

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“SINTESIS Y EVALUACION COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS DE NUEVAS
AMINOACIL FLUOROQUINOLONAS”**

TESIS

QUE PRESENTA:

ELIZABETH MACHUCA DE LA PAZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTORES DE TESIS:

D.C. JUDIT A. AVIÑA VERDUZCO

D.C. LUIS CHACÓN GARCIA

MORELIA, MICHOACÁN, JULIO 2010

ÍNDICE GENERAL

I. Abreviaturas

II. Introducción5

III. Antecedentes9

1. Aminoácidos y Péptidos9

2. Aminoácidos y regioselectividad de membranas celulares.....9

3. Las quinolonas como agentes antimicrobianos.....11

IV. Objetivos14

1. Objetivos particulares.....16

V. Discusión y Resultados16

1. Síntesis de los derivados de quinolona16

2. pruebas biológicas de los derivados de quinolona.....24

VI. Conclusiones.....27

VII. Parte Experimental.....28

1. Aspectos Generales.....28

2. Método general de *N*-protección de aminoácidos29

3. Procedimiento general para las reacciones de acoplamiento.....31

4. Método general de <i>N</i> -Desprotección de Dipéptidos.....	36
5. Prueba de sensibilidad por difusión en agar.....	38
VIII. Referencias.....	66

I. ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
AcOH	Ácido Acético
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
c	Cuadruple
° C	Grados Centigrados
Cbz	Xxx
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
CD ₃ OH	Metanol Deuterado
CH ₃ CN	Acetonitrilo
d	Doble
DCM	DiCloroMetano
dd	Doble de doble
DIEA	Dilsopropil Etilamina
DMSO	Dimetil Sulfóxido
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
h	Hora
Gp	Grupo protector
g	Gramo
Gyr	Girasa
HCl	Ácido clorhídrico

HBTU	Hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uranio
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
H ₂ O	Agua
<i>i</i> -BBOCl	Cloruro de Isobutilo
I α D	α -Dextrina Iodo-litio
LiOH	Hidróxido de Litio
L	Litro
m	Múltiple
MeOH	Metanol
Mg	Magnesio
Mg ²⁺	Ion magnesio 2+
Mg	Miligramo
μ g	Microgramo
ml	Mililitro
mmol	MiliMol
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
N	Normalidad
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
NaOMe	Metóxido de Sodio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
QRDR	Región Determinante en la Aparición a Resistencia a las Quinolonas
Pd/C	Paladio fijado en Carbono
p.f.	Punto de fusión
pH	Antilogaritmo de la Concentración de Hidrógeno
ppm	Partes por millón

<i>R</i> -Ala	<i>R</i> -Alanina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Simple
<i>S</i> -Fen	<i>S</i> -Fenilalanina
SOCl ₂	Cloruro de tionilo
<i>S</i> -Pro	<i>S</i> -Prolina
t	Triple
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametil silano
w/w	Relación peso a peso

II. INTRODUCCIÓN

A partir de la primera guerra mundial y debido a todas las afecciones provocadas por tal acto, los Países Aliados como Estados Unidos e Inglaterra se involucraron totalmente en el descubrimiento y desarrollo de compuestos que presentaban características específicas para atacar a los microorganismos que provocaban la muerte de los soldados como resultado de la contaminación de las heridas de guerra. Este momento histórico fue relevante para el inicio de la búsqueda de compuestos antimicrobianos. Sin embargo, fue hasta 1929 cuando Alexander Fleming comunica su observación de que colonias de estafilococos se lisaban en una placa contaminada con *Penicillium notatum*. Los primeros años transcurridos desde la obtención del primer producto crudo a partir de este hongo incluía la propuesta estructural de la molécula de forma errónea; la cual fue corregida años más tarde con la ayuda del análisis por difracción de rayos X.¹ La naturaleza peptídica de la penicilina fue entonces reconocida como un sistema β -lactámico biciclo conformado por un dipéptido (ver Figura 1), abriendo la posibilidad de la manipulación química de la estructura y llevar con ello a la producción de penicilinas semisintéticas.

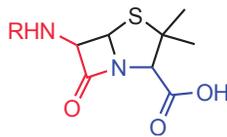


Figura 1. Estructura peptídica de la penicilina

Así como la penicilina, se pueden mostrar antibióticos que presentan en su estructura un conjunto de péptidos como son la gramicidina, valinomicina y alameticina (los dos últimos presentan en su ciclo al aminoácido prolina), la cyclosporina que presenta a la *D*-alanina y la antamanida es un péptido que contiene en su estructura *L*-fenilalanina, *L*-alanina y *L*-prolina, entre otros (Figura 2).

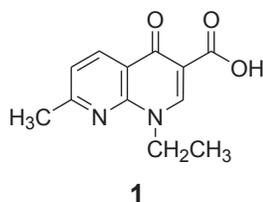


Figura 3. Acido nalidíxico.

Tabla 1. Clasificación de las quinolonas.

Generación	Fármacos	Descripción	Efectivo contra ...
Primera	Ácido pipemídico, ácido oxolónico, ácido piromídico, acroxacino, cinoxacino y rosoxacino.	Ninguno presenta mejor actividad terapéutica que el ácido nalidíxico.	Gram negativas (<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>), excepto <i>Pseudomonas</i> spp. Y otros bacilos Gram negativos no fermentadores
Segunda (Fluoro-Quinolonas)	Ciprofloxacina, norfloxacina, enoxacina, pefloxacina, ofloxacina, lomefloxacina y fleroxacina.	Se incorpora al ácido nalidíxico un grupo piperazina o pirrolidina en el C-7 y un sustituyente flúor en el C-6. Más potentes que el ácido nalidíxico.	Gram negativas, <i>Pseudomonas</i> spp., algunos Gram positivos (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> y metilicina resistentes), <i>Moraxella catarrhalis</i> , micobacterias y patógenos atípicos.
Tercera	Levofloxacina, clinafloxacina, moxifloxacina, gatifloxacino y trovafloxacino.	Se manipula el ácido nalidíxico, se adicionan dos sustituyentes flúor, grupos alquílicos en la piperazina o anillo pirrolidínico y grupos metoxi en el C-8.	Gram negativos y micobacterias y mejor actividad frente a Gram positivos (<i>Streptococcus pyogenes</i> y neumococo sensible y resistente a la penicilina), anaerobios y patógenos atípicos.
Cuarta	Garenoxacina	Remoción del átomo	Bacterias anaerobias

(Desfluoro- Quinolonas)	(descubrimiento reciente). ³	de flúor presente en el carbono 6.	<i>(Clostridium</i> y <i>Bacteroides</i>) y cocos Gram positivos resistentes a penicilina y meticilina.
------------------------------------	---	------------------------------------	--

Dadas las resistencias microbianas presentes en los últimos años, se ha precisado la búsqueda continua de nuevas quinolonas que presenten una mejor farmacodinamia y farmacocinética. En esta tesis se presentan nuevas fluoroquinolonas que en su estructura presentan aminoácidos y péptidos con la intención de obtener derivados de quinolonas con mejoras antibacteriales.

III. ANTECEDENTES

1. Aminoácidos y Péptidos

Los aminoácidos pertenecen al grupo de moléculas fundamentales para la vida. Es así que bajo la presencia de estas biomoléculas está sustentada la teoría más aceptada sobre el inicio de la vida. En la naturaleza tienen la particularidad de que se presentan mayoritariamente en la forma *L*, excepto la glicina que carece de centro quiral.

Presentan como estructura fundamental a un carbono asimétrico (carbono alfa) unido a cuatro grupos distintos: un grupo amino y un grupo carboxilo (de ahí su nombre), un hidrógeno y una cadena lateral (R). Es ésta cadena R la que confiere las diferencias físicas y químicas entre un aminoácido y otro.

La unión entre dos aminoácidos, por la unión del grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del otro, da lugar a un dipéptido mediante la formación de un enlace amida denominado enlace peptídico como se muestra en la Figura 4. Debido a que la formación del enlace peptídico involucra los dos grupos presentes en un mismo aminoácido, se protegen los grupos funcionales que den lugar a productos cruzados.

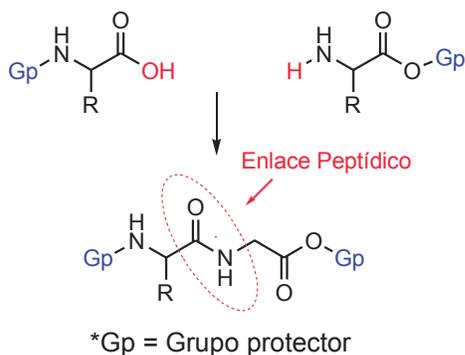


Figura 4. Formación de enlace peptídico.

2. Aminoácidos y regiospecificidad de membranas celulares

Partiendo del hecho de que en los humanos se encuentran, principalmente, aminoácidos en su estructura *S* se puede observar que ésta es de las formas más sencillas y eficientes de selectividad en las membranas.

Muchas moléculas fundamentales para la vida son quirales y por lo tanto el adecuado reconocimiento tridimensional entre estas es un aspecto particular del reconocimiento molecular. Algunos componentes de las biomembranas no escapan de este contexto por ejemplo los receptores. De hecho, investigaciones demostraron que la presencia de aminoácidos tales como fenilalanina y triptófano así como sus dipéptidos proporciona regioselectividad específica en el modelo de biomembrana *N*-dodecanoil-*S*-prolinato de sodio.⁴

Los aminoácidos y péptidos no solo figuran como constituyentes celulares sino además como fármacos. En años recientes se han realizado estudios de actividad antibacteriana de diversos péptidos, exponiendo como resultado un sinergismo entre los antibióticos y péptidos reportados.^{5,6} La hidrofobicidad y la carga neta positiva de los péptidos confieren alta selectividad en la actividad antibacteriana. La carga positiva de los péptidos facilita la interacción de estos con las cargas negativas de las membranas celulares, concediendo sinergismo entre péptidos y antibióticos. Tal es el caso de la tetraciclina, la cual confinada a poner nombre del péptido es particularmente letal a las cepas resistentes para éste mismo antibiótico con ausencia de cadena peptídica.⁶

En la Tabla 2 se muestra como la presencia de péptidos formados por aminoácidos como la prolina, alanina y fenilalanina junto con la tetraciclina, proporcionan un sinergismo considerable en la terapéutica disminuyendo la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del antibiótico de forma considerable.⁷

Tabla 2. Influencia de aminoácidos sobre la actividad antibacteriana in vitro de α -dextrina yodo-litio (I α D) en *E. coli* K-12. No me queda claro que es esa dextrina. En el texto hablas de tetraciclina!

