



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS DE FURANONAS COMO BLOQUEADORES DE
LA PERCEPCIÓN DEL CUÓRUM EN *PSEUDOMONAS*
*AERUGINOSA***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ÁNGEL ERNESTO MARTÍNEZ SOLANO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Héctor García Ortega

VOCAL: Dr. Eduardo Hernández Vázquez

SECRETARIO: M. en C. María Eugenia Mendoza Jasso

1ºer. SUPLENTE: Profesor Eduardo Bonilla Espinosa

2ºdo. SUPLENTE: Profesora María de los Ángeles Olvera León

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 7C, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. EDUARDO HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SUSTENTANTE:

ÁNGEL ERNESTO MARTÍNEZ SOLANO

AGRADECIMIENTOS.

A mi familia por todo el apoyo posible que pudieron brindarme para concluir este gran capítulo de mi vida y por lo cual espero en algún momento pueda retribuirselos. Principalmente a mis padres quienes por la situación complicada en la que se encuentran siempre estuvieron al pendiente de mi en varios aspectos junto con mis padrinos y mi hermano mayor Memo quien ha sido siempre muy tolerante conmigo para aguantar mis enojos y a pesar de ellos darme consejos, por su ayuda para facilitarme el traslado al laboratorio durante la realización de la parte experimental del presente trabajo en los tiempos difíciles de pandemia aún cuando el se comprometía con su trabajo. A mi hermano menor Axel por darme felicidad aún en mis periodos de molestía y por dejarme jugar en su playstation para sacar el estrés, muchas veces más de las necesarias.

Agradezco a la UNAM por darme los recursos para formarme como profesionista. Al Instituto de Química de la UNAM por el espacio para llevar a cabo este proyecto con las mejores herramientas. A mi asesor de tesis, el Dr. Eduardo Hernández Vázquez por la oportunidad de permitirme realizar esta investigación, por sus enseñanzas, disposición para resolver dudas en cualquier momento y enorme paciencia. A su estudiante de maestría Ángel Trinidad Ramírez por su ayuda en el trabajo experimental y explicaciones detalladas. Al personal del IQ, sobre todo a la Dra. María del Carmen González García y la Dra. Adriana Romo Pérez por su notable disposición para trabajar y proporcionar los espectros de masas e IR respectivamente. A los camaradas que conocí durante mi estadía en el laboratorio 7C por la orientación brindada para mejorar mis habilidades. A los miembros del jurado por sus comentarios que me permitieron mejorar este trabajo. A los amigos que logré hacer durante mi camino por la facultad y con quienes espero mantener una buena amistad.

Skate and Rock

Finalmente agradezco al PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) así como a la UNAM (IA202221: preparación de inhibidores de la percepción del cuórum como alternativa en el control de bacterias multi-resistentes)

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	IV
ÍNDICE DE GRÁFICAS	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Resistencia a los antimicrobianos (RAM)	3
2.1.1. Complicación de la RAM	4
2.1.2. Blancos moleculares tradicionales de los antibióticos.....	6
2.1.3. Mecanismos de generación de la RAM	9
2.1.4. Patógenos prioritarios (ESKAPE).....	11
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.2.1. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	15
2.3. Percepción del cuórum.....	18
2.4. Formación de biopelículas.....	20
2.5. Receptor LasR	21
2.6. Furanonas como inhibidores de biopelículas	22
2.6.1. Furanonas naturales.....	22
2.6.2. Furanonas sintéticas.....	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. HIPÓTESIS.....	27

5. OBJETIVOS	27
5.1. General.....	27
5.2. Particulares	27
6. DISEÑO DEL EXPERIMENTO	28
6.1. Estrategias en la búsqueda de antibióticos	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1. Parte química.....	34
7.1.1. Síntesis de la lactona.....	34
7.1.2. Síntesis de los intermediarios ácidos propenoicos	36
7.1.2.1. Síntesis de los intermediarios ácidos α,β -insaturados de la serie de compuestos 38.I	36
7.1.2.2. Síntesis del intermediario ácido α,β -insaturado vinílogado	38
7.1.2.3. Síntesis del intermediario ácido (<i>E</i>)-3,7-dimetilocta-2,6-dienoico	38
7.1.3. Síntesis de las furanonas del tipo L- <i>N</i> -acil homoserinas AHL's (amidación).....	39
7.2. Análisis espectroscópico y espectrométrico	41
7.2.1. Espectroscopía de infrarrojo (IR)	42
7.2.2. Espectrometría de masas.....	44
7.2.3. Espectroscopía de RMN- ¹ H	48
7.2.4. Espectroscopía de RMN- ¹³ C	49
7.3. Evaluación biológica	51
8. CONCLUSIONES	54
9. PERSPECTIVAS	55
10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	56
11. ANEXOS	65

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

Abreviatura	Significado
4-DMAP	4-dimetilaminopiridina
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHL's	L-N-acil homoserinas
AI's	Moléculas autoinductoras
ARN	Ácido ribonucleico
ATR	Reflectancia total atenuada
ccf	Cromatografía en capa fina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
d	Señal de doblete
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de doble de dobles
δ	Desplazamiento químico
DART+	Análisis Directo en Tiempo Real
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DHFA	Ácido dihidrofólico
DHPA	Ácido dihidropteroico
DMF	N,N-dimetilformamida
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
EtOH	Etanol
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ESKAPE	Bacterias: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Enterobacter spp</i>
FDA	Food and Drug Administration
Hex	Hexano

Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>i</i>Pr	Isopropil
<i>i</i>PrOH	Isopropanol
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LPS	Lipolisacárido
<i>m</i>	Señal de multiplete
MM	Masa molar
M⁺	Fragmento catiónico
MeOH	Metanol
<i>m</i>ARN	ARN mensajero
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
NAM	Ácido <i>N</i> -acetilmurámico
NAG	Ácido <i>N</i> -acetilglucosamina
OMe	Metoxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico
PAO1	Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ph	Fenilo
PUCRA	Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana
QS	Percepción del Cuórum
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
ROS	Especies reactivas de oxígeno
<i>t.a.</i>	temperatura ambiente
<i>s</i>	Señal singulete
SAR	Relación estructura-actividad
SOSA	Selective Optimization of Side Activities
<i>t</i>	Señal triplete

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Rangos de mortalidad de la RAM frente a otras enfermedades para el año 2050.....	5
Tabla 2. Rangos de mortalidad de la RAM en diferentes partes del mundo para el año 2050.....	5
Tabla 3. Prioridad de patógenos multirresistentes para el desarrollo de nuevos antibióticos.....	12
Tabla 4. Reporte del CDC sobre los casos de hospitalizaciones y muertes ocasionadas por las bacterias “ESKAPE” en 2017.....	12
Tabla 5. Aislamiento clínico de <i>P. aeruginosa</i> de muestras provenientes de hemocultivos entre los años 2016 y 2017.....	15
Tabla 6. Características de las furanonas del tipo L-N-acil homoserinas (AHL's) sintetizadas.....	41
Tabla 7. Bandas relevantes de IR (cm ⁻¹) de los compuestos sintetizados.....	42
Tabla 8. Fragmentos moleculares de los compuestos.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Pared celular y mecanismo de inhibición por β-lactámicos y vancomicina.....	7
Figura 2. Inhibición de la síntesis de proteínas.....	7
Figura 3. Mecanismo de acción de las quinolonas.....	8
Figura 4. Mecanismo de acción de las sulfonamidas.....	8
Figura 5. Mecanismo de acción de las polimixinas.....	9
Figura 6. A) Adquisición, B) Mecanismos de resistencia y C) Blancos moleculares, con algunos ejemplos de antibióticos.....	11
Figura 7. Tinciones de <i>P. aeruginosa</i>	14
Figura 8. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	17
Figura 9. Moléculas autoinducidas de la percepción del cuórum.....	18
Figura 10. Sistemas de percepción del cuórum con sus respectivas moléculas autoinducidas.....	19

Figura 11. Mecanismo de comunicación (QS).....	20
Figura 12. Formación de biopelículas.....	21
Figura 13. Estructura del receptor LasR cristalizado con el autoinductor <i>N</i> -3-oxo-dodecanoil homoserina.....	22
Figura 14. Compuestos naturales con actividad anti-biopelícula.....	24
Figura 15. Algunas AHL´s sintéticas con actividad antagonista contra el receptor LasR.....	25
Figura 16. Blancos moleculares comunes y potenciales blancos moleculares.....	29

ÍNDICE DE ESQUEMAS.

Esquema 1. Diseño de las furanonas.....	31
Esquema 2. Análisis retrosintético de las furanonas.....	33
Esquema 3. Síntesis del núcleo de lactona.....	34
Esquema 4. Mecanismo de reacción del bromohidrato de lactona.....	35
Esquema 5. Síntesis de los ácidos α,β -insaturados (44a-h).....	37
Esquema 6. Intermediarios ácidos α,β -insaturados.....	37
Esquema 7. Síntesis del ácido α,β -insaturados vinílogado.....	38
Esquema 8. Síntesis del ácido (<i>E</i>)-3,7-dimetilocta-2,6-dienoico.....	39
Esquema 9. Síntesis de las furanonas.....	40
Esquema 10. Ruta sintética de las furanonas.....	57

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Efecto de los compuestos sobre la formación de biopelícula en la cepa PAO1.....	52
---	----

1. INTRODUCCIÓN.

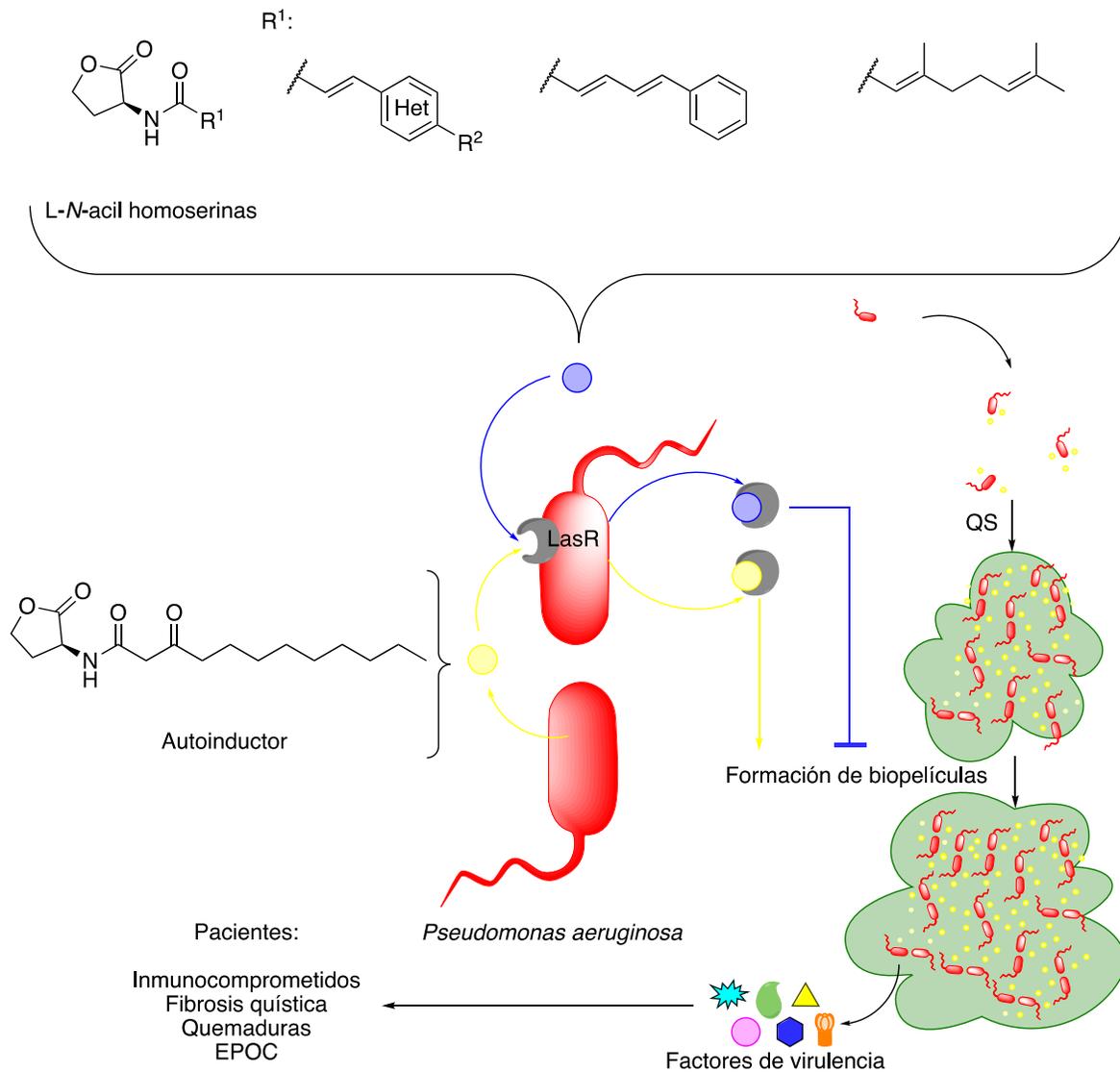
En la actualidad, la mayoría de los antibióticos disponibles en el mercado para uso clínico y veterinario (tanto de origen natural, sintético, semisintético o biotecnológico) han comenzado a perder su efecto farmacológico; otros ya no son funcionales para el tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas que hace algunos años eran fácilmente tratables. La causa de esta problemática se conoce como resistencia antimicrobiana.

Con la finalidad de responder a la inminente crisis sanitaria a nivel mundial ocasionada por la resistencia antimicrobiana, organizaciones globales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Food and Drug Administration (FDA), etc., han insistido a la comunidad científica en desarrollar nuevos enfoques para combatir cepas multirresistentes.

En el caso particular de México, a pesar de que la cultura de la sociedad sobre el tema escasea, la poca información generada por algunas instituciones sirve para tener una buena perspectiva ante esta problemática que, aunque ciertamente no logran ser representativos los datos, éstos pueden extrapolarse para enfocarse mejor en la investigación de antibióticos, así como poder regular su consumo.

Uno de los patógenos más preocupantes en el ámbito hospitalario es la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, la cual posee múltiples mecanismos de resistencia modulados en su mayoría por el proceso de comunicación celular conocido como percepción del cuórum (QS por sus siglas en inglés). El QS de *P. aeruginosa* está regulado por moléculas autoinductoras específicas de la especie que activan genes de virulencia, entre los que destaca la formación de biopelículas –un mecanismo de resistencia que impide a los antibióticos llegar hasta el sitio de acción.

En este contexto, el papel del Químico Farmacéutico Biólogo radica en la obtención de nuevas moléculas destinadas a combatir bacterias patógenas multirresistentes, considerando blancos biológicos con poca probabilidad de generación de resistencia. Precisamente en este punto recae el siguiente proyecto de investigación, cuyo objetivo consistió en la preparación de acil furanonas como potenciales inhibidores de la percepción del cuórum mediante el antagonismo del receptor LasR. Debido a que esta estrategia no ejerce una presión de selección sobre las bacterias, existe una menor probabilidad de generación de resistencia, lo cual es una característica ampliamente deseable en la búsqueda de antimicrobianos.



2. ANTECEDENTES.

2.1. Resistencia a los antimicrobianos (RAM).

Los antibióticos, también conocidos como antimicrobianos, son fármacos que matan o inhiben el crecimiento de bacterias más no de hongos, parásitos o virus. Este tipo de compuestos han sido destinados para tratar infecciones bacterianas, salvando innumerables vidas; sin embargo, así como la humanidad ha combatido contra estos patógenos desde el descubrimiento de la arsfenamina y la penicilina, estos microorganismos han evolucionado para sobrevivir a los antimicrobianos. Esto debido a un fenómeno que representa una de las mayores problemáticas de salud a nivel mundial y es conocido como la resistencia a los antimicrobianos (RAM). La RAM se define como la capacidad adquirida de un microorganismo para combatir los efectos de un fármaco al que normalmente es susceptible.¹

Entre las causas que originan este fenómeno se encuentran el uso indiscriminado de los antibióticos en la práctica médica aunado con el empleo irracional por parte de los pacientes. De acuerdo con un estudio realizado en 76 países, se determinó que hubo un crecimiento en el uso de antibióticos por persona en un 39% en el periodo del año 2000 a 2015.²

El aumento en el consumo de estos fármacos se presenta principalmente en países en vías de desarrollo y recién industrializados como India, China y Pakistán, donde su distribución no es controlada y su compra se lleva a cabo sin prescripción médica.² Adicionalmente al uso terapéutico en humanos, la producción de antibióticos aumentó por su habilidad para mejorar la eficiencia de los alimentos animales, facilitando el crecimiento de éstos a tal grado de emplearse prácticamente como suplementos alimenticios. En este aspecto, China destaca por ser el mayor productor, de acuerdo a datos reportados en 2013, de 248,000 toneladas que produjo, usó 162,000 toneladas, de las cuales el 52% fueron destinadas para animales y el 48% para humanos. Con base en estos datos, se calcula que para el 2030 el consumo mundial de antibióticos en animales sería de 200,235 toneladas.

¹ Madigan T. Michael, et al, *Brock. Biología de los microorganismos*, Pearson, 2015

² Blaskovich, M.A.T. The Fight Against Antimicrobial Resistance Is Confounded by a Global Increase in Antibiotic Usage. *ACS Infect. Dis.* **2018**, 4 (6), 868 – 870. DOI: 10.1021/acsinfecdis.8b00109

Como consecuencia, se han notado residuos de antibióticos en los animales y sus derivados que sirven de alimento para el humano, generando efectos adversos en diferentes órganos y sistemas que incluso podrían llevar a la muerte, así como evidentemente favorecer la RAM.³

Por otro lado, algunos autores sugieren que el incremento del uso de antibióticos es causado por la mala calidad de aire que afecta las vías respiratorias y promueve infecciones, facilitando de esta manera el contagio que bien podría ser causado por un patógeno que no requiera de este tipo de fármacos. De tal manera que se estima que si continua la misma tendencia, para el año 2030 el consumo global de antibióticos será un 200% mayor que en 2015.²

Por si fuera poco, el riesgo de contraer infecciones causadas por bacterias resistentes está presente por la interacción constante del humano con el medio ambiente (tierra, agua, aire, fauna y flora) donde realiza diversas actividades. Por ejemplo, beber agua que podría estar contaminada con heces fecales, ya sea de humanos o animales, actividades como la pesca o ganadería y la inhalación de bioaerosoles son potenciales fuentes de bacterias ajenas a la microbiota humana capaces de causar alguna enfermedad infecciosa.⁴

2.1.1. Complicación de la RAM.

El problema de la RAM es tan grave que se estima que para el año 2050, el número de defunciones atribuidas a este tipo de infecciones ascenderá a más de 10 millones si no se emplean las acciones efectivas contra la RAM lo más pronto posible. En las tablas 1 y 2 se comparan algunos datos basados en modelos estadísticos que muestran un posible escenario ante la RAM.⁵

³ Chen, J.; Ying, G.; Deng, W. Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67 (27), 7569 – 7586. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b01334

⁴ Huijbers, P.; Blaak, H.; De Jong, M. et al. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49 (20), 11993 – 12004. DOI: 10.1021/acs.est.5b02566

⁵ Dadgostar, P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect. Drug. Resist.* **2019**, 12, 3903 – 3910, DOI: 10.2147/IDR.S234610

Tabla 1. Rangos de mortalidad de la RAM frente a otras enfermedades para el año 2050.

Enfermedad	Muertes (millones)
RAM	10
Cáncer	8.2
Diabetes	1.5
Diarrea	1.4
Accidentes de tráfico	1.2
Sarampión	0.13

Tabla 2. Rangos de mortalidad de la RAM en diferentes partes del mundo para el año 2050.

Localización	Muertes (miles)
Asia	4,730,000
África	4,150,000
América Latina	392,000
Europa	390,000
Norte América	317,000
Oceanía	22,000

Con base a reportes oficiales recopilados de una extensa literatura de fuentes como lo son PubMed, Medline, Global Health, entre otras organizaciones oficiales, los impactos de RAM pueden ser categorizados a nivel salud, paciente, económico y social. A nivel salud y paciente la morbilidad y mortalidad son consecuencias inherentes. Por ejemplo, los centros para el control y prevención de enfermedades (CDC) estiman que cada año en los Estados Unidos al menos 2 millones de personas son infectadas con bacterias resistentes a antibióticos y al menos 23,000 de éstas mueren como resultado de la infección.⁵

En cuanto a lo económico, la pérdida del capital de cada país implica no solamente la producción de los antibióticos utilizados para tratar las infecciones, sino también a nivel hospitalario el tiempo de estancia que a su vez conlleva pruebas, operaciones y el cuidado del paciente.⁶ A nivel social, la automedicación es una consecuencia que a su vez juega un papel importante dentro de un círculo vicioso en el que provoca el consumo de más antibióticos potentes, con los cuales

⁶ Cosgroove, S.; Carmeli, Y. The Impact of Antimicrobial Resistance on Health and Economic Outcomes. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, 36 (11), 1433 – 1437, <https://doi.org/10.1086/375081>

emergerán cepas más resistentes que provocan infecciones más letales, lo que eventualmente obligará a la sociedad a perder sus ingresos al conseguir medicamentos sin prescripción médica que no están controlados por normas oficiales.⁷

Aunado a esto, la FDA aprobó únicamente cuatro nuevas clases de antibióticos en el periodo 2000 a 2017, basados principalmente en alteraciones estructurales de antibióticos ya conocidos.⁸ Este panorama obliga a los químicos a buscar nuevas alternativas terapéuticas para poder hacer frente al serio problema que implica la RAM.

