

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Tijuana
Centro de graduados e investigación en química

TRABAJO DE TESIS

“Síntesis y Evaluación Antiparasitaria de 1,3-oxazolidinonas”

Presentado por
Q.F.B. Brandon Raúl Barrera Bermúdez

Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN QUÍMICA

Director de tesis
Dr. Adrián Ochoa Terán

Derechos de Autor

Brandon Raúl Barrera Bermúdez, 2021

Derechos Reservad



Tijuana, Baja California, 14/febrero/2022

Oficio No. 130/CG/2022

Asunto: Se autoriza impresión de trabajo de tesis

GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

Los que suscriben tienen a bien informar que el manuscrito de tesis titulado “**Síntesis y evaluación de la actividad antiparasitaria de 1,3-oxazolidinonas**”, presentado por el **C. Brandon Raúl Barrera Bermúdez**, (con número de control M20210031), cumple con los requisitos de calidad y formato para tesis de Maestría en Ciencias en Química. Por consiguiente, se aprueba y autoriza al interesado para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE


DR. ADRIÁN OCHOA TERÁN
Presidente



DR. DANIEL CHÁVEZ VELASCO
Secretario del Jurado



DRA. NORMA AIDÉ CORTEZ LEMUS
Vocal del Jurado

C.p. Oficina de Titulación
C.p. Expediente
C.p. Interesado
AOT/DCV/NACL



Calzada del Tecnológico S/N Esq. Castillo de Chapultepec y calle Cuahtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
Est. 101

www.itecnm.mx | www.itecnm.mx | www.itecnm.mx | www.itecnm.mx



2022 Flores
Año de Magón
PRECURSOR DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California,
01/marzo/2022
OFICIO No. 023/DEPI/2022
Asunto: **Autorización de Impresión de Tesis**

MARIBEL GUERRERO LUIS
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

En lo referente al trabajo de tesis, "Síntesis y evaluación de la actividad antiparasitaria de 1,3 -oxazolidinonas". Presentado por C. **Brandon Raúl Barrera Bermúdez**, alumno de la Maestría en ciencias en Química con numero de control **M20210031**; informo a usted que a solicitud del comité de tutorial, tengo a bien **Autorizar la impresión de Tesis**, atendiendo las disposiciones de los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado del Tecnológico Nacional de México.

Sin más por el momento le envió un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica



GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO
JEFE DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo

GHE/lap



Calzada del Tecnológico S/N Esg. Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
Est. 101

e-mail: dir_tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | Tijuana.tecnm.mx



“Año de Flores Magón, precursor de la Revolución Mexicana”

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tijuana, B. C. a 24 de febrero de 2022, el C. Brandon Raúl Barrera Bermúdez alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Química con numero de control M20210031, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Adrián Ochoa Terán y ceden los derechos del trabajo titulado **“Síntesis y Evaluación Antiparasitaria de 1,3-oxazolidinonas”** al Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Tijuana para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, figuras, graficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del director de trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico ochoa@tectijuana.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y cita la fuente del mismo.



Brandon Raúl Barrera Bermúdez

Contenido

Carta de liberación de tesis	ii
Carta de autorización de impresión emitida por la DEPI	iii
Carta de cesión de derechos	iv
Contenido	v
Lista de Esquemas	vi
Lista de Figuras	vi
Lista de Tablas	vii
Agradecimientos	viii
Reconocimientos institucionales	ix
Resumen	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	3
III. ANTECEDENTES	4
3.1. Epidemiología	4
3.2. Agentes microbianos	5
3.3. Parasitología	7
3.4. Tratamiento farmacológico (metronidazol)	11
3.5. Oxazolidinonas	12
3.6. Ensayo de viabilidad celular	13
3.7. Ensayo de toxicidad	15
3.8. Agentes antimicrobianos	15
3.9. Hipótesis	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Etapas de reacción	23
a) Síntesis de α -amino éster	24
b) Síntesis de (S)-2-(N,N-dibencilamino) ésteres	24
c) Síntesis de (S)-2-(N,N-dibencilamino) alcoholes	25
d) Síntesis de (S)-2-(N,N-dibencilamino) aldehídos	25
e) Síntesis de α -(N,N-dibencilamino) trimetilsililoxicianhidrina	26
f) Síntesis de α -(N,N-dibencilamino) aminoalcoholes	27
g) Síntesis de oxazolidinonas	27
4.2. Caracterización por FT-IR	28
4.3. Caracterización por RMN	29
4.4. Actividad antiparasitaria frente <i>G. duodenalis</i>	49
4.5. Evaluación de toxicidad	52

V. EXPERIMENTAL	53
5.1. Generalidades	53
5.2. Técnicas analíticas	53
Materiales, reactivos y solventes	53
5.3. Metodología de síntesis de oxazolidinonas	54
a) Síntesis de α -aminoéster	54
b) Síntesis de éster dibencilamino	54
c) Síntesis de β -aminoalcohol	54
d) Síntesis de aldehído (Reacción de Swern)	55
e) Síntesis de trimetilsililoxicianhidrina (Adición)	55
f) Síntesis de α -aminoalcohol	56
g) Síntesis de 1,3-oxazolidinona	56
5.4. Metodología para la evaluación antiparasitaria	59
a) Criopreservación de la cepa	60
b) Descongelamiento y recuperación de trofozoíto de <i>G. duodenalis</i>	61
c) Evaluación de la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i>	61
5.5. Ensayo de toxicidad <i>in vitro</i> con <i>Artemia salina</i>	62
VI. CONCLUSIONES	64
VII. REFERENCIAS y BIBLIOGRAFÍAS	65
VIII. ANEXOS	68

Lista de Esquemas

Esquema 1.	Ochoa-Terán y Rivero (2008), ruta de síntesis. ²⁶	23
Esquema 2.	Síntesis de oxazolidinonas <i>N</i> -benciladas	44

Lista de Figuras

Figura 1.	Causas de muerte a nivel mundial (2019).	4
Figura 2.	Agentes microbianos.	6
Figura 3.	Cadena epidemiológica.	7
Figura 4.	Trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i> al microscopio electrónico de barrido.	8
Figura 5.	Quiste de <i>G. duodenalis</i> con microscopio óptico.	9
Figura 6.	Ciclo de <i>Giardia duodenalis</i> .	10
Figura 7.	Estructuras químicas de metronidazol (a) y sus dos productos oxidados (b y c).	11
Figura 8.	Activación del agente tóxico de metronidazol.	12
Figura 9.	Estructura y función de linezólida.	13
Figura 10.	Reducción de MTT a formazano.	14
Figura 11.	Estructura molecular de metronidazol, tinidazol y furazolidona.	16
Figura 12.	Análogos de linezólida.	19
Figura 13.	Espectro de FTIR de 7a	29
Figura 14.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 7a <i>anti</i> en CDCl ₃ .	30
Figura 15.	Espectro de RMN ¹ H ampliado del compuesto 7a <i>anti</i> en CDCl ₃ .	31
Figura 16.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 7a <i>anti</i> en CDCl ₃ .	32
Figura 17.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 7a <i>sin</i> en CDCl ₃ .	36
Figura 18.	Espectro de RMN ¹ H ampliado del compuesto 7a <i>sin</i> en CDCl ₃ .	37
Figura 19.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 7a <i>sin</i> en CDCl ₃ .	38
Figura 20.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 7f en CDCl ₃ .	45
Figura 21.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 7f en CDCl ₃ .	46
Figura 22.	Ensayo de viabilidad celular colorimétrica a 25 y 50 µg/mL.	51

Lista de Tablas

Tabla 1.	Defunciones en México, año 2020.	5
Tabla 2.	CIM para <i>G. duodenalis</i> en ensayos de susceptibilidad.	15
Tabla 3.	Evaluación antiparasitaria en ambiente aerobio.	16
Tabla 4.	Evaluación antiparasitaria en ambiente anaerobio.	16
Tabla 5.	Actividad de agentes antimicrobianos frente a <i>Pythium</i> spp.	17
Tabla 5.	Actividad de agentes antimicrobianos frente a <i>Pythium</i> spp. (continuación)	18
Tabla 6.	Evaluación del efecto antiparasitaria de análogos de linezólida frente a <i>H. nana</i> .	20
Tabla 6.	Evaluación del efecto antiparasitaria de análogos de linezólida frente a <i>H. nana</i> (continuación).	21
Tabla 7.	Estudio de viabilidad celular de análogos de linezólida.	21
Tabla 7.	Estudio de viabilidad celular de análogos de linezólida (continuación).	22
Tabla 8.	Asignación de las señales de RMN ¹ H de oxazolidinonas con configuración <i>anti</i> .	33
Tabla 8.	Asignación de las señales de RMN ¹ H de oxazolidinonas con configuración <i>anti</i> (continuación).	34
Tabla 9.	Asignación de las señales de RMN ¹³ C de oxazolidinonas con configuración <i>anti</i>	35
Tabla 10.	Asignación de las señales de RMN ¹ H de oxazolidinonas con configuración <i>sin</i> .	39
Tabla 10.	Asignación de las señales de RMN ¹ H de oxazolidinonas con configuración <i>sin</i> (continuación).	40
Tabla 11.	Asignación de las señales de RMN ¹³ C de oxazolidinonas con configuración <i>sin</i> .	40
Tabla 11.	Asignación de las señales de RMN ¹³ C de oxazolidinonas con configuración <i>sin</i> (Continuación).	41
Tabla 12.	Comparación de señales de RMN ¹ H de 7a con configuración <i>anti</i> y <i>sin</i> .	42
Tabla 13.	Comparación de señales de RMN ¹³ C de oxazolidinonas con configuración <i>anti</i> y <i>sin</i> .	43
Tabla 14.	Asignación de señales de RMN ¹ H de oxazolidinonas <i>N</i> -benciladas	47
Tabla 15.	Asignación de señales de RMN ¹³ C de oxazolidinonas <i>N</i> -benciladas.	48
Tabla 16.	Porcentaje de inhibición y concentración inhibitoria media de oxazolidinonas frente a <i>Giardia duodenalis</i> .	50
Tabla 17.	Concentración letal media de oxazolidinonas frente a <i>Artemia</i> salina.	52
Tabla 18.	Reactivos para preparar el medio TYI-S-33.	60

Agradecimientos

Mi agradecimiento va dirigido a Dios, quien ha forjado mi vida, me ha acercado con las personas correctas y me ha dirigido por el camino correcto.

El Instituto Tecnológico de Tijuana y el Centro de Graduados e Investigación en Química me brindó la oportunidad de ser parte de un grupo de investigación, de desarrollarme profesional y académicamente. Por permitirme utilizar sus instalaciones y los instrumentos de trabajo.

Agradezco mucho la ayuda de los doctores que me impartieron clases y compartieron sus conocimientos sin reservas. Destacando a los integrantes de mi comité, Dra. Norma Cortez Lemus y Dr. Daniel Chávez Velasco por el esfuerzo doble que les ocasiono.

Mi familia, quien es mi equipo en todo. Les agradezco por su apoyo incondicional, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ustedes.

Agradecimiento especial a mi madre, quien involucra su alma por la prosperidad de la mía.

Muchas gracias Dr. Adrián Ochoa Terán, por darse el tiempo de enseñarme sus conocimientos diversos con paciencia. Pero, además, es quien con sabiduría me ha aconsejado, dado lecciones de vida y me ha motivado para lograr mis metas y lo que me proponga.

Dr. Eleazar Alcantar Zavala por formar parte de mi formación dentro del laboratorio y la disponibilidad que siempre tuvo.

A mis compañeros de generación y mis compañeros de laboratorio.

Estoy muy agradecido con la Universidad Autónoma de Sinaloa y el personal del Laboratorio de Química de Productos Naturales. A la Dra. López Angulo y al Dr. Julio Montes Ávila por su apoyo en la realización de esta tesis. A mis compañeros de LQPN por su gran hospitalidad, que hizo de una estancia, una gratificante experiencia.

Reconocimientos institucionales

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioorgánica y Química Supramolecular del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Tijuana, bajo la dirección del Dr. Adrián Ochoa Terán.

Se agradece el apoyo brindado por el CONACyT para la realización de estudios de posgrado (No. 2020-000013-01NACF-05338).

Asimismo, el suscrito agradece al Instituto Tecnológico de Tijuana por el apoyo brindado para la realización de estos estudios.

Resumen

“Síntesis y Evaluación Antiparasitaria de 1,3-oxazolidinonas”

Por

Brandon Raúl Barrera Bermúdez

Maestro en Ciencias en Química

Instituto Tecnológico de Tijuana, 2021

Dr. Adrián Ochoa Terán

Director de Tesis

Reconociendo que el tema de la resistencia antimicrobiana es un problema para el ser humano a nivel mundial, se desea disminuir esta situación generando compuestos nuevos como tratamiento alternativo. Entre las especies microbianas de interés se encuentran la forma parasitaria *Giardia lamblia*, agente infeccioso para el ser humano, con un número de incidencia elevado. Con base en la literatura se ha demostrado que los compuestos tipo oxazolidinona presentan actividad antibacteriana y se desea explorar el alcance de estos compuestos contra formas parasitarias. Este trabajo primeramente se desarrolló en la síntesis orgánica de compuestos 1,3-oxazolidinonas enantiopuras, mediante una ruta sintética de siete reacciones consecutivas iniciadas a partir de α -aminoácidos, estos productos fueron aislados y caracterizados por técnicas espectroscópicas. Por otra parte, se evaluó el efecto antiparasitario por medio de estudios de viabilidad celular colorimétricas y técnicas de micro dilución.

I. INTRODUCCIÓN

El tema y problemática principal de esta investigación se centra en la resistencia antimicrobiana (RAM), un tema considerado como una de las mayores amenazas para la salud humana a nivel mundial.¹ La RAM proviene de muchos años atrás, puede considerarse que se originó por el uso indiscriminado de antibióticos en la era antibiótica. El descubrimiento del primer antibiótico en 1940 fue de gran impacto para la sociedad, que hasta se consideró como un remedio milagroso para curar enfermedades. Desafortunadamente, la evolución en la producción de antimicrobianos se ha acompañado de un incremento marcado de la resistencia de bacterias, hongos, parásitos, incluso virus, a diferentes familias de estos. Por tal razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha designado la RAM como una de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana en este siglo al constituir una de las mayores amenazas para la salud mundial.²

Con un enfoque parasitario, a una infección debida a la presencia de un parásito en el organismo se le conoce como parasitosis. Los parásitos aislados comúnmente y que son patógenos para el ser humano son *Hymenolepis nana*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Ascaris lumbricoide* y *Trichuris trichuria* por considerar algunos. Todos ellos manifiestan cuadros clínicos con efectos de riesgo bajo como diarrea, dolor abdominal, estreñimiento, náuseas, vómito y prurito anal. Dentro de las manifestaciones de riesgo moderado están la hepatomegalia y síndrome de Löeffler.³

En esta investigación se tiene un interés específico en *Giardia duodenalis*, también conocido como *Giardia intestinalis* o *Giardia lamblia*, un protozoo flagelado eucarionte. Son de gran importancia epidemiológica y clínica por su prevalencia y patogenicidad altas, predominante en la población infantil e inmunosuprimidos y caracterizada por la producción de cuadros diarreicos agudos y crónicos, de intensidad variable; puede complicarse, originando un síndrome de malabsorción intestinal. En el adulto inmunocompetente suele ser asintomático.⁴ Actualmente los medicamentos de primera línea contra *G. duodenalis* son los compuestos de la familia nitroimidazol, siendo el metronidazol la primera opción. Estos medicamentos han sido

de utilidad para las infecciones parasitarias, sin embargo, se han observado un elevado número de incidencias de resistencia a metronidazol.⁵

Por otro lado, los compuestos pertenecientes a la familia de oxazolidinonas (linezólida) presenta propiedades bacteriostáticas frente a gran variedad de bacterias grampositivas, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica provocando la muerte celular. Este fármaco es relativamente moderno, ha presentado una absorción excelente, concentraciones inhibitorias mínimas y propiedades farmacocinéticas buenas.⁶ Sin embargo, hay pocos estudios dirigidos al efecto antiparasitario.

En este proyecto se planteó una ruta de síntesis de siete reacciones para la obtención de 1,3-oxazolidinonas enantiopuras derivadas de distintos α -aminoácidos. Una vez caracterizados los compuestos por métodos espectroscópicos disponibles, se evaluó la actividad antiparasitaria frente a *Giardia duodenalis* utilizando técnicas de microdilución colorimétricas.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Actualmente existe la necesidad de ampliar el cuadro básico de medicamentos con actividad antiparasitaria, ya que como se ha descrito con anterioridad, existen manifestaciones de resistencia a los fármacos convencionales considerando esto como un riesgo a la salud. El objetivo general es sintetizar y evaluar la actividad antiparasitaria de una serie de 1,3-oxazolidinonas frente a *Giardia duodenalis*.

Objetivos particulares

1. Sintetizar y caracterizar una serie de 10 1,3-oxazolidinonas enantiopuras derivadas de α -aminoácidos (L-alanina, L-soleucina, L-fenilalanina, L-valina y L-leucina).
2. Estudiar la actividad antiparasitaria de las 1,3-oxazolidinonas contra *Giardia duodenalis*.

III. ANTECEDENTES

3.1. Epidemiología

La mortalidad es la incidencia de muerte en la población. Las enfermedades infecciosas fueron la principal causa de muerte en 1900 en los países desarrollados, pero ahora son mucho menos significativas. Ahora las enfermedades no infecciosas, asociadas al estilo de vida, como las enfermedades cardíacas y el cáncer, son mucho más prevalentes y causan mayor mortalidad que las enfermedades infecciosas (Figura 1),⁷ sin embargo, la situación actual podría cambiar rápidamente si se interrumpiesen las medidas de salud pública.⁴ Hoy en día las enfermedades parasitarias constituyen un problema de salud pública a nivel mundial, por su frecuencia alta en países en vías de desarrollo en Asia, África y Latinoamérica, por su presencia en países desarrollados, por la migración de individuos provenientes de países del tercer mundo y por su morbilidad alta.⁸ En el año 2020 INEGI calculó un total de 17,572 defunciones por causa de “ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias” en México (Tabla 1).⁹



Figura 1. Causas de muerte a nivel mundial (2019).

Tabla 1. Defunciones en México, año 2020.

Causa	Número de defunciones
Enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas.	170,806
Enfermedades del sistema circulatorio	260,156
Enfermedades de sistema respiratorio	95,400
Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias	17,572
Enfermedades del sistema nervioso	13,046

3.2. Agentes microbianos

Todos los agentes biológicos son parásitos en un sentido amplio, ya que cumplen con la definición de constituir “seres vivos que viven temporalmente o permanentemente en la superficie o en el interior de otros seres vivos de otra especie a la cual le producen daño en mayor o menor grado”. Desde la perspectiva médica, tanto por tradición como por razones prácticas, existe una separación entre parasitología y la infectología. La primera se centra en enfermedades causadas por animales, incluyendo protozoos, helmintos y artrópodos; en tanto que la segunda aborda bacterias, hongos y virus. Las enfermedades infecciosas constituyen el 30% de 56 millones de muertes anuales (Figura 2).¹⁰

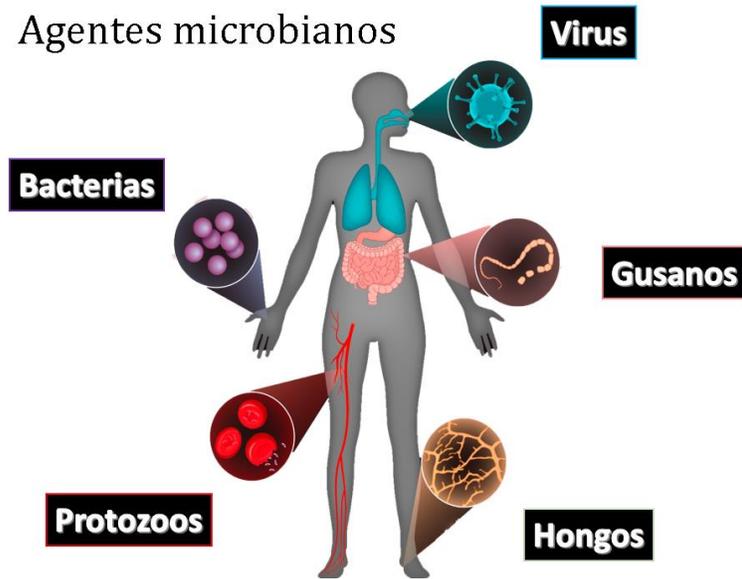


Figura 2. Agentes microbianos.

