

CRIBADO DE COLECCIONES DE PRODUCTOS PARA DESCUBRIR ANTIVIRALES

Daniel Lucas Álvarez

Trabajo fin de grado 2020

Tutora: Susana Abdala Kuri

Cotutora: Dácil Hernández Mesa

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
¹ H-RMN del compuesto 10b	11
¹³ C-RMN del compuesto 10b	13
Actividad biológica	14
MATERIAL Y MÉTODOS	17
CONCLUSIONES.....	20
BIBLIOGRAFÍA	21

RESUMEN

La emergencia de nuevos patógenos o la aparición de resistencias a los tratamientos habituales son según la OMS una de las mayores amenazas a la salud humana y animal en estos momentos, y es necesario desarrollar nuevos antimicrobianos.

El trabajo se ha enfocado en el estudio de compuestos derivados de oxazina como potenciales antimicrobianos. La síntesis de estos derivados se había realizado en el IPNA-CSIC usando un proceso en cadena, pero los compuestos necesitaban purificarse y caracterizarse, para estudiar después sus actividades biológicas. De la colección existente, se seleccionaron cinco parejas de isómeros.

Haciendo uso de las distintas técnicas los compuestos fueron purificados y caracterizados, y preparados para el estudio de su bioactividad en la Universidad de Lovaina. Aquí se describen los estudios de actividad antiviral y de citotoxicidad, y se establecen ciertas relaciones estructura-actividad.

Palabras clave: Oxazinas, isómeros, antiviral, citotoxicidad.

ABSTRACT

The emergence of new pathogens or resistances to the usual clinical treatments are, according to the WHO, one of the major threats to human and animal health in these moments, and demands the development of new antimicrobial agents.

This work is focused on the study of oxazine derivatives as potential antimicrobials. The synthesis of these derivatives was carried out in IPNA-CSIC using a sequential process, but the compounds needed purification and characterization before being submitted to biological screenings. From the existing libraries, five pairs of isomers were selected.

Using different techniques, the compounds were purified, characterized, and prepared for the biological screenings in the University of Lovaine. The studies of antiviral activity and cytotoxicity, as well as some structure-activity relationships, are described herein.

Key words: Oxazines, isomers, antiviral, cytotoxicity.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Acrónimo
DIB	Diacetoxiyodobenceno
DCM	Diclorometano
AcOEt	Acetato de etilo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
OMe	Metoxilo
Ph	Fenilo
Ar	Aromático
s	Singlete
d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doblete de doblete de doblete
m	Multiplete
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Hz	Hercios
IR	Espectro Infrarrojo
CMC	Concentración mínima citotóxica
EC ₅₀	Concentración eficaz al 50%
CC ₅₀	Concentración citotóxica al 50%
MTS	Ensayo colorimétrico MTS

INTRODUCCIÓN

La emergencia de nuevos patógenos o la aparición de resistencias a los tratamientos habituales ^[1,2,3] son según la OMS una de las mayores amenazas a la salud humana y animal en estos momentos ^[4], lo cual hace necesario desarrollar nuevos antimicrobianos ^[5]. La aparición del covid-19 ha puesto de relieve el impacto que pueden tener los virus (y otros patógenos) con alta capacidad de transmisión, incluyendo especies diferentes. Aunque el número de fármacos antivirales ha aumentado considerablemente en los últimos quince años como respuesta a la pandemia de VIH ^[5], gripe aviar, SARS, MERS, Zika, dengue, etc, el desarrollo de antivirales es un campo donde aún queda mucho por hacer.

Como contribución a la identificación de nuevos antivirales, en esta memoria se estudiarán las oxazinas y sus derivados.

Una oxazina es una estructura heterocíclica doblemente insaturado de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno y otro de nitrógeno en el anillo. En función de la posición relativa de los heteroátomos (oxígeno y nitrógeno) y de la posición relativa de los dobles enlaces, existen distintos isómeros de esta molécula, tal y como se muestra en la Figura 1 ^[6].

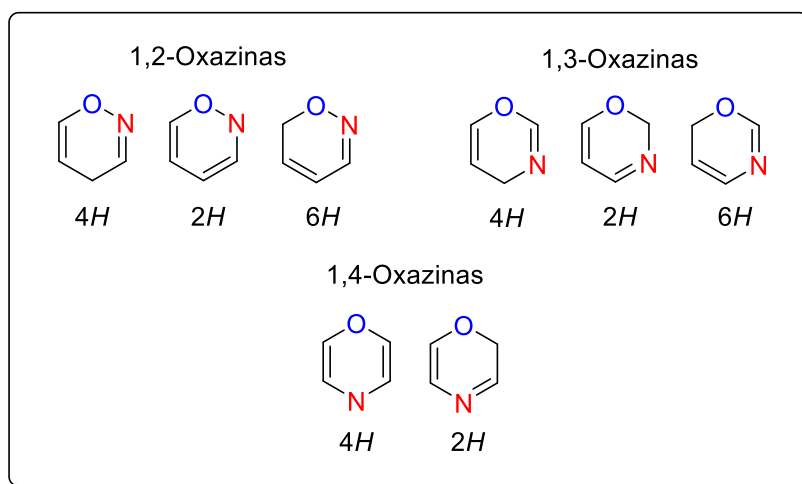


Figura 1. Isómeros de oxazina.

Las oxazinas forman parte de la base de diversos fármacos, entre ellos antivirales como Efavirenz, Emtricitabina o el Tenofovir, y del mismo modo también son la base de otros con actividad antibacteriana como las fluoroquinolonas (levofloxacino y ofloxacino) y los oxacephemis (latamoxef y flomoxef) ^[7,8]. De ahí el interés en el estudio de este tipo de estructuras como alternativa a los antimicrobianos actuales.

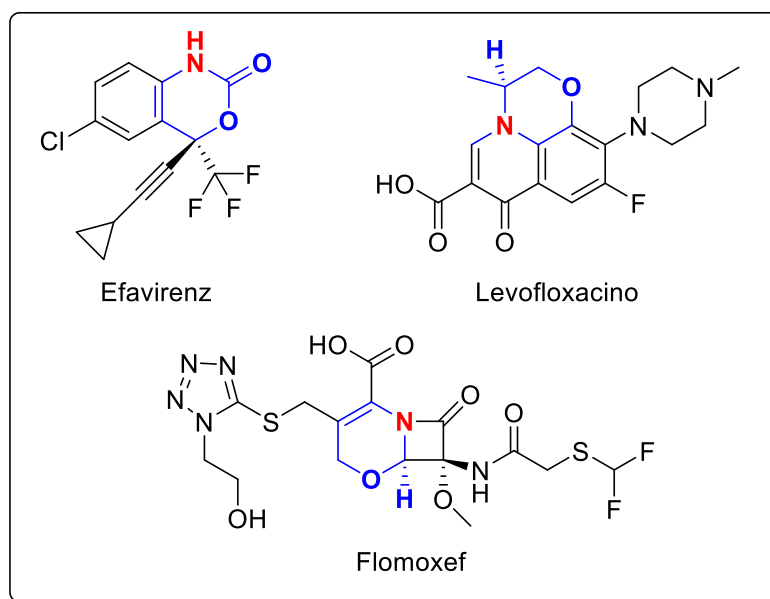
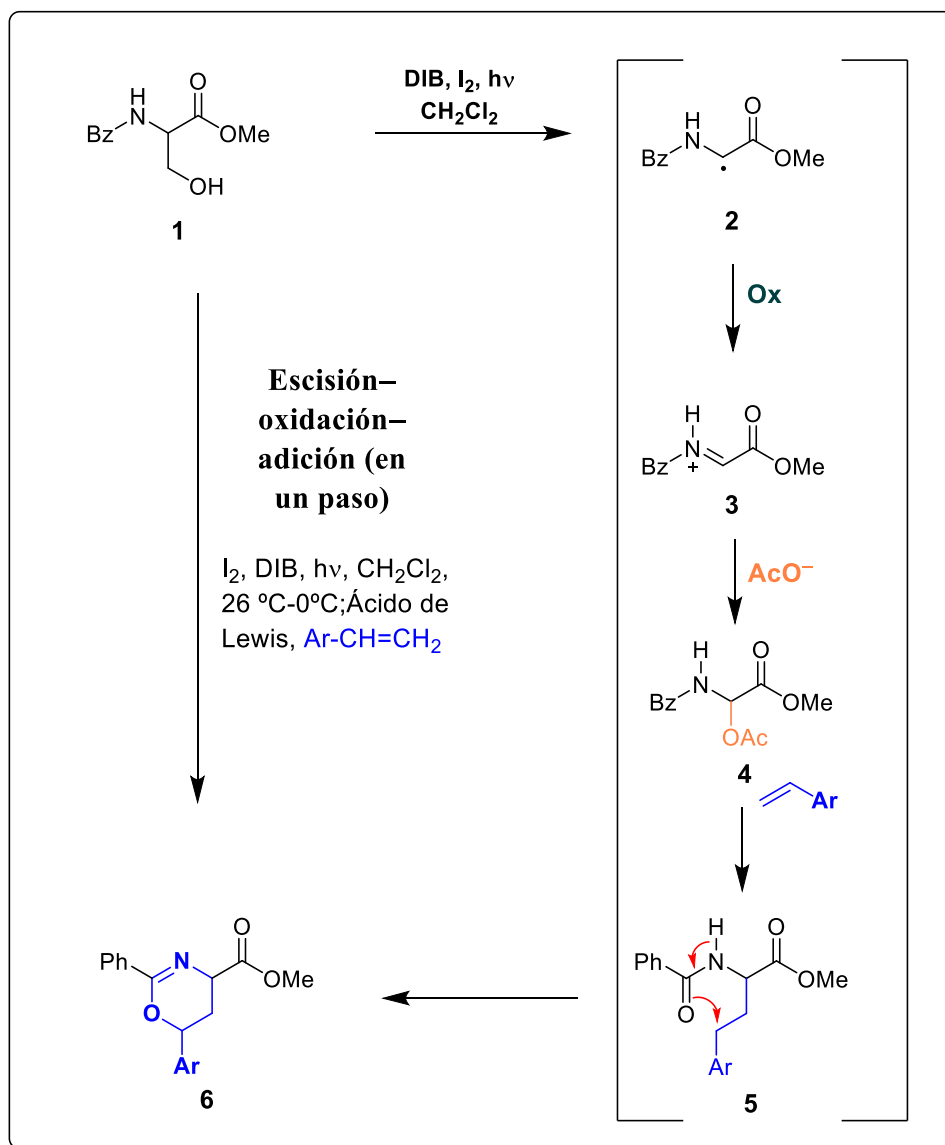


Figura 2. Fármacos derivados de oxazina.

El grupo de Síntesis de Fármacos y compuestos bioactivos, del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPNA–CSIC) ha desarrollado un método que permite de una manera directa y sencilla la síntesis de derivados de oxazinas, usando precursores derivados de L-serina y amino–azúcares comerciales. En el Esquema 1, se muestra como ejemplo la síntesis de 6-aryl-5,6-dihidro-4H-1,3-oxazina (**6**).

La síntesis del derivado de oxazina **6** se realizó mediante un proceso en cadena (**one pot**) de escisión radicalaria–oxidación–adición nucleofílica. Así, se utilizó como precursor el derivado de la L-serina **1** y se trató con DIB (diacetoxydobenceno) y yodo, para producir la escisión radicalaria que condujo al C-radical **2**. Este intermedio se oxidó para dar el ión aciliminio **3**, que a su vez reaccionó con iones acetato procedentes del reactivo para producir el N,O – acetal **4**. Bajo tratamiento con un ácido de Lewis, el ión aciliminio fue regenerado y reaccionó con vinil arenos para formar los intermedios **5**. Finalmente, por ciclación intramolecular, se obtuvieron los derivados de oxazina **6** con rendimientos globales muy buenos. Variando el vinilareno utilizado como nucleófilo en la etapa de adición, se accedió a una variada colección de compuestos ^[9]. Sin embargo, la actividad biológica de los mismos no se estudió en su momento, por lo que en este trabajo de fin de grado nos propusimos purificar y caracterizar compuestos seleccionados de la colección y prepararlos para el estudio de su actividad antiviral y citotoxicidad, y posteriormente, intentar establecer relaciones estructura-actividad (SAR).



Esquema 1. Síntesis de 6-aryl-5,6-dihidro-4H-1,3-oxazina ^[9].

OBJETIVOS

- Purificar una colección de oxazinas, previamente sintetizadas en el IPNA-CSIC, utilizando diferentes técnicas cromatográficas usuales en laboratorios de química orgánica (cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y cromatografía rotatoria en cromatotrón).
- Confirmar la estructura de los compuestos purificados haciendo uso principalmente de la Resonancia Magnética Nuclear (experimentos de ^1H y ^{13}C), así como otras técnicas (infrarrojo, análisis elemental, espectrometría de masas o actividad óptica).
- Preparar muestras de los compuestos puros para su estudio biológico.
- Establecer relaciones estructura – actividad en base a los datos de actividad antiviral y de citotoxicidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la realización de este trabajo se seleccionaron las oxazinas **7–11** (Figura 3), todas ellas sintetizadas anteriormente en el IPNA-CSIC utilizando la metodología de escisión radicalaria – oxidación – adición nucleofílica comentada en la Introducción. Las oxazinas **7–10** presentan distintos sustituyentes en posición C-4 del anillo aromático (H en los compuestos **7**, cloro en los derivados **8**, metilo en los productos **9** y fenilo en los compuestos **10**). En los compuestos **11a** y **11b**, el anillo oxazínico forma parte de un triciclo.

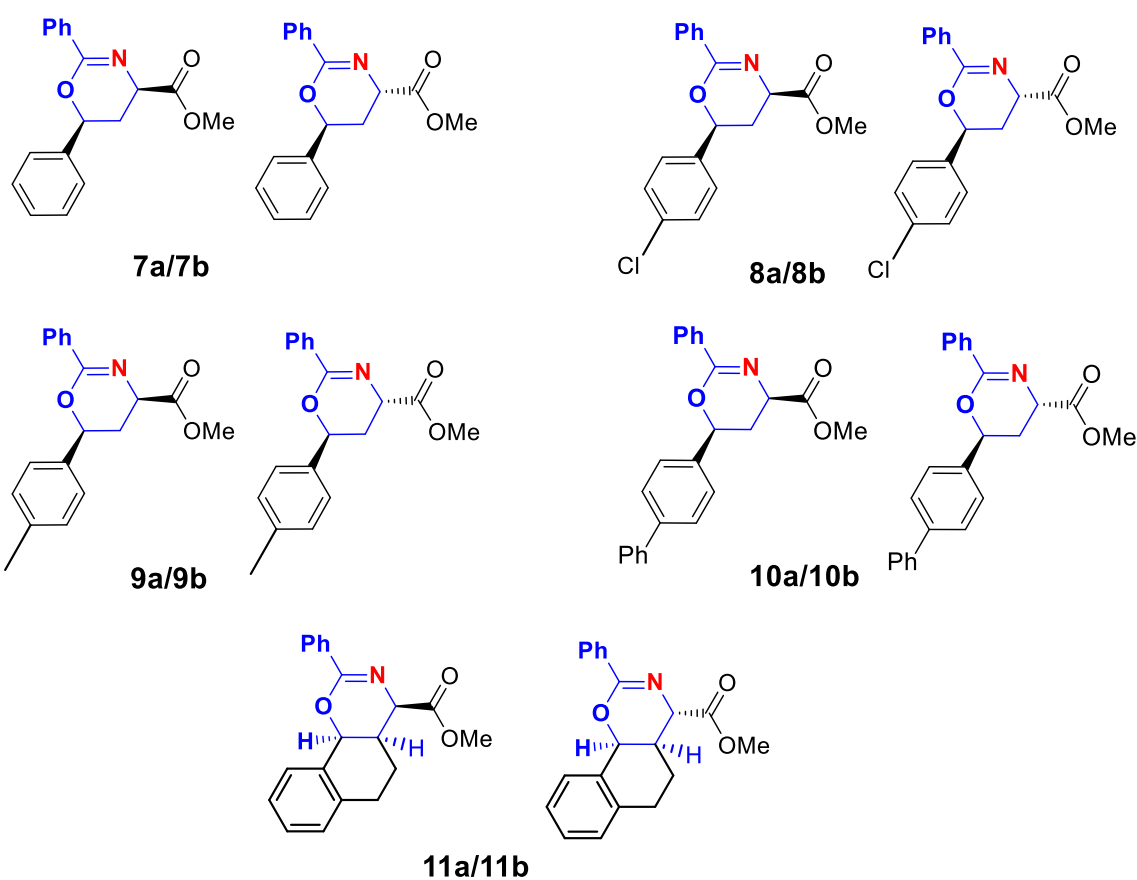


Figura 3. Oxazinas seleccionadas para su estudio.

Para comprobar el estado de las muestras almacenadas en el congelador, se utilizó inicialmente cromatografía en capa fina. Para ello cada compuesto se disolvió en diclorometano (DCM) en los viales donde se conservaban, y mediante el uso de capilares se procedió a depositar una muestra en placas de gel de sílice que posteriormente se eluyeron utilizando mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad variable. Para visualizar los productos se hizo uso de la lámpara ultravioleta,

y además se procedió a pulverizarlas con una disolución de permanganato potásico y posterior calentamiento para asegurarnos de revelar cualquier impureza.