MIC (mg/L)					
< 6.2	12.5	25	50	100	≥ 200
Prolina	Fenilalanina	Tirosina	Treonina	Albumina	Triptofano
Valina	Alanina	Histidina	Serina		Metionina
Leucina	Asp		Cisteina		Lisina
	Glicina		Arginina		Isoluecina
	Gln				
	Glu				
	Asn				
	*				

Es claro entonces, que la incorporación de péptidos y aminoácidos a antibióticos abre la puerta a la búsqueda de nuevas entidades activas, una necesidad urgente pues desde la introducción de los antibióticos, la proporción de patógenos resistentes con respecto a patógenos no resistentes fue menos del 1 %, pero este porcentaje fue dramáticamente aumentado durante los 12 años posteriores después de los primeros antibióticos en el mercado. En la actualidad la resistencia se ha incrementado logarítmicamente. El número de agentes antibacterianos actualmente en el mercado es de alrededor de 150, clasificados entre 6 grandes grupos: β -lactamas, tetraciclina, aminoglucósidos, macrólidos, sulfonamidas y quinolonas.⁸

3. Las quinolonas como agentes antimicrobianos

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos análogos al ácido nalidíxico, con diferentes sustituyentes y químicamente heterogéneo. Químicamente están formadas por el ciclo A sustituido por un ácido 1-sustituido-1,4-dihidro-4-oxopiridin-3-carboxílico y un ciclo aromático, heteroatómico B (Figura 5). Partiendo de esto se puede definir de una forma sencilla al ciprofloxacino como un derivado del ácido 3-carboxílico-4-oxo-quinolina.

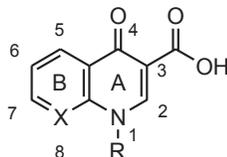


Figura 5. Estructura general de las quinolonas

El ácido nalidíxico **1** que apareció en los años 60's fue la primer quinolona utilizada en la clínica médica al presentar buena actividad contra bacterias Gram negativas y ligeramente activa frente a Gram positivas y *Pseudomonas*; siendo por tal motivo limitado al tratamiento de infecciones en vías urinarias.²

El ácido nalidíxico **1**, abrió un camino de investigación y en los años 80 se le reportan modificaciones incorporando un átomo de flúor en la posición 6 y un anillo de piperazina en el carbono 7, originándose una nueva generación de quinolonas, que por ser desarrolladas en una segunda etapa en el estudio del ácido nalidíxico se les denominaron quinolonas de segunda generación, estando incluidas en ese grupo fármacos como el ciprofloxacino **2**, norfloxacino y ofloxacino, entre otros. Este grupo de quinolonas también fue denominado piperazinil

fluoroquinolonas o simplemente fluoroquinolonas (Figura 6). La presencia de un átomo de flúor en la posición 6 confirió mejor actividad (amplio espectro), buena farmacocinética (buena absorción oral), farmacodinamia (inhibición de la ADN girasa (2 a 17 veces) con respecto a los compuestos no sustituidos en esa posición) y amplia distribución tisular (aumento de 1 a 70 veces en la penetración celular); convirtiéndose en fármacos de primera línea frente a numerosas infecciones.⁹

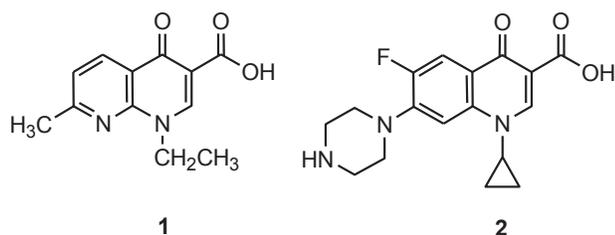


Figura 6. Estructuras de ácido nalidíxico y Ciprofloxacino.

Por su parte, el sustituyente en el C-7 aumentó considerablemente la actividad inhibitoria de la ADN girasa (Gyr), potencia, solubilidad y otras propiedades fisicoquímicas.¹⁰ Asimismo, al aumentar el tamaño del grupo, las propiedades se potencializaban. La Figura 7 muestra la relación entre la estructura de las quinolonas con la actividad de éstas sobre las células diana.

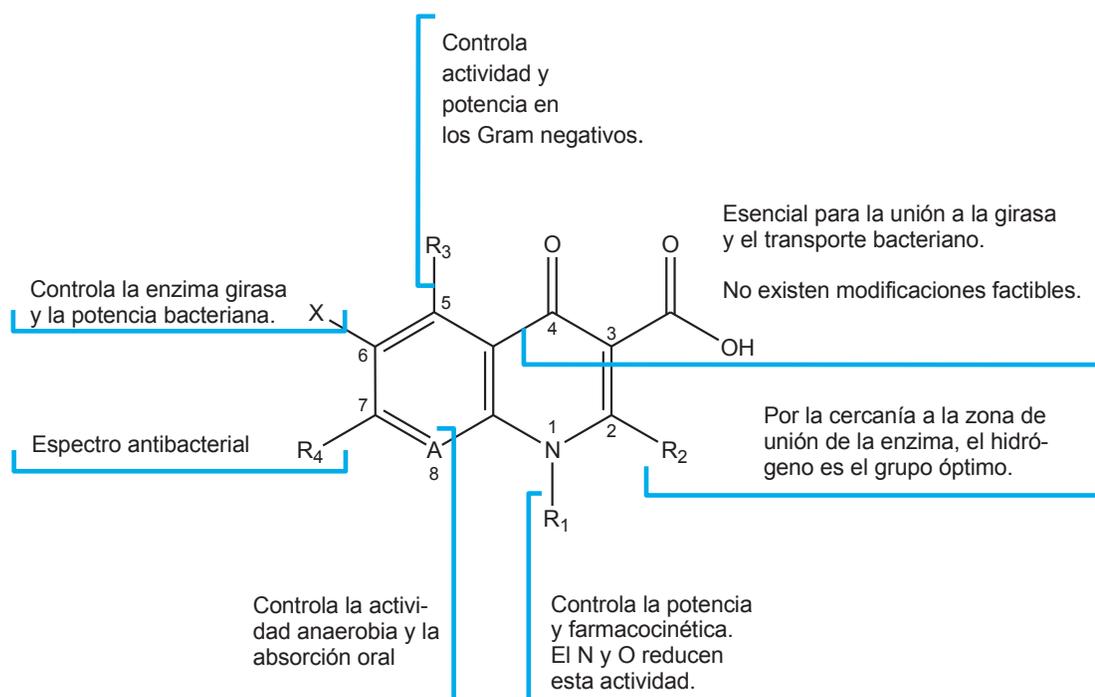


Figura 7. Relación estructura-actividad de las quinolonas.

Las quinolonas ejercen su actividad bactericida tras penetrar la membrana bacteriana mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de canales acuosos transmembranales de porinas, o de la capa de los lipopolisacáridos.¹¹ Para la acción efectiva de las quinolonas, se requiere una interacción directa entre la quinolona y el ADN de cadena doble o sencilla.

Aun cuando se sabe que las quinolonas presentan una actividad microbiana letal, el mecanismo de acción no está del todo claro pero si es contundente que inhiben a la topoisomerasas bacterianas Girasa y topoisomerasa IV. Estas enzimas son necesarias para la replicación del ADN, así como para la transcripción, reparación, composición y transposición del mismo. Las quinolonas por lo tanto inhiben la replicación del ADN y por tal motivo a este grupo de antimicrobianos se les denomina “inhibidores de la girasa”.

La función de la ADN girasa es catalizar el superenrollamiento negativo del ADN circular de la bacteria, que es el estado natural del cromosoma bacteriano. A nivel molecular la ADN girasa es un complejo tetramérico, formado por dos monómeros A (Gyr A) y dos monómeros B (Gyr B)¹² codificados por los genes *gyrA* y *gyrB*. Son las proteínas Gyr A y Gyr B las dianas de las quinolonas. Es fundamental la presencia de ambas subunidades y del ATP para el funcionamiento de la ADN girasa, ya que los monómeros A llevan a cabo cortes y cierres en determinados puntos del ADN y los monómeros B llevan a cabo el superenrollamiento en torno al núcleo del ARN.¹³ El ciprofloxacino al actuar sobre la subunidad A, y al parecer también en la subunidad B, impide el cierre de los cortes producidos en el ADN, por lo que inhibe la replicación del ADN.

La topoisomerasa IV es un tetrámero que muestra que la secuencia de aminoácidos codificados por los genes *parC* y *parE* son homólogos a los que codifican a *gyrA* y *gyrB* respectivamente. Estas secuencias similares se localizan alrededor de la región de la ADN girasa conocida como región determinante en la aparición a resistencia a las quinolonas (QRDR).¹⁴ Esta similitud en la secuencia de aminoácidos es la que hace que las quinolonas actúen en la ADN girasa como en la topoisomerasa IV.¹⁵

Sin lugar a duda, uno de los modelos más aceptados sugiere que el magnesio (Mg) juega un papel importante en la unión de la quinolona al formar el complejo ADN-girasa, existiendo una interacción electrostática y/o covalente entre el ion Mg^{2+} y una molécula de quinolona así como los grupos fosfato y las bases de ADN.¹⁶

En resumen, la acción de las quinolonas es la de inhibir ambas enzimas, formando un complejo ternario entre fármaco, enzima y ADN. A dosis elevadas de antibiótico se cree que tiene lugar la muerte celular por una ruptura irreversible de la doble hélice del ADN.

Recientemente se ha demostrado que el mecanismo de flujo activo capaz de expulsar el antimicrobiano, baja la concentración efectiva para provocar un daño irreversible al ADN bacteriano y con ello llevar a la muerte celular. Siendo este un mecanismo de defensa de gran importancia en microorganismos Gram positivos.

Los principales mecanismos de defensa de bacterias ante el grupo de quinolonas son: alteraciones en la Gyr A, la Gyr B y en la topoisomerasa IV.¹⁷ Así como la dificultad de paso del antibiótico a través de la pared bacteriana o el exceso de salida por alteraciones de los mecanismos de flujo externo. Todo lo anterior debido a mutaciones en distintos genes que codifican la estructura o función correspondiente. Observar Tabla 3.

Tabla 3. Mecanismos de defensa a las fluoroquinolonas.

Especie	Mecanismo de defensa
<i>E. coli</i>	Alteraciones en la Gyr A ¹⁸
<i>Salmonella</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>P. aeruginosa</i>	
<i>C. jejuni</i>	
<i>N. gonorrhoeae</i>	Alteraciones en la topoisomerasa IV ^{18,19}
<i>S. aureus</i>	
<i>S. pneumoniae</i>	
<i>P. aeruginosa</i>	Aumento del flujo externo ¹⁸
<i>S. aureus</i>	
<i>C. jejuni</i>	

La popularidad de la eficacia de las fluoroquinolona y su falta de control en el mercado llevo a un uso desmedido de este fármaco y provocar así un aumento en la resistencia de bacterias como la *E. coli* y *Pseudomonas*. Resulta entonces necesaria la búsqueda de nuevas entidades análogas que actúen sobretodo en cepas multirresistentes y que presenten menores efectos secundarios y colaterales.