2.1.2. Blancos moleculares tradicionales de los antibióticos.

Los antibióticos existentes en el mercado, ya sea que se produzcan naturalmente por bacterias u hongos, por semisíntesis o síntesis total, se clasifican en: espectro reducido si es que son efectivos contra una limitada variedad de patógenos, o de amplio espectro cuando atacan diferentes tipos de bacterias.⁹

Aunque algunos antibióticos son capaces de inhibir a otros grupos de organismos (como las sulfonamidas que son efectivas para tratar infecciones por algunos protozoarios), el mecanismo de acción por el cual inhiben el crecimiento de las bacterias ha resultado de gran importancia para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.⁹

Los antibióticos principalmente actúan en los siguientes blancos:

1) Pared celular. Se ubica como una de las dianas más explotadas por la característica de no estar presente en células eucariotas, consiste en subunidades de peptidoglicano formadas por derivados de dos azúcares –*N*-acetil-glucosamina (NAM) y ácido *N*-acetilmurámico (NAM)–, un péptido corto principalmente de *D*-aminoácidos conectado al grupo carboxilo de NAM, y el entrecruzamiento de estas

⁷ Malik, B.; Bhattacharyya, S. Antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse. *Sci. Rep.* **2019**, 9(1), DOI: 10.1038/s41598-019-50846-1

⁸ Soukarieh, F.; Williams, P.; Stocks, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (23), 10385 – 10402. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00540

⁹ Willey, J.; Sandman, K.; Wood, D. Prescott's Microbiology, Mc Graw Hill, 2020

subunidades varía dependiendo la especie. Fármacos como las penicilinas, cefalosporinas y, en general, β -lactámicos compiten con los aminoácidos que se entrecruzan al unirse covalentemente a las transpeptidasas, enzimas que se encargan de hacer la última reacción en la formación del peptidoglicano (transpeptidación). Por otro lado, la vancomicina inhibe la formación de la pared celular al unirse específicamente a la secuencia terminal péptica del peptidoglicano, es decir, a diferencia de los β -lactámicos, se une al sustrato en lugar de a la enzima. Estos mecanismos se esquematizan en la Figura 1.^{9, 10}

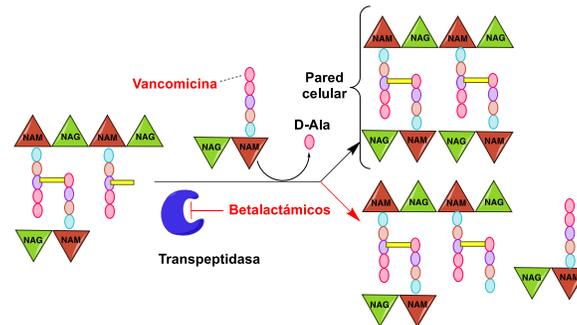


Figura 1. Pared celular y mecanismo de inhibición por β -lactámicos y vancomicina.

2) Síntesis de proteínas (traducción). Los antibióticos como los aminoglucósidos, tetraciclinas y macrólidos (Figura 2) empleados para inhibir la síntesis de proteínas son capaces de distinguir entre los ribosomas de células eucariotas (subunidades 60S y 40S) de los bacterianos (50S y 30S), que son los responsables de sintetizar las proteínas. Dichos antibióticos pueden actuar en prácticamente cualquier paso de la traducción del mRNA, como por ejemplo al unirse a las subunidades 50s o 30s.^{9, 10}

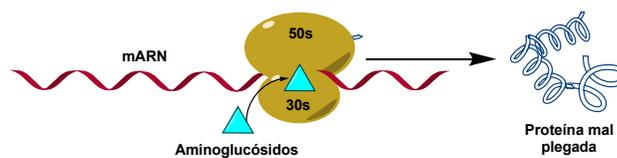


Figura 2. Inhibición de la síntesis de proteínas. Se muestra como ejemplo los aminoglucósidos que se unen a la subunidad 30s del ribosoma, ocasionando una proteína disfuncional que bien podría ser estructural y por ende perjudica la integridad de la bacteria.

¹⁰ Ritter, J. M. et al. Rang & Dale's Pharmacology, Elsevier, 2020

3) ADN o ARN (ADN topoisomerasa o ARN polimerasa). Es posible intervenir en la replicación del ADN y consecuentemente en la transcripción del mRNA al inhibir la síntesis de nucleótidos (subunidades del ADN y ARN), alterando el emparejamiento de las bases, impidiendo la síntesis de ADN como es el caso de las fluoroquinolonas (Figura 3) que actúan uniéndose a las topoisomerasas (enzimas encargadas del desenrollamiento del ADN), así como las rifamicinas que bloquean la transcripción al unirse a la subunidad β de la ARN polimerasa.^{9, 10}

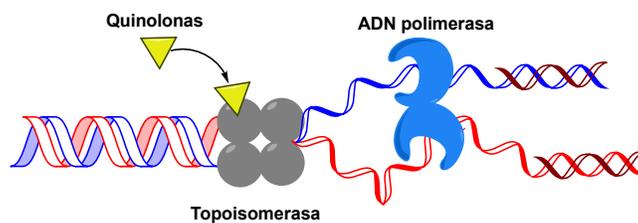


Figura 3. Mecanismo de acción de las quinolonas.

4) Ácido fólico. A diferencia de los humanos que obtienen el ácido fólico por la dieta, las bacterias necesitan de vías metabólicas para sintetizarlo. En vista de esta incapacidad, las sulfonamidas inhiben competitivamente la enzima dihidropteroato sintetasa al competir contra el ácido *p*-aminobenzoico (PABA), un precursor en la biosíntesis del ácido fólico (Figura 4), producto esencial para la síntesis de ADN y ARN, por lo tanto, el crecimiento celular será afectado.^{10, 11}

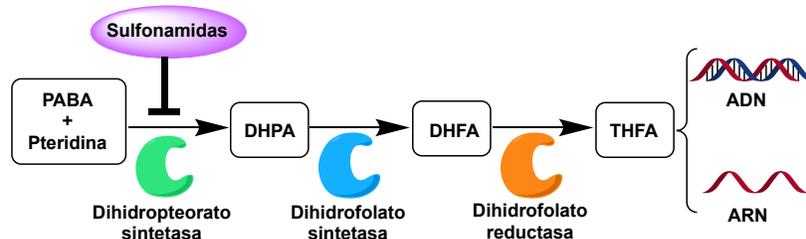


Figura 4. Mecanismo de acción de las sulfonamidas. Ácido *p*-aminobenzoico (PABA), ác. dihidropteroico (DHPA), ác. dihidrofólico (DHFA), ác. tetrahidrofólico (THFA), donde el THFA tiene función de cofactor en la síntesis de ADN y ARN.

¹¹ Rossiter, S.; Fletcher, M.; Wuest, W. Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. *Chem. Rev.* **2017**, 117 (19), 12415 – 12474, DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00283

5) Membrana celular. Dado que la membrana impide a los antibióticos acceder a sus objetivos dentro de la bacteria, los péptidos catiónicos como la polimixina y análogos pueden incrementar la permeabilidad de la membrana al formar poros en ésta ya que interactúan con las cargas negativas del lipopolisacárido (LPS) presente en las bacterias Gram-negativas, permitiéndoles alcanzar sus objetivos a otros antibióticos si se usan en terapia combinatoria.^{12, 13}

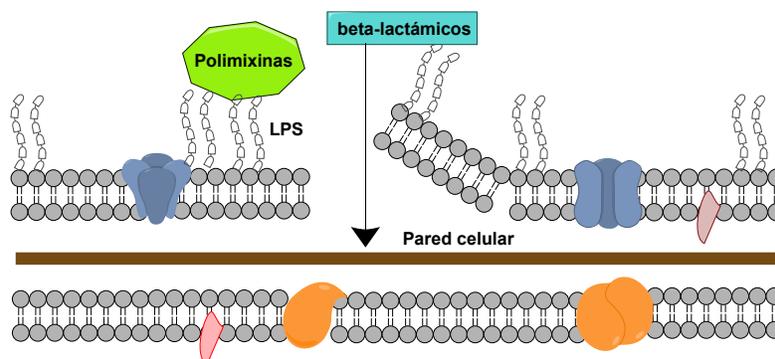


Figura 5. Mecanismo de acción de las polimixinas.

2.1.3. Mecanismos de generación de la RAM.

La evolución de las cepas resistentes es un fenómeno que ocurre a través de una presión que se ejerce sobre la población de bacterias que son expuestas a los antibióticos. Los mecanismos por los cuales se genera la resistencia a los antimicrobianos se pueden clasificar en las siguientes categorías (Figura 6):¹³

- a) Alteración de la permeabilidad de la membrana. Mutaciones en receptores de la pared o la membrana celular. También se dificulta el transporte activo haciendo alteraciones en las porinas. El principal ejemplo de este mecanismo es la que ocurre con los carbapenémicos,

¹² Baral, B.; Mozafar, M. Strategic Moves of “Superbugs” Against Available Chemical Scaffolds: Signaling, Regulation, and Challenges. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, 3 (3), 373 – 400, DOI: 10.1021/acspsci.0c00005

¹³ Chellat, M.; Raguz, L.; Riedl, R. Targeting Antibiotic Resistance. *Angew. Chem.* **2016**, 128 (23), 6710 – 6738, DOI: 10.1002/anie.201506818

donde se dificulta el paso del antibiótico a través de porinas, inhibiendo su entrada a la bacteria.^{13, 14}

- b) Bombas de eflujo. Son proteínas transmembranales citoplasmáticas que exportan de forma activa a un agente antimicrobiano (y a otros agentes nocivos) hacia el exterior de la célula. Como por ejemplo las bombas de expulsión de tetraciclina que se encuentran tanto en bacterias Gram-positivas como en bacterias Gram-negativas.^{12, 13}
- c) Degradación o modificación del antibiótico. Mediante la producción de enzimas que se encargan de alterar la estructura molecular del antibiótico. Esto hace que la molécula disminuya su actividad o bien, pierda completamente la afinidad hacia su sitio receptor. Un ejemplo sumamente estudiado son las β -lactamasas que se encargan de hidrolizar el anillo β -lactámico y por tanto inactivar el fármaco.¹⁵
- d) Modificación de la diana biológica. Esto sucede a través de mutaciones selectivas de genes encargados de codificar proteínas específicas por las cuales actúa el fármaco. Esto ocasiona que el fármaco pierda afinidad al sitio receptor o bien, perder completamente la complementariedad necesaria para ejercer su efecto farmacológico. Entre estos se encuentran las modificaciones de las subunidades 50S y 30S, o en la enzima girasa que interviene en la formación de las cadenas del ADN, evitando así el efecto de las quinolonas.^{15, 16}

Además de las mutaciones “*de novo*”, los mecanismos de resistencia pueden ser heredados de manera vertical (pasados a la progenie), o bien por transferencia horizontal a través genes de resistencia codificados en plásmidos (conjugación), bacteriófagos (transducción), y al incorporar DNA extracelular que provenga de otra bacteria de la misma cepa o de diferentes especies (transformación). El material

¹⁴ Amézquita, R. J. N.; Camargo, O. E. A. Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos. No. 11. CONAMED – OPS. México, Ciudad de México, 2017, http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin11/Numero_completo.pdf (consultado 20/11/2021)

¹⁵ Schillaci, D. et al. Pharmaceutical Approaches to Target Antibiotic Resistance Mechanisms. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (20), 8268 – 8297, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00215

genético adquirido por transferencia horizontal puede convertir cepas inocuas a patógenas o, incluso, se puede incrementar la letalidad de los microorganismos.¹⁶

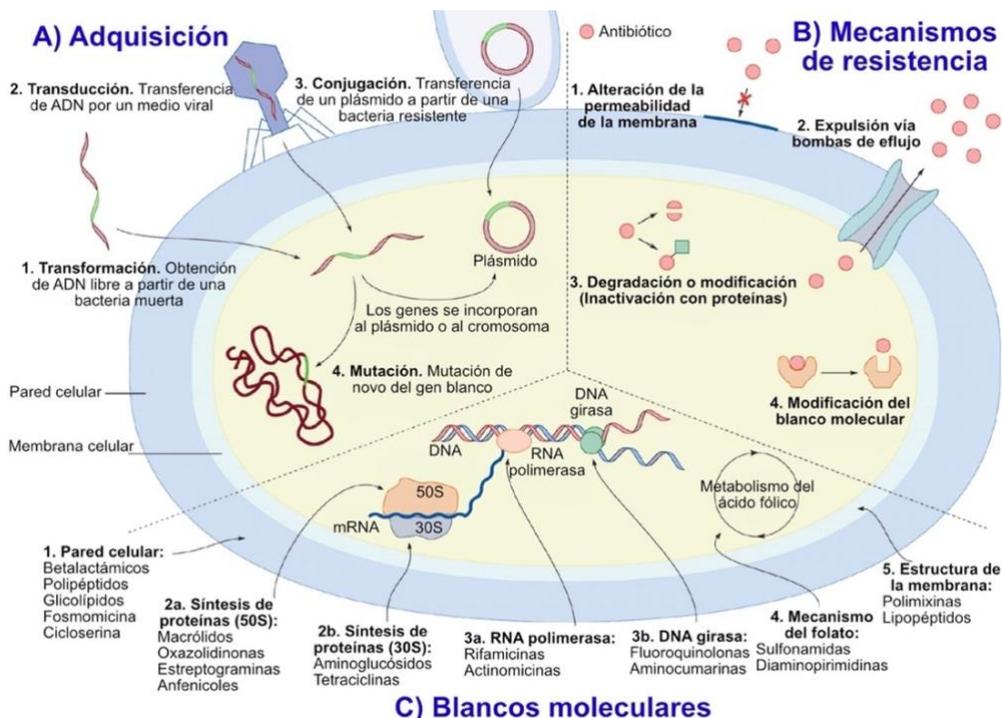


Figura 6. A) Adquisición, B) Mecanismos de resistencia y C) Blancos moleculares, con algunos ejemplos de antibióticos. (Modificado de Chellat M.F.).¹⁴

2.1.4. Patógenos prioritarios (ESKAPE).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recientemente ha enlistado a las bacterias multiresistentes (conocidas como superbugs) como la quinta amenaza de enfermedades que ponen en riesgo la salud humana a nivel mundial.¹⁷ Las bacterias multiresistentes son aquellas aisladas de especies con una disminución de sensibilidad de al menos un fármaco en tres o más clases de antimicrobianos.¹⁸

Actualmente, se ha observado que las bacterias patógenas multiresistentes que típicamente afectan al humano están muy presentes en hospitales. La mayor

¹⁶ Barbosa, F.; Pinto, E.; Kijjoo, A. et al. Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2020**, 56 (1), 106005, DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106005

¹⁷ Sikder, A. et al. Recent Advances on Stimuli-Responsive Combination Therapy against Multidrug-Resistant Bacteria and Biofilm. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, 4 (6), 4667 – 4683, DOI: 10.1021/acsabm.1c00150

¹⁸ Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html> , (consultado 30/11/2021)

preocupación se engloba en el un grupo nombrado como “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*).¹⁹

A raíz de esta amenaza, la OMS en colaboración con la división de enfermedades infecciosas de la universidad de Tübingen, Alemania, publicaron una lista de bacterias para las cuales se requiere urgentemente la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos (Tabla 3), tomando como criterio la mortalidad, tiempo de hospitalización, frecuencia de resistencia a los antimicrobianos, transmisión, prevención (ya sea por higiene o vacunación), la posibilidad de tener tratamiento a mediano plazo.²⁰

Tabla 3. Prioridad de patógenos multirresistentes para el desarrollo de nuevos antibióticos

Prioridad	Bacterias
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae sp.</i>
Alta	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Campylobacter spp.</i> , <i>Salmonellae sp.</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Shigella spp.</i>

Tan solo en los Estados Unidos de América, el CDC hizo en 2017 un estimado de las hospitalizaciones y muertes provocadas por las bacterias del grupo “ESKAPE” o variantes, entre otros microorganismos (Tabla 4).²¹

Tabla 4. Reporte del CDC sobre los casos de hospitalizaciones y muertes ocasionadas por las bacterias “ESKAPE” en 2017.

Bacterias	Hospitalizaciones	Muertes
<i>Enterococcus faecium</i>	54,500	5,400
<i>Staphylococcus aureus</i>	323, 700	10,600
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13,100	1,100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8,500	700
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32,600	2,700
<i>Enterobacter spp.</i>	197,400	9,100

¹⁹ Baral, B.; Mozafari, M. Strategic Moves of “Superbugs” Against Available Chemical Scaffolds: Signaling, Regulation, and Challenges. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, 3 (3), 373 – 400.

²⁰ World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> , (consultado 20/01/2022)

²¹ Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html#pse> , (consultado 20/01/2020)

En México, el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) de la UNAM es quien se ha enfocado en analizar y describir el problema de la RAM en nuestro país. En 2018 publicó un estudio en colaboración con 14 hospitales en donde se recopilaron un total de 11,900 muestras clínicas tomadas entre los años 2016 y 2017, de éstas 3,182 (26.7 %) correspondían a hemocultivos donde 2,616 (82 %) demostraban una gran presencia de bacterias del grupo “ESKAPE”.²² Para el presente trabajo de tesis, la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es el eje central de la investigación, por lo que se abordará un apartado exclusivamente a este patógeno.

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*.

Es una bacteria Gram-negativa aerobia en forma de bacilo, no formadora de esporas, monoflagelada, con un olor similar a las uvas o tortillas (Figura 7). Crece bien entre 25 °C y 37 °C pero su habilidad para crecer a 42 °C la destaca entre otras especies de *Pseudomonas*. Debido a su omnipresencia y a su genoma circular (5.5 – 7 Mb) con la capacidad de codificar una variedad de enzimas, es capaz de sobrevivir frente a diversas condiciones ambientales. Es ampliamente conocida su habilidad para causar enfermedades no solo en plantas y animales, sino también en humanos, principalmente infectando pacientes inmunocomprometidos.²³

Este bacilo provoca una amplia gama de enfermedades que van desde infecciones del tracto urinario, queratitis ulcerativa aguda, otitis media maligna, peritonitis, neumonía aguda en pacientes con entubación endotraqueal; este patógeno afecta principalmente a personas con el sistema inmunológico comprometido (neutropenia y VIH), pacientes con quemaduras y a aquellos con fibrosis quística.²⁴

²² Ponce de León, S. et. al. Programa Universitario de la Investigación de Salud. Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia Antimicrobiana y Consumo de Antibióticos. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Agosto **2018**.

²³ Wu, W.; Jin, Y.; Bai, F. et al. *Molecular Medical Microbiology*, Academic Press, 2014

²⁴ De la Paz, A. A. Estudio de la interacción de la proteína LasR a la caja *las* del gene *lasB* de *Pseudomonas aeruginosa*. M. en C. Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2009

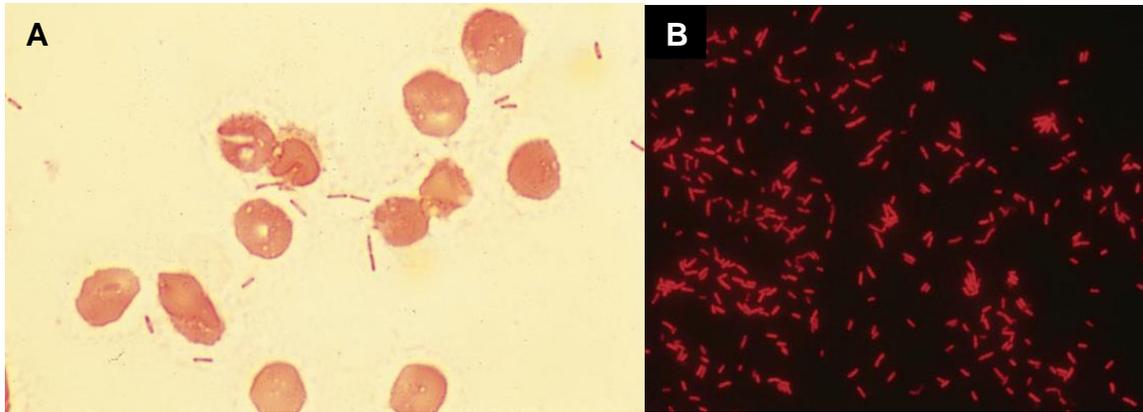


Figura 7. Tinciones de *P. aeruginosa*. A) Tinción de Gram de la bacteria cultivada en agar sangre. B) Micrografía empleando la técnica de fluorescencia de hibridación con sondas peptídicas de ácidos nucleicos PNA FISH. (Tomado de la Maza L.M.).²⁵

De acuerdo con la OMS, *P. aeruginosa* representa uno de los principales patógenos que requieren ser combatidos urgentemente debido a su resistencia a múltiples antibióticos de amplio espectro como lo son las fluoroquinolonas, aminoglucósidos, carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación.

En el caso de México, un estudio reportó 108 eventos de pacientes de un mes a 18 años diagnosticados con bacteriemia ocasionada por *P. aeruginosa* durante 2003 a 2005, de los cuales 65 correspondieron a un origen nosocomial. En cuanto al análisis de defunciones la mortalidad global fue de 21 casos, siendo más alta en eventos nosocomiales con 14 muertes.²⁶ Otro estudio más reciente que engloba una mayor cantidad de hospitales de diferentes niveles, publicó aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, los casos positivos estuvieron presentes en 11 hospitales, principalmente en CDMX (Tabla 5).²²

²⁵ De la Maza, L.M. et al. *Color Atlas of Medical Microbiology*, Wiley, 2020

²⁶ Medigraphic. *Factores asociados a mortalidad y patrones de susceptibilidad antibiótica en bacteriemias por Pseudomonas aeruginosa*. Bol Med Hosp Infant Mex. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=11580> , (consultado 22/01/2022)

Tabla 5. Aislamiento clínico de *P. aeruginosa* de muestras provenientes de hemocultivos entre los años 2016 y 2017 (Modificado de Ponce de León, S.).²²

Ciudad, Estado	Hospital (siglas)	Tipo de centro	Casos de <i>P. aeruginosa</i>
CDMX	HGMGG	Hospital general con especialidades	36
CDMX	HP – CMNSXXI	Tercer nivel	22
CDMX	INCan	Tercer nivel	69
CDMX	INCICH	Tercer nivel	13
CDMX	INNMVS	Tercer nivel	21
Durango, Durango	HGD	Hospital general	18
Guadalajara, Jalisco	HCGFAA	Centro de referencia 2 ^{do} y 3 ^{er} nivel	150
Guadalajara, Jalisco	HCGJIM	Centro de referencia 2 ^{do} y 3 ^{er} nivel	44
León, Guanajuato	HAPL	Centro de referencia 2 ^{do} y 3 ^{er} nivel	9
Monterrey, Nuevo León	UMAE34HC	Tercer nivel	32
Tecámac, Edo. de México	HGR200T	Segundo nivel	9
Total	-	-	423

Ya para el año 2018 se han evidenciado cepas aisladas provenientes de hemocultivos de *P. aeruginosa* resistentes a amikacina, piperazilina/tazobactam, cefepima, ceftazidima, meropenem y ciprofloxacina.^{22, 27}

2.2.1. Factores de virulencia de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista que posee un gran repertorio de factores de virulencia que pueden actuar individualmente o en conjunto que contribuyen directamente a la patogenicidad y a la RAM.²⁴ El vasto arsenal de estos factores de virulencia que le permite invadir y causar infecciones, ya sea agudas o crónicas, al hospedador incluye a la membrana externa que consiste en un lipopolisacárido el cual constituye una barrera física que media las interacciones con los receptores del hospedador, estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), formación de gel de mucinas en las células epiteliales de las vías respiratorias que se asocia a la mortalidad de pacientes con asma, EPOC y fibrosis

²⁷ López S.Y. Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), Universidad Nacional Autónoma de México. *Segundo Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia Antimicrobiana y consumo de antimicrobianos*. Ciudad de México, noviembre 2019

quística, contiene antígenos O-polisacáridos comunes y específicos. Además, expresa alrededor de 26 proteínas que ayudan a mantener la integridad de la célula, unión al peptidoglicano, adhesión a células del hospedador, censo el sistema inmune y unión a otras proteínas.²⁸

Los sistemas de secreción de proteínas de *P. aeruginosa* se encargan de expulsar una gran variedad de toxinas. La exotoxina A tiene la habilidad de necrosar el tejido una vez que invade el sitio colonizado, mientras que inhibe la síntesis de proteínas del hospedador y provoca la activación de caspasas. También participa en la secreción de enzimas hidrolíticas que regulan el sistema de percepción de cuórum (ver más abajo) como las elastasas LasA, LasB, proteasas alcalinas. Finalmente, las enzimas lipolíticas son cruciales para el funcionamiento de otros factores de virulencia como la movilidad y formación de biopelículas y enzimas antioxidantes que ayudan a superar el estrés oxidante en el hospedador.²⁸

P. aeruginosa biosintetiza diferentes metabolitos secundarios, principalmente la piocianina (un metabolito redox responsable de la pigmentación azul-verdosa de las colonias de *P. aeruginosa* en cultivos), la cual puede incrementar las ROS, provocando estrés oxidante que dañará el ciclo celular, enzimas y al ADN, culminando en la consecuente lisis celular y apoptosis. Otro metabolito relevante son los ramnolípidos, que por sus propiedades anfipáticas degradan el surfactante pulmonar y por ende facilitan la motilidad.²⁸

Respecto a la motilidad, el patógeno posee principalmente el flagelo, el cual consiste en un filamento hecho por proteínas FliC, FliD y FlgKL, que en conjunto ayudan a la formación de biopelículas al unirse a células epiteliales de pulmones, adhesión a mucinas respiratorias, además de ser importantes para la quimiotaxis y la motilidad por swimming (movimiento en medio líquido impulsado por la rotación del flagelo). El pili tipo IV se encarga de la motilidad por twitching (atracción a una superficie por el pili al extenderse, seguida de su contracción) y adhesión al hospedador para colonizar diferentes superficies, activar el inflammasoma (complejo

²⁸ Martín, I.J.; Mejías, M.S.; McClean, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (6), 3128, DOI: 10.3390/ijms22063128

intracelular multiproteico resultado de la respuesta inmune innata que activa la inflamación). Otro factor, pero no menos importante es el sistema de adquisición de Fe^{3+} , éste es un nutriente esencial que debe estar presente debido al ambiente de estrés oxidante que se genera en el hospedador.^{9, 28}

Por último, las biopelículas constituyen el factor de virulencia de mayor relevancia, formado principalmente por tres exopolisacáridos (alginato, y dos polisacáridos agregativos Psl y Pel) y en menor medida ADN extracelular y proteínas que en conjunto evitan la fagocitosis en los pulmones y expulsión de ROS producidas por macrófagos y neutrófilos que conllevan a la inflamación. Todos estos factores se observan en la Figura 8.

