



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

**NUEVOS COMPUESTOS DERIVADOS DEL 3-AMINO-
1,2-PROPANODIOL CON ACTIVIDAD CONTRA
ACINETOBACTER BAUMANNII RESISTENTE A
COLISTINA. DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN *IN
VITRO*.**

Gracia Molina Ríos

Sevilla, 17 de Junio de 2016

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Tutores: José Manuel Vega Pérez y Margarita Vega Holm

Tipología del proyecto: Experimental

RESUMEN:

Acinetobacter baumannii es una bacteria perteneciente al género *Acinetobacter*, que comprende cocobacilos Gram-negativos, aerobios estrictos, no fermentadores, catalasa positivos, oxidasa positivos e inmóviles. Es la especie más representativa, debido a que es un patógeno nosocomial con una elevada tasa de mortalidad. *A. baumannii* causa una amplia gama de infecciones como bacteriemia, neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas profundas y osteomielitis en personas hospitalizadas, que se someten a una intervención quirúrgica, o inmunodeprimidas, o que tienen otras enfermedades que favorecen la infección. Este microorganismo puede sobrevivir en el medio ambiente, en objetos inanimados, además de pertenecer a la microbiota de la piel, por lo que su transmisión puede ser endógena o exógena. Lo más importante de *A. baumannii* es su gran capacidad para crear resistencias contra antimicrobianos, por lo tanto, resulta muy complicado encontrar un tratamiento para combatir la infección.

Este proyecto se centra en el diseño, síntesis de nuevos compuestos derivados del 3-amino-1,2-propanodiol, y su evaluación biológica frente a *Acinetobacter baumannii* multirresistente; buscando obtener análogos a un prototipo (compuesto **7**) con actividad, detectado en un screening preliminar.

Se realizaron modificaciones en el esqueleto del prototipo mediante dos aproximaciones centradas en dos de los puntos de variabilidad estructural del modelo, en la función éster y en el esqueleto del aminoalcohol. El diseño se estructuró por generaciones de forma que en cada una de ellas se determine qué rasgos estructurales son necesarios para la actividad biológica y se preserven en las sucesivas generaciones.

Los resultados de actividad biológica de los compuestos de la primera generación permitieron encontrar compuestos activos (**11** y **12**) con baja IC₅₀ de forma que se convierten en nuevos modelos para la siguiente generación. Los compuestos (**13-15**) de la segunda generación son diseñados tomando estos compuestos como modelo.

Palabras clave: Antimicrobianos, *Acinetobacter baumannii*, multirresistencia, derivados de urea.

INDICE

1. Introducción	5
2. Antecedentes	12
3. Objetivos	18
4. Metodología	19
4.1 Métodos generales	19
4.2 Procedimiento para la obtención de las ureas derivadas de 3-aminopropanol y de 3-amino-1,2 propanodiol	19
4.3 Reacción de monoacilación regioselectiva de la urea derivada del 3-amino-1,2-propanodiol	21
4.4 Reacción de acilación de la urea derivada del 3-aminopropanol	22
4.5 Reacción de diacilación de la urea del 3-amino-1,2-propanodiol	24
4.6 Evaluación de la actividad biológica	27
5. Resultados y discusión	28
5.1 1ª Generación de compuestos. Diseño, síntesis y evaluación biológica	29
5.2 2º Generación de compuestos. Diseño y síntesis.	32
6. Conclusiones	35
7. Referencias	36
Anexos	38

1. INTRODUCCIÓN

A principios del siglo XX, en 1911, el microbiólogo holandés Beijerinck describió un microorganismo aislado del suelo, tras enriquecerlo con un medio de calcio-acetato, al que denominó *Micrococcus calco-aceticus*. En las siguientes décadas se fueron describiendo microorganismos similares. Fue en 1954 cuando Brisou y Prévot designaron al género como *Acinetobacter*, del griego ακινητος [akinetos] que significa inmóvil, para diferenciar los microorganismos móviles de los inmóviles.

El género *Acinetobacter* comprende cocobacilos Gram-negativos, aerobios estrictos, no fermentadores, catalasa positivos, oxidasa positivos e inmóviles. Los miembros de este género se clasifican en la familia *Moraxellaceae* dentro del orden *Gammaproteobacteria* (Peleg y cols. 2008).

En la actualidad se aceptan 33 genoespecies del género *Acinetobacter*, que han sido definidas por hibridación ADN-ADN. Prevalen en ambientes naturales, incluyendo suelos, agua dulce, océanos, sedimentos, la región polar, y los sitios contaminados con hidrocarburos (Jung and Park 2015). Tienen forma de varilla de 1-1.5 μ m de diámetro y 1.5-2.5 μ m de longitud, durante su fase rápida de crecimiento, pero luego se desarrollan en forma esférica durante la fase estacionaria (Almasaudi 2016).

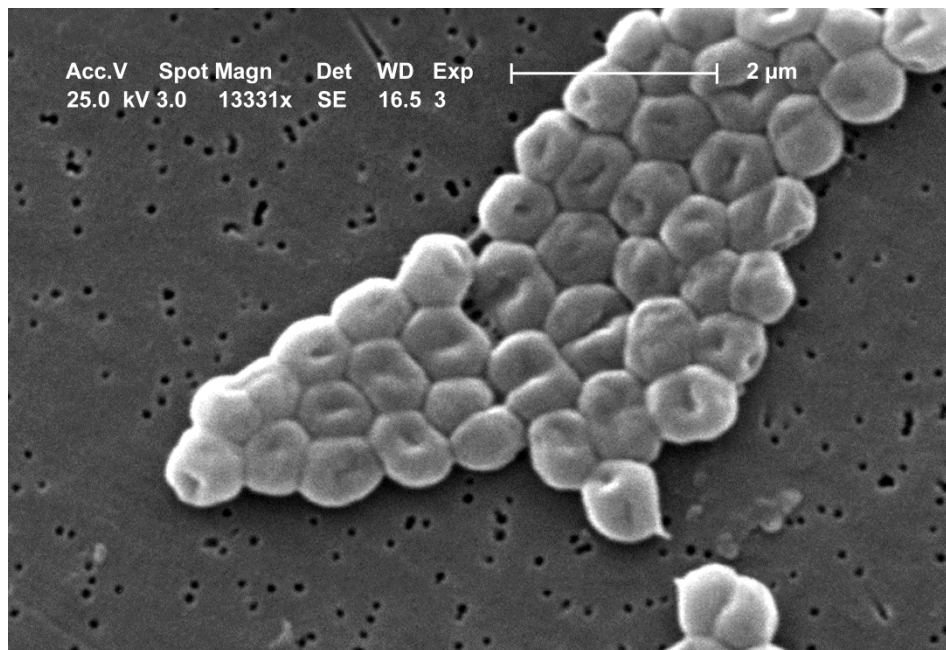


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido. Fuente: CDC's Public Health Image Library

La especie más representativa de *Acinetobacter* es *A. baumannii* (Figura 1), debido a que es típicamente un patógeno nosocomial, de elevada tasa de mortalidad, junto a otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., enterobacterias productoras de betalactamasas y *Pseudomonas aeruginosa*.

Acinetobacter baumannii se ha clasificado dentro de un complejo, llamado *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ABC), junto a otras tres especies, *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. calcoaceticus*, por ser altamente similares, lo que supone que la diferenciación de estas especies mediante técnicas moleculares y fenotípicas en laboratorios de diagnóstico rutinario sea difícil y se identifiquen erróneamente con frecuencia (Vanegas-Múnera y cols. 2014). Actualmente se utiliza una técnica de identificación de las especies del complejo ABC basada en la detección de genes por PCR.

Los genes que codifican oxacilinasas de origen natural, que son β -lactamasas de clase D, se han identificado en varias especies de *Acinetobacter*. El gen blaOXA-51-like es específico de *Acinetobacter baumannii*, por lo que se utiliza para llegar a una identificación exacta mediante PCR (Kamolvit y cols. 2014)

A. baumannii es un patógeno de ámbito hospitalario. Aunque se han descrito brotes en unidades médicas y quirúrgicas, la mayoría han tenido lugar en unidades de cuidados intensivos (UCI) y unidades de quemados (Elicer Cano y cols. 2008). *A. baumannii* causa una amplia gama de infecciones monomicrobianas y polimicrobianas, incluyendo bacteriemia, neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas profundas y osteomielitis. Este microorganismo tiene la capacidad de formar una biopelícula que le permite sobrevivir en el medio ambiente, superficies y objetos inanimados de ámbito hospitalario, lo que puede provocar una contaminación exógena a través de las manos de los profesionales (Mody y cols. 2015). También en sondas vesicales e intravenosas, material quirúrgico y equipos médicos, lo que supone un vehículo potencial para la transmisión endógena del microorganismo patógeno, ya que, *A. baumannii* pertenece a la flora normal de la piel y es un patógeno oportunista (Nurain y cols. 2015). Los factores de riesgo relacionados con su adquisición incluyen:

- Estancia hospitalaria prolongada.
- Empleo de maniobras invasoras como intervenciones quirúrgicas.
- Inmunosupresión.

- Enfermedad de base grave como cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), insuficiencia cardíaca y renal, presencia de heridas.
- Uso previo de antimicrobianos.

Por tanto, una de las medidas de control más importantes para prevenir brotes de *A. baumannii* es la higiene de manos y la necesidad de limpieza de alta calidad y desinfección de las habitaciones que han sido ocupadas por pacientes infectados, ya que, las superficies ambientales son un reservorio epidemiológicamente importante para este patógeno, sólo superada por las manos del personal sanitario (Caroline y cols. 2016). La expansión de *A. baumannii* al medio extrahospitalario es de escasa importancia (Eliecer Cano y cols. 2008).

Uno de los rasgos más importantes de *Acinetobacter baumannii* es su gran facilidad para desarrollar resistencias bacterianas. Así en la última década, la resistencia a antimicrobianos entre las diferentes especies de *Acinetobacter* se ha incrementado de manera sustancial, probablemente en relación a la relativa impermeabilidad de su membrana externa y la exposición ambiental a un amplio grupo de genes de resistencia (Maragakis y Perl 2008) En los diversos mecanismos de resistencia se incluyen: β -lactamasas, sobreexpresión de bombas de expulsión, pérdida de porinas y modificación del blanco de acción de los antibióticos. Éstos pueden ser intrínsecos o adquiridos.

Mecanismos de resistencia intrínsecos:

- Cefalosporinasa tipo AmpC no inducible denominada ADC, es el mecanismo de defensa más frecuente de esta bacteria a los β -lactámicos, que expresada a bajo nivel confiere resistencia a ampicilina pero sobreexpresada produce resistencia a cefalotina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, sin afectar carbapenémicos, ni cefepime.
- OXA-51, cuya expresión basal hidroliza débilmente penicilinas y carbapenémicos.

Mecanismos de resistencia adquiridos:

Resistencia a β -lactámicos que comprende mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

- Enzimáticos: Degradación de β -lactámicos por β -lactamasas de clase A, B o D, que están en elementos genéticos móviles por lo que el uso repetitivo de un

antibiótico puede llevar a la expresión de múltiples mecanismos de resistencia. Clase A son resistentes a penicilinas, clase B o metalo- β -lactamasas que no se inhiben por el ácido clavulánico ni tazobactam, y clase D u oxacilinasas.

