



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
NUEVOS DERIVADOS DE FLUOROQUINOLONA
SUSTITUIDOS EN LA POSICION 7”**

TESIS

QUE PRESENTA:

Q.F.B. YOLANDA VALENCIA BARAJAS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ASESOR:

D.C. LUIS CHACÓN GARCÍA

MORELIA, MICHOACÁN, SEPTIEMBRE DE 2010

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Diseño Molecular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas bajo la asesoría del Dr. Luis Chacón García. Se contó con apoyo económico CONACYT 47907 CIC-UMSNH 2.18.

Asimismo, la QFB Yolanda Valencia Barajas contó con beca de maestría otorgada por CONACYT.

Las pruebas de actividad biológica se realizaron en el laboratorio del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con el apoyo de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa.

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

“Síntesis de nuevos derivados de Fluoroquinolona”. Quinta reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Zacatecas, Zac. Mayo de 2009.

“Síntesis y actividad antimicrobiana de nuevos derivados de Fluoroquinolona”. Cuarto Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología, celebrado durante los días 12 y 13 de noviembre de 2009.

“Síntesis y actividad antimicrobiana de nuevos derivados de Fluoroquinolona”. Primer Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, realizado en la ciudad de Uruapan, Mich. en noviembre de 2009.

Dedicatoria

A mis padres:

Hoy en este día en el que culmino un nuevo ciclo de mi vida, en el cual hago una pausa en mí caminar, sólo para agradecer a las dos personas más importantes en mi vida, a las que debo en todo momento amar y agradecer por existir y permitirme encontrarme en esta nueva etapa de crecimiento profesional, pero sobre todo impulsarme en todo momento así como ayudarme a sostenerme y levantarme de cada tropiezo a través de su amor y apoyo incondicional, quienes sin escatimar esfuerzo alguno sacrificaron gran parte de su vida para verme convertido en una persona de provecho y quienes siempre me recordaron que el señor es la guía, y con los que siempre podré contar, mis padres Gudelia Barajas Castañeda y José Valencia Echeverría. Quienes me guiaron por el buen camino sabiendo ser duros cuando se requería, complacientes cuando lo merecía y amorosos a lo largo de toda mi vida, y a quienes nunca podré pagarles ni con todas las riquezas más grandes del mundo; ante todo esto solo me queda decir por siempre y por todo gracias...mamá y papá.

¡Que Dios los bendiga!

A mis hermanos:

De los seres que aprendo cada día, con quienes he compartido la dicha que ofrece nuestro hogar y familia, quienes han sido mis amigos y confidentes, y de quienes recibo siempre su cariño y apoyo incondicional Alicia, Gudelia, J. Manuel, Noé y Juan Diego Valencia Barajas.

A mis Tíos:

Isaac, Eduardo, Leodeli, Pedro y Aurora por su amistad, cariño y apoyo que siempre me brindan y quienes me han acompañado en cada una de las diferentes etapas de mi vida. ¡Gracias!

A mi esposo y mi hijo:

Joel Ayala Sistos y Alexander Ayala Valencia ya que con su cariño, así como comprensión han motivado y alegrado mi vida, por ser las personas que me transmiten su alegría y con quienes he encontrado la felicidad. ¡Gracias mis dos amores!

Agradecimientos

A mi asesor de tesis: Dr. Luis Chacón García, por brindarme la oportunidad de la realización de este proyecto, por su asesoría, paciencia, confianza, amistad, dedicación, apoyo moral y académico ante mí, durante la estancia de la maestría. Gracias y mi más sincero afecto y respeto hacia usted.

A mis maestros: Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, Dr. Joel Edmundo López, Dra. Judit Aviña, Dra. Claudia Contreras, M.C. Rocío Lara, Prof. Emiliano Pérez y Prof. Salvador Martínez quienes respetando su trabajo me hicieron participe de su sabiduría y que no sólo me transfirieron el conocimiento, sino me proporcionaron las herramientas necesarias para la toma de las mejores decisiones en el campo laboral al cual pretendo incorporarme. A demás de que de ellos aprendí la importancia, conocimiento y compañía que dan los libros los cuales abrieron mi mente y mejoraron mis expectativas, pero más que nada los valores y éticas que me infundieron, tanto profesional como personalmente.

A todos mis amigos: con los cuales he crecido y descubierto el mundo, los que me han dejado escoger como a otra parte de mi familia, que también comparten mis triunfos y descalabros, los cuales son un apoyo más; compañeros de vida, con los cuales me han dado la oportunidad de afianzar el verdadero valor de la amistad gracias a todos mis compañeros de laboratorio y a Marbella, René, Alfredo, Lucy, Selene y Alejandra.

Al personal por la ayuda técnica de datos espectroscópicos: Concepción Armenta y José Luis Salvador, gracias por su apoyo para la caracterización de este trabajo ya que sin ustedes no hubiera sido posible su realización.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas ya la Facultad de Químico-Farmacobiología: por la oportunidad que me brindo para llevar acabo mis estudios de postgrado y con ello mi superación personal.

Al CONACYT: por su apoyo económico para la realización de este proyecto de investigación, el cual no hubiera sido posible sin su valiosa cooperación.

Pero ante todo agradezca a Dios que me ha dado la vida y permitido culminar con esta etapa de mi vida, que no es sólo sino el abrir a la puerta de un comienzo a una nueva etapa de vida, en la cual no seré uno más, por que comprometido con la innovación, la actualización y la competitividad, lograré cada día con el cumplimiento de las nuevas metas planteadas.



D.C. Alejandra Ochoa Zarzosa

D.C. Judit Aviña Verduzco

M.C. María del Carmen Ramírez Medel

D.C. Carlos Cortés Penagos

*Por aceptar ser mis sinodales y por sus valiosas aportaciones en el
Trabajo experimental y escrito.*



ÍNDICE GENERAL

| CONTENIDO | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | III |
| LISTA DE COMPUESTOS | VII |
| ÍNDICE DE TABLAS | IX |
| ABREVIATURAS | X |
| I. RESUMEN | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN | 2 |
| III. ANTECEDENTES | 6 |
| 3.1. Historia de las quinolonas | 6 |
| 3.2. Mecanismo de acción de las quinolonas antibacterianas | 9 |
| 3.3. Relación estructura-actividad de las quinolonas | 12 |
| 3.4. Aminoácidos | 15 |
| IV. HIPÓTESIS | 17 |
| V. OBJETIVOS | 17 |
| 5.1. Objetivo general | 17 |
| 5.2. Objetivos específicos | 18 |
| VI. MATERIAL Y MÉTODOS | 20 |
| 6.1. Procedimiento general para la síntesis de los precursores sustituidos en la posición 7 de la fluoroquinolona | 20 |
| 6.2. Síntesis de compuestos derivados de amina sustituida en el carboxilo en posición 3 de la quinolona | 21 |
| 6.2.1. Esterificación de la quinolona | 21 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 6.3.- | Síntesis de compuestos derivados de aminoácidos sustituidos en la posición 7-(N'-piperacil) del ciprofloxacino. | 22 |
| 6.3.1. | N-Protección de los aminoácidos | 22 |
| 6.3.2. | Reacción de N-acilación de ciprofloxacino con α -aminoácidos protegidos | 22 |
| 6.3.3. | N-Desprotección de las nuevas fluoroquinolonas; CbzHN-aa-Cpx | 23 |
| 6.4. | Prueba de Difusión con Disco | 24 |
| 6.5. | Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de los nuevos análogos de fluoroquinolonas sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> , y <i>Staphylococcus aureus</i> | 25 |
| VII. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 26 |
| 7.1. | Obtención y caracterización de los nuevos compuestos derivados de fluoroquinolonas | 26 |
| 7.2. | Actividad antibacteriana | 34 |
| 7.2.1. | Actividad antimicrobiana de los N-aminoalquil fluoroquinolonas | 34 |
| VIII. | CONCLUSIONES | 45 |
| IX. | REFERENCIAS | 46 |
| X. | ANEXOS | 52 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura básica de las quinolonas (X = C o N). | 2 |
| Figura 2. Estructura del Ciprofloxacino 1 . | 3 |
| Figura 3. Aminoalquil fluoroquinolonas sustituidas en la posición 3 y 7. | 4 |
| Figura 4. Aminoacil fluoroquinolonas <i>N</i> -carboxibenciladas sustituidas en el nitrógeno dista de la piperazina en posición 7. | 4 |
| Figura 5. <i>N</i> -Aminoacil fluoroquinolonas sustituidas en el nitrógeno distal de la piperazina en posición 7. | 5 |
| Figura 6. Estructura del 1-etil-7-cloro-3-carboxiquinolona (26) subproducto que permitió obtener el ácido nalidíxico (27). | 6 |
| Figura 7. Estructura de las quinolonas de la primera generación. | 7 |
| Figura 8. Cronología de la aparición de las principales quinolonas. | 8 |
| Figura 9. Modelo propuesto de la interacción de las quinolonas consigo mismas y con el sitio de unión (ADN). | 11 |
| Figura 10. Relación estructura-actividad de la molécula de quinolona. | 12 |
| Figura 11. Aminoalquil fluoroquinolonas sustituidas en posición 3 y 7. | 18 |
| Figura 12. Aminoacil fluoroquinolonas sustituidas en posición 7 con aa. | 18 |
| Figura 13. Aminoalquil fluoroquinolonas. | 21 |
| Figura 14. Carbamatos de los diferentes aminoácidos elegidos. | 22 |

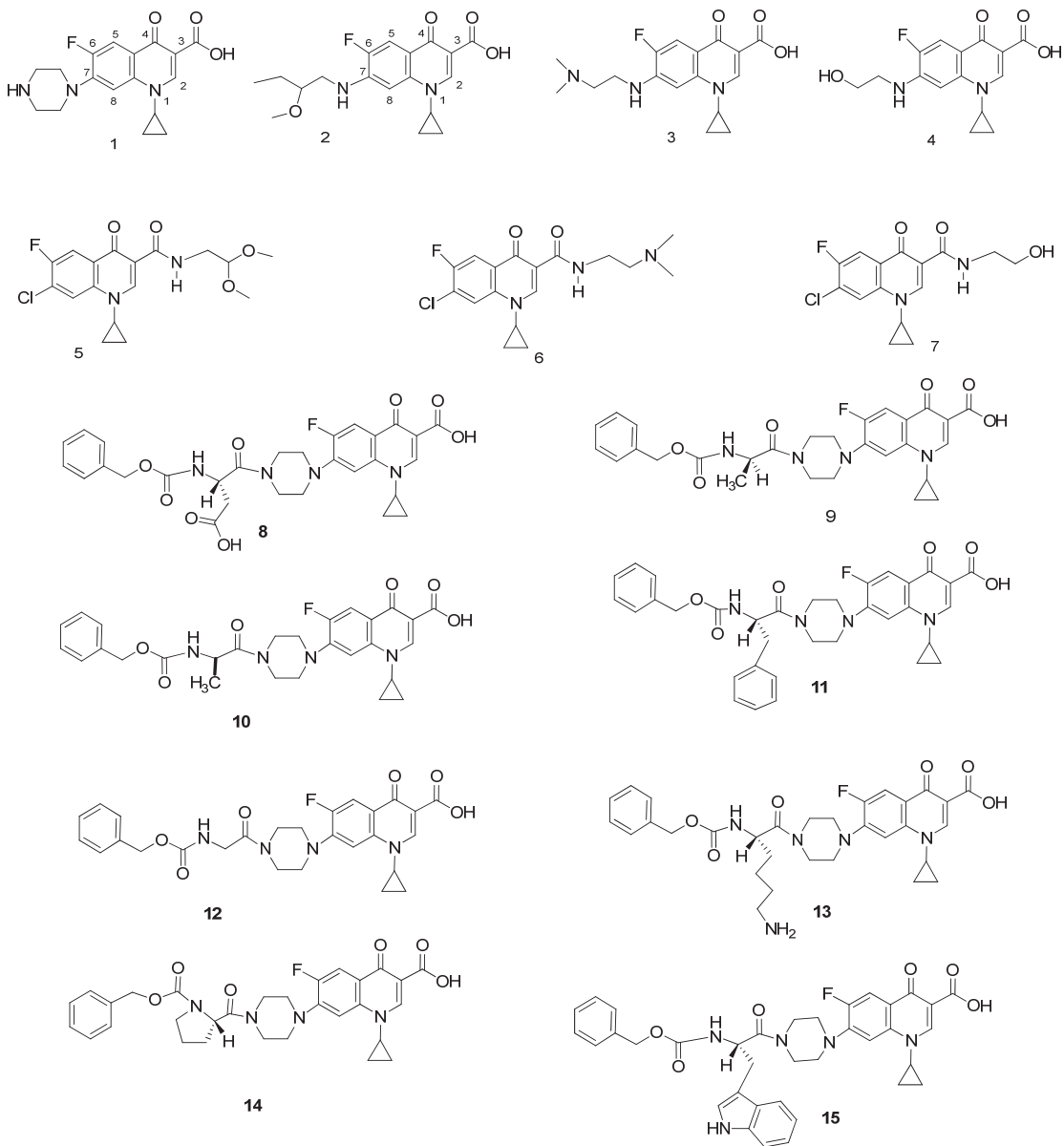
| | |
|--|----|
| Figura 15. Aminoacil fluoroquinolonas <i>N</i> -carboxibenciladas sustituidas en el nitrógeno dista de la piperazina en posición 7 | 23 |
| Figura 16. <i>N</i> -Aminoacil fluoroquinolonas sustituidas en el nitrógeno distal de la piperazina en posición 7. | 23 |
| Figura 17. Estructura de los compuestos sustituidos en C-7 (1-3) y sus análogos sustituidos en C-3 (4-6). | 27 |
| Figura 18. Espectros de RMN ¹ H. Hemiacetal de la FQ sustituida en posición 7(Comp 2). | 28 |
| Figura 19. Espectro de RMN ¹ H del Ciprofloxacino. | 29 |
| Figura 20. α-aminoácidos <i>N</i> -protegidos. | 30 |
| Figura 21. Compuestos derivados de aa-protegidos sustituidos en la posición 7 de la FQ. | 31 |
| Figura 22. Espectro de RMNH ¹ del aminoácido protegido y de su producto de reacción con la FQ. | 32 |
| Figura 23. Espectro de RMNH ¹ del aminoácido protegido y de su producto de reacción con la FQ. | 32 |
| Figura 24. Espectro de RMNH ¹ del compuesto 17; Cpx-Ala. | 33 |
| Figura 25. Actividad antimicrobiana del Ciprofloxacino, Compuestos sustituidos en C-7 y C-3 frente a <i>S. aureus</i> (A) y <i>E. coli</i> (B) en ensayos de difusión radial. | 35 |
| Figura 26. Actividad antibacteriana de nuevos análogos de FQ en posición 7 frente a <i>S.aureus</i> . | 36 |

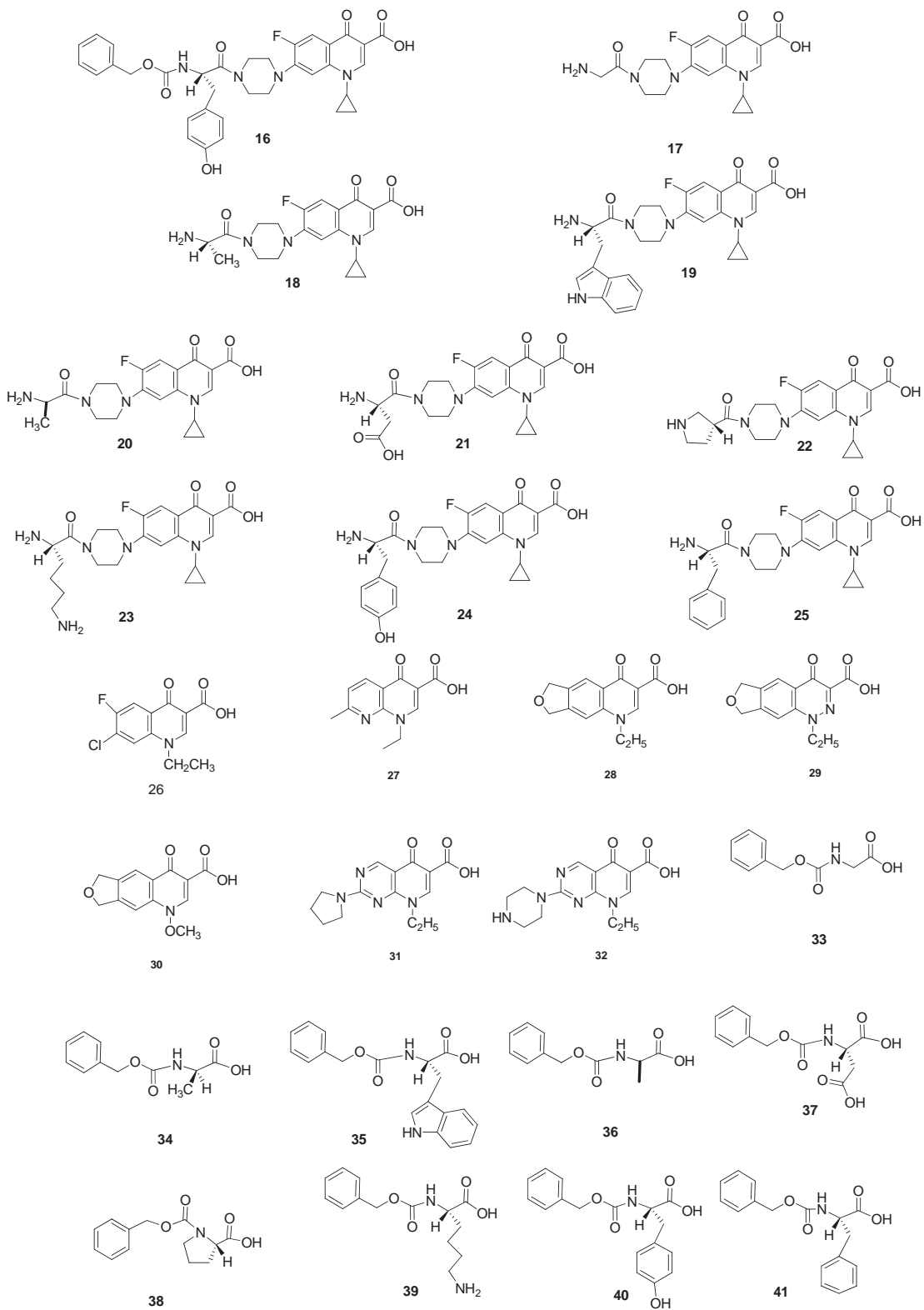
| | |
|---|----|
| Figura 27. Actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i> . Control: Cpx, Compuestos 2 y 4 FQ sustituidas en C 7 y Compuestos 6 y 7 FQ sustituidas en C 3. | 36 |
| Figura 28 . N- aminoacil fluoroquinolonas. | 38 |
| Figura. 29. Aminoacil fluoroquinolonas. | 39 |
| Figura 30. Actividad antimicrobiana de análogos de FQ frente a <i>E.coli</i> . | 40 |
| Figura 31. Actividad antimicrobiana de análogos de FQ frente a <i>S.aureus</i> . | 42 |
| Figura 32. Actividad antimicrobiana en pruebas de dilución en tubo frente a <i>S.aureus</i> y <i>E.coli</i> en $\mu\text{mol/mL}$. | 43 |
| Figura 33. Actividad antimicrobiana en pruebas de dilución en tubo frente a <i>S.aureus</i> y <i>E.coli</i> en $\mu\text{g/mL}$. | 44 |
| Figura 34. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 42. | 53 |
| Figura 35. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 1. | 53 |
| Figura 36. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en CDCl_3 de 2. | 54 |
| Figura 37. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en CDCl_3 de 3. | 54 |
| Figura 38. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 34. | 55 |
| Figura 39. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 9. | 55 |
| Figura 40. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 18. | 56 |