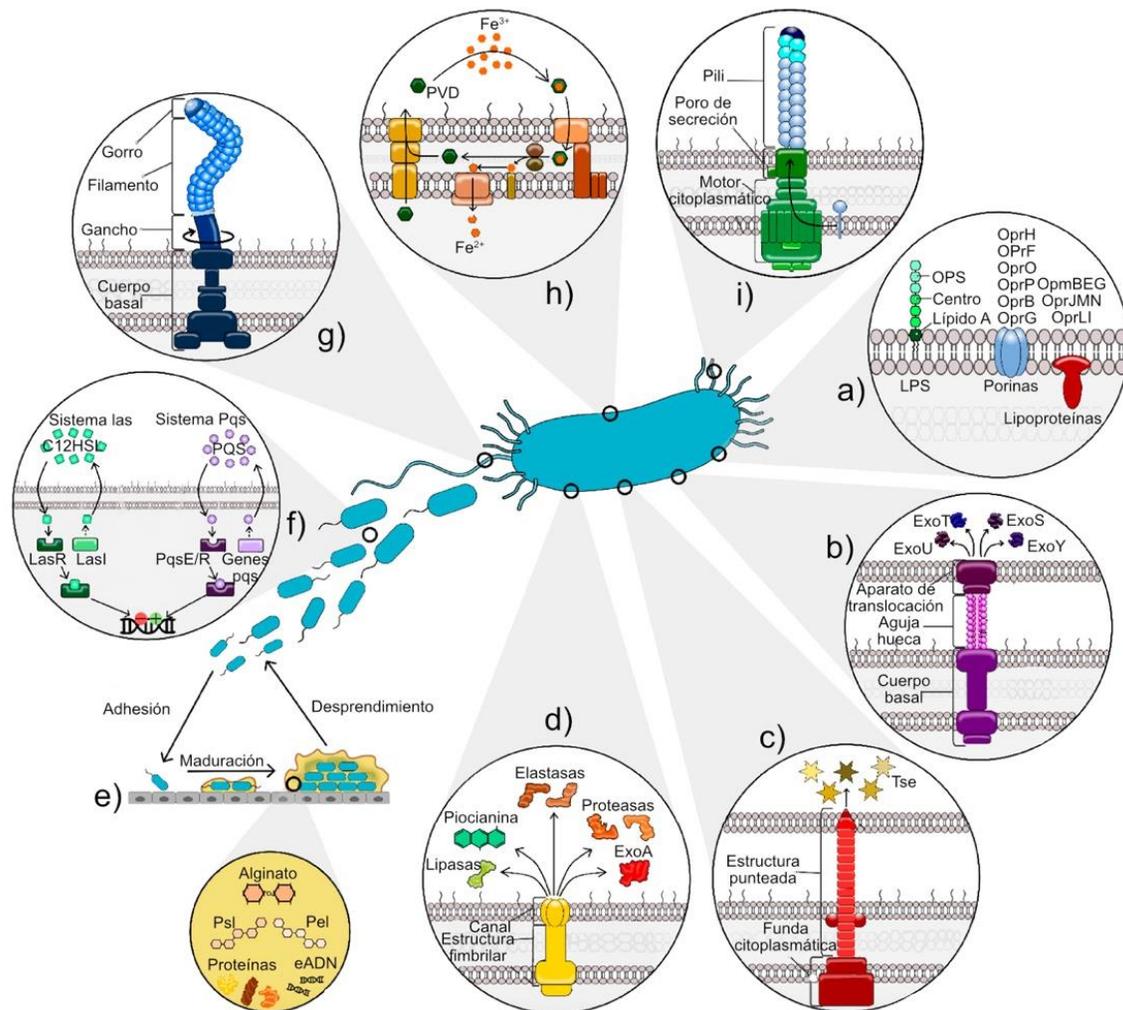


Figura 8. Factores de virulencia de *P. aeruginosa* (Modificado de Martín, I.J.).²⁸

2.3. Percepción del cuórum.

La percepción del cuórum (QS por sus siglas en inglés “quorum sensing”) fue estudiada inicialmente en la bacteria simbiótica *Vibrio fischeri*, organismo al que se le atribuye la generación de bioluminiscencia en especies marinas eucariotas. Este mecanismo de regulación (también conocido como comunicación celular) es dependiente de la densidad poblacional, el cual les permite a las bacterias coordinarse con la expresión de sus genes, muchos de éstos regulando los factores de virulencia responsables de la patogénesis.^{29, 30}

La activación y velocidad con la que se lleva a cabo este proceso está reflejado en la concentración de moléculas autoinducoras (AI´s) que secretan las mismas bacterias. Existen diversos tipos de AI´s, las bacterias pueden construir una familia de moléculas (figura 9) a base de borano como el autoinductor AI-2 (1). Las bacterias Gram-negativas sintetizan moléculas de tipo *L*-homoserina *N*-aciladas (AHL´s o bien lactonas 2), mientras que el sistema de percepción del cuórum en organismos Gram-positivos se destaca por usar pequeños oligopéptidos lineales y cíclicos (3 y 4), como los mostrados en la figura 5.^{29, 30}

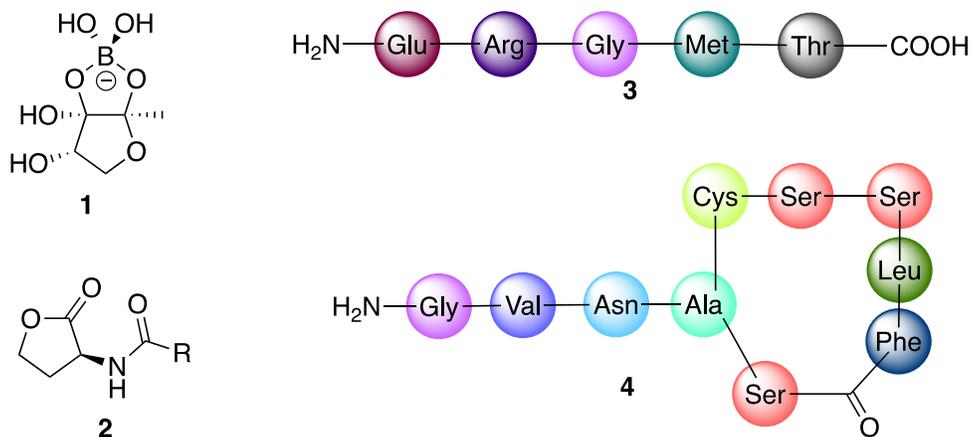


Figura 9. Moléculas autoinducoras de la percepción del cuórum. 1 presente en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, 2 exclusivo de bacterias Gram-negativas, 3 y 4 se representan con el código de tres letras de aminoácidos y solamente se encuentra en bacterias Gram-positivas.

²⁹ Galloway, W.; Hodgkinson, J.; Bowden, S. et al Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways. *Chem. Rev.* **2011**, 111 (1), 28 – 67, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00540

³⁰ Brindhadevi, K.; Oscar, F.; Mylonakis, E. et al. Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochem.* **2020**, 96, 49 – 57, DOI: 10.1016/j.procbio.2020.06.001

En el caso de *P. aeruginosa*, se tienen estudiados cuatro sistemas de percepción del cuórum (*las*, *rhl*, *pqs* e *lqs*) que están altamente interconectados (Figura 10). Los sistemas *las* y *rhl* se caracterizan por tener moléculas autoinducoras del tipo *N*-3-oxo-dodecanoil homoserina (3-oxo-C12-HSL) y la lactona de *N*-butiril homoserina (C4-HSL), respectivamente. El sistema *pqs* usa moléculas del tipo 2-alkil-4-quinolonas: 2-heptil-4-hidroxiquinolina (HHQ) y 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (PQS). Finalmente, el cuarto sistema *lqs* emplea como señal la molécula 2-(2-hidroxifenil)tiazol-4-carbaldehído (IQS).^{8, 30, 31}

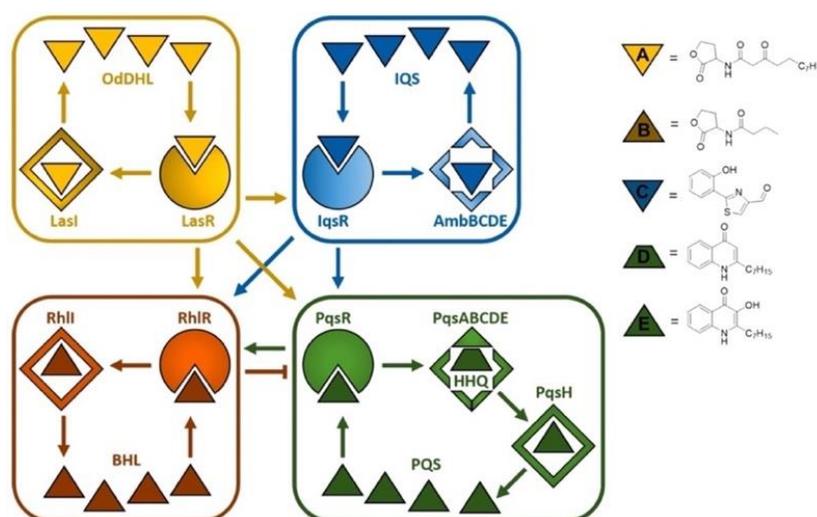


Figura 10. Sistemas de percepción del cuórum con sus respectivas moléculas autoinducoras (A: 3-oxo-C12-HSL; B: C4-HSL; C: IQS; D: HHQ y E: PQS) (Modificado de Schütz, C.).³¹

El sistema *las* controla principalmente a los genes que codifican tanto para las enzimas involucradas en la síntesis de los autoinducoras como para sus respectivos receptores. Una vez formado el complejo ligando-receptor se activa la expresión de genes para la síntesis de más moléculas autoinducoras, así como factores de virulencia específicos, como la formación de biopelículas, que le confiere a *P. aeruginosa* resistencia a los antibióticos tradicionales, protección contra del ambiente externo y el sistema inmune del hospedero (Figura 11).³⁰

³¹ Schütz, C.; Empting, M. Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2018**, 14, 2627 – 2645, DOI: 10.3762/bjoc.14.241

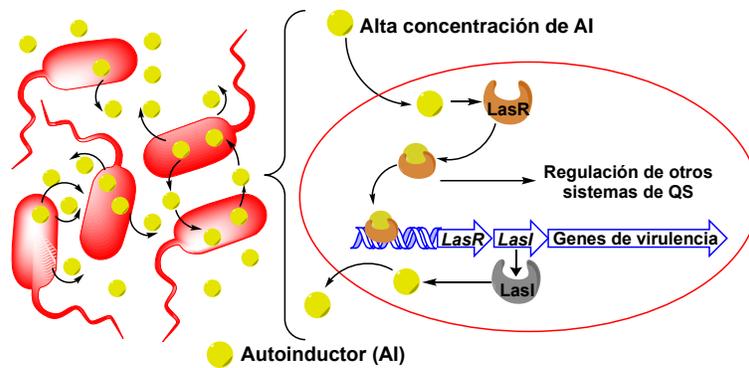


Figura 11. Mecanismo de comunicación (QS). A medida que aumenta la densidad poblacional también lo hace la concentración externa de moléculas autoinductoras (AI's), culminando en la activación de genes de virulencia y regulación de otros sistemas de QS que en conjunto contribuyen a la patogenicidad.

2.4. Formación de biopelículas.

Las biopelículas son agregados de microorganismos viviendo en una matriz extracelular por sustancias secretadas por ellos mismos ya sea sobre superficies bióticas o abióticas.³⁰ El desarrollo de biopelículas comienza con la adhesión de células planctónicas a la superficie del tejido del hospedero por un efecto de adsorción, las cuales llegan por efectos gravitacionales, movimientos Brownianos y la misma motilidad de la bacteria.³²

Enseguida, se forma una matriz polimérica extracelular, principalmente exopolisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Una vez establecida la microcolonia, y con ayuda de los sistemas de percepción del cuórum, es favorable el crecimiento celular para aumentar la densidad poblacional. Finalmente, algunas bacterias se desprenden para ir a colonizar otro sitio y formar una nueva biopelícula (Figura 12).³²

³² Li, Y.; Xiao, P.; Wang, Y. et al. Mechanisms and Control Measures of Mature Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents in the Clinical Context. *ACS OMEGA*. **2020**, 5 (36), 22684 – 22690, DOI: 10.1021/acsomega.0c02294

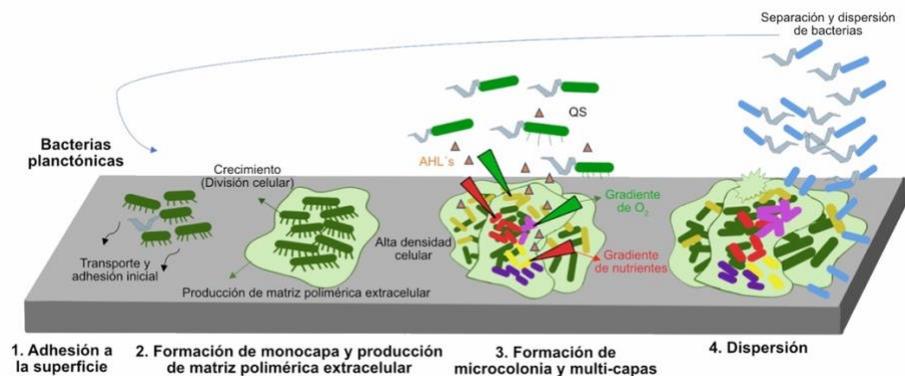


Figura 12. Formación de biopelículas (Modificado de Li, Y.).³²

En vista de que actualmente no hay tratamiento eficaz para las infecciones por *P. aeruginosa*, se busca atacar principalmente las biopelículas ya que contribuyen en gran medida a la RAM impidiendo que los antibióticos penetren hasta las bacterias menos accesibles dentro de estas colonias, llamadas como células persistentes, las cuales pueden sobrevivir y seguir mutando tras haber sido atacadas por una supuesta dosis letal de un antibiótico.³²

2.5. Receptor LasR.

En los 1990's se descubrieron en *P. aeruginosa* los respectivos sistemas de percepción del cuórum involucrados en la formación de biopelículas con la caracterización de las proteínas receptoras homologas a LuxR y LuxN: LasR, RhIR, QscR e IqsR.³³ Las del tipo LuxR se ubican en el citoplasma y contienen sitios de unión a sus respectivas moléculas autoinductoras, variables a ligandos y dominios al ADN bien conservados, mientras que las del tipo LuxN al cual pertenece LasR consisten en proteínas transmembranales de dos componentes de señalización que se unen a las lactonas *N*-acil homoserina en el espacio periplásmico dando paso a cascadas de fosforilación y desfosforilación para activar genes de virulencia.³⁴

³³ Mattmann, M.E.; Blackwell, H.E. Small Molecules That Modulate Quorum Sensing and Control Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (20), 6737 – 6746, DOI: 10.1021/jo101237e

³⁴ McCready, A.; Paczkowski, J.; Henke, B. et al. Structural determinants driving homoserine lactone ligand selection in the *Pseudomonas aeruginosa* LasR quorum-sensing receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116* (1), 245 – 254, DOI: 10.1073/pnas.1817239116

La estructura de receptor LasR ha sido cristalizada con su autoinductor *N*-3-oxo-dodecanoil homoserina, haciendo evidente la fuerte dependencia que tiene con el residuo de serina 129 para la interacción ligando receptor y subsecuentemente culminar en la transcripción de genes.³⁴ Se sabe que consiste en un dímero simétrico donde cada monómero es un sándwich α - β - α con tres hélices α empaquetados por ambos lados de cinco cadenas de pliegues anti paralelos- β y con una masa de 19, 432 Da (Figura 13).³⁵

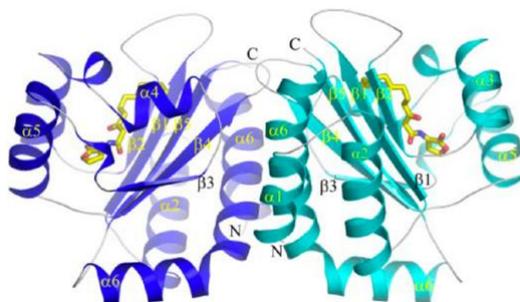


Figura 13. Estructura del receptor LasR cristalizado con el autoinductor *N*-3-oxo-dodecanoil homoserina (Modificado de Bottomley, M.).³⁵

2.6. Furanonas como inhibidores de biopelículas.

Debido a la importancia del receptor LasR durante el proceso de QS en *P. aeruginosa*, en años recientes se han buscado compuestos (tanto naturales como sintéticos) que sean capaces de antagonizar su acción para minimizar la virulencia y resistencia de este patógeno. Los inhibidores del receptor LasR se clasifican en cuatro categorías: antagonistas similares a las AHL's; antagonistas no similares a las AHL's; inhibidores covalentes e inhibidores basados en productos naturales.⁸

2.6.1. Furanonas naturales

Los compuestos naturales –extraídos en su mayoría de las especies marinas *Delisea pulchra* y *Luffariella variabilis* que contienen en común el heterociclo de lactona– mostraron actividad antibiopelícula en cepas de *P. aeruginosa* en modelos

³⁵ Bottomley, M.; Muraglia, E.; Bazzo, R. et al. Molecular Insights into Quorum Sensing in the Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the Structure of the Virulence Regulator LasR Bound to Its Autoinducer. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (18), 13592 – 13600, DOI: 10.1074/jbc.M700556200

in vitro. Dentro de este tipo de metabolitos se encuentran las manoálidas (**5 – 7**), malingólida (**8**), patulina (**9**), ácido penicílico (**10**), furaneol (**11**), protoanemonina (**12**), rubrólidas (**13 – 15**), cadiólidos (**16 – 18**) y fimbrólidas (**19 – 22**) (Figura 14).¹⁷, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45

³⁶ Newman, D.; Cragg, C. Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67 (8), 1216 – 1238, DOI: 10.1021/np040031y

³⁷ Skindersoe, M.; Ettinger-Epstein, P.; Rasmussen, T. et al. Quorum Sensing Antagonism from Marine Organisms. *Mar. Biotechnol.* **2008**, 10 (1), 56 – 63. DOI: 10.1007/s10126-007-9036-y

³⁸ Ghosh, A.; Jayaraman, N.; Chatterji, D. Small-Molecule Inhibition of Bacterial Biofilm. *ACS Omega.* **2020**, 5 (7), 3108 – 3115, DOI: 10.1021/acsomega.9b03695

³⁹ Choi, S.; Zhang, C.; Moon, S. et al. Inhibitory Effects of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone (HDMF) On Acyl-Homoserine Lactone-Mediated Virulence Factor Production and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Microbiol.* **2014**, 52 (9), 734 – 742, DOI: 10.1007/s12275-014-4060-x

⁴⁰ Miranda, A.; Barbosa, L.; Masood, M. et al. Inhibitory Effect on Biofilm Formation of Pathogenic Bacteria Induced by Rubrolide Lactam Analogues. *ACS Omega.* **2018**, 3 (12), 18475 – 18480, DOI: 10.1021/acsomega.8b02334

⁴¹ Boulangé, A.; Parraga, J.; Galán, A. et al. Synthesis and antibacterial activities of cadiolides A, B and C and analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23 (13), 3618 – 3628, DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.010

⁴² Bracegirdle, J.; Stevenson, L.; Sharrock, A. et al. Hydrated Rubrolides from the New Zealand Tunicate *Synoicum kurani*. *J. Nat. Prod.* **2021**, 84 (2), 544 – 547, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c01248

⁴³ Kutty, S.; Barraud, N.; Pham, A. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Fimbrilide-Nitric Oxide Donor Hybrids as Antimicrobial Agents. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (23), 9517 – 9529, DOI: 10.1021/jm400951f

⁴⁴ Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Alagely, A. et al. Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, 2 (6), 739 – 744, DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00169.x

⁴⁵ Fazzini, R.A.B.; Skindersoe, M.E.; Bielecki, P. et al. Protoanemonin: a natural quorum sensing inhibitor that selectively activates iron starvation response. *Environ. Microbiol.* **2013**, 15 (1), 111 – 120, DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02792.x

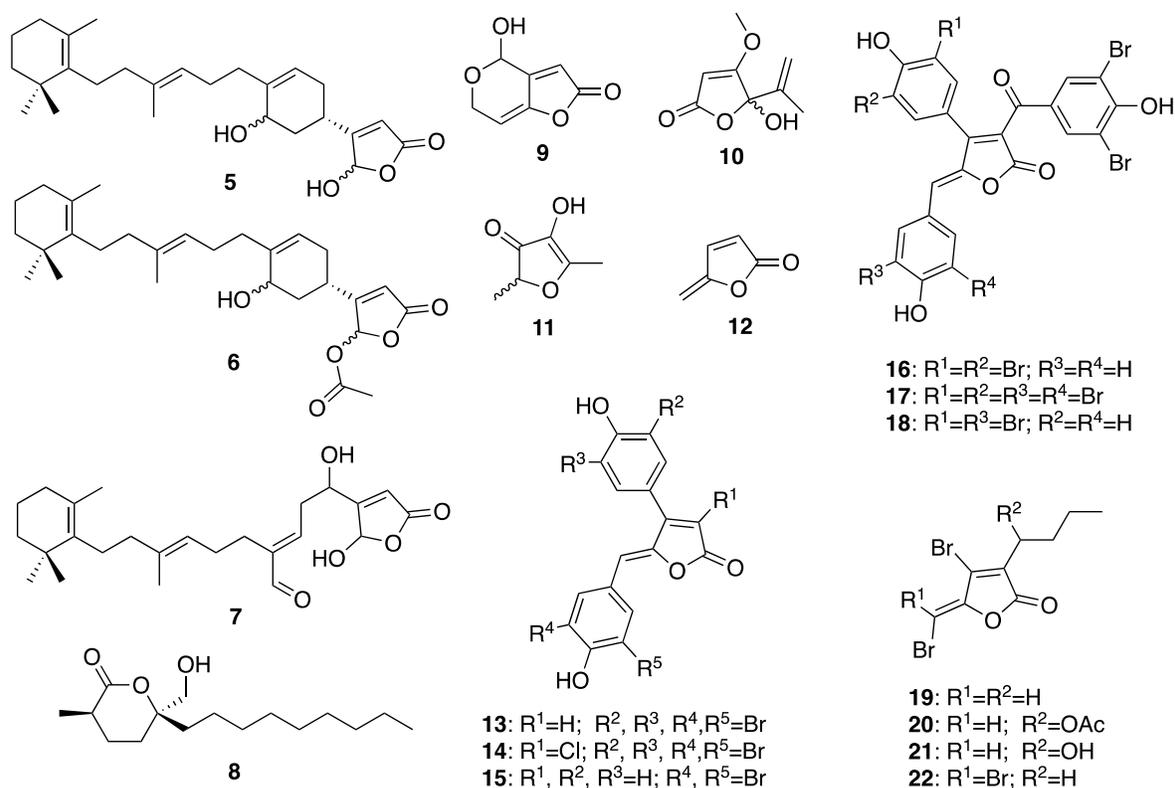


Figura 14. Compuestos naturales con actividad anti-biopelícula.