- No enzimáticos:
 - Alteraciones de las proteínas de membrana externa (OMPs), que se asocian con la resistencia a meropenem e imipenem, la disminución de la permeabilidad de la membrana, lo que disminuye la entrada de colistina y β -lactámicos, y el cierre de porinas para imipenem.
 - Bombas de expulsión de β -lactámicos, aminoglicósidos, macrólidos, cloranfenicol, tigeciclina, tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim.
 - Carencia de las proteínas de unión a penicilinas que confiere resistencia a imipenem y meropenem.

También se han descrito mecanismos de resistencia a aminoglicósidos, quinolonas, polimixinas, tetraciclinas y glicinas, colistina, trimetropim, sulfonamidas y cloranfenicol (Vanegas-Múnera y cols. 2014).

Tabla 1. Mecanismos de resistencia de *A.baumannii* a antibióticos diferentes de los β -lactámicos (Vanegas-Múnera y cols. 2014)

Grupo de antibióticos	Mecanismo de resistencia	Variantes	Perfil de resistencia
Aminoglicósidos	Enzimas modificadoras de aminoglicósidos	AAC, ANT, APH	Variable
	Metilación 16S RNA	armA	Todos los aminoglicósidos
	Bombas de expulsión	AdeABC	Todos los aminoglicósidos
		AdeM	Gentamicina, kanamicina
Quinolonas	Mutación genética	gyrA, parC	Variable
	Bombas de expulsión	AdeABC	Todas las quinolonas
		AdeM	Variable

Tetraciclinas, glicilciclinas	Bombas de expulsión	Tet (A)	Tetraciclina, pero no minociclina
		Tet (B)	Tetraciclina, minociclina
		AdeABC	Tetracilinas, glicilciclinas
	Protección ribosomal	tet(M)	Tetraciclinas
Polimixinas	Modificación lípido A	pmrA,pmrB	Colistina
	Modificación porinas	OmpW	Colistina
Trimetoprim, sulfonamidas, Cloranfenicol	Alteración del blanco	sul	Sulfonamidas
		dnfr	Trimetoprim
	Bombas de expulsión	CraA	Cloranfenicol
		AdeABC	Trimetoprim, cloranfenicol

La resistencia de *A. baumannii* a múltiples fármacos supone un serio problema para el tratamiento de las infecciones causadas por ésta. Resulta ser un microorganismo panresistente, es decir, que no hay de momento ningún antibiótico capaz de tratar las infecciones causadas por éste,

Se ha llevado a cabo antibiogramas, con diferentes antimicrobianos, en muestras con microorganismos aislados de *A. baumannii* con la intención de encontrar algún antibiótico al que sea sensible, para así, poder establecer un tratamiento. Los aislados de *A. baumannii* mostraron una alta tasa de resistencia (94-100%) para todas las generaciones de cefalosporinas, penicilinas, imipenem y quinolonas, también para inhibidores de beta-lactamasas (89-96%), aminoglucósidos como la gentamicina y la tobramicina (87.9% y 76.7% respectivamente), y un grado variable de resistencia, según el país, para sulfametoxazol en combinación con trimetoprim. Tras los resultados se puede decir que *A. baumannii* es enormemente resistente a todos los antibióticos probados, excepto para colistina (1.7%) y minociclina (26.7%), que mostró tasas de resistencias relativamente bajas. Sin embargo, estas tasas varían según el país, debido a

la aparición de resistencias por el uso continuado de éstos como antimicrobianos (Batarseh y cols. 2015).

Tabla 2. Sensibilidad de *Acinetobacter baumannii* multirresistente aislada (n=116) a varios antibióticos probados (Batarseh y cols. 2015)

Variable	Nº de aislamientos	Sensibilidad (%)
Multirresistente ^a	90	77.6
Colistina + minociclina	37	31.9
Colistina + tobramicina	1	0.9
Colistina + sulfametoxazol/trimetoprim	12	10.3
Colistina + ampicilina/sulbactam	6	5.2
Colistina + ampicilina/sulbactam + sulfametoxazol/trimetoprim	2	1.7
Colistina + sulfametoxazol/trimetoprim + tobramicina	1	0.9
Colistina + minociclina + ampicilina/sulbactam	1	0.9
Colistina + minociclina + sulfametoxazol/trimetoprim	9	7.8
Colistina + minociclina + tetraciclina	10	8.6
Colistina + minociclina + tobramicina	2	1.7
Colistina + minociclina + tetraciclina + tobramicina + sulfametoxazol/trimetoprim	9	7.8
Panresistente ^b	10	8.6
No sensible a ningún antibiótico probado	2	1.7
Sensible sólo a colistina	8	6.9

^aResistentes a imipenem más 3 o más clases diferentes de antibióticos. ^bResistentes a todos los antibióticos probados o sólo sensible a colistina.

Aunque este estudio resulta esperanzador en cuanto a la sensibilidad de *Acinetobacter baumannii* frente a colistina, desafortunadamente en la actualidad, se ha informado en todo el mundo sobre la resistencia a la colistina. El mecanismo de resistencia no está claro aún pero algunos estudios confirman que podía estar relacionado con una pérdida de lipopolisacáridos (LPS) y/o el sistema PmrAB de dos componentes (Cai y cols. 2012).

2. ANTECEDENTES:

Debido a la multirresistencia de *Acinetobacter baumannii* a todos los antimicrobianos probados, es necesario buscar nuevas alternativas de tratamiento. Una de las vías a seguir es la terapia combinada.

Una estrategia para el restablecimiento de la eficacia de los antibióticos β -lactámicos fue el desarrollo de nuevos inhibidores de la β -lactamasa. Compuestos derivados del ácido borónico que sustituyen el anillo β -lactámico formando un enlace covalente reversible con la serina del sitio activo de β -lactamasas de clase A y C, asumiendo una geometría que se asemeja a la del estado de transición tetraédrico de la reacción hidrolítica β -lactamasa. Se diseñó un borato que contiene la cadena lateral R¹ de cefoperazona (**1**) (Drawz y cols. 2010). De esta forma se puede administrar conjuntamente con un β -lactámico permitiendo que cumpla su función sin ser hidrolizado.

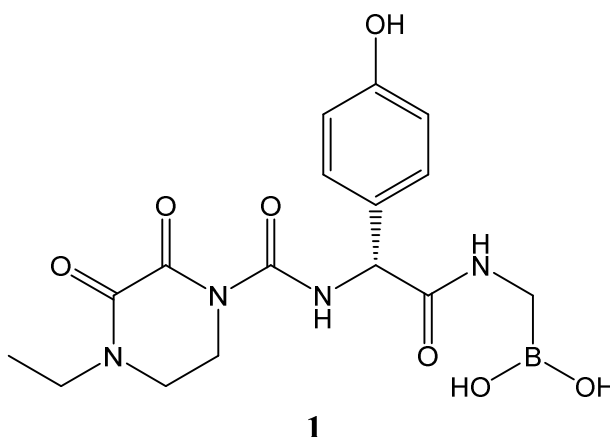


Figura 2. Estructura de análogo de Cefoperazona

Un segundo enfoque para contrarrestar la resistencia a antibióticos mediada por β -lactamasa fue el diseño de β -lactámicos resistentes a la hidrólisis. Se modificaron y sintetizaron derivados de carbapenems. Los más potentes son los derivados de tienamicina (es decir, imipenem (**2**), meropenem, ertapenem, y doripenem). Los carbapenems actúan como inhibidores de β -lactamasas de clase A, clase C, D (ADC) y otras mediante la formación de un intermedio acil-enzima β -lactamasa que se hidroliza muy lentamente. Por lo tanto, las enzimas de ADC β -lactamasas podrían servir como dianas importantes para el diseño de nuevos inhibidores (Drawz y cols. 2010).

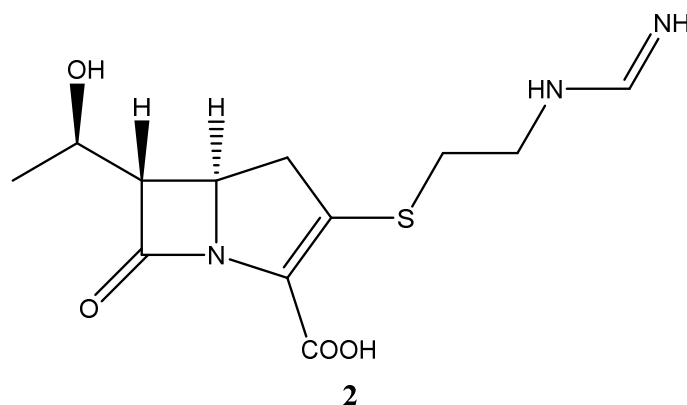


Figura 3. Estructura de Imipenem

Imipenem ha sido el tratamiento de primera línea en infecciones por *Acinetobacter baumannii* hasta que aparecieron casos de resistencias a carbapenems que han ido en aumento.

Se siguió desarrollando compuestos derivados del borónico, pero ahora, con enfoque a cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenems. Éstos se clasifican dentro de una familia llamada oxaboroles. GSK2251052 (**3**) es un compuesto que está siendo desarrollado por GlaxoSmithKline. Inhibe la leucil-ARNt sintetasa, una nueva diana en el campo de los antibacterianos, y por ello, la síntesis proteica (García-Sánchez y cols. 2012)

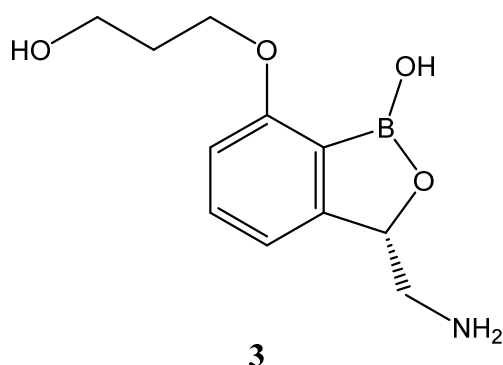
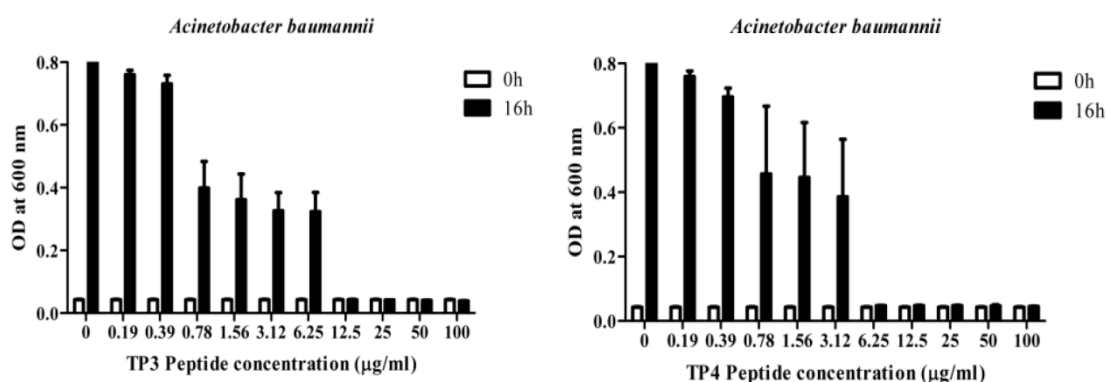


Figura 4. Estructura del compuesto GSK2251052

Se están investigando nuevos péptidos antimicrobianos (AMP) que muestran una buena actividad contra *A. baumannii* resistente a carbapenems, como por ejemplo, péptidos de la familia de las piscidinas: pleurocidina, moronecidina, dicentracina, epinecidina-1 y minixidina. Los AMP pueden ser naturales o sintéticos. Se han aislado varios AMP,

incluyendo cinco clones de ADNc de piscidinas del bazo de tilapia (*Oreochromis niloticus*); estos clones fueron nombrados tilapia piscidina 1 (TP1), TP2, TP3, TP4 y TP5. TP3 y TP4 exhibieron actividades antimicrobianas potentes y de amplio espectro. Estas características sugieren que TP3 y TP4 pueden ser adecuadas para el desarrollo como nuevos, agentes antimicrobianos administrados sistémicamente (Pan y cols. 2015).

