

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**

INFORME DE CONCLUSIÓN

Proyecto de servicio social:

“Síntesis de índoles y su potencial como agentes antimicrobianos”

Saúl Iván de la Rosa Medina

Matrícula: 2183072533

Lugar de servicio: Instituto de Química

Periodo de servicio: 27 de marzo de 2023 – 29 de septiembre de 2023



**Asesor externo
Dr. Eduardo Hernández Vázquez
8324490
Investigador asociado “C” de
tiempo completo interino**



**Asesor interno
Carlos Alberto Méndez Cuesta
37971
Departamento de Ciencias
Biológicas**

Introducción:

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un fenómeno por el cual las bacterias adquieren o desarrollan mecanismos para evitar la acción de los fármacos; este fenómeno incrementa la virulencia y patogenicidad de las bacterias, situándose como un severo problema no solamente en el área de la salud pública, pero también en lo social y cultural. La creciente RAM (debido mayormente a razones antropogénicas) pone en jaque al arsenal de compuestos habidos en la terapéutica actualmente. El problema de la RAM es tan severo que se estima que para el año 2025, el número de defunciones anuales atribuidas a infecciones resistentes ascenderá a más de 10 millones.

Por lo anterior, es de suma importancia el diseño y desarrollo de nuevos antimicrobianos que tengan como objetivo blancos biológicos diferentes a los explorados con anterioridad y, de esta manera disminuir el riesgo de que fracasen en su actividad antimicrobiana, teniendo poca o nula efectividad.

Gracias a los motivos expuestos con anterioridad se buscará la síntesis de moléculas que compartan características con la afabicina (inhibidor de síntesis de ácidos grasos) como lo son ciertos derivados de indoles y γ -carbolinas.

Planteamiento del problema

La necesidad de contar con alternativas terapéuticas conduce al diseño, desarrollo y optimización de obtención de nuevos compuestos de manera urgente. Debido a ello, surge el interés dentro del grupo de investigación en la síntesis de moléculas derivadas de indoles y carbolinas que puedan tener efecto antimicrobiano, siendo de gran importancia el utilizar materias primas accesibles y que no conlleven una gran cantidad de reacciones que no permitan un bajo rendimiento global.

Objetivos

Preparar series de compuestos de carbolinas y carbohidrazidas para ser evaluados como antimicrobianos frente a diferentes cepas de *S. aureus* multirresistente.

Objetivos específicos

- Reforzar conocimientos previos del alumno aprendidos durante la carrera de QFB.
- Aprender sobre temas complejos síntesis orgánica, espectroscopía y microbiología.
- Repasar las técnicas básicas de purificación de un laboratorio de síntesis orgánica.
- Aprender a purificar compuestos orgánicos a través de diversos métodos.

- Repasar técnicas como espectroscopía de infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.
- Estandarizar una ruta de síntesis de carbolinas a partir de anilinas y 4-piperidona.

Antecedentes

Los antimicrobianos son sustancias usadas para tratar o prevenir infecciones bacterianas, y son considerados los agentes antimicrobianos más importantes (NHS, 2019). Los antimicrobianos tradicionales actúan sobre los procesos o estructuras microbianas que difieren de aquellos de las células mamíferas.

El tratamiento con antimicrobianos es una de las formas principales con la que la medicina actual combate las infecciones. Sin embargo, debido a que los antimicrobianos han tenido un uso irracional, existe un incremento en la aparición de cepas multirresistentes. Dichas cepas provocan una gran preocupación no solamente en el área de la salud pública, sino también en el ámbito económico y cultural, por lo que es imperativo darle atención a esta problemática.

Dentro de los agentes etiológicos de mayor preocupación se encuentra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Las infecciones causadas por MRSA son una amenaza creciente a la salud global, por lo que es necesario el descubrimiento de nuevos antibióticos para su control.