Figura 41. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de CDCl_3 . 56

Figura 42. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 43. 57

LISTA DE COMPUESTOS





ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de los compuestos 1-7. | 37 |
| Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de los compuestos 1-24. | 40 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|--|
| δ | Desplazamiento químico |
| aa | Aminoácido |
| Ala | Alanina |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| Asp | Asparagina |
| Cbz | Benciloxicarbonilo |
| CbzCl | Cloroformiato de bencilo |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Fen | Fenilalanina |
| Fig. | Figura |
| Gli | Glicina |
| hr | Hora |
| Lis | Lisina |
| mg | Miligramo |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| μg | Microgramo |
| μl | Microlitro |
| μm | Micromol |
| NCCLS | National Committee for Clinical Laboratory Standards |
| ppm | Partes por millón |
| Pro | Prolina |
| RMN de ^1H | Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |

Try Triptófano

Tyr Tirosina

I. RESUMEN

Las fluoroquinolonas son agentes antimicrobianos de amplio espectro que se han convertido en fármacos de primera elección para varias enfermedades infecciosas (Hooper 2003). Por ello en la actualidad las quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, ofloxacino, etc.) se encuentran dentro de los agentes antimicrobianos más utilizados. De acuerdo a los estudios realizados sobre su estructura, se ha observado que la naturaleza del sustituyente en posición 7 afecta significativamente su preferencia hacia la ADN girasa o ADN topoisomerasa IV; y por lo mismo, esta parte de la molécula ha sido la más sometida a cambios estructurales. En la búsqueda de compuestos potencialmente citotóxicos que presenten actividad frente a la enzima topoisomerasa, en el presente trabajo se obtuvo una serie de *N*-aminoalquil fluoroquinolonas y *N*-aminoacil fluoroquinolonas, a partir de una sustitución en el carbono de la posición 7 de la molécula, los análogos pueden ser usados como precursores de nuevos compuestos de interés. A los nuevos compuestos se les evaluó su actividad antimicrobiana frente a cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de Kirby-Bauer y pruebas de dilución en tubo. Los resultados de actividad antimicrobiana frente a ambas cepas de dos *N*-aminoalquil fluoroquinolonas sustituidas en la posición 7, muestran que a altas concentraciones los compuestos inhiben el crecimiento bacteriano de manera similar al ciprofloxacino. Sin embargo, al sustituir en la posición 3 se pierde completamente la actividad. Por otro lado se obtuvieron *N*-aminoacil fluoroquinolonas que presentaron mayor actividad antimicrobiana que el compuesto de referencia.

II. INTRODUCCIÓN

Las quinolonas por ser agentes antimicrobianos de origen completamente sintético, no son modeladas a partir de ningún antibiótico natural. El término quinolona se ha establecido para nombrar estructuras bicíclicas heteroatómicas, constituidas por un núcleo piridona-funcionalizada con un ácido carboxílico y fusionada a un anillo aromático. Las diferentes posiciones de las quinolonas se numeran partiendo del heteroátomo de nitrógeno como se indica en la figura 1 (Mella *et al.* 2000).

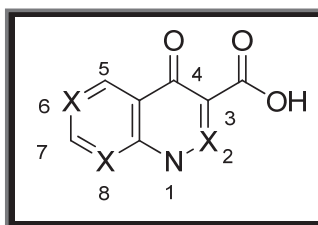


Figura 1. Estructura básica de las quinolonas (X = C o N).

Dependiendo de la incorporación de átomos de nitrógeno en el núcleo básico de las quinolonas, estas se clasifican en cuatro grupos diferentes:

- 1.- Naftiridinas: contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 8.
- 2.- Cinolinas: presentan un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 2.
- 3.- Quinolinas: se caracterizan por contener un único átomo de Nitrógeno en la posición 1.
- 4.- Piridopirimidonas: presentan nitrógenos en las posiciones 1,6 y 8.

De estas subfamilias, solo las 4-quinolinas y las 4-naftiridinas han sido llevadas a la clínica, aunque la más utilizada en la síntesis de nuevos análogos es la 4-quinolina por dar lugar a derivados con actividad notable (Gutierrez, Zufiaurre, 2004). La estructura básica o farmacóforo de estos compuestos, que ha sido sometida a más variaciones en sus sustituyentes, está constituido por un anillo piridona con un carboxilato en posición 3, el

núcleo central de la molécula es el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína. (Wolfson y Hooper, 1989).

Actualmente las quinolonas son de los agentes antimicrobianos más utilizados, entre los que destacan el ciprofloxacino, levofloxacino y ofloxacino. El ciprofloxacino (fig. 2) ha sido muy utilizado en la clínica terapéutica por presentar mayor espectro de actividad, con microorganismos Gram positivos y con una gran actividad sobre Gram negativos (Muytjens, 1983).

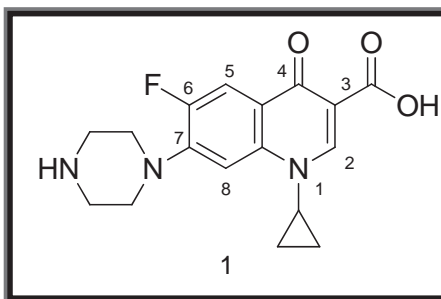


Figura 2. Estructura del Ciprofloxacino **1**.

De acuerdo a los estudios realizados sobre su estructura, se ha observado que la naturaleza del sustituyente en la posición 7 afecta significativamente la preferencia de las fluoroquinolonas por su blanco de acción molecular (ADN girasa o ADN topoisomerasa IV); por lo cual, esta parte de la molécula ha sido la más sometida a variaciones.

En el presente trabajo se presentan nuevos derivados de fluoroquinolona, a partir de sustituciones en las posiciones 3 o 7 de la molécula y evaluarlos frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli*. La primera serie de compuestos que se describe la constituyen las aminoalquil fluoroquinolonas (fig. 3).

El segundo grupo de compuestos que se expone, lo integran análogos de fluoroquinolona sustituidos en la posición 7 con aminoácidos previamente protegidos. Aunque no es el objetivo obtener las aminoacil fluoroquinolonas *N*-carboxibenciladas (fig.4) se consideró importante explorarlas para ver su efecto respecto a las fluoroquinolonas desprotegidas.

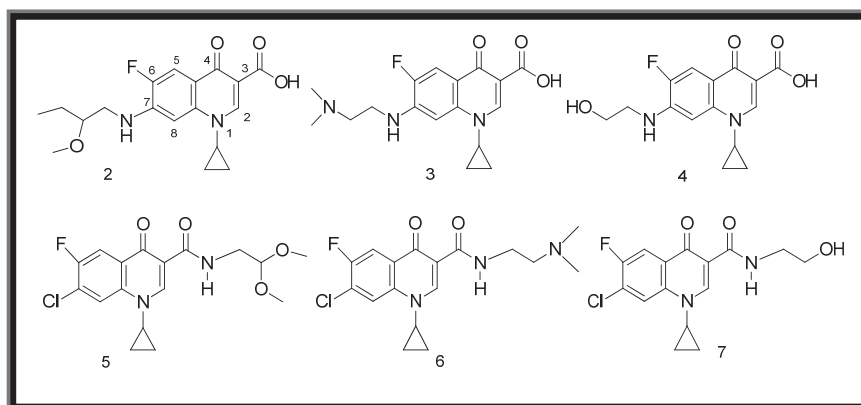


Figura 3. Aminoalquil fluoroquinolonas sustituidas en la posición 3 y 7.

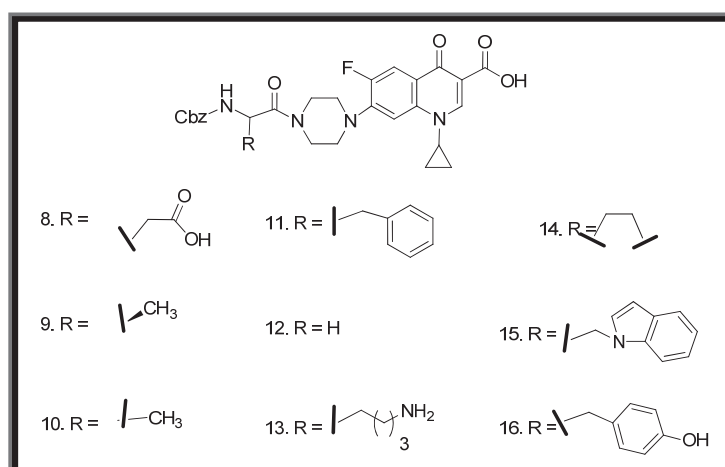


Figura 4. Aminoacil fluoroquinolonas *N*-carboxibenciladas sustituidas en el nitrógeno dista de la piperazina en posición 7.

La liberación del Cbz y desprotección de los aminoácidos de los compuestos previos, dio origen a las *N*-aminoacil fluoroquinolonas (fig.5). Los compuestos obtenidos enriquecen el panel de fluoroquinolonas con potencial uso terapéutico.

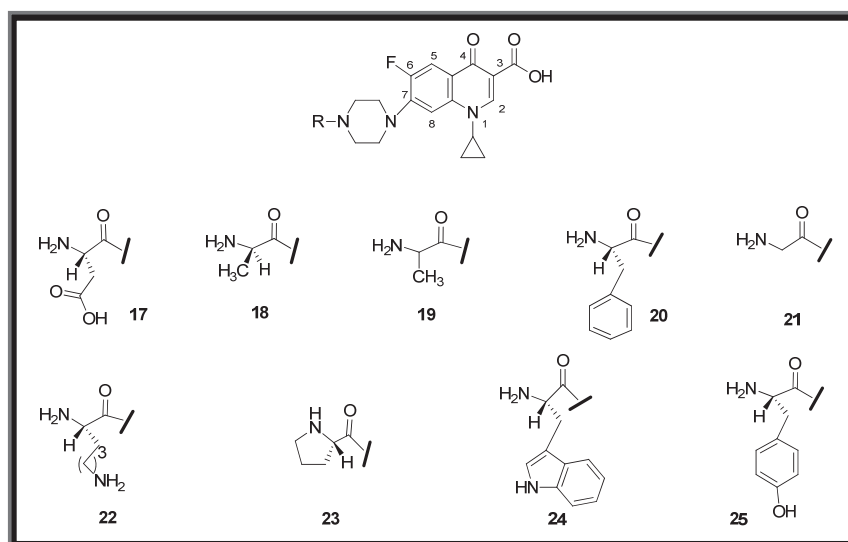


Figura 5. N-Aminoacil fluorquinolonas sustituidas en el nitrógeno distal de la piperazina en posición 7.

III. ANTECEDENTES

3.1. HISTORIA DE LAS QUINOLONAS

Desde la antigüedad el hombre ha tenido interés por descubrir las causas que generan una enfermedad y el modo de combatirla. Esta búsqueda ha permitido obtener antibióticos como la penicilina, descubierta por Fleming, o el ácido nalidíxico por Leshner en 1962.

En el año 1960, Barton obtuvo 80 compuestos quinolónicos, uno de los cuales fue aislado durante la síntesis del antimalárico cloroquina, el cual demostró tener actividad antimicrobiana (Barton 1960). Posteriormente al realizar una modificación a este compuesto **26** (fig. 5) permitió la síntesis del ácido nalidíxico (**27**) primer quinolona introducida en la clínica en 1967 en el tratamiento de las infecciones urinarias causadas por enterobacterias.

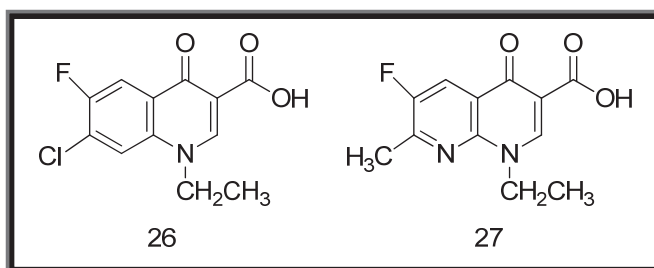


Figura 6. Estructura del 1-etil-7-cloro-3-carboxiquinolona (**26**) subproducto que permitió obtener el ácido nalidíxico (**27**).

La aparición del ácido nalidíxico que presentó una modesta actividad frente a microorganismos Gram negativos, marcó el inicio del desarrollo de las quinolonas como agentes antibacterianos. No fue hasta mediados de los años 70, cuando aparecen nuevos compuestos como; el cinoxacino, miloxacino, ácido piromídico, ácido oxolónico y pipemídico, que junto con el ácido nalidíxico conformaron la primera generación de quinolonas (figura 7).

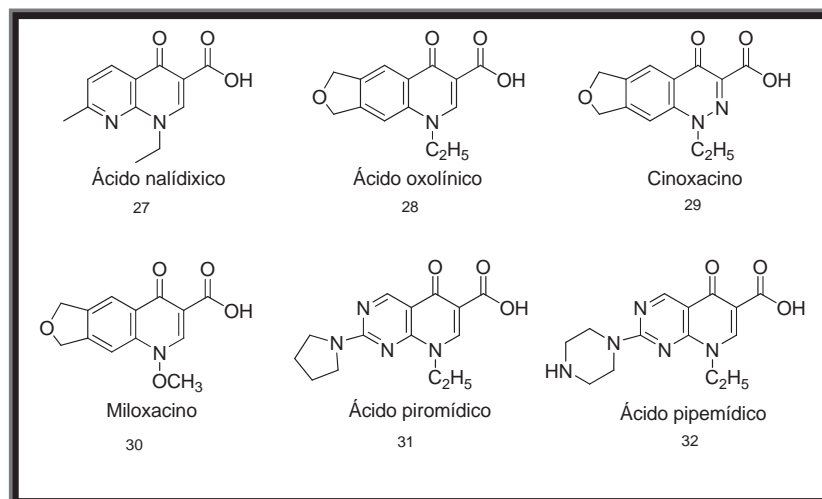


Figura 7. Estructura de las quinolonas de la primera generación.

Las modificaciones estructurales en la molécula de la quinolona, particularmente la introducción de fluor en la posición 6, dieron como resultado las quinolonas de segunda, tercera y cuarta generación, mejor conocidas en la literatura farmacéutica como fluoroquinolonas, ampliando con ello su espectro de acción contra los microorganismos Gram positivos (Emmerson *et al* 2003., Rohlfling *et al* 1976). La primera de ellas, el norfloxacin, fue descrita en 1973. Este compuesto resultó ser más activo que sus predecesores, pero por su mala absorción oral y por lo tanto bajos niveles de concentración en plasma después de su administración, su uso está limitado a infecciones de las vías urinarias.

La introducción de nuevos radicales en la quinolona dió lugar al pefloxacin, enoxacin, lomefloxacin, fleroxacin, ciprofloxacino y ofloxacin de manera simultánea. Estas nuevas fluoroquinolonas presentaron un mayor espectro de actividad (ampliado a organismos Gram positivos y con una gran actividad sobre Gram negativos). El ciprofloxacino y el ofloxacin presentaron mayor biodisponibilidad que sus predecesoras promoviendo su uso para el tratamiento de infecciones sistémicas, además de las infecciones urinarias.

La tercera generación de quinolonas incluye compuestos con mayor complejidad estructural con respecto a las generaciones anteriores. Estos presentan mayor espectro de

acción frente a Gram positivos, por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* (Pidcock 1994) así como patógenos anaerobios (Appelbaum 1999) y atípicos (Jacobs 1999). En este grupo se encuentran derivados como: esparfloxacino, temafloxacino, y tosufloxacino; además del grepafloxacino, moxifloxacino y levofloxacino.

Por otra parte, las quinolonas de cuarta generación al igual que las de tercera incluyen compuestos que actúan frente a Gram positivos, Gram negativos y atípicos. Sin embargo, las quinolonas de cuarta generación son más potentes y actúan frente a un mayor número de patógenos anaerobios (Appelbaum 1999). A Este grupo pertenecen el: clinafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, trovafloxacino, sitafloxacino y gemifloxacino.

En la figura 8 se esquematiza a de manera general la evolución generacional de las fluoroquinolonas.

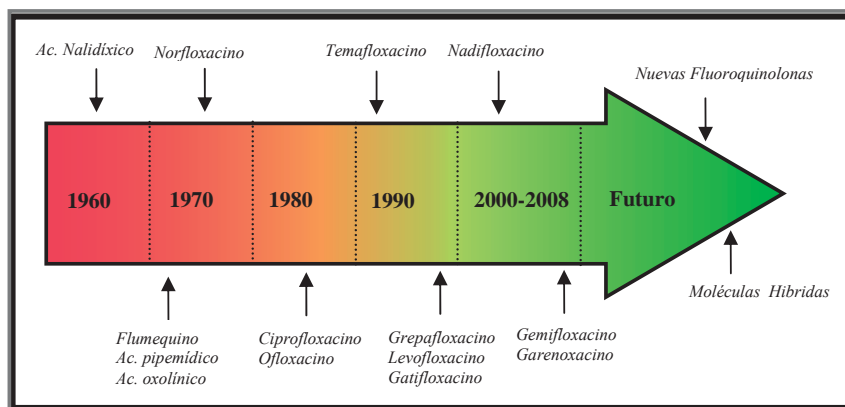


Figura 8. Cronología de la aparición de las principales Quinolonas.

El desarrollo de las quinolonas se ha visto favorecido, no solo por la posibilidad de modificar su estructura básica, sino también por la posibilidad de cambiar sustituyentes en todas las posiciones de la molécula, excepto la posición 3 que presenta el carboxilato y el carbonilo de la posición 4. Así, la actividad antibacteriana de la molécula de quinolona depende no solo de mantener el núcleo intacto, sino también de la naturaleza de los radicales periféricos que conforman la molécula así como también de su relación espacial como es el

caso del levofloxacin, que es el enantiómero puro, mas activo que el ofloxacin que es la mezcla racémica del mismo compuesto.

