



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA XOCHIMILCO
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Reporte final:
“Síntesis de materias primas para la obtención de potenciales antimicrobianos”

Cesar Eduardo Tovar Roman

Asesor externo: Dr. Eduardo
Hernández-Vázquez

Investigador del Instituto de Química,
UNAM

Tovar Roman Cesar Eduardo
Número de matrícula: 2183030464

Alumno:

Dr. Cuauhtemoc Pérez González
19327

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOC
Asesor interno

Introducción:

La resistencia a los antibióticos sucede cuando las bacterias se adaptan y desarrollan mecanismos para evadir el efecto de éstos y es considerada un problema de salud pública mundial. Según la OMS, cada año mueren 700 mil personas de infecciones por bacterias resistentes en el mundo. Según los cálculos más desalentadores, se espera que para el año 2050 se estima que las bacterias van a poder llegar a causar 10 millones de personas colocándose en el primer lugar de causas de muerte en el mundo.^[1]

Lo anterior recalca la necesidad de la investigación en esta área, donde la obtención de nuevos antimicrobianos es preponderante. Es importante indicar que los blancos biológicos a los cuales se enfoca el diseño de los compuestos deben ser completamente diferentes a los utilizados en la era dorada de los antibióticos para disminuir las probabilidades de fracaso temprano. Por ende, se buscará la síntesis de imidazo[1,2-*a*]pirimidinas por medio de reacciones de multicomponente que puedan tener un efecto antimicrobiano. Estos compuestos se evaluarán como antimicrobianos contra cepas multirresistentes de interés clínico, utilizando el método de microdilución en pozo.

Planteamiento del problema y justificación:

La necesidad de contar con nuevas alternativas terapéuticas urge a preparar compuestos diversos y con métodos de síntesis que permitan la construcción de las moléculas de una manera expedita. En nuestro grupo de investigación estamos interesados en explorar el espacio químico utilizando reacciones de multicomponente, específicamente la reacción de Groebke-Blackburn-Bienaymé (GBB). Este protocolo genera imidazo[1,2-*a*]pirimidinas cuyas propiedades farmacológicas no están tan ampliamente exploradas pero algunos trabajos indican su potencial actividad antimicrobiana.

Objetivo General:

Sintetizar las materias primas y distintos heterociclos (imidazo[1,2-*a*]pirimidinas y/o quinoxalinas) y evaluarlos como antimicrobianos.

Objetivos específicos:

1. Sintetizar diferentes isonitrilos y amidas a partir de anilinas.
2. Sintetizar al menos dos heterociclos (imidazo[1,2-*a*]pirimidinas y/o quinoxalinas)
3. Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de una serie de heterociclos (imidazo[1,2-*a*]pirimidinas y/o quinoxalinas) mediante el método de microdilución en pozo.

Antecedentes:

El descubrimiento de los antibióticos fue un momento decisivo en la historia de la humanidad que revolucionó la medicina y ha salvado innumerables vidas y

permitido la realización de procedimientos quirúrgicos en los cuales son indispensables.

El tratamiento con antibióticos es uno de los principales enfoques de la medicina moderna que se utiliza para combatir las infecciones. La “era dorada” de los antibióticos abarcó desde la década de 1930 hasta la década de 1960, lo que dio lugar a una plétora de fármacos englobados en diferentes mecanismos de acción. Sin embargo, la aparición de cepas multirresistentes (en su mayoría por causas antropológicas como el uso racional de los antimicrobianos) ha convertido a la búsqueda de nuevas estrategias antimicrobianas como una prioridad en salud. [2,3]

Actualmente, expertos en el área de la salud están planteando un escenario de alta preocupación por el regreso a la era anterior a los antibióticos donde las enfermedades causadas por infecciones bacterianas era una de las principales causas de muerte. Tras el análisis de los genomas bacterianos disponibles, se ha observado que más de 20.000 genes ayudan a la generación de resistencia potencial a los antibióticos. La resistencia a los antimicrobianos (RAM por sus siglas en inglés) plantea una grave amenaza global de creciente preocupación para la salud humana, animal y ambiental. Esto se debe a la aparición, propagación y persistencia de bacterias resistentes a múltiples fármacos que se denominaron "superbacterias". [4,5]