Tabla 3. Inhibición del crecimiento dependiente de la dosis de los aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii* (SK44) resistente a carbapenems y por incubación con TP3 o TP4 para 16 h (Pan y cols. 2015).



Las barras de error representan la desviación típica (SD) y la densidad óptica (OD).

Se probó el efecto de TP3 y TP4 en ratones infectados con *Acinetobacter baumannii* (SK44) y aumentó significativamente la tasa de supervivencia en comparación con los controles no tratados o los ratones tratados con antibióticos. Por otra parte, reducen la carga bacteriana en la sangre y otros órganos. En cuanto a pruebas toxicológicas, TP3 y TP4 no afectó a los parámetros bioquímicos en ED50 o ED100. Por lo tanto, TP3 y TP4 son compuestos prometedores para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por *A.baumannii* (SK44) resistente a carbapenems (Pan y cols. 2015). Se sigue a la espera de más estudios.

BAL30072 (**4**) es un nuevo antibiótico monocíclico β -lactámico. Actualmente está en la Fase I de ensayos clínicos. Tiene una potente actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias Gram-negativas, entre ellas cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenems. Es un monosulfactam, un sideróforo análogo al tigemonam, que inhibe la síntesis del peptidoglicano. Actualmente es estable frente a la mayoría de carbapenemasas (Bassetti y cols. 2013).

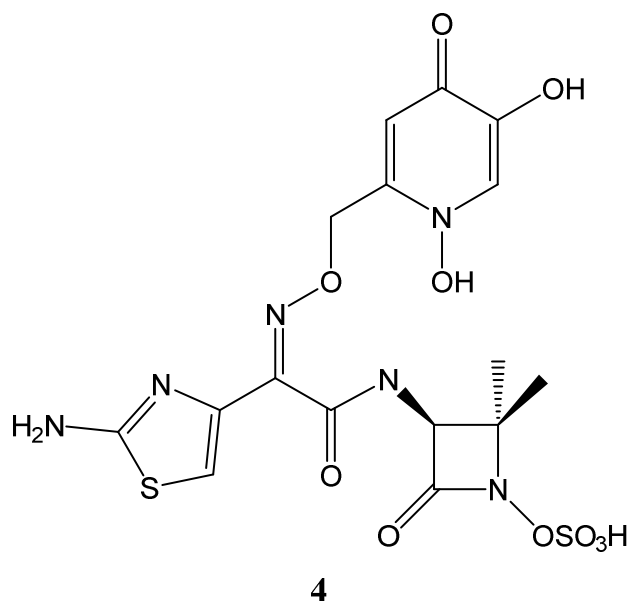


Figura 5. Estructura del compuesto BAL30072

Eravaciclina (**5**) es una nueva fluorociclina de vía oral e intravenosa similar a la tigeciclina. Que se pueda administrar vía oral permite su uso más allá del ámbito hospitalario. Tiene actividad de amplio espectro contra todas las bacterias Gram-negativas, incluyendo patógenos multirresistentes emergentes como *A. baumannii*, además, es de dos a ocho veces más activa que la tigeciclina. Eravaciclina ha tenido muy buenos resultados en las tres fases de ensayos clínicos, sólo falta comprobar el perfil de acontecimientos adversos y las interacciones con otros medicamentos. Por todo esto, eravaciclina parece ser un antimicrobiano prometedor (Zhanel y cols. 2016).

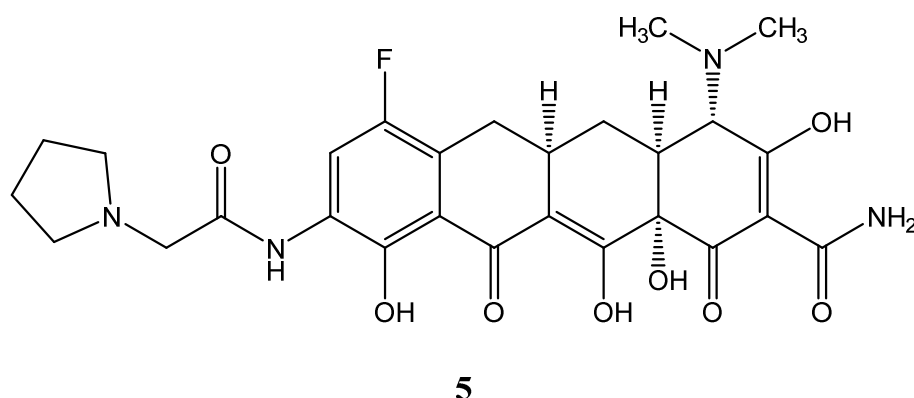


Figura 6. Estructura de Eravaciclina

Un enfoque alternativo para sacar a la luz nuevos antibacterianos, que está atrayendo una atención más reciente, es la selección de bibliotecas de medicamentos aprobados para otras patologías (o medicamentos que llegaron a ensayos clínicos, pero al final no pudieron recibir la aprobación regulatoria) con el fin de reutilizarlos como antimicrobianos.

La auranofina (**6**) es un medicamento aprobado inicialmente para el tratamiento de la artritis reumatoide. Se ha descubierto que presenta una potente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas multirresistentes. En el caso de las Gram-negativas, la actividad se ve disminuida con respecto a las Gram-positivas, debido a la existencia de la membrana externa de Gram-negativas, lo que dificulta la entrada de la auranofina en la célula bacteriana. Se incluyó un agente permeabilizante de membrana como el nonapéptido polimixina B (PMBN) con auranofina y se exhibió una potente actividad contra todas las cepas ensayadas de patógenos Gram-negativos incluyendo *A. baumannii*, que es extremadamente resistente a fármacos (Thangamani y cols. 2016). Por lo que la auranofina puede resultar ser un gran antimicrobiano, pero necesita la administración conjunta de un permeabilizante de la membrana externa de patógenos Gram-negativos.

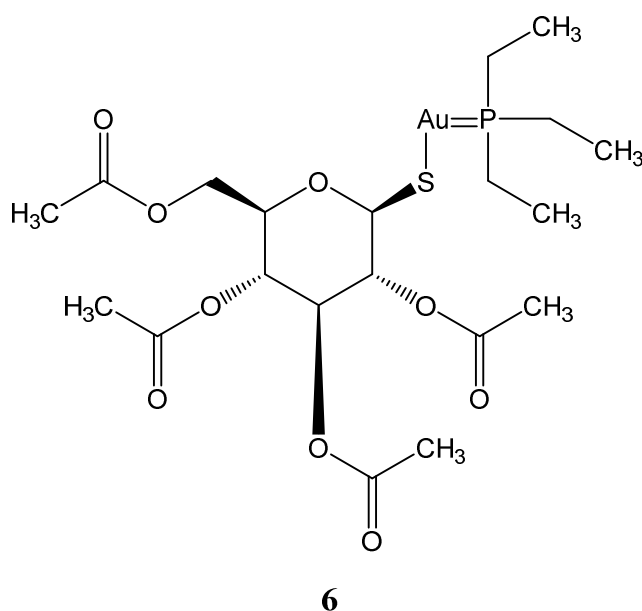


Figura 7. Estructura de auranofina

En cualquier caso, las bacterias no van a dejar de hacerse resistentes y sigue siendo un objetivo prioritario en investigación en química médica la búsqueda de nuevas estructuras que sean potentes y eficaces antibacterianos.

En este contexto donde se enmarca el trabajo que viene haciendo el grupo de investigación en el seno del cual se ha realizado este trabajo de Fin de Grado, en colaboración con el grupo de la Dra. Pachón Ibáñez, (grupo de Enfermedades Infecciosas) del Instituto de Biomedicina de Sevilla. Se había sometido a evaluación de la actividad *in vitro* una colección de 61 compuestos con diferentes estructuras, contra diferentes cepas clínicas resistentes a colistina, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*; encontrando actividad frente a dos cepas de *A. baumannii*, en dos de los compuestos testados, a los cuales se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) así como la Concentración Citotóxica 50 (CC₅₀), no siendo tóxicos. Uno de ellos es el compuesto **7**, un éster sulfónico derivado del 3-amino-1,2-propanodiol, donde el grupo amino está funcionalizado con una urea (Figura 8) y que es el prototipo en base al cual se han diseñado los nuevos análogos, trabajo que se presenta en esta memoria. Los datos de actividad biológica para el compuesto **7** se recogen en la Tabla 4.

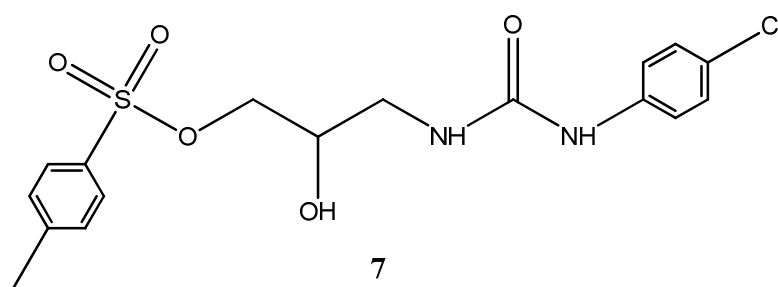


Figura 8. Estructura del prototipo

Tabla 4. CMI, CMB y citotoxicidad para el compuesto **7**

Cepa A.b.21R		Cepa A.b.22P		CC ₅₀ (μM)
CMI (μM)	CMB (μM)	CMI (μM)	CMB (μM)	
35	45	30	45	100,2

3. OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado se enmarca en esa línea de investigación centrada en la búsqueda y preparación de nuevos compuestos con potencial actividad biológica, y en concreto en este trabajo, actividad contra *Acinetobacter baumannii*. Para la consecución de este objetivo global se plantearon varios objetivos parciales.

1) **Diseño de nuevos compuestos.** Plantear, en base a la estructura del prototipo detectado en un screening preliminar (compuesto **7**), el diseño de una pequeña colección de compuestos, diferentes pero relacionados estructuralmente. Se realizará por generaciones de forma que el estudio de cada generación permita analizar las relaciones estructura actividad, y por tanto, qué rasgos estructurales deben ser mantenidos en la siguiente generación de compuestos, con objeto de potenciar la actividad biológica.

2) **Síntesis de los nuevos compuestos diseñados.** Emplear una metodología sintética sencilla y corta que transcurra con altos rendimientos y que permita obtener en pocos pasos una pequeña colección de compuestos análogos al prototipo.

3) **Análisis estructural de los nuevos compuestos.** Los nuevos compuestos obtenidos serán sometidos a los correspondientes estudios que permitan confirmar la estructura propuesta. En concreto se realizarán sus espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear. Para la realización de estos estudios se contará con la colaboración de los Servicios de Espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear, respectivamente, del CITIUS de la Universidad de Sevilla.

4) **Evaluación *in vitro* de la actividad biológica.** Se realizará un screening preliminar en los compuestos de la primera generación que evalúe la inhibición del crecimiento bacteriano frente a cepas de *Acinetobacter baumannii* y para aquellos compuestos que se detecte actividad se determinará la CMI.