Cabe destacar, que no todos los compuestos sintetizados y activos han llegado a usarse en la práctica terapéutica. A muchos de ellos se les suspendieron sus ensayos clínicos y otros fueron retirados del mercado debido a problemas de toxicidad y/o efectos adversos, como fueron los casos del gemifloxacin, clinafloxacin, trovafloxacin o grepafloxacin (Rubinstein 2001).

De igual manera, algunas fluoroquinolonas han sido atractivas terapéuticamente para infecciones poco convencionales como es el caso del moxifloxacin que recientemente se ha considerado un buen candidato para el tratamiento de la úlcera de Buruli producida por *Mycobacterium ulcerans* y para la cual se cuenta en la actualidad con un tratamiento costoso y poco eficiente de rifampicina y estreptomicina combinadas. Cabe mencionar que, para la Organización Mundial de la Salud, la úlcera de Buruli es considerada como una de las 14 enfermedades tropicales desatendidas (neglected tropical diseases) y que representan un problema pues se dan principalmente en condiciones de pobreza y conllevan discapacidades funcionales, lo que genera costo laboral y menor posibilidad de pagar el tratamiento, lo cual da lugar a un círculo vicioso. Es importante mencionar el ejemplo pues algunas regiones de México, sobre todo las de mayor pobreza entran en este esquema por lo que hay una urgencia por encontrar soluciones a problemas locales del mismo tipo que la úlcera de Buruli (Bechtle 2010).

3.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS ANTIBACTERIANAS

Las quinolonas ejercen su acción antibacteriana tras penetrar en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los canales acuosos transmembranales de las porinas o de la capa de los lipopolisacáridos. Una vez dentro de la célula, actúan por mecanismos que son complejos y aunque bastante estudiados no del todo conocidos (Taléns 2001).

El blanco de acción de las quinolonas son dos topoisomerasas bacterianas tipo II: ADN girasa y topoisomerasa IV. Estas enzimas son responsables de resolver problemas topológicos en el ADN. Las quinolonas ejercen su efecto antibacteriano inhibiendo la actividad de la ADN girasa en bacterias Gram negativas y la topoisomerasa IV en Gram positivas (Barmard y Maxwel 2003, Holden 2001).

La DNA girasa es una enzima tetramérica compuesta de dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. La principal función de esta enzima es catalizar el superenrollamiento negativo del ADN (Bates y Maxwell 2005); es una enzima singular entre todas las topoisomerasas que se caracterizan por relajar el ADN, siendo la única capaz de superenrollarlo, actividad exclusiva de células procariotas; aún en organismos más evolucionados no se ha detectado una enzima capaz de llevar a cabo la función de la girasa (Kampranis y Maxwell 1998, Holden 2001).

La topoisomerasa IV es una enzima tetramérica de secuencia muy similar a la ADN girasa, la cual está codificada por los genes *parC* y *parE*. La topoisomerasa IV es capaz de relajar el ADN, pero no superenrollarlo, además de mostrar potente actividad decatenadora (Ruiz 2003, Bates y Maxwell 2005).

Las quinolonas ejercen su efecto antibacteriano involucrándose en el complejo ADN-Topoisomerasa formando un complejo ternario Quinolona-ADN-Topoisomerasa el cual se vuelve tóxico para la célula y provoca la muerte celular (Wilson y Gisvold 1998, Elsea *et al* 1992). Sin embargo, los detalles moleculares de cómo la quinolonas interfieren con la acción de la topoisomerasa o con el complejo de ADN-Topoisomerasa no están completamente claro. (Tuma *et al.* 2002, Kampranis *et al* 1998, Siegmund 2005).

Shen y colaboradores (1989) han propuesto que la inhibición de la ADN girasa se debe a la unión cooperativa entre la quinolona y el ADN, modelo proveniente de estudios realizados con el norfloxaciono donde se sugiere que en presencia de ATP, en el momento en que el ADN se encuentra roto por la enzima, cuatro moléculas de quinolona se unen a cuatro bases desapareadas (ADN de una sola hebra) que forman un hueco mediante puentes de hidrógeno

entre las bases y el grupo carbonilo de C-4 y el ácido carboxílico de C-3. Las moléculas de quinolona se unen además entre sí cooperativamente; probablemente mediante interacciones hidrofóbicas cola con cola entre los grupos del N-1 y apilamientos entre sus anillos aromáticos. Este modelo plantea que la enzima induce un sitio de unión específico para quinolonas en su sustrato, el material genético (fig. 9).

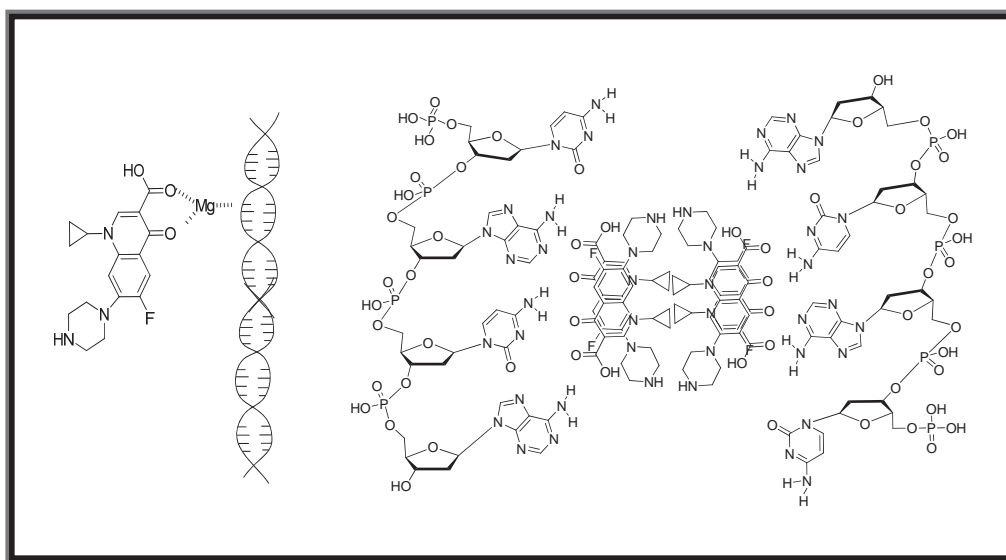


Figura 9.-Modelo propuesto de la interacción de las quinolonas consigo mismas y con el sitio de unión (ADN).

Esta propuesta implica cuatro moléculas de quinolona en cada sitio de unión; trabajos posteriores sugieren que dos moléculas pueden ser suficientes, pero el fundamento del modelo no se ve alterado. En ambos casos las moléculas de quinolona tienen sus grupos polares expuestos hacia fuera interactuando con las bases del ADN y la región interna no polar estabiliza el complejo por asociaciones lipofílicas (Mitscher 2005). El modelo de Shen no toma en cuenta el hecho de que se requiere Mg^{2+} para la interacción ADN-quinolona. Ha sido demostrado que el Mg^{2+} se une a las quinolonas mediante los grupos carbonilo y carboxilato C-3 y C-4. Se ha propuesto que las quinolonas se unen a los grupos fosfodiéster de la columna de ADN mediante una coordinación electrostática entre éstos, el Mg^{2+} y los grupos C-3 y C-4

del fármaco y que esta coordinación puede ser estabilizada por la interacción entre las bases y la quinolona (Noble *et al.* 2003).

Otra modificación que se ha hecho al modelo de Shen es incluir interacciones electrostáticas entre el sustituyente del C-7 de la quinolona y la subunidad B de la girasa (Turel 2002).

3.3. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LAS QUINOLONAS

A partir de la extensa búsqueda en la síntesis de nuevas quinolonas, se han logrado definir las características que pueden aportar diversos sustituyentes alrededor de la región farmacófora. Este estudio detallado de la relación estructura-actividad ha permitido asociar cada posición de la fluoroquinolona con su actividad específica, optimizando sus propiedades antimicrobianas y reduciendo resistencia y toxicidad (Hooper, 1998). En la figura 10 se muestra la actividad que presentan cada uno de los diferentes radicales de la quinolona.

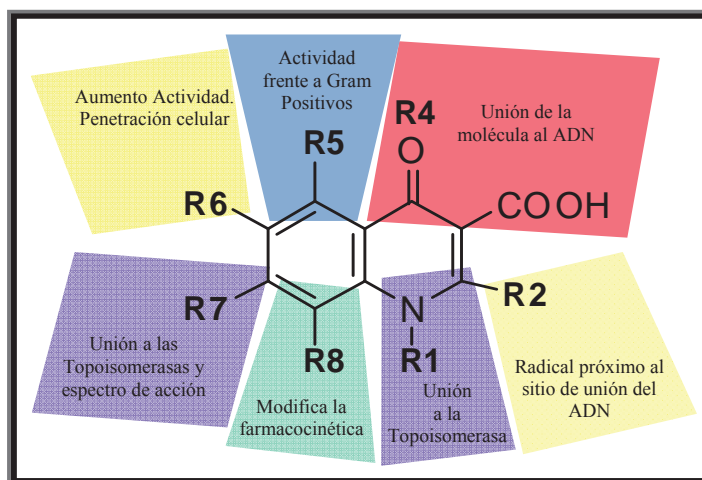


Figura 10. Relación estructura-actividad de la molécula de quinolona.

Posición 1. En esta posición resulta indispensable un nitrógeno que puede presentar distintos sustituyentes. Los primeros compuestos (Ácido Nalidíxico, Norfloxacin, Enoxacina) presentaban etilo en esta posición pero se observó que al sustituir un grupo apolar más

voluminoso la actividad aumentó. El sustituyente ciclopropilo está presente en numerosas fluoroquinolonas dado que confiere excelente potencia. En el caso de Levofloxacin y Ofloxacin, un tercer anillo une el nitrógeno 1 y carbono 8 y le dá mayor actividad frente a Gram positivos (Mitscher 2005).

Posición 2. No se sabe mucho de la relación estructura-actividad de los sustituyentes en esta posición C-3 (Chu 1990). Se han realizado pocas modificaciones, con poco éxito, en esta posición sobre todo por la cercanía a los grupos carboxilo y ceto presentes en C-3 y C-4 que son fundamentales para la unión a topoisomerasas bacterianas. De manera que el sustituyente comúnmente encontrado en esta posición es el hidrógeno (Mitscher 2005).

Posición 3 y 4. En estas posiciones se localiza el grupo carboxilo y el grupo ceto que no pueden ser modificados por ser esenciales para la actividad antimicrobiana de la molécula (Fernández 2004). Ambas posiciones de la molécula son parte fundamental en la formación del complejo Quinolona-Enzima-ADN. Su función es la de unirse al ADN, posiblemente forman algún puente de hidrógeno (Mitscher 2005, Peterson 2001) o deben estar coplanares para acoplarse con Mg^{+2} y reconocer al ADN de modo que fijan el complejo e inhiben la girasa o topoisomerasa IV (García *et al.* 2002).

Posición 5. Los sustituyentes en esta posición deben de ser pequeños y en algunos casos al ser polares incrementan la actividad antibacteriana. Se han introducido sustituyentes como; N, COH, CNH₂, CNH(CH₃)₂, CNHAc, CCH₃, CEt, CCl y CF. Los halógenos sustituidos en esta posición contribuyen significativamente a la fototoxicidad (Mitscher 2005). La mayoría de las quinolonas presentan un hidrógeno en esta posición y aunque un grupo amino (esparfloxacin), o un grupo hidroxilo o metilo (grepafloxacin) incrementan la actividad frente a Gram-positivos (Peterson 2001, Gutiérrez 2004, Anderson 2003), ambas quinolonas están asociadas a efectos adversos por los sustituyentes que presentan en esta posición (Higgins 2003).

Posición 6. La adición de un átomo de flúor en esta posición mejoró la actividad de las quinolonas predecesoras y dio lugar a lo que conocemos como fluoroquinolonas. Se cree que

el átomo de flúor aumenta la actividad de estas moléculas porque facilita su penetración a través de la membrana bacteriana, más que por modificar la interacción con la enzima (Roychoudhury *et al.*2002). Otros sustituyentes que han sido estudiados en esta posición con resultados poco satisfactorios son: Cl, Br, CN, NO₂, CH₃ y NH₂ (Mitscher 2005).

Posición 7. Ha sido la posición más versátil a sustituciones y por lo tanto una gran cantidad de análogos han sido preparados empleando diferentes sustituyentes en esta posición. Una conclusión interesante, después de obtener una gran variedad de análogos, fue que un sistema cíclico que contenga dos o tres grupos amino secundario o terciario favorece la actividad significativamente. Asimismo, la naturaleza del sustituyente en esta posición afecta considerablemente la preferencia de las quinolonas por su blanco de acción (ADN girasa o Topoisomerasa IV) por ser responsable de la unión de la quinolona a la enzima. También está relacionado con cambios de la actividad y espectro de acción, y de algunos parámetros farmacocinéticos como la vida media o la solubilidad de la molécula. La mayoría de los ensayos realizados en esta posición indican que los sustituyentes en C-7 se relacionan mediante interacciones electrostáticas con el sitio de unión a las enzimas. Desde el punto de vista sintético, esta posición es fácilmente sustituida cuando se parte de la quinolona 6,7-difluorada mediante una reacción de sustitución nucleofílica aromática de esta con una amina que contenga carácter nucleofílico. El inconveniente relativo es que pueda existir competencia del carboxilato, que generalmente se tiene protegido en forma de ester, por el nucleófilo (Chu 1990).

Posición 8. Los sustituyentes en esta posición presentan un papel determinante en la afinidad de las quinolonas por la ADN girasa o topoisomerasa IV. Este efecto se complementa por la naturaleza del sustituyente en posición 5, especialmente si este es un átomo de flúor. Se ha observado que la presencia de un sustituyente metoxilo en C-8 incrementa la potencia de la quinolona sin incrementar la fototoxicidad (que es una de las propiedades de reactividad y toxicidad de estos compuestos), como lo haría un halógeno en la misma posición. La primera modificación exitosa en esta posición fue el cambio del N (del ácido nalidíxico) por CH, lo que mejoró notablemente las características farmacocinéticas. Otros grupos que han sido

investigados en esta posición incluyen: etoxilo, OH, OCH₂F, OCHF₂, OCF₃ y SMe. (Suto *et al.* 1992, Heddle 2002, Hayashi *et al.* 2004, Mitscher 2005).

3.4. AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos tanto esenciales como no esenciales, sintéticos o que cumplen alguna función como los neurotransmisores han sido explorados en la Química Medicinal y muchos de ellos incluso, forman parte de importantes antibióticos como los precursores de penicilina.

Por su parte, los péptidos también han sido de interés medicinal. La secuencia de aminoácidos de algunos de estos péptidos se controla por el código genético como es el caso de los péptidos antimicrobianos derivados de histonas. Estudios realizados sobre péptidos codificados por el ADN han permitido la síntesis de aquellos en donde no está involucrado directamente el ADN. Algunos péptidos como la histogranina derivada de histonas, han aportado información que permiten obtener compuestos con posible aplicación biológica. Es interesante resaltar, por las características de esta tesis, que estudios realizados sobre la histogranina indican que su mecanismo de acción es similar al de las quinolonas es decir que involucran la ADN girasa. Al realizar la relación estructura actividad del la histogranina se encontró que la acción antibacteriana que presenta, se debe algunos grupos que se encuentran en la porción del C-terminal de la molécula; grupo básico, fenilo y fenol (Lemaire *et al* 2008).

Un péptido cíclico (-Gli-pCl-Fen-Tir-d-Arg) fue sintetizado con la finalidad de mimetizar el efecto de la histogranina e imitar los principales grupos fenol y fenilo. Este compuesto, aunque no superó la actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas como el ciprofloxacino, si presentó actividad frente a la ADN girasa (Lemaire *et al* 2008).

En 2003 se reportó la síntesis y caracterización de un compuesto derivado de ciprofloxacino, sustituido en el C-3 con un α -aminoácido; glicina (este aminoácido figura en el compuesto cíclico que se mencionó anteriormente). El compuesto se probó frente a *E.coli*, *B.subtilis* y *S.aureus* sin embargo, no presentó ninguna influencia en la actividad

antimicrobiana. Lo anterior debido a que, como se mencionó anteriormente, el carboxilo libre en C-3 resulta esencial para la actividad de las fluoroquinolonas.

Considerando la necesidad de buscar nuevos compuestos con actividad antibacteriana, sobre todo en cepas multiresistentes, y a que los aminoácidos acoplados a fluoroquinolonas abren la posibilidad de ampliar el panel de compuestos a explorar; en el presente trabajo se describe la síntesis y actividad en cepas Gram negativas y positivas de nuevas fluoroquinolonas sustituidas en el C-3 y C-7.

IV. HIPÓTESIS

Al funcionalizar la posición 7 de las fluoroquinolonas con aminas como el aminoacetaldehído dimetil acetal, etanolamina, *N,N*- dimetil etilendiamina y alfa-aminoácidos que pueden interactuar con las topoisomerasa, dá lugar a compuestos con actividad antimicrobiana con posibilidades de actuar frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

V. OBJETIVOS

V.1.- OBJETIVO GENERAL

Obtener nuevos compuestos derivados de fluoroquinolonas sustituidos con aminas funcionalizadas con grupos capaces de actuar con la girasa, a partir de los cambios propuestos en la posición 7 de la molécula y evaluar su actividad antibacteriana frente a cepas de microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

V.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I.- Sintetizar y caracterizar estructuralmente los compuestos 2-6, sustituidos con aminos en posición 7 y 3.

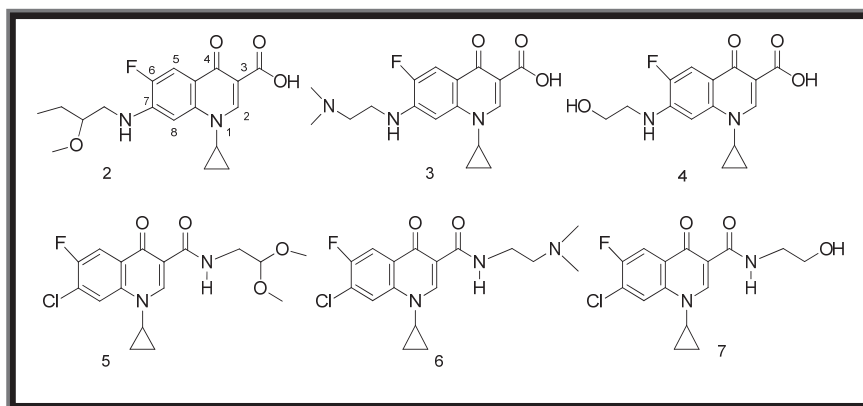


Figura 11.- Aminoalquil fluoroquinolonas sustituidas en posición 3 y 7.

2.- Obtener, purificar y caracterizar los compuestos Ciprofloxacino- α -aminoácidos 17-25.