A fines de la década de 1950 y principios de la de 1960, se detectó por primera vez resistencia a los antibióticos a múltiples agentes antimicrobianos entre bacterias entéricas como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*. Más adelante, en la década de 1970 se observó que *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* adquirieron resistencia a la ampicilina, mientras que en el caso de *Haemophilus*, además, se informó que también es resistente a la tetraciclina y al cloranfenicol. Debido al uso cada vez mayor e indiscriminado de antimicrobianos, la formación de resistencia se aceleró; una de las principales causas es la facilidad de adquisición por parte de los pacientes, así como la falta de terminación del tratamiento o el uso en infecciones de tipo viral. [4]

En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en la preparación de compuestos orgánicos con potencial actividad antimicrobiana. Para lograr este propósito, utilizamos dos aproximaciones: el diseño racional de fármacos y la exploración del espacio químico. En el caso de la segunda aproximación, relacionada directamente con este proyecto, pretende encontrar nuevos núcleos químicos principalmente mediante el empleo de reacciones de multicomponente.

La reacción de Groebke-Blackburn-Bienaymé (**Figura 1**) es utilizada para la síntesis de compuestos aza-heterocíclicos a partir de un aldehído, un isonitrilo y una amidina. La reacción está catalizada por diferentes ácidos de Lewis y puede realizar en disolución o sin disolvente, o bajo irradiación de microondas como fuente de calor. Los productos GBB se pueden utilizar para la síntesis de una variedad de compuestos más complejos a través de reacciones posteriores donde pueden surgir modificaciones. Estos incluyen la ciclación y la sustitución nucleofílica, así como otras MCR. La reacción GBB ha visto diversas

aplicaciones en química combinatoria y médica y sus productos son de gran utilidad en el descubrimiento de fármacos [6]

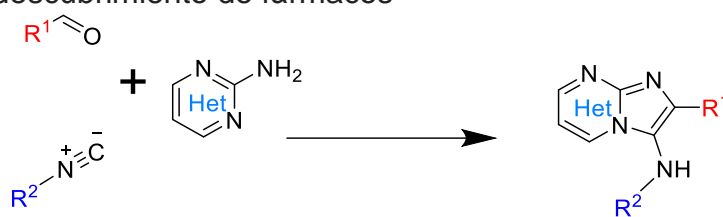
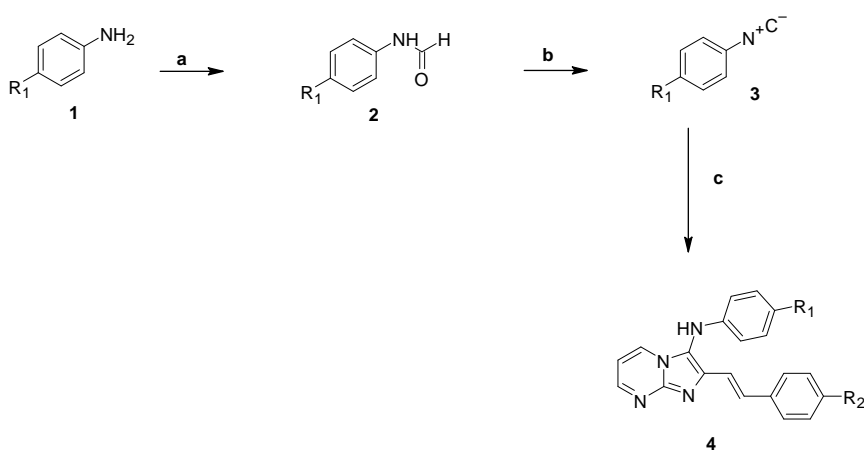