2.6.2. Furanonas sintéticas.

Así mismo se ha observado que las AHL's sintéticas (Figura 15) han demostrado inhibir la formación de biopelículas en cepas de *V. fischeri* y *P. aeruginosa*. En la literatura, existe una gran colección de compuestos derivados de lactonas *N*-acil homoserina, donde destaca que prácticamente es esencial la estereoquímica *L* de la lactona, mientras que la introducción en la cadena alifática por anillos heterocíclicos sustituidos ya sea con grupos electroattractores o electrodonadores (**23-30**), por ejemplo, en *V. fischeri* ha logrado reducir en un 50% la respuesta del QS con la presencia de halógenos como F, Br y Cl en diferentes

posiciones del anillo de benceno colocado al final de la cadena acilo, y lo mismo se ha visto con proteínas homologas a LasR.^{33, 46, 47}

Por otra parte, también se ha experimentado sustituyendo la amida con bioisómeros como sulfonamidas (**31**), sulfonilureas (**32**) o ureas (**33**, **34**), donde sobresalen con mayor actividad antagonista los compuestos con un espacio de siete átomos de carbono, en promedio, en la parte acilo de las moléculas.⁴⁷

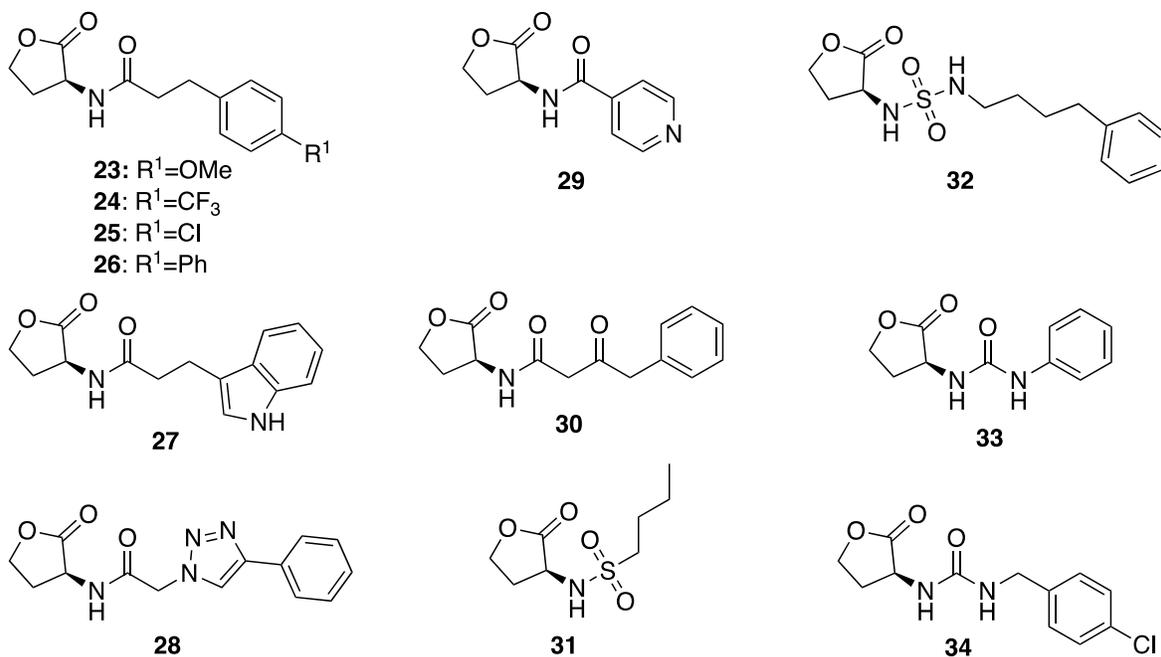


Figura 15. Algunas AHL´s sintéticas con actividad antagonista contra el receptor LasR.

⁴⁶ Stacy, D.; Quement, S.; Hansen, C. et al. Synthesis and biological evaluation of triazole-containing *N*-acyl-homoserine lactones as quorum sensing modulators. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11 (6), 938 – 954, DOI: 10.1039/c2ob27155a

⁴⁷ Stevens, A.; Queneau, Y.; Soullère, L. et al. Mechanism and Synthetic Modulators of AHL-Dependent Gene Regulation. *Chem. Rev.* **2011**, 111 (1), 4 – 27, DOI: 10.1021/cr100064s

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A pesar de que las infecciones bacterianas lograron ser controladas en gran medida desde el siglo pasado con el descubrimiento de los antibióticos y de esta manera incrementar la esperanza de vida de las personas, el escenario que vive la sociedad actualmente contra estos patógenos vuelve a ser alarmante debido a la RAM. Como resultado a esta problemática, se prevé que los índices de mortalidad asociados a infecciones bacterianas en los próximos años superen los de otras enfermedades como es el caso del cáncer, diabetes y VIH.

En este sentido, la ciencia debe replantearse el desarrollo de nuevos fármacos como potenciales antibacterianos, principalmente destinados al control de infecciones en hospitales donde destacan un grupo de bacterias conocidas como “ESKAPE”. Estas bacterias son reconocidas por la OMS como las de principal interés por la gran variedad de mecanismos que han desarrollado para evadir el efecto bactericida de los antibióticos de último recurso, como es el caso de la vancomicina.

Sin embargo, se ha visto en trabajos previos que es posible combatir a *Pseudomonas aeruginosa* inhibiendo las biopelículas que secreta, ya que éstas evitan que los antibióticos penetren hasta las células. Para ello, la síntesis de moléculas que bloquean la acción del autoreceptor involucrado en la formación de biopelículas (LasR) es considerado como una novedosa estrategia. Por tal razón, se piensa abordar el tema empleando la síntesis orgánica para producir nuevos compuestos que pudieran servir de compuesto “líder” para el desarrollo de alternativas terapéuticas en contra de *P. aeruginosa*.

4. HIPÓTESIS.

Sabiendo que las AHL's con núcleo de lactona secretadas por *P. aeruginosa* tienen capacidad de autoinducción en el proceso de QS y que ciertas furanonas naturales y sintéticas tienen capacidad de inhibir la percepción del cuórum (vía antagonismo del receptor LasR), se propone la preparación de una serie de compuestos conteniendo a este heterociclo, los cuales se evaluarán como potenciales compuestos anti-biopelícula.

De acuerdo a la evidencia reportada, se ha visto que un anillo aromático en sustitución de la cadena alifática presente en el autoinductor, genera un efecto antagónico en LasR. Por lo tanto, la acilación de la lactona de homoserina con derivados del ácido cinámico, podría generar una serie de compuestos con actividad anti-biopelícula.

5. OBJETIVOS.

5.1. General.

- Diseñar y sintetizar una colección de lactonas de *N*-acil homoserina como potenciales inhibidores de biopelículas en *P. aeruginosa*.

5.2. Particulares.

- Diseñar diferentes furanonas y analizar los candidatos más viables para la síntesis.
- Estandarizar una metodología para la preparación de la lactona de homoserina a partir de *L*-metionina.
- Preparar diferentes ácidos propenoicos a partir de aldehídos aromáticos utilizando la reacción de Knoevenagel – Doebner.
- Generar una estrategia sintética para la obtención de los compuestos deseados.
- Evaluar la capacidad anti-biopelícula de los compuestos.

6. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.

6.1. Estrategias en la búsqueda de antibióticos.

Con los avances de la Química Farmacéutica, es posible tener en el mercado un medicamento confiable lo más pronto posible para el tratamiento de alguna enfermedad. El descubrimiento de un prototipo para su potencial desarrollo a un fármaco puede ser a través de serendipia, fuentes endógenas, fuentes externas (síntesis total o parcial, productos naturales como plantas, animales, minerales y microorganismos), rastreo sistemático (high-throughput-screening), diseño racional o mediante el empleo de técnicas computacionales –SAR, QSAR, optimización selectiva de actividades secundarias (SOSA por sus siglas en inglés Selective Optimization of Side Activities).⁴⁸

De forma general podemos identificar tres etapas por las que pasa un fármaco antes de salir a la venta: 1) Descubrimiento. Escoger la enfermedad, el blanco molecular e identificar el bioensayo. Esto conlleva a encontrar un compuesto líder; 2) Diseño. Identificar la relación estructura actividad, así como el farmacóforo y considerar las interacciones moleculares; 3) Desarrollo. En esta etapa realizan pruebas preclínicas las cuales eventualmente desembocarán en pruebas clínicas y el potencial registro en el mercado.⁴⁷

Para el caso del desarrollo de antibióticos, se debe considerar que los compuestos sean capaces de actuar selectivamente contra células bacterianas en lugar de células animales; sin embargo, la química farmacéutica actualmente se enfrenta a una situación que requiere la búsqueda nuevos blancos moleculares por la RAM. Por ende, se debe considerar que los compuestos deben cumplir ciertos requisitos: i) una baja presión selectiva para evitar el incremento de cepas resistentes; ii) la inhibir patógenos sin afectar la microbiota; iii) la habilidad de contrarrestar formas naturales de resistencia y iv) la capacidad de eliminar bacterias latentes que sean metabólicamente inertes y naturalmente resistentes a los antibióticos de uso común.⁴⁹

⁴⁸ Patrick, G. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, 2013

⁴⁹ Schillaci, D.; Spanò, V.; Parrino, B. et al. Pharmaceutical Approaches to Target Antibiotic Resistance Mechanisms. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (20), 8268 – 8297, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00215

En el pasado, los antibióticos eran descubiertos de manera aleatoria al probar los metabolitos de los microorganismos contra diversos patógenos. Cualquier compuesto que mostrara actividad antibacteriana era considerado como un fármaco sin descifrar su mecanismo de acción. Actualmente, con ayuda de la secuenciación de genomas es posible tener un mejor acercamiento y seguimiento al descubrimiento de fármacos. En este sentido, blancos moleculares que no están involucrados en rutas metabólicas importantes (Figura 16) han emergido como una alternativa para el control de infecciones bacterianas sin generar una presión de selección.⁵⁰ Considerando estos antecedentes, se decidió atacar la formación de biopelículas presente en la bacteria *P. aeruginosa*.

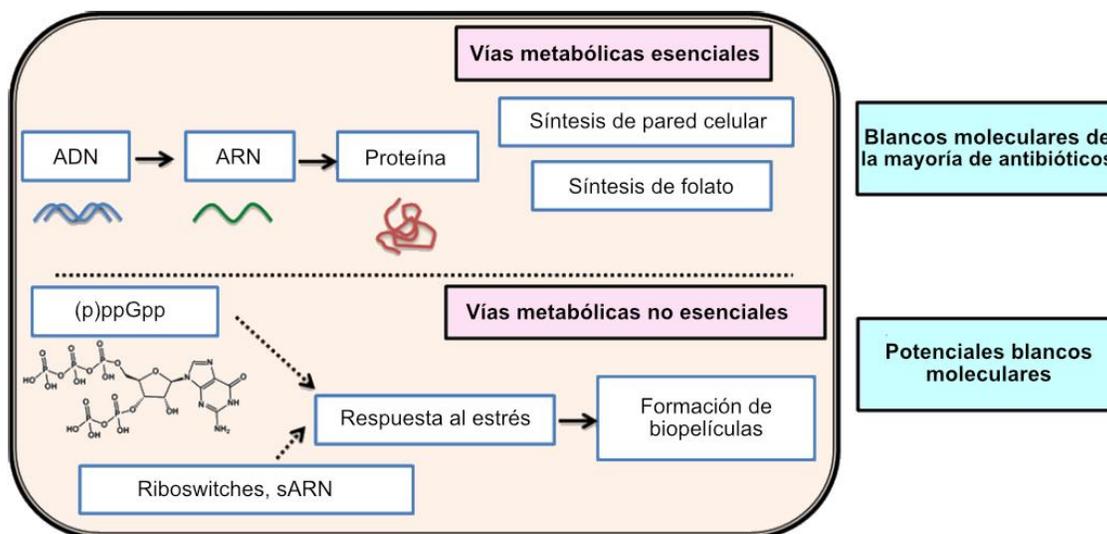


Figura 16. Blancos moleculares comunes y potenciales blancos moleculares (tomado de Petchiappan A.).⁴⁹

⁵⁰ Petchiappan, A.; Chatterji, D. Antibiotic Resistance: Current Perspectives. *ACS Omega*. **2017**, 2 (10), 7400 – 7409, DOI: 10.1021/acsomega.7b01368

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

Con base en la información reportada en la literatura, se sabe que aquellas AHL's sintéticas *N*-aciladas en la posición α (con un promedio de 8 átomos de carbono o anillos aromáticos con grupos electroattractores como F y Br) tienen actividad antagonista contra el receptor *LasR*.²⁹ Este trabajo pretendió explorar más la inhibición del receptor *LasR* al preparar lactonas *N*-aciladas con derivados de ácido propenoico. Este tipo de compuestos ya se han probado como antagonistas del receptor *RpaR* que controla el sistema QS de la bacteria Gram-negativa *Rhodopseudomonas palustris*. En este estudio, sobresalen los compuestos con grupos electroattractores (F y NO₂) o conteniendo una cadena alifática de dos carbonos, logrando inhibir de un 63 – 89% el receptor *RpaR* a una concentración de 1 μ M.⁵¹

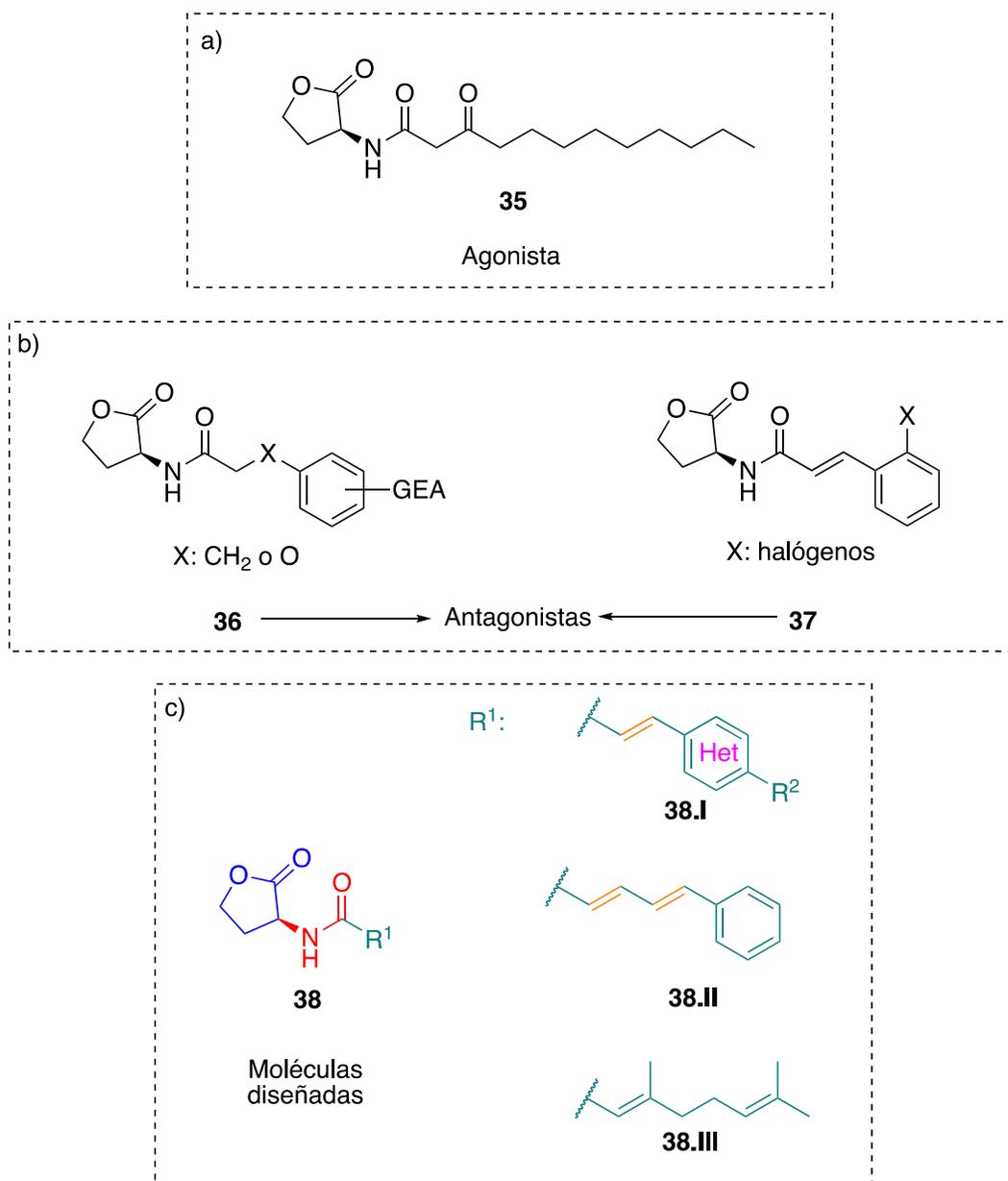
Así mismo, con base en estudios de acoplamiento molecular se ha percibido que los grupos voluminosos en la cadena acilo son relevantes para la interacción con dos aminoácidos aromáticos (Tyr53 y Trp57) del sitio activo de la proteína homóloga *LuxR* con la parte terminal de la cadena del ligando. En cuanto a los compuestos que inhiben *LasR* son notables las interacciones por fuerzas de Van der Waals entre las hélices R y el grupo acilo lipofílico.⁴⁷

La elección de heterociclos como el indol o piridina surge debido a un estudio de inhibición contra *LasR* donde un análogo que contenía indol al final de una cadena acilo de tres átomos de carbono demostró ser dos veces más activo que los compuestos sintéticos de referencia a una concentración de 400 μ M, dos de estos controles similares a los autoinductores *N*-3-oxo-dodecanoil homoserina y *N*-butiril homoserina presentan el heterociclo de lactona mientras que el tercero lo reemplaza por un fenol.⁵²

⁵¹ McInnis, C.; Blackwell, H. Non-native N-Aroyl L-Homoserine Lactones are Potent Modulators of the Quorum Sensing Receptor *RpaR* in *Rhodopseudomonas palustris*. *ChemBioChem*. **2014**, 15 (1), 87 – 93, DOI: 10.1002/cbic.201300570

⁵² Geske, G.; Wezeman, R.; Siegel, A. et al. Small Molecule Inhibitors of Bacterial Quorum Sensing and Biofilm Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (37), 12762 – 12763, DOI: 10.1021/ja0530321

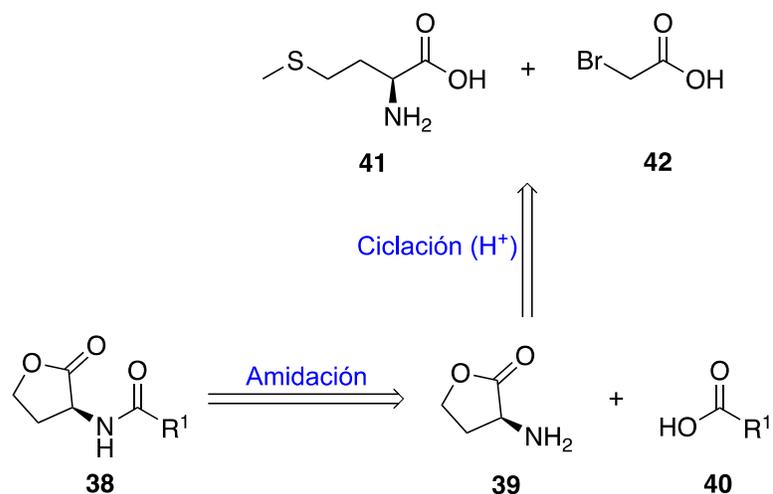
En resumen, los compuestos diseñados consisten de tres partes (Esquema 1): un ciclo de lactona de cinco miembros sustituida en la posición 3 con un grupo amino, una amida central y un grupo acilo derivado del ácido 3-arilpropenoico con grupos electroattractores, electrodonadores, diferentes heterociclos, así como la vinilización en algunos casos.