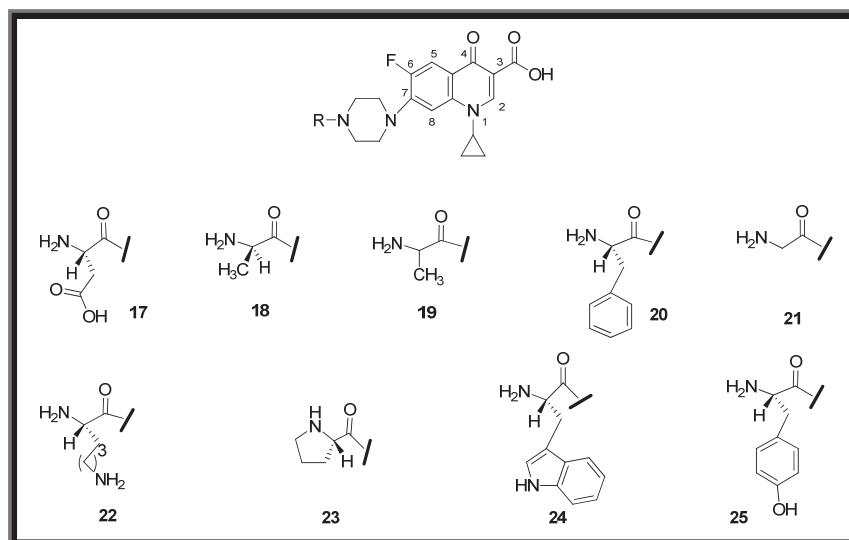


Figura 12.- Aminoacil fluoroquinolonas sustituidas en posición 7 con aa.

3.- Evaluar la actividad antimicrobiana de los nuevos compuestos obtenidos mediante el método de Kirby-Bauer, frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

4.- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de los nuevos análogos que presenten actividad antimicrobiana.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H) se obtuvieron con un equipo Varian Mercury Plus de 200 MHz y/o 400 MHz. Se utilizó como referencia TMS y como disolvente cloroformo (CDCl_3) o dimetil sulfoxido deuterados. La quinolona empleada como materia prima fue el ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxílico y ciprofloxacino disponible comercialmente. Las aminas utilizadas para la síntesis de los compuestos fueron el 1-aminoacetaldehído dimetil acetal, la N, N-dimetiletildiamina, la etanolamina y los respectivos aminoácidos. Todos los reactivos fueron de origen comercial de la empresa Aldrich. El Ciprofloxacino se obtuvo a partir de un producto comercial para lo cual se trituró una tableta de clorhidrato de Ciprofloxacino monohidratado equivalente a 500 mg, hasta obtener un polvo fino y se colocó en un vaso de precipitado con 10 mL de agua destilada. Se sometió a agitación por treinta minutos con la finalidad de disolver la sal y se dejó en reposo hasta precipitación del excipiente. La mezcla se filtró y se obtuvo una solución clara a la cual se agregó gota a gota una solución de $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}$ hasta que se observó un precipitado color blanco. El precipitado se filtró y se dejó secar a temperatura ambiente obteniendo un sólido blanco que mostró las señales de RMN ^1H y ^{13}C de ciprofloxacino.

Para las pruebas de actividad antibacteriana se emplearon cepas de *Escherichia coli* enteropatógena ATCC 0111 y *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, este último aislado de un caso de mastitis clínica. Ambas cepas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) a 37° C.

6.1.- PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LOS PRECURSORES SUSTITUIDOS EN LA POSICIÓN 7 DE LA FLUOROQUINOLONA.

Se colocaron 0.01 mol de ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxílico en un matraz balón; posteriormente se adicionaron 0.05 mol de la amina correspondiente. La mezcla se sometió a reflujo, aplicando calor hasta alcanzar una temperatura que osciló entre 110 y 120 °C, agitando vigorosamente durante 6 horas. Durante este lapso de tiempo se observó una mezcla totalmente líquida, la cual fue cambiando de color

(amarillo a marrón en el caso del aminoacetaldehído dimetil acetal. Sin embargo, cuando se usa N,N-dimetiletilendiamina se observa una mezcla heterogénea con una tonalidad amarilla). Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se llevó a sequedad y se purificó por cromatografía en columna utilizando sílica y como eluente MeOH:AcOEt. Los cristales obtenidos mostraron las señales esperadas en RMN¹H. El rendimiento calculado para estos compuestos fue del 75 %.

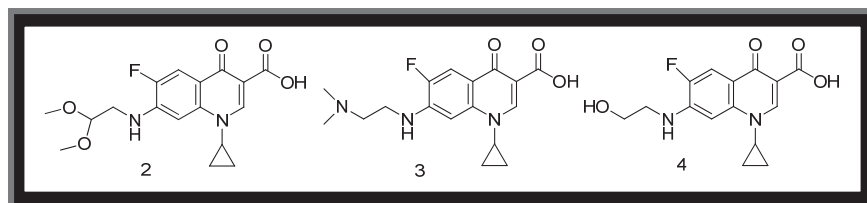


Figura 13. Aminoalquil fluoroquinolonas.

6.2. SÍNTESIS DE COMPUESTOS DERIVADOS DE AMINAS SUSTITUIDA EN EL CARBOXILO EN POSICIÓN 3 DE LA QUINOLONA.

6.2.1. Esterificación de la Quinolona.

Para obtener el compuesto derivado de amina sustituido en el carboxilo de la quinolona, fue necesario primero esterificar la molécula. La esterificación se realizó en base al siguiente procedimiento:

Se colocaron 0.01 mol de la ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxílico a esterificar en 10 mL de metanol (observándose un precipitado blanco insoluble), enseguida se sometió a baño de hielo por 15 minutos. Después se sometió a agitación y se agregaron 0.012 mol de cloruro de tionilo gota a gota. Conforme paso el tiempo la quinolona solubilizó completamente. Se continuó agitando por 1 día (3 horas para la reacción con amiohemiacetal), transcurrido este tiempo se dejó en reposo durante 18 horas permitiendo que se formaran cristales transparentes. Finalmente se filtró y los cristales obtenidos se llevaron a un estado de sequedad. Las señales mostradas en la RMN¹H confirmaron la esterificación de la quinolona.

6.3. SÍNTESIS DE COMPUESTOS DERIVADOS DE AMINOACIDOS SUSTITUIDOS EN LA POSICIÓN 7-(N'-PIPERACINIL) DEL CIPROFLOXACINO

6.3.1. N-Protección de los aminoácidos.

En un matraz balón provisto de agitación se suspendió el aminoácido libre en NaOH 1N a 0°C, posteriormente se adicionaron 1.1 equivalentes de cloroformiato de bencilo (CbzCl) y se mantuvo el pH de reacción en 10. La mezcla se dejó reaccionando por 12 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se lavó con CH₂Cl₂ tres veces; la fase orgánica se desechó y la fase acuosa se acidificó con HCl 1 N hasta pH menor a 4, el producto se extrajo de la fase acuosa con CH₂Cl₂. La fase orgánica se seco con Na₂SO₄ anhidro, se filtro por gravedad y se llevó a sequedad.

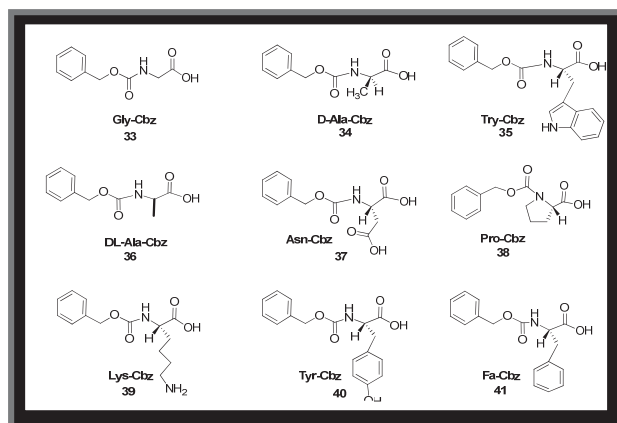


Figura 14.- Carbamatos de los diferentes aminoácidos elegidos.

6.3.2. Reacción de N-acilación de ciprofloxacino con α -aminoácidos protegidos.

En un matraz balón se colocó 1 mmol de Ciprofloxacino en CH₂Cl₂, enseguida se adicionó 1 mmol del α -aminoácido correspondiente, 1.05 mmoles de HOBt, 1.05 mmoles de HBTU, y 2 mmoles de DIEA. La mezcla se sometió a agitación y se dejó reaccionando por 12 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, a la mezcla se le realizaron tres

lavados con agua destilada y tres lavados con una solución saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró por gravedad y se llevó a sequedad.

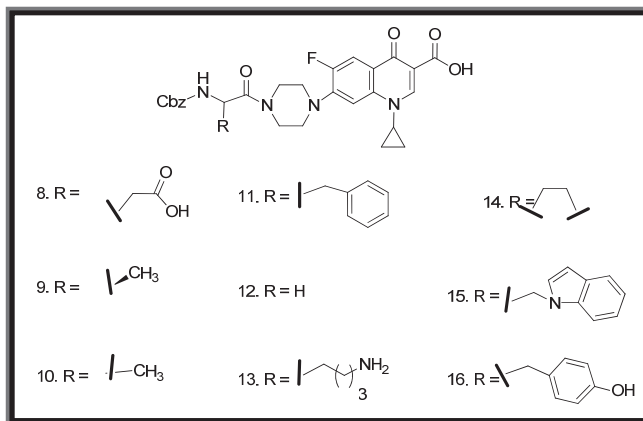


Figura 15. Aminoacil fluoroquinolonas *N*-carboxibenciladas sustituidas en el nitrógeno dista de la piperazina en posición 7.

6.3.3.- N-Desprotección de las nuevas fluoroquinolonas; CbzHN-aa-Cpx.

En un matraz balón se colocó 1 mmol de la fluoroquinolona *N*-protegida disuelta en una mezcla metanol: cloruro de metileno (50:50), 10% (w/w) de Pd/C al 10%. Esta mezcla se sometió a agitación y se saturó con H_2 , se dejó reaccionar por 3 h a presión atmosférica. Transcurrido el tiempo de reacción se filtró, sobre celita, al vacío y se eliminó el disolvente a vacío.

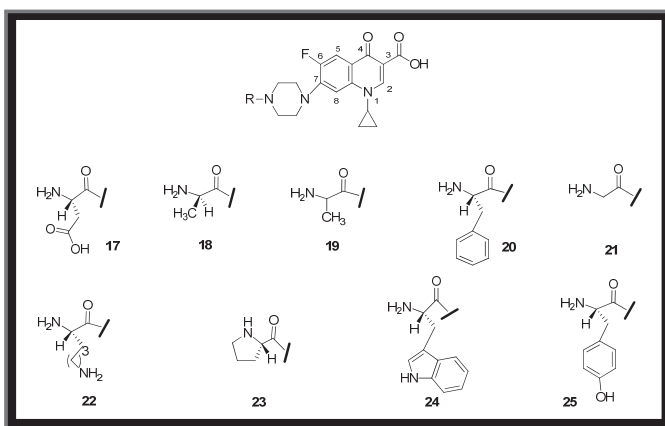


Figura 16. *N*-Aminoacil fluoroquinolonas sustituidas en el nitrógeno distal de la piperazina en posición 7.

6.4. PRUEBA DE DIFUSIÓN CON DISCO.

La medición de la actividad antibacteriana de los nuevos análogos de fluoroquinolona, se obtuvieron mediante el método de Kirby-Bauer (NCCLS). Las pruebas se realizaron frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos; *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Primeramente, se sembró una cepa del microorganismo correspondiente en una placa de Agar LB y se dejó incubar a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Para esto se seleccionaron colonias perfectamente aisladas y se transfirieron a un tubo que contenía 3 mL de caldo LB. El caldo de cultivo se incubó a 37 °C por un lapso de 4-6 horas hasta que alcanzó una absorbancia de 0.2 a 560 nm. El inóculo ajustado que se obtuvo, de acuerdo a la determinación de las UFC previamente realizada, contuvo aproximadamente 6×10^4 UFC/ml en *Escherichia coli* y 9.12×10^6 UFC/ml en *Staphylococcus aureus*. Después de haber obtenido la turbidez adecuada se introdujó un hisopo de algodón dentro de la suspensión ajustada, el cual se rotó varias veces presionando firmemente en las paredes del tubo para eliminar el exceso de inóculo. La superficie de la placa del Agar LB se inoculó por estriamiento masivo, rotando la placa 90°, para la distribución homogénea del inóculo. Se dejó secar durante 5 minutos para eliminar el exceso de humedad.

Se colocaron los sensidiscos y se presionan con la pinzas estériles para obtener un contacto completo con la superficie del Agar. Los discos se aplicaran a una distancia no menor de 24 mm entre cada uno de ellos procurando no colocar mas de 5 sensidiscos por placa. Las placas se incubaron a 37° durante un lapso de tiempo de 24 horas; y después del tiempo de incubación se examinaron midiendo los diámetros de inhibición en milímetros con una regla convencional. A partir de los resultados obtenidos, se comparó la sensibilidad con el control positivo; el ciprofloxacino.

6.5. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS NUEVOS ANÁLOGOS DE FLUOROQUINOLONAS SOBRE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*, Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

Para determinar la CMI se realizaron pruebas de sensibilidad por dilución en tubo (NCCLS): se resembraron las 2 cepas anteriormente mencionadas por cuadrantes en una placa de agar LB para tenerlas frescas, se dejaron incubar a 37°C durante 24 hrs. Enseguida se tocaron con asa estéril 3 colonias y se inocularon en matraz con 325 mL de caldo LB, se homogenizaron agitando y se dejaron incubar durante 4-6 hrs hasta alcanzar una absorbancia de 0.2 a 560 nm.

Con cada patógeno se trabajó con una batería de 10 tubos con 3 repeticiones, a los cuales se adicionaron la respectiva fluoroquinolona previamente microdiluida. La concentración de la fluoroquinolona del primer tubo fue de 100 µg/ml, esta concentración se disminuyó sucesivamente hasta obtener una concentración de 2×10^{-2} µg/ml del compuesto en el tubo número 10. Las muestras obtenidas se incubaron con agitación a 37 °C por 24 hrs. Transcurrido este tiempo se detectó el último tubo sin crecimiento y la concentración de éste se reportó como la CMI.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS NUEVOS COMPUESTOS DERIVADOS DE FLUOROQUINOLONAS.

El primer grupo de compuestos a sintetizar fue la serie de *N*-aminoalquil fluoroquinolonas, en donde la amina se incorporó en la posición 7 de la quinolona y en el carbonilo del carboxilato, C-7 y C-3 respectivamente. En este último caso, dando lugar a las correspondientes amidas. Aunque se sabe por reportes de relación estructura actividad de fluoroquinolonas que el carboxilato no debe ser sustituido pues es esencial en el mecanismo de acción molecular al reconocer al ADN, los derivados que se incorporaron, en este estudio, no son alquilaminas sencillas sino funcionalizadas con grupos que pueden presentar interacciones con el ADN al poseer en su estructura átomos de nitrógeno y oxígeno. Así, se incorporó el amino dimetilacetal (compuestos **2** y **5**) que presenta dos oxígenos capaces de formar puentes de hidrógeno y que además es un excelente sintón para obtener compuestos como derivados de glicina. Otro sustituyente elegido fue el 1,2-aminoetanol que en un momento dado permitiría comparar la actividad del amionoacetal con respecto a un alcohol libre (compuestos **3** y **6**). Los compuestos **4** y **7** fueron derivados en los que se sustituyeron con *N,N'*-dimetiletilendiamina. Esta diamina resulta de particular interés pues es sabido que, al encontrarse como sustituyente en intercaladores del ADN, la afinidad por el material genético se incrementa considerablemente como es el caso del compuesto citotóxico DACA. Cabe señalar que ninguno de los compuestos propuestos (**2** - **7**) habían sido descritos (fig. 17).

La síntesis de las fluoroquinolonas sustituidas en el anillo aromático se llevó a cabo en condiciones típicas de sustitución nucleofílica aromática (SN_{Ar}) partiendo, del ácido 7-cloro-6-fluoro-1,4-dihidro-oxoquinolina-3- carboxílico en ausencia de disolvente y a reflujo. Los derivados sustituidos en el carboxilo no requirieron tratamiento sintético especial pues afortunadamente se aislaron de la misma mezcla de reacción aunque con bajos rendimientos, lo cual en principio no preocupaba pues se trataba de experimentar primeramente la actividad

biológica y, en caso de ser necesario, llevar a cabo una síntesis mas específica de amidas a partir de ácidos carboxílicos y aminas.

La caracterización de los compuestos se realizó por RMN ^1H y ^{13}C , en donde se observó que las señales mostraban patrones de desplazamiento químico similares entre los análogos sustituidos en C-7 y los sustituidos en C-3.

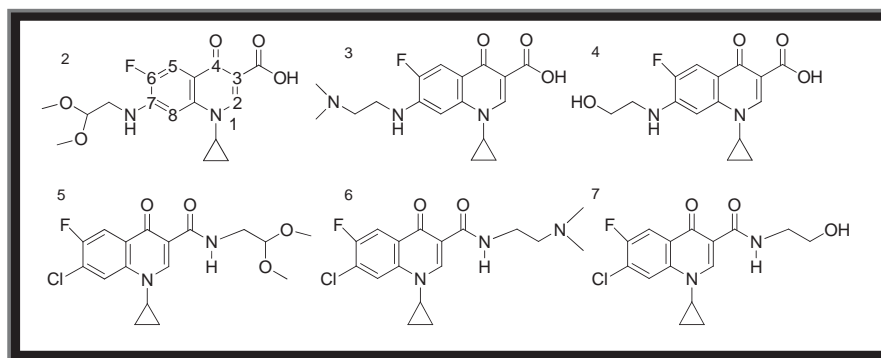


Figura 17. Estructura de los compuestos sustituidos en C-7 (1-3) y sus Análogos sustituidos en C-3 (4-6).

De esta forma, los espectros obtenidos para los compuestos sustituidos con aminas en C-7 mostraron que las señales de los hidrógenos en las posiciones 5 y 8 se ven desplazadas hacia campo alto, con respecto al material de partida (fig. 18), lo cual indica la presencia de un grupo electrodonador cerca de éstos. Sin embargo, es clave la aparición de la señal de amida cerca de 10 ppm, para los compuestos sustituidos en 3, con respecto a la señales del protón del grupo amino, sustituido en 7 (Ver anexo fig. 41).

Aunque el compuesto sustituido en la posición 3 es un subproducto de la reacción de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, para el caso de la adición de la *N,N*-dimetil-1,2-etilendiamina el rendimiento fue bajo y se exploró la reacción partiendo del derivado esterificado del ácido 7-F-8-Cl-quinolona-3-carboxílico obteniendo mejores rendimientos, lo cual es en cierta medida de esperarse puesto que para que se lleve a cabo una reacción tipo $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ se requiere romper la aromaticidad del anillo bencénico mientras que la reacción de adición-eliminación de esteres es enegéticamente mas favorecida dado que no se rompe aromaticidad y el carbonilo es considerablemente más electrófilico.