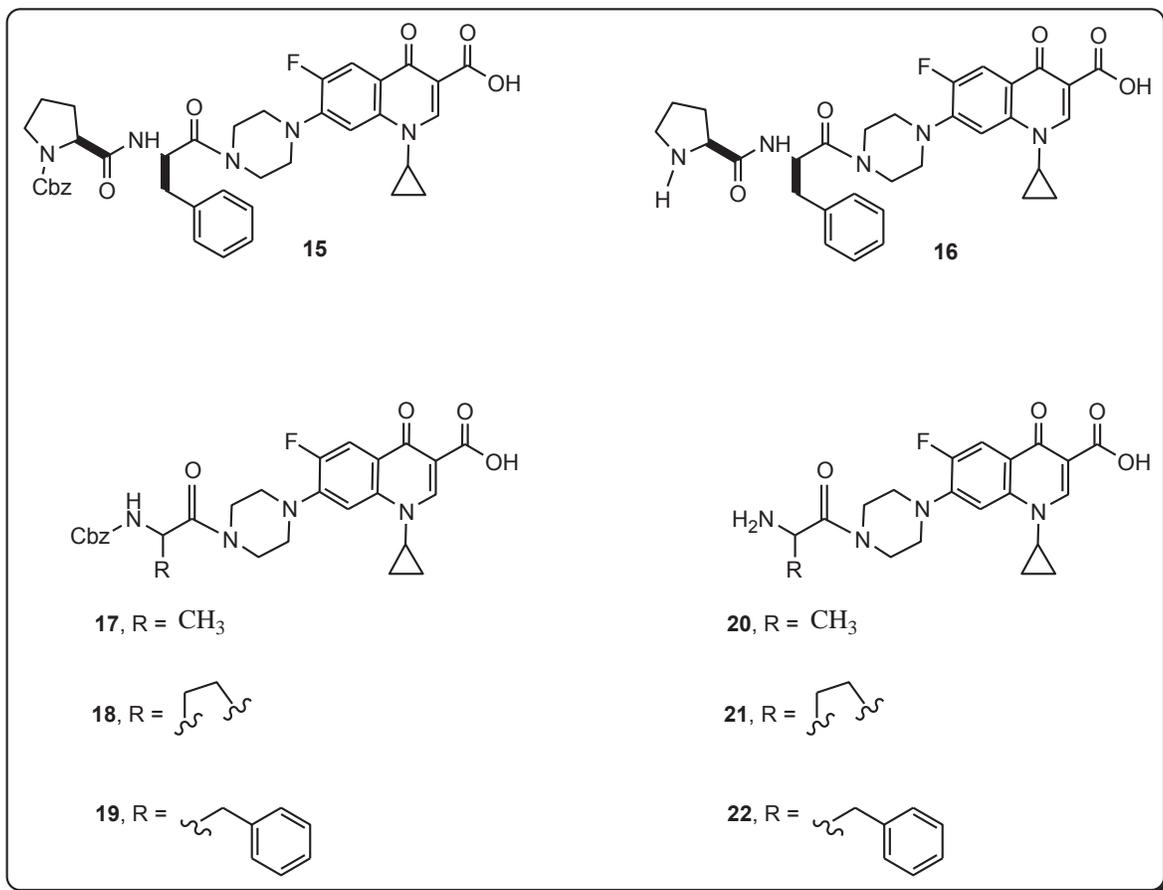
Por lo anterior y tomando en consideración la actividad antibacteriana de diferentes quinolonas y de péptidos como valinomicina y cyclosporina, en este trabajo se plantea sintetizar fluoroquinolonas, acopladas a péptidos y aminoácidos en la posición 7 de la piperazina.

IV. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y evaluar derivados de fluoroquinolonas acoplados a péptidos y aminoácidos

1. Objetivos particulares

1. Sintetizar los compuestos **15**, **16**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21** y **22**.



2. Evaluar su actividad antibacteriana en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

V. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

1. Síntesis de los derivados de quinolona

Con la finalidad de cubrir los objetivos de este proyecto, el trabajo dio inicio con la selección de los aminoácidos para la formación de las fluoroquinolonas funcionalizadas.

Tomando en cuenta la variedad de los grupos laterales de los aminoácidos, se consideraron aquellos cuyas cadenas laterales con mayor facilidad de interacción con la membrana celular (Bombelli) y las cuales mostraban un sinergismo considerable al ser utilizadas con otros antimicrobianos. Es así como se seleccionaron los aminoácidos *S*-prolina (*S*-Pro) **3**, *R*-alanina (*R*-Ala) **4**, *S*-fenilalanina (*S*-Fen) **5** y el dipéptido HN-Pro-Fen-OH **6**, cuyas estructuras se presentan en la figura 8.

Recordemos que la nomenclatura *D* y *L*, al igual que la designación *R* y *S*, se refieren a la configuración del átomo de carbono estereogénico y no implica el signo de la rotación óptica.

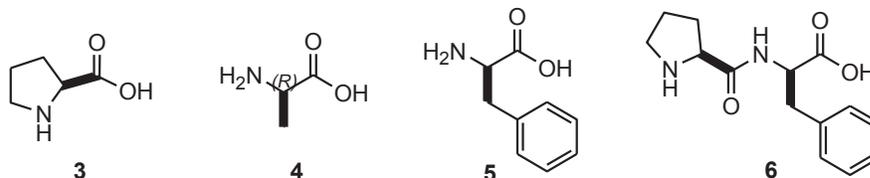
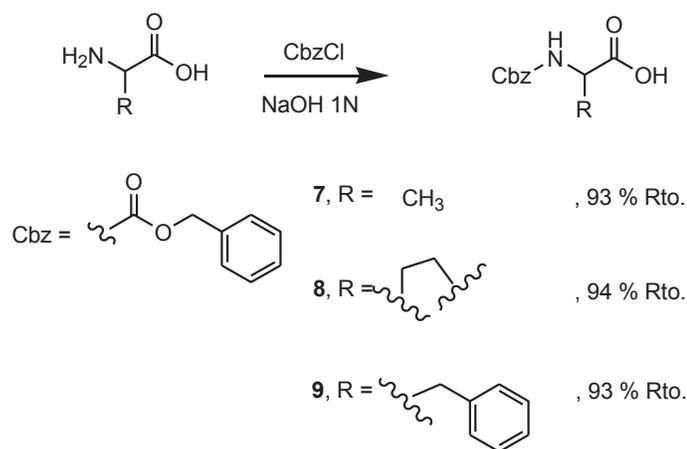


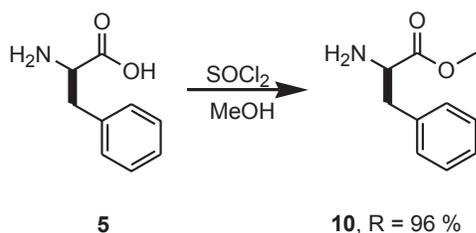
Figura 8. Aminoácidos y péptido utilizados en la síntesis de derivados de quinolona.

El primer paso en la ruta sintética fue la *N*-protección de los aminoácidos **3**, **4** y **5**; tratados con cloroformiato de bencilo para la formación del grupo *N*-Cbz, en solución acuosa de NaOH para obtener el carbamato correspondiente en rendimientos superiores al 90 %. Esquema 1.



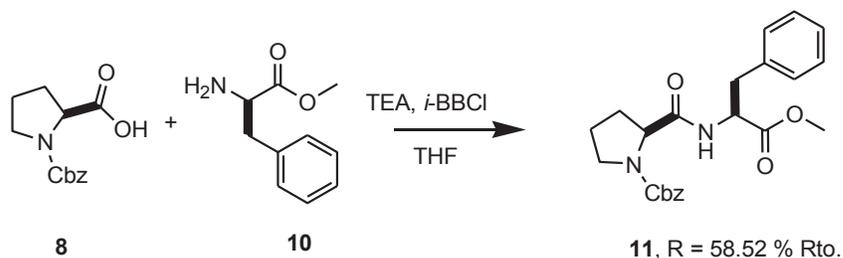
Esquema 1. Síntesis de aminoácidos *N*-protegidos **7**, **8** y **9**.

Para poder llevar a cabo la síntesis del dipéptido **12** se llevó a cabo primeramente la *O*-protección de la *S*-fenilalanina **5**. El aminoácido **5** fue esterificado por medio de una reacción catalítica ácida con metanol, usando SOCl₂ (ver Esquema 2) obteniendo al compuesto **10** en un rendimiento del 96 %.



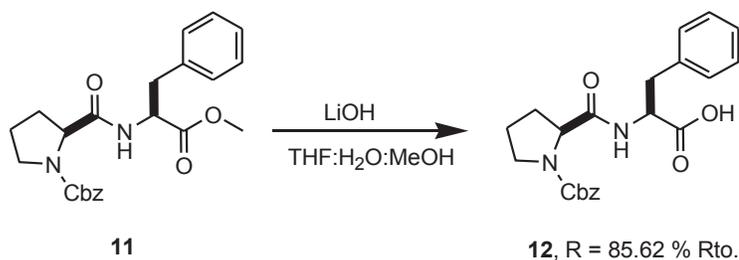
Esquema 2. *O*-protección de Fenilalanina **5**.

Posteriormente se realizó un acoplamiento entre los aminoácidos protegidos **8** y **10** con la finalidad de obtener el dipéptido diprotegido **11** como se aprecia en el Esquema 3. Así, para la obtención de **11** se realizó una reacción de condensación intermolecular entre el aminoácido *N*-protegido (Cbz-*N*-Pro) **8** y el éster metílico de *S*-fenilalanina **10**, tratados con *i*-BBrCl como agente activante, TEA como base y THF como disolvente obteniendo el dipéptido diprotegido **11** con un rendimiento del 58.52 %.



Esquema 3. Acoplamiento para la obtención del dipéptido diprotectado **11**.

Para la O-desprotección del dipéptido **11**, se le realizó una hidrólisis alcalina con LiOH en un medio THF:H₂O:MeOH (25:1.0:0.1), con un rendimiento del 85.62%. Esquema 4.



Esquema 4. O-desprotección del dipéptido **11**.

Siguiendo con la ruta sintética el siguiente paso fue la incorporación del fragmento peptídico **12** a la fluoroquinolona **2**. Cabe mencionar que la obtención de la fluoroquinolona **2** se realizó a partir de una metodología estandarizada utilizando una presentación farmacéutica comercial, en forma de tabletas, de clorhidrato de ciprofloxacino conteniendo 500 mg de principio activo mediante extracciones por disolventes para eliminar el excipiente.

Dadas las características estructurales de la quinolona que involucran un amino secundario de la piperazina y un carboxilato (sustituido en C-3), se planteó la posibilidad de tratarla de forma análoga a como se tratan los péptidos e incorporarla al dipéptido *N*-protectado **12** mediante una reacción de acoplamiento; los ensayos se muestran en la tabla 4.