Resulta fútil la investigación en mecanismos de acción clásicos debido a el enorme arsenal de mecanismos de resistencia. Lo anterior obliga a atacar blancos terapéuticos diferentes o recientemente descubiertos. Uno de los blancos terapéuticos de interés es la enzima FabI (*trans*-enoil-ACP reductasa), esencial para la biosíntesis de ácidos grasos en la ruta tipo 2 (FAS II), ruta responsable para la producción de fosfolípidos precursores. FabI cataliza la reducción final de la ruta, funcionando como reguladora de la biosíntesis de ácidos grasos en la misma. FabI ha mostrado ser inhibida por compuestos con estructura de difenil éter conectados por enlace éter como el triclosán, vía la formación de enlace de hidrógeno con el residuo de tirosina 157 de la proteína. La inhibición de FabI ha demostrado ser letal para MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina), por lo que es reconocida como buen blanco terapéutico para este tipo de cepas cada vez más peligrosas.

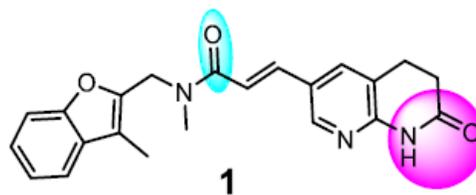


Figura 1. Estructura de la afabicina

En este sentido, se planea la síntesis de γ -carbolinas que mantienen las porciones farmacofóricas encontradas en otros inhibidores de FabI, como, por ejemplo, la afabicina (1, Figura 1). Las series mantienen el grupo carbonilo (color cian) y un grupo capaz de aceptar/donar enlace de hidrogeno (color rosa) con la Ala-97 dentro del sitio catalítico de FabI. Con este propósito se plantea el uso de la síntesis de indoles de Fischer con diferentes cetonas alifáticas y fenilhidrazinas para generar las moléculas objetivo.

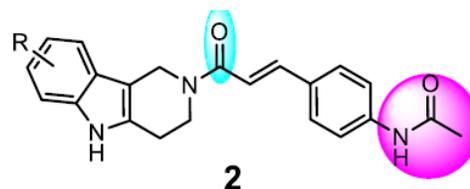
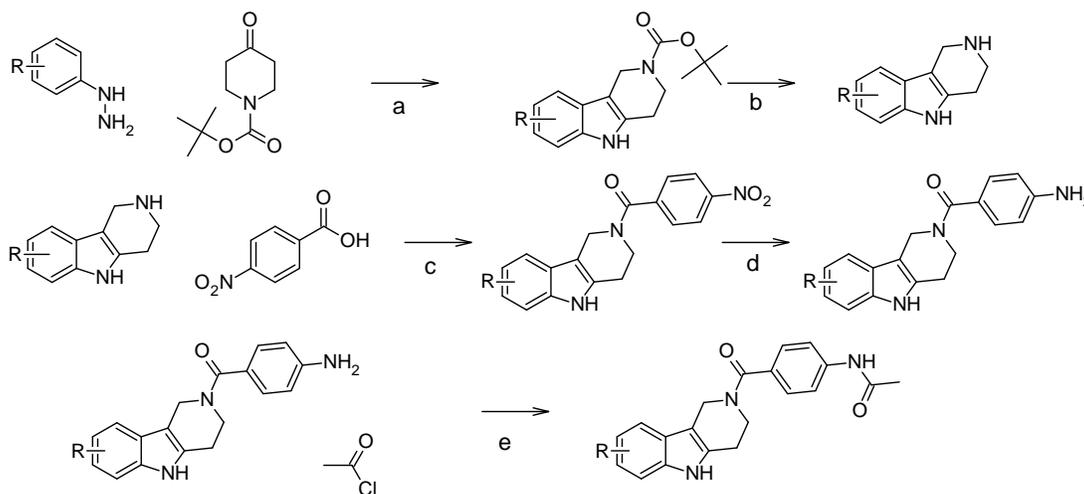