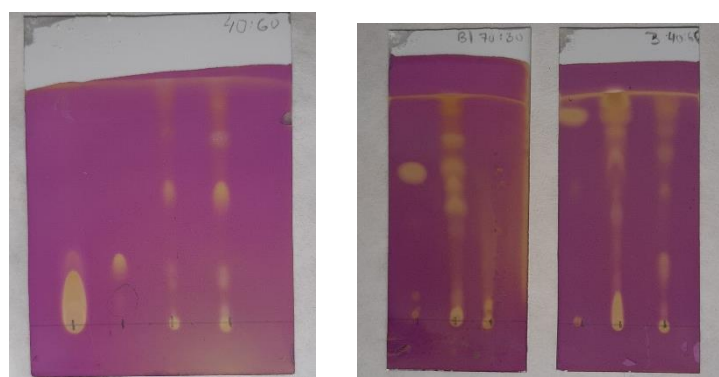


Figura 4. Ejemplos de cromatografías en capa fina.

Tras revelar las capas finas, se seleccionaron las muestras que mostraron un menor grado de descomposición de los productos de interés, asegurando así que tras el proceso de purificación quedaría una cantidad de compuesto suficiente para los estudios biológicos. Así se seleccionaron las oxazinas **7–11** (Figura 3) y se procedió a purificarlas. Para ello, se eligió como técnica de purificación la cromatografía rotatoria en cromatotrón. Se trata de un sistema rotatorio compuesto por placas desmontables de cuarzo recubiertas con gel de sílice. Las placas se fijan a un sistema rotor y se las hace girar a gran velocidad. Inicialmente se añade en el centro de la placa el producto diluido en DCM, se deja secar y luego se empieza a eluir con una mezcla de hexano y AcOEt. Por fuerza centrífuga, el eluyente y los productos se van desplazando hacia el exterior de la placa. Los productos viajan por la placa a distintas velocidades y ésta es la base de su separación. Las fracciones de eluyente y producto/s se van recogiendo y analizando por cromatografía en capa fina, para localizar aquellas fracciones que contienen el producto de interés. Muestras de las distintas fracciones se analizaron por RMN-¹H, como se comentará luego, para confirmar que se trataba de los productos deseados y no de impurezas.

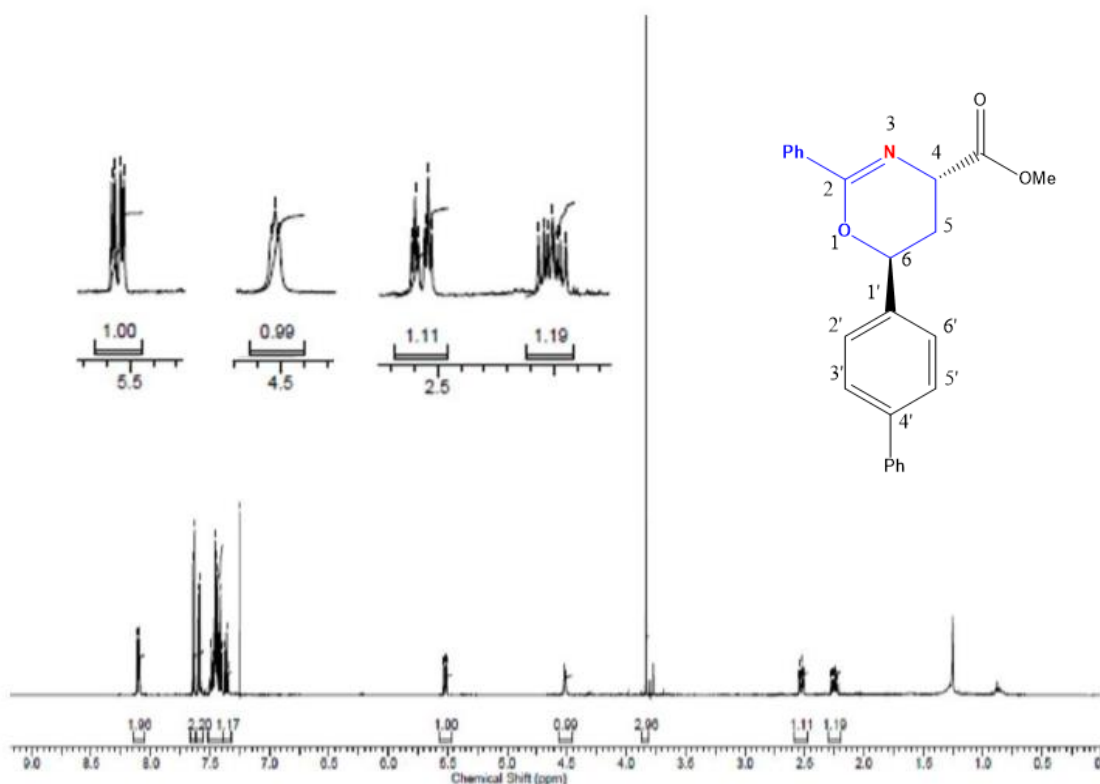
Una vez establecido qué fracciones contenían el producto deseado puro, se reunieron y se procedió a la evaporación del disolvente utilizando un rotavapor. Los compuestos se conectaron posteriormente a una bomba de alto vacío para eliminar cualquier resto de disolvente.

Las oxazinas ya secas, se pesaron, se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl₃) y se procedió a su caracterización utilizando principalmente experimentos de

Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C). Los espectros registrados se compararon con los ya existentes en la base de datos del grupo en relación a estos compuestos. Para completar mi formación en relación a la caracterización de estructuras químicas, a alguna de las muestras se le realizó además su espectrometría de masas, el espectro IR, y la actividad óptica.

A continuación, se procede a explicar de manera detallada, y a modo de ejemplo, la caracterización del compuesto **10b**.

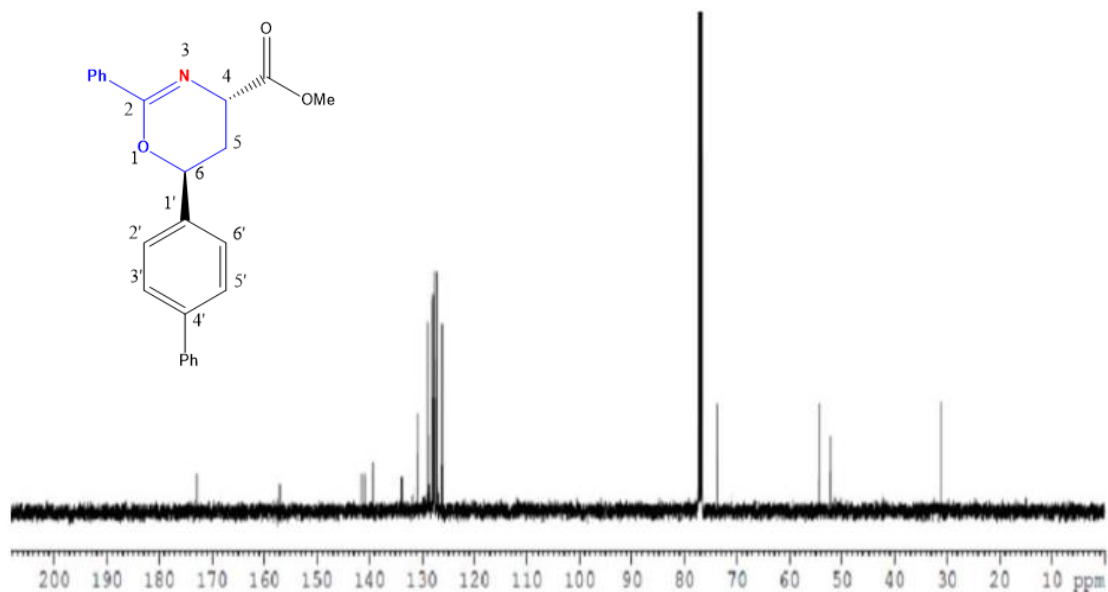
^1H -RMN del compuesto **10b**



Señal ¹ H-RMN	Comentario
2.26 (ddd, $J = 5.7, 9.4, 14.0$ Hz, 1H, 5-H _a)	Doblete de doblete de doblete que integra por un protón (1H). Por su multiplicidad y desplazamiento se trata de uno de los dos protones en posición 5.
2.53 (ddd, $J = 3.8, 3.8, 14.0$ Hz, 1H, 5-H _b)	Doblete de doblete de doblete que integra por un protón (1H). Su multiplicidad y desplazamiento sugieren que se trata del otro protón en posición 5.
3.84 (s, 3H, OMe)	Singlete que integra por tres protones (3H). Debido a su desplazamiento deducimos que se trata de metilo del metilester (OMe).
4.5 (br. dd, $J = 4.0, 5.6$ Hz, 1H, 4'-H)	Doblete de doblete que integra por un protón (1H). Debido a su desplazamiento químico se trata del hidrógeno en posición 4 del anillo oxazínico.
5.53 (dd, $J = 3.5, 9.5$ Hz, 1H, 6'-H)	Doblete de doblete que integra por un protón (1H). Debido a su desplazamiento químico y a su multiplicidad se trata del hidrógeno en posición 6 del anillo oxazínico.
7.38 (dd, $J = 7.4, 7.4$ Hz, 1H, Ar)	Doblete de doblete que integra por un protón (1H). Debido a su desplazamiento y multiplicidad se trata de un hidrógeno del anillo aromático.
7.43 (dd, $J = 7.4, 7.6$ Hz, 2H, Ar)	Doblete de doblete que integra por dos protones (2H). Debido a su desplazamiento y multiplicidad se trata de los hidrógenos del anillo aromático.
7.44–7.48 (m, 4H, Ar)	Multiplete que integra por cuatro protones aromáticos.
7.50 (dd, $J = 7.4, 7.4$ Hz, 1H, Ar)	Doble de doblete que integra por un protón aromático.
7.60 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, Ar)	Doblete que integra por dos protones (2H) aromáticos.
7.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, Ar)	Doblete que integra por dos protones (2H) aromáticos.
8.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar)	Doblete que integra por dos protones (2H) aromáticos.

Tabla 1. Caracterización ¹H-RMN.

¹³C-RMN del compuesto 10b



Señal ¹³ C-RMN	Comentario
31.0 (CH ₂)	Carbono en posición 5 del anillo oxazínico.
52.5 (CH ₃)	Por su desplazamiento químico se trata de un metilo unido a un heteroátomo. Corresponde con el CH ₃ unido al oxígeno.
54.0 (CH)	Carbono en posición 4 del anillo oxazínico.
73.8 (CH)	Carbono en posición 6 del anillo oxazínico.
126.1 (2 x CH)	Carbonos del anillo aromático.
127.1 (2 x CH)	Carbonos del anillo aromático.
127.6 (4 x CH)	Carbonos del grupo Ph unidos al anillo aromático.
127.6 (CH)	Carbono del grupo Ph unidos al anillo aromático.
127.7 (2 x CH)	Carbonos aromáticos.
128.1 (2 x CH)	Carbonos del grupo Ph unido al anillo oxazínico.
128.8 (2 x CH)	Carbonos del grupo Ph unido al anillo oxazínico.
131.0 (CH)	Carbono del grupo Ph unido al anillo oxazínico.
133.3 (C)	Carbono cuaternario aromático.
138.9 (C)	Carbono cuaternario aromático.
140.6 (C)	Carbono cuaternario aromático.
141.4 (C)	Carbono cuaternario aromático.
156.8 (C)	Por su desplazamiento químico, es el carbono en posición 2 del anillo oxazínico.
172.8 (C)	Carbono perteneciente al éster.

Tabla 2. Caracterización ¹³C-RMN.

El peso molecular y la fórmula empírica de **10b** se confirmaron utilizando espectrometría de masas y análisis elemental, y en su espectro de IR se registró una banda de absorción pronunciada a 1738 cm^{-1} , correspondiente al grupo carbonilo.

Actividad biológica

Los productos puros, una vez completada su caracterización, se prepararon para su estudio antimicrobiano. La situación generada por el COVID-19 obligó a suspender los ensayos antibacterianos y antifúngicos en el Servicio de Actividades Biológicas del IPNA-CSIC, pero pudieron efectuarse estudios de actividad antiviral y citotoxicidad en colaboración con la Universidad de Lovaina (Bélgica).