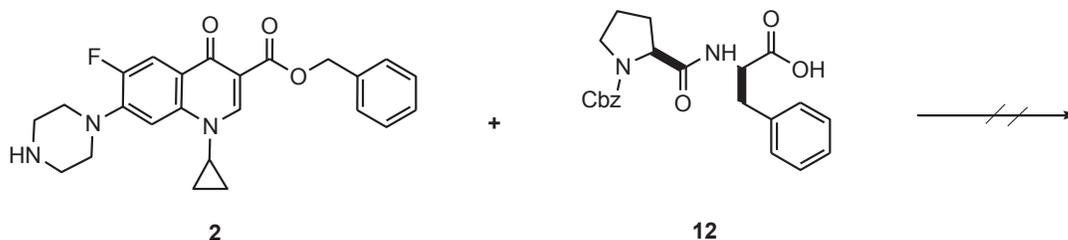


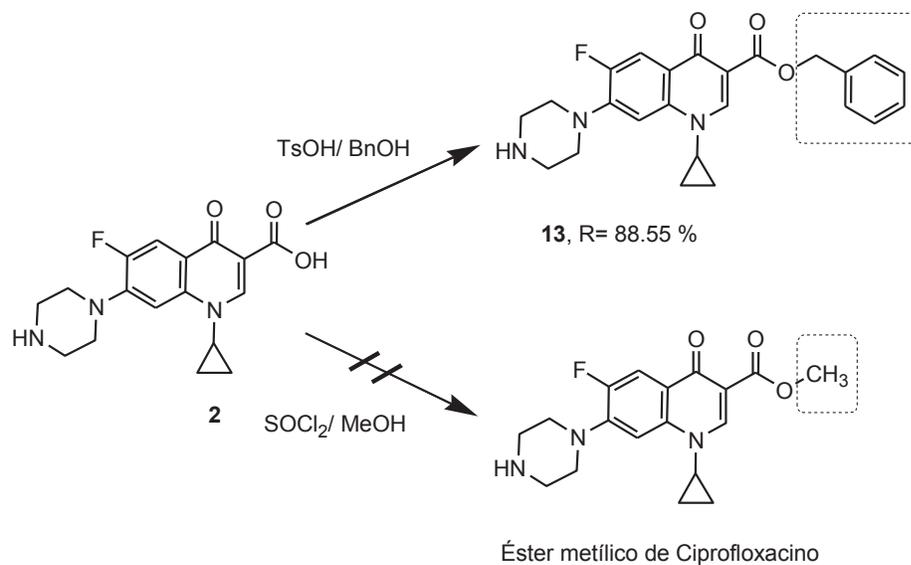
Tabla 4. Reacción de acoplamiento entre el dipéptido **12** y el ciprofloxacino **2**.

Ensayo	R	Condiciones de Reacción	Producto
1	H	TEA, CH ₃ CN, THF	NA
2	H	TEA, <i>t</i> -BBOCl, THF	NA

NA.- No Apreciado

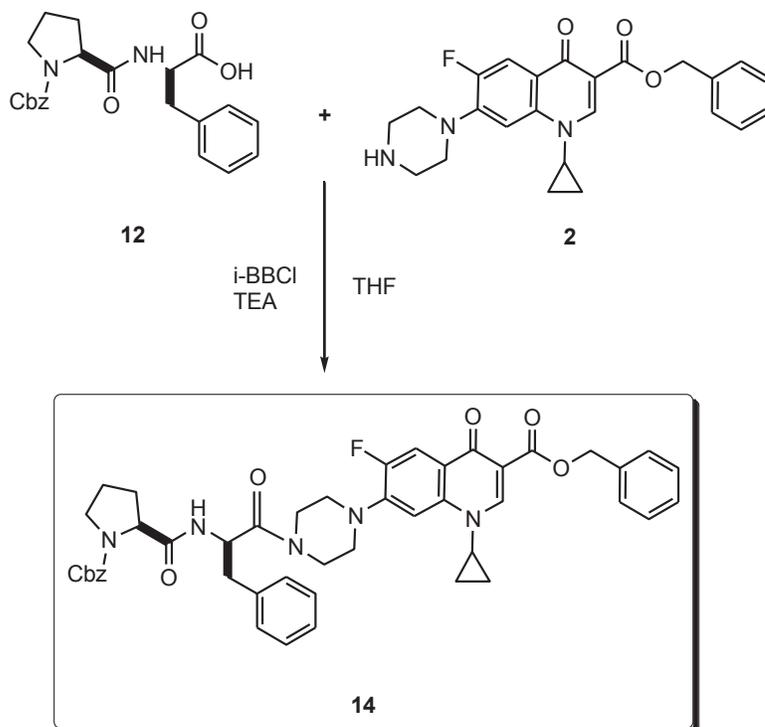
Como se muestra en la tabla, la reacción no procedió adecuadamente observándose solo descomposición de la materia prima. Probablemente esto se debió al carboxilo libre en C-3 que puede dar lugar a reacciones colaterales, entre ellas la esterificación del grupo ácido con isobutilo, las cuales se confirmaron por Resonancia Magnética Nuclear.

La preocupación de mantener intacto al carboxilo del C-3 del Ciprofloxacino **2** por ser región importante para la acción de la quinolona en el ADN, llevo a la búsqueda de alternativas químicas para que en lo mínimo posible la molécula **2** este expuesta a medios agresivos y así mantener la certeza de no ser afectada. Es así que viendo la posibilidad de proteger el grupo carboxilo del ciprofloxacino **2** para poder llevar a cabo la reacción de acoplamiento entre el dipéptido **12** con la molécula **2** de tal forma que se optimice el rendimiento del producto deseado. Así, se optó por la protección de este grupo con alcohol bencílico, ya que presenta dos características importantes sobre la protección con alcohol metílico (Esquema 5): La primera es que el compuesto **2** no será expuesto a condiciones de reacción extremas como altas temperaturas y a ácidos fuertes como en el caso de la esterificación con metanol y la segunda es que al momento de liberar la molécula del grupo *N*-protector (Cbz), también es liberado el grupo bencilo de la *O*-protección, exponiendo a un paso menos para la obtención del producto final.



Esquema 5. O-Protecciones del compuesto **2**.

Una vez protegido la quinolona **2** se intentó nuevamente la reacción de acoplamiento con el dipéptido **12**. Esquema 6. Para ello se empleó la reacción con *i*-BBCl en TEA y THF como disolvente, obteniéndose el derivado peptídico **14**.



Esquema 6. Síntesis del compuesto 14.

Lo anterior fue corroborado por el espectro de RMN de ^1H , y ^{13}C mostrados en la Figura 9.

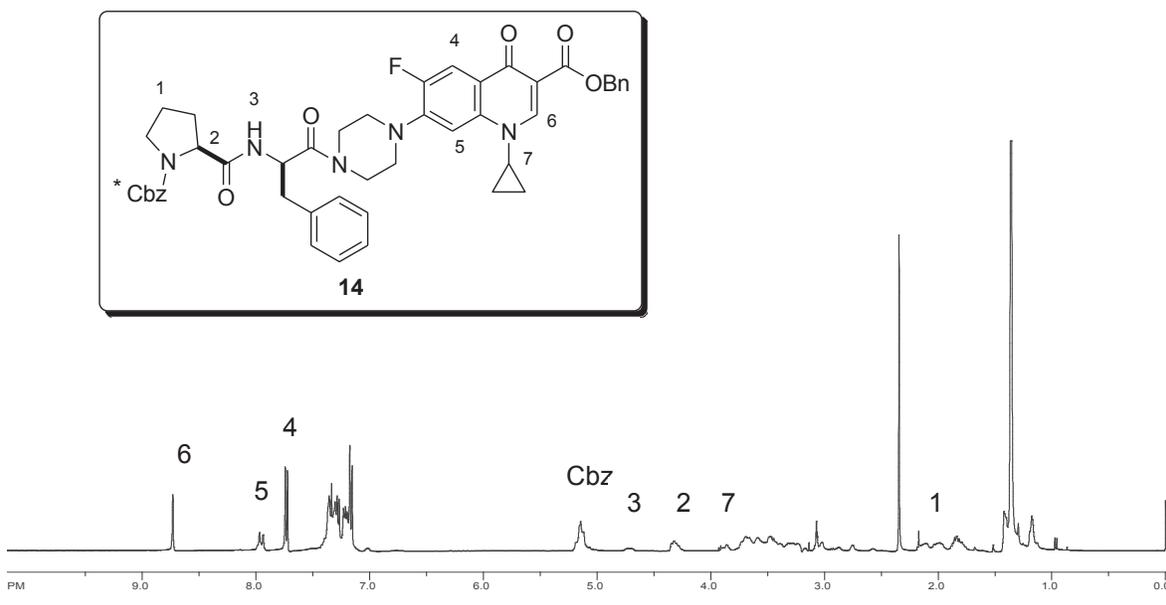
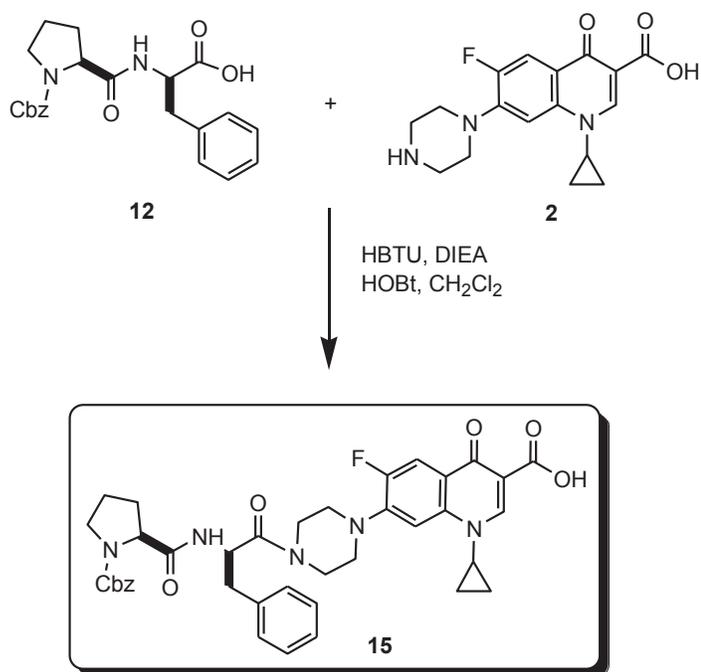


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H del derivado peptídico de quinolona 14.

En el espectro se observó una señal en aproximadamente 2.4 ppm que probablemente no pertenece a las señales ya características de las materias primas y después de intentar purificar el compuesto en varias ocasiones, no se logró purificar. En los intentos de purificación se utilizó SiO_2 , SiO_2 básico, alúmina y alúmina básica así como porfirin. Durante los intentos de purificación se observó que el compuesto 14 es inestable al calor y medios ácidos. Con la finalidad de evitar procesos tediosos de purificación se intentó disminuir la cantidad de TEA durante el proceso, aun así el producto presentaba impurezas.

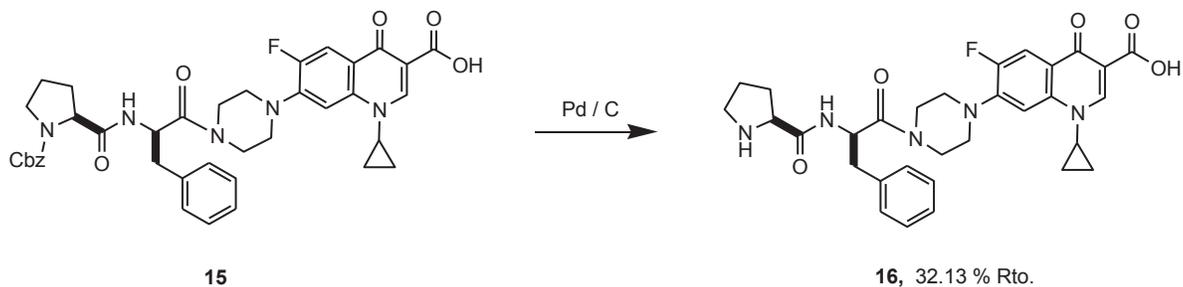
A pesar de que la metodología no pudo ser estandarizada, proporcionó una pauta que indicaba que el producto buscado sí puede ser obtenido, motivando a plantear nuevas rutas de síntesis, Esquema 7.



Esquema 7. Ruta planteada para la síntesis de **15**.