Por su parte, una enfermedad infecciosa se define como la presencia de un organismo dentro de otro organismo que funciona como huésped y una infección se rige por un ciclo (Figura 3). La dinámica que se presenta en las enfermedades infecciosas y parasitarias son una serie de pasos unidos o eslabones secuenciados, se le conoce como cadena epidemiológica, y es la que nos permite entender cómo los fenómenos biológicos de la infección son continuos. De esta manera los microorganismos tienen garantizada la posibilidad de seguir infectando muchos huéspedes, manteniendo así una especie viva en la naturaleza. Un ciclo o cadena epidemiológica consta de una puerta de entrada, que es el sitio por donde un organismo penetra al huésped, una vez que el organismo atraviese umbral de esa puerta se aloja en un sitio específico y comienza a proliferarse, a este proceso se le conoce como establecimiento y diseminación. Continúa las vías de transmisión, por ejemplo, el aire, el agua y los transmisores biológicos y por último un mecanismo de infección que permite la continuación de la infección como la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas, por mencionar algunos.¹¹ Cuando se habla de agentes microbianos se hace referencia a bacterias, hongos, protozoos y virus, y no se consideran patógenos hasta que logran ocasionar un desequilibrio en la fisiología natural del ser humano. Todos estos agentes microbianos son de importancia epidemiológica, ya que son causantes de millones de muertes, cada una con su función especializada.

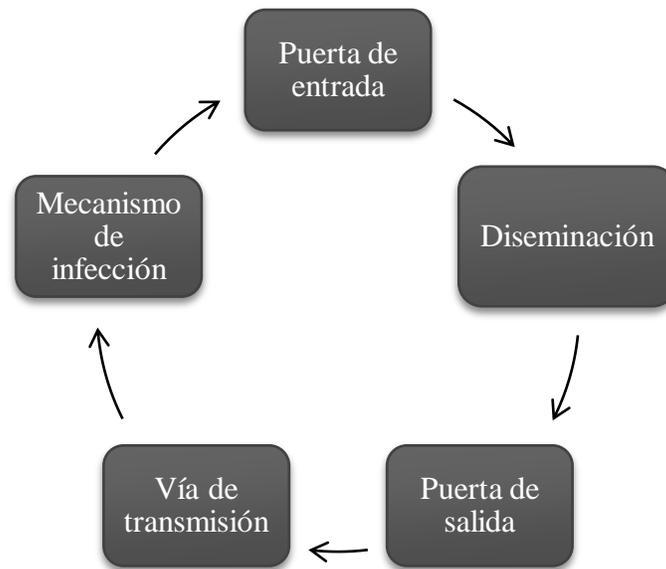


Figura 3. Cadena epidemiológica.

La RAM se ve facilitada por factores distintos, tales como calidad baja del medicamento o formulación, prescripción y venta inapropiada, uso inadecuado, vigilancia deficiente y factores intrínsecos por mutación, siendo este último el más complejo y hasta ineludible debido a la evolución de las especies.¹²

3.3. Parasitología

La forma parasitaria de interés en esta investigación es *Giardia duodenalis*, un protozoo flagelado, anaeróbico que presenta dos formas a la microscopía de luz: el trofozoíto y el quiste. A la parasitosis ocasionada por este parásito se le denomina giardiasis. *G. duodenalis* es de gran importancia epidemiológica y clínica por su prevalencia y patogenicidad alta, fundamentalmente entre la población infantil. La morfología de trofozoíto mide entre 10 y 20 μm de largo, por 5 a 15 μm de ancho y 2 a 4 μm de grosor. Posee simetría bilateral y su cuerpo aparece dividido en mitades por un engrosamiento citoplasmático compuesto por microtúbulo, el axostilo, que es un esqueleto axial. En su extremo anterior presenta dos núcleos grandes y vesiculares, con nucleolos muy visibles en preparaciones teñidas. A diversas alturas de la superficie celular emergen cuatro pares de flagelos que le dan movilidad. La concavidad que

hay en su cara ventral, en sus dos tercios anteriores, constituye una ventosa o disco suctor, la que permite distinguirse a *G. duodenalis* de otros flagelados, compuesto por dos lóbulos unidos a la altura de los núcleos. Este disco tendría capacidad contráctil, y su citoesqueleto este compuesto de microtúbulos, que le permiten al parásito adosarse al epitelio intestinal del hospedero (Figura 4).¹³



Figura 4. Trofozoíto de *Giardia duodenalis* al microscopio electrónico de barrido.

Los quistes son ovalados y miden de 8-12 μm y de 7-10 μm respectivamente; en observación a la microscopía directa aparecen como cuerpos muy refringentes, con una membrana quística de doble pared y, en su interior, se aprecian cuatro núcleos y una serie de filamentos, los que constituyen los restos flagelares y cuerpos parabasales (Figura 5). Se han distinguido, de acuerdo con la morfología de ciertas estructuras micrtubulares denominadas cuerpos mediales, tres especies de giardia: *G. agilis*, descrita en anfibios, *G. muris* en roedores, aves y reptiles, y *G. duodenalis* observada en el hombre, mamíferos, aves y reptiles. Las diferencias se basan en las secuencias de los ácidos nucleicos del ADN.¹³

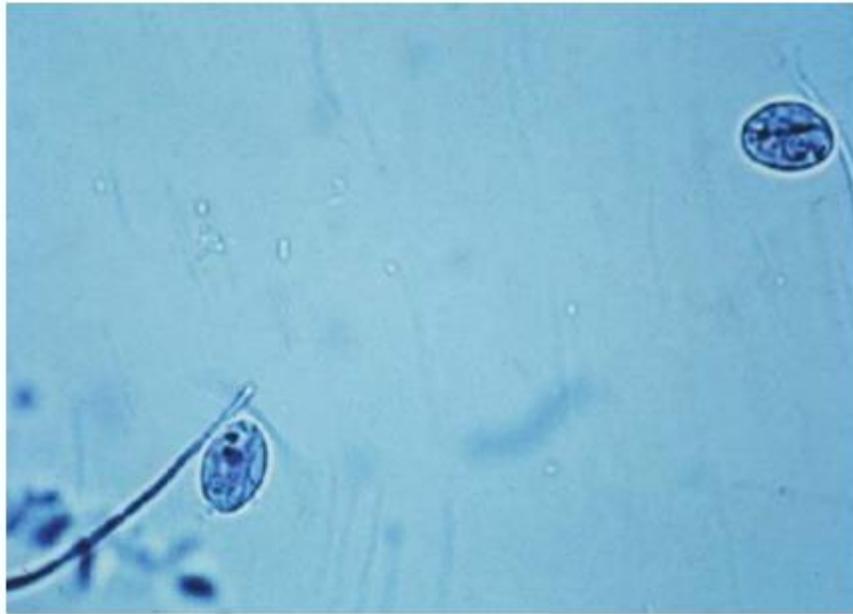


Figura 5. Quiste de *G. duodenalis* con microscopio óptico.

La infección inicia cuando el quiste es ingerido por agua o alimentos contaminados, siendo este último de frecuencia menor o bien, mediante contacto directo oral y heces. La forma quística es resistente relativamente, permitiendo su sobrevivencia en variedad de ambientes y condiciones por un periodo extenso. Después de exponerse al ambiente ácido del estómago, se libera el trofozoíto en el intestino delgado y comienza a proliferarse ocasionando síntomas de diarrea y mala absorción. Algunos trofozoítos después de la exposición a los fluidos biliares forman quistes en la porción yeyuno del intestino y son transcurridos en las heces. Se concluye con el ciclo de transmisión al infectarse otro hospedador (Figura 6).¹³

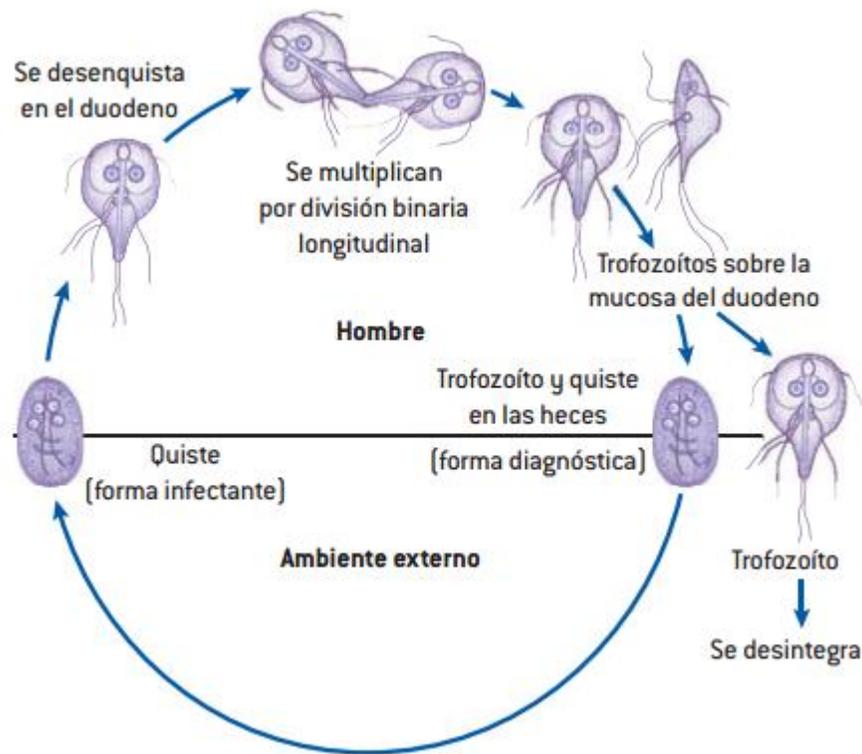


Figura 6. Ciclo de *Giardia duodenalis*.

La respuesta del hospedero a la infección parasitaria es la base de la inmunoparasitología, que se ha desarrollado en forma acelerada en las últimas décadas debido a que se ha tomado a las parasitosis como modelo de estudio y por la importancia de estas enfermedades en la salud pública. La relación parásito-hospedero produce un equilibrio de adaptación en el curso de la filogenia, es decir, a través de la evolución del parásito ha podido modelar la respuesta inmune (inmunomodulación). La respuesta inmune puede provocar la curación total y el hospedero elimina al parásito y es inmune a las infecciones nuevas. En la mayoría de las parasitosis la respuesta inmune del hospedero permite la curación clínica; el hospedero es resistente a la reinfección, pero el parásito sobrevive en él. Los factores defensivos del hospedero corresponden a la inmunidad innata y a la inmunidad adaptativa. Los parásitos tienen la posibilidad de evadir la respuesta inmune por varios mecanismos, cuando el sistema inmunológico falla se debe considerar un tratamiento farmacológico o quirúrgico.¹⁴

3.4. Tratamiento farmacológico (metronidazol)

Actualmente los medicamentos de primera línea para la giardiasis son los compuestos de la familia nitroimidazol, siendo el metronidazol la primera opción. La dosis de metronidazol puede variar en el transcurso de siete días (dosis oral de 1-2 g), en caso de que falle el tratamiento se ha utilizado dosis mayores por tiempos prolongados o la combinación de metronidazol con otros fármacos. Metronidazol es metabolizado por el hospedero en dos principales productos oxidados, un metabolito ácido (1-ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol) con nula actividad antiparasitaria y un metabolito hidroxilado (1-(2-hidroxiethyl)-2-hidroxiethyl-5-nitroimidazol) con actividad antiparasitaria (Figura 7).¹⁵

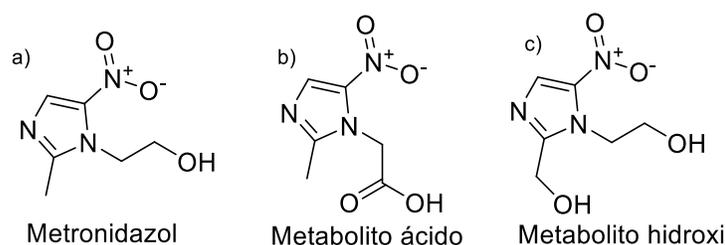


Figura 7. Estructuras químicas de metronidazol (a) y sus dos productos oxidados (b y c).

El mecanismo de acción de metronidazol se observa en la Figura 8. En una ruta metabólica anaerobia normal con propósito de generar energía, el piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) reduce la ferredoxina (Fd), metaloproteína que contiene un centro de hierro-azufre, es encargada del transporte de electrones en el metabolismo. La Fd dona electrones a NAD(P)⁺ catalizada por una ferredoxina: NAD oxidoreductasa (Fd: NOR). En presencia de metronidazol la proteína Fd transfiere los electrones al grupo nitroimidazol generando radicales RNO_2^- , los cuales son tóxicos. La toxicidad se logra por desplazamiento de los grupos SH y las hebras de ADN se rompen resultando la muerte celular.¹⁵ El mecanismo de resistencia a metronidazol se ha estudiado en laboratorios que inducen la resistencia. Se ha observado que esto ocurre por una

regulación a la baja de las rutas metabólicas, especialmente las rutas que involucran las enzimas PFOR y Fd, que activan el radical tóxico de metronidazol.¹⁶

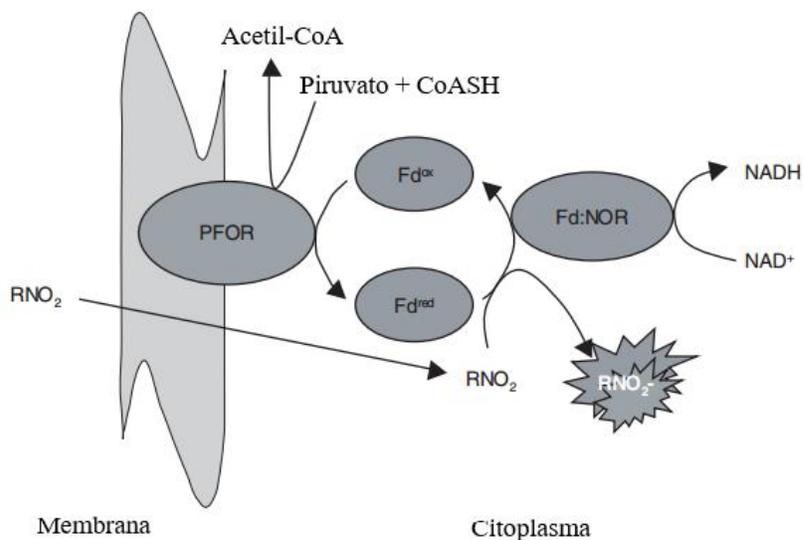


Figura 8. Activación del agente tóxico de metronidazol.

3.5. Oxazolidinonas

Las oxazolidinonas son una reciente clase de antibióticos sintetizados con una estructura química característica por un núcleo de 2-oxazolidinona, son activas contra un espectro amplio de bacterias grampositivas e incluso bacterias multirresistentes, es decir, *Enterococcus* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Mycobacterium tuberculosis*. Las oxazolidinonas se fijan a la subunidad ribosomal 50S, inhibiendo la biosíntesis de proteínas bacterianas, actuando como un bacteriostático. La primer oxazolidinona disponible clínicamente fue linezólida (Figura 9), descubierta en 1996 y aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para uso clínico en el año 2000. Linezólida ha sido empleada para infecciones de bacterias grampositivas y es considerada un fármaco eficiente para las infecciones quirúrgicas, para tratar infecciones pulmonares fármaco resistentes y también es utilizado como tratamiento para infecciones cutáneas.¹⁷ Los compuestos de tipo oxazolidinonas son reconocidos como agentes antibacterianos, sin embargo, en la literatura hay muy poca referencia acerca de la actividad antiparasitaria.

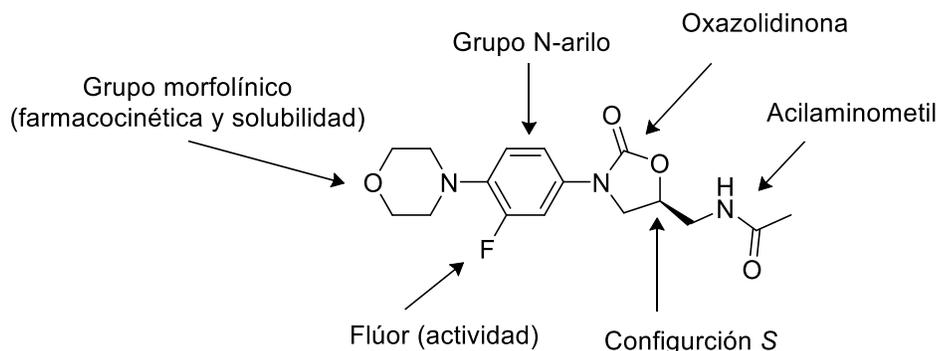


Figura 9. Estructura y función de linezólida.

3.6. Ensayo de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular son utilizados frecuentemente como barridos (colección de datos) de compuestos para determinar si la molécula de estudio presenta efectos en la proliferación celular o un efecto tóxico que eventualmente llevará a la muerte celular. Indiscriminadamente del tipo de célula usado es importante saber la cantidad de células viables al final del ensayo. Existe una variedad de métodos que se pueden usar para estimar el número de células viables.

Se han utilizado una variedad de sales de tetrazolio para detectar la viabilidad celular. De los compuestos más utilizados incluye: MTT, MTS, XTT y WST-1. Estos compuestos se desglosan en dos categorías: 1) MTT el cual es cargado positivamente y fácilmente penetra las células viables eucariotas y 2) por último MTS, XTT y WST-1 los cuales están cargados negativamente y no penetran la célula. La clase 2) son típicamente utilizados con un aceptor de electrones, el cual pueda transferir electrones desde el citoplasma para facilitar la reducción de tetrazolio en el producto colorido formazano.¹⁸ En este ensayo se utilizó el reactivo MTT.

El MTT (bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) ha sido adaptado ampliamente y continúa siendo popular en laboratorios académicos como evidencia por miles de artículos publicados. El MTT es preparado en una solución fisiológica, añadido a células en

medio de cultivo, usualmente a una concentración final de 0.2 – 0.5 mg/mL e incubado de una a cuatro horas. La cantidad de formazano (directamente proporcional al número células viables) es medido con espectrofotómetro a una absorbancia de 570 nm utilizando una placa de 96 pocillos. Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT en formazano, producto de color morado. Cuando las células mueren, pierden la habilidad de convertir el MTT en formazano, por lo tanto, la conversión de color sirve como un marcador muy útil y conveniente solo para células vivas. Se desconoce el mecanismo preciso de la reducción de MTT a formazano, pero es probable que se involucre una reacción con NADH o una molécula reductora similar que logre transferir electrones a MTT (Figura 10).¹⁸

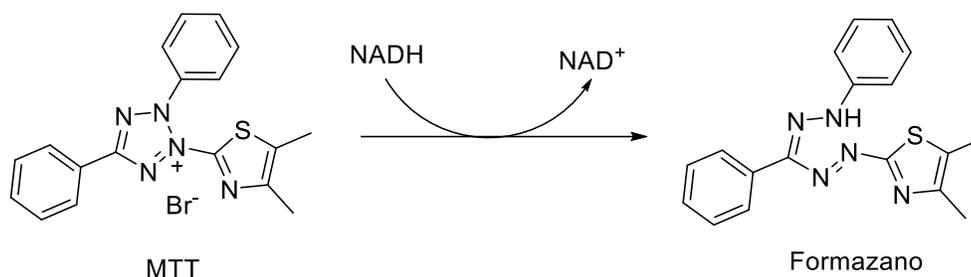


Figura10. Reducción de MTT a formazano.

Upcroft¹⁹ investigó la susceptibilidad de distintos fármacos contra protozoos anaeróbicos de manera *in vitro*, dentro de esos protozoos se encuentra *G. duodenalis*. Se reportaron datos de concentración inhibitoria mínima para las líneas celulares susceptibles (BRIS/83/HEPU/106 y WB-1B) y resistentes (BRIS/83/HEPU/106-2ID₁₀ y WB-M3) a metronidazol, además de una línea celular resistente a albendazol (WB-M3-Alb). En Tabla 2 se puede observar que la concentración inhibitoria mínima (CIM) es de 6.3 μM para las líneas celulares susceptibles a metronidazol el cual se puede tomar como punto de referencia, esta misma información es recurrida varios años después.²⁰ La concentración inhibitoria media (IC₅₀) es otro cálculo estadístico utilizado para determinar la efectividad de un compuesto frente a una línea celular. Montes Ávila y colaboradores²¹ reportó un ensayo de susceptibilidad *in vitro* de *G. duodenalis* (línea celular WB) utilizando metronidazol como control positivo, obteniendo en promedio un IC₅₀ de 2.88 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 2. CIM para *G. duodenalis* en ensayos de susceptibilidad.

<i>G. duodenalis</i> aisladas	CIM (μM) ^a	Rango (μM)	Rango ($\mu\text{g/mL}$)
BRIS/83/HEPU/106	6.3	3.2-12.5	0.52-2.12
BRIS/83/HEPU/106-2ID ₁₀	25	25	4.25
WB-1B	6.3	6.3-12.5	1.06-2.12
WB-M3	50	50	8.5
WB-M3-Alb	6.3	6.3	1.06

^a CIM de metronidazol obtenido con frecuencia mayor.

3.7. Ensayo de toxicidad

Actualmente el ensayo con *Artemia salina*, es utilizado comúnmente para determinar el efecto tóxico de compuestos bioactivos, naturales o sintéticos. Es un barrido preliminar de la toxicidad de extractos de plantas, toxinas fúngicas, metales pesados, toxinas de cianobacterias, pruebas de toxicidad de materiales dentales y nano estructuras. Se recomienda, posteriormente un modelo animal para la confirmación.

Las larvas nauplii, tienen una longitud de aproximadamente de 22 nm, son lo suficientemente grandes para observarse sin necesidad de magnificar y lo suficientemente pequeñas para eclosionar en grandes cantidades sin requerir un amplio lugar de trabajo en un laboratorio.²² El ensayo consiste en la cuantificación de los nauplios antes y después de colocarlas en un medio salino con el compuesto disuelto.