Figura 2. Estructura de los compuestos que se buscan sintetizar

Material y métodos

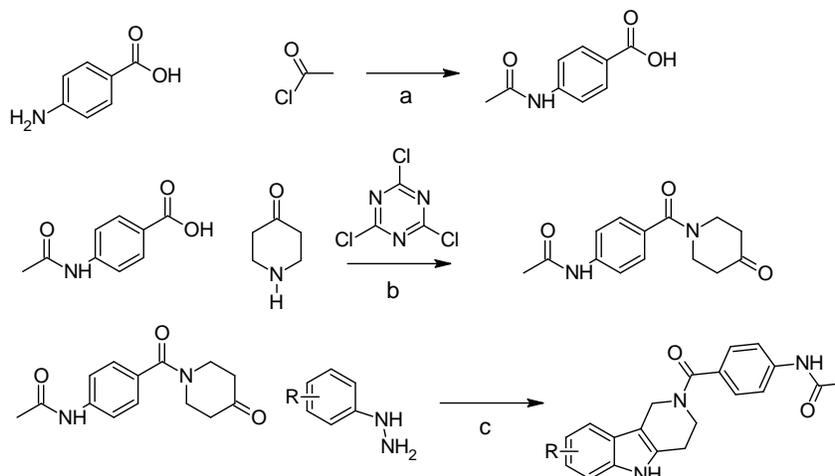
La serie de moléculas a realizar consiste en γ -carbolinas del tipo 2 (Figura 2). Con este propósito se diseñó la siguiente ruta (Esquema 1): Diferentes arilhidrazinas se condensarán con 4-piperidona vía la síntesis de indoles de Fischer para generar la carbolina correspondiente, la reacción se purificará en columna, la amina secundaria resultante se condensará con el ácido 4-nitrofenilpropenoico para obtener la amida correspondiente. Finalmente, la reducción del grupo nitro y la acetilación dará lugar a los productos de interés.



Esquema 1. Ruta original de síntesis propuesta para la formación de γ -carbolinas.

a): H_2SO_4 , EtOH; b): TFA, CH_2Cl_2 ; c): CDI, Trietilamina (TEA), THF; d): HCl, Fe, EtOH:H $_2$ O; e): TEA, CHCl_3 .

Se planteó una ruta alterna (Esquema 2), la cual comienza con la acetilación del PABA (ácido 4-aminobenzoico), la cual se trató con una extracción ácida; seguido con la activación del ácido carboxílico con la 1,3,5-triclorotriazina (TCT) y posterior reacción con la piperidona, cuyo producto puede ser separado con cromatografía en columna. Finalmente, se realizará la síntesis de indoles de Fischer, purificando el producto por cromatografía en columna igualmente.

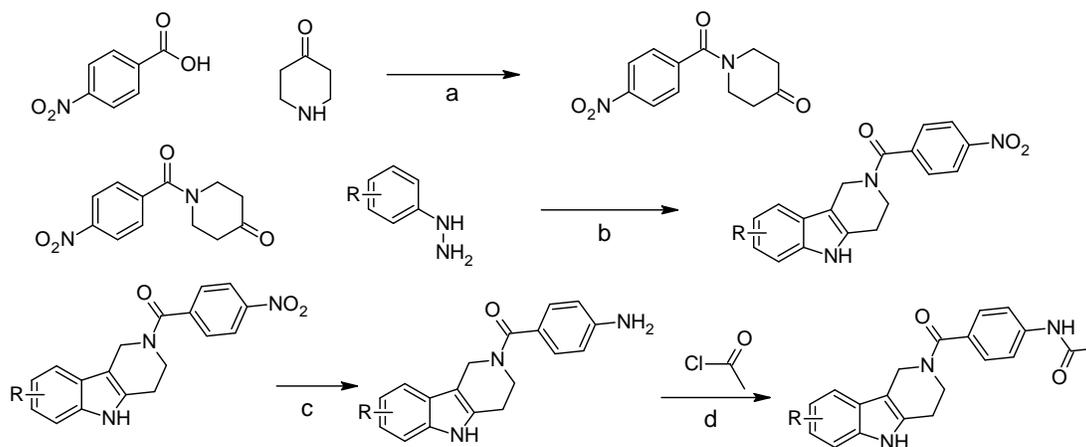


Esquema 2. Ruta alterna para la formación de γ -carbolidinas.

a): Trietilamina (TEA), CHCl_3 ; b): TCT, TEA, THF; c): H_2SO_4 , EtOH.

