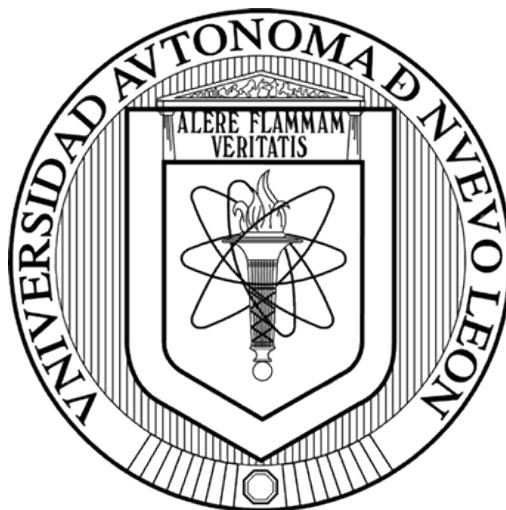


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SÍNTESIS DE NUEVOS ÉSTERES Y FOSFATOS DEL
ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO;
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD CONTRA
BACTERIAS RESISTENTES Y *Mycobacterium
tuberculosis* ASI COMO SU INTERACCIÓN CON LA
ENZIMA DXR *in silico*.**

Por

Q.F.B. Ana Laura Vázquez Ramírez

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en Farmacia

SÍNTESIS DE NUEVOS ÉSTERES Y FOSFATOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO; DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD CONTRA BACTERIAS RESISTENTES Y *Mycobacterium tuberculosis* ASI COMO SU INTERACCIÓN CON LA ENZIMA DXR *in silico*.

Aprobación de la tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Presidente

Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez

Secretario

Dr. Victor Manuel Rosas García

Vocal

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

Subdirectora de Estudios de Posgrado

Revisión y aprobación de la tesis

**SÍNTESIS DE NUEVOS ÉSTERES Y FOSFATOS DEL ÁCIDO *meso*-
DIHIDROGUAJARÉTICO; DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD CONTRA
BACTERIAS RESISTENTES Y *Mycobacterium tuberculosis* ASI COMO
SU INTERACCIÓN CON LA ENZIMA DXR *in silico*.**

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Director de Tesis

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Co- Director de Tesis

Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez
Comité tutorial

Dr. Víctor Manuel Rosas García
Comité tutorial

Dr. Eugenio Hernández Fernández
Comité tutorial

AGRADECIMIENTOS

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
Por su guía, apoyo y asesoramiento en la realización de este proyecto.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
Por la asesoría en la síntesis de los derivados semisintéticos

Dr. Antonio Romo Mancillas

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro
Por la realización e interpretación de los estudios *in silico* con la enzima DXR

Comité tutorial

Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez

Dr. Víctor Manuel Rosas García

Dr. Eugenio Hernández Fernández

Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Nuevo León
Por sus sugerencias y correcciones durante las reuniones tutoriales,
seminarios departamentales y revisión de tesis

Dra. Elvira Garza González

Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio
González, Universidad Autónoma de Nuevo León
Por la infraestructura y apoyo brindado en los ensayos antimicobacterianos y
antibacterianos.

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad
Autónoma de Nuevo León
Por la obtención de los FIDS de Resonancia Magnética Nuclear de los
productos naturales y derivados semisintéticos.

Dra. María Yolanda Ríos Gómez

Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma de Morelos
Por la obtención de los espectros de masas de alta resolución

RESUMEN

Ana Laura Vázquez Ramírez

fecha de graduación

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: **SÍNTESIS DE NUEVOS ÉSTERES Y FOSFATOS DEL ÁCIDO meso-DIHIDROGUAJARÉTICO; DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD CONTRA BACTERIAS RESISTENTES Y *Mycobacterium tuberculosis* ASI COMO SU INTERACCIÓN CON LA ENZIMA DXR *in silico*.**

Número de páginas: 127

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de estudios: Farmacia

Propósito y método de estudio:

La tuberculosis (TB) es una de las mayores amenazas para la salud pública mundial. En 2014 se reportaron 1.5 millones de personas que fallecieron a consecuencia de esta enfermedad además es la principal causa de defunciones en personas infectadas con VIH en 2015. La OMS ha elaborado una lista para guiar y promover la investigación de nuevos antibióticos en la que se incluyen 12 bacterias más peligrosas para la salud humana como *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, etc. En estudios previos de nuestro grupo de investigación, se aisló y caracterizó de *L. tridentata* el lignano ácido meso dihidroguaiarético (AmDG) que posee actividad antimicobacteriana con una CMI en un rango de 12.5 a 50 µg/mL contra aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR, y con una CMI de 50 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv y *S. aureus* resistente a meticilina. Reyes-Melo y colaboradores sintetizaron y caracterizaron 28 derivados del AmDG a los cuales se les determinó su actividad contra bacterias resistentes y contra *M. tuberculosis*. Los resultados de este estudio indicaron que ocho ésteres presentaron actividad antimicobacteriana con una CMI en el rango de 12.5 a 50 µg/mL. La presencia de un grupo benzoilo parece ser un factor determinante en la actividad antimicobacteriana ya que estos derivados presentaron una actividad 4 veces mayor que los análogos que poseen grupos acetilo. Adicionalmente, los derivados semisintéticos con un grupo éster presentaron actividad contra *S. aureus* resistente a meticilina con una CMI de 25-50 µg/ml. Por lo anterior se sintetizaron nuevos ésteres del AmDG con el anillo benzoico y diferentes sustituyentes. La enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR) forma parte de la vía no mevalonato en la biosíntesis de precursores básicos de isoprenoides esenciales para *M. tuberculosis*. Teniendo como blanco esta enzima se sintetizaron fosfonatos a partir de cinamaldehídos teniendo como concentración inhibitoria 50 (IC₅₀): 0.7-21.5 µM. Por lo que el objetivo de este proyecto fue sintetizar derivados del AmDG incluyendo ésteres y fosfatos, determinar su actividad contra bacterias resistentes y *M.*

tuberculosis y finalmente determinar la interacción de los derivados obtenidos con la enzima DXR. Las hojas secas de *L. tridentata* (808 g) se maceraron con CHCl₃/MeOH y se obtuvieron 205.8g de extracto del cual se aislaron y caracterizaron el flavonoide 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, los lignanos ácido meso dihidroguaiarético (*AmDG*) y 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano. A partir del *AmDG* se sintetizaron 7 ésteres por medio de la reacción de Steglich, 5 fosfatos por medio de la reacción de Atherton Todd y un derivado metilado del 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano. Los productos naturales y derivados semi-sintéticos se purificaron mediante cromatografía en columna y placas preparativas y su estructura química se determinó por RMN¹H, RMN¹³C y HRMS. Los derivados se evaluaron contra *M. tuberculosis* H37Rv la cual es sensible a fármacos de primera línea y una cepa TB-MFR (G122) resistente a Rifampicina, Etambutol y Estreptomycin, así como también contra ocho aislados clínicos de bacterias farmacorresistentes.

Conclusiones y contribuciones: Se aislaron, purificaron y caracterizaron tres productos naturales: un flavonoide: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, y dos lignanos: ácido meso dihidroguaiarético y 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano. Se sintetizaron 13 nuevos derivados semisintéticos los cuales incluyen: 7 ésteres, 5 fosfatos y 1 derivado metilado. De los 13 derivados evaluados, los ésteres monosustituídos **1**, **5** y el fosfato **11** presentaron actividad contra la cepa H37Rv (CMI de 25-50 µg/mL), los derivados **5** y **11** también presentaron actividad contra la cepa G122 (CMI de 50µg/mL), los demás derivados no presentaron actividad a las concentraciones ensayadas (CMI >50µg/mL). A los derivados **1** y **5** se les determinó la citotoxicidad en macrófagos J774A.1 donde resultaron ser más citotóxicos que el *AmDG*, y el índice de selectividad de los derivados y el producto natural fue menor de 10 lo que indica que no son selectivos para la micobacteria. Adicionalmente se realizó el docking a los ésteres, fosfatos y al *AmDG* con la enzima DXR, los ésteres **1**, **4**, **5** y **6** y los fosfatos **11** y **13** mostraron mayor afinidad hacia la enzima DXR que el *AmDG*. Los compuestos **1**, **5** y **11** mostraron cierta afinidad teórica a la enzima DXR lo que podría explicar su posible mecanismo de acción.

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Directora de tesis

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Co- Director de tesis

Contenido	
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tuberculosis	1
1.1.1 Etiología	1
1.1.2 Epidemiología	1
1.1.3 Tratamiento.....	3
1.1.1.1. Nuevos fármacos antituberculosos.....	7
1.2. Bacterias resistentes	9
ANTECEDENTES.....	12
2.1 . Ácido meso-dihidroguaiarético.....	12
2.2 . Derivados semisintéticos del <i>AmDG</i>	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1 Hipótesis.....	20
3.2 Objetivo general.....	20
3.3 Objetivos específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1 Material y equipo	21
4.1.1. Técnicas cromatográficas	21
4.1.2. Propiedades físicas y elucidación estructural de los productos naturales y sus derivados semi-sintéticos	21
4.2 Material vegetal	22
4.3 Preparación del extracto orgánico de <i>Larrea tridentata</i>	22
4.4 Aislamiento y purificación del ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético.....	22
4.4.1 Aislamiento y purificación del 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (Lt3)	25
4.4.2 Aislamiento y purificación del ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético (<i>AmDG</i>)	25
4.4.3 Aislamiento y purificación de 4,4-dihidroxi-3-metoxi-6,7-ciclolignano (Lt16).	26
4.5 Síntesis de los derivados del ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético.....	26
4.5.1 Síntesis de ésteres. Reacción de Steglich	26
4.5.1.1 Síntesis de los derivados 1 y 2	28
4.5.1.2 Síntesis de los derivados 3 y 4	29
4.5.1.3 Síntesis de los derivados 5 y 6	30
4.5.1.4 Síntesis de los derivados 7 y 8	31

4.5.2	Síntesis de alquilfosfatos. Reacción de Atherton–Todd	33
4.5.2.1	Síntesis de los compuestos 9 y 10.....	34
4.5.2.2	Síntesis de los compuestos 11 y 12.....	36
4.5.2.3	Síntesis de los compuestos 13 y 14.....	37
4.5.3	Síntesis de 4,4',3-trimetoxi-6,7'-ciclolignano.	38
4.7	. Ensayos biológicos	39
4.7.1.	Determinación de la actividad antimicobacteriana	39
4.7.2	Actividad contra bacterias resistentes.....	40
4.7.2.	Citotoxicidad.....	42
4.7.3.	Docking	43
CAPITULO V.....		45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		45
5.2	Elucidación estructural del 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'- ciclolignano (LT16)	58
5.3	Rendimiento Propiedades físicas y espectroscópicas de los derivados semi-sintéticos	66
5.3.1	Síntesis de ésteres	66
5.3.2.	Síntesis de fosfatos.....	66
5.3.3.	Síntesis del derivado 3,4,4'-trimetoxi-6,7-ciclolignano	67
	En las reacciones de metilación se obtuvo el compuesto di-sustituido del producto natural 4, 4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7-ciclolignano, obteniéndose 4.4 mg de un sólido blanco soluble en cloroformo, con un rendimiento del 8 %.	67
5.2	Actividad antibacteriana	96
5.4	Citotoxicidad de los esteres activos	102
5.5	Docking con enzima DXR.	107
DISPOSICIÓN DE RESIDUOS		123
PERSPECTIVAS		126
BIBLIOGRAFÍA.....		127
ANEXO		131

LISTA DE FIGURAS

1. Estructuras químicas de los fármacos anti-TB de primera línea	3
2. Estructura química de los fármacos anti-TB de segunda línea	5
3. Estructura química de nuevos fármacos anti-TB en Fases II y III	7
4. Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos	10
5. Beilschmina A	12
6. Estructura del Ácido meso dihidroguaiarético (<i>AmDG</i>)	13
7. Estructuras químicas de ésteres del <i>AmDG</i> y su actividad antibacteriana (continuación)	16
8. Estructuras químicas de derivados de pirazinamida y su actividad antimicobacteriana	17
9. Estructuras químicas de fosfonatos y su actividad contra la enzima 1- desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (<i>DXR</i>)	18
10. Reacción de esterificación de Steglich	27
11. Síntesis de los derivados 1 y 2	28
12. Síntesis de los derivados 3 y 4	29
13. Síntesis de los derivados 5 y 6	31
14. Síntesis de los derivados 7 y 8	32
15. Reacción de alquilfosfatos de Atherton-Todd	33
16. Reacción de fosforilación del <i>AmDG</i> con fosfitas cloradas	34
17. Síntesis de los derivados 9 y 10	35
18. Síntesis de los derivados 11 y 12	36
19. Síntesis de los derivados 13 y 14	37
20. Síntesis del derivado 15	38
21. Espectro de RMN ¹ H de <i>AmDG</i> (400 MHz, CDCl ₃)	57
22. Espectro de RMN ¹³ C de <i>AmDG</i> (100 MHz, CDCl ₃)	57
23. Espectro de RMN ¹ H de LT16 (400 MHz, CDCl ₃)	60
24. Espectro de RMN ¹³ C de LT16 (100 MHz, CDCl ₃)	60
25. Espectro de RMN ¹ H de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (400 MHz, acetona)	62
26. Espectro de RMN ¹³ C de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (100 MHz, acetona)	63
27. Espectro de COSY de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	63
28. Espectro de NOESY de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	64
29. Espectro de HMBC de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	64
30. Espectro de HSQC de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	65
31. Espectro de RMN ¹ H del derivado 1 (400 MHz, CDCl ₃)	69
32. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 1 (100 MHz, CDCl ₃)	69
33. Espectro de RMN ¹ H del derivado 3 (400 MHz, CDCl ₃)	71
34. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 3 (100 MHz, CDCl ₃)	71
35. Espectro de RMN ¹ H del derivado 4 (400 MHz, CDCl ₃)	73
36. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 4 (100 MHz, CDCl ₃)	73

37. Espectro de RMN ¹ H del derivado 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	75
38. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 5 (100 MHz, CDCl ₃)	75
39. Espectro de RMN ¹ H del derivado 6 (400 MHz, CDCl ₃).....	77
40. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 6 (100 MHz, CDCl ₃)	77
41. Espectro de RMN ¹ H del derivado 7 (400 MHz, CDCl ₃).....	79
42. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 7 (100 MHz, CDCl ₃)	80
43. Espectro de RMN ¹ H del derivado 8 (400 MHz, CDCl ₃).....	82
44. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 8 (100 MHz, CDCl ₃)	83
45. Espectro de RMN ¹ H del derivado 9 (400 MHz, CDCl ₃).....	84
46. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 9 (100 MHz, CDCl ₃)	85
47. Espectro de RMN ¹ H del derivado 10 (400 MHz, CDCl ₃).....	86
48. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 10 (100 MHz, CDCl ₃)	87
49. Espectro de RMN ¹ H del derivado 11 (400MHz, CDCl ₃).....	89
50. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 11 (100 MHz, CDCl ₃)	89
51. Espectro de RMN ¹ H del derivado 13 (400MHz, MEOD)	91
52. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 13 (100MHz, MEOD).....	91
53. Espectro de RMN ¹ H del derivado 14 (400MHz, MeOD)	93
54. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 14 (100MHz, MeOD)	93
55. Espectro de RMN ¹ H del derivado 15 (400MHz, CDCl ₃).....	94
56. Espectro de RMN ¹³ C del derivado 15 (100MHz, CDCl ₃)	95
57. Análogos del AmDG con actividad antimicobacteriana.....	100
58. Citotoxicidad del derivado 1 , 5 y AmDG en macrófagos J774A.1.....	103
59. Citotoxicidad de Rifampicina en macrófagos J774A.1.	104
60. Estructuras para acoplamiento molecular	107
61. Conformaciones obtenidas del programa Caver.....	108
62. Unión del derivado 1 en la enzima DXR con dos NADPH.	111
63. Unión del derivado 1 en la enzima DXR con un NADPH.	112
64. Unión del derivado 4 en la enzima DXR con dos NADPH	112
65. Unión del derivado 4 en la enzima DXR con un NADPH.	113
66. Unión del derivado 5 en la enzima DXR con dos NADPH.	114
67. Unión del derivado 5 en la enzima DXR con un NADPH.	114
68. Unión del derivado 6 en la enzima DXR con dos NADPH.	115
69. Unión del derivado 6 en la enzima DXR con un NADPH.	116
70. Unión del derivado 11 en la enzima DXR con dos NADPH.	117
71. Unión del derivado 11 en la enzima DXR con un NADPH.	117
72. Unión del derivado 13 en la enzima DXR con dos NADPH.	119
73. Unión del derivado 13 en la enzima DXR con un NADPH	119
74. Interacciones del AmDG y la enzima DXR.....	120

LISTA DE TABLAS

1. Fármacos antituberculosos de primera línea	4
2. Fármacos antituberculosos de segunda línea.....	6
3. Fracciones del extracto cloroformo/metanol (1:1)	24
4. Condiciones de reacción de esterificación	27
5. Condiciones de reacción de fosforilación.....	34
6. Aislados clínicos de bacterias farmacorresistentes.....	41
7. Parámetros termodinámicos en la dinámica molecular.....	44
8. Características físicas y rendimientos de ésteres del AmDG.....	66
9. Características y rendimientos de fosfatos del AmDG.....	67
10. Actividad contra bacterias resistentes de los derivados semi-sintéticos del AmDG	97
11. Actividad antimicobacteriana de los derivados semi-sintéticos del AmDG	99
12. % de viabilidad de macrófagos J774A.1 tratados con los derivados 1 y 5	102
13. % de viabilidad de macrófagos J774A.1 tratados con el AmDG.	102
14. % de viabilidad de macrófagos J774A.1 tratados con los fármacos de primera y segunda línea anti-tuberculosis.	103
15. Citotoxicidad e índice de selectividad de los derivados 1 y 5 , AmDG y estándares positivos contra macrófagos J774A.1.....	106
16. Scores de los diferentes compuestos y acoplamiento molecular.....	109
17. Tipos de unión de los derivados con la enzima DXR con 1 y 2 NADPH.	122

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AcOEt	Acetato de etilo
Am	Amikacina
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
Cm	Capreomicina
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cs	ciclocerina
DCM	Diclorometano
DCU	Diciclohexilurea
DMAP	Dimetilalil difosfato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (siglas en inglés)
DOXP	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato
DXR	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
EMB	Etambutol
FDA	Food and Drug Administration
Hex	Hexano
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria
INH	Isoniazida
IPP	Isopentil difosfato
Km	Kanamicina
Lfx	levofloxacin
LT2	5,4'-dihidroxi-3,7,8,3'-tetrametoxiflavona
LT3	5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona
LT5	5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona
LT16	4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MEP	2-C-metil-D-erytosa 4-fosfato
MTT	(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazolio
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa catalasa
Pto	Protionamida
PZA	Pirazinamida
RF	Relación de frentes
RIF	Rifampicina
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
SM	Streptomycin

SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TB	Tuberculosis
TB-MFR	Tuberculosis multifármaco-resistente
TB-XFR	Tuberculosis extremadamente fármaco-resistente
TMS	Tetrametilsilano
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis

1.1.1 Etiología

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa crónica producida por *Mycobacterium tuberculosis*, que se localiza generalmente en el pulmón, aunque puede afectar otros órganos. Se transmite de persona a persona por inhalación de aerosoles contaminados por el bacilo, que han sido eliminados por los individuos enfermos al toser, hablar o estornudar¹.

Los síntomas son: fatiga, fiebre, sudoración, expectoraciones (a veces sanguinolentas) y dolor torácico. La infección puede progresar y propagarse a los sistemas: nervioso central, linfático, circulatorio, genitourinario, gastrointestinal, óseo, dérmico, así como articulaciones, conociéndose estos casos como tuberculosis extrapulmonar².

1.1.2 Epidemiología

La TB es una de las mayores amenazas para la salud pública mundial. En 2014, 1.5 millones de personas fallecieron a consecuencia de esta enfermedad. Se estima que en 2014 enfermaron de TB 9.6 millones de personas: 5.4 millones de hombres, 3.2 millones de mujeres y 1.0 millón de niños. El 12% de los 9.6 millones de personas a las que se diagnosticó TB por primera vez en 2014 eran VIH-positivas³. La tuberculosis fue la principal causa

de defunciones en personas infectadas con VIH en 2015⁴. Como agente único, *M. tuberculosis* es uno de los principales causantes de muerte entre las enfermedades infecciosas de Latinoamérica⁵. De los 480 000 casos estimados de tuberculosis multifarmacoresistente (TB-MFR) que se registraron en 2014 a nivel mundial, solo una cuarta parte (123 000) fueron detectados y notificados³ y se estima que 190 000 murieron por TB- MFR⁶.

Las enfermedades frecuentemente asociadas con la tuberculosis en México son diabetes, desnutrición, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y alcoholismo. La importancia de esta relación radica en que estas enfermedades no sólo son condicionantes de infección tuberculosa, sino que además pueden afectar la curación y la sobrevivencia de las personas afectadas por esta enfermedad ⁷. En México más de la mitad de todos los municipios del país notifican casos de tuberculosis cada año, sin embargo, las entidades federativas de mayor número de casos y muertes por esta causa son: Veracruz, Baja California, Guerrero, Sonora, Tamaulipas, Chiapas, Nuevo León y Tabasco. Las ciudades o municipios que poseen el mayor número de habitantes es donde se concentran el mayor número de casos de tuberculosis⁸.

En México se diagnosticaron 20 561 casos nuevos de TB⁹, de los cuales 16 462 eran casos nuevos de TB pulmonar en el 2015¹⁰. De enero a septiembre de 2015 se registraron 284 casos por TB meníngea¹¹ y 840 casos de TB asociada a VIH¹². Los estados con mayor número de casos reportados de TB

en el 2015 fueron Veracruz con 2 072, Baja California con 1,988 y Nuevo León con 1 373 ⁹.

1.1.3 Tratamiento

La tuberculosis se trata con una combinación de cuatro medicamentos de primera línea: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida los cuales se administran durante seis meses¹³ (Figura 1). Si el tratamiento no se hace correctamente, los bacilos pueden volverse resistentes a los fármacos utilizados¹⁴(Tabla 1). En la actualidad, a nivel mundial se observa un incremento de la TB fármaco-resistente, siendo la tuberculosis multifármaco-resistente (TB-MFR) un problema a nivel mundial ¹⁴.

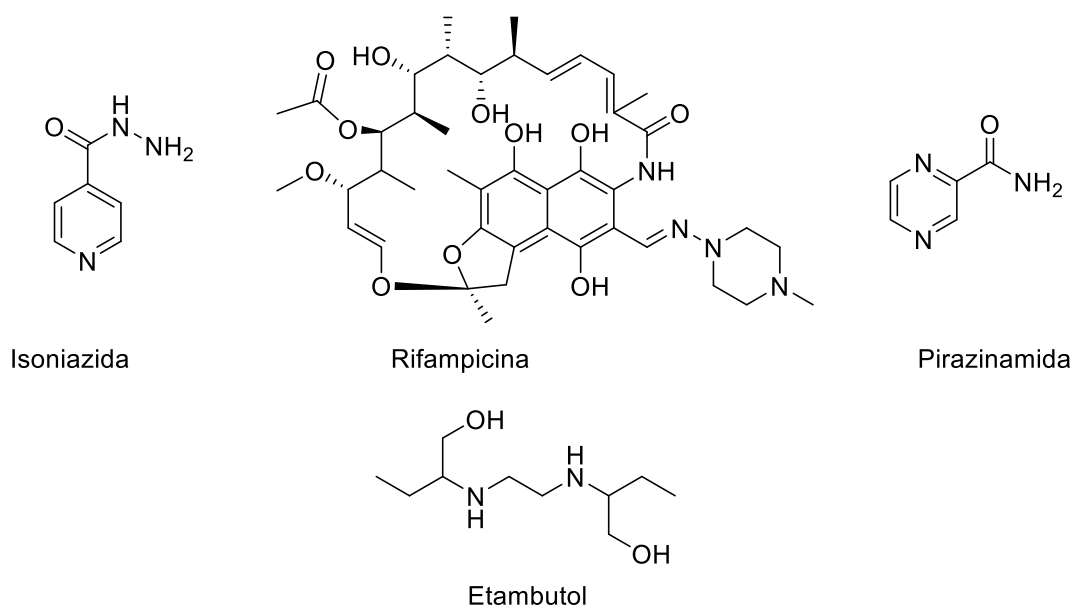
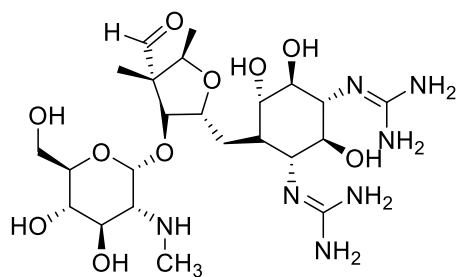


Figura 1. Estructuras químicas de los fármacos anti-TB de primera línea

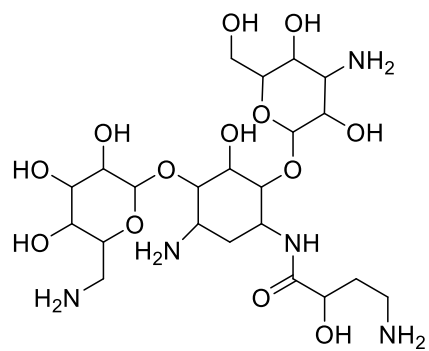
Tabla 1. Fármacos antituberculosos de primera línea

FÁRMACO	CLASIFICACION ESTRUCTURAL	GEN BLANCO	CMI <i>M. tuberculosis H37Rv</i> (µg/mL)	MECANISMO DE ACCIÓN
Isoniacida (INH)	Derivado del ácido isonicotínico	<i>inhA</i> (Rv 1484)	0.05-0.2	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos que son componentes lipídicos específicos de la membrana de las micobacterias
Rifampicina (RIF)	Pertenece al grupo de las rifampicinas es aislado de <i>Streptomyces mediterranei</i>	<i>rpoB</i> (Rv0667)	<0.5	Inhibe la síntesis del ADN actuando sobre la enzima RNA polimerasa
Etambutol (EMB)	Aminoalcohol sintético isómero dextrógiro derivado de la etilendiamina	<i>embC</i> (Rv3793) <i>embA</i> (Rv3794) <i>embB</i> (Rv3795)	1-5	Altera la biosíntesis de la pared celular de los bacilos
Pirazinamida (PZA)	Derivado sintético de nicotinamida	No se conoce	20	Inhibe la síntesis de los ácidos micólicos

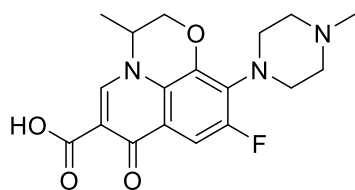
La TB-MFR se define como la resistencia al menos a dos fármacos anti-TB más potentes: la rifampicina e isoniazida ¹⁵. El tratamiento es estandarizado con fármacos de segunda línea (Figura 2), el cual consiste en 24 meses de tratamiento de kanamicina (Km) o amikacina (Am) o capreomicina (Cm), levofloxacina (Lfx) protionamida (Pto), ciclocerina (Cs), y pirazinamida (Pza) (Tabla 2, Figura 2).



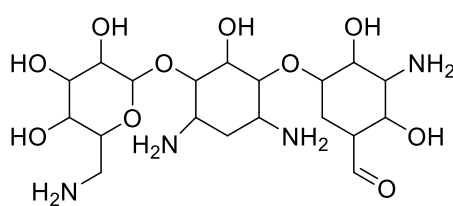
Estreptomina



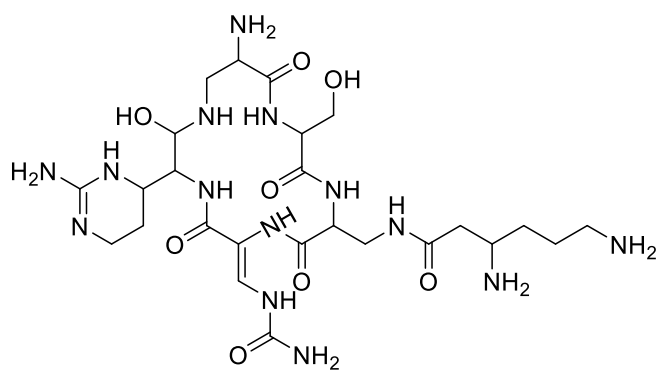
Kanamicina



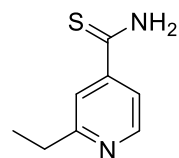
Levofloxacino



Capreomicina



Amikacina



Etionamida

Figura 2. Estructura química de los fármacos anti-TB de segunda línea

Tabla 2. Fármacos antituberculosos de segunda línea

FÁRMACO	CLASIFICACION ESTRUCTURAL	CMI <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (µg/mL)	GEN BLANCO	MECANISMO DE ACCIÓN
Estreptomina (SM)	Aminoglucósido	8	<i>rspL</i> (RV0682)	Bactericida y actúa inhibiendo la síntesis de proteínas
Kanamicina	Aminoglucósido	1	<i>Rrs</i> (<i>MTB000019</i>)	Actúa sobre la síntesis de proteína
Amikacina	Aminoglucósido semi-sintético	1	<i>Rrs</i> (<i>MTM000019</i>)	Actúa sobre la síntesis de proteínas.
Capreomicina	Ciclopéptido	1-50	<i>Rrs</i> (<i>MTM000019</i>)	Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas.
Levofloxacino	Fluoroquinolona	<3	<i>gyrB</i> (Rv0005) <i>gyrA</i> (Rv 0006)	Actúa inhibiendo el ADN girasa
Etionamida	Derivado sintético del ácido isonicotínico	0.6-2.5	<i>inhA</i> (Rv1484)	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos

Por otra parte, la tuberculosis extremadamente fármaco-resistente (TB-XFR) se define como la TB-MFR que también es resistente a las fluoroquinolonas y al menos a uno de los tres antibióticos inyectables de segunda línea (Amikacina, Capreomicina o kanamicina)¹⁵, también es una condición creciente que representa un problema terapéutico complejo y se acompaña de una mortalidad alta¹⁶, para tratar la TB-XFR se cuenta con opciones terapéuticas limitadas ya que los fármacos utilizados no es segura su eficacia, su toxicidad es elevada y disponibilidad es limitada.

El descubrimiento y validación de nuevos fármacos para el tratamiento de TB es necesario, teniendo como objetivo principal, disminuir el tiempo de tratamiento en pacientes con tuberculosis, reducir la interacción con antirretrovirales e identificar nuevas opciones terapéuticas para TB-MFR y TB-XFR ¹⁷.

1.1.1.1. Nuevos fármacos antituberculosos

Actualmente el encontrar nuevas opciones terapéuticas representa un desafío, los nuevos agentes anti-TB deben de reducir el tiempo total del régimen de tratamiento y ser efectivos contra el aumento de cepas resistentes y bacilos en estado de latencia¹⁸.

Existen actualmente diversos fármacos que se encuentran en Fases clínicas II y III contra tuberculosis sensible o resistente, donde en la fase IIa se realizan como lo es PA-824 que se encuentra en Fase II y Gatifloxacina en Fase III (Figura 3)¹⁹.

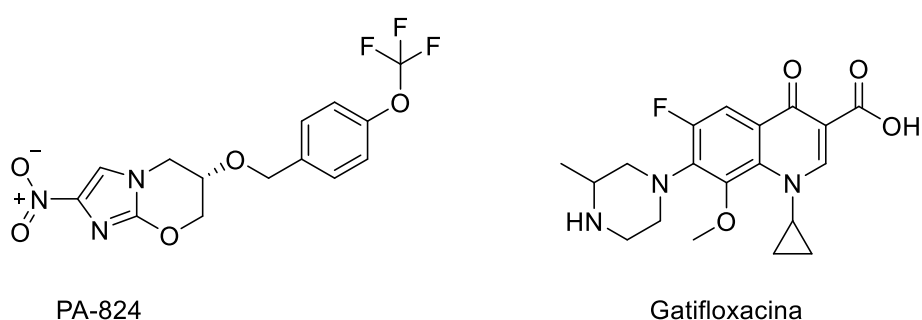


Figura 3. Estructura química de nuevos fármacos anti-TB en Fases II y III

El profármaco PA-824 tiene actividad antituberculosa y presenta actividad contra bacterias replicantes y no replicantes, se encuentra en estudio para evaluar dosis oral en pacientes cuya dosis se evalúa de 50 a 200 mg/día, en estudios anteriores en pacientes se observó que no tenía efecto antituberculoso respecto a la dosis como monoterapia oral en pacientes de 200, 600, 1000 y 1200 mg, lo que sugiere que la dosis efectiva es menor a 200 mg/día¹⁹.

Las fluoroquinolonas son fármacos que tienen como blanco la DNA girasa, además tienen alta biodisponibilidad oral y falta de resistencia cruzada con otros fármacos antituberculosos. La falta de ensayos clínicos no impide que se considere como un componente vital en la terapia contra TB-MFR el uso de 8-metoxifluoroquinolonas (Gatifloxacina). Modelos en ratones indican que el uso de levofloxacino y las nuevas 8-metoxifluoroquinolonas pueden utilizarse para acortar el tratamiento contra TB sensible. Estos resultados lo respaldan cuatro estudios en la Fase IIb¹⁹.

Aunque existen diferentes fármacos que se encuentran en estudio, todavía se espera que se tengan tratamientos con un régimen menor de 6 meses para tuberculosis sensible y resistente, el manejo de la coinfección TB-VIH, manejo de la infección latente de TB, régimen de dosificación apropiados para TB pediátrica y extrapulmonar¹⁹.

1.2. Bacterias resistentes

Las bacterias se pueden volver resistentes por diferentes mecanismos y no se limita a una clase de fármacos, los patógenos pueden evitar la penetración del fármaco ya que pueden presentarse alteraciones en proteínas de la membrana evitando que los fármacos la atraviesen, o la bacteria puede bombear el fármaco al exterior (bombas de eflujo). Además puede haber una modificación química de los fármacos como la hidrólisis del anillo β -lactámico o adición de grupos químicos, etc.²⁰.

Los aparición de mecanismos de resistencia bacteriana a fármacos utilizados son un problema a nivel mundial ya que ponen en peligro el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes, por lo tanto las infecciones prevalecen en el organismo, por lo que aumenta el riesgo de propagación²¹. La diseminación de patógenos resistentes a fármacos es una de las principales amenazas de éxito al tratamiento de enfermedades microbianas²⁰.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publica una lista de patógenos prioritarios que son resistentes a antibióticos, en la que incluyen las 12 bacterias más peligrosas para la salud humana. Esta lista se divide en tres categorías dependiendo de la necesidad de nuevos antibióticos: prioridad crítica, media y alta (Figura 4)²¹. Prioridad crítica: bacterias multifarmacorresistente principalmente peligrosas en hospitales, asilos de ancianos y pacientes que necesitan ventiladores y catéteres intravenosos. Estas bacterias pueden provocar infecciones graves y a menudo letales. Prioridad alta y media: bacterias con farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes.

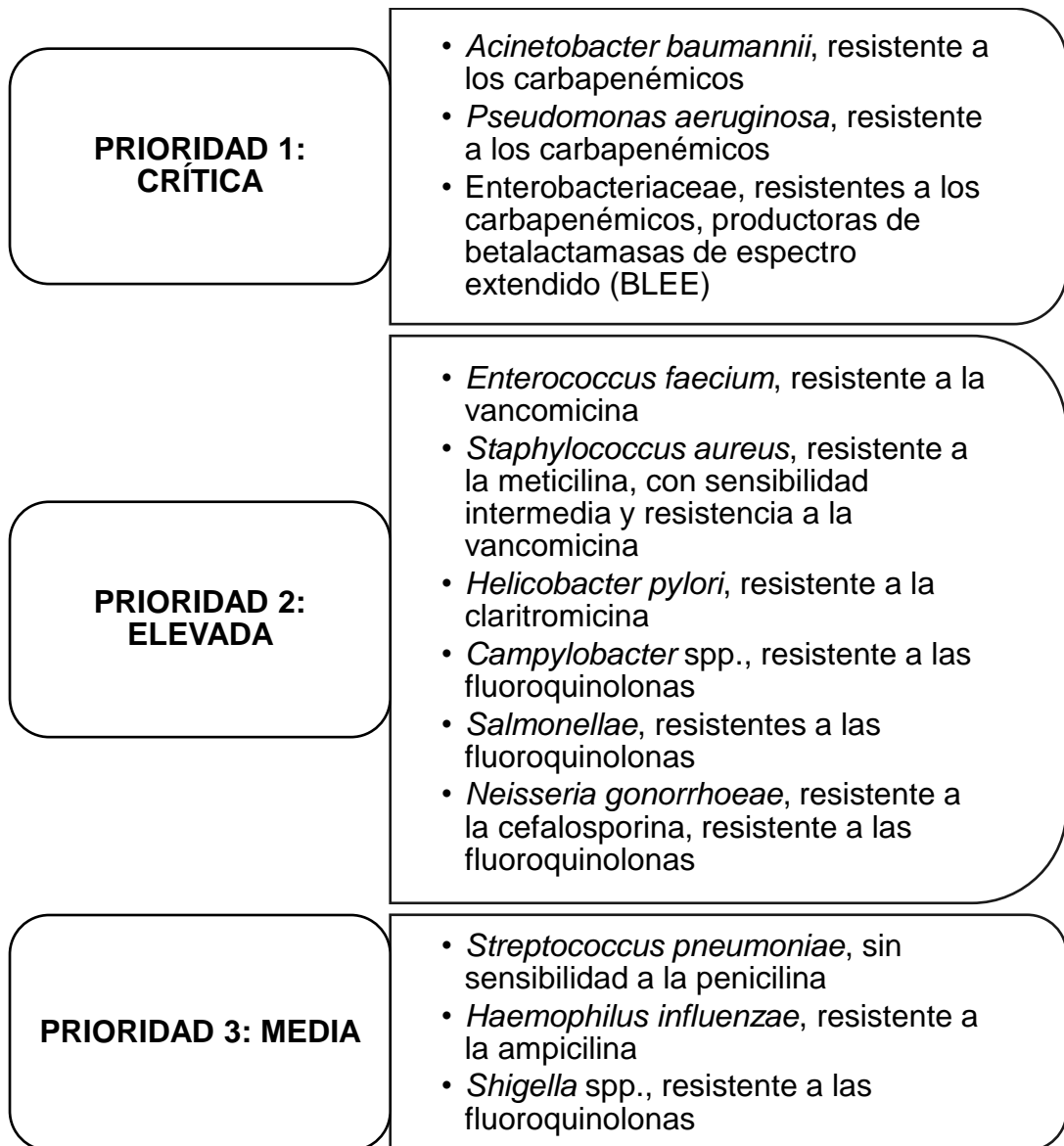


Figura 4. Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos

En México las enfermedades nosocomiales varían del 2.1 al 15.8%. Las enfermedades intrahospitalarias se asocian a altas tasas de mortalidad y morbilidad, por lo que es un problema de salud pública²². Existen factores que aumentan la posibilidad de que el paciente adquiera una infección nosocomial como son: edad, sexo, estado inmunológico, estado de nutrición, así como

factores ambientales como hacinamiento, visitas de pacientes, entre otros. El tratamiento depende del microorganismo y del tipo de infección²³.

El incremento de bacterias resistentes a agentes antibacterianos es un problema de salud mundial, por todo lo anterior es importante el tener nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades y los productos naturales han sido y son una fuente importante de fármacos.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

En las últimas décadas se han reportado diversos compuestos aislados de plantas con actividad contra *M. tuberculosis* sensible y fármaco-resistente siendo prototipos para el desarrollo de nuevos agentes antimicobacterianos. El lignano beilschmina A (Figura 5) fue aislado de las hojas de *Beilschmiedia tsangii* (*Lauraceae*) el cual tuvo una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 2.5 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv siendo más activo que el etambutol (CMI de 6.25 µg/mL)²⁴ por lo que los productos naturales juegan un papel importante en el descubrimiento de nuevos fármacos.

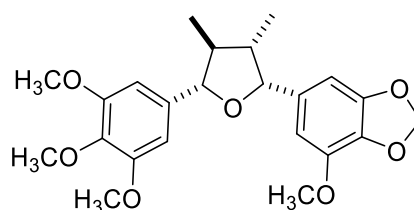


Figura 5. Beilschmina A

2.1. Ácido meso-dihidroguaiarético

En México muchas plantas son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias y tuberculosis²⁵. La gobernadora *Larrea tridentata*, de la familia *Zygophyllaceae* es un arbusto de los desiertos de México y Estados Unidos de Norteamérica. Sus hojas contienen una

espesa resina que tiene como metabolitos secundarios fenoles, lignanos y flavonoides, los cuales actúan como defensa bioquímica para repeler la acción de hongos y otros microorganismos ²⁶.