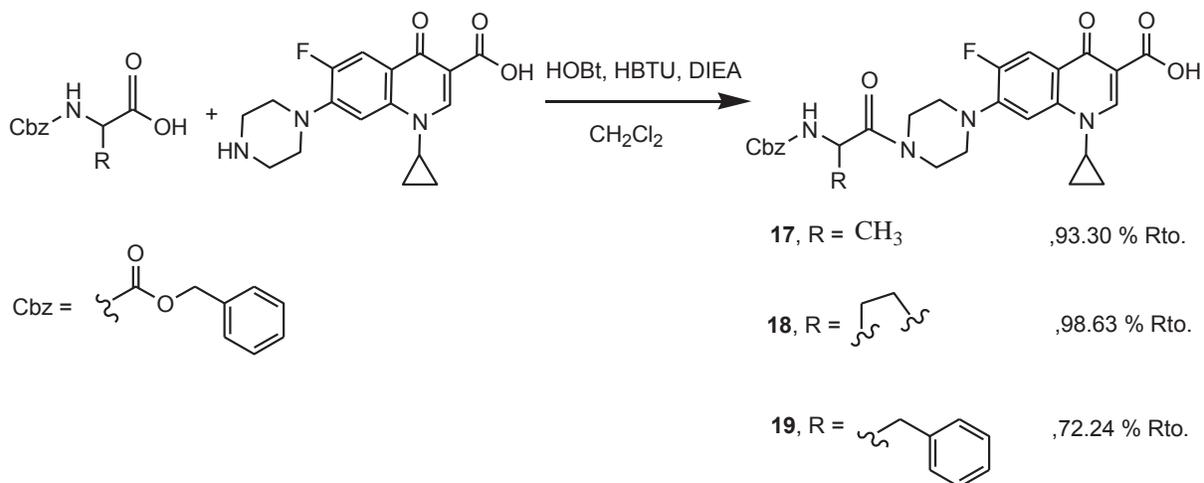
Como se aprecia en el esquema 7, solo la metodología descrita con la quinolona desprotegida **2**, el dipéptido **12** y HOBt/HBTU como agentes activantes, DIEA como base y DCM como disolvente proporcionando un buen rendimiento del compuesto **15**.

La *N*-desprotección de **15** se llevó a cabo en condiciones de hidrogenación catalítica con H₂ a presión atmosférica, con Pd/C al 10% y MeOH como disolvente proporcionándonos el derivado peptídico **16**. Esquema 8.



Esquema 8. *N*-desprotección del compuesto **15**.

Una vez sintetizado el compuesto *HN*-prolina-fenilalanina-*O*-ciprofloxacino **16** y estandarizado el método de acoplamiento entre la quinolona **2** y el dipéptido **12**, se procedió a la síntesis de los compuestos *Cbz-N*-Ala-*O*-ciprofloxacino **17**, *Cbz-N*-Pro-*O*-ciprofloxacino **18** y *Cbz-N*-Fen-*O*-ciprofloxacino **19** como se muestra en el esquema 9.



Esquema 9. Acoplamiento para la obtención de derivados de Quinolona.

Como se puede observar en este caso, se tiene también la estructura base del ciprofloxacino, solo que ahora en lugar del fragmento peptídico se tiene un solo aminoácido, lo que lo hace una molécula de menor tamaño que podría mostrar una mejor actividad antibacteriana que el derivado **16**.³

La reacción se llevó a cabo en DCM como disolvente, utilizando HOBt y posteriormente HBTU como agente activante y DIEA como base.

Cabe destacar que el uso de HBTU como activante en la síntesis de péptidos ha cobrado importancia en los últimos años, esto se debe principalmente a que el acoplamiento se da en condiciones muy suaves evitando al máximo la racemización y presencia de otros compuestos derivados de reacciones colaterales.

El espectro de RMN mostrado en la Figura 10 muestra la presencia del compuesto **17**.

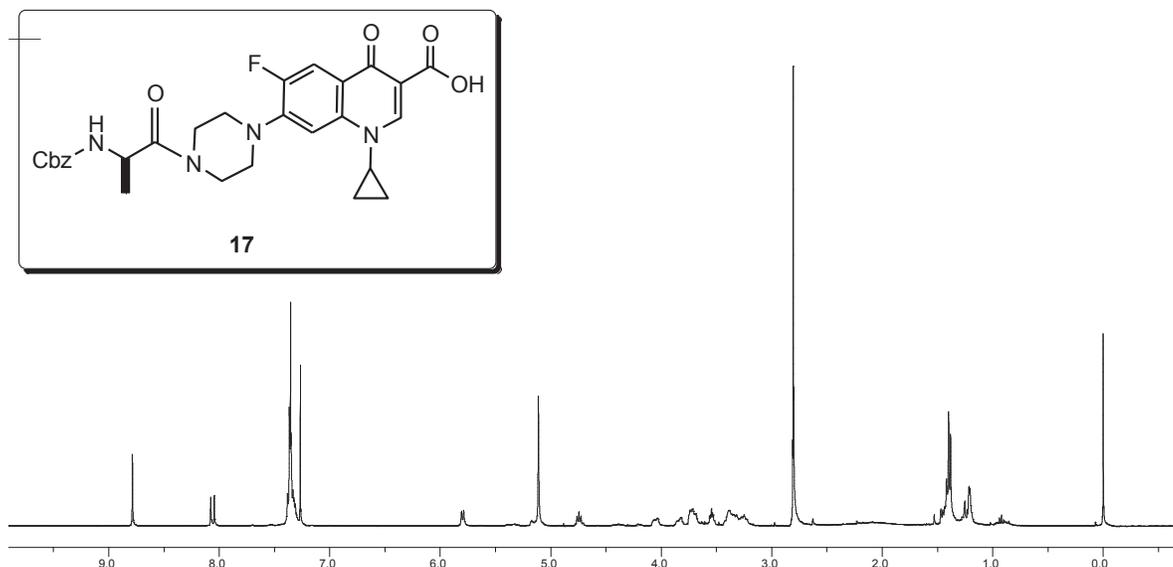
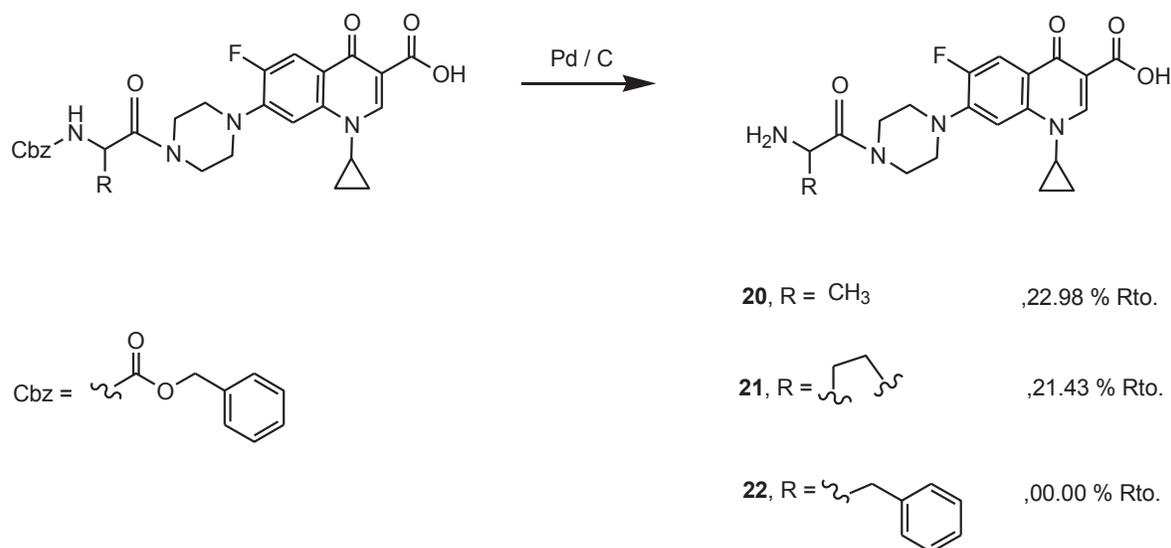


Figura 10. Espectro del compuesto Cbz-HN-Ala-Cpx (compuesto **17**).

Para obtener las moléculas *N*-desprotegidas se realizó una hidrogenación catalítica a las moléculas **17**, **18** y **19** a presión atmosférica empleando Pd/C como catalizador y metanol como disolvente, para poder liberar a la molécula del grupo protector Cbz. Esquema 10.



Esquema 10. Hidrogenólisis catalítica para la obtención de derivados de quinolona.

2. Pruebas biológicas de los derivados de quinolona

En este apartado del trabajo, los compuestos sintetizados de la sección anterior se ponen a prueba para determinar su actividad biológica ante bacterias (Gram positivos o Gram negativos). En el siguiente esquema se muestran las moléculas a las cuales se les realizan pruebas biológicas. Figura 11. Con la finalidad de observar si el grupo *N*-protector (Cbz) proporciona alguna actividad antimicrobiana se optó por realizar una comparación entre las moléculas *N*-protegidas y las *N*-desprotegidas.

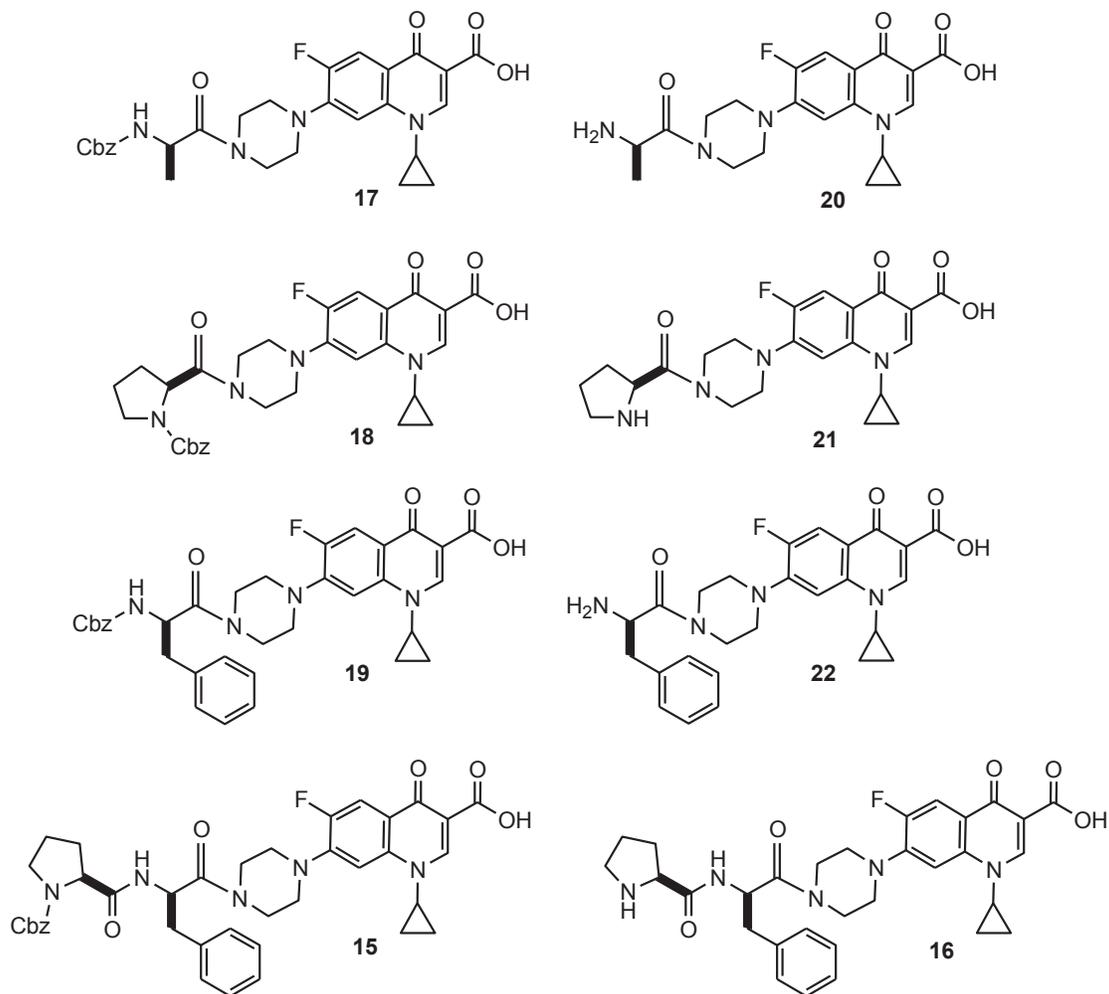


Figura 11. Productos finales que se someterán a pruebas biológicas.

Las pruebas microbiológicas para medir la actividad de los complejos se realizaron en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, siendo de origen clínico. ¿?

Se decidió utilizar estas bacterias para realizar los ensayos debido a la problemática en resistencias que actualmente se presentan. *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, inmóvil, agrupado en forma de racimos de uvas. Es un componente normal de la microflora humana nativa y es transportado de manera asintomática en diferentes partes del cuerpo. Es un microorganismo que genera rápidamente resistencia a nuevos antibióticos, la importancia de hacer las pruebas en este microorganismos es porque genera diversa enfermedades ambulatorias y hospitalarias.

La *Escherichia coli* ha sido objeto de más investigación científica que cualquier otro microorganismo. Esta bacteria es el principal habitante facultativo del intestino grueso y el que con mayor frecuencia es aislado como agente causal de infecciones de las vías urinarias y de heridas, neumonía, meningitis y una amplia variedad de enfermedades gastrointestinales.

Se trabajo con dos cepas susceptibles a ciprofloxacino. La prueba que se realizó para medir la actividad de los complejos fue la prueba de sensibilidad por difusión en agar, empleando el método de Kirby-Bauer que es el más empleado debido a los resultados satisfactorios que proporciona.

Se usaron sensidiscos impregnados con 5 µg de cada complejo basándonos en que ésta concentración es la utilizada para realizar la prueba con Ciprofloxacino de acuerdo a lo reportado por el National Committee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS) y se compararon con los halos control, mostrándose en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la prueba Kirby-Bauer para *Staphylococcus aureus*.

conc. / (µg)	Cbz-HN-Ala-Cpx-OH, (17)	Cbz-N-Pro-Cpx-OH, (18)	Cbz-HN-Fen-Cpx-OH, (19)	HN-Pro-Cpx-OH, (21)	H ₂ N-Fen-Cpx-OH, (22)	Cpx (control positivo)
1.56	11	12	6	12	8	19
3.13	12	14	7	17	10	23
6.25	12	14	8	19	12	25

12.50	13	15	9	21	14	26
25.00	14	16	10	23	16	28

Tabla 6. Resultados de la prueba de Kirby-Bauer para *Escherichia coli*.

conc. / (μg)	Cbz-HN- Ala-Cpx- OH, (17)	Cbz-N- Pro-Cpx- OH, (18)	Cbz-HN- Fen-Cpx- OH, (19)	HN-Pro- Cpx-OH, (21)	H₂N-Fen- Cpx-OH, (22)	Cpx (control positivo)
1.56	15	10	8	13	8	18
3.13	14	13	10	17	11	21
6.25	12	13	10	20	13	24
12.50	11	14	11	22	15	24
25.00	12	16	12	23	17	25

VI. CONCLUSIONES

1. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos microbiológicos se observa que la actividad está en función de la estructura de los complejos y no es debida al grupo protector por sí mismo.
2. En base a la actividad nula de los complejos frente a las cepas resistentes a ciprofloxacino, se observó que la presencia de aminoácidos puede ser favorable y que las moléculas sin grupo protector presentan una mejor actividad.

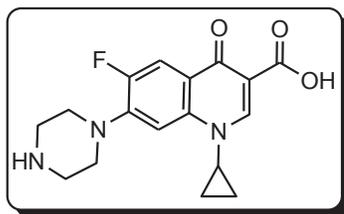
VII. PARTE EXPERIMENTAL

1. Aspectos Generales.

Previo a la realización de cada una de las reacciones, el material se lavo perfectamente y se enjuago con acetona, la cual se seco en estufa a una temperatura aproximada de 80° C. La purificación se realizó por recristalización con tres solventes, cada uno mencionado en la correspondiente metodología. La purificación por cromatografía se efectuó con Sílica gel 70 – 230 de la marca Mesh y como fase móvil los diferentes solventes especificados en las metodologías en particular. El monitoreo de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina por medio de cromatofolios Merck, siendo la fase estacionaria Sílica gel 60 F – 254 y la fase móvil la indicada en la metodología correspondiente. Se usaron como reveladores, vapores de yodo y luz ultravioleta. Los puntos de fusión se determinaron por el método Fisher en un equipo marca Fishe-Johns Mod. 4121.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protono (^1H) y carbono (^{13}C) fueron realizados en equipo Varian 200, Bruker 300 y Mercury 400. Usando los disolventes deuterados CDCl_3 , CD_3OH , DMSO, y Tetrametilsilano (TMS) como referencia. Los desplazamientos son proporcionados en partes por millón (ppm) y la constante de acoplamiento J en Hertz. La multiplicidad está indicada como: s, d, dd, t, c y m.

Extracción de Ciprofloxacino, (2)



En un matraz redondo de 250 ml provisto de agitación, se colocaron 500 mg de clorhidrato de Ciprofloxacino monohidratado y 15 ml de H_2O destilada por un periodo de 1 hora. Posteriormente, se filtro y la solución se trato con solución NaOMe/MeOH hasta saturación y la formación de un precipitado blanco, el cual se filtro y se seco a temperatura ambiente. Se obtuvo 0.44 g (98.7 % de rendimiento) de un polvo blanco que es soluble en DMSO.

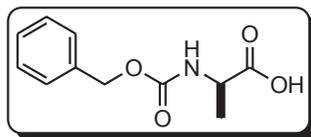
¹H RMN. (DMSO, 200 MHz) δ 1.21 (m, 4H, CH₂), 3.44-3.64 (dc, J = Hz, 4H, CH₂)7.51 (d, J = 7.7 Hz, 1H, CH), 7.84 (d, J= 13.56 Hz, 1H, CH), 8.628 (s, 1H, CH).

¹³C RMN. (DMSO, 50 MHz) δ 8.21 (CH₂), 35.35 (CH), 106.07, 110.66, 111.12 (CH), 139.21 (CF o C-piperazina), 166.00 (CO₂), 176.23 (CO).

2. Método general de N-protección de aminoácidos

En un matraz redondo de 250 ml provisto de agitación magnética y baño de hielo, se colocó una solución de NaOH 1N y 1.0 equivalente del amino ácido y 1.2 equivalente de cloroformiato de bencilo (Cbz). Después de 1 hora de agitación, se revisa que el pH de la solución aun se mantenga en 10, de lo contrario se adiciona NaOH 1N. Continuando después de 12 horas de agitación, se realizan lavados con H₂O, la fase acuosa se acidifica con HCl 1N a un pH aproximado a 3. El precipitado se extrajo con DCM, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentro en rotavapor.

Síntesis de Cbz-HN-Ala, (7)

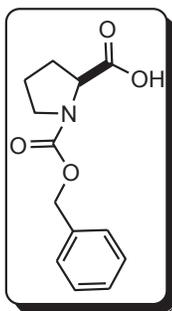


Seguendo el método general de N-protección se adicionaron 1.00 g (11.23 mmol) de L-alanina disuelto en 50 ml de una solución NaOH 1N. Continuando con la adición de 1.8 ml (13.47 mmol) de cloroformiato de bencilo. Obteniendo 2.34 g (93.23 % de rendimiento) de un polvo blanco con un p.f. 78 °C.

¹H RMN. (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.46 (d J = 7.3Hz, 3H, CH₃), 4.41 (c J = 7.14Hz, 1H, CH), 5.12 (d 2H, CH₂), 5.53 (d, J = 6.59Hz, 1H, NH), 5.05-5.36 (m 5H).

¹³C RMN. (CDCl₃, 200 MHz) δ 18.35 (CH₃), 49.42 (CH), 67.1 (CH₂), 128.11, 128.25, 128.53 (C's aromáticos), 136.03 (C *ipso*), 155.81 (CONH), 177.07 (CO).

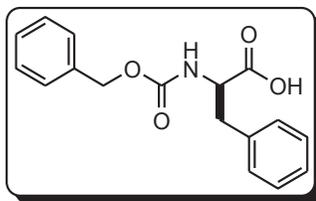
Síntesis de Cbz-N-Pro, (8)



Basados en la metodología general de *N*-protección de aminoácido se trato una solución de 1.00 g (8.68 mmol) de L-prolina disuelta en 50 ml de una solución NaOH 1N y 1.46 ml (10.42 mmol) de Cbz. Se obtuvo 2.0374 g (94.10 % de rendimiento) de un aceite transparente referente al compuesto 7.

¹ H RMN. (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.20 (m, 4H, CH₂), 3.57 (m, 2H, CH₂), 4.45 (m, 1H, CH), 5.19 (m, 2H, CH₂), 7.23-7.43 (m, 5H).

Síntesis de Cbz-HN-Fen, (9)

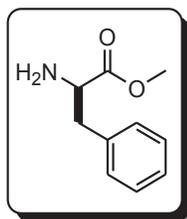


Prosiguiendo con el método general de *N*-protección una solución 1.00 g (6.05 mmol) de L-fenilalanina 5 que fue tratada con 1.02 ml (7.26 mmol) de Cbz que nos proporcionó 1.89 g (93.54 % de rendimiento) de un polvo blanco con un p.f. 66 °C.

¹ H RMN. (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.08 (dd, *J* = 6.2, 14 Hz, 1H, CH₂), 3.21 (dd, *J* = 5.4, 14 Hz, 1H, CH₂) 4.65 (dd, *J* = 8.0, 1H, NH), 7.11-7.32 (m, 10H).

¹³C RMN. (CDCl₃, 50 MHz) δ 37.67 (CH₂), 54.11 (CHCH₂), 67.11 (CH₂OCO), 127.16, 128.06, 128.20, 128.49, 128.61, 128.30 (C's aromáticos), 135.76, 136.01 (C's *ipso*), 155.84 (CONH), 176.00 (CO₂H)

Síntesis de H₂N-Fen-OMe, (10)



En un matraz redondo provisto de agitación magnética se introdujo una solución de 3.00 g (19.33 mmol) de L-fenilalanina disuelta en 30 ml de metanol. Prosiguiendo con una adición de 1.69 ml (23.16 mmol) de SOCl₂. Después de 12 horas de agitación, se concentró en rotavapor a presión reducida, prosiguiendo con lavados de DCM y Hexano, obteniéndose 3.76 g (95.95 % de rendimiento) de un polvo blanco con p.f. de 130 °C.