Resultados

Después de algunos intentos con las rutas antes planteadas (modificando condiciones o equivalentes de los reactivos) se optó por cambiar la ruta sintética a una nueva (Esquema 3) la cual consiste en la activación de ácido 4-nitrobenzoico con CDI o TCT para formar una amida con la 4-piperidona, el producto fue separado por columna. Posteriormente, se formó la carbolina correspondiente al reaccionar la fenilhidrazina y la cetona. La última etapa de la síntesis consistió en la reducción del grupo nitro, el cual tuvo un tratamiento para desechar el hierro utilizando etanol caliente y varias filtraciones al vacío en cama de celita. La acetilación de la amida correspondiente fue el paso final, para purificar los compuestos de interés se realizó una extracción ácida y una posterior purificación en columna.

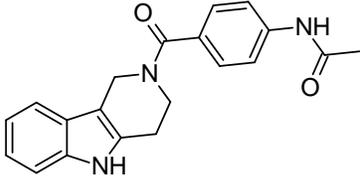
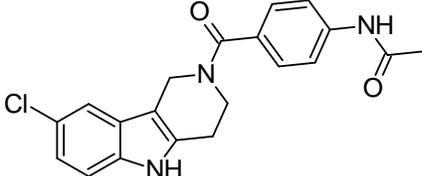
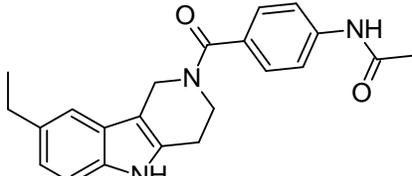
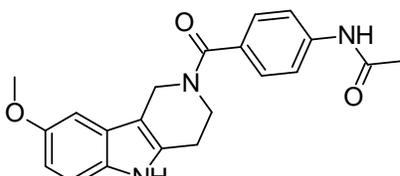
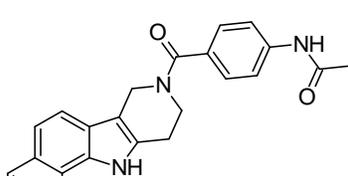


Esquema 3. Ruta elegida para la formación de γ -carbolidinas.

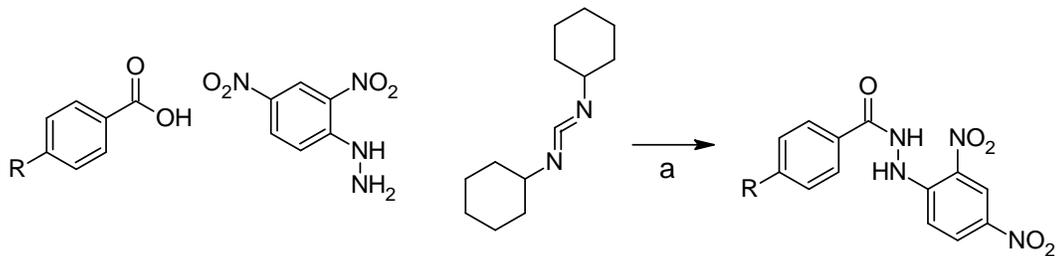
a): CDI, Trietilamina (TEA), THF; b): H_2SO_4 , EtOH; c): HCl , Fe, EtOH: H_2O ; d): TEA, CHCl_3 .

Seguindo la ruta anterior, se prepararon los derivados mostrados en la Tabla 1 en rendimientos moderados bajos (20% - 32%).

Tabla 1. Diferentes carbolinas sintetizadas.