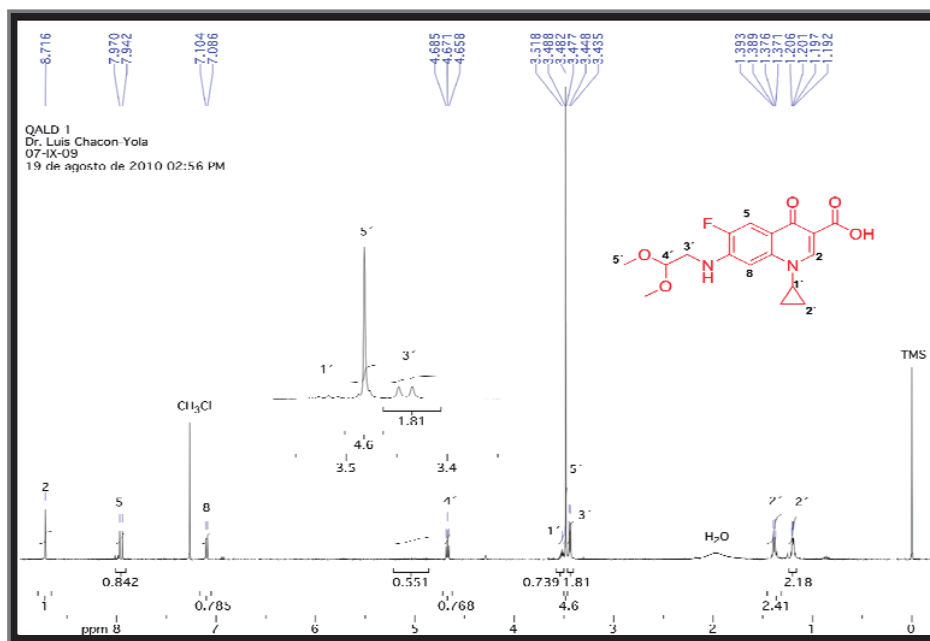


Figura 18. Espectros de RMN ^1H . Hemiacetal de la FQ sustituida en posición 7(Comp 2).

El espectro de RMN ^1H de la fluoroquinolona esterificada (figura 42 ver anexo), con respecto al espectro del hemiacetal de la fluoroquinolona sustituida en posición 3 mostró diferente desplazamiento del protón en posición 2, además de la ausencia del metilo en posición 3. La señal para el hidrógeno del carbono 2 se desplaza hacia campo bajo, indicando la presencia de un grupo que genera un efecto electroattractor para este hidrógeno. Estas señales indican la formación del precursor de fluoroquinolona sustituido en posición 3 (figura 41 ver anexo).

Como se mencionó, el compuesto **2** resulta interesante para funcionalizar la estructura con análogos de glicina, mismos que servirían para incorporar a su vez otros aminoácidos y obtener péptidos sustituidos en esa posición. De esta manera el hemiacetal de la fluoroquinolona se sometió a reaccionar de diversas formas con la finalidad de liberar el acetal y obtener el aldehído correspondiente. Desafortunadamente, a pesar de probar diversas metodologías, se obtenían compuestos inestables que al revelarlos en cromatografía de placa fina con 2,4-dinitrofenilhidrazina evidenciaban la presencia de aldehído pero que al momento de purificarlo se obtenían compuestos inestables y difíciles de caracterizar.

En la búsqueda de nuevas opciones se optó por partir del ciprofloxacino, una fluoroquinolona funcionalizada en la posición 7 con piperacina, y sustituirlo en el nitrógeno distal de la misma. Recientemente, se describió una metodología que permitió incorporar alanina en esta posición y es la que se utilizó en este trabajo para obtener la serie de análogos restante (Machuca 2010).

Primeramente, se obtuvo el ciprofloxacino que, por razones de economía, se aisló de tabletas comerciales mediante extracciones por disolvente y el uso de metóxido de sodio. Para corroborar la extracción adecuada del ciprofloxacino se analizó por RMN ¹H y se identificaron las señales correspondientes de cada protón de la molécula, como se ilustra en la figura 19.

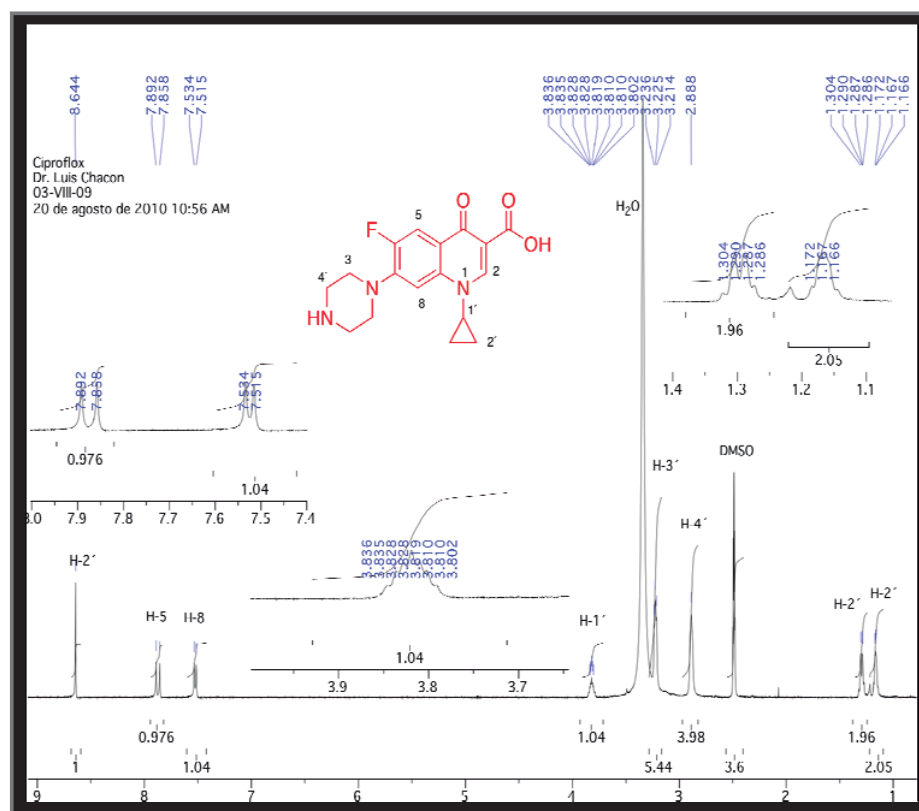


Figura 19. Espectro de RMN ¹H del Ciprofloxacino.

Los aminoácidos que se eligieron para ser sustituidos en la posición 7 del ciprofloxacino fueron la tirosina (Tir), glicina (Gli), D-alanina (Ala), tryptofano (Tri), fenilalanina (Fen), asparagina (Asn), prolina (Pro), lisina (Lis) y DL-alanina. El criterio de elección tuvo que ver con la disponibilidad de los mismos y con la facilidad del manejo en las condiciones de reacción como solubilidad.

El primer paso en la ruta sintética fue la N-protección de los aminoácidos anteriormente mencionados; para lo cual se utilizó cloroformiato de bencilo para la formación del grupo N-Cbz, bajo el procedimiento descrito previamente. El carbamato correspondiente de cada aminoácido (fig. 20) se obtuvo en rendimientos por arriba del 60%.

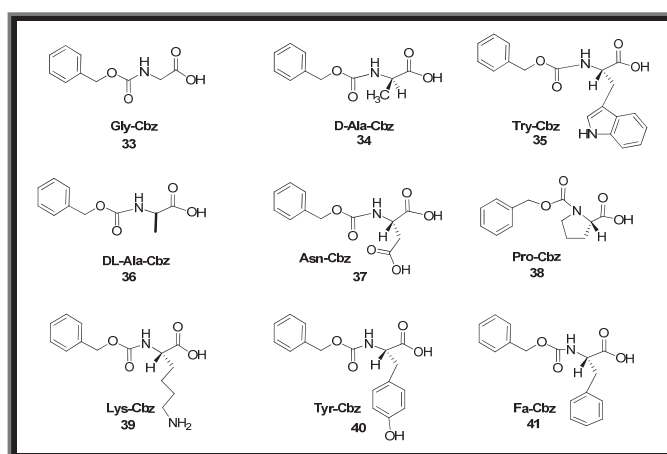


Figura 20. α -aminoácidos N-protegidos.

Al realizar las reacciones de obtención de los compuestos ciprofloxacino-aminoácido-Cbz que se muestran en la figura 21, se observó que al incrementar las cantidades de los reactivos de que se parte mejoran significativamente los rendimientos de un 60% a 80-90%.

La formación de los compuestos ciprofloxacino-aminoácido-Cbz se llevó a cabo mediante el acoplamiento del aminoácido y el nitrógeno secundario de la piperacina mediante la activación del carboxilo libre del aminoácido con HBTU. La estructura de cada uno de ellos

se confirmó mediante RMN ^1H ; la comparación de los desplazamientos químicos se muestran en la figura 22.

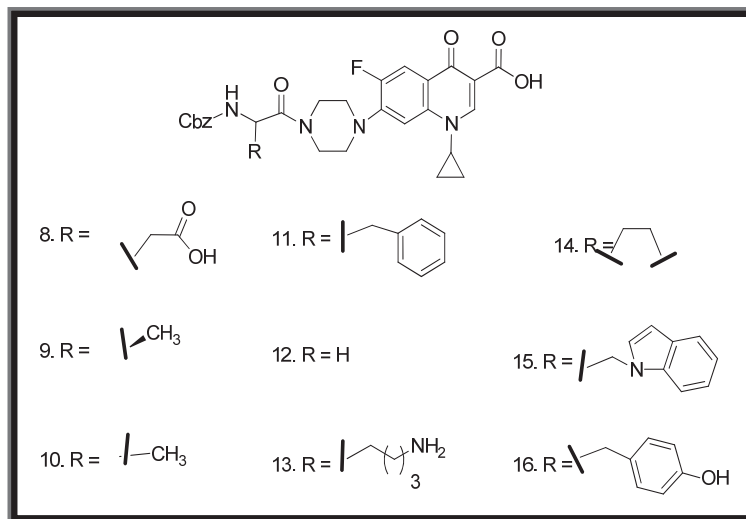


Figura 21. Compuestos derivados de aa-protectados sustituidos en la posición 7 de la FQ.

Al comparar los espectros del aminoácido protegido con respecto a sus derivados productos de acoplamiento con fluoroquinolona se observa una diferencia en los desplazamientos químicos de los protones del grupo amino del aminoácido protegido y el protón del metino hacia campo bajo, lo cual da indicio de la presencia de un grupo electroattractor cercano a ellos indicando que el ciprofloxacino se adicionó. Algo que llama la atención es que las señales de la piperacina se encuentran separadas dado que lo más común es que estas sean equivalentes al menos en lo que refiere a los metilenos vecinos de un mismo nitrógeno. Esta ausencia de equivalencia química y magnética es típica de piperacinas disustituidas con conformación restringida en donde los protones ecuatoriales presentan diferente desplazamiento químico con respecto a los axiales (Chacón 1993).

En las Figuras 22 y 23 se ilustran, como ejemplos de esta transformación, los espectros de RMN ^1H de la D-alanina N protegida y su producto de acoplamiento con el nitrógeno distal de la piperacina del ciprofloxacino.

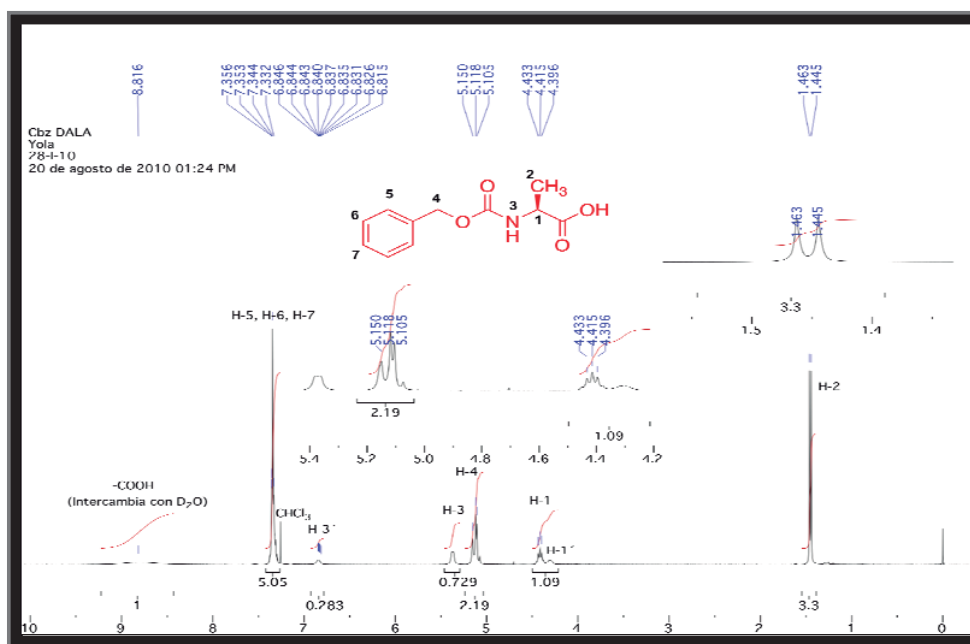


Figura 22. Espectro de RMNH¹ del aminoácido protegido y de su producto de reacción con la FQ.

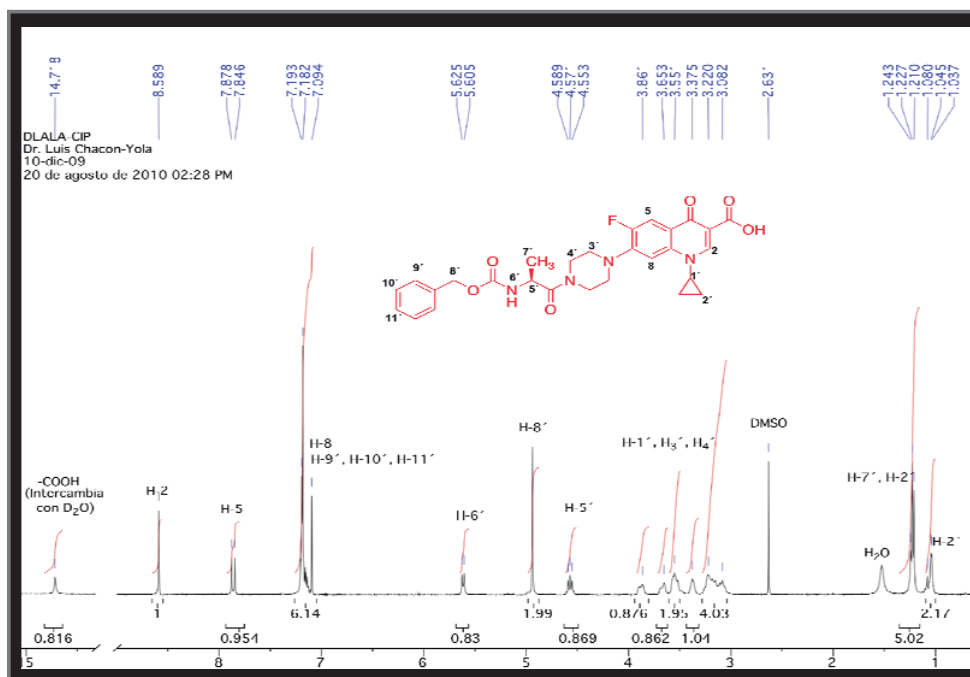


Figura 23. Espectro de RMNH¹ del aminoácido protegido y de su producto de reacción con la FQ.

Aunque el objetivo sintético es obtener los derivados aminoacilados, los intermediarios generados (compuestos **8-16**) también resultan atractivos para formar parte del panel de compuestos a probar como inhibidores del crecimiento bacteriano.

La desprotección del grupo protector carboxibenzoilo, para liberar alcohol bencílico y el amino del aminoacilo, se llevó a cabo mediante la reacción típica de hidrogenólisis. El espectro de RMN ^1H de la alanil fluoroquinolona mostró las señales indicativas tanto de la desprotección del Cbz como las de la presencia del aminoacilo como se muestra en la Figura 24. El resto de los productos fueron caracterizados también por RMN tanto de ^1H como de ^{13}C e IR.

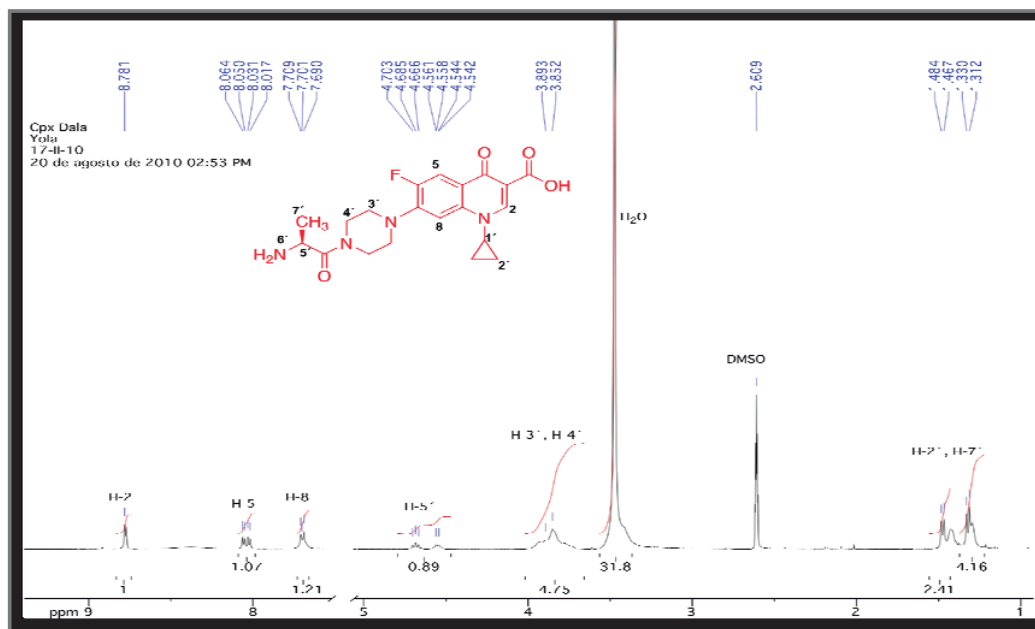


Figura 24. Espectro de RMN ^1H del compuesto 17; Cpx-Ala.

Al igual que la primera serie de compuestos aquí descritos, los derivados aminoacilados **8 – 24** son también novedosos y se describen por primera vez.

6.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para medir la actividad biológica de los nuevos compuestos obtenidos se realizaron pruebas microbiológicas en 2 cepas de referencia; *Staphylococcus aureus* (ATCC) y *Escherichia coli* (0111). Se eligieron estas cepas para realizar los ensayos debido a que es importante observar la actividad que presentan los nuevos análogos de fluoroquinolona tanto en microorganismos Gram positivos como Gram negativos.

Se realizaron ensayos de difusión en disco y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los nuevos análogos mediante la prueba de Kirby-Bauer y el método de microdilución en tubo (NCCLS) respectivamente. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración mínima del fármaco capaz de inhibir el crecimiento de un determinado microorganismo. La CMI, es utilizada como referencia internacional y es el valor más comúnmente aceptado en este tipo de estudios. Asimismo, el compuesto de referencia para ensayos de actividad antibacteriana de nuevas fluoroquinolonas es el ciprofloxacino. La CMI para el ciprofloxacino se determinó experimentalmente y de manera paralela con los ensayos de los compuestos probados coincidiendo con los datos descritos, esta fue de 1.7 $\mu\text{g/ml}$ frente a *S.aureus* y 1.6 $\mu\text{g/ml}$ frente a *E. Coli*.

6.2.1. Actividad antimicrobiana de los N-aminoalquil fluoroquinolonas.

En un primer ensayo se determinó la actividad antimicrobiana de los compuestos 2-7 por ensayos de difusión radial; método de Kirby-Bauer. Se observó que dos de los compuestos sustituidos en C-7 presentan actividad antimicrobiana. El hemiacetal de la fluoroquinolona inhibe el crecimiento bacteriano tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas y la 1-etan-2-ol amina en C-7 solo inhibe a bacterias Gram negativas (figura 25). Los nuevos compuestos sustituidos en C-3 no presentaron actividad antimicrobiana, lo que corrobora que esta posición de la quinolona debe estar libre aún cuando los sustituyentes sean capaces de interactuar con el ADN.

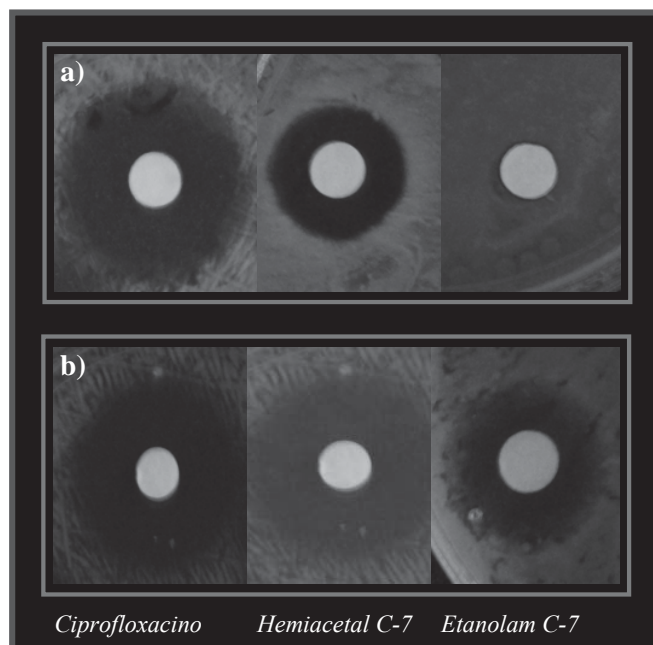


Figura 25. Actividad antimicrobiana del Ciprofloxacino, Compuestos sustituidos en C-7 y C-3 frente a *S. aureus* (A) y *E. coli* (B) en ensayos de difusión radial.

Al determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos **2-7** mediante la prueba de dilución en tubo, se observó que el hemiacetal de la FQ en C-7 presenta una CMI de $12.5 \mu\text{g/ml}$ ó $3.7 \times 10^{-3} \mu\text{mol/ml}$ (tabla 1). Como se observa en la figura 26 y 27 este compuesto inhibe mejor que el Ciprofloxacino a altas concentraciones.

Al observar que el acetal de la fluoroquinolona en C-3 no presentaba actividad antibacteriana se optó por usarla como control negativo.

La actividad antibacteriana de los nuevos análogos en C-7 sustituidos con aminas frente a microorganismos Gram negativos se confirmó al determinar su CMI. La etanolamina sustituida presentó una CMI de $9.4 \times 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$ y el acetal de FQ $1.8 \times 10^{-3} \mu\text{mol/ml}$ (Tabla 1). Los compuestos presentan una actividad comparable con el ciprofloxacino a altas concentraciones.

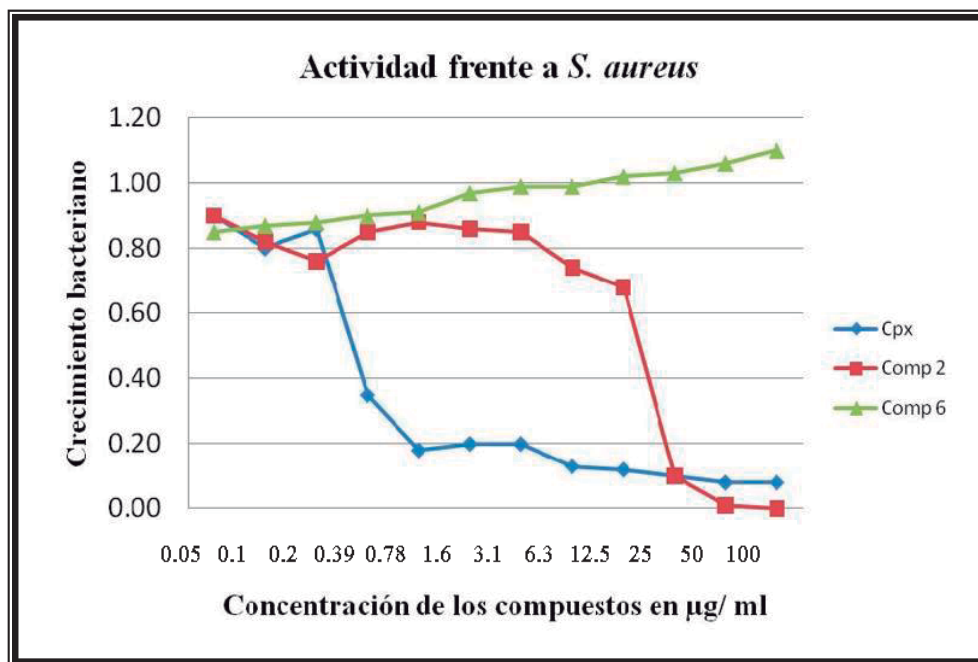


Figura 26. Actividad antibacteriana de nuevos análogos de FQ en posición 7 frente a *S.aureus*. Control positivo: ciprofloxacino, acetal de la FQ; Comp 2, control negativo: acetal de la FQ; Comp 6.

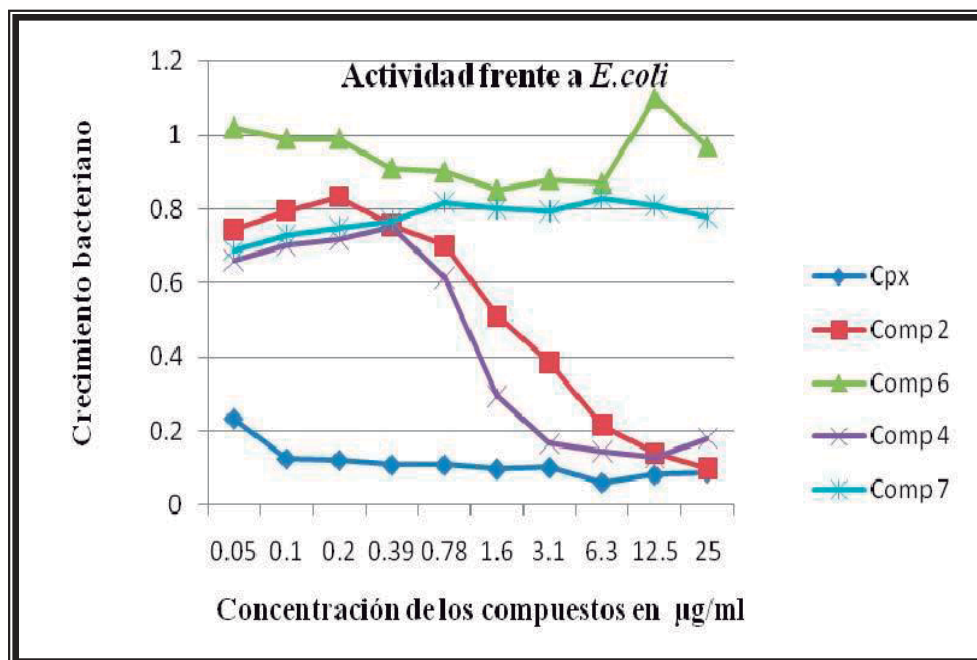
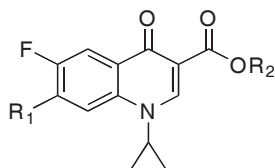


Figura 27. Actividad antibacteriana frente a *E. coli*. Control: Cpx, Compuestos 2 y 4 FQ sustituidas en C 7 y Compuestos 6 y 7 FQ sustituidas en C 3.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de los compuestos 1-7.

| comp. | Sustituyente | | CMI (μmol) | |
|-------|----------------|----------------|-----------------------------|------------------------------|
| | R ₁ | R ₂ | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| 1 | | H | 2.35x10⁻⁴ | 4.73 x10⁻⁴ |
| 2 | | H | 1.8x10⁻³ | 7.55x10⁻³ |
| 3 | | H | NI | NI |
| 4 | | H | 9.4x10⁻⁴ | NI |
| 5 | H | | NI | NI |
| 6 | H | | NI | NI |
| 7 | H | | NI | NI |

El hecho de que estos compuestos presenten actividad da la pauta para explorar análogos y derivados de los mismos.

El segundo grupo de compuestos a evaluar corresponde a las 7-aminoacil fluoroquinolonas, provenientes del acoplamiento del nitrógeno distal de la piperacina del ciprofloxacino y los respectivos aminoácidos. De acuerdo a su clasificación por la cadena lateral, en el panel de compuestos a explorar, se encuentran aminoácidos con cadenas laterales no polares (glicina, alanina, prolina, fenilalanina y triptofano), con cadenas ácidas (ácido aspártico), con cadenas polares pero no ionizados (tirosina) y con cadenas básicas (lisina).

Es claro que la estereoquímica en fármacos puede resultar crucial para su actividad debido al ambiente quiral en el que desempeñan su función molecular, sea esta con proteínas, lípidos, canales iónicos y el mismo ADN. La presencia de mezclas de enantiómeros en un fármaco es considerado por las normas internacionales como contaminación ya que no solo puede no ser inactivo sino tóxico. Las fluoroquinolonas que interactúan con la girasa han sido

también estudiadas desde el punto de vista quiral e incluso en el mercado farmacéutico se encuentra el Levofloxacin que es la forma enantioméricamente pura del ofloxacin. El levofloxacin es más activo, en términos de potencia y espectro de acción y por el hecho de obtenerlo de forma enantioméricamente pura también es considerablemente más costoso. En lo que respecta a la estereoquímica de los compuestos sintetizados, se puede apreciar que, con excepción de la *D*- y *D, L*-alanina, el resto de los sintones utilizados fueron los *L*-aminoácidos. El hecho de utilizar *D*-alanina responde a haber contado con este en anaquel y carecer de su enantiómero *L*.

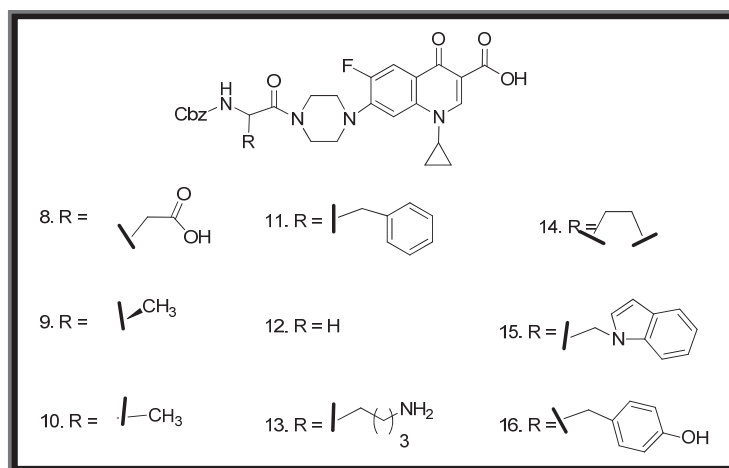


Figura 28 . N- aminoacil fluoroquinolonas

Con la finalidad de ampliar el estudio a un número de compuestos superior, se evaluaron también los intermediarios en la síntesis que fueron los aminoacil fluoroquinolonas *N*-carboxibenciladas (figura 28). Los ensayos se realizaron con la doble intención de, por una parte ampliar el intervalo de compuestos y por otra conocer si resulta necesario el amino del aminoácido en su forma libre lo cual, en cierta medida es de esperarse pues protegido se incrementa el tamaño de la molécula y esto puede interferir en la interacción con la girasa.

La forma más común de elegir la cantidad de compuesto a utilizar en cada una de las pruebas es en términos de $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, considerando que los compuestos aminoacil

fluoroquinolonas poseen un mayor peso molecular que el Ciprofloxacino sólo, para que el análisis fuera más preciso, es necesario comparar los compuestos en términos de micromoles/mL en vez de microgramos/mL. Por ello se utilizó la misma cantidad de compuesto en cada una de los ensayos respecto a la FQ de referencia en términos de $\mu\text{mol/mL}$.

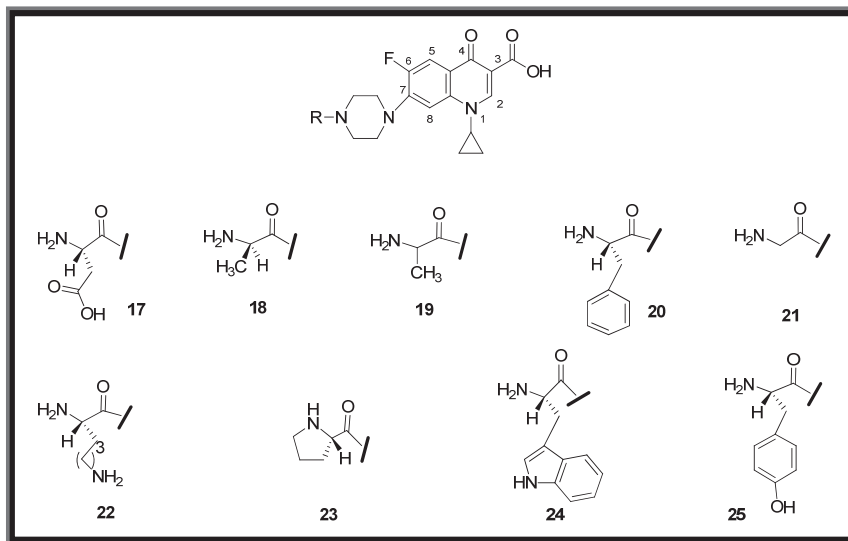


Figura. 29. Aminoacil fluoroquinolonas.

Los resultados de la prueba de difusión en disco frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se presentan en las figuras 30 y 31. En lo que respecta a los halos de inhibición frente a *Escherichia coli* (figura 30) y cuando se comparan los resultados del mismo grupo de compuestos protegidos con Cbz se aprecia que todos presentan menor actividad que el compuesto de referencia ciprofloxacino, contrario a lo que ocurre con el grupo de compuestos con el amino libre en donde los derivados de glicina y lisina son mas activos que el ciprofloxacino. En una comparación de ambos grupos, protegidos y desprotegidos, la tendencia de mayor actividad entre análogos, es siempre mayor o igual en los desprotegidos (fig. 29).

Aunque los ensayos en difusión son útiles sobretudo como estudios preliminares en series grandes de compuestos, los resultados son más confiables en dilución en tubo pues no se

ven afectados por problemas de difusión en el agar. De hecho, los resultados cambian radicalmente y se aprecia que el número de compuestos mas activos que el compuesto de referencia se incrementa en los derivados *D,L*- y *D*-ala-Cbz, *L*-lys-Cbz, gly y *L*-try (fig. 30 y 31). Los datos de CMI de todos los compuestos se presentan en la tabla 1 y 2.

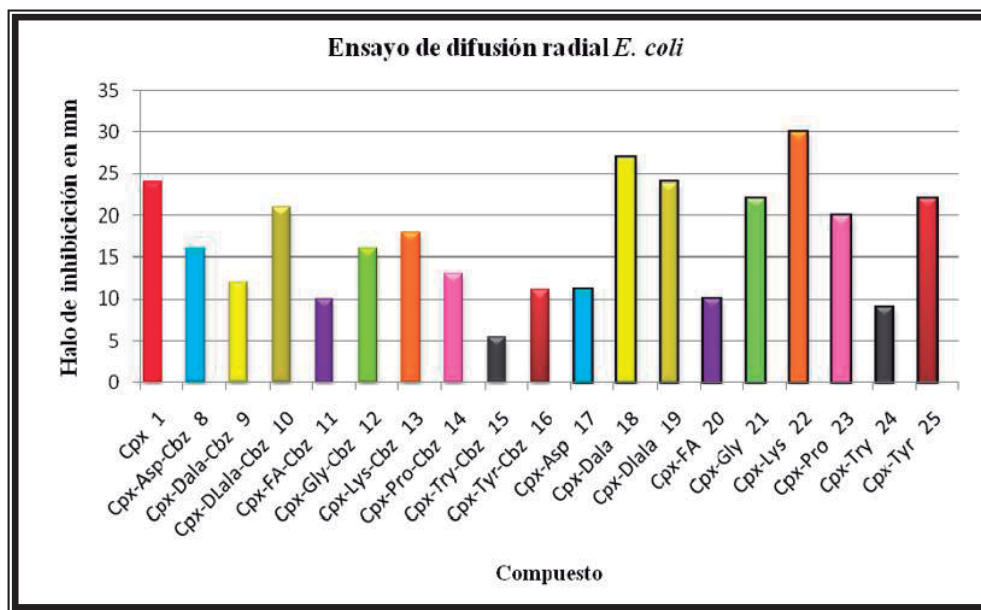
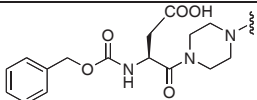
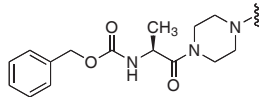
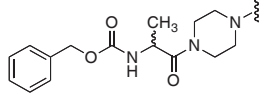
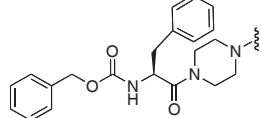
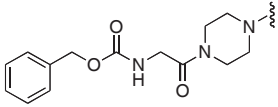
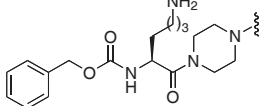
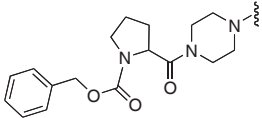
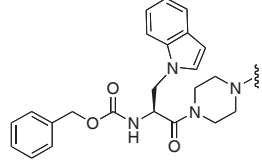
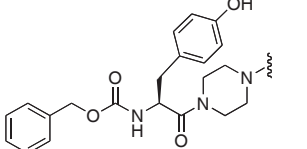
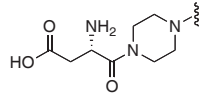
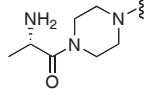
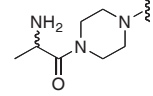
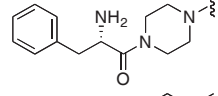
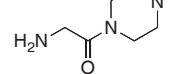
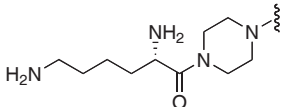
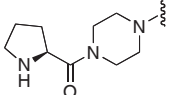
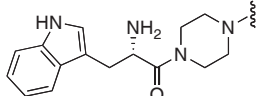
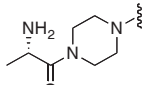


