α]_D = -12.9 (c 1.0, MeOH). **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):** δ 1.30 y 1.34 (2t, J = 7.2 Hz, 6H, (CH₃CH₂O)₂P), 2.82 y 2.87 (2dd, J = 17.8; 15.5 Hz, 2H, CH₂P), 2.94 (d, J = 7.8 Hz, 2H, CH₂Ph), 3.51 y 3.64 (2dd, J = 11.3, 3.5 Hz, 1H, CH₂Br), 4.06 y 4.15 (2dc, J = 14.2, 7.1 Hz, 4H, CH₂OP), 4.42-4.50 (m, 1H, CHBn), 7.10 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH), 7.21-7.33 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃):** δ 16.4 ((CH₃CH₂O)₂P), 16.5 ((CH₃CH₂O)₂P), 35.2 (d, J = 131.0 Hz, CH₂P), 37.5 (CH₂Ph), 46.5 (CH₂Br), 51.5 (CHBn), 62.9 (d, J = 3.7 Hz, CH₂OP), 63.0 (d, J = 3.7 Hz, CH₂OP), 127.0, 128.9, 129.4, 137.0, 163.9 (C=O). **RMN ³¹P (121 MHz, CDCl₃):** δ 22.46.

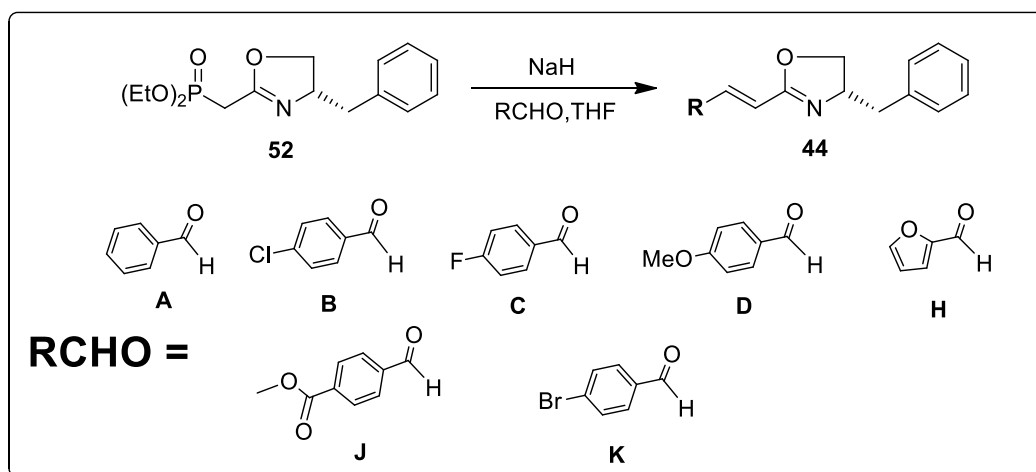
4.1.11.5 Preparación de (S)-((4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)metil) fosfonato de dietilo.



En un matraz redondo de 100 mL provisto de agitador magnético se colocó bajo atmósfera inerte de N₂ 0.13 g (5.6 mmol) de NaH en 25 mL de THF seco. Posteriormente se adicionaron vía cánula 1.0 g (2.5 mmol) de la fosfobromoamida **51** previamente disueltos en 15 mL de THF seco. Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 20 horas bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo, la reacción se terminó con la adición de 5 mL de NH₄Cl y 10 mL de H₂O destilada. Posteriormente se separaron fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de AcOEt:Hex:MeOH (5:4:1) como fase móvil.

Obteniéndose un aceite amarillo, 83%, $[\alpha]_D = -42.9$ (c 4.7, MeOH). **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):** δ 1.35 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H, (CH₃CH₂O)₂P), 2.93 (d, $J = 21.5$ Hz, 2H, CH₂P), 2.66 y 3.10 (2dd, $J = 8.5, 13.8$ Hz, 2H, CH₂Ph), 4.02 y 4.24 (2dd, $J = 9.1, 7.5$ Hz, 2H, CH₂O), 4.17 (dc, $J = 14.4, 7.1$ Hz, 4H, CH₂OP), 4.37-4.46 (m, 1H, CHBn), 7.19-7.32 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃):** δ 16.4 ((CH₃-CH₂O)₂P), 16.4 ((CH₃CH₂O)₂P), 27.4 (d, $J = 138.6$ Hz, CH₂P), 41.6 (CH₂Ph), 62.7 (d, $J = 5.3$ Hz, CH₂OP), 67.6 (CHBn), 72.4 (CH₂O), 126.7, 128.6, 129.2, 137.8, 160.4 (d, $J = 8.9$ Hz, C=N). **RMN ³¹P (121 MHz CDCl₃):** δ 21.13. **EMAR (FAB⁺):** calculado para C₁₅H₂₃NO₄-P [M+H]⁺, m/z 312.1365; encontrado para [M+H]⁺, m/z 312.1363.

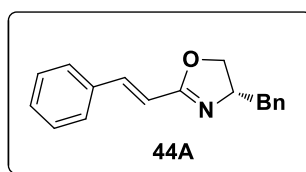
4.1.12 Procedimiento general III para la preparación de oxazolinas α,β -insaturadas a partir de la fosfo-oxazolina **52**.



En un matraz redondo de 100 mL provisto con agitación magnética, se colocaron bajo atmósfera inerte de N₂ [2.2 Eq] de NaH en 25 mL de THF seco. Posteriormente se adicionó vía cánula [1.0 Eq] de la fosfo-oxazolina **52** previamente disuelta en 15 mL de

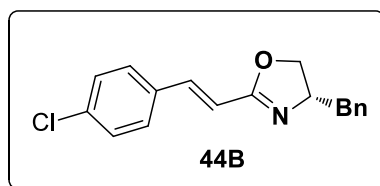
THF seco, terminada la adición, la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se adicionó [1.1 Eq] del aldehído correspondiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas bajo atmósfera inerte. Transcurrido el tiempo de reacción, se terminó la misma con la adición de una solución saturada de NH_4Cl (5 mL) y 10 mL de H_2O destilada, se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida. Finalmente el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y usando como eluente una mezcla Hex:AcOEt (7:3).

4.1.12.1 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-stiril-4,5-dihidrooxazol.



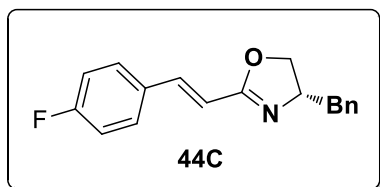
Siguiendo el procedimiento general III se hicieron reaccionar, 0.30 g, (2.0 mmol) de la fosfo-oxazolina **52**; 0.06 g, (4.0 mmol) de NaH; y 0.31 g, (2.2 mmol) de benzaldehído. Obteniéndose un sólido blanco, 30%, p.f. 71-73 °C.

4.1.12.2 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-clorostiril)-4,5-dihidrooxazol.



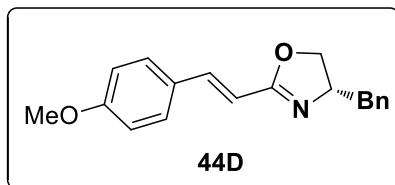
Siguiendo el procedimiento general III se hicieron reaccionar, 0.63 g, (2.03 mmol) de la fosfo-oxazolina **52**; 0.11 g, (4.4 mmol) de NaH y 0.31 g, (2.2 mmol) de *p*-clorobenzaldehído. Obteniéndose un sólido blanco, 32%, p.f. 81-83 °C.

4.1.12.3 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-fluorostiril)-4,5-dihidrooxazol.



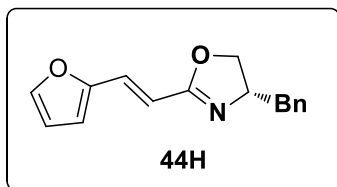
Siguiendo el procedimiento general III se hicieron reaccionar, 0.67 g, (2.1 mmol) de la fosfo-oxazolona **52**; 0.11 g, (4.7 mmol) de NaH y 0.25 mL, 0.28 g, (2.3 mmol) de *p*-flúorbenzaldehído. Obteniéndose un sólido blanco, 15%, p.f. 93-95 °C.

4.1.12.4 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-metoxistiril)-4,5-dihidrooxazol.



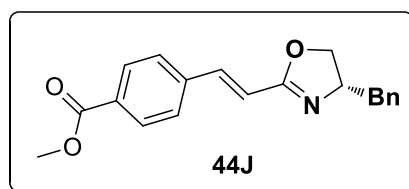
Siguiendo el procedimiento general III se hicieron reaccionar, 0.40 g, (1.3 mmol) de la fosfo-oxazolona **52**; 0.07 g, (2.8 mmol) de NaH y 0.17 mL, 0.19 g, (1.4 mmol) de *p*-metoxibenzaldehído. Obteniéndose un sólido blanco, 34%, p.f. 68-70 °C.

4.1.12.5 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(2-(furan-2-il)vinil)-4,5-dihidrooxazol.



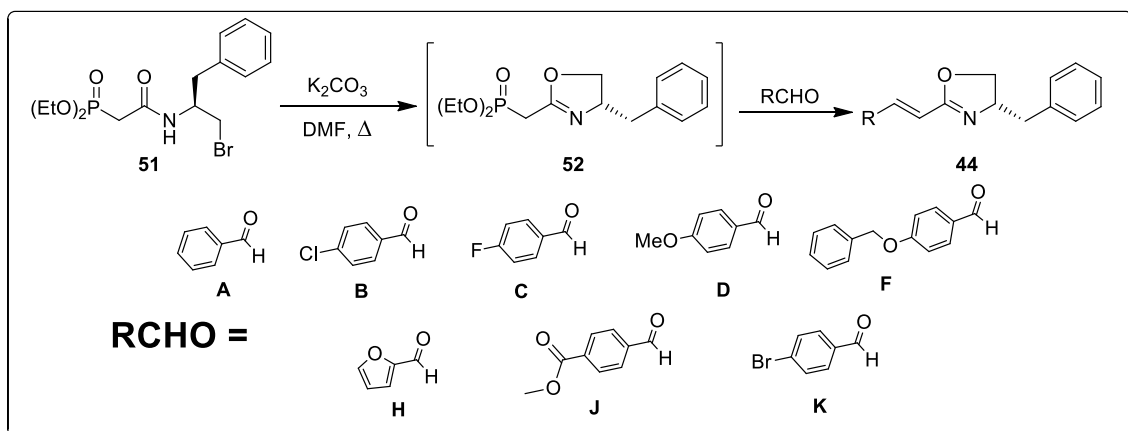
Siguiendo el procedimiento general III se hicieron reaccionar, 0.63 g, (2.0 mmol) de la fosfo-oxazolona; 0.10 g, (4.4 mmol) de NaH y 0.18 mL, (2.2 mmol) de 2-furaldehído. Obteniéndose un sólido café, 41%, p.f. 72-74 °C.

4.1.12.6 Preparación de la (*S,E*)-4-(2-(4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)vinil)benzoato de metilo.



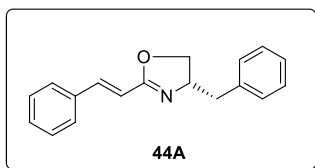
Siguiendo el procedimiento general III se hicieron reaccionar, 0.40 g, (1.3 mmol) de la fosfo-oxazolina **52**; 0.07 g, (2.8 mmol) de NaH y 0.23 g, (1.4 mmol) de 4-formilbenzoato de metilo. Obteniéndose un sólido blanco, 47%, p.f. 114-115 °C.

4.1.13 Procedimiento general IV para la preparación de oxazolinas α,β -insaturadas a partir de la fosfobromoamida **51**.



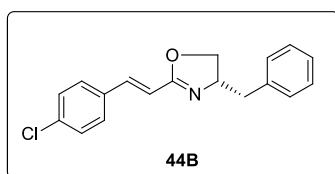
En un matraz redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se coloca la fosfobromoamida **51** en 5 mL de dimetilformamida. Enseguida se adiciona el carbonato de potasio (K_2CO_3) [2.0 Eq] y se deja reaccionar a reflujo por 2 horas, posterior a este tiempo se deja enfriar la reacción y se añade el aldehído correspondiente [1.0 Eq] y se deja a reflujo por otras 2 horas. La reacción se terminó mediante la adición de 15 mL de NH_4Cl , posteriormente se realizó una extracción utilizando acetato de etilo (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y usando como eluente una mezcla de Hex/AcOEt (7:3).

4.1.13.1 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-stiril-4,5-dihidrooxazol.



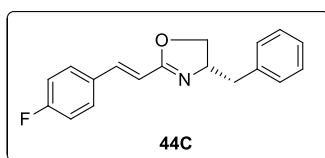
Siguiendo el procedimiento general IV se hicieron reaccionar, 0.41 g, (1.03 mmol) de la fosfobromoamida **51**; 0.29 g, (2.07 mmol) de K_2CO_3 ; posterior al enfriamiento se adicionó 0.11 g, (1.03 mmol) de benzaldehído. Obteniéndose un sólido blanco, 93%, p.f. 71-73 °C.

4.1.13.2 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-clorostiril)-4,5-dihidrooxazol.



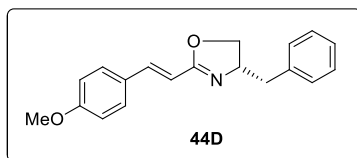
Siguiendo el procedimiento general IV se hicieron reaccionar, 0.32 g, (0.8 mmol) de la fosfobromoamida **51**; 0.22 g, (1.6 mmol) de K_2CO_3 ; posterior al enfriamiento se adicionó 0.11 g, (0.8 mmol) de *p*-clorobenzaldehído. Obteniéndose un sólido blanco, 94%, p.f. 81-83 °C.

4.1.13.3 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-fluorostiril)-4,5-dihidrooxazol.



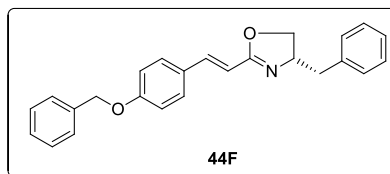
Siguiendo el procedimiento general IV se hicieron reaccionar, 0.40 g, (1.0 mmol) de la fosfobromoamida **51**; 0.27 g, (2.0 mmol) de K_2CO_3 ; posterior al enfriamiento se adicionó 0.12 g, (1.0 mmol) de *p*-fluorobenzaldehído. Obteniéndose un sólido blanco, 93%, p.f. 93-95 °C.

4.1.13.4 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-metoxistiril)-4,5-dihidrooxazol.



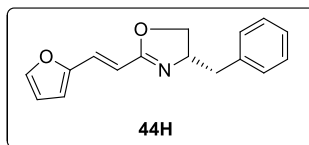
Siguiendo el procedimiento general IV se hicieron reaccionar, 0.27 g, (0.68 mmol) de la fosfobromoamida **51**; 0.19 g, (1.36 mmol) de K_2CO_3 ; posterior al enfriamiento se adicionó 0.93 g, (0.68 mmol) de *p*-metoxibenzaldehído. Obteniéndose un sólido blanco, 68%, p.f. 68-70 °C.

4.1.13.5 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-(benciloxi)stiril)-4,5-dihidrooxazol.



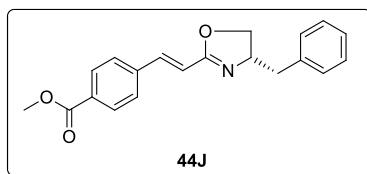
Siguiendo el procedimiento general IV se hicieron reaccionar, 0.15 g, (0.38 mmol) de la fosfobromoamida **51**; 0.11 g, (0.77 mmol) de K_2CO_3 ; posterior al enfriamiento se adicionó 0.08 g, (0.38 mmol) de benciloxibenzaldehído. Obteniéndose un sólido blanco, 53%, p.f. 141-143 °C.

4.1.13.6 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(2-(furan-2-il)vinil)-4,5-dihidrooxazol.



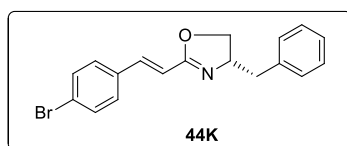
Siguiendo el procedimiento general IV se hicieron reaccionar, 0.28 g, (0.71 mmol) de la fosfobromoamida **51**; 0.20 g, (1.42 mmol) de K_2CO_3 ; posterior al enfriamiento se adicionó 0.07 g, (0.71 mmol) de furaldehído. Obteniéndose un sólido café, 94%, p.f. 72-74 °C.

4.1.13.7 Preparación de la (S,E)-4-(2-(4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)vinil)benzoato de metilo.



Siguiendo el procedimiento general IV se hicieron reaccionar, 0.35 g, (0.90 mmol) de la fosfobromoamida **51**; 0.25 g, (1.80 mmol) de K_2CO_3 ; posterior al enfriamiento se adicionó 0.15 g, (0.90 mmol) de 4-formilbenzoato de metilo. Obteniéndose un sólido blanco, 89%, p.f. 114-115 °C.

4.1.13.8 Preparación de la (S,E)-4-bencil-2-(4-bromostiril)-4,5-dihidrooxazol.



Siguiendo el procedimiento general IV se hicieron reaccionar, 0.29 g, (0.73 mmol) de la fosfobromoamida **51**; 0.20 g, (1.46 mmol) de K_2CO_3 ; posterior al enfriamiento se adicionó 0.14 g, (0.73 mmol) de *p*-bromobenzaldehído.

Obteniéndose un sólido blanco, 80%, p.f. 98-99 °C, $[\alpha]_D = +8.0$ (c 1.0, MeOH). **RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$):** δ 2.70 (dd, $J = 13.8, 8.4$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3.14 (dd, $J = 13.8, 5.7$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.03 (dd, $J = 8.2, 7.8$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.26 (dd, $J = 9.0, 8.2$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.50 (m, 1H, $CHBn$), 6.60 (d, $J_{trans} = 16.2$ Hz, 1H, $CHC=N$), 7.21-7.42 (m, 10H, H_{arom} y $CH(p-BrC_6H_4)$). **RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$):** δ 41.7 (CH_2Ph), 67.7 ($CHBn$), 71.6 (CH_2O), 115.7, 126.5, 128.3, 128.7, 128.8, 129.1, 133.6, 135.3, 137.8, 138.6, 163.5 ($C=N$). **EMAR (FAB $^+$):** calculado para $C_{18}H_{17}NOBr$ $[M+H]^+$, m/z 342.0494; encontrado para $[M+H]^+$, m/z 342.0489

4.2 Evaluaciones Biológicas

4.2.1 Evaluación de la Actividad Antituberculosa

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad antituberculosa, se utilizó la técnica colorimétrica de Alamar Azul (MABA),⁵⁰ una de las metodologías más utilizadas para determinar esta actividad.^{50,51} Esta técnica se fundamenta en las reacciones de óxido-reducción bacterianas, siendo un indicador de la viabilidad celular, además de permitir tener una correlación aceptable en la detección de la resistencia a los fármacos isoniacida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y estreptomycin (STR).

4.2.1.1 Selección de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

La selección de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a estudiar incluyó una cepa resistente a los fármacos de primera línea (aislado clínico), así como una cepa de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv, ATCC 27294, de la American Type Culture Collection, Rockville, MD).

4.2.1.2 Preparación de soluciones “stock” de los compuestos de prueba.

Se preparó un stock de 1,024 µg/mL (1 mL).

- 1.- Se colocaron 1,024 µg del compuesto en un tubo de ensayo.
- 2.- Se adicionaron 200 µL de DMSO para disolver el compuesto.
- 3.- Se adicionaron 700 µL de medio de cultivo Middlebrook 7H9. (Se precipita el compuesto formándose una suspensión lechosa)
- 4.- Se adicionaron 100 µL de Tween 80, para solubilizar por completo.

4.2.1.3 Esterilización de los stocks.

Se colocaron los 2 mL de compuesto en una jeringa colocada sobre un filtro de membrana especial para DMSO con diámetro de poro de 0.22µm y se colectó el filtrado estéril en un vial nuevo, también estéril. El mismo procedimiento se realizó con cada uno de los 18 compuestos preparados anteriormente (**44, 45, R, I, E, Ofx**).

Nota: **44A-G** (oxazolinas), **45A-G** (amidas), **R**-rifampicina, **I**- isoniacida, **E**- etambutol, **Ofx**- ofloxacino. *Este proceso se realizó en una campana de bioseguridad de flujo laminar vertical tipo II estéril.

4.2.1.4 Preparación de las placas de cultivo.

Se realizaron 5 experimentos por sesión de trabajo, se probaron 2 compuestos por placa así como 9 concentraciones las cuales se evaluaron por triplicado.

1.- Inicialmente se realizó la adición de 200 μL de agua desionizada estéril en cada uno de los pozos de la periferia de la placa de 96 pozos.

2.- El segundo paso consistió en colocar 100 μL de medio de cultivo Middlebrook 7H9 a cada uno del resto de los pozos.

3.- Enseguida se colocaron 100 μL del compuesto a probar en los pozos de la posición 2 (concentración más alta), 3 pozos para cada compuesto y en las 2 placas.

4.- Se realizaron las correspondientes diluciones de izquierda a derecha, (256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como se observa en la figura 7.

5.- Teniendo las cajas preparadas se cubrieron con parafilm, se envolvieron en plástico y se almacenaron en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso.

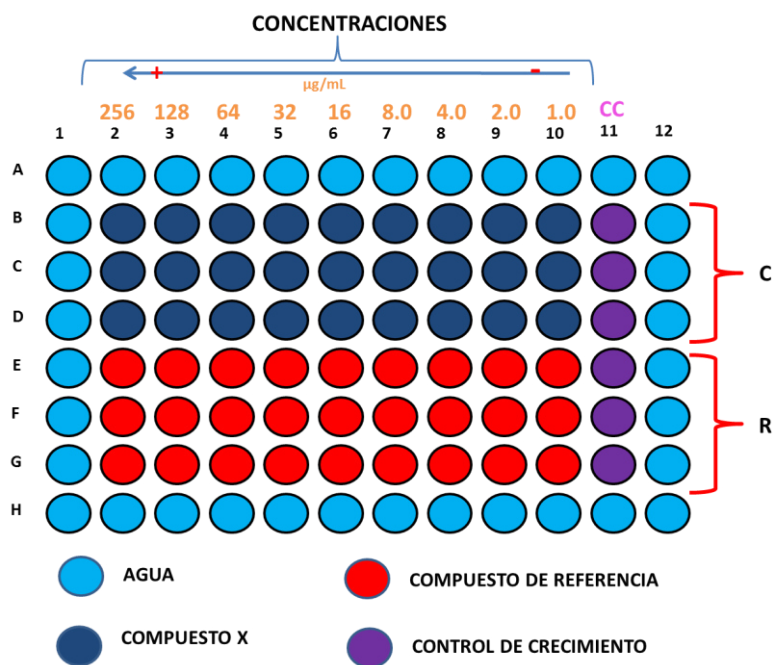


Figura 7. Diseño de placa para las pruebas de actividad anti-Tb.

4.2.1.5 Preparación de la cepa bacteriana.

Se realizó la resiembra de 3 Tubos con medio de cultivo Lowenstein-Jensen conteniendo la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* a probar (sensible o resistente), del panel de evaluación del INDRE.

Se colocaron 4 gotas con pipeta Pasteur a partir de medio líquido (Tubo MGIT) y se procedió a incubar por 14 días.

4.2.1.6 Inoculación de las placas de prueba con la cepa en estudio.

Se rasparon 3 tubos de cultivo con *Mycobacterium tuberculosis*, con asa bacteriológica sobre una pomadera con perlas de agitación con 4 gotas de agua desionizada estéril. Se disgregó el botón celular mediante agitación y vórtex, hasta lograr una disgregación completa.

A partir de este aislado microbiano se preparó un tubo con 10 mL de agua, llevándolos al tubo de McFarland No.1, añadiendo gota a gota la suspensión celular hasta alcanzar la turbidez deseada. Teniendo ya los tubos estandarizados, estos 10 mL preparados se diluyeron 1:25 con medio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado con 0.2% de glicerol, 10% de OADC (ácido oléico, albúmina, dextrosa y catalasa; 10 mL de suspensión + 30 mL de medio). Con la suspensión celular en mano, se procedió al llenado de las placas de 96 pozos anteriormente preparadas y atemperadas, después del proceso de congelación a -80 °C, adicionando 100 µL a cada uno de los pozos, para tener un volumen final de 200 µL. Enseguida se procedió a incubar a 37 °C por 5 días, para posteriormente realizar el ensayo de Azul Alamar.

Nota: Estándar de McFarland No. 1

*Se preparó una solución de cloruro de bario (BaCl_2) al 1%.

Se pesó 0.01g de BaCl_2 y se disolvieron en 1 mL de agua desionizada.

*Se preparó una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1%.

Se midieron 0.1 mL de H_2SO_4 y se disolvieron en 10 mL de agua desionizada.