Figura 1. Reacción GBB

La imidazo[1,2-*a*]piridina es un compuesto bien conocido en muchos fármacos comercializados, como zolpidem, ácido minodrónico, miroprofeno y DS-1. Debido a esto, la reacción de Groebke, Blackburn y Bienaymé generó un auge en la exploración de este tipo de compuestos. Durante el transcurso de dos décadas, la reacción GBB-3CR ha emergido como una reacción multicomponente muy importante, dando como resultado más de cien patentes y un gran número de publicaciones en diversos campos de interés. [6,7]

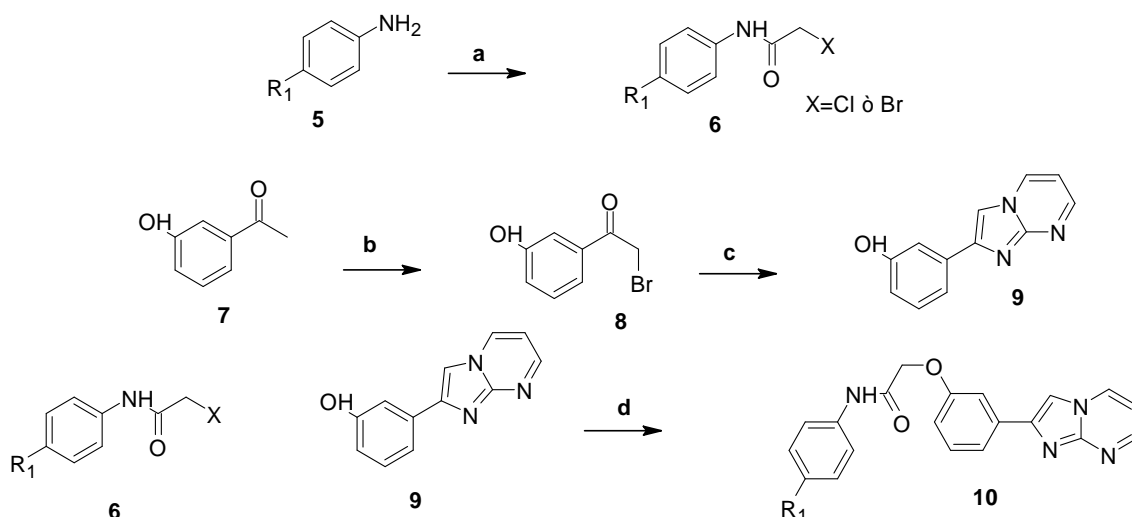
Materiales y métodos:

Se prepararán dos diferentes tipos de imidazo[1,2-*a*]pirimidinas. La primera serie consiste en la sustitución en la posición 2 del biciclo por un alqueno. Esta idea surge de la optimización de trabajos previos donde identificamos la potencial actividad antimicrobiana de este tipo de derivados. Para realizar la síntesis, se seguirá lo mostrado en el **Esquema 1**. Primero, se prepararán diferentes isonitrilos (**3**) siguiendo una síntesis de dos pasos, donde diferentes anilinas (**1**) se formularán mediante el anhídrido mixto correspondiente y posteriormente se deshidratarán utilizando el ioduro de iodotrifetilfosfonio preparado *in situ*. Teniendo los isonitrilos, se llevará a cabo la reacción GBB con 2-aminopirimidina y diferentes cinamaldehídos, utilizando triflato de escandio (III) como catalizador, para, en un solo paso, construir los biciclos del tipo **4**.