Estructura	Rendimiento global
	20%
	30%
	32%
	22%
	10%

Por otro lado, se sintetizaron una serie de carbohidrazidas para un proyecto en colaboración con el Laboratorio de Macromoléculas. Con ese propósito se realizaron

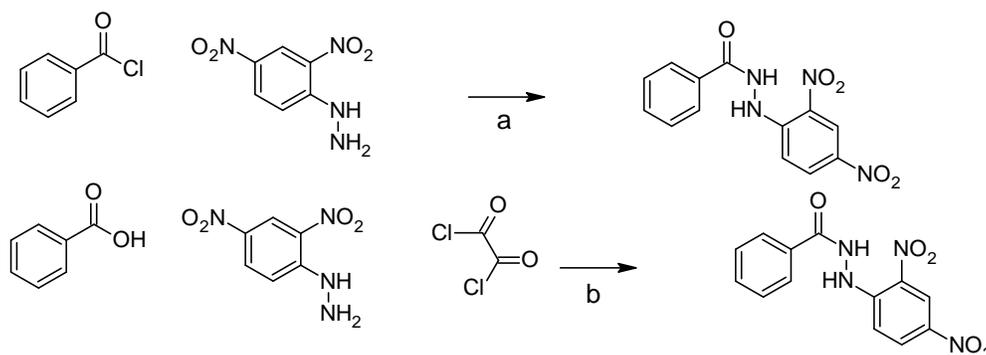


Esquema 4. Primer acercamiento para la formación de las carbohidrazidas.

a): 4-DMAP, THF.

varios experimentos para encontrar la ruta más viable para la síntesis de los compuestos de interés. El primer acercamiento se hizo intentando acoplar la fenilhidrazina utilizando DCC (Esquema 4) como agente de acoplamiento. Para conseguir el producto deseado se procuró hacer una serie de filtraciones al vacío, lavando con acetonitrilo.

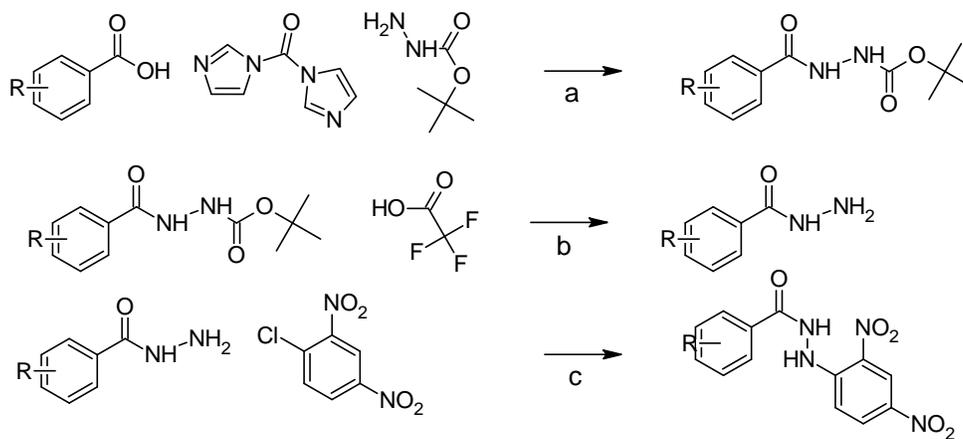
De igual forma, se intentó utilizar cloruro de benzoilo para unir la fenilhidrazina directamente con el grupo aromático, así como el uso de cloruro de tionilo (SOCl_2) como agente para clorar el ácido benzoico y poder acilar con la fenilhidrazina (Esquema 5). Ninguno de estos métodos resultó efectivo para lograr la síntesis



Esquema 5. Reacciones propuestas para la obtención de carbohidrazidas.

a): CDI, THF; b): TEA, DCM.

Debido a estos resultados, se decidió usar CDI para activar el ácido carboxílico correspondiente para unirlo con carbazato de *ter*-butilo. Posteriormente, se realizó la desprotección del grupo Boc con ácido trifluoroacético, la reacción se trató con una extracción básica y una vez obtenido el producto se llevó a reacción con 2,4-dinitroclorobenceno para generar una reacción vía $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ para la formación de los productos de interés. (Esquema 6)