3.8. Agentes antimicrobianos

Narcisi y Secor²³ estudiaron de manera comparativa el efecto antiparasitario frente a 21 *Trichomonas vaginalis* de los cuales 12 son resistentes a metronidazol y 9 susceptibles. La estructura molecular de tinidazol y metronidazol son similares ya que pertenecen al mismo grupo de fármacos nitroimidazoles y furazolidona presenta el grupo oxazolidinona que es de

interés en esta investigación (Figura 11). El estudio se llevó a cabo utilizando técnicas de micro dilución de los agentes antimicrobianos a concentraciones distintas ($400 - 0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) y una concentración conocida del parásito (10^4) en sus respectivos pocillos en una placa de micro dilución. La interpretación de la micro dilución indica la concentración letal mínima (CLM). Debido a que *Trichomonas vaginalis* se considera como un parásito anaerobio facultativo, es decir, su desarrollo se lleva a cabo de manera similar en presencia o ausencia de oxígeno, los experimentos se realizaron bajo esas dos condiciones (Tablas 3 y 4).

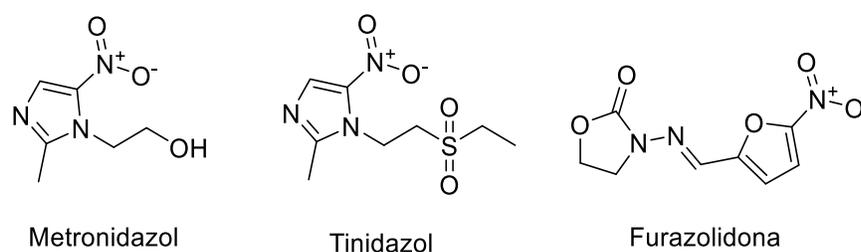


Figura 11. Estructura molecular de metronidazol, tinidazol y furazolidona.

Tabla 3. Evaluación antiparasitaria en ambiente aerobio.

	Categoría	Tinidazol	Metronidazol	Furazolidona
Aerobio	Resistentes	$\geq 50\mu\text{g}/\text{mL}$ de los 12	9 $\geq 50\mu\text{g}/\text{mL}$ (1-12)	Activo para ambos casos $0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ necesario como máximo (los 21)
	Susceptibles	$< 50\mu\text{g}/\text{mL}$ todos los demás	$\leq 25\mu\text{g}/\text{mL}$ (13-21)	

Tabla 4. Evaluación antiparasitaria en ambiente anaerobio.

	Categoría	Tinidazol	Metronidazol	Furazolidona
Anaerobio	Resistentes	$\geq 50\mu\text{g}/\text{mL}$ 4 de los 12 (33.3%)	≥ 50 (1-8,12)	Activo para ambos casos $3.1\mu\text{g}/\text{mL}$ necesario como máximo (los 21)
	Susceptibles	$< 50\mu\text{g}/\text{mL}$ todos los demás	$\leq 25\mu\text{g}/\text{mL}$	

Los resultados obtenidos demostraron que furazolidona presenta una actividad antiparasitaria efectiva tanto a parásitos resistentes como susceptibles incluso mejor que tinidazol y metronidazol, además furazolidona es activo en condiciones aerobias y anaerobias y requiere de concentraciones bajas para ser letal ($3.1\mu\text{g}/\text{mL}$ como máximo).

Loreto y colaboradores,²⁴ realizaron una evaluación de la eficiencia de agentes antimicrobianos diferente contra *Pythium spp.* El interés de este trabajo está enfocado en la efectividad de los compuestos oxazolidinona en presencia de oomycetos, especies consideradas como pseudo hongos ya que presentan funciones de parásitos. Los compuestos utilizados por familias fueron: macrólidos (azitromicina, claritromicina y josamicina), oxazolidinonas (linezólida, tedizólida y sutezólida), pleuromutilinas (retapamulina, tiamulina y valnemulina) y miltefosina, único compuesto descrito como antiprotozoario (Tabla 5). Utilizando técnicas de micro dilución determinaron la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración letal mínima (CLM) se determinó tomando una muestra de la CIM y cultivándola en medios de cultivo para observar después de tiempo transcurrido la presencia (crecimiento) o ausencia (muerte) del organismo microbiano.

Los resultados reportados indican que los compuestos oxazolidinona como sutezólida y linezólida presentan actividad contra *Pythium spp.*, sin embargo, en comparación con miltefosina, estos no son muy eficientes. En cuanto a tedizólida, su actividad inhibitoria fue poca o nula.

Tabla 5. Actividad de agentes antimicrobianos frente a *Pythium spp.*

Agente antimicrobiano	Intervalo de CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	CMI_2^a	CMI_1^a	CMI_0^a	CML
Macrólidos				
Azitromicina	0.5 – 8	1 – 16	1 – 32	4 – 32
Claritromicina	0.5 – 8	0.5 – 16	0.5 – 64	1 – 64
Josamicina	0.5 – 16	1 – 64	2 – 64	2 – 64

Tabla 5. Actividad de agentes antimicrobianos frente a *Pythium spp.* (continuación)

Agente antimicrobiano	Intervalo de CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	CMI_2^a	CMI_1^a	CMI_0^a	CML
Oxazolidinonas				
Linezólida	1 – 32	1 – 32	1 – 64	8 – 64
Sutezólida	1 – 4	2 – 8	4 – 64	4 – 64
Tedizólida	NO	8 a > 32	> 32	> 32
Pleuromutilinas				
Retapamulinas	$\leq 0.125 - 32$	$\leq 0.125 - 32$	0.25 – 32	0.5 – 64
Tiamulina	1 – 8	1 – 32	2 – 64	4 – 64
Valnemulina	$\leq 0.125 - 4$	$\leq 0.25 - 8$	0.25 – 16	0.25 – 32
Anti protozoo				
Miltefosina	NO	NO	0.5 – 4	0.5 – 4

^aCMI₀, 100% inhibición; CMI₁, $\geq 90\%$ inhibición; CMI₂, $\geq 50\%$ y $< 90\%$ inhibición

En el trabajo publicado por Alcantar y colaboradores²⁵ sintetizaron seis análogos de linezólida, presentan tres distintos sustituyentes en el grupo amino (bencilo, hidrógeno y acetilo) y cada uno cuenta con su par diastereomérico (Figura 12). Los análogos sintetizados fueron caracterizados por técnicas como infrarrojo con transformada de Fourier (IFTF), resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno y carbono y espectrometría de masas. La actividad de estos análogos se evaluó frente al parásito *Hymenolepis nana* y algunas bacterias, principalmente grampositivas, también se determinó su viabilidad celular (toxicidad). La actividad antiparasitaria se evaluó colocando el parásito en soluciones que contenían los distintos análogos, todos ellos a una concentración de $20 \text{ mg}/\text{mL}$. Se observó la movilidad y morfología del parásito, a su vez se tomaba el tiempo (minutos) en que se ocasionaba la parálisis y muerte del parásito. Se tiñó el parásito con azul de Evans para observar el daño ocasionado en su anatomía, cuando el parásito es teñido indica muerte celular.

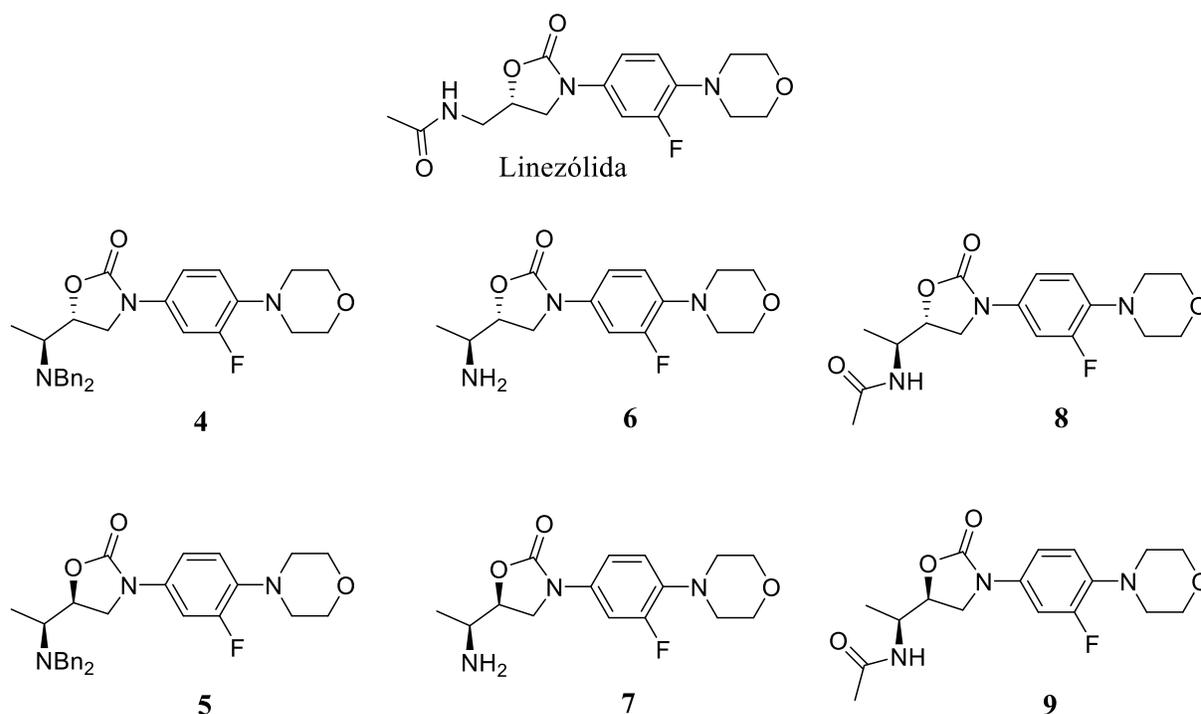


Figura 12. Análogos de linezólida.

Se observó que los compuestos **4** y **5** generaban daño al parásito, pero estos requerían mayor tiempo que praziquantel. Los compuestos **6** y **7** tienen mayor actividad que praziquantel ya que generan la parálisis y muerte en menor tiempo y **7** genera una tinción total. Con los resultados de **8** y **9** se puede observar la importancia de la conformación *anti* y *sin*, hay una diferencia considerable en el tiempo que ocasiona la muerte del parásito. Por último, se observó que linezólida solo generaba la parálisis reversible (Tabla 6).

Los resultados publicados hacen referencia a la buena actividad antiparasitaria de estos análogos. Se observaron mejores resultados en comparación al fármaco de primera elección para el tratamiento de himenolepiasis (praziquantel), ocasionando la parálisis y la muerte en un tiempo menor y una tinción completa indicando el daño anatómico tanto al parásito como a sus huevecillos evitando la retro infección. La viabilidad celular se determinó por medio del contacto entre células epiteliales de retina adulta por sus siglas en inglés (ARPE-19) y una concentración de 400 μM (micro molar) de los análogos, y como de contraste, linezólida a

100 μM (Tabla 7). En general, los análogos obtuvieron mejores porcentajes de proliferación celular que linezólida y no se consideran tóxicos

Tabla 6. Evaluación del efecto antiparasitaria de análogos de linezólida frente a *H. nana*.

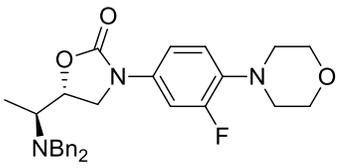
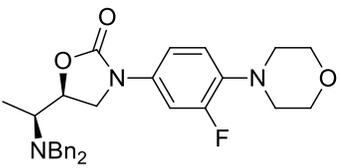
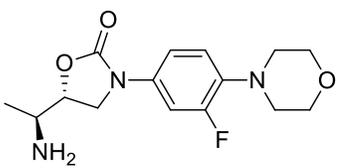
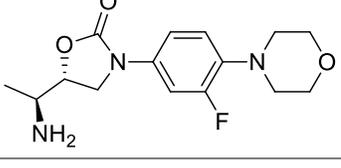
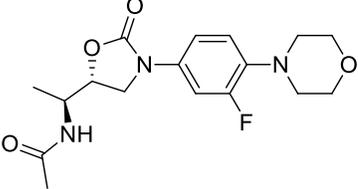
Compuesto	Estructura	Parálisis (min)	Muerte (min)	Efecto anatómico
4		20	60	Tinción parcial, daño en proglótide grávido, liberación moderada de huevos sin teñir
5		20	60	Tinción parcial, daño en cuello, escólex y proglótides maduros
6		11	21	Tinción total, daño en proglótide grávido, escólex y liberación de huevos teñidos
7		10	21	Tinción total
8		2	60	Tinción parcial, daño en cuello, escólex y proglótides maduras

Tabla 6. Evaluación del efecto antiparasitaria de análogos de linezólida frente a *H. nana* (continuación).

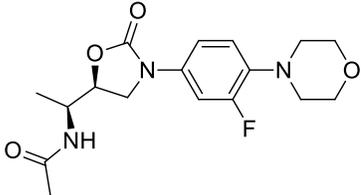
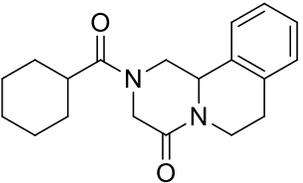
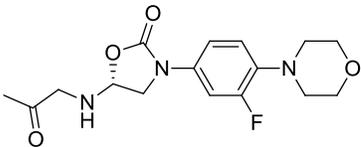
Compuesto	Estructura	Parálisis (min)	Muerte (min)	Efecto anatómico
9		6	18	Tinción total
Praziquantel		20	30	Tinción total
Linezólida		5	N/D	Parálisis reversible, sin daño anatómico
Control (-)		N/D	N/D	Movilidad normal, sin daño anatómico

Tabla 7. Estudio de viabilidad celular de análogos de linezólida.

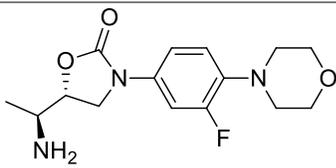
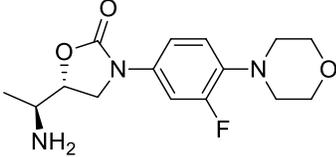
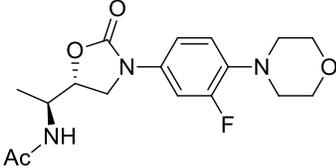
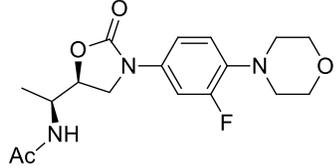
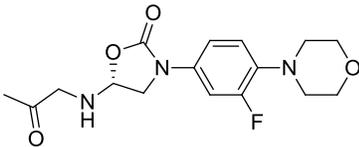
Compuesto	Estructura	Proliferación (%) ^a
6		76.5 ± 1.7
7		85.2 ± 1.0

Tabla 7. Estudio de viabilidad celular de análogos de linezólida (continuación).

Compuesto	Estructura	Proliferación (%) ^a
8		94.9 ± 1.2
9		89.9 ± 2.3
Linezólida		83.1 ± 4.3 ^c

^a. Expresado como el promedio de 3 experimentos independientes.

^b Se utilizó Doxorubicin como control.

^c Evaluado a 100 μM.

Con base a la información presentada se concluye que el compuesto tipo oxazolidinona presentan actividad frente a agentes microbianos como parásitos, requiriendo concentraciones mínimas, los compuestos análogos de linezólida no son tóxicos frente a la línea celular ARPE-19 y que los fundamentos de micro dilución son técnicas de laboratorio factibles para la evaluación de la actividad antiparasitaria.

3.9. Hipótesis

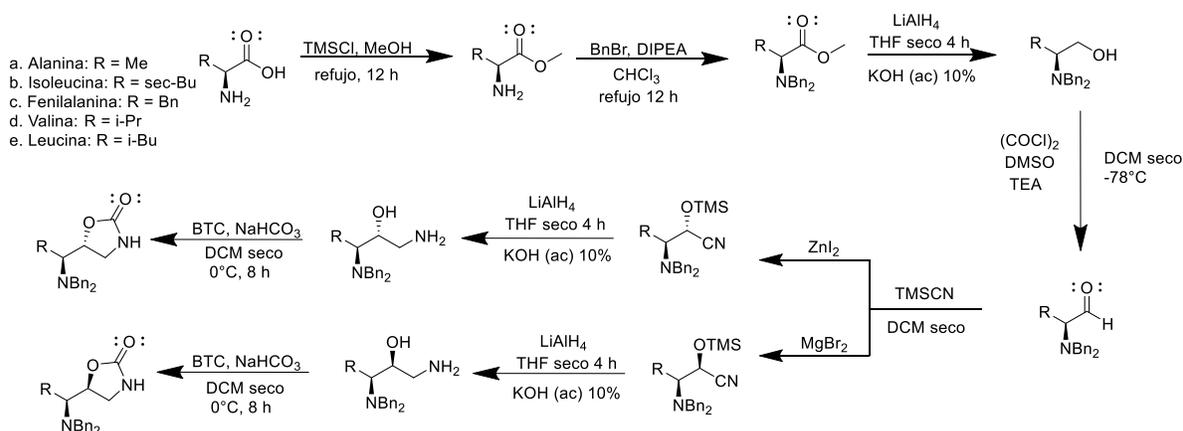
La funcionalidad de tipo oxazolidinona en la estructura molecular de las dibencilamino oxazolidinonas propuestas en esta investigación podría conferirles actividad antiparasitaria frente a *Giardia duodenalis*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se describe primeramente la etapa de síntesis de compuestos de oxazolidinona con dos centros estereogénicos otorgándoles una estereoquímica *anti* (*R*, *S*) o *sin* (*S*, *S*) a partir de α -aminoácidos enantiopuros de L-alanina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-valina y L-Leucina. Posteriormente los resultados de la actividad antiparasitaria frente a *G. duodenalis* y evaluación de toxicidad frente a *Artemia salina* de los compuestos sintetizados.

4.1. Etapas de reacción

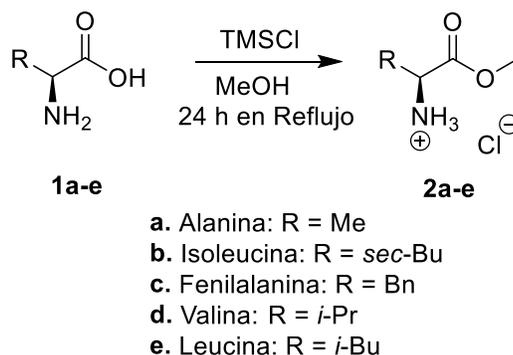
- Esterificación de α -aminoácidos con TMSCl.
- Protección de grupo amino con bromuro de bencilo.
- Reducción con $LiAlH_4$ para la formación de β -aminoalcohol.
- Oxidación por método de Swern.
- Formación de trimetilsililoxicianhidrina con estereoquímica *anti* y *sin* empleando yoduro de cinc (ZnI_2) y bromuro de magnesio ($MgBr_2$) respectivamente.
- Formación de α -aminoalcohol utilizando $LiAlH_4$.
- Formación de 1,3-oxazolidin-2-ona mediado por bis(triclorometil)carbonato (trifosgeno).



Esquema 1. Ochoa-Terán y Rivero (2008), ruta de síntesis.²⁶

a) Síntesis de α -amino éster

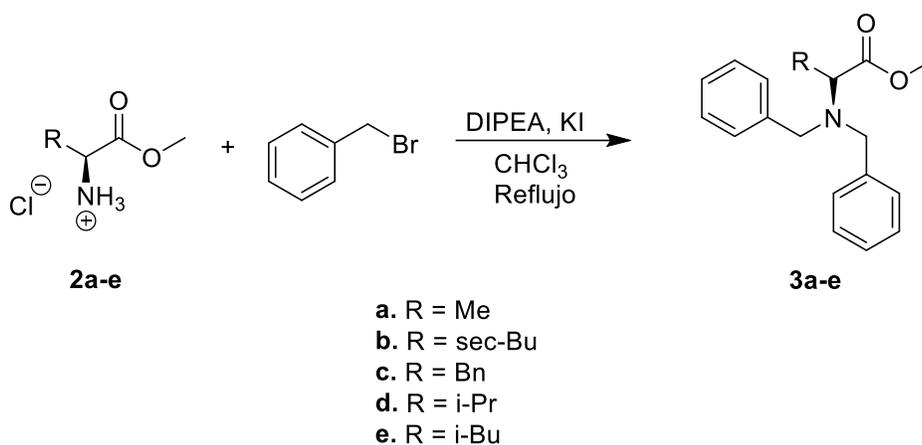
La primera etapa de síntesis consiste en la esterificación de los aminoácidos **1a-e** utilizando cloruro de trimetilsilano (TMSCl) como grupo protector, un agente empleado para una amplia variedad de reacciones químicas y metanol como solvente y nucleófilo (Ecuación 1). Este es un método conveniente ya que se maneja bajo condiciones suaves. Los rendimientos obtenidos fueron del 97-99 %



Ecuación 1

b) Síntesis de (*S*)-2-(*N,N*-dibencilamino) ésteres

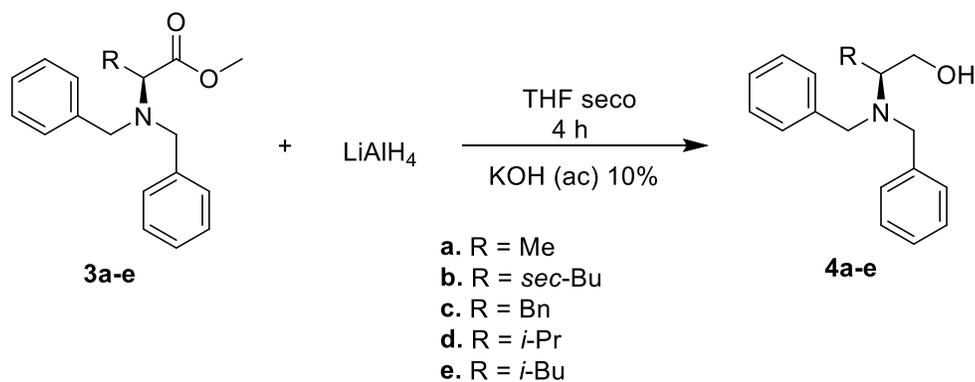
En la segunda etapa se realizó una reacción de protección de los grupos amino **2a-e** con bromuro de bencilo, utilizando diisopropiletilamina (DIPEA) como base y cloroformo como solvente. Se llevó a cabo por mecanismos de sustitución nucleofílica bimolecular (Ecuación 2). El bromuro de bencilo es un grupo protector voluminoso y tiene un papel importante en el control estereoselectivo de reacciones posteriores. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna empacada con gel de sílice empleando una fase móvil éter de petróleo: acetato de etilo (9:1) y se obtuvieron rendimientos de 66%-96%.