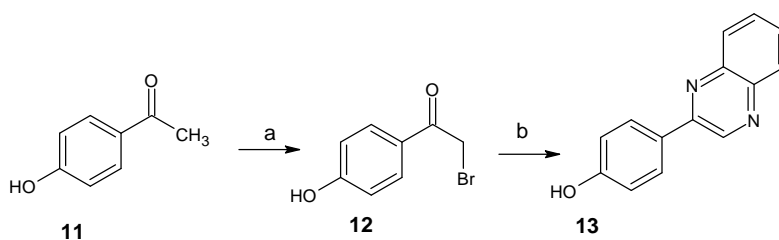
Esquema 1. Síntesis de 2-alquenilimidazo[1,2-*a*]pirimidinas. Reactivos y condiciones: a) HCOOH, Ac₂O, THF, 2 h, 50 °C; b) PPh₃, I₂, TEA, 0 °C, 1h; c) correspondiente derivado de cinamaldehído, 2-aminopirimidina, Sc(TfO)₃, 95 °C, 24 h.

Para el segundo tipo de compuestos, se pretende obtener imidazo[1,2-a]pirimidinas del tipo **10** con el objetivo de realizar una síntesis enfocada a la diversidad estructural. En este sentido, se sintetizarán las amidas del tipo **6** al tratar anilinas (**5**) con cloruro de bromoacetilo. De manera paralela, se realizará la preparación de las imidazo[1,2-a]pirimidinas del tipo **9** a partir de hidroxiacetofenonas (**7**), las cuales se someterán a una α -bromación de la cetona (compuesto **8**) seguida de una ciclocondensación de Hantzsch. Finalmente, la Sustitución nucleofílica alifática entre los halogenuros **6** y los fenoles **9** construirá el producto deseado como se muestra en el **Esquema 2**.



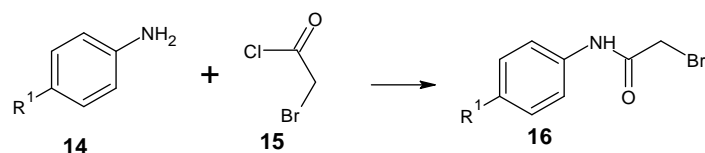
Esquema 2. Preparación de los compuestos del tipo **10**. Condiciones y reactivos: a) TEA, DCM, 0°C, CHCl₃; b) CuBr₂, EtOH, 24 h; c) 2-aminopirimidina, MeCN, reflujo, 12 h; d) K₂CO₃, KI, ACN, reflujo.

Para la síntesis de las quinoxalinas se siguió la ruta del **Esquema 3** donde en primera instancia, se bromaron las 4-hidroxiacetofenona para posteriormente por medio de una reacción de ciclo condensación para formar la quinoxalina correspondiente.



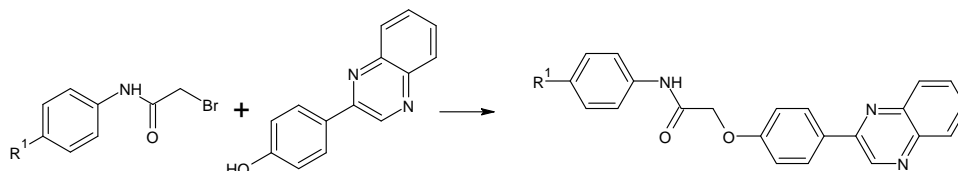
Esquema 3. Formación del heterociclo (quinoxalinas). Condiciones y reactivos a) CuBr₂, EtOH, t.a., 36h; b) 1,2-fenilendiamina, trietilamina, oxígeno, EtOH, 60°C, 5h.

Por otra parte, las distintas aminas se trataron con cloruro de bromo acetilo para formar las amidas correspondientes (Esquema 4)



Esquema 4. Condiciones y reactivos Trietilamina, DCM, 2h, t.a

El último paso consistió en una reacción nucleofílica bimolecular (S_N2) para formar las moléculas deseadas con posible efecto antibacteriano (Esquema 5).



Esquema 5. Condiciones y reactivos K₂CO₃, KI, DMF, 60°C, 12h

Evaluación biológica:

La evaluación se llevó a cabo en distintas cepas seleccionadas procedentes de aislamientos clínicos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*), por medio de un ensayo en placa de 96 pozos leyendo absorbancias a tiempo 0h y a las 24h. Se empleó como control positivo la gentamicina y como control negativo DMSO (disolvente de los compuestos).