En estudios previos de nuestro grupo de investigación, se aisló y caracterizó de *L. tridentata* el lignano ácido meso-dihidroguaiarético (AmDG, Figura 6), que posee actividad antimicobacteriana con una CMI en un rango de 12.5 a 50 µg/mL contra tres aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR y con una CMI de 50 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv²⁷. También presentó actividad contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con una CMI de 50 µg/ml.

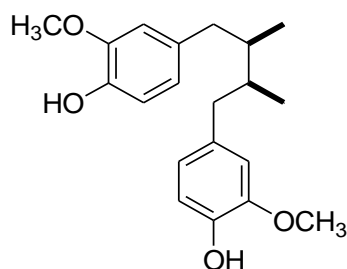


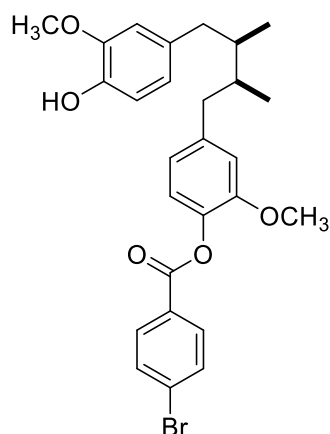
Figura 6. Estructura del Ácido meso dihidroguaiarético (AmDG).

Clemente-Soto y colaboradores sugirieron que el AmDG tiene como blanco farmacológico la inhibición de la CoA transferasa del gen Rv3551, lo que causa que el geraniol y el 1,2-metil-naftaleno no se degraden y se acumulen en el interior de la micobacteria llegando a ser tóxicos y ocasionando la muerte de la micobacteria²⁵.

2.2. Derivados semisintéticos del AmDG

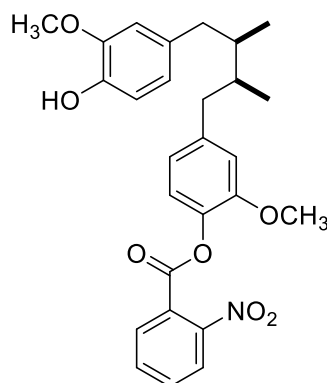
Reyes-Melo y colaboradores sintetizaron y caracterizaron 28 derivados del AmDG a los cuales se les determinó su actividad antibacteriana y antimicobacteriana. Los resultados de este estudio indicaron que ocho ésteres presentaron actividad antimicobacteriana con una CMI en el rango de 12.5 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Éstos fueron: KRM-1m, KRM-2m, KRM-3m, KRM-3d, KRM-4m, KRM-7m, KRM-8m, y KRM-8d (Figura 7). Como se puede observar, la presencia de heteroátomos en anillos aromáticos confiere modesta actividad antimicobacteriana como es el caso de KRM-4m (*M. tuberculosis* H37Rv, MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y *M. tuberculosis* G122, MIC 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), KRM-8m (*M. tuberculosis* H37Rv, MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y KRM-8d (*M. tuberculosis* H37Rv, MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por el contrario, la incorporación de un anillo de benceno como en los derivados KRM-1m (*M. tuberculosis* H37Rv, MIC 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), KRM-2m (*M. tuberculosis* H37Rv, MIC 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y *M. tuberculosis* G122, MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y KRM-7m (*M. tuberculosis* H37Rv, MIC 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y *M. tuberculosis* G133, MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incrementa su actividad antimicobacteriana. Aparentemente, la presencia de un grupo electroatractor como el nitro o el bromo en el benceno no es un factor determinante en la actividad antimicobacteriana ya que los análogos que presentaron estos sustituyentes en el anillo presentaron la misma CMI (12.5 – 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que el análogo con el anillo de benceno (12.5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La presencia de un grupo benzoilo parece ser un factor determinante en la actividad antimicobacteriana ya que estos presentaron una actividad cuatro veces mayor que los análogos KRM-3m (*M. tuberculosis* H37Rv, MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y KRM-3d (*M. tuberculosis* H37Rv, MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que

poseen grupos acetilo. Adicionalmente, se evaluó la actividad antibacteriana contra 12 cepas resistentes de compuestos semisintéticos que poseen un grupo éster. Los resultados indicaron que tienen una moderada actividad como son los compuestos KRM-4m (*S. aureus* resistente a meticilina, MIC 25µg/mL) y KRM-8m (*S. aureus* resistente a meticilina, MIC 50µg/mL) ²⁸.



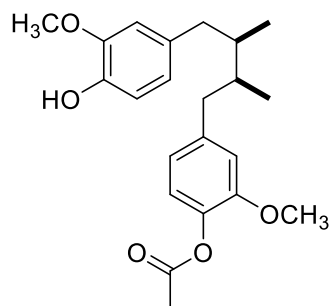
KRM-1m

M. tuberculosis H37Rv CMI= 12.5 µg/ml
M. tuberculosis G122 CMI >50µg/ml
M. tuberculosis G133 CMI >50µg/ml



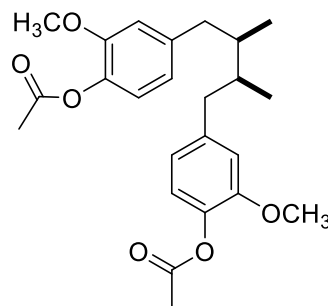
KRM-2m

M. tuberculosis H37Rv CMI= 12.5µg/ml
M. tuberculosis G122 CMI= 50µg/ml
M. tuberculosis G133 CMI= >50µg/ml



KRM-3m

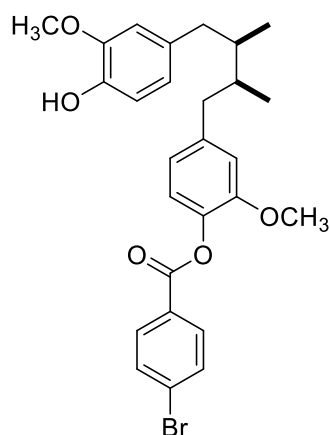
M. tuberculosis H37Rv CMI= 50µg/ml
M. tuberculosis G122 CMI >50µg/ml
M. tuberculosis G133 CMI >50µg/ml



KRM-3d

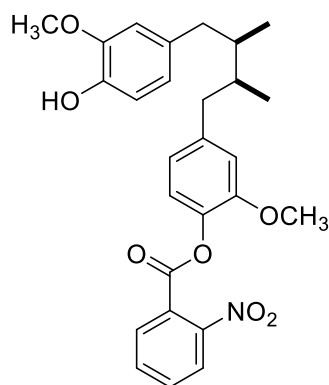
M. tuberculosis H37Rv CMI= 50µg/ml
M. tuberculosis G122 CMI >50µg/ml
M. tuberculosis G133 CMI >50µg/ml

Figura 7. Estructuras químicas de ésteres del AmDG y su actividad antibacteriana.



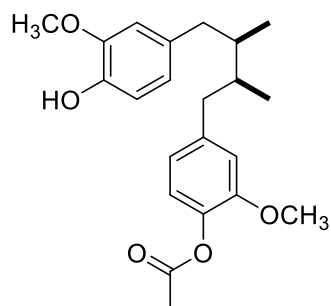
KRM-1m

M. tuberculosis H37Rv CMI= 12.5 µg/ml
M. tuberculosis G122 CMI >50µg/ml
M. tuberculosis G133 CMI >50µg/ml



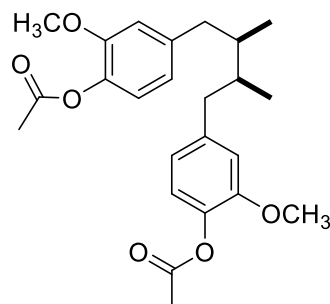
KRM-2m

M. tuberculosis H37Rv CMI= 12.5µg/ml
M. tuberculosis G122 CMI= 50µg/ml
M. tuberculosis G133 CMI= >50µg/ml



KRM-3m

M. tuberculosis H37Rv CMI= 50µg/ml
M. tuberculosis G122 CMI >50µg/ml
M. tuberculosis G133 CMI >50µg/ml



KRM-3d

M. tuberculosis H37Rv CMI= 50µg/ml
M. tuberculosis G122 CMI >50µg/ml
M. tuberculosis G133 CMI >50µg/ml

Figura 7. Estructuras químicas de ésteres del AmDG y su actividad antibacteriana (continuación).

Nordqvist et al (2011)²⁹ para potencializar el efecto terapéutico de los medicamentos ya utilizados en el tratamiento contra *M. tuberculosis* se realizaron cambios estructurales en la pirazinamida, donde se sintetizaron derivados de tipo éster y amida a los que se les determinó la CMI contra *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 8). Los resultados indicaron un incremento en la actividad antimicobacteriana de los ésteres con un rango de CMI de 10 a 40

$\mu\text{g/mL}$ respecto a las amidas con una CMI $> 800 \mu\text{g/mL}$ y a la pirazinamida con una CMI = $200 \mu\text{g/mL}$ ³⁰.

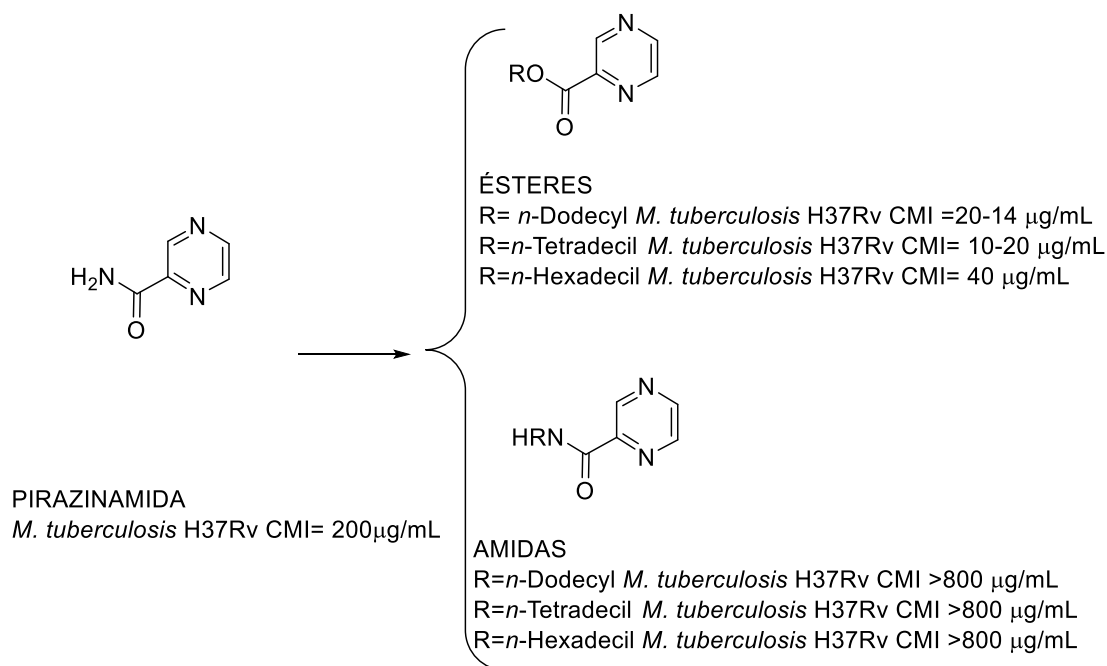


Figura 8. Estructuras químicas de derivados de pirazinamida y su actividad antimicobacteriana.

La enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR) es una enzima de la vía no mevalonato que se encuentra *en M. tuberculosis* la cual cataliza la conversión de 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato. (DOXP) a 2-C-metil-D-erytosa 4-fosfato (MEP) que es usada para la biosíntesis de Isopentil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP) dos precursores básicos de isoprenoides esenciales. Todas las enzimas de la vía no mevalonato son un blanco importante para fármacos contra bacterias incluyendo *M. tuberculosis* y parásitos. Se sintetizaron fosfonatos derivados cinamaldehídos teniendo

como blanco DXR y se determinó su concentración media inhibitoria (IC_{50}) contra la enzima DXR. (Figura 9)³¹. Esta enzima, al igual que las enzimas involucradas en esta ruta son dianas farmacológicas atractivas ya que los humanos no utilizan esta vía para la síntesis de isoprenoides²⁹.

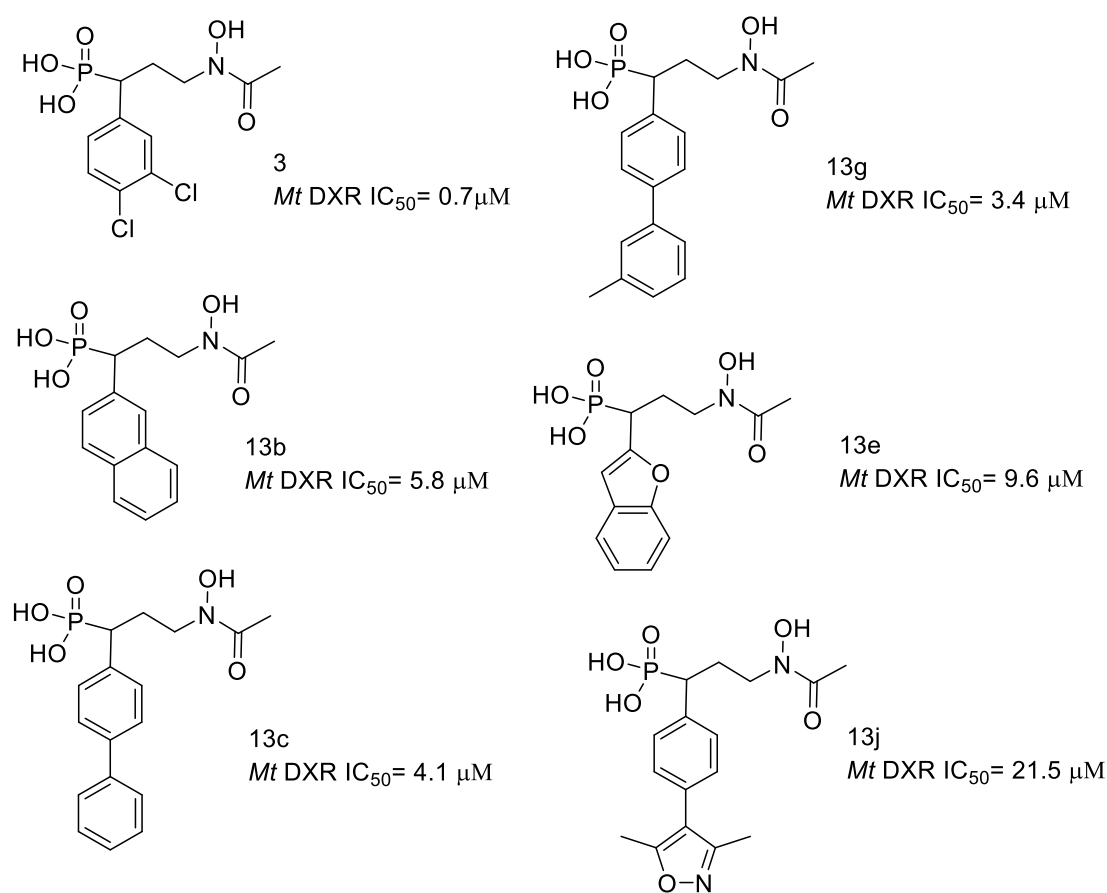


Figura 9. Estructuras químicas de fosfonatos y su actividad contra la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR).

2.3. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular explora las conformaciones de ligandos adoptadas dentro de los sitios de unión de los objetivos macromoleculares³². El acoplamiento molecular se asocia al descubrimiento de nuevos fármacos y la identificación de sitios de unión críticos o alostéricos y la predicción de enlaces de las moléculas y receptores macromoleculares. Las simulaciones de dinámica molecular identifican sitios de unión bien definidas que acoplan ligandos endógenos de estas macromoléculas. El acoplamiento molecular se utiliza para predecir el sitio de unión y la energía en un modelo de una molécula pequeña dentro de un receptor, y los mejores ligandos se prueban experimentalmente para confirmar la unión³³.

Múltiples estructuras cristalinas de la enzima DXR se han utilizado para el diseño de nuevos fármacos de este complejo que ha servido como plantilla para el acoplamiento de proteína-ligando. La estructura cristalina ha revelado la quelación entre fosmidomicina y un catión metálico, el sitio de unión del fosfonato y la estrecha proximidad de unión de fosmidomicina y NADPH³¹.

Por todo lo anterior, se sintetizarán derivados del *AmDG* incluyendo bencil ésteres y fosfatos teniendo como blanco la enzima DXR. También, se evaluará su citotoxicidad con macrófagos JA44.1, y el acoplamiento molecular de todos los derivados semi-sintéticos con la enzima DXR.

CAPITULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Al menos un éster o fosfato derivado del AmDG tendrá mayor actividad contra bacterias resistentes o *M. tuberculosis*, así como menor citotoxicidad que alguno de los estándares positivos isoniazida, rifampicina, etambutol o levofloxacina.

3.2 Objetivo general

Sintetizar, purificar, caracterizar y determinar la actividad contra bacterias resistentes, *M. tuberculosis* de nuevos ésteres y fosfatos del AmDG. Determinar la citotoxicidad de los derivados más activos y la interacción de los nuevos análogos con la enzima DXR *in silico*.

3.3 Objetivos específicos

- Preparar el extracto orgánico de *L. tridentata*.
- Aislar, purificar y caracterizar el AmDG.
- Sintetizar, purificar y caracterizar nuevos ésteres y fosfatos derivados del AmDG.
- Determinar la actividad contra bacterias resistentes y *M. tuberculosis* de los derivados semi-sintéticos.
- Determinar la citotoxicidad de los derivados más activos
- Determinar la interacción de todos los análogos sintetizados con la enzima DXR *in silico*.

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

La preparación del extracto vegetal, el aislamiento, purificación y caracterización de los productos naturales, así como la síntesis, purificación y caracterización de los derivados se realizaron en el Laboratorio Productos Naturales y Sintéticos, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

4.1 Material y equipo

4.1.1. Técnicas cromatográficas

La cromatografía en columna se llevó a cabo teniendo como fase estacionaria gel de sílice de Sigma-Aldrich con un tamaño de partícula 63-200 μm de Sigma Aldrich. La fase móvil fue hexano (Hex), cloroformo (CHCl_3), acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (DCM), acetona, metanol (MeOH) grado reactivo marca Baker. Las cromatografías en capa fina se utilizaron Gel de sílice en TLC lámina de aluminio 60 F₂₅₄ de 20 x 20 cm marca Merck con indicador fluorescente 254 nm. Los reveladores utilizados fueron: lámpara UV marca Spectroline (λ 254 nm y 365 nm), sulfato cérico en ácido sulfúrico.

4.1.2. Propiedades físicas y elucidación estructural de los productos naturales y sus derivados semi-sintéticos

El punto de fusión se determinó en el aparato Fisher-Johns. La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó por Resonancia Magnética

Nuclear de Hidrógeno (RMN ^1H) y de Carbono trece (RMN ^{13}C) en el equipo BRUKER NMR de 400 MHz utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) y Metanol deuterado (MeOD) y teniendo como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

4.2 Material vegetal

Las hojas de *L. tridentata* fueron colectas en San Luis Potosí, S.L.P, México. en Julio de 2016. Las hojas fueron secadas a la sombra y se molieron en una licuadora marca Sunbeam Modelo 4181. El material vegetal seco y molido se pesó en una balanza granataria Marca Liedel.

4.3 Preparación del extracto orgánico de *Larrea tridentata*

El material vegetal seco y molido (858 g) se extrajo cuatro veces por maceración con cloroformo/metanol (1:1) para lo cual se utilizó 2.5 L de CHCl_3 y 2.5 L de MeOH. Los extractos reunidos se filtraron por gravedad y se destilaron al vacío en un evaporador rotativo y se dejó secar a temperatura ambiente obteniendo una cantidad de 205.8 g de extracto total.

4.4 Aislamiento y purificación del ácido *meso*-dihidroguaiarético

El extracto orgánico obtenido se sometió a una cromatografía en columna usando gel de sílice (2000 g) como fase estacionaria y como fase móvil un gradiente hexano/acetato de etilo y acetato de etilo/metanol obteniendo un total de 306 fracciones de 500 mL cada una. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina bajo luz ultravioleta y por revelado con sulfato

cérico, las fracciones con similitud cromatográfica se reunieron dando un total de 21 fracciones reunidas, fracciones A-U (Tabla 3)

Tabla 3. Fracciones del extracto cloroformo/metanol (1:1)

Fracciones	Fracciones reunidas	Fase móvil	Compuesto aislado
1-12	A } B }	Hex 100	AmDG, Lt16
13-24		Hex/AcOEt 95:5	
25-30		Hex/AcOEt 90:10	
31-36	C	Hex/AcOEt 90:10	
37-42	D } E }	Hex/AcOEt 90:10	
43-56		Hex/AcOEt 85:15	
57-60	E } F }	Hex/AcOEt 85:15	
61-72		Hex/AcOEt 80:20	
73-90	F	Hex/AcOEt 80:20	
91-102	G	Hex/AcOEt 80:20	
103-126	H	Hex/AcOEt 80:20	
127-132	I	Hex/AcOEt 75:25	
133-138	J	Hex/AcOEt 75:25	
139-156	K	Hex/AcOEt 70:30	
157-186	L	Hex/AcOEt 70:30	
187-192	M	Hex/AcOEt 70:30	
193-198	N } O }	Hex/AcOEt 70:30	Lt3
199-204		Hex/AcOEt 60:40	
205-222	O } P }	Hex/AcOEt 60:40	
223-228		Hex/AcOEt 50:50	
229-240	P	Hex/AcOEt 50:50	
241-246	Q } R }	Hex/AcOEt 40:60	
247-252		Hex/AcOEt 30:70	
253-258	R } S }	Hex/AcOEt 30:70	
259-264		Hex/AcOEt 20:80	
265-270	S } T } U }	Hex/AcOEt 20:80	
271-282		AcOEt 100	
283-294		AcOEt/ MeOH	
295-296		20:80	
297-306	U	AcOEt/ MeOH 50:50	

AmDG (ácido *meso* dihidroguaiarético), Lt16 (4,4' -dihidroxi- 3-metoxi-6,7' -ciclolignano) y Lt3 (5,8,4' -trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona)

4.4.1 Aislamiento y purificación del 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (Lt3)

De la fracción P (29.7g; hexano/acetona 50:50) precipitó un sólido amarillo que se lavó con hexano. Se realizó una CCF teniendo como referencia 5,4'-dihidroxi-3,7,8,3'-tetrametoxiflavona, 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona y 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona y se observó misma relación de frentes (RF) con el 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, obteniéndose un total de 33.9 mg de este flavonoide el cual fue soluble en metanol.

4.4.2 Aislamiento y purificación del ácido *meso*-dihidroguaiarético (AmDG)

Posteriormente de la fracción H (6.8195 g; hex/AcOEt 80:20) se le realizó una purificación adicional por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil hex/CHCl₃ y CHCl₃/acetona en gradiente. Se obtuvieron 18 subfracciones (h1-h18) las cuales se reunieron por similitud cromatográfica.

De la fracción h10 (Hex: CHCl₃ 10:90) precipitó un sólido blanco que se lavó con hexano para eliminar el exceso de clorofila. Se realizó una CCF teniendo como referencia el AmDG y se observó el mismo RF, se obtuvo un total de 792.7 mg (0.092 %), fue soluble en cloroformo y acetona, con punto de fusión (pf) de 80-82 °C.

4.4.3 Aislamiento y purificación de 4,4-dihidroxi-3-metoxi-6,7-ciclolignano (Lt16).

De la fracción h18 (CHCl₃: acetona 90:10) precipitó un sólido blanco que se lavó con cloroformo para eliminar el exceso de clorofila. Se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) teniendo como referencia el *AmDG* y se observó que tenía el mismo RF. Se obtuvo un total de 161 mg (0.01 %), fue soluble en metanol y mostro un pf de 81-83 °C.

4.5 Síntesis de los derivados del ácido *meso*-dihidroguaiarético

A partir del *AmDG* se sintetizaron 14 nuevos derivados los cuales incluyeron: 8 ésteres y 6 fosfatos, que corresponden a los derivados monosustituídos y disustituídos del producto natural.

4.5.1 Síntesis de ésteres. Reacción de Steglich

Para la síntesis de ésteres se utilizó la reacción de Steglich utilizando el *AmDG* (1 equivalente), el ácido carboxílico (1.5 - 1.8 equivalentes) y como catalizadores dicitclohexilcarbodiimida (DCC) 0.1 M y 2.0 eq de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP), usando diclorometano como disolvente (DCM)³⁴ en 2.5 mL de CH₂Cl₂ en agitación. En estas reacciones se obtuvieron rendimientos del 5% al 49% (Figura 10) En las reacciones de esterificación se obtuvo como subproducto también la DCU la cual se pudo eliminar por diferencia de solubilidad.

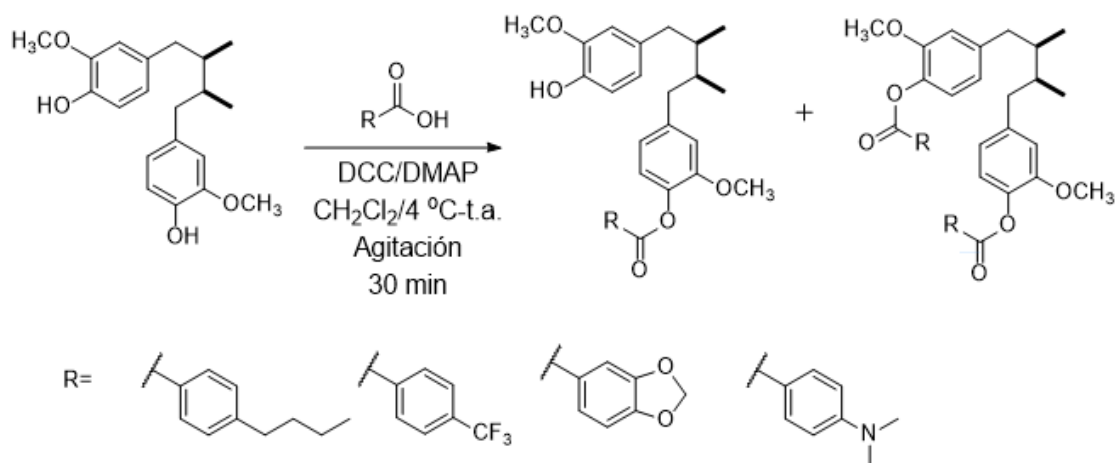


Figura 10. Reacción de esterificación de Steglich

Los derivados monosustituidos **1**, **3**, **5**, **7** y disustituidos **4**, **6**, **8** se obtuvieron por medio de la reacción de Steglich con diferentes condiciones de reacción (Tabla 4)

Tabla 4. Condiciones de reacción de esterificación

DERIVADO	CONDICIÓN DE REACCIÓN
1	<i>AmDG</i> 1 eq (25 mg), DMAP 1.1 eq (10.16 mg), DCC 1.5 eq (23.28 mg) ácido 4-dimetilaminobenzoico 1.5 eq (18.74 mg), DCM anhidro (2.5 mL), temperatura ambiente, 30 min.
3 y 4	<i>AmDG</i> 1 eq (30 mg), DMAP 1.1 eq (12.19 mg), DCC 1.5 eq (27.94 mg), ácido piperonílico 1.7 eq (25.64 mg), DCM anhidro (2.5 mL), temperatura ambiente, 2 h.
5 y 6	<i>AmDG</i> 1 eq (30 mg), DMAP 2.0 eq (21.97 mg), DCC 2.0 eq (39.93 mg), ácido 4-trifluorometil benzoico 2.0 eq (34.22 mg), DCM anhidro (2.5 mL), temperatura ambiente, 30 min.
7 y 8	<i>AmDG</i> 1 eq (30 mg), DMAP 2.0 eq (21.97 mg), DCC 2.0 eq (39.93 mg), ácido 4-butilbenzoico 2.0 eq (32.08 mg), DCM anhidro (2.5 mL), temperatura ambiente, 2h.

4.5.1.1 Síntesis de los derivados 1 y 2

Se disolvieron 25 mg (0.075 mmol) de *AmDG*, DMAP (0.083 mmol) y ácido 4-dimetilaminobenzoico (0.114 mmol) en 2.5 mL de DCM previamente deshidratado con malla molecular en agitación en baño de hielo, posteriormente se adicionó DCC (0.0114 mmol), después de 5 min se retiró del baño del hielo y se dejó a temperatura ambiente. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo cada 60 min durante 17 h por CCF empleando CHCl_3 : acetona 90:10 como fase móvil (Figura 11).

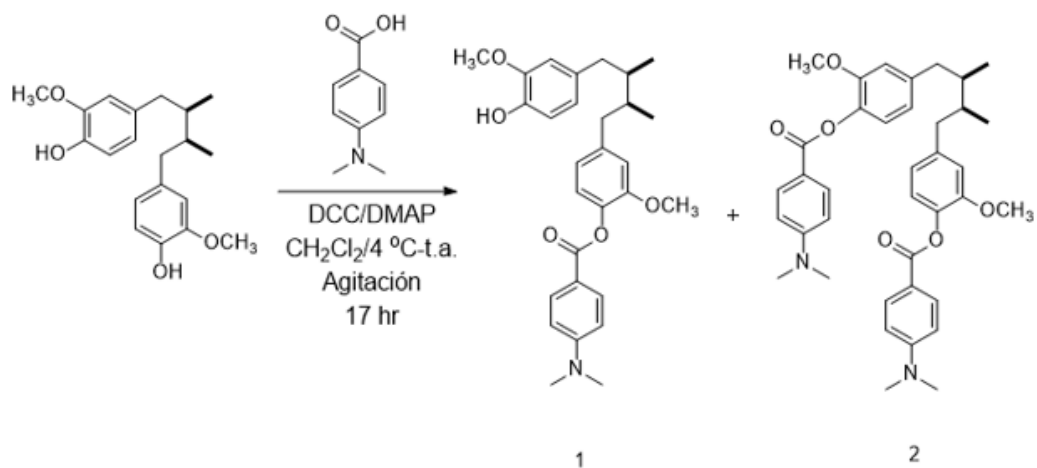


Figura 11. Síntesis de los derivados 1 y 2

Purificación: Una vez finalizada la reacción en el matraz de reacción se formó dicitclohexilurea (DCU) como un sólido blanco. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se procedió a purificar por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice en relación 1:20 y como fase móvil un gradiente de Hex/ CHCl_3 y CHCl_3 /MeOH con cambios de polaridad de 10%, el volumen de cada fracción fue de 500 μL . Como la separación no se pudo llevar a cabo, se realizó una placa preparativa de las fracciones 32-112

(Hexano/ CHCl_3 20:80) para la separación de los dos productos de reacción, teniendo como fase móvil CHCl_3 /Acetona 99:1.

4.5.1.2 Síntesis de los derivados 3 y 4

En baño de hielo con agitación se disolvieron 30 mg (0.0998 mmol) de *AmDG*, DMAP (0.0998 mmol) y ácido piperónilico (0.1543 mmol) en 2.5 mL de DCM previamente deshidratado con malla molecular. Posteriormente se adicionó DCC (0.01361 mmol), después de 5 min se retiró del baño del hielo y se dejó a temperatura ambiente. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo cada 60 min por 2 h en CCF teniendo como fase móvil Hex: Acetona 70:30 (Figura 12).

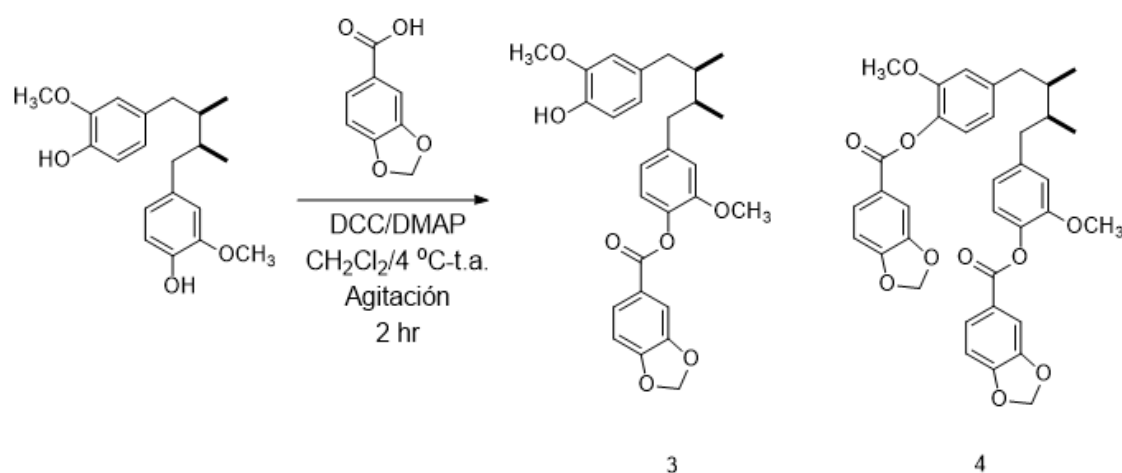


Figura 12. Síntesis de los derivados 3 y 4

Purificación: Una vez finalizada la reacción, en el matraz de reacción se formó diciclohexilurea (DCU) como un sólido blanco. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se procedió a purificar por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice en relación 1:50 y como fase móvil en gradiente Hex/ CHCl_3 y CHCl_3 /MeOH con cambios de polaridad de 2%, el volumen de cada fracción fue de 500 μL . Se realizó una placa

preparativa de las fracciones 106-135 (Hex/CHCl₃ 48:52) para la separación de los compuestos monosustituido y disustituido, teniendo como fase móvil CHCl₃/AcOEt 99:1. El compuesto monosustituido aislado de la cromatografía plana preparativa no estaba puro por lo que se realizó una columna cromatográfica para su purificación. Se empleó como fase estacionaria gel de sílice en una relación 1:30, y como fase móvil Hex/CHCl₃ en gradiente con cambios de polaridad de 10 % y un volumen de fracción de 200 µL. El compuesto monosustituido se obtuvo en las fracciones 61-100 (CHCl₃: AcOEt 50:50).

4.5.1.3 Síntesis de los derivados 5 y 6

Se disolvieron 30 mg (0.090 mmol) de *AmDG*, DMAP (0.18 mmol) y ácido 4-trifluorometil benzoico (0.18 mmol) en 2.5 mL de DCM previamente deshidratado con malla molecular en agitación en baño de hielo. Posteriormente, se adicionó DCC (0.18 mmol), después de 5 min se retiró del baño del hielo y se dejó a temperatura ambiente. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo cada 15 min durante 30 min en CCF teniendo como fase móvil Hex: AcOEt 70:30 (Figura 13).

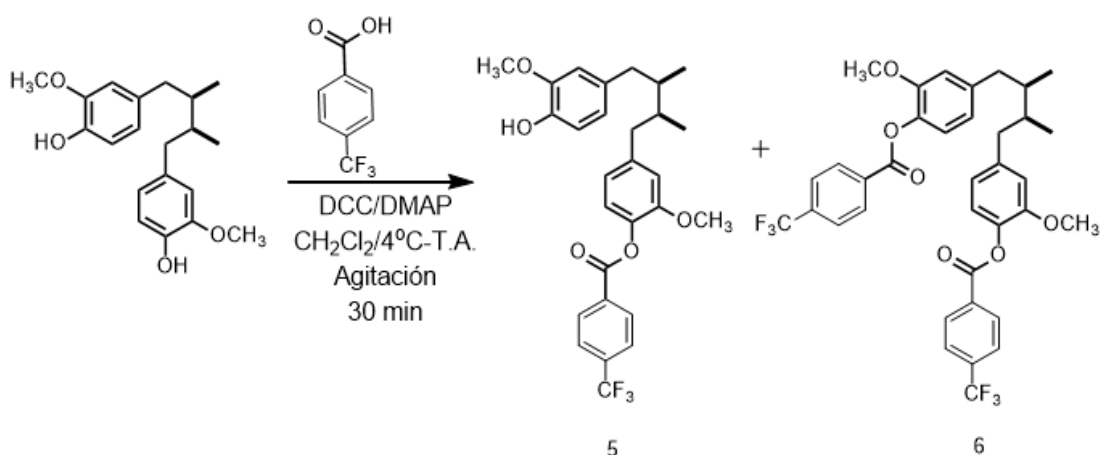


Figura 13. Síntesis de los derivados **5** y **6**

Purificación: Una vez finalizada la reacción, en el matraz de reacción se formó dicitclohexilurea (DCU) un sólido blanco, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se procedió a purificar por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice en relación 1:30 y como fase móvil en gradiente Hex/AcOEt con cambios de polaridad de 5%, el volumen de cada fracción fue de 1 mL. El compuesto monosustituido se obtuvo en la fracción 41-56 (Hex: AcOEt 85:15) y el compuesto disustituido no se pudo purificar por cromatografía en columna, por lo que se procedió a purificar por placa preparativa, teniendo como fase móvil CHCl₃/AcOEt (99:1).

4.5.1.4 Síntesis de los derivados **7** y **8**

En agitación en baño de hielo, se disolvieron 30 mg (0.090 mmol) de *AmDG*, DMAP (0.18 mmol) y ácido 4-butylbenzoico (0.18 mmol) en 2.5 mL de DCM previamente deshidratado con malla molecular. Posteriormente, se adicionó DCC (0.18 mmol), después de 5 min se retiró del baño del hielo y se dejó a

temperatura ambiente. El monitoreo de la reacción se llevó cada 30 min por 2 h por CCF teniendo como fase móvil Hex: Acetona (70:30) (Figura 14).

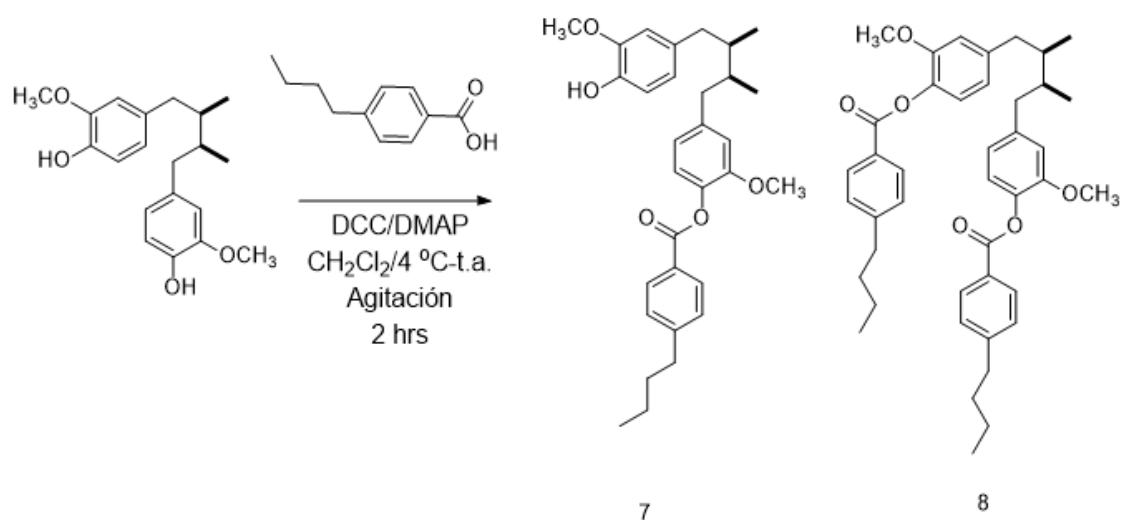


Figura 14. Síntesis de los derivados 7 y 8

Purificación: Una vez finalizada la reacción, en el matraz de reacción se formó dicitclohexilurea (DCU) un sólido blanco. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se procedió a purificar por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice en relación 1:30 y como fase móvil en gradiente Hex/Acetona con cambios de polaridad de 2%, el volumen de cada fracción fue de 1 mL. El compuesto monosustituido se obtuvo en la fracción 40-50 (Hex: acetona 98:2) y disustituido se obtuvo en la fracción 66-86 (Hex: acetona 98:2) pero este último no se obtuvo puro. Por lo que se procedió a realizar una columna cromatográfica teniendo como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex/acetona con cambios de polaridad de 5%, el volumen de cada fracción fue de 100 μ L. El compuesto disustituido se obtuvo en las fracciones 29-42 (Hex: acetona 80:20).