Figura 30. Actividad antimicrobiana de análogos de FQ frente a *E. coli*.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de los compuestos 1-24.

| comp. | Sustituyente | | CMI (μmol) | |
|-------|---|----------------|-------------------------|-----------------------|
| | R ₁ | R ₂ | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| 8 |  | H | 3.79×10^{-5} | 3.79×10^{-5} |

| | | | | |
|----|---|---|-----------------------|-----------------------|
| 9 |  | H | 1.89×10^{-6} | 9.46×10^{-6} |
| 10 |  | H | 1.89×10^{-6} | 1.18×10^{-6} |
| 11 |  | H | 9.46×10^{-6} | 4.73×10^{-6} |
| 12 |  | H | 9.46×10^{-6} | 2.73×10^{-6} |
| 13 |  | H | 1.89×10^{-6} | 9.46×10^{-6} |
| 14 |  | H | 3.79×10^{-5} | 3.79×10^{-5} |
| 15 |  | H | 9.46×10^{-6} | NPI |
| 16 |  | H | 9.46×10^{-6} | 3.79×10^{-5} |
| 17 |  | H | 3.79×10^{-5} | 3.79×10^{-5} |
| 18 |  | H | 4.73×10^{-6} | 2.73×10^{-6} |
| 19 |  | H | 7.57×10^{-6} | 9.46×10^{-6} |
| 20 |  | H | 9.46×10^{-6} | 9.46×10^{-6} |
| 21 |  | H | 1.89×10^{-6} | 1.89×10^{-6} |

| | | | | |
|----|---|---|-----------------------|-----------------------|
| 22 |  | H | 9.46×10^{-6} | 9.46×10^{-6} |
| 23 |  | H | 1.89×10^{-5} | 1.89×10^{-5} |
| 24 |  | H | 1.89×10^{-5} | 1.89×10^{-5} |
| 25 |  | H | 2.73×10^{-6} | 2.73×10^{-6} |

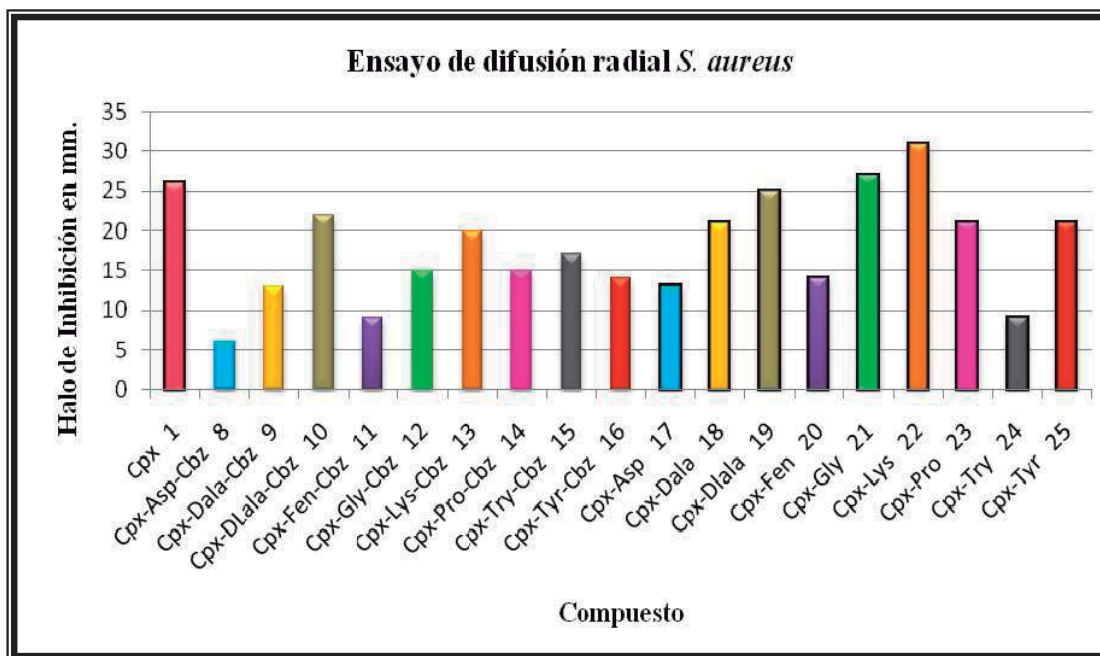


Figura 31. Actividad antimicrobiana de análogos de FQ frente a *S.aureus*.

Por su parte, con respecto a los ensayos de actividad frente a *Staphylococcus aureus* en las pruebas de difusión en disco (fig. 30), el halo de inhibición es mas grande para L-Gly y L-Lys que para el ciprofloxacino. Fuera de estos compuestos la actividad es igual o menor. Sin embargo, cuando se analizan los datos de la figura 31, los derivados gli-Cbz, D, L-ala-Cbz, L-gly, D-ala y L-Lys presentan una CMI por debajo que el ciprofloxacino sobretodo la L-Lys.

Asimismo, resulta interesante el comportamiento de los compuestos que contienen alanina en su estructura. El compuesto N-prottegido (*D, L*-alanil) presenta prácticamente el doble de actividad que el ciprofloxacino en esta cepa pero el compuestos también N-carboxibencilado X (*D*-alanil) es menos activo en un orden de diez veces de magnitud, lo que permite predecir a priori que el derivado *L*-alanil será entonces a su vez más activo aún que el *D, L*-alanil lo cual es posible si se recuerda que el Levofloxacino es también más activo que su componente racémico. Este proyecto abre la puerta para experimentar la actividad de todos los compuestos aquí descritos y su respectivo enantiómero.

Cuando se comparan las actividades de análogos frente a *E. coli* y *S. aureus* es notoria la diferencia de actividad tanto en términos de de $\mu\text{moles/ mL}$ como de $\mu\text{gramos/ mL}$ (fig. 32 y fig. 33) en los derivados de gly-Cbz, *D*-ala-Cbz, *D*-Lyz-Cbz, *L*-Try y *L*-Lys que presentan frente a ambas cepas confiriéndoles cierta selectividad.

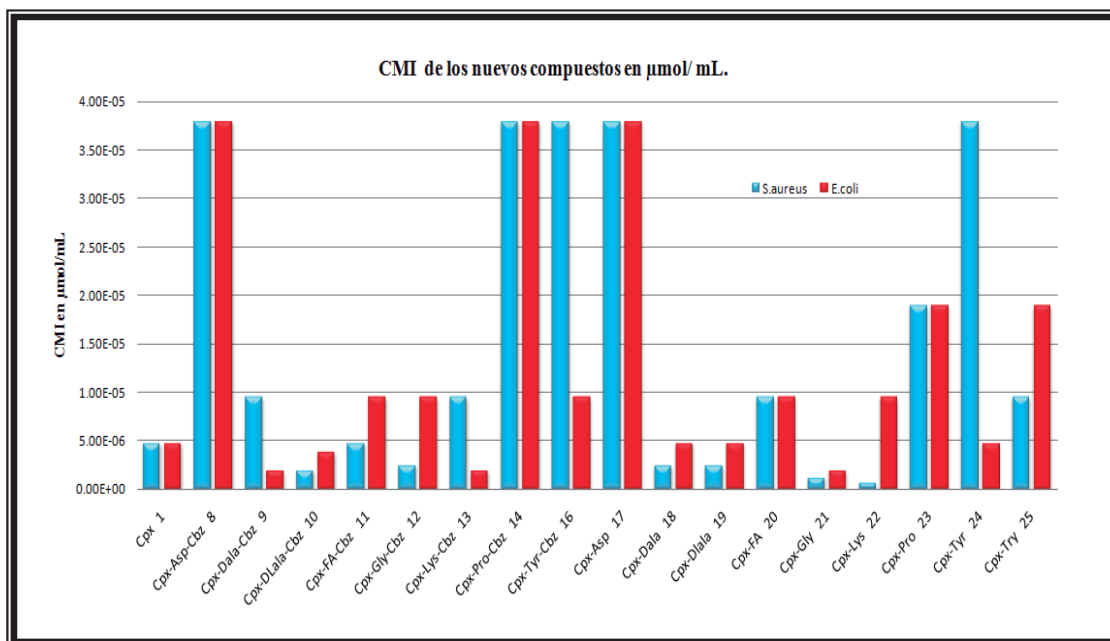


Figura 32. Actividad antimicrobiana en pruebas de dilución en tubo frente a *S. aureus* y *E. coli* en $\mu\text{mol/ mL}$.

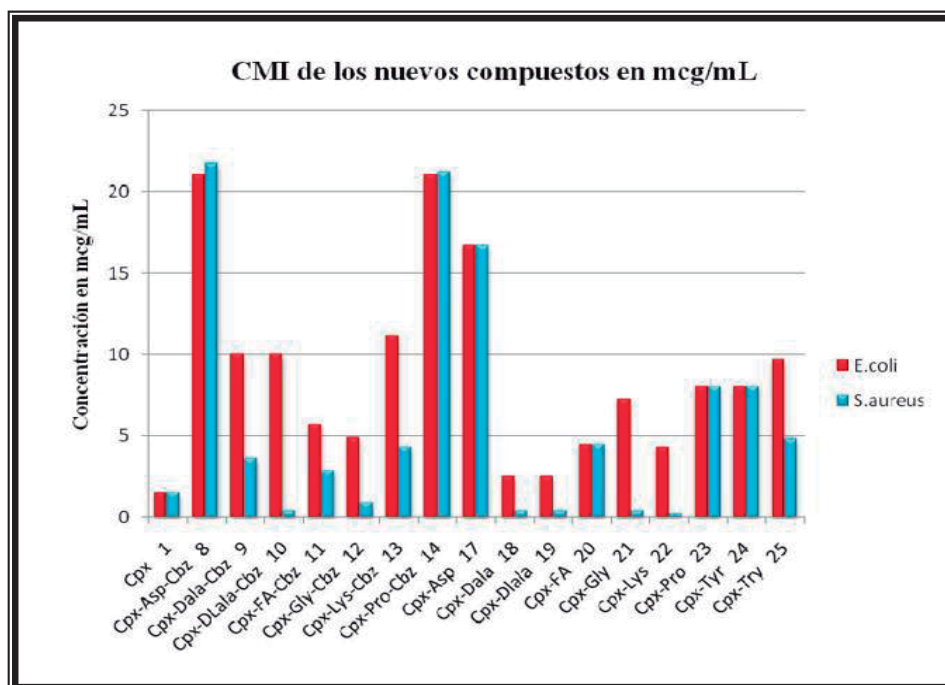


Figura 33. Actividad antimicrobiana en pruebas de dilución en tubo frente a *S.aureus* y *E.coli* en $\mu\text{g/mL}$.

Evidentemente, harán falta ensayos sobre una gama más amplia de microorganismos Gram positivos y negativos para concluir que existe selectividad lo cual sería un resultado importante pues la selectividad de un fármaco hace que sus efectos colaterales y secundarios disminuyan.

VIII. CONCLUSIONES

Se demuestra que el grupo aminoacilo en la posición 7 de la fluoroquinolona afecta la actividad antibacteriana frente a las cepas de *S.aureus* y *E. coli*, en algunos casos mejorándola lo cual los hace buenos candidatos a ser explorados en series más amplias.

Los nuevos análogos *N*-aminoalquil fluoroquinolonas y *N*-aminoacil fluoroquinolonas descritas enriquecen la cantidad de compuestos con actividad antibacteriana y permiten obtener compuestos que se pueden utilizar como precursores para la síntesis de otros compuestos de interés.

Los resultados obtenidos en esta tesis abren la puerta para sintetizar más derivados de aminoácidos y su respectivo enantiómero.

IX. REFERENCIAS

1. Andersson, M. I. and A. P. MacGowan. 2003. Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:1-11.
2. Appelbaum P.C. 1999. Quinolone activity against anaerobes. *Drugs* 58 (2): 60-64.
3. Ball P. New Fluoroquinolones: Real and Potential Roles. 1999. *Current Infectious Disease Reports*.1: 470-479.
4. Barbarics E., J.F. Kronauge, D. Cohen, A. Davison, A.G. Jones and J.M. Croop. 1998. Characterization of P-glycoprotein transport and inhibition in vivo. *Cancer Research* 58: 276-282.
5. Barnard, F.M. and A. Maxwell. 2001. Interaction between DNA gyrase and quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA subunit residues Ser83 and Asp87. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45: 1994-2000.
6. Barton, N., A. F. Crowther, W. Hesworth, *et al.* 1960. Quinolones and therapeutic compositions containing them. UK patent no. 830-832.
7. Bates A.D., Maxwell A. 2005. *DNA Topology*. Ed.Oxford.2nd edición.186pp.
8. Bechtle M., S. Chen and T. Efferth.2010. Neglected Diseases caused By Bacterial Infections. *Current Medicinal Chemistry* 17 (1): 42-60.
9. Chacón G.L. Estudio conformacional comparativo de algunas 3-N'-(cicloalquilamino) succinimidias por rnm vs. Datos obtenidos por computadora. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico farmacobiología. U.M.S.N.H.

10. Chu, D. T. Lico, I.M. Claiborne, A. K. Plattner, J.J. Pernet, A. G. 1990. Structure – activity relationship of quinolone antibacterial agents: The effects of C-2 substitution. *Drugs under experimental and clinical research* 16: 215-224.
11. Eash, K.J., M. S. Pulia, L. C. Wieland, and R.S. Mohan. 2000. A Simple Chemoselective Method for the Deprotection of Acetals and Ketals Using Bismuth Nitrate Pentahydrate. *The Journal of Organic Chemistry*. 65 (24), 8399-8401.
12. Emmerson, A. M. and A. M. Jones. 2003. The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:13-20.
13. Elsea H.S., Osheroff N., Nitiss J.L. 1992. Citotoxicity of quinolones toward eukaryotic cells. Identification of topoisomerase II as the primary cellular target for the quinolone cp-115,953 in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 13150-13153.
14. Fernández, E., G. Sánchez, E. Navarrete y Del Acázar F. 2004. Pérdida de la actividad antimicrobiana de quinolonas por efecto de la radiación UVA. Trabajos originales, facultad de farmacia. Valparaíso, Chile. <http://www.ugr.es/~ars/abstract/vol45/111-119.pdf> (Accesada en diciembre de 2009).
15. García, J. A. y N. Gutiérrez. 2002. Desfluoroquinolonas frente a Fluoroquinolonas; *Revista Española de Quimioterapia* 15 (4): 303-305.
16. Gutierrez, N. 2004. Relation between structure, activity and adverse effects of quinolones. *Revista Española de Quimioterapia* 17:232-243.
17. Heddle, J. and A. Maxwell. 2002. Quinolone-Binding Pocket of DNA Gyrase: Role of GyrB. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46: 1805-1815.
18. Higgins, P. G., A. C. Fluit, and F. J. Schmitz. 2003. Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Current Drug Targets* 4:181-190.

19. Holden, J. A. 2001. DNA Topoisomerases as Anticancer Drug Targets: From the Laboratory to the Clinic. *Current Medicinal Chemistry* 1: 1-25.
20. Hooper, D. C. 1998. Clinical applications of quinolones. *Biochimica et Biophysica Acta* 1400: 45-61.
21. Hooper, D. C. 2003. The quinolone antimicrobials. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 332-336.
22. Hayashi N., Y. Nakata and A. Yazaki. 2004. New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones with various substituents at position 1. *The American Society For Microbiology* 48 (3): 799-803.
23. Jacobs M.R. 1999. Activity of quinolones against mycobacteria. *Drugs* 59 (2): 9.
24. Kampranis, C. S. and A. Maxwell. 1998. The DNA gyrase-quinolone complex. *The Journal of Biological Chemistry* 3 (5): 22615-22626.
25. Lemaire S., T. Thuy, H. Le, S. C. Tang, M. Hincke, O. Labadie and S. Ziai. 2008. Antimicrobial effects of H4-(86-100), histogranin and related compounds – possible involvement of DNA gyrase. *FEBS Journal* 275: 5286-5297.
26. Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Baiely, and R. P. Brundage. 1962. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* 91:1063-1065.
27. Machuca E. de la P. 2010. Síntesis y evaluación como agentes antibacterianos de nuevas aminoacil fluoroquinolonas. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico farmacobiología. U.M.S.N.H.

28. Maxwell, A. 1997. DNA gyrase as a drug target. *Trends in Microbiology* 5:102-109.
29. Mella M. S., I. G. Acuña y M. Muñoz. 2000. Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Revista Chilena de Infectología* 17(1):53-66.
30. Mitscher L. A. 2005. Bacterial Topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridine antibacterial agents. *Chemical Reviews* 105 (2): 559-592.
31. Muytjens, H. L., V. R. de Repe, and G. V. Veldhuizen. 1983. Comparative activities of ciprofloxacin (Bay o 9867), norfloxacin, pipemidic acid, and nalidixic acid. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 24 (2): 302-304.
32. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grows Aerobically* - Fourth Edition; Approved Standard, NCCLS Document M7-A4, Volume 17, No. 2, NCCLS.
33. Noble G.C., Barnard M.F., Maxwell A. 2003. Quinolone-DNA interaction: Sequence dependent binding to single-stranded DNA reflects the interaction within the gyrase-DNA complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 854-862.
34. Peterson L.R. 2001. Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clinical Infectious Diseases* 33: 180-186.
35. Piddock, LJV.1994. New quinolones and gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 38: 163-169.
36. Rohlfig, S. R., J. R. Gerster, and D. C. Kvam. 1976. Bioevaluation of the antibacterial flumequine for urinary tract use. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 10:20-24.

37. Roychoudhury, S. and B. Ledoussal. 2002. Non-fluorinated quinolones (NFQs): new antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. *Current Drug Targets-Infectious Disorders* 2:51-65.
38. Rubinstein, E. 2001. History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy* 47 (3): 3-8.
39. Ruiz J. 2003. Mechanism of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 1109-1117.
40. Shen L.L., L.A. Mitscher, P.N. Sharma, T.J. O'Donnell, D.W. Chu, C.S. Cooper, T. Rosen and A.G. Pernet. 1989. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* 28: 3886-3894.
41. Siegmund K., S. Maheshwary., S. Narayanan., M. Riedrich., M. Printz., C. Richert and W. Connors. 2005. Molecular details of quinolone-DNA interactions: solution structure of an unusually stable DNA duplex with covalent linked nalidixid acid residues and non-covalent complexes derived from it. *Nucleic Acids Research* 33: 4838-4884.
42. Suto J.M., J.M. Domagala , *et al.* 1992. Fluoroquinolones: Relationships between structural variations, mammalian cell cytotoxicity, and antimicrobial activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 35: 4745-4750.
43. Taléns R.2001. Actividad antimicrobiana in vitro de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por vía oral. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.
44. Tuma J, H. Connors, W. Sitelman, H. David and R. Clemens. 2002. "On the effect of covalent appende quinolones on termini of DNA duplexes". *Journal of the American Chemical Society* 124: 4236-4246.

45. Turel I. 2002. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chemistry Reviews* 232: 27-47.
46. Wilson y Gisvold. 1998. Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 10^a Ed. Delgado Remers, Lippincott-Raven Publishers. pp. 197-202.
47. Wise, R., J. M. Andrews, and L. J. Edwards. 1983. In vitro activity of Bay 09867, a new quinoline derivative, compared with those of other antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 23: 559-564.

X. ANEXOS

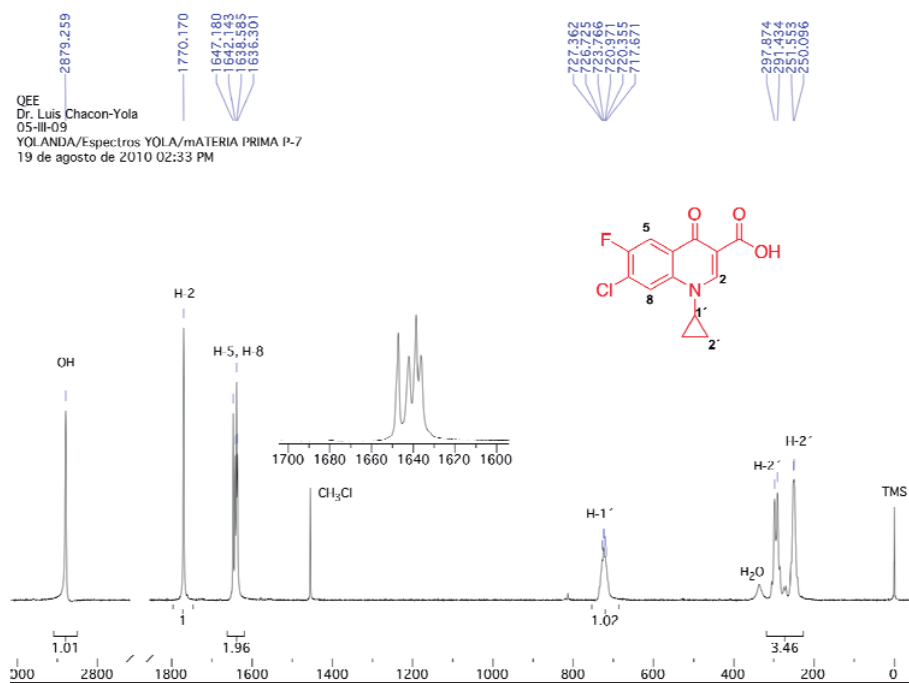


Figura 34. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 42.

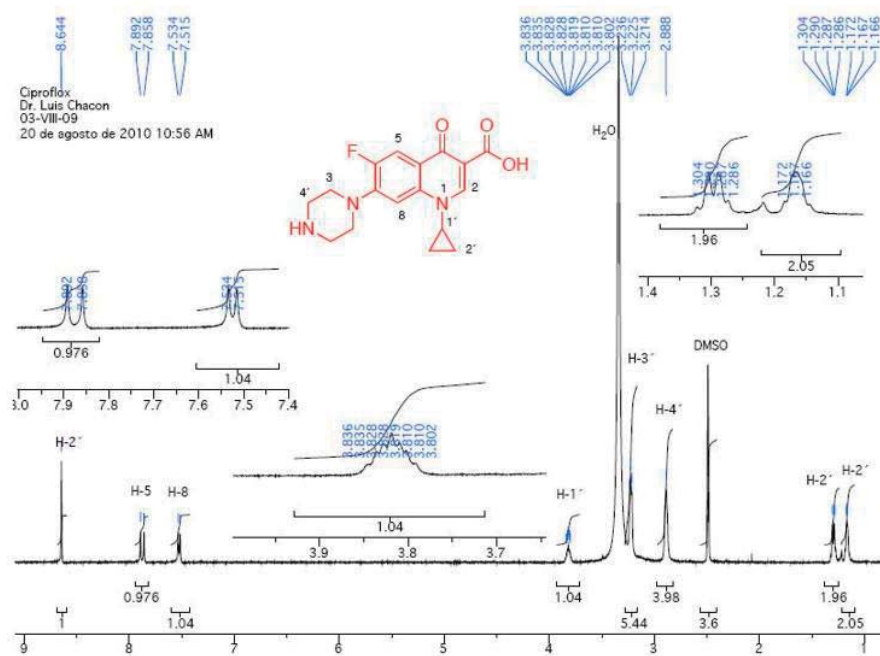
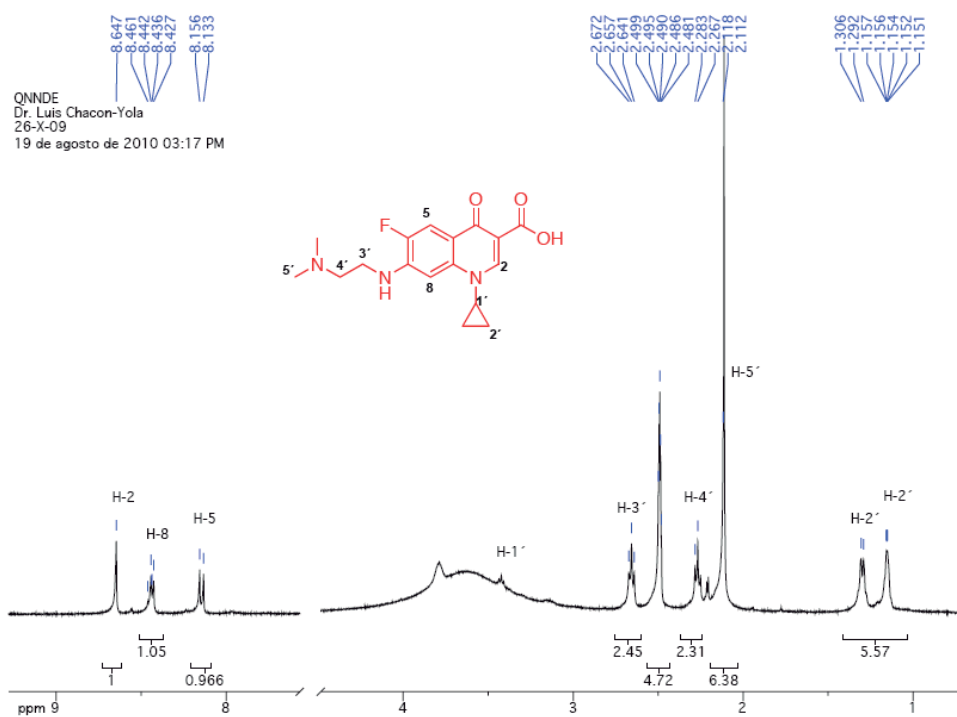
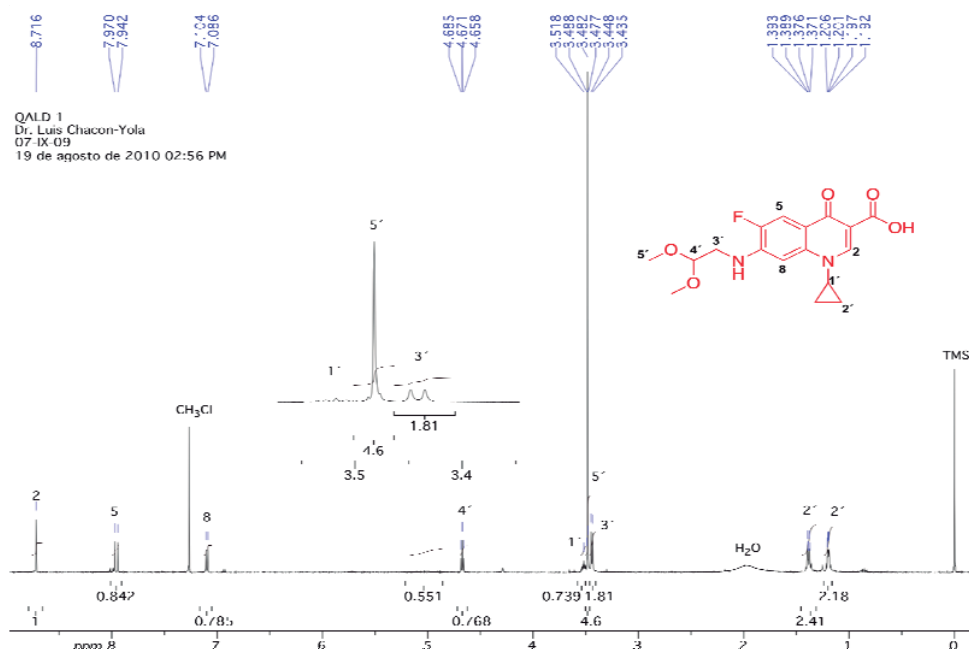


Figura 35. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 1.



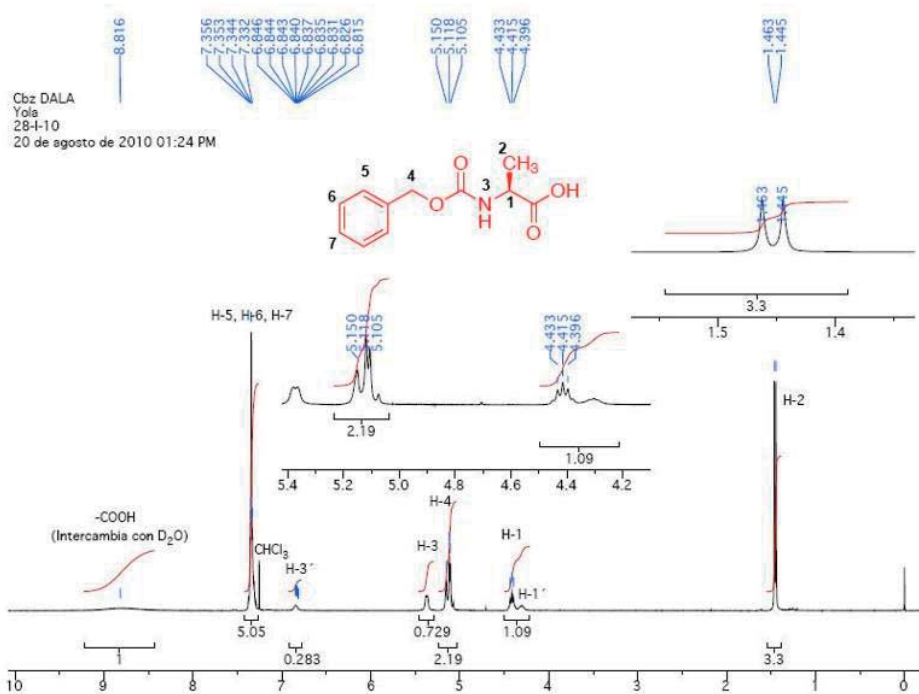


Figura 38. Espectro de ¹H RMN a 400 MHz en DMSO de 34.

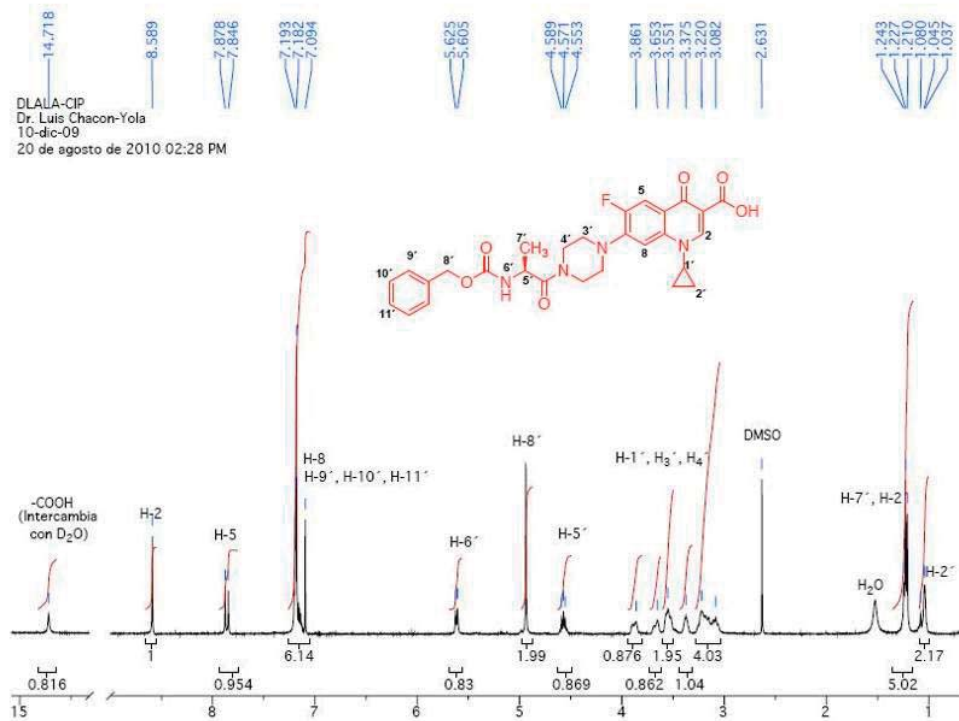


Figura 39. Espectro de ¹H RMN a 400 MHz en DMSO de 9.

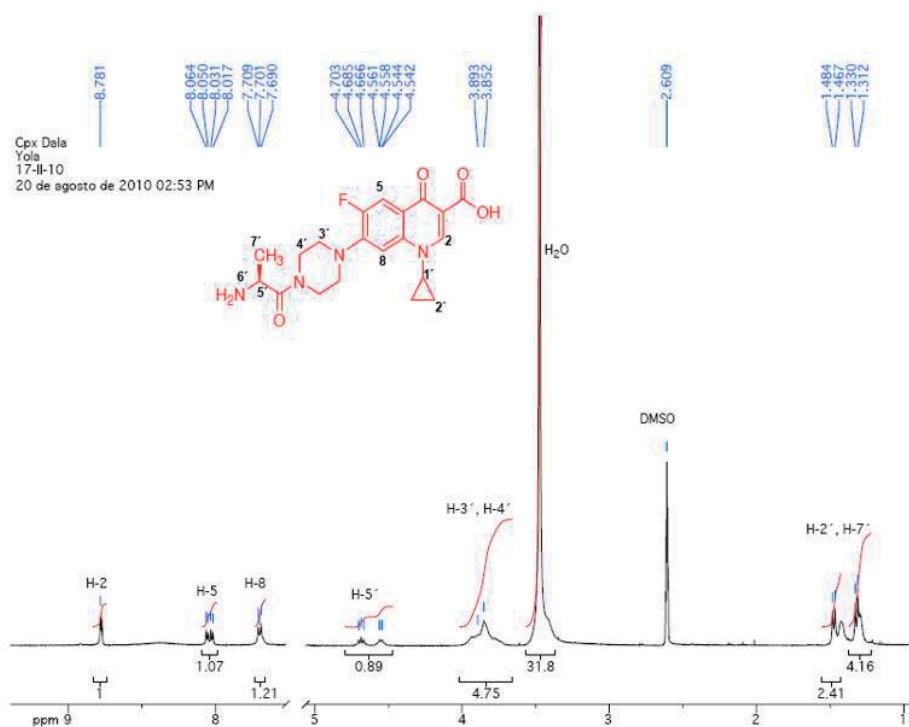


Figura 40. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 18.

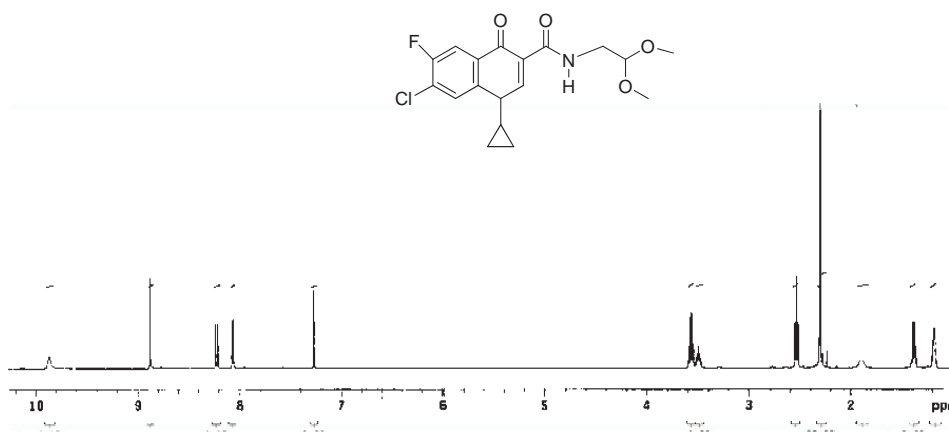


Figura 41. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de CDCl_3 .

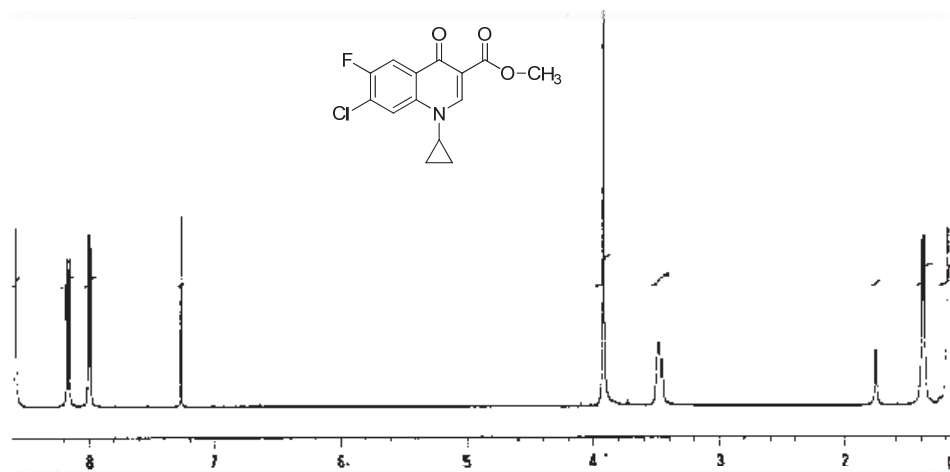


Figura 42. Espectro de ^1H RMN a 400 MHz en DMSO de 43.