Resultados:

Las imidazopirimidinas aquí reportadas se obtuvieron mediante la reacción GBB en rendimientos moderados (22-61%); mientras que la evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó contra 5 bacterias de las 6 listadas como prioridad por la OMS (ESKAPE). En la primera fase de este trabajo se demostró que los compuestos presentan una prometedora actividad antimicrobiana contra *S. aureus* resistente a la meticilina, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Además, la actividad antimicrobiana aumenta cuando R¹ es un grupo poco voluminoso, siendo el compuesto **1e** el que presentó mayor porcentaje de inhibición contra dos cepas de *S. aureus* (Figura 2)

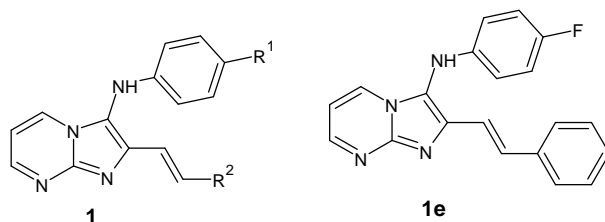
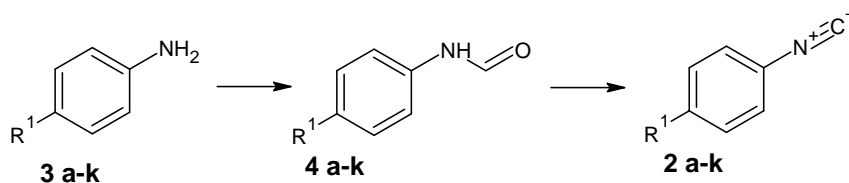


Figura 2. Estructura general de las imidazopirimidinas sintetizadas. Los resultados de las pruebas in vitro indican una mayor actividad antimicrobiana cuando R₁=F (1e).

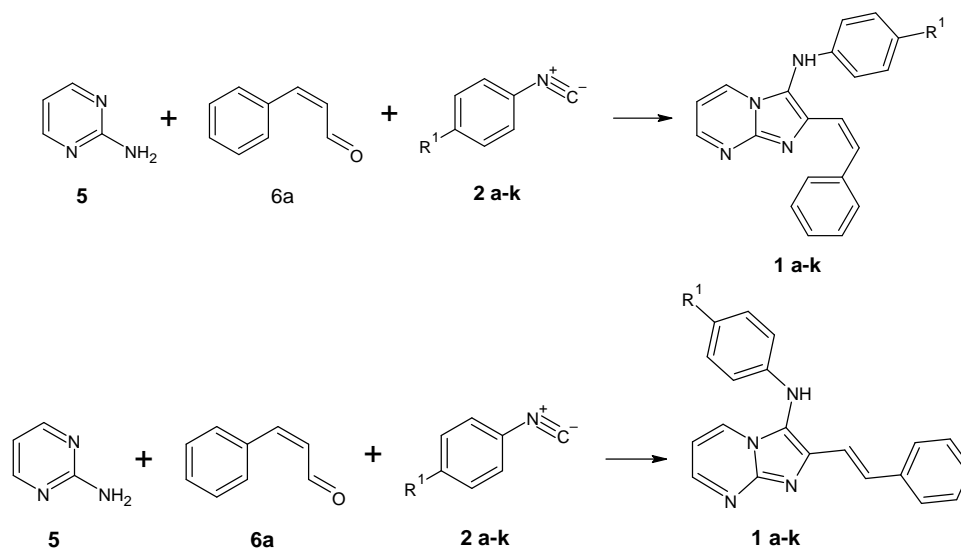
En la primera fase de este proyecto se sintetizaron una serie de 11 imidazopirimidinas variando el sustituyente del componente isonitrilo (2). Para ello, se obtuvieron diferentes isonitrilos mediante la formilación de las anilinas

correspondientes con un anhídrido mixto (**3a-k**) y su posterior deshidratación con PPh₃, I₂ y TEA; dichos isonitrilos se obtuvieron en rendimientos moderados 30-40% (**Esquema 6**).