4.5.2 Síntesis de alquilfosfatos. Reacción de Atherton-Todd

Para la síntesis de alquilfosfatos se usó la reacción de Atherton-Todd la cual consiste en dos pasos. El primer paso es la formación de dialquil triclorometilfosfato como intermediario y el segundo paso es la sustitución nucleofílica en el fósforo. Para la reacción se utilizó el producto natural (1 equivalente), la fosfita (2.5 equivalentes) y como catalizadores 2.5 eq de diisopropiletilamina (DIPEA) y 0.12 eq de dimetilaminopiridina (DMAP), usando 6 eq de tetracloruro de carbono (CCl_4) como disolvente³⁵ (Figura 15).

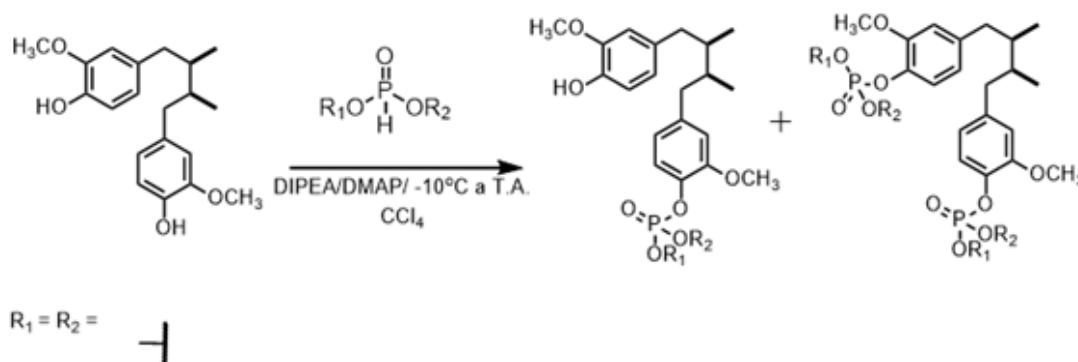


Figura 15. Reacción de alquilfosfatos de Atherton-Todd

Para la reacción de la fosforilación del ácido *meso* dihidroguaiarético con el grupo etil y el grupo bencil se utilizaron fosfitas cloradas. Para la reacción se agregaron 1 eq de *AmDG*, 3 eq de fosfita clorada y 1 eq de óxido de magnesio en 2.0 mL de CH_2Cl_2 previamente desecada en malla molecular (Figura 16).

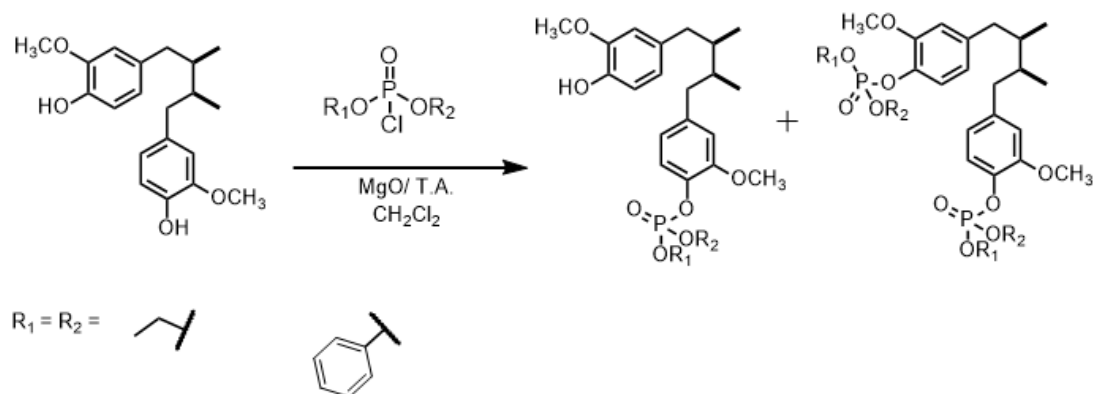


Figura 16. Reacción de fosforilación del AmDG con fosfitas cloradas.

Las fosfitas monosustituidas **9**, **11**, **13** y disustituidas **10**, **14** se obtuvieron con la reacción de Atherton-Todd con diferentes condiciones de reacción (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de reacción de fosforilación

DERIVADO	CONDICIONES DE REACCIÓN
9 y 10	AmDG 1 eq (25 mg), CCl ₄ 6 eq (0.043 mL), DIPEA 2.5 eq (0.031 mL), DMAP 0.12 eq (1.098 mg), dimetil fosfita 2.5 eq (0.0165 mL), DCM anhidro (2.5 mL), -10 °C, 1 h.
11	AmDG 1 eq (30 mg), MgO 1 eq (3.65 mg), dietilclorofosfato 1.8 eq (145.3 μL), DCM anhidro (2.5 mL), temperatura ambiente, 24 h.
13 y 14	AmDG 1 eq (30 mg), MgO 1 eq (3.65 mg), difenilclorofosfato 1.8 eq (33.87 μL), DCM anhidro (2.5 mL), temperatura ambiente, 17 h.

4.5.2.1 Síntesis de los compuestos **9** y **10**

Se disolvieron 25 mg (0.075 mmol) de AmDG en 2.5 mL de DCM previamente tratado con malla molecular, se agitó por 1 min a temperatura ambiente. Después se enfrió a -10 °C en un baño de hielo y se adicionó CCl₄ (0.45

mmol), se agitó durante 3 min y se agregó DIPEA (0.18 mmol) y DMAP (0.009 mmol). Continuando en agitación a -10 °C se adicionó dimetil fosfita (0.18 mmol) gota a gota lentamente. El monitoreo de la reacción se llevó cada 30 min por 1 h por CCF teniendo como fase móvil CHCl₃: acetona 80:20 (Figura 17).

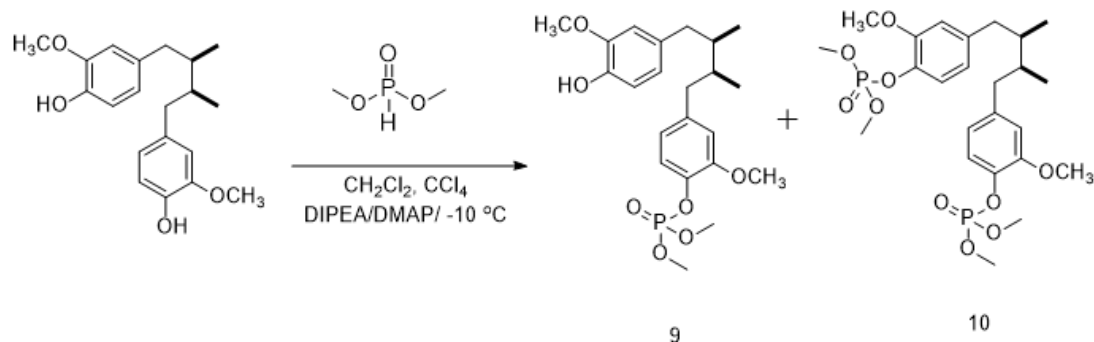


Figura 17. Síntesis de los derivados **9** y **10**

Tratamiento de la reacción: Se realizó una extracción líquido-líquido, se extrajo 3 veces la mezcla de reacción con 5 mL de AcOEt y 3 mL de agua desionizada. A la fase orgánica se le agregaron 5 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se pasó a través en una cama de sulfato de sodio.

Purificación: La mezcla de reacción se procedió a purificar por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice en relación 1:30 y como fase móvil un gradiente de hex/acetona con cambios de polaridad de 2%, el volumen de cada fracción fue de 1.1 mL. El compuesto monosustituido se obtuvo en la fracción 21-23 (CHCl₃: acetona 95:5) y disustituido se obtuvo en las fracciones 26-35 (CHCl₃: acetona 95:5).

4.5.2.2 Síntesis de los compuestos 11 y 12

Se disolvieron 30 mg (0.090 mmol) de *Am*DG en 2.5 mL de DCM previamente secado con malla molecular, se agregó dietilclorofosfato (0.163 mmol) y óxido de magnesio (0.09 mmol), continuando con agitación a temperatura ambiente. El monitoreo de la reacción se llevó cada hora y se dejó en agitación por 24 h por CCF teniendo como fase móvil CHCl_3 : AcOEt 70:30 (Figura 18).

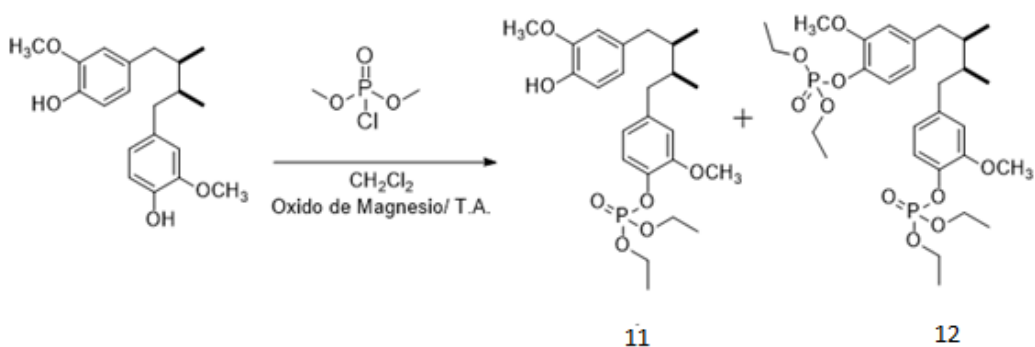


Figura 18. Síntesis de los derivados 11 y 12

Purificación: La mezcla de reacción se procedió a purificar por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice en relación 1:20 y como fase móvil un gradiente de Hex/ CHCl_3 con cambios de polaridad de 5%, el volumen de cada fracción fue de 1.0 mL. En las fracciones 93-124 (Hex/ CHCl_3 40:60) se obtuvo el derivado monosustituido de la reacción. En esta reacción solo se pudo sintetizar el compuesto monosustituido.

4.5.2.3 Síntesis de los compuestos 13 y 14

Se disolvieron 30 mg (0.090 mmol) de *AmDG* en 2.5 mL de DCM previamente secado con malla molecular, se agregó difenilclorofosfato (0.163 mmol) y oxido de magnesio (0.09 mmol), continuando con agitación a temperatura ambiente. El monitoreo de la reacción se llevó cada hora y se dejó en agitación por 17 h por CCF teniendo como fase móvil CHCl_3 : acetona 80:20 (Figura 19).

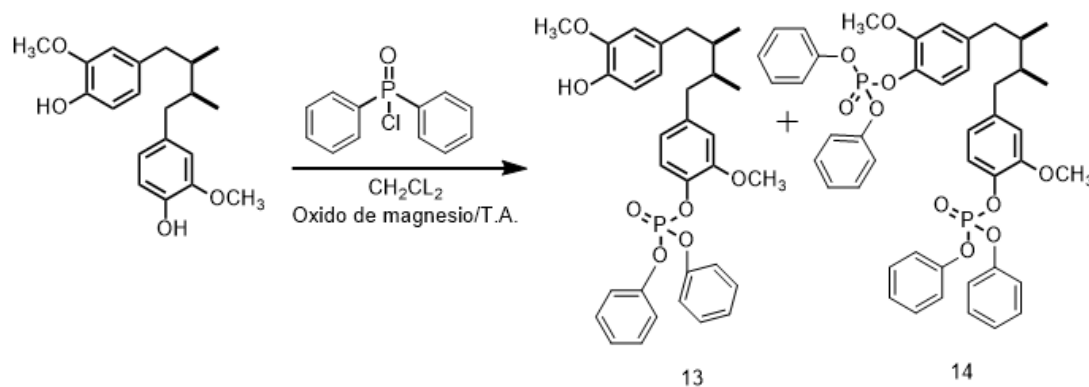


Figura 19. Síntesis de los derivados 13 y 14

Purificación: La mezcla de reacción se procedió a purificar por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice en relación 1:40 y como fase móvil un gradiente de Hex/ CHCl_3 con cambios de polaridad de 2%, el volumen de cada fracción fue de 1.5 mL. En las fracciones 71-100 (Hex: CHCl_3 40:60) se observó la mezcla del derivado monosustituido y disustituido por lo que se procedió a realizar la purificación de los mismos en placa preparativa con un sistema Hex: CHCl_3 : Acetona 0.5:9:0.5.

4.5.3 Síntesis de 4,4',3-trimetoxi-6,7'-ciclolignano.

Se disolvieron 50 mg (0.1677 mmol) de 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano en 2 mL de acetona, se agregó 17.75 μ L (0.2851 mmol) de carbonato de potasio y 40.46 μ L (0.2851 mmol) de yodo metano, se dejó reaccionar estando en agitación a reflujo a 50°C. Se agregaron 17.75 μ L (0.2851 mmol) de yodo metano a la hora de reacción y se dejó reaccionar por 24 h, se adicionó 5.21 μ L (0.08385 mmol) y se dejó reaccionar 72 hrs. Se monitoreó la reacción por CCF teniendo como fase móvil Hexano: acetona 70:30 (Figura 20).

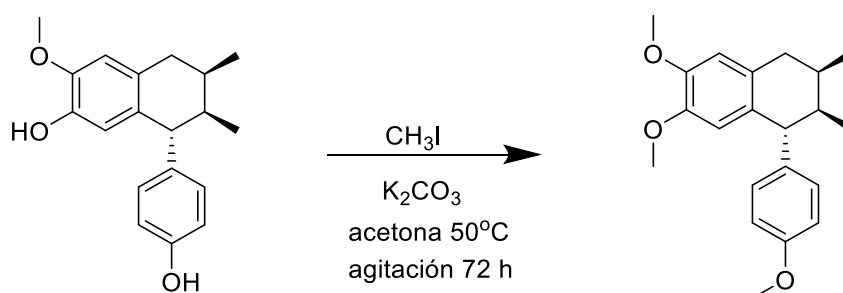


Figura 20. Síntesis del derivado 15

Purificación: La mezcla de reacción se procedió a purificar por cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice en relación 1:30 y como fase móvil un gradiente de Hex/acetona con cambios de polaridad de 5%, el volumen de cada fracción fue de 1.5 mL. En las fracciones 85-96 (Hex: acetona 90:10) se obtuvo el derivado disustituido del producto natural.

4.7. Ensayos biológicos

4.7.1. Determinación de la actividad antimicobacteriana

Cepas empleadas: *M. tuberculosis* H37Rv (American Type Culture Collection, ATCC 27794) sensible a todos los antifímicos de primera línea (estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida) y un aislado clínico MFR: G122 resistente a rifampicina, isoniacida y etambutol.

Cultivo de bacterias y preparación de inóculo: Cada una de las cepas se cultivó a 37 °C en el medio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado con 0.2% de glicerol y 10% OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa catalasa) hasta tener un cultivo en fase logarítmica. Cada cultivo se mezcló con un volumen suficiente de Middlebrook 7H9 estéril ajustando al tubo No.1 de McFarland. Para obtener el inóculo para la prueba se diluyó 1:20 con el mismo medio de cultivo antes mencionado.

Ensayo

La actividad antimicobacteriana se determinó por el método de Alamar azul descrito por Franzblau *et al.* (1998)³⁶. El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos. Cada derivado se evaluó a 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.562 µg/mL, cada concentración se ensayó por duplicado. Se colocaron 200 µL de agua estéril en los pozos de la fila A y en los pozos H1, H2, H3, H10, H11 y H12, dejando los pozos del centro sin agua. Al resto de los pozos de la placa se le agregaron 100 µL de medio Middlebrook. Después se añadieron 100 µL de la solución de trabajo de cada derivado en la fila B.

Se realizaron diluciones 1:2 a lo ancho de la placa y posteriormente se añadieron 100 μ L del inóculo bacteriano previamente preparado. En los pocillos que quedaron en la fila H se prepararon tres controles 100:100, 100:10 y 1:100, los cuales representan el 100%, 10% y 1% de la población bacteriana a ensayar. Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días, después de este tiempo se le adicionaron 20 μ L de reactivo Resazurina y 12 μ L de Tween 80 al 10% a los pocillos de los controles sin tratar, se incubaron a 37 °C por 24 horas. Pasado este tiempo, si los controles viraron de coloración de manera adecuada, se agregó colorante al resto de los pocillos y se incubaron nuevamente a 37 °C por 24 y 48 horas. Al término de la incubación se evaluaron de forma visual el crecimiento o inhibición de la bacteria, tomándose como inhibición los pocillos donde no hubo cambio de color (azul), mientras que en los pocillos donde hubo cambio a color rosa se tomó como crecimiento bacteriano. Se utilizó etambutol, rifampicina, isoniazida como controles positivos. Se determinaron la CMI como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria.²⁰

4.7.2 Actividad contra bacterias resistentes

La actividad antibacteriana se determinó por el método de microdilución reportado previamente por Zgoda *et al.* (2001)³⁷ en aislados clínicos de bacterias de farmacorresistentes (Tabla 6):

Tabla 6. Aislados clínicos de bacterias farmacorresistentes

BACTERIA	RESISTENCIA
Gram- negativas	
<i>Staphylococcus aureus</i> (14-2095)	Resistente a meticilina
<i>Enterococcus faecium</i> (10984)	Resistente a vancomicina
Gram- positivas	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (12666)	Resistente a carbapenémicos
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (OXA-48)	Resistente oxacilinas
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (14-2081)	Productora de BLEE
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (13-1391)	Resistente a carbapenémicos
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NDM-1+ (14-3335)	Resistente a carbapenémicos y cefalosporinas de amplio espectro
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (17-1692)	Productora de BLEE

BLEE: Producción de β -lactamasas de espectro extendido y NDM-1+: Nueva Delhi Metalo beta-lactamasa 1

Cultivo de bacterias y preparación de inóculo

Las bacterias se cultivaron en agar sangre, se incubaron durante 24 h. Se tomaron de 3-5 unidades formadoras de colonia (UFC) y se suspendieron en 5 mL de solución salina, se ajustó a 0.5 de la escala de McFarland. Se tomaron 10 μ L de la suspensión y se agregaron a 11 mL de medio Müller Hinton.

Ensayo

En una placa de 96 pocillos se agregaron 100 μ L de medio de cultivo a cada pocillo, posteriormente en la fila A se agregan 100 μ L del compuesto a evaluar (por duplicado). Se realiza una dilución seriada mezclando con una micropipeta, tomando 100 μ L y pasando a la fila B y así sucesivamente, en la fila H los 100 μ L se desecharon. Finalmente, se agregaron 100 μ L de la suspensión bacteriana de la fila A la fila G. Se incubaron por 24 h y 48 h (*S. epidermis* y *K. pneumoniae*). La determinación de actividad se llevó a cabo de forma visual tomando como crecimiento turbidez y como inhibición el pocillo transparente utilizando cámara de contraste para determinar la CMI como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria.

4.7.2. Citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad se determinó en macrófagos por el método de microdilución usando bromuro 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (Denizot *et al.* 1986)³⁸.

Ensayo:

Los macrófagos J774A.1 se sembraron (8×10^4 células/pozo) en DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco por sus siglas en inglés) en una placa de 96 pocillos con el compuesto a una concentración por triplicado de 1 a 200

$\mu\text{g/mL}$ disueltos en DMSO. Después de 48 h de tratamiento, se agregó 10 $\mu\text{g/mL}$ de solución MTT (5 mg/mL en solución salina de buffer de fosfatos) a cada pocillo, y se incubó por 4 h a 37 °C. Terminado ese tiempo el medio se eliminó y los cristales de formazan fueron disueltos en 100 μL de DMSO. La densidad óptica se midió a 540 nm usando un lector de placas BioRad. La determinación se midió por triplicado para determinar la viabilidad utilizando la ecuación:

$$\%Viabilidad = \frac{\text{Densidad óptica de macrófagos tratados}}{\text{Densidad óptica de los macrófagos controles}} \times 100$$

4.7.3. Docking

Se realizó el docking en la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR). Se tomó de la base de datos UniProt con el número de acceso P9WNS1. La estructura 4A03 es la proteína que posee como cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y se encuentra unida a el antibiótico experimental FR-900098 que son esenciales para la funcionalidad de la proteína y así la cristalografía pertenece a la conformación activa de la proteína³⁹. Para relajar la estructura se sometió a una dinámica molecular de 10 ns en un ensamble isotérmico-isobárico utilizando el campo de fuerza amber 99 en el programa Gromacs 2016.4., se usaron los parámetros de manganeso y NADP los cuales fueron adaptados para su uso en Gromacs utilizando Acypype. El análisis de la dinámica molecular mostró que la simulación fue estable durante el tiempo de simulación, ya que los parámetros termodinámicos (tabla 7) que se mantuvieron estables durante la

simulación. Por lo tanto, la información emana de esta simulación se puede usar con confianza para otros análisis o cálculos.

Tabla 7. Parámetros termodinámicos en la dinámica molecular

Parámetro	Promedio	Error estándar	Deriva total
Energía potencial (kJ/mol)	-2.36336 x 10 ⁶	150	-1019.08
Energía cinética (kJ/mol)	383665	6.1	24.3986
Energía total (kJ/mol)	-1.9797 x 10 ⁶	150	-994.682
Temperatura (K)	300.002	0.0047	0.0190777
Presión (bar)	0.705118	0.25	-0.0534394
Volumen (nm ³)	1526.51	0.056	-0.372916
Densidad (kg/m ³)	1023.81	0.038	0.250153

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Propiedades físicas y espectroscópicas de los productos naturales y derivados semisintéticos.

A los productos naturales y los derivados semisintéticos se les realizó RMN ^1H , RMN ^{13}C y HRMS, teniendo diferentes propiedades físicas y espectroscópicas presentadas a continuación.

5.1.1. Ácido *meso*-dihidroguaiarético.

Sólido blanco; pf 80-82 °C; 0.38% de rendimiento; RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 6.81 (d, $J=8.04$ Hz, 2H-5,5'), 6.64 (dd, $J=7.94$, 1.70 Hz, 2H-6,6'), 6.60 (d, $J=1.72$ Hz, 2H-2,2'), 5.45 (s, 2H-OH), 3.85 (s, 6H-OMe), 2.70 (dd, $J=13.44$, 5 Hz, 2H-7a), 2.25 (dd, $J=13.5$, 9.2 Hz, 2H-7b), 1.71 (m, 2H-8), 0.83 (d, $J=6.6$ Hz, 6H-2Me); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 146.2, 143.5, 133.7, 121.6, 113.9, 111.41, 55.84, 39.18, 38.88, 16.21.

5.1.2. LT16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano.

Sólido blanco; pf: 100-102°C ; 0.07% de rendimiento: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 6.86 (d, $J=8.48$ Hz, 2H-2', 6'), 6.68 (d, $J=8.44$ Hz, 2H-3', 5'), 6.56 (s, 1H-2), 6.38 (s, 1H-5), 5.33 (s, 1H-OH-4), 4.76 (s, 1H-OH-4'), 3.86 (s, 3H-MeO-3), 3.60 (d, $J=6.24$, 1H-7'), 2.84 (dd, $J=16.38$, 5.36 Hz, 1H-7a), 2.42 (dd, $J=16.36$, 7.4 Hz, 1H-7b), 1.98 (m, 1H-8), 1.6 (m, 1H-8'), 0.88 (d,

$J= 7.92$ Hz, 3H-9'), 0.87 (d, $J= 7.92$ Hz, 3H-9); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 153.53, 144.95, 143.46, 139.42, 130.83, 130.15, 127.76, 116.06, 114.82, 110.57, 55.8, 50.0, 40.69, 35.17, 26.98, 16.08.

5.1.3. LT3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona.

Sólido amarillo; Pf: 258-260 °C, 0.014% de rendimiento: RMN ^1H (Acetona- D_6 , 400 MHz) δ 11.28 (s, 1-OH-5), 9.1 (s, 1H-OH-4'), 8.11 (d, $J=8.76$ Hz, 2H-2',6'), 7.03 (d, $J= 8.76$ Hz, 2H-3', 5'), 6.50 (s, 1H-6), 3.97 (s, 3H-MeO-7), 3.89 (s, 3H, MeO-3), RMN ^{13}C (Acetona- D_6 , 100 MHz) δ 179.10, 160.05, 155.99, 153.78, 143.31, 138.03, 130.45, 130.25, 126.52, 122.02, 115.50, 111.89, 105.02, 94.93, 59.28, 55.98.

5.1.4. Derivado 1: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil 4-(dimetilamino)benzoato.

Resina; 22.4 % de rendimiento: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.05 (d, $J= 9.8$ Hz, 2H-2'',5''), 7.01 (d, $J= 7.92$ Hz, 2-H-3'',5''), 6.81 (d, $J= 7.96$ Hz, 1H-5'), 6.76 (dd, $J= 7.96$, 1.8 Hz, 1H-6') 6.74 (d, $J= 1.8$ Hz, 1H-2), 6.66 (dd, $J= 7.96$, 1.8 Hz, 1H-6), 6.65 (d, $J=8.04$, 1.88 z, 2H-3'', 5''), 6.62 (d, $J= 0.9$ Hz, 1H-2), 5.45 (s, 1H-OH), 3.86 (s, 3H-MeO-3'), 3.77 (s, 3H-MeO-3), 3.07 (s, 6H-Me-N), 2.80 (dd, $J= 13.4$, 4.96 Hz, 1H-7a), 2.74 (dd, $J= 13.56$, 4.96 Hz, 1H-7a'), 2.32 (m, 2H-7b,7b'), 1.78 (m, 2H-8,8'), 0.87 (d, $J= 6.52$ Hz, 3H-Me-9), 0.85 (d, $J= 6.56$ Hz, 3H-Me-9'); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 165.24, 153.66, 151.26, 146.34, 143.59, 140.39, 138.35, 133.69, 132.07, 122.69, 121.71, 121.23, 116.12, 113.97, 113.27, 111.43, 110.78, 55.95,

55.90, 40.09, 39.29, 39.16, 39.04, 29.70, 16.33, 16.17; HRMS m/z calculada para $C_{29}H_{35}NO_5$ [M+H]: 477.2515, obtenida [M+H]: 477.2515.

5.1.5. Derivado 3: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenyl benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxilato.

Resina; 15.8 % de rendimiento: RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.83 (dd, $J=$ 8.18, 1.70 Hz, 1H-6'), 7.64 (d, $J=$ 1.64 Hz, 1H-2'), 7.03 (d, $J=$ 7.92, 1H-6''), 6.91 (d, $J=$ 8.16, 1H-6'''), 6.84 (d, $J=$ 7.96 Hz, 1H-6'''), 6.76 (dd, $J=$ 7.98, 1.72 Hz, 2H-5,5'), 6.68 (dd, $J=$ 7.98, 1.86 Hz, 1H-6'), 6.65 (d, $J=$ 1.8 Hz, 1H-6), 6.09 (s, 2H), 5.48 (s, 1H-OH), 3.88 (s, 3H-OMe3'), 3.80 (s, 3H-OMe3), 2.74 (dd, $J=$ 13.46, 5.2 Hz, 2H-7a,7a'), 2.33 (m, 2H-7b,7b'), 1.8 (m, 2H-8,8'), 0.8 (dd, $J=$ 6.64, 3.6 Hz, 6H-Me). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 164.26, 152.04, 150.99, 147.83, 146.36, 143.62, 140.87, 137.96, 133.63, 126.26, 123.49, 122.39, 121.71, 121.24, 113.99, 113.24, 111.43, 110.13, 108.11, 101.89, 55.90, 33.32, 39.11, 39.07, 38.99, 29.70, 16.35, 16.14.

5.1.6. Derivado 4: ((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyl) bis(2-metoxi-4,1-fenileno) bis(benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxylato.

Sólido blanco; Pf: 84-86 °C, 6.5 % de rendimiento: RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.81 (dd, $J=$ 8.18, 1.70 Hz, 2H-6'',6'''), 7.62 (d, $J=$ 1.64 Hz, 2H-2'',2'''), 7.02 (d, $J=$ 7.88 Hz, 2H-5'',5'''), 6.88 (d, $J=$ 8.16 Hz, 2H-5,5'), 6.78 (d, $J=$ 1.72 Hz, 2H-2,2'), 6.76 (s, 2H-6,6'), 6.07 (s, 4H-CH₂-O), 3.79 (s, 6H, OMe-3,3'), 2.80 (dd, $J=$ 13.48, 4.84 Hz, 2H-7a,7a'), 2.38 (d, $J=$ 4.08 Hz,

1H-7b), 2.35 (d, $J = 2.76$ Hz, 1H-7b'), 2.26 (m, 2H-8,8'), 0.84 (d, $J = 8$ Hz, 6H-9,9'). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 164.25, 152.02, 151.02, 147.81, 140.73, 137.96, 126.26, 123.47, 122.44, 121.22, 113.20, 110.13, 108.11, 101.88, 55.92, 39.28, 39.17, 29.70, 29.36, 16.26. HRMS m/z calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$ [M+H]: 626.2152, obtenida [M+H]: 626.2173.

5.1.7. Derivado 5: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil 4-(trifluorometil)benzoato.

Resina; 47.7 % de rendimiento: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.31 (d, $J = 8.08$ Hz, 2H-2'',6''), 7.76 (d, $J = 8.24$ Hz, 2H-3'',5''), 7.03 (d, $J = 7.92$ Hz, 1H-5), 6.82 (d, $J = 7.92$, 1H-5'), 6.78 (dd, $J = 8$, 1.76 Hz, 1H-6), 6.75 (d, $J = 1.72$ Hz, 1H-2), 6.67 (dd, $J = 7.4$, 1.8 Hz, 1H-6'), 6.64 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H-2'), 5.46 (s, 1H-OH), 3.86 (s, 3H-OMe3'), 3.77 (s, 3H-OMe3), 2.82 (dd, $J = 13.34$, 3.44 Hz, 1H-7a), 2.74 (dd, $J = 13.72$, 4.32 Hz, 1H-7a'), 2.36 (dd, $J = 12.8$, 9.48 Hz, 1H-7b), 2.32 (dd, $J = 13.16$, 5.88 Hz, 1H-7b'), 1.78 (m, 2H-8,8'), 0.88 (d, $J = 6.64$ Hz, 3H-Me-9), 0.86 (d, $J = 6.68$ Hz, 3H-Me-9'). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 163.71, 150.77, 146.36, 143.64, 141.35, 137.62, 133.58, 132.85, 130.67, 126.99, 125.56, 125.52, 122.17, 121.71, 121.28, 114.01, 113.24, 111.43, 55.86, 55.89, 39.36, 39.13, 39.07, 38.97, 16.12, 16.38. HRMS m/z calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{O}_5$ [M+H]: 502.1967, obtenida [M+H]: 502.1967.

5.1.8. Derivado 6: ((2R,3S)-2,3- dimetilbutano-1,4-diyl) bis(2-metoxi-4,1-fenilene) bis(4-(trifluorometil)benzoato).

Sólido blanco; Pf: 96-98 °C, 59.1 % de rendimiento: RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.31 (d, *J*= 8.08 Hz, 4H- 2'',2''', 6'', 6'''), 7.76 (d, *J*= 8.24 Hz, 4H- 3'',5'',3''',5'''), 7.05 (d, *J*= 5 Hz, 2H-5,5'), 6.80 (dd, *J*= 8.22, 1.72 Hz, 2H- 6,6'), 6.79 (d, *J*= 1.72 HZ, 2H-2,2'), 3.78 (s, 6H-OMe3,3'), 2.81 (dd, *J*= 13.38, 4.88 Hz, 2H-7a,7a'), 2.38 (dd, *J*= 13.42, 9.36 Hz, 2H-7b,7b'), 1.85 (m, 2H-8,8'), 0.90 (d, *J*= 6.56 Hz, 6H-Me9,9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 163.69, 150.82, 141.15, 137.68, 135.02, 132.89, 130.67, 125.56, 125.53, 122.25, 121.25, 113.23, 55.89, 39.31, 39.17, 16.28. HRMS *m/z* calculada para C₃₆H₃₂F₆O₆ [M+H]: 674.2103, obtenida [M+H]: 674.2138.

5.1.9. Derivado 7: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil-4-butilbenzoato.

Resina; 49.7 % de rendimiento: RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.1 (d, *J*= 8.28 Hz, 2H-2'',6''), 7.29 (d, *J*= 8.32 Hz, 2H-3'',5''), 7.01 (d, *J*= 7.92 Hz, 1H-5'), 6.81 (d, *J*= 7.96 Hz, 1H-5), 6.77 (d, *J*= 1.8 Hz, 1H-2'), 6.74 (dd, *J*= 5, 1.76 Hz, 1H-6), 6.65 (dd, *J*= 8, 1.8 Hz, 1H-6'), 6.62 (d, *J*= 1.8 Hz, 1H-2), 5.45 (s, 1H-OH), 3.86 (s, 3H-OMe3'), 3.77 (s, 3H-OMe3), 2.80 (dd, *J*= 13.38, 4.8 Hz, 1H-7a), 2.74 (dd, *J*= 14.2, 5.32 Hz, 1H-7a'), 2.60 (t, *J*= 7.76 Hz, 1H-7''), 2.29 (m, 7b,7b'), 1.76 (m, 2H-8,8'), 1.60 (m, 2H-8'), 1.33 (Sex, *J*= 7.4 Hz, 2H-9'), 0.92 (t, *J*= 7.34 Hz, 3H-Me10'), 0.86 (d, *J*= 6.6 Hz, 3H-9), 0.85 (d, *J*= 6.6 Hz, 3H-9'). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 164.96, 151.04, 149.08, 146.35, 143.61, 140.82, 138.01, 133.64, 130.34, 128.58, 127.03, 122.43,

121.71, 121.24, 113.99, 113.26, 111.42, 55.89, 39.31, 39.13, 39.05, 39.00, 35.79, 33.30, 22.32, 16.34, 16.15, 13.91. HRMS m/z calculada para $C_{31}H_{38}O_5$ [M+H]: 490.2719, obtenida [M+H]: 490.2758.

5.1.10. Derivado 8: ((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyl) bis(2-metoxi-4,1-fenilene) bis(4-butilbenzoato)

Sólido blanco; Pf: 107-109 °C 41.6 % de rendimiento: RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.1 (d, $J= 6.6$ Hz, 4H-3'', 3''',5'',5'''), 7.29 (d, $J= 8.32$ Hz, 4H-2'',2''',6'',6'''), 7.02 (d, $J= 7.92$ Hz, 2H-5,5'), 6.78 (dd, $J= 8.54, 1.8$ Hz, 2H-6,6'), 6.77 (d, $J= 1.8$ Hz, 2H-2,2'), 3.78 (s, 6H-OMe-3), 2.80 (dd, $J= 13.4, 4.84$ Hz, 2H-7a,7a'), 2.67 (t, $J= 7.76$ Hz, 4H-7'',7'''), 2.38 (dd, $J= 13.4, 9.36$ Hz, 2H-7b, 7b'), 1.79 (m, 2H-8,8'), 1.61 (dp, $J= 7.4, 1.8$ Hz, 4H-8'', 8'''), 1.34 (sex, $J= 7.4$ Hz, 4H-9'', 9'''), 0.94 (t, $J= 7.32$ Hz, 6H-Me10'',10'''), 0.90 (d, $J= 6.6$ Hz, 6H-9,9'). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 164.96, 151.08, 149.08, 140.69, 138.04, 130.35, 128.58, 127.03, 122.48, 121.24, 113.24, 55.93, 39.30, 39.18, 35.78, 33.30, 22.32, 16.27, 13.91. HRMS m/z calculada para $C_{42}H_{50}O_6$ [M+H]: 650.3670, obtenida [M+H]: 650.365.

5.1.11. Derivado 9: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil dimetil fosfato.

Resina; 31.2 % de rendimiento: RMN 1H (MeOD, 400 MHz) δ 7.15 (dd, $J= 8.64, 1.32$ Hz, 1H-6), 6.81 (d, $J= 7.92$ Hz, 1H-5), 6.67 (d, $J= 7.92$ Hz, 1H-2),

6.69 (d, $J = 7.92$ Hz, 1H-5), 6.66 (d, $J = 1.88$ Hz, 1H-2), 6.63 (dd, $J = 8.22$, 1.8 Hz, 1H-6'), 3.89 (s, 3H-OMe-3'), 3.80 (d, $J = 3.28$ Hz, 6H-MeOP), 3.83 (s, 3H-OMe3), 2.76 (dd, $J = 13.52$, 4.64 Hz, 1H-7a), 2.71 (dd, $J = 13.6$, 8.2 Hz, 1H-7a'), 2.32 (dd, $J = 13.92$, 4.88 Hz, 1H-7b), 2.28 (dd, $J = 13.48$, 9.56 Hz, 1H-7b'), 1.72 (m, 2H-8,8'), 0.85 (d, $J = 6.76$ Hz, 3H-9), 0.83 (d, $J = 6.76$ Hz, 3H-9'). RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz) δ 150.26, 146.36, 143.63, 139.94, 137.68, 133.57, 121.68, 121.24, 120.82, 120.79, 114.00, 113.43, 111.42, 55.89, 54.90, 54.84, 39.36, 39.12, 38.94, 38.87, 16.09, 16.32. HRMS m/z calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_7\text{P}$ [M+H]: 438.1807, obtenida [M+H]: 438.181.

5.1.12. Derivado 10: 4-((2R,3S)-4-(4-((dimetoxifosforil)oxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil dimetil fosfato.

Resina; 44.9 % de rendimiento: RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) δ 7.17 (dd, $J = 8.08$, 0.96 Hz, 2H-5, 5'), 6.71 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H-2, 2'), 6.70 (dd, $J = 8.08$, 1.8 Hz, 2H-6, 6'), 3.91 (d, $J = 0.36$ Hz, 6H- MeOP), 3.89 (d, $J = 0.36$ Hz, 6H-MeOP), 3.86 (s, 6H-OMe3,3'), 2.75 (dd, $J = 13.36$, 4.76 Hz, 2H-7a,7a'), 2.31 (dd, $J = 13.36$, 9.4 Hz, 2H-7b, 7b'), 1.77 (m, 2H-8,8'), 0.86 (d, $J = 6.64$ Hz, 6H-9,9'). RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz) δ 150.31, 150.26, 139.75, 137.82, 137.75, 121.23, 120.88, 120.85, 113.42, 55.99, 54.90, 54.84, 39.15, 39.11, 16.19. HRMS m/z calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_{10}\text{P}_2$ [M+H]: 546.1784, obtenida [M+H]: 546.1781.

5.1.13. Derivado 11: dietil (4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil) fosfato.

Resina; 44.9 % de rendimiento: RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) δ 7.09 (d, $J=$ 8.08 Hz, 1H-5), 6.81 (d, $J=$ 1.92 Hz, 1H-2), 6.74 (dd, $J=$ 7.96, 1.92 Hz, 1H-6), 6.72 (d, $J=$ 7.64 Hz, 1H-5'), 6.71 (d, $J=$ 1.92 Hz, 1H-2'), 6.62 (dd, $J=$ 7.84, 1.16 Hz, 1H-6'), 4.21 (m, 4H-1''), 3.83 (s, 3H-OMe3), 3.82 (s, 3H-OMe3'), 2.80 (dd, $J=$ 13.38, 4.93 Hz, 1H-7a), 2.71 (dd, $J=$ 13.48, 5.72 Hz, 1H-7a'), 2.36 (dd, $J=$ 13.52, 8.72 Hz, 1H-7b), 2.32 (dd, $J=$ 13.28, 4.56 Hz, 1H-7b'), 1.76 (m, 2H-8,8'), 1.34 (t, $J=$ 7.06 Hz, 6H-Me2''), 0.87 (, $J=$ 6.8 Hz, 3H-9), 0.85 (d, $J=$ 6.8 Hz, 3H-9). RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz) δ 150.50, 150.45, 147.74, 144.11, 140.48, 137.49, 133.09, 121.17, 120.76, 120.39, 114.54, 113.17, 112.22, 64.73, 64.67, 54.96, 38.91, 38.63, 38.45, 38.16, 15.27, 15.09, 14.99, 14.99. HRMS m/z calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_7\text{P}$ [M+H]: 466.2120, obtenida [M+H]: 466.2121.

5.1.14. Derivado 13: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil difenil fosfato.

Resina; 20 % de rendimiento: RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) δ 7.40 (t, $J=$ 7.46 Hz, 4H-2'', 6''), 7.26 (t, $J=$ 7.33 Hz, 6H-3'', 4'', 5''), 7.02 (d, $J=$ 8.12 Hz, 1H-5), 6.80 (sa, 1H-2), 6.74 (sa, 1H-2'), 6.71 (d, $J=$ 8.12 Hz, 1H-5'), 6.71 (dd, $J=$ 8, 1.44 Hz, 1H-6), 6.61 (dd, $J=$ 7.96, 1.44 Hz, 1H-6'), 3.79 (s, 3H-OMe3'), 3.70 (s, 3H-OMe3), 2.79 (dd, $J=$ 13.36, 5.08 Hz, 1H-7a'), 2.70 (dd, $J=$ 13.52, 5.76 Hz, 1H-7a), 2.31 (m, 2H-7b,7b'), 1.78 (m, 2H-8,8'), 0.87 (d,

$J = 6.24\text{ Hz}$, 3H-9), 0.86 (d, $J = 6.24\text{ Hz}$, 3H-9'). RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz) δ 150.52, 150.44, 147.38, 144.07, 141.23, 137.32, 133.04, 129.61, 125.51, 121.15, 119.86, 119.81, 114.31, 113.27, 112.13, 54.93, 54.89, 38.81, 38.62, 38.36, 38.17, 15.25, 15.12. HRMS m/z calculada para $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{O}_7\text{P}$ [M+H]: 562.2120, obtenida [M+H]: 562.2167.

5.1.15. Derivado 14: 4-((2S,3R)-4-(4-((difenoxifosforil)oxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil difenil fosfato.

Sólido blanco; Pf: 125-127 °C, 16.6 % de rendimiento: RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) δ 7.39 (td, $J = 7.9, 1.62\text{ Hz}$, 8H-2'', 6''), 7.25 (t, $J = 7.33\text{ Hz}$, 12H-3'', 4'', 5''), 7.03 (dd, $J = 8.18, 1.2\text{ Hz}$, 2H-5,5'), 6.85 (sa, 2H-2,2'), 6.74 (dd, $J = 8.18, 1.4\text{ Hz}$, 2H-6,6'), 3.68 (s, 6H-OMe3,3'), 2.79 (dd, $J = 13.26, 5.36\text{ Hz}$, 2H-7a,7a'), 2.37 (dd, $J = 13.32, 9.06\text{ Hz}$, 2H-7b,7b'), 1.78 (m, 2H-8,8'), 0.87 (d, $J = 6.64\text{ Hz}$, 6H-Me9,9'). RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz) δ 150.54, 150.45, 150.34, 141.06, 129.62, 125.62, 120.81, 120.37, 119.86, 119.81, 113.35, 54.92, 38.70, 38.33, 15.15. HRMS m/z calculada para $\text{C}_{44}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{P}_2$ [M+H]: 794.2410, obtenida [M+H]: 794.2484.

5.1.16. Derivado 15: (1R,2R,3R)-6,7-dimetoxi-1-(4-metoxifenil)-2,3-dimetil-1,2,3,4 tetrahidronaftaleno.

Resina; 8 % de rendimiento: RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) δ 6.91 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 2H-5',3'), 6.77 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 2H-2',6'), 6.59 (s, 1H-2), 6.32 (s, 1H-5),

3.86 (s, 3H-OMe4'), 3.78 (s, 3H-OMe4), 3.70 (d, $J= 5.24$ Hz, 1H-7'), 3.66 (s, 3H-MeO3'), 2.81 (dd, $J= 16.52, 5.321$ Hz, 1H-7a), 2.42 (dd, $J= 16.52, 8.32$ Hz, 1H-7b), 1.99 (m, 1H-8), 1.90 (m, 1H-8'), 0.91 (d, $J= 6.32$ Hz, 3H-9), 0.89 (d, $J= 5.88$ Hz, 3H-9'). RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz) δ 157.65, 147.24, 147.14, 139.42, 129.93, 129.60, 128.50, 113.33, 113.30, 111.17, 55.77, 55.74, 55.20, 50.55, 40.92, 34.62, 28.26, 16.73, 15.20. HRMS m/z calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_3$ [M+H]: 326.1882, obtenida [M+H]: 326.1871.

5.2. Elucidación estructural del Ácido meso-dihidroguaiarético

Como se observa en el espectro de RMN ^1H (Figura 21) se presenta una señal doblete (d) a 0.83 ppm (d, $J=6.6$ Hz, 6 H) de los metilos en la posición 9, 9' de la cadena alifática que acopla con el protón de la posición 8, 8'; un multiplete (m) en 1.71 ppm (m, 2H) de los protones de los metinos de la posición 8 y 8' que se acoplan con los metilos de la posición 9, 9' y con los metilenos de la posición 7, 7'; se observa un doble de doble (dd) en 2.25 ppm (dd, $J= 13.5; 9.22$ Hz, 2 H) que corresponden a los protones 7b, 7b' de los metilenos que se acoplan con los protones de la posición 8, 8' y con un acoplamiento geminal con los protones 7a, 7a'; se observa un doble de doble en 2.70 ppm (dd, $J= 13.44; 5$ Hz, 2H) que corresponden a los protones 7a, 7a' que acoplan con los protones de la posición 8, 8' y un acoplamiento geminal con los protones 7b, 7b'; se observa un singulete (s) en 3.85 ppm (s, 6H) que corresponden a los metoxilos de la molécula; se observa un singulete en 5.45 ppm (s, 2H) que corresponden a los dos hidroxilos fenólicos de la molécula; se observa un doblete en 6.60 ppm (d, $J=1.72$ Hz, 2H) de los protones de la región aromática en la posición 2 y 2' que acoplan con los protones de la posición 6, 6' respectivamente; se observa un doble de doble en 6.64 ppm (dd, $J= 7.94; 1.70$ Hz, 2H) de los protones de la posición 6, 6' que acoplan con los protones aromáticos en orto con los protones en la posición 5, 5' y en meta con los protones de la posición 2, 2'; se observa un doblete en 6.81 ppm (d, $J= 8.04$ Hz, 2H) de los protones de la posición 5, 5' que acoplan en orto con los protones en la posición 6, 6'.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 22) se observa en campos altos en 16.21 ppm el carbono de los metilos de la posición 9,9', en 38.88 ppm los carbonos de la posición 7,7', 39.18 ppm los carbonos de la posición 8,8', 55.84 ppm los carbonos de los metoxilos de la posición 3,3', en campos bajos se observa en 111.41 ppm los carbonos de la posición 2,2', en 113.9 ppm los carbonos de la posición 5,5', en 121.6 ppm los carbonos de la posición 6,6', en 133.7 ppm los carbonos de la posición 1,1', en 143.5 ppm los carbonos de la posición 3,3' y en 146.2 ppm los carbonos de la posición 4,4'.

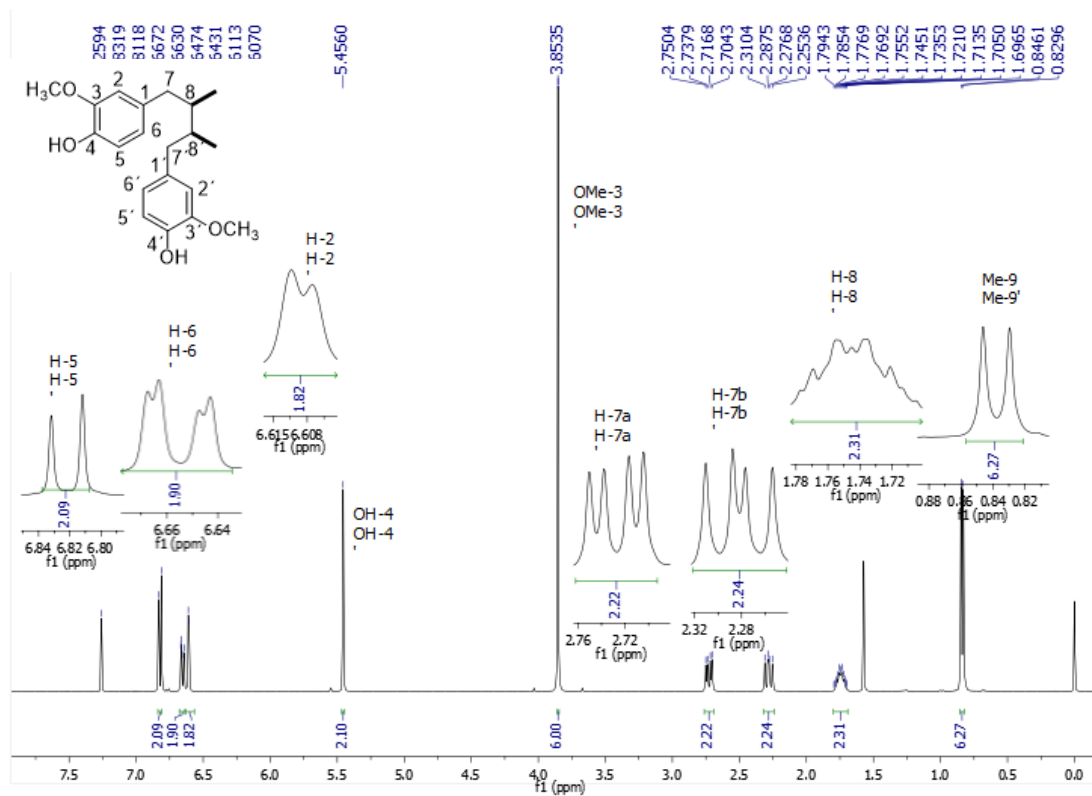


Figura 21. Espectro de RMN ^1H de AmDG (400 MHz, CDCl_3)

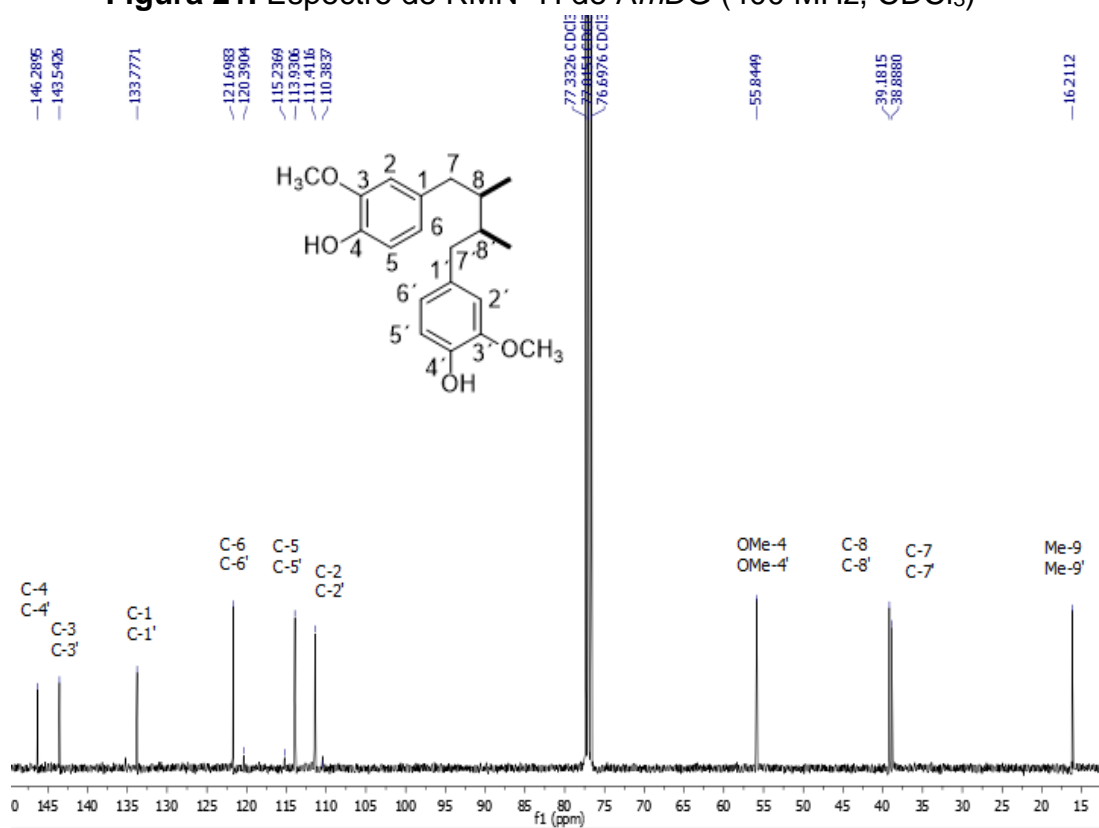


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C de AmDG (100 MHz, CDCl_3)

5.2 Elucidación estructural del 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-

ciclolignano (LT16)

En el espectro de RMN ^1H (Figura 23), se observa en 0.87 ppm un doblete (d, $J=7.92$ Hz, 3H) que integra para metilos de la posición 9 que se acoplan con los protones de la posición 8; en 0.88 ppm se observa un doblete (d, $J=7.92$ Hz, 3H) que integra para metilos de la posición 9' que se acoplan con los protones de la posición 8'; en 1.6 ppm (m, 1H) resuena un multiplete del protón de la posición 8' que se acopla con los protones del metilo de la posición 9' y los protones de la posición 7'; en 1.98 ppm (m, 1H) resuena un multiplete para el protón de la posición 8 que se acopla con los protones de la posición 7, y 9; en 2.42 ppm (dd, $J=7.4, 16.36$ Hz, 1H) se observa un doble de doble de la posición 7b que se acopla con el protón 8 y existe un acoplamiento geminal con 7a; en 2.84 ppm (dd, $J=5.36, 16.38$ Hz, 1H) resuena el protón 7a que acopla de manera geminal con 7b y vecinal con 8; en 3.60 ppm (d, $J= 6.24$ Hz, 1H) se observa un doblete del protón 7' que acopla con el protón de la posición 8'; en 3.86 ppm (s, 3H) resuena el metoxilo de la posición 3; en 4.76 ppm (s, 1H) se observa el singulete del hidroxilo en la posición 4'; en 5.33 ppm (s, 1H) el hidroxilo de la posición 4; en 6.38 ppm (s, 1H) resuena el singulete del protón de la posición 5; en 6.56 ppm (s, 1H) resuena un singulete de los protones de la posición 2; en 6.68 ppm (d, $J=8.44$ Hz, 2H) un doblete para los protones de la posición 3',5' y en 6.86 ppm (d, $J= 8.48$ Hz, 1H) resuena un doblete para los protones de la posición 2', 6' .

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 24) se observa en 16.08 ppm los carbonos de la posición 9,9'; en 28.98 ppm el carbono de la posición 8, 35.17 ppm el carbono de la posición 7; en 40.69 ppm el carbono de la posición 8'; en 50.0 ppm el carbono de la posición 7'; en 55.8 ppm el carbono del metoxilo; en 110.57 ppm el carbono de la posición 2; en 114.82 ppm los carbonos de la posición 3', 5'; en 116.06 ppm el carbono 5; en 127.76 ppm el carbono de la posición 1; en 130.15 ppm los carbonos de la posición 6', 2'; en 130.83 ppm el carbono 6; en 139.42 ppm el carbono de la posición 1'; en 143.46 ppm el carbono 4; en 144.95 ppm el carbono 3; y finalmente en 153.53 el carbono de la posición 4'.

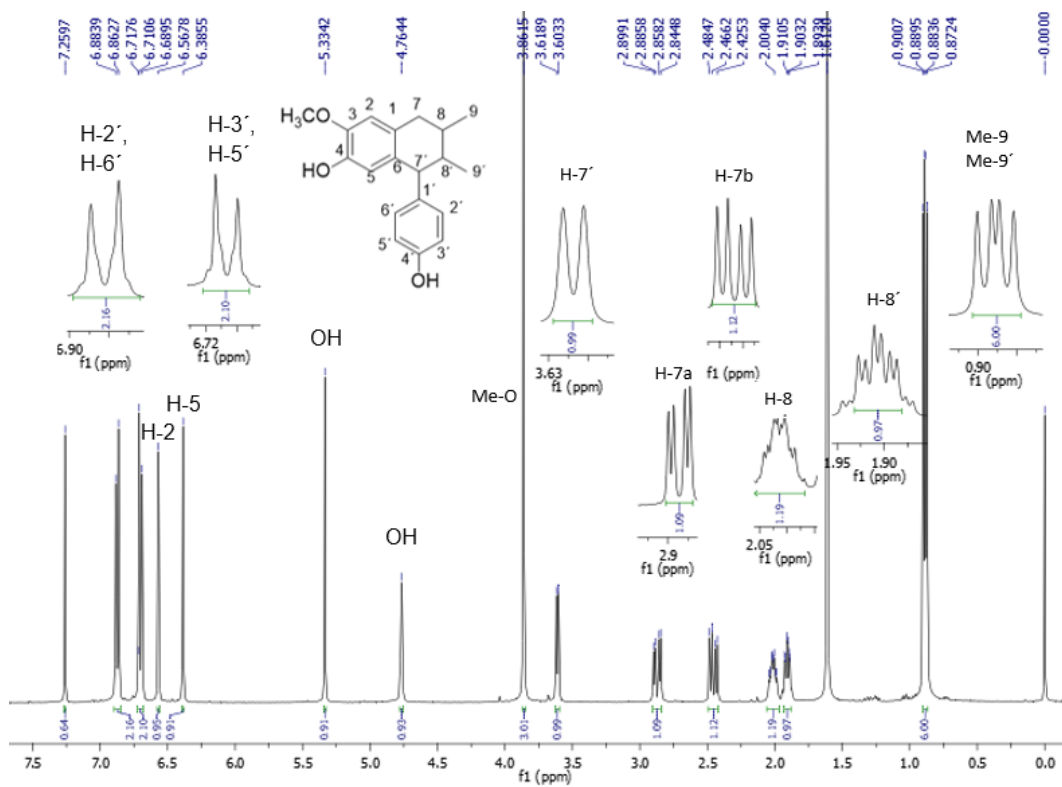


Figura 23. Espectro de RMN ¹H de LT16 (400 MHz, CDCl₃)

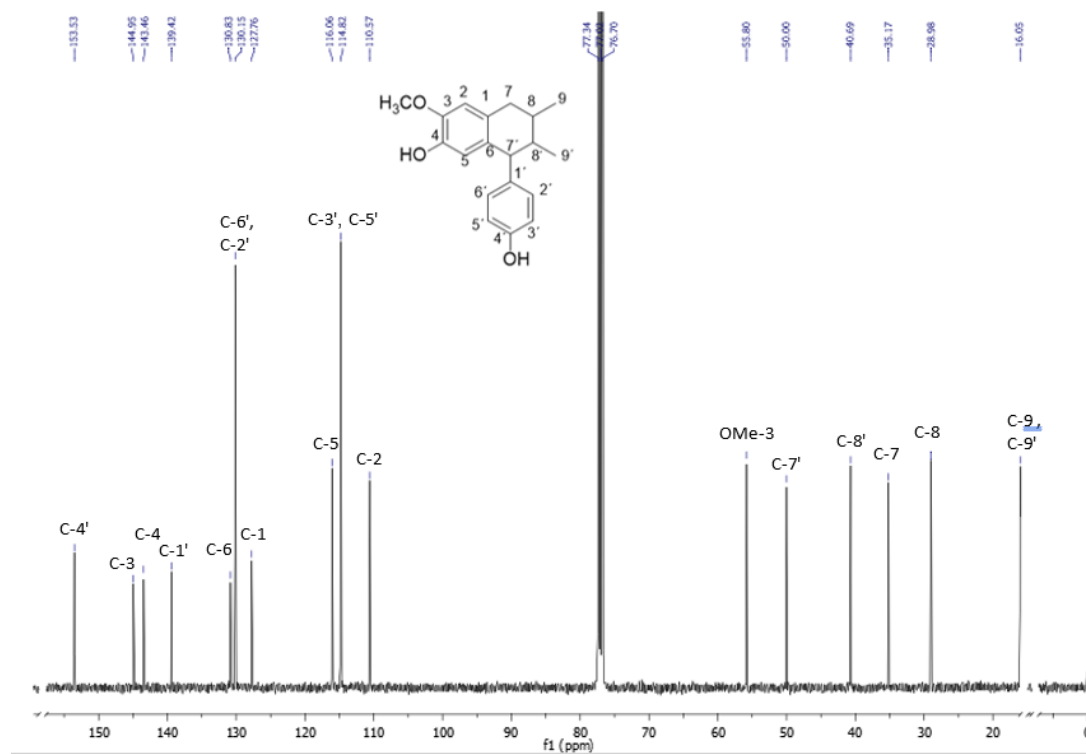


Figura 24. Espectro de RMN ¹³C de LT16 (100 MHz, CDCl₃)

5.3. Elucidación estructural del 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (Lt3)

En el espectro de RMN ^1H (Figura 25), se observa en 3.89 ppm un singulete (s, 3H) que integra para metoxilos de la posición 3; en 3.97 ppm se observa un singulete (s, 3H) que integra para los protones de la posición 7; en 6.5 ppm se observa un singulete (s, 1H) que integra para los protones de la posición 6; en 7.03 ppm se observa un doble (d, $J= 8.76$ Hz, 2H) que integra para los protones de la posición 3' y 5' que acopla con los protones de la posición 2' y 6'; en 8.1 ppm se observa un doblete (d, $J= 8.76$ Hz, 2H) que integra para los protones de la posición 2' y 6' que acoplan con los protones de la posición 3' y 5'; en 9.1 ppm se observa un singulete (s, 1H) que integra para el hidroxilo de la posición 4'; en 12.28 ppm se observa un singulete (s, 1H) que integra para el hidroxilo de la posición 5'.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 26) se observa en 55.98 y 59.28 ppm los carbonos de los metoxilos de la posición 3 y 7, respectivamente. En 94.93, 105.02, 111.89, 115.50, 122.02, 126.52, 130.45, 138.03, 143.31, 153.78, 155.99, 160.05 y 179 ppm resuenan los carbonos: 6, 8, 4a, 3' y 5', 4', 7, 2' y 6', 3, 8a, 1', 5, 2, y 4, respectivamente.

En el espectro COSY (Figura 27) se observa la correlación entre los protones del anillo aromático H-2' y H-6' con los protones H-3' y H-5'. En el espectro NOESY (Figura 28) donde se puede observar las interacciones en el espacio del protón H-6 y el metoxilo de la posición 7, esta correlación es coherente con la estructura propuesta. En el espectro HMBC (Figura 29)

se observa la correlación heteronuclear a uno, y dos enlaces de distancia del protón H-6 con los carbonos C-5, C-7 y C-8. En el espectro HSQC (Figura 30) se observan todas correlaciones heteronucleares. Por todo lo anterior se confirma la estructura propuesta.

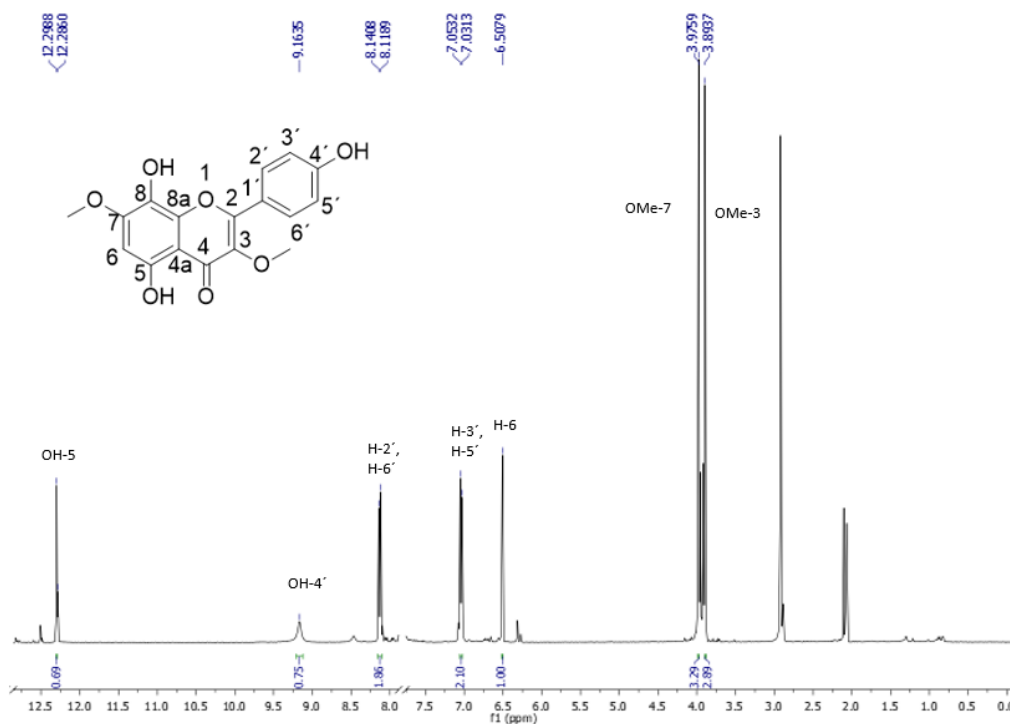


Figura 25. Espectro de RMN ^1H de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (400 MHz, acetona)

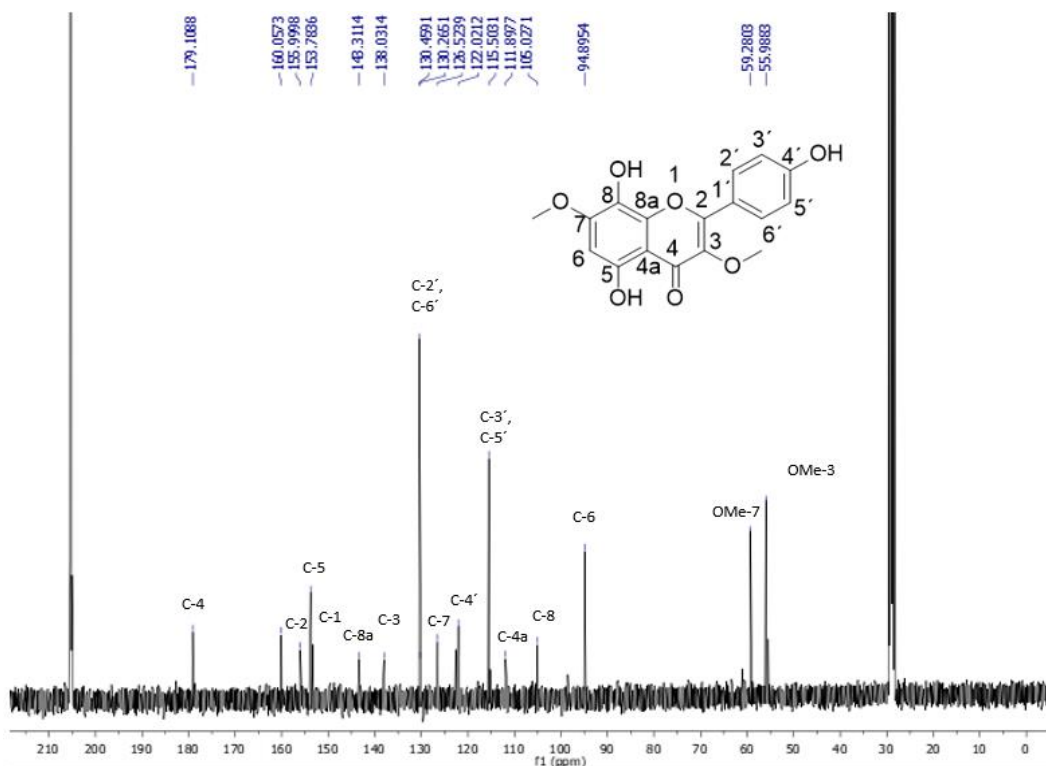


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (100 MHz, acetona)

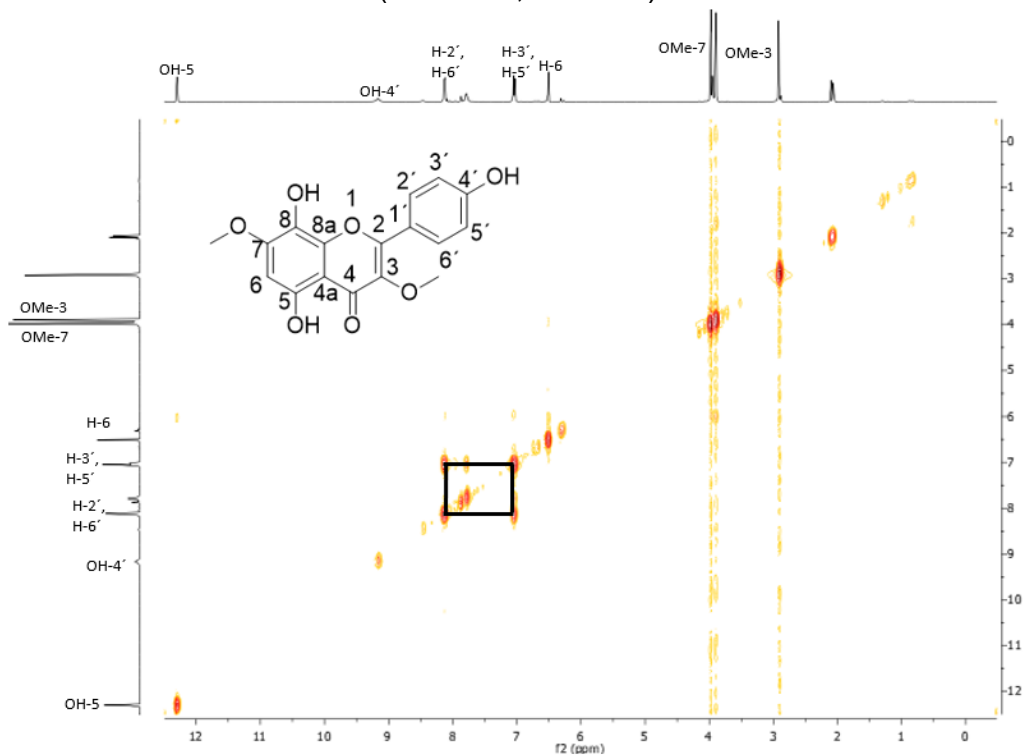


Figura 27. Espectro de COSY de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona.

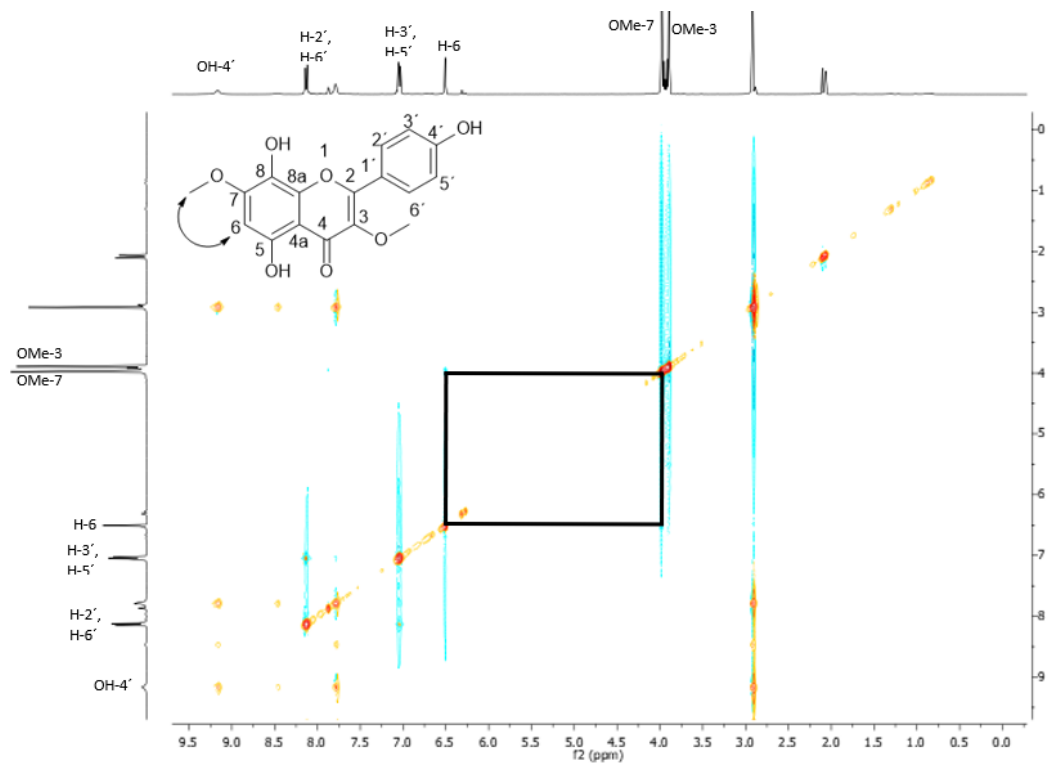


Figura 28. Espectro de NOESY de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona.

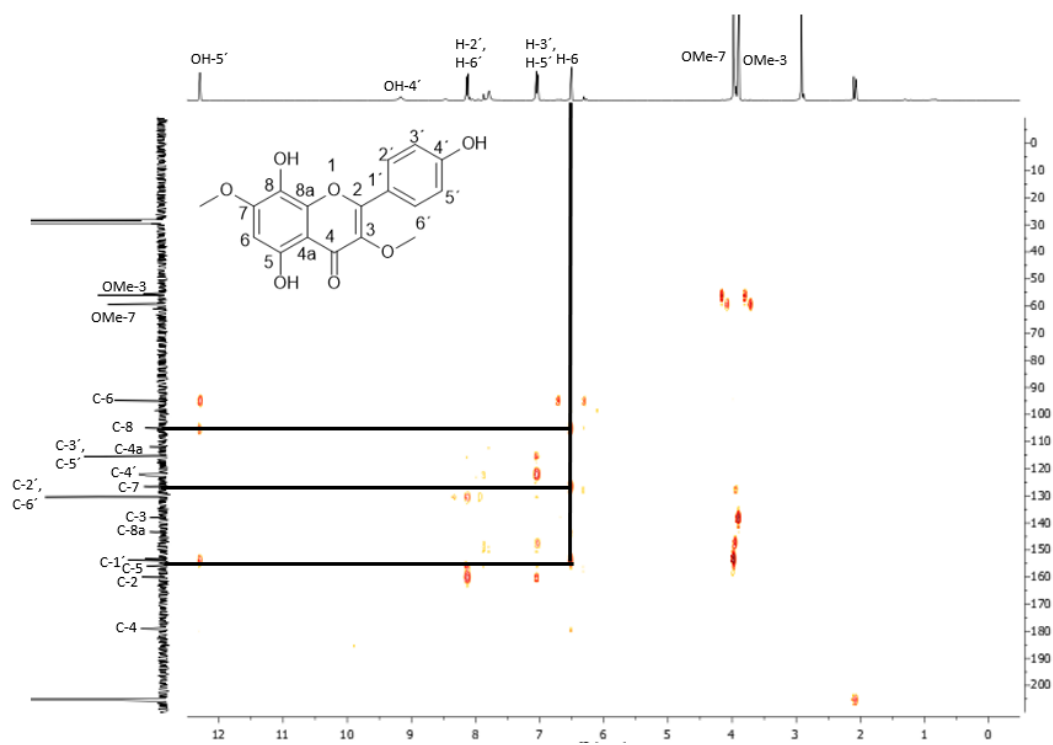


Figura 29. Espectro de HMBC de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona.

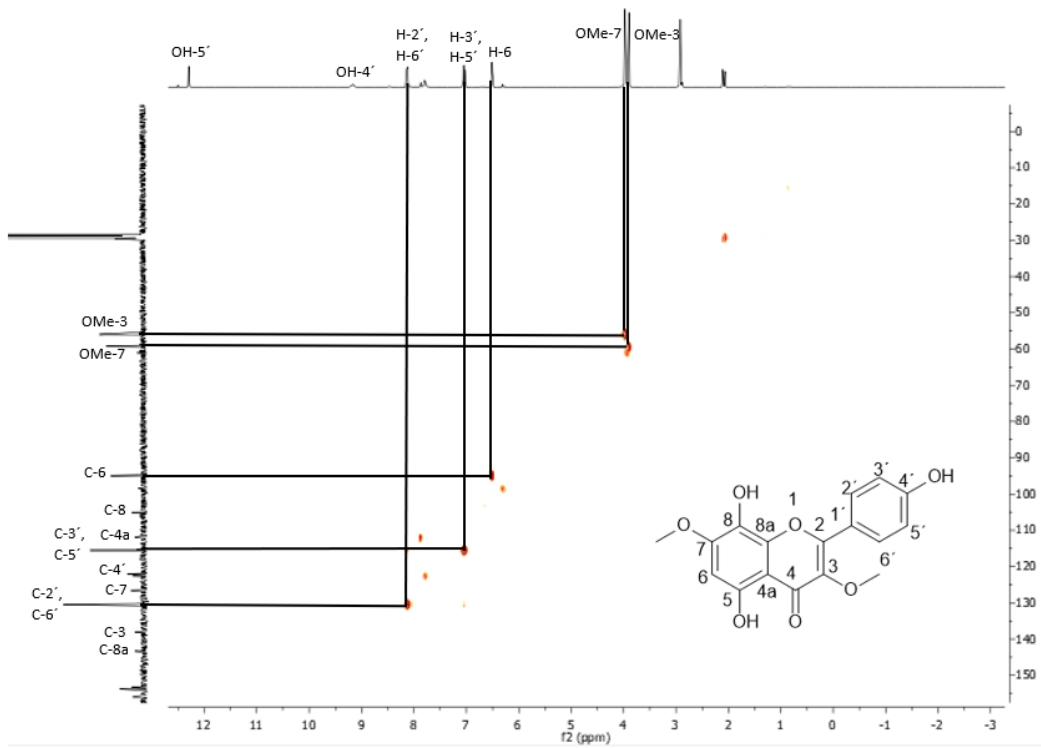


Figura 30. Espectro de HSQC de 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona.

5.3 Rendimiento Propiedades físicas y espectroscópicas de los derivados semi-sintéticos

5.3.1 Síntesis de ésteres

En las reacciones que se realizaron se obtuvieron los compuestos mono-sustituídos y di-sustituídos del producto natural. Los compuestos mono-sustituídos se obtuvieron en un rendimiento de 15.8 al 41.7% y los compuestos di-sustituídos en un rendimiento de 5.6 al 59.1 % (Tabla 8). Del derivado 2 se obtuvieron 2.0 mg por lo que no se pudo obtener sus espectros de RMN¹H y RMN ¹³C.

Tabla 8. Características físicas y rendimientos de ésteres del *AmDG*.

Derivado semi-sintético	Solubilidad	Estado físico	Peso (mg)	Rendimiento (%)
1	Cloroformo	Resina	8.1	22.4
2	Cloroformo	Sólido blanco	2.0	5.6
3	Cloroformo	Resina	5.7	15.8
4	Cloroformo	Sólido blanco	3.0	6.5
5	Cloroformo	Resina	18.0	47.7
6	Cloroformo	Sólido blanco	28.2	59.1
7	Cloroformo	Resina	18.3	49.7
8	Cloroformo	Sólido blanco	19.7	41.6

5.3.2. Síntesis de fosfatos

En las reacciones de fosforilación se obtuvieron los compuestos mono-sustituídos y di-sustituídos del producto natural. Los compuestos

monosustituidos se obtuvieron con un rendimiento del 20 al 35 % y los compuestos di- sustituido se obtuvieron en un rendimiento del 16 al 44.9 % (Tabla 9).

Tabla 9. Características y rendimientos de fosfatos del *AmDG*.

Derivado semi-sintético	Solubilidad	Estado físico	Peso (mg)	Rendimiento (%)
1	Cloroformo	Resina	10.3	31.2
2	Cloroformo	Resina	18.4	44.9
3	Metanol	Resina	11.0	35
5	Metanol	Resina	8.7	20
6	Metanol	Sólido blanco	10.0	16.6

5.3.3. Síntesis del derivado 3,4,4'-trimetoxi-6,7-ciclolignano

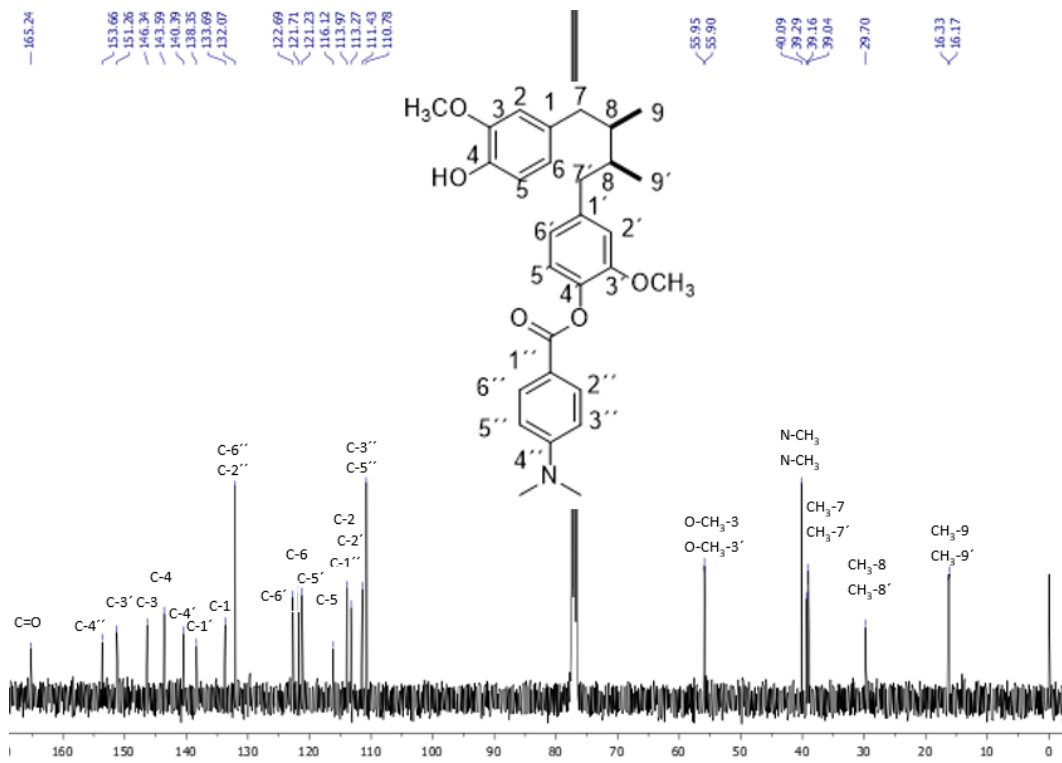
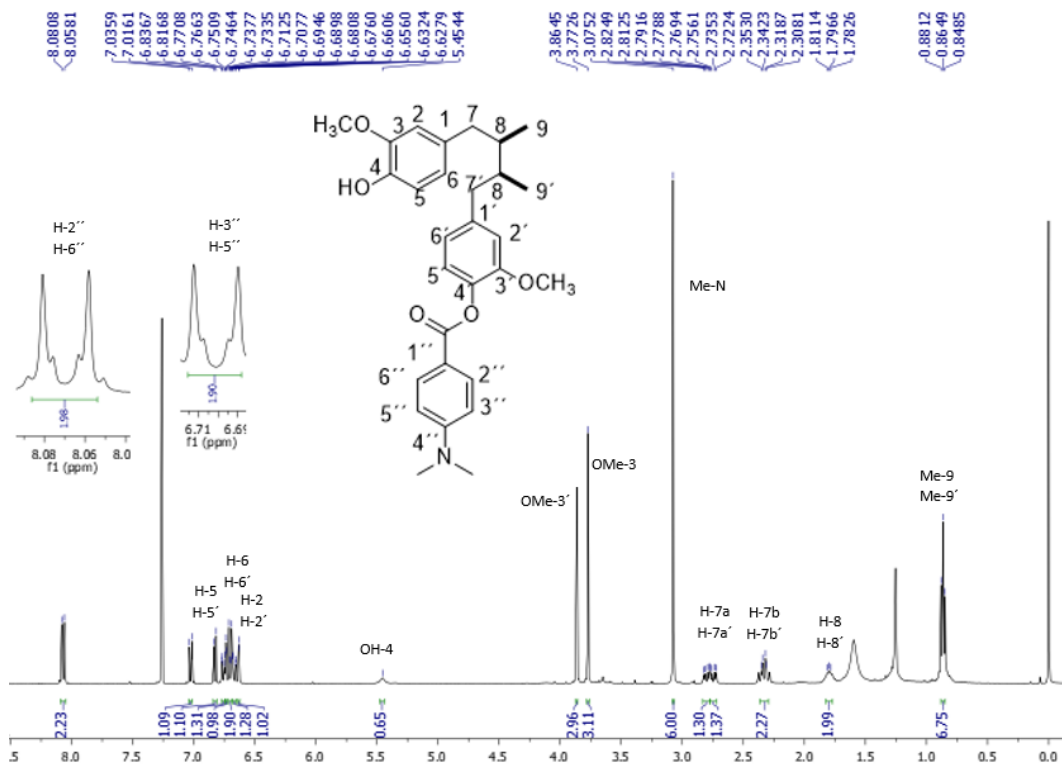
En las reacciones de metilación se obtuvo el compuesto di-sustituido del producto natural 4, 4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7-ciclolignano, obteniéndose 4.4 mg de un sólido blanco soluble en cloroformo, con un rendimiento del 8 %.

5.3.2 Elucidación estructural de los ésteres del AmDG

5.3.2.1 Elucidación estructural del derivado 1: 4-((2*S*,3*R*)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil 4-(dimetilamino)benzoato.

El derivado 1 corresponde al derivado monosustituido del producto natural y el ácido dimetil amino benzoico. Al ser un derivado monosustituido la molécula pierde la simetría, por lo que a diferencia del espectro de AmDG se observa un aumento de la cantidad de señales y multiplicidad. En la elucidación estructural de los derivados solo se mencionarán las señales de los sustituyentes que se insertaron ya que se discutió previamente la elucidación estructural del AmDG. En el espectro de RMN ¹H (Figura 31) se puede observar en 5.45 ppm un singulete que integra para 1H que corresponde a un hidroxilo, lo que indica que esta monosustituido. Se observa en 3.07 ppm un singulete que (s, 6H) que corresponde a los dos metilos unidos al N del sustituyente; en 6.71 ppm se observa un doblete (d, $J= 7.16$, 2H) que corresponde a los protones 3'', 5''; en 8.05 ppm se observa un doblete (d, $J= 9.65$, 2H) que integra para los protones de la posición 2'', 6''.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 32) se observa en 40.09 ppm los carbonos de los metilos unidos al N del sustituyente; en 110 ppm los carbonos aromáticos de la posición 3'', 5''; en 132.07 ppm se observan los carbonos de la posición 2'', 6''; en 153.66 ppm resuena el carbono de la posición 4''; y en 165.24 ppm se observa el carbono del carbonilo del éster.



5.3.2.2 Elucidación estructural del derivado 3: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenyl benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxilato.

El derivado 3 corresponde al derivado monosustituido del producto natural y el ácido piperonílico. En el espectro de RMN ^1H (Figura 33) se observa en 6.09 ppm un singulete (S, 2H) que integra para los dos protones del metilendioxi; en 7.03 ppm se observa un doblete (d, $J= 7.92$ Hz, 1H) de protón 5'' que acopla en orto con el protón 6''; en 7.64 ppm se observa un doblete (d, $J=1.68$ Hz, 1H) que corresponde al protón de la posición 2'' que acopla en meta con el protón 6''; en 7.83 ppm se observa un doble de doble (dd, $J= 8.18; 1.70$ Hz, 1H) que corresponde al protón de la posición 6'' que acopla con los protones 5'' en posición orto y en meta con el protón 2''.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 34) se observa en 101 ppm el carbono del metilendioxi; en 108.11 ppm el carbono de la posición 2''; en 113.24 ppm el carbono en la posición 5''; en 126.26 ppm el carbono en la posición 1''; en 133.63 ppm el carbono de la posición 6''; en 147.83 ppm el carbono de la posición 3''; en 152.04 ppm el carbono de la posición 4''; y en 164.26 ppm el carbono del carbonilo del éster.

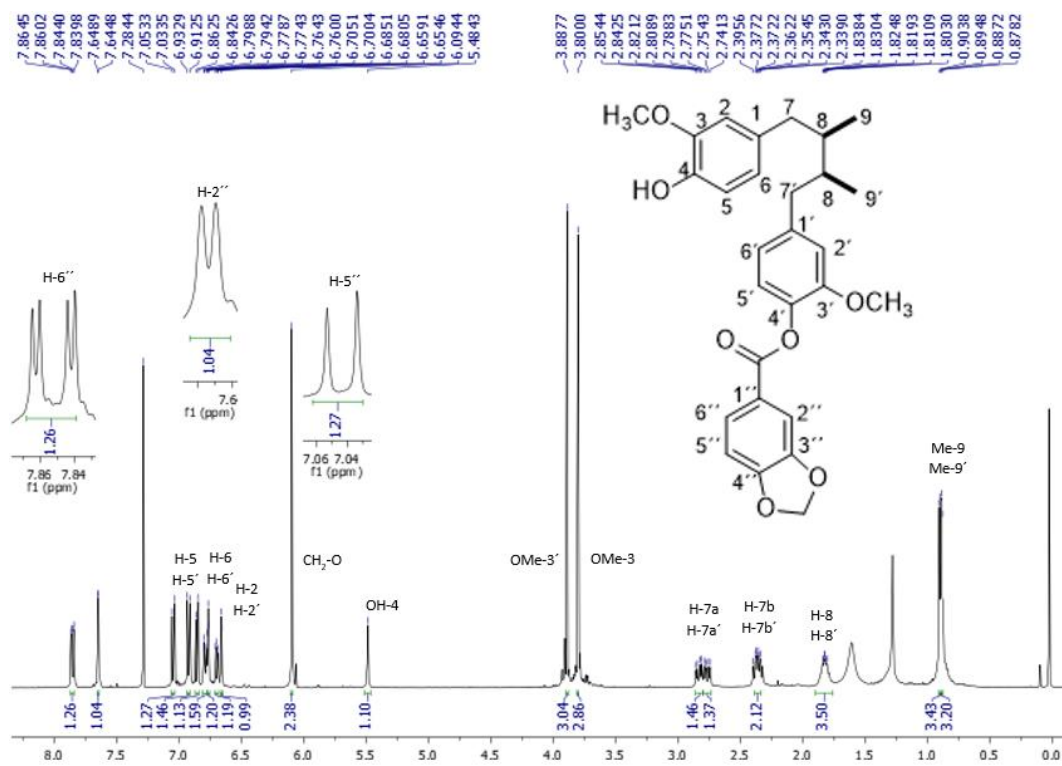


Figura 33. Espectro de RMN ¹H del derivado 3 (400 MHz, CDCl₃)

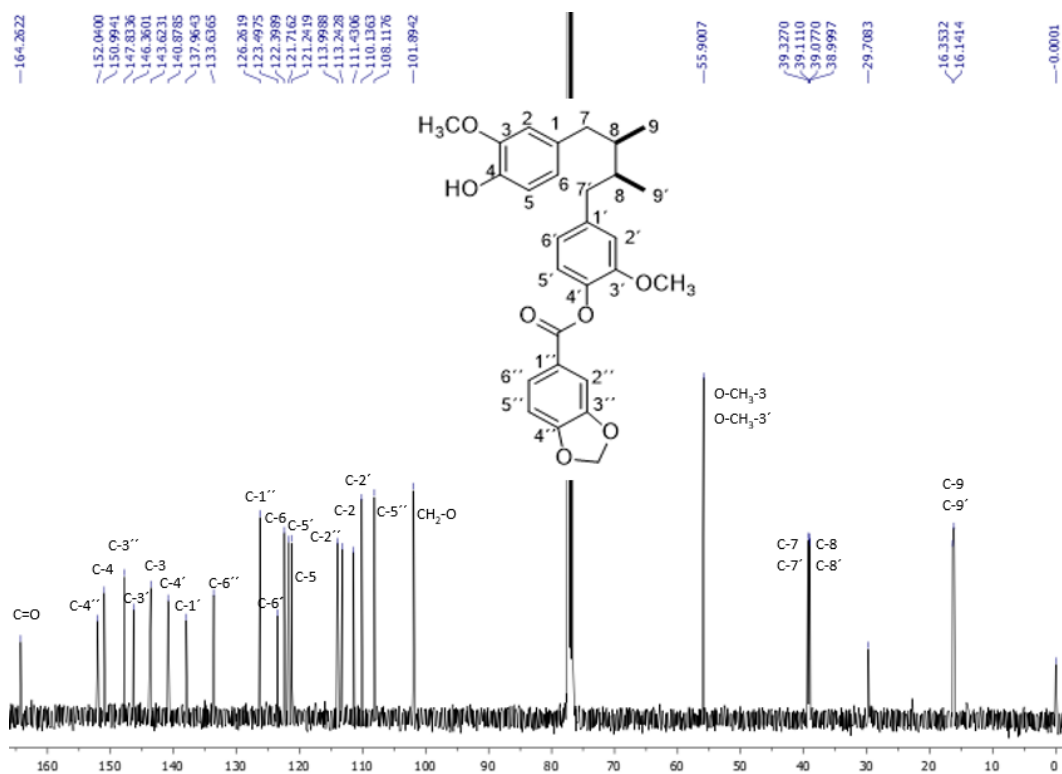


Figura 34. Espectro de RMN ¹³C del derivado 3 (100 MHz, CDCl₃)

5.3.2.3. Elucidación estructural del derivado 4: ((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyl) bis(2-metoxi-4,1-fenileno) bis(benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxylato).

El derivado 4 corresponde al derivado disustituido del producto natural y el ácido piperónilico. Al ser un derivado disustituido la molécula no pierde simetría, y el espectro es más simple que el derivado monosustituido. En el espectro de RMN ^1H (Figura 35) se observa en 6.07 ppm un singulete (s, 4H) que integra para los protones del metilendioxi; en 7.02 ppm se observa un doblete (d, $J= 7.88$ Hz, 2H) del hidrogeno $5''$, $5'''$ que acopla en orto con el protón $6''$; $6'''$; en 7.62 ppm se observa un doblete (d, $J=1.64$ Hz, 2H) del protón de la posición $2''$, $2'''$ que acopla en meta con el protón $6''$, $6'''$; en 7.81 ppm se observa un doble de doble (dd, $J= 8.18$; 1.70 Hz, 2H) que corresponde al protón de la posición $6''$, $6'''$ que se acopla en orto con el protón $5''$, $5'''$ y en meta con el protón $2''$, $2'''$.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 36) se observa en 101.88 ppm los carbonos de los metilendioxi ; en 108.11 ppm el carbono de la posición $5''$, $5'''$; en 113.20 ppm el carbono en la posición $2''$, $2'''$; en 126.26 ppm el carbono en la posición $1''$, $1'''$; en 137.96 ppm el carbono de la posición $6''$, $6'''$; en 147.81 ppm el carbono de la posición $3''$, $3'''$; en 152.02 ppm el carbono de la posición $4''$, $4'''$; y en 164.25 ppm se observa el carbono del carbonilo del éster.

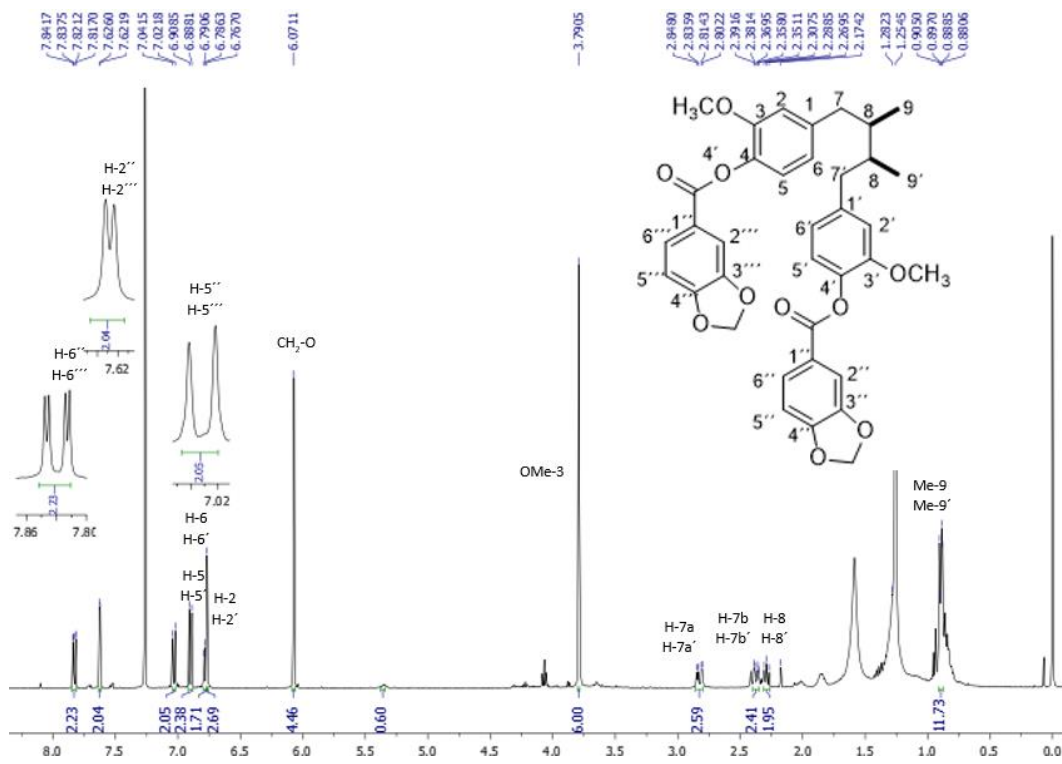


Figura 35. Espectro de RMN ^1H del derivado 4 (400 MHz, CDCl_3)

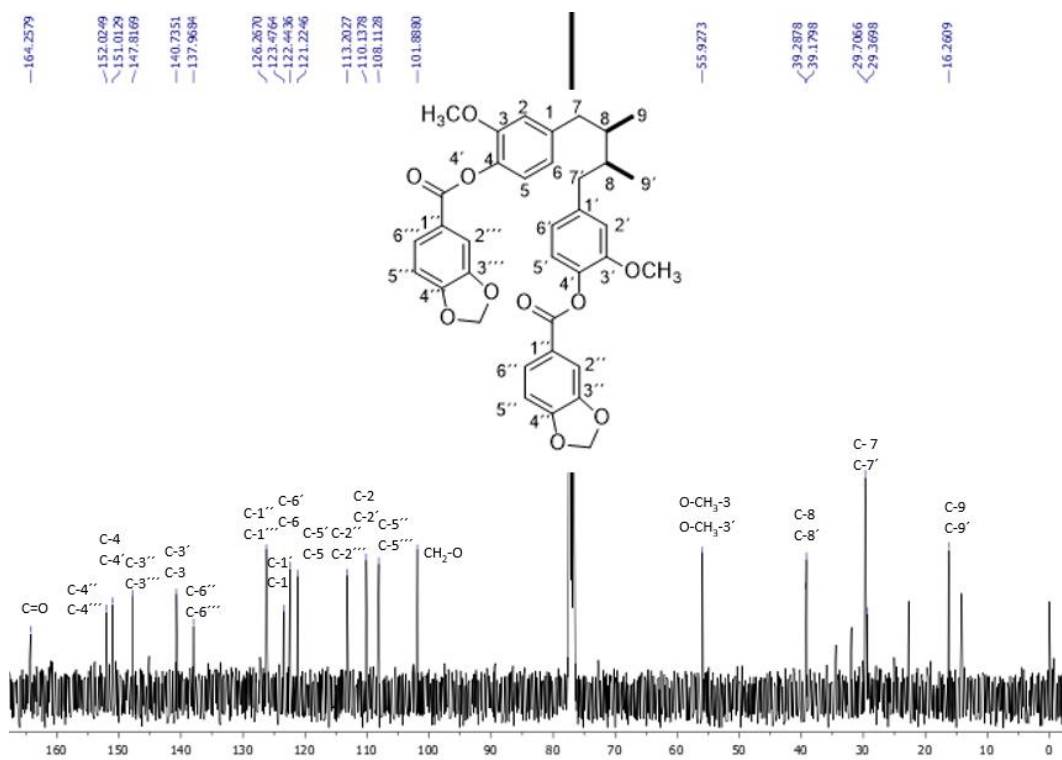


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C del derivado 4 (100 MHz, CDCl_3)

5.3.2.4. Elucidación estructural del derivado 5: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil 4-(trifluorometil)benzoato.

El derivado 5 corresponde al derivado monosustituido del producto natural y el ácido trifluorometilbenzoico. En el espectro de RMN ^1H (Figura 37) se observa un doblete en 7.76 ppm (d, $J= 8.24$ Hz, 2H) que integra para los protones de la posición 3'' y 5'' del sustituyente, estos hidrógenos acoplan en orto con los protones 6'' y 2''; en 8.31 ppm se observa un doblete (d, $J=8.08$ Hz, 2H) que corresponde a los protones de la posición 6'' y 2'' que se acoplan en posición orto con los protones 3'' y 5''.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 38) se observa en 121 ppm el carbono de la posición 3'' y 5''; en 125.96 ppm se observa el carbono unido al flúor; en 130.67 ppm se observa el carbono en la posición 2'' y 6''; en 132.98 ppm resuena el carbono en la posición 1''; en 137.62 ppm resuena el carbono de la posición 4''; y en 163.70 ppm se observa el carbono del carbonilo del éster.

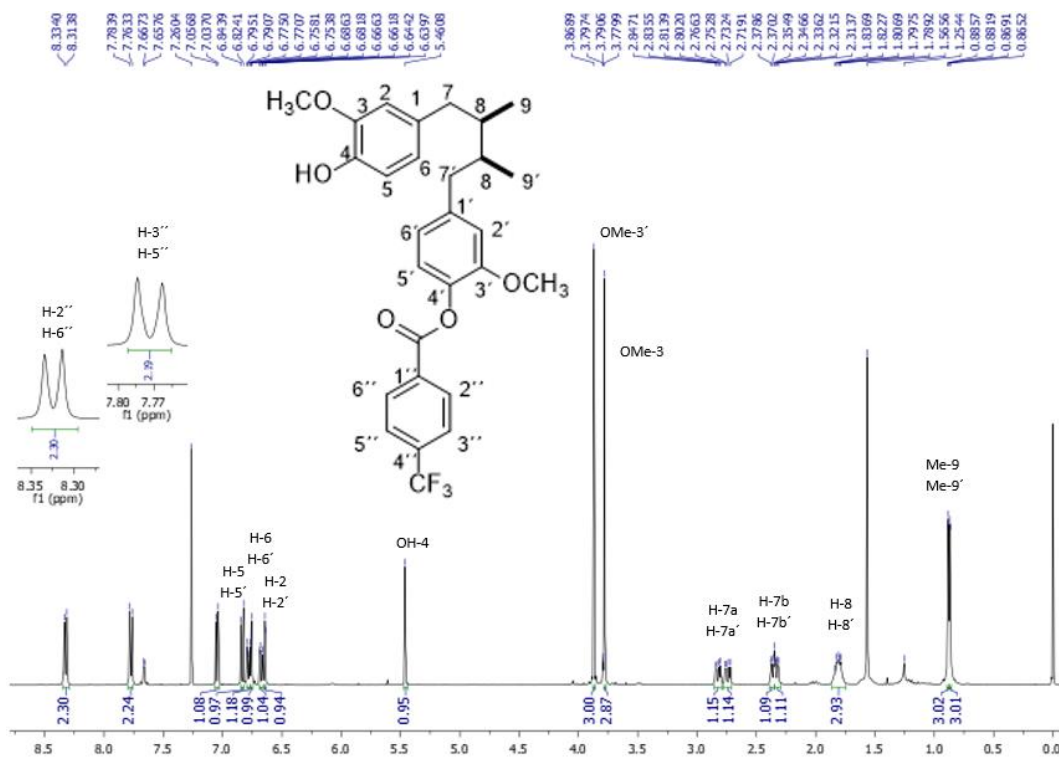


Figura 37. Espectro de RMN ¹H del derivado 5 (400 MHz, CDCl₃)

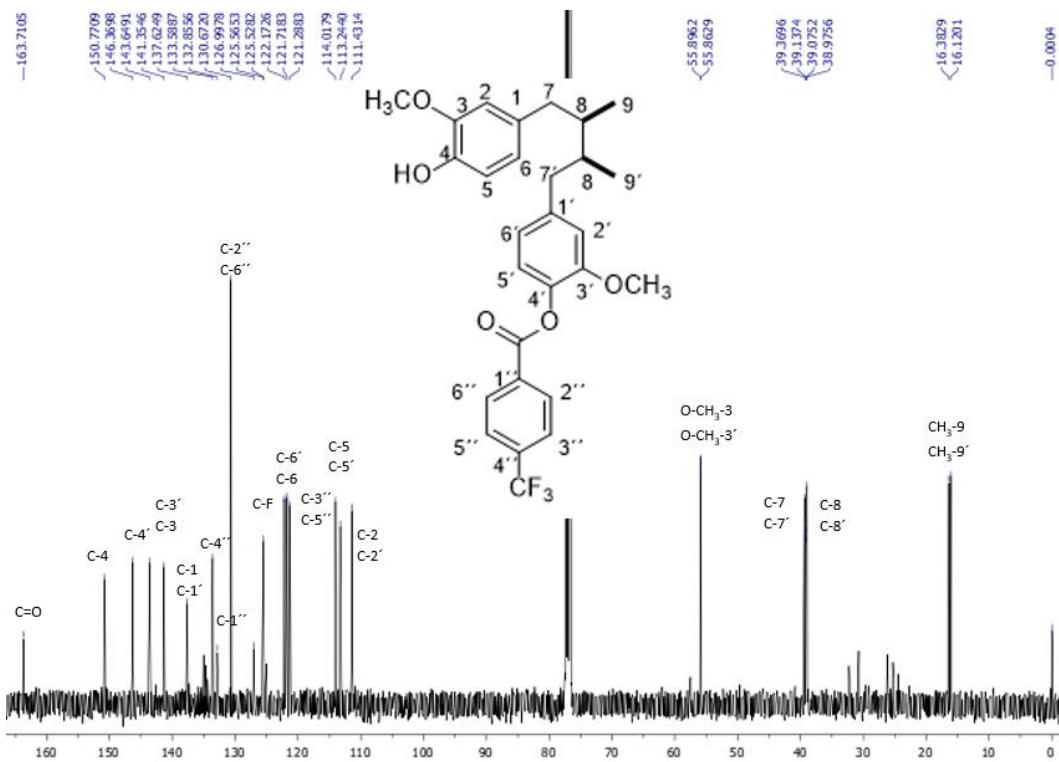


Figura 38. Espectro de RMN ¹³C del derivado 5 (100 MHz, CDCl₃)

5.3.2.5. Elucidación estructural del derivado 6: ((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyl) bis(2-metoxi-4,1-fenilene) bis(4-(trifluorometil)benzoato).

El derivado corresponde al derivado disustituido del producto natural con el ácido trifluorometilbenzoico. En el espectro de RMN ^1H (Figura 39) se observa un doblete en 7.76 ppm (d, $J= 8.24$ Hz, 4H) que integra para los protones de la posición 3'', 3''', 5'', 5''' que se acoplan en orto con los protones 2'', 2''', 6'', 6'''; en 8.31 ppm se observa un doblete (d, $J=8.08$ Hz, 4H) que corresponde a los protones 2'', 2''', 6'', 6''' que acoplan en orto con los protones 3'', 3''', 5'', 5'''.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 40) se observa en 122.25 ppm el carbono de la posición 3'', 3''', 5'', 5'''; en 125.56 ppm se observa el carbono unido al flúor; en 130.67 ppm se observa el carbono en la posición 2'', 2''', 6'', 6'''; en 132.83 ppm se observa el carbono en la posición 1'', 1'''; en 137.68 ppm se observa el carbono de la posición 4'', 4'''; y en 163.69 ppm se observa el carbono del carbonilo del éster.

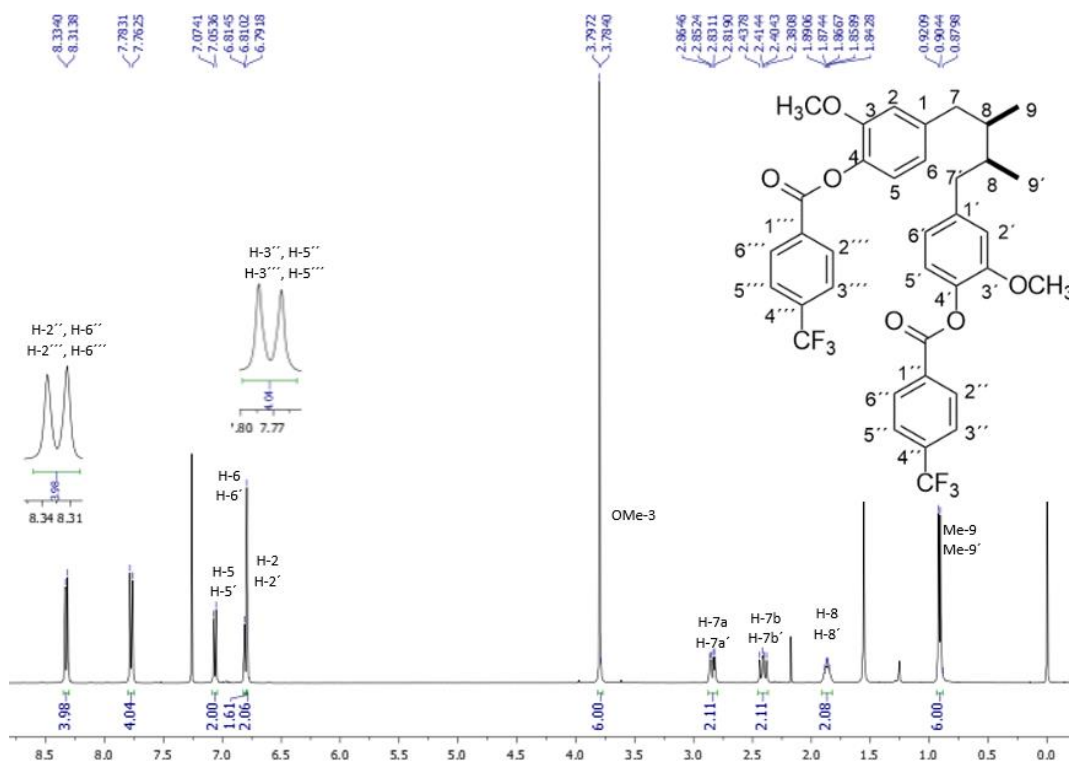


Figura 39. Espectro de RMN ^1H del derivado 6 (400 MHz, CDCl_3)

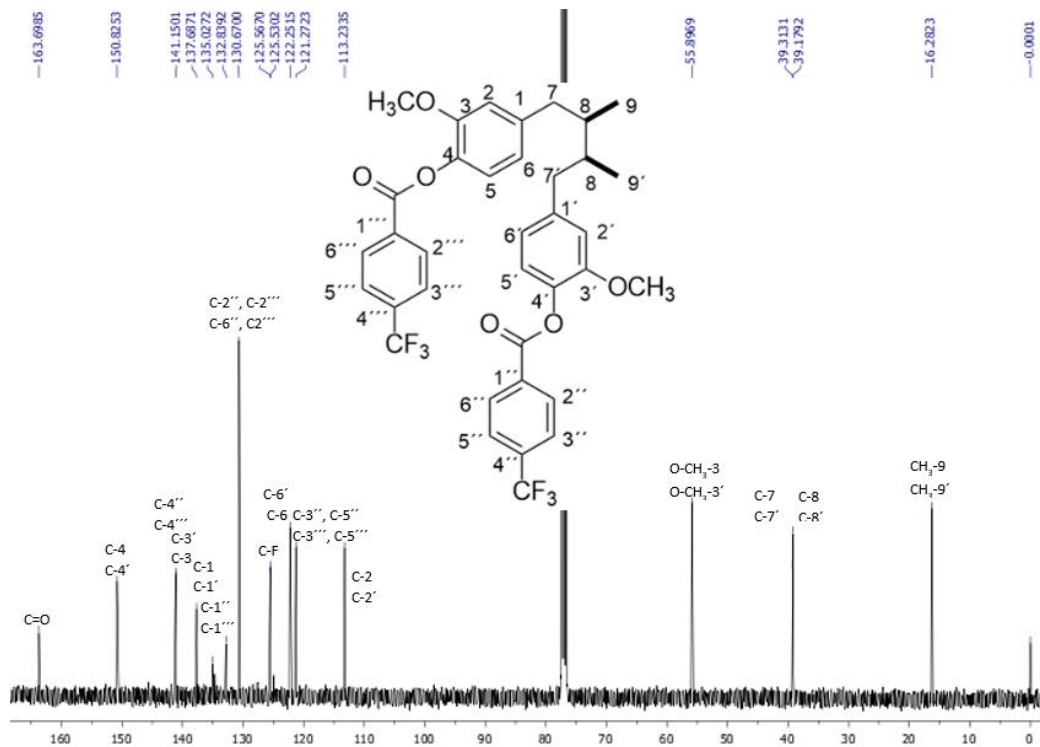


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C del derivado 6 (100 MHz, CDCl_3)

5.3.2.6. Elucidación estructural del derivado 7: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil-4-butilbenzoato.

El derivado 7 corresponde al derivado monosustituido del producto natural con el ácido butilbenzoico. En la región alifática del espectro de RMN ^1H (Figura 41) se observó un triplete en 0.92 ppm (t, $J=7.34$ Hz, 3H) de los protones del metilo de la posición 10'' que se acoplan con los protones de la posición 9'' del sustituyente; se observa un sextaplete (sex) en 1.33 ppm (sex, $J=7.4$ Hz, 2H) que integra para los protones de la posición 9'' que se acoplan con los protones de las posiciones 10'' y 8''; se observa un pentaplete (p, $J=7.4$ Hz, 2H) de la posición 8'' que se acopla con los protones de la posición 9'' y 7''; en 2.60 ppm se observa un triplete (t, $J=7.76$ Hz, 2H) que corresponde a los protones de la posición 7'' que se acoplan con los protones de la posición 8''. En la región aromática se observa un doblete en 7.29 ppm (d, $J=8.32$ Hz, 2H) que corresponde a los protones de la posición 3'', 5'' que se acoplan en orto con los protones de la posición 2'', 6''; en 8.1 ppm (d, $J=8.28$ Hz, 2H) aparece un doblete que corresponde a los protones 2'', 6'' que se acoplan con los protones 3'', 5''.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 42) resuenan en 13.91, 22.32, 33.30, y 35.79 ppm los carbonos de la posición 10'', 9'', 8'', y 7'', respectivamente. En la región aromática se observa en 127.03 ppm el carbono de la posición 1''; en 128.58 ppm se observan los carbonos de la posición 3'' y 5''; 130.34

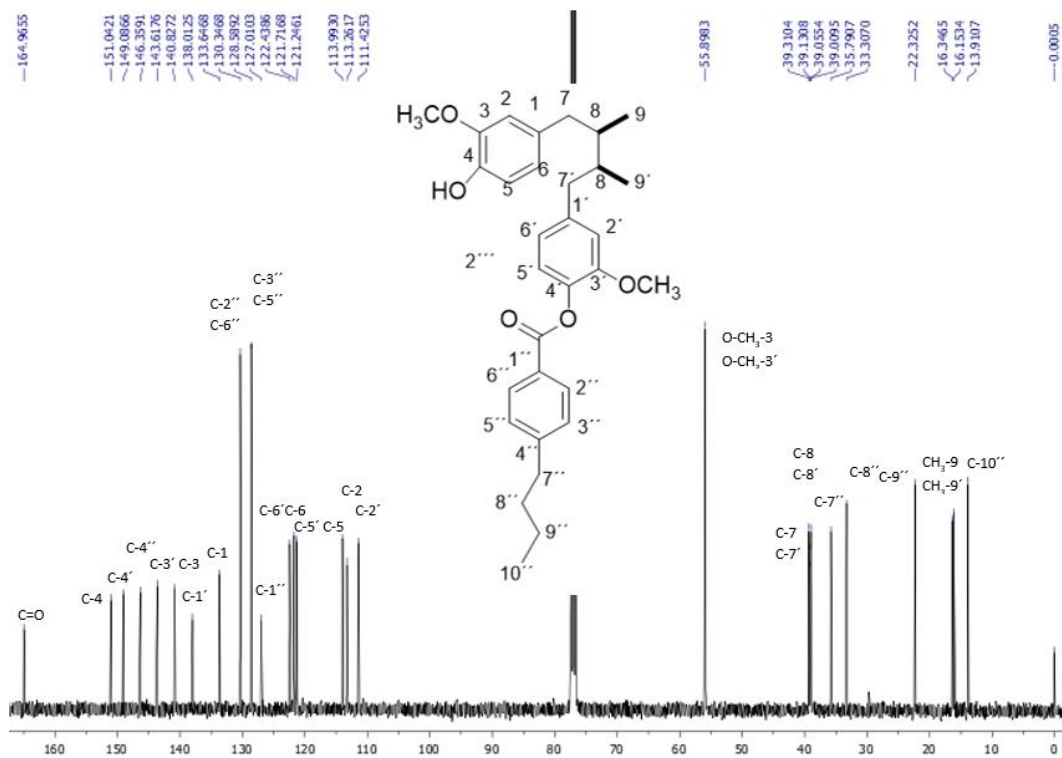


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C del derivado 7 (100 MHz, CDCl_3)

5.3.2.7. Elucidación estructural del derivado 8: ((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyl) bis(2-metoxi-4,1-fenilene) bis(4-butilbenzoato).

El derivado 8 corresponde al derivado disustituido del producto natural con el ácido butilbenzoico. En la región alifática del espectro de RMN ^1H (Figura 43) se observa un triplete en 0.92 ppm (t, $J=7.34$ Hz, 6H) de los protones del metilo de la posición 10'', 10''' y que acopla con los protones de la posición 9'', 9''' del sustituyente; se observa un sextaplete en 1.34 ppm (sex, $J=7.4$ Hz, 4H) que corresponde a los protones de la posición 9'', 9''' que se acoplan con los protones de las posiciones 8'', 8''', 10'', 10'''; se observa un pentaplete doblete en 1.61 ppm (pd, $J=7.4, 1.8$ Hz, 4H) que corresponde a los protones de la posición 8'', 8''' que se acoplan con los protones de la posición 7'', 7''', 9'', 9'''; en 2.67 ppm se observa un triplete (t, $J=7.76$ Hz, 4H) de los protones de la posición 7'', 7''' que se acoplan con los protones de la posición 8'', 8'''. En la región aromática se observa un doblete en 7.29 ppm (d, $J=8.32$ Hz, 4H) de los protones de la posición 2'', 2''', 6'', 6''' que se acoplan en orto con los protones de la posición 3'', 3''', 5'', 5'''; en 8.10 ppm se observa un doblete (d, $J=6.6$ Hz, 4H) de los protones de la posición 3'', 3''', 5'', 5''' .

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 44) resuenan en 13.91 ppm los carbonos de la posición 10'', 10'''; en 22.32 ppm los carbonos de la posición 9'', 9''', en 33.30 ppm los carbonos de la posición 8'', 8'''; en 35.78 ppm los carbonos de la posición 7'', 7''', en la región aromática se observa

en 127.03 ppm el carbono de la posición 1'',1'''; en 128.58 ppm se observan los carbonos de la posición 3'', 3''', 5'', 5'''; 130.35 ppm resuenan los carbonos de la posición 2'',2'' ,6'', 6'''; en 146.06 ppm se observa el carbono de la posición 4'',4''' y en 164.96 ppm resuena el carbono del carbonilo de los éster.

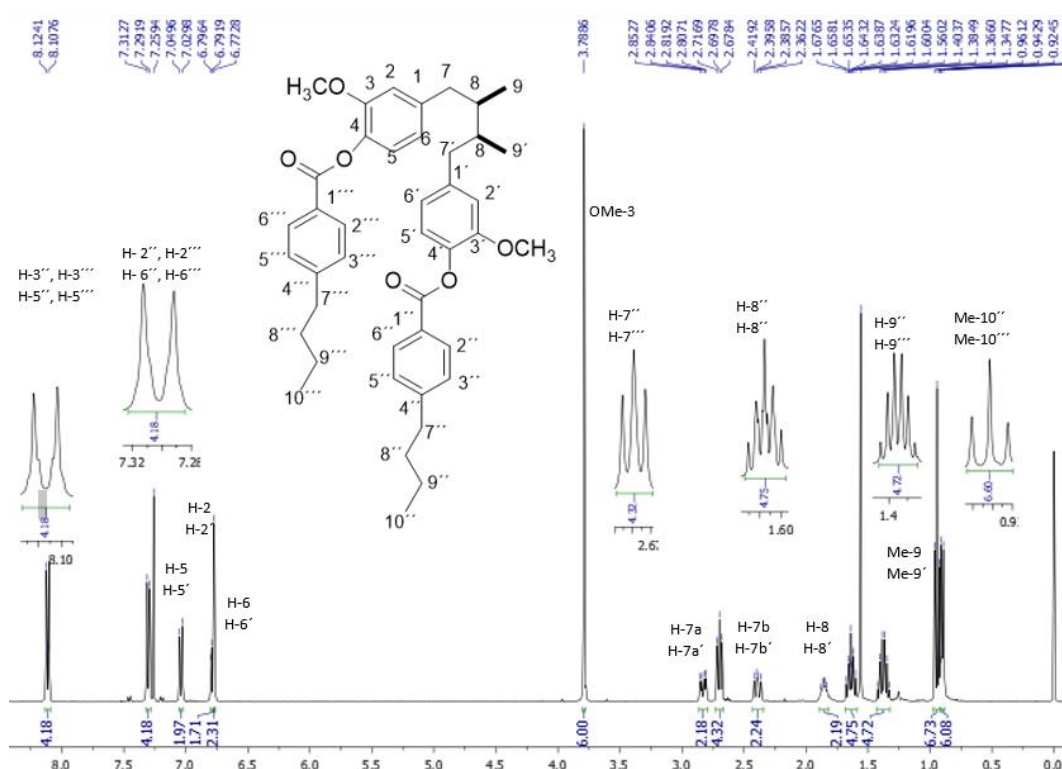


Figura 43. Espectro de RMN ¹H del derivado 8 (400 MHz, CDCl₃).

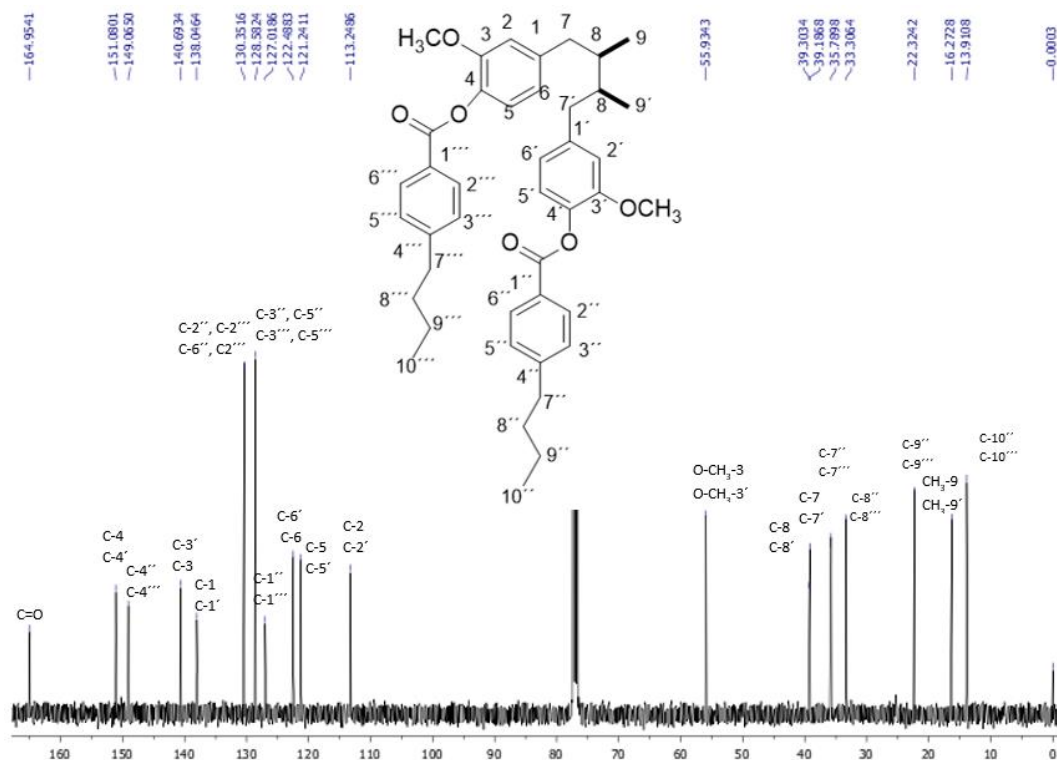


Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C del derivado 8 (100 MHz, CDCl_3)

5.3.3. Elucidación estructural de los derivados fosfatos del AmDG

5.3.3.1. Elucidación estructural del derivado 9: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil dimetil fosfato.

El derivado 9 corresponde al derivado monosustituido del producto natural con la dimetil fosfita. En el espectro de RMN ^1H (Figura 45) se puede observar en 3.86 ppm un doblete (d, $J = 3.28$ Hz, 6H) que corresponde a los metilos del sustituyente que se acoplan con el fosforo.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 46) se observa en 55.89 ppm los carbonos de los metilos del sustituyente.

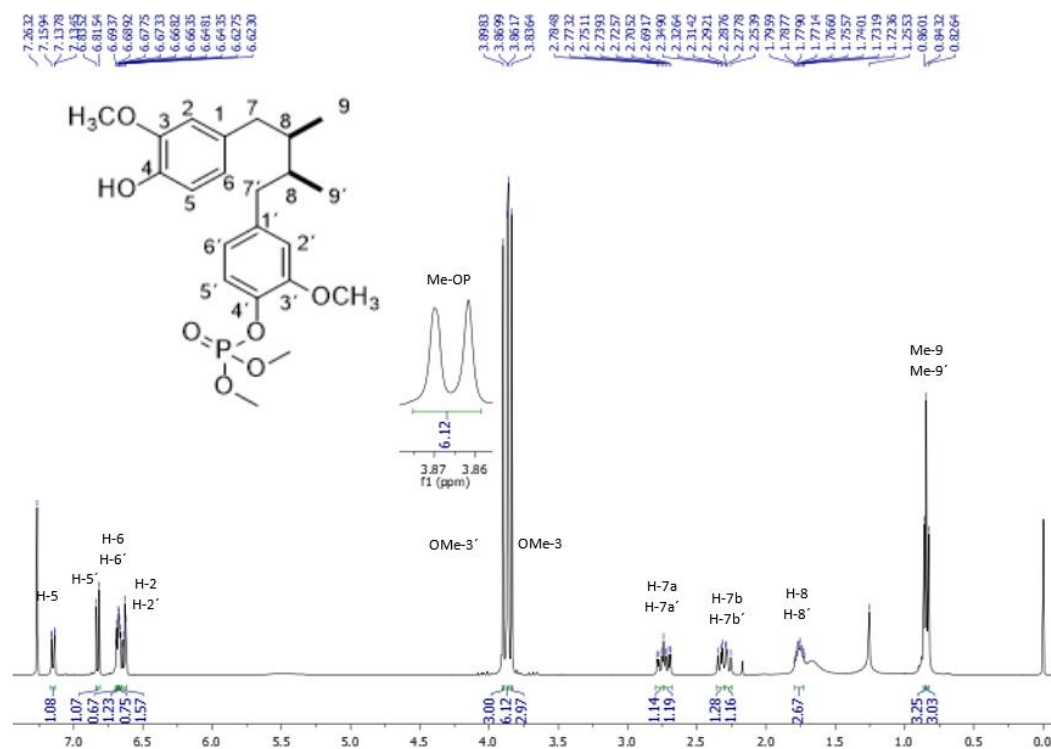


Figura 45. Espectro de RMN ^1H del derivado 9 (400 MHz, CDCl_3)

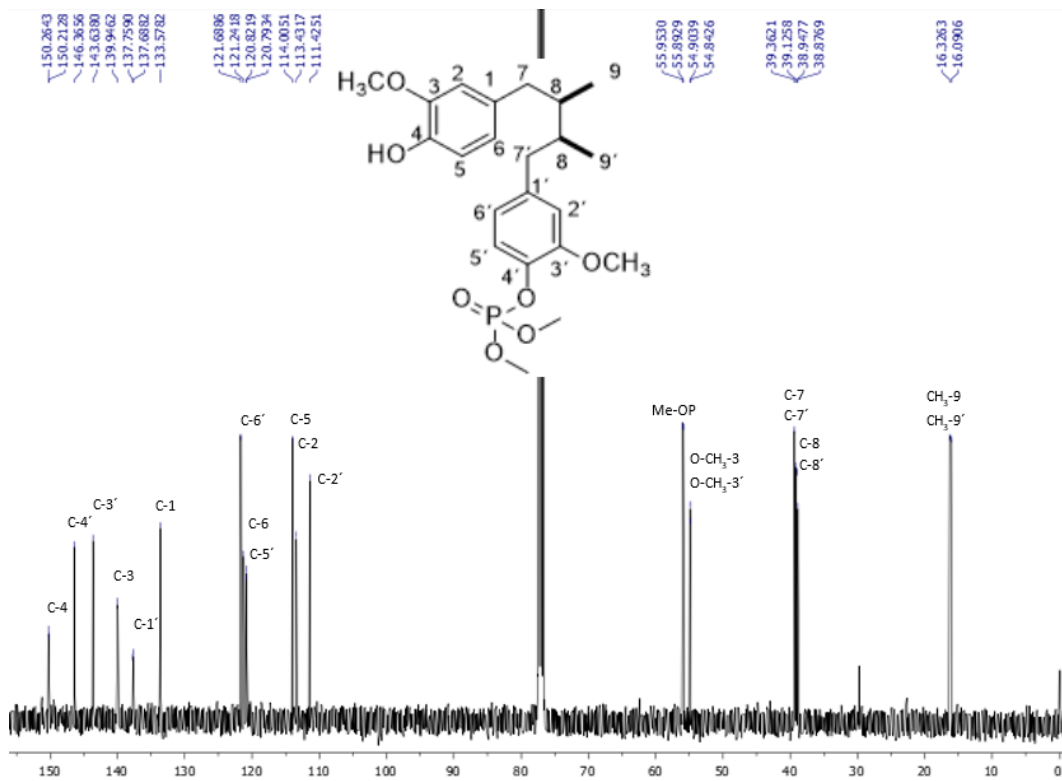


Figura 46. Espectro de RMN ¹³C del derivado 9 (100 MHz, CDCl₃)

5.3.3.2. Elucidación estructural del derivado 10: 4-((2R,3S)-4-(4-((dimetoxifosforil)oxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil dimetil fosfato.

El derivado 10 corresponde al derivado disustituido del producto natural con la dimetil fosfita. En el espectro de RMN ^1H (Figura 47) se puede observar en 3.89 y 3.91 ppm dos dobletes (d, $J = 0.36$ Hz, 6H) que integran para los protones de los metilos del sustituyente los cuales se acoplan con el fosforo.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 48) se observa en 55.99 ppm los carbonos de los metilos del sustituyente.

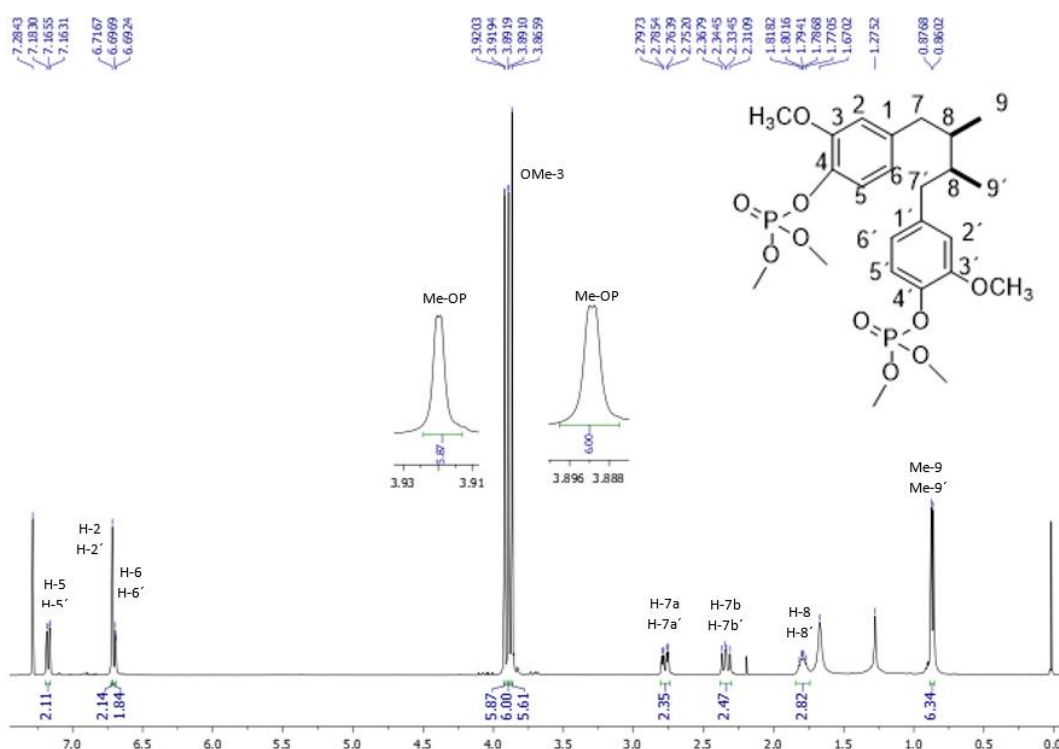


Figura 47. Espectro de RMN ^1H del derivado 10 (400 MHz, CDCl_3)

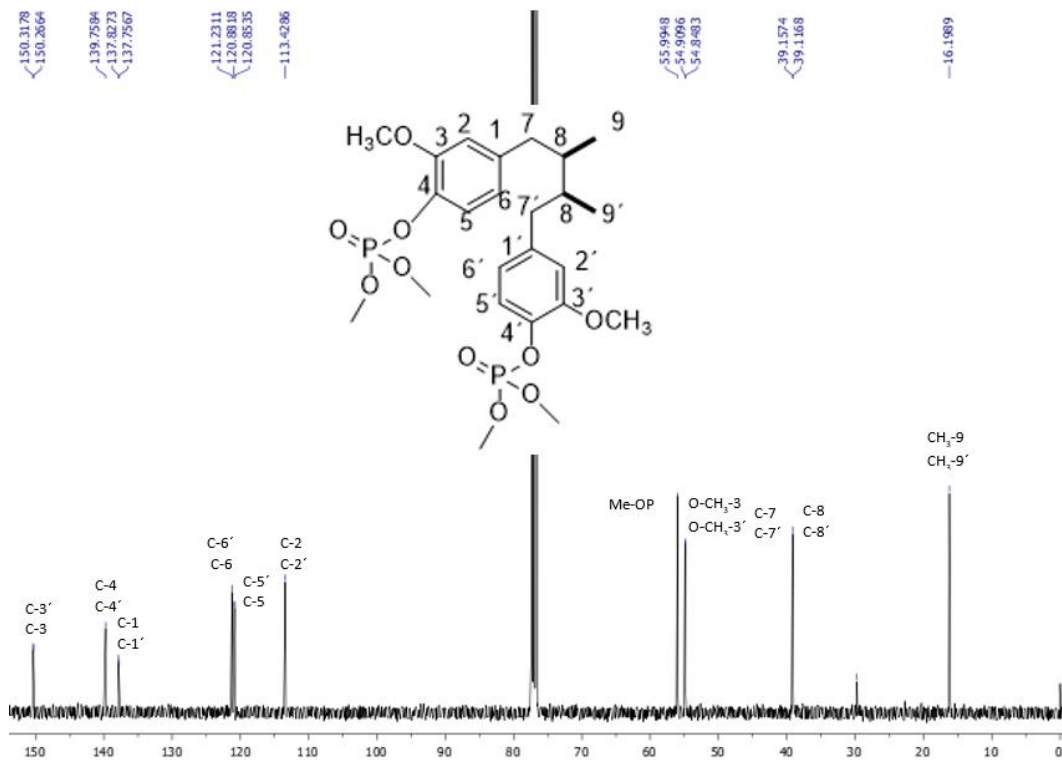


Figura 48. Espectro de RMN ¹³C del derivado 10 (100 MHz, CDCl₃)

5.3.3.3. Elucidación estructural del derivado 11: dietil (4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil) fosfato

El derivado 11 corresponde al derivado monosustituido del producto natural con la dietil-cloro-fosfita. En el espectro de RMN ^1H (Figura 49) se puede observar en 1.34 ppm un triplete (t, $J= 7.06$ Hz, 6H) de los protones de los metilos terminales del sustituyente; en 4.21 ppm se observa un multiplete (m, 4H) de los metilenos que se acoplan con los metilos terminales de los sustituyentes y con el fosforo.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 50) se observa en 14.93 y 14.99 ppm los metilos terminales del sustituyente; en 38.16 y 38.45 ppm los carbonos de los metilenos de los sustituyentes.

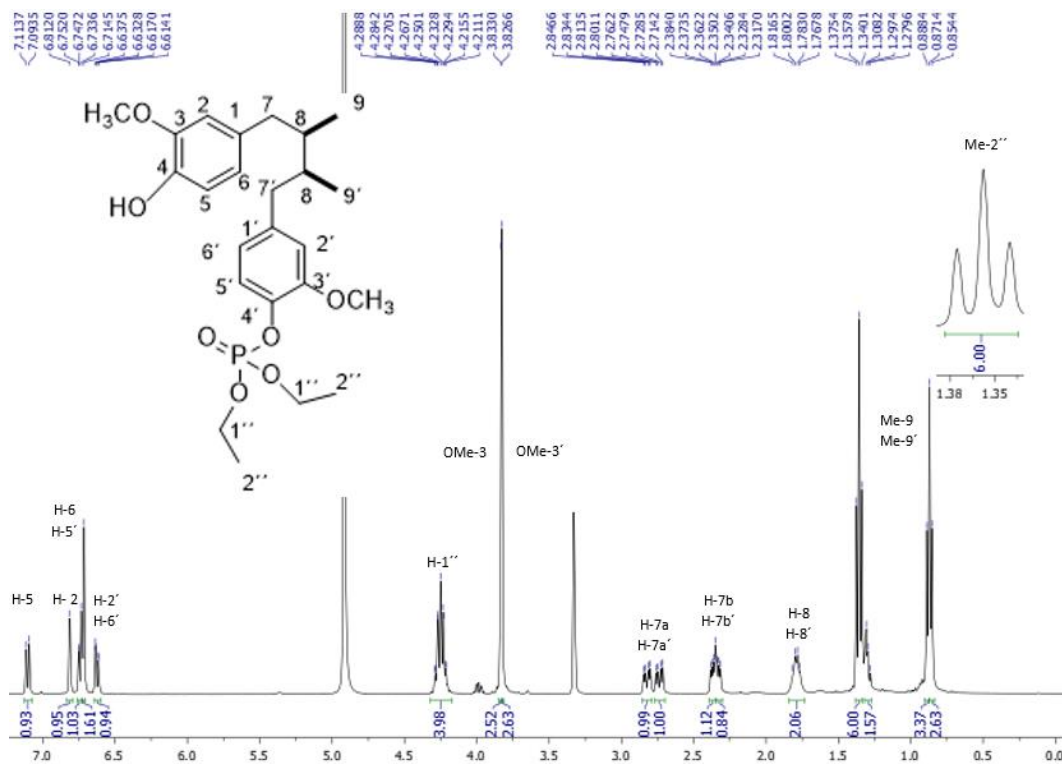


Figura 49. Espectro de RMN ^1H del derivado 11 (400MHz, CDCl_3)

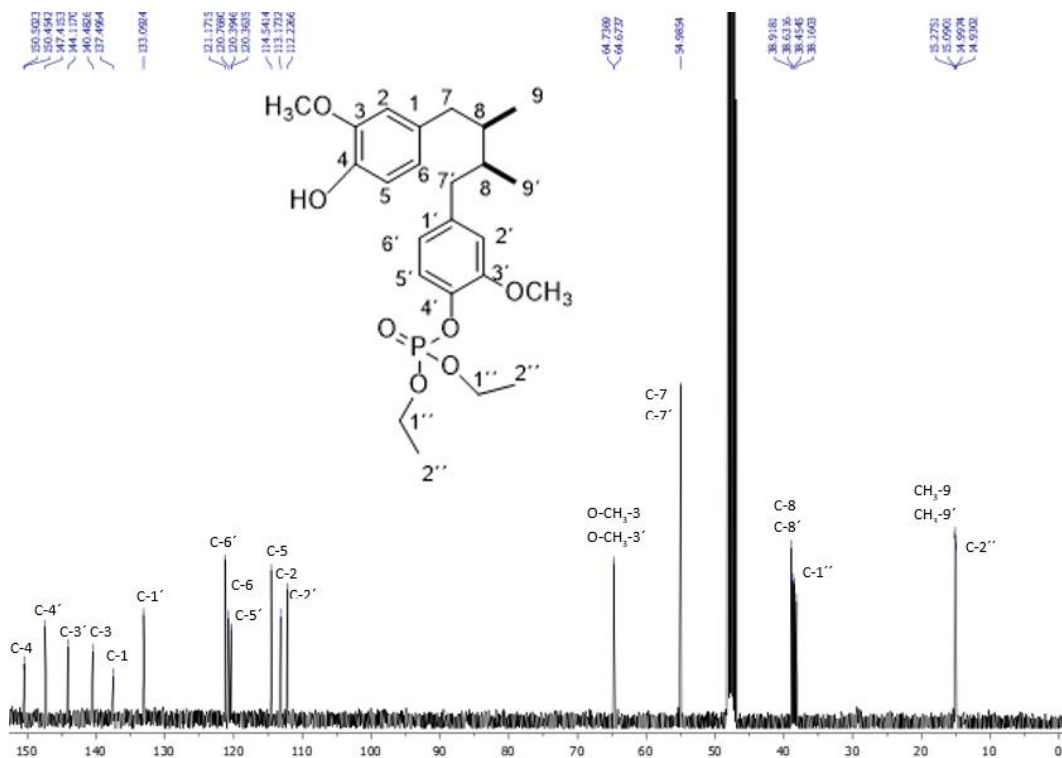


Figura 50. Espectro de RMN ^{13}C del derivado 11 (100 MHz, CDCl_3)

5.3.3.4. Elucidación estructural del derivado 13: 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil difenil fosfato.

El derivado 13 corresponde al derivado monosustituido del producto natural y el difenilclorofosfita. En el espectro de RMN ^1H (Figura 51) se puede observar en la región aromática en 7.26 ppm un triplete (t, $J= 7.33$ Hz, 6H) que corresponde a los protones 3'', 4'', 5'', en 7.40 ppm se observa un triplete dobleteado (td, $J= 7.46; 1.8$ Hz, 4H) corresponde a los protones de la posición 2'' y 6''.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 52) se observa en 119.81 ppm los carbonos de la posición 3'', 4'' y 5'' del sustituyente; en 129.61 ppm se observan los carbonos de la posición 2'' y 6''.

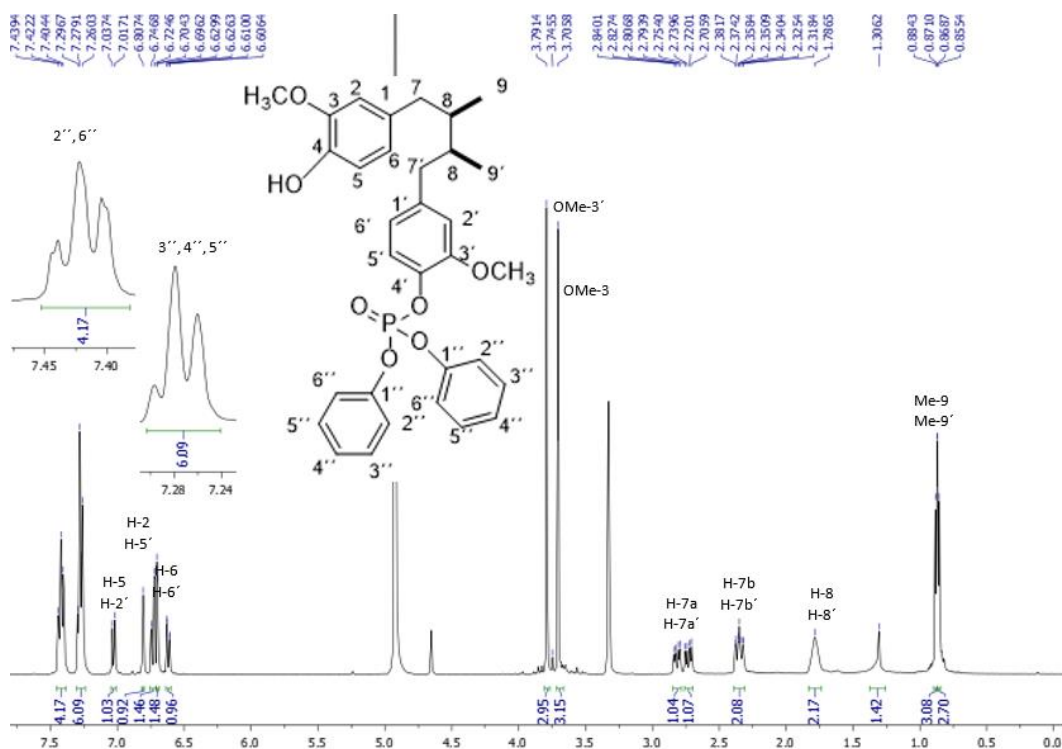


Figura 51. Espectro de RMN ^1H del derivado 13 (400MHz, MEOD)

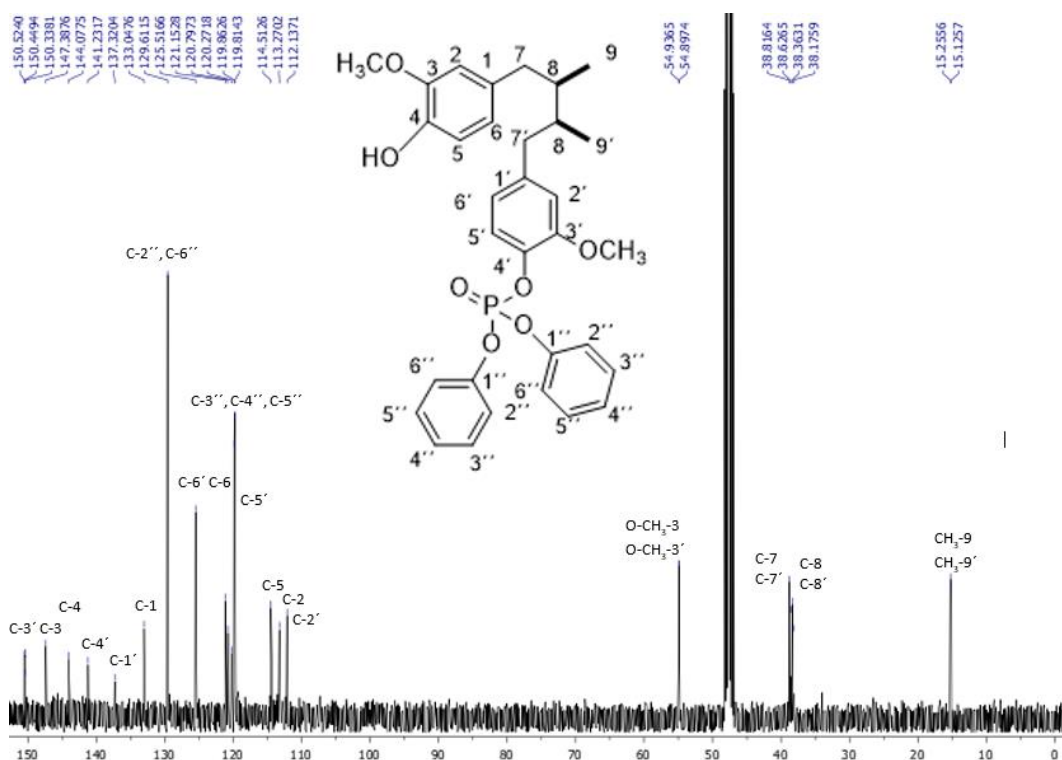


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C del derivado 13 (100MHz, MEOD).

5.3.3.5. Elucidación estructural del derivado 14: 4-((2S,3R)-4-(4-((difenoxyfosforil)oxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil difenil fosfato.

El derivado 14 corresponde al derivado disustituido del producto natural con la difenilclorofosfita. En el espectro de RMN ^1H (Figura 53) se observa en 7.25 ppm un triplete (t, $J= 7.33$ Hz, 12H) que corresponde a los protones 3'', 4'', 5'', en 7.39 ppm se observa un triplete dobleteado (td, $J= 7.9; 1.62$ Hz, 8H) que corresponde a los protones de la posición 2'' y 6''.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 54) se observa en 119.81 ppm los 2'' y 6'' del sustituyente; y en 129.62 ppm se observan los carbonos de la posición 3'', 4'', 5''.

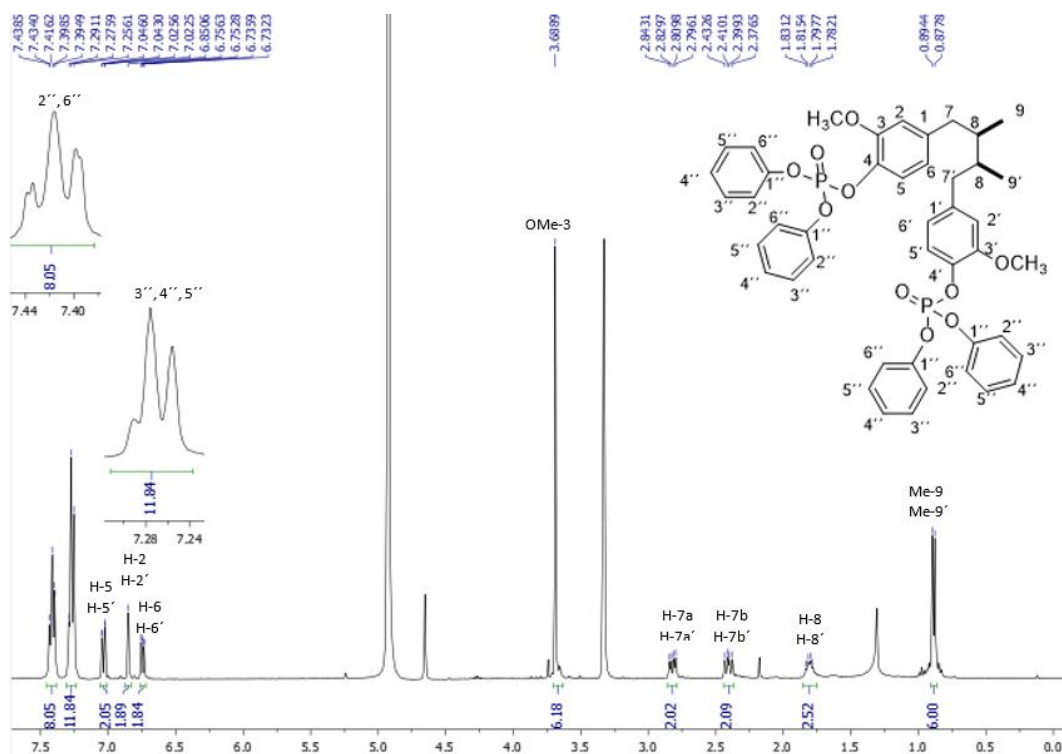


Figura 53. Espectro de RMN ^1H del derivado 14 (400MHz, MeOD)

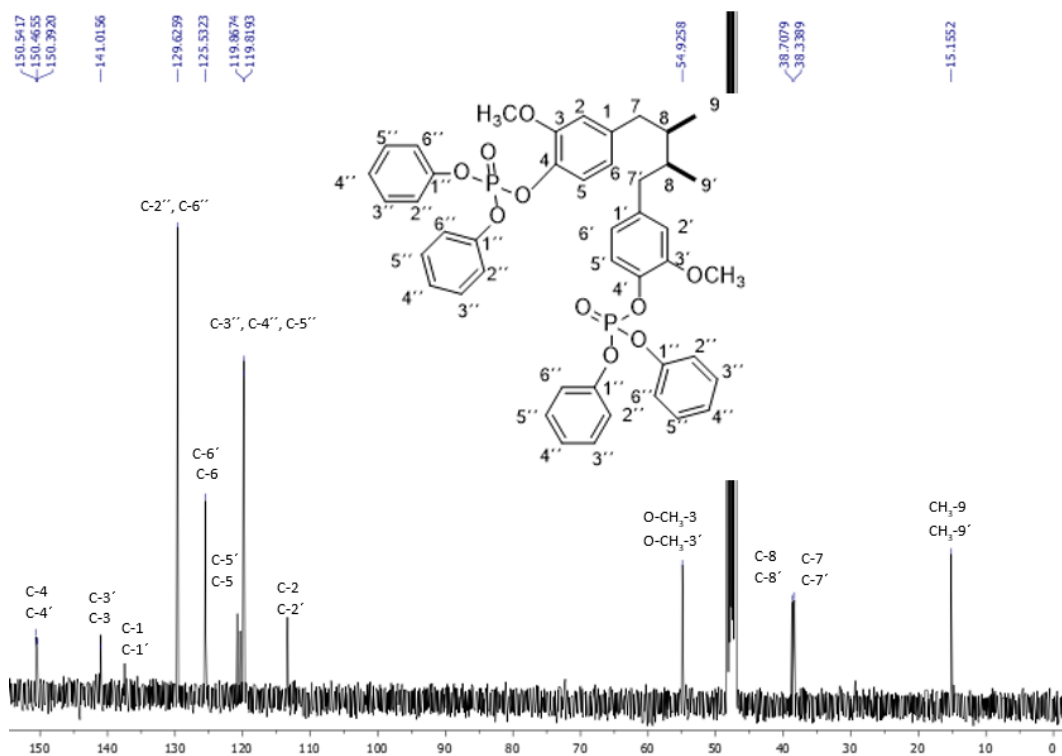


Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C del derivado 14 (100MHz, MeOD)

1.3.3. Elucidación estructural del derivado metilado de LT16

1.3.3.1. 3, 4, 4'-trimetoxi-6,7-ciclolignano (15).

El derivado 15 corresponde al derivado metilado del producto natural LT16. Solo se mencionarán las señales adicionales observadas con respecto al producto natural. En el espectro de RMN ^1H (Figura 55) se observan en 3.78y 3.86 ppm dos singuletes (s, 6H) adicionales que corresponde a los metoxilos de la posición 4 y 4', respectivamente.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 56) se observan en 55.74 y 55.77 ppm los carbonos de los metoxilos de la posición 4 y 4', respectivamente.

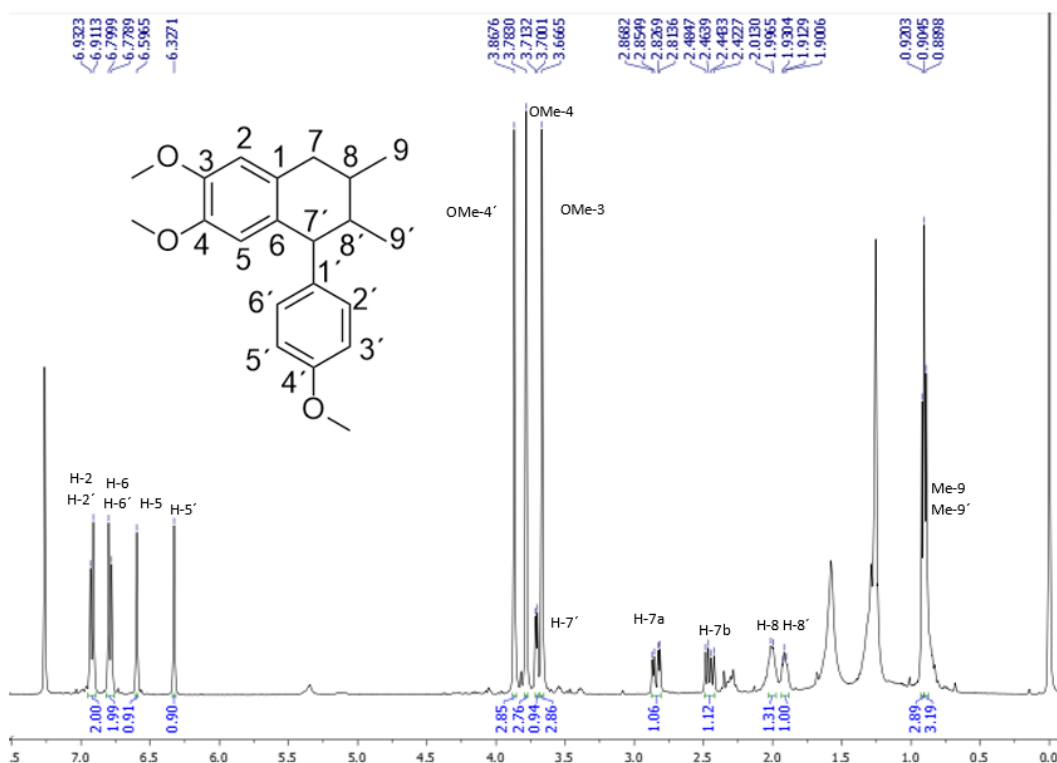


Figura 55. Espectro de RMN ^1H del derivado 15 (400MHz, CDCl_3)

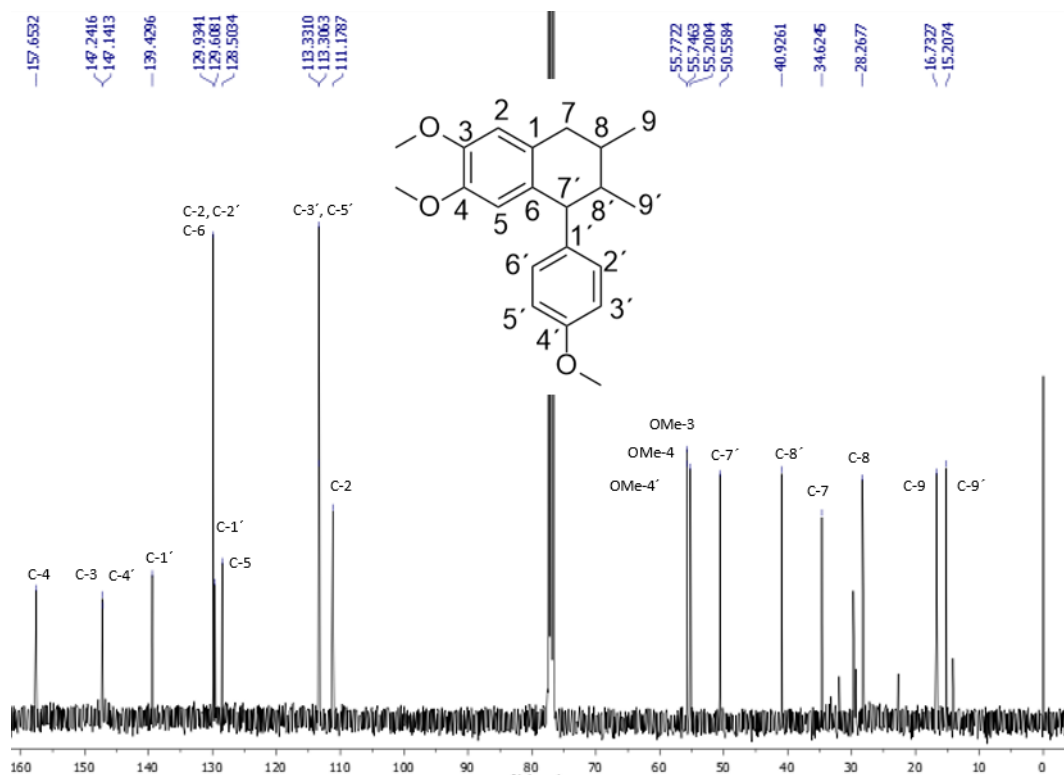


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C del derivado 15 (100MHz, CDCl_3)

5.2 Actividad antibacteriana

Se evaluaron 12 derivados del AmDG y el derivado metilado del LT16 contra ocho aislados clínicos de bacterias farmacorresistentes. Los derivados semi-sintéticos evaluados contra cepas resistentes a diferentes fármacos tuvieron un CMI $>50 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 10).

La actividad antibacteriana de los derivados semi-sintéticos no fue comparable con la actividad antibacteriana del fármaco de referencia levofloxacino.

Tabla 10. Actividad contra bacterias resistentes de los derivados semi-sintéticos del AmdG

Compuesto	<i>P. aeruginosa</i> Resistente a carbapenémicos	<i>S. aureus</i> Resistente a meticilina	<i>K. pneumoniae</i> Resistente a oxacilinas	<i>K. pneumoniae</i> NMD-1+ Resistente a carbapenémicos y cefalosporinas de amplio espectro	<i>A. baumannii</i> Resistencia a carbapenémicos	<i>E. faecium</i> Resistente a vancomicina	<i>K. pneumoniae</i> Productora de BLEE
1	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
3	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
4	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
5	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
6	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
7	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
8	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
9	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
10	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
11	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
13	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
14	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
15	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
Levofloxacin	0.78 µg/mL	12.5 µg/mL	25 µg/mL	>50 µg/mL	12.5 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL

5.3 Actividad antimicobacteriana de los derivados semi-sintéticos del AmDG

Se evaluaron 13 derivados contra la cepa sensible H37Rv y un aislado clínico MFR la cepa G122 (Tabla 11). Los resultados indicaron que solamente dos ésteres el **1** (CMI 25 µg/mL), **5** (CMI 25 µg/mL), y el fosfato **11** (CMI 50 µg/mL), presentaron actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv. Los esterres **5** y **11** presentaron también actividad contra la cepa G122 con una CMI de 50 µg/mL (Figura 57).

La actividad antimicobacteriana de los derivados activos mostraron menor actividad que los fármacos de referencia isoniazida, rifampicina, estreptomycin y etambutol.

Tabla 11. Actividad antimicobacteriana de los derivados semi-sintéticos del AmDG

Compuesto	CMI	
	H37Rv	G122
1	25 µg/mL	> 50 µg/mL
3	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
4	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
5	25 µg/mL	50 µg/mL
6	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
7	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
8	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
9	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
10	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
11	50 µg/mL	50 µg/mL
13	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
14	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
15	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL
Isoniacida	0.048 µg/mL	0.19 µg/mL
Rifampicina	0.048 µg/mL	0.097 µg/mL
Estreptomina	0.78 µg/mL	1.56 µg/mL
Etambutol	3.125 µg/mL	6.25 µg/mL

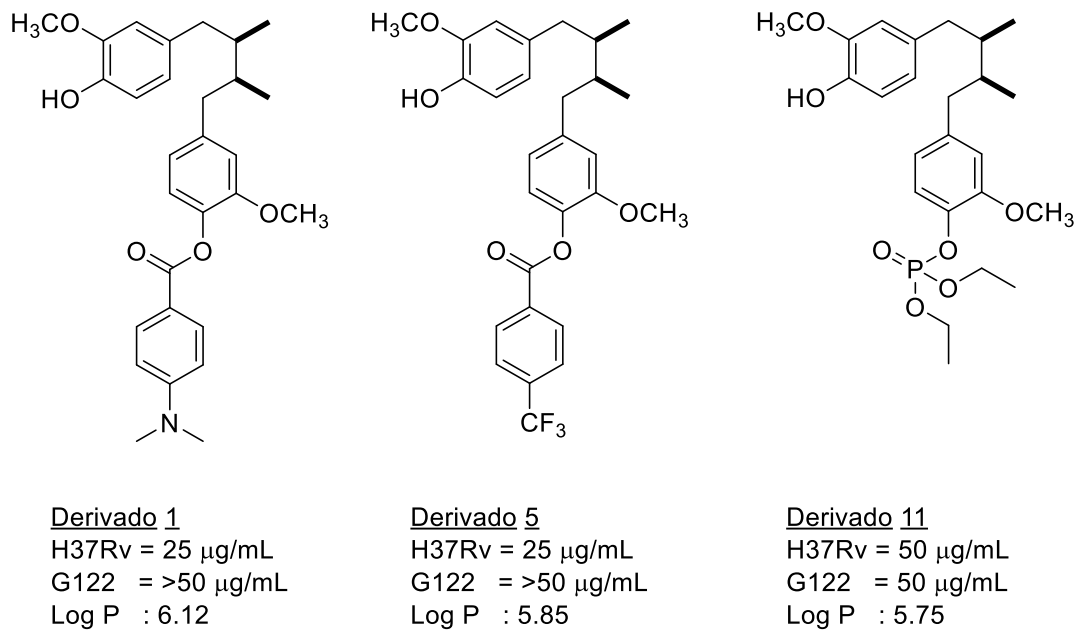


Figura 57. Análogos del AmDG con actividad antimicobacteriana

Los ésteres disustituídos con los mismos sustituyentes no presentaron actividad contra ninguna de las cepas, por lo que se sugiere que la presencia del grupo hidroxilo probablemente sea necesario para la interacción con su diana molecular. Los derivados **1** y **5** fueron activos contra la cepa H37Rv con una CMI de 25 $\mu\text{g/mL}$, siendo 7.7 veces menos activo que el estándar positivo etambutol; el derivado **5** y **11** también presentaron actividad contra la cepa multifarmacorresistente G122 con una CMI de 50 $\mu\text{g/mL}$ siendo 8 veces menor que el estándar positivo etambutol. Los derivados **1**, **5** y **11** fueron menos activos que los estándares positivos rifampicina, isoniacida, estreptomycin y etambutol.

Los derivados **1**, **5**, y **11** cumplen con casi todas las reglas de Lipinski excepto por la regla que indica que el logP debe ser menor de 5. El valor de logP del derivado **1** es de 6.12, del derivado **5** es de 5.85 y el derivado

11 es de 5.75 lo que nos indica que estos derivados son lipofílicos, sin embargo, esto puede ayudar a que atraviese la membrana de *M. tuberculosis* y llegue a su diana farmacológica y así pueda realizar su efecto.

Ambos derivados semisintéticos cumplen las reglas de Veber (2002)⁴⁰ las cuales nos indican la biodisponibilidad oral de los compuestos. Las 2 reglas de Veber analizan los enlaces que puede rotar los cuales deben ser menor a 10 para cumplir con esta regla y para los derivados **1** y **5** es de 7, pero para el derivado **11** es de 12; también analiza el área de superficie polar debe ser menores de 140 Å, para el derivado **1** es de 64.99 Å, el derivado **5** es de 48.00 Å y el derivado **11** es de 84.03 Å es de 6 cumpliendo ambos compuestos esta regla es de 12. Los tres derivados activos tendrían absorción gastrointestinal, para el compuesto 1 sería baja y para el derivado 5 sería alta. Los valores fueron obtenidos mediante la utilización del programa SwissADME ^{41,42}.

Es importante recalcar que los compuestos sintetizados no poseen similitudes con fármacos utilizados actualmente, lo cual nos brinda una nueva opción terapéutica contra *M. tuberculosis*, ya que podrían tener diferente diana terapéutica que los fármacos utilizados.

5.4 Citotoxicidad de los esteres activos

Se determino la citotoxicidad contra macrófagos J774A.1 del *AmDG*, los ésteres **1** y **5** así como los estándares positivos rifampicina, isoniazida, etambutol, levofloxacino, y estreptomycinina (Tablas 12-14). Con el programa GraphPad Prism 7.04 se calculó el IC₅₀ a partir de las absorbancias obtenidas (Figura 58-59).

Tabla 12. % de viabilidad de macrófagos J774A.1 tratados con los derivados **1** y **5**

Concentración µg/mL	% Viabilidad	
	derivado 1	derivado 5
80	13.62	16.63
40	22.16	26.39
20	62.37	52.22
8	74.58	63.67
0.8	91.50	72.26

Tabla 13. % de viabilidad de macrófagos J774A.1 tratados con el *AmDG*.

Concentración µg/mL	% Viabilidad
100	12.91
50	18.24
25	69.08
10	77.66
1	86.31

Citotoxicidad del derivado 1, 5 y AmDG

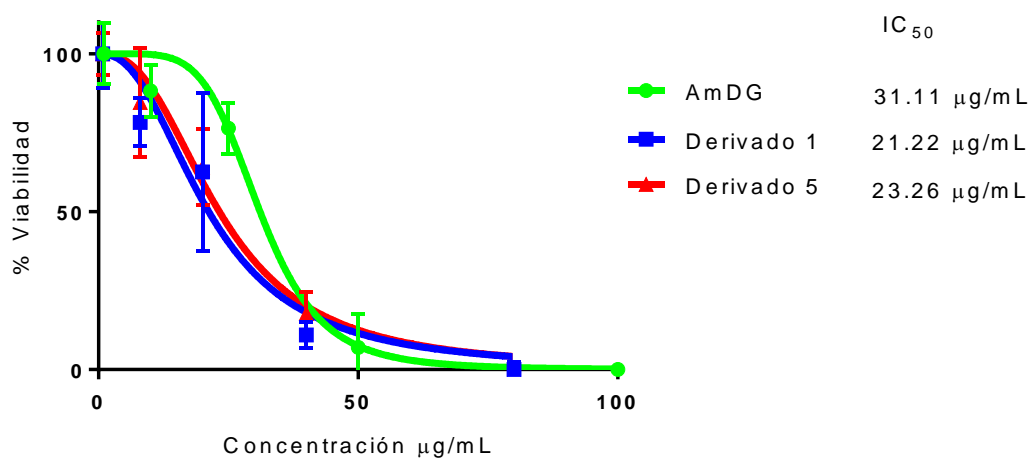


Figura 58. Citotoxicidad del derivado 1, 5 y AmDG en macrófagos J774A.1.

Tabla 14. % de viabilidad de macrófagos J774A.1 tratados con los fármacos de primera y segunda línea anti-tuberculosis.

Concentración µg/mL	Viabilidad (%)				
	INH	RIF	SM	EMB	LFX
100	72.94	11.73	54.31	55.72	81.87
50	88.39	33.45	68.73	65.82	88.39
25	86.03	68.06	72.95	68.56	90.53
10	90.0	94.83	79.47	79.17	92.33
1	100.0	96.41	90.53	78.83	92.63

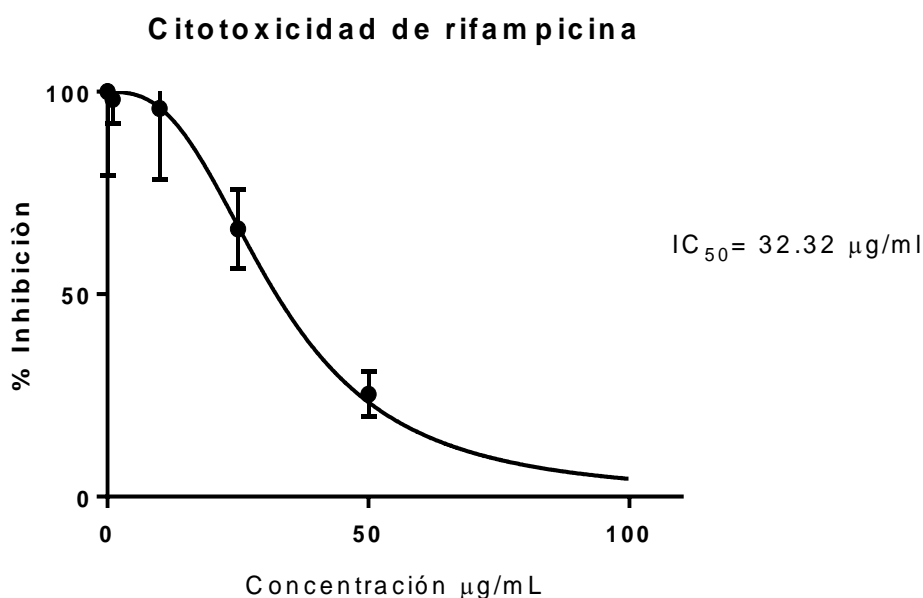


Figura 59. Citotoxicidad de Rifampicina en macrófagos J774A.1.

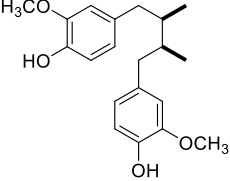
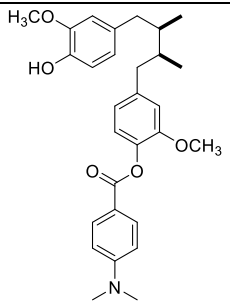
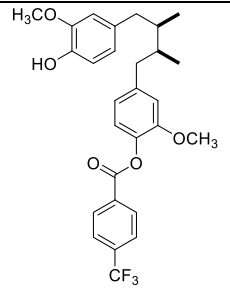
Los resultados de la Figura 58 indica que los esteres **1** ($IC_{50} = 21.22 \mu\text{g/mL}$) y **5** ($IC_{50} = 23.26 \mu\text{g/mL}$) fueron más citotóxicos que el producto natural *AmDG* ($IC_{50} = 31.11 \mu\text{g/mL}$).

Los estándares positivos, isoniazida, estreptomycin, etambutol y levofloxacino presentaron IC_{50} mayores $100 \mu\text{g/mL}$ frente a los macrófagos J774A.1; únicamente se pudo calcular el IC_{50} para rifampicina que fue de $IC_{50} = 32.32 \mu\text{g/mL}$.

Se calculó el índice de selectividad (IS) para el *AmDG* fue de 0.6222 para ambas cepas de *M. tuberculosis*. El éster **1** tuvo un IS de 0.8488 y >0.4244 para *M. tuberculosis* H37Rv y G122, respectivamente. El éster **5** mostro un IS de 0.9304 y 0.4652 para *M. tuberculosis* H37Rv y G122, respectivamente. El *AmDG* y los esteres **1** y **5** presentaron un IS menor a

10 lo que indica que son más citotóxicos para los macrófagos que para *M. tuberculosis*. En contraste los fármacos de referencia presentan un IS mayor de 10 lo que indica que son más tóxico para la micobacteria que para las células mamíferas (Tabla 15).

Tabla 15. Citotoxicidad e índice de selectividad de los derivados **1** y **5**, *AmDG* y estándares positivos contra macrófagos J774A.1

COMPUESTO	IC₅₀ µg/mL	I.S. H37Rv <i>IC₅₀/CMI</i>	I.S. G122 <i>IC₅₀/CMI</i>
 <p>AmDG</p>	31.11	0.6222	0.6222
 <p>Derivado 1</p>	21.22	0.8488	>0.4244
 <p>Derivado 5</p>	23.26	0.9304	0.4652
Isoniazida	>100 µg/mL	>2083.3	>526.31
Rifampicina	32.32 µg/mL	673.3	333.1
Estreptomina	>100 µg/mL	>128.2	>64.10
Etambutol	>100 µg/mL	>32.0	>16
Levofloxacino	>100 µg/mL	>512	>64

5.5 Docking con enzima DXR.

El agrupamiento de las conformaciones resultado de la simulación de dinámica molecular lo que permite identificar conformaciones de la proteína que valdría la pena estudiar como posibles conformaciones de los sitios de unión en un estadio de acoplamiento molecular. El agrupamiento de conformaciones de esta simulación arrojó 8 estructuras relevantes de la DXR, las cuales solo las 2 más numerosas presentan información útil para hacer el acoplamiento molecular (Figura 60).

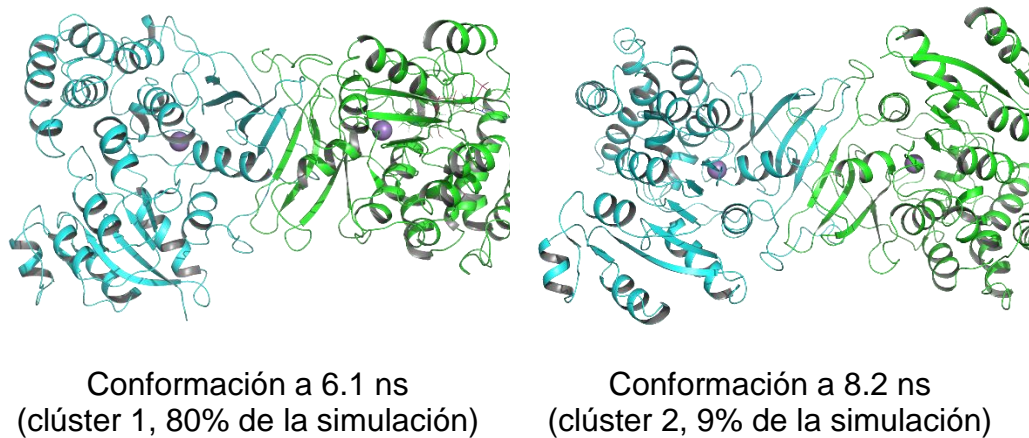
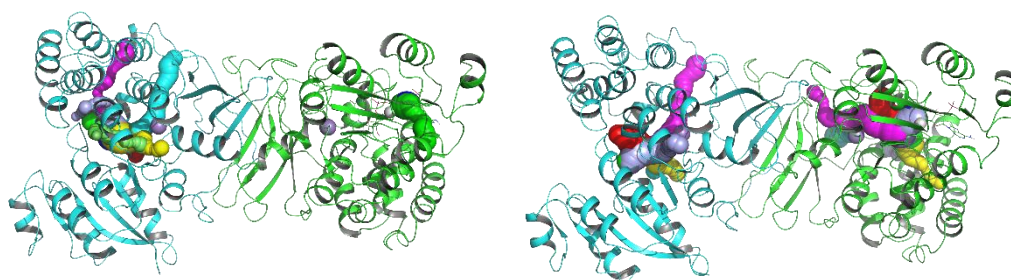


Figura 60. Estructuras para acoplamiento molecular

La estructura está conformada por un dímero y posee dos sitios catalíticos en donde cada sitio contiene un NADPH, durante la simulación uno de ellos fue expulsado. Se realizó un análisis de cavidades y túneles en la estructura realizado con Caver, el cual indicó que tanto la simulación como la presencia del sitio catalítico cambió el tamaño de las cavidades posibles (Figura 61).



Conformación a 6.1 ns

Conformación a 8.2 ns

Figura 61. Conformaciones obtenidas del programa Caver.

La estructura con la conformación a 8.2 ns representa la estructura más relajada y podría constituir a la más representativa en simulaciones más prolongadas. El análisis permitió identificar dos sitios de unión que coinciden con el sitio catalítico de la enzima cuando una de las cadenas carece de cofactor y el otro está presente, con todo lo anterior se definen 2 sitios de unión para 2 conformaciones de la proteína.

El docking se realizó utilizando dos programas distintos para tomar en cuenta diversos factores y posibles conformaciones de unión: AutoDockVina y rDock los cuales nos dan informan: aminoácidos relevantes para la unión de los compuestos, características estructurales de los compuestos necesarios para la unión, tipo de interacciones posibles entre los compuestos y la enzima DXR.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron en situaciones:

- (1-1): cavidad con el sitio catalítico con NADPH conformación cerrada.

- (1-2): cavidad del sitio catalítico sin NADPH en conformación cerrada.
- (2-1): cavidad del sitio catalítico con NADPH en conformación relajada.
- (2-2): cavidad del sitio catalítico sin NADPH en conformación relajada.

Obteniendo diferentes scores en los estudios del acoplamiento molecular para cada compuesto (Tabla 16).

Tabla 16. Scores de los diferentes compuestos y acoplamiento molecular.

Deriv.	MIC (mM)		Score rDock (kcal/mol)				Score AutodockVina (kcal/mol)			
	<i>H37Rv</i>	<i>G122</i>	1-1	1-2	2-1	2-2	1-1	1-2	2-1	2-2
1	0.052	0.105	-198.5	-194.7	-218.1	-223.9	-7.5	-7.9	-7.5	-9.1
3	0.105	0.105	-167.6	-164.5	-187.5	-191.7	-7.8	-8.3	-7.9	-9.9
4	0.080	0.080	-167.6	-182.5	-209.3	-230.5	-7.8	-9.4	-8.5	-10.1
5	0.050	0.100	-167.7	-177.4	-199.3	-199.8	-7.7	-8.6	-7.8	-9.2
6	0.074	0.074	-156.7	-179.8	-205.1	-205.1	-7.8	-7.9	-7.2	-9.9
7	0.102	0.102	-182.8	-182.0	-190.0	-214.2	-7.5	-7.4	-7.5	-8.8
8	0.077	0.077	-145.9	-142.3	-183.3	-185.7	-7.1	-7.3	-6.8	-8.8
9	0.114	0.114	-178.5	-174.5	-203.1	-197.9	-6.4	-7.5	-8.8	-7.8
10	0.092	0.092	-176.9	-169.1	-199.7	-195.2	-6.5	-6.7	-6.5	-6.8
11	0.107	0.107	-178.2	-181.5	-210.2	-211.6	-6.6	-7.4	-6.5	-7.5
13	0.089	0.089	-174.7	-173.3	-216.8	-198.7	-7.2	-8.7	-7.7	-8.5
14	0.063	0.063	-48.6	-115.0	-150.5	-164.8	-7.4	-9.3	-9.0	-9.4
<i>AmDG</i>	0.151	0.151	-200.6	-186.1	-197.8	-196.8	-6.8	-7.0	-6.6	-7.7

Presentaron mayor estabilidad cuando las estructuras están en la conformación más relajada (2-1. 2-2). La diferencia entre los programas es que rDock calculó que los derivados 1, 4, 5, 6, 11 y 13 (resultados sombreados en la tabla 16) presentaron scores más favorables que el producto natural sin derivar, y en el programa AutodockVina la mayoría de los derivados presentaron mayor afinidad teórica que el *AmDG*. Los derivados disustituidos 8, 10, 12 y 14 fueron los que presentaron menor afinidad teórica que los derivados monosustituidos con los mismos sustituyentes. Por lo anterior y observando la tendencia de todos los dockings realizados, los compuestos que mostrarían mejor potencial para unirse a la enzima DXR serían 1, 4, 5, 6, 11 y 13.

El derivado 1 presenta la formación de puentes de hidrógeno con los metoxilos con el TRP277 y GLY145. El grupo adicionado al *AmDG* queda ligeramente expuesto al solvente (sombras grises) y no parece formar interacciones relevantes con la proteína solo posibles choques estéricos con LEU139. El ambiente del sitio de unión, que está por detrás del sitio catalítico, es de naturaleza hidrofóbica que son los aminoácidos verdes (Figura 62).

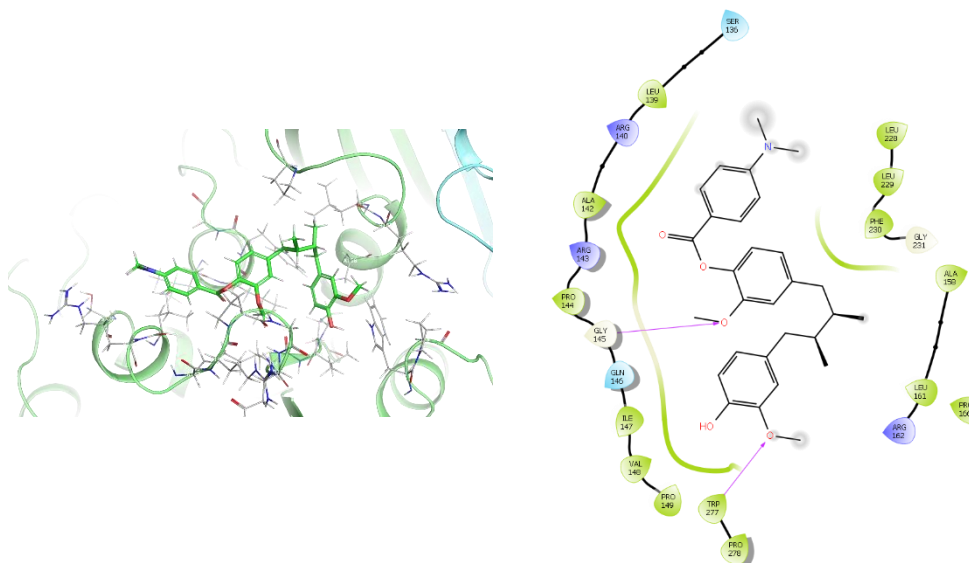


Figura 62. Unión del derivado **1** en la enzima DXR con dos NADPH.

Cuando la proteína cuenta un cofactor NADPH, el derivado presenta interacciones π -catión con el ion manganeso, π - π con TRP203, π -catión con LYS128 y puente de hidrógeno del metoxilo con SER23 (Figura 63). El conjunto de estas interacciones podría tener potencial para Este derivado presento actividad contra la cepa de *M. tuberculosis*, lo que podría ser un posible mecanismo de acción, por lo que se necesitaría realizar la inhibición enzimática *in vitro* para corroborar el resultado obtenido en el docking.

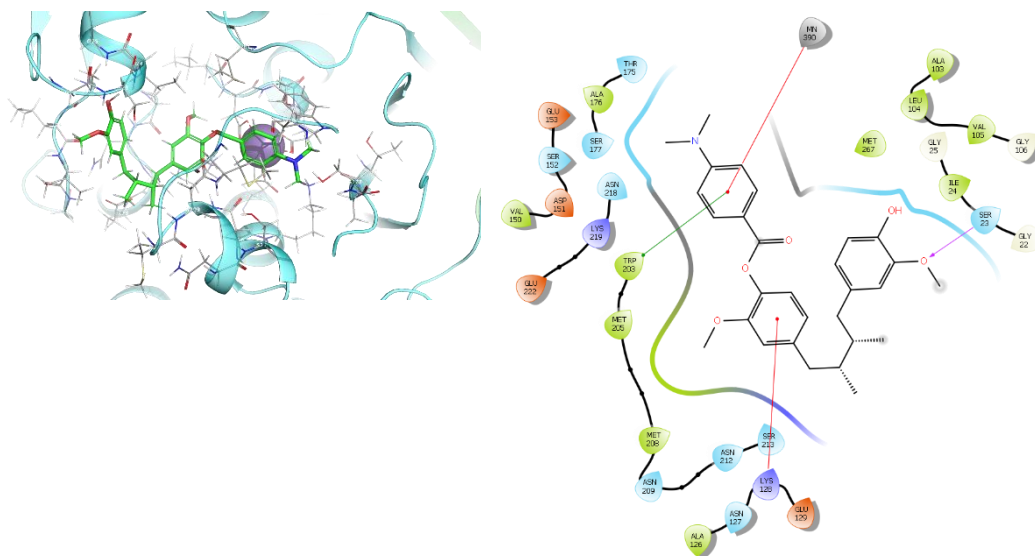


Figura 63. Unión del derivado 1 en la enzima DXR con un NADPH.

Para el derivado 4 es el único derivado disustituido que presenta interacciones con la enzima DXR, este presenta la formación del enlace π - π del anillo aromático del producto natural con PHE230, puentes de hidrogeno del metoxilo con el TRP277 y del oxígeno del sustituyente con ARG279 (Figura 64).

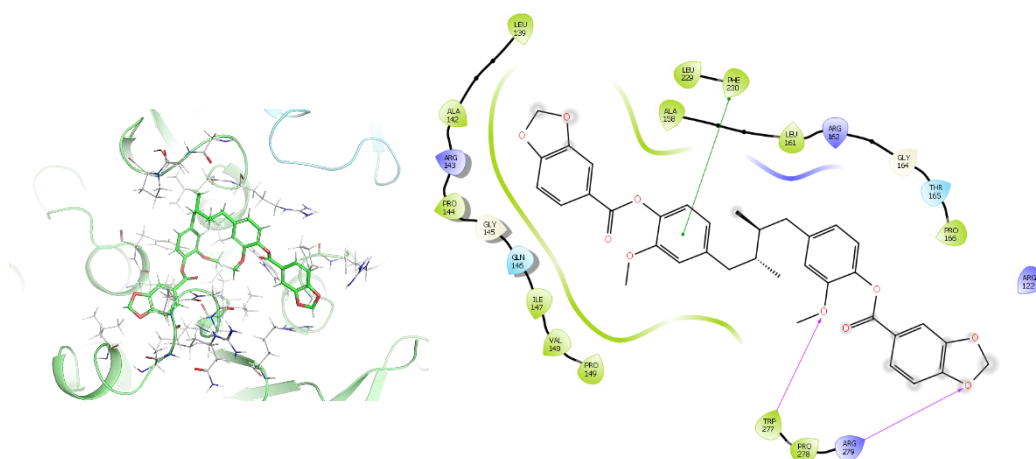


Figura 64. Unión del derivado 4 en la enzima DXR con dos NADPH

Cuando la enzima se encuentra con un cofactor NADPH se forman interacciones π - π del anillo aromático del sustituyente con el TRP203, π -

cación del anillo aromático del sustituyente con el MN390, π -cación del aromático del *AmDG* con LYS128 y también forma puentes de H el oxígeno del sustituyente y GLY47 (Figura 65).

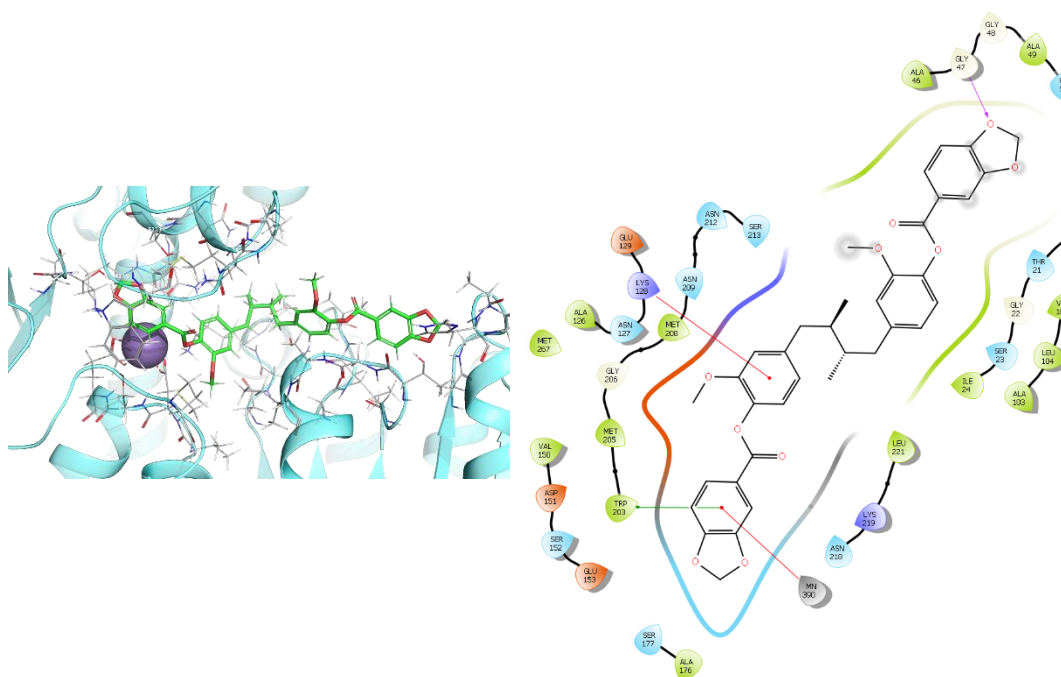


Figura 65. Unión del derivado **4** en la enzima DXR con un NADPH.

Por las interacciones que forma el derivado **4** con la enzima DXR podría ser un potencial inhibidor; pero en estudio *in vitro* contra las cepas de *M. tuberculosis* presento una concentración mínima inhibitoria $>50 \mu\text{g/mL}$, esto se puede deber a la presencia de otros factores que intervengan para que llegue a esta enzima y poder inhibirla como puede ser el tamaño del derivado que impida que pueda atravesar las barreras biológicas de la micobacteria.

El derivado **5** presenta una interacción π - π del anillo aromático del producto natural con PHE230, este derivado tiene posibles choques estéricos con

Este derivado presenta moderada actividad contra las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y G122 con un rango de MIC = 25-50 µg/mL por lo que este compuesto podría ser guía para realizar una optimización de esta estructura.

El derivado disustituido **6** no presenta interacciones relevantes cuando la proteína cuenta con los NADPH unidos, inclusive, la estructura toma una conformación de pliegue sobre sí misma, lo que tendría de consecuencia la falta de interacciones relevantes. Adicionalmente los grupos presentan choques estéricos con varios aminoácidos como GLY145 y PHE230 (Figura 68).

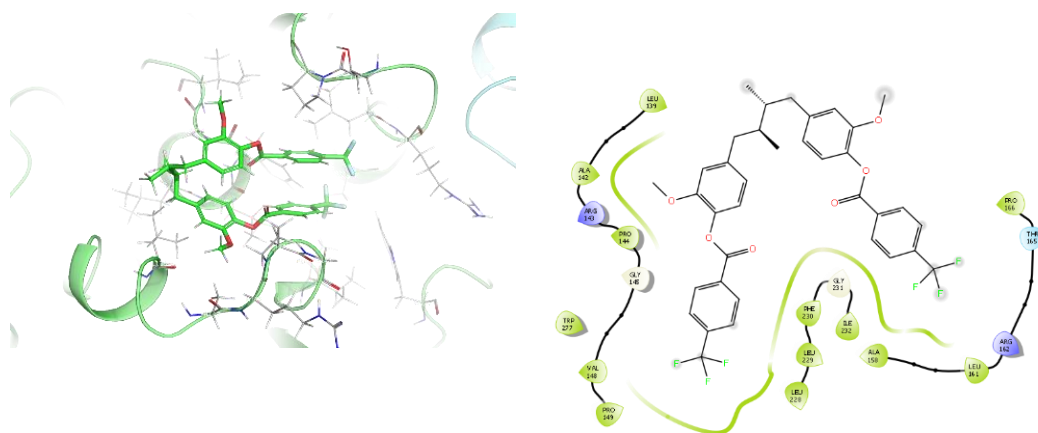


Figura 68. Unión del derivado **6** en la enzima DXR con dos NADPH.

El derivado **6** presenta en el sitio catalítico un puente de hidrógeno del metoxilo con GLY47, exponiendo ligeramente a uno de los grupos al disolvente. Al igual que la estructura con un NADPH no presenta interacciones importantes y los grupos trifluorometilfenilcarbonil pueden

presentar choques estéricos con ILE24, ALA88, LEU104 y LYS128 (Figura 69).

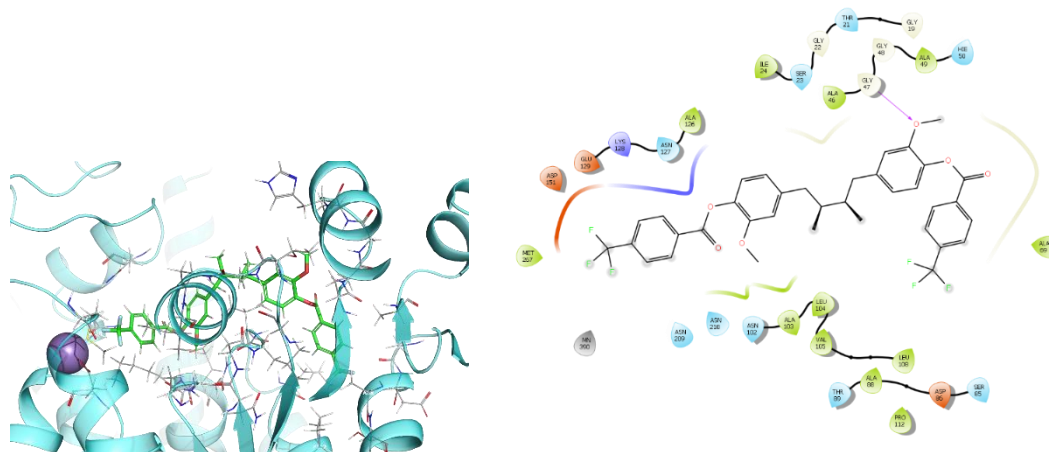


Figura 69. Unión del derivado **6** en la enzima DXR con un NADPH.

Comparando con el compuesto monosustituido que presento actividad antimicobacteriana. Los resultados de acoplamiento molecular indicarían que esta pérdida de actividad se debe a que el compuesto ya no interactúa correctamente como los otros compuestos, en particular el ion manganeso del sitio catalítico o por lo relacionado con las propiedades fisicoquímicas del compuesto.

Al calcular la unión del derivado **11** con la enzima NADPH en su sitio catalítico no presentó interacciones relevantes, el grupo añadido está expuesto al solvente y podría presentar choques estéricos LEU139 y con ILE149 (Figura 70).

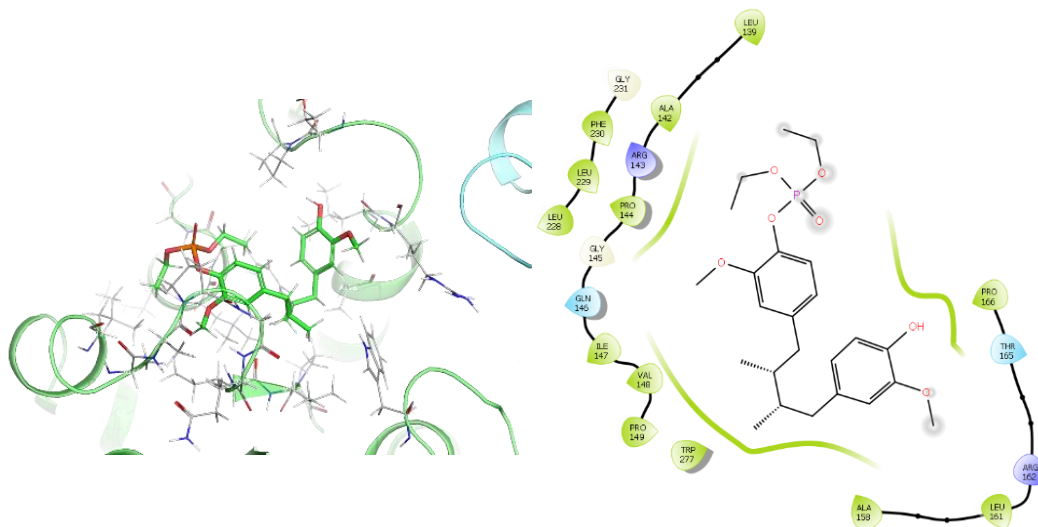


Figura 70. Unión del derivado 11 en la enzima DXR con dos NADPH.

Cuando se calculó la unión a la enzima con un NADPH no se presentaron interacciones relevantes, al igual que cuando se calculó con dos NADPH podría presentar choques estéricos con GLU153, TRP203 y ASN209 (Figura 71).

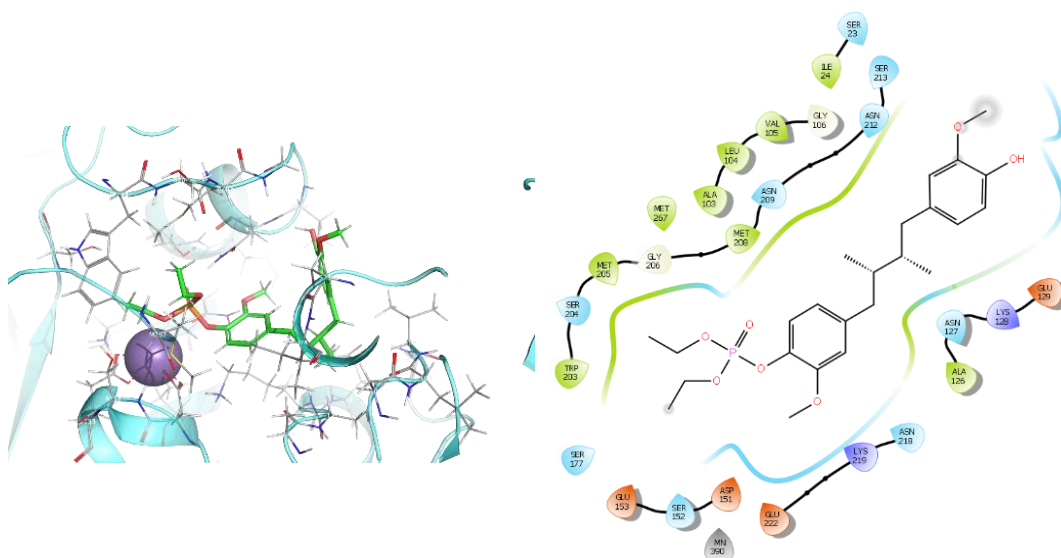


Figura 71. Unión del derivado 11 en la enzima DXR con un NADPH.

Por la presencia de choques estéricos y ninguna interacción de relevancia para su unión, este compuesto probablemente no permanezca unido a la enzima el tiempo suficiente para modificar su actividad catalítica. Esto podría estar relacionado con la baja actividad antimicobacteriana *in vitro* que presenta este compuesto; sin embargo, no se puede descartar otro tipo de fenómenos, como el hecho que los ésteres fosfóricos son biológicamente lábiles y que dado las condiciones especiales del cultivo de *M. tuberculosis*, es posible que en el medio de cultivo se esté hidrolizando este fosfoéster de forma bioquímica para resultar el fosfato de AmDG, el cual tendría pocas posibilidades de atravesar las barreras biológicas y tener un efecto antimicobacteriano.

El derivado **13** muestra un puente de hidrógeno del sustituyente y GLY145 cuando se encuentran presentes en la enzima ambos NADPH, además los grupos fenilo del sustituyente pueden presentar choques estéricos con ILE139, GLY145, ILE147 y VAL148 (Figura 72).

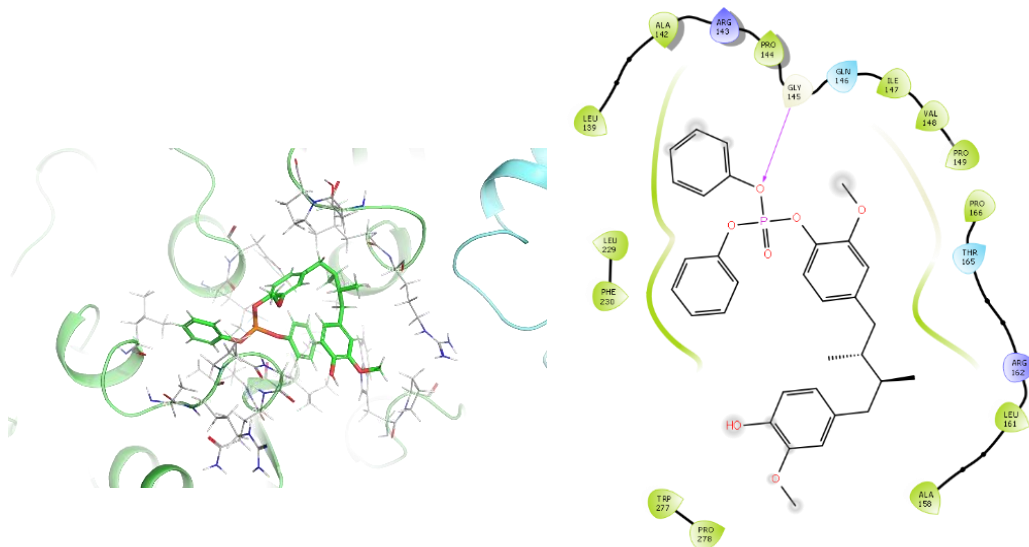


Figura 72. Unión del derivado **13** en la enzima DXR con dos NADPH.

Cuando la enzima tiene solo un NADPH se presentan puentes de hidrógeno que se forma entre el metoxilo con THR21, el hidroxilo con GLY47 y el sustituyente con ASN218, adicionalmente puede presentar choques estéricos con ILE24, ALA126, LYS128 y ASN209 (Figura 73).

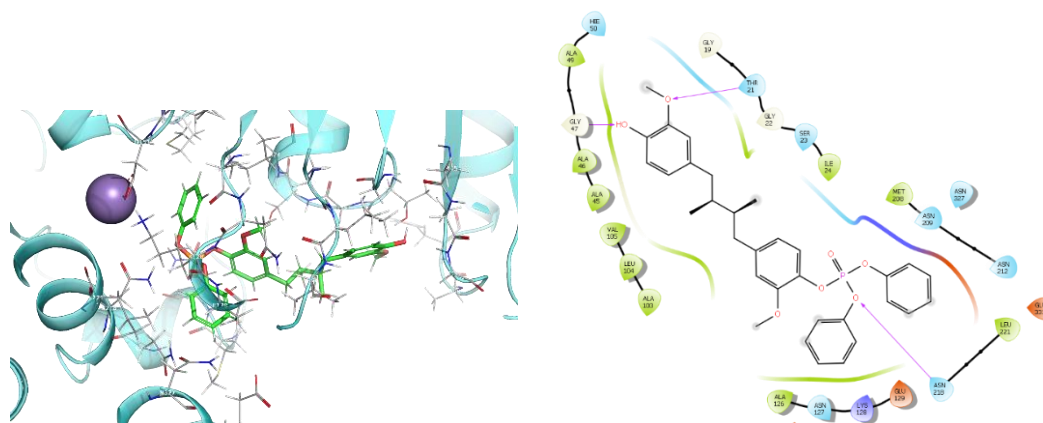
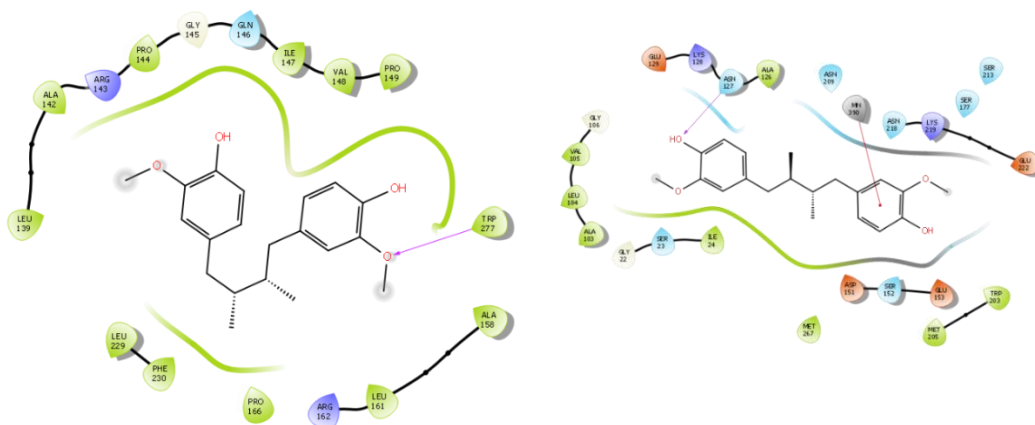


Figura 73. Unión del derivado **13** en la enzima DXR con un NADPH

Las interacciones que presenta el *AmDG* con la enzima DXR fueron puentes de hidrógeno del metoxilo con TRP277 cuando la enzima se

encuentra con dos NADPH. Pero cuando se evalúa las interacciones de la enzima con un NADPH se observan puentes de hidrógeno del hidroxilo con AGN127 y π - π del anillo aromático y el ion manganeso (Figura 74).



Unión del AmDG en la enzima DXR con dos NADPH

Unión del AmDG en la enzima DXR con un NADPH

Figura 74. Interacciones del AmDG y la enzima DXR

De los derivados evaluados fueron los monosustituidos los que mostraron mayor afinidad teórica con la enzima DXR y resultaron ser más afines que el producto natural. Por los scores obtenidos la actividad antimicrobacteriana se puede proponer que los grupos añadidos tienen que formar interacciones con los aminoácidos aromáticos como TRP227, PHE230 o TRP203 y por otra parte interacciones π -catión como con LYS128 y ARG279. Los derivados monosustituidos son los que podrían presentar este tipo de interacciones, a diferencia de los derivados disustituidos que tuvieron scores más bajos y esto podría sugerir que existe poca afinidad con la enzima.

Los derivados que presentaron actividad antimicobacteriana *in vitro* (Tabla 17) son los derivados que mostraron interacciones π -catión con el ion manganeso y podría ser el cual podría explicar solo en parte la actividad antimicobacteriana teniendo como blanco esta enzima. Tomando en cuenta que el *AmDG* también presenta interacción con el ion manganeso y también presenta actividad contra *M. tuberculosis* con un MIC= 50 $\mu\text{g/mL}$ y esta interacción es compartida con los derivados que presentaron actividad, para demostrar los resultados obtenidos teóricamente son necesarios los estudios *in vitro* de estos derivados con la enzima.

Tabla 17. Tipos de unión de los derivados con la enzima DXR con 1 y 2 NADPH.

DERIVADO	UNIÓN A CADENA CON 2 NADPH	UNIÓN A CADENA CON 1 NADPH
1	Puentes de H entre GLY 145 -OMe Puentes de H entre TRP 277 -OMe	π -catión con el ion manganeso 390 π - π con TRP 203 π -catión con LYS 128 Puente de H con SER 23
4	Puentes de H del Trp 277- OMe Puentes de H de ARG 279 – O(Dioxi) π - π con PHE 230	π - π con TRP 203 π -catión con el ion manganeso (benzodioxolano) π -catión con LYS 128 Puentes de H con GLy 47
5	π - π con PHE 230 (AmDG)	π -catión con el ion manganeso 390 (sustituyente) Puente de H con ASN 212-OH
6	No presenta interacciones importantes, toma conformación de pliegue sobre si misma. Además, presentan choques con varios aminoácidos como GLY 145 y PHE 230	Puentes de H con GLY 47-OMe
11	No presenta interacciones relevantes, el grupo añadido está expuesto al solvente y podría presentar choques estéricos con LEU 139 y ILE 149	No presenta interacciones relevantes, el grupo añadido está expuesto al solvente y podría presentar choques estéricos con GLU 153 y TRP 203 y ASN 209
13	Puente de H con GLU 145 Los grupos fenilo del fosfoester pueden presentar choques estéricos con ILE 139, GLY 145, ILE 147 y VAL 148	Puentes de H entre THR 21-OMe Puentes de H entre GLY 47-OH Puentes de H entre ASN 218-Ofosfita Puede presentar choques estéricos con ILE 24, ALA 126, LYS 128 y ASN 209

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de residuos se realizó conforme a las normas establecidas por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y por Reglamento de la Ley General Para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) en la Facultad de Ciencias Químicas y en el Hospital Universitario, UANL.

CÁPITULO VI

CONCLUSIONES

1. Se aisló, purificó y caracterizó el *AmDG*, 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona y 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano.
2. Se sintetizó, purificó y caracterizó el derivado 3,4,4'-trimetoxi-6,7'-ciclolignano a partir del 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano
3. Se sintetizaron a partir del *AmDG*, purificaron y caracterizaron 12 derivados semisintéticos, incluyendo siete ésteres y cinco fosfatos.
4. Los derivados semisintéticos no presentaron actividad contra ocho aislados clínicos de bacterias farmacorresistentes (MI > 50 µg/mL)
5. Los ésteres **1** y **5**, presentaron actividad antimicobacteriana con una CMI de 25µg/mL contra la cepa H37Rv. El éster **5** presentó actividad contra la cepa resistente G122 con una CMI de 50 µg/mL.
6. El fosfato **11** presentó actividad contra las cepas H37Rv y G122 una CMI de 50 µg/mL.
7. Los derivados **1** (IC₅₀ = 21.22 µg/mL) y **5** (IC₅₀ = 23.26 µg/mL) fueron más citotóxicos que el *AmDG* (IC₅₀ = 31.11 µg/mL) frente a los macrófagos J744.
8. El índice de selectividad para los derivados **1** y **5** fue menor que 10 por lo que no son selectivos para la micobacteria.
9. Los resultados del docking indicaron que los ésteres **1**, **4**, **5** y **6** y los fosfatos **11** y **13** mostraron mayor afinidad hacia la enzima DXR que el *AmDG*.
10. Los derivados **1** y **5** que mostraron actividad contra las dos cepas de *M. tuberculosis* mostraron también interacciones en el sitio catalítico de

la enzima DXR lo que podría explicar la actividad antimicobacteriana y posible mecanismo de acción.

11. Los derivados semi-sintéticos fueron menos activos contra las cepas bacterianas evaluadas y fueron más citotóxicos que los fármacos isoniazida, rifampicina, etambutol y levofloxacina por lo que la hipótesis se rechaza.

PERSPECTIVAS:

1. Determinar la actividad enzimática *in vitro* de los derivados activos **1**, **4**, **5**, **6**, **11** y **13** con la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR).

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Informe mundial sobre la tuberculosis 2018. http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/.
2. Vecchiola H, M. [Mycobacterium tuberculosis]. *Rev. Chilena Infectol.* **27**, 1–4 (2010).
3. World Health Organization. Informe mundial sobre la tuberculosis. http://www.who.int/tb/publications/global_report/g (2014).
4. Organización Mundial de la Salud. OMS | Tuberculosis. *WHO* (2016). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. (Accessed: 29th September 2016)
5. En, C., Fuente, L. & Sede De La Ops, B. MARCO DE TRABAJO PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN GRANDES CIUDADES DE LATINOAMÉRICA Y EL CARIBE. *Organ. paramericana la Salud* 1–56 (2016).
6. Soediono, B. Global Tuberculosis report. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 160 (2015).
7. DOF - Diario Oficial de la Federación. Available at: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5321934&fecha=13/11/2013&print=true.
8. Secretaria de Salud. Tuberculosis | Secretaría de Salud | Gobierno | [gob.mx](http://www.gob.mx). 07 de Marzo (2016). Available at: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/tuberculosis>.
9. CENAPRE. Casos nuevos de Tuberculosis Todas Formas en Estados Unidos Mexicanos 1990-2015. Available at: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/casos_nuevos_tb_todas_formas.pdf. (Accessed: 14th September 2016)
10. CENAPRE. Casos nuevos de Tuberculosis Pulmonar en Estados Unidos Mexicanos 1990-2015. Available at: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/casos_nuevos_tb_pulmonar.pdf. (Accessed: 14th September 2016)
11. CENAPRE. Casos Nuevos de Tuberculosis Meningea en Estados Unidos Mexicanos. Available at: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/casos_nuevos_tb_meningea.pdf. (Accessed: 15th September 2016)
12. Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el sida. Panorama de la respuesta nacional al VIH México 2015.
13. WHO. OMS | Tuberculosis. *WHO* (2018). Available at:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. (Accessed: 5th February 2018)

14. Lozano, J. A. Tuberculosis . Patogenia ,. *Offarm* **21**, 102–110 (2002).
15. Salud, S. de. Prevención y Control de la Tuberculosis. 1–5 (2009) http://www.cenapre.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PreventionControlTuberculosis2013_2018.pdf.
16. Ministerio Protección Social, Instituto Nacional de Salud & Organización Panamericana de la Salud. Lineamientos para el Manejo Programático de pacientes con Tuberculosis Farmacorresistente. 1–223 (2013).
17. Zager, E. M. & McNerney, R. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect. Dis.* **8**, 1–5 (2008).
18. GUEST COMMENTARY Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis TUBERCULOSIS DRUG SCREENING PROGRAM*. **45**, 1943–1946 (2001).
19. Sloan, D. J., Davies, G. R. & Khoo, S. H. Recent advances in tuberculosis: New drugs and treatment regimens. *Antimicrob. AGENTS CHEMOTHERAPY* 1943–1946 (2001).
20. Karley Klein, P. *Microbiología*. (2002).
21. OMS | Resistencia a los antimicrobianos. *WHO* (2017).
22. OMS | La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. *WHO* (2017).
23. Infecciones Nosocomiales | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. Available at: <https://www.gob.mx/salud/articulos/infecciones-nosocomiales>. (Accessed: 6th February 2018)
24. García, A., Bocanegra-García, V., Palma-Nicolás, J. P. & Rivera, G. Recent advances in antitubercular natural products. *Eur. J. Med. Chem.* **49**, 1–23 (2012).
25. Clemente-Soto, Balderas-Rentería, I. Rivera, G. Segura-Cabrera, A. Garza-González, E. Camacho-Corona, M. Potential Mechanism of Action of meso-Dihydroguaiaretic Acid on Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Molecules* **19**, 20170–20182 (2014).
26. Saldívar, L. Estado Actual del Conocimiento Sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D . C .) Coville]. *Rev. Mex. Fitopatol.* **21**, 214–222 (2003).
27. J. M. J. Favela-Hernández, A. García, 1 E. Garza-González, V. M. R.-G. and & Camacho-Corona^{1*}, M. R. Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*. **1960**, 1957–1960 (2012).
28. Reyes-Melo, K. Y. Universidad Autónoma De Nuevo León. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 2015).

29. Nordqvist, A. Christofer B. Mounir A. . Jansson M.,. Sherry L. .Anders K. and Mats L. Synthesis of Functionalized Cinnamaldehyde Derivatives by an Oxidative Heck Reaction and Their Use as Starting Materials for Preparation of Mycobacterium tuberculosis 1-Deoxy-D-xylulose- 5-phosphate Reductoisomerase Inhibitors. *J. Org. Chem* **76**, 8986–8998 (2011).
30. Simões, M. F., Valente, E., Gómez, M. J. R., Anes, E. & Constantino, L. Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs. Stability, activation and activity against M. tuberculosis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **37**, 257–263 (2009).
31. San Jose, G. Jacksona R., Uha E., Johnyb C., Haymondb A. Lundbergc L., Pinkhamc C., Kehn-Hallc K., Boshoffd H.I., Couchb R. D. and Cynthia S. DowdDesign of Potential Bisubstrate Inhibitors against Mycobacterium tuberculosis (Mtb) 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (Dxr)-Evidence of a Novel Binding Mode. *Medchemcomm* **4**, 1099–1104 (2013).
32. Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G. & Andricopulo, A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* **20**, 13384–13421 (2015).
33. Durrant, J. D. & McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* **9**, 71 (2011).
34. Vitor Gilles, Marianna A. Vieira, V. L. J. E. V. R. C. A New, Simple and Efficient Method of Steglich Esterification of Juglone with Long Chain Fatty Acids: Synthesis of a New Class of Non-Polymeric Wax Deposition Inhibitors for Crude Oil. *J. Braz. Chem. Soc.* **26**, 74–83 (2015).
35. Le Corre, S. S., Berchel, M., Couthon-Gourvès, H., Haelters, J. P. & Jaffrès, P. A. Atherton-Todd reaction: Mechanism, scope and applications. *Beilstein J. Org. Chem.* **10**, 1166–1191 (2014).
36. Franzblau, S. G. Witzig, R S. McLaughlin, J C Torres, P. Madico, G. Hernandez, A. Degnan, M T. Cook, M B. Quenzer, V K. Ferguson, R M. Gilman, R H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 362–6 (1998).
37. J.R. ZGODA & J.R. PORTER. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. *Pharm. Biol.* **39**, 221–225 (2001).
38. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**, 271–277 (1986).
39. dxr - 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa - Mycobacterium tuberculosis (cepa ATCC 25618 / H37Rv) - dxr gene & protein. Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/P9WNS1>. (Accessed: 19th June 2018)

40. Veber, D. F. Stephen R. Hung-Yuan C. Brian R. Keith W. and Kenneth D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem* **45**, 2615–2623 (2002).
41. Daina, A. & Zoete, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* **11**, 1117–1121 (2016).
42. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of *n* -Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 3284–3301 (2014).

ANEXO

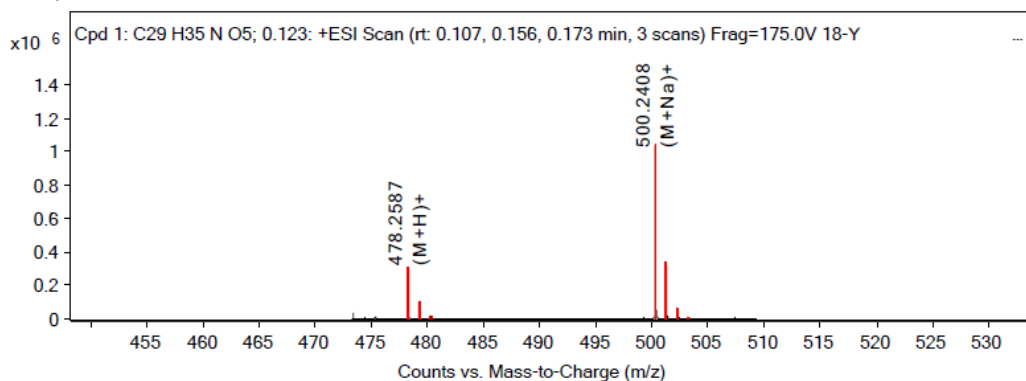
Derivado 1

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C ₂₉ H ₃₅ N O ₅ ; 0.123	0.123	477.2515	1039600	C ₂₉ H ₃₅ N O ₅	477.2515	-0.05	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C ₂₉ H ₃₅ N O ₅ ; 0.123	500.2408	0.123	Find By Formula	477.2515

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
478.2587	478.2588	0.2	1	303107.09	(M+H) ⁺

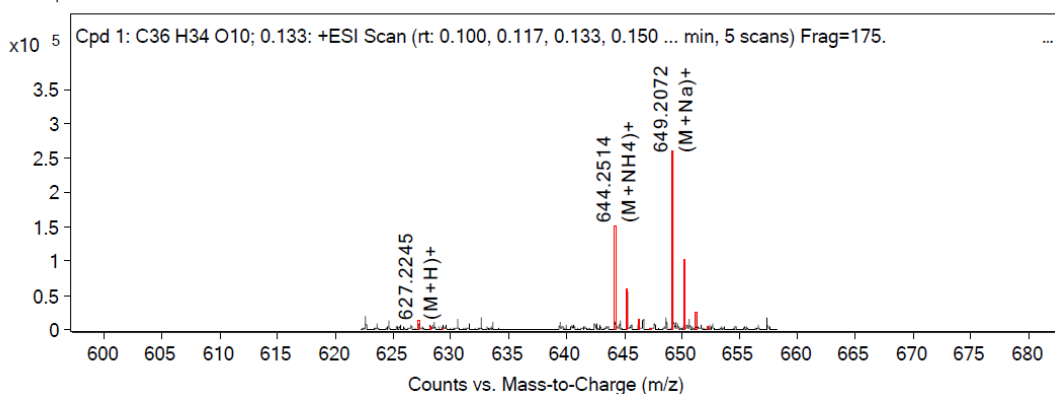
Derivado 4

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C ₃₆ H ₃₄ O ₁₀ ; 0.133	0.133	626.2173	150354	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₀	626.2152	3.36	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C ₃₆ H ₃₄ O ₁₀ ; 0.133	644.2514	0.133	Find By Formula	626.2173

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
627.2245	627.2225	-3.17	1	9460.09	(M+H)+
628.2082	628.2259	28.16	1	6016.54	(M+H)+
629.2017	629.2287	43.01	1	3937.85	(M+H)+
644.2514	644.249	-3.64	1	150354.47	(M+NH4)+
645.2545	645.2524	-3.29	1	56267.46	(M+NH4)+
646.2572	646.2552	-3.04	1	13895.12	(M+NH4)+
649.2072	649.2044	-4.26	1	259466.97	(M+Na)+
650.2103	650.2078	-3.87	1	96647.61	(M+Na)+
651.2124	651.2107	-2.62	1	23672.2	(M+Na)+
652.2138	652.2134	-0.54	1	4417.95	(M+Na)+

--- End Of Report ---

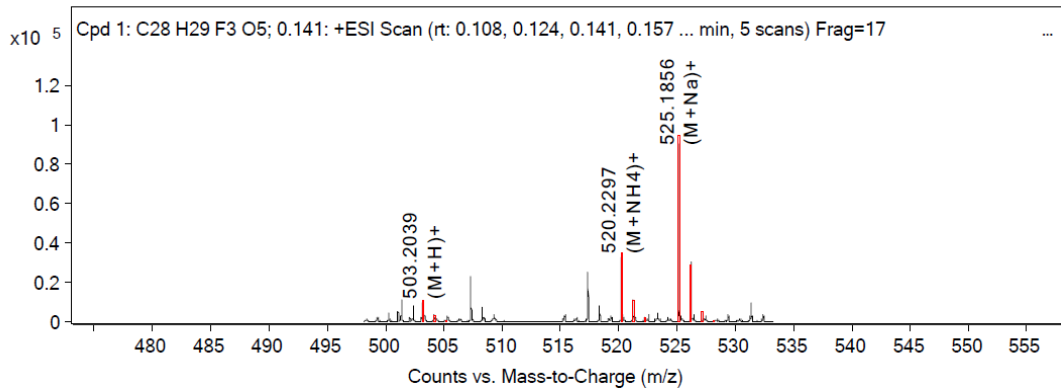
Derivado 5

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C28 H29 F3 O5; 0.141	0.141	502.1964	92650	C28 H29 F3 O5	502.1967	-0.66	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C28 H29 F3 O5; 0.141	525.1856	0.141	Find By Formula	502.1964

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
503.2039	503.204	0.19	1	9671	(M+H)+
504.2078	504.2074	-0.88	1	3701.46	(M+H)+
505.215	505.2103	-9.28	1	1313.61	(M+H)+
520.2297	520.2305	1.66	1	33312.89	(M+NH4)+
521.2333	521.2339	1.02	1	11433.37	(M+NH4)+
522.2447	522.2367	-15.24	1	2979.49	(M+NH4)+
525.1856	525.1859	0.68	1	92650.05	(M+Na)+
526.1884	526.1893	1.74	1	30775.37	(M+Na)+
527.1923	527.1923	-0.17	1	5608.36	(M+Na)+
528.1967	528.195	-3.16	1	651.71	(M+Na)+

--- End Of Report ---

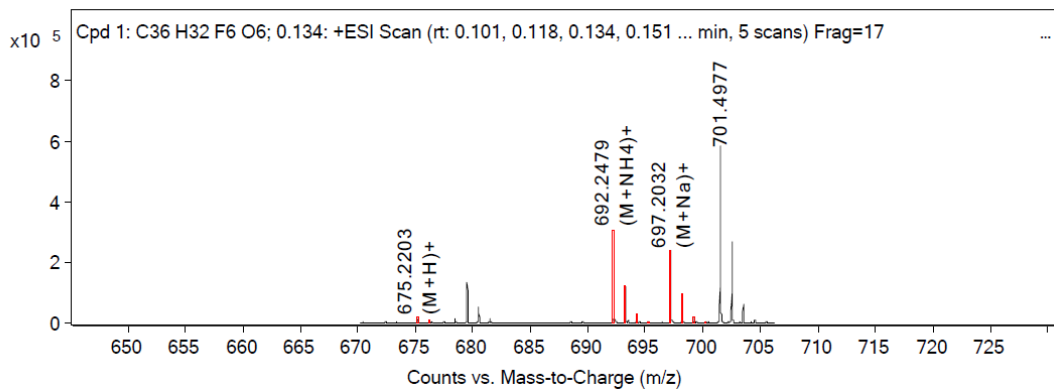
Derivado 6

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C36 H32 F6 O6; 0.134	0.134	674.2138	19157	C36 H32 F6 O6	674.2103	5.25	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C36 H32 F6 O6; 0.134	675.2203	0.134	Find By Formula	674.2138

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
675.2203	675.2176	-4.05	1	19157.02	(M+H)+
676.2228	676.221	-2.64	1	6906.64	(M+H)+
692.2479	692.2441	-5.47	1	308166.81	(M+NH4)+
693.2508	693.2475	-4.82	1	124382.14	(M+NH4)+
694.2534	694.2505	-4.16	1	26421.71	(M+NH4)+
695.2564	695.2533	-4.44	1	4497.21	(M+NH4)+
697.2032	697.1995	-5.3	1	238571.16	(M+Na)+
698.2062	698.2029	-4.68	1	91374.6	(M+Na)+
699.2086	699.206	-3.73	1	19825.63	(M+Na)+
700.2119	700.2088	-4.36	1	3651.06	(M+Na)+

--- End Of Report ---

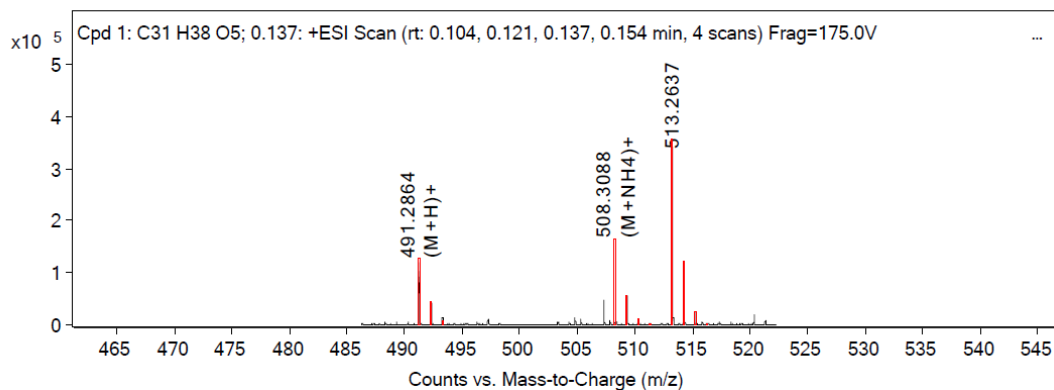
Derivado 7

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C31 H38 O5; 0.137	0.137	490.2758	354192	C31 H38 O5	490.2719	7.83	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C31 H38 O5; 0.137	513.2637	0.137	Find By Formula	490.2758

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
491.2864	491.2792	-14.75	1	122696.24	(M+H)+
492.2907	492.2826	-16.41	1	44863.71	(M+H)+
493.2937	493.2856	-16.41	1	15461.21	(M+H)+
508.3088	508.3057	-6.01	1	161751.16	(M+NH4)+
509.3114	509.3091	-4.65	1	56525.29	(M+NH4)+
510.3264	510.3121	-28.18	1	14115.51	(M+NH4)+
513.2637	513.2611	-5.03	1	354191.66	(M+Na)+
514.2666	514.2645	-4.05	1	122582.69	(M+Na)+
515.2715	515.2675	-7.7	1	25399.01	(M+Na)+
516.276	516.2704	-10.81	1	4300.33	(M+Na)+

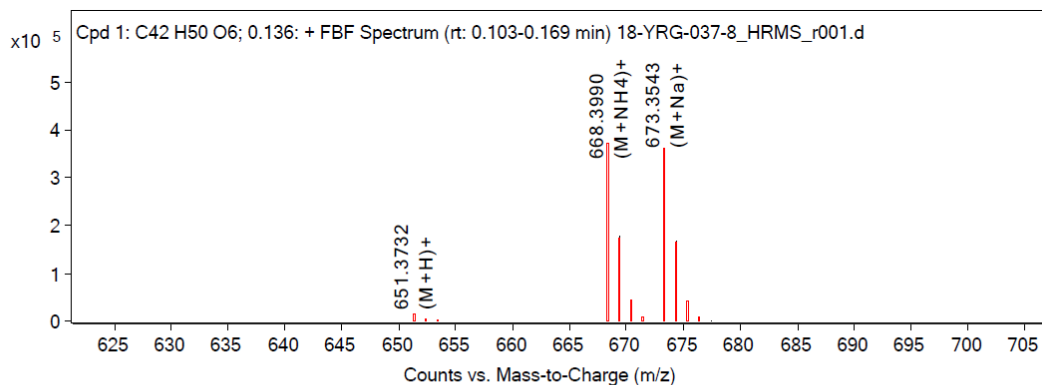
--- End Of Report ---

Derivado 8

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C42 H50 O6; 0.136	0.136	650.365	360140	C42 H50 O6	650.3607	6.5	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C42 H50 O6; 0.136	673.3543	0.136	Find By Formula	650.365



MS Spectrum Peak List

m/z	z	Abund	Ion
651.3732	1	16116.13	(M+H)+
652.3748	1	1950.12	(M+H)+
668.399	1	366194.41	(M+NH4)+
669.4019	1	177255.06	(M+NH4)+
670.403	1	44956.17	(M+NH4)+
671.4076	1	3577.41	(M+NH4)+
673.3543	1	360139.56	(M+Na)+
674.3572	1	167592.91	(M+Na)+
675.3598	1	41064	(M+Na)+
676.3627	1	7373.3	(M+Na)+

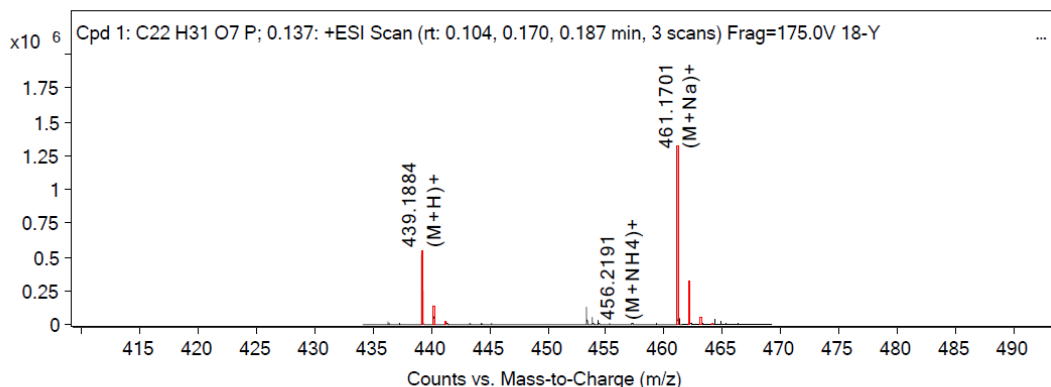
Derivado 9

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C22 H31 O7 P; 0.137	0.137	438.181	1318538	C22 H31 O7 P	438.1807	0.58	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C22 H31 O7 P; 0.137	461.1701	0.137	Find By Formula	438.181

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff (ppm)	z	Abund	Ion
439.1884	439.188	-0.86	1	545306.44	(M+H)+

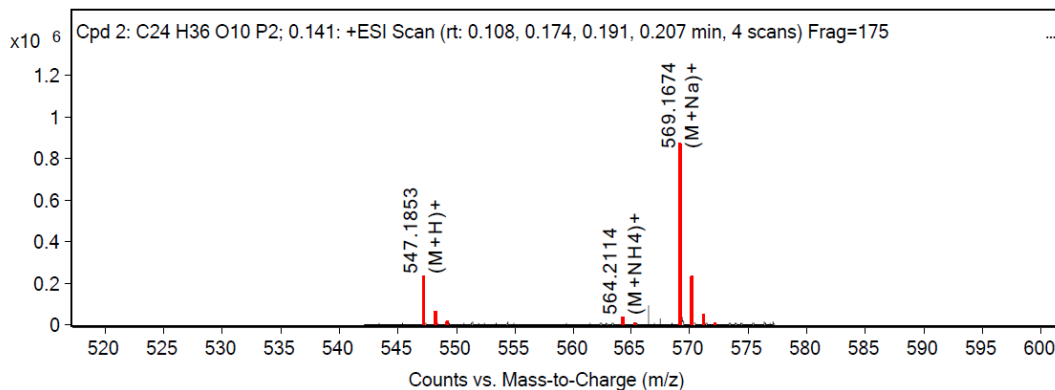
Derivado 10

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 2: C24 H36 O10 P2; 0.141	0.141	546.1781	872367	C24 H36 O10 P2	546.1784	-0.52	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 2: C24 H36 O10 P2; 0.141	569.1674	0.141	Find By Formula	546.1781

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
547.1853	547.1856	0.68	1	230009.33	(M+H)+
548.1884	548.1891	1.13	1	60575.47	(M+H)+
549.1913	549.1915	0.41	1	12899.79	(M+H)+
550.1958	550.1942	-2.87	1	2327.59	(M+H)+
564.2114	564.2122	1.34	1	31951.32	(M+NH4)+
565.215	565.2155	0.97	1	8913.17	(M+NH4)+
569.1674	569.1676	0.3	1	872366.88	(M+Na)+
570.1706	570.171	0.63	1	238607.64	(M+Na)+
571.1727	571.1735	1.4	1	43664.46	(M+Na)+
572.1761	572.1761	0.08	1	6963.51	(M+Na)+

--- End Of Report ---

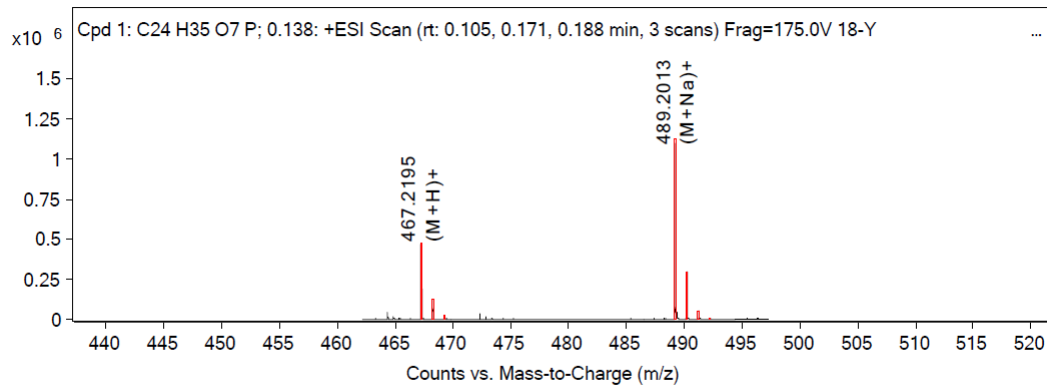
Derivado 11

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C24 H35 O7 P; 0.138	0.138	466.2121	1117474	C24 H35 O7 P	466.212	0.2	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C24 H35 O7 P; 0.138	489.2013	0.138	Find By Formula	466.2121

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
467.2195	467.2193	-0.47	1	467325.16	(M+H)+

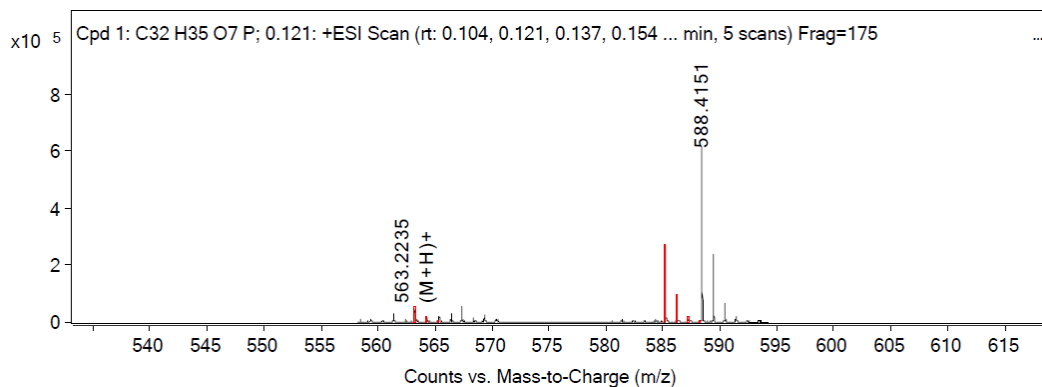
Derivado 13

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C32 H35 O7 P; 0.121	0.121	562.2167	53758	C32 H35 O7 P	562.212	8.29	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C32 H35 O7 P; 0.121	563.2235	0.121	Find By Formula	562.2167

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
-----	----------	-----------	---	-------	-----

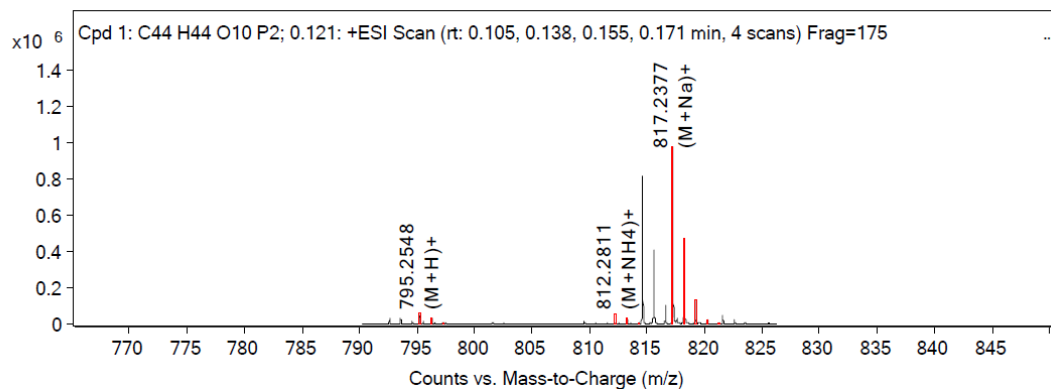
Derivado 14

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C44 H44 O10 P2; 0.121	0.121	794.2484	60654	C44 H44 O10 P2	794.241	9.36	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C44 H44 O10 P2; 0.121	795.2548	0.121	Find By Formula	794.2484

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
795.2548	795.2482	-8.2	1	60654.31	(M+H)+
796.2581	796.2516	-8.06	1	30568.21	(M+H)+
797.26	797.2546	-6.74	1	8309.65	(M+H)+
812.2811	812.2748	-7.74	1	57740.56	(M+NH4)+
813.2848	813.2781	-8.16	1	29213.01	(M+NH4)+
814.2868	814.2811	-6.97	1	8916.54	(M+NH4)+
817.2377	817.2302	-9.14	1	979412.5	(M+Na)+
818.2416	818.2336	-9.82	1	468174.81	(M+Na)+
819.2436	819.2366	-8.57	1	128800.08	(M+Na)+
820.2458	820.2395	-7.77	1	26268.74	(M+Na)+

--- End Of Report ---

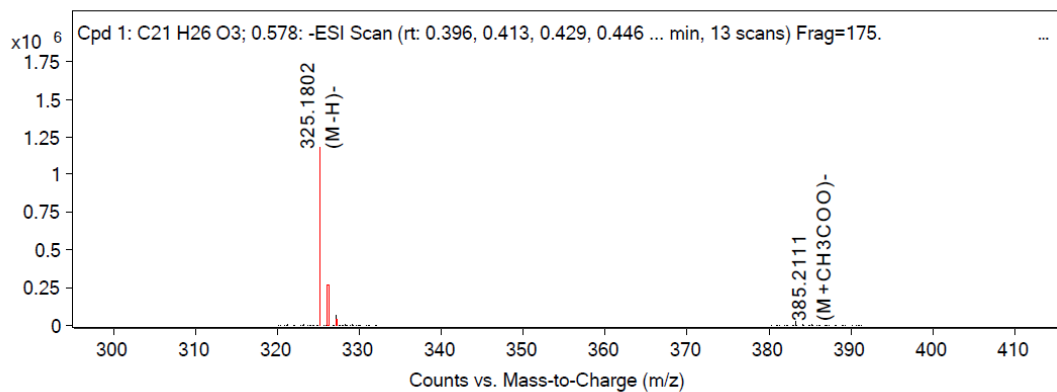
Derivado 15

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C21 H26 O3; 0.578	0.578	326.1871	1176332	C21 H26 O3	326.1882	-3.36	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C21 H26 O3; 0.578	325.1802	0.578	Find By Formula	326.1871

MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

m/z	Calc m/z	Diff(ppm)	z	Abund	Ion
325.1802	325.1809	2.28	1	1176331.75	(M+H)-
326.1833	326.1843	3.01	1	247303.11	(M+H)-
327.1794	327.1872	23.87	1	67036.16	(M+H)-
385.2111	385.202	-23.54	1	422.26	(M+CH3COO)-