5) **Establecimiento de relaciones estructura actividad.** En base a los resultados de actividad de la primera generación se diseñarán nuevos análogos potencialmente activos (2ª generación de compuestos).

4. METODOLOGÍA

4.1 Métodos generales

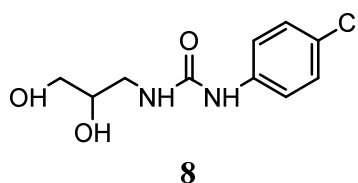
Todos los reactivos, disolventes y materiales de partida fueron obtenidos a partir de proveedores comerciales y usados directamente sin previa purificación. Las evaporaciones fueron realizadas a presión reducida en rotavapor. Las reacciones fueron monitorizadas por cromatografía en capa fina (TLC) en soportes de aluminio Kieselgel 60 F254 y detector UV para su visualización. La cromatografía en columna fue realizada en Silica Gel 60. Los rendimientos obtenidos proceden de los productos purificados. Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Stuart Melting Point SMP 10 y están sin corregir. Los espectros de masas (MS) fueron registrados en un espectrómetro de masas Micromass AUTOSPECQ mediante las técnicas de ionización química (CI) a 150 eV y bombardeo de átomos rápidos (FAB) usando una matriz de tioglicerol. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron con una resolución de 10.000. Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) fueron realizados a 25 °C en un espectrómetro Bruker AV500 a 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . Los desplazamientos químicos están expresados en ppm en la escala relativa al tetrametilsilano (TMS). Los experimentos COSY, DEPT, HSQC y NOESY fueron realizados con objeto de asignar las señales en el espectro de NMR.

4.2 Procedimiento para la obtención de las ureas derivadas de 3-aminopropanol y de 3-amino-1,2 propanodiol

A una disolución de 3-amino-1-propanol (3,6 mmol) en diclorometano seco (20 mL) se adiciona el isocianato correspondiente (3,0 mmol), apareciendo al instante un precipitado blanco que se aísla por filtración a vacío.

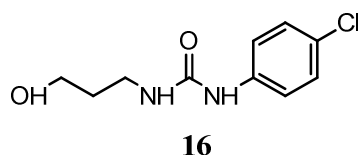
A una disolución del isocianato correspondiente (3,6 mmol) en diclorometano seco (20 ml) se le adiciona gota a gota una disolución de 3-amino-1,2 propanodiol (3 mmol) en metanol (1mL), precipitando al instante el producto buscado que se aísla por filtración a vacío.

4.2.1 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-2,3-dihidroxiopropilurea (8)



Se obtuvo el producto como un sólido puro mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (30:1) como eluyente (0,6 g; 85% rendimiento). MS (FAB): m/z 267 (100%) $[M+Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,76 (s, 1H), 7,37-7,35 (m, 2H), 7,25-7,23 (m, 2H), 6,19 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 5,01 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 4,82 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 3,56-3,50 (m, 2H), 3,38-3,30 (m, 2H), 3,03-2,98 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 155,6, 139,1, 128,4, 124,8, 119,4, 70,5, 63,5, 42,4. HRMS (m/z): calcd. para $C_{10}H_{13}ClN_2O_3Na$ 267,0507 $[M+Na]^+$; encontrado 267,0501. Anal. calcd para $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$: C, 49,09; H, 5,36; N, 11,45. Encontrado: C, 49,51; H, 5,66; N, 11,34.

4.2.2 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-3-hidroxiopropilurea (16)

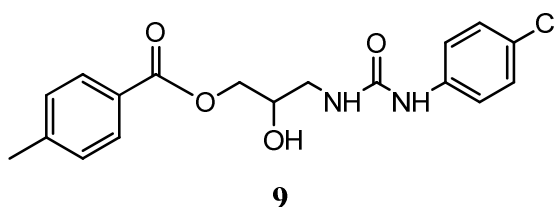


Se obtuvo el producto como un sólido cromatográficamente puro. (0,7g; 95% rendimiento). MS (CI): m/z 251 (100%) $[M+Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,59 (s, 1H), 7,44-7,41 (m, 2H), 7,27-7,24 (m, 2H), 6,16 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H), 4,48 (t, $J = 5,1$ Hz, 1H), 3,47 (dd, $J = 6,2$ Hz, $J = 11,3$ Hz, 2H), 3,16 (dd, $J = 6,0$ Hz, $J = 12,1$ Hz, 2H), 1,62-1,57 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 155,1, 139,6, 128,4, 124,3, 119,0, 58,6, 36,5, 32,8. HRMS (m/z): calcd. para $C_{10}H_{13}ClN_2O_2Na$ 251,0558 $[M+Na]^+$; encontrado 251,0550. Anal. Calcd para $C_{10}H_{13}ClN_2O_2$: C, 52,52; H, 5,73; N, 12,25. Encontrado: C, 52,93; H, 5,85; N, 12,13.

4.3 Reacción de monoacilación regioselectiva de la urea derivada del 3-amino-1,2-propanodiol (8)

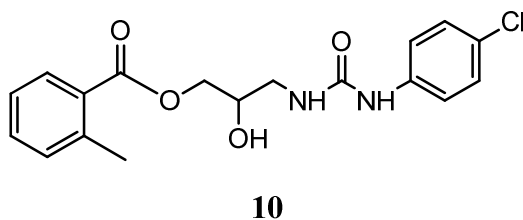
A una disolución enfriada en un baño de agua-hielo de **8** (0,5 mmol) en diclorometano seco (20 ml) y piridina (0,5 mmol) se le añade gota a gota el correspondiente cloruro de acilo (0,4 mmol) disuelto en diclorometano (5 mL). La reacción se deja evolucionar a temperatura ambiente y se procesa cuando la cromatografía en capa fina indica que todo el producto de partida ha reaccionado. La mezcla de reacción se procesa evaporando a sequedad y coevaporando con tolueno para eliminar restos de piridina. El producto se purifica por cromatografía en columna.

4.3.1 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-[2-hidroxi-3-(4-metilbenzoiloxi)propil]urea (**9**)



Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (50:1) como eluyente (90 mg; 63% rendimiento); MS (FAB): m/z 385 (100%) $[M+Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,73, (s, 1H), 7,92-7,84 (m, 4H), 7,43-7,26 (m, 4H), 6,32 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23-4,17 (m, 2H), 3,97-3,86 (m, 2H), 3,22-3,16 (m, 2H), 2,39, 2,38 (2s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 155,2, 143,6, 139,5, 129,3, 129,2, 129,1, 128,5, 127,0, 124,4 119,0, 67,6, 66,4, 42,2, 21,1. Anal. Calcd para $C_{18}H_{19}ClN_2O_4$: C, 59,59; H, 5,28; N, 7,72. Encontrado: C, 60,14; H, 5,53; N, 8,15.

4.3.2 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-[2-hidroxi-3-(2-metilbenzoiloxi)propil]urea (**10**)

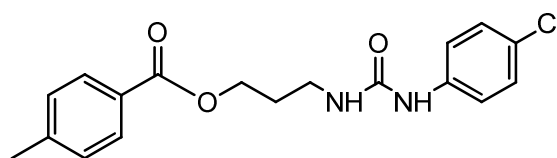


Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (60:1) como eluyente (83 mg; 57% rendimiento); MS (FAB): m/z 385 (100%) $[M+Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,73, (s, 1H), 7,91-7,83 (m, 1H), 7,51-7,46 (m, 1H), 7,43-7,40 (m, 2H), 7,35-7,30 (m, 2H), 7,28-7,25 (m, 2H), 6,34-6,29 (m, 1H), 5,33-5,32 (m, 1H), 4,24-4,18 (m, 2H), 3,92-3,87 (m, 1H), 3,65-3,52 (m, 1H), 3,21-3,16 (m, 1H), 2,54 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 155,2, 139,4 139,0, 132,1, 131,5, 130,2 129,5, 128,4, 125,9, 124,4 119,2, 74,4, 67,6, 66,4, 60,6, 42,3, 21,1. HRMS (m/z): calcd. para $C_{18}H_{19}ClN_2O_4Na$ 385,0926 $[M+Na]^+$; encontrado 385,0922.

4.4 Reacción de acilación de la urea derivada del 3-amino-1-propanol (16)

A una disolución de **16** (0,5 mmol) en diclorometano seco (25 mL) y 4-dimetilaminopiridina (0,78 mmol, 1,5 eq) se le añade el correspondiente cloruro de acilo (0,62 mmol, 1,2 eq). La reacción se deja estar hasta que la cromatografía en capa fina indica que todo el producto de partida ha reaccionado. La mezcla de reacción se procesa evaporando a sequedad. El producto se purifica por cromatografía en columna.

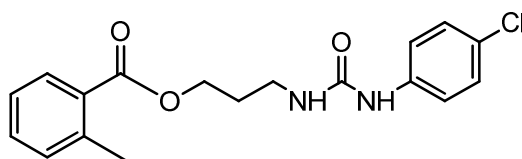
4.4.1 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-[3-(4-metilbenzoiloxi)propil]urea (17)



17

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (35:1) como eluyente (140 mg; 79% rendimiento). MS (CI): m/z 369 (100%) $[M+Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,61 (s, 1H), 7,89-7,87 (m, 2H), 7,43-7,41 (m, 2H), 7,34-7,32 (m, 2H), 7,27-7,24 (m, 2H), 6,30 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,31 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,26 (dd, $J = 6,4$ Hz, $J = 12,6$ Hz, 2H), 2,39 (s, 3H), 1,92-1,87 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 155,1, 143,5, 139,5, 129,2, 129,1, 127,1, 124,4, 119,1, 62,4, 36,1, 29,0, 21,1. HRMS (m/z): calcd. para $C_{18}H_{19}ClN_2O_3Na$ 369,0976 $[M+Na]^+$; encontrado 369,0971. Anal. Calcd para $C_{18}H_{19}ClN_2O_3$: C, 62,34; H, 5,52; N, 8,08. Encontrado: C, 62,53; H, 5,38; N, 7,86.

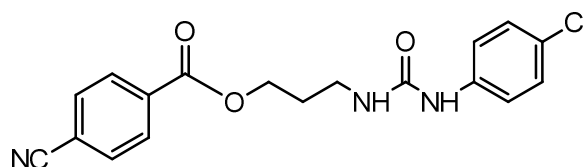
4.4.2 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-[3-(2-metilbenzoiloxi)propil]urea (18)



18

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (35:1) como eluyente (160 mg; 88% rendimiento). MS (CI): m/z 380(100%) $[M+Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,61 (s, 1H), 7,86-7,82 (m, 1H), 7,50-7,47 (m, 1H), 7,44-7,42 (m, 2H), 7,34-7,30 (m, 2H), 7,27-7,25 (m, 2H), 6,31 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H), 4,30 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,28-3,24 (m, 2H), 2,54 (s, 3H), 1,92-1,87 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 167,0, 155,1, 139,5, 138,9, 132,0, 131,6, 130,0, 129,6, 128,4, 125,9, 124,4, 119,1, 62,3, 36,1, 29,0, 21,1. HRMS (m/z): calcd. para $C_{18}H_{16}ClN_3O_3Na$ 380,0072 $[M+Na]^+$; encontrado 380,0070. Anal. Calcd para $C_{18}H_{19}ClN_2O_3$: C, 60,42; H, 4,51; N, 11,74. Encontrado: C, 60,56; H, 4,95; N, 11,18.