Ecuación 2

c) Síntesis de (S)-2-(N,N-dibencilamino) alcoholes

En la tercera etapa de reacción se llevó a cabo la reducción de los grupos éster **3a-e** hacia alcohol con LiAlH_4 como agente reductor (Ecuación 3). Los rendimientos fueron del 95-98%.

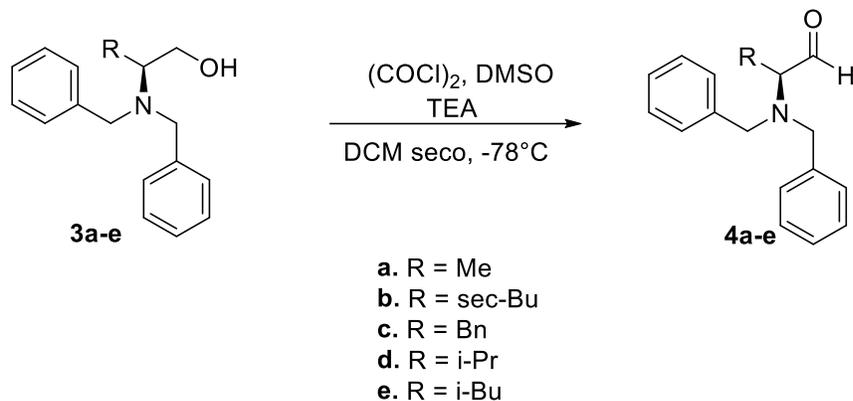


Ecuación 3

d) Síntesis de (S)-2-(N,N-dibencilamino) aldehídos

La cuarta reacción consiste en una oxidación de Swern (Ecuación 4), para este caso la transformación de un alcohol primario **3a-e** está dirigido a la formación de un aldehído **4a-4e** y

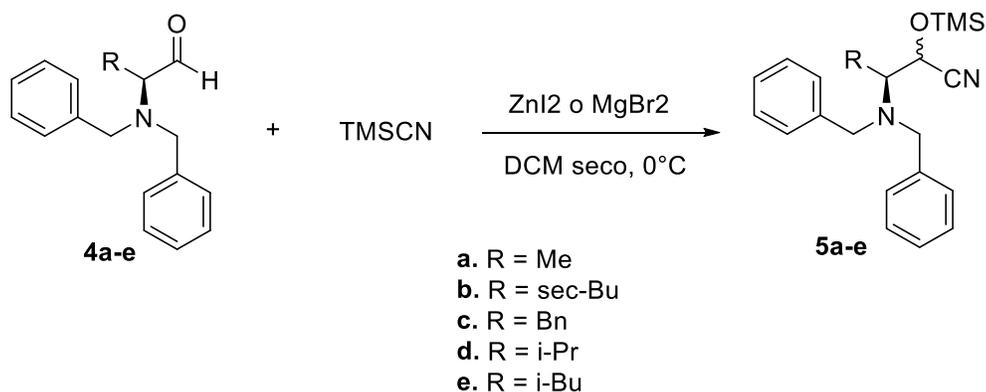
se requiere condiciones de reacción controladas. Se obtuvieron productos con rendimientos de 88-98%.



Ecuación (4)

e) Síntesis de α -(*N,N*-dibencilamino) trimetilsiloxicianhidrina

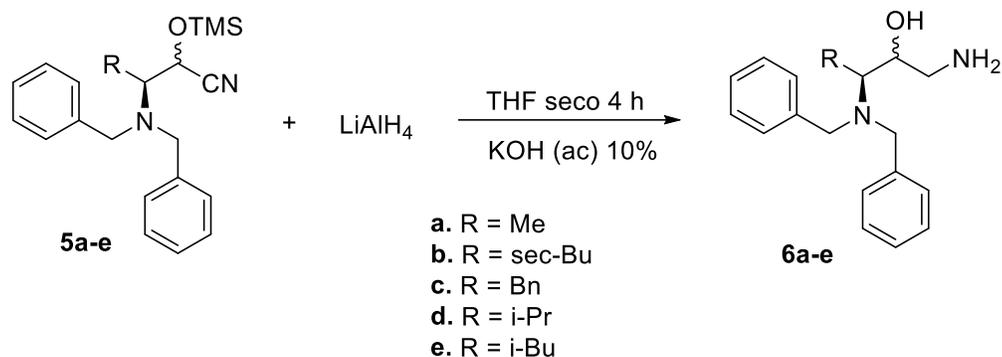
La quinta etapa de síntesis consiste en la adición de cianuro de trimetilsililo (TMSCN) a compuestos **4a-e** y que a su vez da origen a un nuevo centro quiral de manera estereoselectiva empleando ácidos de Lewis como catalizadores (Ecuación 5). El ZnI_2 induce la configuración *anti* y MgBr_2 la configuración *sin*, la estereoselectividad se puede pronosticar por modelos de Felkin-Anh. Los productos se obtuvieron con rendimientos de 89-95%.



Ecuación (5)

f) Síntesis de α -(*N,N*-dibencilamino) aminoalcoholes

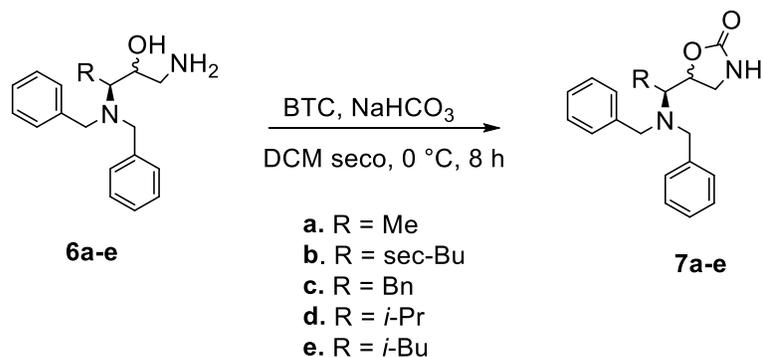
La sexta reacción consistió en la reducción del compuesto **5a-e** utilizando LiAlH_4 como agente reductor (Ecuación 6). Se obtuvieron rendimientos del 67-88%.



Ecuación (6)

g) Síntesis de oxazolidinonas

La séptima y última reacción consiste en la formación de la 1,3-oxazolidin-2-ona. Para la ciclación de los compuestos **6a-e** se utilizó trifosgeno (Ecuación 7). El producto crudo se purificó por columna con una fase móvil 1:1 de éter de petróleo-acetato de etilo. Se obtuvieron rendimientos de 20-42%.



Ecuación (7)

En este grupo de investigación ya se ha logrado la síntesis de este tipo de oxazolidinonas y se cuenta con la experiencia en el laboratorio y la caracterización a detalle de todos los productos de reacción intermedios.²⁶ A continuación, se presenta solamente los resultados de la caracterización del producto final de la síntesis de oxazolidinonas como evidencia de una síntesis exitosa.

4.2. Caracterización por FT-IR

El espectro de FTIR (Figura 13) corresponde al compuesto **7a anti**, sin embargo, son consistentes los patrones de señales características para todos los compuestos de oxazolidinonas: una sola banda a 3250 cm^{-1} para la amina secundaria de la oxazolidinona y su respectivo estiramiento C-N a 1235 cm^{-1} , bandas alrededor de $2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ indicando insaturaciones de los sistemas aromáticos y una banda intensa que pertenece al grupo carbonilo a 1740 cm^{-1} .

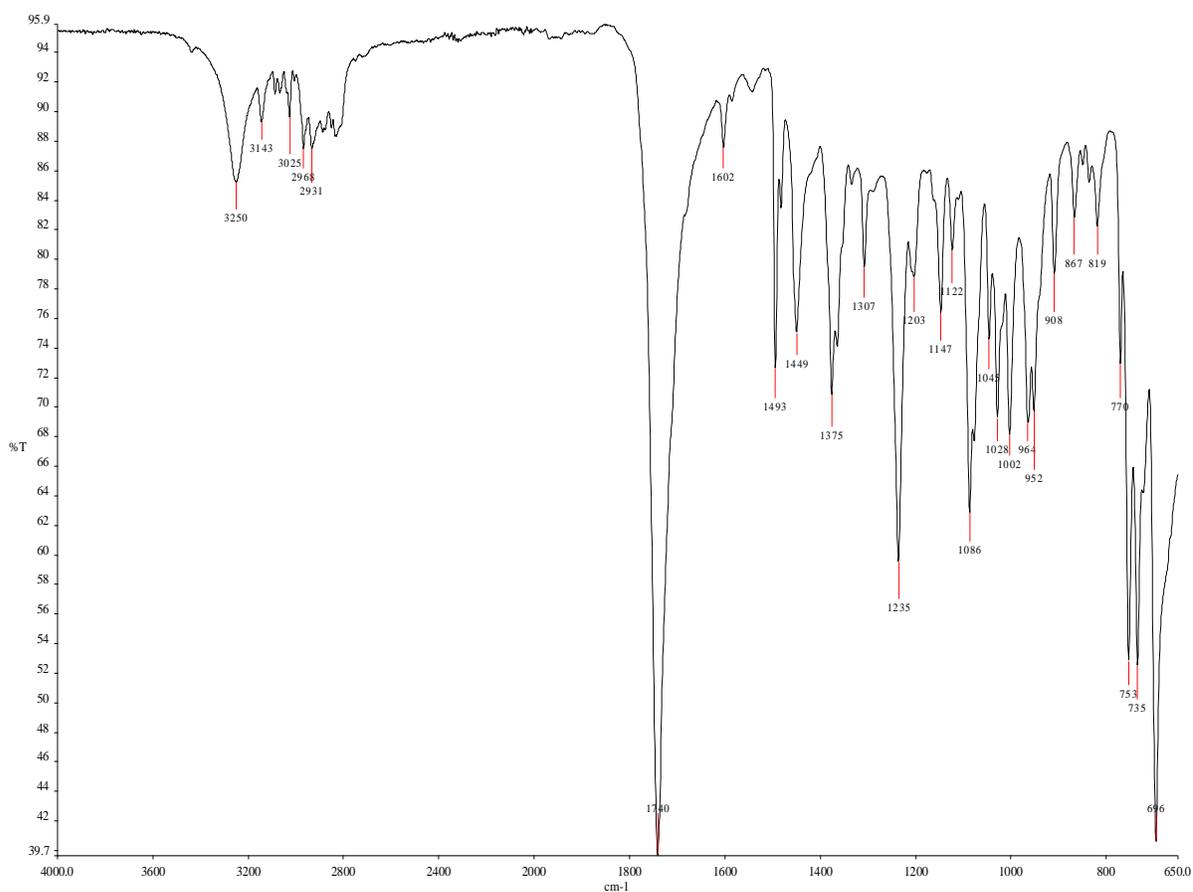


Figura 13. Espectro de FTIR de **7a**

4.3. Caracterización por RMN

En la Figura 14 se presenta espectro de RMN ^1H de **7a** con configuración *anti*. Se observó a 7.27 ppm un multiplete que integra para 10 hidrógenos correspondientes a los dos sistemas aromáticos ($\text{A}_2\text{B}_2\text{C}$). Un singulete ancho a 5.69 ppm haciendo referencia al hidrógeno unido a nitrógeno del anillo oxazolidinona. A 4.46 ppm un triple de dobles que se observa como un cuarteto con $J = 8.4$ Hz, correspondiente al metino unido a oxígeno. En la figura 15 se encuentra el espectro ampliado del mismo compuesto, donde se puede apreciar mejor las siguientes señales. A 3.70 y 3.44 ppm se observan dos dobletes que integran para dos

hidrógenos cada uno y con $J = 13.6$ Hz, pertenecientes a los metilenos bencílicos. A 3.54 y 3.23 ppm aparecen dos dobles de dobles vistos como tripletes con $J = 8.6$, correspondiente al metileno del anillo de oxazolidinona donde se observa un ambiente diastereotópico. La siguiente señal a 2.82 ppm se observa un doble de cuartetos, ambos con $J = 6.6$ Hz que integra para el hidrógeno de metino unido a nitrógeno. Por último, se observa un doblete a 1.22 ppm que integra para tres hidrógenos correspondientes al metilo con $J = 6.6$ Hz.

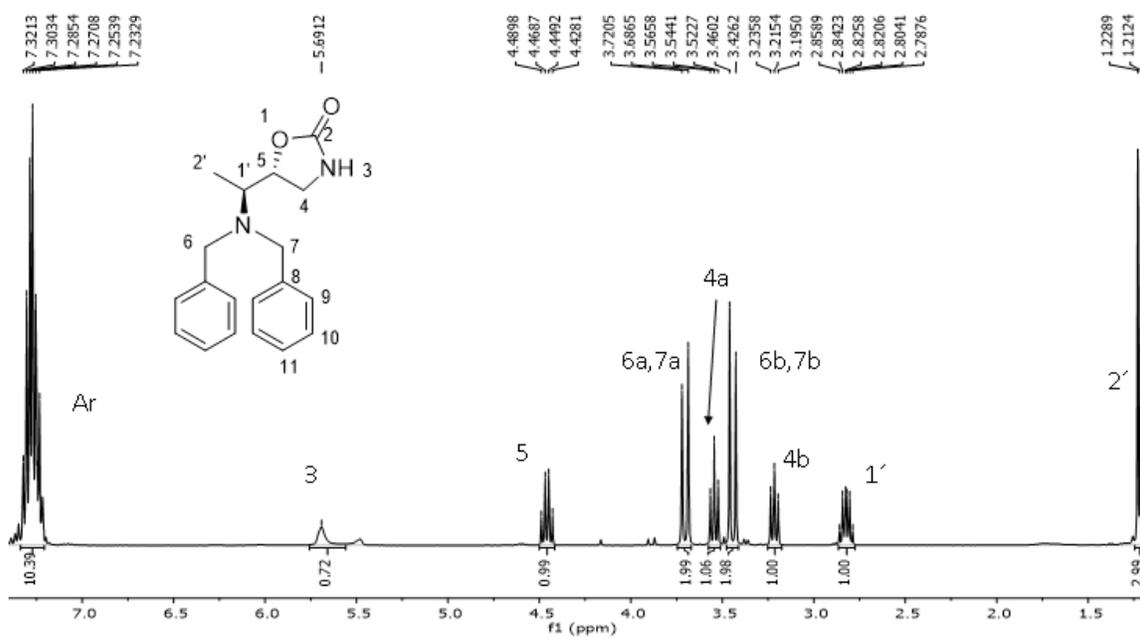


Figura 14. Espectro de RMN ^1H del compuesto **7a anti** en CDCl_3 .

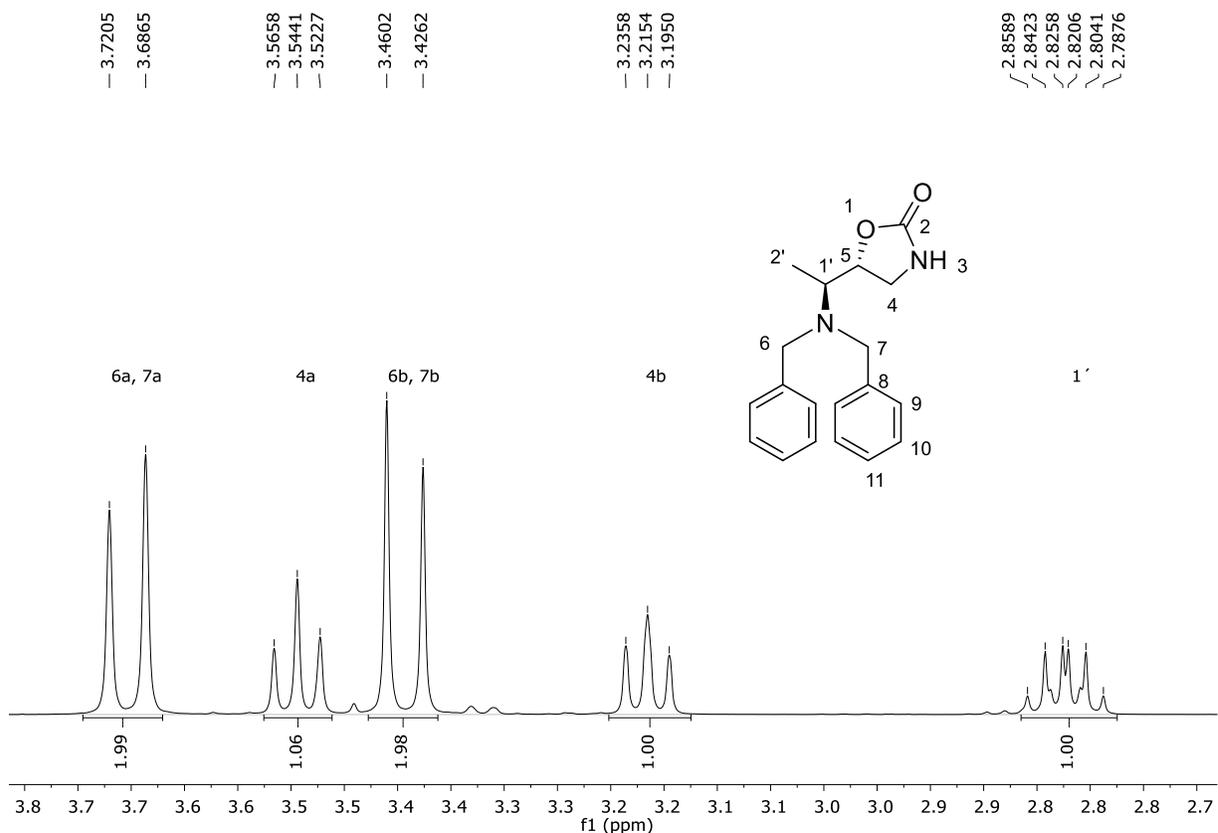


Figura 15. Espectro de RMN ^1H ampliado del compuesto **7a anti** en CDCl_3

En el espectro de RMN ^{13}C de **7a anti** (Figura 16) se observó una señal a 159.9 ppm para el carbonilo de la oxazolidinona, se identifican cuatro señales en la región aromática, a 139.3 ppm se encuentra el carbono cuaternario y para el sistema A_2B_2C las señales a 128.8, 128.4 y 127.3 ppm. La señal a 78.6 ppm pertenece al metino unido a oxígeno. A 56.7 ppm se encuentra la señal del metino unido a nitrógeno. Los metilenos bencílicos aparecen a 54.6 ppm, a 44.8 ppm la señal del metileno de la oxazolidinona y por último a 8.65 ppm la señal del metilo.