En primer lugar, y dada la actualidad del covid-19, se hicieron estudios de los compuestos frente al coronavirus felino, ya que es un coronavirus relacionado con el covid pero menos transmisible al ser humano. Es de destacar que el covid ha saltado del hombre a distintos animales, especialmente gatos y otros felinos. Para el estudio se usaron células de riñón de gato Crandell-Rees (CRFK), que se infectaron con el coronavirus felino.

Para que haya una ventana terapéutica útil, un compuesto debe tener una alta actividad antiviral pero una baja toxicidad hacia la célula animal. Por ello, primero se estudió la citotoxicidad de los compuestos sobre células CRFK, medida como la CC50, es decir, la concentración a la que la viabilidad de las células se reduce en un 50%. Para ello se empleó el ensayo colorimétrico MTS, donde las células viables generan formazán, un compuesto coloreado. La intensidad del color se mide en un colorímetro. Como se puede ver en la Tabla 3, los compuestos no mostraron citotoxicidad a dosis $> 100\text{ }\mu\text{g/mL}$, salvo el compuesto **11a**.

A continuación, las células CRFK se infectaron con el coronavirus y se trataron con diferentes concentraciones de los compuestos. Con ello se determinó la EC50, que es la concentración a la que se reduce en un 50% la citopatogenicidad inducida por el virus. La viabilidad se determinó también con el ensayo MTS. Solamente el compuesto **11a** mostró una actividad considerable, comparable a la de uno de los controles (HHA) si bien su citotoxicidad es superior. Es de destacar que **11a** es uno de los compuestos tricíclicos, de alta rigidez estructural. Como su isómero **11b** no mostró una actividad apreciable, la configuración debe ser importante para la bioactividad.

Las células CRFK también se emplearon para estudiar la actividad contra el herpesvirus felino (Tabla 3). De nuevo, el compuesto **11a** es el único que mostró una actividad considerable.

Compuestos	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	
		Virus corona felino	Virus herpes felino
7a	> 100	> 100	> 100
7b	> 100	> 100	> 100
8a	> 100	> 100	> 100
8b	> 100	> 100	> 100
9a	> 100	> 100	> 100
9b	> 100	> 100	> 100
10a	> 100	> 100	> 100
10b	> 100	> 100	> 100
11a	63	> 20	> 20
11b	> 100	> 100	> 100
HHA (μg/ml)	> 100	18	2
UDA (μg/ml)	16	1.1	0.8
Ganciclovir	> 100	> 100	1.1

Tabla 3. Resultados estudio antiviral en cultivos CRFK. **Controles:** HHA (*Hippeastrum hybrid* agglutinin) es una lectina de plantas específica para manosa, con importante actividad anticoronavirus. La UDA (*Urtica dioica agglutinin*) es otra lectina con potente actividad antiviral/anticoronavirus. Ambas se usan como controles positivos ^[10]. El nucleósido acíclico ganciclovir, que se emplea mucho contra varios virus (ej. citomegalovirus), no es muy activo contra los coronavirus (control negativo para éstos y positivo para herpesvirus) ^[11].

También se estudió la actividad antiviral frente a patógenos de humanos, como el virus de la estomatitis vesicular, el virus Coxsackie y el virus sincitial respiratorio (Tabla 4). Para ello se infectaron células de cáncer de cuello de útero HeLa con los virus nombrados anteriormente.

En primer lugar, se determinó la CMC, es decir, la concentración mínima citotóxica, concentración capaz de producir alteraciones en la morfología normal de las células. Fue determinada midiendo la viabilidad celular con el ensayo colorimétrico MTS. Los compuestos ensayados no mostraron efectos citotóxicos hasta concentraciones iguales o superiores a 100 μM. Llegados a este punto, se procedió a determinar la EC₅₀, también con el ensayo MTS. Como se puede observar en la Tabla 4, el compuesto **11a** es de nuevo el que mejores resultados presenta, y es de destacar que su relación actividad antiviral/citotoxicidad es mejor frente a virus humanos que frente a los virus felinos.

El compuesto **11a** merece ser estudiado con mayor profundidad en un futuro. Para ello, se generarán otros derivados tricíclicos con anillos de distinto tamaño, rigidez y sustituyentes, y se estudiará de nuevo su actividad antiviral. Los datos que se obtengan servirán para diseñar estructuras más potentes y selectivas.

Compuestos	CMC (μM)	EC ₅₀ (μM)		
		Virus estomatitis vesicular	Virus Coxsackie	Virus sincitial respiratorio
7a	> 100	> 100	> 100	> 100
7b	> 100	> 100	> 100	> 100
8a	> 100	> 100	> 100	> 100
8b	> 100	> 100	> 100	> 100
9a	> 100	> 100	> 100	> 100
9b	> 100	> 100	> 100	> 100
10a	> 100	> 100	> 100	> 100
10b	> 100	> 100	> 100	> 100
11a	100	> 20	> 20	> 20
11b	> 100	> 100	> 100	> 100
DS – 5000 ($\mu\text{g/ml}$)	> 100	> 100	> 100	1
S – DHPA	> 250	> 250	> 250	> 250
Ribavirina	> 250	5	50	3

Tabla 4. Resultados estudio antiviral en cultivos HeLa. **Controles:** DS-5000 (Dextran sulphate MW 5000) es activo contra VIH-1, virus sincitial respiratorio, etc ^[12]. La S-DHPA [(S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl) adenine] es un nucleósido acíclico, en que el anillo del azúcar se sustituye por una cadena lineal. Es activo tanto contra virus RNA como DNA ^[12]. La Ribavirina es un análogo de nucleósido en el que la base nitrogenada es triazolcarboxamida. Se usa contra virus de la hepatitis C y otros como el virus sincitial respiratorio ^[13].

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Técnicas experimentales.

Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C). Ambos experimentos (^1H y ^{13}C) se realizaron en un espectrofotómetro Bruker, modelo Avance II 500, a una frecuencia de 500 MHz para ^1H y 125.7 MHz para ^{13}C . Como disolvente para preparar las muestras para su análisis se usó CDCl_3 . Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en partes por millón (ppm), en relación al disolvente empleado como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

Espectroscopía de Infrarrojo (IR). Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrómetro Perkin-Elmer modelo 681/FTIR, en células de 0.2 mm, disolviendo el producto en cloroformo seco sobre gel de sílice Merck con indicador de humedad. La espectrometría de infrarrojo permitió también comprobar para cada uno de los productos la presencia de grupos funcionales característicos.

Espectrometría de Masa (EM). Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron realizados en un espectrómetro Vg – Micromass modelo Zab 2F, con la técnica de Impacto Electrónico de alta y de baja resolución. La temperatura de la fuente fue de 220 oC y la energía de ionización 70 eV.

Análisis elemental. Los análisis elementales se realizaron en un analizador Fisons modelo EA 1108 CHNS.

2. Técnicas cromatográficas para la purificación de los productos.

Cromatografía en capa fina. El estado de pureza de las muestras a estudiar se monitorizó mediante placas de gel de sílice Merck (60 F254 de 0,25 mm de espesor). Los eluyentes empleados se especifican en cada caso (C_6H_{14} y $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$). El revelado de las mismas se realizó mediante exposición a la luz ultravioleta de 254 nm, y la pulverización con una disolución de permanganato potásico (por cada litro de agua, 10 g de KMnO_4 , 66.7 g K_2CO_3 y 0.85 g NaOH) y posterior calentamiento.

Cromatografía rotatoria en cromatotrón. Aparato que utilizando un sistema de placas circulares en los que la mezcla a resolver se separa por un proceso de cromatografía en centrífuga. Se utilizó una placa circular de 1 mm de grosor de gel de sílice Merck (60PF254) con yeso.

3. Procedimiento de purificación y caracterización estructural.

(4R*,6S*)-Metil 2,6-Difenil-5,6-dihidro-4H-1,3-oxazina-4-carboxilato (±)-7a y su isómero (4S*,6S*) (±)-7b. Se purificaron utilizando cromatografía rotatoria en cromatotrón (hexano/AcOEt 90:10). **Compuesto (±)-7a:** IR (CHCl₃): 3030, 1742, 1652, 1276 cm⁻¹; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 26 °C) δ_H = 2.12 (ddd, *J* = 11.6, 11.6, 13.6 Hz, 1H, 5-H_a), 2.54 (ddd, *J* = 2.8, 4.8, 13.6 Hz, 1H, 5-H_b), 3.80 (s, 3H, OMe), 4.59 (dd, *J* = 4.8, 11.4 Hz, 1H, 4-H), 5.32 (dd, *J* = 2.8, 11.6 Hz, 1H, 6-H), 7.37–7.40 (m, 3H, Ar), 7.41–7.43 (m, 4H, Ar), 7.45 (dd, *J* = 7.2, 8.8 Hz, 1H, Ar), 8.03 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, Ar) ppm; ¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 26 °C) δ_C 32.4 (CH₂), 52.4 (CH₃), 56.5 (CH), 76.2 (CH), 125.8 (2 × CH), 127.6 (2 × CH), 128.0 (2 × CH), 128.5 (CH), 128.8 (2 × CH), 130.9 (CH), 133.1 (C), 139.7 (C), 157.0 (C), 172.5 (C) ppm; MS (EI, 70 eV) *m/z* (%) 295 [M⁺]; HRMS: calculado C₁₈H₁₇NO₃ 295.1208, encontrado 295.1212. **Compuesto (±)-7b:** IR (CHCl₃): 2956, 1738, 1650, 1283 cm⁻¹; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 26 °C) δ_H 2.19 (ddd, *J* = 5.7, 9.3, 14.8 Hz, 1H, 5-H_a), 2.48 (ddd, *J* = 3.8, 3.9, 14.0 Hz, 1H, 5-H_b), 3.82 (s, 3H, OMe), 4.44 (dd, *J* = 4.2, 5.6 Hz, 1H, 4-H), 5.46 (dd, *J* = 3.6, 9.3 Hz, 1H, 6-H), 7.34–7.45 (m, 7H, Ar), 7.47 (dd, *J* = 7.2, 7.4 Hz, 1H, Ar), 8.06 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar) ppm; ¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 26 °C) δ_C 31.0 (CH₂), 52.5 (CH₃), 54.0 (CH), 73.8 (CH), 125.6 (2 × CH), 127.6 (2 × CH), 128.1 (2 × CH), 128.3 (CH), 128.7 (2 × CH), 131.0 (CH), 133.3 (C), 140.0 (C), 157.1 (C), 172.8 (C) ppm; MS (EI, 70 eV) *m/z* (%) 295 (19) [M⁺]; HRMS: calculado C₁₈H₁₇NO₃ 295.1208, encontrado 295.1216. Análisis elemental calculado C 73.20, H 5.80, N 4.74; encontrado C 73.22, H 5.86, N 4.61.

(4R*,6S*)-Metil 2,6(bifenil -4-aril)-Difenil-5,6-dihidro-4H-1,3-oxazina-4-carboxilato (±)-10a y su isómero (4S*,6S*) (±)-10b. Se purificaron utilizando cromatografía rotatoria en cromatotrón (hexano/AcOEt 90:10). **Compuesto (±)-10a:** IR (CHCl₃): 3018, 1742, 1649, 1488 cm⁻¹. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 26 °C) δ_H = 2.18 (ddd, *J* = 11.5, 11.5, 13.7 Hz, 1 H, 5-H_a), 2.60 (ddd, *J* = 2.9, 4.9, 13.7 Hz, 1 H, 5-H_b), 3.81 (s, 3 H, OMe), 4.64 (dd, *J* = 4.8, 11.5 Hz, 1 H, 4-H), 5.39 (dd, *J* = 2.8, 11.7 Hz, 1 H, 6-H), 7.36 (dd, *J* = 7.4, 7.5 Hz, 1 H, Ar), 7.41 (dd, *J* = 7.0, 7.6 Hz, 2 H, Ar), 7.46 (dd, *J* = 7.0, 7.5 Hz, 2 H, Ar), 7.48 (m, 1 H, Ar), 7.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar), 7.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar), 7.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar), 8.07 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar) ppm; ¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_C = 32.4 (CH₂),