Esquema 6. Secuencia de reacciones para la obtención de los isonitrilos empleados.

Una vez obtenida una colección de isonitrilos con diferentes sustituyentes (electrodonadores, electro-atractores y voluminosos), se procedió a la construcción del biciclo mediante la reacción de GBB. Las imidazo[1,2-a]pirimidinas se obtuvieron en rendimientos moderados (22- 61%), teniendo como materias primas a la 2-aminopirimidina (**5**), el cinamaldehído (6a) y los isonitrilos correspondientes (2a-k), empleando Sc(OTf)₃ como catalizador y trifluoroetanol (TFE) como disolvente (**Esquema 7**).





Esquema 7. Obtención de las imidazo[1,2-a]pirimidinas a través de la reacción multicomponente GBB.

En la **Tabla 1** se presentan detalladamente los rendimientos de reacción de cada una de las imidazo[1,2-a]pirimidinas sintetizadas y el estudio antimicrobiano. De acuerdo con los porcentajes de inhibición de crecimiento, los compuestos sintetizados presentan una buena actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Lo anterior es de gran relevancia puesto que coloca a los derivados de imidazo[1,2-a]pirimidina (**1a-k**) como antimicrobianos de espectro reducido, lo cual reduce la probabilidad de generación de resistencia a diferencia de lo que sucede con los antimicrobianos de amplio espectro. Aunque se desconoce el mecanismo de acción, resulta claro que la actividad

antimicrobiana contra *S. aureus* (tanto la cepa de aislados clínicos como ATCC) aumenta cuando los sustituyentes en R¹ son grupos poco voluminosos, siendo los compuestos 1b, 1c, 1e, 1f, 1i, 2c, y 2e aquellos que presentaron mayor porcentaje de inhibición. Con base en lo anterior y los resultados de citotoxicidad, se eligió al F como el mejor sustituyente para R¹ en el caso de las imidazo[1,2-a]pirimidina. Se está trabajando en una segunda serie de compuestos donde se fijará el isonitrilo **2e** y se sintetizarán derivados de cinamaldehído con diferentes sustituyentes en R². Esto pretende explorar la importancia de los sustituyentes de esta posición en la actividad antimicrobiana de la imidazo[1,2-a]pirimidina **1e**.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la parte sintética de las imidazo[1,2-a]pirimidina y ensayos biológicos.

Compuesto	R ¹	% rend.	% inhibición de crecimiento ^{a,b}			
			<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i> clínico	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1a	H	53	23.42	59.85	46.40	53.76
1b	Me	27	22.21	100	27.20	29.78
1c	Et	28	22.96	100	41.04	66.38
1d	iPr	39	10.80	45.65	100	73.73
1e	F	22	27.34	100	28.99	62.59
1f	Cl	38	22.56	100	0	69.76
1g	CF ₃	22	8.22	25.88	0	75.20
1h	NO ₂	23	6.58	28.63	57.21	29.04
1i	OMe	61	26.97	100	0	56.19
1j		34	16.48	37.56	0	60.52
1k		50	18.06	23.12	14.52	39.83

a) Los compuestos fueron evaluados a una concentración 50 μM.

b) 1a-k no mostraron actividad contra K.

La **Tabla 2** resume los resultados obtenidos con las quinoxalinas. El compuesto **2c** resulto ser el más activo contra *S.aureus* y *P.aeruginosa*. Por otra parte, el

compuesto **2e** resultó ser más selectivo contra *S. aerus* (compuesto de espectro reducido), mientras que **2f** actuó como un antimicrobiano de amplio espectro; ninguno fue activo contra *A.baumanii*.

Para futuras investigaciones, se buscará explorar el efecto de intercambiar la posición del grupo hidroxilo en el fenol unido a la quinoxalina sobre la actividad antimicrobiana, así como analizar el efecto anti-biopelícula.