¹ H RMN. (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.09 (dd, *J* = 75.1, 14.48 Hz, 1H, CH₂), 3.23 (dd, *J* = 5.86, 14.29 Hz, 1H, CH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.31 (dd, *J* = 6.32, 7.33 Hz, 1H, CH), 7.13-7.53 (m, 5H).

¹³ C RMN. (CDCl₃, 50 MHz) δ 35.72 (CH₂), 53.72 (CH₃), 54.25 (CH), 128.27, 128.44, 128.53 (C's aromáticos), 133.87 (C *ipso*), 170.2 (CO₂).

3. Procedimiento general para las reacciones de acoplamiento

Acoplamiento de aminoácidos vía un anhídrido mixto.

En un matraz provisto de agitación se colocó una solución de 1.0 equivalente de amino éster y THF tratados con 2.0 equivalentes de trietilamina (TEA). Se deja reaccionar por un periodo de 1 horas.

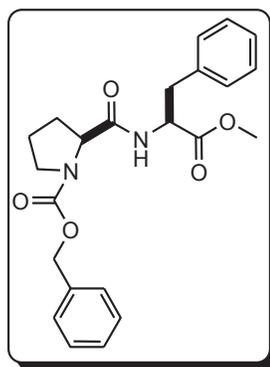
En otro matraz con agitación magnética y baño de hielo, se trata una solución de 1.0 equivalentes del aminoácido *N*-protegido en THF y 1.0 equivalente de TEA la cual se trató a goteo lento con 1.05 equivalente de una solución 0.2 M de cloroformiato de isobutilo (*i*-BBCI) en THF. Se dejó reaccionar por 20 minutos a una temperatura aproximada de 0 a 4 °C.

Transcurridas los dos periodos de reacción, el amino éster activado se adiciona lentamente al matraz del aminoácido *N*-protegido y se deja ascender la temperatura lentamente durante las 12 horas de reacción.

Al finalizar la reacción, se filtra a gravedad y el líquido se concentra. Se resuspende el residuo en AcOEt y se realizan 3 lavados con agua. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se concentra en rotavapor a presión reducida.

Una solución de 1 equivalente de Cbz-N-aminoácido-OH y DCM fueron tratados con 1 equivalente de Ciprofloxacino, 1.05 equivalentes de 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt), 1.05 equivalentes de Hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-urano (HBTU) y 2.0 equivalentes de Diisopropiletilamina (DIEA), dejando la mezcla en agitación por 12 horas. Posteriormente se realizaron lavados con H₂O destilada y solución de NaHCO₃, la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y se concentra en rotavapor a presión reducida y sin temperatura.

Síntesis de Cbz-HN-Pro-Fen-OMe, (11)

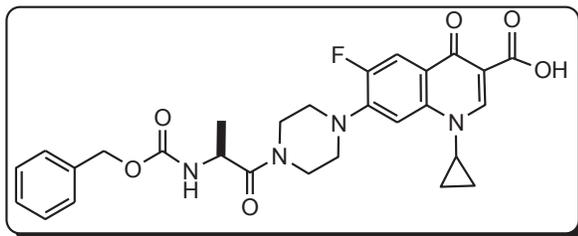


Siguiendo el procedimiento general de acoplamiento I una solución de 0.95 g (4.41 mmol) de L-Fen-OMe **9** disuelta en 22.07 ml de THF y tratada con 1.53 ml (11.03 mmol) de TEA, seguida de la adición de la mezcla formada por 1.00 g (4.01 mmol) de Cbz-N-Pro **7** disuelta en 20.08 ml de THF y tratada con 0.52 ml (4.01 mmol) de *i*-BbCl disueltos en 2 ml de THF anhidro. Se aislaron 1.05 g (58.52 % de rendimiento) del compuesto **10** como un aceite ambar.

¹ H RMN. (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.09 (dd, *J* = 75.1, 14.48 Hz, 1H, CH₂), 3.23 (dd, *J* = 5.86, 14.29 Hz, 1H, CH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.31 (dd, *J* = 6.32, 7.33 Hz, 1H, CH), 7.13-7.53 (m, 5H).

¹³ C RMN. (CDCl₃, 50 MHz) δ 35.72 (CH₂), 53.72 (CH₃), 54.25 (CH), 128.27, 128.44, 128.53 (C's aromáticos), 133.87 (C *ipso*), 170.2 (CO₂).

Síntesis de Cbz-HN-Ala-Cpx-OH, (**18**)

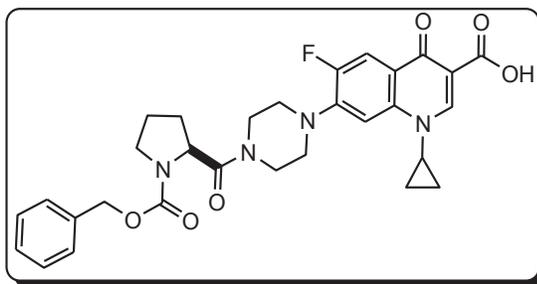


Bajo el procedimiento general de acoplamiento II, en un matraz redondo de 50 ml se colocaron 0.50 g (2.24 mmol) de Cbz-HN-Ala **6** en 40 ml de DCM, 0.74 g (2.24 mmol) del compuesto **2**, 0.32g (2.35 mmol) de HOBt, 0.89 g (2.35 mmol) de HBTU y 0.78 ml (4.48 mmol) de DIEA y se dejaron en agitación por 12 horas. Se percoló con AcOEt y se aisló 1.19 g (98.30 % de rendimiento) de un polvo blanco con un p.f. 228 °C del compuesto **14**.

¹ H RMN. (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.09 (dd, *J* = 75.1, 14.48 Hz, 1H, CH₂), 3.23 (dd, *J* = 5.86, 14.29 Hz, 1H, CH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.31 (dd, *J* = 6.32, 7.33 Hz, 1H, CH), 7.13-7.53 (m, 5H).

¹³C RMN. (CDCl₃, 50 MHz) δ 35.72 (CH₂), 53.72 (CH₃), 54.25 (CH), 128.27, 128.44, 128.53 (C's aromáticos), 133.87 (C *ipso*), 170.2 (CO₂).

Síntesis de Cbz-HN-Pro-Cpx-OH, (**19**)

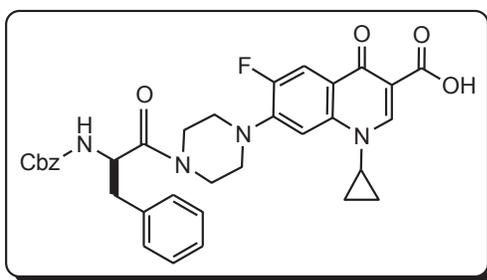


En base al procedimiento general de acoplamiento II, en un matraz de 50 ml provisto de agitación se introdujo una solución de 0.50 g (2.00 mmol) de Cbz-N-Pro **7** y 40 ml de DCM, posteriormente fue tratada con 0.66 g (2.00 mmol) de Cpx **2**, 0.28 g (2.10 mmol) de HOBT, 0.798 g (2.10 mmol) de HBTU y 0.698 ml (4.00 mmol) de DIEA. Posterior a una percolada en la cual se uso como eluyente AcOEt, se obtuvo 1.11 g (98.63 % de rendimiento) de un polvo blanco de el producto Cbz-N-Pro-Cpx-OH **15** que presentó un p.f. de 177 °C.

¹ H RMN. (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.09 (dd, *J* = 75.1, 14.48 Hz, 1H, CH₂), 3.23 (dd, *J* = 5.86, 14.29 Hz, 1H, CH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.31 (dd, *J* = 6.32, 7.33 Hz, 1H, CH), 7.13-7.53 (m, 5H).

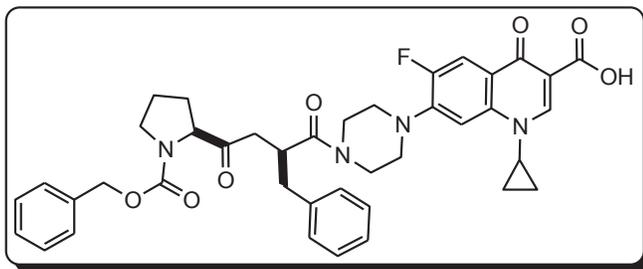
¹³ C RMN. (CDCl₃, 50 MHz) δ 35.72 (CH₂), 53.72 (CH₃), 54.25 (CH), 128.27, 128.44, 128.53 (C's aromáticos), 133.87 (C *ipso*), 170.2 (CO₂).

Síntesis de Cbz-HN-Fen-Cpx-OH, (**20**)



Tomando como base el procedimiento general para acoplamiento II, en un matraz se colocan 0.05 g (0.17 mmol) del compuesto 8 disuelto DCM, al cual se le agrego 0.05 g (0.17 mmol) del compuesto 2, 0.06g (0.18 mmol) de HBTU, 0.02 g (0.18 mmol) de HOBT y 0.04 g (0.33 mmol) de DIEA. Se dejó reaccionar por 12 horas a temperatura ambiente. Al termino de la reacción, se percoló con AcOEt obteniendo 0.099 g (72.24 % de rendimiento) de un compuesto blanco que funde a 00.00 (este compuesto no se la ha determinado el punto de fusión porque estaba en resonancia, es de los lotes realizados con yola) °C.

Síntesis de Cbz-HN-Pro-Fen-Cpx-OH, (**16**)

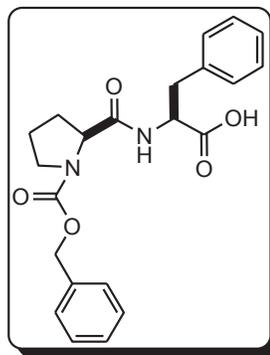


Guiándonos por el procedimiento general de acoplamiento II, se colocaron en un matraz redondo de 50 ml provisto de agitación 0.50 g (1.26 mmol) del dipéptido **11** en 40 ml de DMC, 0.42 g (1.26 mmol) de Ciprofloxacino **2**, 0.18 g (1.32 mmol) de HOBT, 0.50 g (1.32 mmol) de HBTU y 0.44 ml (2.52 mmol) de DIEA. Terminada la reacción se percoló con AcOEt recuperándose 0.8443 g (94.30 % de rendimiento) del compuesto **17**, el cual funde a 93 °C.

¹H RMN. (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.09 (dd, *J* = 75.1, 14.48 Hz, 1H, CH₂), 3.23 (dd, *J* = 5.86, 14.29 Hz, 1H, CH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.31 (dd, *J* = 6.32, 7.33 Hz, 1H, CH), 7.13-7.53 (m, 5H).

¹³C RMN. (CDCl₃, 50 MHz) δ 35.72 (CH₂), 53.72 (CH₃), 54.25 (CH), 128.27, 128.44, 128.53 (C's aromáticos), 133.87 (C *ipso*), 170.2 (CO₂).