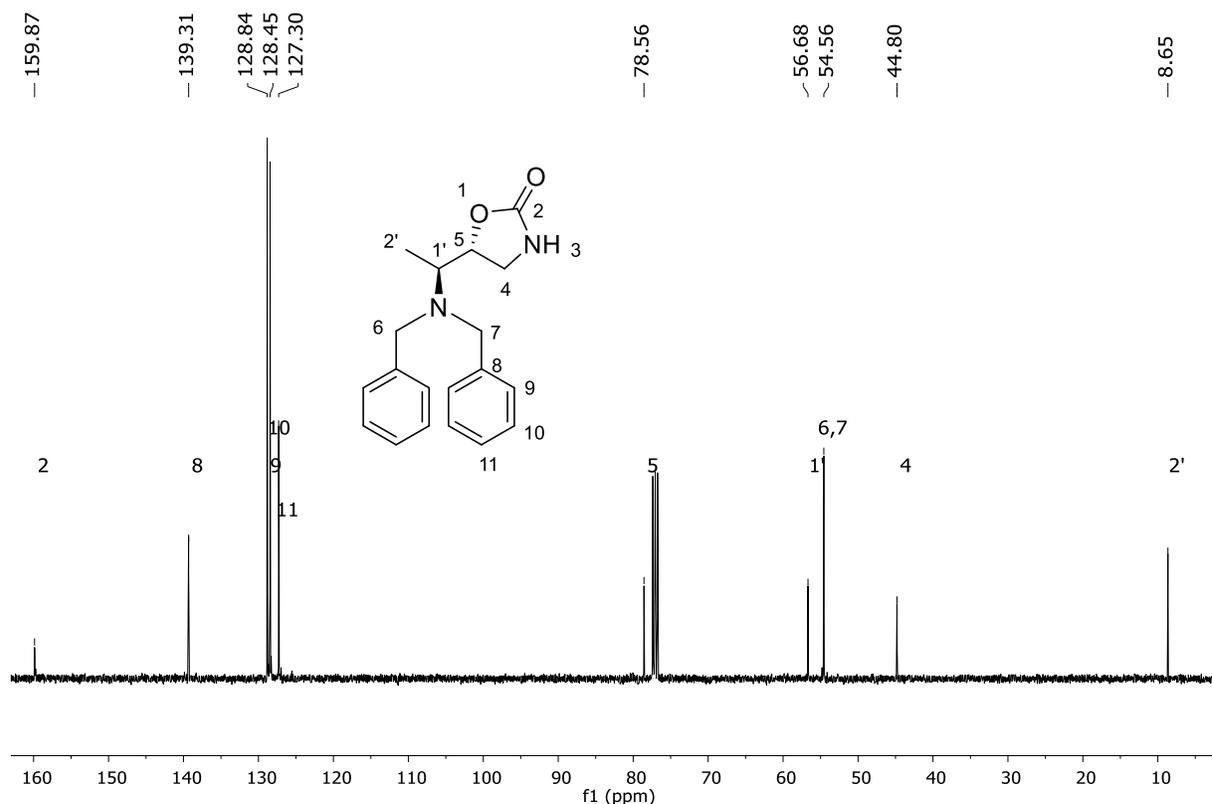
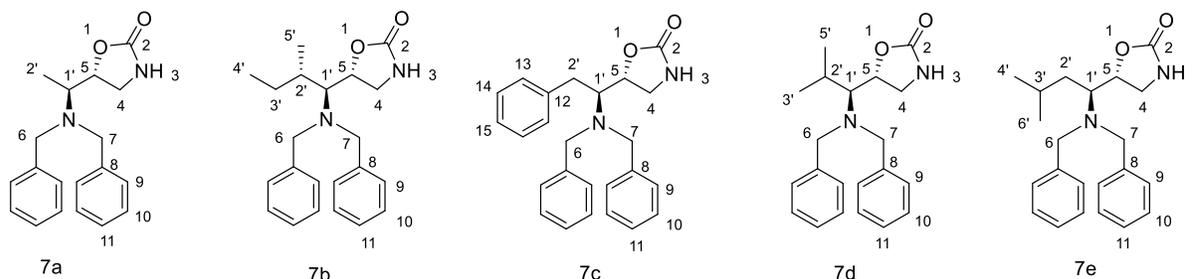


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7a anti** en CDCl_3 .

En la Tabla 8 se comparan los desplazamientos químicos en ppm y la multiplicidad de RMN ^1H de todos las oxazolidinonas con configuración *anti*. La sección de aromáticos (7.27 a 7.33 ppm) integra para diez hidrógenos para todas la oxazolidinonas dibenciladas (**7a**, **7b**, **7d** y **7e**) pero **7c** integra para 15 debido al radical fenilo. Las señales características de las oxazolidinonas son los hidrógenos 3, 4 y 5 y se logran identificar en todos los compuestos, con la misma multiplicidad y una variación en los desplazamientos químicos. Los metilenos bencílicos (6ab y 7ab) son similares en todos los compuestos. Se comienza a observar diferencias con el hidrógeno 1' ya que los sustituyentes son distintos y debido al efecto diastereotópico, principalmente en la multiplicidad.

Tabla 8. Asignación de las señales de RMN ^1H de oxazolidinonas con configuración *anti*.

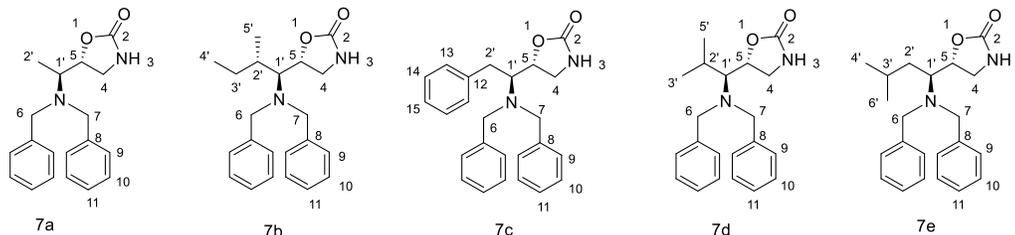
No.	Posición	7a	7b	7c	7d	7e
1	Ar	7.27 (10H, m)	7.27 (10H, m)	7.33 (15H, m)	7.29 (10H, m)	7.28 (10H, m)
2	3	5.69 (1H, sa)	5.41 (1H, sa)	5.82 (1H, sa)	5.64 (1H, sa)	5.69 (1H, sa)
3	5	4.46 (1H, c, 8.4)	4.85 (1H, c, 8.3)	4.55 (1H, td, 8.0, 4.1)	4.83 (1H, c, 8.4)	4.74 (1H, c, 6.2)
4	6a, 7a	3.70 (2H, d, 13.6)	3.72 (2H, d, 13.4)	4.06 (2H, d, 13.5)	3.69 (2H, d, 13.5)	3.72 (2H, d, 13.8)
5	4a	3.54 (1H, t, 8.6)	3.64 (1H, t, 8.6)	3.47 (1H, t, 7.9)	3.62 (1H, t, 8.7)	3.60 (1H, t, 3.9)
6	6b, 7b	3.44 (2H, d, 13.6)	3.49 (2H, d, 13.4)	3.59 (2H, d, 13.5)	3.57 (2H, d, 13.5)	3.57 (2H, d, 13.8)
7	4b	3.23 (1H, t, 8.6)	3.26 (1H, t, 8.6)	2.92 (1H, t, 7.9)	3.24 (1H, t, 8.6)	3.13 (1H, t, 8.4)
8	1'	2.82 (1H, dc, 6.6)	2.66 (1H, dd, 9.3, 2.1)	2.83 (1H, m)	2.59 (1H, dd, 3.2)	2.71 (1H, c, 7.1)
9	2'	1.22 (3H, d, 6.6)	2.04 (1H, m)	3.13 (2H, m)	2.33 (1H, m)	1.96 (1H, m) 1.73 (1H, m)

Tabla 8. Asignación de las señales de RMN ^1H de oxazolidinonas con configuración *anti* (continuación).

No.	Posición	7a	7b	7c	7d	7e
10	3'		1.45 (2H, m)		1.09 (3H, d, 7.0)	1.29 (1H, m)
11	5'		1.14 (3H, d, 7.0)		1.13 (3H, d, 7.0)	
12	4'		0.92 (3H, t, 7.4)			0.93 (3H, d, 6.6)
13	6'					0.75 (3H, d, 6.6)

Desplazamientos en ppm y constante de acoplamiento en Hz.

En la Tabla 9 se muestran las señales de RMN ^{13}C . Las señales características de las oxazolidinonas son el grupo carbonilo (C2), metileno (C4) y metino unido a oxígeno (C5), se observa C4 con el desplazamiento más bajo en el compuesto **7c**. De C6-C11 hay consistencia en los desplazamientos que corresponden a los carbonos metilenos bencílicos y del sistema aromáticos. A partir de C1' ya comienza a haber discrepancia en los desplazamientos debido a los sustituyentes.

Tabla 9. Asignación de las señales de RMN ^{13}C de oxazolidinonas con configuración *anti*

No.	Posición	7a	7b	7c	7d	7e
1	2	159.9	159.8	159.7	160.0	160.1
2	4	44.8	45.6	42.5	45.6	44.9
3	5	78.6	75.5	77.5	75.7	77.1
4	6,7	54.6	54.8	55.5	54.8	54.6
5	8	139.3	139.2	139.0	139.2	139.5
6	9	128.8	129.0	129.1	129.0	129.0
7	10	128.4	128.4	128.4	128.4	128.4
8	11	127.3	127.3	127.1	127.3	127.2
9	1'	56.7	63.7	60.9	64.4	58.4
10	2'	8.7	31.8	31.4	25.4	35.4
11	3'		15.7		19.1	24.8
12	4'		12.4			23.3
13	5'		30.0		23.3	
14	6'					22.5
15	12			139.5		
16	13			129.5		
17	14			128.6		
18	15			126.4		

Desplazamientos en ppm.

En la Figura 17 se presenta espectro de RMN ^1H de **7a** con configuración *sin*. Se observó tres señales para el sistema aromático, lográndose ver el sistema $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}$. A 7.37 ppm un doblete que integra para cuatro hidrógenos correspondientes a los metinos aromáticos A_2 y $J = 7.1$ Hz. Un doble de dobles a 7.28 ppm con $J = 7.3$ Hz que integra para cuatro hidrógenos del sistema aromático B_2 y el último a 7.19 ppm como triplete, integra para dos hidrógenos perteneciente a

los metinos C del sistema aromático y tiene $J = 7.3$ Hz. A 5.88 ppm aparece un singulete ancho que integra para el hidrógeno unido a nitrógeno de la oxazolidinona. A 4.62 ppm un triple de dobles visto como un cuarteto con $J = 8.2$ Hz correspondiente al metino unido a oxígeno. En la figura 18 se encuentra el espectro ampliado del mismo compuesto, donde se puede apreciar mejor las siguientes señales. A 3.90 y 3.53 ppm se observan dos dobletes que integran para dos hidrógenos cada uno y con $J = 13.7$ Hz, pertenecientes a los metilenos bencílicos. A 3.36 ppm aparece un doble de triples visto como quintuplete correspondiente al metileno del anillo de oxazolidinona con $J = 8.2$ Hz. La siguiente señal a 2.91 ppm se observa un quintuplete con $J = 6.8$ Hz que integra para el hidrógeno de metino unido a nitrógeno. Por último, se observa un doblete a 1.13 ppm que integra para tres hidrógenos correspondientes al metilo con $J = 6.8$ Hz.

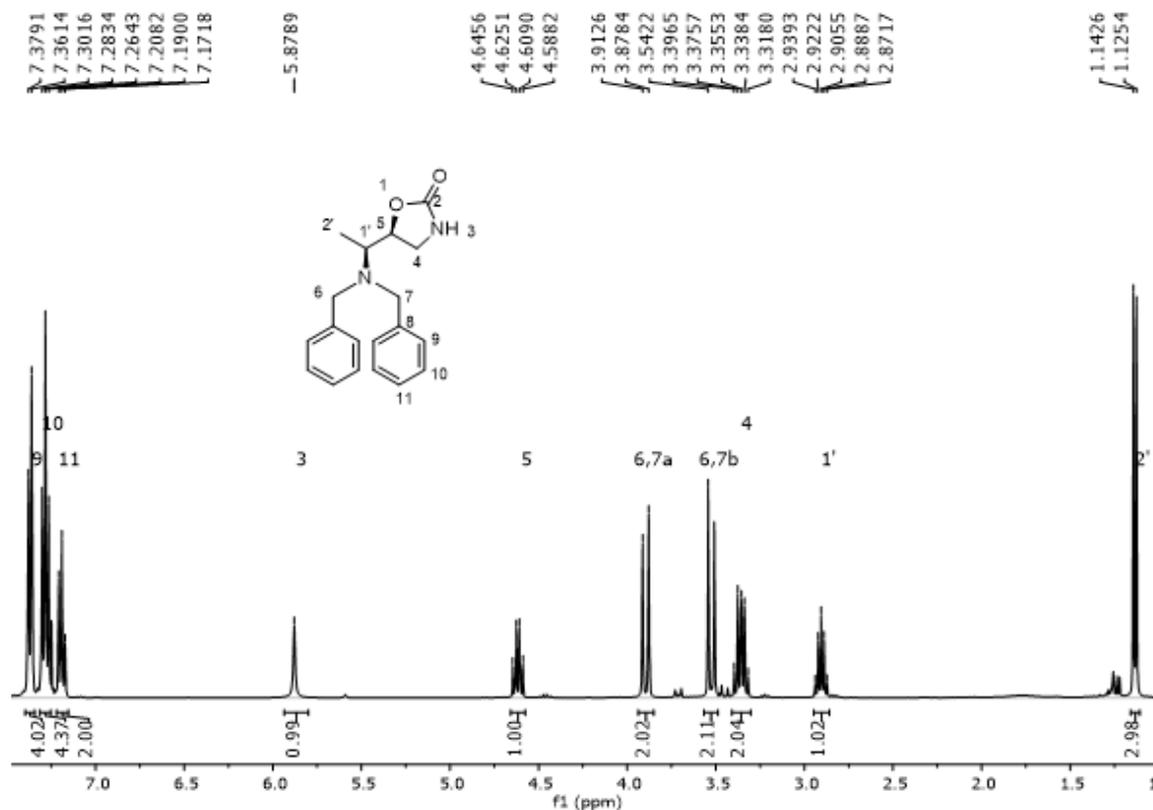
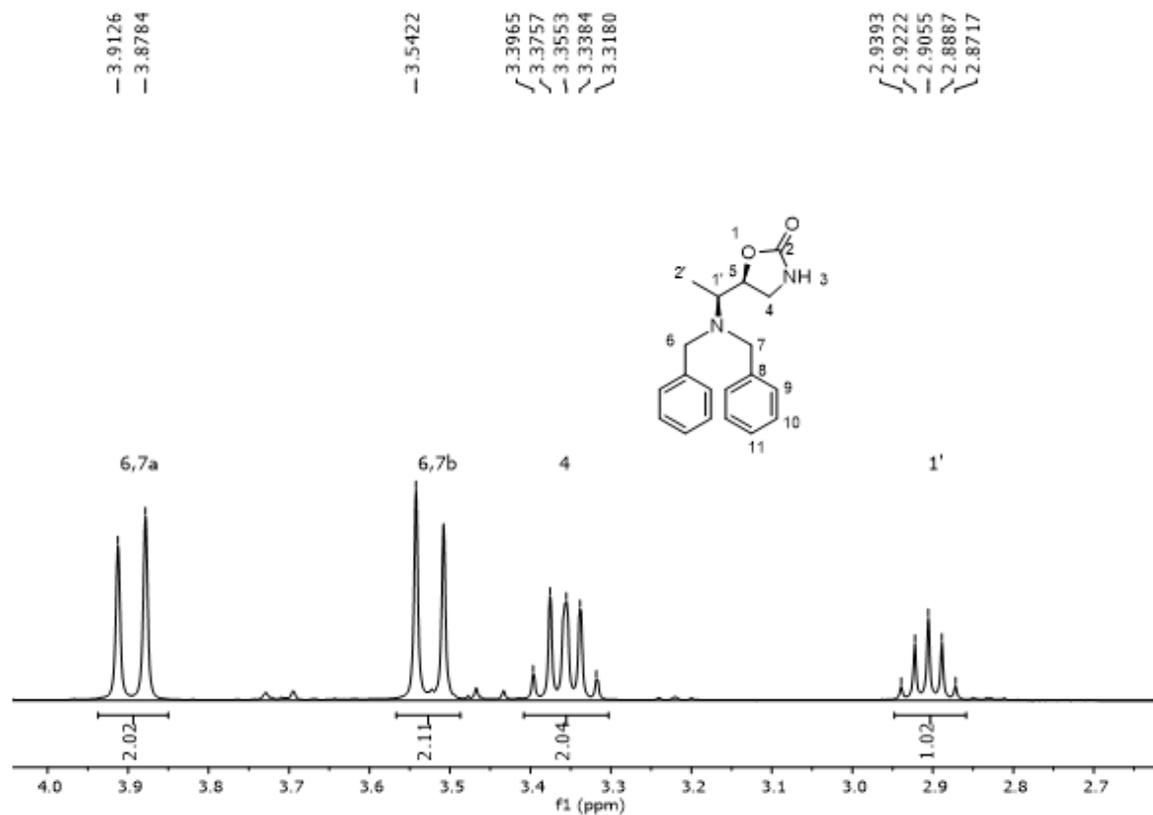


Figura 17. Espectro de RMN ^1H del compuesto **7a sin** en CDCl_3 .**Figura 18.** Espectro de RMN ^1H ampliado del compuesto **7a sin** en CDCl_3 .

En el espectro de RMN ^{13}C de **7a sin** se observó una señal a 160.0 ppm para el carbonilo de la oxazolidinona, se identifican cuatro señales en la región aromática, a 139.9 ppm se encuentra el carbono cuaternario y para el sistema A_2B_2C las señales a 128.8, 128.3 y 127.0 ppm. La señal a 80.0 ppm pertenece al metino unido a oxígeno. A 54.9 ppm se encuentra la señal del metino unido a nitrógeno. Los metilenos bencílicos aparecen a 54.7 ppm, a 43.8 ppm la señal del metileno de la oxazolidinona y por último a 10.5 ppm la señal del metilo (Figura 19).

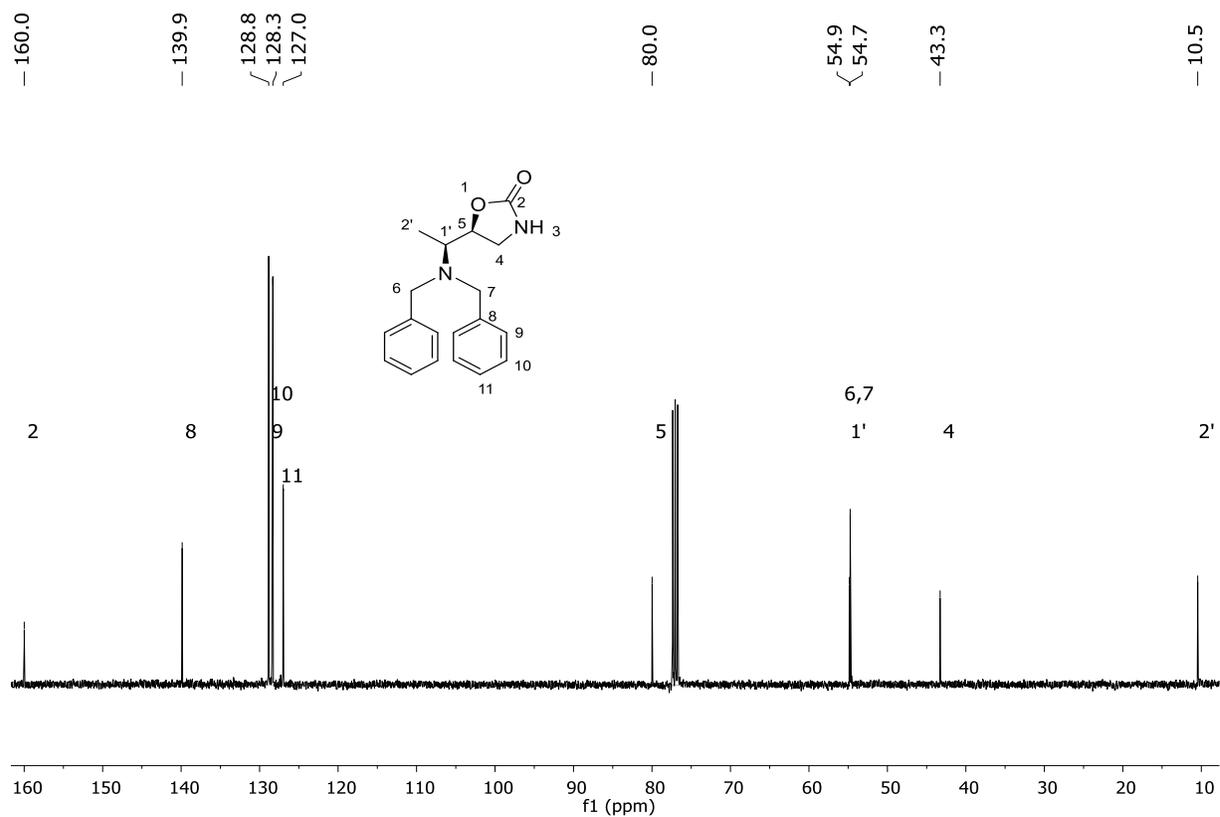
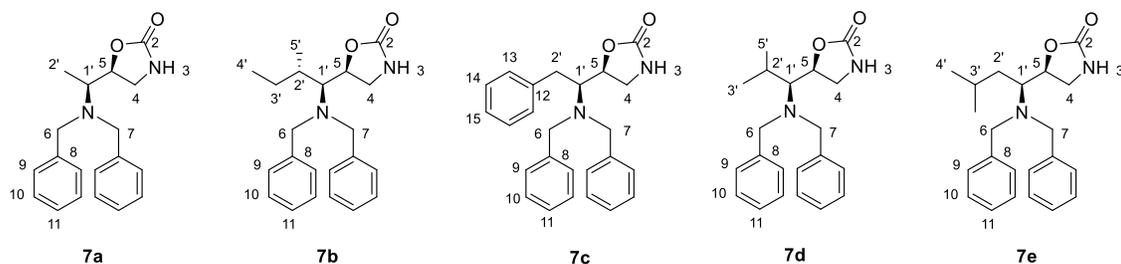


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7a sin** en CDCl_3 .

En la Tabla 10 se muestran las señales de RMN ^1H de todos los compuestos *sin*. En **7a sin** fue el único en el que se logró observar el desdoblamiento de las señales del sistema aromático $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}$. Los hidrógenos **3** y **5** mantienen la misma multiplicidad, pero hay discrepancia en el desplazamiento a lo largo de los cinco compuestos *sin*. Cuando el diastéromero es *sin*, las señales del hidrógeno **4** aparecen solapadas en una sola señal, alterando la multiplicidad, como es el caso del compuesto **7a**, **7b** y **7c**.

Tabla 10. Asignación de las señales de RMN ¹H de oxazolidinonas con configuración *sin*.

No.	Posición	7a	7b	7c	7d	7e
1	Ar	7.37 (4H, d, 7.1)				
		7.28 (4H, dd, 7.3,)	7.30 (10H, m)	7.25 (15H, m)	7.28 (10H, m)	7.29 (10H, m)
		7.19 (2H, t, 7.3)				
2	3	5.88 (1H, sa)	5.83 (1H, sa)	5.24 (1H, sa)	5.97 (1H, sa)	5.96 (1H, sa)
3	5	4.62 (1H, c, 8.2)	4.91 (1H, c, 5.7)	4.74 (1H, c, 5.1)	4.91 (1H, c, 5.8)	4.73 (1H, c, 6.8)
4	6, 7a	3.90 (2H, d, 13.7)	3.94 (2H, d, 13.3)	3.64 (4H, c, 11.6)	3.93 (2H, d, 13.3)	3.85 (2H, d, 13.3)
5	4a	3.36 (2H, q, 8.2)	3.36 (2H, dd, 8.5, 3.0)	3.54 (1H, t, 8.6)	3.36 (2H, d, 8.4)	3.70 (1H, t, 13.8)
6	6, 7b	3.53 (2H, d, 13.7)	3.75 (2H, d, 13.3)	*2	3.80 (2H, d, 13.3)	3.67 (1H, d, 13.3)
7	4b	*1	*1	3.09 (1H, m)	*1	3.42 (1H, t, 8.3)
8	1'	2.91 (1H, q, 6.7,)	2.59 (1H, t, 5.9)	3.09 (1H, m)	2.51 (1H, t, 6.4)	2.75 (1H, c, 6.8)
9	2'	1.13 (3H, d, 6.8)	2.01 (1H, m)		2.04 (1H, m)	1.82 (1H, m) 1.47 (1H, m)

Desplazamientos en ppm y constante de acoplamiento en Hz.

Tabla 10. Asignación de las señales de RMN ^1H de oxazolidinonas con configuración *sin* (continuación).

No.	7a	7b	7c	7d	7e
10	3'	1.81 (1H, m) 1.63 (1H, m)		1.06 (3H, d, 6.8)	1.06 (1H, m)
11	5'	0.91 (3H, d, 6.8)		0.90 (3H, d, 6.8)	
12	4'	0.84 (3H, t, 7.4)			0.87 (3H, d, 6.7)
13	6'				0.61 (3H, d, 6.7)

*1 Las asignaciones 4a y 4b aparecen en una sola señal.

*2 Las asignaciones de 6a, 7a y 6b, 7b aparecen en una sola señal.

Desplazamientos en ppm y constante de acoplamiento en Hz.

En la Tabla 11 se muestran las señales de RMN ^{13}C . Existe una ligera diferencia en los desplazamientos, especialmente aquellos a que se encuentran adyacentes a los centros quirales.

Tabla 11. Asignación de las señales de RMN ^{13}C de oxazolidinonas con configuración *sin*.

No.	Posición	7a	7b	7c	7d	7e
1	2	160.0	159.9	159.5	160.0	160.0
2	4	43.3	44.2	44.8	44.1	43.7
3	5	80.0	78.3	77.2	78.4	78.8
4	6,7	54.7	56.0	54.7	56.1	54.9
5	8	139.9	140.0	139.2	140.0	140.0
6	9	128.8	129.4	128.8	129.5	129.3
7	10	128.3	128.2	128.3	128.2	128.3

Tabla 11. Asignación de las señales de RMN ^{13}C de oxazolidinonas con configuración *sin* (Continuación).

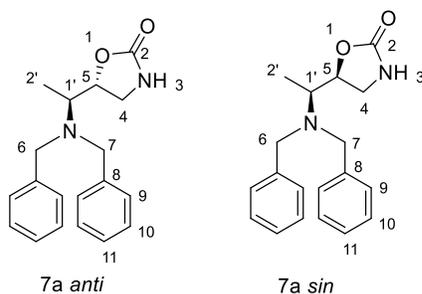
No.	Posición	7a	7b	7c	7d	7e
8	11	127.0	127.0	127.2	127.0	127.0
9	1'	54.9	62.7	62.7	63.7	57.0
10	2'	10.5	34.5	32.6	28.3	35.6
11	3'		16.9		21.0	24.4
12	4'		11.6			23.2
13	5'		27.3		21.4	
14	6'					22.2
15	12			139.9		
16	13			129.7		
17	14			128.5		
18	15			126.3		

Desplazamientos de ppm.

Las principales diferencias entre las oxazolidinonas *anti* y *sin* en el espectro de RMN ^1H se observan en los desplazamientos y multiplicidades, son más notorios en los átomos que están enlazados a un centro quiral. En el compuesto *anti*, los hidrógenos aromáticos aparecen en un multiplete mientras que en la configuración *sin* se alcanzan a desdoblar y aparece la misma cantidad de hidrógenos en tres señales separadas (Compuesto **7a**). Otras señales que logran diferenciarlos son aquellas con efecto diasterotópico, es decir 1' y 5, en el compuesto *anti* aparecen como un multiplete y cuarteto respectivamente y para el compuesto *sin* estas mismas señales aparecen como quintuplete y triple de dobles. Los hidrógenos 4 aparecen en dos señales

(4a y 4b) cuando el compuesto tiene configuración *anti*, pero estas señales se logran solapar apareciendo en una sola señal cuando la configuración es *sin* (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación de señales de RMN ^1H de **7a** con configuración *anti* y *sin*.

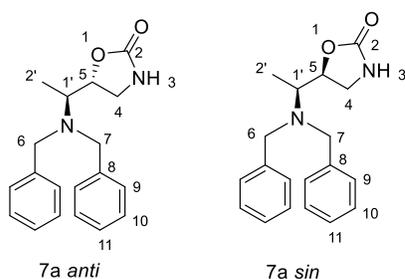


No.	Posición	7a anti	7a sin
1	Ar	7.27 (10H, m)	7.37 (4H, d)
			7.28 (4H, t)
			7.19 (2H, t)
2	3	5.69 (1H, sa)	5.88 (1H, sa)
3	5	4.46 (1H, c)	4.62 (1H, td)
4	6a, 7a	3.70 (2H, d)	3.90 (2H, d)
5	4a	3.54 (1H, t)	3.35 (2H, dt)
6	6b, 7b	3.44 (2H, d)	3.53 (2H, d)
7	4b	3.22 (1H, t)	*
8	1'	2.82 (1H, m)	2.91(1H, q)
9	2'	1.22 (3H, d)	1.13 (3H, d)

* 4a y 4b aparecen en una sola señal.
Desplazamientos de ppm.

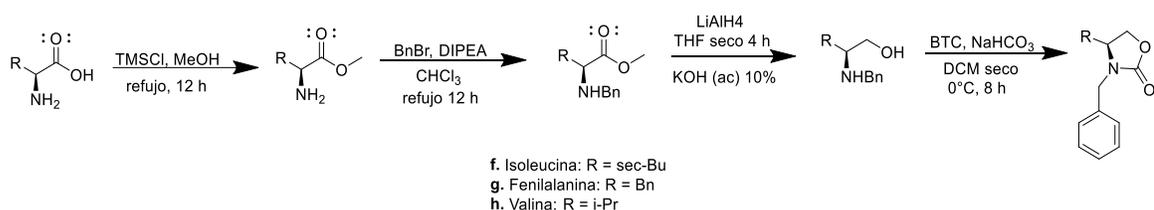
En la Tabla 13 también se comparan los compuestos **7a** en las dos configuraciones estereoquímicas, respecto a los desplazamientos del espectro de ^{13}C . Los desplazamientos de los carbonos diastereotópicos (C5 y C1') son distintos, al igual que C2' en su respectiva configuración. Se observó que en el compuesto *sin* las señales de C1' y C6, C7 aparecen más cercanas entre sí, 0.2 ppm de diferencia mientras que con la configuración *anti* se encuentran a 2.1 ppm de diferencia.

Tabla 13. Comparación de señales de RMN ^{13}C de oxazolidinonas con configuración *anti* y *sin*.



No.	Posición	7a anti	7a sin
1	2	159.9	160.0
2	4	44.8	43.3
3	5	78.6	80.0
4	6,7	54.6	54.7
5	8	139.3	139.9
6	9	128.8	128.8
7	10	128.4	128.3
8	11	127.3	127.0
9	1'	56.7	54.9
10	2'	8.7	10.5

En proceso de síntesis se obtuvo un subproducto el cual se purificó y caracterizó por RMN de ^1H , ^{13}C , además de HSQC y FT-IR. Al elucidar la estructura se determinó que el subproducto hace referencia a una oxazolidinona *N*-bencilada, se le atribuye a que una porción del éster no reaccionó por completo y resultó monobencilado. Se continuó con la ruta de síntesis hasta ciclarse (Esquema 2). Debido a que este tipo de moléculas es consistente con la estructura del anillo de oxazolidinona, se aisló con el propósito de adicionarlas para la evaluación de la actividad antiparasitaria.



Esquema 2. Síntesis de oxazolidinonas *N*-benciladas.

El espectro de RMN ^1H realizado a **7f** (Figura 20) presenta un multiplete a 7.32 ppm que integran para los cinco hidrógenos del sistema aromático. A 4.85 y 3.96 aparecen dos dobletes con $J = 15.1$ Hz que integran para los dos hidrógenos del metileno bencílico. El metileno de la oxazolidinona se compone de dos señales distintas, una a 4.14 ppm como triplete y con $J = 9.0$ Hz y la otra señal a 4.04 ppm como doble de dobles con $J = 9.0$ y 6.1 Hz. A 3.63 ppm se encuentra un multiplete que integra para un hidrógeno correspondiente al metino unido a nitrógeno. El metino alifático 1' aparece como un multiplete a 1.81 ppm. La señal a 1.14 ppm aparece como multiplete e integra para dos hidrógenos del metileno alifático y por último los dos metilos restantes aparecen solapados como un multiplete que integra para seis hidrógenos.

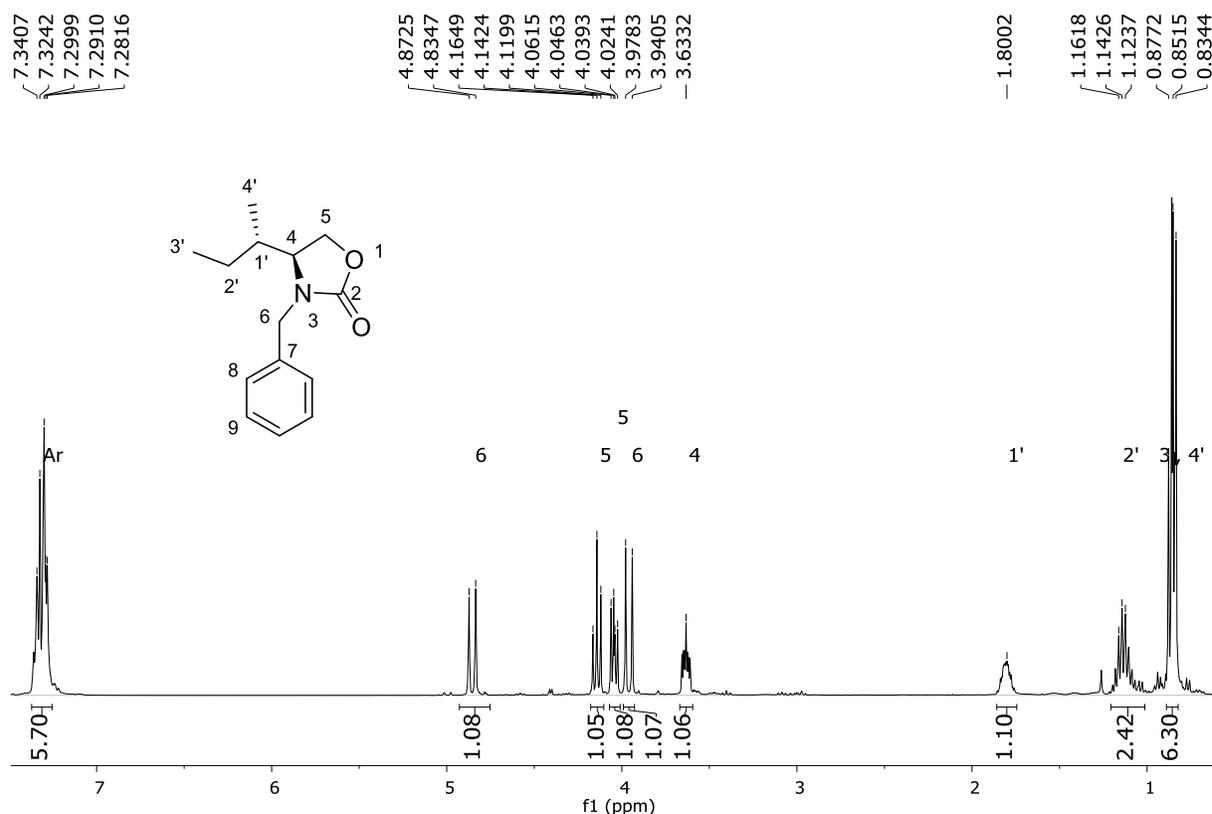


Figura 20. Espectro de RMN ^1H del compuesto **7f** en CDCl_3 .

En la Figura 21 se observa el espectro de RMN ^{13}C de **7f**. Hay una señal a 158.8 ppm para el carbonilo del anillo de la oxazolidinona, los carbonos aromáticos aparecen a 135.9 ppm para el carbono cuaternario y el resto del sistema $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}$ aparece a 128.8, 128.2 y 127.9 ppm. El metileno unido a oxígeno se encuentra a 62.7 ppm, el carbono unido a nitrógeno aparece a 57.1 ppm y el metileno bencílico a 45.8 ppm. El resto de los sustituyentes está constituido por un metino a 33.9 ppm, un metileno a 25.2 ppm y dos metilos a 11.9 y 11.4 ppm.

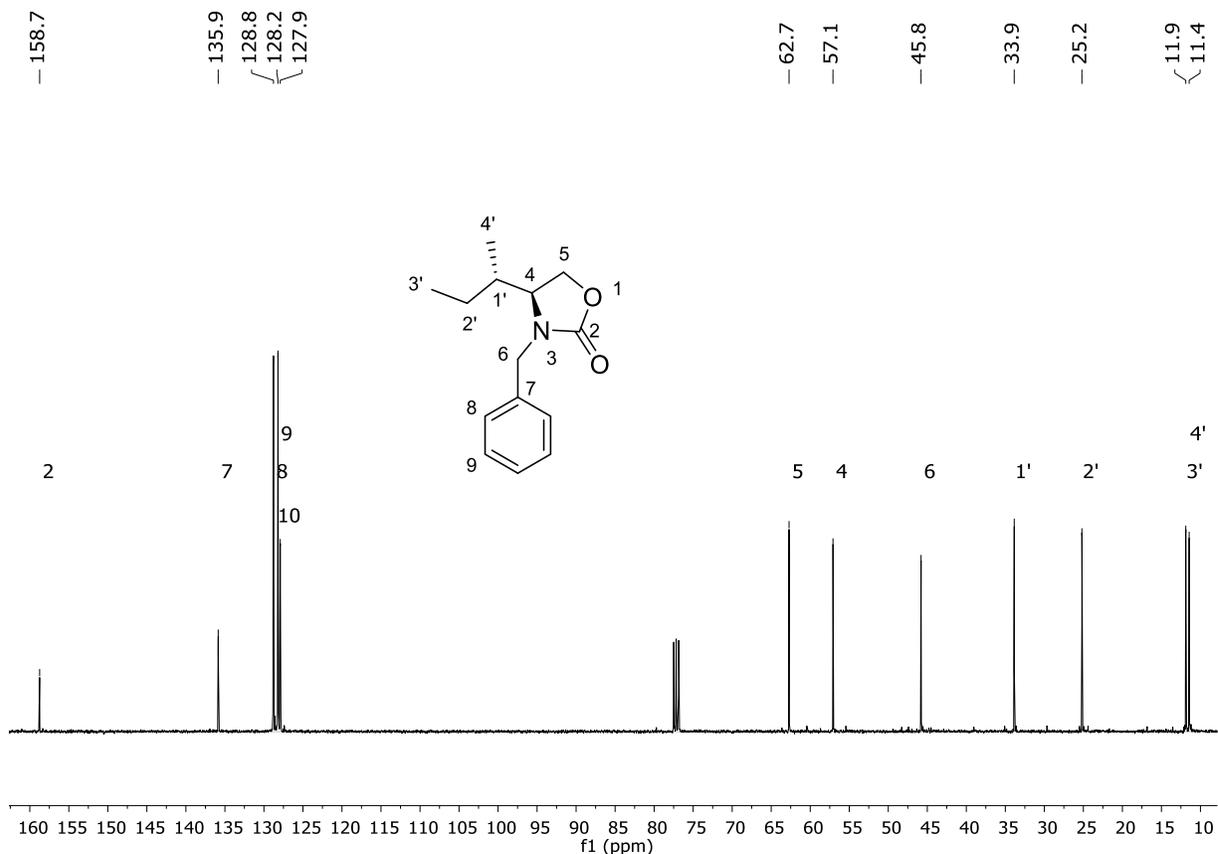
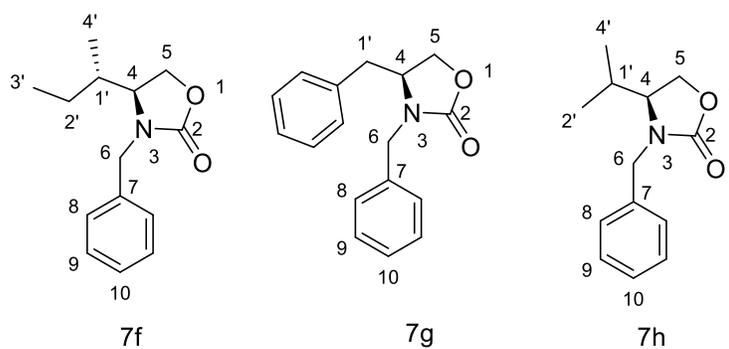


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7f** en CDCl_3 .

En la Tabla 14 se observan los datos de RMN ^1H para los tres compuestos *N*-bencilados. Se observa que en el área de aromáticos integran para cinco hidrógenos y diez cuando se utilizó fenilalanina. En estos compuestos no se observa el singulete ancho característico del N-H de la oxazolidinona. En estas moléculas los hidrógenos 5 aparecen en dos señales distintas integrando cada una para un hidrógeno y a partir de 4 se encuentran las señales de los sustituyentes diferentes por lo que 4 y 1' tienen desplazamientos y multiplicidades distintos.

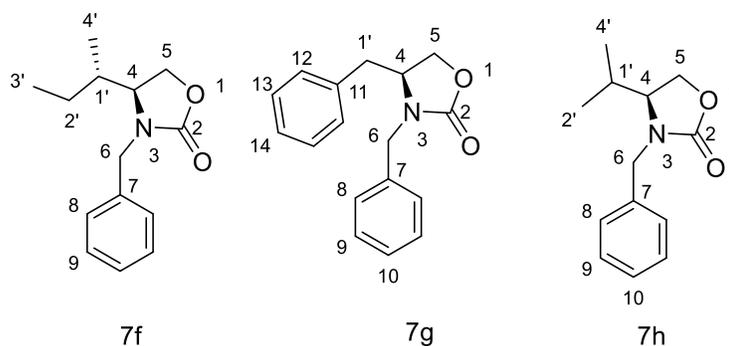
**Tabla 14.** Asignación de señales de RMN ¹H de oxazolidinonas *N*-benciladas.

No.	Posición	7f	7g	7h
1	Ar	7.32 (5H, m)	7.30 (8H, m)	7.33 (5H, m)
2			7.04 (2H, d)	
3	6	4.85 (1H, d)	4.86 (1H, d)	4.87 (1H, d)
4		3.96 (1H, d)	4.11 (1H, d)	3.99 (1H, d)
5	5	4.14 (1H, t)	4.14 (1H, d)	4.17 (1H, t)
6		4.04 (1H, dd)	4.00 (1H, dd)	4.07 (1H, dd)
7	4	3.63 (1H, m)	3.80 (1H, m)	3.55 (1H, td)
8	1'	1.81 (1H, m)	3.10 (1H, dd)	2.07 (1H, hd)
9			2.64 (1H, dd)	
10	2'	1.14 (2H, m)		0.87 (3H, d)
11	3'	0.85 (6H, m)		0.83 (3H, d)
12	4'		*	

* Para 7f 3' y 4' aparecen en una sola señal.
Desplazamientos en ppm.

La Tabla 15 presenta los desplazamientos de RMN ^{13}C para los compuestos **7f**, **7g**, **7h**. Se distingue una variación en los desplazamientos para C4 y C5. El compuesto **7f** y **7h** presentan más señales en la zona de alifáticos y **7g** en la zona de aromáticos.

Tabla 15. Asignación de señales de RMN ^{13}C de oxazolidinonas *N*-benciladas.



No.	Posición	7f	7g	7h
1	2	158.7	158.4	158.7
2	4	57.1	55.4	58.2
3	5	62.7	67.0	62.8
4	6	45.8	46.4	46.0
5	7	135.9	135.9	135.9
6	8	128.8	129.0	128.8
7	9	128.2	128.9	128.2
8	10	127.9	128.0	127.9
9	11		135.6	
10	12		128.9	
11	13		128.2	
12	14		127.2	
13	1'	33.9	38.5	27.2
14	2'	25.2		17.6
15	3'	11.4		
16	4'	11.9		14.2

Desplazamiento en ppm.

4.4. Actividad antiparasitaria frente *G. duodenalis*

La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular de *G. duodenalis*, frente a los 13 compuestos de tipo oxazolidinonas sintetizados. Se determinó el porcentaje de inhibición (%Inh) y la concentración inhibitoria media (IC₅₀). Los compuestos **7f**, **7g** y **7h** (compuestos monobencilados) fueron los primeros en retirarse del ensayo debido a que a concentraciones mayores de 100 µg/mL ya no se observaba la inhibición de la especie, y se interpreta que es importante la protección del grupo amino para otorgarle actividad antiparasitaria a los compuestos. El resto de las oxazolidinonas fueron evaluadas a la menor concentración de 25 µg/mL, concentración en la cual ya se observaba una inhibición mínima. Los compuestos **7c sin** y el par diastereomérico **7e** obtuvieron un porcentaje de inhibición mayor a 50 % a una concentración de 25 µg/mL, se puede concluir que estos compuestos podrían obtener un IC₅₀ menor a los establecido en este ensayo. El compuesto con mayor actividad antiparasitaria fue **7e**, cuya diferencia está en el sustituyente isobutilo, obteniendo la concentración inhibitoria media más baja, de 23.0 µg/mL. En la mayoría de los casos, cuando se compara el par diastereomérico, los compuestos con configuración *sin* presentan menor IC₅₀ que los compuestos *anti*, es decir, los compuestos *sin* presentan mayor actividad antiparasitaria, sin embargo, con el compuesto **7a** no se observa este patrón, esto se le puede atribuir a que **7a** no presenta un sustituyente voluminoso (grupo metilo) y por ende la configuración *anti* presenta mayores interacciones con el parásito. Hasta el momento no se ha establecido un mecanismo de acción de los compuestos oxazolidinonas frente a *G. duodenalis*. En este último ensayo no se utilizó un control positivo, evaluando la actividad antiparasitaria de metronidazol, sin embargo, si se comparan los resultados obtenidos con los referenciados en la literatura, metronidazol requiere de menores concentraciones inhibitorias²¹ que los sintetizados en este proyecto.

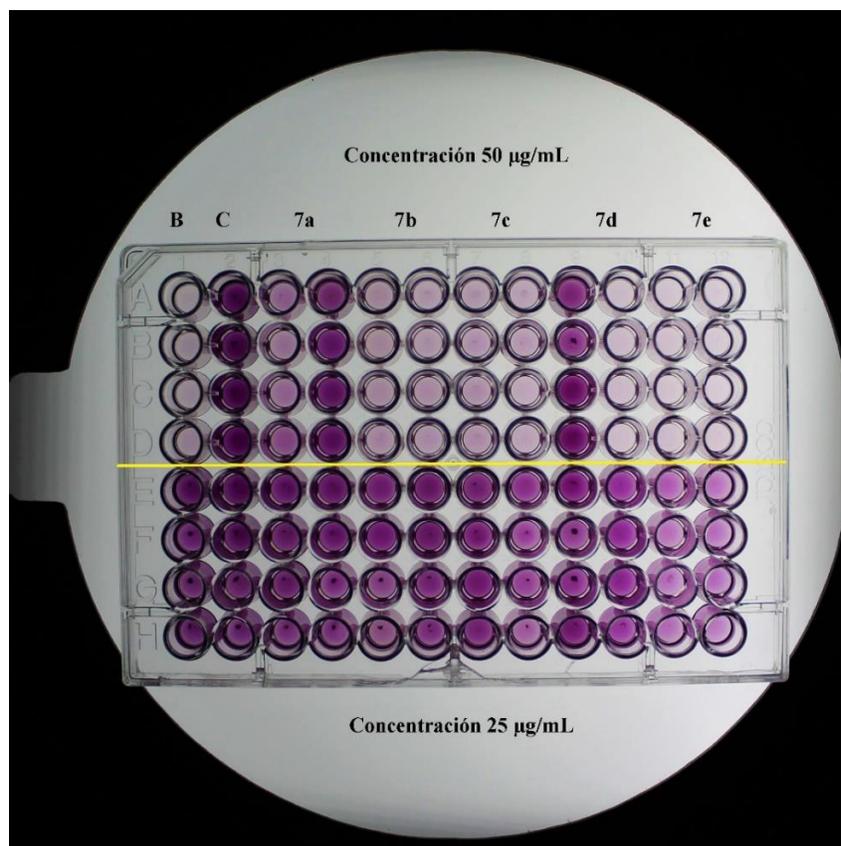
Tabla 16. Porcentaje de inhibición y concentración inhibitoria media de oxazolidinonas frente a *Giardia duodenalis*.

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) ^a				IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ^b
	25	50	100	200	
7a anti	32.1 \pm 4.32	83.2 \pm 6.24	99.9 \pm 0.03	100.0	31.1
7a sin	20.9 \pm 1.86	52.2 \pm 7.41	99.9 \pm 0.04	100.0	44.7
7b anti	28.8 \pm 4.55	92.6 \pm 0.94	99.9 \pm 0.03	100.0	30.0
7b sin	27.2 \pm 3.31	94.4 \pm 0.33	99.9 \pm 0.04	100.0	29.9
7c anti	27.0 \pm 3.09	89.9 \pm 0.71	96.5 \pm 0.49	100.0	31.1
7c sin	50.5 \pm 4.39	92.4 \pm 1.64	96.5 \pm 0.65	100.0	24.8
7d anti	19.8 \pm 2.47	33.5 \pm 1.00	99.3 \pm 0.17	100.0	56.2
7d sin	22.7 \pm 3.45	98.5 \pm 0.48	99.9 \pm 0.03	100.0	29.2
7e anti	59.0 \pm 3.64	98.9 \pm 0.14	99.8 \pm 0.08	100.0	23.5
7e sin	63.0 \pm 1.12	99.6 \pm 0.28	99.9 \pm 0.03	100.0	23.0
7f	NI	NI	48.6 \pm 2.34	92.8 \pm 0.07	102.1
7g	NI	NI	41.8 \pm 0.64	92.7 \pm 0.09	108.3
7h	NI	NI	NI	6.3 \pm 1.41	>200

^aSe muestra la media de %Inh \pm DE de un ensayo por triplicado.

^bCoefficiente de determinación (R²), valores entre 0.9336-0.9991.

En la Figura 22 se observa una fotografía de la placa de 96 pocillos donde se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular colorimétrica a dos concentraciones (50 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$) utilizando el reactivo MTT. Se llenó la placa por columna, realizada por cuadruplicado, colocando un blanco (medio de cultivo), un control (*G. duodenalis*) y los 10 compuestos oxazolidinonas colocando el par diastereomérico primeramente con configuración *anti* y seguido los de configuración *sin*. La placa está dividida por una línea amarilla, indicando que en la parte superior se realizó el ensayo a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto y la parte inferior a 25 $\mu\text{g/mL}$. La coloración morada es proporcional a la cantidad de células vivas. Se puede apreciar la diferencia en la intensidad del color morado cuando los compuestos se evaluaron a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, coloración tenue y a 25 $\mu\text{g/mL}$, coloración intensa.



B: Blanco, C: control.

Figura 22. Ensayo de viabilidad celular colorimétrica a 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$.

4.5. Evaluación de toxicidad

En tabla 17 se observa los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad utilizando *Artemia salina*. Los valores obtenidos indican que los compuestos presentan moderada toxicidad (LC_{50} 100-500 μ g/ml).²⁸

Tabla 17. Concentración letal media de oxazolidinonas frente a *Artemia salina*.

Compuesto	LC_{50} (μ g/mL)
7a anti	>200
7a sin	>200
7b anti	>200
7b sin	>200
7c anti	177.31
7c sin	>200
7d anti	>200
7d sin	>200
7e anti	140.76
7e sin	>200
7f	162.77
7g	110.91
7h	112.81

V. EXPERIMENTAL

5.1. Generalidades

El desarrollo experimental se realizó en el laboratorio de química supramolecular del Centro de Graduados e Investigación del Instituto de Tijuana y en colaboración con la Universidad Autónoma de Sinaloa en el laboratorio de química de productos naturales y en la Unidad de Investigación en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”.

5.2. Técnicas analíticas

Se utilizó equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) de 400 megahercios (MHz). Los valores de los desplazamientos químicos son expresados en partes por millón (ppm) y se utilizó como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz). Además, se utilizó un espectro de infrarrojo (FT-IR400) Perkin Elmer. Para la evaluación de la actividad antiparasitaria se utilizó el espectrofotómetro Labsystems Multiskan RC.

Materiales, reactivos y solventes

Los materiales, reactivos y solventes utilizados fueron obtenidos de las compañías Sigma Aldrich y VWR.

En la evaluación de la actividad antiparasitaria se utilizaron cepas de *Giardia duodenalis* WB, del Departamento de Patología Experimental, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

El ensayo de toxicidad *in vitro* se realizó con larvas de *Artemia salina* cultivadas a partir de huevos (Brine shrimp eggs, BIO-MARINE INC, EE.UU.).

5.3. Metodología de síntesis de oxazolidinonas

a) Síntesis de α -aminoester.

Se añadieron 2 g del respectivo aminoácido (L-alanina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-valina o L-leucina) y 100 mL de metanol en un matraz de fondo redondo de 250 mL, bajo agitación constante. Se agregó por goteo 5 Eq de TMSCl con ayuda de un embudo de adición. Se dejó reaccionando y en reflujo por 12 h. Posteriormente se hicieron lavados con metanol y éter etílico. Por último, se eliminó el disolvente a presión reducida obteniendo un sólido blanco con excepción del éster de isoleucina el cual se obtiene como aceite amarillo.

b) Síntesis de éster dibencilamino.

A un matraz de fondo redondo de 250 mL se suspendió 1 g del clorhidrato de α -aminoester en 80 mL de cloroformo, además se introdujo una barra de agitación magnética. Bajo agitación constante se añadió por goteo al matraz 3 Eq de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) y 3 Eq de bromuro de bencilo (BnBr). Posteriormente se llevó a reflujo durante 24 h. Se observó el avance de la reacción realizando cromatografía de capa fina. El *N,N*-dibencilaminoéster tiene un factor de retención de 0.63 en un sistema de 9:1 éter de petróleo y acetato de etilo.

Una vez concluida la reacción, se traspasó el contenido del matraz de fondo redondo a un embudo de separación. A éste se añadió 80 mL de agua destilada y realizaron lavados con diclorometano (3x100 mL), se recolectó la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhídrido. Se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida. El *N,N*-dibencilaminoester fue purificado por columna en gel de sílice con una fase móvil 9:1 de éter de petróleo y acetato de etilo, obteniendo un aceite amarillo.

c) Síntesis de β -aminoalcohol.

En un matraz de fondo redondo de 250 mL en baño de hielo, se añadió 1.5 Eq de hidruro de litio y aluminio (LiAlH₄), se dispersó en 50 mL de THF seco y se añadió por goteo una solución de *N,N*-dibencilaminoéster. La reacción procede bajo atmósfera inerte de argón y agitación

constante por cuatro horas. En cromatografía de capa fina y un sistema de éter de petróleo y acetato de etilo 9:1 se observa el producto con un factor de retención de 0.45. Finalmente se agregó por goteo hidróxido de sodio acuoso al 10% hasta formar un precipitado blanco, se filtró y se secó con sulfato de sodio anhídrido. Se eliminó el disolvente mediante presión reducida para obtener el *N,N*-dibencilaminoalcohol como aceite amarillo.

d) Síntesis de aldehído (Reacción de Swern).

Empleando un embudo de adición conectado a un matraz de fondo redondo de 250 mL, con agitación constante, bajo atmósfera inerte de argón y a -78°C , se añadió 1.5 Eq de cloruro de oxalilo en diclorometano seco. Se añadió por goteo 2.2 Eq de dimetilsulfóxido junto con diclorometano. El *N,N*-dibencilaminoalcohol se añadió por goteo disuelto en diclorometano. Se esperó 20 minutos y posteriormente se le agregó 5 Eq de trietilamina diluido en diclorometano y dejó durante 30 minutos. El compuesto deseado aparece con un factor de retención de 0.60 en placa de cromatografía, en un sistema 9:1 éter de petróleo y acetato de etilo. Posteriormente, a temperatura ambiente, se traspasó el contenido del matraz de fondo redondo a un embudo de separación. A éste se añadió 80 mL de agua destilada y realizaron lavados con diclorometano (3x100 mL), se recolectó la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhídrido. Se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida, obteniendo el *N,N*-dibencilaminoaldehído como aceite amarillo.

e) Síntesis de trimetilsililoxicianhidrina (Adición)

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se colocó el compuesto dibencilamino aldehído disuelto en diclorometano seco, se le añadió una barra de agitación magnética y se mantuvo en atmósfera de argón. Para la generación del producto *anti* (con ZnI_2) se realizó a temperatura ambiente, en cuanto a el producto *sin* (con MgBr_2) se realizó a 0°C . Posteriormente se agregó 1.1 Eq del catalizador ZnI_2 o MgBr_2 para obtener el producto de adición con configuración *anti* o *sin* respectivamente. Se añadió por goteo 2.2 Eq de TMSCN. Después de haber transcurrido 2 horas se traspasó el contenido del matraz de fondo redondo a un embudo de separación. A éste se añadió 80 mL de agua destilada y realizaron lavados con diclorometano (3x100 mL), se

recolectó la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidrido. Se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida, obteniendo el *N,N*-dibencilaminotrimetilsililoxicianhidrina como aceite naranja. Se observó con un factor de retención de 0.60 con una fase móvil 9:1 éter de petróleo y acetato de etilo.

f) Síntesis de α -aminoalcohol

En un matraz de fondo redondo de 250 mL en baño de hielo, se añadió 1.5 Eq de hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4), se dispersó en 50 mL de THF secó y se añadió por goteo una solución de *N,N*-dibencilaminotrimetilsililoxicianhidrina. La reacción procede bajo atmósfera inerte de argón y agitación constante por 4 horas. En cromatografía de capa fina y un sistema de éter de petróleo y acetato de etilo 9:1 se observa el producto con un factor de retención de cero. Finalmente se agregó por goteo hidróxido de sodio acuoso al 10 % hasta formar un precipitado blanco, se filtró y se secó con sulfato de sodio anhidrido. Se eliminó el disolvente mediante presión reducida para obtener el α -aminoalcohol como aceite amarillo.

g) Síntesis de 1,3-oxazolidinona

A un matraz de fondo redondo de 250 mL con un embudo de adición se mantuvo con agitación magnética, atmósfera de argón inerte y a 0 °C. Se le agregó una solución del aminoalcohol en diclorometano (80 mL). Después se agregó por goteo una solución de trifosgeno (1.0 Eq) disuelto en 25 mL de diclorometano y se agitó durante 8 horas. Transcurrido el tiempo se añadió una solución saturada de bicarbonato de sodio y continuó agitando por 3 horas. El contenido del matraz de fondo redondo se traspasó a un embudo de separación. A éste se añadió 80 mL de agua destilada y realizaron lavados con diclorometano (3×100 mL), se recolectó la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidrido. Se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida, el producto preliminar se purificó por cromatografía en columna, empacada con gel de sílice y se utilizó como fase móvil un sistema 1:1 de éter de petróleo y acetato de etilo, obteniendo como producto final un aceite amarillo o un sólido blanco.

7a anti: Sólido blanco. FTIR: 3250, 2968, 1740, 1235 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.27 (m, 10H), 5.69 (sa, 1H), 4.46 (c, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J = 13.6$ Hz, 2H), 3.54 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.44 (d, $J = 13.6$ Hz, 2H), 3.23 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 2.82 (dc, $J = 6.6, 6.6$ Hz, 1H), 1.22 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 159.9 (C), 139.3 (2 x C), 128.8 (4 x CH), 128.4 (4 x CH), 127.3 (2 x CH), 78.6 (CH), 56.7 (CH), 54.6 (2 x CH_2), 44.8 (CH_2), 8.6 (CH_3).

7a sin: Sólido blanco. FTIR: 3275, 2967, 2930, 1743, 1239 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.37 (d, $J = 7.1$ Hz, 4H), 7.28 (dd, $J = 7.3$ Hz, 4H), 7.19 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 5.88 (sa, 1H), 4.62 (c, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.90 (d, $J = 13.7$ Hz, 2H), 3.53 (d, $J = 13.7$ Hz, 2H), 3.36 (q, $J = 8.2$ Hz, 2H), 2.91 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H), 1.13 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 160.0 (C), 139.9 (2 x C), 128.8 (4 x CH), 128.3 (4 x CH), 127.0 (2 x CH), 80.0 (CH), 54.9 (CH), 54.7 (2 x CH_2), 43.8 (CH_2), 10.5 (CH_3).

7b anti: Aceite amarillo. FTIR: 3279, 2962, 1746, 1236, 1074 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.27 (m, 10H), 5.41 (sa, 1H), 4.85 (c, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J = 13.4$ Hz, 2H), 3.64 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.49 (d, $J = 13.4$ Hz, 2H), 3.26 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 2.66 (dd, $J = 9.3, 2.1$ Hz, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.45 (m, 2H), 1.14 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 159.8 (C), 139.2 (2 x CH), 129.0 (4 x CH), 128.4 (4 x CH), 127.3 (2 x CH), 75.5 (CH), 63.7 (CH), 54.8 (2 x CH_2), 45.6 (CH_2), 31.8 (CH), 30.0 (CH_2), 15.7 (CH_3), 12.41 (CH_3).

7b sin: Aceite amarillo. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.30 (m, 10H), 5.83 (s, 1H), 4.91 (c, $J = 5.7$, 1H), 3.94 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H), 3.75 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H), 3.36 (dd, $J = 8.5, 3.0$ Hz, 2H), 2.59 (t, $J = 5.9$, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 0.91 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 159.9 (C), 140.0 (2 x CH), 129.4 (4 x CH), 128.2 (4 x CH), 127.0 (2 x CH), 78.3 (CH), 62.7 (CH), 56.0 (2 x CH_2), 44.2 (CH_2), 34.5 (CH), 27.3 (CH_2), 16.9 (CH_3), 11.6 (CH_3).

7c anti: Sólido blanco. FTIR: 3279, 2962, 1746, 1236 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.33 (m, 15H), 5.82 (sa, 1H), 4.55 (td, $J = 8.0, 4.1$ Hz, 1H), 4.06 (d, $J = 13.5$ Hz, 2H), 3.59 (d, $J = 13.5$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.13 (m, 2H), 2.92 (t, 1H, 7.9 Hz), 2.83 (m, 1H). RMN

^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 159.7 (C), 139.5 (C), 139.0 (2 x C), 129.5 (2 x CH), 129.1 (4 x CH), 128.6 (2 x CH), 128.4 (4 x CH), 127.1 (2 x CH), 126.4 (CH) 77.5 (CH), 60.9 (CH), 55.5 (2 x CH_2), 42.5 (CH_2), 31.4 (CH_2).

7c sin: Aceite amarillo. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.25 (m, 15H), 5.24 (sa, 1H), 4.74 (c, $J = 5.1$ Hz, 1H), 3.64 (c, $J = 11.6$ Hz, 4H), 3.54 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.09 (m, 1H), 3.09 (m, 1H), 3.09 (m, 2H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 159.5 (C), 139.9 (C), 139.2 (2 x C), 129.7 (2 x CH), 128.8 (4 x CH), 128.5 (2 x CH), 128.3 (4 x CH), 127.2 (2 x CH), 126.3 (CH) 77.2 (CH), 62.7 (CH), 54.7 (2 x CH_2), 44.8 (CH_2), 32.6 (CH_2).