4.4.3 *N*-[3-(4-Cianobenzoiloxi)propil]-*N'*-(4-clorofenil)urea (19)



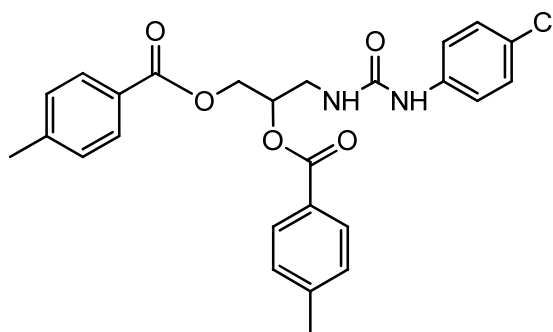
19

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (35:1) como eluyente (160 mg; 93% rendimiento). MS (CI): m/z 369 (100%) $[M+Na]^+$; 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,59 (s, 1H), 8,13-8,11 (m, 2H), 8,01-7,99 (m, 2H), 7,42-7,39 (m, 2H), 7,36-7,30 (m, 2H), 6,30 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,37 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,29-3,25 (m, 2H), 1,95-1,89 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164,6, 155,1, 139,4, 133,7, 132,7, 129,8, 128,4, 124,4, 119,1, 118,0, 115,4, 63,4, 36,0, 28,9, 26,8. HRMS (m/z): calcd. para $C_{18}H_{19}ClN_2O_3Na$ 369,0976 $[M+Na]^+$; encontrado 369,0972. Anal. Calcd para $C_{18}H_{19}ClN_2O_3$: C, 62,34; H, 5,52; N, 8,08. Encontrado: C, 62,28; H, 5,47; N, 7,65.

4.5 Reacción de diacilación de la urea derivada del 3-amino-1,2-propanodiol (**8**)

A una disolución de **8** (0,5 mmol) en diclorometano seco (25 mL) y 4-dimetilaminopiridina (1,25 mmol, 2,5 eq) se le añade el correspondiente cloruro de acilo (1,1 mmol, 2,2 eq). La reacción se deja estar hasta que la cromatografía en capa fina indica que todo el producto de partida ha reaccionado. La mezcla de reacción se procesa lavando con HCl (2 x 20 mL), HCO₃Na (2 x 20 mL) y disolución saturada de sal (20 mL). Se seca sobre Na₂SO₄, filtra y evapora a sequedad. El producto se purifica por cromatografía en columna.

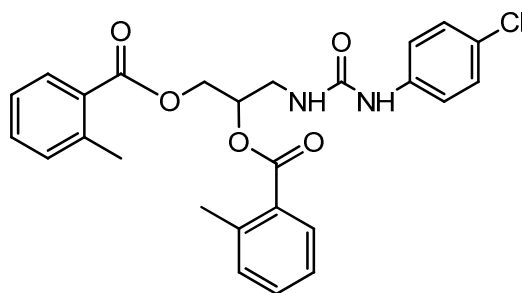
4.5.1 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-[2,3-di-(4-metilbenzoiloxi)propil]urea (**11**)



11

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (70:1) como eluyente (205 mg; 85% rendimiento); MS (FAB): m/z 503 (100%) [M+Na]⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,72, (s, 1H), 7,89-7,87 (m, 2H), 7,83-7,81 (m, 2H), 7,42-7,40 (m, 2H), 7,33-7,29 (m, 4H), 7,27-7,25 (m, 4H), 6,28 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 5,46-5,41 (m, 1H), 4,61 (dd, J = 4,1 Hz, J = 12,0 Hz, 1H), 4,46 (dd, J = 6,0 Hz, J = 11,6 Hz, 1H), 3,62-3,54 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,37 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,4, 165,2, 155,1, 143,8, 143,6, 139,3, 129,4, 129,3, 129,2, 129,1, 128,4, 126,8, 126,6, 124,4 119,2, 71,3, 65,7, 30,7, 21,2, 21,1. Anal. Calcd para C₂₆H₂₅ClN₂O₅: C, 64,93; H, 5,24; N, 5,82. Encontrado: C, 64,82; H, 5,76; N, 5,74.

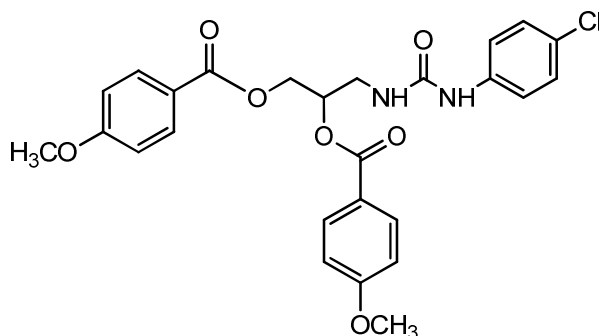
4.5.2 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-[2,3-di-(2-metilbenzoiloxi)propil]urea (12)



12

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (80:1) como eluyente (216 mg; 90% rendimiento); MS (FAB): m/z 503 (100%) $[M+Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,72, (s, 1H), 7,88-7,86 (m, 1H), 7,83-7,81 (m, 1H), 7,50-7,46 (m, 2H), 7,43-7,41 (m, 2H), 7,43-7,27 (m, 6H), 6,48 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 5,50-5,45 (m, 1H), 4,63 (dd, $J = 3,4$ Hz, $J = 12,0$ Hz, 1H), 4,48 (dd, $J = 6,5$ Hz, $J = 12,0$ Hz, 1H), 3,64-3,55 (m, 2H), 2,49 (s, 3H), 2,48 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 167,0, 166,8, 155,6, 139,8, 139,7, 139,6, 132,8, 132,7, 132,1, 132,0, 130,7, 130,6, 129,9, 129,5, 128,9, 126,5, 126,3, 125,2, 119,8, 71,8, 64,1, 31,2, 21,5, 21,4. Anal. Calcd para $C_{26}H_{25}ClN_2O_5$: C, 64,93; H, 5,24; N, 5,82. Encontrado: C, 64,75; H, 5,58; N, 5,60.

4.5.3 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-[2,3-di-(4-metoxibenzoiloxi)propil]urea (13)

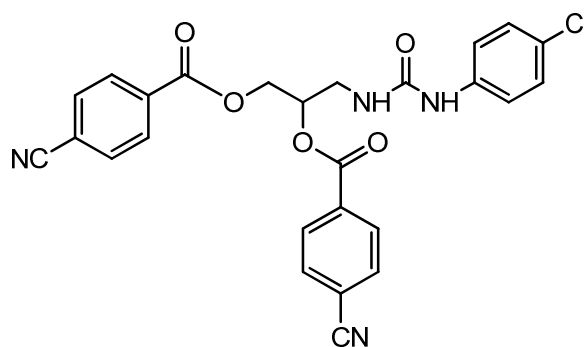


13

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (120:1) como eluyente (190 mg; 74% rendimiento); MS (FAB): m/z 535 (100%) $[M+Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,71, (s, 1H), 7,96-7,94 (m, 2H), 7,90-7,88 (m, 2H), 7,44-7,42 (m, 2H), 7,27-7,25 (m, 2H), 7,04-7,01 (m, 4H), 6,48 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 5,45-5,41 (m, 1H), 4,59 (dd, $J = 3,5$ Hz, $J = 12,1$ Hz, 1H), 4,46

(dd, $J = 6,7$ Hz, $J = 11,8$ Hz, 1H), 3,63-3,55 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,82 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 165,1, 165,0, 163,3, 163,2, 155,1, 139,3, 131,4, 131,3, 128,4, 124,7, 121,8, 121,5, 119,2, 114,0, 113,9, 71,2, 63,4, 55,5, 55,4, 31,2, 21,5, 21,4. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_7\text{Na}$ 535,1242 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; encontrado 535,1247.

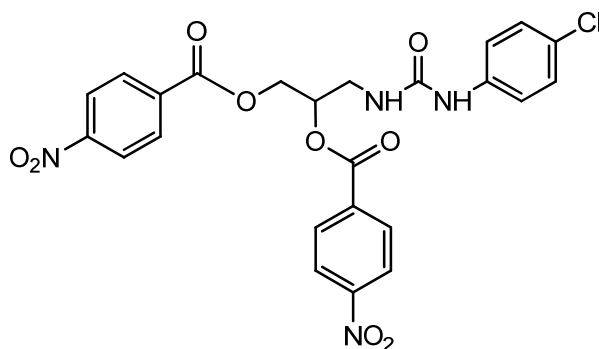
4.5.4 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-[2,3-di-(4-cianobenzoiloxi)propil]urea (14)



14

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (120:1) como eluyente (150 mg; 60% rendimiento); MS (FAB): m/z 525 (100%) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,70, (s, 1H), 8,13-8,12 (m, 2H), 8,08-8,06 (m, 2H), 8,01-7,99 (m, 4H), 7,40-7,38 (m, 2H), 7,26-7,23 (m, 2H), 6,51 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 5,50-5,47 (m, 1H), 4,70 (dd, $J = 3,3$ Hz, $J = 12,4$ Hz, 1H), 4,56 (dd, $J = 6,6$ Hz, $J = 12,0$ Hz, 1H), 3,67-3,60 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,82 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164,3, 164,2, 155,2, 139,2, 133,5, 133,2, 132,8, 132,7, 129,9, 129,8, 128,4, 124,7, 119,3, 118,0, 117,9, 115,6, 72,3, 64,3. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{Na}$ 525,0936 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; encontrado 525,0933. Anal. Calcd para $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{ClN}_4\text{O}_5$: C, 62,09; H, 3,82; N, 11,14. Encontrado: C, 62,25; H, 3,81; N, 11,00.

4.5.5 *N*-(4-Clorofenil)-*N'*-[2,3-di-(4-nitrobenzoiloxi)propil]urea (15)



15

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (100:1) como eluyente (244 mg; 90% rendimiento); MS (FAB): m/z 565 (100%) $[M+Na]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,70, (s, 1H), 8,35-8,33 (m, 4H), 8,23-8,21 (m, 2H), 8,18-8,16 (m, 2H), 7,41-7,38 (m, 2H), 7,26-7,23 (m, 2H), 6,53 (t, $J = 6,01$ Hz, 1H), 5,55-5,51 (m, 1H), 4,74 (dd, $J = 3,3$ Hz, $J = 12,2$ Hz, 1H), 4,60 (dd, $J = 6,7$ Hz, $J = 12,2$ Hz, 1H), 3,70-3,60 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164,1, 163,0, 155,2, 150,4, 150,3, 139,2, 134,9, 134,7, 130,8, 130,6, 128,4, 124,7, 123,9, 123,8, 119,2, 72,5, 64,4.

4.6 Evaluación de la actividad biológica

4.6.1. Screening preliminar. Evaluación de la inhibición del crecimiento bacteriano

Se usó una concentración final de 50 μ M para cada compuesto junto a una concentración de 5×10^5 UFC/ml de cada cepa de *A. baumannii* en placas de 96 pocillos. Estas placas fueron incubadas durante 18 horas a 37°C. Se consideró un resultado positivo valores < 50 μ M.