Síntesis de Cbz-HN-Pro-Fen-OH, (**11**)



En un matraz redondo de 50 ml provisto de agitación magnética y baño de hielo se colocaron 0.63 g (1.41 mmol) del dipéptido **10** que fue disuelto en 6.3 ml de THF:H₂O:MeOH (25:3:0.1) y posteriormente tratado con 2.12 ml de LiOH 2M. Después de 3 horas de reacción, la mezcla de reacción se llevó a un pH de 3 con HCl 1N. La extracción se realizó con AcOEt y se

secó con Na₂SO₄. Después de la purificación del crudo por medio de cromatografía en columna empleando como eluyente Hexano:AcOEt:AcOH (1:1:0.1) se aislaron 0.48 g (85.62 % de rendimiento) del compuesto **6** como aceite amarillo paja.

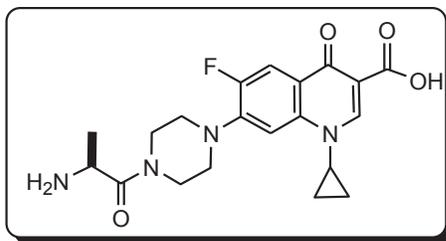
¹H RMN. (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.09 (dd, *J* = 75.1, 14.48 Hz, 1H, CH₂), 3.23 (dd, *J* = 5.86, 14.29 Hz, 1H, CH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.31 (dd, *J* = 6.32, 7.33 Hz, 1H, CH), 7.13-7.53 (m, 5H).

¹³C RMN. (CDCl₃, 50 MHz) δ 35.72 (CH₂), 53.72 (CH₃), 54.25 (CH), 128.27, 128.44, 128.53 (C's aromáticos), 133.87 (C *ipso*), 170.2 (CO₂).

4. Método general de N-Desprotección de Dipéptidos.

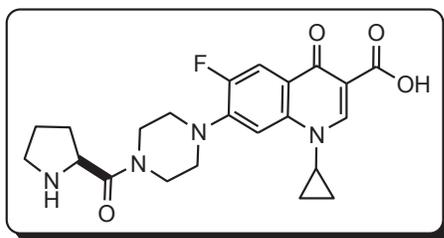
En un matraz de fondo Redondo provisto de agitación magnética se trató 1 equivalente del dipéptido N-protégido disuelto en metanol, con 10% (w/w) de Pd/C al 10% y se saturó con H₂. Se dejó reaccionar por 4 h a presión atmosférica. Finalizada la reacción se realizó una cristalización especificada para cada síntesis. **Revisar el paso de filtrado.**

Síntesis de H₂N-Ala-Cpx-OH (**21**)



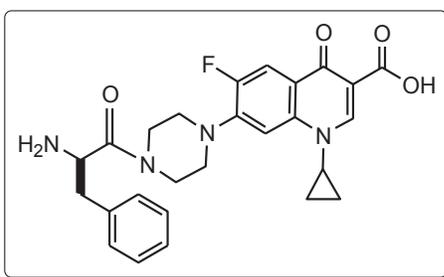
De acuerdo a la metodología general de N-desprotección, se trataron 0.24 g (0.45 mmol) del dipéptido N-protégido **14** y disuelto en metanol con 0.015 g de Pd/C al 10 % y se dejó reaccionar por un periodo de 4 horas en atmósfera de Hidrogeno. Transcurridas las 4 horas de reacción, se recrystalizó en tres disolventes DCM/MeOH/AcOEt obteniendo 0.04 g (22.98 %) del compuesto N-desprotegido que funde a 206 °C.

Síntesis de HN-Pro-Cpx-OH, (**22**)



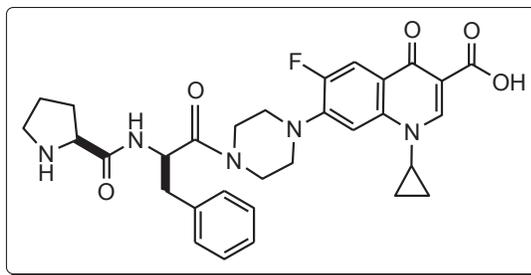
En un matraz redondo se trató una mezcla de 0.4968 g (0.88 mmol) de el compuesto protegido **15** en metanol como disolvente con 0.0496 g de Pd/C al 10 % en atmosfera de Hidrógeno, tal mezcla se dejo reaccionar por un periodo de 4 horas. Posterior a la reacción, se realizó una recristalización a tres disolventes DCM/MeOH/AcOEt, obteniendo 0.081 g (21.43 % de rendimiento) de un polvo color amarillo claro con punto de fusión de 254 °C.

Síntesis de H₂N-Fen-Cpx-OH, (**23**)



Siguiendo el procedimiento general de N-desprotección se realizó la hidrogenólisis de 00.00 g (00.00 mmol) del compuesto N-protegido **16**, en presencia de 0.00 g de Pd/C en atmósfera de Hidrogeno por un periodo de 4 horas. Posterior a la reacción se llevo a cabo una recristalización a tres disolventes DCM/MeOH/AcOEt dando 00.00 g (00.00 %) del compuesto **20**, el cual presenta un punto de fusión de 00.00 °C.

Síntesis de H₂N-Pro-Fen-Cpx-OH (**17**)



A 0.15 g (0.21 mmol) del dipéptido **17** N-protégido se le efectuó una hidrogenólisis catalítica con 0.015 g de Pd/C al 10 % por un lapso de 4 horas en una atmósfera de hidrogeno. Pasadas las horas de reacción se llevo a cabo una recristalización a tres disolventes DCM/MeOH/AcOEt obteniendo 0.039 (32.13 %) de compuesto de color verde olivo que funde a una temperatura de 210 °C.

5. Prueba de sensibilidad por difusión en agar.

El método empleado para realizar esta prueba fue el método de Kirby-Bauer.

El siguiente procedimiento se realizó a las 2 cepas, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*:

Se sembraron las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en placas de agar Mueller-Hinton y se dejaron incubar a 37 ° C durante 24hr. Se tocaron con un asa estéril 3 colonias del patógeno crecido en el medio de cultivo y se inocularon en un tubo con 3 ml de caldo Mueller-Hinton, se homogenizó agitando y se dejó incubar durante 4-6 h hasta que se alcanzó una turbidez comparable con el estándar del tubo número 0.5 de la escala McFarland (cuya turbidez es equivalente a la provocada por crecimiento de 150 000 000 bacterias).

* Si no se alcanza la turbidez deseada se deja incubar por más tiempo y si se tiene un exceso de ésta, se diluye agregando más caldo Mueller-Hinton estéril.

Enseguida se sumergió un hisopo estéril en la suspensión bacteriana estandarizada, (el hisopo fue rotado varias veces y presionado firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido para remover el exceso de inóculo) y se utilizó para inocular de forma homogénea toda la superficie de una placa de agar Mueller Hinton.

*La técnica que se utilizó para inocular la placa fue estriado sobre toda la superficie, se giró 90 ° y se repitió el rayado para asegurar la distribución uniforme del inóculo, como paso final se

pasó el hisopo sobre los bordes del agar, después se dejó secar aproximadamente 5 minutos y enseguida se colocaron los sensidiscos impregnados con 5 µg/ml de cada compuesto a probar.

Los sensidiscos se colocaron con pinzas estériles presionando un poco sobre el agar con la finalidad de que el antibiótico difundiera, se colocaron cuidando conservar una distancia no menor de 24 milímetros entre cada uno de ellos y procurando no colocar más de 5 sensidiscos por placa. La placa con los sensidiscos fue invertida, rotulada y se llevó a la incubadora a 37°C durante 18 – 24 h.

Pasado el tiempo de incubación se midieron los diámetros de inhibición en milímetros con regla y se comparó la sensibilidad, resistencia o sensibilidad intermedia con referencia que presenta el ciprofloxacino en el esquema reportado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y por el BD BBL TM Sensi-Disc para el análisis de sensibilidad antimicrobiana.

VIII. REFERENCIAS

1. H.R.V. Arnstein, D. Morris, The structure of a peptide containing α -amino-adipic acid in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*, *Biochem. J.*, Vol 76, **1960**, Pag.1153-1157.
2. Leshner, G.Y.; Froelich, E.J.; Gruett, M.D.; Bailey, J.H.; Brundage, P.R., 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Chem.*, Vol. 5, **1962**, Pag. 1063-1065.
3. Van Bameke, J.M. Michot, J. Van Eldere and P.M. Talkens. Quinolones in 2005. An update. *Clin.Mich. Inf. Review article*. Vol. 11, **2005**, Pag. 256-280.
4. Bombelli, C., Borocci, S., Lupi, F., Mancini, G., Mannina, L., Segre, A.L., Viel, S., Chiral Recognition of Dipeptides in a Biomembrane Model, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 126, **2004**, Pag. 13354-13362.
5. S. Soper T., M. Manning J., Different Modes of Action of Inhibitors of Bacterial D-Amino Acid Transaminase A target enzyme for the design of new antibacterial agents, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 256, No. 9, **1981**, Pag. 4263-4268.
6. O. Ziv, J. Hong, Y. Shai, A repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, No. 23, **1997**, Pag. 14643-14649.
7. K. Davtyan T., S. Hakobyan I., E. Murandyan R., G. Hovhannisyanyan H. S. Gabrielyan E., Evaluation of amino acids as mediators for the antibacterial activity of iodine-lithium- α -dextrin in vitro and in vivo, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 59, **2007**, Pag. 1114-1122.
8. Russell, P. E., Milling, R. J., and Wright, K. (1995) in *Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends* (Hunter P. A., Darby G. K., and Russell N. J., eds) Pag. 67-85, Cambridge University Press, Cambridge.
9. Koga, H.; Itoh, A.; Murayama, S.; Suzue, S.; Irikura, T., Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8- disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.*, Vol. 23, **1980**, Pag. 1358-1363.
10. Chu, D.T.W.; Fernandes, P.B., Structure-activity-relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 33, No. 2, **1989**, Pag.131-135.
11. Nikaido H, Thanassi DG. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemoter*, 37, **1993**, 1393-1399.
12. Kevan L, Wang JC. Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base-pairs of deoxyribonucleic acid and $\alpha 2\beta 2$ protein core. *Biochemistry*, 19, **1980**, 5229-5234.
13. García-Arata MI, Alarcón T, López-Brea M. Emergence of resistant isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. Baumannii* complex in a Spanish hospital over a five-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15, **1996**, 512-515.
14. Nakamura S. Mechanisms of quinolone resistance. *J Infect Chemother*, 3, **1997**, 138.
15. Wingender W, Graefe KH, Gau W, Forster D, Beermann D, Schacht P. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after oral and intravenous administration in healthy volunteers. *Eur J Clin Microbiol*, 3, **1984**, 355-359.

16. Lecomte, S.; Moreau, N.J.; Chenon, M.T., NMR investigation of pefloxacin-cation-DNA interations: the essential role of Mg^{2+} . *Int. J. Pharm.*, Vol. 164, No. 1,2, **1998**, Pag. 61-71.
17. Poole, K., Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 44, No. 9, **2000**, Pag. 2233-2241.
18. Hooper, D.C., Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases and anti-topoisomerases resistance. *Clin. Infect. Dis.*, Vol. 27, No. 1, **1998**, Pag. S54-S63.
19. Kaatz, G.W.; Seo, S.M., Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 41, No. 12, **1997**, Pag. 2733-2737.