52.4 (CH₃), 56.5 (CH), 76.0 (CH), 126.3 (2 × CH), 127.1 (2 × CH), 127.5 (2 × CH), 127.6 (2 × CH), 128.0 (2 × CH), 128.5 (CH), 128.8 (2 × CH), 130.9 (CH), 133.1 (C), 138.6 (C), 140.6 (C), 141.6 (C), 156.9 (C), 172.5 (C) ppm. MS (EI, 70 eV) m/z (%) 371 (33) [M⁺]. HRMS: calculado C₂₄H₂₁NO₃ 371.1521; encontrado 371.1523; calculado C₂₂H₁₈NO 312.1388; encontrado 312.1386. Análisis elemental calculado C 77.61, H 5.70, N 3.77; encontrado C 77.43, H 5.98, N 3.66. **Compuesto (±)-10b**: IR (CHCl₃): 3011, 1738, 1649 cm⁻¹. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_H = 2.26 (ddd, *J* = 5.7, 9.4, 14.0 Hz, 1 H, 5-Ha), 2.53 (ddd, *J* = 3.8, 3.8, 14.0 Hz, 1 H, 5-Hb), 3.84 (s, 3 H, OMe), 4.50 (br. dd, *J* = 4.0, 5.6 Hz, 1 H, 4-H), 5.53 (dd, *J* = 3.5, 9.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.38 (dd, *J* = 7.4, 7.4 Hz, 1 H, Ar), 7.43 (dd, *J* = 7.4, 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.44–7.48 (m, 4H, Ar), 7.50 (dd, *J* = 7.4, 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar), 8.11 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar) ppm; ¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_C = 31.0 (CH₂), 52.5 (CH₃), 54.0 (CH), 73.8 (CH), 126.1 (2 × CH), 127.1 (2 × CH), 127.6 (4 × CH), 127.6 (CH), 127.7 (2 × CH), 128.1 (2 × CH), 128.8 (2 × CH), 131.0 (CH), 133.3 (C), 138.9 (C), 140.6 (C), 141.4 (C), 156.8 (C), 172.8 (C) ppm. MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 371 (100) [M⁺]. HRMS: calculado C₂₄H₂₁NO₃ 371.1521; encontrado 371.1519; calculado C₂₂H₁₈NO 312.1388; encontrado 312.1384. Análisis elemental calculado C 77.61, H 5.70, N 3.77; encontrado C 77.61, H 5.98, N 3.70.

El resto de los derivados de oxazinas se purificaron siguiendo la metodología descrita y se identificaron por comparación de su espectro de RMN de ¹H con los datos ya existentes en el grupo.

CONCLUSIONES

- Una colección de oxazinas, sintetizadas previamente en el IPNA-CSIC, fue purificada utilizando técnicas cromatográficas usuales en laboratorios de química orgánica como son cromatografía en capa fina, y cromatografía rotatoria en cromatotrón.
- La estructura de los compuestos purificados se pudo confirmar haciendo uso de Resonancia Magnética Nuclear (experimentos de ^1H y ^{13}C), así como otras técnicas como la espectroscopía infrarroja, análisis elemental o actividad óptica.
- Muestras de los compuestos puros fueron preparadas y sometidas a ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral. Los resultados obtenidos en estos ensayos permitieron identificar un compuesto (**11a**) que mostró una prometedora actividad antiviral frente al coronavirus felino, el herpesvirus felino, y los virus humanos de la estomatitis vesicular, el virus Coxsackie y el virus sincitial respiratorio. Es de destacar que su relación actividad antiviral/citotoxicidad es mejor frente a virus humanos que frente a los virus felinos.
- Las relaciones estructura-actividad establecidas sugieren que la rigidez estructural del compuesto tricíclico **11a**, así como su estereoquímica, son necesarios para una acción antiviral potente.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] World Health Organization. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. **2015**. [Consultado en 16 de mayo de 2020]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf;jsessionid=6D2850CDCC03181AA42EE0F45D1213B1?sequence=1
- [2] World Health Organization. Antimicrobial resistance Global Report on Surveillance. **2014**. [Consultado en 11 de mayo de 2020]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1
- [3] Organización Mundial de la Salud. ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos?. **2017**. [Consultado en 15 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/features/qa/75/es/>
- [4] Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. **2018**. [Consultado en 9 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
- [5] Agut H, Burrel S, Bonnafous P, Boutelleau D. Antivirales (a excepción del VIH y la hepatitis). EMC – Tratado de Medicina. **2017**, 21(1): 1–10. [Consultado en 8 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7147123/>
- [6] Eckstein Z, Urbański T. Advances in Heterocyclic Chemistry, Elsevier. **1963**, volume 2, 311–342. [Consultado en 7 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065272508607539>
- [7] Oxazinas – MeSH – NCBI. [Consultado en 9 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010078>
- [8] Gennaro A. Remington Farmacia. 20^º ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. **2003**, volumen 2, 1368 p.
- [9] Boto A, Gallardo J, Álvarez E. One-pot Conversion of Serine Derivatives and Amino Sugars into Oxazine Derivatives of γ -Aryl- γ -(hydroxy)amines. Eur. J. Org. Chem. **2012**, 391–397.
- [10] Keyaerts E, Vijgen L, Pannecouque C, Van Damme E, Peumans W, Egberink H, Balzarini J, Van Ranst M. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. Antiviral Research. **2007**, 75, 179–187.

[11] MedlinePlus medicinas. Ganciclovir. Disponible en:
<https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a605011-es.html>

[12] Clercq E, Descamps J, Sommer P, Holy A. (S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl) adenine: An Aliphatic Nucleoside Analog with Broad-Spectrum Antiviral Activity. *Science*. **1978**, 200, 563-565.

[13] MedlinePlus medicinas. Ribavirina. Disponible en:
<https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a605018-es.html>