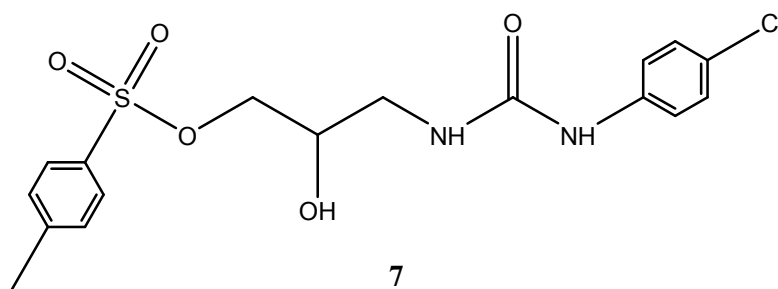
4.6.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Microdilución en caldo Müeller Hinton Broth II (MHBI). Esta técnica se llevó a cabo en aquellos derivados de piperazinas que presentaron actividad inhibitoria en el primer estudio.

Se usaron concentraciones decrecientes de los compuestos estudiados (50 μ M-0,05 μ M) y una concentración de 5×10^5 UFC/ml de cada cepa de *A. baumannii* en placas de 96 pocillos. Estas placas fueron incubadas durante 18 horas a 37°C.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este Trabajo de Fin de Grado se ha dirigido a realizar modificaciones en el prototipo detectado en un screening preliminar de una colección de 61 compuestos que ha sintetizado el grupo de investigación del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla, buscando nuevas estructuras que sean activas contra *Acinetobacter baumannii*.

La estructura del prototipo es:



En este compuesto existen tres puntos de posible variabilidad estructural a la hora de diseñar análogos (Figura 9):

- la función éster sulfónico
- el esqueleto central de 3-amino-1,2-propanodiol
- la función urea así como la naturaleza electrónica del sustituyente o sustituyentes que porta el anillo aromático de la función urea y su posición.

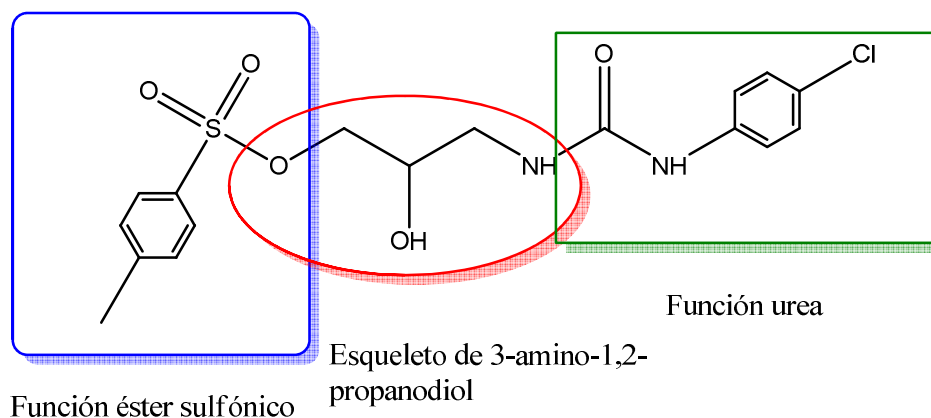


Figura 9. Puntos de variabilidad estructural en el prototipo

5.1 Primera generación de compuestos. Diseño, síntesis y evaluación biológica

El punto de variabilidad escogido para generar la primera familia de derivados es la función éster y las modificaciones realizadas han sido:

- 1) reemplazar el éster sulfónico por un éster carboxílico
- 2) emplear para ello cloruros de acilo diferentemente sustituidos en el anillo aromático
- 3) y obtener también los derivados diacilados, de forma que se funcionalice también el hidroxilo secundario.

La Figura 10 muestra las estructuras generales de los compuestos que forman esta familia así como el análisis retrosintético planteado para la preparación de los nuevos compuestos.

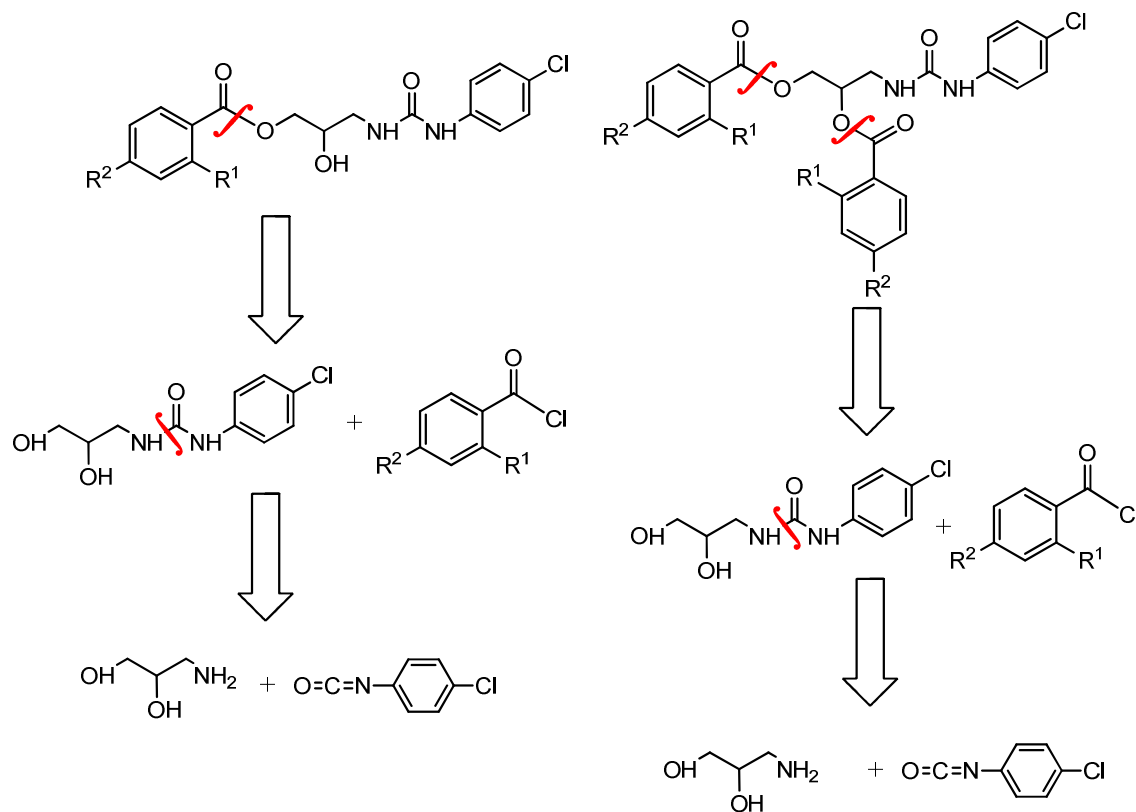
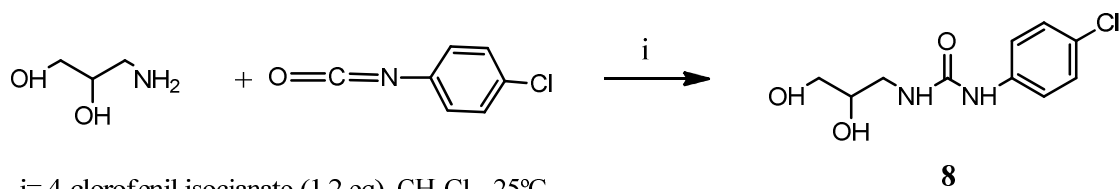


Figura 10. Primera familia. Estructura general y análisis retrosintético

La obtención de los nuevos derivados se llevó a cabo mediante una metodología sintética corta constituida por reacciones químicas sencillas que transcurren con elevado rendimiento.

A partir del producto de partida comercial 3-amino-1,2-propanodiol se sintetizó el compuesto **8** por reacción con 4-clorofenilisocianato (Esquema 1).



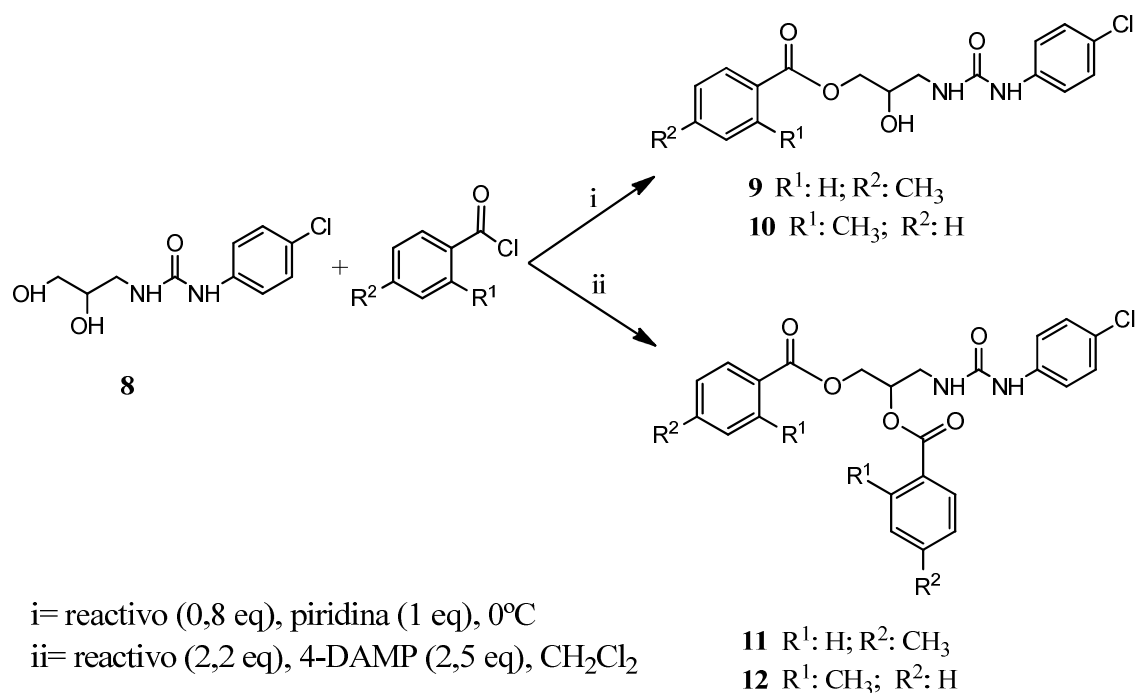
i= 4-clorofenil isocianato (1,2 eq), CH₂Cl₂, 25°C

Esquema 1.

En el espectro de ¹H NMR del compuesto **8** se destaca a 8,76 ppm la señal atribuida al protón del nitrógeno ureídico contiguo al anillo aromático y a 6,30 ppm el del otro nitrógeno, el contiguo a la cadena alifática; y entre 7,3-7,2 ppm las debidas a los protones aromáticos. En el espectro de ¹³C NMR aparece a 155 ppm la señal del carbonilo de la urea y entre 139-112 ppm las de los carbonos del anillo aromático.

El compuesto **8** se empleó como precursor para la síntesis de los compuestos de la 1ª familia presentada en el Figura 10. Se realizó la reacción de monoacilación selectiva del hidroxilo primario controlando la proporción de reactivo (0,8 equivalentes de cloruro de acilo), la velocidad de adición, la base empleada (piridina) así como la temperatura. Se han sintetizado los compuestos **9** y **10**. El compuesto **10** es un análogo al **9** en el que el grupo metilo se encuentra en posición *orto*.

La reacción empleando 2,5 equivalentes del cloruro de acilo y 4-dimetilaminopiridina como base proporcionó los derivados diacilados **11** y **12** (Esquema 2).



i= reactivo (0,8 eq), piridina (1 eq), 0°C

ii= reactivo (2,2 eq), 4-DAMP (2,5 eq), CH₂Cl₂

Esquema 2.