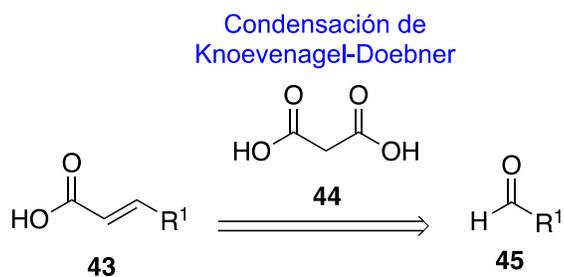
Esquema 1. Diseño de las furanonas. a) Molécula autoinductora natural del sistema *las* de QS (**35**), b) compuestos derivados de furanona con actividad antagonista en un receptor homólogo a LasR (**36** y **37**) y a partir de las cuales se proponen c) las estructuras de los compuestos del presente trabajo (**38**).

Para acceder a los compuestos del tipo **38**, se propuso la retrosíntesis del Esquema 2. La *N*-acilfuranonas (**38**) se pueden obtener de la correspondiente lactona de homoserina (**39**) y los derivados de ácido propenoico (**40**). Para obtener **39**, se puede reaccionar la *L*-metionina (**41**) y el ácido α -bromo acético (**42**) en medio ácido, formando *in situ*, la homoserina.

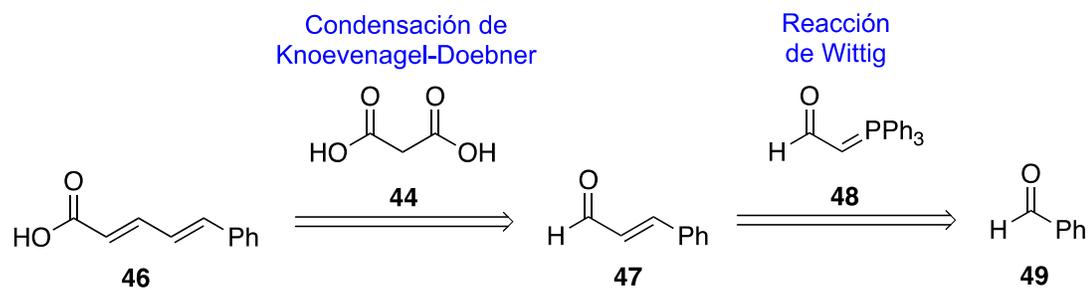
Paralelamente, los ácidos (**43** y **46**) se pueden obtener de los aldehídos correspondientes, para lo cual se propone la condensación de Knoevenagel – Doebner y así producir los intermediarios de los compuestos de la serie **38.I**. En el caso del compuesto dieno **38.II**, se requiere un segundo doble enlace conjugado, el cual bien podría obtenerse por medio de una reacción de Wittig previo a la condensación de Knoevenagel – Doebner. Mientras que el compuesto **38.III** puede prepararse a partir de una oxidación de Tollens partiendo del citral comercial (**51**).



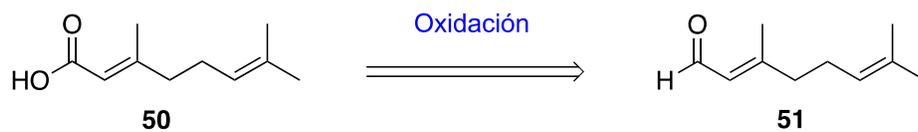
Para los derivados 36.I



Para los derivados 36.II



Para los derivados 36.III

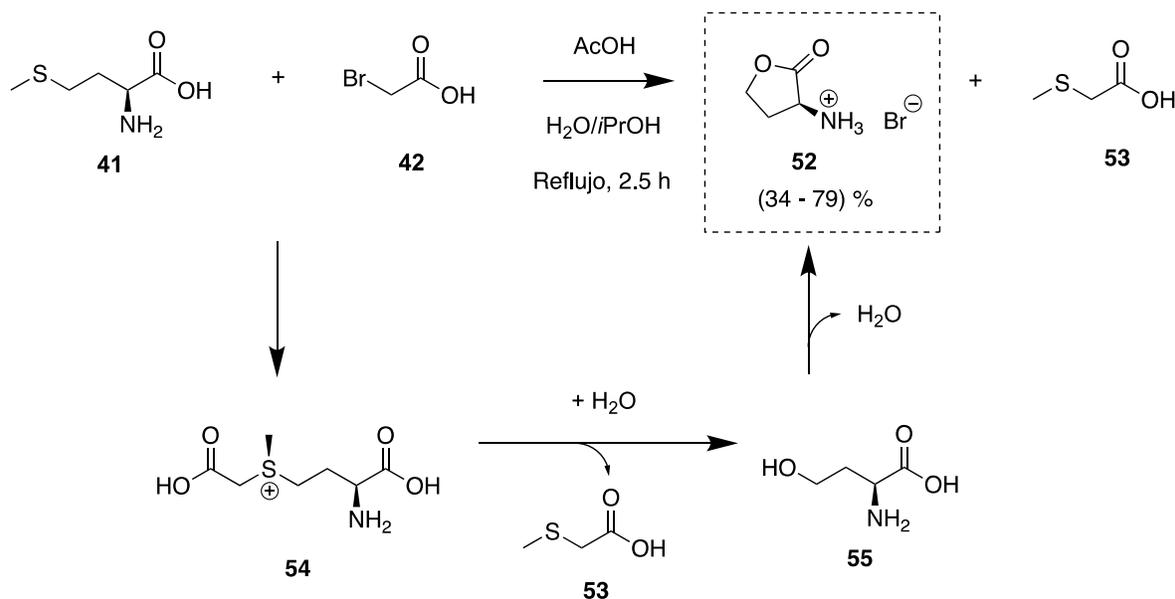


Esquema 2. Análisis retrosintético de las furanonas.

7.1. Parte Química.

7.1.1. Síntesis de la lactona.

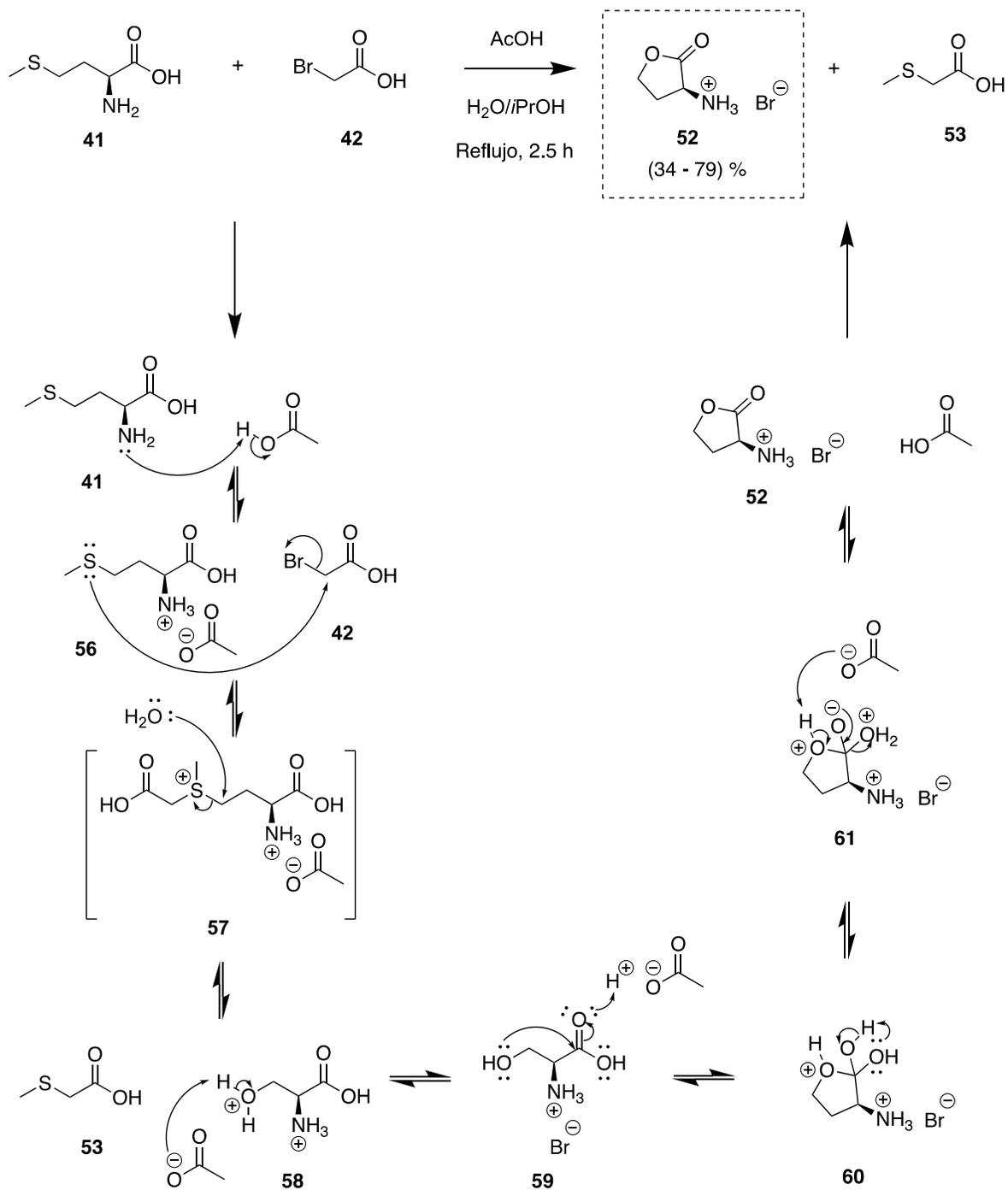
El primer paso de la síntesis consistió en la formación del núcleo de lactona a partir de la *L*-metionina (**41**) y el ácido α -bromoacético (**42**) en condiciones ácidas y usando una mezcla de agua/*i*PrOH como disolvente, lo cual produce el bromohidrato de lactona (**52**) y el ácido 2-metiltioacético (**53**) como subproducto (esquema 3).⁵³ La reacción procede vía la formación de la homoserina (**55**), la cual se deshidrata con las condiciones de la reacción.



Esquema 3. Síntesis del núcleo de lactona.

Esta reacción inicia con un equilibrio ácido-base cuando el par de electrones libre del grupo amino de **41** abstrae el protón del ácido acético, evitando así que actúe como nucleófilo sobre **42**. Posteriormente, el intermediario sulfonio (**54**) que se forma mediante el ataque del tipo S_N2 de **41** con el ácido bromoacético, sufre una hidrólisis para dar paso al ácido 2-metiltioacético (**53**) y la homoserina. Las condiciones de reacción favorecen la ciclación que permite obtener el bromohidrato de lactona (Esquema 4). El aislamiento de la lactona fue posible al precipitar debido a que **53** es insoluble en *i*PrOH.

⁵³ Natelson, S.; Natelson, E. Preparation of D-, DL-, and L- Homoserine Lactone from Methionine. *Microchem. J.* **1989**, 226 – 232



Esquema 4. Mecanismo de reacción del bromohidrato de lactona.

7.1.2. Síntesis de los intermediarios ácidos propenoicos.

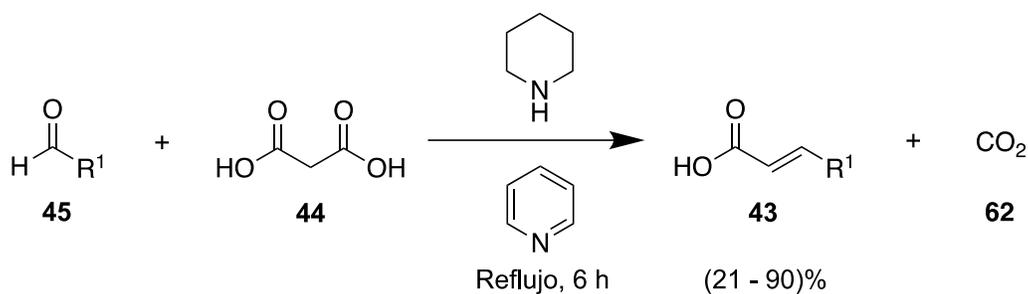
En esta sección se muestra la preparación de los ácidos que se utilizaron para la formación de la amida con la lactona: los ácidos α,β -insaturados (**38.I**), ácidos α,β -insaturados vinilogados (**38.II**) y un caso particular a partir del compuesto natural citral (**38.III**).

7.1.2.1. Síntesis de los intermediarios ácidos α,β -insaturados de la serie de compuestos **38.I**.

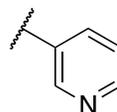
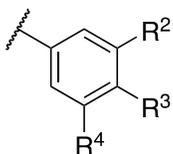
La reacción de Knoevenagel–Doebner –una modificación a la condensación de Knoevenagel que añade pirdina como disolvente para poder descarboxilar grupos ácidos– se empleó para acceder a los derivados de ácidos carboxílicos. La reacción emplea aldehídos o cetonas que reaccionan con compuestos que contengan grupos metilenos ácidos (ésteres malónicos, ésteres acetoacéticos, malondinitrilo, etc.) en presencia de una base débil.⁵⁴

Se decidió que los aldehídos (**45**) se condensaran a reflujo con ácido malónico (**44**), ya que permitiría agregar el grupo ácido a la molécula deseada junto con la formación del doble enlace conjugado. El enolato se forma después de la abstracción del hidrógeno ácido en la posición α del ácido malónico por la piperidina y actúa como nucleófilo atacando al grupo carbonilo del aldehído. La posterior deshidratación y descarboxilación da lugar a los ácidos α,β -insaturados correspondientes a la serie **43** (**43a-I**) más CO_2 (**61**) como subproducto en un tiempo promedio de seis horas (Esquema 5).

⁵⁴ Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. Elsevier Academic Press, 2005



R¹:



45h

45a: R², R³, R⁴ = H

45b: R², R⁴ = H; R³ = *i*Pr

45c: R², R⁴ = H; R³ = CF₃

45d: R², R⁴ = H; R³ = Ph

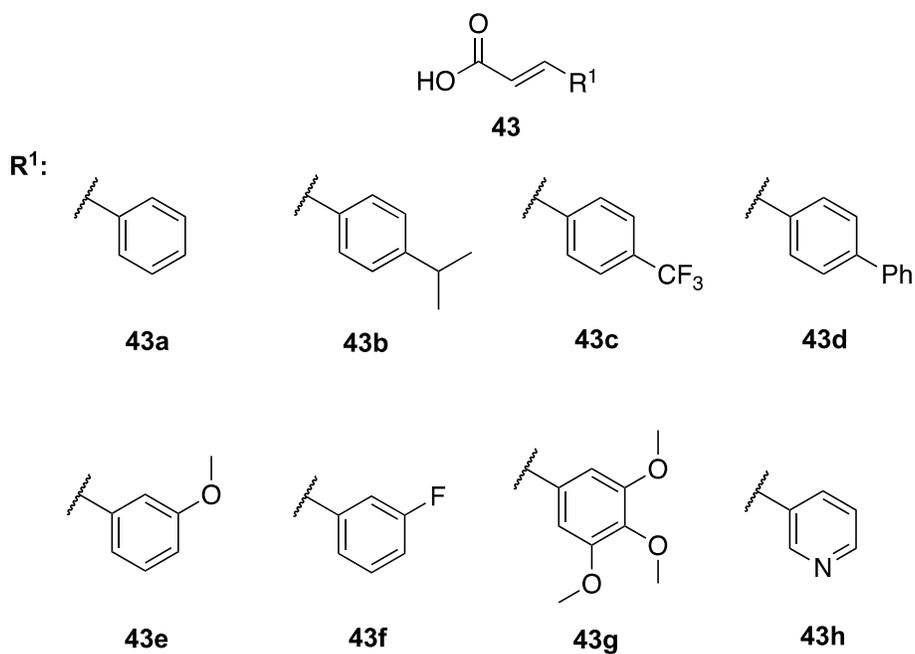
45e: R³, R⁴ = H; R² = OMe

45f: R³, R⁴ = H; R² = F

45g: R², R³, R⁴ = OMe

Esquema 5. Síntesis de los ácidos α,β -insaturados (43a-h).

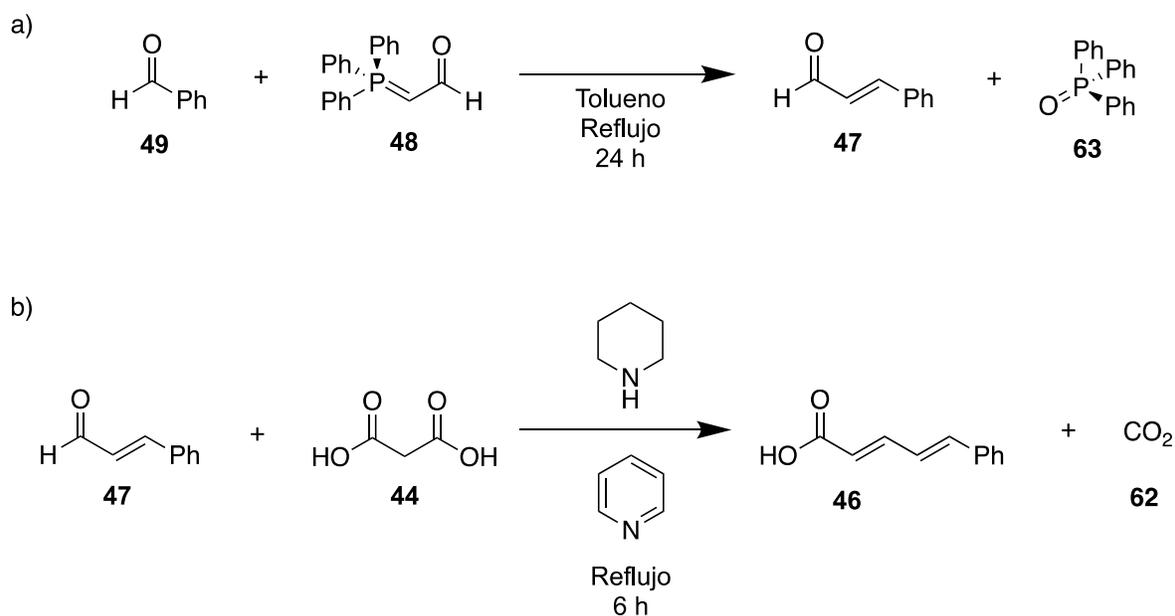
Con esta metodología, se prepararon los diferentes ácidos en rendimiento de moderados a excelentes (Figura 17).



Esquema 6. Intermediarios ácidos α,β -insaturados.

7.1.2.2. Síntesis del intermediario ácido α,β -insaturado vinílogado.

A diferencia de los ácidos que se mostraron en la sección anterior, el compuesto del tipo **38.II** incorpora en su estructura un segundo doble enlace para obtener un dieno conjugado. Este tipo de compuestos (**46**), se pueden construir empleando la reacción de Wittig ocurrida entre los benzaldehídos con trifenilfosforanilidienacetaldehído (**48**), usando tolueno anhidro (Esquema 7). De acuerdo con el esquema anterior, subsecuentemente a la formación del producto **47** se realizó la condensación de Knoevenagel – Doebner mostrada en la sección previa y así lograr tener el alqueno conjugado **46** (figura 18).



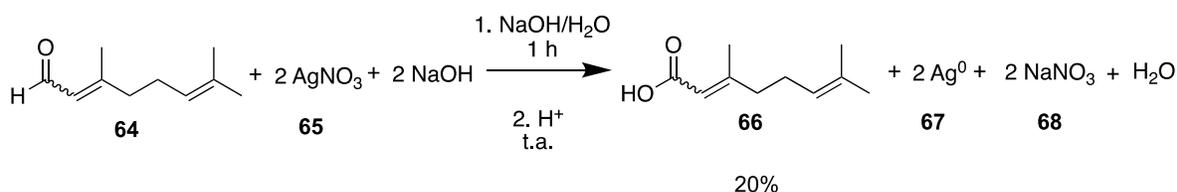
Esquema 7. Síntesis del ácido α,β -insaturado vinílogado. a) Reacción de Wittig y b) Reacción de Knoevenagel – Doebner. *No obstante ya se contaba con suficiente ácido

7.1.2.3. Síntesis del intermediario ácido (*E*)-3,7-dimetilocta-2,6-dienoico.

En vista de las propiedades antimicrobianas reportadas del enantiómero (-) del monoterpeno citral (**64**) –también conocido como geranial–, al inhibir en *P. aeruginosa* la producción de plicianina controlada por el sistema de QS,⁵⁵ se

⁵⁵ Silva, L.; Zimmer, K.; Macedo, A. et al. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (16), 9162 – 9236, DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00184

decidió acoplar a la furanona mediante el enlace amida. Para ello, fue necesario oxidar el aldehído al ácido carboxílico correspondiente con AgNO_3 en condiciones tipo Tollens, la cual emplea un complejo de plata con amoníaco (Esquema 8).



Esquema 8. Síntesis del ácido (*E*)-3,7-dimetilocta-2,6-dienoico.