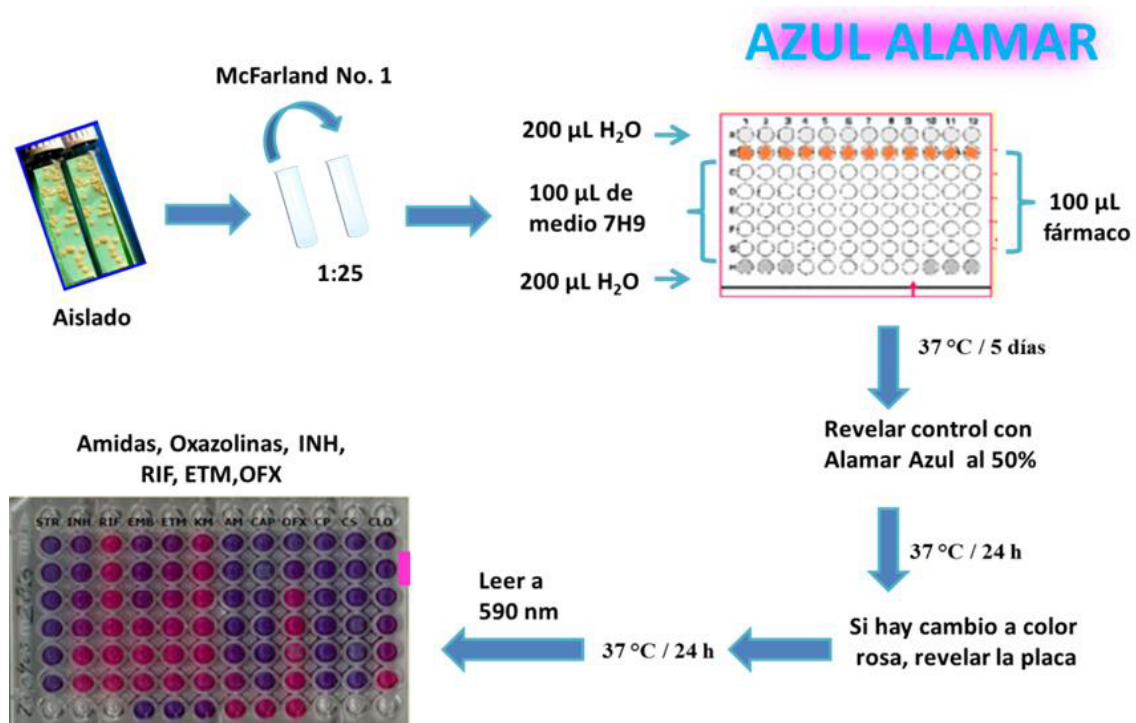
Teniendo ambas soluciones al 1%, se mezclaron 0.1 mL de BaCl_2 con 9.9 mL de H_2SO_4 , obteniendo así el estándar de McFarland No.1 (3×10^8 UFC/mL)

4.2.1.7 Revelado de la viabilidad con el reactivo Azul Alamar.

*El reactivo original se diluyó con Tween 80 al 10% en una proporción 1:1.

Después de los 4 días de incubación se procedió a añadir 50 µL del reactivo* a los pozos del carril control de crecimiento y se incubó por otras 24 horas. Después de este tiempo se observó el viraje de coloración de azul intenso a rosa, procediendo al revelado del resto de la placa (Esquema 4).

Cada uno de los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y cada una de las concentraciones por triplicado, sobre dos cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, una sensible a los fármacos de primera línea (S, I, R, E, Pz) y otra resistente a estos mismos fármacos (farmacorresistente), como se mencionó anteriormente.



Esquema 4. Técnica de Alamar Azul para evaluación de la actividad antituberculosa.

4.2.2 Toxicidad Tisular

4.2.2.1 Metodología de evaluación.

Los compuestos que mostraron mejor actividad antituberculosa, fueron estudiados en un modelo *ex vivo*, utilizando rebanadas de hígado de rata, para evaluar su posible efecto hepatotóxico.

4.2.2.2 Preparación y esterilización de los compuestos a evaluar.

Se preparó un stock de 1 mg/mL de cada uno de los compuestos, disolviendo éstos en DMSO y medio TYI sin suplementar en una proporción 1:1. (1.5 mL DMSO – 1.5 medio).

Se probaron 3 concentraciones diferentes 30, 15, 5 $\mu\text{g/mL}$

*30 $\mu\text{g/mL}$.- Del stock de 1 mg/mL se tomaron 300 μL y se diluyeron con 9.7 mL de medio de cultivo TYI sin suplementar.

*15 $\mu\text{g/mL}$.- De la dilución anteriormente preparada (30 $\mu\text{g/mL}$), se tomaron 3.5 mL y se diluyó con 3.5 mL de medio TYI.

*5 $\mu\text{g/mL}$.- De la dilución anteriormente preparada (15 $\mu\text{g/mL}$) se tomaron 2 mL y se diluyó con 4 mL de medio TYI.

4.2.2.3 Preparación de Placas.

a) Preparación de una placa de transporte de 6 pozos con 4 mL de medio de cultivo TYI suplementado bajo condiciones de esterilidad.

b) Preparación de las placas de cultivo de 24 pozos con los compuestos a probar.

Rebanada de Hígado: Cada prueba se realizó por duplicado, se incluyeron además controles consistentes en medio de cultivo, solvente, control-isoniacida, **44-45**. En todos los casos se utilizaron 3 concentraciones (Figura 8).

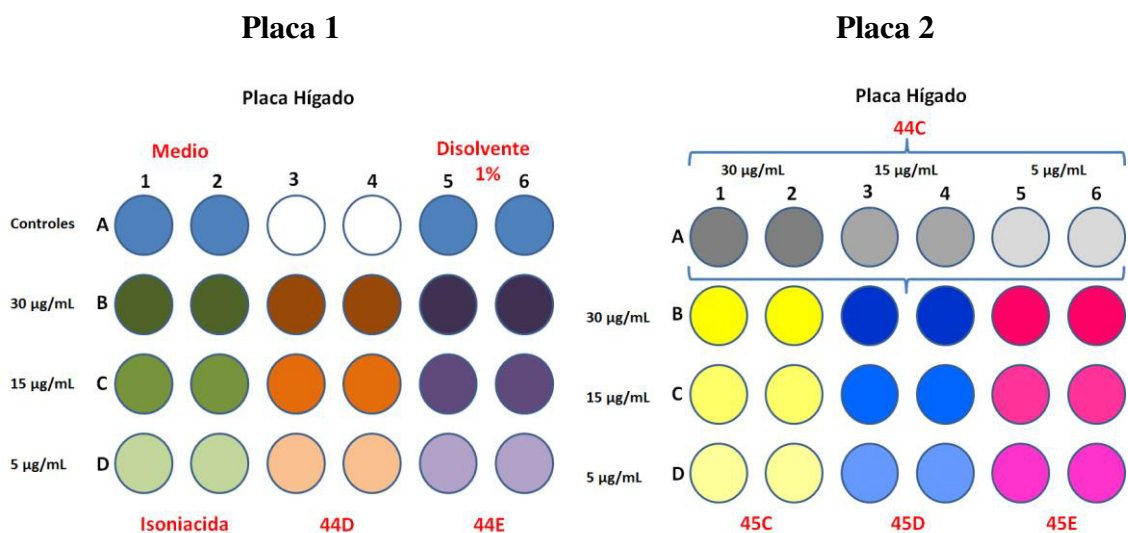


Figura 8. Distribución de placas para pruebas de hepatotoxicidad.

4.2.2.4 Preparación de rebanadas de hígado.

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de dos a tres meses de edad, machos o hembras, las cuales fueron proporcionadas por el Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, donde recibieron los cuidados y manejo humanitarios basados en normas internacionales acerca del cuidado de los animales de experimentación, así como en los criterios definidos en la NOM 062-ZOO-1999.⁵³

En condiciones de esterilidad, se anestesió el animal mediante una inyección de pentobarbital sódico (5 mg/100 g de peso), ya anestesiado el animal se procedió a realizar la cirugía para extraer el hígado, colocándolo sobre un recipiente con buffer KB a 4 °C. El hígado fue separado de acuerdo a sus lóbulos y posteriormente se hicieron bocados del tejido del tamaño adecuado para colocarlos en un rebanador Brendel Vitron; se prepararon rebanadas de 10 mm de diámetro y 300 µm de grosor, a partir de éstas se prepararon chips de tejidos utilizando un sacabocados y se colocaron en el medio de transporte (medio TYI suplementado). Las rebanadas se colocaron en el medio de transporte el cual se dejó en incubación por 1 hora y en agitación moderada a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂. Después de este tiempo, bajo condiciones de esterilidad, se colocó 1 rebanada por pozo en las placas anteriormente preparadas y se incubaron en presencia de los compuestos de prueba y los controles correspondientes durante 24 h a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂ y agitación lenta. Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas.

4.2.2.5 Fijación de las rebanadas tratadas.

Después del tiempo de incubación con los tratamientos, y de haber verificado la no contaminación de los tejidos, las rebanadas se colocaron en viales que contenían 5 mL de formalina amortiguada al 10%, y se fijaron durante 24 horas a temperatura ambiente.⁵⁴

4.2.2.6 Encapsulación de las muestras fijadas.

Las muestras fijadas anteriormente, se colocaron en papel filtro triangular dentro de un cassette de inclusión y se sometió al siguiente proceso de la técnica histológica, 30 minutos en cada paso.

Deshidratación

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| 1.- Etanol al 80% | 5.- Etanol Absoluto (3) |
| 2.- Etanol del 96 | 6.- Etanol Absoluto (4) |
| 3.- Etanol Absoluto (1) | 7.- Etanol Absoluto (5) |
| 4.- Etanol Absoluto (2) | |

Aclaramiento

8.- Xilol

9.- Xilol

Infiltración

10.- Parafina líquida (1 hora) 55-60 °C.

Inclusión

Teniendo la muestra infiltrada con parafina, el siguiente paso consistió en incluir las rebanadas en un bloque de parafina.

Inicialmente la parafina se fundió en un baño de calentamiento, mientras que las cápsulas conteniendo el tejido se precalentaron en una plancha de calentamiento a 60 °C al igual que los moldes de acero inoxidable donde se confecciona el bloque de parafina que contendrá el tejido. Teniendo todo el material a una temperatura similar se procedió a colocar el tejido en el molde de inclusión y se le adicionó la parafina fundida, posteriormente los moldes fueron enfriados para lograr la solidificación de la parafina, colocando encima la base de la cápsula; después se colocaron en refrigeración para

lograr una solidificación homogénea y finalmente se liberó el molde para el proceso de corte posterior.

A partir de los bloques de parafina conteniendo el tejido, se prepararon cortes histológicos de 5 µm de grosor, los cuales fueron extendidos en un baño con agua destilada a 56 °C, posteriormente se colocaron en un portaobjetos con una gota de albúmina y se dejaron secar del agua; ya secos se colocaron en una plancha de calentamiento a 60 °C para desparafinizar los cortes de tejido. El proceso de corte se realizó utilizando un microtomo American Optical.

4.2.2.7 Tinción Hematoxilina - Eosina.

Las laminillas con los cortes histológicos se tiñeron con Hematoxilina y Eosina, bajo el siguiente procedimiento:

- | | |
|--|--|
| 1.- Xilol “Desparafinar” (5 min) | 14.- Agua de la llave (10 inmersiones) |
| 2.- Xilol (5 min) | 15.- Etanol al 80% (10 inmersiones) |
| 3.- Etanol Absoluto (2 min) | 16.- Eosina (20 segundos) |
| 4.- Etanol Absoluto (2 min) | 17.- Etanol al 96% (10 inmersiones) |
| 5.- Etanol al 96% (2 min) | 18.- Etanol al 96% (10 inmersiones) |
| 6.- Etanol al 80% (2 min) | 19.- Etanol al 96% (10 inmersiones) |
| 7.- Etanol al 70% (2 min) | 20.- Etanol al 96% (10 inmersiones) |
| 8.- Agua destilada (10 inmersiones) | 21.- Etanol Absoluto (10 inmersiones) |
| 9.- Hematoxilina de Harris (7-10 min) | 22.- Alcohol isopropílico (10 inmersiones) |
| 10.- Agua de la llave (10 inmersiones) | 23.- Xilol (5 min) |
| 11.- Etanol ácido (2 inmersiones) | 24.- Xilol (5 min) |
| 12.- Agua de la llave (10 inmersiones) | 25.- Montaje con resina sintética |
| 13.- Etanol amoniacal (2 inmersiones) | |

4.2.2.8 Montaje con resina sintética.

Después del proceso de tinción se continuó con la etapa de montaje, para ello se colocó 1 o 2 gotas de resina sobre el portaobjetos y se colocó un cubreobjetos sobre los tejidos evitando la formación de burbujas.

Posteriormente, se colocaron los portaobjetos sobre una plancha precalentada a 60 °C por 15 minutos y finalmente se dejaron en la estufa a 55 °C por 24-48 horas, para su posterior observación por el patólogo.

*Se realizaron 3 experimentos y se seleccionaron fotografías representativas de los resultados (Esquema 5).



Esquema 5. Técnica de evaluación de la toxicidad tisular.

4.2.3 Evaluación del Posible Mecanismo de Acción.

4.2.3.1 Microarreglo de ADN.

Para llevar a cabo la determinación del posible mecanismo de acción de este tipo de compuestos (amidas insaturadas y oxazolinas), se realizó un análisis genético, mediante un microarreglo de ADN. La técnica diseñada por Brown y Botstein^{55,56} en 1999, que consiste en un conjunto ordenado de genes de un organismo en particular en una pequeña superficie sólida, que bajo las condiciones de estudio, permite evaluar las diferencias de expresión entre los genes estudiados.

4.2.3.2 Preparación del Compuesto 44D.

Se preparó un stock de 1,000 µg/mL (1 mL) del compuesto **44D**.

- 1.- Se colocaron 1000 µg del compuesto **44D** en un tubo de ensayo.
- 2.- Se adicionaron 200 µL de DMSO y se disolvió el compuesto.
- 3.- Se añadieron 700 µL de Medio de cultivo Middlebrook 7H9.
- 4.- Se adicionaron 100 µL de Tween 80, para lograr la solubilidad.
- 5.- Se esterilizó el compuesto por filtración.

4.2.3.3 Preparación de las cajas de cultivo.

Se colocaron 2000 µL del compuesto **44D** a 8 µg/mL por pocillo en una placa de 6 pozos (**tratamiento**), mientras que a otra placa de 6 pozos se le adicionó únicamente medio de cultivo (**sin tratamiento**). Teniendo las cajas preparadas, se taparon con parafilm y se envolvieron en plástico y se procedió a almacenar en un criocongelador a -80 °C hasta su uso.

4.2.3.4 Preparación de la cepa bacteriana.

Se realizó la resiembra de 3 Tubos Lowenstein-Jensen de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Se colocaron 4 gotas con pipeta Pasteur a partir de medio líquido (Tubo MGIT) y se procedió a incubar por 14 días.

Se rasparon 3 tubos de cultivo con *Mycobacterium tuberculosis*, con asa bacteriológica sobre una pomadera con perlas de agitación con 4 gotas de agua desionizada estéril. Se disgregó el botón celular mediante agitación y vórtex, hasta lograr una disgregación completa. A partir de este aislado microbiano se preparó un tubo con 10 mL de agua, llevándolo al tubo de McFarland No.1 anteriormente preparado, añadiendo gota a gota la suspensión celular hasta alcanzar la turbidez deseada. Teniendo ya los tubos estandarizados (3-30 mL) se procedió al llenado de las placas de 6 pocillos anteriormente preparadas y atemperadas, después del proceso de congelación a -80 °C, adicionando 2000 µL a cada uno de los pocillos.

Finalmente se procedió a incubar a 37 °C por 6 horas, para su posterior lisis.

4.2.3.5 Proceso de colección, lisis y extracción del ARN total.

Después del tiempo de tratamiento, se llevó a cabo la extracción de la bacteria tratada y sin tratar de la placa de 6 pocillos y se colocó en un vial.

Se procedió a centrifugar por 15 minutos a 10,000 x g en una centrífuga con rotor de seguridad para aerosoles y se descartó el sobrenadante. Teniendo listo el botón celular, este se resuspendió en 1.5 mL de ARN later para la posterior lisis de la bacteria.

Para realizar la lisis bacteriana y la extracción del ARN total, se utilizó el kit RNeasy Mini Kit de QIAGEN

Inicialmente el pellet bacteriano se resuspendió completamente en 700 µL de buffer RLT en vortex por 5-10 segundos. Enseguida se adicionó la suspensión bacteriana a un vial que contenía perlas de zirconia para lisis y se sometió a tres etapas de 20 segundos de vortex en el equipo fastprep, después de esto se centrifugó por 3 minutos a 4 °C y se pasa el sobrenadante a un tubo limpio y libre de nucleasas. Enseguida se adicionaron 700 µL de etanol al 70% y se mezcló bien por pipeteo y se transfiere el lisado a una columna RNeasy spin y se centrifugó por 1 minuto a 10,000 rpm y se desechó el filtrado. Se adicionaron 700 µL del buffer RW1 en el centro de la columna RNeasy spin y se volvió a centrifugar por 1 minutos a 10,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 500 µL del buffer RPE en el centro de la columna RNeasy spin y se volvió a centrifugar por 1 minuto a 10,000 rpm y se desecha el sobrenadante.

Nuevamente se adicionaron 500 µL del buffer RPE en el centro de la columna RNeasy spin y se volvió a centrifugar por 3 minutos a 10,000 rpm y se desecha el sobrenadante.

El tubo con el filtro se volvió a centrifugar por 1 minuto para asegurarse de la eliminación de trazas de etanol.

Se transfirió la columna RNeasy a un tubo de colección nuevo de 1.5 mL y se añadieron 30 µL de agua libre de nucleasas en el centro de la membrana de la columna RNeasy y se centrifugó durante 2 min a 10,000 rpm para eluir el ARN.

Esto se realizó con cada uno de los experimentos realizados, midiéndose las concentraciones de ARN obtenidas en el equipo Nanodrop, así como corriendo la muestra en gel de agarosa al 1%.

4.2.3.6 Proceso de síntesis y etiquetado del ARNa.

Para lograr la síntesis y etiquetado de las muestras de ARN total se llevaron a cabo los siguientes pasos:

PASO 1. Poliadenilación del ARN total.

Inicialmente se colocaron aproximadamente 500 ng de ARN total en tubo estéril libre de RNasa para cada muestra y se aforó a 5 µL con agua libre de nucleasas.

Muestra 1

Muestra (C/T 1) 103.0 ng-1µL

500 ng- **4.80µL** (Se tomaron 5 µL)

Control (S/T) 142.2 ng-1µL

500 ng- **3.51µL** (Se tomaron 5 µL)

Muestra 2

Muestra (C/T 2) 139.3 ng-1µL

500 ng- **3.58µL** (Se tomaron 3.6µL + 1.4 µL de agua libre de nucleasas)

Control (S/T 2) 309.6 ng-1µL

500 ng- **1.61µL** (Se tomaron 2µL + 3 µL de agua libre de nucleasas)

Para tener una tercera repetición y validar los resultados, se procedió a preparar una tercera muestra utilizando una combinación de la muestra 1 y 2.

Muestra 3

Muestra (C/T 3) 2.5µL de C/T 1 + 1.8 µL de CT/ 2 + 0.7 µL de agua libre de nucleasas.

Control (S/T 3) 1.8 µL de S/T 1 + 0.8 µL de ST/ 2 + 2.9 µL de agua libre de nucleasas.

Teniendo las muestras listas se procedió a la desnaturalización de las mismas por lo que se colocaron en el termociclador por 10 min a 70 °C. Después de los 10 minutos se retiraron las muestras de ARN del termociclador, se centrifugaron brevemente (~ 5 seg) y se colocaron en hielo durante 3 min.

Mientras las muestras eran incubadas a 70 °C por 10 minutos, se preparó el Master Mix de poliadenilación en un tubo libre de nucleasas a temperatura ambiente y en el siguiente orden (Tabla 7):

Tabla 7. Master Mix de Poliadenilación.

Cantidad	Para 7 muestras	Componente
1.5µL	10.5	Agua libre de nucleasas
1.0µL	7.0	Buffer de colas poli (A) 10X
1.0µL	7.0	Inhibidor de RNasa
0.5µL	3.5	Colas poli (A) ATP
1.0µL	7.0	PAP

La mezcla se sometió a vortex suavemente y se centrifugó durante ~ 5 segundos. Teniéndolo listo se transfirió 5 µL a cada muestra de ARN, se mezcló bien por agitación suave, se centrifugó para limpiar las paredes del tubo y se colocaron en el termociclador a 37 °C por 15 minutos. Después de la incubación, se removieron las muestras del termociclador y se colocaron en hielo.

PASO 2. Síntesis de la primera hebra de ADNc.

Teniendo el ARN poliadenilado se procedió a realizar la transcripción de la misma, para lo cual primeramente se preparó el Master Mix para transcripción inversa en un tubo libre de nucleasas a temperatura ambiente y en el orden siguiente (Tabla 8):

Tabla 8. Master Mix para primera cadena.

Cantidad	Para 7 muestras	Componente
3µL	21.0	Agua libre de nucleasas
1µL	7.0	T7 Oligo(dT)VN
1µL	7.0	Buffer de primera hebra 10X
4µL	28.0	dNTP Mix
1µL	7.0	arrayscript

Se transfirieron 10 μL del Master Mix para transcripción inversa a cada muestra, se mezcló bien por agitación suave, se centrifugaron y se colocaron las muestras en el termociclador a 42 °C por 2 horas. Después de la incubación de las reacciones durante 2 horas, se prosiguió a centrifugar brevemente (~ 5 seg) y se dejaron en hielo.

PASO 3. Síntesis de la segunda hebra de ADNc.

Se preparó sobre hielo el Master Mix para segunda cadena, mezclando los reactivos en el orden indicado (Tabla 9):

Tabla 9. Master Mix para segunda cadena.

Cantidad	Para 7 muestras	Componente
63 μL	441.0	Agua libre de nucleasas
10 μL	70.0	Buffer de segunda hebra 10X
4 μL	28.0	dNTP Mix
2 μL	14.0	ADN Polimerasa
1 μL	7.0	RNase H

Se agitó suavemente el tubo para hacer una mezcla homogénea, se centrifugó durante ~ 5 segundos y se transfirieron 80 μL a cada muestra, enseguida se mezclaron por agitación suave a fin de no inactivar las enzimas, se centrifugaron y se colocaron en el termociclador a 16 °C por 2 horas. Después de las 2 horas, las muestras se dejaron en hielo mientras se preparaba el paso de purificación del ADNc.

PASO 4. Purificación del ADNc.

Primeramente se prepararon 2 filtros y dos tubos de lavado para ADNc, uno para cada muestra y se les añadió 50 μL de buffer de unión para ADNc y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, enseguida se añadieron 250 μL de buffer de unión de ADNc a cada muestra y se mezclaron por pipeteo suave. Esta mezcla fue adicionada al centro del filtro para ADNc y se centrifugó durante ~ 1 min a 11,000 rpm y se descartó el filtrado. Se aplicaron 500 μL de buffer de lavado a cada cartucho para ADNc, se centrifugó durante 1 min a 11,000 rpm, se desechó el filtrado y se volvió a centrifugar por otro minuto para eliminar trazas de etanol. Finalmente se transfirió el cartucho con el ADNc a un tubo de colección para ADNc y se le añadieron 10 μL de agua libre de nucleasas precalentada a 55 °C en el centro del cartucho de ADNc y se dejó a temperatura

ambiente durante 2 min, después de este tiempo se centrifugó por 2 min a 11,000 rpm, o hasta que todo el agua libre de nucleasas atravesó el filtro. Se repitió el paso anterior con otros 10 μL de agua DEPC.

PASO 5. Síntesis del aRNA por Transcripción *in vitro*.

Inicialmente se procedió a preparar a temperatura ambiente el Master Mix IVT añadiendo los siguientes reactivos a un tubo libre de nucleasas en el orden indicado (Tabla 10):

Tabla 10. Master Mix para transcripción.

Cantidad	Para 7 muestras	Componente
16 μL		ADNc de doble cadena
12 μL	84 μL	ATP, CTP, GTP Mix (25 mM)
3 μL	21 μL	aaUTP Solution (50 mM)
1 μL	7 μL	UTP solution (50mM)
4 μL	28 μL	T7 Buffer de reacción10X
4 μL	28 μL	T7 Mezcla de enzimas

Se mezcló con agitación suave, se centrifugó brevemente (~ 5 segundos) y se añadieron 24 μL a cada muestra, se mezcló por pipeteo de 2-3 veces, se centrifugó brevemente y se colocaron los tubos en el termociclador a 37 °C por 14 horas.

Después del tiempo de incubación, las muestras se dejaron en hielo, mientras se preparaba la siguiente etapa.

PASO 6. Purificación del ARNa.

Para iniciar el proceso de purificación del ARNa se añadieron 60 μL de agua libre de nucleasas a cada muestra para aforar a un volumen final de 100 μL y se mezcló por agitación suave. Enseguida se añadieron 350 μL de buffer de unión para ARNa a cada muestra, se mezclaron por agitación suave, se continuó con la adición de 250 μL de etanol absoluto calidad ACS a cada muestra de ARNa, y se mezcló por pipeteo; teniendo la mezcla completa, esta se transfirió al centro del filtro para ARNa, se centrifugó durante ~ 1 min a 11,000 rpm y se descartó el filtrado.

Se aplicaron 650 μL de buffer de lavado a cada filtro para ARNa, se centrifugó durante ~ 1 min a 11,000 rpm, o hasta que toda la solución de lavado atravesara el filtro, se descartó el filtrado y se volvió a centrifugar una vez más por ~ 1 min para eliminar trazas de etanol. Finalmente se transfirió el filtro para ARNa a un tubo nuevo de

colección libre de RNAsas y se añadieron 100 μ L de agua libre de nucleasas precalentada a 55 °C, sobre el centro del filtro, se incubaron las muestras a 55 °C durante 5 min y finalmente se procedió a centrifugar durante ~ 1.5 min a 11,000 rpm, o hasta que la solución atravesara el filtro.

PASO 7. Proceso de Cuantificación.

Se llevó a cabo la cuantificación del ARNa amplificado, utilizando el nanodrop.

PASO 8. Acoplamiento del ARNa con las cianinas Cy3 y Cy5.

Teniendo el ARNa amplificado se procedió a etiquetar las muestras con las cianinas Cy3 y Cy5, por lo que se calcularon 15,000 ng de cada muestra y se colocaron en un tubo de colección.

Muestra (C/T 1) 539.5ng- 1 μ L	Control (S/T 1) 433.3ng- 1 μ L
15000ng- 27.8μL	15000ng- 34.62μL

Muestra (C/T 2) 404.8ng- 1 μ L	Control (S/T 2) 358.8ng- 1 μ L
15000 ng- 37.05μL	15000ng- 41.80μL

Muestra (C/T 3) 306.3ng- 1 μ L	Control (S/T 3) 336.4ng- 1 μ L
15000 ng- 48.97μL	15000 ng- 44.58μL

Se procedió a centrifugar la muestra en una centrífuga de vacío Speedvac por 45 min a 45 °C hasta sequedad. Después de centrifugar, se observó en la pared del tubo una pequeña mancha blanca correspondiente al ARNa el cual se redisolvió con 7 μ L de buffer de acoplamiento (buffer de carbonatos) y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 20 minutos.

Por otro lado se procedió a preparar los colorantes Cy3 (naranja) y Cy5 (azul), adicionando a cada vial 22 μ L de DMSO, se mezcló por pipeteo hasta disolución completa y se dejó en reposo por 15 minutos para asegurar la disolución (sin contacto con la luz).

Teniendo lista la muestra y los colorantes se llevó a cabo el etiquetado adicionando 5 μ L del colorante apropiado a cada muestra (Tabla 11).

Tabla 11. Etiquetado con cianinas (Cy3-Cy5).

Muestra	Cianina
C/T 1 (Muestra 1)	Cy5 (Azul)
S/T 1 (Control 1)	Cy3 (Naranja)
C/T 2 (Muestra 2)	Cy3 (Naranja)
S/T 2 (Control 2)	Cy5 (Azul)
C/T 3 (Muestra 3)	Cy5 (Azul)
S/T 3 (Control 3)	Cy3 (Naranja)

Se mezcló por pipeteo y se centrifugó suavemente para limpiar las paredes del tubo y se dejaron en incubación por 3 horas a temperatura ambiente y sin contacto con la luz.

PASO 9. Purificación del ARNa acoplado.

Después del transcurso de las 3 horas de incubación, se adicionaron 4.5 μL de hidroxilamina 4M para detener la reacción de acoplamiento y se aforó a 100 μL con agua libre de nucleasas (83.5 μL)

Se adicionaron 350 μL de buffer RLT, 250 μL de etanol absoluto y se homogenizó por pipeteo, para adicionar los 700 μL de muestra sobre una columna RNeasy MinElute Spin, se centrifugó por 15 segundos a 10,000 rpm y se descartó el filtrado, enseguida se transfirió la columna a un nuevo tubo de colección de 2 mL, se pipetearon 500 μL de buffer RPE sobre el centro de la columna, se centrifugó por 15 segundos a 10,000 rpm y se descartó el filtrado nuevamente. Se adicionaron 500 μL de etanol al 80% sobre la columna, se centrifugó bajo las mismas condiciones, se desechó el filtrado y se volvió a centrifugar por 3 minutos para eliminar trazas de etanol.

Finalmente se realizó el proceso de elución, pasando el filtro a un tubo de colección nuevo para centrifuga y se adicionaron 20 μL de agua DEPC precalentada a 55°C y se dejó en reposo por 2 minutos, después de esto se centrifugó a 11,000 rpm por 1 minuto. Se repitió la elución con otros 20 μL de agua DPEC.

PASO 10. Cuantificación en el Nanodrop.

Se siguieron los mismos pasos que en las cuantificaciones anteriores, a diferencia de que se utilizó la pestaña de microarreglos en lugar de ácidos nucleicos, obteniéndose tanto la concentración en picomoles/ μL como en ng/ μL .

PASO 11. Hibridación

A. Microarreglos utilizados.

Para el proceso de hibridación se adquirieron 3 microarreglos CAT-30-Array de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* de la marca MYcroarray, permitiendo analizar 3975 genes, 99.4 % del genoma total de *Mycobacterium tuberculosis*.

B. Preparación de la muestra para hibridación.

Para la preparación de la muestra para hibridación se calcularon 150 pmol/ μL de cada muestra y se llevó a un volumen final de 48 μL con agua DPEC (Cy3 más Cy5 más agua DEPC).

Muestra (C/T 1) 46.8pmol- 1 μL Control (S/T 1) 37.5pmol- 1 μL

150pmol- **3.20 μL** 150pmol- **4.0 μL**
3.20 μL C/T 1 + 4.0 μL S/T 1 + 40.8 μL H₂O DEPC

Muestra (C/T 2) 41.3pmol- 1 μL Control (S/T 2) 30.3pmol- 1 μL

150 pmol- **3.63 μL** 150pmol- **5.0 μL**
3.63 μL C/T 2 + 5.0 μL S/T 2 + 39.37 μL H₂O DEPC

Muestra (C/T 3) 25.2pmol- 1 μL Control (S/T 3) 38.7pmol- 1 μL

150 pmol- **5.95 μL** 150 pmol- **3.87 μL**
5.95 μL C/T 3 + 3.87 μL S/T 3 + 38.18 μL H₂O DEPC

A los 48 μL de muestra se le adicionaron 6 μL de SSC 20X, 3.6 μL de liquid block, 2.4 μL de SDS al 2% y 0.6 μL de oligos control, se homogenizó por pipeteo en tres ocasiones y se procedió a desnaturalizar a 65 °C por 5 minutos.

C. Montaje de la hibridación.

Después del tiempo de desnaturalización, se procedió a adicionar la muestra en el microarreglo anteriormente preparado, para lo cual se colocó un cubreobjeto con la parte rugosa hacia abajo, asegurándose de cubrir todos los pots del microarreglo. Teniendo listo el microarreglo, se añadió la muestra sobre los bordes horizontales del mismo, cerciorándose de que se desplace la muestra completamente en todo el arreglo, luego se selló con el acrílico y sus tornillos con el mayor ajuste posible.

D. Tiempo de hibridación.

Se colocó el soporte con los microarreglos en una incubadora a 55 °C por 8 horas.

PASO 12. Lavado de los microarreglos post hibridación.

Después del tiempo cumplido de hibridación se procedió al lavado de los microarreglos hibridados, para lo cual, primeramente se hizo pasar por la solución 1 precalentada a 55°C (20 mL de SSC a 20X + 10 mL de SDS al 10% + 170 mL de agua miliQ) por 5 minutos en agitación, después de esto se pasó a la solución 2 (5 mL de SSC al 20X + 195 mL de agua miliQ) por otros 5 minutos y finalmente por la solución 3 (1 mL de SSC al 20X + 199 mL de agua miliQ) por el mismo tiempo.

Después del proceso de lavado se procedió a secar los microarreglos por centrifugación sobre tubos de 50 mL con desecante hasta asegurarse de que las láminas queden completamente secas.

4.2.3.7 Lectura y cuantificación de los microarreglos.

Teniendo los microarreglos hibridados, limpios y secos, se procedió al proceso de escaneo, para lo cual se hizo uso del equipo GenePix 4000B Molecular Devices y el software GenePix Pro 6.0.

4.2.3.8 Análisis Estadístico.

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GenePix Pro 6.0 dando como resultado la sobreexpresión de 186 genes con una relación tratamiento-control mayor de 0, así como 20 genes reprimidos con relación menor a 0. Considerandose relevantes para el caso de los genes sobreexpresados aquellos mayores a 2.0 mientras que para los reprimidos valores menores a -1.0.

4.2.3.9 Análisis Bioinformático.

Los genes sobreexpresados e inhibidos fueron analizados en la base de datos Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>),⁶² obteniendo de ahí la categoría de funcionalidad, así como su actividad biológica, lo que permitió clasificarlos en base a esto.

4.3 Materiales y Equipo (Infraestructura).

Las actividades del proyecto se realizaron en los Laboratorios de Síntesis Orgánica FCQ-UANL, Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud de Nuevo León, Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste del IMSS, el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica FCQ-UANL y el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto BIO5 de la Universidad de Arizona, E.U.

A continuación se hace un listado del equipo utilizado.

Nombre	Ubicación
*Espectrofotómetro de IR	Laboratorio de Análisis Instrumental
*Campana de Bioseguridad Nivel II.	Laboratorio Estatal SS y CIBIN-IMSS
*Incubadora para tejido celular	CIBIN-IMSS
*Microscopio óptico	CIBIN-IMSS
*Histoquinette	CIBIN-IMSS
*Centrífuga	CIBIN-IMSS
*Reostato	Laboratorio de Síntesis Orgánica-UANL
*Lámpara de UV	Laboratorio de Síntesis Orgánica-UANL
*Columna de separación	Laboratorio de Síntesis Orgánica-UANL
*Material de vidrio diverso	Laboratorio de Síntesis Orgánica-UANL
*Columna de destilación	Laboratorio de Síntesis Orgánica-UANL
*Bomba de vacío	Laboratorio de Síntesis Orgánica-UANL
*Evaporador rotativo	Laboratorio de Síntesis Orgánica-UANL
*Campana de extracción	Laboratorio de Síntesis Orgánica-UANL
*Termociclador	BIO5-UA
*Lector de microarreglos	BIO5-UA
*Centrifuga de vacío Speedvac	BIO5-UA
*Incubadora de UV	BIO5-UA
*Nanodrop	BIO5-UA
*Cámara de electroforesis	INGGEN-UANL
*Campana libre de RNAsas	INGGEN-UANL

4.4 Seguridad en el laboratorio y disposición de residuos.

La seguridad en el laboratorio y la disposición de cada uno de los residuos generados en el presente proyecto de investigación se hicieron de acuerdo a lo señalado en el Reglamento Interno de Seguridad e Higiene de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Se manejaron residuos tanto químicos como biológicos que se dispusieron en diversos contenedores; el material biológico restante y físico reusable se esterilizó mediante calor húmedo.

Colector A: Soluciones salinas pH= 6-8. Soluciones de sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y sales inorgánicas.	Colector C: Tóxicos e inflamables, combinaciones orgánicas no halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas, disolventes orgánicos no halogenados.	Colector D: Tóxicos e inflamables, combinaciones orgánicas halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas, disolventes orgánicos halogenados.
Colector E orgánico: Muy tóxico, cancerígeno orgánico.	Colector E inorgánico: Muy tóxico, cancerígeno inorgánico.	Colector F: Sales de metales preciosos.
Colector G: Combinaciones orgánicas sólidas.	Colector B: Sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.	Colector H: Oxidantes.
Vidrio impregnado de sustancias peligrosas.	Plásticos impregnados con sustancias peligrosas.	Basura industrial.

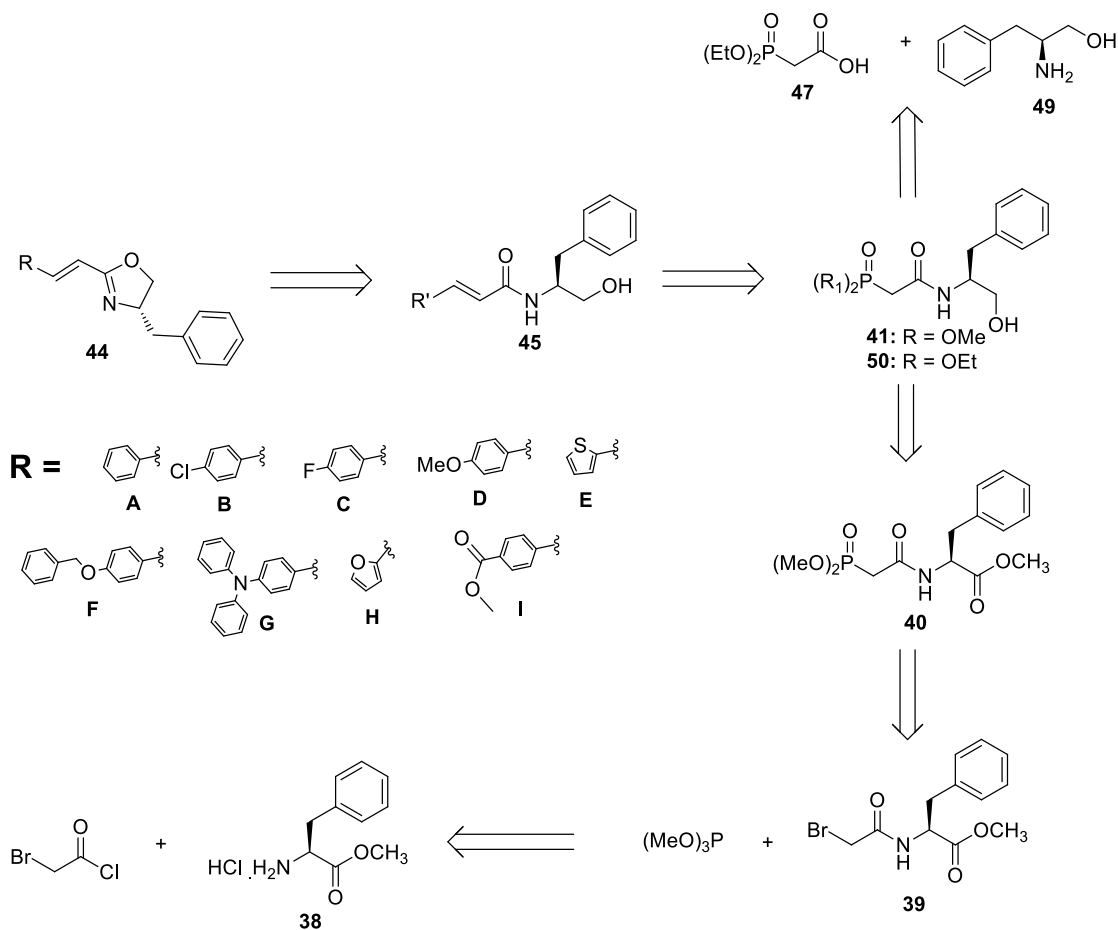
CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Preparación de amidas y oxazolinas quirales α,β -insaturadas.

5.1.1. Análisis retrosintético propuesto.

Para llevar a cabo la preparación de amidas y oxazolinas quirales α,β -insaturadas se propuso el siguiente análisis retrosintético (Esquema 6).



Esquema 6. Análisis retrosintético para la preparación de amidas y oxazolinas α,β -insaturadas.

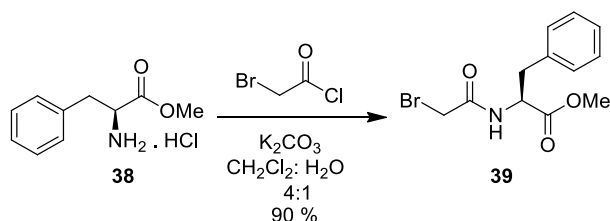
Como se puede observar en el esquema 6, las oxazolininas α,β -insaturadas **44** pueden ser preparadas a partir de la β -hidroxiamida insaturada **45**, la cual se obtiene a través de la reacción de Wittig-Horner de las β -hidroxiamidas **41** y **50** con diferentes aldehídos aromáticos (benzaldehído, *p*-clorobenzaldehído, *p*-metoxibenzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído, *p*-benciloxibenzaldehído, tiofen-2-carbaldehído y *p*-difenilaminobenzaldehído, furaldehído, *p*-formilbenzoato de metilo). A su vez la β -hidroxiamida **41** se puede obtener a partir de la reacción de Michaelis-Arbuzov entre la trimetilfosfita y la bromoamida **39**, con su correspondiente proceso de reducción del grupo éster. La bromoamida **39** se obtiene mediante la reacción del cloruro de bromoacetilo con el clorhidrato del éster metílico de la (*S*)-fenilalanina **38**. Por otra parte, la fosfohidroxiamida **50** también se puede preparar mediante la reacción de acoplamiento entre el ácido dietilfosfonoacético **47** y el (*S*)-fenilalaninol **49**.

5.1.2. Síntesis de compuestos.

En esta parte se describen los resultados obtenidos en la etapa de síntesis orgánica, además de la discusión de algunos espectros representativos de cada etapa del proceso.

5.1.2.1 Preparación de la bromoamida del éster metílico de la (*S*)-fenilalanina **39**.

A partir del clorhidrato **38** se llevó a cabo la preparación de la bromoamida **39**, para lo cual se hizo reaccionar el clorhidrato del éster metílico de la (*S*)-fenilalanina **38** con cloruro de bromoacetilo, utilizando carbonato de potasio en una mezcla diclorometano-agua, obteniéndose la bromoamida **39** como un sólido blanco con un rendimiento químico del 90% y un punto de fusión de 82 °C (Esquema 7).



Esquema 7. Preparación de la bromoamida **39**.

La bromoamida **39** fue caracterizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EMAR).

A continuación se describen las señales más importantes de RMN de ^1H para la bromoamida **39** (Tabla 12): en un desplazamiento químico de 3.15 ppm se observan dos dobles de dobles que corresponde al grupo (CH_2Ph), con constantes de acoplamiento de $J = 14.0$ y 6.0 Hz, e integra para 2H; en 3.74 ppm se observa una señal sencilla que corresponde a los protones del grupo metoxilo (OMe), e integra para 3H; en 3.84 ppm se observa un sistema AB que corresponde a los protones del grupo metileno unido al bromo (CH_2Br) con una constante de acoplamiento $J = 13.6$ Hz, e integran para 2H; en 4.85 ppm se observa un doble de triples que corresponde al grupo metino unido al bencilo (CHBn) con constantes de acoplamiento $J = 7.6$ y 6.0 Hz, e integra para 1H; en 6.85 ppm se observa una señal ancha que corresponde al hidrógeno unido al nitrógeno (NH), e integra para 1H; finalmente de 7.10-7.33 ppm se observa una señal múltiple que corresponde para los hidrógenos aromáticos del grupo fenilo (H_{arom}), e integra para 5H.

Tabla 12. Datos de RMN de ^1H para la bromoamida **39**.

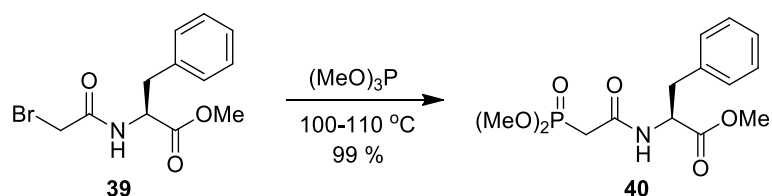
Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
3.15	2dd	2H	CH_2Ph	14.0, 6.0
3.74	s	3H	OMe	-----
3.84	Sistema AB	2H	CH_2Br	13.6
4.85	dt	1H	CHBn	7.6, 6.0
6.85	a	1H	NH	-----
7.10-7.33	m	5H	H_{arom}	-----

Asimismo, el espectro de RMN de ^{13}C mostró las siguientes señales: δ 29 (CH_2Ph), 38 (CH_2Br), 53 (OMe), 54 (CHBn), 127, 128.9, 129.5, 135 (Ph), 165 (CONH), 171.5 (CO_2Me).

Por otro lado, el espectro de masas de alta resolución para el compuesto **39** mostró un ión molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ y un $[\text{M}+2]^+$ con una relación m/z 300.0301 y 302.0289. Estos resultados indican que el compuesto analizado presenta bromo en su estructura al observarse un M+2 característico de isótopos.

5.1.2.2 Preparación de fosfonamida 40.

El siguiente paso consistió en llevar a cabo la preparación de la fosfonamida **40**, para lo cual se hizo reaccionar la bromoamida **39** con trimetilfosfita a una temperatura de 100-110 °C sin disolvente, obteniéndose la fosfonamida **40** como un líquido amarillo, con un rendimiento químico de 99 % (Esquema 8).



Esquema 8. Preparación de la fosfonamida **40**.

La fosfonamida **40** fue caracterizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C, ³¹P y Espectrometría de Masas de Alta Resolución.

A continuación se describen las señales más importantes de RMN de ¹H para la fosfonamida **40** (Tabla 13): en un desplazamiento químico de 2.87 ppm se observa un doble de dobles que corresponde al grupo metileno unido al fósforo (**CH₂P**) con constantes de acoplamiento $J = 20.8$ y 4.8 Hz, e integra para 2H; en 3.12 ppm se observan dos dobles de dobles, que corresponden al metileno del bencilo (**CH₂Ph**) con constantes de acoplamiento de $J = 14.4$ y 5.6 Hz e integra para 2H; en 3.71 ppm se observa una señal sencilla que corresponde al metoxilo (**OMe**) del éster, e integra para 3H; en 3.69 y 3.76 ppm se observan dos señales dobles para los protones de los metilos del éster fosfónico [(**MeO**)₂P] con constantes de acoplamiento $J = 11.2$ Hz, e integran para 6H; en 4.84 ppm se observa un doble de triples que corresponde al grupo metino unido al bencilo (**CHBn**) con constantes de acoplamiento $J = 9.2$ y 7.2 Hz, e integra para 1H; en 7.10 ppm se observa una señal doble que corresponde al hidrógeno unido al nitrógeno (**NH**) con una constante de acoplamiento $J = 7.6$ Hz, e integra para 1H; finalmente de 7.16-7.32 ppm se observa una señal múltiple que corresponde a los hidrógenos aromáticos del grupo fenilo (**H_{arom}**), e integra para 5H.

Tabla 13. Datos de RMN de ^1H para la fosfonamida **40**.

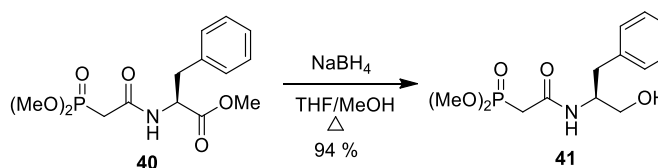
Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
2.87	dd	2H	CH_2P	20.8, 4.8
3.12	2dd	2H	CH_2Ph	14.4, 5.6
3.71	s	3H	OCH_3	----
3.69 y 3.76	2d	6H	$(\text{OCH}_3)_2$	11.2
4.84	dt	1H	CHBn	9.2, 7.6
7.10	d	1H	NH	7.6
7.16-7.32	m	5H	H_{arom}	----

Asimismo, el espectro de RMN de ^{13}C mostró las siguientes señales: δ 34 (CH_2P), 38 (CH_2Ph), 52 (CHNH), 53 ($(\text{MeO})\text{P}$), 54 (OMe), 127, 128, 129, 136 (Ph), 164 (CONH), 172 (CO_2Me). El espectro de RMN de ^{31}P (81MHz, CDCl_3), mostró una señal en 25.66 ppm.

Por otro lado, el espectro de masas de alta resolución para el compuesto **40** mostró un ión molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ con una relación m/z 330.1119 correspondiente al compuesto esperado.

5.1.2.3 Preparación de la fosfohidroxiamida **41**.

Para la preparación de la fosfohidroxiamida **41**, se llevó a cabo la reacción de reducción del éster metílico, para ello se hizo reaccionar la fosfonamida **40** con borohidruro de sodio en una mezcla de tetrahidrofurano-metanol, obteniéndose el alcohol de la fosfonoamida como un líquido viscoso transparente con un rendimiento químico del 94% (Esquema 9).



Esquema 9. Preparación de la fosfohidroxiamida **41**.

La fosfohidroxiamida **41** fue caracterizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , ^{31}P .

Las señales de RMN de ^1H para la fosfohidroxiamida **41** se muestran a continuación (Tabla 14): en un desplazamiento químico de 2.87 ppm se observa una señal doble que corresponde al grupo metileno unido al fósforo (CH_2P) con una constante de acoplamiento $J = 21.2$ Hz, e integra para 2H; en un desplazamiento químico de 2.88 ppm se observa un doble de dobles que corresponde al grupo metileno unido a fenilo (CH_2Ph) con constantes de acoplamiento $J = 7.6$ y 2.4 Hz, e integra para 2H; en 3.54 ppm se observa un doble de dobles que corresponde al metileno unido al grupo hidroxilo (CH_2OH) con constantes de acoplamiento de $J = 11.2$ y 4.4 Hz, e integra para 2H; en 3.69 y 3.77 ppm se observan dos señales dobles que corresponden a los metoxilos del éster fosfónico [$\text{P}(\text{OMe})_2$] con constantes de acoplamiento $J = 11.6$ Hz, e integran para 6H; en 4.21 ppm se observa una señal múltiple correspondiente al metino unido al bencilo (CHBn) e integra para 1H; en 7.10 se observa una señal doble que corresponde al hidrógeno unido al nitrógeno (NH) con una constante de acoplamiento $J = 7.6$ Hz, e integra para 1H; finalmente de 7.18 a 7.30 ppm se observa una señal múltiple que corresponde para los hidrógenos aromáticos del grupo fenilo (H_{arom}) e integra para 5H.

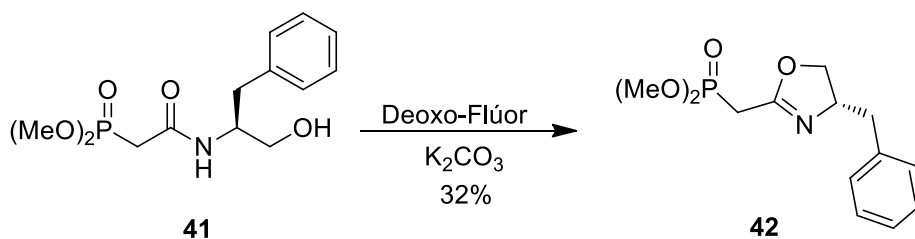
Tabla 14. Datos de RMN de ^1H para la fosfohidroxiamida **41**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
2.87	d	2H	CH_2P	21.2
2.88	dd	2H	CH_2Ph	7.6, 2.4
3.54	dd	2H	CH_2OH	11.2, 4.4
3.69 y 3.77	2d	6H	$(\text{OCH}_3)_2$	11.6
4.21	m	1H	CHBn	-----
7.10	d	1H	NH	7.6
7.18-7.30	m	5H	H_{arom}	-----

Asimismo, el espectro de RMN de ^{13}C mostró las siguientes señales: δ 35 (CH_2P), 37 (CH_2Ph), 53 (CH_2OH), 54 [$(\text{MeO})\text{P}$], 63 (CHBn), 126, 128.6, 129.4, 138 (Ph), 164 (CONH). El espectro de RMN de ^{31}P (81MHz, CDCl_3), mostró una señal en 26.58 ppm.

5.1.2.4 Reacción de *O*-alquilación.

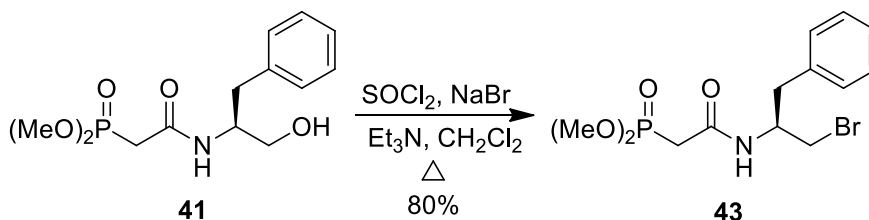
Al llevar a cabo una revisión de la literatura se encontró que es posible llevar a cabo una reacción de *O*-alquilación a partir de β -hidroxiamidas para generar oxazolinas, para lo cual se hace uso de agentes de fluoración⁴ como lo son el DAST y el Deoxo-Flúor, reportándose que el uso de estos reactivos permite generar los correspondientes heterociclos con excelentes rendimientos químicos, razón por la cual se decidió probar Deoxo-Flúor en la reacción de la fosfohidroxiamida **41** para generar la fosfo-oxazolina **42** (Esquema 10).