7d anti: Sólido blanco. FTIR: 3278, 2959, 1744, 1235 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.29 (m, 10H), 5.64 (sa, 1H), 4.83 (c, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.69 (d, $J = 13.5$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 3.57 (d, $J = 13.5$ Hz, 2H), 3.24 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 2.59 (dd, $J = 3.2$ Hz, 1H), 2.33 (m, 1H), 1.13 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.09 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 160.0 (C), 139.2 (2 x C), 129.0 (4 x CH), 128.4 (4 x CH), 127.3 (2 x CH), 75.7 (CH), 64.4 (CH), 54.8 (2 x CH_2), 45.6 (CH_2), 25.4 (CH), 23.3 (CH_3), 19.1 (CH_3).

7d sin: Aceite amarillo. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.28 (m, 10H), 5.97 (sa, 1H), 4.91 (c, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.93 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H), 3.80 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H), 3.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.06 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 160.0 (C), 140.0 (2 x C), 129.5 (4 x CH), 128.2 (4 x CH), 127.0 (2 x CH), 78.4 (CH), 63.7 (CH), 56.1 (2 x CH_2), 44.1 (CH_2), 28.3 (CH), 21.4 (CH_3), 21.0 (CH_3).

7e anti: Sólido blanco. FTIR: 3277, 2954, 1745, 1237 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.28 (m, 10H), 5.69 (sa, 1H), 4.74 (c, $J = 6.2$, 1H), 3.72 (d, $J = 13.8$ Hz, 2H), 3.60 (t, $J = 3.9$ Hz, 1H), 3.57 (d, $J = 13.8$ Hz, 2H), 3.13 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.71 (c, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.29 (m, 1H), 0.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.75 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 160.1 (C), 139.5 (2 x C), 129.0 (4 x CH), 128.4 (4 x CH), 127.2 (2 x CH), 77.1 (CH), 58.4 (CH), 54.6 (2 x CH_2), 44.9 (CH_2), 35.4 (CH_2), 24.8 (CH), 23.3 (CH_3), 22.5 (CH_3).

7e sin: Aceite amarillo. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.29 (m, 10H), 5.96 (sa, 1H), 4.73 (c, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.85 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J = 13.8$ Hz, 1H), 3.67 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H), 3.42 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.75 (c, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.82 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.06 (m, 1H), 0.87

(d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.61 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 160.0 (C), 140.0 (2 x C), 129.3 (4 x CH), 128.3 (4 x CH), 127.0 (2 x CH), 78.8 (CH), 57.0 (CH), 54.9 (2 x CH_2), 43.7 (CH_2), 35.6 (CH_2), 24.4 (CH), 23.2 (CH_3), 22.2 (CH_3).

7f: Aceite amarillo. FTIR: 3488, 2963, 1742, 1421 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.32 (m, 5H), 4.85 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 4.14 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.04 (dd, $J = 9.0, 6.1$ Hz, 1H), 3.96 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 3.63 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 1.14 (m, 2H), 0.85 (m, 6H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 158.7 (C), 135.9 (C), 128.8 (2 x CH), 128.2 (2 x CH), 127.9 (CH), 62.7 (CH_2), 57.1 (CH), 45.8 (CH_2), 33.9 (CH), 25.2 (CH_2), 11.9 (CH_3), 11.4 (CH_3).

7g: Aceite amarillo. FTIR: 3437, 2923, 1740, 1418 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.30 (m, 8H), 7.04 (d, 2H), 4.86 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 4.14 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 4.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.00 (dd, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.10 (dd, $J = 13.6$ Hz, 1H), 2.64 (dd, $J = 13.6$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 158.4 (C), 135.9 (C), 135.6 (C), 129.0 (2 x CH), 128.9 (2 x CH), 128.9 (2 x CH), 128.2 (2 x CH), 128.0 (CH), 127.2 (CH), 67.0 (CH_2), 55.4 (CH), 46.4 (CH_2), 38.5 (CH_2).

7h: Aceite amarillo. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.38 (m, 5H), 4.87 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 4.17 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J = 8.9, 5.9$ Hz, 1H), 3.99 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 3.55 (td, $J = 9.3, 5.8, 3.6$ Hz, 1H), 2.07 (hd, $J = 13.9, 6.9, 3.7$ Hz, 1H), 0.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 158.8 (C), 135.9 (C), 128.8 (CH), 128.2 (C), 127.9 (C), 62.8 (CH_2), 58.2 (CH), 46.0 (CH_2), 27.2 (CH), 17.6 (CH_3), 14.2 (CH_3).

5.4. Metodología para la evaluación antiparasitaria

El ensayo de actividad antiparasitaria se realizó con base al trabajo realizado por la Dra. López Angulo, realizando algunas modificaciones.²⁷

Para el cultivo de trofozoítos de *Giardia duodenalis* se utilizó medio TYI-S-33 adicionado con antibiótico (0.5 % v/v) y suero fetal bovino inactivado (SFB), para descongelar los parásitos se utilizó SFB al 15% v/v o para cultivarlos al 10%. Los

componentes utilizados para preparar el medio (Tabla 18) se disolvieron en agua tridestilada estéril, ajustando el pH a 7 con NaOH 1 N, y posteriormente se esterilizó por filtración.

Tabla 18. Reactivos para preparar el medio TYI-S-33.

Reactivo	Cantidad
NaCl	0.3 mg
K ₂ HPO ₄	0.15 mg
KH ₂ PO ₄	0.09 mg
Peptona tripticasa	3.0 mg
Extracto levadura	1.5 mg
D- (+)-Glucosa	1.5 mg
Cisteína	0.3 mg
Ac. ascórbico	0.015 mg
Citrato de hierro	0.0035 mg
Bilis	0.075 mg
Suero fetal bovino	15 mL
Antibiótico	0.750 mL
Agua tridestilada	Cbp. 150 ml

a) Criopreservación de la cepa

La cepa de *G. duodenalis* se preservó en medio TYI-S-33 suplementado con SFB al 20% v/v y DMSO (dimetil sulfóxido) al 10% v/v. Un concentrado de trofozoítos de *G. duodenalis*. se preparó a partir de un cultivo de 48 horas de incubación; para tal fin, los tubos con el cultivo fueron introducidos en hielo por 40 minutos para desprender los parásitos de las paredes, se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min (BECKMAN, GS-6, EE.UU.), el sobrenadante fue decantado y el concentrado resuspendido en 1 mL de medio con las características previamente descritas. Las muestras se colocaron en crioviales, se congelaron de inmediato con nitrógeno líquido y se almacenaron a 80°C hasta su utilización.

b) Descongelamiento y recuperación de trofozoíto de *G. duodenalis*

La cepa de *G. duodenalis* fue descongelada de manera gradual de -80 °C hasta 37 °C. Una solución criopreservada (medio TYI-S-33 suplementada con SFB al 20% v/v y DMSMO al 10% v/v) fue transferida de criovial a un tubo de vidrio de 15 mL con tapa de rosca el cual contenía 9 mL de medio TYI-S-33 suplementado con SFB (15% v/v), la mezcla se agitó suavemente y centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos (BECKMAN, GS-6, EE.UU.) para eliminar los restos de DMSO. El sobrenadante se decantó, la pastilla se suspendió en 13 mL de medio TYI-S-33 suplementado con SFB (15% v/v) y la mezcla se incubó por 24 horas a 37 °C en una incubadora con corriente de CO₂ al 5 % (Fischer Scientific EE.UU.). Este procedimiento se repitió cada 24 horas dos veces más. El tercer día, se realizaron subcultivos (2 tubos con 5 mL de cultivo). A cada tubo se le adicionó medio nuevo suplementado con SFB ahora al 10%, hasta un volumen final de 13 mL. Los tubos fueron incubados por 48 horas a 37 °C y se prosiguió a la evaluación de actividad antiparasitaria de los compuestos oxazolidinonas.

c) Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro*

La determinación de la viabilidad de los trofozoítos de *G. duodenalis* se realizó usando el colorante azul de tripano al 4%. 100 µL del cultivo perfectamente homogenizado se mezcló con 10 µL de colorante; la mezcla se homogenizó y se colocaron 10 µL en una cámara de Neubauer para realizar la observación microscópica y el recuento celular. Los criterios de viabilidad evaluados fueron la movilidad, los cambios morfológicos y la retención del colorante por los trofozoítos. Después del recuento de células, se preparó una suspensión a una concentración de 250,000 células/mL. Una vez preparado el cultivo se procedió a la evaluación de las muestras. Los compuestos oxazolidinonas sintetizados fueron evaluados a 200, 100, 50 y 25 µg/mL. El ensayo se llevó a cabo en placas de micro dilución donde se colocaron 200 µL del cultivo (5 X 10⁴ células) y 100 µL de compuesto. Como control negativo, se utilizó solvente DMSO al 0.5% en medio TYI-S-33 (sin *G. duodenalis* ni compuesto). La placa se incubó a 37 °C durante 24

horas (5% de CO₂). Posteriormente, se centrifugó (2500 rpm por 5 min) (BECKMAN, GS-6, EE.UU.), se hicieron dos lavados con PBS 10 mM (pH 7.4) para eliminar los restos de medio TYI-S-33, y los trofozoítos se resuspendieron en 185 µL de PBS, se les adicionaron 15 µL de MTT (5 mg/mL), y se incubaron nuevamente durante 4 horas. Pasado este tiempo, la placa fue centrifugada (4000 rpm por 5 min), se eliminó el sobrenadante y las sales de formazano formadas por las células vivas se disolvieron añadiendo 200 µL de DMSO. La lectura se realizó a una longitud de onda de 540 nm (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, EE.UU.). El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{Abs_C - Abs_M}{Abs_C} \right) 100$$

Donde Abs_C es la absorbancia del control, y Abs_M la absorbancia de la muestra. Se calculó la concentración inhibitoria media (IC₅₀) con el programa *Graphpad prism* 8.

5.5. Ensayo de toxicidad *in vitro* con *Artemia salina*

El ensayo de toxicidad de *Artemia salina* se llevó a cabo de acuerdo a lo publicado por la Dra. López Angulo²⁷. Para obtener los nauplios del crustáceo, huevos de *A. salina* (300 mg/500 mL) se colocaron en un recipiente con medio de mar artificial (MMA) preparada con sal comercial y agua destilada (38 g/L) provisto de un sistema de oxigenación y bajo régimen continuo de luz. Después de 48 horas a una temperatura de 22-29°C, los nauplios fototrópicos eclosionados se colocaron en MMA fresco. Los compuestos tipo oxazolidinonas se disolvieron en Tween y MMA (4, 2, 1 y 0.2 mg/mL), la concentración final de Tween en el tubo fue de 10%). La evaluación se realizó en tubos de ensayo, en cada uno se colocaron 10 nauplios de *A. salina*, 100 µL de la muestra y finalmente se aforó a 2 mL, obteniendo una concentración final de la muestra de 200, 100, 50 y 10 µg/mL. Cada concentración se evaluó

por triplicado. El control negativo se preparó adicionando 100 μL de Tween al 50% (concentración final 5%). Los tubos se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (22-29°C) bajo luz continua. Después de este tiempo, se contó el número de larvas vivas en cada tubo. Los porcentajes de muerte a cada dosis y de los controles fueron determinados por la corrección en la fórmula de Abbott:

$$\% M = \left(\frac{r}{s} \right) 100$$

En donde $\% M$ es el porcentaje de mortalidad; r las larvas muertas en el tubo de ensayo y s las larvas vivas en el blanco. Los valores de la concentración letal media (CL_{50}) se determinaron graficando la concentración de los compuestos evaluados contra el porcentaje de letalidad del conteo de 24 horas. La información se analizó utilizando el análisis probit en el programa *Statgraphics Centurion*.

La escala de toxicidad en *Artemia salina* es registrada como: elevada ($LC_{50} > 100$ $\mu\text{g/mL}$), moderada ($LC_{50} 100-500$ $\mu\text{g/mL}$) o débil ($LC_{50} 500-1000$ $\mu\text{g/mL}$)

VI. CONCLUSIONES

Se concluyeron los objetivos planteados de manera exitosa. Se logró la síntesis y caracterización de los 10 compuestos 1,3-oxazolidin-2-onas con configuración *anti* y *sin* además de tres compuestos oxazolidinonas *N*-bencilados y se evaluó la actividad antiparasitaria de un total de 13 compuestos frente a *Giardia duodenalis* por técnicas colorimétricas en placas de micro dilución.

La recopilación de investigaciones en torno a los compuestos oxazolidinonas y su actividad biológica, daban indicios de que las oxazolidinonas sintetizadas podrían poseer actividad antiparasitaria frente a *Giardia duodenalis*.

Con base al análisis de los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular se concluyó que las tres oxazolidinonas *N*-benciladas no presentaban una actividad antiparasitaria eficiente y que los 10 compuestos 1,3-oxazolidin-2-onas con configuración *anti* y *sin* presentan actividad antiparasitaria buena pero no superan la potencia que tiene el fármaco de elección, metronidazol. Por otro lado, es bien conocido el mecanismo de acción que le otorga la actividad antiparasitaria a los compuestos nitroimidazoles y como es que las formas parasitarias logran evadirlo y considerarse como resistentes. Es aquí donde se destaca la originalidad de compuestos oxazolidinonas, en la que por medio de un mecanismo distinto e incierto logra inhibir el crecimiento del parásito.

Con los valores obtenidos en el ensayo de toxicidad frente a *Artemia salina* se concluyó que los compuestos oxazolidinonas sintetizados son moderadamente tóxicos (LC₅₀ mayor a 100 µg/mL).

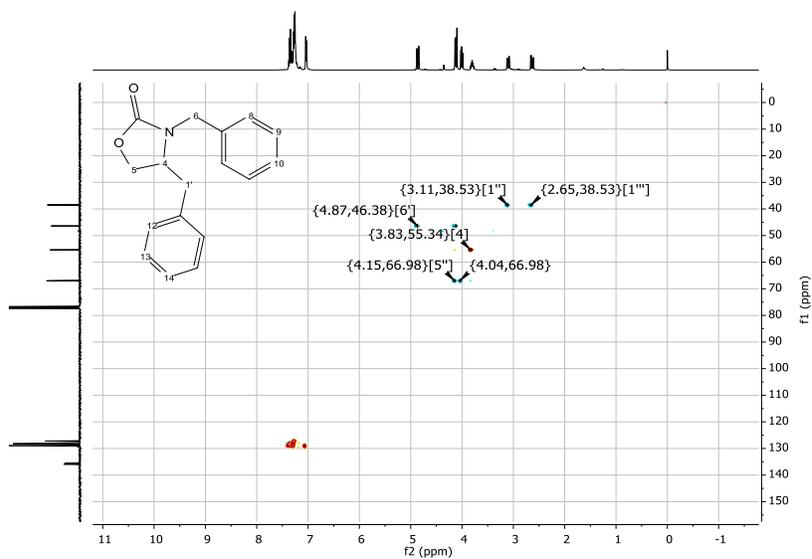
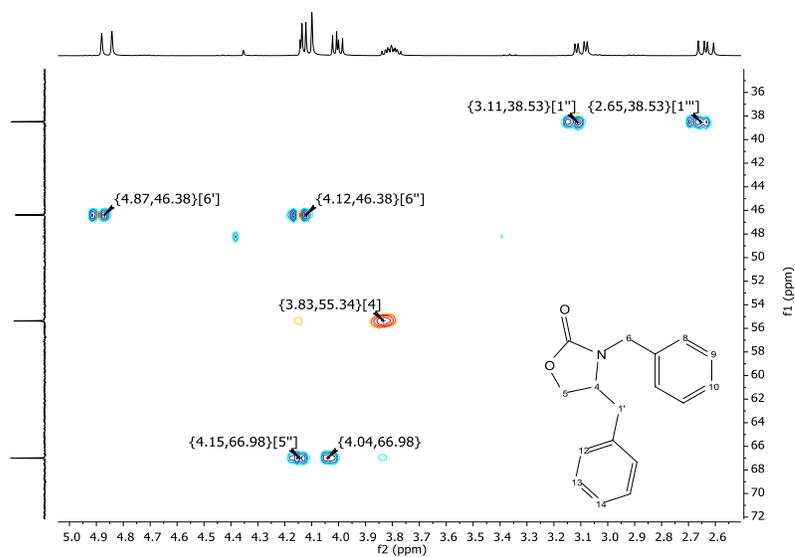
VII. REFERENCIAS y BIBLIOGRAFÍAS

1. Spelberg, B.; Blaser, M.; Guidos, R. J.; Boucher H. W.; Bradley, J. S.; Eisentein, B. I.; Gerding, D.; Lynfield, R.; Reller, L. B.; Rex, J.; Schwartz, D.; Septimus, D.; Tenover, F. C.; Gilbert, D. N. Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. *I.D.S.A.* **2011**, *52*, 397-428.
2. Quiñones Pérez, D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “Una salud”. *Rev. Cubana Med. Trop.* **2017**, *69*, 1-17.
3. Romero, R. *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*; Editorial médica panamericana, 2007; pp13-17.
4. Werner, A. B. *Parasitología humana*; McGraw-Hill Interamericana editores, 2013; p 145.
5. Carter, E. R.; Nabarro, L. E.; Hedley, L.; Chiodini, P. L. Nitroimidazole-refractory giardiasis: a growing problem requiring rational solutions. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 37-42.
6. Pigrau, C.; Almirante, B. Oxazolidinonas, gluco péptidos y lipopéptidos cíclicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* **2009**, *4*, 236-246.
7. Cibercita. En: Organización mundial de la salud (O.M.S). Página virtual: The top 10 causes of death (who.int), 13 de octubre de 2021.
8. Werner, A. B. *Parasitología humana*; McGraw-Hill Interamericana editores, 2013; p 1.
9. Cibercita. En: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Página virtual Mortalidad, conjunto de datos, Tabulados básicos (inegi.org.mx), 12 de septiembre de 2021.
10. Werner, A. B. *Parasitología humana*; McGraw-Hill Interamericana editores, 2013; p 3.
11. Romero, R. *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*; Editorial médica panamericana, 2007; 13-17.

12. Serra, M. A. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Rev. Haban. Cienc. Méd.* **2017**, *16*, 402-419.
13. Werner, A. B. *Parasitología humana*; McGraw-Hill Interamericana editores, 2013; 145-146.
14. Werner, A. B. *Parasitología humana*; McGraw-Hill Interamericana editores, 2013; pp 10.
15. Wright, J. M.; Dunn, L. A.; Upcroft, P.; Upcroft, J. A. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2003**, *2*, 529-541.
16. Upcroft, J. A.; Dunn, L. A.; Wright, J. M.; Benakli, K.; Upcroft, P.; Vanelle, P. 5-Nitroimidazole Drugs Effective against Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 344-347.
17. Foti, C.; Piperno, A.; Scala, A.; Giuffrè, O. Oxazolidinone Antibiotics: Chemical, Biological and Analytical Aspects. *Molecules* **2021**, *26*, 4280-4293.
18. Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. *The assay guidance manual*; et al., editors, 2016; pp 1-39.
19. Upcroft, J. A.; Upcroft, P. Drug Susceptibility Testing of Anaerobic Protozoa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1810-1814.
20. Dunn, L. A.; Burgess, A. G.; Krauer, K. G.; Eckmann, L.; Vanelle, P.; Crozet, M. D.; Gillin, F. D.; Upcroft, P.; Upcroft, J. A. A new-generation 5-nitroimidazole can induce highly metronidazole-resistant *Giardia lamblia* *in vitro*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2010**, *36*, 37-42.
21. Montes, J.; Díaz, S. P.; Sicairos, J.; Delgado, F.; Rivero, I. A. Solution-phase parallel synthesis of substituted chalcones and their antiparasitic activity against *Giardia lamblia*. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6780-6785.

22. Quazi, S.; Fatema, C.; Mir, M. Brine shrimp lethality. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2017**, *12*, 186-189.
23. Narcisi, E. M.; Secor W. E. *In Vitro* Effect of Tinidazole and Furazolidone on Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1121-1125.
24. Loreto, E. S.; Tondolo J. S. M.; Oliveira, D. C.; Santurio, J. M.; Alves, S. H. *In Vitro* Activities of Miltefosine and Antibacterial Agents from the Macrolide, Oxazolidinone, and Pleuomutilin Classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, 1678-1694.
25. Alcantar, E.; Hernández, E.; Ochoa, A.; Montes, J.; Estrada, E. A.; Salazar, A. J.; Alday, E.; Cabrera, A.; Aguirre, G.; Miranda, V.; Velazquez, C.; Díaz, S. P.; Medina, J. L. Novel Linezolid Analogues with Antiparasitic Activity against *Hymenolepis nana*. *Bioorg. Chem.* **2020**, *105*, 104359-104386.
26. Ochoa, A.; Rivero, I.A. Synthesis of enantiopure 1,3-oxazolidin-2-ones from α -dibenzylamino esters. *Arkivoc* **2008**, *xiv*, 330-343.
27. López-Angulo, G. Caracterización química de compuestos con actividad biológica obtenidos de tres especies de *Echeveria* del estado de Sinaloa. Tesis de Doctorado en Biotecnología de la Salud, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán de Rosales, Sinaloa, 2016, p 58-59.
28. Rajabi, S.; Ramazani, A.; Hamidi, M.; Naji, T. *Artemia salina* as model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU*, **2015**, *23*, 20-25.

VIII. ANEXOS

Espectro 2D HSQC de 7g en CDCl₃.Espectro ampliado 2D HSQC de 7g en CDCl₃.