De igual forma que en los derivados monoacilados, el compuesto **12** es el análogo a **11** con el grupo metilo en posición *orto*.

En el espectro de ¹H-RMN de estos compuesto **9-12** se destaca en torno a 8 ppm las señales de los protones de los anillos aromáticos introducidos y las señales de los metilo en este anillo a 2,3 ppm. En el espectro de ¹³C-RMN destacar a 165 ppm una nueva señal debida al carbonilo del éster así como a 21 ppm asignada ésta a los grupos metilo en el anillo.

Para evaluar la actividad biológica se realizó en primer lugar un screening preliminar frente a diferentes cepas de *A. baumannii* (Tabla 5). Se evaluó también el compuesto **8**.

Tabla 5. Screening preliminar (µM)

		<i>Acinetobacter baumannii</i>													
Compuestos	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	Ab	
	1	10	11	14	16	17	19	20	21R	22P	24	99	113	1327	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	< 50	< 50	< 50	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	< 50	< 50	< 50	-	-	-	
11	-	-	-	-	-	-	-	-	< 50	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	< 50	< 50	-	-	-	-	

Se considera que hay inhibición del crecimiento con valores < 50 µM. El precursor **8** no es seleccionado por no detectarse actividad biológica.

En esos casos se determinó la CMI frente a las cepas correspondientes y se compara con los datos del prototipo frente a esas cepas (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria (MCI, μM)

Compuestos	<i>Acinetobacter baumannii</i>		
	Ab 21R	Ab 22P	Ab 24
Prototipo	35	30	-
9	25	> 50	> 50
10	25	> 50	> 50
11	3,12	-	-
12	1,56	3,12	-

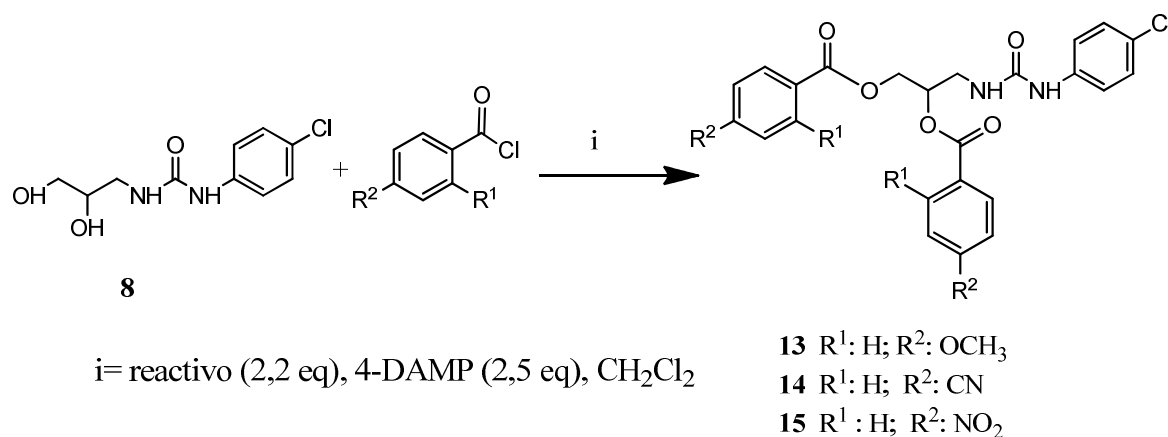
De estos resultados se observó que los compuestos **9** y **10**, monoésteres carboxílicos análogos al prototipo no han ofrecido un mejor perfil de actividad. Sin embargo, los dos derivados diacilados, **11** y **12** (*orto*-metilo) tienen un valor bastante mejor de CMI, destacando el compuesto **12** frente a la cepa AB 21R con un valor de **1,56** μM .

5.2 Segunda generación de compuestos. Diseño y síntesis.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la 1ª Generación, los compuestos que presentaron mejor perfil de actividad fueron los diésteres **11** y **12**, y por ello se escogió su estructura como modelo para plantear la segunda familia. Disponíamos de un nuevo esqueleto para poder generar análogos con objeto de introducir cambios.

La modificación que se realizó entonces fue en relación al sustituyente en el anillo aromático de la función éster, de forma que van a ser ahora grupos tanto electrón donadores como electrón atrayentes con objeto de poder estudiar en qué medida las propiedades electrónicas de esos grupos podrían influir en la actividad.

En las mismas condiciones de reacción, a partir del compuesto **8** se obtienen los compuestos **13-15** con grupos metoxilo (electrón donador), ciano y nitro (electrón atrayentes) respectivamente, en posición *para* de los anillos aromáticos de los dos ésteres (Esquema 3).

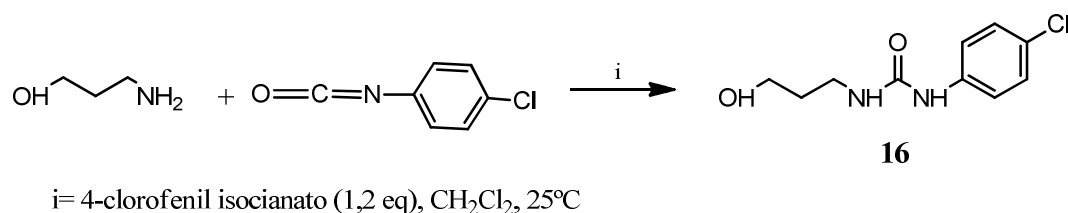


Esquema 3.

La evaluación de la actividad biológica de los compuestos **13-15** permitirá conocer qué propiedades electrónicas de los grupos en el anillo aromático del éster son las más adecuadas para optimizar la actividad biológica.

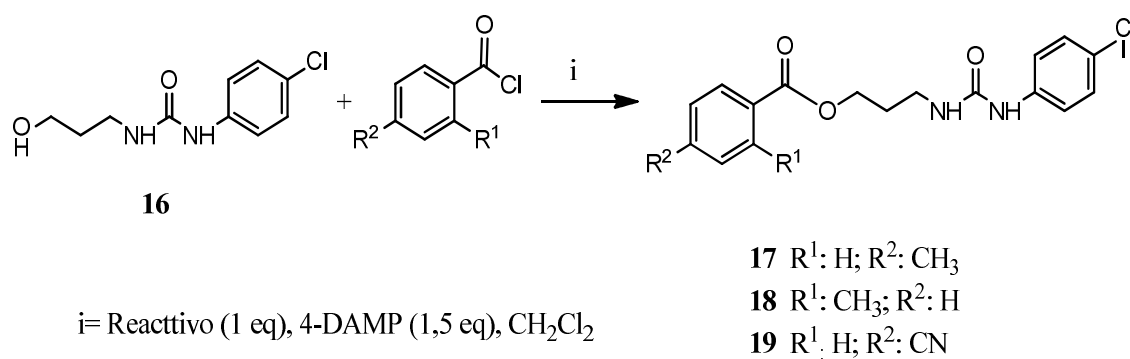
Finalmente y para disponer de más información sobre la posible actividad de derivados monoésteres, y antes de descartarlos como candidatos para las sucesivas generaciones se planteó obtener análogos a los compuestos **9** y **10**, pero carentes del hidroxilo secundario, que en estos compuestos está sin esterificar, cambiando por tanto el esqueleto central, en lugar de un aminodiol un aminoalcohol.

La metodología sintética seguida es similar a la empleada para la primera generación. A partir de 3-amino-1-propanol por reacción con 4-clorofenilisocianato se obtiene la urea derivada **16** (Esquema 4).



Esquema 4.

La reacción con el cloruro de acilo apropiado proporciona los ésteres **17-19**. Se han preparado análogos con grupos en posición *para* del anillo con diferentes propiedades electrónicas (Esquema 5).



Esquema 5.

Los resultados biológicos que proporcionen los compuestos **17-19** permitirán determinar si el nuevo esqueleto central escogido puede generar una nueva estructura general para las posteriores modificaciones y obtención de análogos que optimicen la actividad.

6. CONCLUSIONES

Como parte de la línea de investigación que se lleva a cabo en el Dpto. de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla dirigida a la síntesis de nuevos compuestos con actividad antibacteriana se ha realizado:

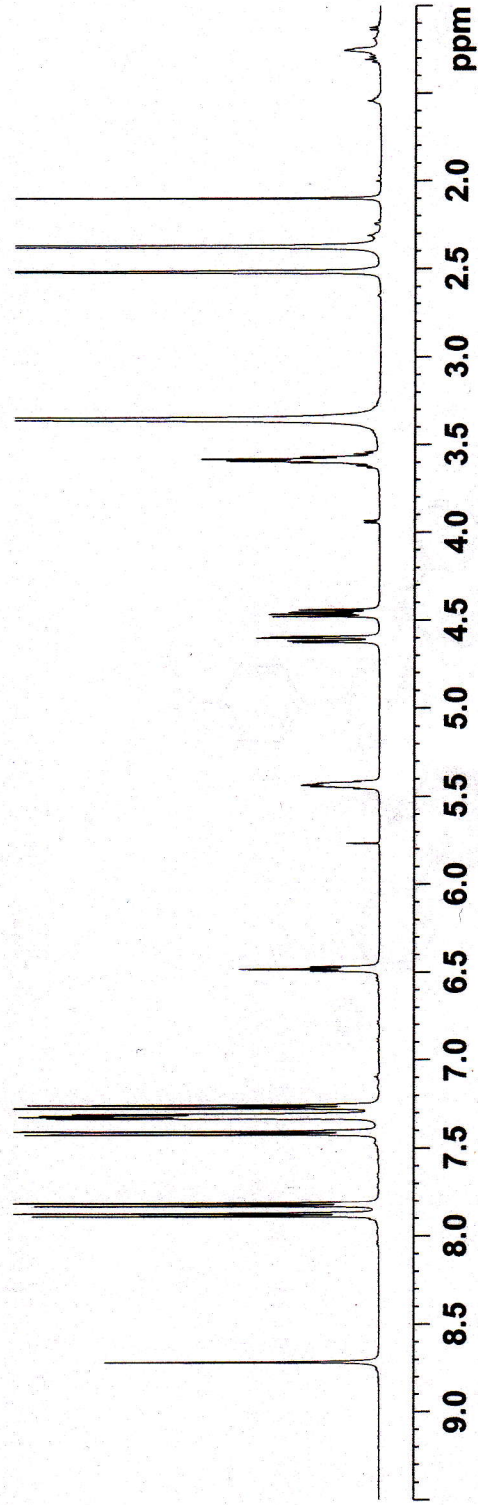
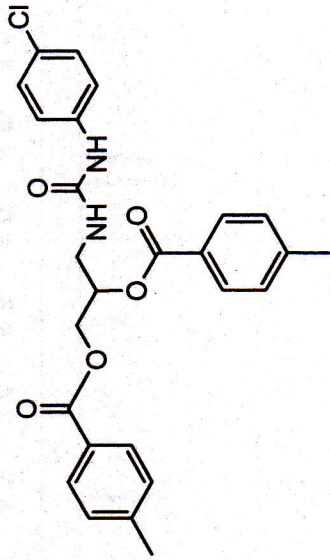
- 1) El diseño de familias de compuestos con posible actividad contra *Acinetobacter baumannii* planteadas a partir de la estructura de un prototipo, urea derivada del 3-amino-1.2-propanodiol, detectado en un screening preliminar. Se realizaron dos aproximaciones, la primera centrada en modificar la función éster sobre el hidroxilo primario, y la segunda a nivel del esqueleto central del aminoalcohol.
- 2) La síntesis de los nuevos compuestos diseñados empleando una metodología sintética sencilla que transcurre con altos rendimientos. Se han obtenido 2 productos intermedios y 10 productos finales.
- 3) El análisis estructural de los nuevos compuestos. Permitiendo confirmar la estructura propuesta. En concreto, se han realizado sus espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear. Para la realización de estos estudios se ha contado con la colaboración de los Servicios de Espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear del CITIUS de la Universidad de Sevilla.
- 4) Se ha evaluado la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de los compuestos de la 1ª generación, y se ha determinado la CMI en aquellos que dieron positiva la inhibición de crecimiento. Los compuestos con estructura de diésteres **11** y **12** (con un grupo metilo en *para* y *orto* respectivamente) presentaron valores de 3,12 μM y 1,52 μM respectivamente, constituyéndose por tanto en nuevos prototipos para el diseño de nuevos análogos. Así se ha planteado la 2ª generación de compuestos.