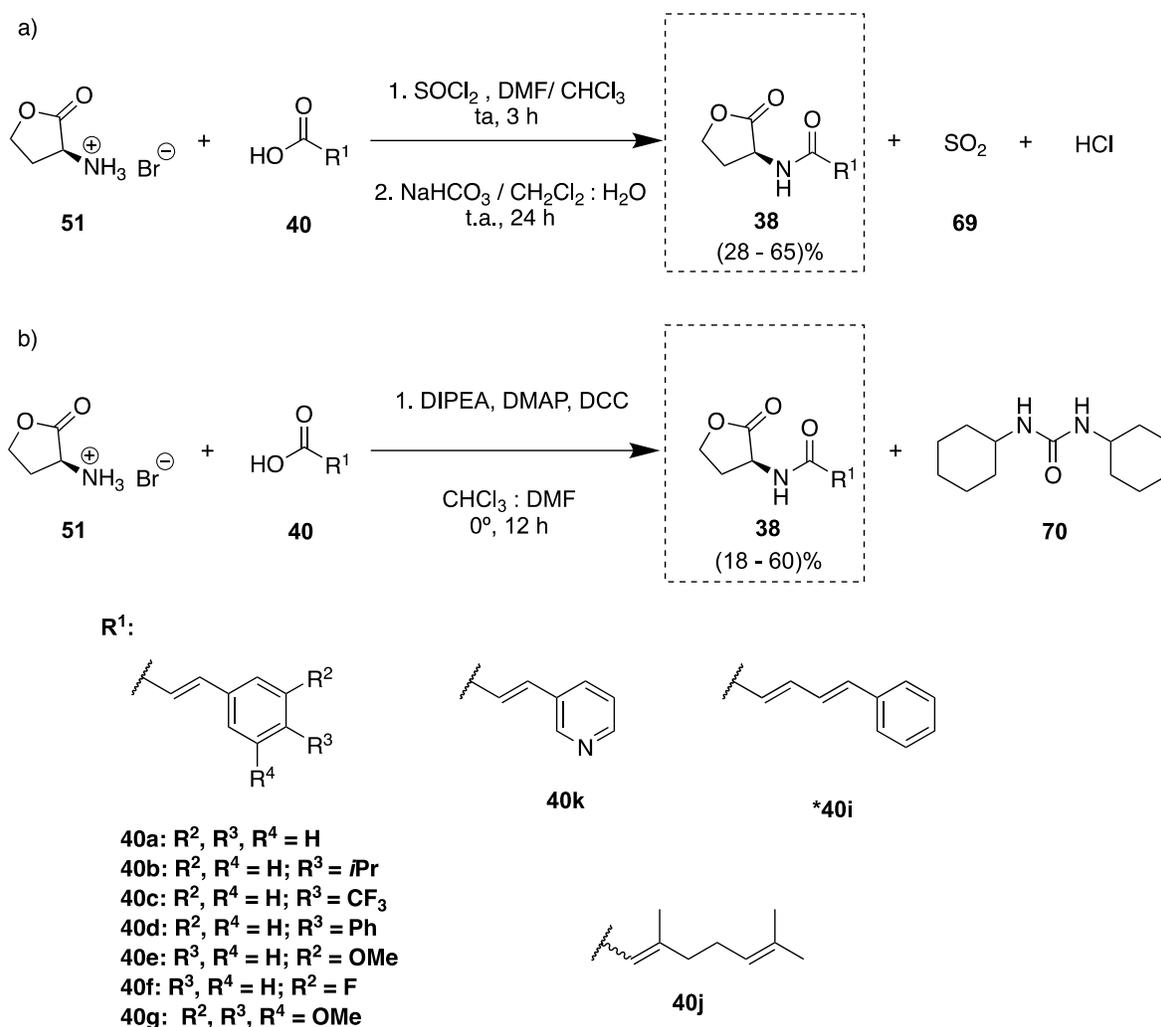
El ácido dienoico **66** se generó mediante una reacción redox donde el aldehído se oxida al ácido carboxílico correspondiente y la Ag^{+1} se reduce a Ag^0 . Desafortunadamente, el producto se obtuvo como una mezcla de isómeros inseparables debido a que se partió de una mezcla comercial que contenía citral A, también conocido como neral (*E*) más geranial (*Z*).

7.1.3. Síntesis de las furanonas del tipo L-N-acil homoserinas AHL's (Amidación).

La síntesis de la diferentes furanonas de N-acil homoserina que se propusieron en el esquema 1 (**38.I**, **38.II** y **38.III**) se describe a continuación. En primera instancia, el acoplamiento entre la lactona de homoserina y los ácidos carboxílicos α,β -insaturados se llevó a cabo mediante la formación del cloruro de ácido correspondiente formado *in situ* con cloruro de tionilo (SOCl_2). Una vez terminada la síntesis del cloruro, se añadió la lactona con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) en una mezcla cloroformo (CHCl_3) agua lo que permitió la formación del enlace peptídico. Debido a la insolubilidad de la furanona, se decidió utilizar el sistema bifásico $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ para la reacción, mientras que el carbonato fue utilizado para liberar a la furanona y neutralizar el ácido clorhídrico generado.

Sin embargo, se observó que el método antes descrito no procedía en ciertos ácidos carboxílicos por la inestabilidad en las condiciones ácidas (por ejemplo, el derivado de pirrol) o bien, el producto se aislaba en un rendimiento bajo. Eventualmente, se reemplazó el método de acoplamiento por el sistema binario de

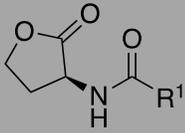
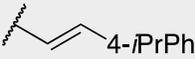
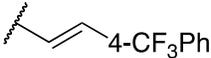
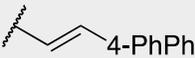
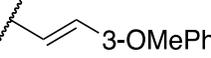
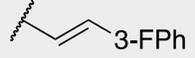
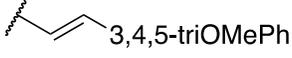
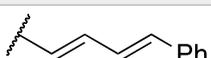
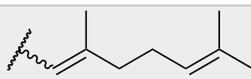
diciclohexilcarbodiimida/4-dimetilaminopiridina (DCC/4-DMAP) como agente de acoplamiento y catalizador, respectivamente (Esquema 9).



Esquema 9. Síntesis de las furanonas. I) A partir del cloruro de ácido. II) Utilizando el sistema binario DCC/4-DMAP.

En el esquema anterior se muestra la estructura general de las furanonas con la variación de las cadenas acilo ancladas mediante el enlace amida, resultando un total de 10 compuestos que se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Características de las furanonas del tipo L-N-acil homoserinas (AHL's) sintetizadas.

Compuesto (Estructura general)		Apariencia	Rendimiento (%)	R.F.	Sistema de elución.
Clave	R ¹				
38.I.a		Sólido blanco	65	0.83	Hex: AcOEt (45:55)
38.I.b		Sólido blanco	53	0.27	Hex:AcOEt (1:1)
38.I.c		Sólido blanco	28	0.37	Hex:AcOEt (1:1)
38.I.d		Sólido blanco	18	0.22	Hex:AcOEt (4:6)
38.I.e		Sólido blanco	63	0.11	Hex: AcOEt (45:55)
38.I.f		Sólido blanco	51	0.16	Hex:AcOEt (1:1)
38.I.g		Sólido blanco	53	0.17	Hex:AcOEt (3:7)
38.I.h		Cristales blancos	60	0.3	AcOEt: MeOH:NH ₄ OH (95:5:0.5)
38.II.i		Sólido blanco	61	0.32	Hex: AcOEt (45:55)
38.III.j		Aceite amarillento	53	0.16	Hex:AcOEt (7:3)

7.2. Análisis espectroscópico y espectrométrico.

En esta sección se muestra la elucidación estructural de los 10 compuestos sintetizados mediante las técnicas de espectroscopia en el IR, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) y carbono 13 (RMN-¹³C). Aunque solo se profundizará en algunos compuestos, en la sección de anexos se encuentra la caracterización completa de los análogos preparados.

7.2.1. Espectroscopía de infrarrojo (IR).

Con ayuda de la espectroscopia en el infrarrojo por el método ATR, fue posible determinar los grupos funcionales presentes en las moléculas. En este sentido, se observan para todos los análogos las bandas de la lactona que se encuentran cercano al rango de (1750–1735) cm^{-1} debido a la vibración del enlace C=O, y entre (1210–1163) cm^{-1} se percibe la del enlace sencillo C-O. El estiramiento del enlace N-H de la amida se nota como una banda de mediana intensidad en el rango de (3500–3180) cm^{-1} , mientras que el estiramiento del C=O de la amida se percibe como una banda intensa cercana a 1680 cm^{-1} . La señal del alqueno conjugado está cercana a los 1600 cm^{-1} . En la tabla 7 se muestra el compendio de las bandas más relevantes, considerando valores encontrados en tablas de IR.⁵⁶

Tabla 7. Bandas relevantes de IR (cm^{-1}) de los compuestos sintetizados.

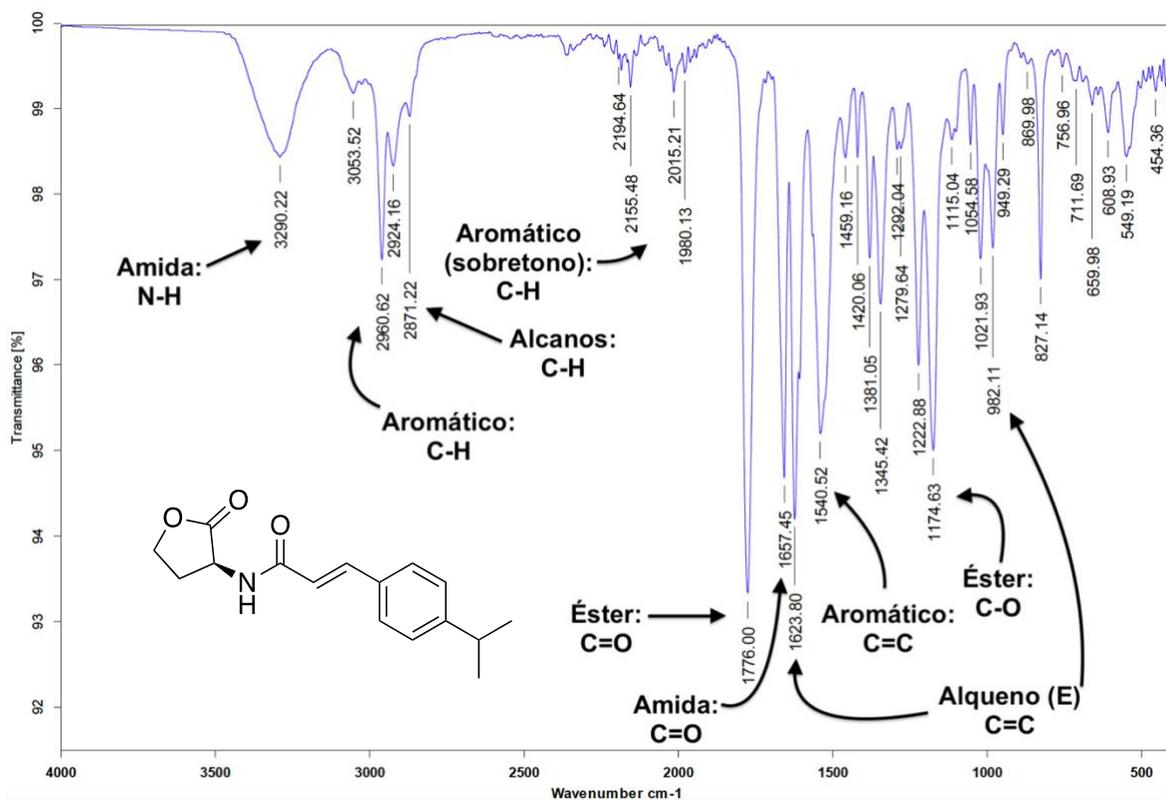
Compuesto	Frecuencia (cm^{-1})							
	Éster		Amida		Alqueno (E)	Aromático		Otros
	C=O	C-O	N-H	C=O	C=C	C-H	C=C	
38.I.a	1776	1167	3287	1654	1622, 966	3060, 3029	1546, 1493	757, 721 (monosustitución del benceno)
38.I.b	1776	1174	3290	1657	1623, 982	3053, 2960	1540, 1459	2946, 2877 (alcanos)
38.I.c	1774	1169	3293	1658	1626, 968	3070, 2918	1542	1323 (C-F)
38.I.d	1775	1177	3321	1650	1622, 969	3033	1533, 1486	2926, 2850 (C-H y C=C aromáticos)
38.I.e	1773	1170	3294	1659	1624, 979	3059, 3000	1533, 1453	1255 (Ar-O), 1170 (C-O)
38.I.f	1775	1175	3320	1655	1623, 972	3065, 2927	1580, 1542	1175 (C-F)

⁵⁶ Chemistry Libre Texts. Infrared Spectroscopy Absorption Table. https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table, (consultado 10/02/2022)

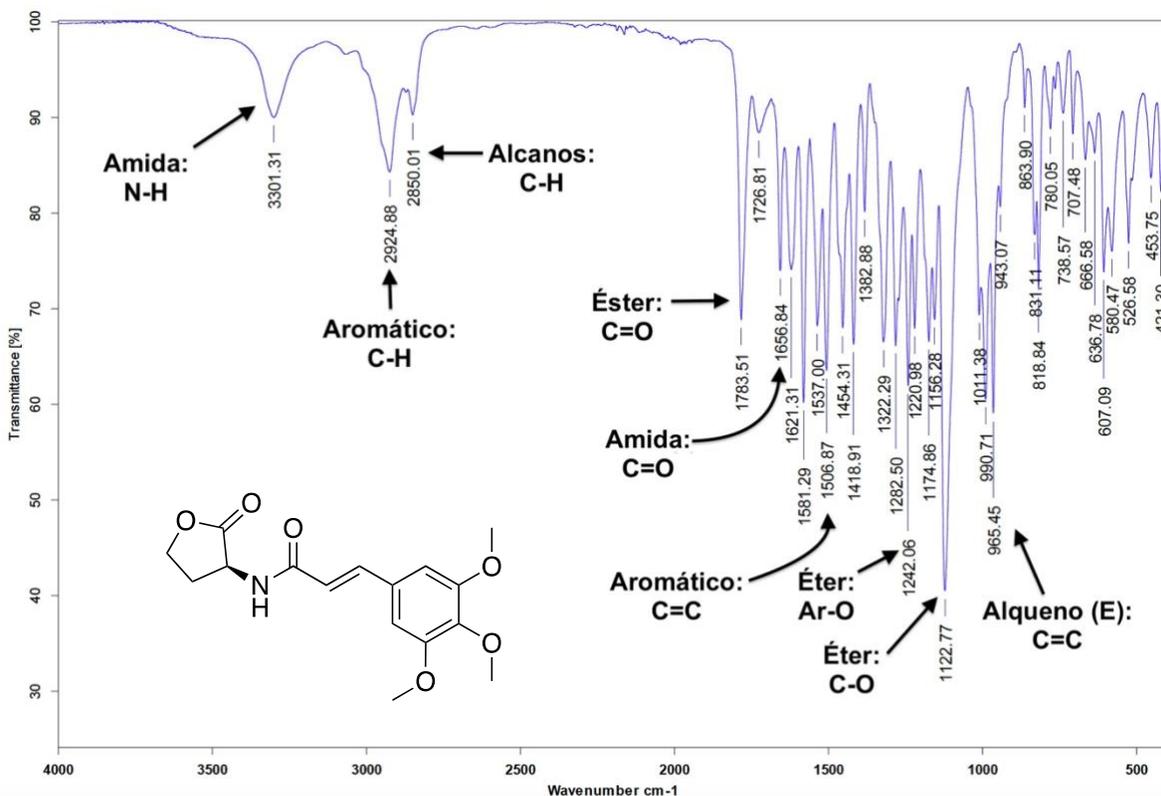
Tabla 7. Bandas relevantes de IR (cm⁻¹) de los compuestos sintetizados (Continuación).

Compuesto	Frecuencia (cm ⁻¹)							Otros
	Éster		Amida		Alqueno (E)	Aromático		
	C=O	C-O	N-H	C=O	C=C	C-H	C=C	
38.I.g	1783	1174	3301	1656	1621, 965	2924	1537, 1506	2850 (alcanos), 1242 (Ar-O); 1122 (C-O)
38.I.h	1762	1180	3280	1663	1633, 974	3108, 3069	1594, 1456	1338 (C-N Ar)
38.II.i	1771	1174	3303	1650	1612, 999	3058, 3027	1530, 1449	692 (alqueno)
38.III.j	1772	1165	3312	1659	1632, 1019	-	-	2967, 2914 (-CH ₃ , -CH ₂ -)

A manera de ejemplo, a continuación, se indican las señales más representativas de los compuestos **38.I.b** y **38.I.e**.



Espectro 1. IR del compuesto **38.I.b**.



Espectro 2. IR del compuesto **38.I.e.**

7.2.2. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas se empleó para confirmar la masa molar (MM) de los compuestos preparados gracias a la identificación del pico base de m/z característico para cada molécula a través de la técnica DART⁺, cuyo procedimiento permite determinar iones cuasimoleculares (iones moleculares cargados ya sea positiva o negativamente debido a la pérdida o ganancia de un protón) mediante la transferencia de protón al ionizar los compuestos. En el caso de la técnica de DART, estos compuestos ionizados se forman al interactuar con especies metaestables (especies vibracionalmente excitadas), lo cual genera un radical catión de la molécula que es acarreado por un gas inerte como N₂ o He. Las especies cargadas reaccionan con moléculas de agua del medio para generar agua como ión-radical que posteriormente interactuará con otra molécula de agua para así producir radical

hidroxilo e hidronio, siendo ésta última especie quien aporta el protón a la molécula M+1.⁵⁷

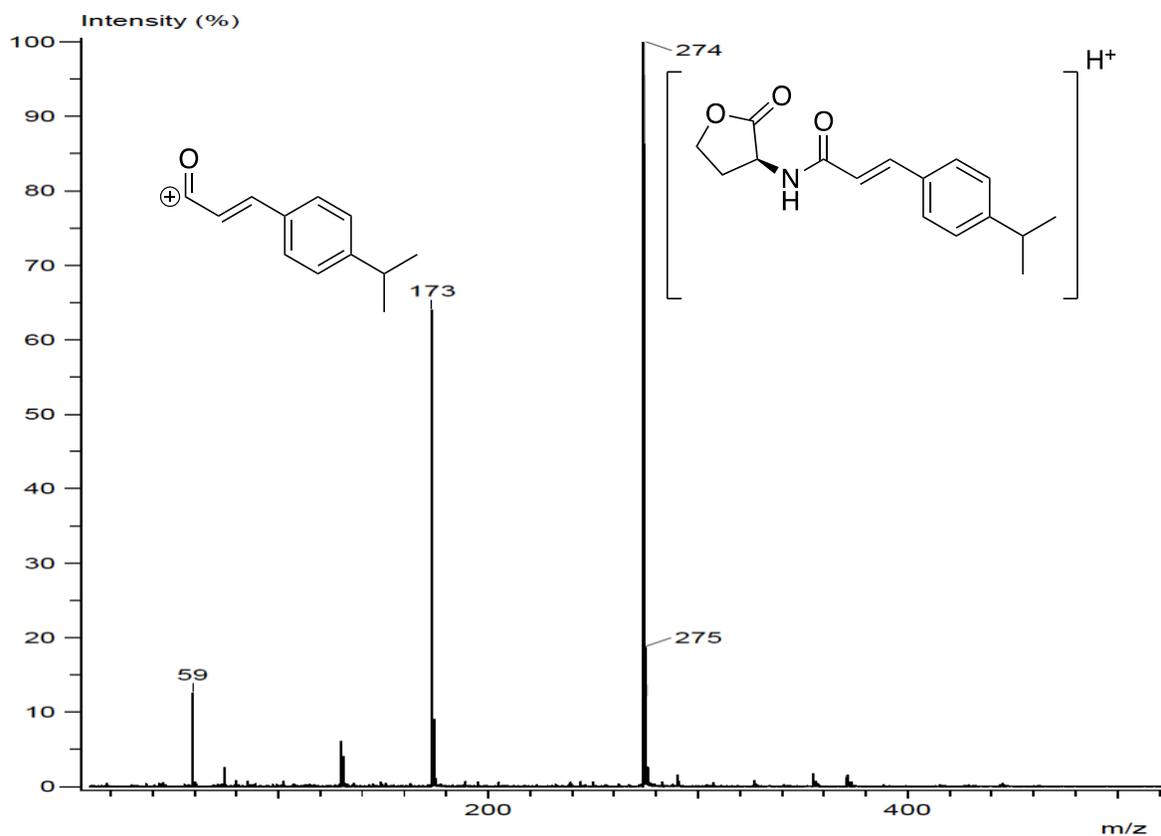
En la tabla 10 se resumen el pico base y los iones cuasimoleculares como resultado de la fragmentación de éstas.

Tabla 8. Fragmentos moleculares de los compuestos.

Compuesto	Composición elemental	MM teórica (g/mol)	lón(es) cuasimolecular(es) (m/z)	Pico base (m/z)
38.I.a	C ₁₃ H ₁₃ NO ₃	231	131	232
38.I.b	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	273	173, 59	274
38.I.c	C ₁₄ H ₁₂ F ₃ NO ₃	299	199	300
38.I.d	C ₁₉ H ₁₇ NO ₃	307	207, 308, 449	225
38.I.e	C ₁₄ H ₁₅ NO ₄	261	262	161
38.I.f	C ₁₃ H ₁₂ FNO ₃	249	149, 365	225
38.I.g	C ₁₆ H ₁₉ NO ₆	321	221, 322	306
38.I.h	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	232	59	233
38.II.i	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃	257	59, 157	258
38.III.j	C ₁₄ H ₂₁ NO ₃	251	123, 151, 196	225

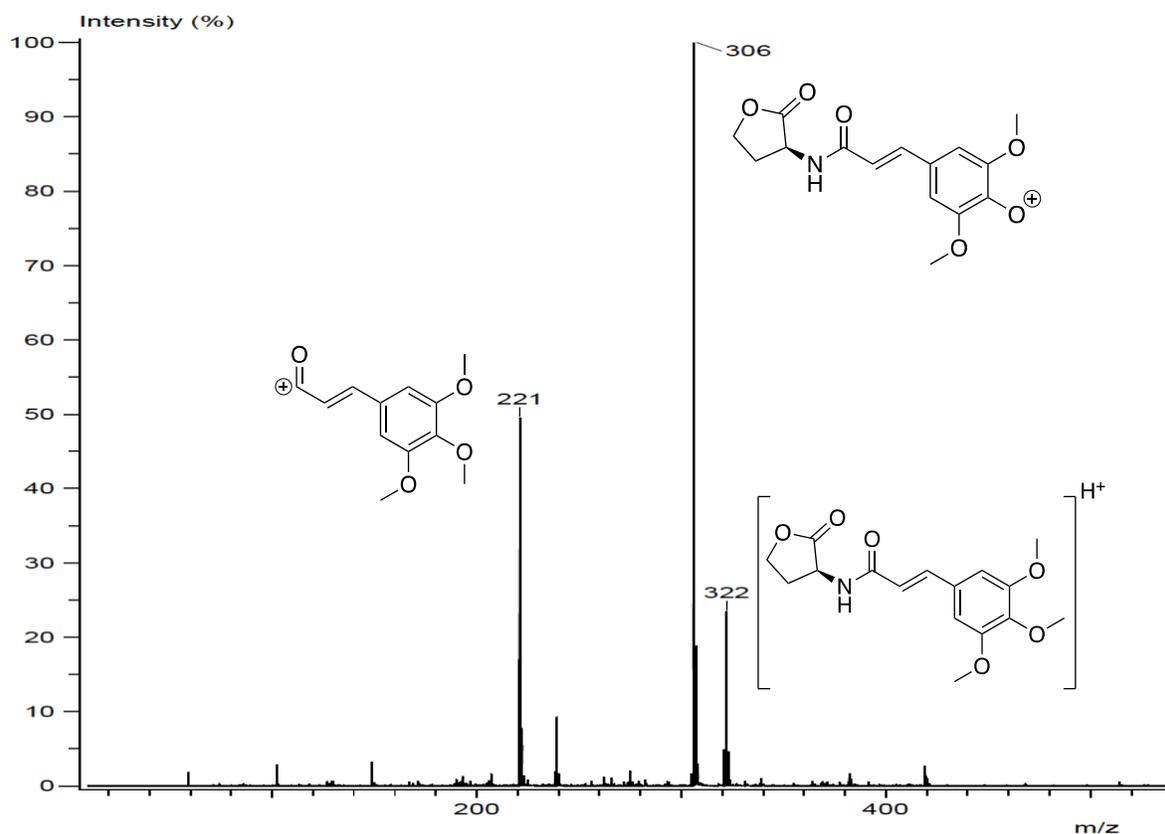
Como ejemplos particulares, se detallarán los resultados de dos compuestos. Del espectro de **38.I.b**. (Espectro 3) destacan dos señales: la más intensa que corresponde al pico base de 274 m/z y concuerda con M+1, mientras que la segunda pertenece al ion molecular de un acilcarbocatión que ocurre tras la ruptura α del enlace amida con un valor de 173 m/z.

⁵⁷ Domin, M.; Steinberg, B.; Quimby, J. Routine analysis and characterization of highly insoluble polycyclic aromatic compounds by direct analysis in real time mass spectrometry (DART). *Analyst*. **2010**, 135 (4), 700 – 704, DOI: 10.1039/b923300h



Espectro 3. Espectro de masas del compuesto **38.I.b.**

Para el compuesto **38.I.e**, se observa que $M+1$ corresponde con el ión molecular de 322 m/z y dos fragmentos más: uno de 306 m/z equivale a la pérdida de un metilo (ruptura estabilizada por la resonancia con el anillo de benceno), y el segundo de 221 m/z pertenece al acilcarbocatión derivado de la ruptura α del enlace amida.



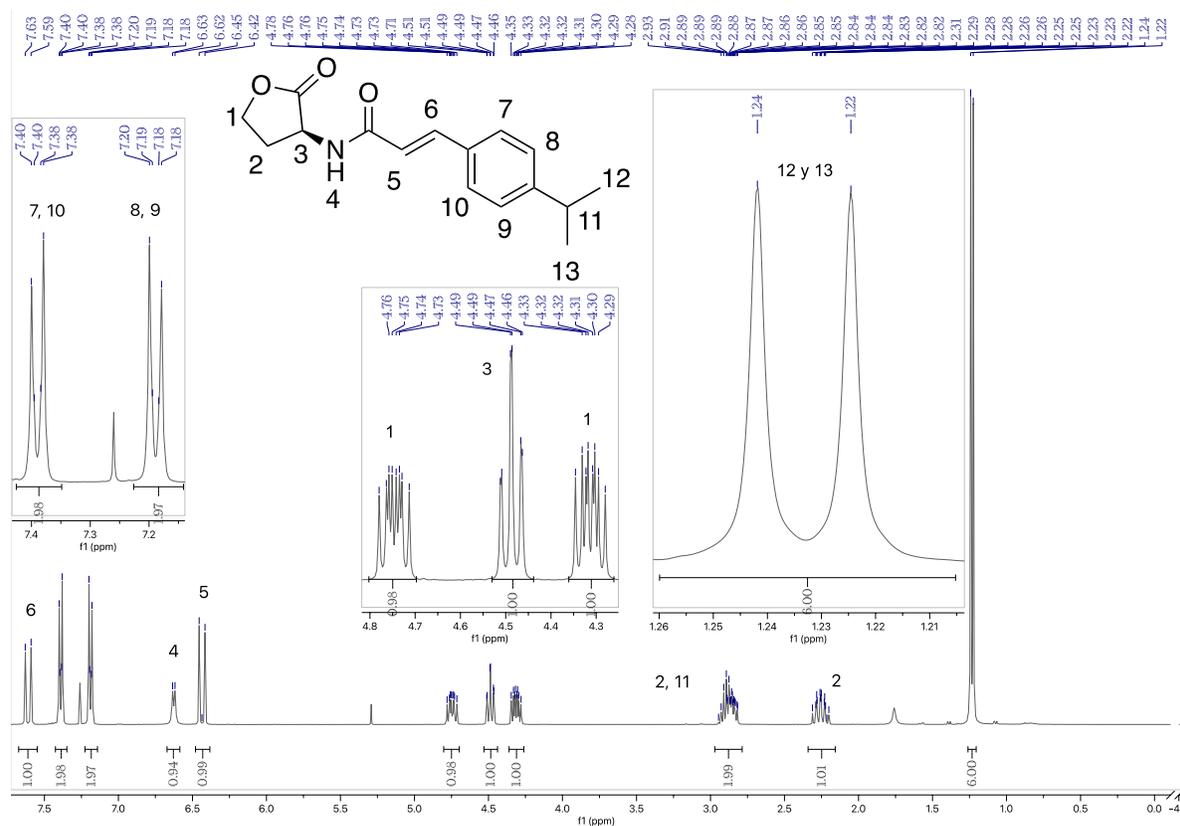
Espectro 4. Espectro de masas del compuesto **38.I.e.**

Considerando la información que se puede recabar de los espectros de masas 3 y 4, así como la reportada en el soporte, se observa que es constante un ion molecular del tipo acilcarbocación debido a la fragmentación del enlace amida.

La espectrometría de masas, específicamente la técnica de alta resolución, permite asociar la composición elemental más probable a una masa encontrada experimentalmente. A manera de ejemplo, se observa que la masa experimental (con 5 cifras significativas) concuerda con la predicha para las furanonas: 274.1409 para el compuesto **38.I.b** y de 322.12789 para el compuesto **38.I.e**. Estos valores arrojan una composición elemental en concordancia con la propuesta teóricamente. Además, el número de insaturaciones que resultaron en ambos espectros fue de 8, que corresponden a: tres del anillo de benceno, el propio de la lactona, la insaturación α,β , dos que forman el doble enlace del carbonilo de la amida y dos más del grupo carbonilo de la lactona.

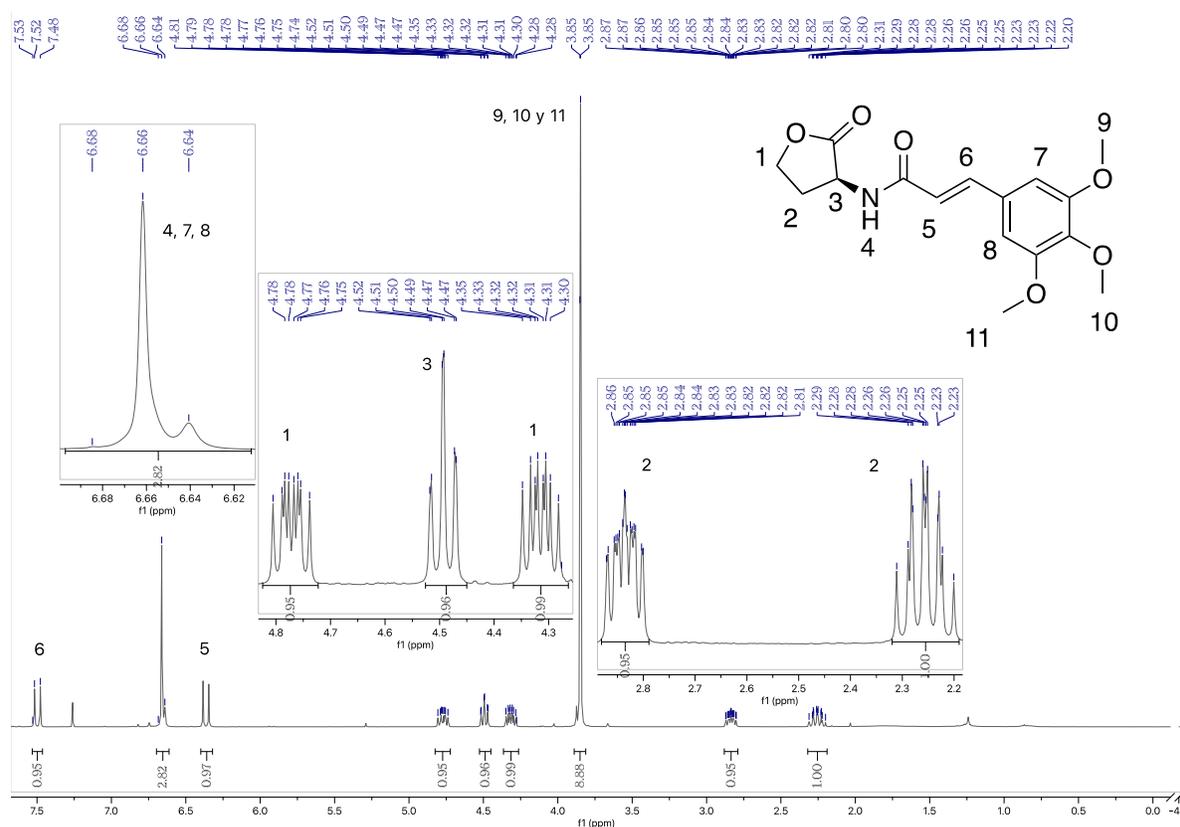
7.2.3. Espectroscopía de RMN-¹H.

Finalmente, para complementar la elucidación estructural de los compuestos se utilizó la RMN-¹H con un equipo de 400 MHz. De acuerdo con tablas de desplazamiento químico (δ) de RMN-¹H del compuesto **38.I.b** (espectro 5), se observa claramente una señal doblete (1.23) que corresponde a los hidrógenos en 12 y 13 y que se acoplan con 11. Uno de los hidrógenos de 2 aparece en 2.25 ppm, mientras que la señal del segundo aparece traslapada con la de 11 como una señal compleja de 2.80 a 2.96 ppm, a radiofrecuencias altas debido a la protección de los carbonos vecinos. Las señales de 1 y 3 aparecen entre 4 y 5 ppm debido a la electronegatividad de los átomos O y N que tienen como vecinos. Además, 7, 8, 9 y 10 concuerdan con los de un benceno *para*-sustituido, los cuales se observan en el rango de 7.2 a 7.4 ppm. H4 (6.63 ppm) de la amida está en el rango de 5.5 a 8.5 ppm y se observa como un doblete por el acoplamiento con el hidrógeno en 3. Se logran apreciar las señales de un alqueno con una $J = 15.6$ Hz, que indica la geometría *E*, por ende, se confirma la estructura del producto.



Espectro 5. Espectro de RMN-¹H del compuesto **38.I.b**.

Respecto al espectro de **38.I.e** (espectro 6), a diferencia del espectro anterior destacan las señales de los grupos metoxilo 9, 10 y 11 alrededor de 3.85 ppm debido al efecto electronegativo que ejerce el oxígeno. Con respecto a las señales del ciclo de la lactona, las señales de 1, 2 y 3 se mantienen prácticamente en el mismo desplazamiento que el espectro anterior. Las señales de H 7 y 8 del anillo arilo que son equivalentes aparecen en 6.66 ppm junto con la del hidrógeno de la amida en 6.64. De igual manera, hay señales que indican la presencia del alqueno α,β con un valor de constante de acoplamiento de 15.5 Hz que indica la geometría *E* del compuesto.

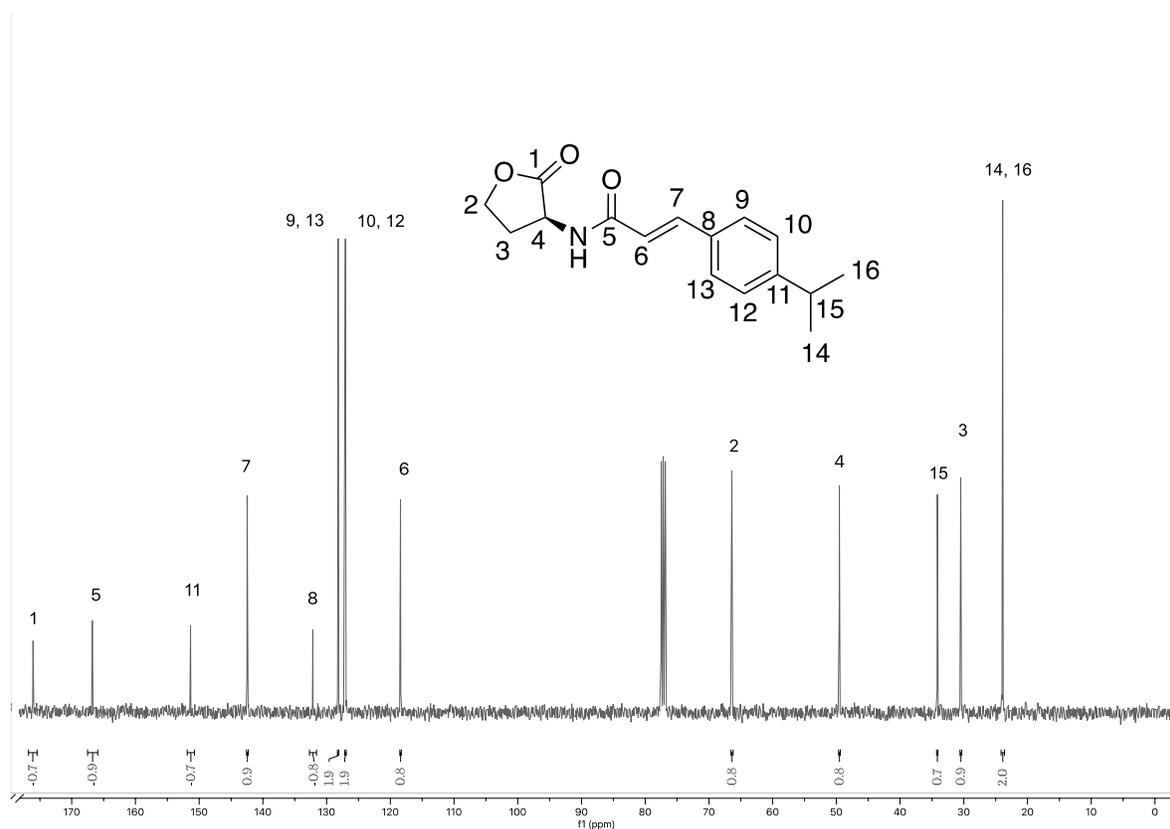


Espectro 6. Espectro de RMN-¹H del compuesto **38.I.e**.

7.2.4. Espectroscopía de RMN-¹³C.

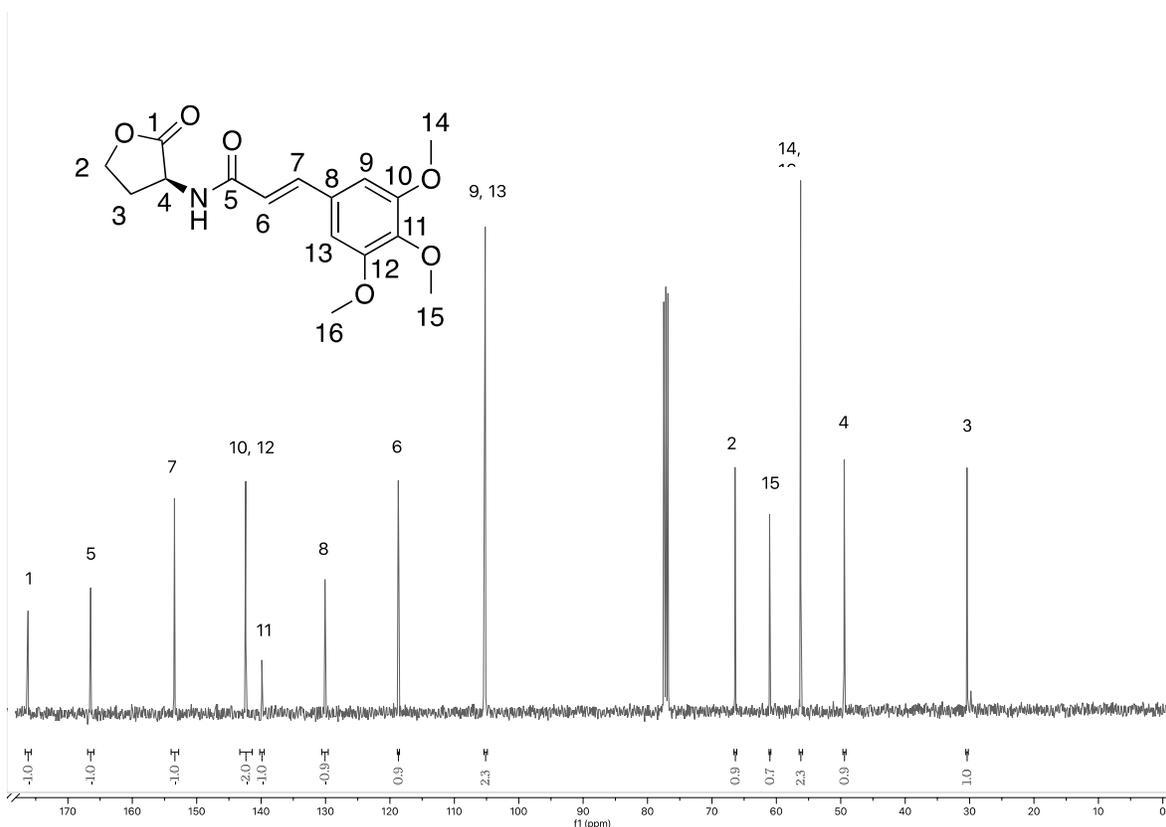
El número de carbonos se verificaron con la RMN-¹³C. Se analizarán los compuestos **38.I.b** y **e**. Para **38.I.b**, se pueden observar claramente dos carbonos de carbonilo, correspondientes al éster en 176 ppm, y el de la amida en 166 ppm; además 8 señales en la zona de carbonos *sp*² (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) que

confirman la incorporación del ácido. Finalmente, en la región de carbonos sp^3 se notan 5 señales, tres de éstas pertenecientes al núcleo de la 2-furanona y dos que corresponden al isopropilo en la posición *para* del benceno (Espectro 7).



Espectro 7. Espectro de RMN-¹³C del compuesto **38.I.b.**

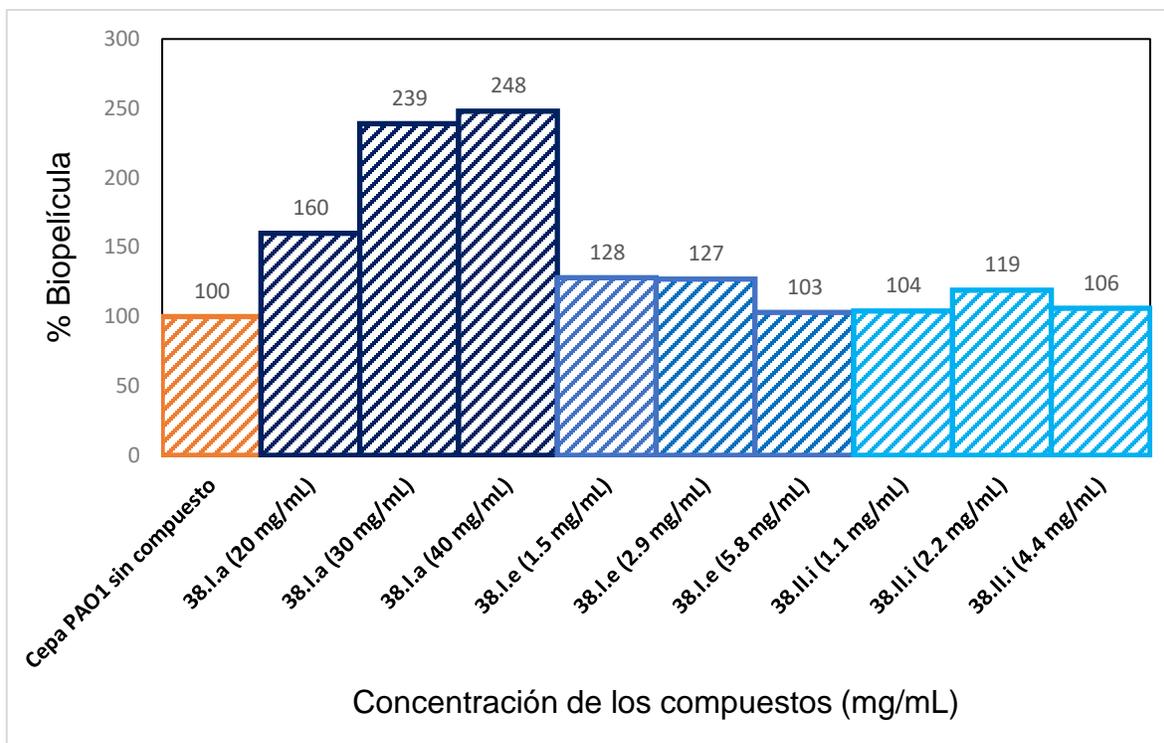
En el caso del análogo trimetoxilado **38.I.e**, se mantienen prácticamente constantes las señales de los carbonilos del éster y de la amida en 176 ppm y 166 ppm, respectivamente, así como las de los carbonos sp^3 en las posiciones 2, 3 y 4, a las que se les suman la presencia de los carbonos de metoxilo ($-OCH_3$) 15, 14 y 16, siendo la señal de 14 y 16 más intensa debido a que son carbonos equivalentes; por otra parte, en la zona de carbonos sp^2 hay 6 señales, correspondientes a las propias del anillo aromático (8,9,10 y 11) y a aquellas correspondientes al alqueno (6 y 7). Lo anterior confirma la estructura propuesta para **38.I.e**.



Espectro 8. Espectro de RMN-¹³C del compuesto **38.I.e.**

7.3. Evaluación biológica.

En esta sección se muestran los resultados de 3 compuestos a los que se les determinó su actividad anti-biopelícula mediante el método del cristal violeta. La gráfica 1 recopila los resultados del porcentaje de inhibición de biopelícula en la cepa de PAO1 a tres diferentes concentraciones para cada compuesto, comparando contra la bacteria sin la adición de algún compuesto (100 % de formación de biopelícula). Debido a lo preliminar del estudio, no se utilizó un control positivo.



Gráfica 1. Efecto de los compuestos sobre la formación de biopelícula en la cepa PAO1.

Con base en los datos obtenidos de la gráfica 1 se observa que ningún compuesto posee las cualidades de inhibir la biopelícula producida por la bacteria *P. aeruginosa* (específicamente la cepa PAO1) que se utilizó para este experimento a las concentraciones empleadas. Debido a que los resultados son mayores al 100%, y por lo tanto en general se puede afirmar que los compuestos actúan como agonistas del receptor LasR, al igual que lo haría el autoinductor del tipo *N*-3-oxo-dodecanoil homoserina (3-oxo-C12-HSL), al menos a las concentraciones que se reportan.