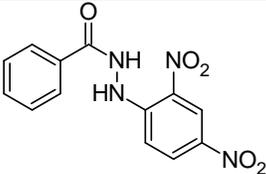
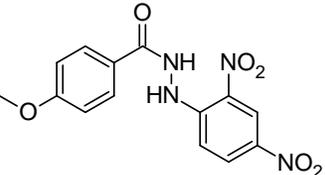
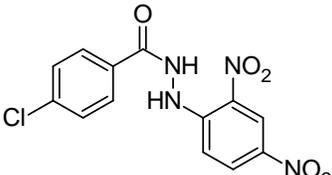
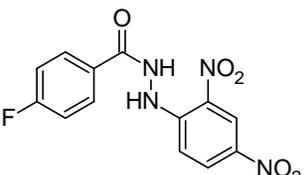
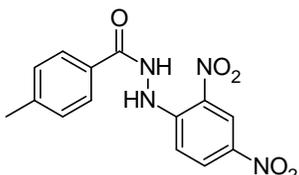
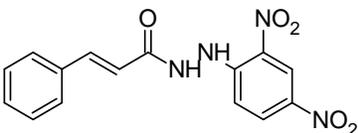
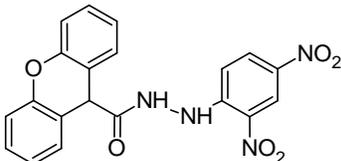


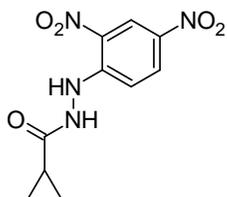
Esquema 6. Ruta seguida para la formación de las carbohidrazidas.

a): TEA, THF; b): CHCl_3 ; c) TEA, EtOH.

Con esta ruta, se prepararon diferentes carbohidrazidas en un rendimiento entre el 10% y 40% (tabla 2).

Tabla 2. Diferentes carbohidrazidas sintetizadas.

Estructura	Rendimiento global
	20%
	20%
	25%
	10%
	40%
	30%
	40%



15%

Conclusiones

Se lograron preparar dos serie de heterociclos, los cuales podrían presentar una actividad antimicrobiana contra alguno de los 6 patógenos listados como prioritarios por la OMS (*Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp*). Los resultados aquí expuestos afirman la posibilidad de generar nuevos compuestos con potencial aplicación biológica de compuestos con el heterociclo y grupos funcionales de interés.

Las moléculas desarrolladas podrían sentar las bases para el diseño de compuestos innovadores que puedan tener efecto antimicrobiano con mecanismos de reacción no exploradas con anterioridad, para así tener una menor probabilidad de que los patógenos desarrollen mecanismos de resistencia.

Los rendimientos bajos podrían ser mejorados modificando algunas variables al momento del montaje de las reacciones, en su tratamiento y purificación de los compuestos, esto con el objetivo de poder investigar en los diferentes tipos de análogos que podrían conseguirse. Las diferentes condiciones modificadas se pueden observar en la tabla 3 en la sección de anexos.

Anexos

Tabla 3. Condiciones de las diferentes reacciones llevadas a cabo. En verde se marcan las condiciones empleadas para la síntesis de los compuestos de interés.

Esquema	Reacción	Condiciones	Resultado
1	a	A reflujo, 2 horas	No procedió, baja solubilidad de la reacción
		A reflujo, 2 horas 0.8 equivalentes de TEA	No se obtuvo el producto
	b	No se realizó	NA
	c	No se realizó	NA
	d	No se realizó	NA
	e	En diclorometano 0° C, 15 minutos	La mezcla con solubilidad muy baja
2	a	0° C, 15 minutos Temperatura ambiente, 2 horas En diclorometano	Mezcla resultante mostró baja solubilidad
		0° C, 15 minutos T.A., 2 horas En cloroformo	Rendimiento moderado alto
	b	40° C, 2 horas 40° C, 20 horas	Rendimiento moderado bajo, productos muy poco solubles
	c	No se realizó	NA
3	a	45° C, 2 horas 40° C, 18 horas Sin TEA	Formación de muchos productos difíciles de separar
		45° C, 2 horas 40° C, 18 horas Sin TEA	Rendimiento moderado a alto, condiciones utilizadas para la síntesis
	b	Reflujo. 6 horas	Rendimiento moderado alto, condiciones utilizadas para la síntesis