Esquema 10. Preparación de la fosfo-oxazolina **42**.

Como se puede observar en el esquema anterior, se logró obtener la fosfo-oxazolina **42** como un aceite viscoso, sin embargo el rendimiento químico obtenido fue bajo (32%).

Con base en este resultado, se procedió a la preparación de un intermediario bromado para facilitar la ciclación intramolecular, por lo tanto se llevó a cabo la preparación de la fosfobromoamida **43**, para la cual se hizo reaccionar la fosfohidroxiamida **41** con trietilamina (Et_3N), cloruro de tionilo ($SOCl_2$) y bromuro de sodio ($NaBr$), utilizando diclorometano (CH_2Cl_2) como disolvente. La reacción se sometió a reflujo por 4 horas generándose un sólido amarillo, el cual fue purificado por columna cromatográfica, obteniéndose un sólido blanco con un rendimiento químico del 80% (Esquema 11).



Esquema 11. Preparación de la fosfobromoamida **43**.

La fosfobromoamida **43** fue caracterizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , ^{31}P .

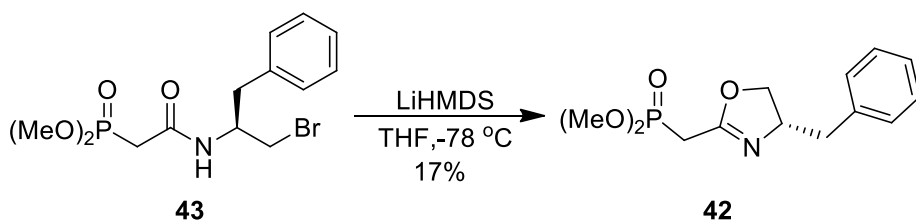
Las señales de RMN de ^1H para la fosfobromoamida **43** se muestran a continuación (Tabla 15): en un desplazamiento químico de 2.84 ppm se observa una señal doble que corresponde al grupo metileno unido al fósforo (CH_2P) con una constante de acoplamiento de $J = 20.7$ Hz e integra para 2H; en un desplazamiento químico de 2.92 ppm se observa una señal doble que corresponde al grupo metileno unido al fenilo (CH_2Ph) con una constante de acoplamiento de 7.5 Hz e integra para 2H; en 3.49 y 3.64 ppm se observan dos doble de dobles que corresponde al metileno unido al bromo (CH_2Br) con constantes de acoplamiento de $J = 11.4, 4.2$ Hz e integra para 2H; en 3.68 y 3.87 ppm se observan dos dobletes que corresponden a los metoxilos unidos al fósforo [$\text{P}(\text{OMe})_2$] con una constante de acoplamiento de $J = 11.4$ Hz, e integra para 6H; en 4.45 ppm se observa una señal múltiple correspondiente al metino unido al bencilo (CHBn) e integra para 1H; en 7.0 se observa una señal doble que corresponde al hidrógeno unido al nitrógeno (NH) con constante de acoplamiento de $J = 7.8$ Hz e integra para 1H, finalmente de 7.18 a 7.33 ppm se observa una señal múltiple que corresponde para los hidrógenos aromáticos del grupo fenilo (H_{arom}) e integra para 5H.

Tabla 15. Datos de RMN de ^1H para la fosfobromoamida **43**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
2.84	d	2H	CH_2P	20.7
2.92	d	2H	CH_2Ph	7.5
3.49 y 3.64	2dd	2H	CH_2Br	11.4, 4.2
3.68 y 3.87	2d	6H	$(\text{MeO})_2\text{P}$	11.4
4.45	m	1H	CHBn	-----
7.0	d	1H	NH	7.8
7.18-7.33	m	5H	H_{arom}	-----

Asimismo, el espectro de RMN de ^{13}C mostró las siguientes señales: δ 35 (CH_2P), 38 (CH_2Ph), 53 (CH_2OH), 54 [$(\text{MeO})\text{P}$], 64 (CHBn), 126, 128.5, 129.4, 138 (Ph), 164 (CONH).

Con la fosfobromoamida **43** en mano, el siguiente paso consistió en llevar a cabo la reacción de ciclación intramolecular, para ello se hizo reaccionar **43** bajo condiciones anhidras con hexametildisilamiduro de litio (LiHMDS), utilizando THF como disolvente a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, obteniéndose un líquido amarillo viscoso, el cual fue purificado por columna cromatográfica, utilizando como fase estacionaria silica gel y como fase móvil un sistema de Acetato de etilo:Hexano:Metanol (5:4:1), obteniéndose la fosfo-oxazolina **42** con un rendimiento de 17% (Esquema 12).



Esquema 12. Preparación de la fosfo-oxazolina **42**.

La fosfo-oxazolina **42** fue caracterizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H .

Las señales de RMN de ^1H para la oxazolina **42** se muestran a continuación (Tabla 16): en un desplazamiento químico de 2.67 y 3.10 ppm se observan dos doble de dobles que corresponden al grupo metileno unido a fenilo (CH_2Ph) con constantes de acoplamiento de $J = 13.6, 5.6\text{ Hz}$, e integra para 2H; en un desplazamiento químico de 2.94 ppm se observa una señal doble que corresponde al grupo metileno unido al fosforilo (CH_2P) con una constante de acoplamiento $J = 21.8\text{ Hz}$, e integra para 2H; en 3.80 y 3.81 ppm se observan dos señales dobles que corresponden a los metoxilos del éster fosfónico [$(\text{MeO})_2\text{P}$] con una constante de acoplamiento $J = 11.0\text{ Hz}$ para cada señal, e integran para 6H; en 4.10 y 4.25 se observan dos doble de dobles empalmados, que corresponde al metileno unido al oxígeno de la oxazolina (CH_2O) con una constante de acoplamiento $J = 8.4\text{ Hz}$, integra para 2H; en 4.41 se observa una señal múltiple que corresponde al grupo metino unido al imino (CHN=), e integra para 1H, finalmente de 7.12 a 7.40 ppm se observa una señal múltiple que corresponde para los hidrógenos aromáticos del grupo fenilo (H_{arom}) e integra para 5H.

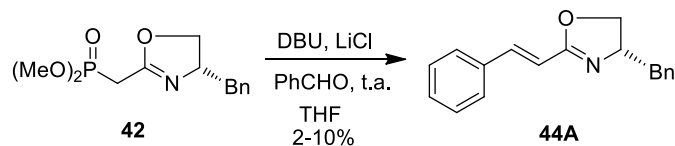
Tabla 16. Datos de RMN de ^1H para la oxazolina **42**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
2.67 y 3.10	2dd	2H	CH_2Ph	13.6, 5.6
2.94	d	2H	CH_2P	21.8
3.8 y 3.81	2d	6H	$[(\text{MeO})_2\text{P}]$	11.0
4.1 y 4.25	2dd	2H	CH_2O	8.4
4.41	m	1H	CHN=	-----
7.12-7.40	m	5H	Ph	-----

Así mismo, el espectro de RMN de ^{13}C mostró las siguientes señales: δ 25 y 28 (CH_2P), 42 (CH_2Ph), 53 $[(\text{MeO})\text{P}]$, 67 (CHBn), 73 (CH_2O), 126, 129, 130, 138 (**Ph**), 161 (CONH). El espectro de RMN de ^{31}P (81MHz, CDCl_3), mostró una señal en 24.93 ppm.

5.1.2.5 Reacción de Horner-Wadsworth-Emmons.

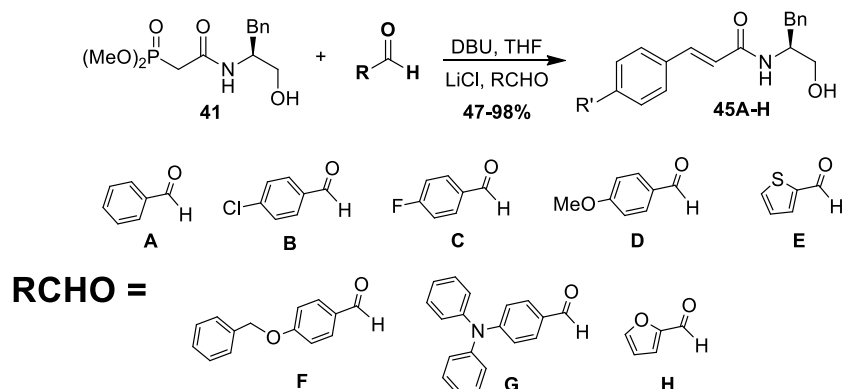
Teniendo la fosfo-oxazolina **42** en mano, la siguiente etapa consistió en llevar a cabo la reacción de HWE de **42** con benzaldehído utilizando 1,8-Diazabicycloundec-7-eno (DBU) como base en presencia de cloruro de litio (LiCl) en tetrahidrofurano (THF) a temperatura ambiente, sin embargo a pesar de realizar diferentes repeticiones sólo se logró obtener la oxazolina α,β -insaturada **44A** con bajos rendimientos (Esquema 13).



Esquema 13. Preparación de la oxazolina α,β -insaturada **44A**.

Con base en los resultados anteriores se decidió realizar un cambio en las etapas de reacción, es decir se procedió a realizar la reacción de HWE de la fosfohidroxiamida **41** con diferentes aldehídos aromáticos empleando las condiciones de reacción mostradas

en el esquema 14, lográndose obtener satisfactoriamente 8 hidroxiamidas α,β -insaturadas **45A-H**.



Esquema 14. Preparación de hidroxiamidas α,β -insaturadas **45A-H**.

En tabla siguiente se puede observar que la reacción de la fosfohidroxiamida **41** con benzaldehído, *p*-clorobenzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído, *p*-metoxibenzaldehído y tiofeno-2-carbaldehído utilizando 1,8-Diazabicycloundec-7-eno (DBU), cloruro de litio (LiCl) en THF bajo condiciones anhidras generó excelentes rendimientos químicos (93-98%), mientras que la reacción utilizando *p*-benciloxibenzaldehído, *p*-difenilaminobenzaldehído y furaldehído bajo las mismas condiciones proporcionó rendimientos moderados (64-71%).

Tabla 17. Preparación de hidroxiamidas α,β -insaturadas.

Aldehído	Rendimiento (%)	Aspecto Físico	P. Fusión	Comp.
benzaldehído	96	Sólido blanco	144-146 °C	45A
<i>p</i> -clorobenzaldehído	98	Sólido blanco	132-134 °C	45B
<i>p</i> -fluorobenzaldehído	96	Sólido blanco	75-77 °C	45C
<i>p</i> -metoxibenzaldehído	95	Sólido blanco	128-130 °C	45D
tiofeno-2-carbaldehído	93	Sólido Amarillo	110-113 °C	45E
<i>p</i> -benciloxibenzaldehído	64	Sólido blanco	171-173 °C	45F
<i>p</i> -difenilaminobenzaldehído	64	Sólido verde	70-74 °C	45G
2-Furaldehído	71	Sólido blanco	111-113 °C	45H

A continuación se describen las señales de RMN de ^1H para la hidroxiamida α,β -insaturada **45D** (Tabla 18 y Figura 9): en un desplazamiento químico de 2.91 y 2.98 ppm se observan dos señales doble de dobles que corresponde al grupo metileno unido a fenilo (CH_2Ph) con constantes de acoplamiento de $J = 14.1, 7.6$ Hz, e integra para 2H; en un desplazamiento químico de 3.60 ppm se observa una señal doble de dobles que

corresponde a un protón del grupo metileno unido al hidroxilo (CH_2OH) con constantes de acoplamiento $J = 11.2, 5.1$ Hz, e integra para 1H y en 3.67 se observa la otra señal doble de dobles que corresponde al otro protón del grupo metileno unido al hidroxilo (CH_2OH) con constantes de acoplamiento $J = 11.2, 4.3$ Hz, en 3.78 ppm se puede observar una señal simple que corresponde a los protones del metoxilo unidos a fenilo (PhOMe), e integra para 3H; en 4.26-4.34 ppm se observa un multiplete que corresponde al grupo metino unido al bencilo (CHBn) y se traslapa con la señal del hidrógeno unido al nitrógeno (NH), integra para 2H; en 6.40 se observa una señal doble que corresponde al grupo (CHC=O) con una constante de acoplamiento $J_{trans} = 15.7$ Hz e integra para 1H; en 6.85 se observa una señal doble correspondiente a protones aromáticos (H_{arom}), con una constante de acoplamiento $J = 8.7$ Hz, integrando para 2H; en 7.13-7.41 ppm se observa una señal múltiple que corresponde para los hidrógenos aromáticos (H_{arom}), integrando para 5H; en 7.42 se observa una señal doble correspondiente a protones aromáticos (H_{arom}), con constante de acoplamiento $J = 8.7$ e integrando para 2H y finalmenten en 7.54 se observa otro doble que corresponde al grupo $\text{CH}(p\text{-OMeC}_6\text{H}_4)$ con una constante de acoplamiento $J_{trans} = 15.7$ Hz e integra para 1H.

Las constantes de acoplamiento de 15.7 Hz nos permiten corroborar que las hidroxiamidas **45** obtenidas presentan una geometría trans (*E*) para el enlace vinílico.

Tabla 18. Datos de RMN de ^1H para la hidroxiamida α,β -insaturada **45D**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
2.91 y 2.98	2dd	2H	CH_2Ph	14.1, 7.6
3.60	dd	1H	CH_2OH	11.2, 5.1
3.67	dd	1H	CH_2OH	11.2, 4.3
3.78	s	3H	OMe	-----
4.26-4.34	m	2H	CHBn y NH	-----
6.40	d	1H	CH-C=O	15.7
6.85	d	2H	H_{arom}	8.7
7.13-7.31	m	5H	H_{arom}	-----
7.42	d	2H	H_{arom}	8.7
7.51	d	1H	$\text{CH}(p\text{-OMeC}_6\text{H}_4)$	15.7

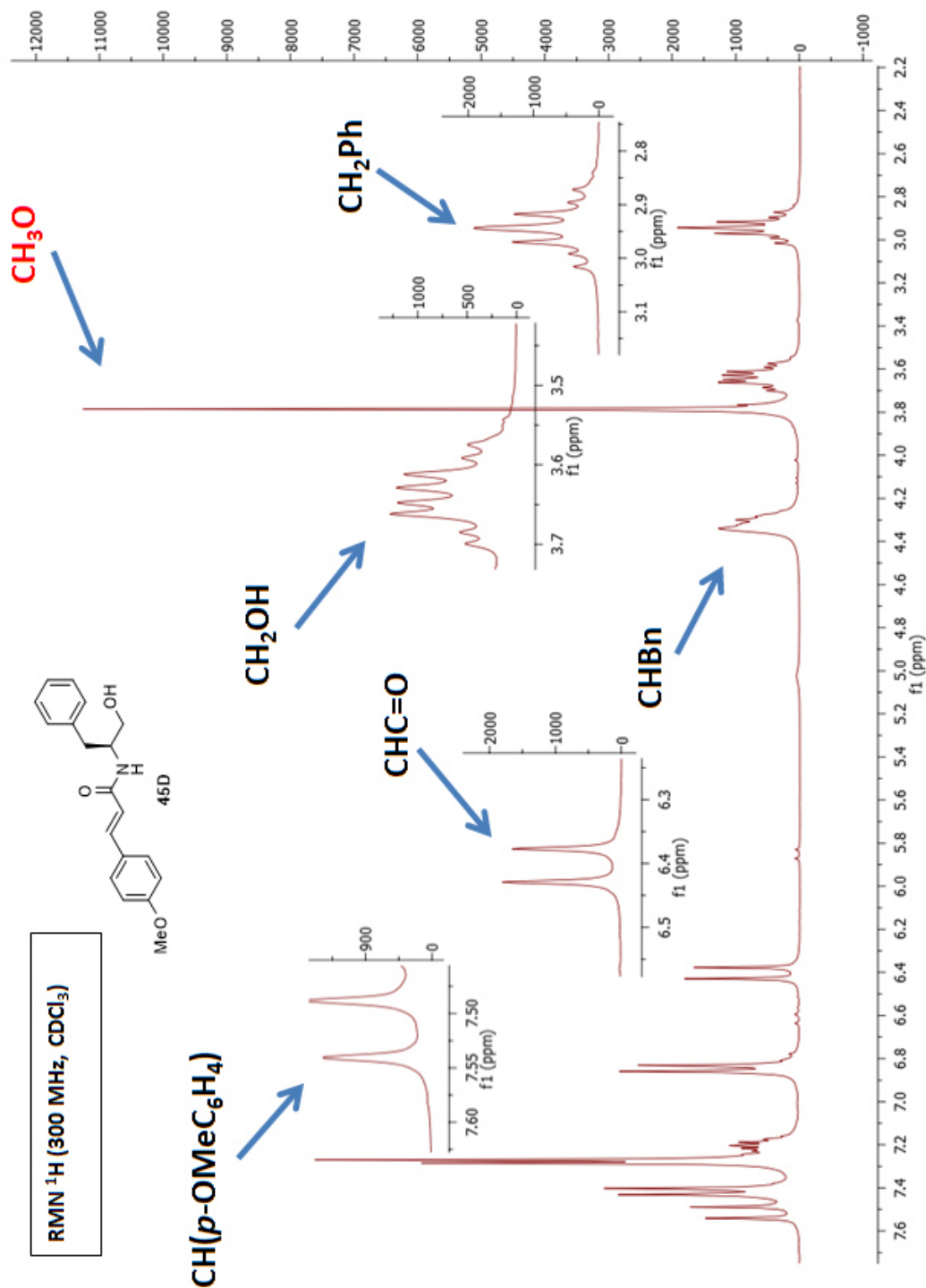
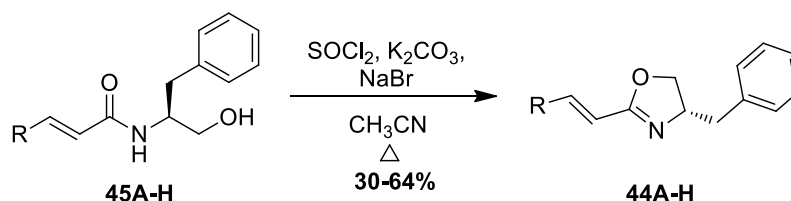


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H para la amida α,β -insaturada 45D.

Asimismo, el espectro de RMN de ^{13}C mostró las siguientes señales: δ 36.6 (CH_2Ph), 52.5 (CHBn), 54.8 ($\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$), 62.6 (CH_2OH), 113.7, 117.7, 125.8, 126.9, 127.8, 128.7, 128.8, 137.6, 140.0, 160.3, 166.7 ($\text{C}=\text{O}$). Por otro lado, el espectro de masas de alta resolución para el compuesto **45D** mostró un ión molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ con una relación m/z 312.1587, correspondiente al compuesto esperado.

5.1.2.6 Reacción de *O*-alquilación de hidroxiacrilamidas **45** para generar **44A-H**.

Teniendo estos compuestos preparados **45A-H**, el siguiente paso consistió en realizar la reacción de *O*-alquilación, pero observando que las metodologías anteriormente presentadas para generar el anillo de oxazolina no proporcionaban buenos rendimientos químicos, se decidió probar nuevas condiciones de reacción. Por lo tanto, se llevó a cabo la reacción de **45A-H** utilizando cloruro de tionilo (SOCl_2), bromuro de sodio (NaBr), carbonato de potasio (K_2CO_3) en acetonitrilo (CH_3CN) como disolvente a reflujo, lográndose obtener en un solo paso las oxazolinas α,β -insaturadas correspondientes, llevando a cabo la etapa de bromación *in situ* (Esquema 15).



Esquema 15. Preparación de las oxazolinas α,β -insaturadas **44**.

Como se puede observar en la tabla 19, la reacción de **45A**, **45C**, **45E** y **45F** bajo las condiciones de reacción establecidas proporcionaron las oxazolinas correspondientes con rendimientos moderados (60-64%), mientras que la reacción con **45B**, **45D**, **45G** y **45H** generó rendimientos químicos más bajos (32-41%).

Tabla 19. Síntesis de oxazolinas α,β -insaturadas.

Aldehído	Rendimiento (%)	Aspecto Físico	P. Fusión	Comp.
Benzaldehído	60	Sólido blanco	71-73 °C	44A
<i>p</i> -clorobenzaldehído	32	Sólido blanco	81-83 °C	44B
<i>p</i> -fluorobenzaldehído	64	Sólido blanco	93-95 °C	44C
<i>p</i> -metoxibenzaldehído	34	Sólido amarillo	68-70 °C	44D
tiofeno-2-carbaldehído	63	Sólido amarillo	62-64 °C	44E
<i>p</i> -benciloxibenzaldehído	64	Sólido blanco	141-143 °C	44F
<i>p</i> -difenilaminobenzaldehído	38	Sólido amarillo	151-153 °C	44G
2-Furaldehído	41	Sólido café	72-74 °C	44H

En este caso se decidió utilizar carbonato de potasio (K_2CO_3) como base, así como acetonitrilo (CH_3CN) como disolvente, logrando obtener en un sólo paso, las oxazolinas α,β -insaturadas correspondientes, llevando a cabo la etapa de bromación *in situ* (Esquema 15).

Las oxazolinas insaturadas **44A-H** fueron caracterizadas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de 1H y ^{13}C . A continuación se describe el espectro de RMN 1H para la oxazolina insaturada **44D** (Tabla 20 y Figura 10): en un desplazamiento químico de 2.72 ppm se observa una señal doble de dobles que corresponde al protón del grupo metileno unido al fenilo (CH_2Ph) con constantes de acoplamiento de $J = 13.8, 8.7$ Hz, e integra para 1H; en 3.16 ppm se observa otra señal doble de dobles que corresponden al otro protón del grupo metileno unido al fenilo (CH_2Ph) con constantes de acoplamiento de $J = 13.7, 4.8$ Hz, e integra para 1H; en 3.80 ppm se observa una señal sencilla que corresponde al grupo metoxilo (CH_3O) e integra para 3H; en 4.03 ppm se observa una señal doble de dobles que corresponde al grupo metileno unido al oxígeno (CH_2OH) con constantes de acoplamiento de $J = 8.1, 7.5$ Hz, e integra para 1H; en 4.26 ppm se observa la otra señal doble de dobles que corresponde al grupo metileno unido al oxígeno (CH_2OH) con constantes de acoplamiento de $J = 8.7, 8.1, 7.5$ Hz, e integra para 1H; en 4.50 se observa una señal múltiple que corresponde al metino del grupo $CHBn$, e integra para 1H; en 6.52 ppm se observa una señal doble que corresponde al protón vinílico ($CHC=N$) con constante de acoplamiento $J_{trans} = 16.2$ Hz, e integra para 1H; en 7.32 ppm se observa otra señal doble que corresponde a protones aromáticos (H_{arom}), con constante de acoplamiento $J = 6.9$ Hz, e integra para 2H; en 7.22-7.43 se observa una señal múltiple que corresponde a protones aromáticos (H_{arom}) así como al otro protón vinílico ($C(p-OMeC_6H_4)$), integrando para 8H.

Tabla 20. Datos de RMN de ^1H para la oxazolina insaturada **44D**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
2.72	dd	1H	CH_2Ph	13.8, 8.7
3.16	dd	1H	CH_2Ph	13.8, 4.8
3.80	s	3H	OMe	-----
4.03	dd	1H	CH_2OH	8.1, 7.5
4.26	dd	1H	CH_2OH	8.7, 8.1
4.50	m	1H	CHBn	-----
6.52	d	1H	CHC=N	16.2
7.32	d	2H	H_{arom}	6.9
7.22-7.43	m	8H	H_{arom} y $\text{CH}(p\text{-OMeC}_6\text{H}_4)$	-----

Asimismo, el espectro de RMN de ^{13}C mostró las siguientes señales: δ 41.8 (CH_2Ph), 55.3 (CH_3O), 67.6 (CHBn), 71.5 (CH_2O), 112.7 (CH), 114.2, 126.5, 127.9, 128.5, 128.9, 129.1, 138.0, 139.7 (CH), 160.7, 164 ($\text{C}=\text{N}$). Por otra parte el espectro de masas de alta resolución para el compuesto **44D** mostró un ión molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ con una relación m/z 294.1490 correspondiendo a la estructura propuesta.

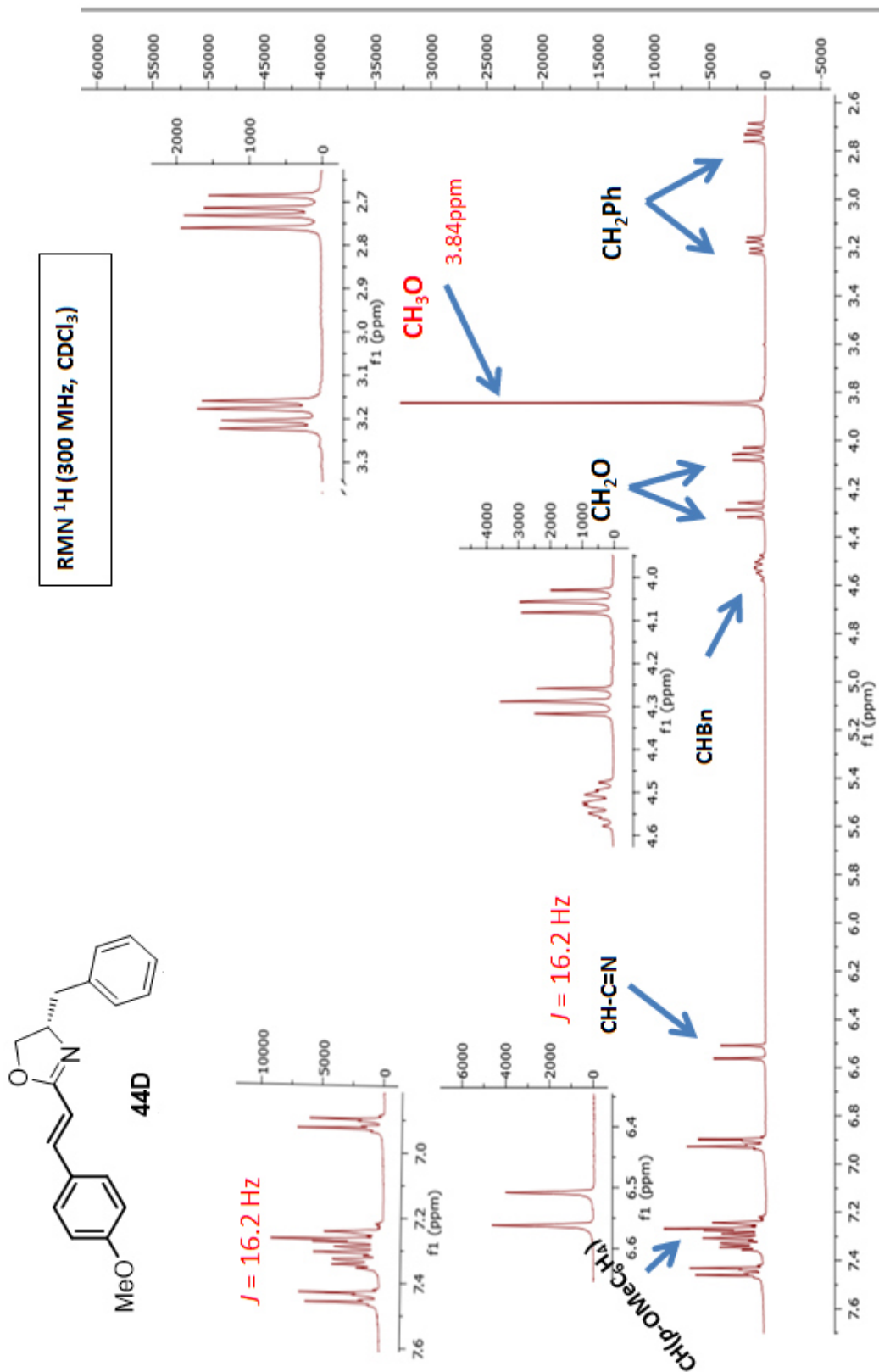
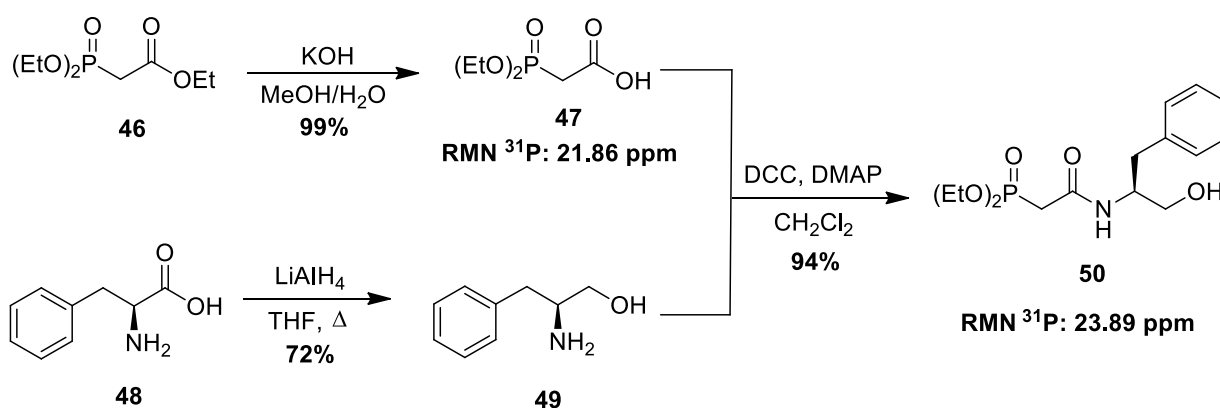


Figura 10. Espectro de RMN de ¹H para la oxazolina α,β-insaturada **44D**.

5.1.2.7 Ruta de síntesis alterna para la preparación de oxazolinas α,β -insaturada.

Con los resultados ya obtenidos, se pensó que era posible utilizar una ruta de síntesis alterna para la preparación de la fosfohidroxiamida **50**, así como de las correspondientes oxazolinas **44** de una manera más corta y con mejores rendimientos químicos. Por lo tanto se utilizó como materiales de partida el 2-(dietoxifosforil)acetato de etilo y la (*S*)-fenilalanina, para posteriormente obtener el ácido 2-(dietoxifosforil)acético y el fenilalaninol respectivamente, los cuales se acoplaron haciendo uso de DCC y DMAP en diclorometano como disolvente, logrando obtener la fosfohidroxiamida **50** (Esquema 16).



Esquema 16. Preparación de la fosfohidroxiamida **50**.

5.1.2.8 Preparación del ácido 2-(dietoxifosforil) acético **47**.

La reacción de hidrólisis del trietilfosfonoacetato con hidróxido de potasio (KOH) en una mezcla de metanol/agua (MeOH/H₂O), proporcionó el ácido dietilfosfonoacético como un líquido viscoso transparente con un rendimiento químico del 99%.

El compuesto obtenido fue caracterizado por Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ³¹P.

A continuación se describen las señales de RMN de ¹H (Tabla 21): en 1.34 ppm se observa una señal triple que corresponde a los metilos del grupo fosfonato (CH₃CH₂OP), con una constante de acoplamiento de $J = 6.8$ Hz que integra para 6H, en 2.07 ppm se observa una señal ancha que integra para 1H, correspondiente al protón del grupo hidroxilo (OH). En 2.99 ppm se observa una señal doble que corresponde al metileno unido al carboxilo (CH₂COOH), con constante de acoplamiento de $J = 21.7$ Hz, e

integra para 2H. Finalmente, en 4.18 ppm se observa una señal múltiple que corresponde a los protones de los grupos metileno del fosfonato ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), e integra para 4H.

Tabla 21. Datos de RMN de ^1H para el ácido dietilfosfonoacético **47**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
1.34	t	6H	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$	6.8
2.07	a	1H	OH	----
2.99	d	2H	CH_2COOH	21.7
4.18	m	4H	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$	----

Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{31}P se observa una sola señal en 21.86 ppm lo que indica que el compuesto obtenido está libre de algún subproducto que se pudiera generar y que presente fósforo en su estructura.

5.1.2.9 Preparación del (*S*)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol **49**.

Una vez obtenido el ácido dietilfosfonoacético **47**, el siguiente paso consistió en realizar una reacción de reducción de la (*S*)-fenilalanina utilizando como agente reductor el hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) en THF como disolvente a reflujo, para formar el (*S*)-fenilalaninol **49**. Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 90-92 °C y con un rendimiento químico del 72%.

El producto obtenido fue caracterizado por Resonancia Magnética Nuclear de Protón ^1H (Tabla 22): en un desplazamiento químico de 2.31 ppm se observa una señal ancha que corresponde al protón del grupo hidroxilo (OH) que integra para 1H; en 2.52 ppm se observa un doble de dobles que corresponde a un protón del grupo metileno unido al fenilo (CH_2Ph), que integra para 1H con constantes de acoplamiento de $J = 13.4, 8.7$ Hz respectivamente; en 2.79 ppm se observa otro doble de dobles que corresponde al otro protón del grupo metileno (CH_2Ph) con constantes de acoplamiento de $J = 13.4, 5.1$ Hz, e integra para 1H. En 3.11 ppm se observa una señal múltiple que integra para 1H y corresponde al metino unido a bencilo (CHBn). En 3.40 ppm se observa un doble de dobles que corresponde a uno de los protones adyacentes del grupo hidroxilo (CH_2OH) con constantes de acoplamiento de $J = 10.7$ y 7.2 Hz que integra para 1H. En 3.63 ppm se observa otro doble de dobles que corresponde al otro protón adyacente del grupo hidroxilo (CH_2OH) con constantes de acoplamiento de $J = 10.7, 3.8$ Hz que integra para 1H. Finalmente en 7.25 ppm se observa una señal múltiple que corresponde a los protones aromáticos del grupo fenilo (H_{arom}) e integra para 5H.

Tabla 22. Datos de RMN de ^1H para el aminoalcohol **49**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
2.31	a	1H	OH	----
2.52	dd	1H	CH ₂ Ph	13.4, 8.7
2.79	dd	1H	CH ₂ Ph	13.4, 5.1
3.11	m	1H	CHBn	15.9
3.40	dd	2H	CH ₂ OH	10.7, 7.10
3.63	dd	2H	CH ₂ OH	10.7, 3.8
7.25	m	5H	H _{arom}	----

5.1.2.10 Preparación del (S)-(2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo **50**.

Para la preparación de la fosfohidroxiamida **50**, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento entre el ácido fosfonoacético **47** y el aminoalcohol **49** anteriormente preparados, haciendo uso de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y dimetilaminopiridina (DMAP), obteniéndose el compuesto **50** como un aceite viscoso con un rendimiento químico del 94%.

La fosfohidroxiamida **50** fue caracterizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C (Tabla 23): en un desplazamiento químico de 1.28 y 1.31 ppm se observan dos señales triples que corresponden a los protones de los metilos del fosforilo (CH₃CH₂O) con una constante de acoplamiento de $J = 7.1$ Hz que integra para 6H. En 2.82 ppm se observan una señal doble, que corresponde a los protones del metileno unido al carbonilo (CH₂CO) con constante de acoplamiento de $J = 21.0$ Hz, e integra para 2H y la otra que corresponde a los protones del metileno unido al fenilo (CH₂Ph) que integra para 2H. De 3.50 a 3.69 ppm se observa una señal múltiple que corresponde a los protones del metileno unido al hidroxilo (CH₂OH). De 3.98 a 4.14 ppm se observa otra señal múltiple que corresponde al grupo metileno unido al grupo fosfonato (CH₃CH₂O), e integra para 4H. De 4.16 a 4.25 se observa una señal múltiple que corresponde al protón del carbono unido al nitrógeno (NHCH) que integra para 1H. Finalmente en 6.95 ppm se puede observar una señal doble que corresponde al grupo amino (NH) con constante de acoplamiento de 8.0 Hz que integra para 1H y de 7.16 a

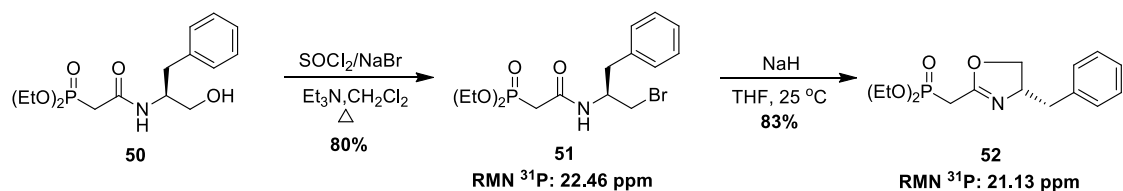
7.31 ppm se observa una señal múltiple correspondiente a los protones del anillo aromático (H_{arom}) que integra para 5H.

Tabla 23. Datos de RMN de ^1H para el fosfohidroxiamida **50**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
1.28 y 1.31	2t	6H	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$	7.1
2.82	2d	4H	CH_2CO y CH_2Ph	21.0
3.50-3.69	m	2H	CH_2OH	6.8
3.98-4.14	m	4H	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$	-----
4.16-4.25	m	1H	CHNH	-----
6.95	d	1H	NH	8.0
7.16-7.31	m	5H	H_{arom}	-----

El espectro de masas de alta resolución para la fosfohidroxiamida **50** mostró un ión molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ con una relación m/z 330.1467 correspondiente al compuesto esperado.

Teniendo la fosfohidroxiamida **50**, se procedió a preparar el compuesto bromado **51**, seguido de la reacción de ciclación intramolecular utilizando NaH como base (Esquema 17).



Esquema 17. Preparación de la fosfo-oxazolina **52**.

5.1.2.11 Preparación del (S)-(2-((1-bromo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo **51**.

Para la preparación del (S)-(2-((1-bromo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo **51**, se hizo reaccionar la fosfohidroxiamida **50** con cloruro de tionilo (SOCl_2), trietilamina (Et_3N) y bromuro de sodio (NaBr) en diclorometano (CH_2Cl_2) a reflujo, obteniéndose un sólido blanco con un rendimiento químico del 80% y un punto de fusión de 89-91 °C y una rotación óptica de $[\alpha]_{\text{D}} = -12.9$ (c 1.0, MeOH).

La fosfobromoamida **51** fue caracterizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C .

Las señales de RMN de ^1H para la fosfobromoamida **51** se muestran a continuación (Tabla 24): en un desplazamiento químico de 1.30 y 1.34 se observan dos señales triples que corresponden a los protones de los grupos metilo del fosfonato ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) $_2\text{P}$ con una constante de acoplamiento de 7.2 Hz, e integra para 6 protones; 2.82 y 2.87 ppm se observan dos señales dobles de dobles que corresponden a los protones del metileno unido al grupo fosfonato (CH_2P) con unas constantes de acoplamiento de 17.8, 15.5 Hz, e integra para 2H; en un desplazamiento de 2.94 se observa una señal doble que corresponde al metileno unido al fenilo (CH_2Ph) con una constante de acoplamiento de $J = 7.8$ Hz, e integra para 2H; en 3.51 y 3.64 ppm se observan dos dobles de dobles que corresponden al grupo metileno unido al bromo (CH_2Br) con constantes de acoplamiento de $J = 11.3$ y 3.5 Hz, e integra para 2H; en 4.06 y 4.15 se observan dos señales doble de cuarteto que corresponden a los protones del metileno del fosfonato (CH_2OP), con constantes de acoplamiento de 14.2, 7.1 Hz e integra para 4H; en un desplazamiento entre 4.42-4.50 se observa una señal multiplete que corresponde al protón del metino unido al bencilo (CHBn), e integra para 1H; en un desplazamiento de 7.10 ppm se observa una señal doble correspondiente al protón del NH, con una $J = 8.0$ Hz y finalmente en un desplazamiento de 7.21-7.33, se observa un multiplete que corresponde a los protones aromáticos (H_{arom}), e integra para 5H.

Tabla 24. Datos de RMN de ^1H para la fosfobromoamida **51**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
1.30 y 1.34	2t	6H	$(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}$	7.2
2.82 y 2.87	2dd	2H	(CH_2P)	17.8, 15.5
2.94	2dd	2H	CH_2Ph	7.8
3.51 y 3.64	2dd	2H	CH_2Br	11.3, 3.5
4.06 y 4.15	2dc	4H	(CH_2OP)	14.2, 7.1
4.42-4.50	m	1H	CHBn	-----
7.10	d	1H	NH	8.0
7.21-7.33	m	5H	H_{arom}	-----

Asimismo, el espectro de RMN de ^{13}C mostró las siguientes señales: δ 16.4 ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}$), 16.5 ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}$), 35.2 (d, $J = 131.0$ Hz, CH_2P), 37.5 (CH_2Ph), 46.5 (CH_2Br), 51.5 (CHBn), 62.9 (d, $J = 3.7$ Hz, CH_2OP), 63.0 (d, $J = 3.7$ Hz, CH_2OP), 127.0, 128.9, 129.4, 137.0, 163.9 (C=O). Por otra parte el espectro de RMN ^{31}P (161 MHz, CDCl_3) mostró una señal en δ 22.46ppm.

5.1.2.12 Preparación del (*S*)-((4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)metil) fosfonato de dietilo **52**.

Para la preparación del (*S*)-((4-bencil-4,5-dihidrooxazol-2-il)metil)fosfonato de dietilo **52**, se hizo reaccionar la fosfobromoamida **51** con hidruro de sodio (NaH), en THF a temperatura ambiente, obteniéndose un aceite amarillo con un rendimiento químico del 83% y una rotación óptica de $[\alpha]_{\text{D}} = -42.9$ (c 4.7, MeOH).

La oxazolina **52** fue caracterizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C .

Las señales de RMN de ^1H para la oxazolinas **52** se muestran a continuación (Tabla 25): en un desplazamiento químico de 1.35 se observa una señal triple que corresponde al metilo del fosfonato ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}$, con constante de acoplamiento de 6.8 Hz, e integra

para 6H; en 2.93 se observa una señal doble que corresponde al metileno unido al fosfonato (CH_2P), con una $J = 21.5$ Hz, e integra para 2H; en 2.66 y 3.10 ppm se observan dos señales dobles de dobles que corresponden a los protones del grupo metileno unido al fenilo (CH_2Ph) con constantes de acoplamiento de $J = 13.8, 8.5$ Hz, e integra para 2H; en 4.02 ppm se observa un doble de dobles que corresponde al grupo metileno unido al oxígeno (CH_2O) con constantes de acoplamiento de $J = 8.3, 7.5$ Hz, e integra para 1H; en 4.24 ppm se observa el otro doble de dobles que corresponde al grupo metileno unido al oxígeno (CH_2O) con constantes de acoplamiento de $J = 9.1, 8.8$ Hz, e integra para 1H; en 4.17 se observa una señal doble de cuartetos que corresponde al metileno del fosfonato (CH_2OP), con constante de acoplamiento de 14.4, 7.1 Hz, e integra para 4H; en un desplazamiento entre 4.37-4.46 se observa un multiplete que corresponde al metino del grupo CHBn , e integra para 1H, finalmente entre 7.19-7.32 ppm se observa un multiplete, que corresponde a los protones aromáticos (H_{arom}) e integra para 5H.

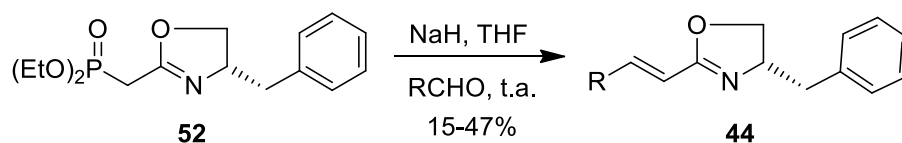
Tabla 25. Datos de RMN de ^1H para la oxazolina **52**.

Desplazamiento (δ)	Multiplicidad	Integración	Protón	J (Hz)
1.35	t	6H	$(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}$	6.8
2.93	d	2H	CH_2P	21.5
2.66 y 3.10	2dd	2H	CH_2Ph	13.8, 8.5
4.02	dd	1H	CH_2O	8.3, 7.5
4.24	dd	1H	CH_2O	9.1, 8.8
4.17	dc	4H	CH_2OP	14.4, 7.1
4.37-4.46	m	1H	CHBn	-----
7.19-7.32	m	5H	H_{arom}	-----

Asimismo, el espectro de RMN de ^{13}C mostró las siguientes señales: δ 16.4 ($(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{O})_2\text{P}$), 16.4 ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}$), 27.4 (d, $J = 138.6$ Hz, CH_2P), 41.6 (CH_2Ph), 62.7 (d, $J = 5.3$ Hz, CH_2OP), 67.6 (CHBn), 72.4 (CH_2O), 126.7, 128.6, 129.2, 137.8, 160.4 (d, $J = 8.9$ Hz, C=N). El espectro de RMN ^{31}P (161 MHz, CDCl_3) mostró una señal en δ 21.13. Por otra parte, el espectro de masas de alta resolución para la oxazolina **52** presentó un ión molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ con una relación m/z 312.1363 correspondiente al compuesto esperado.

5.1.2.13 Reacción HWE de la fosfo-oxazolina **52**, utilizando NaH.

Teniendo la fosfooxazolina **52** en mano se procedió a realizar la reacción de HWE, intercambiando el DBU, por NaH, logrando obtener las oxazolinas α,β -insaturadas **44A-D**, **44H** y **44J**, pero nuevamente con rendimientos químicos bajos (Esquema 18).



Esquema 18. Preparación de oxazolinas α,β -insaturadas **44A-D**, **44H** y **44J**.

Como se puede observar en la tabla 26, la reacción de **52** con benzaldehído, *p*-clorobenzaldehído, *p*-flúorobenzaldehído, *p*-metoxibenzaldehído, 2-furaldehído y *p*-formilbenzoato de metilo bajo las condiciones establecidas generó rendimientos químicos bajos, siendo el rendimiento más bajo cuando se utilizó *p*-flúorobenzaldehído (15%) y el más alto cuando se utilizó *p*-formilbenzoato de metilo (47%).

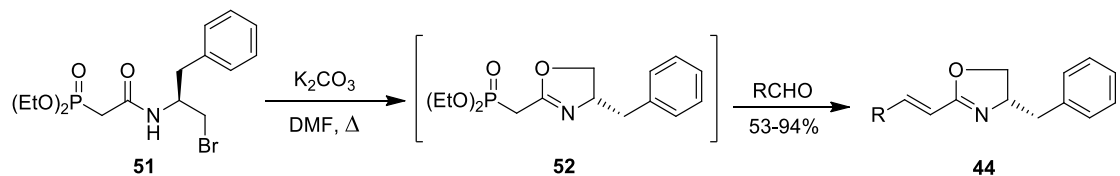
Tabla 26. Preparación de oxazolinas α,β -insaturadas utilizando NaH.

Aldehído	Rendimiento (%)	Aspecto Físico	P. Fusión	Comp.
Benzaldehído	30	Sólido blanco	71-73 °C	44A
<i>p</i> -clorobenzaldehído	32	Sólido blanco	81-83 °C	44B
<i>p</i> -flúorobenzaldehído	15	Sólido blanco	93-95 °C	44C
<i>p</i> -metoxibenzaldehído	34	Sólido amarillo	68-70 °C	44D
2-furaldehído	41	Sólido café	72-74 °C	44H
<i>p</i> -formilbenzoato de metilo	47	Sólido blanco	114-115 °C	44J

5.1.2.14 Síntesis de oxazolinas insaturadas a partir de la fosfobromoamida **51**.

Los bajos rendimientos químicos obtenidos, nos condujo a desarrollar una nueva metodología que nos permitiera obtener mejores resultados. Por lo tanto, se decidió realizar modificaciones a las condiciones de reacción, para lo cual se hizo reaccionar la fosfobromoamida **51** con K_2CO_3 en DMF a reflujo por 2 horas, esperando la formación *in situ* de la fosfo-oxazolina **52**, después de este tiempo se dejó enfriar la reacción y en el mismo matraz se adicionó el aldehído correspondiente, y colocando la mezcla de reacción a reflujo por 2 horas más. Obteniéndose las oxazolinas α,β -insaturadas **44A-D**,

44F, 44H, 44J y 44K con mejores rendimientos químicos en comparación con las metodologías anteriormente descritas (Esquema 19).



Esquema 19. Preparación de fosfo-oxazolinas α,β -insaturadas **44A-D, 44F, 44H, 44J y 44K**.

Como se puede observar en la tabla 27, los mejores rendimientos se obtuvieron cuando se utilizó benzaldehído, *p*-clorobenzaldehído, *p*-flúorobenzaldehído y 2-furaldehído, presentando rendimientos mayores del 90%. Rendimientos moderados fueron obtenidos cuando se utilizó *p*-formilbenzoato de metilo y *p*-bromobenzaldehído (89 y 80%). Finalmente, los más bajos rendimientos se obtuvieron cuando se utilizó *p*-benciloxibenzaldehído y *p*-metoxibenzaldehído (53 y 68%).

Tabla 27. Oxazolinas α,β -insaturadas a partir de la fosfobromoamida **51**.

Aldehído	Rendimiento (%)	Aspecto Físico	P. Fusión	Comp.
benzaldehído	93	Sólido blanco	71-73 °C	44A
<i>p</i> -clorobenzaldehído	94	Sólido blanco	81-83 °C	44B
<i>p</i> -flúorobenzaldehído	93	Sólido blanco	93-95 °C	44C
<i>p</i> -metoxibenzaldehído	68	Sólido amarillo	68-70 °C	44D
<i>p</i> -benciloxibenzaldehído	53	Sólido blanco	141-143 °C	44F
2-Furaldehído	94	Sólido café	72-74 °C	44H
<i>p</i> -formilbenzoato de metilo	89	Sólido blanco	114-115 °C	44J
<i>p</i> -bromobenzaldehído	80	Sólido blanco	98-99 °C	44K

En la figura 11 y 12 se muestran respectivamente la estructura de rayos X y el espectro de RMN ^1H para el compuesto **44B**.

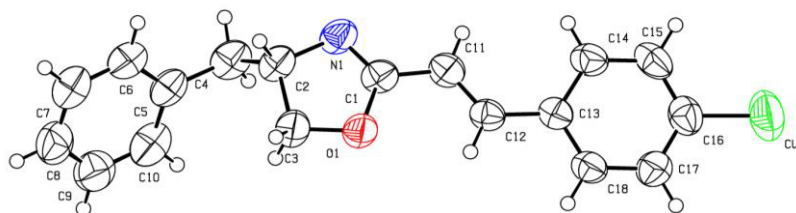


Figura 11. Imagen ORTEP de la estructura de rayos X de la oxazolina **44B**.

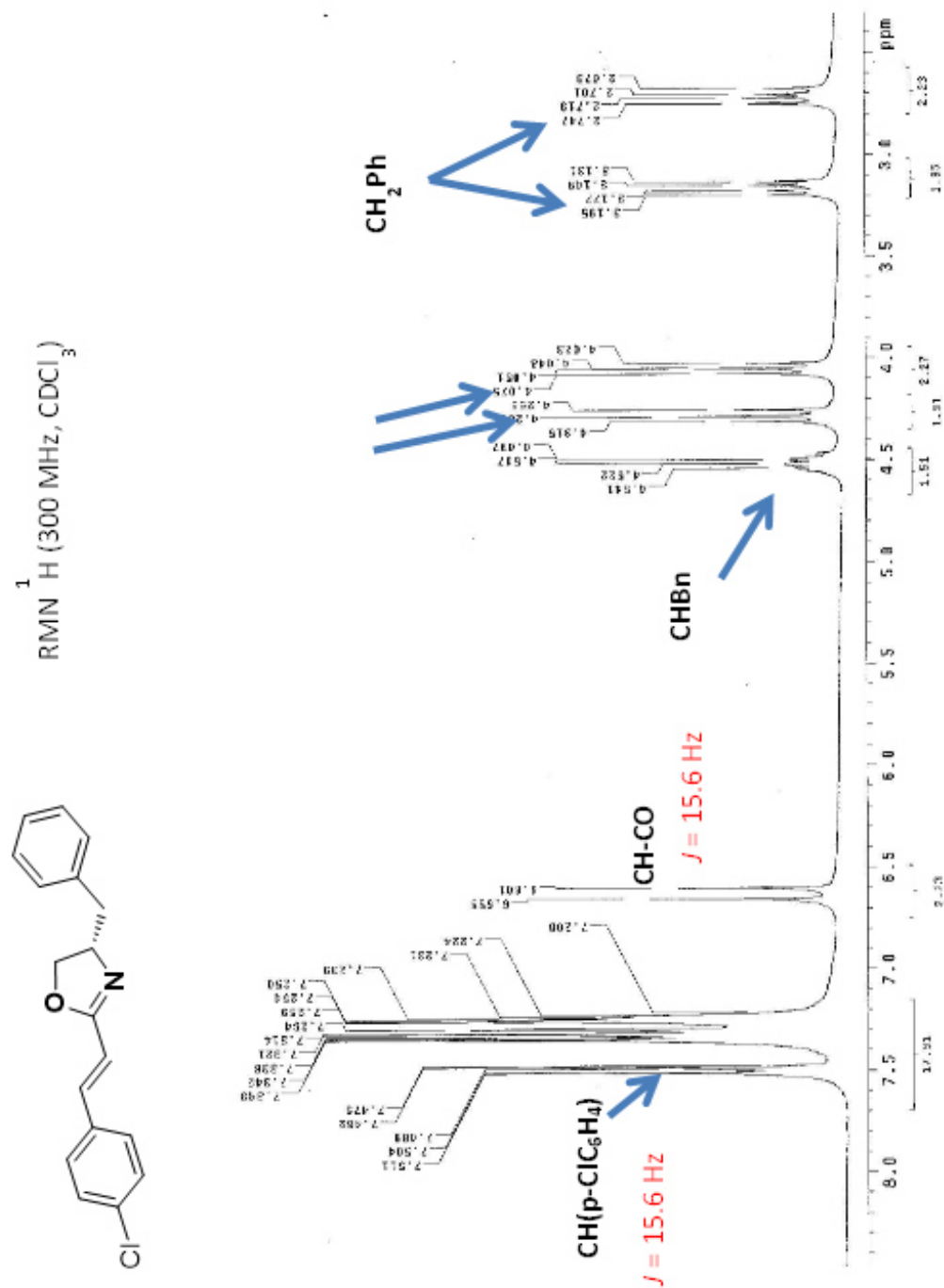


Figura 12. Espectro de RMN de ¹H para la oxazolona α,β -insaturada **44B**.

En el espectro de RMN se logran detectar las señales del par de dobles correspondientes a los protones vinílicos con constantes de acoplamiento $J = 15.6$ Hz que junto con la estructura de rayos X confirma la obtención de las oxazolona α,β -insaturada con geometría *E*.

5.2 Evaluación de la actividad antituberculosa, hepatotóxica y determinación de un posible mecanismo de acción.

5.2.1 Actividad Antituberculosa.

5.2.1.1 Selección de los compuestos a probar.

De los compuestos obtenidos, se seleccionaron 7 oxazolinas α,β -insaturadas **44A-G**, 7 β -hidroxiamidas α,β -insaturadas **45A-G** y cuatro fármacos de referencia isoniazida (**I**), rifampicina (**R**), etambutol (**E**) y ofloxacino (**Ofx**). Cada uno de estos compuestos fueron evaluados a nueve concentraciones diferentes 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 $\mu\text{g/mL}$, con la finalidad de analizar un posible efecto estructural en la actividad antituberculosa (Figura 13).

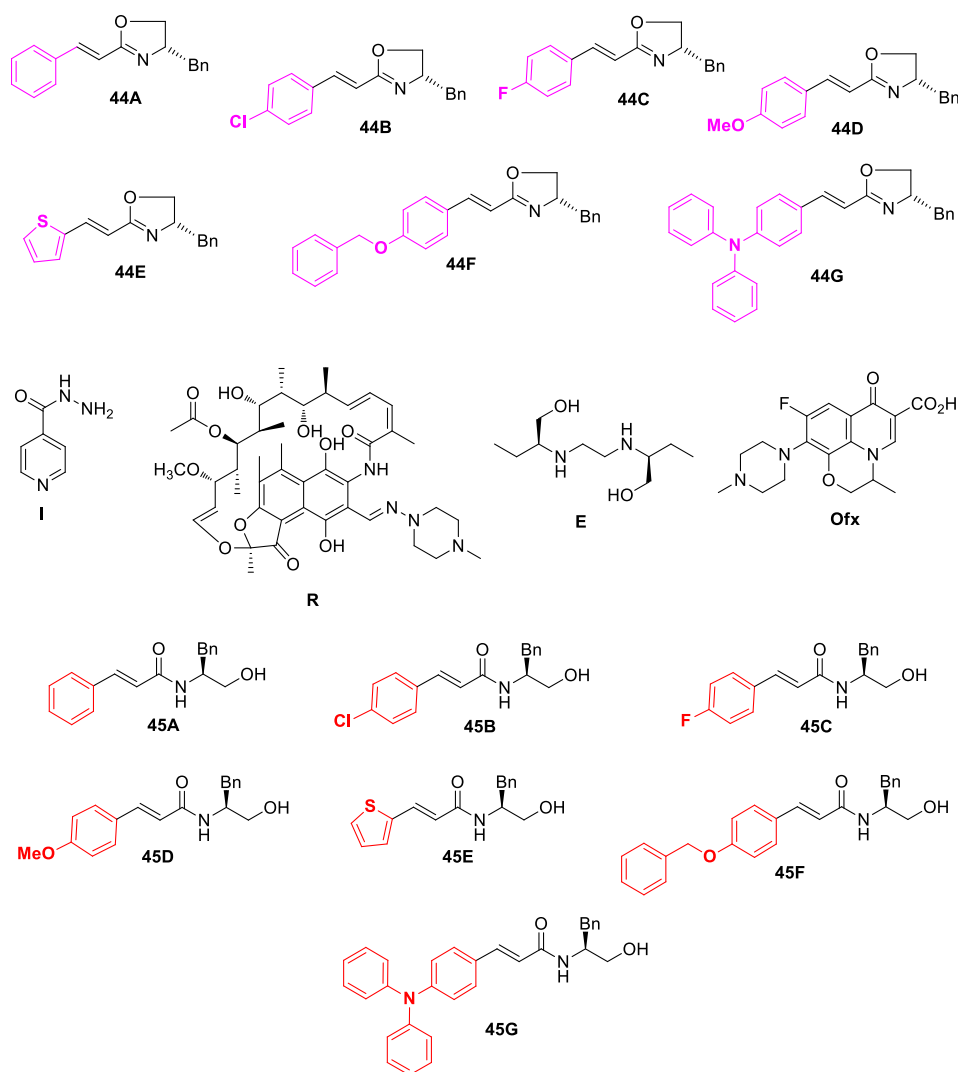
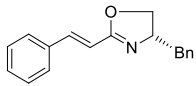
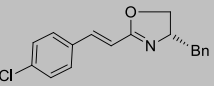
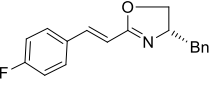
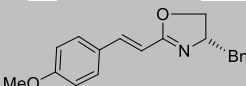
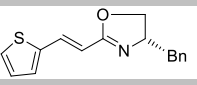
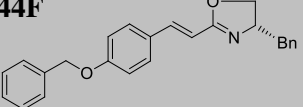
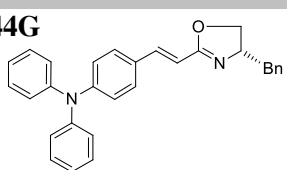
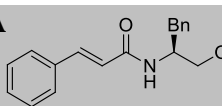
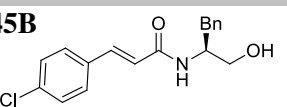
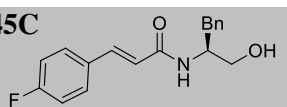
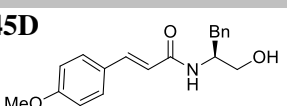
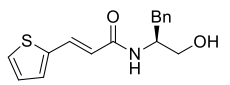
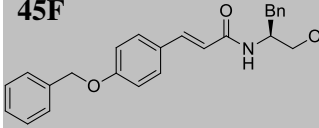
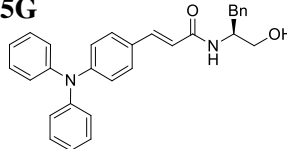
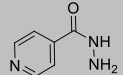
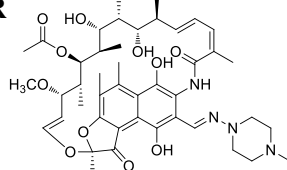
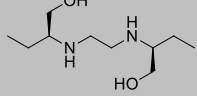
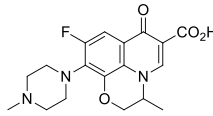


Figura 13. Compuestos seleccionados para evaluar la actividad anti-TB.

Los experimentos fueron realizados por duplicado y cada una de las concentraciones por triplicado, sobre dos cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, una sensible a los fármacos de primera línea (S, I, R, E, Pz) y otra resistente a estos mismos fármacos (farmacorresistente), obteniéndose los siguientes resultados mostrados en la tabla 28.

Tabla 28. Actividad Antituberculosa.

ACTIVIDAD ANTI-TB DE AMIDAS Y OXAZOLINAS α,β -INSATURADAS					
[CMI $\mu\text{g/mL}$ - (μM)]					
Comp.	Estructura	Peso molecular	CLogP	*Cepa Sensible (H37Rv)	**Cepa Resistente (Aislado clínico)
44A		263.33	4.639	16 $\mu\text{g/mL}$ - 60.8 μM	8 $\mu\text{g/mL}$ - (30.4 μM)
44B		297.78	5.352	8 $\mu\text{g/mL}$ - (26.9 μM)	8 $\mu\text{g/mL}$ - (26.9 μM)
44C		281.32	4.782	4 $\mu\text{g/mL}$ - (14.2 μM)	16 $\mu\text{g/mL}$ - (56.9 μM)
44D		293.36	4.558	4 $\mu\text{g/mL}$ - (13.6 μM)	2 $\mu\text{g/mL}$ - (6.8 μM)
44E		269.36	4.285	8 $\mu\text{g/mL}$ - (29.7 μM)	2 $\mu\text{g/mL}$ - (7.4 μM)
44F		369.46	6.326	4 $\mu\text{g/mL}$ - (10.8 μM)	8 $\mu\text{g/mL}$ - (21.6 μM)
44G		430.54	8.232	8 $\mu\text{g/mL}$ - (18.5 μM)	16 $\mu\text{g/mL}$ - (37.1 μM)
45A		281.34	3.071	16 $\mu\text{g/mL}$ - (56.8 μM)	16 $\mu\text{g/mL}$ - (56.8 μM)
45B		315.79	3.784	8 $\mu\text{g/mL}$ - (25.3 μM)	16 $\mu\text{g/mL}$ - (50.6 μM)
45C		299.33	3.214	8 $\mu\text{g/mL}$ - (26.7 μM)	16 $\mu\text{g/mL}$ - (53.4 μM)
45D		311.37	2.99	8 $\mu\text{g/mL}$ - (25.6 μM)	16 $\mu\text{g/mL}$ - (51.3 μM)

Continuación...					
45E		287.37	2.717	16 µg/mL - (55.6 µM)	16 µg/mL - (55.6 µM)
45F		387.47	4.758	16 µg/mL - (41.2 µM)	16 µg/mL - (41.2 µM)
45G		448.55	6.6646	8 µg/mL - (17.8 µM)	8 µg/mL - (17.8 µM)
I		137.14	-0.668	<1 µg/mL - (<7.2 µM)	8 µg/mL - (58.3 µM)
R		820.96		4 µg/mL - (4.8 µM)	16 µg/mL - (19.4 µM)
E		204.31	0.1188	8 µg/mL - (39.1 µM)	>256 µg/mL - (>1,252.9 µM)
Ofx		361.14	-0.507	<1 µg/mL - (<2.7 µM)	2 µg/mL - (5.5 µM)

S= Estreptomina, *I*= isoniácida, *R*= rifampicina, *E*= etambutol, *Pz*= pirazinamida, *Ofx* = ofloxacino
 *Sensible a los fármacos de primera línea (*S*, *I*, *R*, *E*, *Pz*), **Resistente a los fármacos de primera línea (*I*, *R*, *E*)

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que todos los compuestos estudiados, tanto las amidas α,β -insaturadas **45**, así como las oxazolinas **44** presentaron una concentración mínima inhibitoria (CMI), menor o igual a 16 µg/mL, tanto para la cepa sensible como para la resistente.

Es importante destacar que los compuestos **44C**, **44D** y **44F**, presentaron una actividad antituberculosa relevante frente a la cepa sensible a los fármacos de primera línea, mostrando valores de CMI de 4 µg/mL; estos resultados son comparables con la actividad anti-TB de la rifampicina y el etambutol quienes presentan valores de CMI de 4 µg/mL y 8 µg/mL respectivamente bajo nuestras condiciones de estudio.

Por otra parte, para la cepa resistente a SIRE, nuevamente el compuesto **44D**, además del **44E**, presentaron una mejor actividad anti-TB mostrando valores de CMI de 2 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores de CMI representan un área de oportunidad para el diseño y síntesis de nuevos compuestos con características estructurales similares a las descritas en el presente trabajo; además de evaluar su potencial actividad anti-TB principalmente ante una cepa resistente a los fármacos de primera línea.

Con base en estos resultados prometedores, se procedió a realizar la selección de los compuestos con la mejor actividad anti-TB, y llevar a cabo la evaluación de la posible toxicidad de los mismos sobre rebanadas de hígado de rata.

5.2.2 Evaluación de la Actividad Hepatotóxica *Ex-Vivo* sobre rebanadas de tejido.

5.2.2.1 Selección de los compuestos a evaluar.

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad hepatotóxica, se seleccionaron tres oxazolinas α,β -insaturadas **44C-E**, tres β -hidroxiamidas α,β -insaturadas **45C-E**, así como el fármaco de referencia isoniacida **I**, y se establecieron tres concentraciones de prueba 30, 15, 5 $\mu\text{g/mL}$ con la finalidad de realizar un tamizaje amplio del efecto de la concentración (Figura 14).

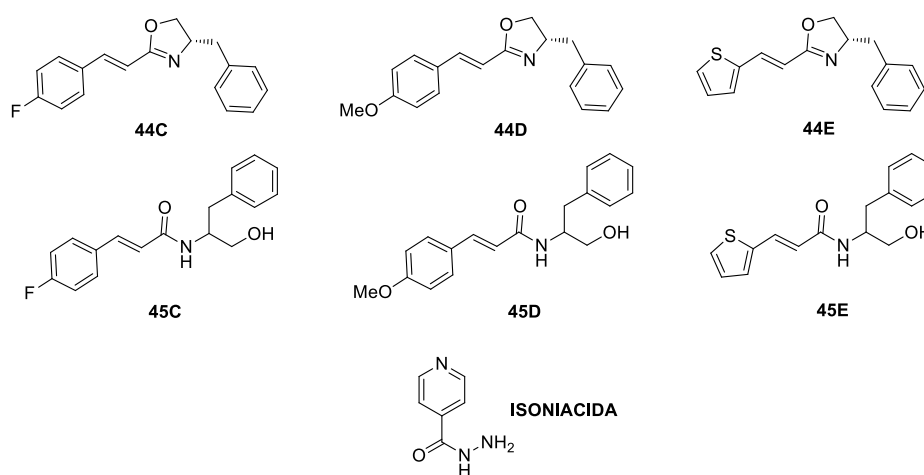


Figura 14. Compuestos seleccionados para evaluar la actividad hepatotóxica.

5.2.2.2 Observaciones histopatológicas del tejido hepático.

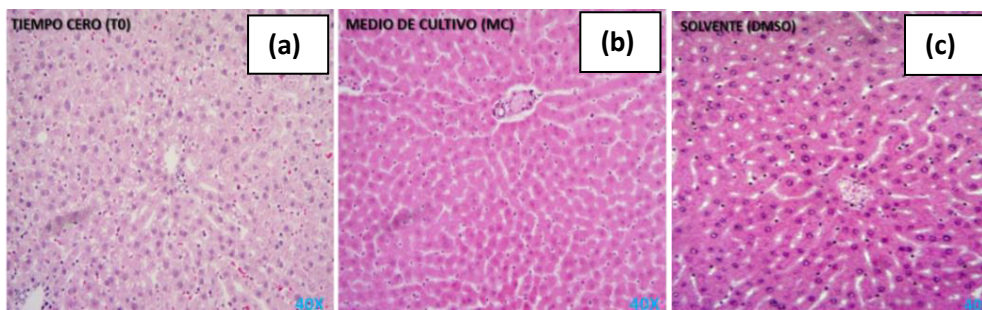


Figura 15. Fotografías de controles a 40X; Tiempo cero (a), Medio de cultivo (b), Disolvente (c).

Como se puede observar en la figura 15, en el caso del tiempo cero (a), se conserva la estructura histológica del hígado normal; sin embargo, se observa la presencia de esteatosis (grasa hepática), siendo normal la presencia de esta proporción en el hígado, no causando problemas para el desarrollo del experimento.

Con respecto al control negativo (b), no se observa daño alguno después de 24 horas, lo que indica que hay una buena conservación del tejido bajo las condiciones de estudio, y finalmente en el control de disolvente (c) de igual manera no se observa la presencia de daño alguno sobre el tejido, trabajando bajo concentraciones seguras de disolvente. Estos resultados permiten asegurar que cualquier posible cambio observado en los tejidos puestos en contacto con los diferentes compuestos, es directamente causado por los compuestos de prueba, y no por artefactos o factores propios del experimento, al menos en el tejido de hígado, bajo las condiciones experimentadas estandarizadas.

En la figura 16 se muestran las imágenes obtenidas de los tratamientos del tejido de hígado con los diferentes compuestos probados, así como las tres concentraciones analizadas.

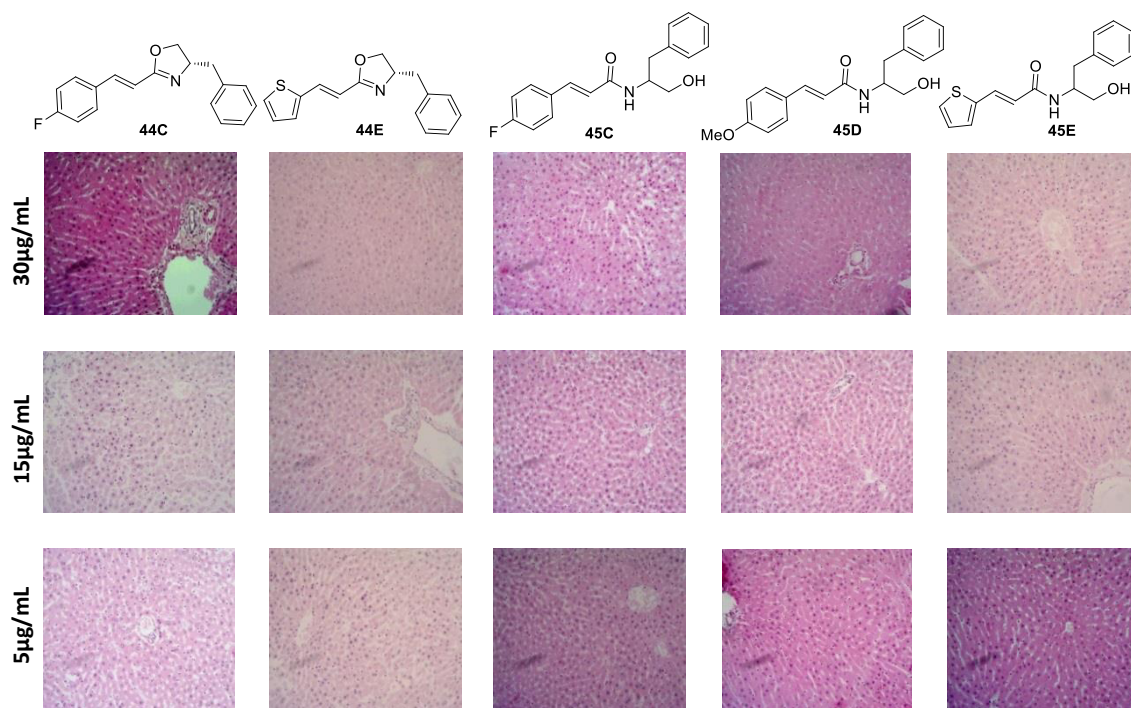


Figura 16. Fotografías a 40X de los compuestos probados sobre hígado.

Como se puede observar en la figura anterior, se muestra que después del tratamiento con los compuestos **44C**, **44E**, **45C**, **45D** y **45E** sobre las rebanadas de hígado durante 24 horas, aún a la concentración más alta (30 µg/mL) analizada, no se presentan daños

notorios en los tejidos, conservando sus estructuras sinusoidales intactas, las triadas portales en buenas condiciones, y en general características estructurales sin cambio en todos los casos estudiados.

De manera particular se muestra lo observado en el compuesto **44D** y el fármaco de referencia (isoniacida).

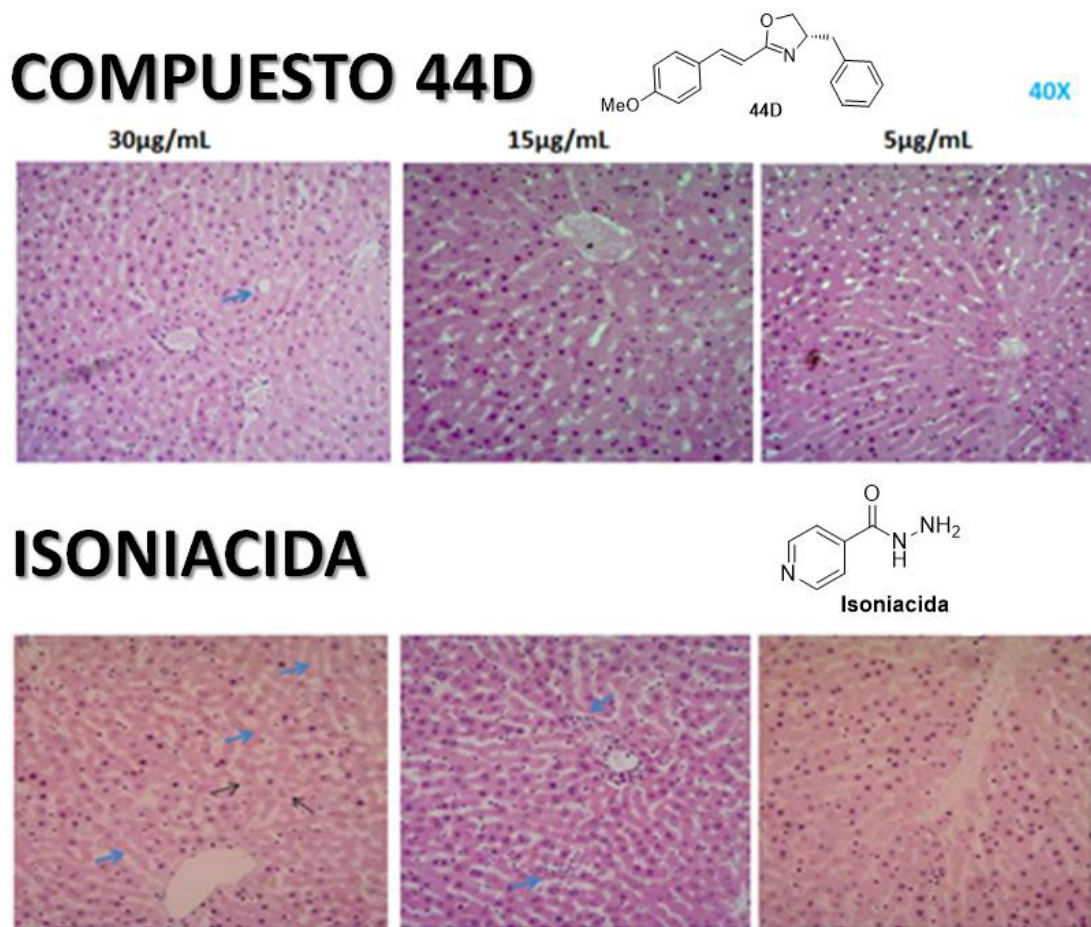


Figura 17. Fotografías a 40X de **44D** e isoniacida sobre rebanadas de hígado.

Con respecto al compuesto **44D**, molécula que presentó la mejor concentración mínima inhibitoria (CMI-2 µg/mL) contra *Mycobacterium tuberculosis*, se puede apreciar que la estructura tisular no muestra daño y que se conservan los sinusoides hepáticos sin alteraciones, así como la estructura celular sin patologías observables (Figura 17).

Nota: La flecha señala una gota de grasa (esteatosis), factor concordante con el tiempo cero y normal en este estudio.

Con respecto a lo obtenido en el tratamiento con el fármaco isoniacida, podemos observar una ligera degradación de la estructura celular, principalmente a la concentración de 15 µg/mL donde se logra apreciar la presencia de focos de inflamación (señalados con flechas), así como a 30 µg/mL donde comienza a presentarse una degeneración balonoide (células más claras), lo que precede al proceso de necrosis tisular.

Estas observaciones concuerdan con lo reportado en otros trabajos, donde se menciona que la isoniacida es causante de daño hepatotóxico directo, observándose en la mayoría de los casos una necrosis centrolobulillar típica debido a la alta actividad enzimática y a los metabolitos secundarios tóxicos generados durante el proceso de metabolización.⁵⁸

Con base en los resultados anteriormente presentados, particularmente el compuesto (*S,E*)-4-bencil-2-(4-metoxistiril)-4,5-dihidrooxazol **44D**, presenta una destacada actividad antituberculosa, mostrando una concentración mínima inhibitoria de 2 µg/mL tanto para la cepa sensible como para la cepa resistente a los fármacos de primera línea, además de mostrar una mínima actividad hepatotóxica bajo las condiciones estudiadas en este trabajo. Debido a esto es que se procedió a determinar el posible mecanismo de acción de esta molécula, mediante la técnica de microarreglo de ADN.

5.2.3 Microarreglo de ADN.

Para llevar a cabo la determinación de un posible mecanismo de acción para el compuesto **44D**, siguiendo los procedimientos descritos en la literatura,^{59,60,61} y a la experiencia adquirida en la etapa de evaluación de la actividad antituberculosa, se determinó utilizar la cepa sensible a los fármacos de primera línea de *M. tuberculosis* (H37Rv), utilizando una concentración de 4 µg/mL del compuesto **44D**, así como un tiempo de contacto de 6 horas.

5.2.3.1 Extracción del ARN total.

Para realizar la lisis bacteriana y la extracción del ARN total, se utilizó el kit RNAeasy Mini Kit de QIAGEN y para verificar la calidad y la cantidad de ARN total obtenido se hizo uso del equipo Nanodrop (Tabla 29), así como un gel de agarosa al 1% (Figura 18), obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 29. ARN total de *M. tuberculosis* H37Rv

EXTRACCIÓN DE ARN total de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv			
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	RELACIÓN 260/280	RELACIÓN 230/260
Experimento 1			
Tratamiento 1 (C/T 1)	103.0 ng/mL	1.87	1.73
Control 1 (S/T 1)	142.2 ng/mL	1.86	1.73
Experimento 2			
Tratamiento 2 (C/T 2)	139.3 ng/mL	1.99	1.05
Control 2 (S/T 2)	309.6 ng/mL	1.97	1.69

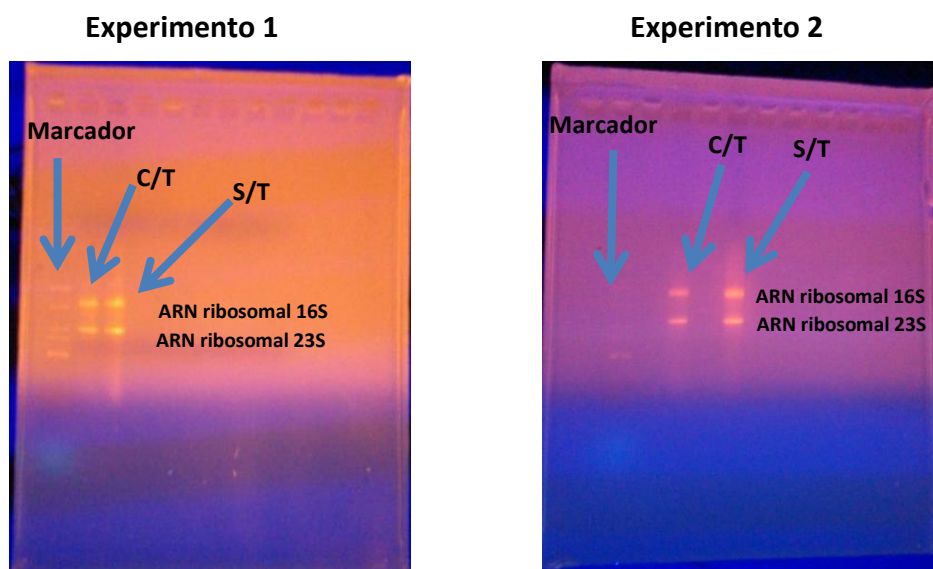


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de ARN total.

De acuerdo a la literatura, para considerar un ARN de buena calidad debe presentar una relación espectrofotométrica 260/280 entre 1.8 y 2.0 así como presentar en gel de agarosa las dos bandas del ARN ribosomal 16S y 23S en una proporción 3:1, estas mismas características presentaron las muestras de ARN obtenidas y por lo tanto se consideraron de buena calidad (Tabla 29, Figura 18).

5.2.3.2 Síntesis ARNa.

Para lograr la síntesis del ARNa, se utilizó el kit MessageAMp™ II-Bacteria Prokaryotic RNA Kit de AMBION (Tabla 30).

Tabla 30. Síntesis de ARNa de *M. tuberculosis* H37Rv.

ARNa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv			
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	RELACIÓN 260/280	RELACIÓN 230/260
Experimento 1			
Tratamiento 1 (C/T 1)	539.5 ng/mL	1.89	1.60
Control 1 (S/T 1)	433.3 ng/mL	1.82	1.52
Experimento 2			
Tratamiento 2 (C/T 2)	404.8 ng/mL	1.83	1.41
Control 2 (S/T 2)	358.8 ng/mL	1.85	1.22
Experimento 3			
Tratamiento 3 (C/T 3)	306.3 ng/mL	1.84	1.39
Control 3 (S/T 3)	336.4 ng/mL	1.89	1.46

5.2.3.3 ARNa etiquetado con las cianinas Cy3 y Cy5.

Teniendo el ARNa amplificado se procedió a etiquetar las muestras con las cianinas Cy3 y Cy5 de GE Healthcare y el kit RNeasy MiniElute Cleanup de QIAGEN (Tabla 31).

Tabla 31. Síntesis de ARNa etiquetado con cianinas.

ARNa etiquetado con cianinas Cy3 y Cy5		
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (pmol/μL)	CONCENTRACIÓN (ng/μL)
Experimento 1		
Tratamiento 1 (C/T 1)	46.8 pmol/ μL	181.8 ng/μL
Control 1 (S/T 1)	37.5 pmol/ μL	169.2 ng/μL
Experimento 2		
Tratamiento 2 (C/T 2)	41.3 pmol/ μL	169.0 ng/μL
Control 2 (S/T 2)	30.0 pmol/ μL	145.4 ng/μL
Experimento 3		
Tratamiento 3 (C/T 3)	25.2 pmol/ μL	155.7 ng/μL
Control 3 (S/T 3)	38.7 pmol/ μL	163.0 ng/μL

5.2.3.4 Proceso de hibridación.

Para el proceso de hibridación se adquirieron 3 microarreglos CAT-30-Array de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* de la marca MYcroarray, hibridando 150 pmol/μL de cada muestra

5.2.3.5 Lectura y cuantificación de los microarreglos.

Teniendo los microarreglos hibridados, limpios y secos, se procedió al escaneo, para lo cual se hizo uso del equipo GenePix 4000B Molecular Devices y el software GenePix Pro 6.0, obteniendo las siguientes imágenes (Figura 19).

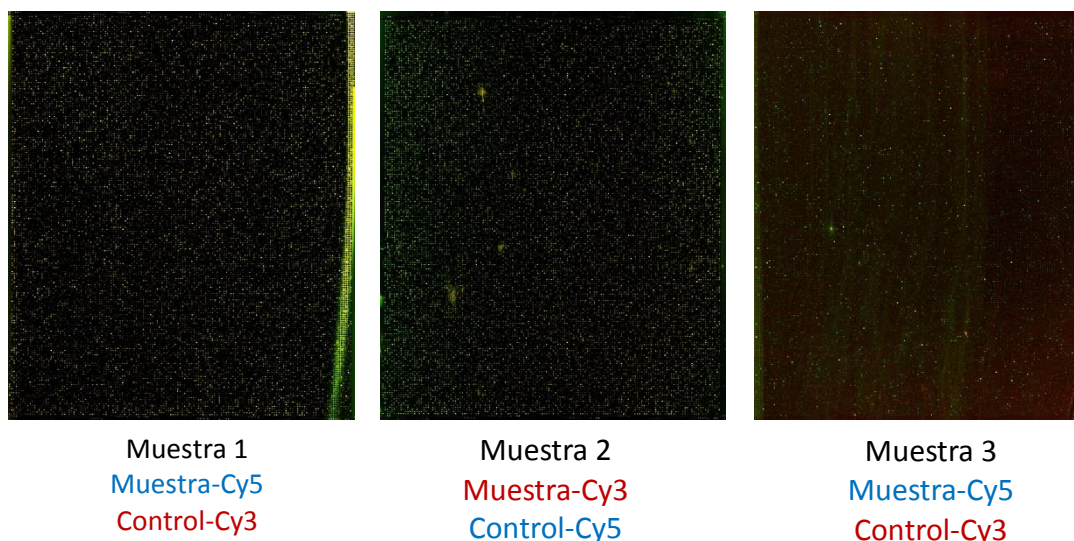


Figura 19. Imagen de los microarreglos para cada una de las 3 muestras analizadas.

En la figura anterior es posible observar las imágenes de los microarreglos hibridados obtenidos con cada una de las muestras estudiadas, marcadas con su respectiva cianina (Cy3 y Cy5).

Como se puede observar, se nota una variedad de tonalidades de color en cada pocillo debido a la relación presentada entre los genes expresados en la condición control y los expresados en la condición de tratamiento. En el caso de la muestra 1 y 3 los pocillos observados de color verde corresponden a los genes expresados por *M. tuberculosis* bajo las condiciones de tratamiento con el compuesto **44D**, mientras que los pocillos observados de color rojo, corresponden a los genes expresados bajo las condiciones control (sin tratamiento); con respecto a la muestra 2, la relación es a la inversa. Por lo tanto se procedió a realizar el análisis estadístico de los datos.

5.2.3.6 Análisis Estadístico.

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GenePix Pro 6.0 dando como resultado la sobreexpresión de 186 genes con una relación tratamiento-control mayor de 0, así como 20 genes reprimidos con relación menor a 0. Considerándose relevantes para el caso de los genes sobreexpresados aquellos valores de relación tratamiento-control mayores a 2.0 mientras que para los reprimidos menores a -1.0.

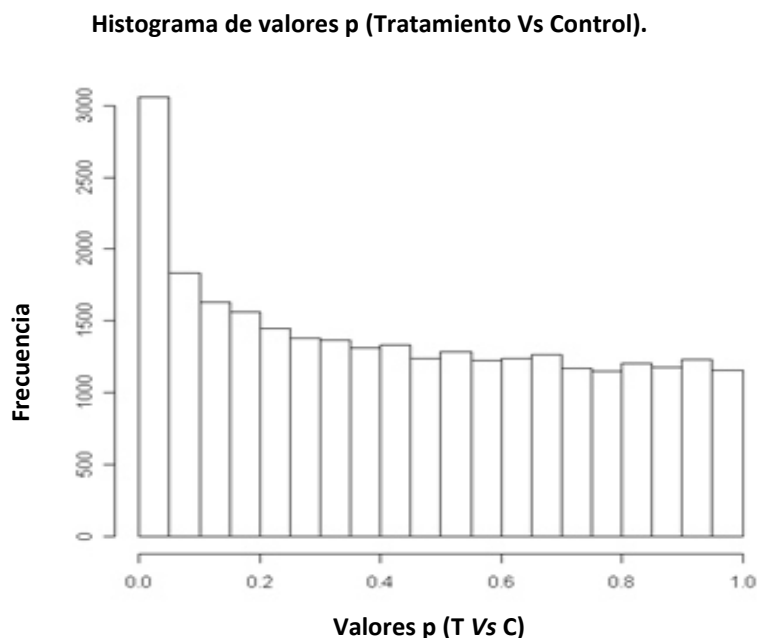


Figura 20. Histograma de la relación de los valores p.

Como se puede observar en la figura 20, se logró obtener una buena relación de los valores p, lo que da indicio de que la técnica realizada resultó satisfactoria para determinar las diferencias de expresión.

Cabe recordar que valores “p” cercanos a 0 representan una diferencia de expresión, mientras que los cercanos 1 no representan diferencia de expresión considerable.

5.2.3.7 Análisis Bioinformático.

Los genes sobreexpresados e inhibidos fueron analizados en la base de datos Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>),⁶² obteniendo de ahí la categoría de funcionalidad, así como su actividad biológica, lo que permitió clasificarlos (Tabla 32 y 33).

Tabla 32. Genes sobreexpresados con valores mayores de Coef. C Vs T de 2.0.

ID	GEN	Coef. C Vs T	Categoría de funcionalidad	Genes restantes
Rv2555c	alaS	3.84269	Vías de información	10
Rv3911	sigM	2.36695	Vías de información	
Rv0312	Rv0312	3.65437	Virulencia, adaptación y detoxificación	8
Rv1102c	mazF3	3.58862	Virulencia, adaptación y detoxificación	
Rv0298	Rv0298	2.2762	Proteína hipotética conservada	35
Rv2478c	Rv2478c	2.99038	Proteína hipotética conservada	
Rv1157c	Rv1157c	3.71753	Proteína hipotética conservada	
Rv3521	Rv3521	2.53473	Proteína hipotética conservada	
Rv3655c	Rv3655c	2.76009	Proteína hipotética conservada	
Rv2619c	Rv2619c	2.80716	Proteína hipotética conservada	
Rv1078	Para	2.72673	Proteína hipotética conservada	
Rv1765c	Rv1765c	2.01332	Proteína hipotética conservada	
Rv0967	CsoR	2.35548	Proteínas regulatorias	10
Rv3583c	Rv3583c	3.28406	Proteínas regulatorias	
Rv0386	Rv0386	2.04598	Proteínas regulatorias	
Rv2610c	PimA	5.69194	Metabolismo de lípidos	9
Rv1665	pks11	2.25897	Metabolismo de lípidos	
Rv1527c	pks5	2.07313	Metabolismo de lípidos	
Rv2503c	ScoB	2.07052	Metabolismo de lípidos	
Rv0247c	Rv0247c	3.5268	Intermediario del metab. y la respiración	31
Rv3206c	moeB1	3.48836	Intermediario del metab. y la respiración	
Rv3602c	PanC	2.1333	Intermediario del metab. y la respiración	
Rv1928c	Rv1928c	2.16954	Intermediario del metab. y la respiración	
Rv3891c	EsxD	5.40017	Procesos celulares y pared celular	44
Rv3064c	Rv3064c	5.26118	Procesos celulares y pared celular	

Continuación...			
Rv1039c	PPE15	5.25683	Procesos celulares y pared celular
Rv3887c	eccD ₂	2.14053	Procesos celulares y pared celular
Rv0917	BetP	2.17252	Procesos celulares y pared celular

Tabla 33. Genes reprimidos con valores menores de Coef. C Vs T de -1.0.

ID	GEN	Coef. C Vs T	Categoría de funcionalidad	Genes restantes
Rv3014c	Liga	-1.13246	Vías de información	1
Rv2513	Rv2513	-1.39025	Proteína hipotética conservada	0
Rv2744c	35kd_ag	-1.28277	Proteína hipotética conservada	
Rv1032c	TrcS	-1.25929	Proteínas regulatorias	0
Rv2648	Rv2648	-1.55578	Inserción de secuencias y fagos	1
Rv3186	Rv3186	-1.3958	Inserción de secuencias y fagos	
Rv2943A	Rv2943A	-1.24231	Inserción de secuencias y fagos	
Rv1415	ribA2	-1.98029	Intermediario del metab. y la respiración	3
Rv1833c	Rv1833c	-1.61593	Intermediario del metab. y la respiración	
Rv0337c	aspC	-1.25583	Intermediario del metab. y la respiración	
Rv1501	Rv1501	-1.16846	Intermediario del metab. y la respiración	

En la tabla 34, se puede observar que la mayoría de los genes sobreexpresados se encuentran clasificados principalmente en tres grupos que son Intermediario del metabolismo y la respiración, Proteína hipotética conservada y Procesos celulares y pared celular, mismos que fueron sometidos a la base de datos en línea DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery),⁶³ buscando alguna relación entre estos.

Tabla 34. Porcentaje de genes sobreexpresados e inhibidos.

Clasificación Funcional	Genes Sobreexpresados	%	Genes Inhibidos	%
Vías de información	12	6.45	2	10
PP/PPE	4	2.15	1	5
Virulencia, adaptación y detoxificación	10	5.37	0	0
Proteína hipotética conservada	43	23.11	2	10
Proteínas regulatorias	13	6.98	1	5
Metabolismo de lípidos	13	6.98	0	0
Inserción de secuencias y fagos	7	3.76	4	20
Intermed. del metab. y la respiración	35	18.81	7	35
Procesos celulares y pared celular	49	26.34	3	15

5.2.3.8 Posible mecanismo de acción.

Con los datos arrojados por la base de datos Tuberculist, se procedió a someter estos mismos a la base de datos DAVID,⁶³ proporcionando información solamente para los genes sobreexpresados.

Cabe señalar que los genes fueron insertados en grupos por función, así como todos juntos, apareciendo como cluster de resultado en la mayoría de los casos unión a ADN como grupo principal, por lo que se decidió analizar este resultado y ver que características arrojaba este cluster.

Se ingresó a la base de datos uniprot (<http://www.uniprot.org/keywords/?query=dna-binding>),⁶⁴ arrojando 3 diferentes grupos de proteínas:

1. Ligando.- Proteínas de unión a ADN.
2. Dominio.- Proteína con secuencia conservada originalmente detectada (Endopeptidasa dependiente de ATP).
3. Proceso Biológico.- Proteína de respuesta a cambios ambientales (transferasas).

Estos 3 datos fueron asociados y se propone que probablemente el efecto del compuesto evaluado **44D** recae sobre proteínas asociadas a nucleoide (NAPs), particularmente HU histona de unión a nucleoide (HU-HNS), ya que se ha reportado que la deficiencia en el funcionamiento de este tipo de proteína, genera la sobreexpresión de genes relacionados con los procesos de adaptación al estrés ambiental, choque osmótico y estrés oxidativo.^{65,66,67}

Dentro de este grupo de genes se sobreexpresan particularmente aquellos involucrados en procesos relacionados con actividad o síntesis de ATP^{68,69} (mgtA-Rv0557, Rv3602, Rv2623, Rv3764, Rv1095), con el objetivo de generar ATP para abastecer los procesos

de respuesta a estrés que son dependientes de ATP. Un ejemplo de esto es el funcionamiento de las ATPasas de la superfamilia AAA⁺, las cuales juegan un papel importante en múltiples actividades celulares,^{70,71} ya que se sabe que son parte de un sistema multichaperona inducida por estrés,⁷² además de ser cruciales en la transformación de la energía química dentro de eventos biológicos.^{73,74,75} Genes relacionados con metabolismo de lípidos^{76,77} (fadA-Rv0859, fadA4-Rv1323, fadD3-Rv3561, fadE2-Rv0154, fadE3-Rv0215c), como respuesta a la necesidad de generación de ATP como se mencionó anteriormente y esto principalmente vía β -oxidación. Así como genes del regulon RpoS⁷⁸⁻⁸¹ que comprende proteínas translocadoras (EsxD-Rv3891c, EsxF-Rv3905c, eccD2-Rv3887c, ftsY-Rv2921c, OMP-Rv1698, drrC-Rv2938, mmpL11-Rv0202), buscando la translocación de proteínas de respuesta a estrés a agentes productores de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, así como la extracción de agentes tóxicos.

Como ya se mencionó anteriormente, la proteína HU-HNS se sobreexpresa en procesos de estrés, con el objetivo de asegurar la estabilidad del genoma mediante el condensamiento del ADN y proteínas y por ende la adaptación de *M. tuberculosis* a la persistencia, latencia y tolerancia a cambios provocados por agentes exógenos.⁶⁵ En *E.coli* y *Salmonella* se ha estudiado la interacción de la proteína HU con el ADN, demostrándose la importancia de esta interacción, observando que alguna mutación en HU genera grandes problemas en el crecimiento bacteriano⁶⁵⁻⁶⁷ al grado de que en *Bacillus subtilis* resulta letal.⁶⁶

La importancia de la unión de HU y ADN es debido a que atrapa a la ARN polimerasa permitiendo el inicio de la transcripción y por ende si se ve modificada esta interacción es concebible que se pueda reprimir la transcripción, con todos los efectos celulares que esto implica. En base a lo anterior Bhowmick y col.⁶⁶ estudiaron agentes inhibidores de esta interacción HU-ADN derivados de estilbeno (Figura 21), ácido (4, 4-[(*E*)-eteno-1,2-diilbis({5[(fenilcarbonil)amino]benceno-2,1-diil} sulfonilimino)] dibenzóico y su derivado metoxilado, ácido 4,4-[1,2-eteno-diilbis({5-[(4-metoxibenzoil)amino]2,1-fenileno} sulfonilimino)]dibenzóico, los cuales presentan actividad inhibitoria de esta interacción, uniéndose selectivamente a HU.

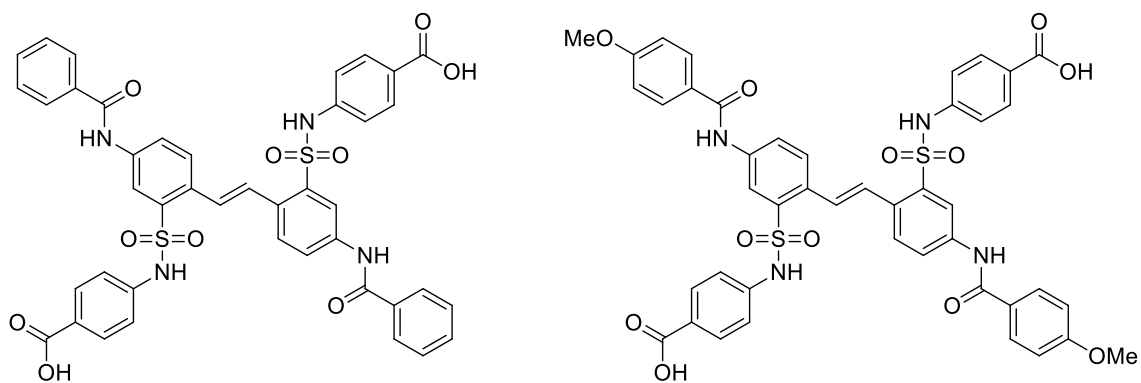


Figura 21. Inhibidores de HU-ADN derivados de estilbeno.

Se observó que este tipo de moléculas presentan interacción selectiva con residuos de aminoácidos de la superficie de unión proteína-ADN, la cual se compone principalmente de aminoácidos de carga positiva (Lisina 3, Arginina 53, 55, 58, 61, 64, 80 y Lisina 86) de manera similar como lo hiciera con los grupos fosfatos del ADN como se observa en la figura 22.

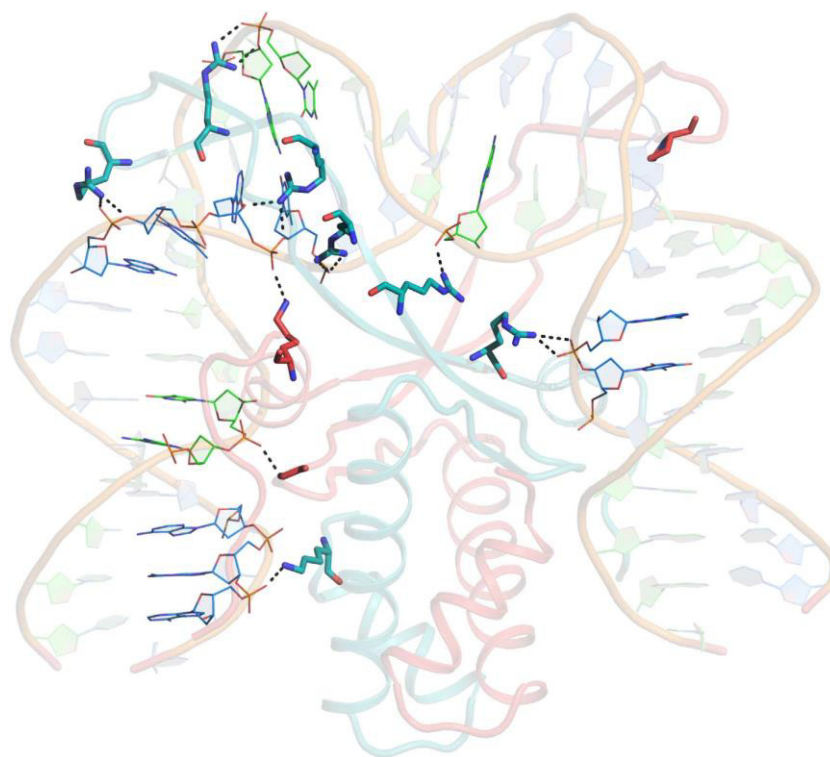


Figura 22. Interacción de HU-ADN.

En el caso de los derivados de estilbeno, se presenta interacción con los residuos Arginina 55, 58, 80 y Lisina 86 mediante puentes de hidrógeno generados entre los grupos amino de la arginina y lisina de la HU y los oxígenos de los grupos carboxilo y sulfonamida.

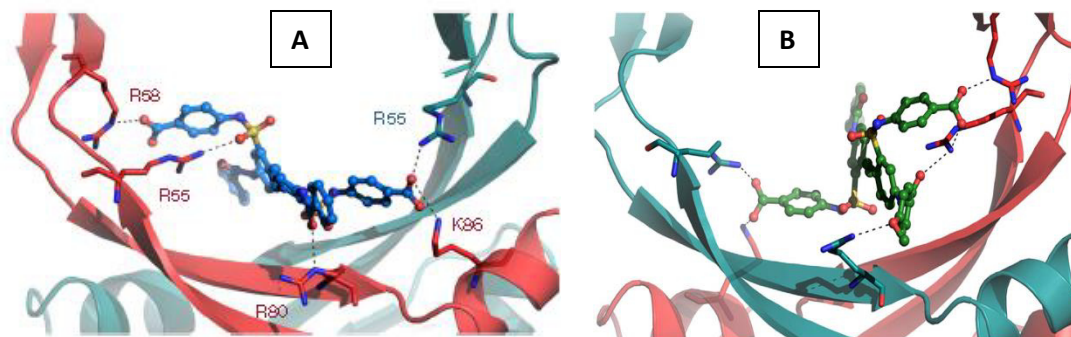


Figura 23. Representación de las interacciones entre HU y derivados de estilbeno.

Los autores reportaron que en el caso del derivado metoxilado (B) genera una interacción extra comparado con el compuesto no metoxilado (Figura 23), lo que proporciona una mejor selectividad e incrementa la actividad inhibitoria.

Con todo lo anteriormente reportado, los perfiles de expresión encontrados y con base en las características fisicoquímicas del compuesto evaluado **44D** (Figura 24), se propone que posiblemente el compuesto presenta actividad ante la proteína HU de *Mycobacterium tuberculosis*, ya que teóricamente es posible formar puentes de hidrógeno entre los grupos amino de la arginina y la lisina de HU con los heteroátomos de la oxazolina así como con el grupo metoxilo, lo cual podría ser sustentado al realizar un estudio de docking (técnica no contemplada en el presente trabajo de investigación).

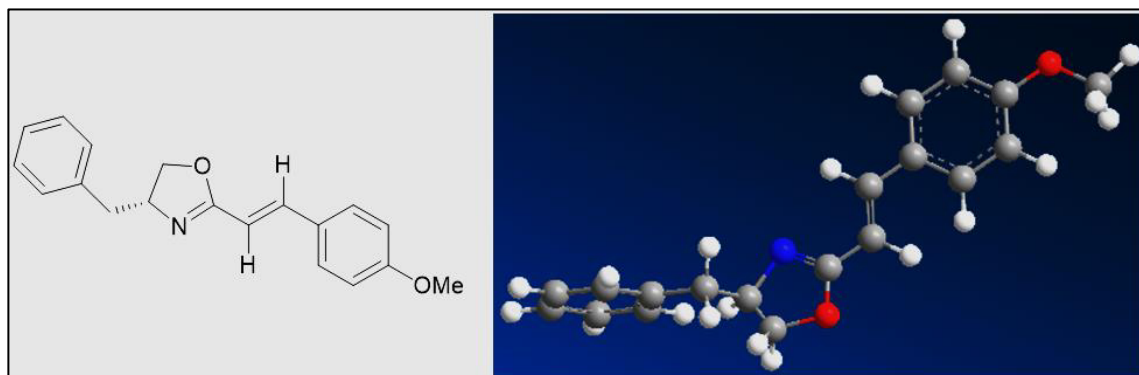


Figura 24. Oxazolona 44D.

Estas interacciones nos generarían una inhibición competitiva y selectiva sobre este tipo de enzimas lo cual sería de suma importancia, debido a lo poco explorado de estos receptores, lo que abre un nuevo campo de investigación para la generación de moléculas dirigidas a este sitio blanco.

Con todo lo anteriormente planteado nos podemos dar cuenta que si se ven afectadas las funciones de este tipo de proteínas, llevará a un desequilibrio homeostático de la célula, que repercutirá a todos niveles de actividad celular, desde los mecanismos de transcripción, hasta la biosíntesis de biomoléculas (L-alanil-tRNA (Rv2555c), L-glicin-tRNA (Rv2357c) (Rv1665, Rv0247c, Rv0917).

Por ello se propone como sitio blanco la proteína HU-HNS, probablemente afectando el proceso de iniciación de la transcripción, llevando al desequilibrio energético celular, estrés oxidativo y por ende a la muerte de *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 25), quedando a reserva de una confirmación de la expresión genética por PCR en tiempo real con la que se puede confirmar el perfil de expresión, así como el docking y otros estudios más específicos.

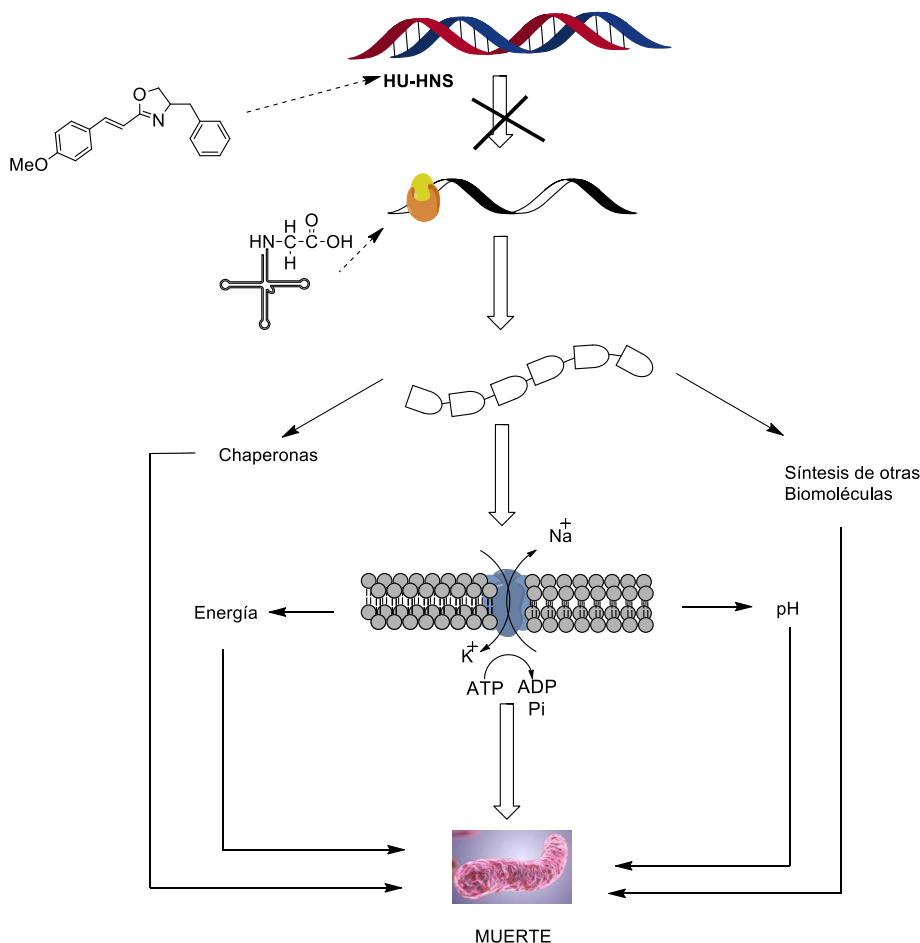


Figura 25. Posible mecanismo de acción del compuesto 44D.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES

1.- Se diseñaron 2 metodologías de síntesis para la obtención de oxazolininas α,β -insaturadas, la primera partiendo de la (*S*)-fenilalanina y cloruro de bromoacetilo, involucrando 6 pasos de reacción y la segunda utilizando nuevamente la (*S*)-fenilalanina y el trietilfosfonoacetato, involucrando 5 pasos de reacción, logrando obtener con éxito en ambos casos las moléculas objetivo.

2.- Se lograron sintetizar 8 amidas α,β -insaturadas así como 10 oxazolininas α,β -insaturadas de manera satisfactoria.

3.- La segunda ruta sintética propuesta resultó ser la más rentable, ya que involucró un paso de reacción menos que la inicialmente propuesta, además de obtener mejores rendimientos químicos.

Ruta 1: Rendimientos moderados (30-64 %).

Ruta 2: Rendimientos de moderados a buenos (53-94 %).

4.- Se logró realizar en un sólo paso de reacción la preparación de oxazolininas α,β -insaturadas, la cual involucró una reacción de *O*-alquilación y una HWE, a partir de la fosfobromoamida, sin la necesidad de aislamiento y purificación del intermediario (fosfo-oxazolinina), resultando en un rápido y eficiente proceso.

5.- De acuerdo a los resultados obtenidos, es mejor realizar una reacción del tipo Wittig-Horner sobre una fosfonoamida (rendimientos 47-98 %) que sobre una fosfo-oxazolinina (rendimientos 15-47 %).

6.- Se probaron 14 compuestos sintetizados (7 amidas α,β -insaturadas y 7 oxazolininas α,β -insaturadas, así como la isoniacida, rifampicina, etambutol y ofloxacino ante dos cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, una sensible a los fármacos de primera línea (H37Rv-SIRE) y un aislado clínico resistente a los mismos, observándose CMI ($\mu\text{g/mL}$) ≤ 16 en todos los casos.

7.- Ante la **cepa sensible** a los fármacos de primera línea los compuestos que resultaron con mejor actividad anti-Tb, fueron los nombrados como **44C**, **44D** y **44F**, mostrando una CMI de $4 \mu\text{g/mL}$, valor comparable con lo obtenido por la rifampicina ($4 \mu\text{g/mL}$) y el etambutol ($8 \mu\text{g/mL}$).

8.- Ante la **cepa resistente** a los fármacos de primera línea los compuestos **44D** y **44E**, presentaron una CMI de 2 µg/mL, actividad mejor que el mostrado por los fármacos de primera línea e igual al observado por el ofloxacino, fármaco de segunda línea.

9.- Los compuestos **44D** y **44E**, son moléculas prometedoras debido a su alta actividad antituberculosa ante cepas resistentes a fármacos de primera línea.

10.- Las condiciones de estudio estandarizadas en la técnica de evaluación hepatotóxica *ex-vivo* resultaron adecuadas para el análisis de daño hepático.

11.- De los 6 compuestos probados, en ningún caso se observó daño hepatotóxico adjudicable a las moléculas de prueba a las 3 concentraciones estudiadas, por lo que podemos decir que este tipo de moléculas, oxazolininas α,β -insaturadas y amidas α,β -insaturadas resultan seguras para el tejido hepático.

12.- El fármaco isoniacida es capaz de causar daño hepatotóxico a concentraciones mayores de 15 µg/mL, generando procesos de inflamación así como degradación estructural y balonoide; observaciones que están de acuerdo con la literatura.

13.- El compuesto **44D** probablemente presenta un efecto sobre la proteína HU-HNS (HU histona de unión a nucleóide), repercutiendo en la inhibición de la transcripción y por ende en la síntesis de proteínas en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

ANEXO 1. DIVULGACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Publicaciones:

Eugenio Hernández-Fernández, Pedro P. Sánchez-Lara, Mario Ordóñez, Oscar Abelardo Ramírez-Marroquín, **Francisco G. Avalos-Alanís**, Susana López-Cortina, Víctor M. Jiménez-Pérez, Tannya R. Ibarra-Rivera. Synthesis of β -hydroxyacetamides from unactivated ethyl acetates under base-free conditions and microwave irradiation. *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, 26, 73-78.

Francisco G. Avalos-Alanís, Eugenio Hernández-Fernández, Rocio Hernández-Romero, Susana López-Cortina, Mario Ordóñez, Oscar García-Barradas, Selene Lagunas-Rivera. Practical and efficient synthesis of chiral 2,4-disubstituted oxazolines from β -phosphonoamides. *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, 25, 156-162.

Congresos:

Francisco G. Avalos Alanís, Mario Ordóñez Palacios, Oscar García Barradas, Pilar Carranza Rosales, Eugenio Hernández Fernández. Síntesis de amidas y oxazolinas α,β -insaturadas: evaluación de la actividad antituberculosa bajo la técnica de Azul Alamar. **10ma. Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica**, San Luis Potosí, México. 8-9 de Mayo de **2014 (Presentación Cartel)**.

Francisco Guadalupe Avalos Alanís, Ma. del Rocío Hernández Romero, Mario Ordóñez Palacios, Oscar García Barradas, Eugenio Hernández Fernández. Optimización de la ruta sintética para la obtención de oxazolinas quirales α,β -insaturadas a partir de una β -hidroxiamida. **II Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde**, Monterrey, N. L., 25-27 de Septiembre de **2013 (Presentación Cartel)**.

Francisco Guadalupe Avalos Alanís, Ma. Del Rocio Hernández Romero, Ruth Hernández Pérez, Mario Ordóñez Palacios, Oscar García Barradas, Susana López Cortina y Eugenio Hernández Fernández. Optimización de la ruta sintética, para la obtención de oxazolinas α,β -insaturadas a partir de fosfonoamidas quirales. **9a Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica**. Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana. 25 y 26 de abril de **2013**, Boca del Rio, Veracruz (**Presentación Cartel**).

Francisco Guadalupe Avalos Alanís, Mario Ordóñez Palacios, Oscar García Barradas, Eugenio Hernández Fernández. Optimización de la ruta sintética, para la obtención de fosfo-oxazolinias quirales a partir de aminoácidos. **Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde**. Monterrey, Nuevo León. Octubre 24 al 26 de **2012 (Presentación Oral)**.

Francisco Guadalupe Avalos Alanís, Yessica Samani Paredes Pérez, Pilar Carranza Rosales, Mario Ordóñez Palacios, Oscar García Barradas y Eugenio Hernández Fernández. Preparación de amidas α,β -insaturadas: evaluación de la actividad citotóxica *in vitro*. **8a Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica**. Puebla, Puebla. Marzo 22 y 23 de **2012 (Presentación Cartel)**.

ANEXO 2. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Francisco Guadalupe Avalos Alanís

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

Síntesis y caracterización de nuevas amidas y oxazolininas α,β -insaturadas: determinación de su actividad antituberculosa *in vitro* y posible mecanismo de acción del compuesto más activo.

27 años

Campo de estudio: Área de la Salud

Biografía

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México el 21 de Febrero de 1987, hijo de Francisco Avalos Silva y Enedelia Alanís Cruz

Educación

Egresado de la Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Ciencias

Químicas-UANL 2008.

Egresado de la Maestría con Orientación en Farmacia del Posgrado en Ciencias de la Facultad

de Ciencias Químicas-UANL 2011.

REFERENCIAS

- 1.- Global tuberculosis report **2013**, World Health Organization. ISBN 9789241564656
- 2.- Mendoza, A.; Gotuzzo, E. *Acta Med. Per.* **2008**, *25*, 236-246.
- 3.- Lucarelli, A.; Buroni, S.; Pasca, M.; Rizzi, M.; Cavagnino, A.; Valentini, G.; Riccardi, G.; Chiarelli, L. *PLoS ONE*. **2010**, *5*, 11, 15494.
- 4.- Moraski, G.; Markley, L.; Mayland, Ch.; Sanghyun Ch.; Franzblau, S.; Hwang, Ch.; Boshoff, H.; Miller, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 7, 2214-2220.
- 5.- Gutiérrez-Lugo, Ma.; Bewley, C. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 2606–2612.
- 6.- Plataforma Única de Información/SUIVE./Secretaría de Salud. SIS/DGIS/ Secretaría de Salud
- 7.- Lineamientos para la implementación del control de infecciones de tuberculosis en las américas, Organización Panamericana de la Salud. **2014**, World Health Organization. ISBN 978-92-75-31830-0
- 8.- Johnson, R.; Streicher, E.; Louw, G.; Warren, R.; Helden, P.; and Thomas, C. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2006**, *8*, 97–112.
- 9.-Ma, Z.; Lienhardt, Ch.; McIlleron, H.; Nunn, A.; Wang, X. **2010**, *375*, 2100-2109.
- 10.- Chhabria, M.; Jani, M.; Patel, S. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 401-430.
- 11.- Xian, M.; Sodnomtseren, P.; Chang-qi, HU. *Nal. Prod. Res. Dev.* **2008**, *20*, 647-649.
- 12.- Scott, I.; Puniani, E.; Jensen, H.; Livesey, J.; Poveda, L.; Sanchezvindas, P.; Durst, T.; Arson, J. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1907–1913.
- 13.- Faizi, S.; Farooqi, F.; Rehman, S.; Naz, A.; Noor, F.; Ansari, F.; Ahmad, A.; Khan, S. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 998–1004.
- 14.- Djurendić, E.; Dojčinović, S.; Sakač, M.; Ajduković, J.; Gaković, A.; Kojić V.; Bogdanović, G.; Klisurić, O.; Penov, K. *ARKIVOC*. **2011**, *ii*, 83-102.
- 15.- Young, D.; Kasmar, A.; Moraski, G.; et al. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 37, 25087-25096.
- 16.- Hauck, D.; Joachim, I.; Frommeyer, B.; Varrot, A.; Philipp, B.; Möller, H.; Imberty, A.; Exner, T.; Titz, A. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1775–178.

- 17.- Pacher, T.; Raninger, A.; Lorbeer, E.; Brecker, L.; Pui-Hay, P.; Greger, H. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1389–1393.
- 18.- Poss, G.; Carson, J.; McGowin, J.; et. al. **1963**, *6*, 266-272.
- 19.- Díaz, M.; Pérez, H. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* **2005**, *36*.
- 20.- Lullman, H.; Mohr, K.; Hein, L.; Bieger, D. *Color Atlas of Pharmacology.* 3a Ed.; Thieme, **2005**, ISBN 3-13-781703-X.
- 21.- Cairns, D. *Essentials of Pharmaceutical Chemistry.* 3a Ed.; Pharmaceutical Press, **2008**, ISBN 978-085369745-9.
- 22.- Concellon, J.; Bardales, E. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9492-9495.
- 23.- Concellon, J.; Solla, H.; Concellon, C.; Simal, C.; Alvaredo, N. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3451–3453.
- 24.- Concellon, J.; Solla, H.; Díaz, P. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7974-7979.
- 25.- Arutyunyan, A.; Melik-Ogadzanyan, R.; Sarkisyan, T.; Alaverdonva, L.; Papoyan, S.; Ter-Zakharyan, Z.; Paronikyan, G.; Sarkisyan, T.; ITOkh, Y. *Khim. Farm. Zh.* **1989**, *23*, 10, 1223-6.
- 26.- Nesterenko, V.; Putt, K.; Hergenrother, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14672-14673.
- 27.- Hernández, E.; Fernández, M.; García O.; Muñoz, O.; Ordoñez, M. *Synlett*, **2006**, *3*, 0440-0444.
- 28.- Ordóñez, M.; Hernández, E.; Montiel, M.; Bautista, R.; Bustos, P.; Rojas, H.; Fernández, M.; García O. *Tetrahedron-Asymmetry.* **2007**, *18*, 2427–2436.
- 29.- Artículo de Revisión sobre la reacción HWE, ver: (a) Maryanoff, B.; Reitz, B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863–927.; (b) Kelly, S. *Comp. Org. Syn.* Trost, B.; Fleming, I.; Eds., Pergamon Press: Oxford, **1991**, *1*, 755. (c) Boutagy, J.; Thomas, R. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 87–99. (d) Pedersen, T.; Hansen, E.; Kane, J.; Rein, T.; Helquist, P.; Norrby, P.; Tanner, D.; *Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9738–9742. (e) Ando, K.; Oishi, T.; Hiramama, M.; Ohno, H.; Ibuka, T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4745–4749. (f) Ando, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6815–6821. (g) Brandt, P.; Norrby, P.; Martin, I.; Rein, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1280–1289.

- 30.-** Para ver la versión asimétrica de la reacción HWE ver: (a) Rein, T.; Pedersen, T. *Synthesis*. **2002**, 579–594. (b) Pedersen, T.; Jensen, J.; Humble, R.; Rein, T.; Tanner, D.; Bodmann, K.; Reiser, O. *Org. Lett.* **2000**, 2, 535–538. (c) Rein, T.; Reiser, O. *Acta Chem. Scand.* **1996**, 50, 369–379.
- 31.-** Wuts, P.; Northuis, J.; Kwan, T. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 9223-9225.
- 32.-** Emery, F.; Silva, R.; De Moura, K.; Pinto, M.; Amorim, M.; Malta, V.; Santos, R.; Honorio, K.; Da Silva, A.; Pinto, A. *An Acad Bras Cienc.* **2007**, 79, 1.
- 33.-** Takahashi, S.; Togo, H. *Synthesis*. **2009**, 14, 2329–2332.
- 34.-** Kamata, K.; Agata, A. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3113-3116.
- 35.-** Kristian, K.; Lobert, M.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. *J. Comb. Chem.* **2009**, 11, 274–280.
- 36.-** Terán, A.; Pina, G.; Muñiz, R.; Equihua, C.; Gómez, J.; Urías, C. Síntesis stereoselectiva de nuevos compuestos tipo 2-oxazolina enantiopuros a partir de α -dibencilamino ésteres quirales. *Avances de proyecto CONACYT Clave del proyecto: ITTIJ-PTC-001*.
- 37.-** Katritzky, A.; Cai, Ch.; Suzuki, K.; Singh, S. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 811-814.
- 38.-** Ohshima, T.; Iwasaki, T.; Mashima, K.; *Chem. Commun.* **2006**, 2711–2713.
- 39.-** Fan, L.; Lobkovsky, E.; Ganem, B. *Org. Lett.* **2007**, 9, 10, 2015-2017.
- 40.-** Boissarie, P.; Hamilton, Z.; Lang, S.; Murphy, J.; Suckling, C. *Org. Lett.* **2011**, 13, 23, 6256–6259.
- 41.-** Avalos, F.; Hernández, E.; Hernández, R.; López, S.; Ordoñez, M.; García, O.; Lagunas, S. *Tetrahedron-Asymmetry*. **2014**, 25, 156–162.
- 42.-** Matnaghani, M.; Atid, M.; Ghasemi, F. *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, 7, 4, 972-977.
- 43.-** Phillips, A.; Uto, Y.; Wipf, P.; Reno, M.; Williams, D. *Org. Lett.* **2000**, 2, 8, 1165-1168.
- 44.-** Pouliot, M.; Angers, L.; Hamel, J.; Paquin, J. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 4121–4123.
- 45.-** Hajra, S.; Bar, S.; Sinha, D.; Maji, B. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4320–4322.
- 46.-** Ochiai, M.; Kitagawa, Y. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 3181-3189.

- 47.- Koci, J.; Klimesova, V.; Waisser, K.; Kaustova, J.; Dahse, H.; Mollmann, U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3275–3278.
- 48.- Eswaran, S.; Adhikari, AV.; Kumar R. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3, 957-66.
- 49.- Moraski, G.; Mayland, Ch.; Estrada, A.; Franzblau, S.; Mo'llmann, U.; Miller, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5, 1703-16.
- 50.- Collins, L.; Franzblau, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *5*, 41, 1004–1009.
- 51.- Molina, D. Métodos rápidos para la detección de Resistencia en *Mycobacterium Tuberculosis*. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias de la salud, Instituto de medicina tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba, **2007**.
- 52.- Franzblau, S.; et al. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 362-366.
- 53.- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- 54.- Moronvalle, M.; Sacre, B.; V., Labbe, G.; Gautier, J. *Toxicology.* **2005**, *207*, 203–214.
- 55.- Ramírez, J.; Chávez, L.; Santillán, J.; Guzmán, S. *Mensaje Bioquímico.* **2003**, *XXVII*.
- 56.- Brown, P.; Botstein, D. *Nat. Genet. Supplement.* **1999**, *21*, 33-37.
- 57.- Galbraith, D. International Microarray Workshop **2010**, University of Arizona.
- 58.- Porth, Fisiopatología, Salud-Enfermedad; un enfoque conceptual, 7a Ed., **2006**; pp. 926, ISBN 9788479039325
- 59.- Hughes, M.; Silva, J.; Geromanos, S.; Townsend, C.; *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 54-63.
- 60.- Fisher, M.; Plikaytis, B.; Shinnick, T. *J. Bacteriol.* *184*, **2002**, 14, 4025–4032.
- 61.- Sullivan, T.; Truglio, J.; Boyne, M.; Novichenok, P.; Zhang, X.; Stratton, Ch.; Li, H.; Kaur, T.; Amin, A.; Johnson, F.; Slayden, R.; Kisker, C.; Tonge, P. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 1, 43-53.
- 62.- TubercuList. <http://tuberculist.epfl.ch/> (Accesado 23/ septiembre/ 2014)

- 63.-** David Bioinformatics Resources 6.7. david.abcc.ncifcrf.gov/ (Accesado 23/ septiembre/ 2014)
- 64.-** Uniprot. <http://www.uniprot.org/keywords/?query=dna-binding> (Accesado 23/ septiembre/ 2014)
- 65.-** Mangan, M.; Lucchini, S.; O' Cro' ini'n, T.; Fitzgerald, S.; Hinton, J.; Dorman, Ch. *Microbiology* **2011**, *157*, 1075–1087.
- 66.-** Bhowmick, T.; Ghosh, S.; Dixit, K.; Ganesan, V.; Ramagopal, U.; Dey, D.; Sarma, S.; Ramakumar, S.; Nagaraja, V. *Nature Communication*. **2014**, *5*, 4124, 1-13.
- 67.-** Sharadamma, N.; Harshavardhana, Y.; ingh, P.; Muniyappa, K. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 11, 3555–3569.
- 68.-** Mishra, A.; Driessen, N.; Appelmelk, B.; Besra, G. *FEMS Microbiol Rev.* **2011**, *35*, 1126–1157.
- 69.-** Drumm, J.; Mi, K.; Bilder, P.; Sun, M.; Lim, J.; Ohmann, H.; Basaraba, R.; So, M.; Zhu, G.; Tufariello, J.; Izzo, A.; Orme, I.; Almo, S.; Leyh, T.; Chan, J. *PLoS Pathogens*. **2009**, *5*, 5, 1-13.
- 70.-** COMBREX. <http://combrex.bu.edu/DAI?command=SciBay&fun=proteinCluster&pClusterID=833003#functional> (Accesado 23/ septiembre/ 2014)
- 71.-** Europe Pub Med Central. <http://europepmc.org/abstract/MED/11473577> (Accesado 23/ septiembre/ 2014)
- 72.-** http://stringdb.org/newstring.cgi/show_network_section.pl?identifier=262724. TTC11 23 (Accesado 23/ septiembre/ 2014)
- 73.-** Europe Pub Med Central. <http://europepmc.org/abstract/MED/18466635> (Accesado 23/ septiembre/ 2014)
- 74.-** <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:bKo2JIR44f4J:combrex.bu.edu/DI%3Fcommand%3DSciBay%26fun%3DproteinCluster%26pClusterID%3D790482+&cd=16&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx> (Accesado 23/ septiembre/ 2014)
- 75.-** Ogura, T.; Wilkinson, A. *Genes Cell.* **2001**, *6*, 575-597.
- 76.-** Forrellad, M.; Klepp, L.; Gioffré, A.; García, J.; Morbidoni, H.; Santangelo, M.; Cataldi, A.; Bigi, F. *Virulence*. **2013**, *4*, 1, 3-66.
- 77.-** Chim, N.; Owens, C.; Contreras, H.; Goulding, C. NIH Public Access, *Infect Disord Drug Targets*. **2014**, 1-51.

- 78.-** Ligona, L.; Haydena, J.; Miriam Braunstein, M. *Tuberculosis (Edinb)*. **2012**, 92, 2, 121–132.
- 79.-** Sarathy, J.; Dartois, V.; Lee ,E. *Pharmaceuticals*. **2012**, 5, 1210-1235.
- 80.-** Feltcher, M.; Sullivan, J.; Braunstein, M. *Future Microbiol*. **2010**, 5, 1581–1597. doi:10.2217/fmb.10.112.
- 81.-** Forrellad, M.; Klepp, L.; Gioffré, A.; García, J.; Morbidoni, H.; Santangelo, M.; Cataldi, A.; Bigi, F. *Virulence*. **2013**, 4, 1, 3-66.