Tabla 2: Resultados obtenidos en la parte sintética de las quinoxalinas y ensayos biológicos.

Compuesto	R ¹	%rendimiento	% inhibición de crecimiento			
			<i>A.baumanii</i>	<i>S.aureus</i> clínico	<i>K.neumoniae</i>	<i>P.aeruginosa</i>
2a	Et	71	0	46.677	13.058	38.021
2b	H	65	0	26.894	41.651	33.200
2c	Cl		0	54.815	15.952	48.822
2d	F	78	0	35.152	29.200	47.264
2e	Me	72	0	51.832	3.590	14.281
2f	iPr		0	53.061	43.711	46.285
2g	CF ₃	61	0	43.889	26.748	47.771
2h	OMe	73	0	45.373	-1.251	14.824
2i	Benzodioxolano	67	0	48.025	5.575	38.782

a) Las quinoxalinas no mostraron actividad contra *A.baumani*

Conclusiones:

Se lograron preparar dos serie de nuevos heterociclos (imidazo[1,2-*a*]pirimidinas y quinoxalinas), las cuales demostraron presentar una interesante actividad antimicrobiana contra 3 de los 6 patógenos listados como prioritarios por la OMS. Los resultados aquí expuestos reafirman la potencial aplicación biológica de compuestos que contengan el heterociclo en cuestión; en adición, las moléculas sientan las bases para el desarrollo de nuevos compuestos con potencial actividad antimicrobiana y la elucidación de su mecanismo de acción.

Referencias:

- [1] Guevara DJA, Rojas MM, Valadez PDE, et al. Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enf Infec Microbiol.* 2021;41(3):111-117.
- [2] Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA, Qamar MU, Salamat MKF, Baloch Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018 Oct 10; 11:1645-1658. doi: 10.2147/IDR.S173867. PMID: 30349322; PMCID: PMC6188119.

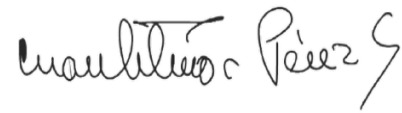
[3] Santos Zonta, Franciele do Nascimento, Roque, Márcia da Silva, Soares da Silva, Ruan Gabriel, Ritter, Amanda Gabrieli, & Jacobsen, Fernanda Tondello. (2020). Colonización por ESKAPES y características clínicas de pacientes en estado crítico. *Enfermería Global*, 19(59), 214-254. Epub 10 de agosto de 2020. <https://dx.doi.org/10.6018/eglobal.406691>

[4] Morehead MS, Scarbrough C. Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Prim Care*. 2018 Sep;45(3):467-484. doi: 10.1016/j.pop.2018.05.006. PMID: 30115335.

[5] Shaaban S, Abdel-Wahab BF. Groebke-Blackburn-Bienaymé multicomponent reaction: emerging chemistry for drug discovery. *Mol Divers*. 2016 Feb;20(1):233-54. doi: 10.1007/s11030-015-9602-6. Epub 2015 May 28. PMID: 26016721.

[6] Boltjes, A. and Dömling, A. (2019), The Groebke-Blackburn-Bienaymé Reaction. *Eur. J. Org. Chem.*, 2019: 7007-7049. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901124>

[7] Shaaban, S., Abdel-Wahab, B.F. Groebke–Blackburn–Bienaymé multicomponent reaction: emerging chemistry for drug discovery. *Mol Divers* **20**, 233–254 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11030-015-9602-6>

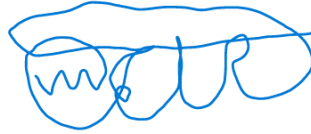


Dr. Cuauhtemoc Pérez González
19327

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-XOC
Asesor interno

Asesor externo: Dr. Eduardo
Hernández-Vázquez

Investigador del Instituto de Química,
UNAM



Tovar Roman Cesar Eduardo
Número de matrícula: **2183030464**

Alumno: