



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE 1,5-BENZODIAZEPINTIONAS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
ANTITUBERCULOSA Y CITOTÓXICA**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. GUSTAVO PRETELIN CASTILLO

Dr. ROBERTO MARTÍNEZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Febrero 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE 1,5-BENZODIAZEPINTIONAS Y EVALUACIÓN  
DE SU ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA Y CITOTÓXICA**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. GUSTAVO PRETELIN CASTILLO**

**DR. ROBERTO MARTÍNEZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA**



**Posgrado  
Ciencias  
Químicas**

Ciudad de México, febrero 2022

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2-11 del **Instituto de Química** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** bajo la asesoría del **Dr. Roberto Martínez**.

Se agradece el apoyo económico de la beca de Doctorado (**No. De Becario 308250, CVU 592355**) otorgada por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** para la realización de este proyecto, así como el financiamiento a través de los proyectos CONACyT (A1-S-16584), DGAPA-UNAM (IN204619) y NUATEI-IIB-UNAM

Parte de los resultados obtenidos en la realización de este trabajo fueron publicados en la revista *Infection and Drug Resistance*:

Pretelín-Castillo G, Silva Miranda M, Espitia C, Chávez-Santos RM, Suárez-Castro A, Chacón-García L, Aguayo-Ortiz R, Martínez R. (2Z)-3-Hydroxy-3-(4-R-Phenyl)-Prop-2-Enedithioic Acids as New Antituberculosis Compounds. *Infect Drug Resist.* **2021**; 14, 4323-4332.

<https://doi.org/10.2147/IDR.S328132>

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

**Vocal:** Dr. Eduardo González Zamora

**Vocal:** Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano

**Vocal:** Dr. Fernando León Cedeño

**Secretario:** Dr. José Alberto Rivera Chávez

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer enormemente al **Dr. Roberto Martínez** por la oportunidad de haber seguido en su grupo de investigación con la realización de este trabajo, por su asesoría continua y por la honestidad en sus opiniones que han tenido un impacto positivo en mi formación. Agradezco también la paciencia que ha mostrado conmigo en todo este tiempo.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y al **Instituto de Química** por la oportunidad de ser alumno de Doctorado y por la posibilidad de usar libremente sus instalaciones.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por la beca otorgada durante los estudios de Doctorado

A mi comité tutor, el **Dr. Rafael Castillo Bocanegra** (Facultad de Química, UNAM) y el **Dr. Eduardo Gonzales Zamora** (Universidad Autónoma Metropolitana, UAM), de quienes recibí en cada semestre valiosos comentarios, consejos y críticas que me han ayudado a mejorar.

Al jurado asignado integrado por el **Dr. José Alfredo Vázquez Martínez**, **Dr. Eduardo Gonzales Zamora**, **Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano**, **Dr. Fernando León Cedeño** y **Dr. José Alberto Rivera Chávez**; agradezco el tiempo invertido en la lectura, revisión y corrección de este trabajo.

Quisiera agradecer también a la **Dra. Mayra Silva Miranda** (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) y la **Dra. Clara I. Espitia Pinzón** (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por la realización de los experimentos de evaluación antituberculosis. De igual forma al **Dr. Luis Chacón García** (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, UMSNH) y al alumno de doctorado **Abel Suárez Castro** (UMSNH) por su contribución con los estudios de acoplamiento molecular. De la misma manera agradezco al **Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz** (Facultad de Química, UNAM) por su valiosa contribución para la publicación del artículo.

Al **personal técnico** del Instituto de Química por el apoyo en la realización de los análisis espectroscópicos y espectrométricos: Dra. María del Carmen García González y Dr. Francisco Javier Pérez Flores (Espectrometría de Masas); Q. María de los Ángeles Peña

González, M. en C. Héctor Ríos Olivares y M. en C. Elizabeth Huerta Salazar (Resonancia Magnética Nuclear). Además, a la M. en C. María Teresa Ramírez Apan (Laboratorio de Pruebas Biológicas).

Agradezco al alumno de doctorado **David Martínez Velázquez** y al **Dr. Noé Zúñiga** (Instituto de Química, UNAM) por su apoyo con el uso del espectrómetro de infrarrojo.

También se agradece profundamente a la **Coordinación del Posgrado en Ciencias Químicas**, así como a los profesores que impartieron los Seminarios de Doctorado a los que asistí.

Quisiera agradecer también a mis **amigos** del Instituto de Química que han estado conmigo durante la realización de este trabajo. A mis amigos del laboratorio 2-11: **Aldahir Ramos Orea, Diego Díaz Bautista, Mauricio Bahena García, Velvett Guadalupe Domínguez Méndez y Wilfrido Eliot Almaraz Ortiz.**

Al **Dr. Rubén Omar Torres Ochoa** y la **Dra. Rosa María Chávez Santos**, por su amistad e incondicional apoyo durante la realización de este proyecto.

Agradezco también todo el apoyo y amistad de mi gran amiga **Fabiola Angélica López Huerta**. Y de la misma forma a mis amigos de la Facultad de Química y FES Cuautitlán: **Francisco Xavier Domínguez Villa y Pablo Arturo Martínez Soriano (LQM-FESC).**

Finalmente, quisiera agradecer enormemente el apoyo de **mi familia**. Gracias a mi mamá y papá por toda su confianza, amor y motivación. A mis hermanos Ale y Luis por creer siempre en mí y por los momentos alegres que hemos tenido a pesar de mi constante ausencia.

## ÍNDICE

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b><i>i</i></b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b><i>iii</i></b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
2.1 Tuberculosis.....	2
2.2 Fármacos y tratamiento de la tuberculosis.....	3
2.3 Desarrollo de fármacos antituberculosis en la actualidad.....	4
2.4 Blancos moleculares de los fármacos antituberculosis.....	7
2.5 Pared celular y capa de ácidos micólicos.....	9
2.6 1,5-benzodiazepinas.....	14
Actividad Biológica.....	15
Métodos de síntesis.....	17
2.7 Investigación Previa en el laboratorio 2-11 del Instituto de Química.....	22
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>26</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos particulares.....	28
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	<b>29</b>
6.1 Metodología de Síntesis.....	29
6.2 Metodología para la determinación de la Actividad Antituberculosis.....	30
Soluciones Stock.....	30
Ensayos de citotoxicidad.....	30
Preparación del inóculo de Mtb.....	30
Pruebas de susceptibilidad por el método de Ensayo de microtitulación de Resazurina en placa (REMA).....	31
Concentración mínima inhibitoria (MIC).....	31



Concentración mínima bactericida .....	31
Índice de selectividad.....	32
<b>6.3 Determinación teórica de las propiedades ADMET .....</b>	<b>32</b>
<b>6.4 Metodología para el acoplamiento molecular .....</b>	<b>32</b>
Validación .....	32
Ligante .....	32
Receptor .....	33
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>7.1 Parte Química .....</b>	<b>34</b>
Síntesis de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioicos (49a-j).....	34
Síntesis de las 4-(R-fenil)-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -1,5-benzodiazepin-2-tionas (48a-j).....	40
<b>7.2 Parte Biológica .....</b>	<b>44</b>
Actividad antituberculosis de las 4-(R-fenil)-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -1,5-benzodiazepin-2-tionas (48a-j).....	44
Actividad antituberculosis de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioicos (49a-j) .....	45
<b>7.3 Propiedades ADMET .....</b>	<b>49</b>
<b>7.4 Acoplamiento Molecular .....</b>	<b>55</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>9. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>64</b>
<b>9.1 Información general .....</b>	<b>64</b>
<b>9.2 Procedimiento general para la síntesis de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioicos (49a-j). Procedimiento con NaH y THF.....</b>	<b>65</b>
<b>9.3 Procedimiento general para la síntesis de 4-(R-fenil)-2,3-dihidro-1<i>H</i>-1,5-benzodiazepin-2-tionas (48a-j) .....</b>	<b>70</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>76</b>
Espectros de IR, RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>13</sup> C Y EMAR de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioicos (49a-j) .....	76

## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

**AcOEt:** Acetato de Etilo

**ADMET:** Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación, Toxicidad

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de calcio

**CDCl<sub>3</sub>:** Cloroformo deuterado

**DART:** Espectrometría de Masas por Análisis Directo en Tiempo Real

**DMF:** Dimetilformamida

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DMSO-*d*<sub>6</sub>:** Dimetilsulfóxido hexadeuterado

**EMA:** Agencia Europea de Medicamentos

**EMAR:** Espectrometría de Masas de Alta Resolución

**FAS:** Sintasa de Ácidos Grasos

**FDA:** Administración de Medicamentos y Alimentos (EU)

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Ácido sulfúrico

**HCl:** Ácido clorhídrico

**Hz.:** Hertz

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria 50 es concentración a la cual se inhibe el crecimiento del 50% de células

**IR:** Infrarrojo

**IS:** Índice de Selectividad

***J*:** Constante de acoplamiento

**KOH:** Hidróxido de potasio

**logP:** Coeficiente de partición *n*-octanol/agua

**MBC:** Concentración Mínima Bactericida

**MHz:** Mega Hertz

**MIC:** Concentración Mínima Inhibitoria

**Mtb:** *Mycobacterium tuberculosis*

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Sulfato de Sodio

**NaH:** Hidruro de sodio

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PM:** Peso molecular

**ppm:** Partes por millón

**REMA:** Ensayo de microtitulación de Resazurina

**Rif.:** Rifampicina

**RMN <sup>13</sup>C:** Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13

**RMN <sup>1</sup>H:** Resonancia Magnética Nuclear de protón

***t*-AmONa:** *tert*-amilato de sodio

**TBAF:** Fluoruro de tetrabutilamonio

**TB-MDR:** Tuberculosis Multifármaco resistente

***t*-BuOK:** *tert*-butóxido de potasio

**TB-XDR:** Tuberculosis extremadamente Resistente

**THF:** Tetrahidrofurano

**TIPSCI:** Cloruro de triisopropilsilano

**TLC:** Cromatografía en capa Fina

**( $\delta$ ):** Desplazamiento químico

**$\mu$ g/mL:** Microgramos por mililitro

**$\mu$ M:** Micromolar

## ABSTRACT

---

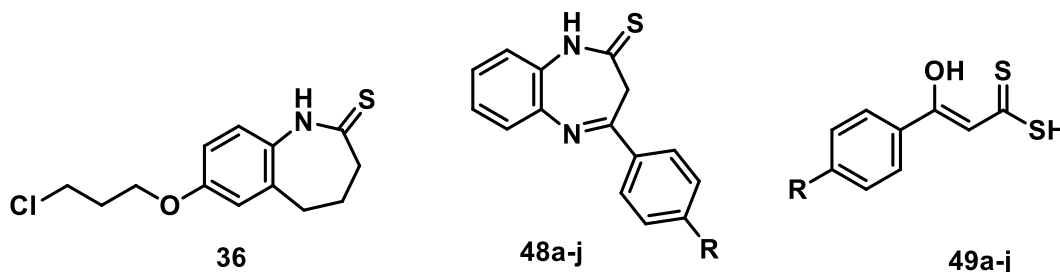
Tuberculosis is an infectious disease which has coexisted with humans since ancient times and nowadays it still being a serious health problem. Tuberculosis is caused by bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and its prevalence due to other diseases such cancer, diabetes, AIDS, as well as some addictions. Moreover, antibiotic resistance is a hard obstacle that decrease success of the tuberculosis therapies. Hence, many research groups in medicinal and synthetic chemistry are working to find novel drugs with new action mechanisms or different molecular targets. This work describes the results when compound **36** was structurally modified with the aim to obtain better antitubercular compounds. A series of 1,5-benzodiazepin-2-thiones **48a-j** and 3-hydroxy-3-(4-R-phenyl)-prop-2-enedithioic acids **49a-j** were synthesized and evaluated for growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. The antitubercular activity (MIC= 7.8 µg/mL) and selectivity index (SI) value of 3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)-prop-2-enedithioic acid **49e** suggested that this compound could be used for the design of novel antituberculosis agents. Further, ADMET properties were calculated *in silico* for compounds **49a-j** and docking studies were carried out with the enzyme HadAB (PDB: 4RLU) as possible molecular target.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

La tuberculosis es una enfermedad que ha coexistido con el ser humano desde tiempos muy remotos y que sigue siendo un problema de salud actual. Es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y su prevalencia está acompañada de varios factores que pueden volver más susceptible al individuo contagiado. Las enfermedades tales como el SIDA, diabetes y cáncer, así como algunas adicciones, son factores de riesgo para contraer tuberculosis.<sup>1,2</sup> En la actualidad, la resistencia a los antibióticos provoca la ineficiencia y fallo de los tratamientos contra la tuberculosis, así como la aparición de importantes reacciones adversas. La necesidad de contar con nuevos fármacos eficaces y seguros se ha convertido en una tarea de diversos grupos de investigación en síntesis orgánica y química medicinal.

El presente trabajo describe los resultados obtenidos cuando el compuesto **36** fue modificado estructuralmente con la finalidad de encontrar compuestos con mejor actividad antituberculosis. En particular, se realizó la síntesis de las 1,5-benzodiazepintionas **48a-j** y los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-2-propeno-1-tioicos **49a-j** para la evaluación de su actividad inhibitoria frente a la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Asimismo, se determinaron las propiedades ADMET teóricas de los compuestos **49a-j**, y se realizaron estudios de acoplamiento molecular de los compuestos **49d** y **49e** utilizando la enzima HadAB (PDB: 4RLU) como el posible blanco molecular.



- a) R= H, b) R= CH<sub>3</sub>, c) R= OCH<sub>3</sub>, d) R= OH, e) R= NO<sub>2</sub>,  
f) R= CN, g) R= Br, h) R= I, i) R= Cl, j) R= F

---

<sup>1</sup>Osorio-López, E. A.; Vilar-Compte, D.; García-Tirado, J.; Martín-Onraet, A. Prevalence of latent tuberculosis in patients with hematological neoplasms in a cancer referral hospital in Mexico City. *BMC Infectious Diseases*, **2021**, *21*, 510.

<sup>2</sup>Barrios-Payán, J.A.; Castañón-Arreola, M.; Florez-Valdez, M. A.; Hernández-Pando, R. Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente. *Salud Pública México*. **2010**, *52*, 70-78

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1 Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) descubierta por el médico y microbiólogo Robert Koch en 1882, y que afecta principalmente a los pulmones, aunque también es posible que infecte a otros órganos.<sup>3</sup> Esta enfermedad puede ser transmitida de un sujeto infectado a otro a través de la inhalación de gotas de saliva en forma de aerosol las cuales se depositan en los alvéolos pulmonares.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calculó que en 2019 cerca de 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis, con 1.4 millones de casos mortales y de los cuales 208,000 eran de personas infectadas con VIH.<sup>4</sup> El problema en la prevalencia y resurgimiento de la tuberculosis en varios países del mundo se debe a la aparición de cepas de Mtb multifármaco resistentes (TB-MDR) y extremadamente resistentes (TB-XDR). En 2019 la OMS estimó que hubo 465,000 casos de tuberculosis multirresistente a fármacos.<sup>3</sup>

En México, desde la primera mitad del siglo XX se empezaron a implementar los primeros programas para el tratamiento de esta enfermedad. Actualmente los factores que predisponen a ciertos sectores de la población mexicana son el bajo peso, la desnutrición, la infección por VIH, la diabetes mellitus, la insuficiencia renal, trasplantes de órganos, el uso de medicamentos que deprimen el sistema inmunológico y el alcoholismo o alguna otra farmacodependencia.<sup>5</sup> Estos factores van acompañados de las condiciones socioeconómicas y geográficas en las que principalmente los sectores de mayor pobreza, de zonas rurales y de difícil acceso a los servicios de salud son más vulnerables.<sup>6,7</sup> Según los datos recabados por

---

<sup>3</sup>de Wet, T. J.; Warner, D. F.; *et al.* Harnessing Biological Insight to Accelerate Tuberculosis Drug Discovery. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 2340–2348.

<sup>4</sup>Global Tuberculosis Report 2020. Consultado el 3 de octubre de 2021 en <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2020>.

<sup>5</sup>Olvera Correa, T.; Barragán Solís, A.; Olvera Castillo, R. La Tuberculosis Pulmonar En Un Grupo de Pacientes Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Un Enfoque Antropológico. *Rev. del Inst. Nac. Enf Respir Mex.* **2001**, *14*, 99–104

<sup>6</sup>Castañeda Martínez, F. C.; Padilla, Valdespino, M. G.; Cazares Montero, S.; Martínez Lemus, M. A. Caracterización de La Tuberculosis En La Delegación Michoacán, Periodo 2015-2018. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* **2019**, *57*, 232–240.

<sup>7</sup>Ramírez Rayón, E. M.; López Velázquez, D. F.; García Torres, E.; García Jiménez, F. J.; Guadarrama Quintana, J. F.; Blancas Cervantes, J. M.; Castro Campos, A. Á.; Lara Cortez, M.; Ávalos Ríos, J. M.; Centeno Ramírez, B. Choque Séptico Por *Mycobacterium tuberculosis*. *Med. Int. Mex* **2019**, *35*, 813–818

la Organización Panamericana de la Salud (OPS), se estimó que en la región de las Américas, hubo 289,000 casos de tuberculosis en 2019.<sup>8</sup> Este mismo año, en México murieron 1,763 personas a causa de tuberculosis pulmonar, siendo los estados de Baja California, Chiapas y Veracruz los de mayor número de muertes registradas.<sup>9</sup>

## 2.2 Fármacos y tratamiento de la tuberculosis

Los primeros fármacos contra tuberculosis fueron introducidos a mediados del siglo XX con el uso de la estreptomina, tioacetazona y el ácido *p*-amino salicílico. En 1951 fue descubierta la isoniazida mejorando sustancialmente los resultados en el tratamiento de la tuberculosis. Finalmente, otros antibióticos como la pirazinamida y cicloserina (1952), etionamida (1956), rifampicina (1957) y etambutol (1962), fueron descubiertos. De estos últimos, la rifampicina revolucionó el tratamiento contra la tuberculosis.<sup>10</sup> Aun con el éxito en los tratamientos de la enfermedad, la comunidad médica empezó a observar casos de resistencia, principalmente hacia la isoniacida y rifampicina. Esto propició el uso combinado de más de dos medicamentos por tiempos prolongados, lo que trajo como consecuencia la aparición de efectos adversos.

La OMS clasifica los fármacos antituberculosis y los agrupa según su eficacia y toxicidad.<sup>11</sup> A continuación, se resume la clasificación de acuerdo con el manual de lineamientos de la OMS para el tratamiento de la tuberculosis multirresistente (Tabla 1).<sup>12</sup>

---

<sup>8</sup>Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis>. Consultado el 3 de octubre del 2021.

<sup>9</sup> Sistema de Información de la Secretaría de Salud. <http://sinaiscap.salud.gob.mx:8080/DGIS/> Consultado el 03 de octubre de 2021.

<sup>10</sup>Keshavjee, S.; Farmer, P. E. Tuberculosis, *N. Engl. J. Med.* **2012**, 6, 931–936.

<sup>11</sup>Tiberi, S.; Scardigli, A.; Centis, R.; D'Ambrosio, L.; Muñoz-Torrico, M.; Salazar-Lezama, M. A.; Spanevello, A.; Visca, D.; Zumla, A.; Battista Migliori, G.; Caminero Luna, J. A. Classifying New Anti-Tuberculosis Drugs: Rationale and Future Perspectives. *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, 56, 181–184

<sup>12</sup>World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2014.11. Geneva: WHO; **2014**.

**Tabla 1.** Clasificación de la OMS para los fármacos antituberculosis.

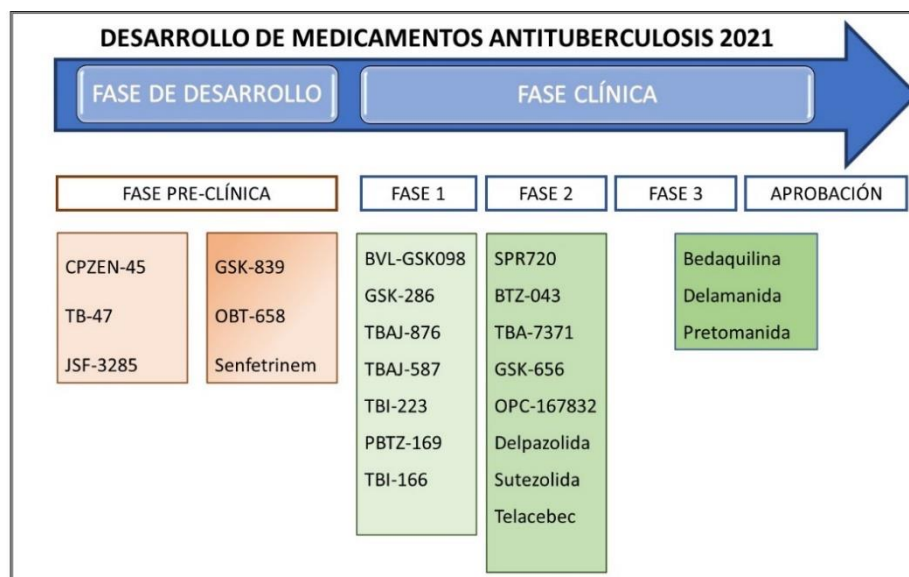
Grupo	Fármaco Antituberculosis	Mecanismo de acción	Descripción
<b>Grupo 1.</b> <b>Fármacos de primera línea</b>	Rifampicina, Rifabutina, Rifapentina	Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos	Fármacos más potentes y mejor tolerados. Son utilizados en el tratamiento inicial de tuberculosis.
	Isoniazida, Etambutol	Inhibidores de la síntesis de la pared celular	
<b>Grupo 2.</b> <b>Segunda línea</b>	Estreptomicina, Kanamicina, Amikacina	Inhibidores de la síntesis de proteínas	Aplicado a pacientes que se encuentren en las fases intensivas de tuberculosis multirresistente a fármacos (TB-MDR)
<b>Grupo 3.</b> <b>Segunda línea</b>	Levofloxacin, Moxifloxacin, Gatifloxacin	Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos	Fluoroquinolonas de 3ª y 4ª generación Fármacos más efectivos en los esquemas de tratamiento de tuberculosis multirresistente a fármacos (TB-MDR)
<b>Grupo 4.</b> <b>Segunda línea</b>	Etionamida, Protionamida, Cicloserina	Inhibidores de la síntesis de la pared celular	Fármacos bacteriostáticos
<b>Grupo 5</b>	Delamanida, Linezolid, Tioacetazona	Inhibidores de la síntesis de la pared celular	Fármacos que no están recomendados para su uso rutinario en el tratamiento de tuberculosis multirresistente. Fármacos en fases de investigación o Fases Clínicas. No hay evidencia clara de la seguridad a largo plazo
	Bedaquilina, Clofazimina	Inhibidores del metabolismo	

### 2.3 Desarrollo de fármacos antituberculosis en la actualidad

En química medicinal, un *hit* se define como un compuesto del cual se tiene su estructura bien definida y que muestra actividad biológica deseada en un determinado ensayo de tamizaje junto a otros compuestos. Los mejores hits de un ensayo biológico que cumplan con las características farmacéuticas deseadas tales como baja toxicidad, buena solubilidad acuosa, selectividad, entre otras, podrán ser optimizados para entonces así encontrar un



compuesto *líder*.<sup>13</sup> Desde el descubrimiento de la isoniazida y rifampicina, ningún nuevo fármaco antituberculosis había sido incorporado a los esquemas de tratamiento, fue hasta el año 2012 cuando la bedaquilina fue aprobada de forma condicional por la FDA como fármaco adicional a los de segunda línea para el tratamiento de la TB-MDR. Por otra parte, la delamanida fue aprobada condicionalmente en el año 2014 por la EMA (European Medicines Agency) y por la OMS, e incluido en la terapia de TB-MDR.<sup>14</sup> En los últimos años han sido descubiertas varias familias de compuestos que presentan actividad antituberculosis. Algunas han podido avanzar de ser compuestos hits o líderes hacia las fases preclínicas y entre los cuales están los compuestos CPZEN-45, TB-47 y JSF-3285. Otros se encuentran actualmente en alguna de las fases clínicas de desarrollo, tales como BVL-GSK098, GSK-286 y TBAJ-876 en Fase 1; SPR720, BTZ-043, Telacebec y Sutezolida en Fase 2; así como Bedaquilina, Delamanida y Pretomanida en Fase 3 y con aprobación condicional (Figura 1 y 2).<sup>15</sup>

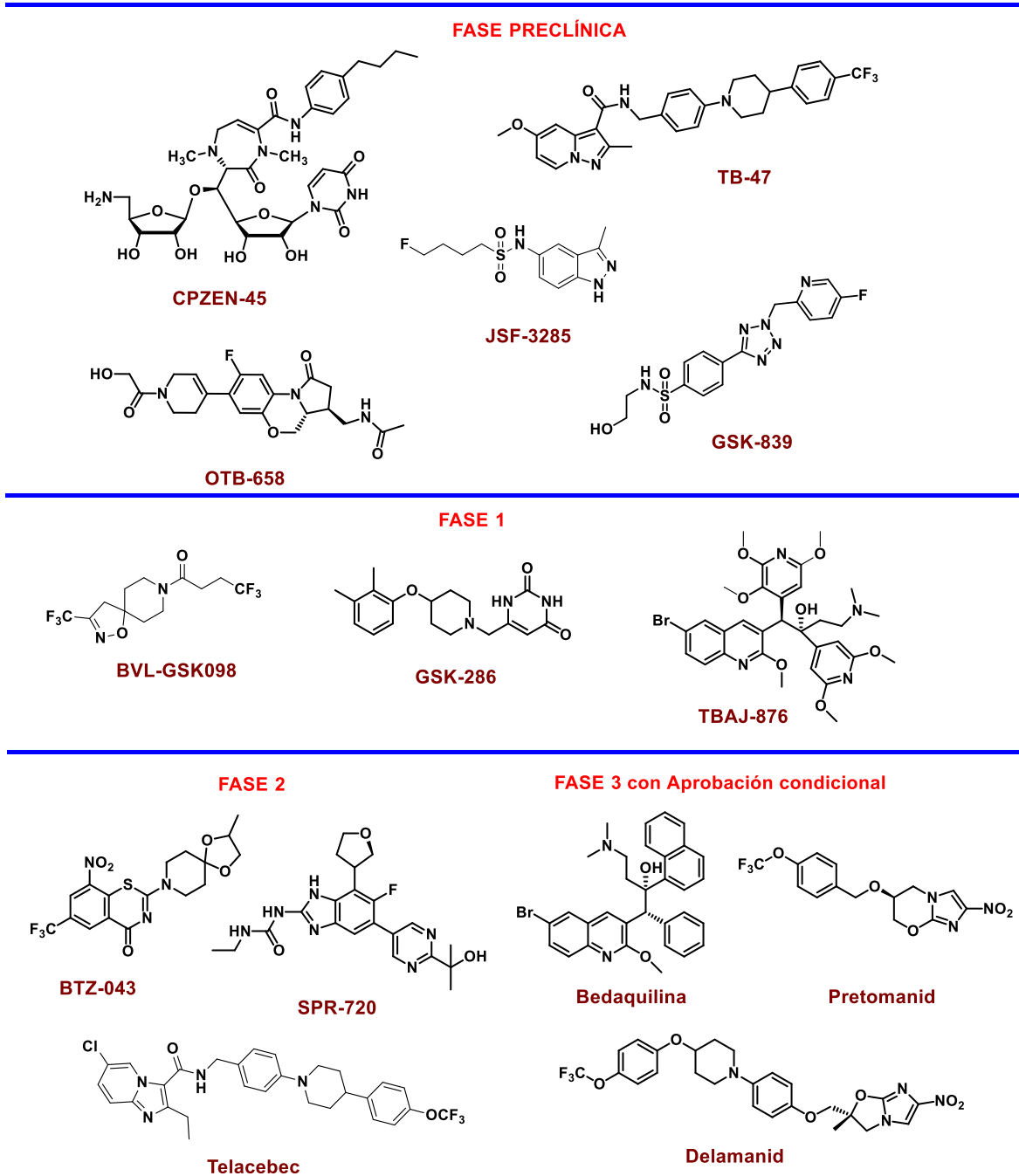


**Figura 1.** Nuevos fármacos antituberculosis y fase de investigación en la que se encuentran

<sup>13</sup>Buckle, D. R.; *et al.* Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry Part II (IUPAC Recommendations 2013). *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Elsevier Inc., **2013**; Vol. 48, pp 387–418.

<sup>14</sup>Mabhula, A.; Singh, V. Drug-Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*: Where We Stand. *Med. Chem. Commun.* **2019**, 10, 1342–1360

<sup>15</sup>La información acerca del estado actual en el desarrollo de fármacos antituberculosis fue consultada en: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical>. Fecha de consulta 3 de Octubre de 2021



**Figura 2.** Fármacos antituberculosis en fase de desarrollo

## 2.4 Blancos moleculares de los fármacos antituberculosis

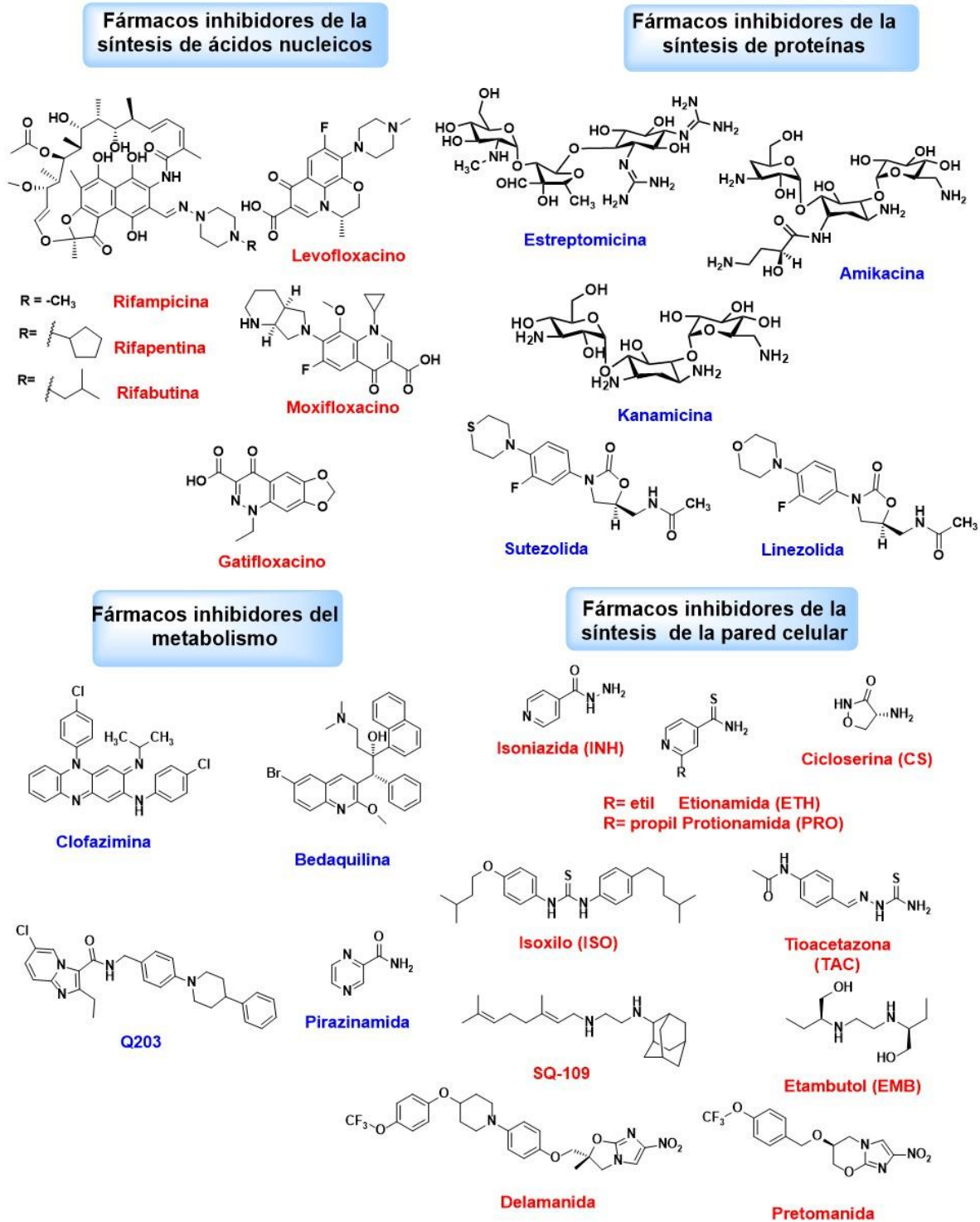
Los fármacos antituberculosis pueden actuar mediante diferentes mecanismos de acción principalmente en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, la inhibición de la síntesis de proteínas, la inhibición del metabolismo y la inhibición de la síntesis de la pared celular (Figura 3).

***Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.*** Esta clase de fármacos actúan inhibiendo las enzimas que están involucradas en la replicación del ADN, el cual es un proceso esencial para transmisión de la información genética durante la reproducción de Mtb. Ejemplos: rifampicina y las fluoroquinolonas

***Inhibidores de la síntesis proteínas.*** Esta clase de fármacos actúa inhibiendo la síntesis de proteínas principalmente al unirse a sitios específicos del ribosoma. Ejemplos: los aminoglucósidos estreptomycin, amikacina y kanamicina.

***Inhibidores del metabolismo.*** Esta clase de fármacos inhiben los procesos de generación de adenosin-trifosfato (ATP) al impedir las rutas de fosforilación oxidativas y fosforilación de sustratos. Ejemplos: bedaquilina, pirazinamida, clofazimina y Q203.

***Inhibidores de la síntesis de la pared celular.*** Los fármacos como isoniazida, etionamida, cicloserina, etambutol y tioacetazona, son ejemplos de fármacos que interrumpen la formación de alguna de las capas de la pared celular de Mtb.



**Figura 3.** Lista de fármacos antituberculosis en función de su modo de acción

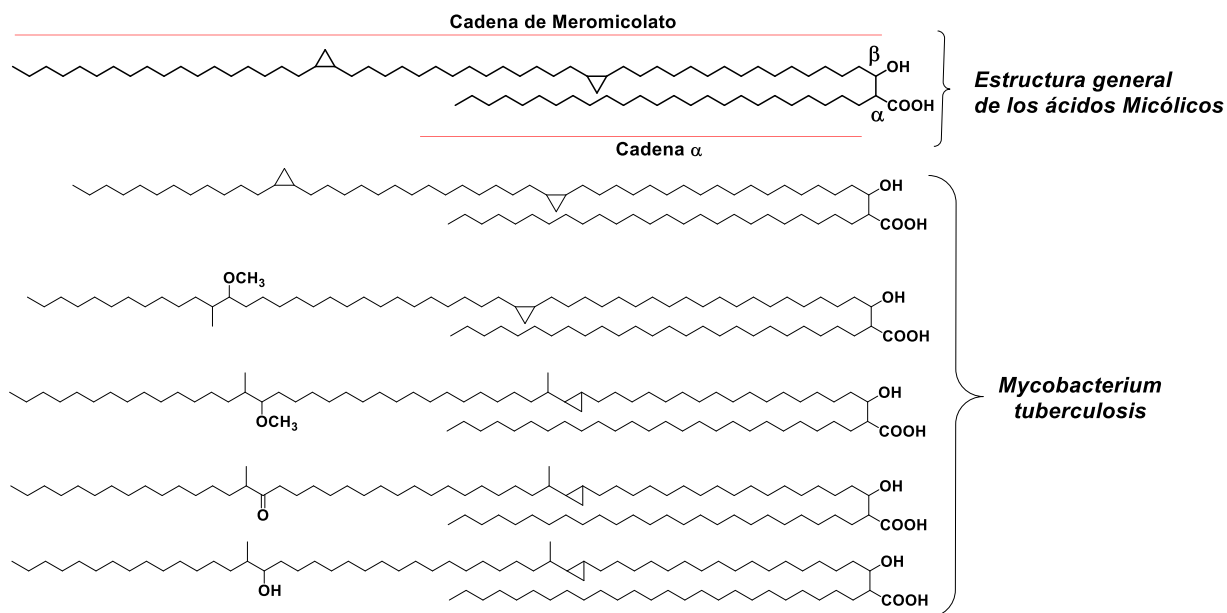
## 2.5 Pared celular y capa de ácidos micólicos

La pared celular es una estructura compleja formada de tres capas y que es esencial para la patogénesis y supervivencia de Mtb. La pared celular posee un carácter lipofílico que la hace ser una barrera natural al paso de varios compuestos entre ellos los antibióticos. Está constituida por el complejo micolil-arabinogalactan-peptidoglicano (mAGP) formado por la unión covalente de tres subestructuras interconectadas: una capa de cadenas largas de ácidos micólicos (micomembrana, capa externa), cadenas ramificadas de polisacárido arabinogalactano (capa media) que está interconectada a la capa polimérica de peptidoglicano (capa interna).<sup>16</sup>

La micomembrana también contribuye a la impermeabilidad de la envoltura micobacteriana, haciéndola de 100 a 1000 veces menos permeable a antibióticos  $\beta$ -lactámicos que en bacterias Gram negativas. La micomembrana está formada por ácidos  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxi grasos en los cuales el sustituyente lipídico en posición 2 llamado cadena  $\alpha$ , es una porción hidrocarbonada de 22-26 átomos de carbono. El sustituyente lipídico de la posición 3, es llamado meromicolato y está formado por cadenas de 48-62 átomos de carbono (Figura 4).

---

<sup>16</sup>Singh, P.; Rameshwaramet, R.N.; Ghosh, S.; Mukhopadhyay, S. Cell Envelope Lipids in the Pathophysiology of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Future Micorbiol.* **2018**, 13, 689-710



**Figura 4.** Estructura de los ácidos micólicos presentes en Mtb

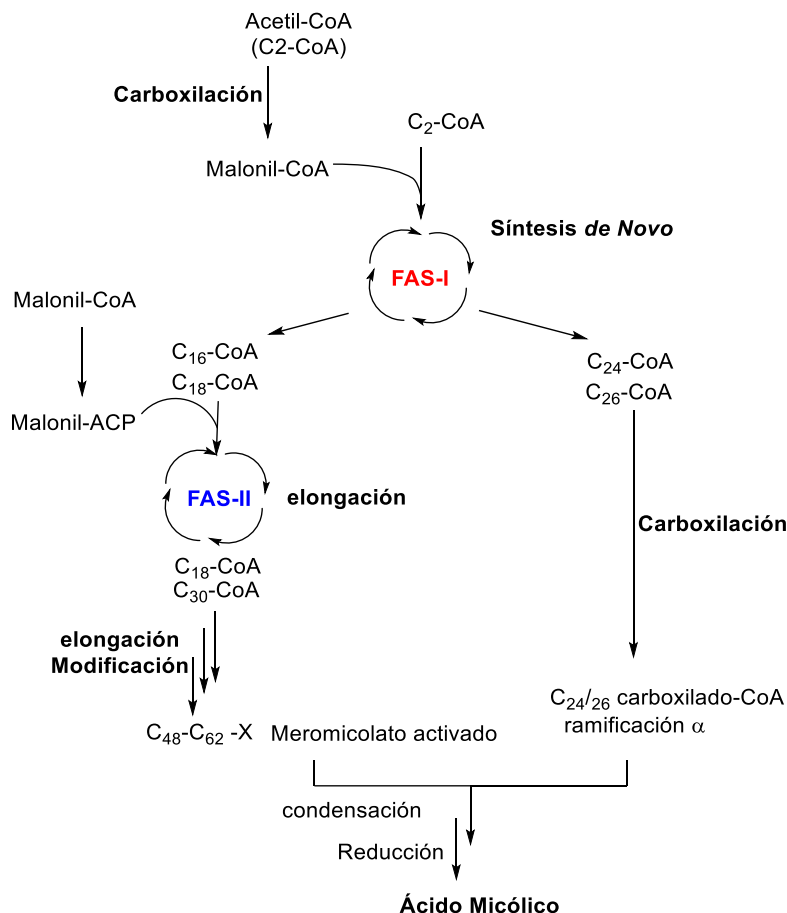
La biosíntesis de los ácidos micólicos se puede dividir en tres etapas principales: 1) Síntesis y elongación de los ácidos grasos que forman los precursores tanto de la cadena  $\alpha$  como de la cadena de meromicolato, 2) la elongación y modificación de la cadena del meromicolato y 3) la condensación de las dos cadenas de ácidos seguida de una reducción para formar el esqueleto principal de los ácidos micólicos.<sup>17</sup>

La biosíntesis de los ácidos micólicos requiere de dos tipos de sistemas de sintasas de ácidos grasos conocidas como FAS-I y FAS-II. Los productos de ambos ciclos servirán para formar la estructura final de los ácidos micólicos. El sistema FAS-I es un complejo enzimático multifuncional que exhibe siete dominios que corresponden a la actividad catalítica requerida en el ciclo sintético.<sup>18</sup> FAS-I inicia con la síntesis *de novo* de cadenas extensas de acil-CoA a partir de acetil-CoA y usando al malonil-CoA como unidad para la elongación de la cadena. Los productos acil-CoA que se producen en el ciclo de FAS-I tienen de 16 a 18 carbonos de longitud y otros que van de los 24 a 26 carbonos de longitud. Las cadenas acil-CoA de 16-

<sup>17</sup>Marrakchi, H.; Bardou, F.; Lanéelle, M. A.; Daffé, M. A Comprehensive Overview of Mycolic Acid Structure and Biosynthesis. In *The Mycobacteria Cell Envelope*; Daffé, M., Reytrat, J. M., Avenir, G., Eds.; ASM Press: Washington, DC, **2008**; pp 41–62.

<sup>18</sup>Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, 18, 81–101.

18 átomos de carbono son utilizados después en el ciclo de FAS-II, mientras que aquellas de 24-26 carbonos participan subsecuentemente para completar la síntesis de los ácidos micólicos (Esquema 1).



**Esquema 1.** Esquema general de la biosíntesis de los ácidos micólicos de Mtb

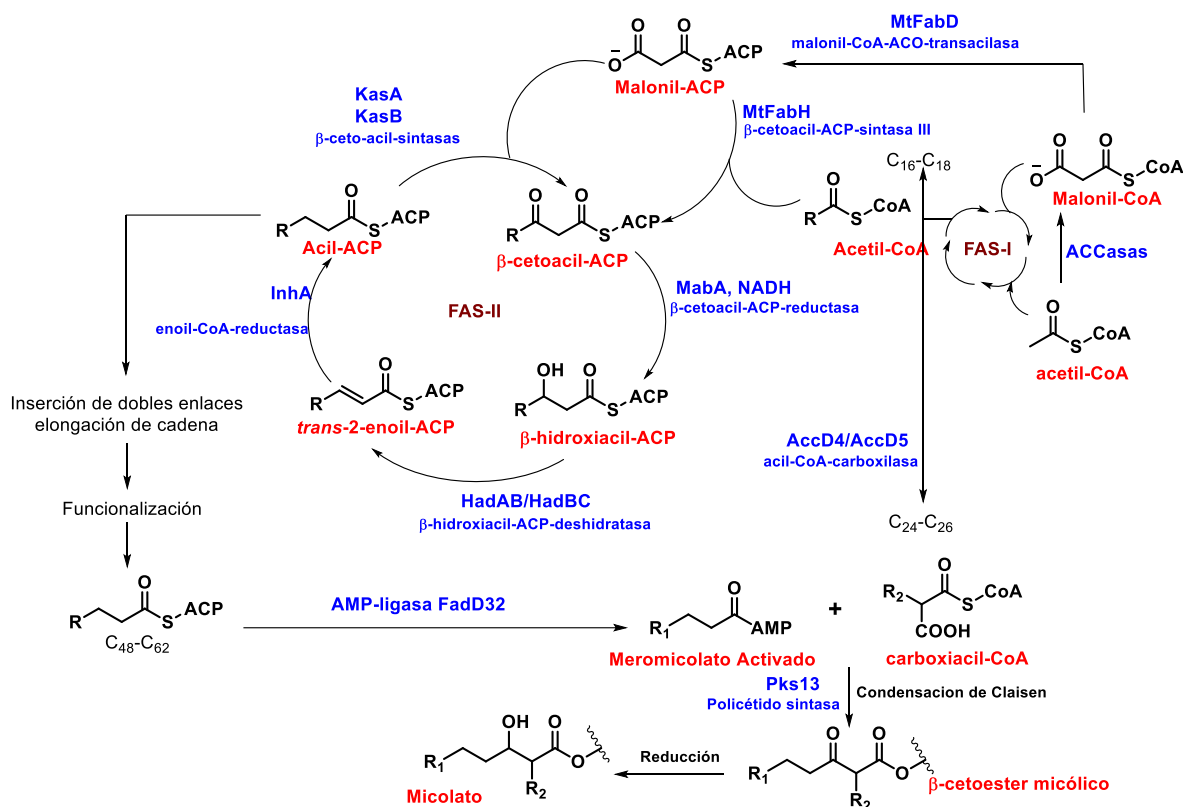
Por otro lado, FAS-II es un sistema compuesto de una serie de enzimas monofuncionales que catalizan individualmente cada uno de los pasos del ciclo biosintético. Este sistema lleva a cabo la elongación de sustratos de cadena media unidos a enzimas acarreadoras de acilo (ACP). Este sistema es responsable de la elongación de las cadenas de ácidos grasos con lo que se generan las cadenas más largas del meromicolato que van de 48 a 62 carbonos de longitud.

En el Esquema 2 se muestran las etapas principales del ciclo catalítico de FAS-II especificando las enzimas y sustratos participantes. De este ciclo biosintético se pueden destacar las etapas de:

- Inicio del ciclo con la formación del sustrato  $\beta$ -cetoacil-ACP.
- Reducción del  $\beta$ -cetoacil-ACP a  $\beta$ -hidroxiacil-ACP a través de la enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP-reductasa (MabA).
- Deshidratación del sustrato  $\beta$ -hidroxiacil-ACP a *trans*-enoil-ACP catalizado por la enzima heterodimérica  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-deshidratasa (HadAB y HadBC).
- Reducción del sustrato *trans*-enoil-ACP al intermediario acil-ACP mediante la enzima *trans*-2-enoil-ACP-reductasa (InhA).

La finalidad del sistema de FAS-II es la elongación de las cadenas hidrocarbonadas de los sustratos mediante la repetición del ciclo catalítico que por la acción de la enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP-sintasa (KasA y KasB) sobre el intermediario acil-ACP alarga su cadena con otros dos átomos de carbono para formar un nuevo  $\beta$ -cetoacil-ACP el cual reinicia el ciclo hasta que la cadena alcanza la longitud requerida para el meromicolato. Una vez formadas estas cadenas de acil-ACP de 18-32 carbonos de longitud, pueden ser modificadas introduciendo dobles enlaces o funcionalizando con grupos metilo, ciclopropilo, metoxilo, hidroxilo y ceto. En estas modificaciones, las cadenas llegan a extenderse hasta tener 48-62 átomos de carbono de longitud. Los productos provenientes de FAS-II se condensan con ácidos grasos de 24-26 carbonos (proveniente de FAS-I) que finalmente forman la cadena de micolato (Esquema 2).





**Esquema 2.** Ciclo catalítico del sistema FAS-II

Como se ha mencionado con anterioridad, muchos fármacos actúan a nivel de la síntesis de la pared celular de Mtb, y algunos de estos interfieren en la biosíntesis de la capa de ácidos micólicos. La tioacetazona es uno de los antibióticos que más se utilizaba desde hace varias décadas para el tratamiento de la tuberculosis. Su potente actividad contra Mtb está representada por su valor de MIC encontrado en el intervalo de 0.1-0.5 µg/mL. Sin embargo, su alta toxicidad, así como la generación de mutaciones que confieren resistencia ha limitado y suspendido su uso en casi todo el mundo.<sup>19</sup> La tioacetazona es un profármaco inhibidor de la síntesis de los ácidos micólicos en varias cepas del género *Mycobacterium*. Su actividad biológica requiere de la activación enzimática de la flavoproteína-monooxigenasa (EthA),

<sup>19</sup>Grzegorzewicz, A. E.; Korduláková, J.; Jones, V.; Born, S. E. M.; Belardinelli, J. M.; Vaquié, A.; Gundi, V. A. K. B.; Madacki, J.; Slama, N.; Laval, F.; Vaubourgeix, J.; Crew, R. M.; Gicquel, B.; Daffé, M.; Morbidoni, H.R.; Brennan, P.J.; Quémar, A.; McNeil, M.R.; Jackson, Mary. A Common Mechanism of Inhibition of the *Mycobacterium Tuberculosis* Mycolic Acid Biosynthetic Pathway by Isoxyl and Thioacetazone. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 38434–38441.

que forma el S-óxido sobre el grupo tiocarbonilo de la tioacetazona.<sup>20</sup> El metabolito activo de la tioacetazona inhibe a la enzima  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-deshidratasa HadAB/HadBC mediante la unión covalente sobre el residuo de cisteína 61 (Cys61) de la subunidad HadA. Esta interacción también se ha observado en el antibiótico Isoxil (ISO) el cual sigue un mecanismo de acción similar a la tioacetazona.<sup>21</sup>

## 2.6 1,5-benzodiazepinas

Las benzodiazepinas son de los grupos de heterociclos más explorados en el campo de la química medicinal. Están constituidas de un anillo de fenilo fusionado a otro anillo formado por siete átomos, siendo dos de ellos átomos de nitrógeno. Según la posición que ocupen los dos heteroátomos de nitrógeno dentro del anillo de siete miembros pueden existir diversas clases de isómeros y núcleos de benzodiazepina (Figura 5).

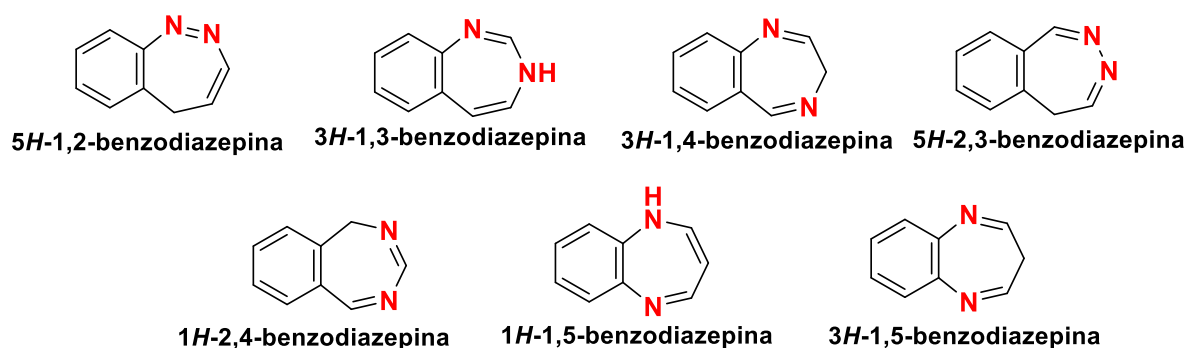


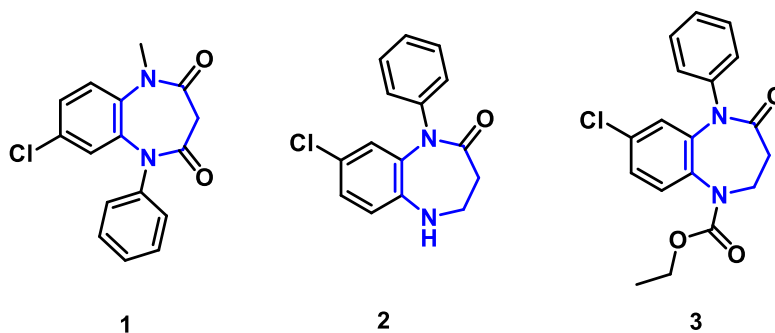
Figura 5. Isómeros de 1,5-benzodiazepina

<sup>20</sup>Dover, L. G.; Alahari, A.; Gratraud, P.; Gomes, J. M.; Bhowruth, V.; Reynolds, R. C.; Besra, G. S.; Kremer, L. EthA, a Common Activator of Thiocarbamide-Containing Drugs Acting on Different Mycobacterial Targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 1055–1063.

<sup>21</sup>Grzegorzewicz, A. E.; Eynard, N.; Quémar, A.; North, J. E.; Margolis, A.; Lindenberger, J. J.; Jones, V.; Korduláková, J.; Brennan, P. J.; Lee, R. E.; Ronning, D.R., McNeil, M.R., Jackson, M. Covalent Modification of the *Mycobacterium Tuberculosis* FAS-II Dehydratase by Isoxyl and Thiacetazona. *ACS Infect. Dis.* **2015**, 1, 91–97

## Actividad Biológica

Desde el punto de vista biológico el sistema heterocíclico fusionado de las benzodiazepinas se considera como una estructura privilegiada debido a su amplio espectro farmacológico.<sup>22</sup> La actividad biológica de las 1,5-benzodiazepinas y sus derivados ha sido poco explorada. Por ejemplo, algunos fármacos ansiolíticos que se usan para el tratamiento de enfermedades psiquiátricas contienen este núcleo en su estructura, como el clobazam **1**, lorendazam **2** y arfendazam **3** (Figura 6).



**Figura 6.** Fármacos ansiolíticos con núcleos estructurales de 1,5-benzodiazepina usados para enfermedades psiquiátricas

También, se ha reportado actividad anticancerígena<sup>23,24</sup> para los compuestos **4** y **5**, actividad antiviral para **6**,<sup>25</sup> antifúngica para **7**, y antibacterial para **8**<sup>26,27</sup> (Figura 7).

<sup>22</sup>Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Smythe, M. L. The Combinatorial Synthesis of Bicyclic Privileged Structures or Privileged Substructures. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 893–930

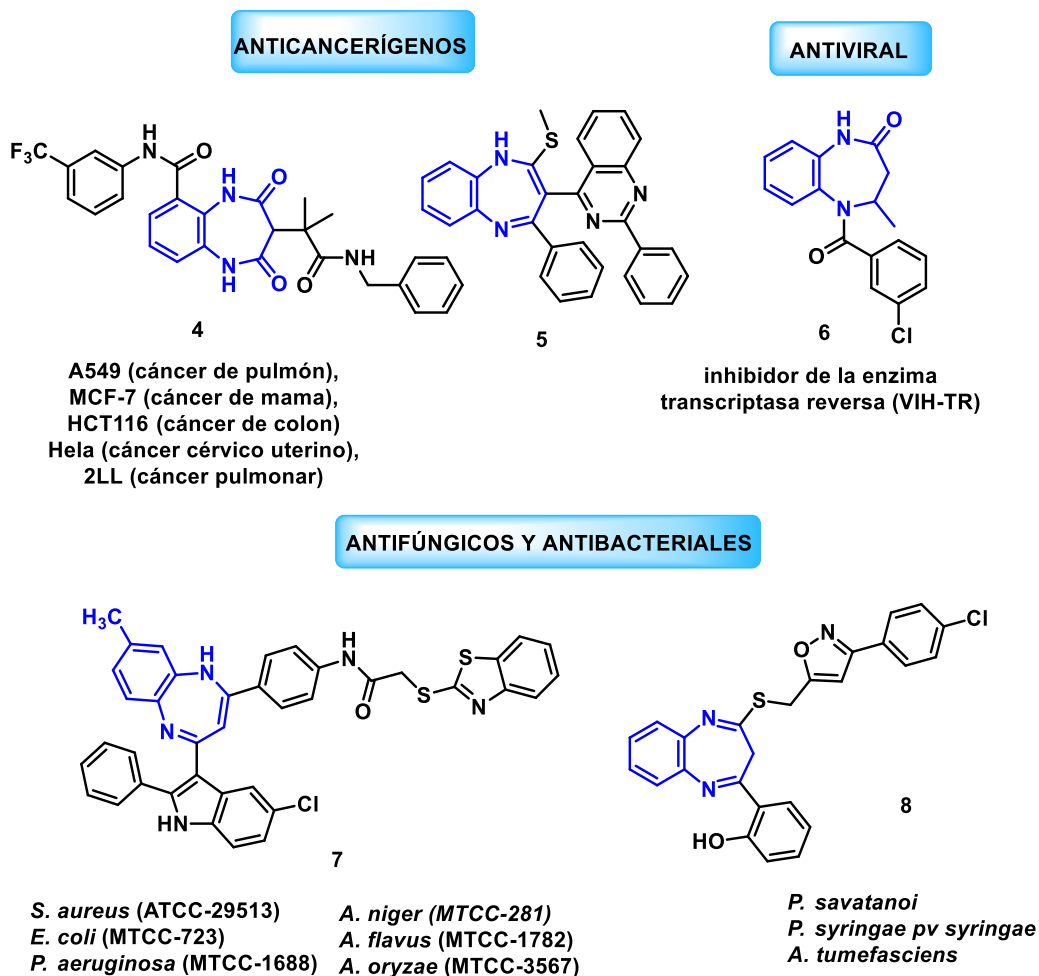
<sup>23</sup>Chen, Y.; Le, V.; Xu, X.; Shao, X.; Liu, J.; Li, Zhong. Discovery of Novel 1,5-Benzodiazepine-2,4-Dione Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 3948–3951

<sup>24</sup>Misra, A.; Kishore, D.; Verma, V. P.; Dubey, S.; Chander, S.; Gupta, N.; Bhagyawant, S.; Alothman, Z. A.; Wabaidur, S. M.; Sharma, S. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of Pyrimidine and Quinazoline Derivatives of 1,5-Benzodiazepine as Potential Anticancer Agents. *J. King Saud Univ.* **2020**, 32, 1486–1495.

<sup>25</sup>Chander, S.; Tang, C. R.; Al-Maqtari, H. M.; Jamalis, J.; Penta, A.; Hadda, T. B.; Sirat, H. M.; Zhrng, Y. T.; Sankaranarayanan, M. Synthesis and Study of Anti-HIV-1 RT Activity of 5-Benzoyl-4-Methyl-4-Methyl-1,3,4,5-Tetrahydro-2H-1,5-Benzodiazepin-2-One Derivatives. *Bioorg. Chem.* **2017**, 72, 74–79.

<sup>26</sup>Abdallah, W.; Daami-Remadi, M.; Znati, M.; Jannet, H. B.; Gharbi, R. Design and Synthesis of (3,5-Disubstituted Isoxazole)-Linked 1,5-Benzodiazepine Conjugates: Evaluation of Their Antimicrobial and Anti-Tyrosinase Activities. *J. Chem. Res.* **2016**, 41, 12–17

<sup>27</sup>Naraboli, B. S.; Biradar, J. Design and Synthesis of Benzodiazepines Bearing Benzimidazole/Benzothiazole and Indole Moieties as a Potent Antimicrobial and Antioxidant Agents. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2018**, 11, 70–77.



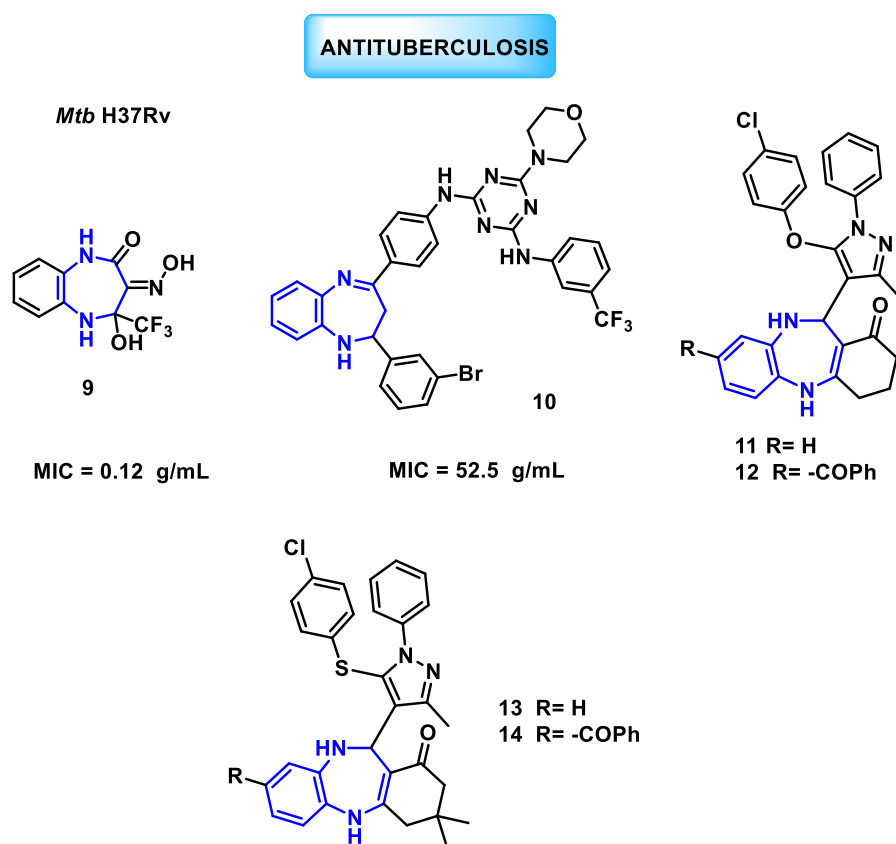
**Figura 7.** Derivados de 1,5-benzodiazepina con actividad biológica

Por otra parte, se han descrito compuestos que contienen en su estructura el anillo de 1,5-benzodiazepina con actividad antituberculosis. Por ejemplo, el compuesto **9**, con una MIC de 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra la cepa de Mtb H37Rv.<sup>28</sup> También, el compuesto **10** mostró un valor de MIC de 52.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ante Mtb H37Rv.<sup>29</sup> Asimismo, los compuestos **11** y **12** y sus análogos

<sup>28</sup> Khudina, O. G.; Burgart, Y. V.; Kravchenko, M. A.; Saloutin, V. I. Synthesis, Structure, Tuberculostatic Activity, and Toxicity of Fluoroalkyl-Containing 3-Hydroxyimino-1,5-Benzodiazepines. *Pharm. Chem. J.* **2011**, 45, 75–78.

<sup>29</sup> Solanke, A.; Tailor, R.; Kapadia, K. In Vitro Antimycobacterial and Antimicrobial Activity of Some New Pyrazoline, Isoxazole and Benzodiazepine Derivatives Containing 1,3,5-Triazine Nucleus via Chalcone Series. *Indian J. Chem. Sect. B Org. Med. Chem.* **2016**, 55B, 1277–1287.

**13** y **14** inhibieron el crecimiento de *Mtb* H37Rv en un porcentaje por arriba del 80% (Figura 8).<sup>30</sup>



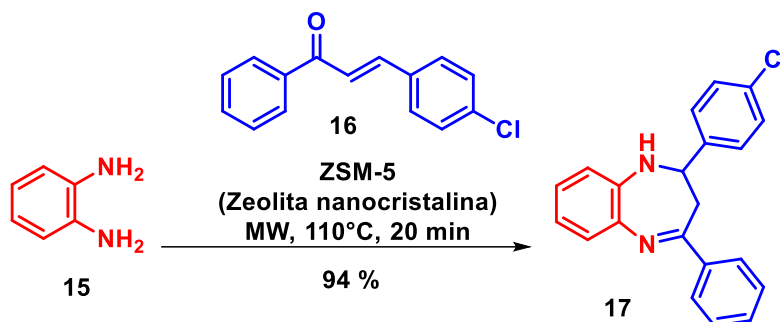
**Figura 8.** Ejemplos de compuestos con núcleos de 1,5-benzodiazepina con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

### Métodos de síntesis

Existen numerosos métodos para la síntesis del sistema de 1,5-benzodiazepina, la mayoría de ellos lo hacen mediante la condensación o adición en compuestos 1,3-dicarbonílicos o carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados con *orto*-fenilendiamina, siendo los más comunes para la preparación de derivados de 1,5-benzodiazepina, 1,5-benzodiazepin-2,4-dionas y 1,5-benzodiazepin-2-onas.

<sup>30</sup> Brahmhatt, G. C.; Sutariya, T. R.; Atara, H. D.; Parmar, N. J.; Gupta, V. K.; Lagunes, I.; Padrón, J. M.; Murumkar, P. R.; Yadab, M. R. New Pyrazolyl-dibenzo[b,e][1,4]Diazepinones: Room Temperature One-pot Synthesis and Biological Evaluation. *Mol. Divers.* **2019**, 24, 355–377.

La adición de Michael y condensación de *orto*-fenilendiamina **15** con distintas clases de chalconas **16** lleva a la formación de derivados de 2,3-dihidro-1*H*-1,5-benzodiazepina, principalmente con sustituyentes aromáticos en las posiciones 2 y 4 como en el caso del compuesto **17** (Esquema 3).<sup>31</sup>



**Esquema 3.** Síntesis de derivados de 2,3-dihidro-1*H*-1,5-benzodiazepina.

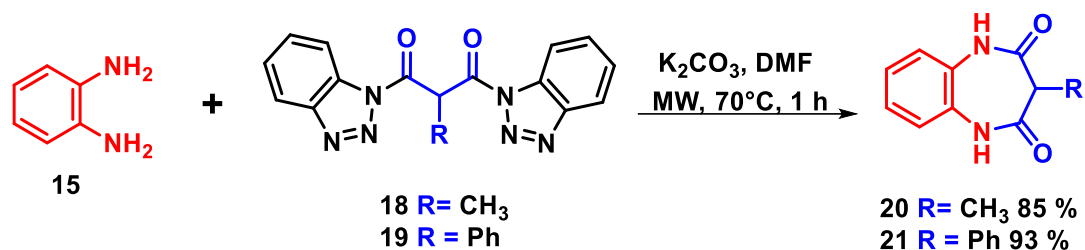
La reacción entre *orto*-fenilendiamina **15** con compuestos 1,3-dicarbonílicos como el ácido malónico<sup>32</sup> o el malonato de dietilo,<sup>33</sup> conduce a la formación de derivados de 3,5-dihidro-1,5-benzodiazepin-2,4-dionas con sustituyentes en la posición tres. En un reporte reciente, los *N*-acilbisbenzotriazoles **18** y **19** fueron utilizados como compuestos de partida para formar los productos **20** y **21** (Esquema 4).<sup>34</sup>

<sup>31</sup> Escobar, C. A.; Donoso Tauda, O.; Matuara Araya, R.; Sicker, D. Synthesis of 1,5-Benzodiazepines with Unusual Substitution Pattern from Chalcones Under Solvent-Free Microwave Irradiation Conditions. *Synth. Commun.* **2008**, 39, 166–174.

<sup>32</sup> Shang, X.; Yu, J.; Lin, H. A Supramolecular Optic Receptor for Selective Recognition CDP in Neutral Aqueous Solution. *J. Coord. Chem.* **2009**, 62, 3951.

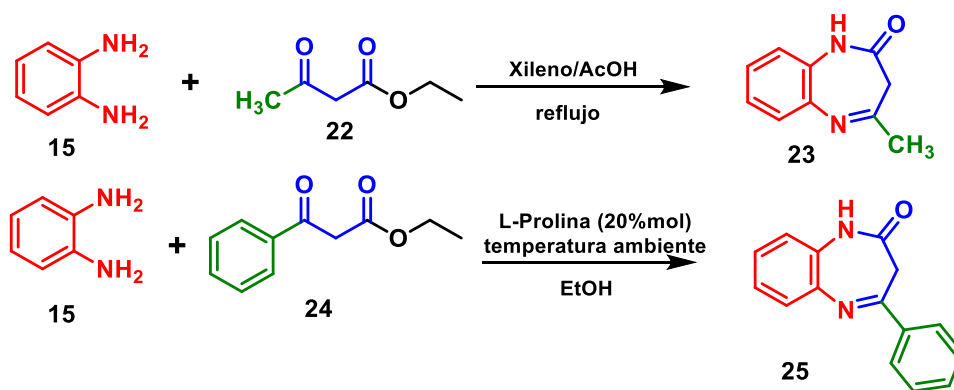
<sup>33</sup> Ramos, T.; Avendaño, C.; Elguero, J. Reactivity of Aryl- and Heteroarylmalonates against Ortho-Dinucleophiles. Triaryl-(Heteroaryl)Methane Synthesis. *J. Heterocycl. Chem.* **1987**, 24, 247–249.

<sup>34</sup> Elagawany, M.; Ibrahim, M. A.; Panda, S. S. One-Pot Synthesis of Bi- and Tricyclic Heterocyclic Compounds Using Benzotriazole Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 4910–4913.



**Esquema 4.** Síntesis de 3,5-dihidro-1,5-benzodiazepin-2,4-dionas sustituidas en posición tres usando *N*-acilbisbenzotriazoles.

Hay una amplia variedad de metodologías para obtener derivados de 1,5-benzodiazepin-2-onas principalmente con sustituyentes alquilo o aromáticos en posición cuatro. Una de las formas más utilizadas consiste en hacer reaccionar acetoacetato de etilo **22** y *ortho*-fenilendiamina **15** en reflujo de xileno para la formación del producto 4-metil-1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-ona **23**.<sup>35</sup> Se ha reportado que esta clase de condensaciones se han efectuado de forma eficiente mediante la catálisis con L-prolina, como en la síntesis del compuesto **25** a partir de benzoilacetato de etilo **24** y *ortho*-fenilendiamina **15** en solución de etanol a temperatura ambiente<sup>36</sup> (Esquema 5).

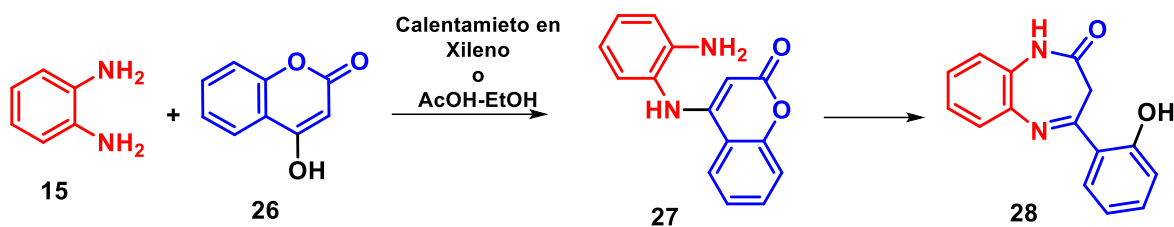


**Esquema 5.** Síntesis de 1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-onas a través de la condensación de *ortho*-fenilendiamina y compuestos 1,3-dicarbonílicos.

<sup>35</sup>M. Kidwai, R.; Venkataraman, R. A Facile Synthesis of Substituted Benzodiazepines Using Solid Support. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2004**, 40, 631–634.

<sup>36</sup>Goswami, P.; Das, B. Organocatalyzed One-Pot Synthesis of Substituted 1,5-Benzodiazepine and Benzimidazole Derivatives. *Synth. Commun.* **2010**, 40, 1685–1693.

La síntesis de 1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-onas también se ha reportado a partir de la reacción entre 4-hidroxicumarinas y *orto*-fenilendiamina. En este procedimiento se da la adición del grupo amino de la *orto*-fenilendiamina sobre la posición C-4 de la cumarina **26** formando el intermediario **27**. Posteriormente, lleva a cabo una reacción de ciclación intramolecular con el ataque nucleofílico del segundo grupo amino sobre el grupo carbonilo de la cumarina. El producto formado corresponde a una 4-(2-hidroxifenil)-1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-ona **28** (Esquema 6).<sup>37</sup>



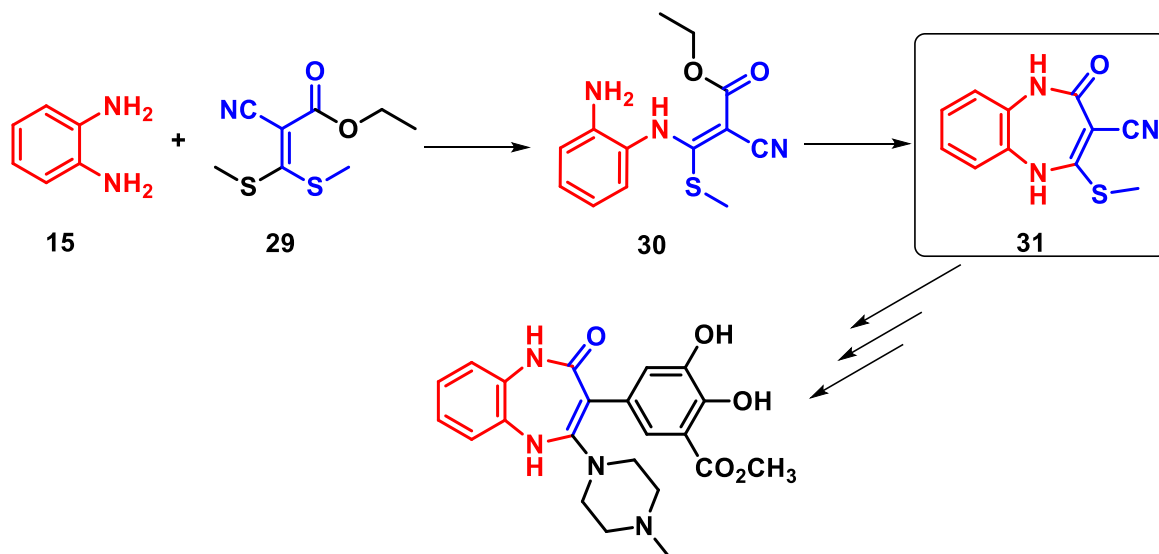
**Esquema 6.** Síntesis de 1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-onas a partir de 4-hidroxicumarinas y *orto*-fenilendiamina.

Por otra parte, algunos derivados de 1,5-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-onas pueden ser obtenidos a partir de 2-ciano-3,3-ditiometilacrilato de etilo **29** y *orto*-fenilendiamina **15**. La reacción involucra dos pasos, la sustitución nucleofílica de uno de los grupos tiometilo, y un segundo paso de ciclación intramolecular del intermediario **30**. De esta forma el producto 4-tiometil-3-ciano-1,5-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-ona **31** se obtiene como intermediario sintético de moléculas más complejas (Esquema 7).<sup>38</sup>

<sup>37</sup>Hamdi, M.; Grech, O.; Sakellariou, R.; Spézale, V. New Method of Synthesis of 1,5-benzodiazepin-2-ones from 4-hydroxycoumarin. *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, 31, 509–511.

<sup>38</sup>Misra, A.; Jain, S.; Kishore, D.; Dave, V.; Reddy, K. R.; Sadhu, V.; Dwivedi, J.; Sharma, S. A Facile One Pot Synthesis of Novel Pyrimidine Derivatives of 1,5-Benzodiazepines via Domino Reaction and Their Antibacterial Evaluation. *J. Microbiol. Methods* **2019**, 163, 105648.

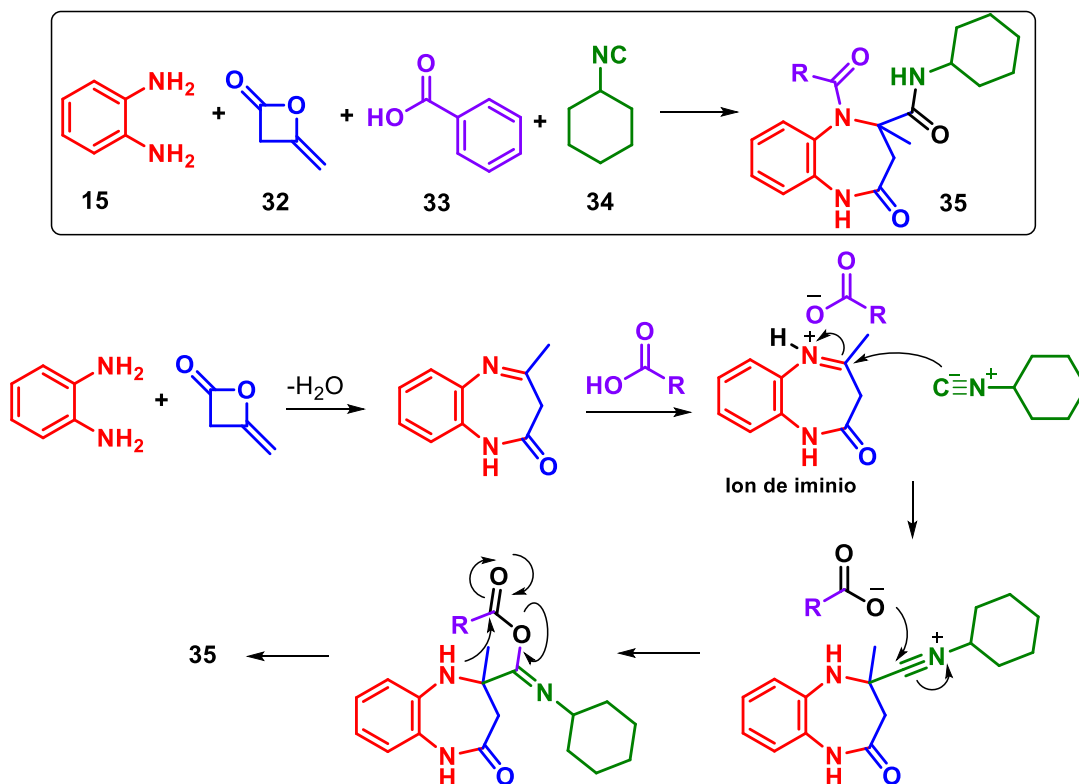




**Esquema 7.** Síntesis de derivados de tipo 2,5-dihidro-1*H*-1,5-benzodiazepin-2-ona **31**

Finalmente, se han reportado varias metodologías de reacciones de multicomponente capaces de formar estructuras más complejas que contienen el sistema fusionado de 1,5-benzodiazepina. Como ejemplo, la formación del sistema de 1,3,4,5-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-ona del compuesto **35** que se llevó a cabo mediante una reacción de cuatro componentes tipo Ugi al usar *orto*-fenilendiamina como amina inicial y la lactona **32**.<sup>39</sup> En la etapa inicial de la reacción se da la formación del sistema de 1,5-benzodiazepin-2-ona y posteriormente el ácido **33** conduce a la generación del ion de iminio. Posteriormente, la reacción procede mediante el mecanismo clásico de la reacción de Ugi, con la adición nucleofílica del isonitrilo **34** seguido por el reordenamiento y transferencia del grupo acilo hacia el grupo amino (Esquema 8).

<sup>39</sup>Zohreh, N.; Alizadeh, A.; Bijanzadeh, H. R.; Zhu, L. Novel Approach to 1,5-Benzodiazepine-2-ones Containing Peptoid Backbone via One-Pot Diketene-Based Ugi-4CR. *J. Comb. Chem.* **2010**, 12, 497–502.

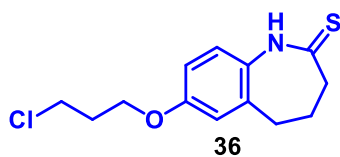


**Esquema 8.** Síntesis multicomponente de derivados de 1,3,4,5-2H-1,5-benzodiazepin-2-ona **35**

## 2.7 Investigación Previa en el laboratorio 2-11 del Instituto de Química

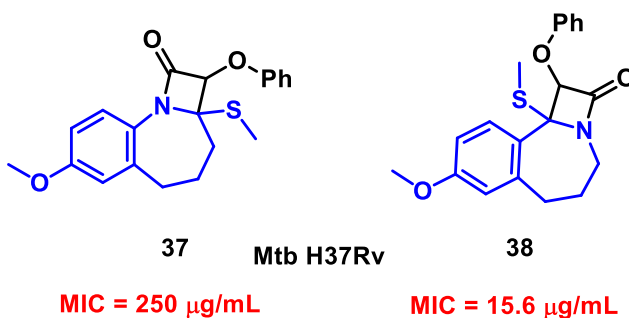
El grupo de investigación del Laboratorio 2-11 del Instituto de Química de la UNAM, tiene como objetivo la búsqueda de nuevos compuestos heterocíclicos, generados mediante la simplificación estructural de compuestos líderes y el análisis de la actividad antiproliferativa que presentan contra líneas celulares cancerígenas y Mtb. Por ejemplo, el compuesto **36** (Figura 9) se generó mediante modificaciones estructurales de las azetobenzodiazepinonas **37** y **38**, que mostraron valores de MIC de 250  $\mu\text{g/mL}$  y 15.6  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente contra Mtb (Figura 10).<sup>40</sup>

<sup>40</sup>Jurado Tasco, J. E. *Tesis de Maestría*. Búsqueda de los fragmentos necesarios para que las azetobenzodiazepinonas muestren actividad antiproliferativa y antituberculosa. UNAM. México, **2016**



Mtb H37Rv  
MIC = 3.8  $\mu\text{g/mL}$

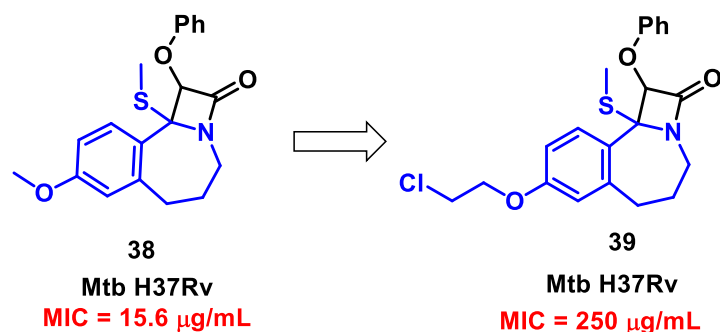
**Figura 9.** Compuesto hit generado por modificaciones estructurales



**Figura 10.** Estructura de las azetobenzoazepinonas **37** y **38** y su actividad antituberculosis

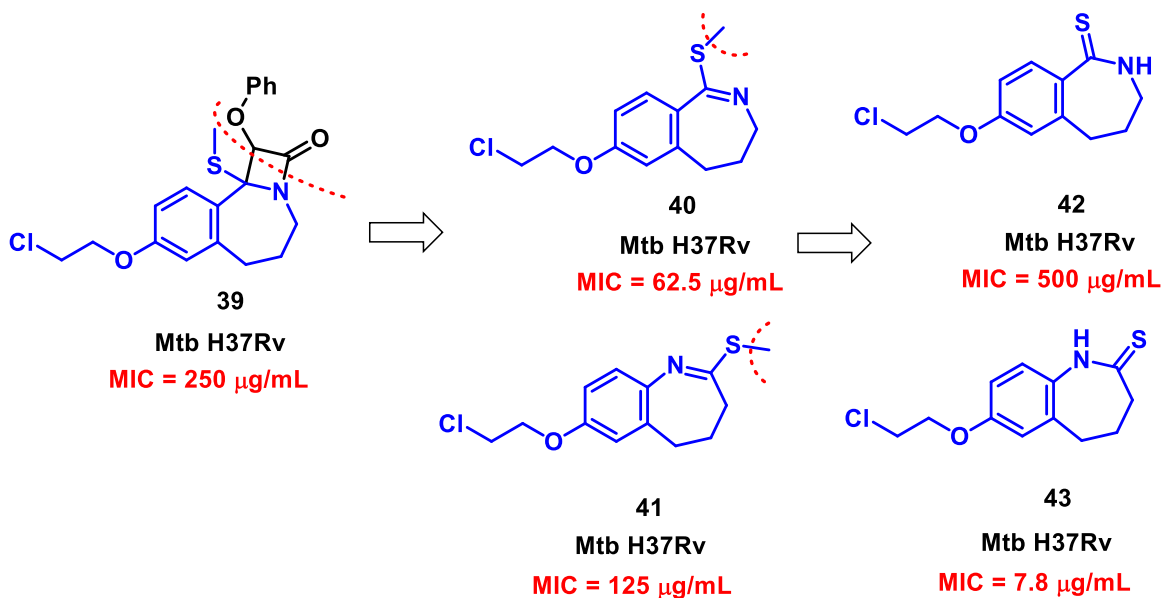
Con el fin de determinar si el grupo 8-metoxilo influía en la actividad antituberculosis mostrada por el compuesto **38**, fue cambiado por el grupo 2-cloroetoxilo (compuesto **39**); sin embargo, la actividad de este compuesto (MIC= 250  $\mu\text{g/mL}$ ) fue menor a la de **38** (Figura 11).<sup>41</sup>

<sup>41</sup>Becerra Anaya, S. J. *Tesis de Maestría*. Síntesis de Benzoazepinonas y la evaluación de su actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*. UNAM, México, 2018



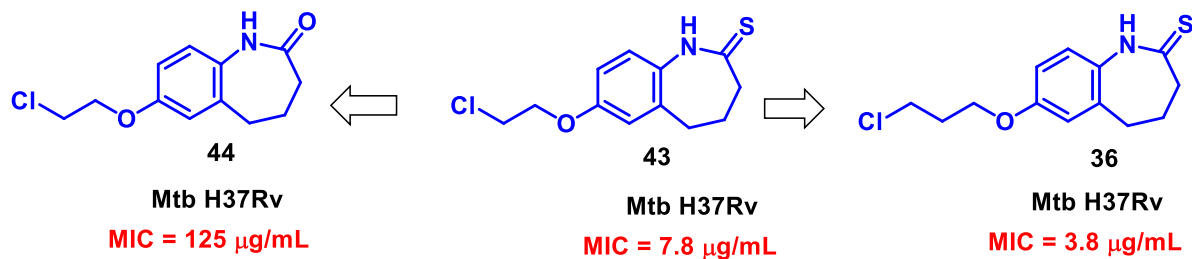
**Figura 11.** Estructura de la azetobenzoozepinona **39** y su actividad antituberculosis

Después, se eliminó el anillo  $\beta$ -lactámico del compuesto **39**, lo que produjo el compuesto **40**, que al ser evaluado contra Mtb H37Rv obtuvo un valor de MIC de 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . Asimismo, se sintetizó el isómero de posición **41**, que presentó un valor de MIC de 125  $\mu\text{g/mL}$ . La remoción del grupo metilo de los compuestos **40** y **41**, originó las tioamidas **42** y **43**, y que al ser evaluadas frente a Mtb H37Rv tuvieron valores de MIC de 500  $\mu\text{g/mL}$  7.8  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (Figura 12).



**Figura 12.** Simplificación estructural del compuesto **38** y la actividad antituberculosis de los compuestos generados.

Ya que la actividad del compuesto **38** fue mejorada significativamente por el compuesto **43**, se procedió a evaluar si la presencia del grupo tioamida es esencial para la actividad antituberculosis, para lo cual se sintetizó la amida **44** que mostró una MIC de 125  $\mu\text{g/mL}$ . Finalmente, la actividad del compuesto **43** fue mejorada al sustituir la cadena de 2-cloroetoxilo por una de 3-cloropropiloxilo (compuesto **36**), que presentó un valor de MIC de 3.8  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 13).



**Figura 13.** Modificaciones del compuesto **42** y actividad antituberculosis

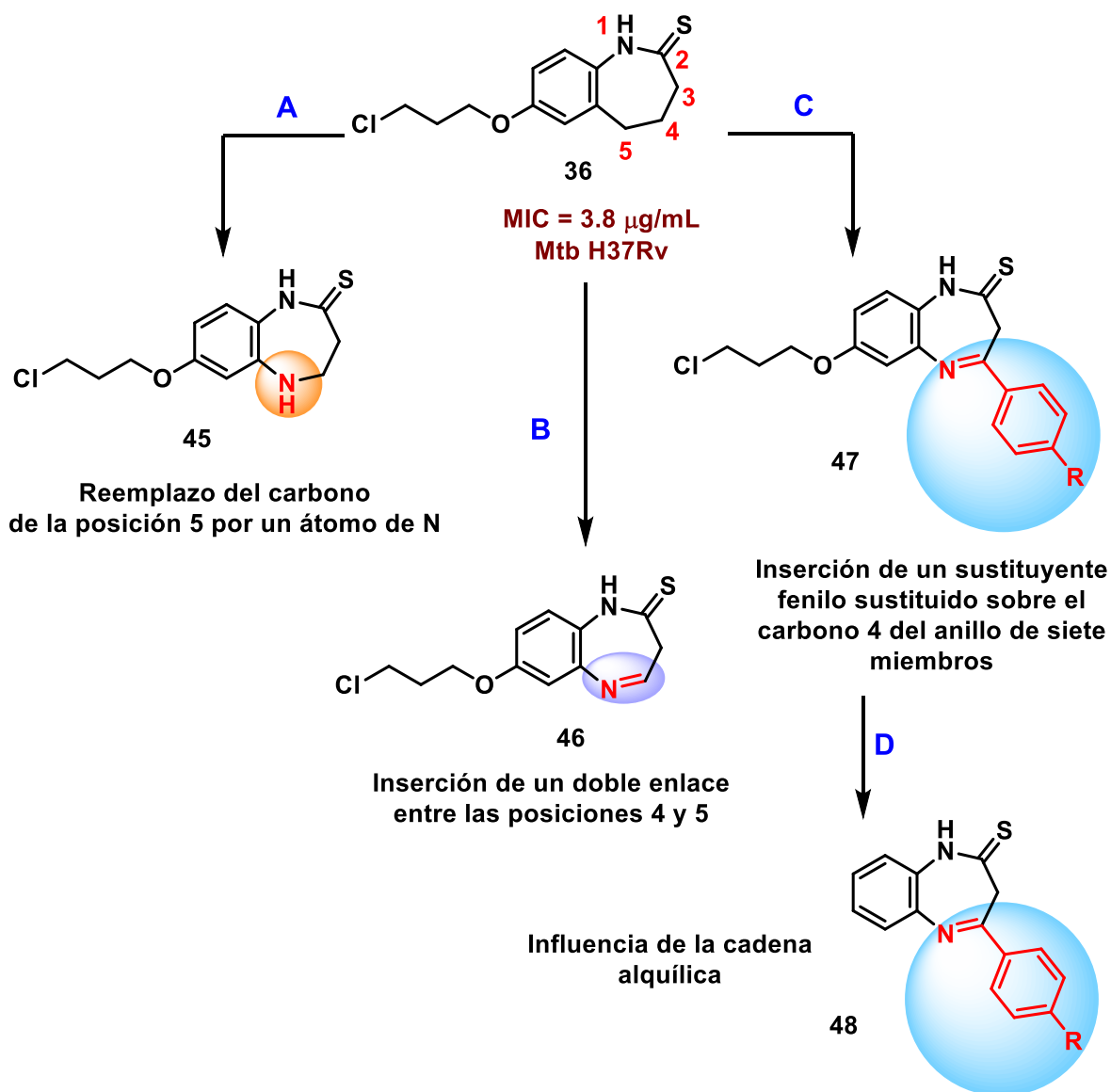
### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

Por décadas el tratamiento efectivo de la tuberculosis ha sido con el uso de medicamentos de primera línea, principalmente isoniacida y rifampicina. Sin embargo, el uso inadecuado de estos y otros antibióticos, dosis incorrectas, así como la mutación espontánea de la bacteria han provocado el desarrollo de resistencia a fármacos. La capacidad de Mtb para adquirir resistencia a diversas clases de antibióticos utilizados en el tratamiento de la enfermedad ha generado el interés de elaborar nuevas moléculas que tengan actividad antituberculosis.

## 4. HIPÓTESIS

Las modificaciones moleculares A, B, C y D sobre la estructura del compuesto **36**, generará compuestos con mejor actividad antituberculosis (Esquema 9).



**Esquema 9.** Cambios estructurales sugeridos sobre el compuesto **36**.

## 5. OBJETIVOS

---

### 5.1 Objetivo general

- Sintetizar y evaluar la actividad antituberculosis de los compuestos generados por la modificación D del compuesto **36**.

### 5.2 Objetivos particulares

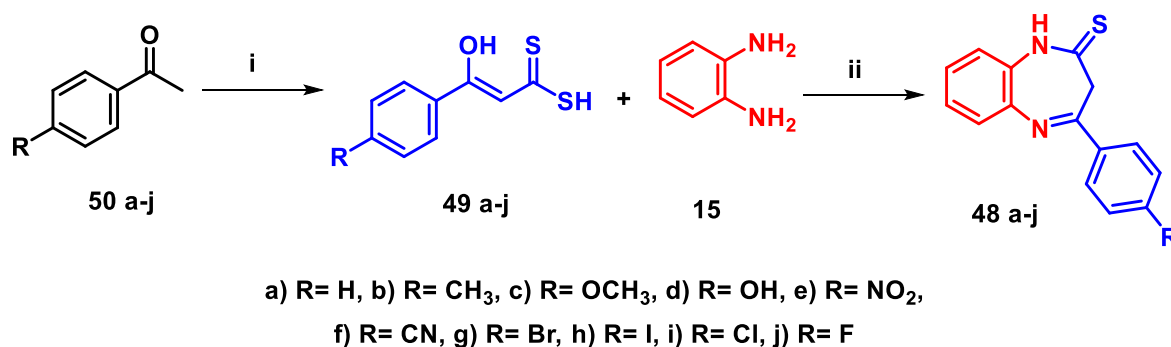
- Sintetizar los compuestos **48a-j** y **49a-j**.
- Identificar los compuestos **48a-j** y **49a-j** mediante sus espectros de IR, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y espectrometría de masas.
- Evaluar la actividad antituberculosis de los compuestos **48a-j** y los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-2-propenoicos **49a-j**, usando la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- Evaluar las propiedades ADMET *in silico* de los compuestos **49a-j**.
- Determinar teóricamente si los compuestos **49d** y **49e** funcionan como inhibidores de la enzima de  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-deshidratasa HadAB de *Mycobacterium tuberculosis*.



## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Metodología de Síntesis

Los compuestos **48a-j** fueron obtenidos en dos pasos de síntesis, utilizando acetofenonas 4-sustituidas **50a-j** como materias primas. El primer paso consistió en hacer reaccionar **50a-j** y CS<sub>2</sub> en presencia de bases tales como *t*-AmONa<sup>42</sup>, *t*-BuOK<sup>43</sup> o NaH, para obtener los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-2-propeno-1-tioicos **49a-j**, y posteriormente hacerlos reaccionar con la *orto*-fenilendiamina **15** en calentamiento de xileno a reflujo para obtener las 1,5-benzodiazepin-2-tionas **48a-j** (Esquema 10).



**Esquema 10.** (i) 1) Base, 2) CS<sub>2</sub> 3) sol. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2N; (ii) Reflujo de Xileno

La identidad de los compuestos sintetizados se comprobó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, espectroscopía de infrarrojo IR y espectrometría de masas de alta resolución (EMAR).

<sup>42</sup>Cortés, E.; Martínez, R. Synthesis and Mass Spectral Fragmentation of 2-methylthio-7-(*p*-R-phenyl)-8-phenoxy-4,5-benzo-3-aza-2-nonem. III. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, 20, 161–167.

<sup>43</sup>Velasco, B. E.; López-Téllez, G.; González-Rivas, N.; García-Orozco, I.; Cuevas-Yañez, E. Catalytic Activity of Dithioic Acid Copper Complexes in the Alkyne-Azide Cycloaddition. *Can. J. Chem.* **2013**, 91, 292–299.

## 6.2 Metodología para la determinación de la Actividad Antituberculosis

### Soluciones Stock

Los compuestos sintetizados fueron disueltos en soluciones stock de DMSO con una concentración de 10 mg/mL para el ensayo de microplaca de Resazurina (REMA). Cada compuesto fue diluido en medio de cultivo Middlebrook 7H9. Las soluciones stock de los compuestos de referencia fueron preparadas a una concentración 64 µg/mL y filtradas usando una membrana de 0.22 µm (Millipore; Darmstadt, Germany). Las soluciones stock fueron almacenadas a -20°C previo a su evaluación.

### Ensayos de citotoxicidad

Se colocaron un total de 10,000 células Vero en una placa de 96 pozos y se incubaron en un medio RPMI (100 µL) durante 24 h. La placa se lavó y se añadió medio de cultivo fresco que contenía los compuestos sintetizados a diferentes concentraciones. Cada compuesto se incubó en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 48 horas a 37 ° C. Se añadió a cada pozo una solución de 10 µL de MTT (5 mg/mL en PBS estéril) y las mezclas resultantes se incubaron durante otras 4 h. A continuación, se eliminó el medio y se utilizó un volumen de 100 µL de DMSO para solubilizar el formazán. Se midió la absorbancia de formazán a 570 nm y se calculó la citotoxicidad como % de toxicidad = (1 - (problema de ABS / control de ABS)) x 100. Los controles eran células sin tratamiento, pero siguiendo los mismos procedimientos descritos anteriormente.<sup>44</sup>

### Preparación del inóculo de Mtb

Se utilizó un medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de glicerol y ADC (albúmina, dextrosa, catalasa) y tiloxapol al 0.01% para cultivar las cepas de Mtb H37Rv, H37Ra (No virulenta) y 209 (aislado clínico resistente a rifampicina) a una temperatura de 37°C hasta alcanzar un valor de densidad óptica de 0.4 (600nm).

---

<sup>44</sup>Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **1983**, 65, 55–63.

### **Pruebas de susceptibilidad por el método de Ensayo de microtitulación de Resazurina en placa (REMA)**

Los pozos externos de una placa de 96 pozos fueron llenados con 200  $\mu\text{L}$  de solución estéril PBS (buffer de fosfatos) para prevenir la deshidratación durante el proceso de incubación (8 días). Se preparó en la placa una curva del fármaco de referencia de rifampicina (RIF) del intervalo de concentración de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (diluciones seriales). Los compuestos sintetizados fueron evaluados a diferentes concentraciones en un intervalo de 0.98  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por triplicado. Se agregó 100  $\mu\text{L}$  de inóculo de Mtb a las diluciones de referencia y de compuestos sintetizados. Se incluyeron controles de DMSO, DMSO + inóculo de Mtb, medio de cultivo, medio de cultivo + inóculo de Mtb, compuesto sintetizado sin inóculo de Mtb, RIF sin inóculo Mtb y RIF con inóculo de MTB para validar la placa. Después de 6 días de incubación en la placa, se adicionó a cada pozo 30  $\mu\text{L}$  de resazurina al 0.001% (m/v), y posteriormente las placas fueron incubadas por dos días. El color de cada placa fue determinado mediante la inspección visual interpretando el azul como no crecimiento y rosa como crecimiento.

### **Concentración mínima inhibitoria (MIC)**

Se define como la concentración más baja a la que un compuesto inhibe el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. La MIC para cada experimento fue determinada como la mínima concentración a la cual los pozos tornaron a color azul.<sup>45</sup>

### **Concentración mínima bactericida**

Se transfirieron 5  $\mu\text{L}$  de las suspensiones de bacterias duplicadas sin desarrollar REMA a una nueva microplaca con 195  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo fresco en cada pozo. Posteriormente, las microplacas se incubaron como se describió anteriormente para REMA. Los valores de MBC indican la concentración mínima del compuesto que no provocó un cambio de color en los cultivos reincubados en medio fresco.

---

<sup>45</sup>Collins, L. A.; Franzblau, S. G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1997**, 41, 1004–1009.

## Índice de selectividad

Fue calculado al dividir los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en células Vero con el valor de MIC determinado por REMA.

$$\text{Índice de Selectividad} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ Células Vero}}{\text{MIC}}$$

### 6.3 Determinación teórica de las propiedades ADMET

El cálculo y determinación *in silico* de las propiedades ADMET se llevó a cabo mediante el uso de herramientas en línea de acceso libre: FAF-Drug<sup>46</sup> (<https://fafdrugs4.rpbs.univ-paris-diderot.fr/>), vNN-ADMET<sup>47</sup> (<https://vnnadmet.bhsai.org/vnnadmet/home.xhtml>), pkCSM<sup>48</sup> (<http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsm>), SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), admetSAR 2.0<sup>49</sup> (<http://lmmmd.ecust.edu.cn/admesar2>).

### 6.4 Metodología para el acoplamiento molecular

#### Validación

La validación del cálculo se realizó usando el complejo enzima-ligante de la base de datos Protein Data Bank (PDB) de la enzima HadAB con código PDB:4RLU y 2,4,4'-trihidroxichalcona (HCC). Se realizó el cálculo de re-docking del ligante en el sitio activo, con un valor de RMSD de 3.0 Å entre la estructura co-cristalizada y la estructura obtenida del re-docking.

#### Ligante

Las estructuras de los compuestos **49a-j** fueron modeladas cada una en sus formas tautoméricas como estructuras 2D usando el software ChemBio Draw Ultra 12.0, y fueron

<sup>46</sup>Lagorce, D.; Bouslama, L.; Becot, J.; Miteva, M. A.; Villoutreix, B. O. FAF- Drugs4: free ADME-tox filtering computations for chemical biology and early stages drug discovery. *Bioinformatics*. **2017**, 33, 3658–3660

<sup>47</sup>Schyma, P.; Liu, R.; Desai, V.; Wallqvist, A. vNN web server for ADMET predictions. *Front Pharmacol*. **2017**, 8, 889

<sup>48</sup>Pires, D. E. V.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem*. **2015**, 58, 4066–4072

<sup>49</sup>Yang, H.; Lou, C.; Sun, L.; Li, J.; Cai, Y.; Wang, Z.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*. **2019**, 35, 067–1069

convertidas en estructuras 3D en formato MDL.<sup>50</sup> Los estados protonados fueron modelados usando la herramienta en línea Chemicalize.<sup>51</sup> La geometría de los compuestos, así como del ligando co-cristalizado fueron calculadas con el software Gaussian 16 usando el nivel del funcional de la densidad B3LYP 6-31G (d, p).<sup>52</sup> La preparación del ligante fue finalizada usando AutoDock Tools, adicionando hidrógenos polares y cargas de Gasteiger así como enlaces rotables asignados por default.<sup>53</sup>

## Receptor

Las coordenadas de rayos X de la enzima HadAB (4RLU) fueron obtenidas de la base de datos Protein Data Bank. Las moléculas de agua fueron eliminadas de la estructura cristalográfica, y la preparación final del receptor fue realizada mediante el módulo Dock Prep del software Chimera usando el campo de fuerza AMBER-ff14SB. Finalmente, a la estructura obtenida se le adicionaron cargas de Kollman usando Autodock Tools.

*Cálculo de Docking.* El cálculo de docking se realizó usando Autodock 4 con un modelo de receptor rígido, usando el algoritmo genético Lamarckiano.<sup>54</sup> Se utilizó una celda de  $70 \times 70 \times 70$  en el sitio activo del receptor con las coordenadas  $x=0.272$ ,  $y=22.253$ ,  $z=-30.833$  y una distancia de los puntos de la celda de  $0.375 \text{ \AA}$ . Con estos parámetros se realizaron 10 corridas, con un tamaño de población de 100 y 27000 generaciones o 250000 evaluaciones de energía. La visualización y análisis de las interacciones no covalentes en las mejores posiciones se llevó a cabo usando el software Discovery Studio Visualizer.<sup>55</sup>

---

<sup>50</sup> Cousins, K. R.; Computer review of ChemDraw Ultra 12.0. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 8388.

<sup>51</sup> Swain, M. Chemicalize.org. *J. Chem. Inf. Mod.* **2012**; 52, 613–615

<sup>52</sup> Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J. Revision C.01. Gaussian, Inc.; **2016**.

<sup>53</sup> Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **1999**, 17, 57–61

<sup>54</sup> Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comp. Chem.* **1998**, 19, 1639–1662

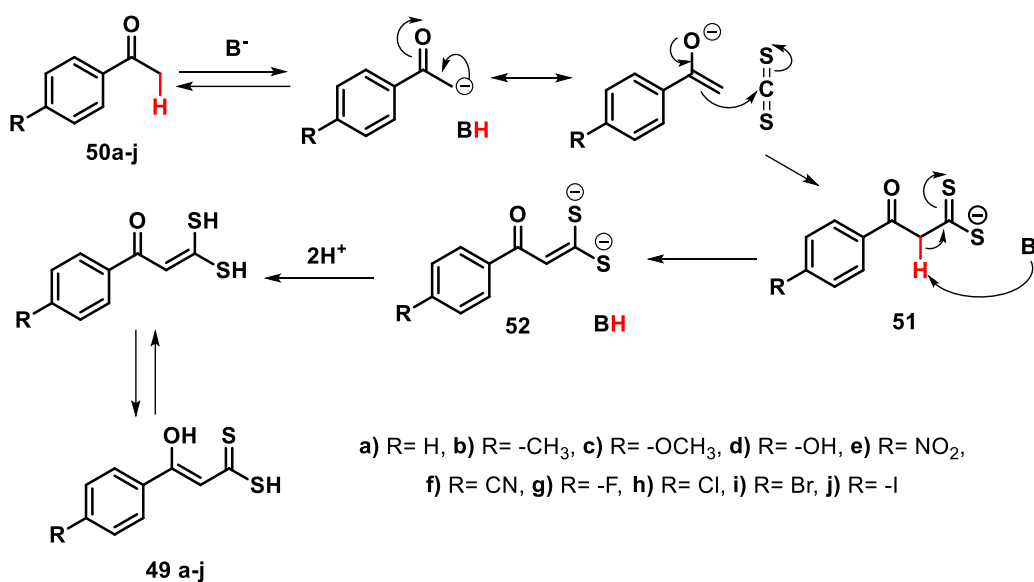
<sup>55</sup> BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio 2019. San Diego: Dassault Systèmes; **2019**. Available from: <https://www.3ds.com/products-services/biovia/>

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Parte Química

#### Síntesis de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-2-propeno-2,2-ditioicos (49a-j)

La síntesis de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-2-propeno-2,2-ditioicos **49a-j** se llevó a cabo haciendo reaccionar las acetofenonas **50a-j** con disulfuro de carbono, utilizando diferentes bases y disolventes. La reacción procede mediante la formación del enolato de la respectiva acetofenona cuando la base abstrae el hidrógeno ácido en posición  $\alpha$  al grupo carbonilo, y que posteriormente reacciona con disulfuro de carbono mediante una adición que produce la especie monoaniónica **51**, que vuelve a reaccionar con la base para formar la sal dianiónica **52**, que al protonarse en medio ácido forma los ácidos **49a-j** (Esquema 11).



**Esquema 11.** Propuesta mecanística para la formación de los ácidos 3-fenil-3-hidroxi-2-propeno-2,2-ditioicos **49a-j**

Para encontrar las mejores condiciones de reacción se empleó la acetofenona **50a** como materia prima. Primero, se utilizó como base el *t*-AmONa y xileno como disolvente, a 0°C, y el tiempo de reacción fue de 18 horas, obteniendo el ácido **49a** con un rendimiento del 60%. Posteriormente, la reacción se realizó usando como base *t*-BuOK y THF como disolvente, y

el tiempo de reacción fue de 15 horas, obteniendo el ácido **49a** en un rendimiento del 68%. En estas condiciones el tratamiento del crudo de reacción se facilitó. Finalmente, la reacción se llevó a cabo utilizando como base NaH en THF. En estas condiciones el tiempo de reacción fue de 15 horas y el rendimiento con el que se obtuvo **49a** fue del 68% (Tabla 2).

**Tabla 2.** Condiciones usadas para la formación del compuesto **49a**

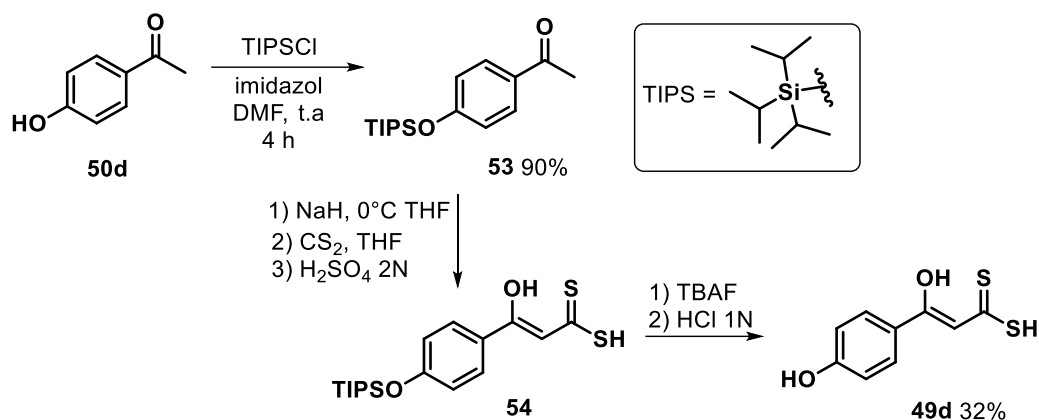
Ensayo	Base	Disolvente	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
1	<i>t</i> -AmONa	Xileno	18	60
2	<i>t</i> -BuOK	THF	15	68
3	NaH	THF	15	68

De acuerdo con los resultados anteriores, la síntesis de los otros ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioicos **49b-j** se efectuó empleando las acetofenonas sustituidas **49b-j**, NaH como base y THF como disolvente. La Tabla 3 muestra los rendimientos obtenidos para estos compuestos.

**Tabla 3.** Rendimientos en la síntesis de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioicos **49a-j**

Compuesto	R	Rendimiento (%)
<b>49 a</b>	H	68
<b>49 b</b>	CH <sub>3</sub>	86
<b>49 c</b>	OCH <sub>3</sub>	84
<b>49 d</b>	OH	19
<b>49 e</b>	NO <sub>2</sub>	67
<b>49 f</b>	CN	69
<b>49 g</b>	F	54
<b>49 h</b>	Cl	55
<b>49 i</b>	Br	83
<b>49 j</b>	I	38

Con la finalidad de obtener el compuesto **49d** con mejores rendimientos, se siguió la secuencia de reacciones que se muestran en el Esquema 12. El primer paso, consistió en la protección del grupo hidroxilo de la 4-hidroxiacetofenona **50d** con el cloruro de triisopropilsilano TIPSCl,<sup>56</sup> usando imidazol y DMF como disolvente, a temperatura ambiente, obteniendo el compuesto **53** con un 90% de rendimiento. El compuesto **53** se hizo reaccionar con CS<sub>2</sub> y NaH en THF. El crudo de reacción fue utilizado para la siguiente etapa, en la que se hizo la desprotección del grupo hidroxilo de **54** utilizando TBAF en THF, y después del tratamiento con HCl 1N se obtuvo el ácido **49d** en 32% de rendimiento.



**Esquema 12.** Síntesis de **49d** usando el grupo protector TIPS

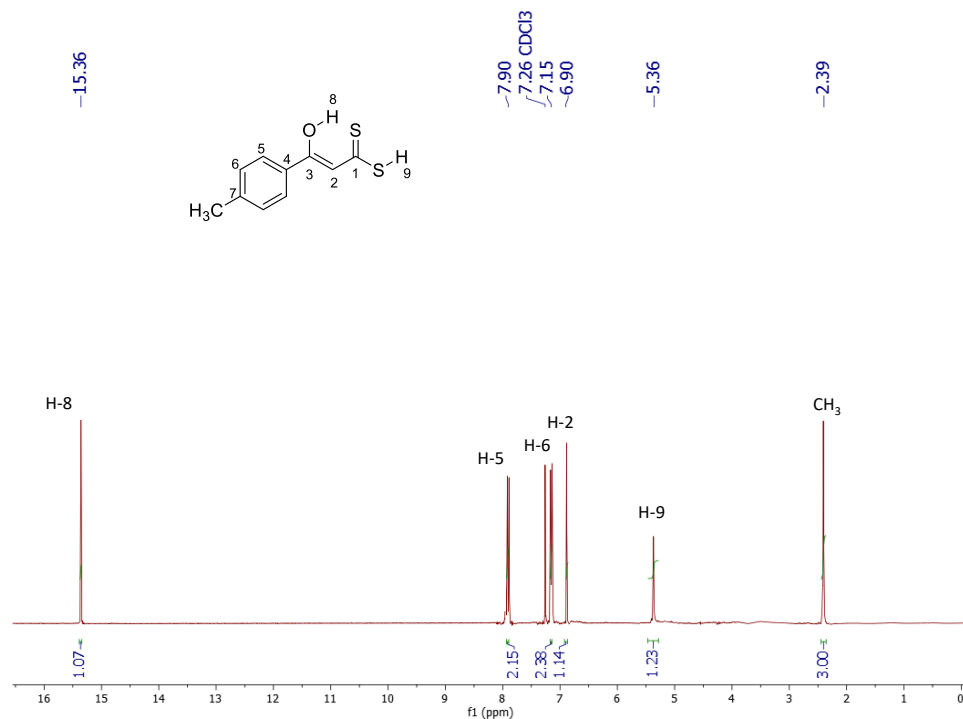
Los compuestos **49a-j** fueron caracterizados mediante RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, espectroscopía IR, y espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). Tomando como ejemplo el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **49b**, se observan dos señales dobletes en 7.90 ppm ( $J = 8.4$  Hz H-5 y H-5') y 7.15 ppm ( $J = 8.7$  Hz H-6 y H-6') que pertenecen a los hidrógenos del anillo aromático. En dicho espectro también se observa una señal singulete sobre 2.39 ppm que corresponde a los hidrógenos del grupo metilo. La señal simple sobre 6.90 ppm (H-2) indica la presencia de un hidrógeno olefínico y la señal situada en 15.36 ppm (O-H) corresponde un protón asignado al grupo hidroxilo. Como se señala en el trabajo de Larson<sup>57</sup>, la forma tautomérica que se observa de **49b** es la enólica, y en la cual el hidrógeno del grupo hidroxilo

<sup>56</sup>Rodrigues-Correia, A.; Weyel, X. M. M.; Heckel, A. Four Levels of Wavelength-Selective Uncaging for Oligonucleotides. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5500–5503.

<sup>57</sup>Larsson, F. C. V.; Lawesson, S. O. Preparation and Alkylation of Substituted  $\beta$ -Hydroxydithiocinnamic Acids. *Tetrahedron* **1972**, *28*, 5341–5357.



puede formar un puente de con el átomo de azufre del grupo tiocarbonilo en la molécula. La señal sobre 5.36 ppm (S-H) pertenece al átomo de hidrógeno del grupo ditiocarboxílico. (Figura 14)



**Figura 14.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **49b**

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **49b** se observa una señal situada en 21.9 ppm que corresponde al carbono del grupo metilo sustituyente de la posición 4 del anillo aromático. También se puede ver que las señales en 144.7 (C-7), 130.6 (C-4), 130.0 (C-6 y C-6') y 127.6 (C-5 y C-5') ppm pertenecen a los carbonos del anillo aromático. Las señales que aparecen en 174.8 ppm y 105.2 ppm se asignan los carbonos C-3 y C-2 que forman el doble enlace de la forma enólica de la molécula. Finalmente, la señal que se observa sobre 209.3 ppm es característica del carbono C-1 que forma al grupo tiocarbonilo (Figura 15). En la Tabla 4 se resumen los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los ácidos 3-fenil-3-hidroxi-2-enoditioicos **49a-j** que fueron sintetizados.

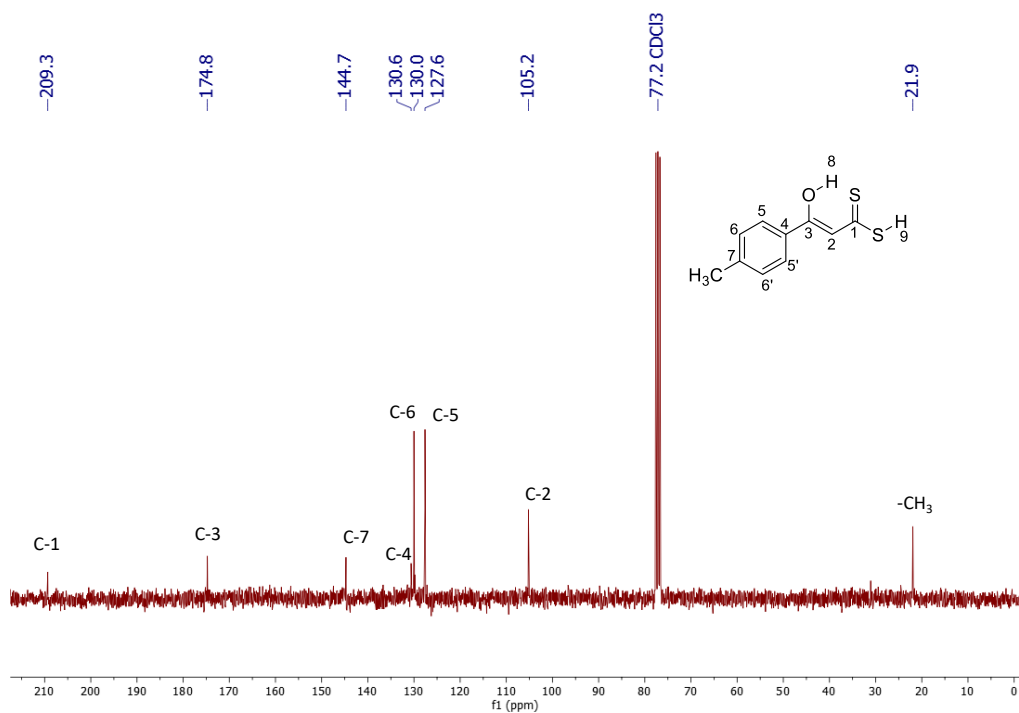
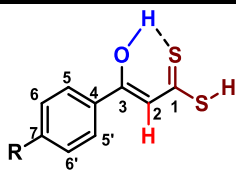


Figura 15. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **49b**

Tabla 4. Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **49a-j**

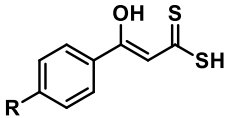
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
<b><math>\delta</math> (H) (ppm)</b>										
S-H	5.43	5.36	5.43	5.42	5.65	5.93	5.43	5.46	5.58	5.43
H-2	6.96	6.90	7.39	7.11	6.93	7.61	6.90	6.90	6.91	6.87
H-6	7.50	7.15	6.96	6.62	8.03	8.11	7.15	7.44	7.76	7.56
H-5	7.90	7.90	7.91	7.76	8.29	8.32	7.90	7.81	7.97	7.79
O-H	15.31	15.36	15.34	15.40	14.96	15.56	15.36	15.31	15.21	15.25
H-7	7.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\delta</math> (C) (ppm)</b>										
C-2	105.6	105.2	109.7	112.5	108.8	108.5	107.9	108.0	108.0	107.7
C-6	129.3	130.0	129.6	115.3	124.0	132.6	116.5	129.4	132.4	126.8
C-4	133.5	130.6	132.2	127.9	140.6	138.8	129.9	132.3	128.8	131.4
C-5	127.6	127.6	113.8	127.6	127.6	127.2	129.6	128.4	128.5	129.6
C-7	130.4	144.7	162.3	159.2	149.5	114.9	167.2	139.0	132.6	142.8
C-3	174.4	174.8	165.0	176.0	165.5	165.9	171.8	171.5	171.6	169.7
C-1	210.3	209.3	184.7	203.4	219.1	218.9	211.4	211.9	212.0	216.7



**49a** R= H, **49b** R=  $\text{CH}_3$ , **49c** R=  $\text{OCH}_3$ , **49d** R= OH, **49e** R=  $\text{NO}_2$ ,  
**49f** R= CN, **49g** R= F, **49h** R= Cl, **49i** R= Br, **49j** R= I

En el espectro de infrarrojo (IR) del compuesto **49b** se muestran las bandas de absorción en  $3100\text{ cm}^{-1}$  atribuidas al enlace del hidrógeno del grupo hidroxilo (O-H), la banda en  $2490\text{ cm}^{-1}$  es típica del enlace azufre e hidrógeno en el grupo ditiocarboxílico (S-H). La banda que se presenta en  $1603\text{ cm}^{-1}$  y  $1576\text{ cm}^{-1}$  se pueden atribuir al grupo arilo. Y finalmente, se observa una banda en  $1209\text{ cm}^{-1}$  que de acuerdo con la literatura corresponde al grupo tiocarbonilo (C=S). Por otro lado, el compuesto **49b** también fue analizado por espectrometría de masas de alta resolución, donde se encontró que la masa es de 211.02588 (error de 3.53 ppm) para este compuesto de fórmula  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{OS}_2$ . En la Tabla 5 se resumen los resultados de IR y espectrometría de masas de toda la serie de compuestos **49a-j**.

**Tabla 5.** Resultados de la espectroscopía infrarrojo (IR) y espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) de los compuestos **49a-j**.



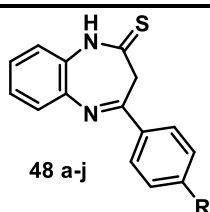
**49a-j**

Compuesto	R	IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	EMAR ( $m/z$ ) [error ppm]
<b>49 a</b>	H	3062 (-OH), 2921 (-SH), 1688, 1595 (C=C aromáticos), 1523, 1279 (S=C)	197.00898 [2.55 ppm]
<b>49 b</b>	$\text{CH}_3$	3100 (-OH), 2914 (-SH), 1603, 1576 (C=C aromáticos), 1209 (S=C), 1181	211.02588 [3.53 ppm]
<b>49 c</b>	$\text{OCH}_3$	3300 (-OH), 2800 (-SH), 1665, 1596 (C=C aromáticos), 1230 (S=C)	227.01915 [3.94 ppm]
<b>49 d</b>	OH	3357 (-OH), 2917, 2850, 1601, 1567 (C=C aromáticos), 1220 (S=C)	212.99657 [1.26 ppm]
<b>49 e</b>	$\text{NO}_2$	3062 (-OH), 2921, 2550 (-SH), 1688, 1595 (C=C aromáticos), 1523, 1279 (S=C)	194.99441 [2.97 ppm]
<b>49 f</b>	CN	3069 (-OH), 2580 (-SH), 2227 (-CN), 1687, 1549 (C=C aromáticos), 1227 (S=C)	222.00401 [3.24 ppm]
<b>49 g</b>	F	3065 (-OH), 2919, 2574 (-SH), 1686, 1596 (C=C aromáticos), 1292 (S=C), 1225	214.99950 [2.62 ppm]
<b>49 h</b>	Cl	2839, 2546 (-SH), 1678, 1587 (C=C aromáticos), 1228 (S=C), 1091	230.97051 [0.00 ppm]
<b>49 i</b>	Br	2925, 2548 (-SH), 1677, 1585 (C=C aromáticos), 1417, 1233 (S=C)	274.91890 [3.98 ppm]
<b>49 j</b>	I	3030 (-OH), 2800, 2510 (-SH), 1680, 1590 (C=C aromáticos), 1232 (S=C)	322.90488 [3.85 ppm]

### Síntesis de las 4-(R-fenil)-1,3-dihidro-2H-1,5-benzodiazepin-2-tionas (48a-j)

Para poder obtener los compuestos **48a-j**, se siguió la ruta de síntesis mostrada en el Esquema 10, que consistió en la reacción de condensación y ciclación entre los ácidos **49a-j** con *orto*-fenilendiamina **15**. La reacción se llevó a cabo usando xileno anhidro como disolvente a temperatura de reflujo y los productos **48a-j** se obtuvieron en tiempos que fueron de 3-5 horas y rendimientos moderados (Tabla 6).

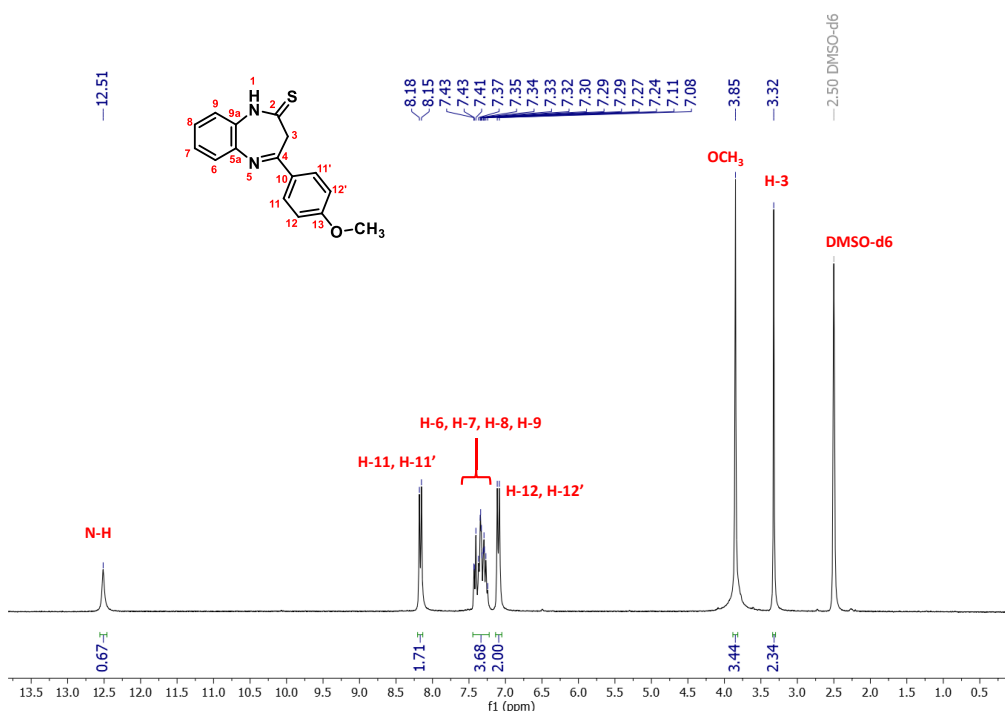
**Tabla 6.** Rendimientos obtenidos en la síntesis de la serie de 4-(4-R-fenil)-1,3-dihidro-2H-1,5-benzodiazepin-2-tionas **48a-j**



Compuesto	R	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
<b>48 a</b>	H	3	55
<b>48 b</b>	CH <sub>3</sub>	4	70
<b>48 c</b>	OCH <sub>3</sub>	4	54
<b>48 d</b>	OH	5	51
<b>48 e</b>	NO <sub>2</sub>	4.5	50
<b>48 f</b>	CN	3	80
<b>48 g</b>	F	3.5	42
<b>48 h</b>	Cl	3	40
<b>48 i</b>	Br	3	49
<b>48 j</b>	I	3	46

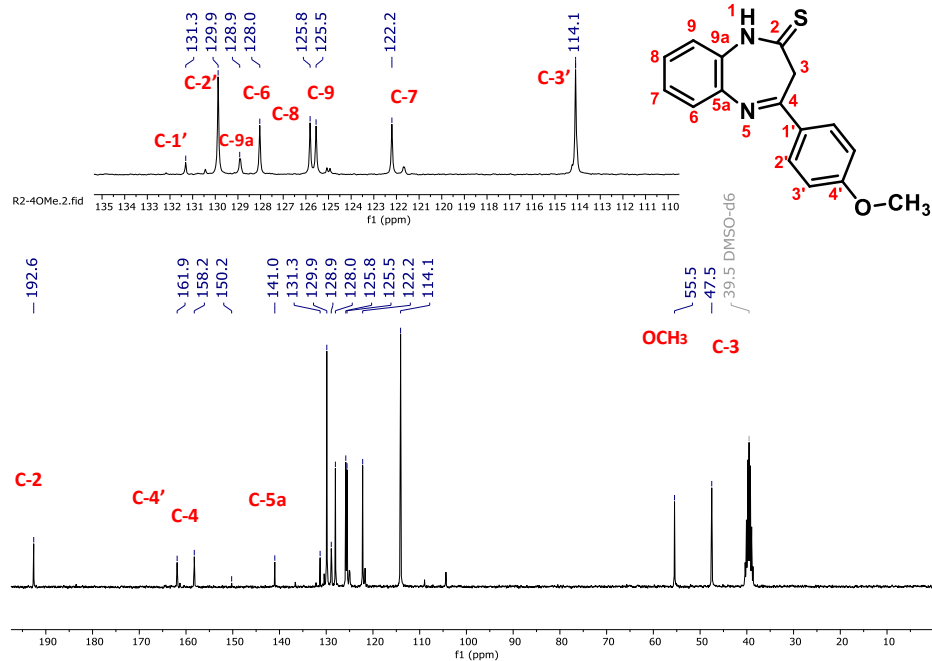
Tomando como ejemplo el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **48c** es posible observar una señal ancha sobre 12.51 ppm que indica la presencia del hidrógeno en el grupo tioamida (N-H). En la región aromática se observan dos dobletes sobre 8.17 ppm ( $J = 8.5$  Hz) y 7.10 ppm ( $J = 8.6$  Hz) que corresponden a los átomos de hidrógeno que forman al sistema AA'BB' del anillo aromático (H-11 y H-11'), mientras que de 7.45-7.24 ppm se observa una señal multiplete asignada a cuatro hidrógenos del anillo aromático fusionado de la benzodiazepina (H-6, H-7, H-8, H-9). Otra señal simple en 3.85 ppm corresponde al grupo metoxilo (-OCH<sub>3</sub>).

y finalmente, una señal simple situada sobre 3.32 ppm es atribuida a los hidrógenos del metileno de la posición tres (H-3). (Figura 16).



**Figura 16.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) del compuesto 4-(4-metoxifenil)-1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-tiona **48c**.

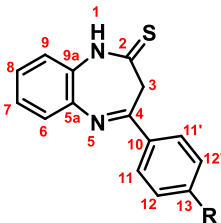
El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **48c** confirma la estructura del heterociclo de 1,5-benzodiazepin-2-tiona ya que se observa una señal sobre 192.6 ppm la cual es asignada al carbono C-2 del grupo tiocarbonilo y las señales correspondientes a los carbonos del metileno C-3 y el carbono de imina C-4 se observan en 47.5 ppm y 158.2 ppm respectivamente. El grupo de señales que corresponden a los átomos de carbono en el anillo aromático sustituyente son 161.9 ppm (C-4'), 131.3 ppm (C-1'), 129.9 ppm (C-2') y 114.1 ppm (C-3'). Las señales de carbono del anillo aromático fusionado se sitúan sobre 141.0 ppm (C-5a), 128.9 ppm (C-9a), 128.0 ppm (C-6), 125.8 ppm (C-8), 125.5 ppm (C-9) y 122.2 ppm (C-7). Finalmente, la señal presente a 55.5 ppm es asignada al grupo metoxilo (Figura 17).



**Figura 17.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) del compuesto 4-(4-metoxifenil)-1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-tiona **49c**.

En la Tabla 7 se muestran los datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  de las 4-(4-*R*-fenil)-1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-tionas **48a-j** que se sintetizaron. El espectro de IR del compuesto **48c** muestra una banda característica del enlace N-H del grupo amida en  $3200\text{ cm}^{-1}$ , así como una banda en  $3065\text{ cm}^{-1}$  que es característica de los enlaces alifáticos C-H. También, se observa una banda en  $1582\text{ cm}^{-1}$  atribuida al doble enlace carbono-nitrógeno (C=N) y en  $1246\text{ cm}^{-1}$  una banda correspondiente al enlace C=S. Finalmente, en el espectro de masas de alta resolución se encontró que la masa para el compuesto **48c** está en 283.09385.

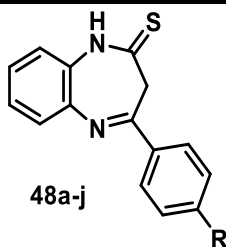
**Tabla 7.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 4-(4-R-fenil)-1,3-dihidro-2H-1,5-benzodiazepin-2-tionas **48a-j**



**48a** R= H, **48b** R= CH<sub>3</sub>, **48c** R= OCH<sub>3</sub>, **48d** R= OH, **48e** R= NO<sub>2</sub>,  
**48f** R= CN, **48g** R= F, **48h** R= Cl, **48i** R= Br, **48j** R= I

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
<b><math>\delta</math> (H) (ppm)</b>											
N-H	10.42	12.54	12.51	12.49	11.58	12.64	12.59	12.59	12.59	12.58	
H-3	4.04	3.32	3.32	3.38	3.85	3.35	3.91	3.32	3.33	3.34	
H- (6,7,8, 9)	7.73- 7.20	7.46- 7.25	7.22- 7.45	7.44- 7.21	7.45- 7.02	7.50- 7.32	7.48- 7.25	7.49- 7.26	7.50- 7.26	7.47- 7.28	
H-11, 11'	8.42	8.10	8.17	8.06	8.29	8.34	8.26	8.21	8.13	8.00	
H-12, 12'	7.93	7.36	7.10	6.91	7.67	8.02	7.48- 7.25	7.63	7.77	7.90	
<b><math>\delta</math> (C) (ppm)</b>											
C-2 (C=S)	192.7	192.7	192.6	192.7	195.1	192.4	195.0	192.5	193.0	192.5	
C-3 (CH <sub>2</sub> )	47.8	47.7	47.5	47.4	41.7	47.8	40.9	47.7	48.3	47.6	
C-4 (C=N)	158.9	158.8	158.2	158.8	157.8	157.5	158.3	157.8	158.5	158.2	
C-A	140.8, 129.0, 128.1, 126.0, 125.9, 122.2	141.4, 131.4, 128.1, 127.2, 125.8, 122.2	141.0, 128.9, 128.0, 125.8, 125.5, 122.2	141.1, 128.0, 127.4, 125.8, 125.3, 122.2	140.9, 129.3, 129.0, 126.9, 124.5, 123.9	140.5, 131.4, 126.8, 126.0, 122.3	141.0, 129.4, 128.9, 127.0, 124.2, 124.1	140.6, 131.4, 128.2, 126.3, 126.0, 122.3	141.2, 131.9, 128.7, 126.9, 126.5, 125.9	140.6, 131.4, 128.1, 126.2, 125.9, 122.3	140.6, 131.4, 128.1, 126.2, 125.9, 122.3
	C-B	136.6, 131.1, 128.7, 127.8	140.9, 133.8, 129.3, 127.9	161.9, 131.3, 129.9, 114.1	160.6, 131.3, 130.1, 115.5	147.8, 142.9, 129.7, 124.4	140.4, 132.7, 128.3, 113.4	163.4, 133.2, 131.0, 116.0	136.3, 135.3, 129.6, 128.8	136.2, 132.3, 130.4, 122.9	137.6, 135.9, 129.6, 99.3

En la Tabla 8 se resumen los resultados de IR y espectrometría de masas de alta resolución de todos los compuestos **48a-j**.

**Tabla 8.** Resultados de la espectroscopía infrarrojo (IR) y espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) de los compuestos **48a-j**.

Compuesto	R	IR (cm <sup>-1</sup> )	EMAR (m/z) [error ppm]
<b>48 a</b>	H	3174 (N-H), 3057 (C-H), 1615, 1529 (C=N), 1311 (S=C)	253.08115 [4.79 ppm]
<b>48 b</b>	CH <sub>3</sub>	3138 (N-H), 3056 (C-H), 1606, 1527 (C=N), 1253 (S=C),	267.09652 [-3.48 ppm]
<b>48 c</b>	OCH <sub>3</sub>	3200 (N-H), 3065 (C-H), 1604, 1582 (C=N), 1246 (S=C)	283.09385 [-3.07 ppm]
<b>48 d</b>	OH	3138 (N-H), 3056 (C-H), 1606, 1527 (C=N), 1253 (S=C)	268.06612 [3.39 ppm]
<b>48 e</b>	NO <sub>2</sub>	3174 (N-H), 3057 (C-H), 1615, 1529 (C=N), 1311 (S=C)	297.0572 [2.28 ppm]
<b>48 f</b>	CN	3200 (N-H), 3060 (C-H), 2232 (CN, nitrilo), 1613, 1527 (C=N), 1237 (S=C)	278.07454 [-2.35 ppm]
<b>48 g</b>	F	3190 (N-H), 3092 (C-H), 1619, 1586 (C=N), 1219 (S=C)	270.06987 [2.40 ppm]
<b>48 h</b>	Cl	3200 (N-H), 3060 (C-H), 1589, 1467 (C=N), 1238 (S=C)	287.03966 [-4.58 ppm]
<b>48 i</b>	Br	3137 (N-H), 3056 (C-H), 1579, 1525 (C=N), 1265 (S=C)	331.98161 [3.09 ppm]
<b>48 j</b>	I	3134 (N-H), 3010 (C-H), 1576, 1530 (C=N), 1253 (S=C)	378.97792 [3.51 ppm]

## 7.2 Parte Biológica

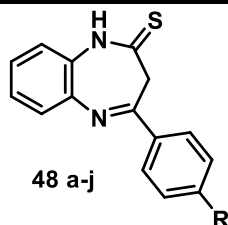
### Actividad antituberculosis de las 4-(R-fenil)-1,3-dihidro-2H-1,5-benzodiazepin-2-tionas (48a-j)

La actividad antituberculosis de los compuestos **48a-j** fue evaluada en la cepa de Mtb H37Rv mediante el ensayo de microtitulación de resazurina en placa (REMA). Se observó que los valores de MIC no fueron mejores que los del compuesto **36**. El compuesto **48e** presentó un valor de MIC de 32.25 µg/mL lo que sugiere que el grupo NO<sub>2</sub> contribuye con la actividad biológica. También, se encontró que los compuestos **48d** y **48j** tuvieron un valor de MIC de



62.5  $\mu\text{g/mL}$ . Las demás 1,5-benzodiazepin-2-tionas no mostraron tener actividad sobresaliente (Tabla 9).

**Tabla 9.** Resultados de los ensayos de REMA para evaluar la actividad antituberculosis de las 4-(R-fenil)-1,3-dihidro-2H-1,5-benzodiazepin-2-tionas **48a-j**

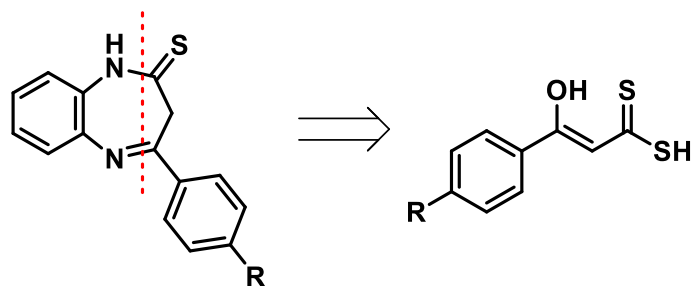


Compuesto	R	(MIC) Mtb H37Rv ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS
48a	H	500	-
48b	CH <sub>3</sub>	500	-
48c	OCH <sub>3</sub>	500	-
48d	OH	62.5	-
48e	NO <sub>2</sub>	32.25	-
48f	CN	125	0.4
48g	Br	500	0.538
48h	I	500	-
48i	Cl	500	-
48j	F	62.5	7.088
RIF	-	<b>0.06</b>	<b>&gt;16,666</b>

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria. IS: Índice de selectividad.  
RIF: Rifampicina

#### Actividad antituberculosis de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioicos (49a-j)

Debido a que se encontró que los compuestos **48a-j** no tuvieron actividad significativa contra Mtb H37Rv, se decidió remover completamente el anillo de siete miembros (Figura 18). De este análisis, se planteó la pregunta de si los ácidos precursores podrían tener actividad antituberculosis. Los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioicos **49a-j** fueron evaluados contra Mtb H37Rv tomando como criterio la similitud estructural que existe con el fármaco tioacetazona, por lo que se planteó que estos podrían tener como blanco molecular a la enzima  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-deshidratasa HadAB de *Mycobacterium tuberculosis*.

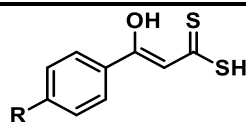


**Figura 18.** Análisis de desconexión y simplificación estructural de los compuestos **48a-j**

La actividad antituberculosis de los ácidos **49a-j** fue determinada por medio del ensayo de microtitulación de resazurina en placa (REMA). Para esto, se utilizó la cepa de Mtb H37Rv y el ensayo se realizó en un intervalo de concentraciones de 250  $\mu\text{g/mL}$  a 0.98  $\mu\text{g/mL}$  usando rifampicina (RIF) como fármaco de referencia. Se observó que el valor de MIC para el compuesto **49a** (R= H) fue de 62.5  $\mu\text{g/mL}$  y el IS fue de 3.46.

El análisis de la influencia de los grupos sustituyentes sobre el anillo de fenilo puede hacerse al comparar grupos electrodonadores, electroattractores y halogenados. En el caso de los compuestos con grupos electrodonadores, se observó que **49b** (R=CH<sub>3</sub>) no fue activo ya que su MIC fue de 250  $\mu\text{g/mL}$ . El compuesto **49c** (R=OCH<sub>3</sub>) tuvo un valor de MIC similar al de **49a**; sin embargo, el IS fue menor. La actividad antituberculosis del compuesto **49d** (R=OH) fue mayor respecto a **49a** con un valor de MIC de 15.6  $\mu\text{g/mL}$  y su IS tuvo un valor de 6.47. Por otro lado, para los compuestos con grupos sustituyentes electroattractores, se observó que la actividad del compuesto **49e** (R=NO<sub>2</sub>) fue la mejor al presentar un valor de MIC de 7.8  $\mu\text{g/mL}$ , además de poseer un IS de 32.69 que lo hizo menos tóxico. El compuesto **49f** (R=CN) mostró actividad antituberculosis similar que **49a**, pero con un IS de 0.8. Los compuestos con sustituyentes de halógeno en el anillo aromático también fueron evaluados como agentes antituberculosis. El compuesto **49g** (R=F) tuvo un valor de MIC de 62.5  $\mu\text{g/mL}$  similar al de **49a** pero valor de IS de 7.09. EL compuesto **49h** (R=Cl) tuvo un valor de MIC de 15.6  $\mu\text{g/mL}$  y una IS de 7.05 muy parecido con **49e**. Los compuestos **49i** (R=Br) y **49j** (R=I) no mostraron actividad sobresaliente ya que sus valores de MIC fueron 62.5  $\mu\text{g/mL}$  y 500  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente y sus IS fueron bajos (Tabla 10).

**Tabla 10.** Resultados de los ensayos de REMA para evaluar la actividad antituberculosis de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditióicos **49a-j**



Compuesto	R	(MIC) Mtb H37Rv (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MTT IC <sub>50</sub> , Células Vero (µg/mL)	IS
<b>49a</b>	H	62.5	-	216	3.46
<b>49b</b>	CH <sub>3</sub>	250	-	221	0.88
<b>49c</b>	OCH <sub>3</sub>	62.5	-	100	1.60
<b>49d</b>	OH	15.6	-	101	6.47
<b>49e</b>	NO <sub>2</sub>	7.8	31.25	255	32.69
<b>49f</b>	CN	62.5	-	>50	0.80
<b>49g</b>	F	62.5	-	443	7.09
<b>49h</b>	Cl	15.6	-	110	7.05
<b>49i</b>	Br	62.5	-	ND	ND
<b>49j</b>	I	500	-	381	7.762
<b>RIF</b>	-	0.06	ND	>1000	>16,666

**MIC:** Concentración Mínima Inhibitoria. **IS:** Índice de selectividad. **MBC:** Concentración mínima bactericida. **MTT IC<sub>50</sub>:** Concentración Inhibitoria 50 en el ensayo de Citotoxicidad por MTT en Células Vero. **RIF:** Rifampicina

De forma general, se sabe que la actividad biológica de un fármaco depende de su capacidad para interactuar con un determinado blanco molecular el cual puede ser alguna proteína receptora, transportadora o enzima. Dichas interacciones se dan principalmente mediante fuerzas intermoleculares no covalentes en el sitio de unión, por ejemplo: enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals o fuerzas dipolo-dipolo. Debido a lo anterior, los grupos funcionales presentes en la estructura de un fármaco jugarán un papel importante en la formación de enlaces intermoleculares con el sitio de unión.

En el caso de los compuestos **49b**, **49c** y **49d**, la actividad es mejor para aquellos cuyos sustituyentes pueden formar más enlaces o puentes de hidrógeno, ya que **49c** (R=OCH<sub>3</sub>) y **49d** (R=OH) poseen un átomo de oxígeno que funciona como aceptor. Sin embargo, el sustituyente hidroxilo de **49d** también es capaz de donar un hidrógeno, por lo que su interacción con el receptor podría ser más fuerte. Los compuestos **49e** (R=NO<sub>2</sub>) y **49f** (R=CN), tienen sustituyentes que también son capaces de formar enlaces de hidrógeno. El

grupo nitro es capaz de aceptar dos enlaces de hidrógeno<sup>58</sup>, mientras que el grupo nitrilo puede formar sólo un enlace de hidrógeno.<sup>59</sup> Lo anterior podría explicar la diferencia entre los valores de la MIC de **49e** y **49f**; sin embargo, también se deben considerar otros factores tales como el acomodo adecuado de la molécula en el sitio de acción y las interacciones que tenga con éste. Por otra parte, los átomos de halógeno también son capaces de interactuar con sitios receptores a través de enlaces electrostáticos. La interacción electrostática entre una región positiva deficiente de electrones que se genera sobre un átomo de halógeno de un determinado ligante y una región donadora de electrones con características básicas (base de Lewis) del sitio receptor es conocida como enlace de halógeno. Este efecto es mayormente observado con átomos de Cl, Br y I; sin embargo, el átomo de F muy rara vez puede formar una unión con este tipo de interacción.

El índice de selectividad (IS) de un compuesto es un parámetro que relaciona su concentración citotóxica con la concentración a la cual es activo. Para los compuestos evaluados, el IS se puede calcular dividiendo el valor de la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) en el ensayo de citotoxicidad de células VERO y el valor de concentración mínima inhibitoria (MIC). Idealmente, se espera que un compuesto activo tenga un índice de selectividad alto, que en el caso de aquellos que tengan actividad antimicrobiana deberá ser igual o mayor a 10. De los compuestos evaluados solamente **49e** tuvo un IS superior a 10, por lo que puede decirse que su toxicidad es baja. Se sabe que todo compuesto que sea evaluado como antimicrobiano deberá tener un valor de IS mayor de 10 para poder ser considerado seguro y de baja toxicidad.<sup>60</sup>

Uno de los criterios que establece Katsuno y en los cuales nos hemos basado para poder establecer que un compuesto con actividad antituberculosis es un *hit*, es que tenga un IS mayor a 10, y además de que muestre actividad contra cepas de Mtb que sean resistentes a un sólo fármaco (Rifampicina o Isoniazida).<sup>61</sup> Por lo anterior, el compuesto **49e** (MIC= 7.8

---

<sup>58</sup> Nepali, K.; Lee, H. Y.; Liou, J. P. Nitro-Group-Containing Drugs. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 2851.

<sup>59</sup> Wang, Y.; Du, Y.; Huang, N. A Survey of the Role of Nitrile Groups in Protein-Ligand Interactions. *Future Med. Chem.* **2018**, 10, 23

<sup>60</sup> Indrayanto, G.; Putra, G. S.; Suhud, F. *Validation of In-Vitro Bioassay Methods: Application in Herbal Drug Research*. In Prof. of Drug Substances, Excipients & Related Methodology; Elsevier Inc., **2020**; pp 273–307.

<sup>61</sup> Katsuno K, et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov.* **2015**; 14, 751–758

µg/mL, IS= 32.69) al ser el que mejor actividad presentó, fue elegido para ser evaluado frente a las cepas de Mtb H37Ra (no virulenta) y la cepa Mtb 209 (aislado clínico) resistente a rifampicina. El ensayo se hizo usando diluciones de 250 µg/mL a 0.98 µg/mL y los resultados son mostrados en la Tabla 11. Se encontró que el compuesto **49e** fue activo contra la cepa Mtb 209 resistente a rifampicina con un valor de MIC de 15.6 µg/mL. Para cepas no virulentas, se espera que la MIC sea más baja que con cepas virulentas; sin embargo, la MIC encontrada para Mtb H37Ra fue de 7.8 µg/mL.

**Tabla 11.** Ensayo REMA del compuesto **49e** contra las cepas de Mtb H37Ra (no virulenta), 209 (resistente a rifampicina). H37Rv ATCC 27294 como cepa de referencia.

Compuesto	MIC <sub>100</sub> (µg/mL)	MIC <sub>100</sub> (µg/mL)	MIC <sub>100</sub> (µg/mL)
	Mtb H37Rv	Mtb H37Ra	Mtb 209 resistente
<b>49e</b>	7.8	7.8	15.6
<b>RIF</b>	0.06	0.008	>64

**MIC.** Concentración Mínima Inhibitoria.

Aunque el compuesto **49e** tuvo un perfil toxicológico seguro (IS= 32.69), el valor de su actividad antituberculosis (MIC= 7.8 µg/mL o 32.33 µM) aun no alcanza el establecido por los criterios de Katsuno,<sup>61</sup> el cual debe ser de una MIC menor a 10 µM para poder ser considerado como un *hit*. El compuesto **49e** puede ser considerado para un proceso de optimización y con esto alcanzar o superar el valor requerido de MIC necesaria para la generación de nuevos *hits* antituberculosis.

### 7.3 Propiedades ADMET

El perfil farmacocinético de un compuesto con actividad biológica está definido por sus propiedades de absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicológicas (ADMET). Las propiedades ADMET que pueden medirse *in vitro* son principalmente la solubilidad acuosa, el coeficiente de partición *n*-octanol/agua (logP), pKa, permeabilidad, inhibición del gen hERG (human ether-a-go-go related gene), inhibición de las isoformas del citocromo P450 (CYPs), entre otras. Con la finalidad de reducir los tiempos requeridos en

los ensayos *in vitro* para determinar todas estas propiedades, se puede recurrir a las predicciones *in silico* de las mismas. Estos métodos relacionan cuantitativamente alguna propiedad fisicoquímica con un descriptor molecular mediante herramientas de quimioinformática.

Actualmente existen herramientas confiables de acceso libre con las que se pueden predecir diferentes propiedades que definen el perfil ADMET de un compuesto activo. En el caso del proceso de absorción de un compuesto, se ha establecido que esta será favorecida si se cumplen los “criterios de Lipinski”. Estos criterios establecen que las propiedades fisicoquímicas tales como el peso molecular (PM), el coeficiente de partición (logP), el número de átomos donadores (HBD) y aceptores (HBA) de puentes de hidrógeno, deberán cumplir con los siguientes requerimientos para poder tener buena biodisponibilidad por vía oral:<sup>62</sup>

- No tener más de 5 átomos donadores de puentes de hidrógeno
- No tener más de 10 átomos aceptores de puentes de hidrógeno
- Peso molecular por debajo de 500
- Un valor de logP no superior de 5

Por otra parte, Veber y Egan establecen que para que un compuesto tenga buena absorción por vía oral es mejor considerar que:<sup>63</sup>

- El número de enlaces rotables (RB) sea menor a 10
- El valor del área polar (tPSA) sea menor de 140 Å

Se observó que ninguno de los compuestos evaluados **49a-j** viola los criterios de Lipinski, Veber y Egan (Tabla 12), por lo que se puede suponer que en general tendrían buena absorción por vía oral.

Por otra parte, uno de los requerimientos esenciales en la selección de compuestos *hits* es que estos no posean grupos altamente reactivos en su estructura o en su sitio farmacofórico. Lo

---

<sup>62</sup>Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3–26.

<sup>63</sup>Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615–2623.

anterior se puede validar mediante la identificación de *hits* promiscuos que tengan falta de especificidad con los blancos moleculares. Por lo tanto, un PAIN (Pan-Assay Interference Compound) es un compuesto que puede interferir con la actividad biológica causando un falso positivo.<sup>64</sup> Estos compuestos pueden ser reactivos bajo las condiciones del ensayo biológico mediante procesos de óxido-reducción, quelación, modificaciones covalentes o degradación. La presencia de determinados grupos funcionales o fragmentos dentro de un compuesto puede ser causa de interferencias en los ensayos biológicos. Es posible poder establecer si algún compuesto es un posible PAIN mediante el uso de herramientas *in silico*.<sup>65</sup> Se determinó si los compuestos **49a-j** son o contienen PAINS, y se encontró que ninguno de estos representa un falso positivo en los ensayos de actividad antituberculosis (Tabla 12).

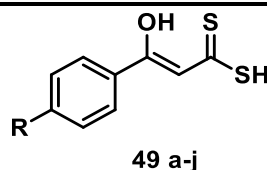
La actividad de la glucoproteína-P es importante durante el proceso de absorción y distribución de un fármaco hacia el interior de las células. Esta proteína está implicada en los mecanismos de transporte hacia los órganos principalmente en el intestino y cerebro. La glucoproteína-P, se encarga de la extracción de compuestos extraños del interior de la célula. Este mecanismo limita el paso de muchos fármacos que llegan por vía oral y es responsable de reducir la biodisponibilidad.<sup>66</sup> Los fármacos que sean sustratos de la glucoproteína-P podrían tener complicaciones en su permeabilidad y biodisponibilidad. Este parámetro pudo ser calculado para los compuestos **49a-j** y se encontró que ninguno de ellos es sustrato de la glucoproteína-P (Tabla 12).

---

<sup>64</sup>Baell, J.; Walters, M. A. Chemical Con Artists Foil Drug Discovery. *Nature*, **2014**, 513, 481–483.

<sup>65</sup>Baell, J. B.; Nissink, W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017-Utility and Limitations. *ACS Chem. Biol.* **2018**, 13, 36–44.

<sup>66</sup>Gleeson, M. P. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 817–834.

**Tabla 12.** Resultados de la predicción teórica de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos **49a-j**


Comp	R	PM	logP	logS	tPSA	RB	HBD	HBA	PAINS	Sustrato Glucoprot eína-P
49a	H	196.29	2.42	-2.67	72.22	2	2	2	NO	No
49b	CH <sub>3</sub>	210.32	2.78	-2.96	72.22	2	2	2	NO	No
49c	OC H <sub>3</sub>	226.32	2.39	-2.74	81.45	3	2	3	NO	No
49d	OH	212.29	2.06	-2.53	92.45	2	3	3	NO	No
49e	NO <sub>2</sub>	241.29	2.25	-2.76	113.76	3	2	4	NO	No
49f	CN	221.3	2.13	-2.63	96.01	2	2	3	NO	No
49g	F	214.28	2.52	-2.85	72.22	2	2	2	NO	No
49h	Cl	230.73	3.04	-3.28	72.22	2	2	2	NO	No
49i	Br	275.19	3.11	-3.6	72.22	2	2	2	NO	No
49j	I	322.19	3.07	-3.86	72.22	2	2	2	NO	No

**PM.** Peso Molecular. **logP.** Coeficiente de Partición n-octanol/agua. **logS.** Solubilidad. **tPSA.** Superficie polar. **RB.** Número de enlaces rotables. **HBD.** Número de átomos donadores de puentes de hidrógeno. **HBA.** Número de átomos aceptores de puentes de hidrógeno. **PAINS.** Falsos positivos (Pan-assay interference compounds).

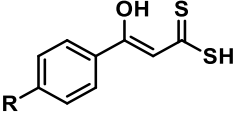
Los citocromos P450 son una familia grande de proteínas hepáticas que catalizan el metabolismo de Fase 1 de un amplio número de moléculas tanto endógenas como exógenas y están implicadas también en los efectos tóxicos de muchas de ellas. Existen más de 50 diferentes formas del citocromo P450 (CYP) agrupadas principalmente en las familias CYP1-CYP4, las cuales también se dividen en subfamilias que albergan diferentes formas enzimáticas. La mayoría de los fármacos son metabolizados principalmente por las enzimas CYP3A, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2, CYP2C19; además se sabe que la mayoría de las interacciones fármaco-fármaco ocurren sobre algunas de estas enzimas. Es por esta razón que la interacción de un fármaco con alguna de las enzimas CYP 450 podría repercutir en el



metabolismo de otro, por lo que el riesgo de presentar efectos tóxicos y reacciones adversas aumenta.

Se llevó a cabo la predicción *in silico* de las interacciones entre enzimas del CYP 450 y los compuestos sintetizados **49a-j**, y los resultados mostraron que todos los compuestos pueden inhibir la isoforma CYP1A2, mientras que solamente **49c**, **49i**, y **49j** inhiben a la isoforma CYP2C19. También, la isoforma CYP2C9 puede ser inhibida por los compuestos **49h**, **49i** y **49j**. La isoforma CYP3A4 podría ser inhibida por los compuestos **49d** y **49f** y finalmente ningún compuesto es inhibidor de la isoforma CYP2D6 (Tabla 13). Se sabe que la familia CYP3 es la que más participa en el metabolismo de fármacos y que la isoforma CYP3A4 es la más importante de estas, debido a que su abundancia en el hígado es casi el 30% de todas las enzimas del CYP y tiene un amplio número de sustratos. Por el contrario, la isoforma CYP1A2 solamente representa el 10% de la actividad metabólica de los fármacos usados actualmente. Las demás isoformas evaluadas tienen menor porcentaje de actividad metabólica que CYP3A4. Con estos resultados puede suponerse los posibles fármacos que tendrían interacción con los compuestos **49a-j**.

**Tabla 13.** Predicción de la interacción con las isoformas del CYP450 de los compuestos **49a-j**



49 a-j

Compuesto	R	CYP 1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
<b>49a</b>	H	+	-	-	-	-
<b>49b</b>	CH <sub>3</sub>	+	-	-	-	-
<b>49c</b>	OCH <sub>3</sub>	+	+	-	-	-
<b>49d</b>	OH	+	-	-	-	+
<b>49e</b>	NO <sub>2</sub>	+	-	-	-	-
<b>49f</b>	CN	+	-	-	-	+
<b>49g</b>	F	+	-	-	-	-
<b>49h</b>	Cl	+	-	+	-	-
<b>49i</b>	Br	+	+	+	-	-
<b>49j</b>	I	+	+	+	-	-

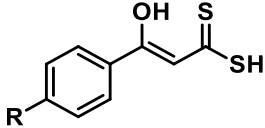
Por otra parte, para la determinación *in silico* de la toxicidad de los compuestos **49a-j**, se realizaron las predicciones de la inhibición del canal de potasio hERG, mutagenicidad (AMES), toxicidad mitocondrial (MMP), hepatotoxicidad (HepG2) e inducción al daño hepático (DILI).

La proteína del canal de potasio hERG está implicada en el mantenimiento de la actividad eléctrica del corazón, sin embargo, esta enzima es capaz de unirse a varios tipos de moléculas lipofílicas, por lo que es importante determinar si un fármaco podría ser sustrato y causar su inhibición. Los fármacos capaces de inhibir al hERG podrían estar relacionados severos con efectos adversos cardíacos. Con los resultados de la predicción *in silico*, se determinó que ninguno de los compuestos **49a-j** es inhibidor de hERG.

Por otro lado, los efectos mutagénicos de fármacos en fases desarrollo pueden evaluarse con el ensayo de AMES (AMES test), el cual puede ser simulado *in silico*. Se pudo predecir que sólo el compuesto **49e** podría tener efectos mutagénicos. La toxicidad mitocondrial es evaluada con el cambio que genera un fármaco en el potencial de membrana mitocondrial (MMP). La predicción *in silico* indicó que ninguno de los compuestos sintetizados podría causar toxicidad mitocondrial (MMP) la cual está relacionada a efectos cancerígenos, neurodegenerativos y cardiovasculares.

Finalmente, el efecto de hepatotoxicidad se determina con los ensayos sobre diferentes líneas celulares hepáticas, una de estas es la HepG2. Con los cálculos *in silico*, se encontró que los compuestos **49e**, **49f** y **49h** son los únicos que podrían causar hepatotoxicidad. Sin embargo, la mayoría de los compuestos sintetizados tienen alta posibilidad de inducir el daño hepático (DILI) (Tabla 14).

**Tabla 14.** Toxicidad teórica de los compuestos **49a-j**



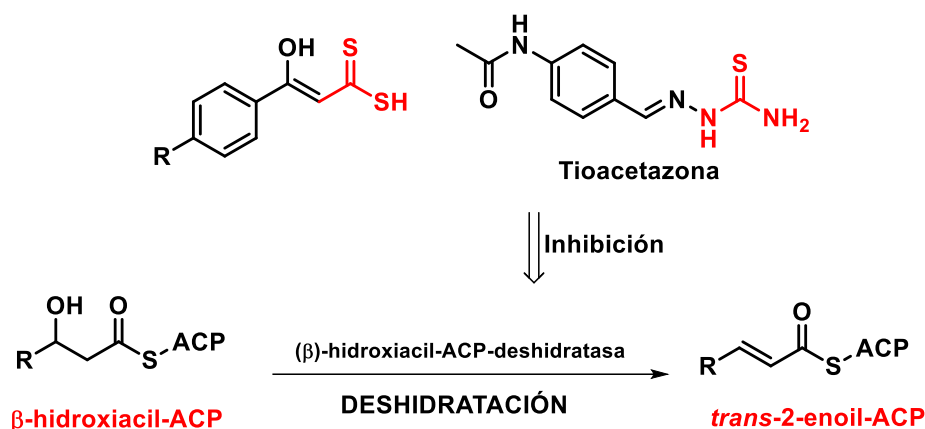
**49 a-j**

Compuesto	R	AMES	hERG	MMP	HepG2	DILI
<b>49a</b>	H	-	-	-	-	+
<b>49b</b>	CH <sub>3</sub>	-	-	-	-	+
<b>49c</b>	OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-
<b>49d</b>	OH	-	-	-	-	-
<b>49e</b>	NO <sub>2</sub>	+	-	-	+	+
<b>49f</b>	CN	-	-	-	+	+
<b>49g</b>	F	-	-	-	-	+
<b>49h</b>	Cl	-	-	-	+	+
<b>49i</b>	Br	-	-	-	-	+
<b>49j</b>	I	-	-	-	-	+

AMES: Mutagenicidad. hERG: Efecto de cardiotoxicidad. MMP: Toxicidad mitocondrial. DILI: Inducción de daño hepático

#### 7.4 Acoplamiento Molecular

Los resultados de actividad antituberculosis mostrados por los compuestos **49a-j** se pueden sustentar con la similitud estructural que hay entre estos compuestos y la tioacetazona. La tioacetazona es un fármaco antituberculosis que actúa mediante la inhibición de la enzima ( $\beta$ )-hidroxiacil-ACP-deshidratasa (HadAB) de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>18</sup> impidiendo el paso de deshidratación del sustrato  $\beta$ -hidroxiacil-ACP dentro del ciclo catalítico de la sintasa de ácidos grasos FAS-II, bloqueando la síntesis de los ácidos micólicos que conforman a la pared celular (Esquema 13). Basados en lo anterior se realizó un estudio de acoplamiento molecular de los compuestos sintetizados utilizando a la enzima HadAB cristalizada encontrada en la base de datos del Protein Data Bank con código PDB 4RLU.



**Esquema 13.** Posible relación estructural entre los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hiroxiprop-2-enoditioicos y  $\beta$ -hidroxiacil-ACP sustrato de la enzima HadAB/HadBC de *Mycobacterium tuberculosis*.

Para poder llevar a cabo estos experimentos computacionales, se tomó en cuenta que los compuestos **49a-j** pueden adoptar cualquiera de sus formas tautoméricas. Como se mencionó anteriormente, las observaciones hechas por los experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se ha establecido que la forma predominante es la enólica. Sin embargo, teniendo en cuenta la posibilidad de un cambio en el equilibrio tautomérico inducido por el medio biológico, se decidió hacer el estudio de acoplamiento molecular con ambas formas de cada compuesto.

La validación del estudio de acoplamiento se realizó utilizando la enzima cristalizada HadAB de código PDB 4RLU en complejo con el inhibidor 2',4,4-trihidroxichalcona (HCC). Para llevar a cabo la validación del sistema se calculó el acoplamiento usando este compuesto de referencia y se encontró un valor de RMSD de 3.0 Å. Con las condiciones del protocolo el compuesto de referencia HCC mostró un valor de energía libre de unión de -8.32 kcal/mol, la cual es un valor muy cercano al reportado.<sup>67</sup>

Una vez establecidas las condiciones del protocolo, se llevó a cabo el cálculo de acoplamiento para los compuestos **49a-j**. El estudio de acoplamiento molecular fue hecho sobre el sitio activo del receptor en la subunidad A. Para poder hacer una predicción más precisa, los

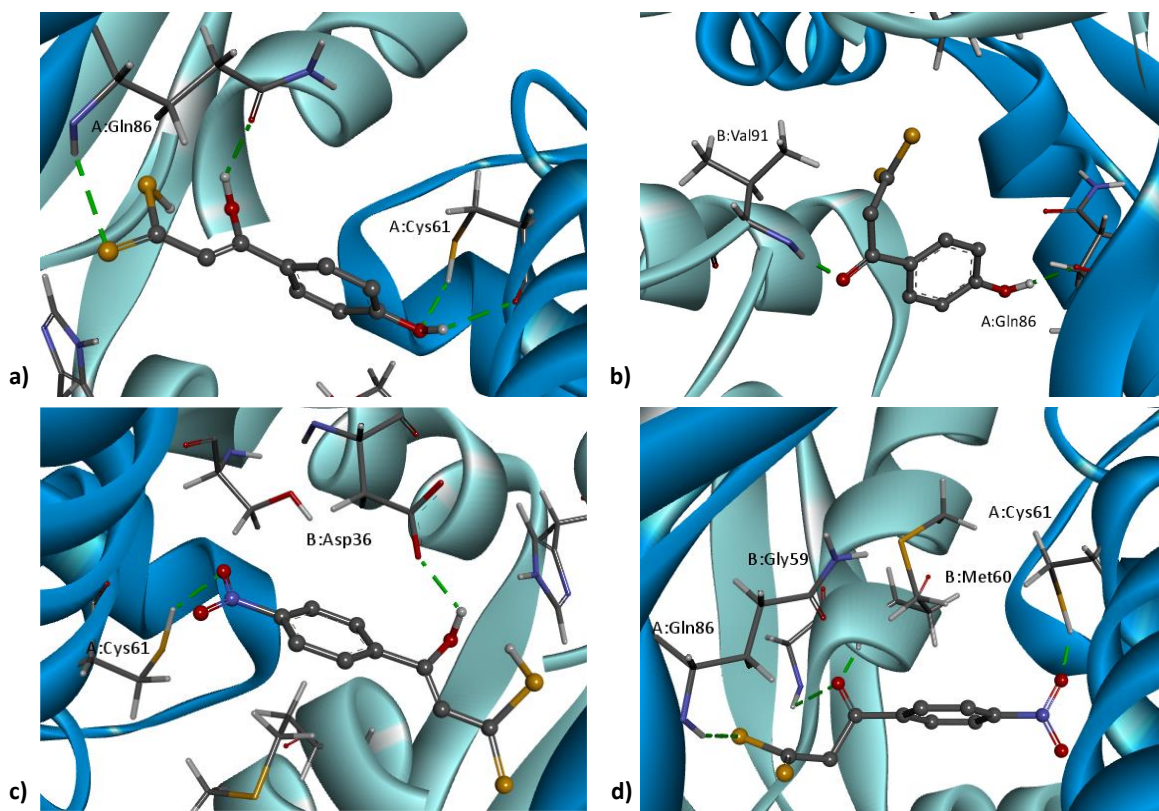
<sup>67</sup>Dong, Y.; *et al.* Molecular Basis for the Inhibition of  $\beta$ -Hydroxyacyl-ACP Dehydratase HadAB Complex from *Mycobacterium Tuberculosis* by Flavonoid Inhibitors. *Protein Cell*, **2015**, 6, 504–517.

cálculos de energía libre y afinidad fueron hechos tanto en las formas enólica como ceto de los ácidos **49a-j**. La Tabla 15 resume los resultados de energía libre ( $\Delta G$ ).

**Tabla 15.** Energía libre de unión ( $\Delta G$ ) calculada del docking molecular de las dos formas tautoméricas de los compuestos **49a-j** y la la enzima HadAB

Compuesto	R	$\Delta G$ (kcal/mol)	
		Forma ceto	Forma enólica
<b>49a</b>	H	-5,96	-5,74
<b>49b</b>	CH <sub>3</sub>	-6,36	-6,62
<b>49c</b>	OCH <sub>3</sub>	-5,78	-5,91
<b>49d</b>	OH	-6,02	-5,91
<b>49e</b>	NO <sub>2</sub>	-6,03	-5,45
<b>49f</b>	CN	-7,24	-6,55
<b>49g</b>	F	-5,9	-6,1
<b>49h</b>	Cl	-6,54	-6,72
<b>49i</b>	Br	-6,69	-6,52
<b>49j</b>	I	-6,61	-6,94
<b>HCC</b>	-	-8.32	

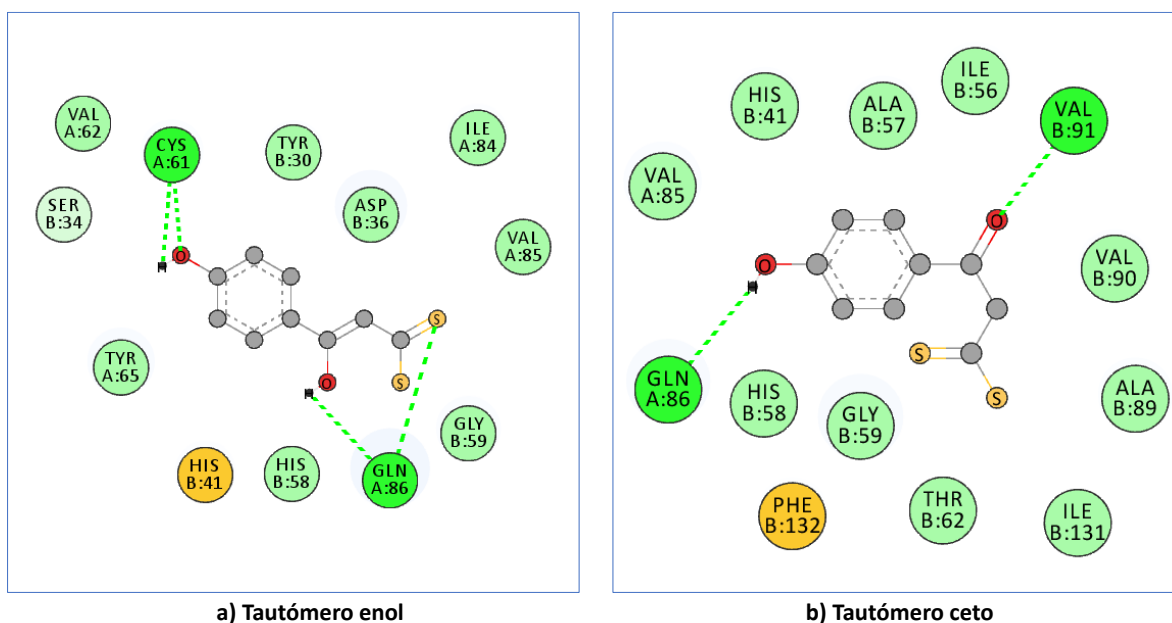
Los resultados muestran los valores de energía libre de unión ( $\Delta G$ ) más bajo de los compuestos **49a-j** en cada una de sus formas tautoméricas. Se encontró que mientras los compuestos **49b**, **49f**, **49h**, **49i** y **49j** tienen los mejores valores de energía libre de unión ( $\Delta G$ ) en ambas formas tautoméricas, sólo los compuestos **49d** y **49e** muestran tener interacciones con el residuo de A:Cys61 a través de puentes de hidrógeno. El compuesto **49d** solamente lo hace mediante su forma enólica (Figura 19a y 19b), mientras que el compuesto **49e** lo hace en sus dos formas tautoméricas (Figura 19c y 19d).



**Figura 19.** a) Conformación adoptada por la forma enólica del compuesto **49d**, se muestra la interacción mediante puentes de hidrógeno entre el grupo OH y el residuo de A:Cys61. b) Conformación adoptada por la forma ceto del compuesto **49d**, se observa que no hay interacción por puentes de hidrógeno con el residuo de A:Cys61. c) Conformación adoptada por la forma enólica del compuesto **49e** y la interacción con el residuo de A:Cys61. d) Conformación adoptada por la forma ceto del compuesto **49e** y la interacción por puentes de hidrógeno con A:Cys61

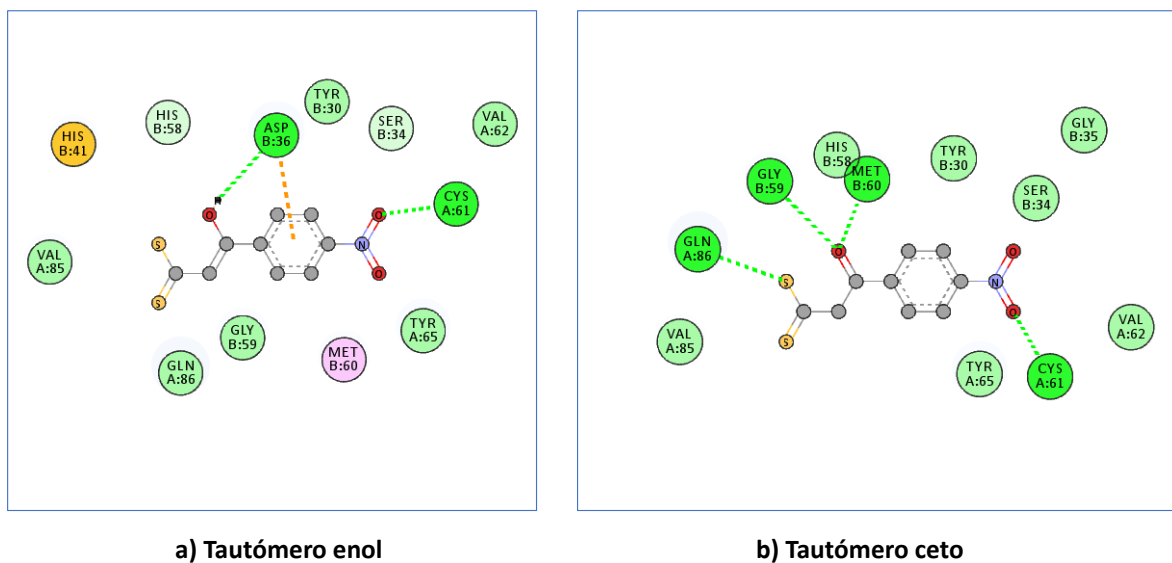
En todos los casos, la interacción con A:Cys61 es mediante el sustituyente de la posición 4 del anillo aromático. Los valores de energía libre del tautómero ceto de **49d** ( $\Delta G_{\text{ceto}} = -6.02$  kcal/mol) y **49e** ( $\Delta G_{\text{ceto}} = -6.03$  kcal/mol) son similares, y poco difieren de las energías encontradas para los tautómeros enólicos **49d** ( $\Delta G_{\text{enol}} = -5.91$  kcal/mol) y **49e** ( $\Delta G_{\text{enol}} = -5.45$  kcal/mol). Esta diferencia de energía puede deberse a la capacidad de formar puentes de hidrógeno de cada compuesto. El tautómero enol de **49d** forma cuatro puentes de hidrógeno, dos con el residuo de A:Cys61 por medio del sustituyente OH del anillo aromático y dos con el residuo de A:Gln86 a través del grupo OH enólico y el grupo tiocarbonilo (Figura 20a). El tautómero ceto de **49d** forma dos puentes de hidrógeno con la enzima, uno a través del grupo

ceto y el residuo de B:Val91 y otro mediante el grupo OH del anillo aromático y el residuo de A:Gln86 (Figura 20b).



**Figura 20.** Enlaces de hidrógeno formados entre los tautómeros enol (a) y ceto (b) del compuesto **49d** con la enzima HadAB.

Por otra parte, el tautómero enol del compuesto **49e** forma dos enlaces de hidrógeno, uno mediante el grupo sustituyente  $\text{NO}_2$  del anillo aromático y el residuo A:Cys61, y uno más por medio del grupo OH enólico y el residuo de B:Asp36 (Figura 21a). El tautómero ceto del compuesto **49e** forma cuatro puentes de hidrógeno, uno con el residuo de A:Gln86 y el grupo tiol (SH), dos a través de los residuos B:Gly59 y B:Met60 con el grupo carbonilo, y uno más con la A:Cys61 y el grupo sustituyente nitro  $\text{NO}_2$  del anillo aromático (Figura 21b).



**Figura 21.** Enlaces de hidrógeno formados entre los tautómeros enol (a) y ceto (b) del compuesto **49e** con la enzima HadAB.

Los resultados del acoplamiento molecular ayudan a sustentar que la actividad antituberculosis del compuesto **49e** es mejor a la de **49d**. Esto se explica al observar que **49e** puede formar puentes de hidrógeno con el residuo de A:Cys61 en ambas formas tautoméricas mientras que **49d** solamente hace en su forma enólica. Con esto último puede suponer que la presencia de sustituyentes en la posición 4 del anillo aromático de esta clase de compuestos es importante en la actividad antituberculosis siempre y cuando estos también propicien la formación de puentes de hidrógeno con la A:Cys61 de la enzima HadAB.



## 8. CONCLUSIONES

---

- La síntesis de las 4-(4-R-fenil)-1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-tionas **48a-j** fue realizada basándose en la modificación D del compuesto **36**. Se comprobó que la inserción de un sustituyente aromático en la posición C-4 del anillo de siete miembros no mejora la actividad antituberculosis de su predecesor **36**. El alcance de este trabajo no permitió conocer si las modificaciones A, B y C sobre el compuesto **36** generan compuestos que inhiban mejor el crecimiento de Mtb H37Rv, sin embargo, sí se pudo conocer más acerca de los requerimientos estructurales para mantener la actividad. Por otro lado, la ruta sintética basada en la ciclación y condensación de ácidos 3-hidroxiopropenditioicos con *orto*-fenilendiamina es un método rápido para la preparación de 1,3-dihidro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2-tionas.
- Los ácidos 3-hidroxiopropenditioicos **49a-j** además de ser precursores sintéticos de las 1,5-benzodiazepin-2-tionas, mostraron tener actividad significativa contra Mtb H37Rv. De los ácidos **49a-j** que se sintetizaron, los compuestos **49d** (R= OH, MIC= 15.6 µg/mL) y **49e** (R= NO<sub>2</sub>, MIC= 7.8 µg/mL) fueron los de mejor actividad frente a la cepa de Mtb H37Rv. Estos resultados apuntan a que un requerimiento estructural para la actividad antituberculosis de esta clase de compuestos es la presencia de grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno.
- El valor de IC<sub>50</sub> en el ensayo de citotoxicidad en células VERO del compuesto **49e** es más de 10 veces mayor que su valor de MIC. Este compuesto tiene baja toxicidad lo cual se refleja por su índice de selectividad (IS= 32.69), sin embargo, el valor de la MIC (7.8 µg/mL o 32.33 µM) aun no es el óptimo de acuerdo con los criterios que Katsuno<sup>58</sup> establece para la selección de un compuesto *hit* con actividad antituberculosis (MIC <10 µM). La potencia del compuesto **49e** frente a la cepa de Mtb H37Ra (no virulenta) fue similar (MIC= 7.8 µg/mL) que en el ensayo frente a Mtb H37Rv, mientras que la actividad frente a la cepa resistente Mtb209 (aislado clínico) fue determinada con una MIC de 15.6 µg/mL. Estos resultados pueden sugerir que la actividad antituberculosis de este tipo de compuestos se lleve a cabo por un mecanismo de acción diferente al de rifampicina.

- Con el cálculo teórico de las propiedades ADME de los compuestos **49a-j** se conoce un posible perfil farmacocinético. La absorción por vía oral para estos compuestos podría ser buena, lo cual se refleja con los valores de las propiedades fisicoquímicas como logP, logS, tPSA así como las los números de donadores (HBD) y aceptores (HBA) de enlaces de hidrógeno. En cada uno de los valores calculados para los compuestos sintetizados no se observó alguna violación a los criterios de Lipinski, Veber y Egan.
- Ninguna estructura de los compuestos **49a-j** es capaz de interferir con la actividad antituberculosis observada, por lo tanto, ninguno de estos se considera que sea un PAIN. Esta característica permite continuar con la investigación y optimización de compuestos que posean el núcleo estructural de los ácidos 4-(R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enodíticos.
- De acuerdo con los resultados en la predicción de la inhibición del metabolismo llevado a cabo por las isoformas CYP3A, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2, CYP2C19, los compuestos **49a-j** podrían tener interacciones farmacológicas principalmente con aquellos metabolizados por CYP1A2 la cual no es la principal isoenzima. A excepción de CYP2D6, las demás isoformas evaluadas tienen la posibilidad de ser inhibidas por algunos compuestos de esta serie. Por otro lado, se estableció el perfil toxicológico de cada uno de los compuestos **49a-j** encontrando que en su mayoría no son posibles causantes de efectos mutagénicos, cardiotoxicos y citotóxicos. Sin embargo, la mayoría podrían inducir al daño hepático. Con los datos anteriores es necesario considerar la optimización de las estructuras con la finalidad de reducir los posibles efectos tóxicos sin comprometer la actividad antituberculosis.
- El estudio de acoplamiento molecular de los compuestos **49a-j** con la enzima ( $\beta$ )-hidroxiacil-ACP-deshidratasa (HadAB) ayudó a establecer que para los compuestos con mejor actividad, existe interacción con el residuo de A:Cys61 para las formas enólicas de **49d** y **49e** y únicamente de **49e** en su forma ceto. De esta observación se puede decir que la actividad de **49e** fue mejor gracias a su capacidad de interactuar mediante sus dos formas tautoméricas con A:Cys61.
- Finalmente se puede decir que estas observaciones aún son muy tempranas para poder asegurarse de que el compuesto **49e** puede tener como blanco molecular a la enzima

HadAB, sin embargo, este trabajo abre un nuevo camino para el descubrimiento de nuevas estructuras que hasta la fecha no habían sido exploradas como posibles compuesto antituberculosis. Desde el punto de vista sintético, los compuestos **49a-j**, cumplen con los requerimientos para un compuesto *hit* o *líder*, ya que no se involucran demasiados pasos en su preparación. Finalmente, la optimización de las estructuras **49d** y **49e** representa un reto importante para el mejoramiento de sus perfiles toxicológicos y de la actividad antituberculosis.

## 9. PARTE EXPERIMENTAL

---

### 9.1 Información general

#### Reactivos y disolventes.

Los reactivos comerciales que se utilizaron fueron provistos por Sigma-Aldrich, y analizados por cromatografía en capa fina (TLC) y en algunos casos purificados.

Todos los disolventes fueron secados y posteriormente destilados previo a su uso mediante las metodologías convencionales. El AcOEt fue secado usando  $\text{CaCl}_2$  y posteriormente fue destilado. En el caso del hexano se utilizó KOH como desecante y después fue destilado. El THF y Xileno fueron secados mediante agitación con sodio metálico y benzofenona, y posteriormente fueron destilados, ambos disolventes se colectaban en un recipiente con malla molecular.

#### Monitoreo de Reacciones

El monitoreo de las reacciones se hizo mediante TLC usando cromatoplasmas de sílica gel con indicador y usando como agente revelador una lámpara de luz UV.

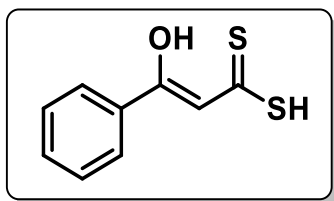
#### Puntos de fusión y espectroscopía

La determinación de los puntos de fusión se hizo en un aparato Mel-Temp II a través de capilar abierto y no fueron corregidos.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  se realizaron en los espectrómetros de Resonancia Magnética Nuclear JEOL-Eclipse y Bruker Fourier-300 a 300 MHz y 75 MHz, utilizando cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) y dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO-d}_6$ ) deuterados. Los espectros de IR fueron obtenidos en un equipo espectrómetro Bruker FTIR Tensor 27 mediante ATR. Los análisis de espectrometría de masas EM fueron realizados en un equipo JMS-T100LC mediante la técnica de DART.

## 9.2 Procedimiento general para la síntesis de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioicos (49a-j). Procedimiento con NaH y THF.

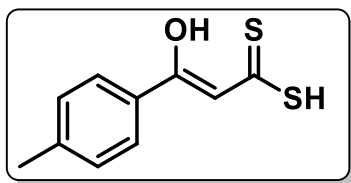
En un matraz de fondo redondo y de dos bocas, enfriado en baño de hielo y provisto de agitación magnética, se suspendió NaH (3.0 equivalentes) en THF previamente secado. A esta suspensión le fue adicionada una solución en THF de la acetofenona correspondiente **50a-j** (1.0 equivalente) y fue agitada en baño de hielo durante 30 minutos. Después, a la mezcla de reacción le fue adicionada una solución de CS<sub>2</sub> (1.5 equivalentes) en THF anhidro y se agitó a temperatura ambiente durante 12-15 horas. Una vez concluido este tiempo la mezcla de reacción fue agregada a un matraz con hielo. Se realizó una extracción por triplicado con acetato de etilo colectando la fase acuosa. Posteriormente la fase acuosa fue llevada a pH= 2 con solución de ácido sulfúrico 2.0 N. El producto precipitado fue filtrado al vacío, y posteriormente el sólido obtenido fue lavado con mezcla de hexano y acetato de etilo (2:1).



### Ácido 3-fenil-3-hidroxi-propen-2-enoditioico (49a)

Acetofenona: 0.4806 g (0.004 mol). Sólido rojo, rendimiento 0.5339 g (68%). P.f: 89-91°C (lit.<sup>9</sup> m.p: 86-89 °C). **IR (ATR)**

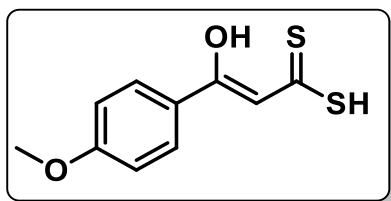
**v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3061, 2917, 1592, 1228. **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 5.43 (s, 1H, H-9), 6.96 (s, 1H, H-2), 7.62-7.43 (m, 3H, H-6, H-6', H-7), 7.84-7.95 (m, 2H, H-5, H-5'), 15.31 (s, 1H, H-8). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 107.6 (C-2), 128.0 (C-6, C-6'), 128.6 (C-5, C-5'), 131.7 (C-7), 133.5 (C-4), 173.2 (C-3), 210.4 (C-1). **EMAR (DART):** calculada para C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>OS<sub>2</sub> [M+1]: 197.00948, encontrada [M+1]: 197.00898.



**Ácido 3-(4-metilfenil)-3-hidroxi-2-propeno-1-tioico (49b)**

4-metilacetofenona: 0.5367 g (0.004 mol). Sólido rojo, rendimiento 0.7234 g (86%). P.f: 84-86°C (lit.<sup>9</sup> m.p: 85-86

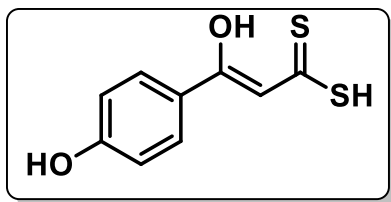
°C). **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3100, 2914, 1603, 1209. **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 2.39 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 5.36 (s, 1H, H-9), 6.90 (s, 1H, H-2), 7.15 (d,  $J = 8.7$ , 2H, H-6, H-6'), 7.90 (d,  $J = 8.4$ , 2H, H-5, H-5'), 15.36 (s, 1H, H-8). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 21.9 (-CH<sub>3</sub>), 105.2 (C-2), 127.6 (C-5, C-5'), 130.0 (C-6, C-6'), 130.6 (C-4), 144.7 (C-7), 174.8 (C-3), 209.3 (C-1). **EMAR (DART):** calculada para C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>OS<sub>2</sub> [M+1]: 211.02513, encontrada [M+1]: 211.02588.



**Ácido 3-(4-metoxifenil)-3-hidroxi-2-propeno-1-tioico (49c)**

4-metoxiacetofenona: 0.6021 g (0.0040 mol). Sólido rojo, rendimiento 0.7621 g (84%). P.f: 100-102°C (lit.<sup>10</sup> m.p:

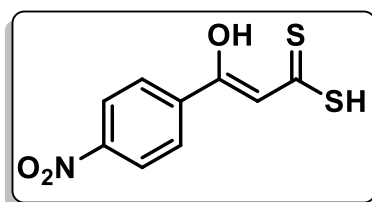
98°C). **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3300, 2800, 1665, 1596, 1230. **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 3.88 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5.43 (s, 1H, H-9), 6.96 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, H-6, H-6'), 7.39 (s, 1H, H-2), 7.91 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, H-5, H-5'), 15.48 (s, 1H, H-8). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 55.5 (-OCH<sub>3</sub>), 107.9 (C-2), 127.8 (C-5, C-5'), 130.0 (C-6, C6'), 132.2 (C-4), 162.3 (C-7), 170.0 (C-3), 203.5 (C-1). **EMAR (DART):** calculada para C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> [M+1]:  $m/z$  227.02005, encontrada [M+1]:  $m/z$  227.01915.



**Ácido 3-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-2-propeno-1-tioico (49d)**

4-hidroxiacetofenona: 0.5449 g (0.0040 mol). Sólido rojo, rendimiento 0.5522 g (65%). P.f: 112-114°C. **IR (ATR)**

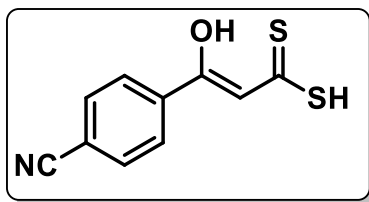
$\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3357, 2917, 2850, 1601, 1567, 1220. **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 5.42 (s, 1H, H-9), 6.62 (s, 1H, H-2), 7.11 (d,  $J = 8.4$ , 2H, H-6, H-6'), 7.76 (d,  $J = 8.7$ , 2H, H-5, H-5'), 10.31 (bs, 1H, -OH), 15.40 (s, 1H, H-8). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 112.5 (C-2), 115.3 (C-6, C-6'), 127.6 (C-5, C-5'), 127.9 (C-4), 159.2 (C-7), 176.0 (C-3), 203.4 (C-1). **EMAR (DART):** calculada para  $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2\text{S}_2$  [M+1]:  $m/z$  212.28100, encontrada [M+1]:  $m/z$  212.99657.



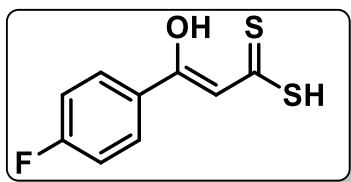
**Ácido 3-(4-nitrofenil)-3-hidroxi-2-propeno-1-tioico (49e)**

4-nitroacetofenona: 0.6610 g (0.0040 mol). Sólido rojo, rendimiento 0.6470 g (67%). P.f: 104-106°C. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$**

( $\text{cm}^{-1}$ ): 3062, 2921, 1688, 1595, 1523, 1279. **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 5.65 (s, 1H, H-9), 6.93 (s, 1H, H-2), 8.03 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H, H-6, H-6'), 8.29 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H, H-5, H-5'), 14.96 (s, 1H, H-8). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 108.8 (C-2), 124.0 (C-6, C-6'), 127.6 (C-5, C-5'), 140.6 (C-4), 149.5 (C-7), 165.5 (C-3), 219.1 (C-1). **EMAR (DART):** calculada para  $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}_2[-\text{NO}_2]$ :  $m/z$  194.99383, encontrada  $m/z$  194.99441

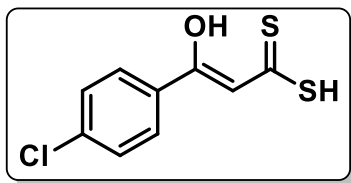

**Ácido 3-(4-cianofenil)-3-hidroxi-2-propenoico (49f)**

4-acetilbenzonitrilo: 0.5811 g (0.0040 mol). Sólido anaranjado, rendimiento 0.6112 g (69%). P.f: 112-114°C (lit.<sup>10</sup> m.p: 110 °C). **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3069, 2227, 1687, 1549, 1227. **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 5.93 (s, 1H, H-9), 7.26 (s, 1H, H-2), 8.11 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-6, H-6'), 8.32 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-5, H-5'), 15.56 (s, 1H, H-8). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 108.5 (C-2), 114.9 (C-7), 118.3 (-CN), 127.2 (C-5), 132.6 (C-6), 138.8 (C-4), 165.9 (C-7), 218.9 (C-1). **EMAR (DART):** calculada para C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>NOS<sub>2</sub> [M+1]: m/z 222.00473, encontrada [M+1]: m/z 222.00401.


**Ácido 3-(4-fluorofenil)-3-hidroxi-2-propenoico (49g)**

4-fluoroacetofenona: 0.5531 g (0.004 mol). Sólido anaranjado, rendimiento 0.4633 g (54%). P.f: 70-72°C (lit.<sup>10</sup> m.p: 74°C). **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3065, 2919, 1686, 1596, 1292, 1225. **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 5.43 (s, 1H, H-9), 6.90 (s, 1H, H-2), 7.15 (dd,  $J = 8.4, 2.0$  Hz, 2H, H-6, H-6'), 7.90 (dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, 2H, H-5, H-5'), 15.25 (s, 1H, H-8). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 107.9 (C-2), 116.5 (C-6, C-6'), 129.6, (C-5, C-5'), 129.9 (C-4), 167.2 (C-7), 171.8 (C-3), 211.4 (C-1). **EMAR (DART):** calculada para C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>FOS<sub>2</sub> [M+1]: m/z 215.00006, encontrada [M+1]: m/z 214.99950.

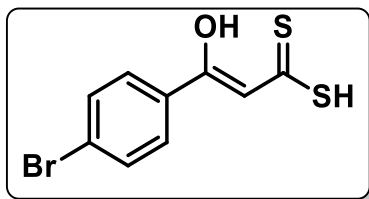




**Ácido 3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-propenoico (49h)**

4-cloroacetofenona: 0.6187 g (0.0040 mol). Sólido anaranjado, rendimiento 0.1754 g (55%). P.f: 95-97°C (lit.<sup>9</sup>

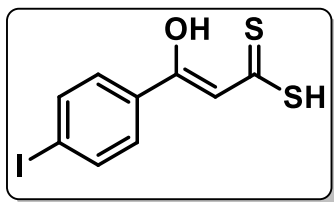
m.p: 88-91°C). **IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>):** 2839, 2546, 1678, 1587, 1228, 1091. **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 5.46 (s, 1H, H-9), 6.90 (s, 1H, H-2), 7.44 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-6, H-6'), 7.81 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-5, H-5'), 15.31 (s, 1H, H-8). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 108.0 (C-2), 128.3 (C-5, C-5'), 129.4 (C-6, C-6'), 132.3 (C-4), 139.0 (C-7), 171.5 (C-3), 211.9 (C-1). **EMAR (DART):** calculada para C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>ClOS<sub>2</sub> [M+1]:  $m/z$  230.97051, encontrada [M+1]:  $m/z$  230.97051.



**Ácido 3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-propenoico (49i)**

4-bromoacetofenona: 0.7971 g (0.0040 mol). Sólido anaranjado, rendimiento 0.9146 g (83%). P.f: 104-106°C

(lit.<sup>10</sup> m.p: 105°C). **IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>):** 2925, 2648, 1677, 1585, 1417, 1233. **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 5.58 (s, 1H, H-9), 6.91 (s, 1H, H-2), 7.76 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-6, H-6'), 7.97 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-5, H-5'), 15.21 (s, 1H, H-8). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 108.0 (C-2), 128.5 (C-5, C-5'), 128.8 (C-4), 132.4 (C-6, C-6'), 132.6 (C-7), 171.6 (C-3), 212.0 (C-1). **EMAR (DART):** calculada para C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>BrOS<sub>2</sub> [M+1]:  $m/z$  274.91999, encontrada [M+1]:  $m/z$  274.91890.



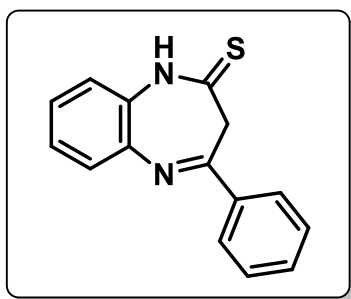
### Ácido 3-(4-yodofenil)-3-hidroxi-2-propeno-1-tioico (49j)

4-iodoacetofenona: 0.9843 g (0.0040 mol). Sólido rojo, rendimiento 0.5050 g (38%). P.f: 108-110°C. **IR (ATR)**  $\nu_{\max}$

( $\text{cm}^{-1}$ ): 3030, 2800, 1680, 1590, 1232. **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 5.43 (s, 1H, H-9), 6.87 (s, 1H, H-2), 7.56 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-6, H-6'), 7.79 (d,  $J = 8.7$ , 2H, H-5, H-5'), 15.25 (s, 1H, H-8). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 107.7 (C-2), 126.8 (C-6, C-6'), 129.6 (C-5, C-5'), 131.4 (C-4), 142.8 (C-7), 169.7 (C-3), 216.7 (C-1). **EMAR (DART)**: calculada para  $\text{C}_9\text{H}_8\text{IOS}_2$  [M+1]:  $m/z$  322.90612, encontrada [M+1]:  $m/z$  322.90488.

### 9.3 Procedimiento general para la síntesis de 4-(R-fenil)-2,3-dihidro-1H-1,5-benzodiazepin-2-tionas (48a-j)

En un matraz de fondo redondo y provisto de agitación magnética, se coloca 1.0 equivalente del correspondiente ácido **49a-j** y 1.0 equivalente de *orto*-fenilendiamina y se disuelven en 5-10 mL de xileno anhidro. Esta mezcla se agita a temperatura de reflujo durante 3-5 horas. El avance de la reacción se monitoreó mediante TLC. Al finalizar la reacción, es enfriada a temperatura ambiente y el disolvente es evaporado a vacío. El producto es purificado por cromatografía en columna con un sistema de elución de hexano/acetato de etilo (8:2).



### 4-fenil-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona (48a)

Sólido blanco, rendimiento 55%. P.f: 220-222°C. **IR (ATR)**:

$\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3174, 3057, 1615, 1529, 1311. **RMN  $^1\text{H}$  (300**

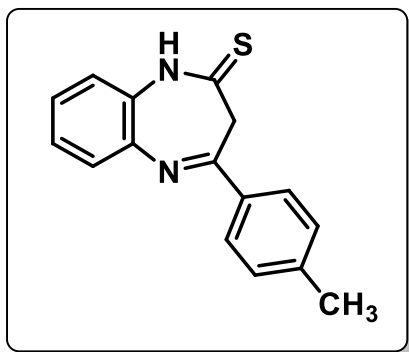
**MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )**  $\delta$  (ppm): 10.42 (s, 1H), 8.42 – 7.93 (m, 4H),

7.73 – 7.20 (m, 5H), 4.04 (s, 2H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,**

**$\text{DMSO}-d_6$ )**  $\delta$  (ppm): 192.7, 158.9, 140.8, 136.6, 133.1, 129.0, 128.7, 128.1, 127.8, 126.0,

125.9, 122.2, 47.8. **EMAR (DART)**: calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{S}$  [M+1] 253.07994,

encontrada 253.08115



**4-(4-metilfenil)-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona (48b)**

Sólido blanco, rendimiento 70%. P.f: 214-216 °C. **IR**

(ATR):  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3138, 3056, 1606, 1527, 1253. **RMN**

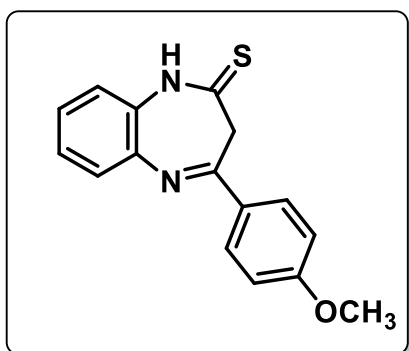
$^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 12.54 (s, 1H), 8.10

(d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.46 – 7.25 (m, 6H), 3.32 (s, 2H), 2.39

(s, 3H). **RMN**  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 192.7, 158.8, 141.4, 140.9, 133.8, 131.4,

129.3, 128.1, 127.9, 127.2, 125.8, 122.2, 47.7, 21.0. **EMAR (DART):** calculada para

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{S}$  [M+1] 267.09559, encontrada 267.09652



**4-(4-metoxiilfenil)-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona (48c)**

Sólido blanco, rendimiento 54%. P.f: 226-228 °C. **IR**

(ATR):  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3200, 3065, 1604, 1582, 1246. **RMN**  $^1\text{H}$

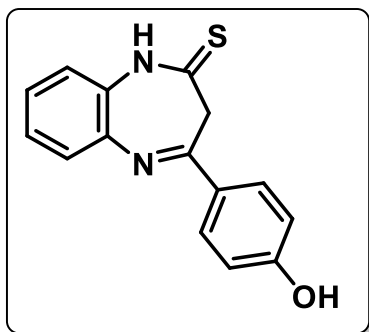
(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 12.51 (s, 1H), 8.17 (d,  $J$

= 8.5 Hz, 2H), 7.45 – 7.23 (m, 4H), 7.10 (d,  $J = 8.6$  Hz,

2H), 3.85 (s, 3H), 3.32 (s, 2H). **RMN**  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 192.6, 161.9,

158.2, 141.0, 131.3, 129.9, 128.9, 128.0, 125.8, 125.6, 122.2, 114.1, 55.5, 47.5. **EMAR**

(DART): calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}\text{S}$  [M+1] 283.09051, encontrada 283.09138



**4-(4-hidroxifenil)-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona (48d)**

Sólido café claro, rendimiento 51%. P.f: 250-252°C. **IR**

(ATR):  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3200, 3065, 1604, 1582, 1246. **RMN  $^1\text{H}$**

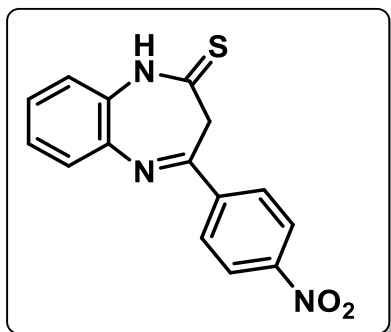
(300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 12.49 (s, 1H), 10.18 (s,

1H), 8.06 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.44-7.21 (m, 4H), 6.91 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 3.38 (s, 2H). **RMN**

$^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 192.7, 160.6, 158.4, 141.1, 131.3, 130.1, 128.0, 127.4,

125.8, 125.3, 122.2, 115.5, 47.4. **EMAR (DART):** calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{OS}$  [M+1]

269.07486, encontrada 269.07586



**4-(4-nitrofenil)-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona (48e)**

Sólido café claro, rendimiento 50%. P.f: 228-230°C. **IR**

(ATR):  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3174, 3057, 1615, 1529, 1311. **RMN**

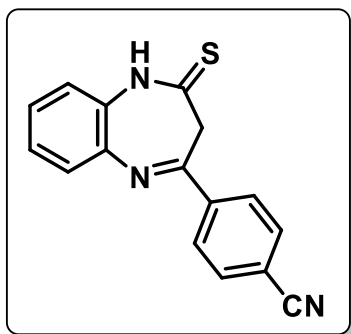
$^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 11.58 (s, 1H), 8.29 (d,

$J = 7.7$  Hz, 2H), 7.67 (d, 7.7 Hz, 2H), 7.45-7.02 (m, 4H), 3.85 (s, 2H). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,

$\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 195.1, 157.8, 147.8, 142.9, 140.9, 129.7, 129.3, 129.0, 126.9, 124.5,

124.4, 123.9, 41.7. **EMAR (DART):** calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  [M+1] 298.06503,

encontrada 298.06435



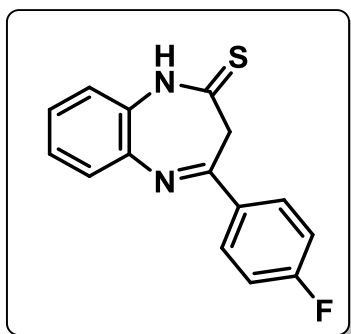
**4-(4-cianofenil)-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona (48f)**

Sólido amarillo claro, rendimiento 80%. P.f: 218-220°C. **IR**

(ATR):  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3200, 3060, 2232, 1613, 1527, 1237.

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 12.64 (s, 1H), 8.34

(d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 8.02 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.50-7.43 (m, 1H), 7.41-7.32 (m, 3H), 3.35 (s, 2H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 192.4, 157.5, 140.5, 140.4, 132.7, 131.4, 128.3, 126.8, 126.0, 122.3, 118.5, 113.4, 47.8. **EMAR (DART):** calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{S}$  [M+1] 278.07519, encontrada 278.07454



**4-(4-fluorofenil)-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona (48g)**

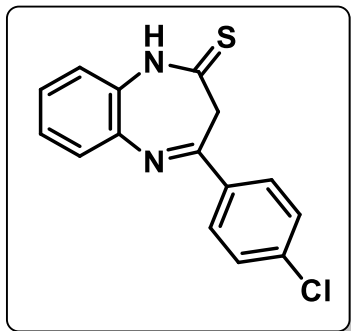
Sólido café claro, rendimiento 42%. P.f: 240-242°C. **IR**

(ATR):  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3190, 3092, 1619, 1586, 1219. **RMN  $^1\text{H}$**

**(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 12.59 (s, 1H), 8.26 (dd,  $J =$

8.9, 5.6 Hz, 2H), 7.48 – 7.25 (m, 6H), 3.91 (s, 2H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 195.0, 163.4, 158.3, 141.0, 133.2, 131.0, 129.4, 128.9, 127.0, 124.2, 124.1, 116.0, 40.9.

**EMAR (DART):** calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{S}$  [M+1] 271.07052, encontrada 271.06987



**4-(4-clorofenil)-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona (48h)**

Sólido amarillo, rendimiento 40%. P.f: 244-246°C. **IR**

(ATR):  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3200, 3060, 1589, 1467, 1238. **RMN  $^1\text{H}$**

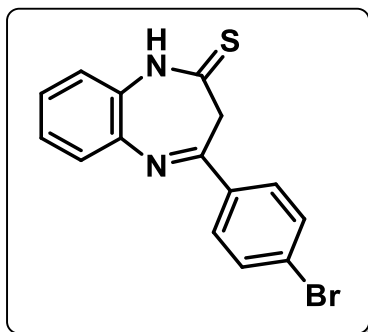
(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 12.59 (s, 1H), 8.21 (d,  $J =$

8.6 Hz, 2H), 7.63 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.49-7.26 (m, 4H), 3.32 (s, 2H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,**

**DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 192.5, 157.8, 140.6, 136.3, 135.3, 131.4, 129.6, 128.8, 128.2, 126.3,

126.0, 122.3, 47.7. **EMAR (DART):** calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClN}_2\text{S}$  [M+1] 287.04097,

encontrada 287.03966



**4-(4-bromofenil)-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona (48i)**

Sólido blanco, rendimiento 49%. P.f: 244-246°C. **IR (ATR):**

$\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3137, 3056, 1579, 1525, 1265. **RMN  $^1\text{H}$  (300**

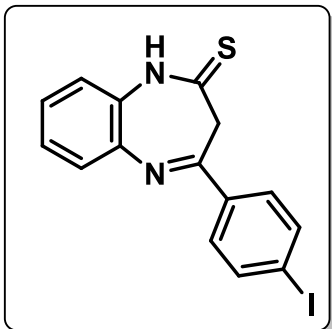
**MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 12.59 (s, 1H), 8.13 (d,  $J = 8.6$

Hz, 2H), 7.77 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.50-7.26 (m, 4H), 3.33 (s, 2H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,**

**DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 193.0, 158.5, 141.2, 136.2, 132.3, 131.9, 130.4, 128.7, 126.9, 126.5,

125.9, 122.9, 48.3. **EMAR (DART):** calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{S}$  [M+1] 331.98059,

encontrada 331.98161



**4-(4-iodofenil)-1,3-dihidro-2H-benzo-1,5-diazepin-2-tiona  
(48j)**

Sólido amarillo, rendimiento 46%. P.f: 240-242°C. **IR (ATR):**

**$\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>)** 3134, 3010, 1576, 1530, 1253. **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz,**

**DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 12.58 (s, 1H), 8.00-7.90 (m, 4H), 7.47-

7.28 (m, 4H), 3.34 (s, 2H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** 192.5, 158.2, 140.6,

137.6, 135.9, 131.4, 129.6, 128.1, 126.2, 125.9, 122.3, 99.3, 47.6. **EMAR (DART):**

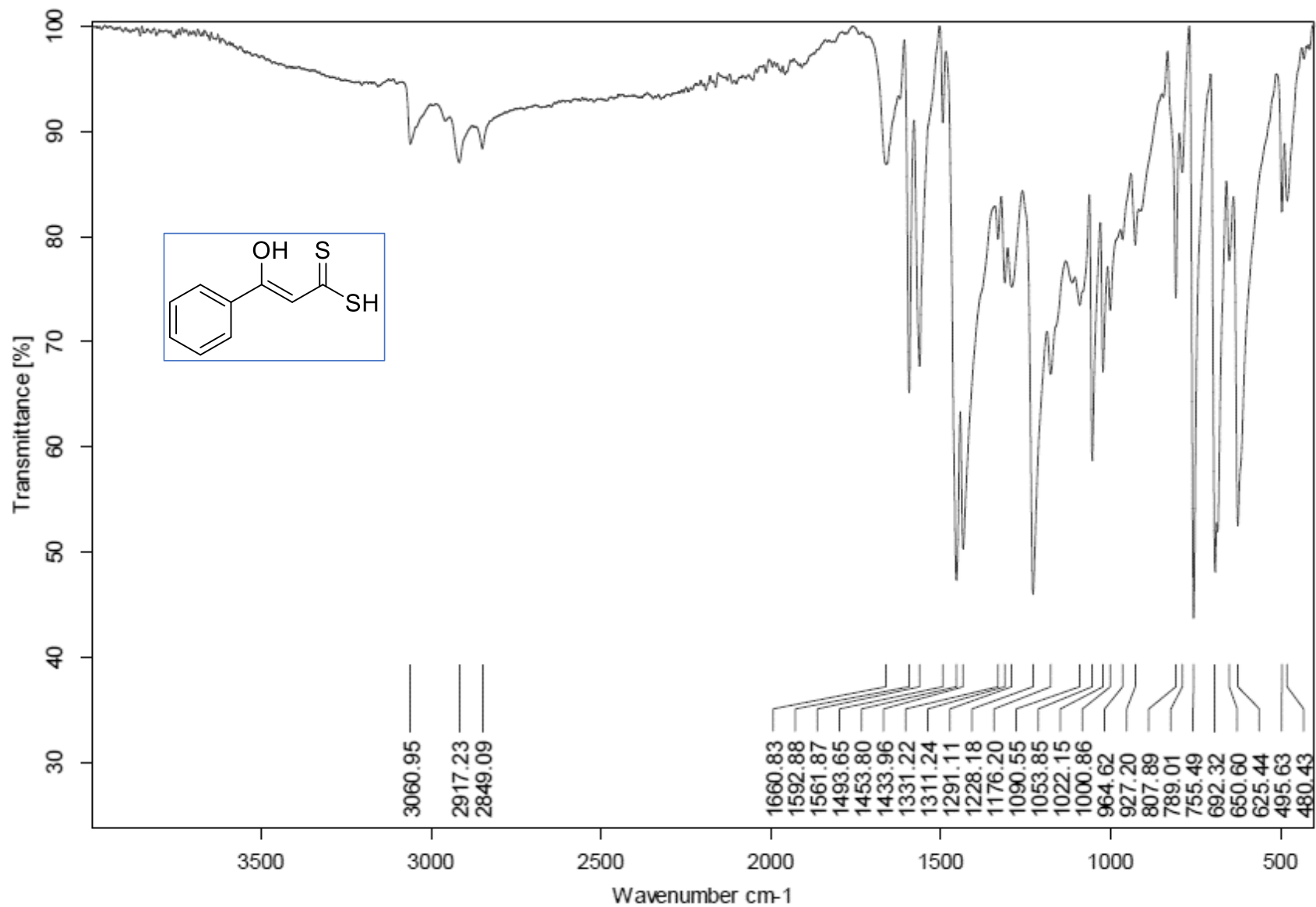
calculada para C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>2</sub>S [M+1] 378.97659, encontrado 378.97792

## 10. ANEXOS

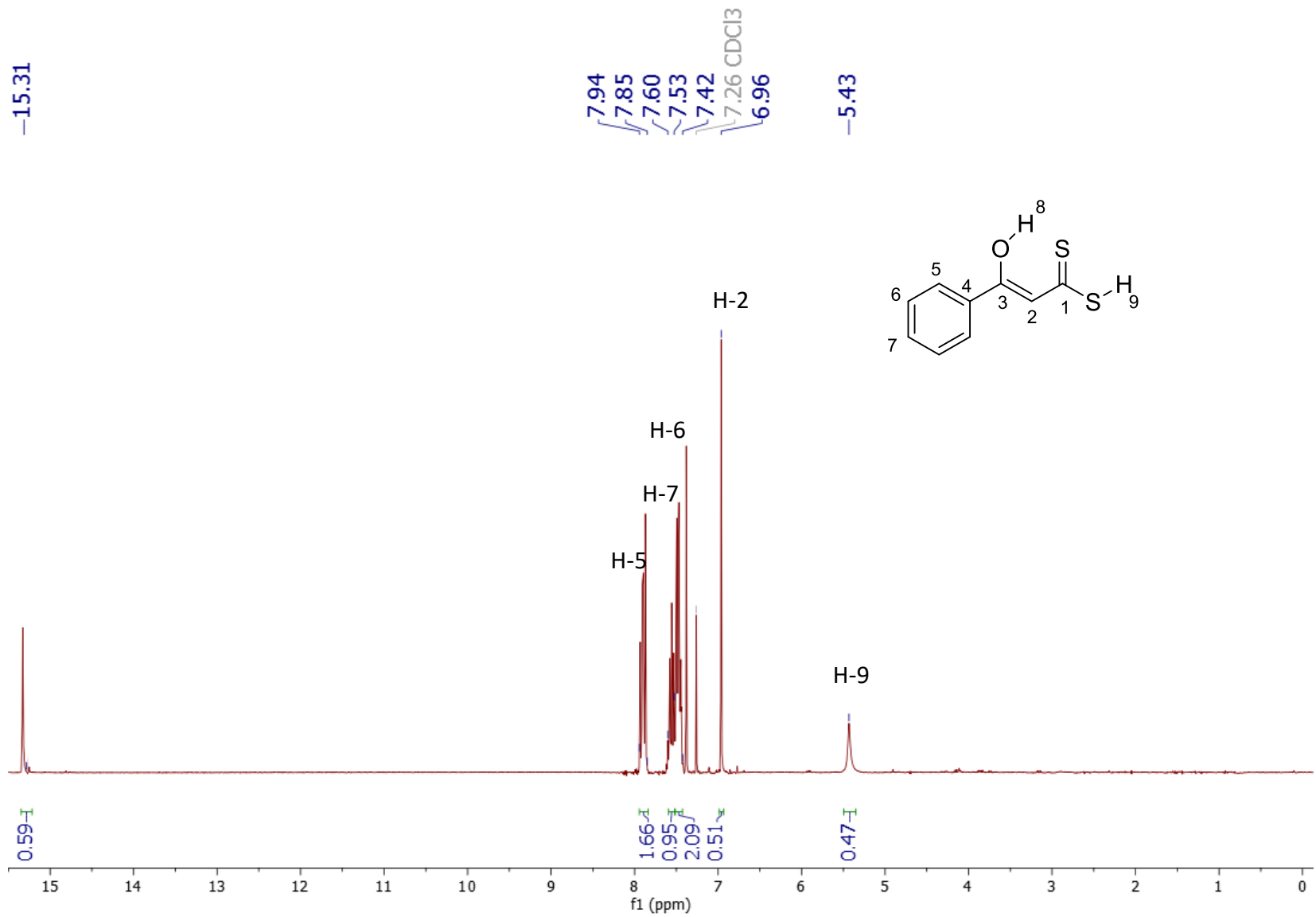
---

**Espectros de IR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C Y EMAR de los ácidos 3-(4-R-fenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditióicos (49a-j)**

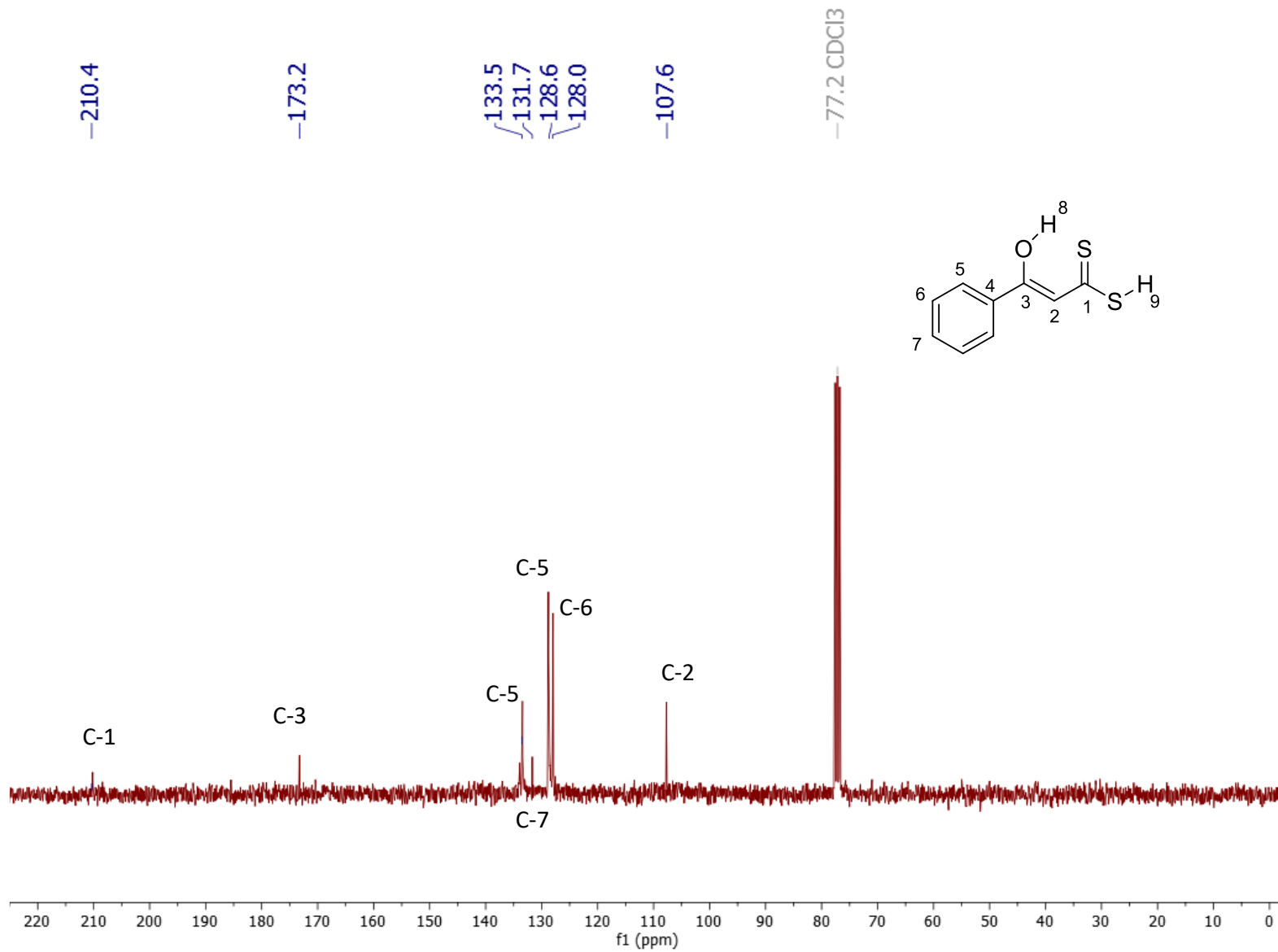




Anexo 1. Espectro IR (ATR) del Ácido 3-fenil-3-hidroxi-propen-2-enoditioico (49a)



Anexo 2. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-fenil-3-hidroxiprop-2-enodioico (49a)



Anexo 3. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-fenil-3-hidroxi-propen-2-enodioico (49a)

Data:U2047

Sample Name:Rosa ma Chavez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];

Acquired:4/5/2019 12:09:21 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal\_Peg\_600

Created:11/27/2019 2:38:55 PM

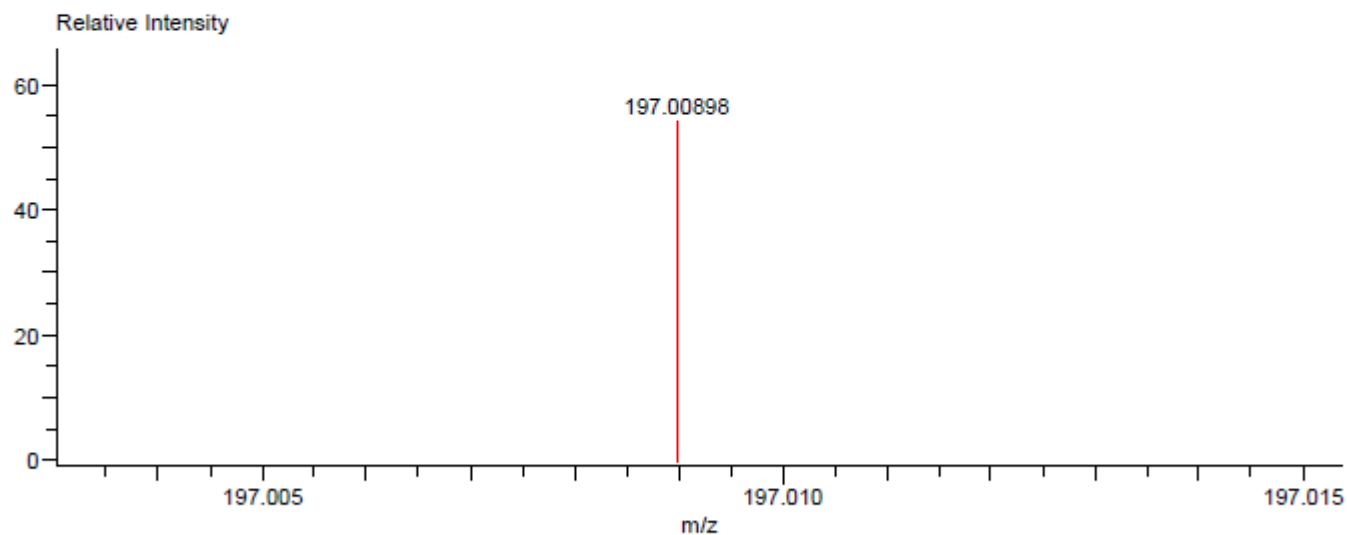
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:20.00(mmu)

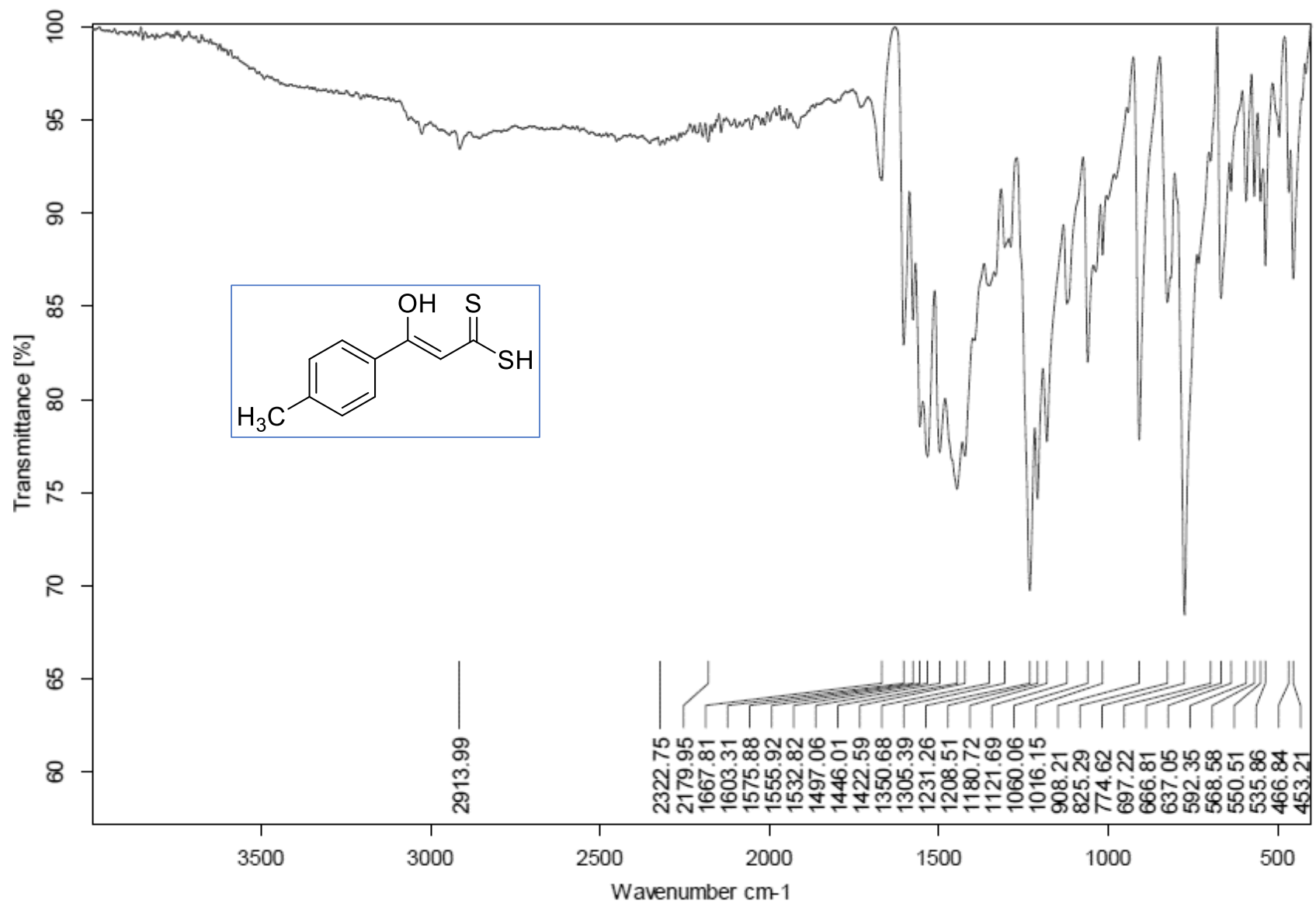
Unsaturation Number:0.0 .. 40.0 (Fracti...

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 9, <sup>1</sup>H:0 .. 9, <sup>79</sup>Br:0 .. 0, <sup>14</sup>N:0 .. 0, <sup>16</sup>O:0 .. 1, <sup>32</sup>S:0 .. 2

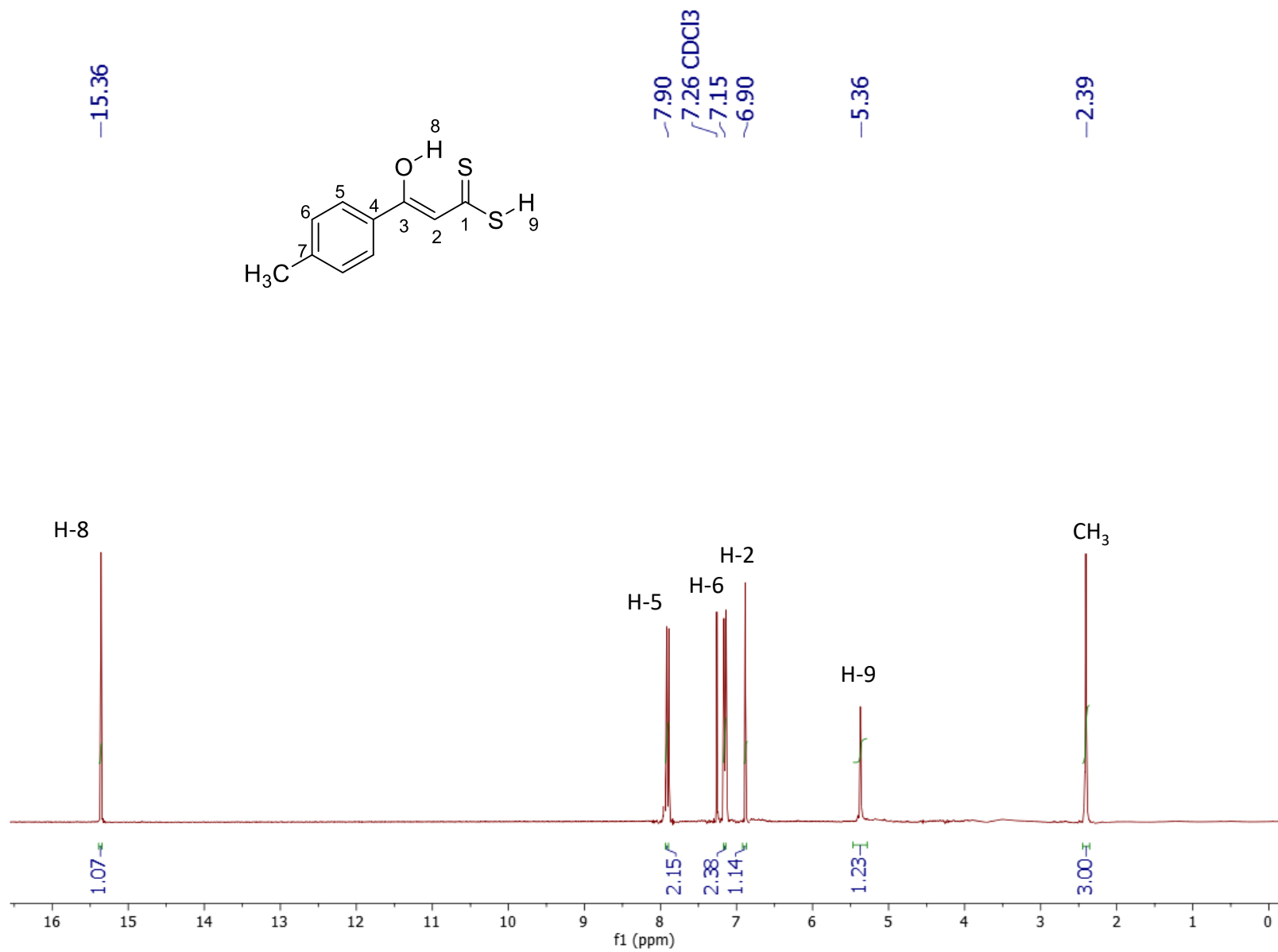


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
197.00898	1673.91	197.00948	-0.50	-2.55	<sup>12</sup> C <sub>9</sub> <sup>1</sup> H <sub>9</sub> <sup>16</sup> O <sub>1</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

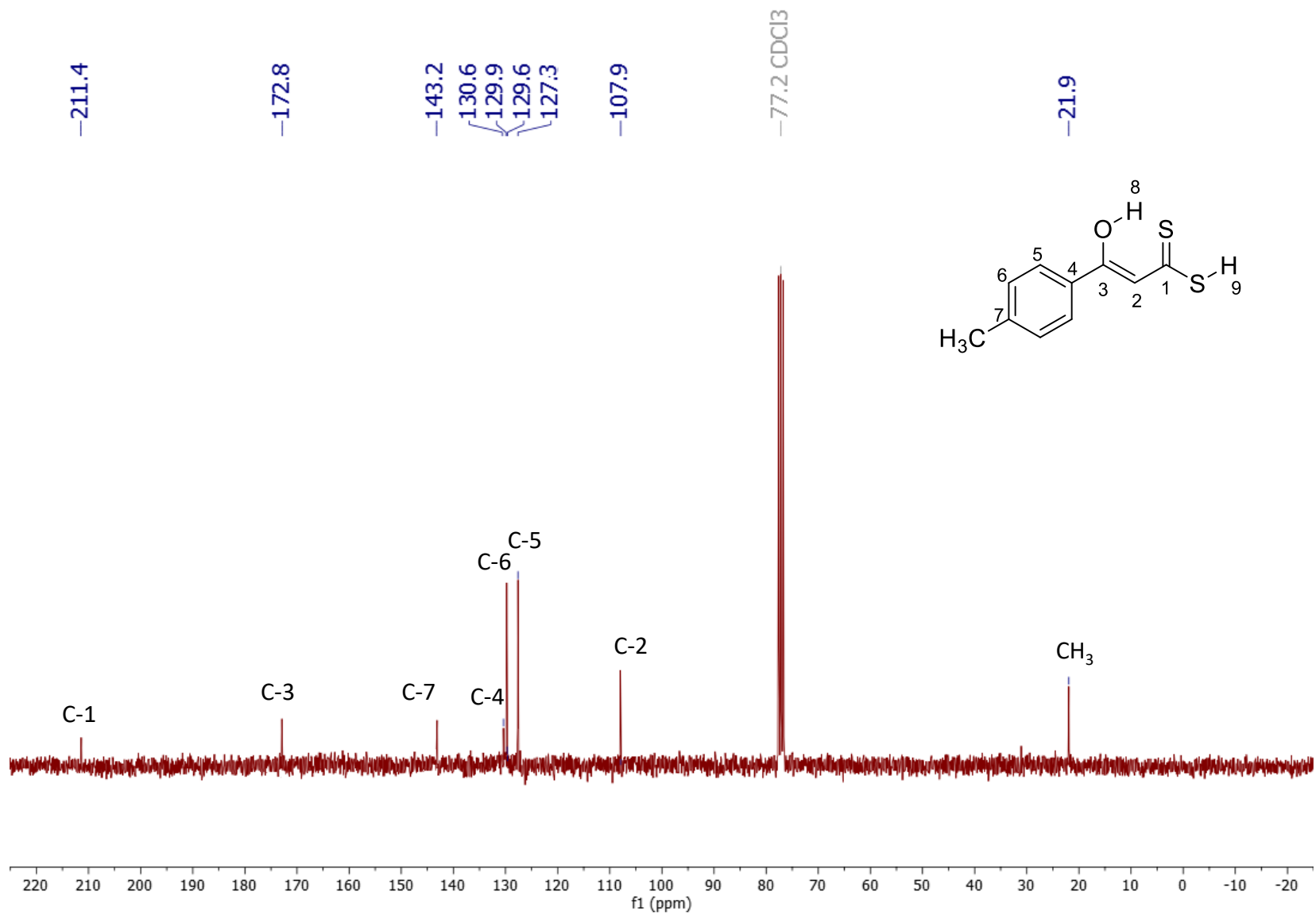
**Anexo 4.** Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-fenil-3-hidroxiipropen-2-enoditioico (**49a**)



Anexo 5. Espectro IR (ATR) del Ácido 3-(4-metilfenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (49b)



Anexo 6. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-metilfenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (49b)



Anexo 7. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del Ácido 3-(4-metilfenil)-3-hidroxiprop-2-enoditioico (49b)

Data:U 4091

Sample Name:Dr. Roberto Martinez/Rosa Ma Cahvez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];

Acquired:11/22/2019 12:30:14 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:11/22/2019 1:46:41 PM

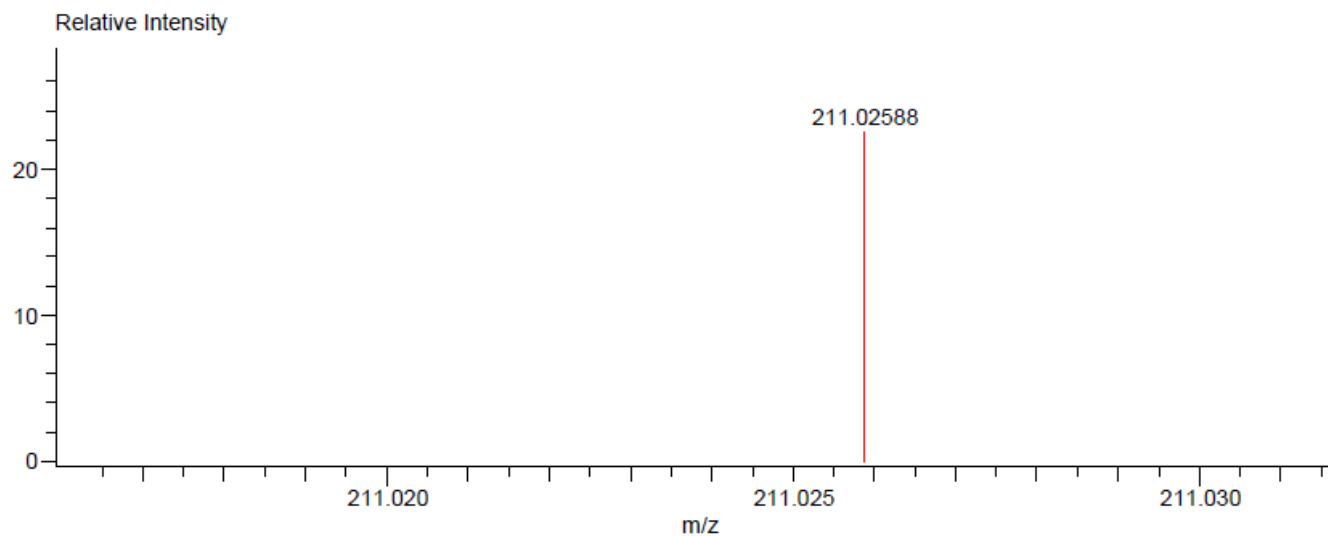
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:60.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 1000.0 (Fr...

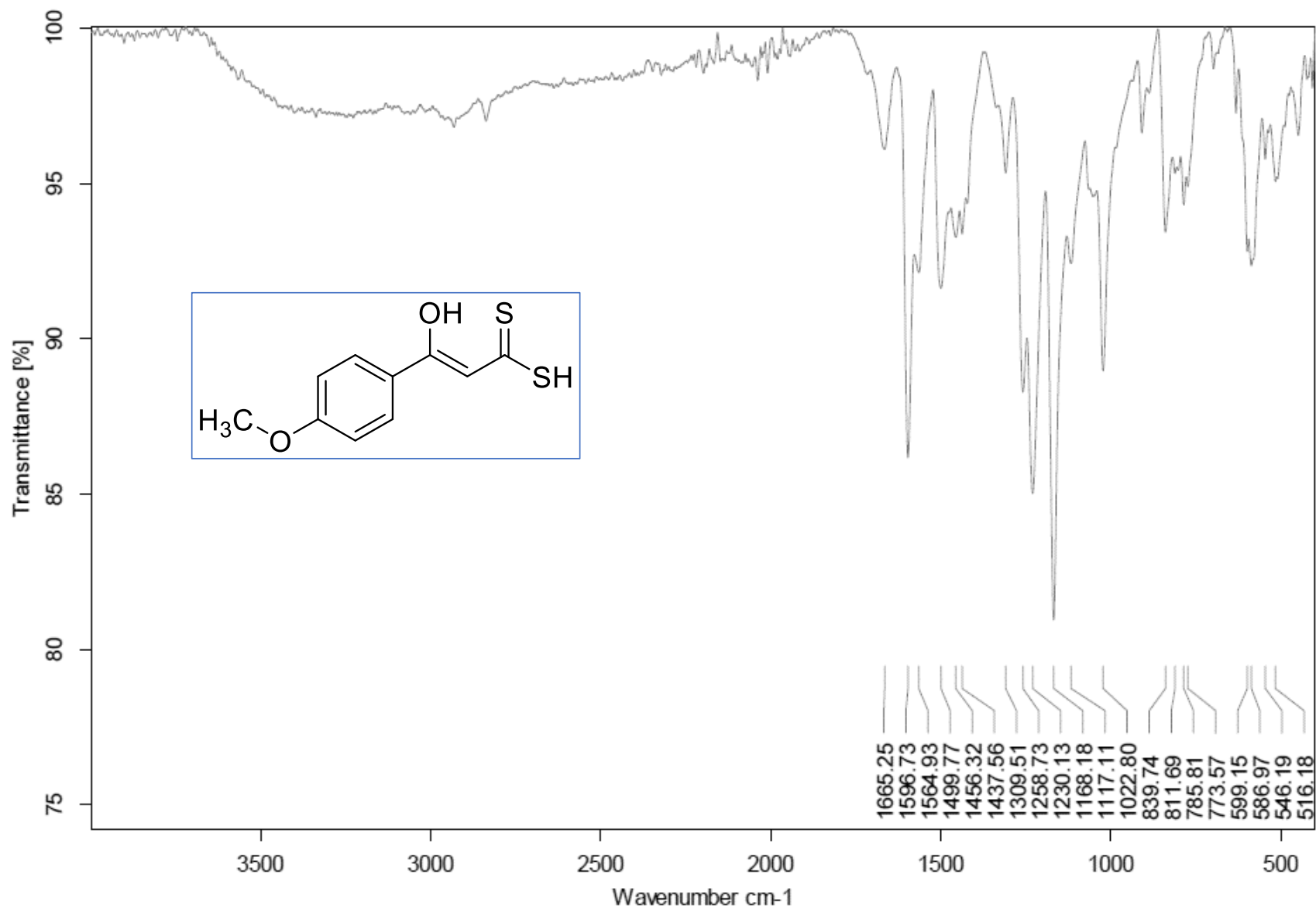
Element:<sup>12</sup>C:0 .. 10, <sup>1</sup>H:0 .. 11, <sup>35</sup>Cl:0 .. 0, <sup>37</sup>Cl:0 .. 0, <sup>16</sup>O:0 .. 1, <sup>32</sup>S:0 .. 2



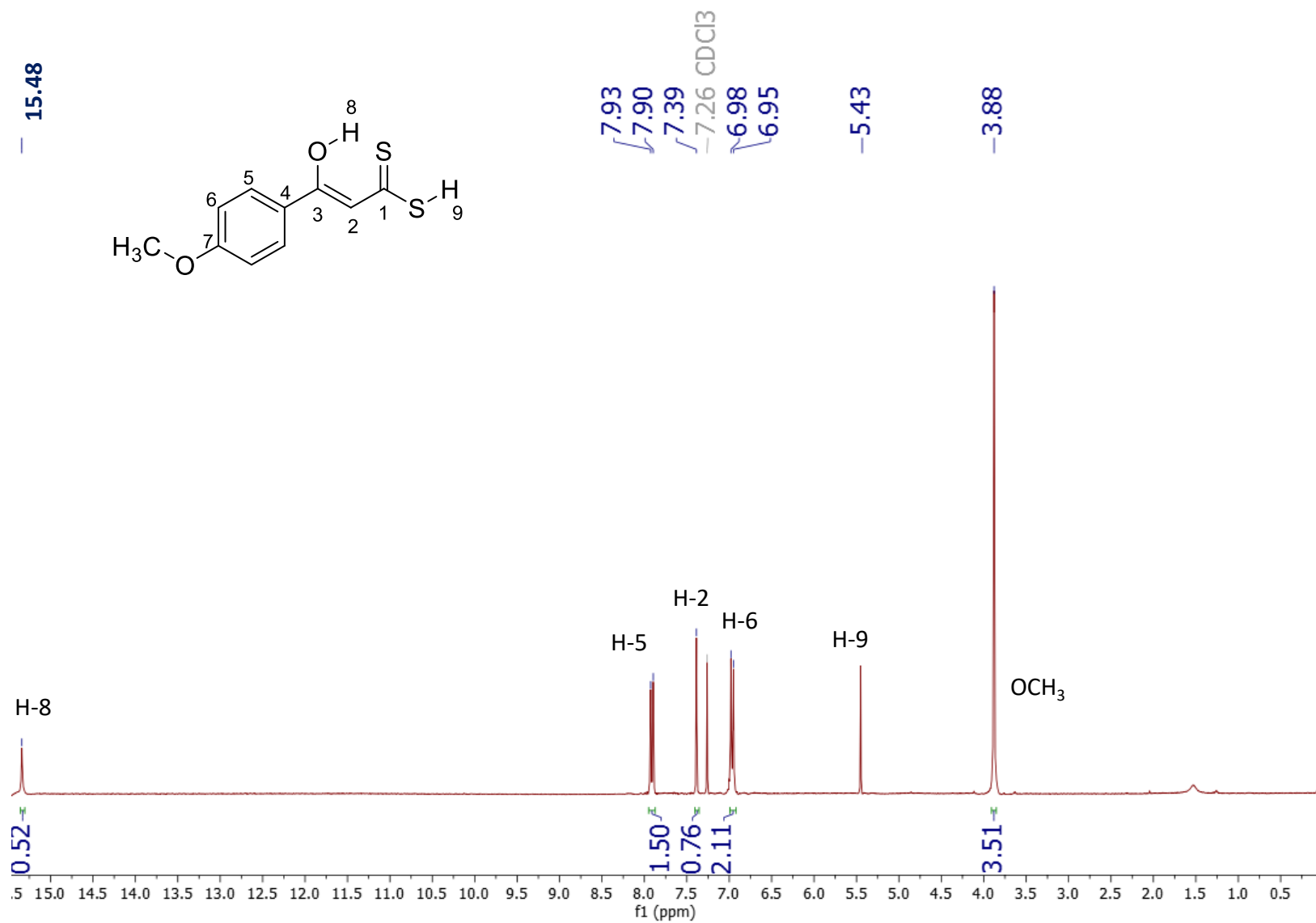
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
211.02588	4293.67	211.02513	0.74	3.53	<sup>12</sup> C <sub>10</sub> <sup>1</sup> H <sub>11</sub> <sup>16</sup> O <sub>1</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

Anexo 8. Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-(4-metilfenil)-3-hidroxiprop-2-enodioico (49b)

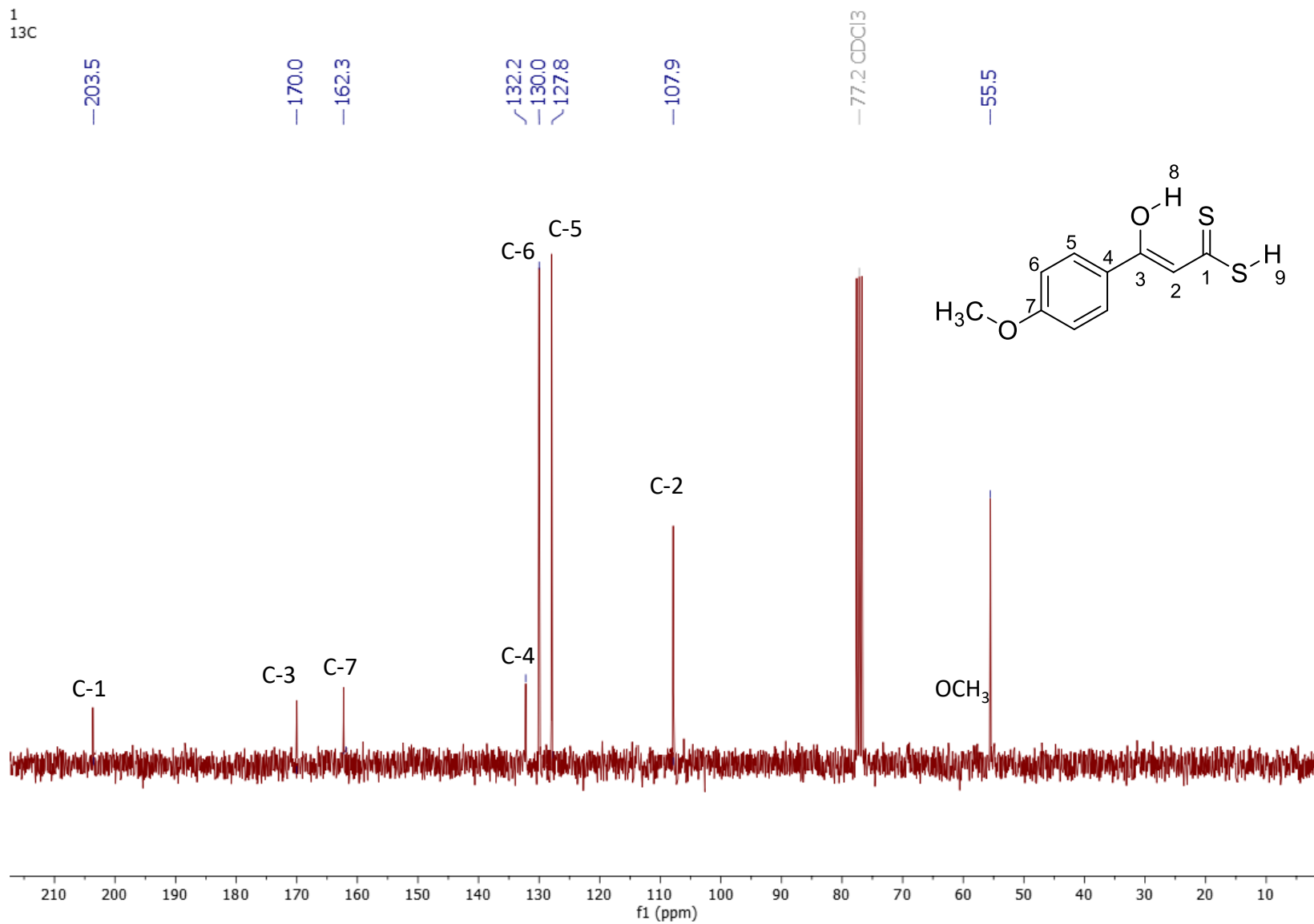




**Anexo 9.** Espectro de IR (ATR) del Ácido 3-(4-metoxifenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (**49c**)



Anexo 10. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-metoxifenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (49c)



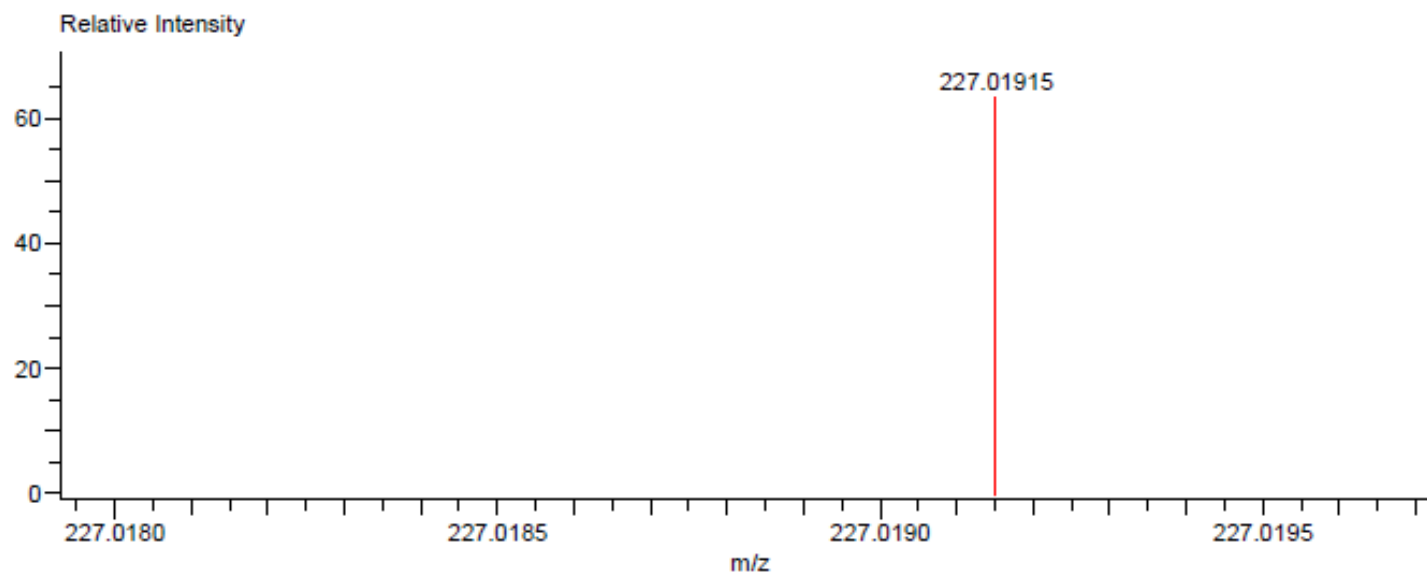
Anexo 11. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-metoxifenil)-3-hidroxiprop-2-enoditioico (49c)

Data:U-3852 R1-4OMe-ac  
 Sample Name:Martinez Roberto  
 Description:  
 Ionization Mode:ESI+  
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];

Acquired:10/24/2019 3:28:03 PM  
 Operator:AccuTOF  
 Mass Calibration data:Cal\_Peg\_600  
 Created:11/27/2019 3:00:35 PM  
 Created by:AccuTOF

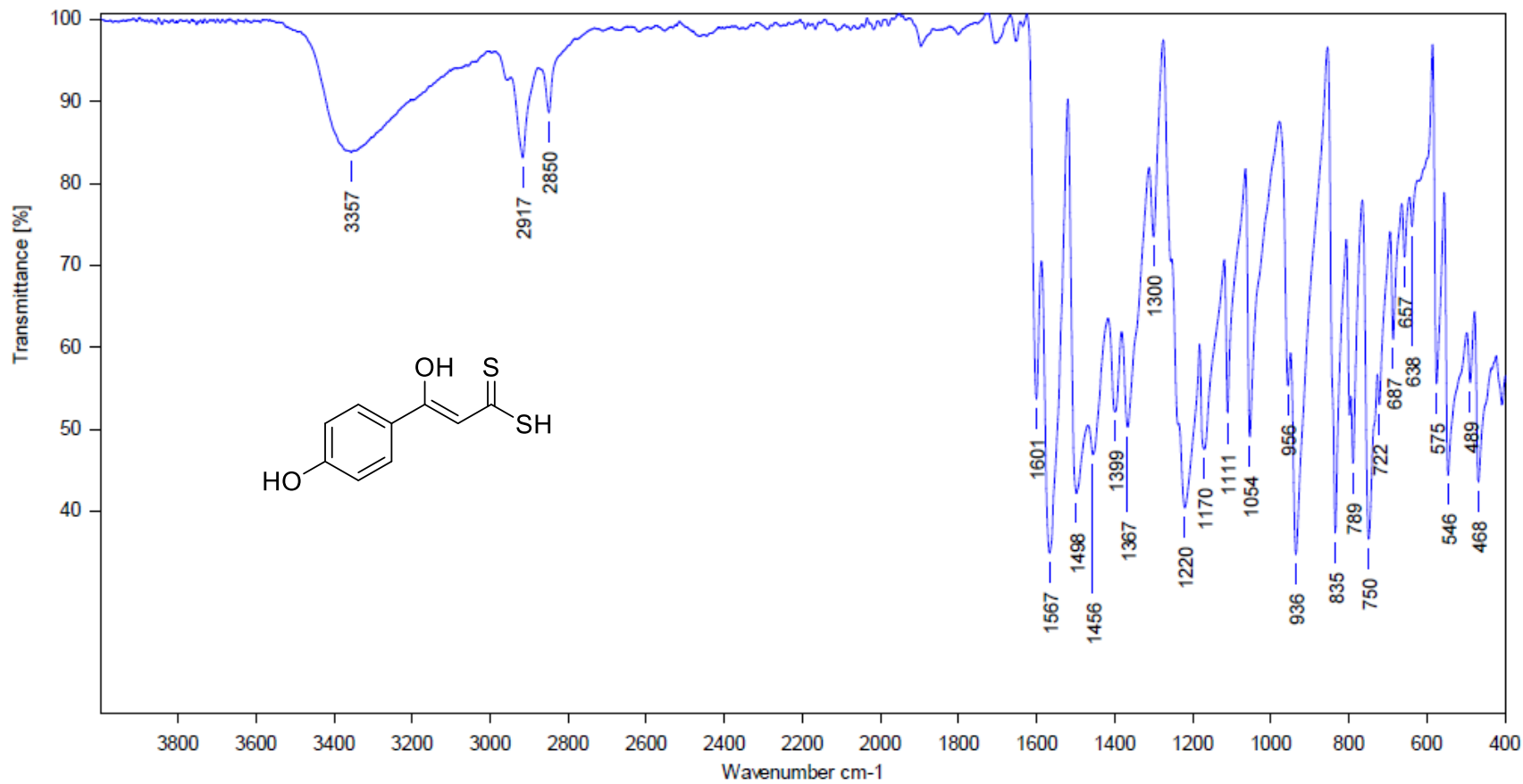
Charge number:1  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 10, <sup>1</sup>H:0 .. 11, <sup>79</sup>Br:0 .. 0, <sup>14</sup>N:0 .. 0, <sup>16</sup>O:0 .. 2, <sup>32</sup>S:0 .. 2

Unsaturation Number:0.0 .. 40.0 (Fracti...

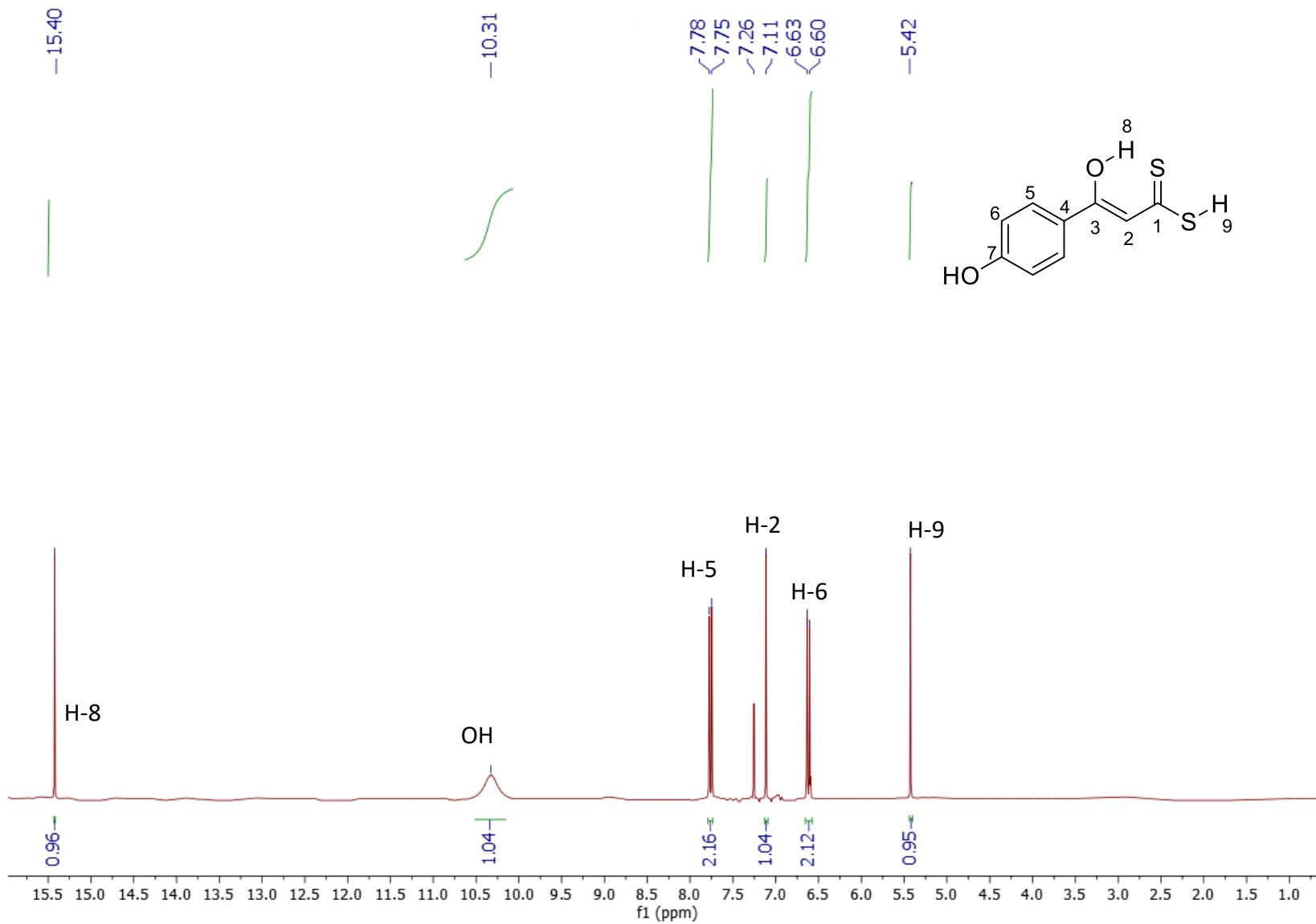


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
227.01915	10677.06	227.02005	-0.89	-3.94	<sup>12</sup> C <sub>10</sub> <sup>1</sup> H <sub>11</sub> <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

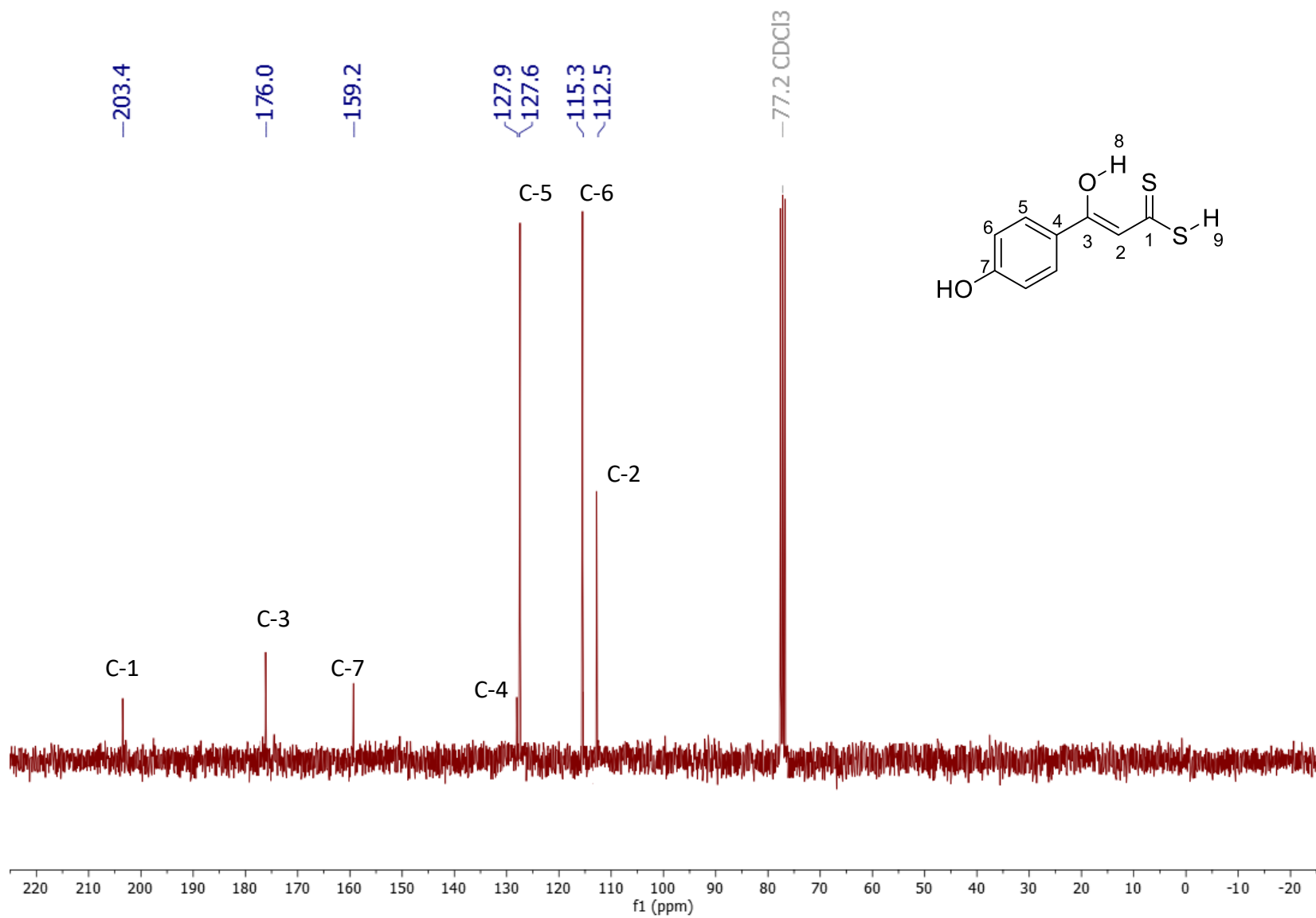
Anexo 12. Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-(4-metoxifenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (49c)



**Anexo 13.** Espectro de IR (ATR) del Ácido 3-(4-hidroxifenil)-3-hidroxirop-2-enoditioico (**49d**)



Anexo 14. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del Ácido 3-(4-hidroxifenil)-3-hidroxiprop-2-enodioico (49d)

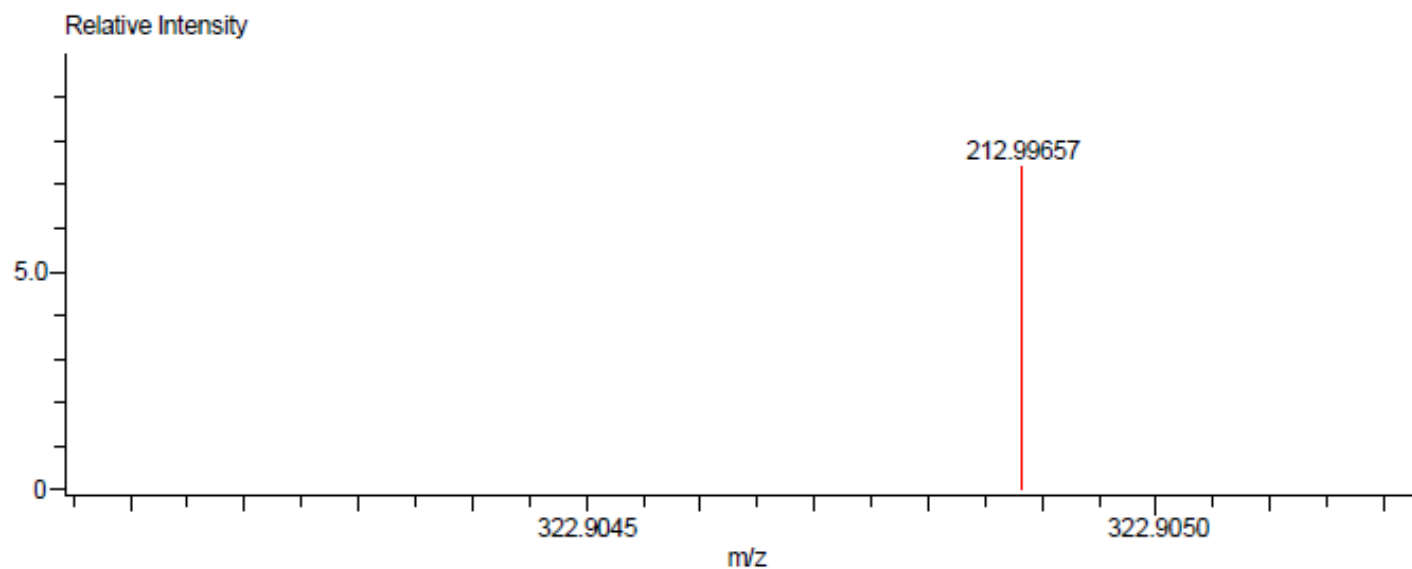


Anexo 15. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-hidroxifenil)-3-hidroxiprop-2-enoditioico (49d)

Data:R1-OH  
 Sample Name:Dr. Roberto Martinez/Rosa Ma Cahvez  
 Description:  
 Ionization Mode:ESI+  
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5];...

Acquired:11/22/2019 12:22:45 PM  
 Operator:AccuTOF  
 Mass Calibration data:Cal Peg 600  
 Created:11/22/2019 1:39:04 PM  
 Created by:AccuTOF

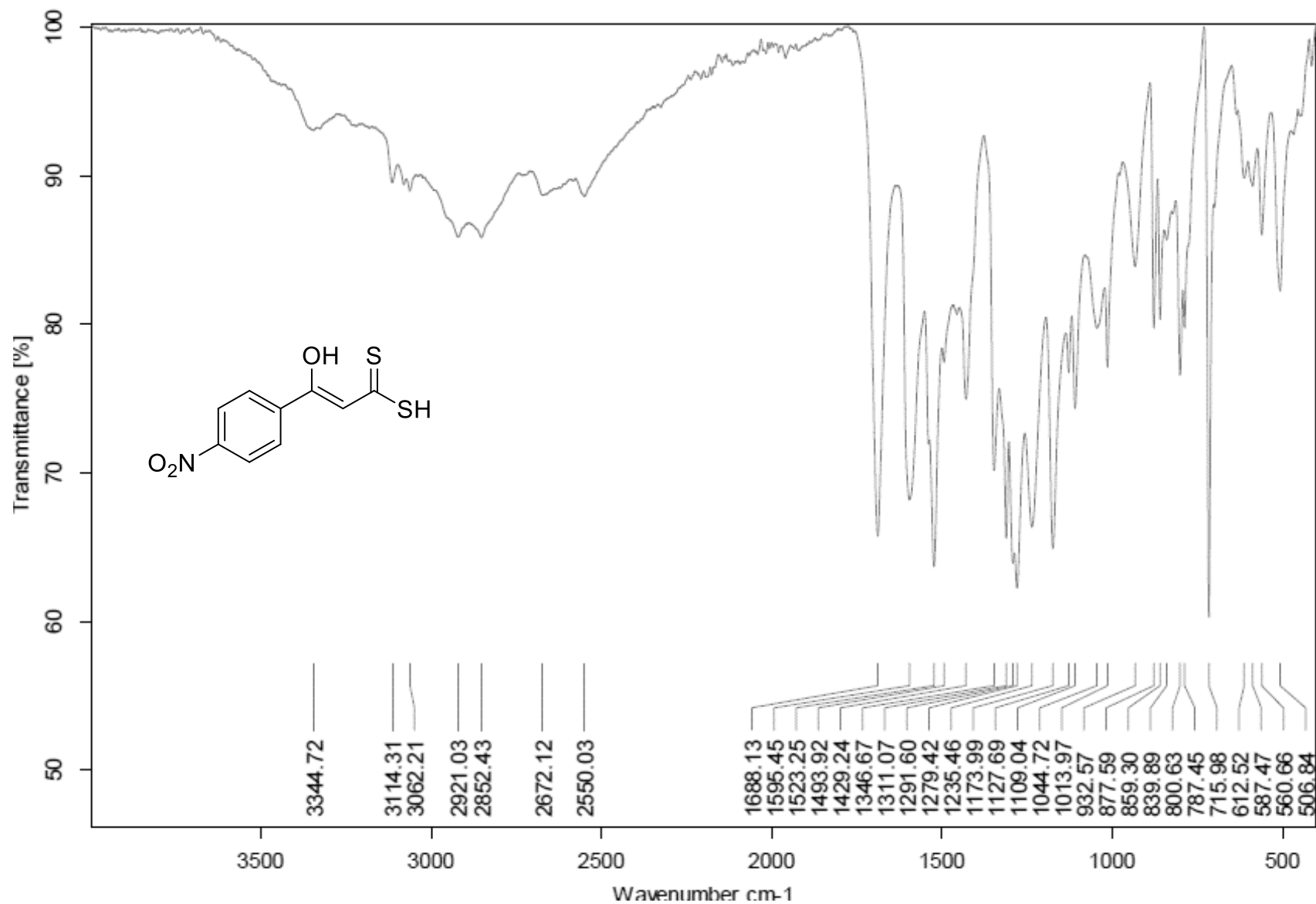
Charge number:1 Tolerance:60.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 1000.0 (Fr...  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 9, <sup>1</sup>H:0 .. 8, <sup>127</sup>I:0 .. 1, <sup>14</sup>N:0 .. 0, <sup>16</sup>O:0 .. 1, <sup>32</sup>S:0 .. 2, <sup>118</sup>Sn:0 .. 0, <sup>119</sup>Sn:0 .. 0, <sup>120</sup>Sn:0 .. 0



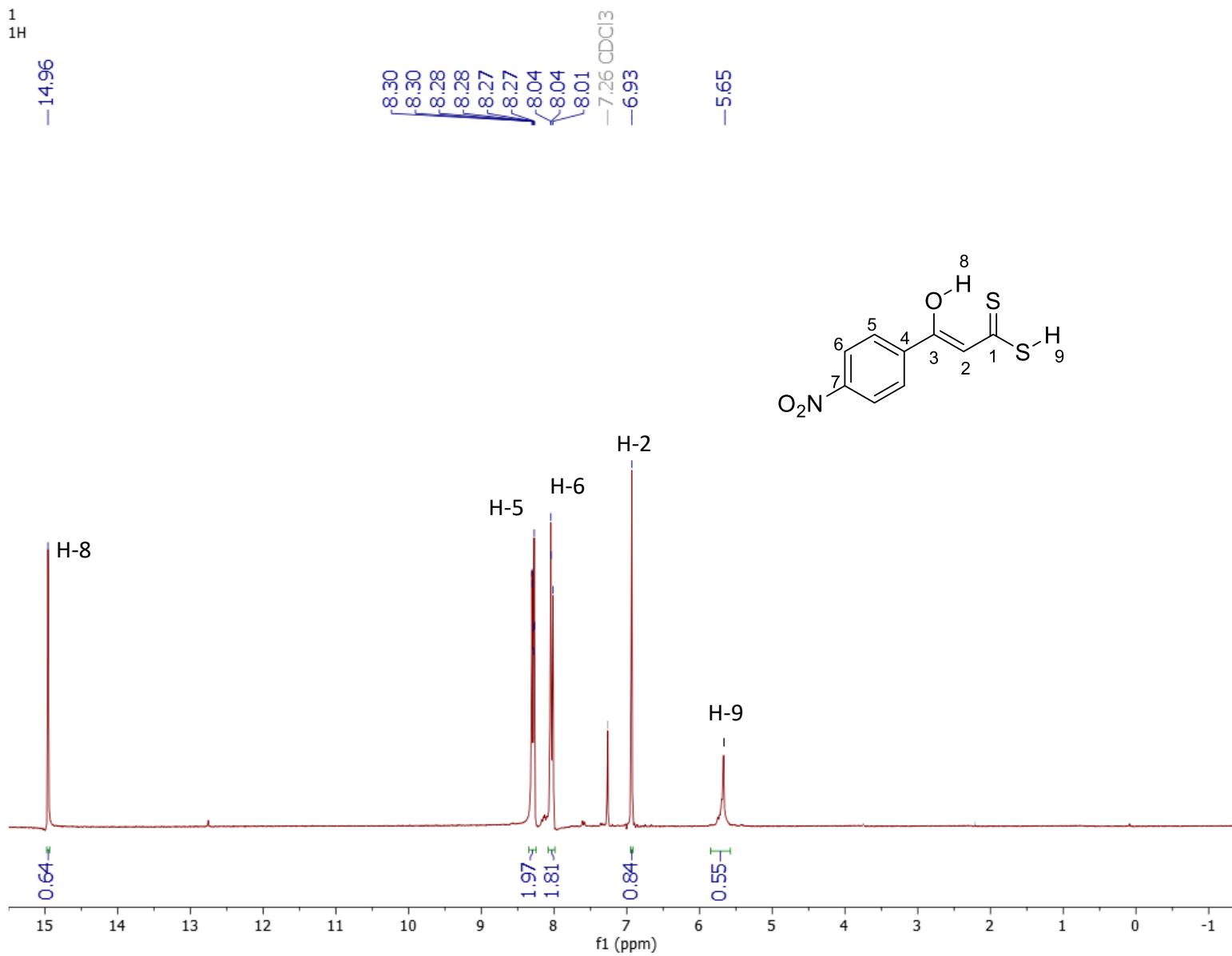
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
212.99657	300.57	212.99693	-0.36		<sup>12</sup> C <sub>9</sub> <sup>1</sup> H <sub>9</sub> <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

**Anexo 16.** Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-(4-hidroxifenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (**49d**)

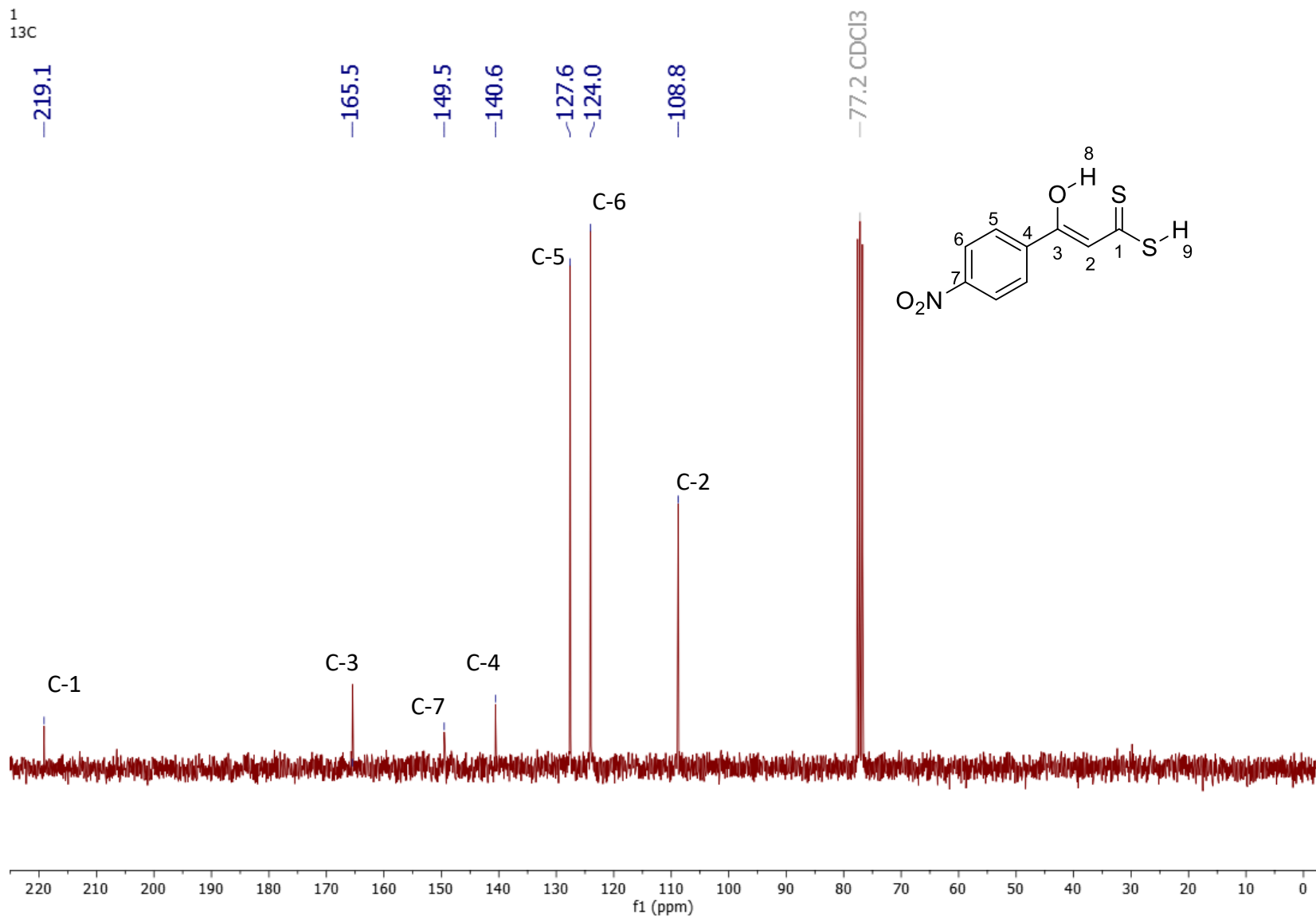




Anexo 17. Espectro de IR del Ácido 3-(4-nitrofenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (49e)



**Anexo 18.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-nitrofenil)-3-hidroxiprop-2-enoditioico (**49e**)

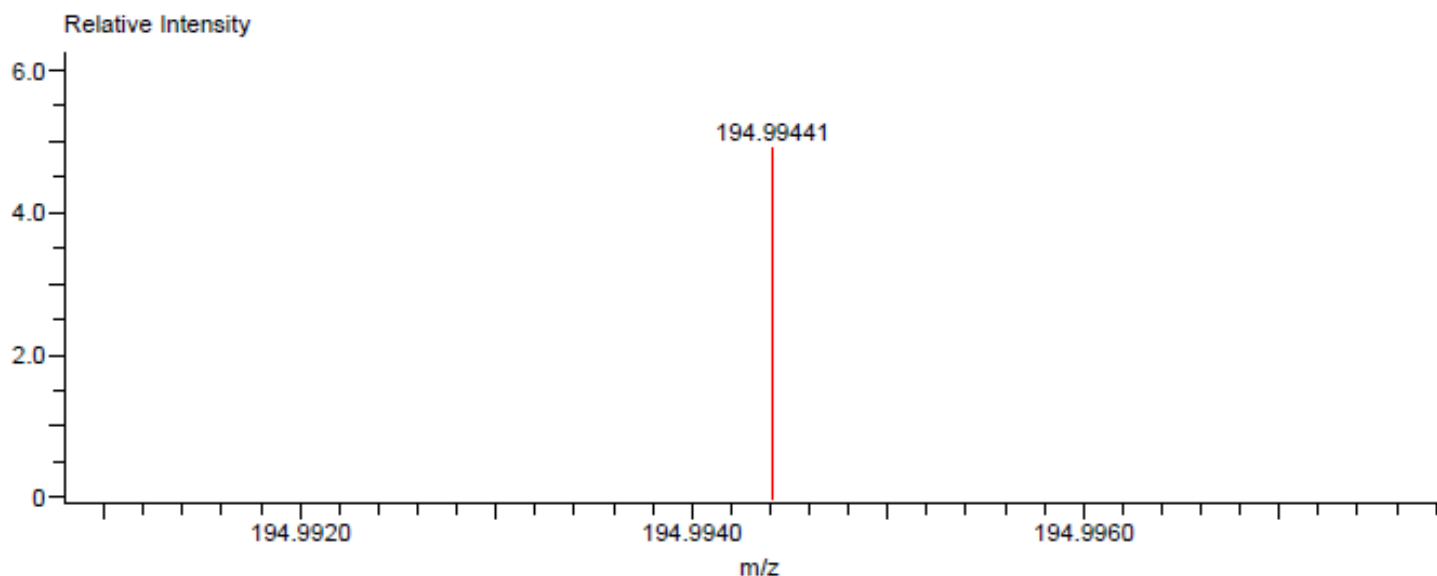


Anexo 19. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-nitrofenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (49e)

Data:U4088  
 Sample Name:Dr. Roberto Martinez/Rosa Ma Cahvez  
 Description:  
 Ionization Mode:ESI+  
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];...

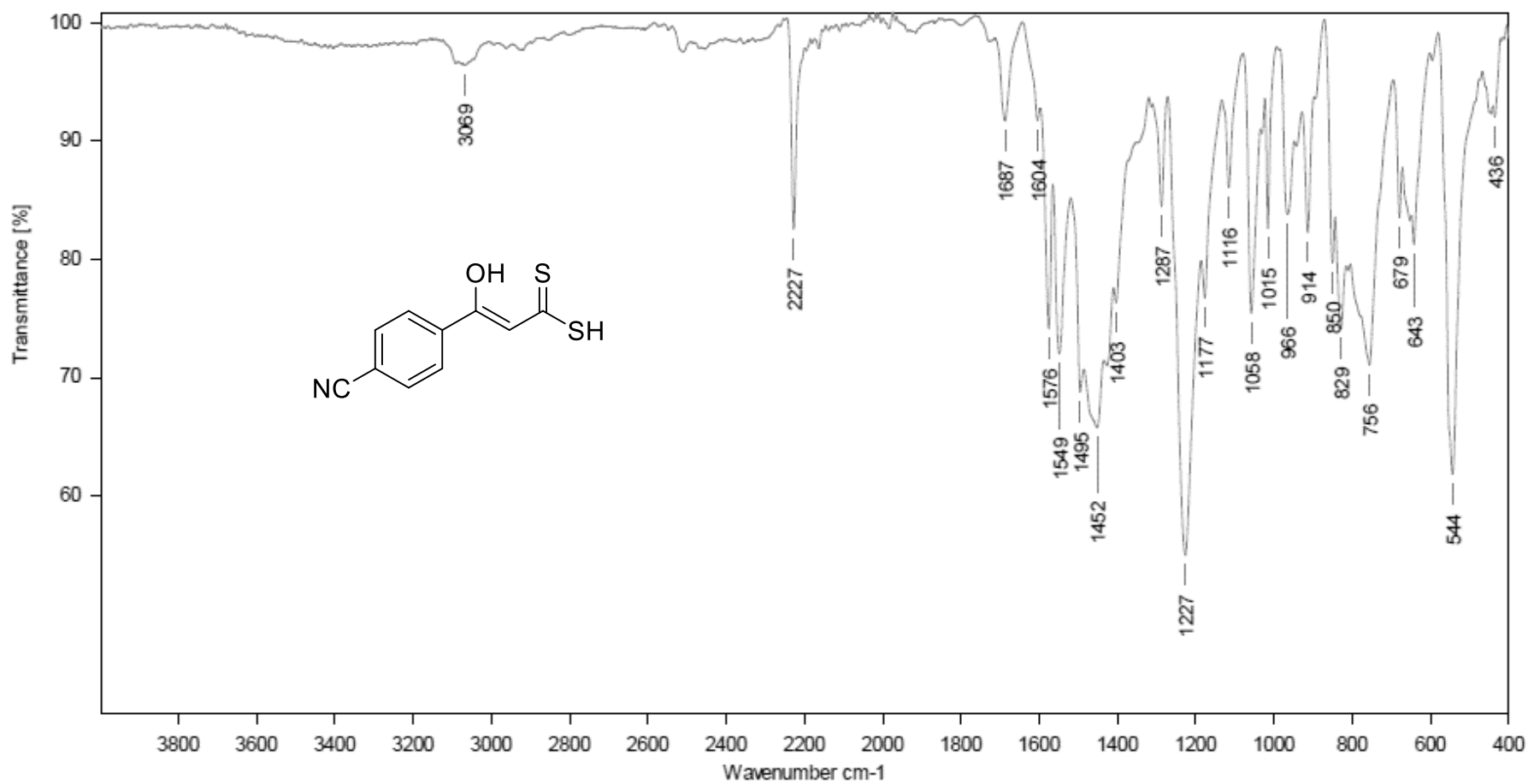
Acquired:11/22/2019 12:13:42 PM  
 Operator:AccuTOF  
 Mass Calibration data:Cal Peg 600-oct...  
 Created:11/22/2019 1:15:25 PM  
 Created by:AccuTOF

Charge number:1  
 Tolerance:60.00(mmu)  
 Unsaturation Number:0.0 .. 1000.0 (Fr...  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 9, <sup>1</sup>H:0 .. 8, <sup>14</sup>N:0 .. 0, <sup>16</sup>O:0 .. 1, <sup>32</sup>S:0 .. 2, <sup>118</sup>Sn:0 .. 0, <sup>119</sup>Sn:0 .. 0, <sup>120</sup>Sn:0 .. 0

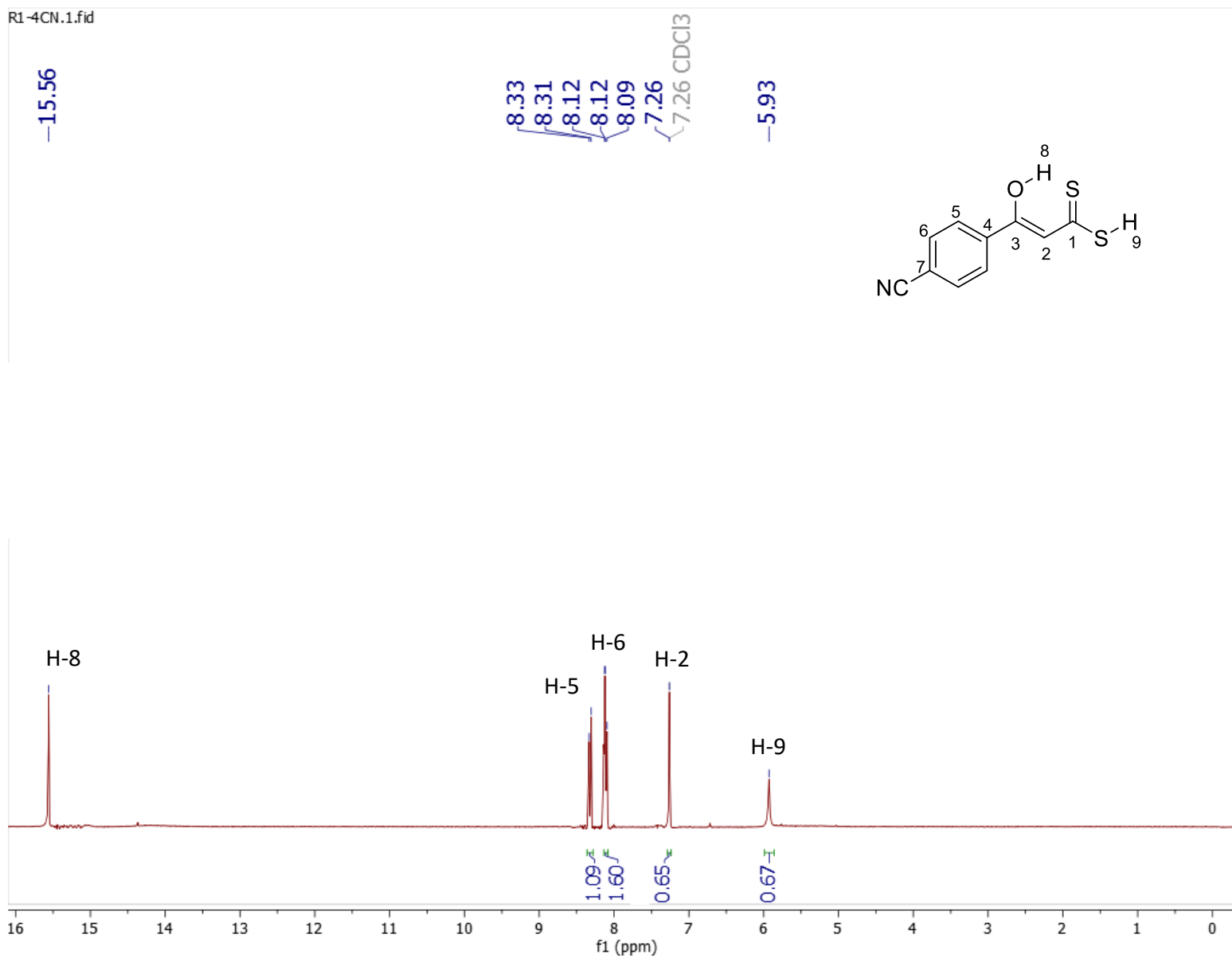


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
194.99441	2085.31	194.99383	0.58	2.97	<sup>12</sup> C <sub>9</sub> <sup>1</sup> H <sub>7</sub> <sup>16</sup> O <sub>1</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

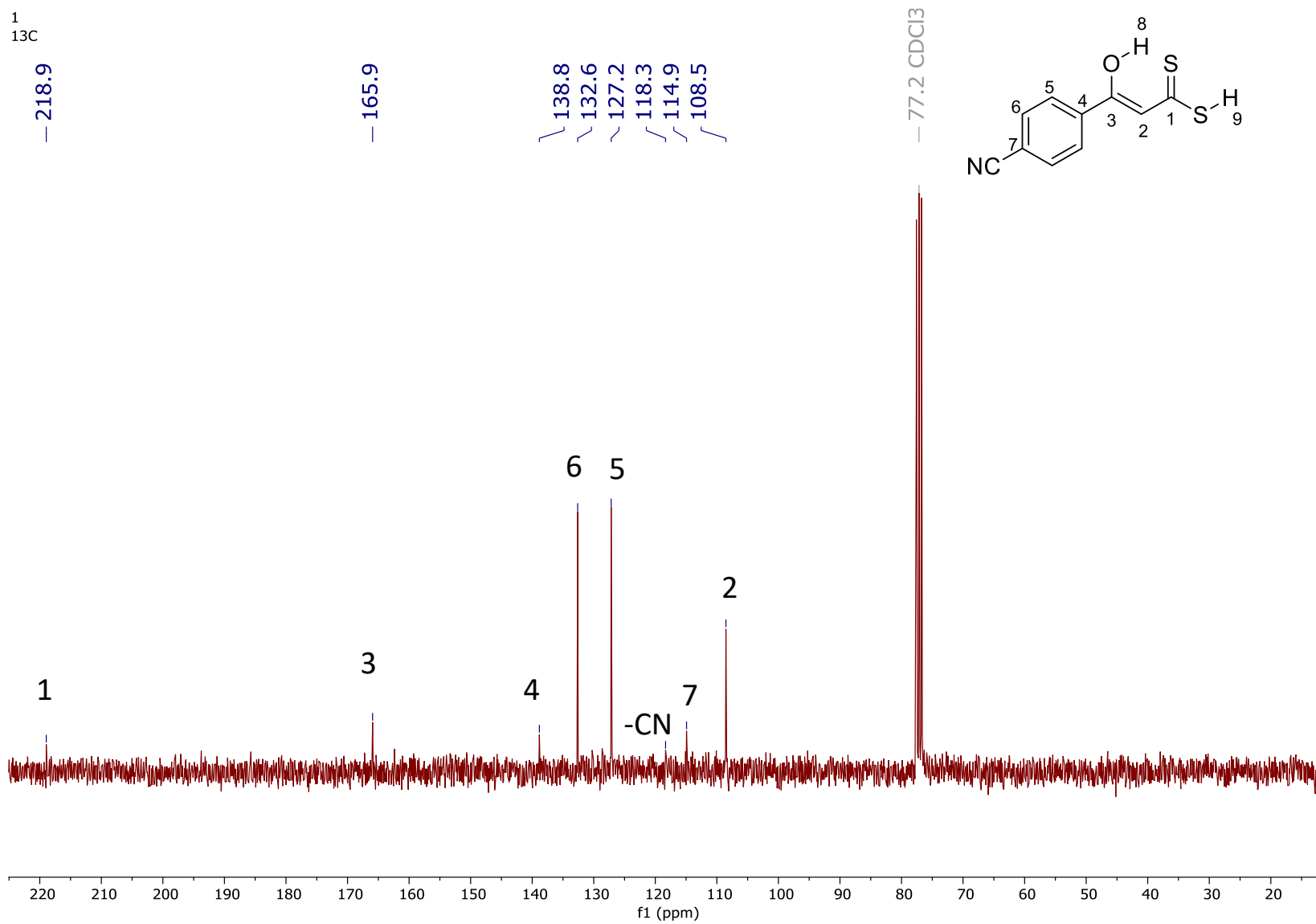
**Anexo 20.** Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-(4-nitrofenil)-3-hidroxiprop-2-enoditioico (**49e**)



Anexo 21. Espectro de IR del Ácido 3-(4-cianofenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (49f)



Anexo 22. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-cianofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (49f)



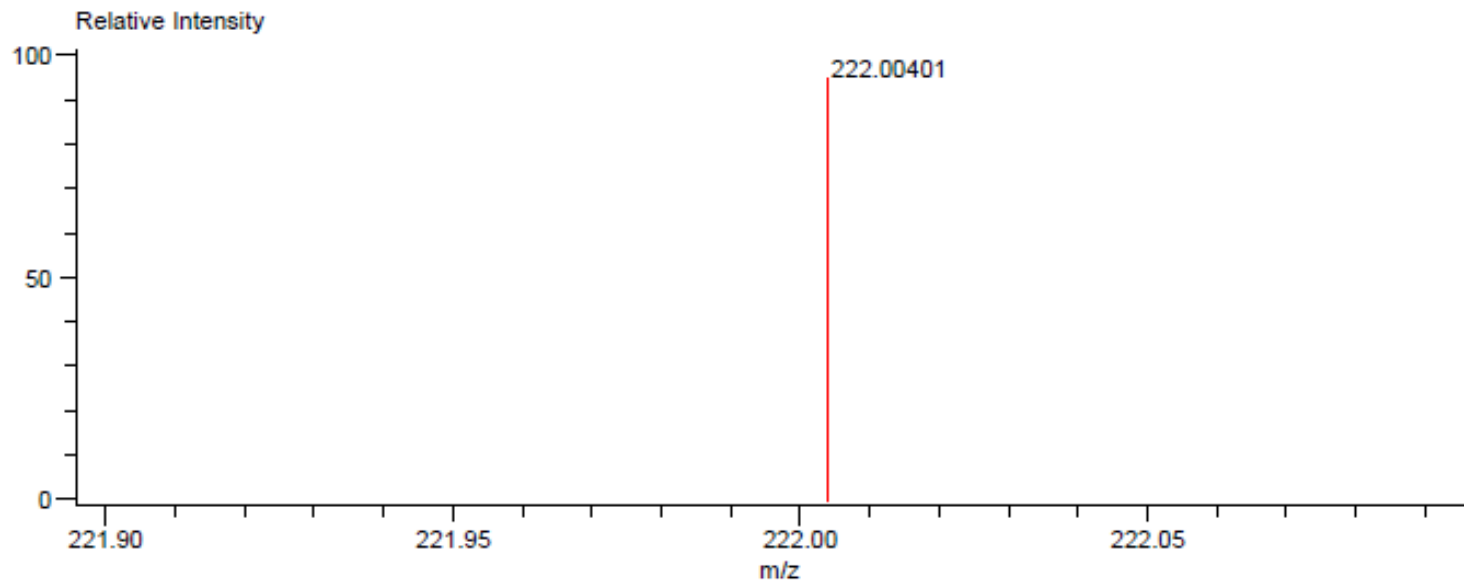
Anexo 23. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-cianofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (49f)

Data: u 4123  
 Sample Name: Dr. Roberto MARTINEZ/ Gustavo  
 Description:  
 Ionization Mode: ESI+  
 History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];

Acquired: 11/27/2019 2:11:05 PM  
 Operator: AccuTOF  
 Mass Calibration data: Cal\_Peg\_600  
 Created: 11/29/2019 10:17:32 AM  
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1  
 Tolerance: 5.00(mmu)  
 Element: <sup>12</sup>C: 0 .. 10, <sup>1</sup>H: 0 .. 8, <sup>14</sup>N: 0 .. 1, <sup>16</sup>O: 0 .. 1, <sup>32</sup>S: 0 .. 2

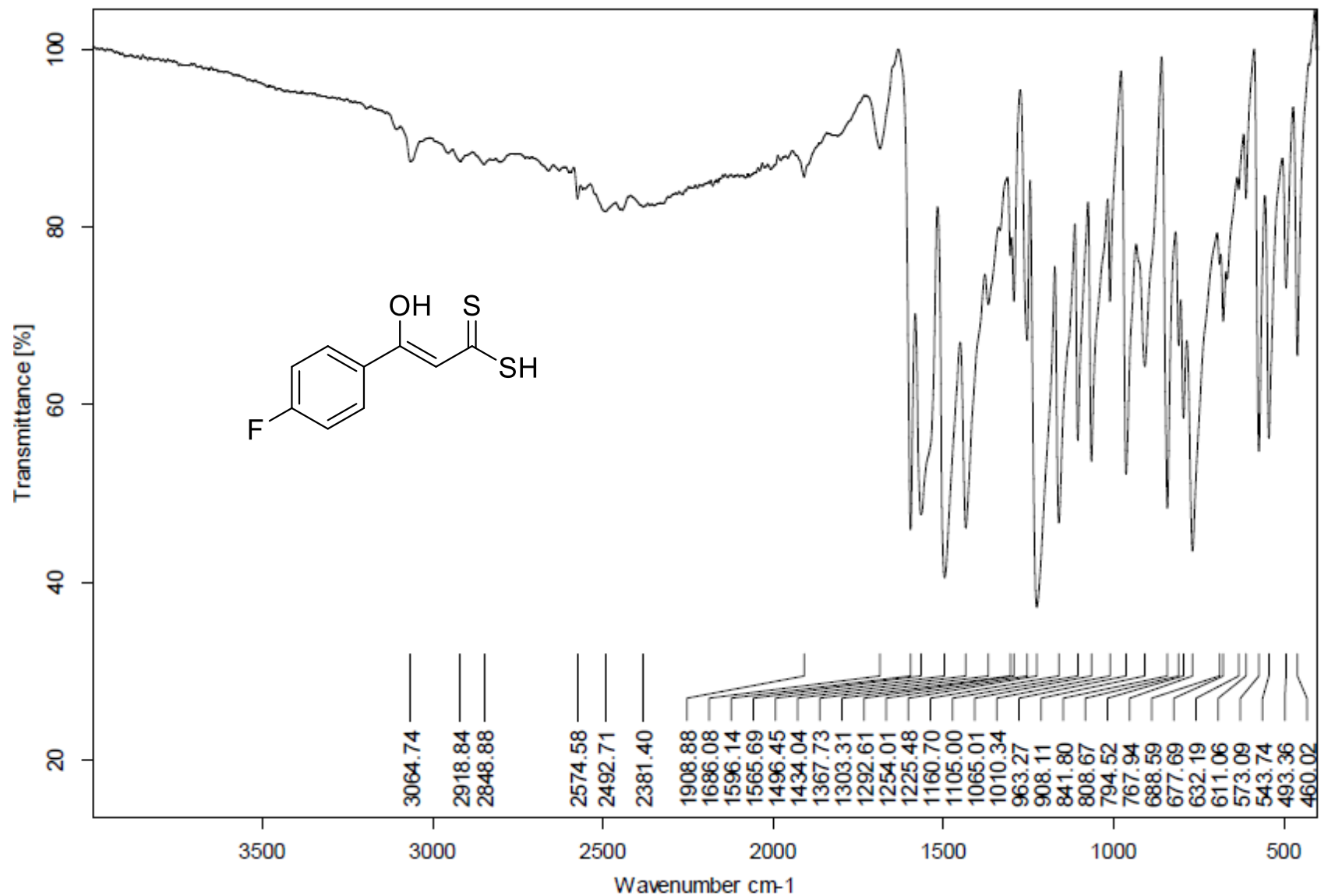
Unsaturation Number: 0.0 .. 40.0 (Fracti...



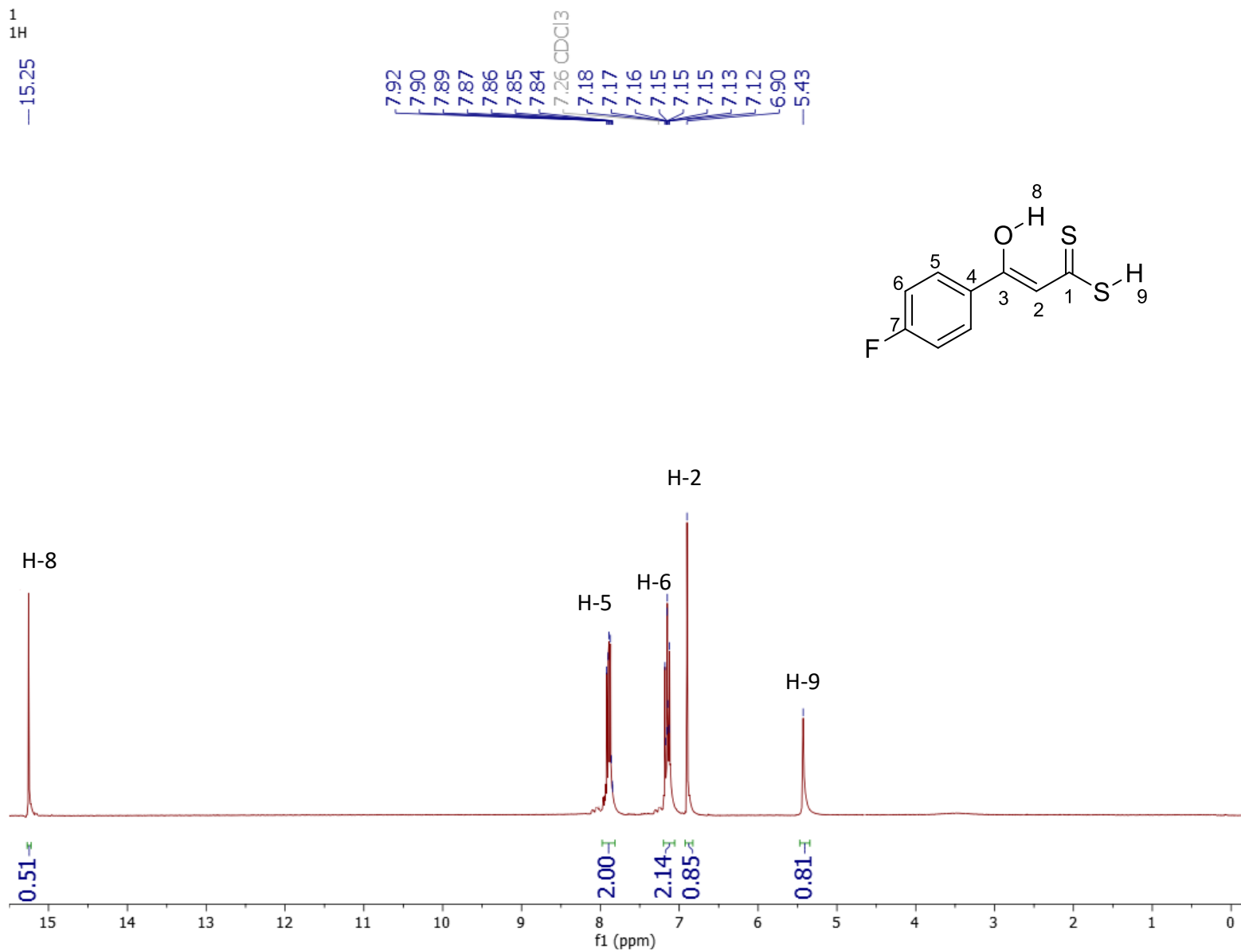
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
222.00401	49082.68	222.00473	-0.72	-3.24	<sup>12</sup> C <sub>10</sub> <sup>1</sup> H <sub>8</sub> <sup>14</sup> N <sub>1</sub> <sup>16</sup> O <sub>1</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

Anexo 24. Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-(4-cianofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (49f)

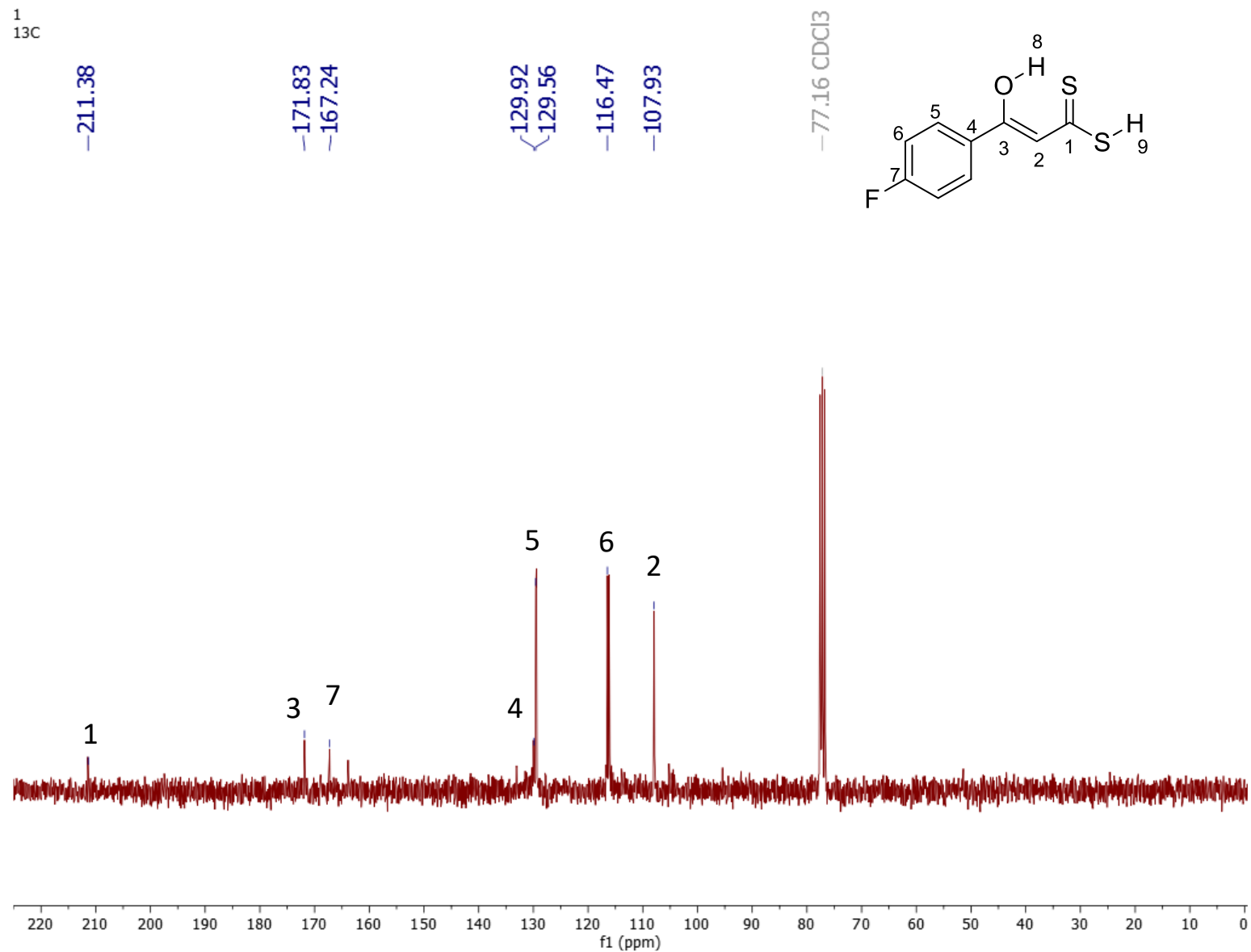




Anexo 25. Espectro de IR del Ácido 3-(4-fluorofenil)-3-hidroxiprop-2-enoditioico (49g)



Anexo 26. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-fluorofenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (**49g**)



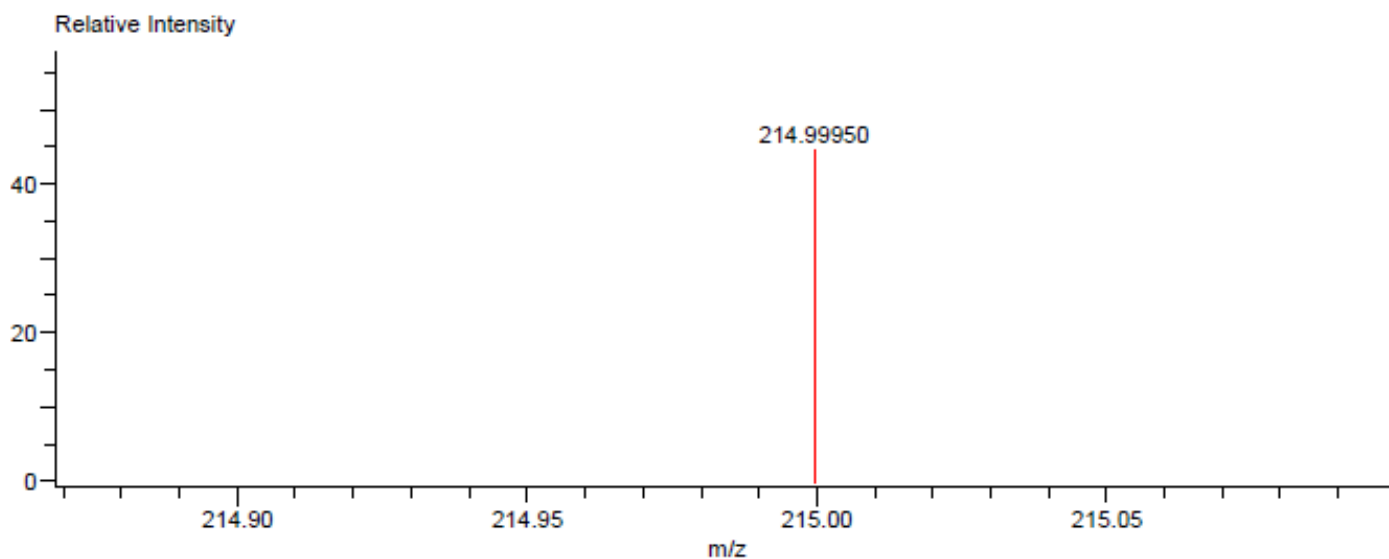
Anexo 27. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-fluorofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (49g)

Data:U 4087  
 Sample Name:Dr. Roberto Martinez/Rosa Ma Cahvez  
 Description:  
 Ionization Mode:ESI+  
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];

Acquired:11/22/2019 12:10:39 PM  
 Operator:AccuTOF  
 Mass Calibration data:Cal Peg 600  
 Created:11/22/2019 12:49:00 PM  
 Created by:AccuTOF

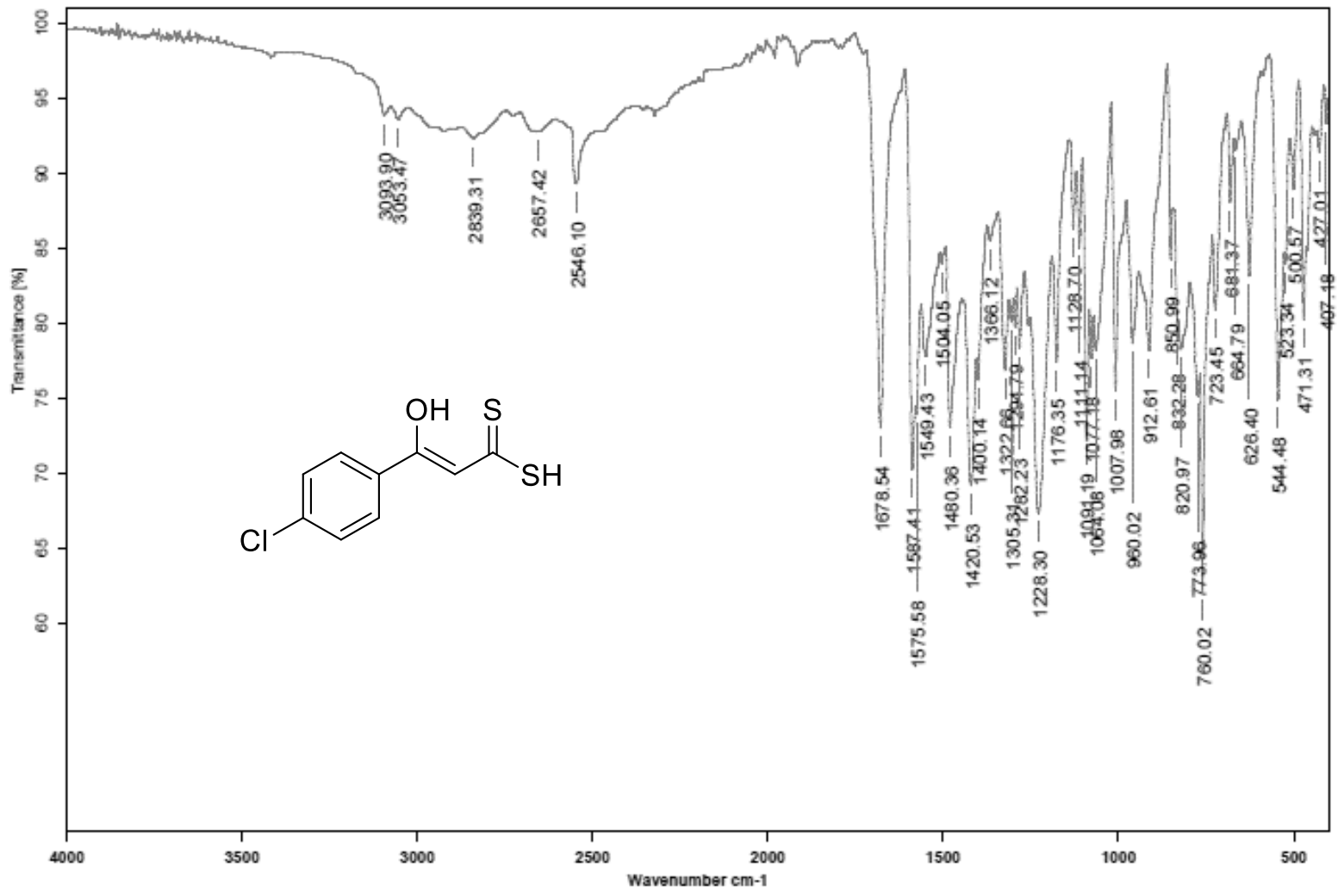
Charge number:1 Tolerance:5.00(mmu)  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 9, <sup>1</sup>H:0 .. 65, <sup>19</sup>F:1 .. 1, <sup>16</sup>O:1 .. 4, <sup>32</sup>S:0 .. 2

Unsaturation Number:0.0 .. 1000.0 (Fr...

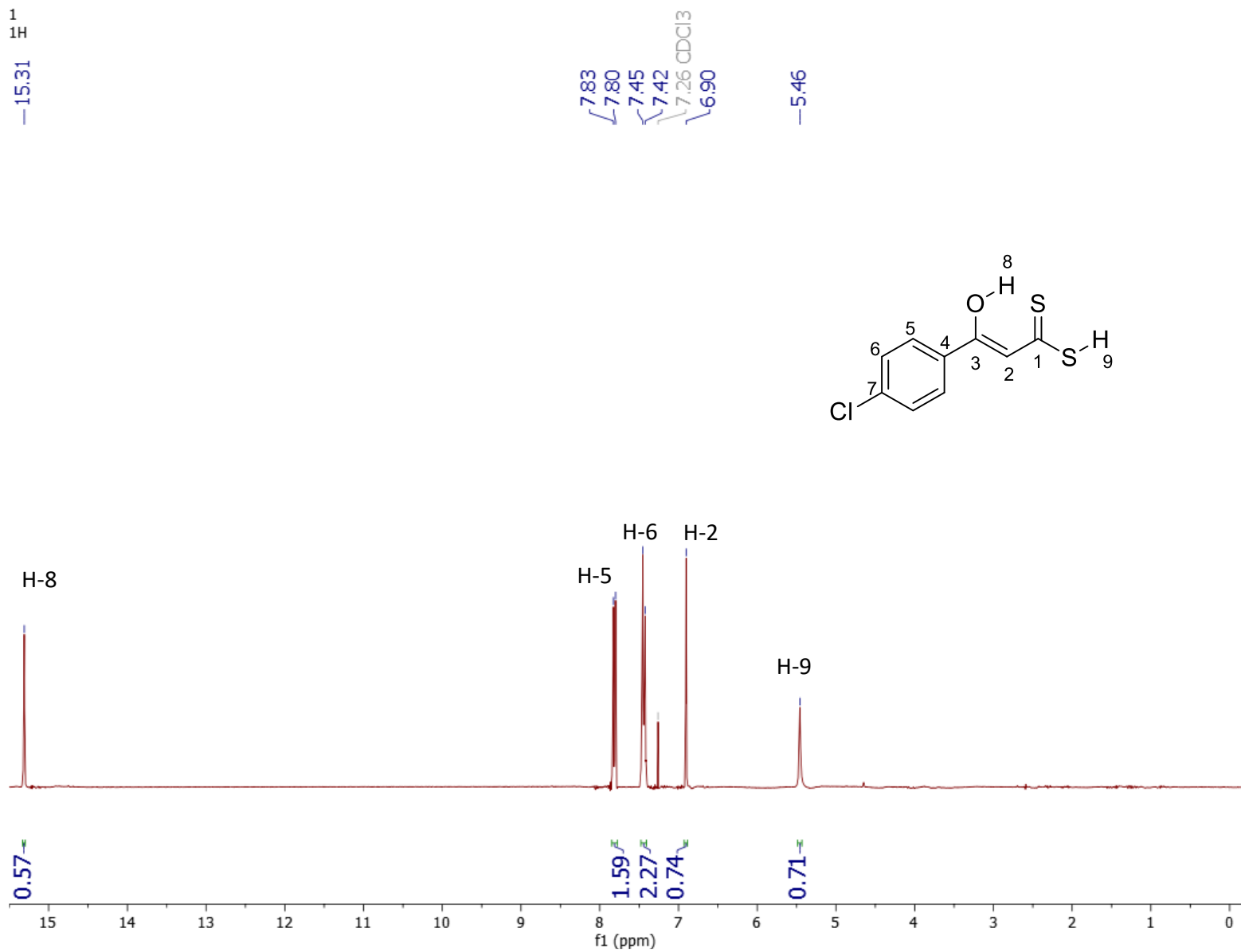


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
214.99950	14451.56	215.00006	-0.56	-2.62	<sup>12</sup> C <sub>9</sub> <sup>1</sup> H <sub>8</sub> <sup>19</sup> F <sub>1</sub> <sup>16</sup> O <sub>1</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

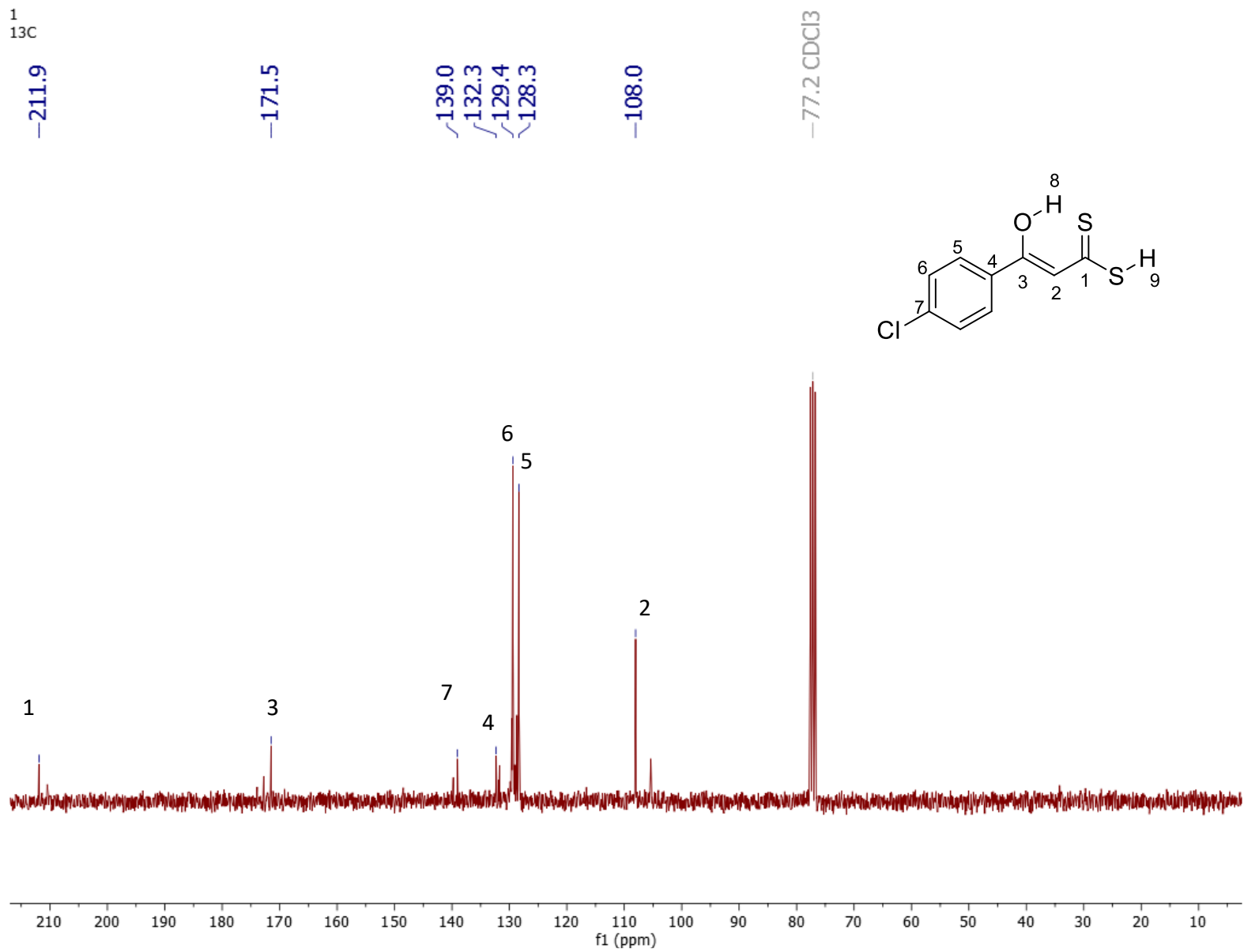
**Anexo 28.** Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-(4-fluorofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (**49g**)



Anexo 29. Espectro de IR (ATR) del Ácido 3-(4-clorofenil)-3-hidroxiprop-2-enodioico (49h)



Anexo 30. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (**49h**)



Anexo 31. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (**49h**)

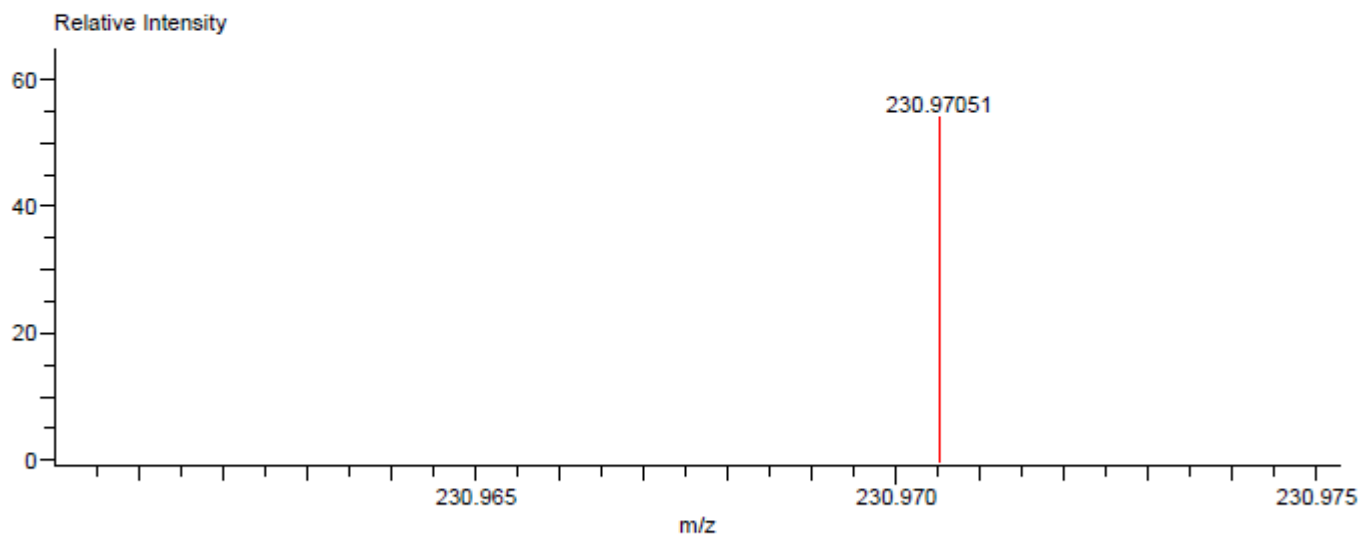
Data:U4090  
 Sample Name:Dr. Roberto Martinez/Rosa Ma Cahvez  
 Description:  
 Ionization Mode:ESI+  
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];

Acquired:11/22/2019 12:27:09 PM  
 Operator:AccuTOF  
 Mass Calibration data:Cal Peg 600  
 Created:11/22/2019 1:43:13 PM  
 Created by:AccuTOF

Charge number:1  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 9, <sup>1</sup>H:0 .. 8, <sup>35</sup>Cl:0 .. 1, <sup>37</sup>Cl:0 .. 0, <sup>16</sup>O:0 .. 1, <sup>32</sup>S:0 .. 2

Tolerance:60.00(mmu)

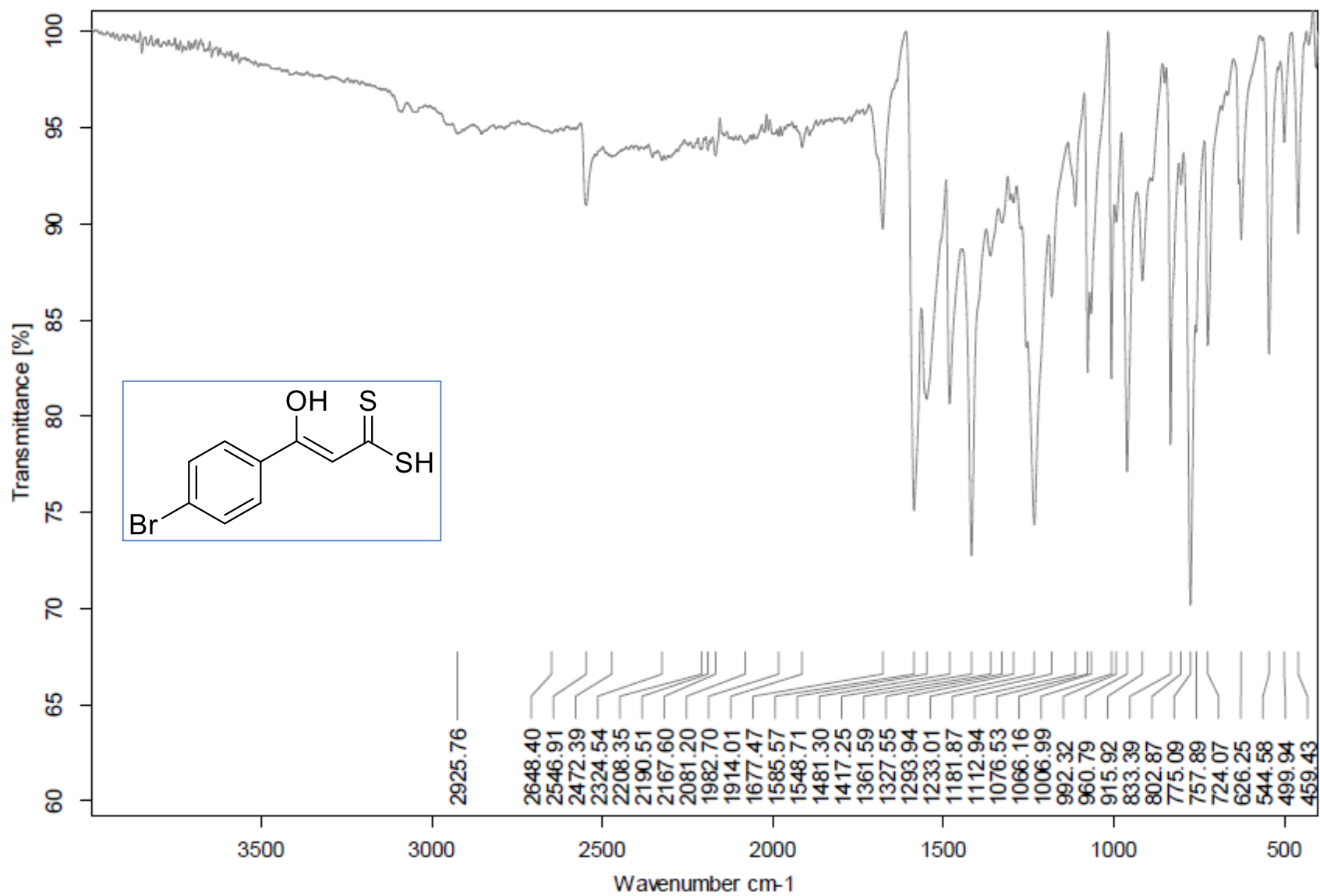
Unsaturation Number:0.0 .. 1000.0 (Fr...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
230.97051	15357.16	230.97051	0.00	0.00	<sup>12</sup> C <sub>9</sub> <sup>1</sup> H <sub>8</sub> <sup>35</sup> Cl <sub>1</sub> <sup>16</sup> O <sub>1</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

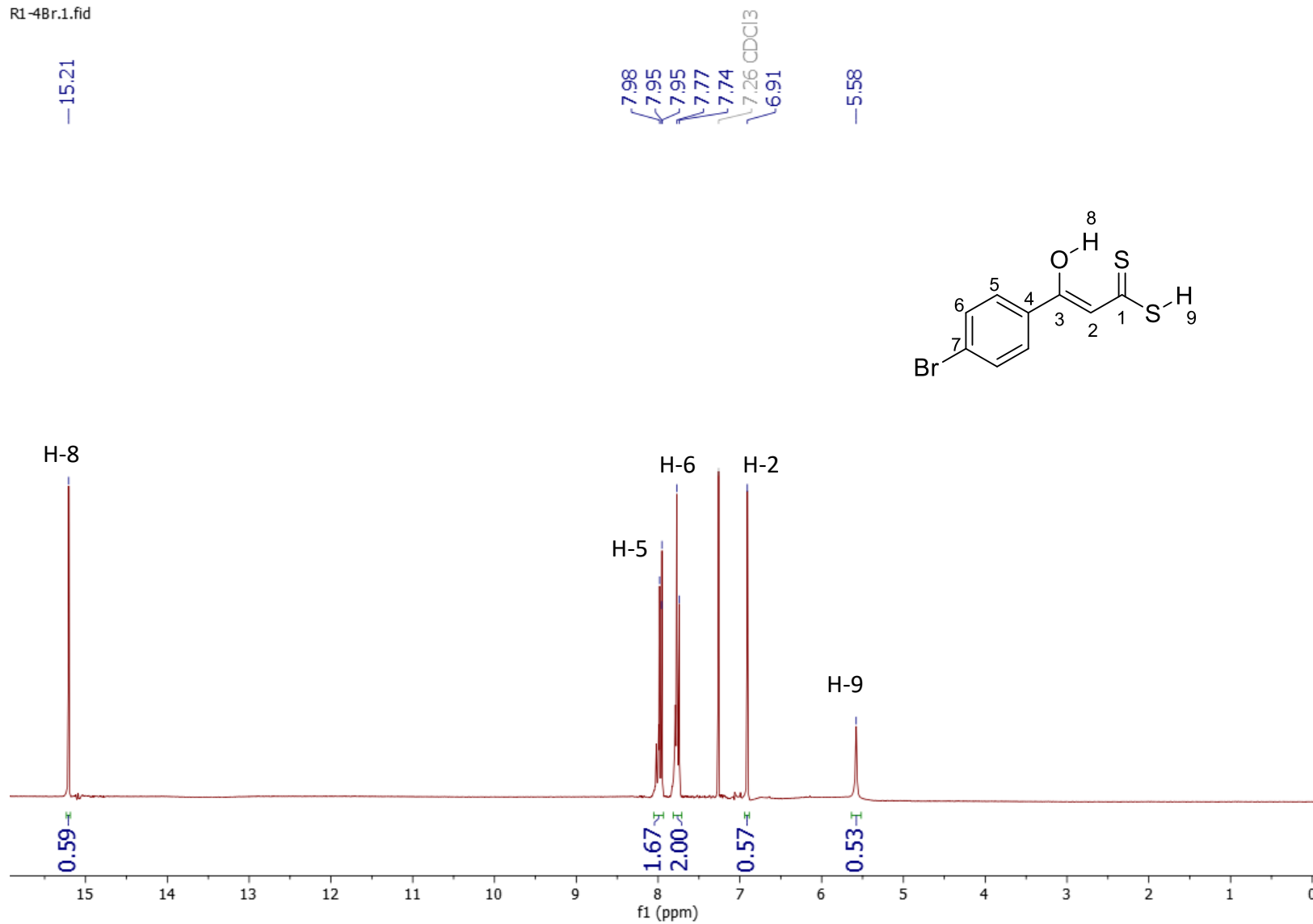
**Anexo 32.** Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (**49h**)



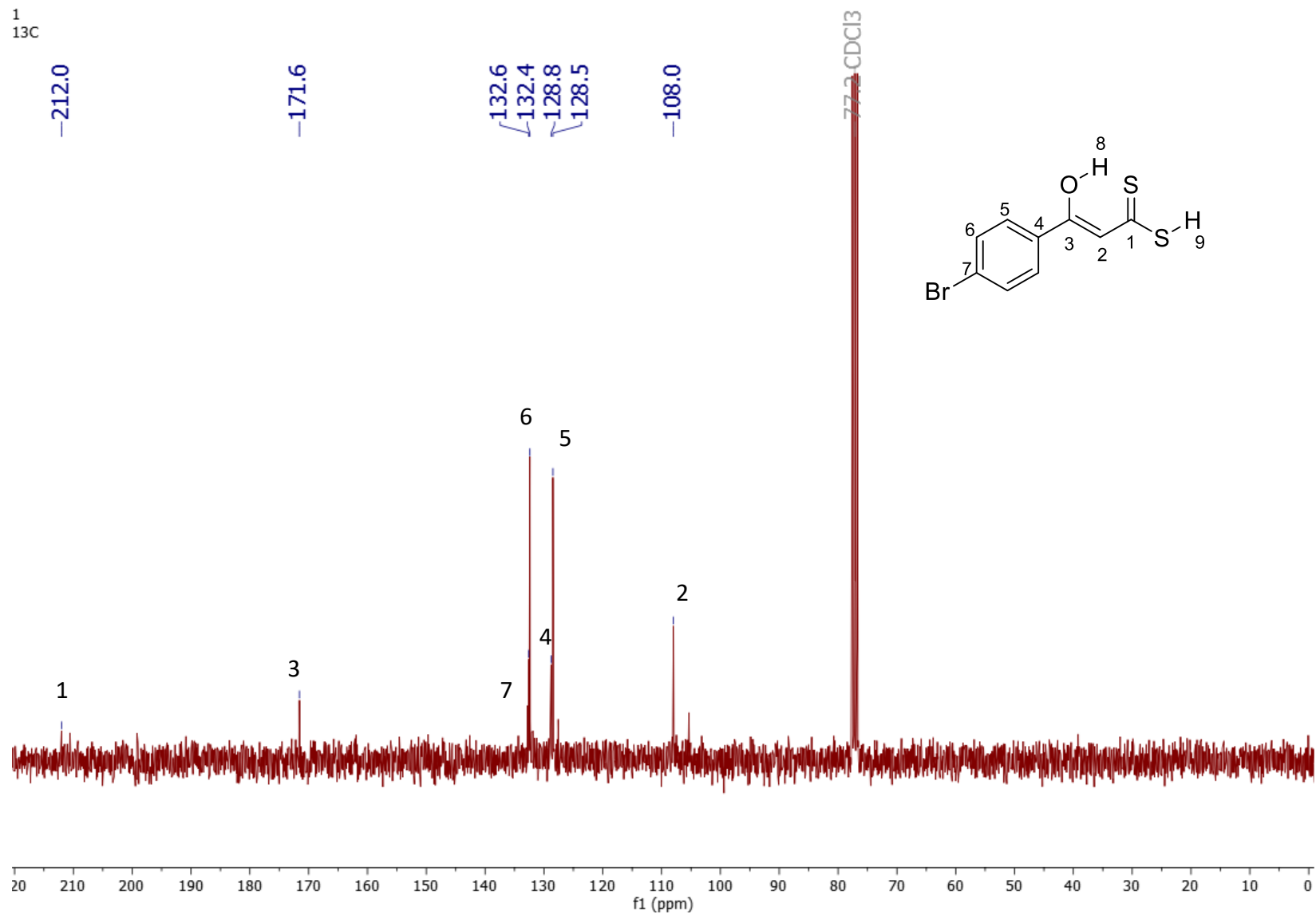


**Anexo 33.** Espectro de IR (ATR) del Ácido 3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (**49i**)

R1-4Br.1.fid



Anexo 34. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (49i)



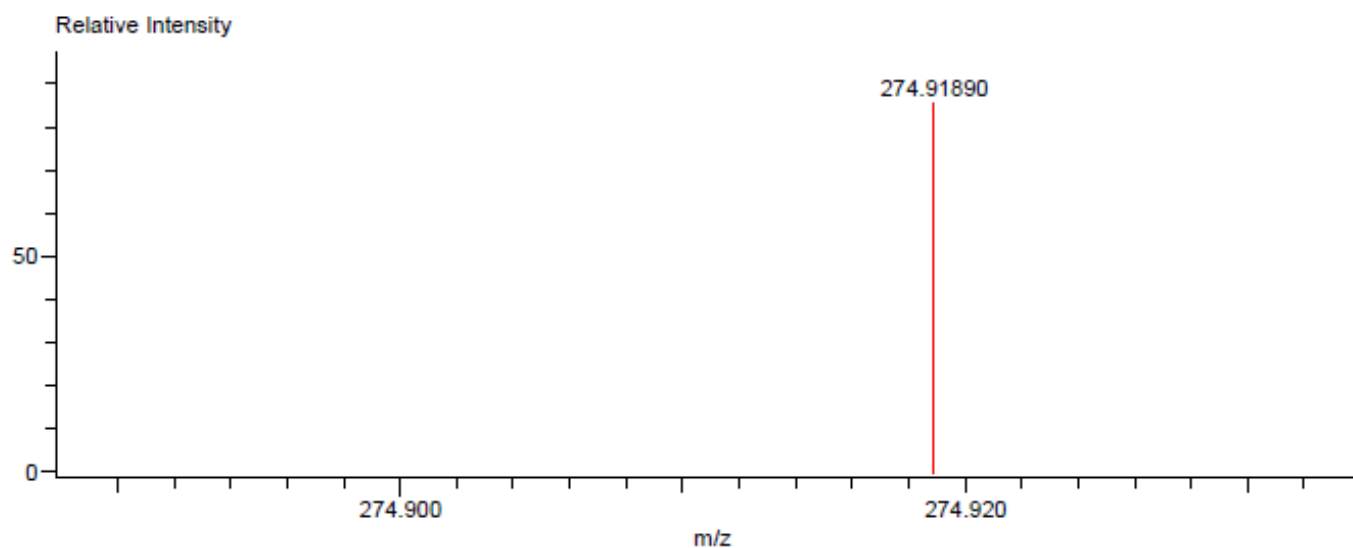
Anexo 35. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (49i)

Data:U-3851 R1-4Br-ac  
 Sample Name:Martinez Roberto  
 Description:  
 Ionization Mode:ESI+  
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];

Acquired:10/24/2019 3:22:46 PM  
 Operator:AccuTOF  
 Mass Calibration data:Cal\_Peg\_600  
 Created:11/27/2019 2:52:00 PM  
 Created by:AccuTOF

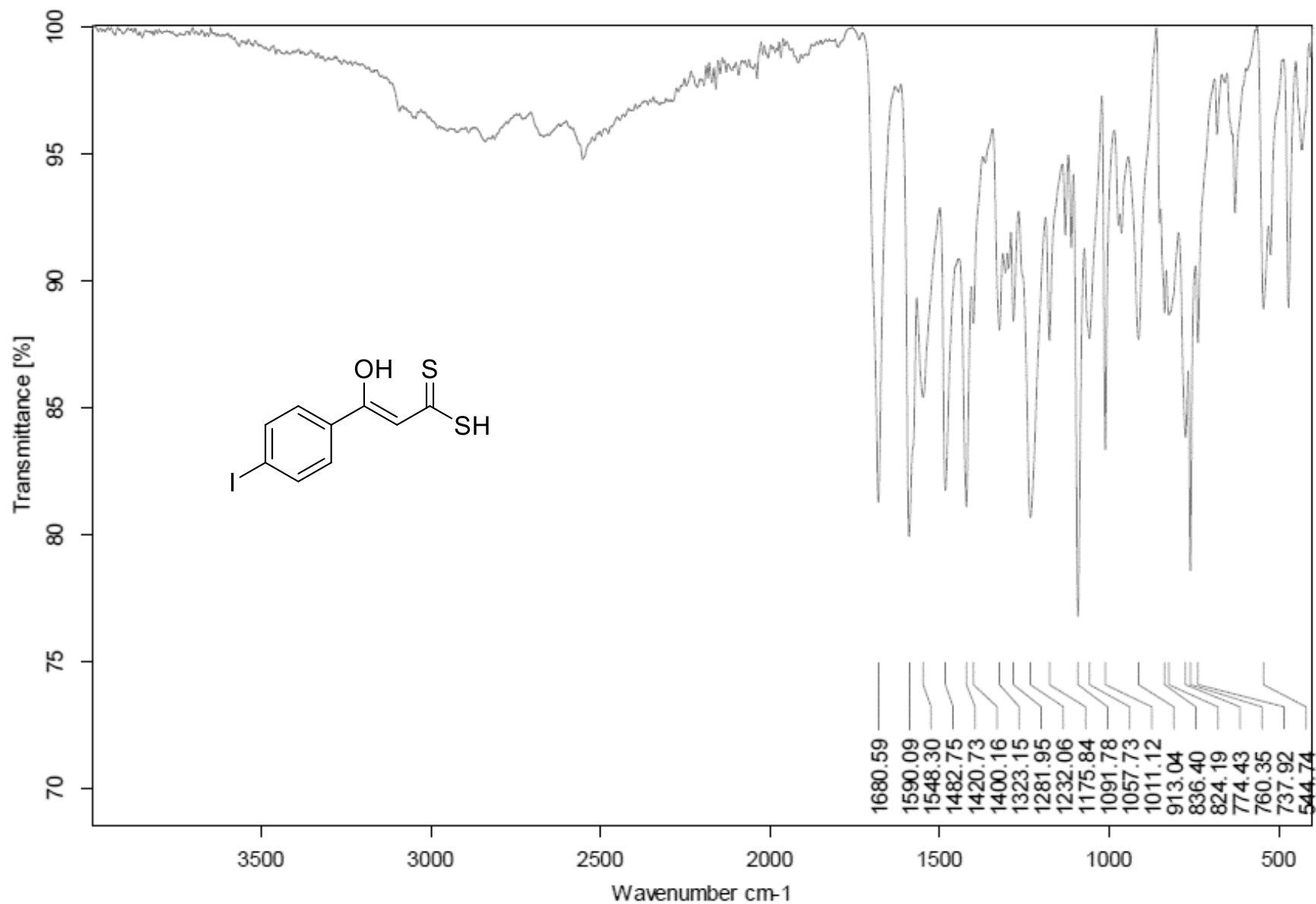
Charge number:1  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 9, <sup>1</sup>H:0 .. 8, <sup>79</sup>Br:0 .. 1, <sup>14</sup>N:0 .. 0, <sup>16</sup>O:0 .. 1, <sup>32</sup>S:0 .. 2  
 Tolerance:20.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 40.0 (Fracti...

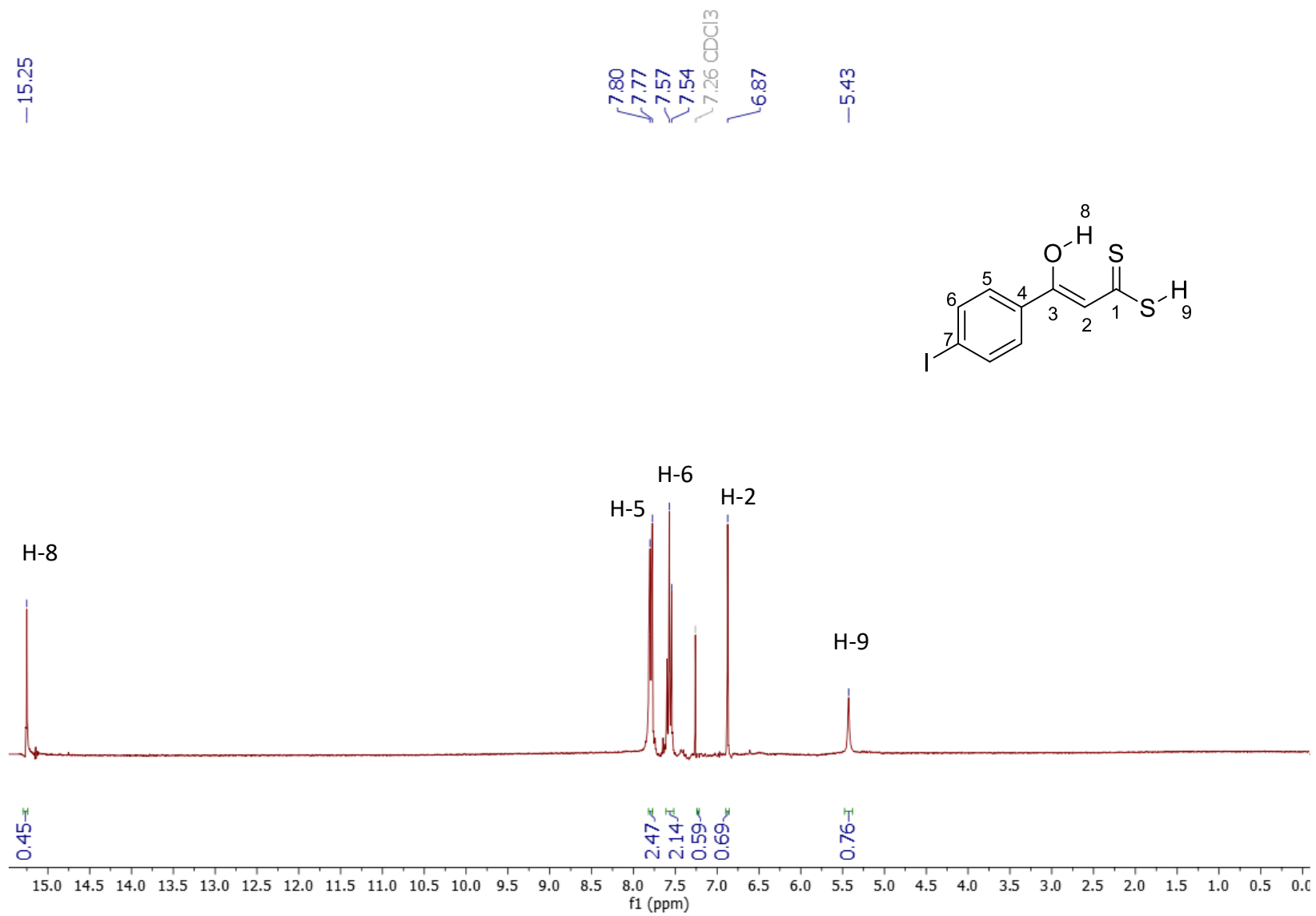


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
274.91890	61745.09	274.91999	-1.09	-3.98	<sup>12</sup> C <sub>9</sub> <sup>1</sup> H <sub>8</sub> <sup>79</sup> Br <sub>1</sub> <sup>16</sup> O <sub>1</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

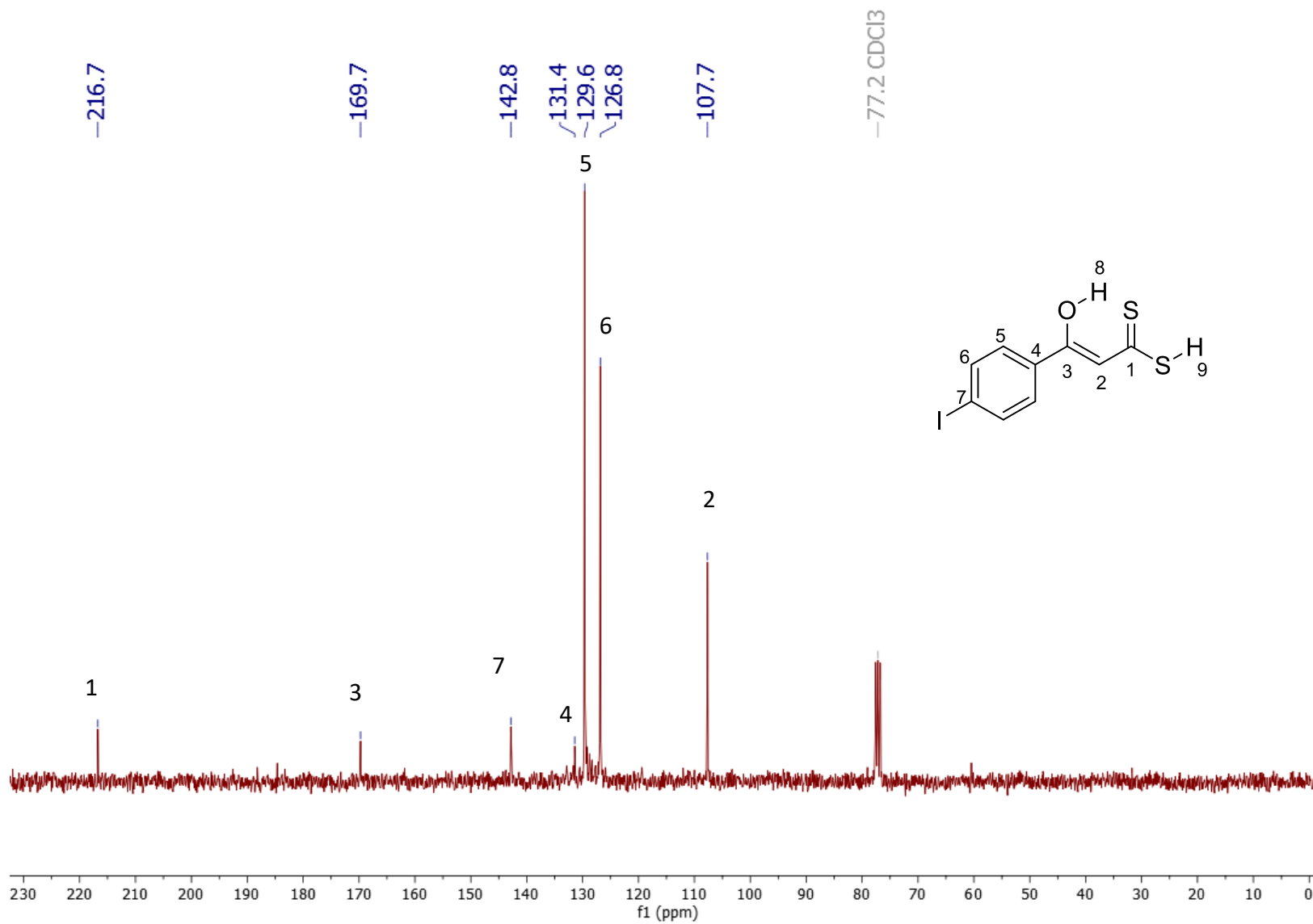
**Anexo 36.** Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (**49i**)



Anexo 37. Espectro de IR (ATR) del Ácido 3-(4-yodofenil)-3-hidroxirop-2-enodioico (49j)



Anexo 38. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido 3-(4-yodofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (49j)



Anexo 39. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del Ácido 3-(4-yodofenil)-3-hidroxi-prop-2-enoditioico (49j)

Data:U 4089

Sample Name:Dr. Roberto Martinez/Rosa Ma Cahvez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];

Acquired:11/22/2019 12:22:45 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:11/22/2019 1:39:04 PM

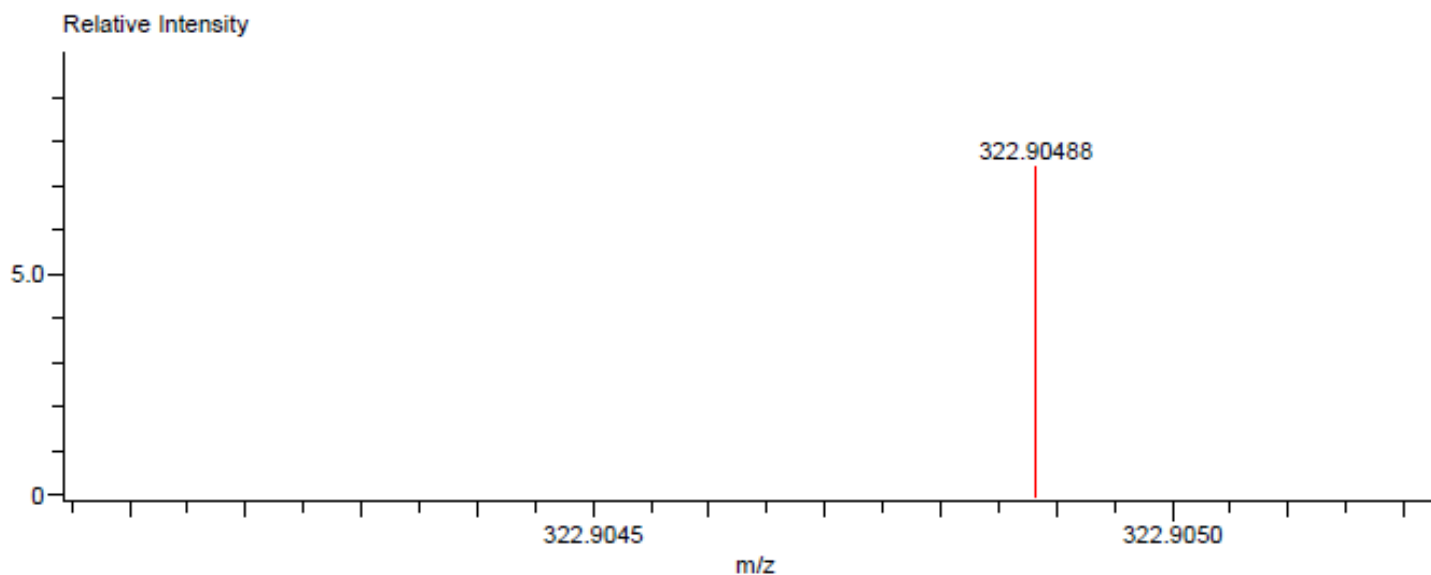
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:60.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 1000.0 (Fr...

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 9, <sup>1</sup>H:0 .. 8, <sup>127</sup>I:0 .. 1, <sup>14</sup>N:0 .. 0, <sup>16</sup>O:0 .. 1, <sup>32</sup>S:0 .. 2, <sup>118</sup>Sn:0 .. 0, <sup>119</sup>Sn:0 .. 0, <sup>120</sup>Sn:0 .. 0



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
322.90488	300.57	322.90612	-1.24	-3.85	<sup>12</sup> C <sub>9</sub> <sup>1</sup> H <sub>8</sub> <sup>127</sup> I <sub>1</sub> <sup>16</sup> O <sub>1</sub> <sup>32</sup> S <sub>2</sub>

Anexo 40. Espectro de Masas de Alta Resolución del Ácido 3-(4-yodofenil)-3-hidroxi-prop-2-enodioico (49j)



# (2Z)-3-Hydroxy-3-(4-R-Phenyl)-Prop-2-Enedithioic Acids as New Antituberculosis Compounds

Gustavo Pretelín-Castillo<sup>1</sup>  
 Mayra Silva Miranda<sup>2,3</sup>  
 Clara Espitia<sup>2,3</sup>  
 Rosa María Chávez-Santos<sup>1</sup>  
 Abel Suárez-Castro<sup>4</sup>  
 Luis Chacón-García<sup>4</sup>  
 Rodrigo Aguayo-Ortiz<sup>5</sup>  
 Roberto Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Cd. México, 04510, México; <sup>2</sup>Catedrática CONACYT adscrita al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Cd. México, 04510, México; <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Inmunología, Ciudad Universitaria, Cd. México, 04510, México; <sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-1, Ciudad Universitaria, Morelia Michoacán, 58030, México; <sup>5</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Cd. México, 04510, México

**Background:** Tuberculosis is an infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. Compounds including a sulfur-containing scaffold have been shown to be key scaffolds in various antituberculosis agents. Interestingly, the 3-hydroxy-3-phenyl-prop-2-enedithioic acids **11a-j** have, to the best of our knowledge, not been previously described as antituberculosis agents.

**Purpose:** In the present study, we investigated the role of substituents attached to the phenyl ring of a 3-hydroxy-3-phenyl-prop-2-enedithioic acid scaffold (compounds **11a-j**) in inhibiting the growth of *M. tuberculosis* strain H37Rv.

**Methods:** (Z)-3-hydroxy-3-(4-R-phenyl)-prop-2-enedithioic acids **11b-j**, with R groups including various electron-donating or electron-withdrawing groups, were designed by structurally modifying the lead compound **11a**. The syntheses of **11a-j** involved each one-step procedure starting from the corresponding substituted acetophenone. Compounds **11a-j** were tested against *M. tuberculosis* strain H37Rv to evaluate their bacterial growth inhibitory activities. ADMET profiles were predicted by employing three different methods. In addition, molecular docking studies were carried out, based on the molecular similarities of the synthesized compounds with ethionamide (**5**), on the active site of the *M. tuberculosis* H37Rv (3R)-hydroxyacyl-ACP (HadAB) dehydratase heterodimer.

**Results:** The antituberculosis activities of compounds **11a-j** could be explained in terms of the presence of electron-donating or electron-withdrawing substituents on the aromatic ring of the substituted 3-hydroxy-3-phenyl-prop-2-enedithioic acid core. The activity and selectivity index (SI) value of (Z)-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)-prop-2-enedithioic acid **11e** suggested that this compound could be used for the design of novel antituberculosis agents. Most of the synthesized molecules showed an acceptable ADME profile and a low probability of being toxic. Docking studies of **11d** and **11e** showed them forming hydrogen bonds with the ACys61 residue of the HadAB enzyme.

**Conclusion:** Our results suggested that the antituberculosis compound **11e** could be used for the design of novel antituberculosis agents.

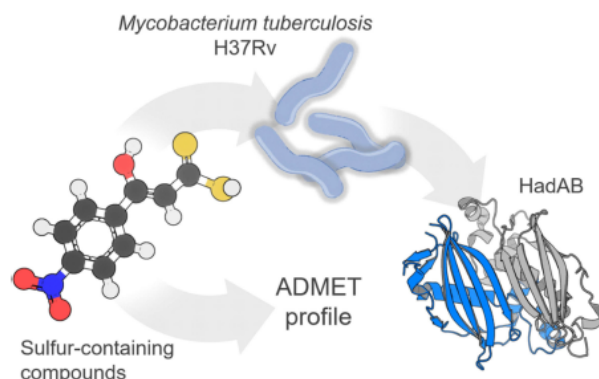
**Keywords:** synthesis, 3-hydroxy-3-(4-R-phenyl)-prop-2-enedithioic acids, antituberculosis agents, docking, theoretical ADME

## Introduction

*Mycobacterium tuberculosis* is a pathogenic bacterium that is well known to be the causative agent of tuberculosis. The World Health Organization (WHO) has pinpointed this pathogen as one of the two leading causes worldwide of higher mortality resulting from an infectious agent. The increase in the number of cases of tuberculosis, the presence of *M. tuberculosis* strains showing resistance to first-line drugs, and the adverse effects or long treatment durations of current

Correspondence: Roberto Martínez  
 Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Cd. México, 04510, México  
 Tel +52 55 56224441  
 Fax +52 55 56162217  
 Email robmar@unam.mx

## Graphical Abstract



tuberculosis medications have increased concerns about the ability to find a safe and effective treatment for this disease but at the same time have led researchers in medicinal chemistry to search for new compounds that are more effective against this disease.<sup>1</sup> Most drugs launched in the last decade were derived by modifying known drugs or lead structures, and structural modification has been shown to be an effective approach for understanding the mechanism of drug action and for designing better drugs.<sup>2,3</sup>

A sulfur-containing scaffold, for example, is a key structural feature present in most compounds displaying antituberculosis activity (Figure 1). Several drugs targeting various diseases contain this scaffold, including the anticoagulant agent rivaroxaban **1**,<sup>4</sup> the prostate cancer drug enzalutamide **2**,<sup>5</sup> and disulfiram **3**, which is used for the treatment of alcohol abuse.<sup>6</sup> Compounds containing a sulfur-containing scaffold and displaying antituberculosis activity, however, have not been reported on much, but with examples that have been reported including

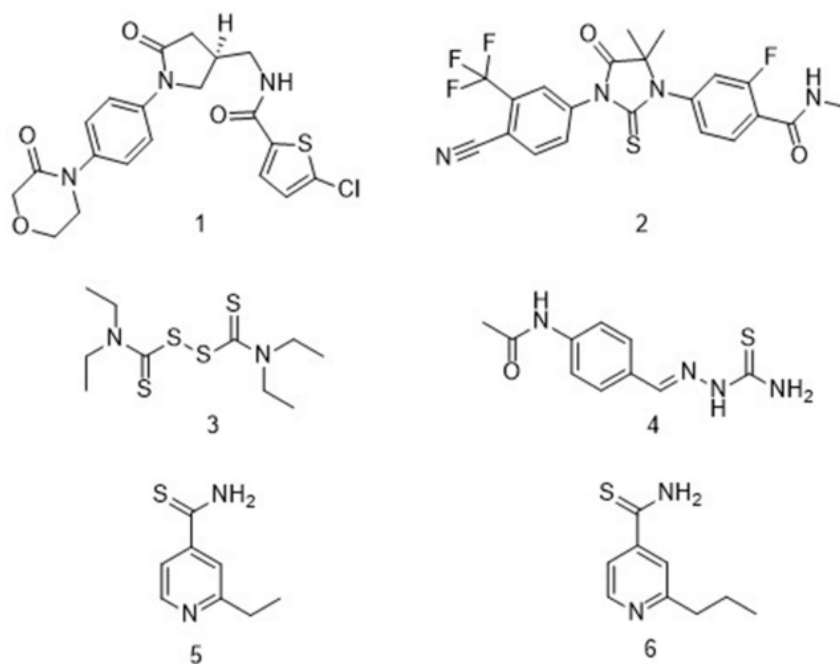


Figure 1 Examples of compounds that both contain a thio scaffold and exhibit biological activity.

thioacetazone **4**, ethionamide **5**, and prothionamide **6** as prodrugs.<sup>7</sup> In the present study, we investigated the role of substituents attached to the phenyl ring of a 3-hydroxy-3-phenyl-prop-2-enedithioic acid scaffold (to form compounds **11a–j**) in inhibiting the growth of *M. tuberculosis* strain H37Rv. Compounds **11a–j** have, to the best of our knowledge, not been previously described as antituberculosis agents—but some of them were found in the current work to display antituberculosis activity.

## Materials and Methods

Melting points were measured for the compounds in open capillaries using a Mel-Temp apparatus. <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded using a 300 MHz Jeol Eclipse spectrometer with the samples dissolved in deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) solutions containing tetramethylsilane (TMS) as an internal standard ( $\delta = 0$  ppm), and <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded at 75 MHz using the same instrument. Regarding these NMR spectra, the chemical shift ( $\delta$ ) values are reported in parts per million (ppm), and the peak shapes are indicated as s for singlet, d for doublet, t for triplet, q for quartet, m for multiplet, and bs for broad signal. The coupling constant (*J*) values are reported in hertz (Hz). IR spectra were obtained using a Magna-IR spectrometer. Mass spectra were recorded using a Jeol AccuTOF Direct Analysis in Real Time (DART) spectrometer with time-of-flight detection for low- and high-resolution measurements. Flash column chromatography was carried out using silica gel 60 (230–400 mesh ASTM) from Macherey–Nagel GmbH & Co. Reactions were monitored using thin-layer chromatography (TLC). The TLC plates were visualized using a dual short-wavelength/long-wavelength UV lamp or by staining them with an ethanol solution of potassium permanganate, vanillin, or *p*-anisaldehyde. The reagents **12a–j**, sodium hydride, and carbon disulfide were used as obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, as commercial raw materials.

## Chemistry

### General Procedure for Preparing (Z)-3-Hydroxy-3-(4-R-Phenyl)-Prop-2-Enedithioic Acids **11a–j**

Ten samples of ice-bath-cooled NaH (12.0 mmol) suspensions in pre-dried THF (5.0 mL) were prepared, and to each sample was added, dropwise, a THF solution (2.0 mL) of a different acetophenone **12a–j** (4 mmol). Each resulting mixture was stirred for 30 minutes, and then to each mixture was added, dropwise, a THF solution (1.0 mL) of CS<sub>2</sub> (6 mmol)). Each resulting mixture was

stirred for over 12–15 hours at room temperature. In each case, after the starting material was consumed (as monitored using TLC), the crude reaction product was poured into a water–ice suspension and extracted three times with ethyl acetate. The resulting aqueous phase was acidified with 2 N sulfuric acid to a pH of 2 and then extracted three times with ethyl acetate, while the resulting organic layer was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Removal of the solvent under reduced pressure gave an amorphous solid that was crystallized from an appropriate solvent.<sup>8</sup> Spectroscopic data collected from each of the resulting compounds **11a–j** fully supported their expected structures (see Spectral Data in the [Supplementary Information](#)).<sup>9,10</sup>

## Antitubercular Activity Evaluation

### Preparations of Stock Solutions

DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) stock solutions of the synthesized compounds at a concentration of 10 mg/mL were prepared for carrying out in each case the resazurin microtiter assay (REMA). Each compound was diluted in a Middlebrook 7H9 broth medium (Difco, Sparks, MD, USA). Stock solutions for each of the reference compounds at 64  $\mu$ g/mL were prepared and filtered employing a 0.22  $\mu$ m-diameter pore membrane (Millipore, Darmstadt, Germany). The prepared stock solutions were stored at –20°C prior to their evaluation.

### Cell Culture

The Vero cell line (African green monkey kidney) from American Type Culture Collection (ATCC) was employed to carry out the cytotoxicity assays. RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NE, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and nonessential amino acids (Gibco) was used to culture these cells.

### Cytotoxicity Assay

A total of 10,000 Vero cells were placed in a 96-well plate and then incubated in an RPMI medium (100  $\mu$ L) for 24 h. Then, the plate was washed and fresh medium containing the synthesized compounds at different concentrations was added to it. Each compound was incubated under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 48 h at 37°C. A 10  $\mu$ L MTT (Sigma-Aldrich) solution (5 mg/mL in sterile PBS) was added to each well, and the resulting mixtures were incubated for another 4 h. The medium was then removed, and a volume of 100  $\mu$ L of DMSO was used to solubilize the formazan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The formazan absorbance

(ABS) at a wavelength of 570 nm was measured, and cytotoxicity was calculated as %toxicity =  $(1 - (\text{ABS experimental}/\text{ABS control})) \times 100$ . Controls were cells without treatment but following the same procedures as described above.<sup>11</sup>

### *M. tuberculosis* Inocula Preparation

A 7H9–glycerol–10% ADC–0.01% tyloxapol medium was used to cultivate *M. tuberculosis* strains H37Rv, H37Ra (virulent and non-virulent reference strains, respectively) and 209 (clinical isolated strain, rifampicin resistant) at 37°C until an OD<sub>600nm</sub> of 0.4 was reached.

### Antimicrobial Susceptibility Test Using the Resazurin-Based Microtiter Plate Assay (REMA)

The REMA procedure used in the current work was developed based on a microplate alamar Blue assay (MABA) used in a previous work for determining antimycobacterial activities of various compounds.<sup>12</sup> In brief, the outer wells of a 96-well plate were each filled with 200 µL of sterile PBS to prevent dehydration from occurring during the long incubation period (8 days). Here, rifampicin (RIF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was included in each plate as a reference drug (16–0.001 µg/mL serial two-fold dilutions), DMSO, DMSO+*Mtb*, medium, media +*Mtb*, and compound alone were added as control to validate the plate. The compounds were evaluated at various concentrations, ranging from 0.98 µg/mL to 250 µg/mL and in triplicate. After 6-day incubations of the plates, a volume of 30 µL of 0.01% (weight/volume) resazurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) instead of MABA was added to each well, and the plates were incubated for additional 2 days. Visual inspection was done to determine the color of each well, with blue interpreted as a lack of cells growth and pink as growth of cells. The MIC value for each experiment was defined as the lowest concentration of the compound in those wells where the blue color was observed.

### Selectivity Index (SI)

This index was calculated by comparing the IC<sub>50</sub> values obtained in Vero cells with the bacteria MIC<sub>100</sub> determined by performing the REMA.

### Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

Following the methodology described in a previous study, some of the compounds were selected to determine their respective MBCs. Here, MBC was defined as the minimum extract concentration that did not cause a color shift

in cultures reincubated in fresh medium. Briefly, 5 µL volumes of REMA duplicate bacteria suspensions were transferred to a new microplate containing 195 µL of fresh culture medium in each well. Subsequently, the microplates were incubated as described previously for the REMA.<sup>13</sup>

## Physicochemical Properties and ADMET Prediction

The ADME-Tox filtering tool FAF-Drugs4 was used to evaluate the physicochemical properties of the synthesized compounds.<sup>14</sup> The ADMET profiles were predicted by employing the consensus of the results of vNN-ADMET,<sup>15</sup> admetSAR 2.0 (unrestricted applicability domain),<sup>16</sup> and pkCSM.<sup>17</sup>

## In silico Molecular Docking Studies Validation of the Docking Procedure

The complex of 4RLU with 2',4,4'-trihydroxychalcone (HCC) was selected for docking studies and done so due to 4RLU having been identified as the protein receptor for HadAB.<sup>33</sup> To validate the docking process, the co-crystallized ligand (HCC) was re-docked into the active site, and an RMSD value of 3.0 Å between the cocrystallized structure and the redocked structure was obtained.

### Ligand Preparation

The structures of compounds 11a–j were each modeled in their two tautomeric forms (keto and enol) as 2D structures by using the software ChemBio Draw Ultra 12.0 and were converted into 3D structures in MDL format.<sup>18</sup> Their protonated states were then modeled using the online tool Chemicalize.<sup>19</sup> The geometries of the compounds and co-crystallized ligand were calculated at the density functional B3LYP level using the 6-31G (d, p) basis set in the Gaussian 16 software package.<sup>20</sup> Finally, using Autodock Tools, the ligands were prepared by including in them polar hydrogens and Gasteiger charges as well as rotatable (ie, single) bonds that were assigned by default, and a PDBQT file was generated.<sup>21</sup>

### Receptor Preparation

The X-ray coordinates of the HadAB receptor were retrieved from the Protein Data Bank (PDB code:4RLU).<sup>22</sup> Molecular water was removed from the crystallographic structure, and the final preparation and minimization of the receptor structure was carried out by deploying the Dock Prep module of Chimera software<sup>23</sup>

using the AMBER-ff14SB force field. Lastly, Kollman charges were added to the obtained structure by using Autodock Tools, and a PDBQT file was generated.

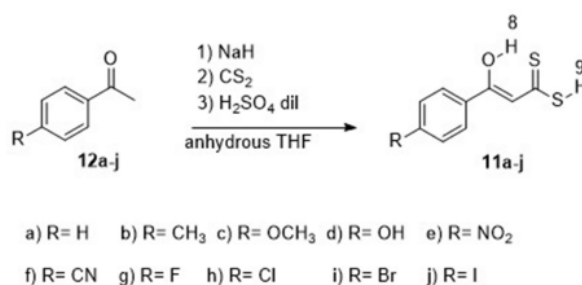
### Docking Calculations

Rigid receptor molecular docking was carried out in Autodock4 using the Lamarckian genetic algorithm.<sup>24</sup> We used grid maps with  $70 \times 70 \times 70$  points in the active site of the receptor with the coordinates  $x=0.272$ ,  $y=22.253$ ,  $z=-30.833$ , and a grid-point spacing of 0.375 Å. AD4.dat parameters were applied to all the ligands. The parameters used were 10 runs, a population size of 100, and a run-termination criterion of a maximum of 27,000 generations or a maximum of 250,000 energy evaluations. The visualization and analysis of the nonbonded interactions as hydrogen bonds of the best poses were carried out using Discovery Studio Visualizer software.<sup>25</sup>

## Results and Discussion

### Chemistry

The desired 3-hydroxy-3-(4-R-phenyl)-prop-2-enedithioic acids **11a–j** (Scheme 1) were prepared with good yields by carrying out respective coupling reactions between carbon disulfide and the substituted acetophenones **12a–j** in the presence of sodium hydride in dry tetrahydrofuran.<sup>8</sup> The spectroscopic data of the **11a–j** products were fully consistent with their expected structures. Note that the <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra of these products showed the signals characteristic for their enol and not keto forms.<sup>9,10</sup>



Scheme 1 Synthetic route to compounds **11a–j**.

### Antitubercular Activity Evaluation

Compounds **11a–j** were evaluated as *M. tuberculosis* strain H37Rv growth inhibitors in 250 µg/mL–0.98 µg/mL serial two-fold dilutions (Table 1). These activities were compared with those of RIF, which is usually indicated for the treatment of *Mycobacterium* infections, including tuberculosis (TB).<sup>11–13</sup> First, we synthesized compound **11a** (R=H) and measured its antituberculosis minimal inhibition concentration (MIC) to be 62.5 µg/mL. Then, to examine the influence of electron-donating and electron-withdrawing groups on the antituberculosis activity, we synthesized compounds **11b** (R=CH<sub>3</sub>), **11c** (R=OCH<sub>3</sub>), and **11d** (R=OH). Surprisingly, **11b** did not inhibit the growth of *M. tuberculosis* cells (MIC=250 µg/mL). The compound resulting from replacing the 4-CH<sub>3</sub> substituent with the 4-OCH<sub>3</sub> group (**4c**) exhibited inhibition levels similar to those of **11a** (R=H) but with a lower SI [SI (**11a**)= 3.46 vs SI (**11c**)= 1.60].

Compound **11d**, generated by incorporating an -OH group at position 4 of the phenyl ring of compound **11a**,

Table 1 Anti-*M. tuberculosis* Effects and Cytotoxicity Levels of Compounds **11a–j**

Compound	R	REMA-Determined MIC <sub>100</sub> (µg/mL)	REMA-Determined MBC (µg/mL)	MTT-Determined IC <sub>50</sub> in Vero Cells (µg/mL)	Selectivity Index (SI)
<b>11a</b>	-H	62.5	ND	216	3.46
<b>11b</b>	-CH <sub>3</sub>	250	ND	221	0.88
<b>11c</b>	-OCH <sub>3</sub>	62.5	ND	100	1.60
<b>11d</b>	-OH	15.6	ND	101	6.47
<b>11e</b>	-NO <sub>2</sub>	7.8	31.25	255	32.69
<b>11f</b>	-CN	62.5	ND	>50	0.80
<b>11g</b>	-F	62.5	ND	443	7.09
<b>11h</b>	-Cl	15.6	ND	110	7.05
<b>11i</b>	-Br	62.5	ND	ND	ND
<b>11j</b>	-I	500	ND	381	0.762
Rifampin	–	0.06	ND	>1000	>16,666

Notes: Mtb: *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 reference strain. SI= IC<sub>50</sub>/MIC<sub>100</sub>.

Abbreviations: MIC<sub>100</sub>, minimal inhibition concentration; REMA, resazurin microtiter assay; MBC, minimal bactericidal activity; IC<sub>50</sub>, inhibitory concentration 50 (MTT assay in Vero cells).

showed an inhibitory activity four times that of **11a** and a toxicity level lower than that of **11a**; and compound **11e**, generated by incorporating an -NO<sub>2</sub> group at position 4 of the phenyl ring of compound **11a**, showed an even greater inhibitory activity – eight times that of **11a** – and was observed to be much less toxic [SI (**11a**)= 3.46 vs SI (**11e**) = 32.69]. Because the reduction in the aromatic nitro group in vivo produces hydroxylamine and nitrosamine,<sup>26</sup> both highly reactive and carcinogenic species, this group was replaced with an isosteric group, namely -CN, which produces fewer toxic compounds than to nitro compounds.<sup>27</sup> Unexpectedly, when the 4-NO<sub>2</sub> substituent was replaced with 4-CN (**11f**), the new compound exhibited inhibition levels similar to those of **11a** (R=H) but with a lower SI [SI (**11a**)=3.45 vs SI (**11f**) =0.80]. We also investigated the effects of halogen substituents on the antituberculosis activities by synthesizing compounds containing fluorine, chloro, bromo, and iodine groups at the 4 position of the phenyl ring. Compound **11g**, having a fluorine at position 4 of the phenyl group, exhibited an antituberculosis activity essentially the same as that of **11a** (MIC=62.50 µg/mL) but with lower toxicity [SI (**11a**)= 3.46 vs SI (**11g**)=7.09]. The inhibitory activity of compound **11h**, generated by the incorporation of a chlorine substituent at position 4 of the phenyl ring, was four times that of **11a**, and the compound was essentially equally toxic. In contrast, when 4-H was replaced with 4-Br, the generated compound **11i** exhibited inhibition levels similar to those of **11a** (R=H), and with a lower SI [SI (**11a**)=3.46 vs SI (**11i**)=1.60]. And compound **11j**, having an iodine substituent, showed no inhibitory activity.

All told, none of the compounds with halogen substituents showed an antituberculosis activity as good as that of **11e**. Based on our results, derivatization of the phenyl ring with substituents such as -OH and especially -NO<sub>2</sub> offered a suitable approach for optimizing the antituberculosis activities of the 3-hydroxy-3-(4-R-phenyl)-prop-2-enedithioic acids. In both cases, the presence of hydrogen bonds apparently influenced the antituberculosis activity. The presence of a nitro group has been proposed to increase the number of hydrogen bond interactions with the target receptor.<sup>28</sup> In vitro activity against *M. tuberculosis* strains that are resistant to a single TB drug (eg, isoniazid or RIF) has been used as a key criterion to determine the reliability of a compound to be considered as an anti-TB drug.<sup>29</sup> Therefore, we also evaluated compound **11e** with non-virulent *M. tuberculosis* H37Ra

**Table 2** REMA-Determined MIC<sub>100</sub> Values of **11e** Against Virulent, Non-Virulent and RIF-Resistant *M. tuberculosis* Strains

Compound	MIC <sub>100</sub> µg/mL in H37Rv 27294	MIC <sub>100</sub> µg/mL in H37Ra	MIC <sub>100</sub> µg/mL in Mtb-209
<b>11e</b>	7.8	7.8	15.6
Rifampin	0.06	0.008	320

**Notes:** *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 reference strain; *M. tuberculosis* H37Ra: non-virulent strain. *M. tuberculosis*-209: RIF-resistant clinical isolate of *M. tuberculosis*.

bacteria, which are more susceptible to lower concentrations of drugs than are virulent strains. Specifically, compound **11e** activities against *M. tuberculosis* H37Ra and 209 (an RIF-resistant strain) were evaluated using 250 µg/mL–0.98 µg/mL serial two-fold dilutions (Table 2). Table 2 also lists the MIC<sub>100</sub> values of RIF. Compound **11e** was found to be active against *M. tuberculosis* strains H37Ra and 209.

## ADMET Predictions

Table 3 shows the determined physicochemical properties of the ten synthesized compounds. Assessment of these molecules using the Lipinski,<sup>30</sup> Veber,<sup>31</sup> and Egan<sup>32</sup> rules suggested that they each had a high probability of exhibiting good oral bioavailability. An absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) consensus analysis indicated that none of the compounds could inhibit P-glycoprotein and that only compounds **11b** and **11d** could be pumped out of the cell through this multidrug-resistant protein (Table 3).

The prediction also suggested that all the compounds could lower CYP1A2 activity, and that only **11c**, **11h**, **11i**, and **11j** could inhibit CYP2C19, while **11b** and **11h** would be metabolized by CYP2C9 (Table 3). The compounds were concluded to have a low probability of exerting mutagenicity, cardiotoxicity, mitochondrial toxicity, and cytotoxicity, but have a high risk of damaging the liver and the skin (see Table 4). Therefore, it will apparently be necessary to modify the structure at the hit-to-lead stage to reduce its hepatotoxicity.

## Docking Studies

To investigate the possible mode or modes of interaction of compounds **11a-j** with *M. tuberculosis*, molecular docking studies were carried out, based on the molecular similarity of the synthesized compounds with ethionamide (**5**), on the active site of the (3R)-hydroxyacyl-ACP (HadAB)

**Table 3** Calculated Physicochemical Properties of Compounds **11a-j**

Compound	MW	logP	logD	logSw	tPSA	RB	HBD	HBA	HA	PAINS
11a	196.29	2.42	1.64	-2.67	72.22	2	1	1	12	NO
11b	210.32	2.78	2.16	-2.96	72.22	2	1	1	13	NO
11c	226.32	2.39	1.49	-2.74	81.45	3	1	2	14	NO
11d	212.29	2.06	1.33	-2.53	92.45	2	2	2	13	NO
11e	241.29	2.25	4.97	-2.76	113.76	3	1	4	15	NO
11f	221.3	2.13	1.5	-2.63	96.01	2	1	2	14	NO
11g	214.28	2.52	1.79	-2.85	72.22	2	1	1	13	NO
11h	230.73	3.04	2.25	-3.28	72.22	2	1	1	13	NO
11i	275.19	3.11	2.41	-3.6	72.22	2	1	1	13	NO
11j	322.19	3.07	2.57	-3.86	72.22	2	1	1	13	NO

**Abbreviations:** Cmpd, compound; MW, molecular weight; logP, logarithm of the partition coefficient between n-octanol and water; logD, logP of the physiological pH; logSw, logarithm of the water solubility of the compound; RB, numbers of rotatable bonds; HBD, hydrogen bond donors; HBA, hydrogen bond acceptors; HA, heavy atoms in the compound; PAINS, pan-assay interference compounds.

**Table 4** Predicted Toxicities of the Synthesized Compounds **11a-j**

Compound	Mutagenicity (AMES Test)	Cardiotoxicity (hERG Blocker)	Mitochondrial Toxicity (MMP)	Hepatotoxicity	DILI	Cytotoxicity	AO
11a	-	-	-	-	+	-	III
11b	-	-	-	-	+	+	III
11c	-	-	-	-	-	-	III
11d	-	-	-	-	-	-	II
11e	+	-	-	+	+	-	III
11f	-	-	-	+	+	-	II
11g	-	-	-	-	+	-	III
11h	-	-	-	+	+	-	III
11i	-	-	-	-	+	+	III
11j	-	-	-	-	+	-	III

**Notes:** no risk (-); high risk (+).

**Abbreviations:** Cmpd, compound; hERG, human ether-à-go-go-related gene; MMP, mitochondrial membrane potential; DILI, drug-induced liver injury; AO, acute oral toxicity category.

dehydratase heterodimer (PDB: 4RLU).<sup>33</sup> It is important to note that each of compounds **11a-j** can be found in a tautomeric ketone or enol form. Although the enol form of each of them was found according to <sup>1</sup>H-NMR observations to be predominant in organic media (see above), the relative amounts of the two forms of each compound may differ when the compound is placed in aqueous media or when interacting with a receptor biomolecule. Therefore, we decided to carry out *in silico* studies of the interactions of both the keto and enol forms of each compound with the HadAB enzyme. The predicted free energy and affinity constant values are listed in **Table 5**.

#### Molecular Dockings of Compounds **11a-j**

The above-described docking protocol was implemented to analyze the binding interactions between each of the

**Table 5** Calculated Binding Free Energy ( $\Delta G$ ) from Molecular Docking Results of the Two Tautomeric Forms (Keto and Enol) of **11a-j** Compounds Within HadAB Active Site

Compound	$\Delta G$ (kcal/mol)	
	Keto	Enol
11a	-5.96	-5.74
11b	-6.36	-6.62
11c	-5.78	-5.91
11d	-6.02	-5.91
11e	-6.03	-5.45
11f	-7.24	-6.55
11g	-5.90	-6.10
11h	-6.40	-6.72
11i	-6.69	-6.52
11j	-6.61	-6.94
<b>HCC</b>	-8.32	

compounds **11a-j** and HadAB. To compare these results with that for a leading compound known to interact with the same receptor, an anchoring study involving the co-crystallized enzyme complex and the 2',4,4'-trihydroxychalcone (HCC) inhibitor was carried out under the same conditions as those used with **11a-j**. Here, the free energy of the binding of HCC was found to be  $-8.32$  kcal/mol, within about 2 kcal/mol of the values obtained for the tested compounds. All compounds were analyzed in their best pose with the lowest binding free energy with the nonbonding interactions at the active site. While **11f**, **11h**, **11i**, **11j**, and **11b** in both tautomeric forms showed better-than-predicted free energy values, only **11e** in its keto and enol forms and **11d** in its enol form showed nonbonding interactions with ACys61 (Figure 2). Similar free energy values were predicted for the ketonic tautomers of **11d** and **11e**, but quite different ones for their enolic forms, with **11d** predicted to have the lowest binding energy. This difference may have been due to their making different numbers of hydrogen bonds with the enzyme according to the docking studies—with **11d** predicted to make four hydrogen bonds with the enzyme, specifically two with ACys61 and at the

same time two with AGln86, and the **11e** enolic form predicted to only make two hydrogen bonds, one with ACys61 and the other with BAsp36. Moreover, each of the two tautomeric forms of **11e** was predicted to make hydrogen bond interactions with ACys61. Thus, the molecular docking studies indicated that the experimentally measured anti-tuberculosis activity of **11d** could be explained by its forming hydrogen bonds with HadAB.

## Conclusions

The present results indicated that derivatizing the phenyl group of 3-hydroxy-3-phenyl-prop-2-enedithioic acids with electron-donating and electron-withdrawing groups modified its antituberculosis activity. We investigated the role of electron-donating groups in the antituberculosis activity of this type of acid by synthesizing compounds **11b-d**. Our results showed that the 4-hydroxy derivative of **11a** (ie, **11d**) was the most active of these compounds. The data presented here were found to be inconclusive regarding the relationship between the electronegativity of the halogen substituent on the phenyl group and the inhibition of the growth of *M. tuberculosis* cells, as well as

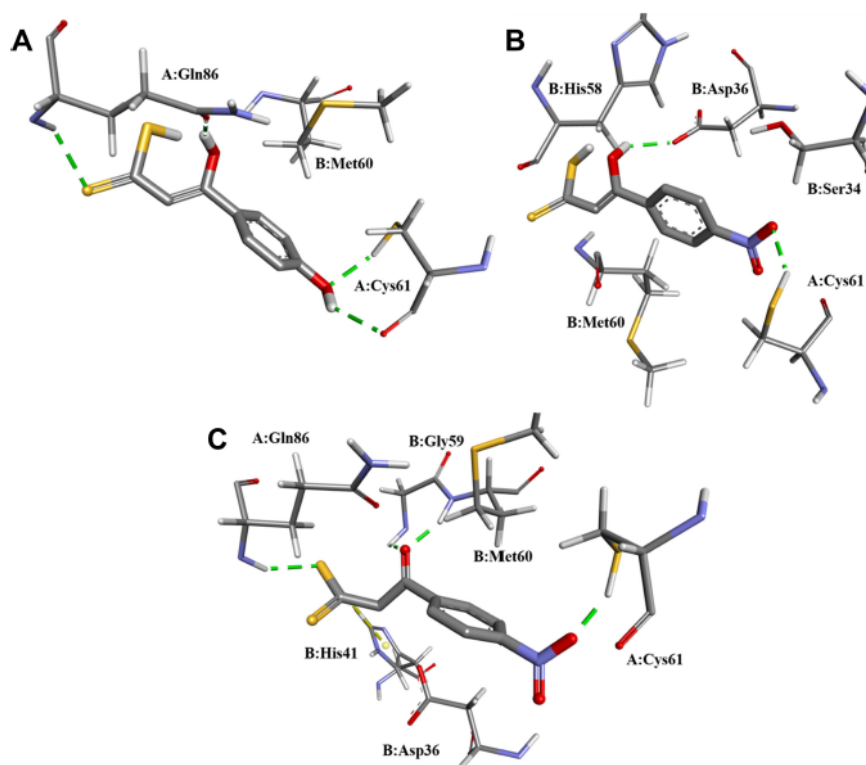


Figure 2 Nonbonding interactions between the active site of HadAB and (A) the **11d** enolic tautomer, (B) **11e** enolic tautomer, and (C) **11e** ketonic tautomer.



regarding the relationship between the size of the halogen substituent and this inhibition (compounds **11g–j**).

The role of the electron-withdrawing groups in the antituberculosis activity was investigated by synthesizing and measuring the activity levels of compounds **11e** and **11f**; in these experiments, compound **11e** (R=NO<sub>2</sub>) was more active and showed a remarkable selectivity index (SI=32.69). All of the tested molecules were also shown to not be pan-assay interference compounds (PAINS), so the antiproliferative activities reported in this study could be due to a target-specific interaction. In our docking studies, **11d** and **11e** made hydrogen bond interactions with ACys61 of the HadAB enzyme, leading us to think that HadAB should be considered as a possible therapeutic target for these compounds and suggesting that the development of new compounds based on these structures should be pursued. Accepted criteria for developing new drugs against infectious diseases such as tuberculosis include an SI higher than 10, an MIC lower than 10 μM, and activity against a mono-resistant strain.<sup>29</sup> Therefore, our results suggested that the antituberculosis compound **11e** might be useful for the design of novel antituberculosis agents. Further optimization of this hit compound is expected to provide information about the structural requirements for achieving high antitubercular activity. Overall, this study represents an important attempt towards the development of novel tuberculosis treatments.

## Acknowledgments

We thank R. Patiño, A. Peña, E. Huerta, B. Quiroz, L. Velasco, J. Pérez, and E. Segura Salinas for technical support. During the experimental phase of the study, Gustavo Pretelin Castillo was a CONACyT Graduate Scholarship holder (308250).

## Funding

Financial support from the DGAPA (project PAPIIT 204619), CONACyT (project A1-S-16584) and NUATEI-IIB-UNAM is gratefully acknowledged.

## Disclosure

The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise.

## References

- World Health Organization [homepage on the internet]. Geneva; 1948. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>. Accessed October 6, 2021.

- Teague SJ. Learning lessons from drugs that have recently entered the market. *Drug Discov Today*. 2011;16(9,10):398–411. doi:10.1016/j.drudis.2011.03.003
- Flick AC, Ding HX, Leverett CA, et al. Synthetic approaches to the 2014 new drugs. *Bioorg Med Chem*. 2016;24(9):1937–1980. doi:10.1016/j.bmc.2016.03.004
- Mueck W, Schwes S, Stampfuss J. Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring. *Thromb J*. 2013;11(10):1–17. doi:10.1186/1477-9560-11-10
- Bassetto M, Ferla S, Pertusati F, et al. Design and synthesis of novel bicalutamide and enzalutamide derivatives as antiproliferative agents for the treatment of prostate cancer. *Eur J Med Chem*. 2016;118:230–243. doi:10.1016/j.ejmech.2016.04.052
- Pal A, Pattanayak RD, Sagar R. Tracing the journey of disulfiram: from an unintended discovery to a treatment option for alcoholism. *J Mental Health Hum Behav*. 2015;20(1):41–43. doi:10.4103/0971-8990.164826
- Laborde J, Deraeve C, Bernardes-Génisson V. Update of antitubercular prodrugs from a molecular perspective: mechanisms of action, bioactivation pathways, and associated resistance. *ChemMedChem*. 2017;12(20):1657–1676. doi:10.1002/cmcd.201700424
- Konreddy AK, Toyama M, Ito W, Bal C, Baba M, Sharon A. Synthesis and anti-HCV activity of 4-hydroxyamino α-pyrone carboxamide analogues. *ACS Med Chem Lett*. 2014;5(3):259–263. doi:10.1021/ml400432f
- García-Orozco I, López-Cortés JG, Ortega-Alfaro MC, Toscano RA, Penieres-Carrillo G, Alvarez-Toledano C. Synthesis, characterization, and tautomerism of four novel copper(I) complexes from 3-hydroxy-3-(p-R-phenyl)-2-propenedithioic acids. *Inorg Chem*. 2004;43(26):8572–8576. doi:10.1021/ic048813z
- Larsson FCV, Lawesson SO. Preparation and alkylation of substituted β-hydroxydithiocinnamic acids. *Tetrahedron*. 1972;28(21):5341–5347. doi:10.1016/S0040-4020(01)93857-8
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Collins LA, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(5):1004–1009. doi:10.1128/AAC.41.5.1004
- Molina SGM, Ramos GMC, Vargas VJ, Mata CBD, Beceril MP, Said FS. Activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res*. 2006;37(1):45–49. doi:10.1016/j.arcmed.2005.04.010
- Lagorce D, Bouslama L, Becot J, Miteva MA, Villoutreix BO. FAF-Drugs4: free ADME-tox filtering computations for chemical biology and early stages drug discovery. *Bioinformatics*. 2017;33(22):3658–3660. doi:10.1093/bioinformatics/btx491
- Schyman P, Liu R, Desai V, Wallqvist A. vNN web server for ADMET predictions. *Front Pharmacol*. 2017;8:889. doi:10.3389/fphar.2017.00889
- Yang H, Lou C, Sun L, et al. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*. 2019;35(6):1067–1069. doi:10.1093/bioinformatics/bty707
- Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem*. 2015;58(9):4066–4072. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00104
- Cousins KR. Computer review of ChemDraw Ultra 12.0. *J Am Chem Soc*. 2011;133(21):8388. doi:10.1021/ja204075s
- Swain M. Chemicalize.org. *J Chem Inf Mod*. 2012;52(2):613–615. doi:10.1021/ci300046g

20. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, et al. *Gaussian 16, Revision C.01*. Wallingford CT: Gaussian, Inc.; 2016.
21. Sanner MF. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*. 1999;17(1):57–61. doi:10.1016/S1093-3263(99)99999-0
22. Rose PW, Prlić A, Bi C, et al. The RCSB protein data bank: views of structural biology for basic and applied research and education. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(D1):D345–D356. doi:10.1093/nar/gku1214
23. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
24. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comp Chem*. 1998;19(14):1639–1662. doi:10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B
25. BIOVIA. Dassault Systèmes, Discovery Studio 2019. San Diego: Dassault Systèmes; 2019. Available from: <https://www.3ds.com/products-services/biovia/>. Accessed October 6, 2021.
26. Chung MC, Bosquesi PL, dos Santos JL. A prodrug approach to improve the physico-chemical properties and decrease the genotoxicity of nitro compounds. *Curr Pharm Des*. 2011;17(32):3515–3526. doi:10.2174/1381612111798194512
27. Cambridge MedChem Consulting. Available from: <https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/bioisoterres/>. Accessed December 18, 2019.
28. Szatyłowicz H, Stasyuk OA, Fonseca Guerra C, Krygowski TM. Effect of intra- and intermolecular interactions on the properties of para-substituted nitrobenzene derivatives. *Crystals*. 2016;6(3):29–45. doi:10.3390/cryst6030029
29. Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(11):751–758. doi:10.1038/nrd4683
30. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;23(1–3):3–25. doi:10.1016/S0169-409X(96)00423-1
31. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*. 2002;45(12):2615–2623. doi:10.1021/jm020017n
32. Egan WJ, Merz KM, Baldwin JJ. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J Med Chem*. 2000;43(21):3867–3877. doi:10.1021/jm000292e
33. Dong Y, Qui X, Shaw N, et al. Molecular basis for the inhibition of  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP dehydratase HadAB complex from *Mycobacterium tuberculosis* by flavonoid inhibitors. *Prot Cell*. 2015;6(7):504–517. doi:10.1007/s13238-015-0181-1

## Infection and Drug Resistance

Dovepress

### Publish your work in this journal

Infection and Drug Resistance is an international, peer-reviewed open-access journal that focuses on the optimal treatment of infection (bacterial, fungal and viral) and the development and institution of preventive strategies to minimize the development and spread of resistance. The journal is specifically concerned with the epidemiology of

antibiotic resistance and the mechanisms of resistance development and diffusion in both hospitals and the community. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/infection-and-drug-resistance-journal>