7. REFERENCIAS

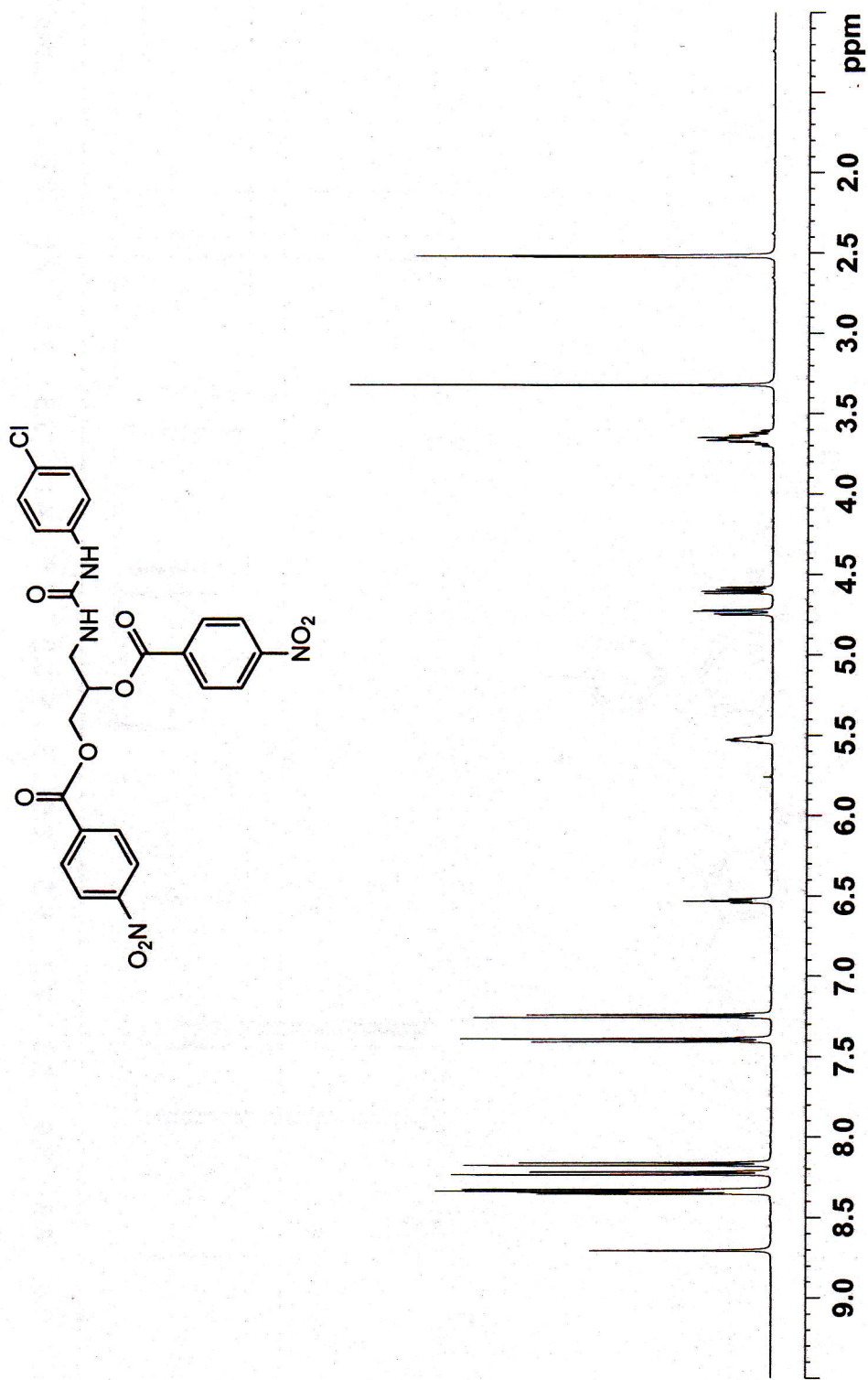
- Almasaudi SB. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J. Biol. Sci. King Saud University. 2016 [en línea]. [Consultado en Junio de 2016]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X16000565>
- Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 2013;12(22):1.
- Batarseh A, Al-Sarhan A, Maayteh M, Al-Khatirei S, Alarmouti M. Antibiogram of multidrug resistant Acinetobacter baumannii isolated from clinical specimens at King Hussein Medical Centre, Jordan: A retrospective analysis. East. Mediterr. Heal. J. 2015;21(11):828–34.
- Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of Acinetobacter baumannii: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J. Antimicrob. Chemother. 2012;67(7):1607–15.
- Caroline F, Audrey M, France B, Marguerite F, Carole P. Spatio-temporal analysis of outbreak with multiple routes of transmission in ICU setting. Can. J. Infect. Control. 2016;31(1):24–8.
- Drawz SM, Babic M, Bethel CR, Taracila M, Distler AM, Ori C, et al. Inhibition of the class C β -lactamase from Acinetobacter spp.: Insights into effective inhibitor design. Biochemistry. 2010;49(2):329–40.
- Eliecer Cano M, Ángeles Domínguez M., Ezpeleta C, Padilla B, Ramírez de Arellano E, Martínez-Martínez L. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2008;26(4):220–9.
- García-Sánchez JE, García-Merino E, Martín-del-Rey Á, García-Sánchez E. Antibioterapia para el siglo XXI, antibacterianos para la segunda década. ¿Posibilidades o realidades en un futuro? Rev. Esp. Quimioter. 2012;25(2):100–21.
- Jung J, Park W. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015;99(6):2533–48.

- Kamolvit W, Higgins PG, Paterson DL, Seifert H. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014;69(4):959–63.
- Maragakis LL, Perl TM. Antimicrobial Resistance: *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. *Clin. Infect. Dis.* 2008;46(8):1254–63.
- Mody L, Gibson KE, Horcher A, Prenovost K, McNamara SE, Foxman B, et al. Prevalence of and Risk Factors for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Colonization Among High-Risk Nursing Home Residents. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2015;36(10):1–8.
- Nurain AM, Bilal NE, Ibrahim ME. The frequency and antimicrobial resistance patterns of nosocomial pathogens recovered from cancer patients and hospital environments. *Asian Pac. J. Trop. Biomed. Elsevier (Singapore) Pte Ltd.* 2015;5(12):1055–9.
- Pan CY, Chen JC, Chen TL, Wu JL, Hui CF, Chen JY. Piscidin is highly active against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and NDM-1-producing *Klebsiella pneumonia* in a systemic septicemia infection mouse model. *Mar. Drugs.* 2015;13(4):2287–305.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008;21(3):538–82.
- Thangamani S, Mohammad H, Abushahba MFN, Sobreira TJP, Hedrick VE, Paul LN, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*; 2016;6(October 2015):22571.
- Vanegas-Múnera JM, Roncancio-Villamil G J-QJ. *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *Rev. CES Med.* 2014;28(2):233–46.
- Zhanel GG, Cheung D, Adam H, Zelenitsky S, Golden A, Schweizer F, et al. Review of Eravacycline, a Novel Fluorocycline Antibacterial Agent. *Drugs.* 2016;76(5):567–88.

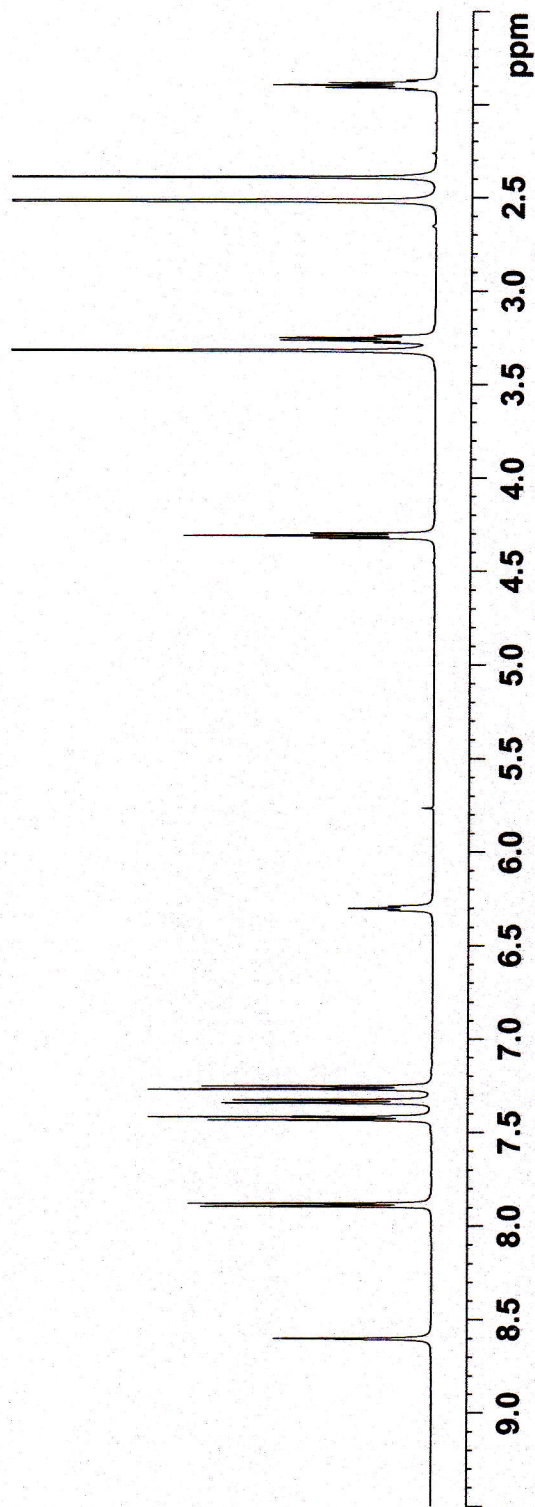
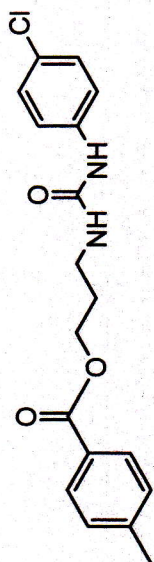
ANEXOS



Espectro 1. ¹H RMN de N-(4-Clorofenil)-N'-[2,3-di-(4-metilbenzoiiloxi)propil]urea (11). 1^a Generación.



Espectro 2. ¹HRMN de N-(4-Clorofenil)-N'-[2,3-di-(4-nitrobenzoiloxi)propil]urea (15). 2^a Generación.



Espectro 3. ¹HRMN de N-(4-Clorofenil)-N'-[3-(4-metilbenzoioloxi)propil]urea (17). 2^a Generación.