	c	Reflujo, 4 horas Sistema H ₂ O, EtOH 2:1	Pérdidas del producto al intentar evaporar el exceso de agua
		Reflujo, 4 horas Sistema H ₂ O, EtOH 1:2	Rendimientos altos, condiciones utilizadas para la síntesis
		0° C, 15 minutos T.A., 2 horas En cloroformo	Rendimiento moderado alto, condiciones utilizadas para la síntesis
4	a	0° C, 20 horas	No procedió la reacción
		0° C, 2 horas T.A., 18 horas	Rendimiento muy bajo
		0°C, 15 minutos 0°C, 10 minutos T.A., 16 horas	Rendimiento muy bajo
5	a	0° C, 15 minutos T.A., 2 horas	Rendimiento muy bajo
		40 °C, 2 horas 40 °C, 6 horas	No procedió
	b	40 °C, 2 horas 50 °C, 18 horas	No procedió
6	a	45° C, 2 horas 40° C, 18 horas 0.8 equivalentes CDI	Rendimiento muy bajo
		45° C, 2 horas 40° C, 18 horas 1 eq CDI 0.9 eq carbazato de tert-butilo	Procedió con rendimiento moderado bajo
		45° C, 2 horas 40° C, 16 horas 1.1 eq. CDI 0.9 eq. carbazato de tert-butilo	Rendimientos moderados, condiciones utilizadas para la síntesis
	b	5 eq. TFA Sin disolvente	Pérdida en el tratamiento de la reacción

		3 eq. TFA En diclorometano	Poca solubilidad de la reacción, pérdida de en el tratamiento
		5 eq TFA En cloroformo T.A., 2 horas	Procedió con buen rendimiento, condiciones utilizadas para la síntesis
	c	Uso de 1-fluor-2,4-dinitrobenceno En cloroformo 50 °C, 2 horas	Aparición de muchos productos, materia prima probablemente contaminada
		Uso de 1-fluor-2,4-dinitrobenceno En etanol 50° C, 3 horas	Procedió con buenos rendimientos, condiciones elegidas para la síntesis

Referencias

1. National Health Service. (29 de mayo de 2019). Overview: Antibiotics. NHS. Recuperado el día 12/01/2022 de <https://www.nhs.uk/conditions/antibiotics/>
2. Lu, H., & Tonge, P. J. (2008). Inhibitors of FabI, an Enzyme Drug Target in the Bacterial Fatty Acid Biosynthesis Pathway. *Accounts of Chemical Research*, 41(1), 11–20. <https://doi.org/10.1021/ar700156e>
3. Marrakchi, H., Zhang, Y., & Rock, C. O. (2002). Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochemical Society Transactions*, 30(Pt 6), 1050–1055. <https://doi.org/10.1042/bst0301050>
4. Park, H. C., Yoon, Y. S., Jung, S., Yun, I. N. R., Kim, C. S., Kim, J. H., & Kwak, J. (2007). CG400462, a new bacterial enoyl–acyl carrier protein reductase (FabI) inhibitor. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(5), 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.07.006>
5. Payne, D. N., Miller, W. R., Berry, V., Brosky, J., Burgess, W. J., Chen, E. P., DeWolf, W. E., Fosberry, A. P., Greenwood, R. C., Head, M. S., Heerding, D. A., Janson, C. A., Jaworski, D. C., Keller, P. A., Manley, P. E., Moore, T. D., Newlander, K. A., Pearson, (2002). Discovery of a Novel and Potent Class of FabI-Directed Antibacterial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3118–3124. <https://doi.org/10.1128/aac.46.10.3118-3124.2002>
6. Schiebel, J., Chang, A. C., Lu, H., Baxter, M., Tonge, P. J., & Kisker, C. (2012). Staphylococcus aureus FabI: Inhibition, Substrate Recognition, and Potential Implications for In Vivo Essentiality. *Structure*, 20(5), 802–813. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.03.013>

7. Kenneth J. Ryan, C. George Ray. (2011). Sherris. Microbiología Medica (5ª edición), New York: McGraw Hill Book Co.