En particular, se aprecia que el crecimiento de la biopelícula es favorecido al incrementar la concentración del compuesto **38.I.a**, el cual corresponde al derivado de ácido cinámico. Este mismo efecto agonista fue previamente reportado por el grupo de Grant D., quienes lo identificaron (y algunos análogos) como agonistas de LasR en las cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, *P. aeruginosa* y *V. Fischeri* a concentraciones μM . Sin embargo, el efecto no es tan eficaz para interactuar con

sus respectivas proteínas TraR, LasR y LuxR y así inhibir la producción de elastasa modulada por el QS, ergo, actúan como agonistas parciales.⁵⁸

Otro grupo de investigadores reportó que al menos en la proteína homóloga RpaR la aromaticidad no es importante –al igual que la insaturación– ya que uno de sus compuestos que posee un ciclohexil directo al grupo amida en lugar del grupo arilideno resultó ser mejor antagonista.⁵¹

En cuanto al compuesto **38.I.e**, la gráfica puede indicar un efecto antagonista debido que en la concentración mayor el porcentaje de biopelícula fue menor en comparación a las otras dos concentraciones. Este análogo posee un grupo metoxi en la posición 3 del benceno. Esto concuerda con lo propuesto por el grupo de McInnis C. y Blackwell H, cuyo análogo sustituido por 4-etoxi exhibe una inhibición del 28% en la proteína RpaR de la especie *R. palustris*.⁵¹

Finalmente, con el compuesto **38.II.i** se observa un efecto agonista, por tanto, la vinilogación propuesta del alqueno que presenta dicho compuesto podría no ser favorable. No obstante, se explorarán concentraciones menores para evaluar el efecto antibiopelícula.

⁵⁸ Geske, G.; O'Neil, J.; Miller, D.; et al. Modulation of Bacterial Quorum Sensing with Synthetic Ligands: Systematic Evaluation of N-Acylated Homoserine Lactones in Multiple Species and New Insights into Their Mechanism of Action. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (44), 13613 – 13625, DOI: 10.1021/ja074135h

8. CONCLUSIONES.

Se logró establecer una ruta de síntesis con la cual se prepararon 10 furanonas del tipo L-N-acil homoserinas (AHL's) a partir de materias primas accesibles que son análogas a las moléculas autoinductoras del sistema *las* de percepción de cuórum en *P. aeruginosa* con rendimientos moderados.

La estructura de los compuestos se confirmó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, demostrándose la pureza aceptable de los compuestos.

Desafortunadamente, ninguno de los tres compuestos sintetizados que se evaluaron mostraron tener la actividad anti-biopelícula deseada sobre la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, a las concentraciones evaluadas. En contraste, los compuestos actuaron como agonistas para la formación de biopelículas.

9. PERSPECTIVAS.

Debido a la carente actividad antibiopelícula de los compuestos, se planea explorar la actividad antibiopelícula de los compuestos a dosis menores. Así mismo, se propone modificar la ruta de síntesis de tal manera que se puedan obtener mejores rendimientos de las L-N-acil homoserinas (AHL's) y obtener una nueva serie de lactonas.

Con ayuda de un estudio de acoplamiento molecular, se pueden buscar los grupos funcionales que pueden tener mayor interacción con la proteína LasR, o bien en proteínas homólogas. Una vez obtenidos los productos del tipo L-N-acil homoserinas puros realizar pruebas en cepas *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), o bien si es posible en cepas obtenidas a partir de muestras clínicas.

Finalmente, se considera la incorporación de heterociclos como triazol 1,5-disustituidos, ya que de acuerdo a la bibliografía consultada, son potencialmente efectivos como antagonistas contra el receptor LasR.

10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

10.1. Reactivos y equipo.

Las materias primas se obtuvieron comercialmente de Aldrich y se emplearon sin previa purificación.

Los espectros de IR se obtuvieron con ayuda del espectrómetro FT-IR Brucker Tensor 27 reportando las unidades en cm^{-1} . Los espectros de masas se realizaron con la técnica DART⁺ en un espectrómetro AccuTOF JMS-T100LC; el ion cuasimolecular se expresa como $[M+1]^+$, la nomenclatura m/z expresa la relación masa/carga.

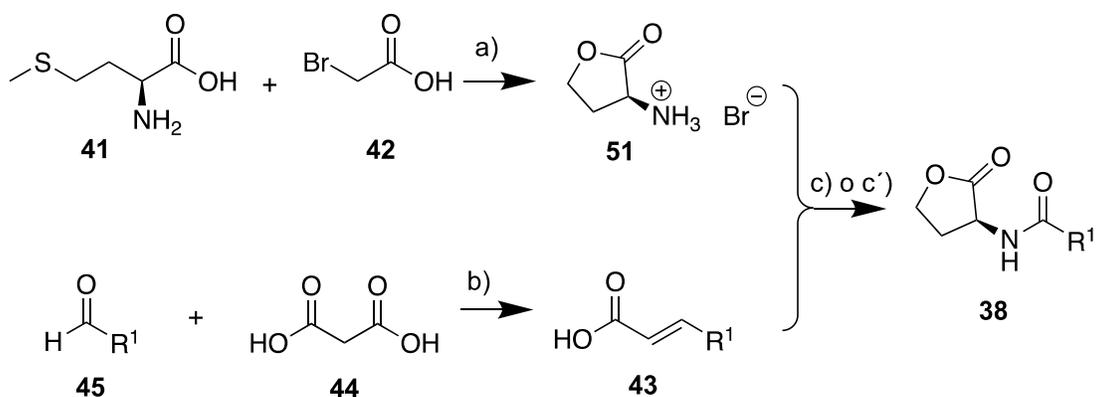
Los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se realizaron con un aparato Bruker Avance III de 400 MHz usando como referencia tetrametilsilano, y CDCl_3 como disolvente; los espectros muestran los desplazamientos químicos en ppm y las constantes de acoplamiento en Hz. La multiplicidad de las señales se reporta como s= singulete, d= doblete, t= triplete, dd= doble de doble y m=multiplete.

10.2. Cromatografía

Esta técnica se realizó utilizando placas recubiertas de gel sílice y su visualización en una lámpara de luz UV (longitudes de onda 254 y 365 nm). Los sistemas de elución se muestran en la tabla 9.

10.3. Síntesis.

La obtención de los compuestos se resume en la siguiente ruta sintética:



- a) AcOH, H₂O/*i*PrOH, reflujo 2.5 h
 b) Piridina, piperidina, reflujo 6 h
 c) 1. SOCl₂, DMF/ CHCl₃, ta, 3 h; 2. NaHCO₃ / CH₂Cl₂ : H₂O, t.a., 24 h
 c') DIPEA, DMAP, DCC, CHCl₃ : DMF, 0°, 12 h

Esquema 10. Ruta sintética de las furanonas.

10.3.1. Método general para la obtención de la furanona 51.

En un matraz bola de 10 mL se agregaron 6.57 mmol de *L*-metionina, 28 mmol de ácido acético, 7.88 mmol de ácido bromo acético y una mezcla de H₂O (1 mL) e *i*PrOH (1 mL). Se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos hasta disolución; posteriormente, la reacción se dejó en reflujo durante 2.5 horas. Una vez enfriada la mezcla a temperatura ambiente se removió el agua usando un rota vapor. El aceite formado se disolvió en 1 mL de dioxano y se dejó enfriando una noche en el congelador, la pasta formada color café crema-rosada viscosa se agitó por una hora a temperatura ambiente, se precipitó con isopropanol en frío y se filtró el sólido rosa palido al vacío.

10.3.2. Método general para la obtención de los derivados ácidos 38.I.

Tomando como ejemplo el compuesto **43.b**, en un matraz bola de 5 mL, se mezclaron 34.8 mmol del aldehído correspondiente, 41.7 mmol de ácido malónico 52.2 mmol de piridina y 4.17 mmol de piperidina. La reacción se dejó a temperatura de reflujo por 6 horas. Al pasar el tiempo de reacción, la solución se trasvasó a un vaso de precipitados donde se adicionó HCl 1 M hasta llegar a pH ácido y formarse

un precipitado. La mezcla se agitó por 30 minutos y dejó en el refrigerador por una noche. Se filtró al vacío para obtener un sólido blanco cristalino.

10.3.3. Obtención del compuesto (*E*)-3,7-dimetilocta-2,6-dienoico 38.III.

Se agregó en un matraz bola 1.97 mmol de 3,7-dimetil-octa-2,6-dienal, 7.88 mmol de NaOH, 25 mL de agua en un baño de hielo por 15 min. Pasado el tiempo, se adicionó 3.94 mmol de AgNO₃ por goteo, se mantuvo agitando por 15 min y después se dejó a temperatura ambiente por 24 h. La mezcla heterogénea se filtró y se lavó con agua fría. La solución se acidificó con una solución de HCl diluida, se extrajo con CHCl₃ (3x10 mL), la fase orgánica se lavó con salmuera y secó con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró la solución y se evaporó el disolvente, el producto se purificó por columna flash (Hex:AcOEt, 90:10) obteniendo un aceite color amarillo en un rendimiento de 20%.

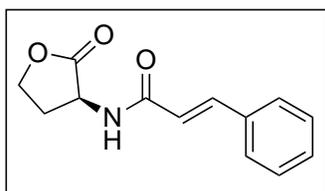
10.3.4. Método general 1 para la obtención de las amidas (38.I.a, b, c, e, g, y 38.II.i).

En un matraz bola se disolvieron 333 μmol del ácido **43.a** en 2 mL de CHCl₃ y una gota de DMF. Posteriormente, se agregó 500 μmol de SOCl₂ y se agitó a temperatura ambiente por 3 horas; la formación del cloruro de ácido correspondiente se verificó mediante la formación del éster metílico usando CCF. Una vez formado el cloruro de ácido, se evaporó el disolvente y se goteó a una mezcla (previamente enfriada a 0°C por 30 min) de 333 μmol del bromohidrato de lactona **51** y 999 μmol de NaOH en 200 μL de una mezcla CH₂Cl₂:H₂O de proporción 1:1, la reacción se dejó 24 h a temperatura ambiente. Consumida la materia prima, se extrajo con DCM y purificó por columna flash, obteniéndose un sólido blanco con rendimiento del 65%.

10.3.5. Método general 2 para la obtención de las amidas (38.I.d, f, h y 38.III.i)

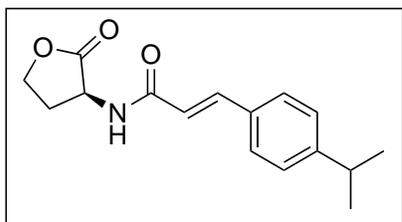
Se agregó a un matraz bola de 5 mL, 333 μmol del bromohidrato de lactona **51**, 549 μmol de *N,N*-diisopropiletilamina, 138 μmol de 4-dimetilaminopiridina en una mezcla de disolventes CHCl_3 (3 mL) y DMF (200 μL), se agitó a 0 $^\circ\text{C}$ en baño de hielo por 15 minutos. Posteriormente, se agregó 275 μmol del ácido **43.f**, y 30 min después se agregó 357 μmol de DCC, la mezcla se dejó reaccionar por un día y se monitoreó por CCF. Se filtró al vacío y al filtrado se le evaporó el disolvente en el rotavapor. Se le adicionó 1 mL de MeCN y después se enfrió en el congelador 30 minutos, se filtró nuevamente y se purificó por columna flash usando la mezcla de disolventes correspondiente.

10.3.5.1. (*S*)-*N*-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)cinamamida (38.I.a).



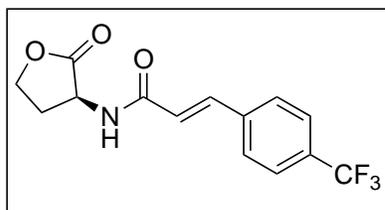
Obtenido con el método general 1. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema Hex-AcOEt 45:55. Sólido blanco en un rendimiento de (65%). **RMN- ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.63 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.46 (dd, $J = 6.7, 2.9$ Hz, 2H), 7.37 – 7.30 (m, 3H), 6.71 (s, 1H), 6.48 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.49 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.32 (td, $J = 10.0, 5.4$ Hz, 1H), 2.85 (dt, $J = 12.1, 7.0$ Hz, 1H), 2.27 (p, $J = 11.2$ Hz, 1H); **RMN- ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ : 176.06, 166.60, 142.51, 134.54, 130.12, 128.95, 128.10, 119.45, 66.44, 49.57, 30.43; **MS (DART+)** m/z : $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_1\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS m/z calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_1\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 232.09737; experimental: 232.09720. **IR (ATR, cm^{-1})**: 3287, 3060, 3029, 1776, 1654, 1622, 1546, 1493, 1167, 966, 757, 721

**10.3.5.2. (S)-3-(4-isopropilfenil)-N-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)cinamamida
(38.I.b).**



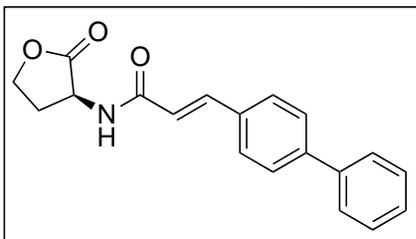
Obtenido con el método general 1. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema Hex-AcOEt 1:1 . Sólido blanco en un rendimiento de (53%). **RMN-¹H** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.61 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.42 – 7.36 (m, 2H), 7.21 – 7.16 (m, 2H), 6.63 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 4.75 (ddd, *J* = 11.5, 8.7, 6.4 Hz, 1H), 4.49 (td, *J* = 9.0, 1.3 Hz, 1H), 4.31 (ddd, *J* = 11.1, 9.2, 5.9 Hz, 1H), 2.96 – 2.80 (m, 2H), 2.26 (dtd, *J* = 12.6, 11.3, 8.8 Hz, 1H), 1.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H). **RMN-¹³C** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 176.08, 166.78, 151.36, 142.47, 132.17, 128.19, 127.06, 118.41, 66.40, 49.53, 34.15, 30.48, 23.89. **MS (DART+)** *m/z*: C₁₆H₂₀N₁O₃ [M+H]⁺; HRMS *m/z* calculada para C₁₆H₂₀N₁O₃ [M+H]⁺: 274.14432; experimental: 274.14409. **IR (ATR, cm⁻¹)**: 3290, 3053, 2960, 2946, 2877, 1776, 1657, 1623, 1540, 1459, 1174, 982

**10.3.5.3. (S)-N-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)-3-(4-trifluorometil)fenil)cinamamida
(38.I.c).**



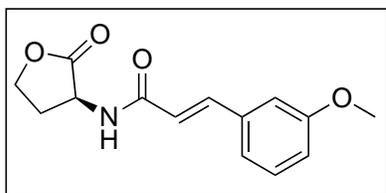
Obtenido con el método general 1. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema Hex-AcOEt 1:1. Sólido blanco en un rendimiento de (28%). **RMN-¹H** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.57 (d, *J* = 11.4 Hz, 6H), 6.60 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 4.73 (q, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.35 – 4.23 (m, 1H), 2.83 – 2.67 (m, 1H), 2.27 (dd, *J* = 21.8, 11.2 Hz, 1H). **RMN-¹³C** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 175.68, 165.97, 140.03, 138.18, 128.07, 125.80 (d, *J* = 3.4 Hz), 122.46, 66.17, 49.22, 29.98. **MS (DART+)** *m/z*: C₁₄H₁₃F₃N₁O₃ [M+H]⁺; HRMS *m/z* calculada para C₁₄H₁₃F₃N₁O₃ [M+H]⁺: 300.08475; experimental: 300.08365. **IR (ATR, cm⁻¹)**: 3293, 3070, 2918, 1774, 1658, 1626, 1542, 1323, 968.

**10.3.5.4. (S)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-N-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)cinamamida
(38.I.d).**



Obtenido con el método general 2. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema Hex-AcOEt 4:6. Sólido blanco en un rendimiento de (18%). **RMN-¹H** (301 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.98 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 15.8$ Hz, 2H), 7.41 (q, $J = 3.3, 2.8$ Hz, 6H), 7.29 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.27 – 7.23 (m, 1H), 6.46 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 4.58 (ddd, $J = 11.1, 8.9, 7.4$ Hz, 1H), 4.30 (td, $J = 9.0, 1.8$ Hz, 1H), 4.12 (ddd, $J = 10.7, 9.1, 6.3$ Hz, 1H), 2.50 (td, $J = 6.3, 3.0$ Hz, 1H), 2.13 (dtd, $J = 12.6, 10.9, 8.8$ Hz, 1H). **RMN-¹³C** (76 MHz, Chloroform-*d*) δ 175.23, 166.17, 142.02, 140.39, 139.84, 133.59, 128.61, 128.06, 127.46, 127.12, 126.63, 120.06, 65.60, 48.53, 29.36. **MS (DART+)** m/z : C₁₉H₁₈N₁O₃ [M+H]⁺; HRMS m/z calculada para C₁₉H₁₈N₁O₃ [M+H]⁺: 308.12867; experimental: 308.12853. **IR (ATR, cm⁻¹)**: 3321, 3033, 2926, 2850, 1775, 1650, 1622, 1533, 1486, 1177, 969

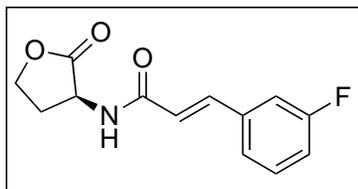
**10.3.5.5. (S)-3-(3-metoxifenil)-N-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)cinamamida
(38.I.e).**



Obtenido con el método general 1. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema Hex-AcOEt 45:55. Sólido blanco en un rendimiento de (63%). **RMN-¹H** (301 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.59 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.30 – 7.22 (m, 1H), 7.09 – 7.03 (m, 1H), 6.98 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.90 (dd, $J = 8.2, 2.6$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 4.75 (ddd, $J = 11.5, 8.7, 6.4$ Hz, 1H), 4.56 – 4.44 (m, 1H), 4.32 (ddd, $J = 11.2, 9.2, 5.9$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.94 – 2.78 (m, 1H), 2.26 (qd, $J = 11.6, 8.8$ Hz, 1H). **RMN-¹³C** (76 MHz, Chloroform-*d*) δ 176.02, 166.50, 159.98, 142.41, 135.95, 129.96, 120.69, 119.76, 115.94, 113.14, 66.40, 55.39, 49.55, 30.45. **MS (DART+)** m/z : C₁₄H₁₆N₁O₄ [M+H]⁺; HRMS m/z calculada para C₁₄H₁₆N₁O₄ [M+H]⁺: 262.10793; experimental:

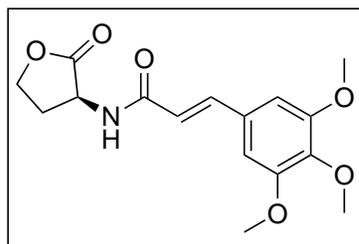
262.10764. **IR (ATR, cm⁻¹):** 3294, 3059, 3000, 1773, 1659, 1624, 1533, 1453, 1255, 1170, 979

10.3.5.6. (S)-3-(3-fluorofenil)-N-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)cinamamida (38.I.f).



Obtenido con el método general 2. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema Hex-AcOEt 1:1. Sólido blanco en un rendimiento de (51%). **RMN-¹H** (301 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.81 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.49 – 7.34 (m, 3H), 7.15 (ddt, *J* = 11.6, 6.0, 2.6 Hz, 1H), 6.85 – 6.71 (m, 1H), 4.87 – 4.71 (m, 1H), 4.45 (td, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 1H), 4.34 (ddd, *J* = 10.6, 8.9, 6.3 Hz, 1H), 2.66 (dddd, *J* = 12.3, 8.5, 5.2, 1.9 Hz, 1H), 2.36 (dtd, *J* = 12.2, 10.8, 8.9 Hz, 1H). **RMN-¹³C** (76 MHz, Acetone-*d*₆) δ 175.59, 165.84, 162.34, 139.97, 139.94, 131.64 (d, *J* = 8.6 Hz), 124.87 (d, *J* = 2.8 Hz), 123.44, 117.07 (d, *J* = 21.5 Hz), 114.70 (d, *J* = 22.1 Hz), 66.21, 49.53, 29.94. **MS (DART+)** *m/z*: C₁₄H₁₆N₁O₄ [M+H]⁺; HRMS *m/z* calculada para C₁₄H₁₆N₁O₄ [M+H]⁺: 250.12902; experimental: 250.12788 no esta en el drive. **IR (ATR, cm⁻¹):** 3320, 3065, 2927, 1775, 1655, 1623, 1580, 1542, 1175, 972

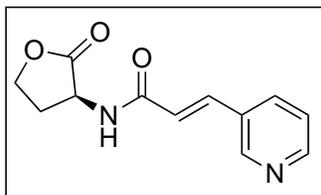
10.3.5.7. (S)-N-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)cinamamida (38.I.g).



Obtenido con el método general 1. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema Hex-AcOEt 3:7. Sólido blanco en un rendimiento de (53%). **RMN-¹H** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.50 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.66 (s, 3H), 6.36 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 4.77 (ddd, *J* = 11.6, 8.7, 6.6 Hz, 1H), 4.49 (td, *J* = 9.0, 1.3 Hz, 1H), 4.32 (ddd, *J* = 11.2, 9.3, 5.9 Hz, 1H), 3.85 (d, *J* = 1.6 Hz, 9H), 2.84 (dddd, *J* = 12.5, 8.7, 5.9, 1.3 Hz, 1H), 2.26 (dtd, *J* = 12.5, 11.3, 8.8 Hz, 1H). **RMN-¹³C** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 176.19, 166.48, 153.45, 142.39, 139.89, 130.09, 118.71, 105.20, 66.41, 61.05, 56.23, 49.47, 30.40. **MS (DART+)** *m/z*: C₁₆H₂₀N₁O₆ [M+H]⁺; HRMS *m/z* calculada para C₁₆H₂₀N₁O₆

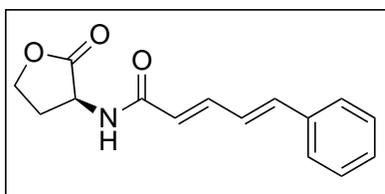
[M+H]⁺: 322.12906; experimental: 322.12789. **IR (ATR, cm⁻¹):** 3301, 2924, 2850, 1783, 1656, 1621, 1537, 1506, 1242, 1174, 1122, 965

10.3.5.8. (S)-N-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)cinamamida (38.I.h).



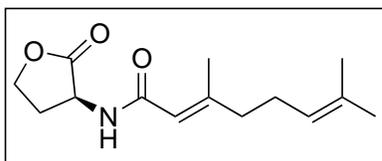
Obtenido con el método general 2. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema AcOEt-MeOH-NH₄OH 95 : 5 : 0.5. Cristales blancos en un rendimiento de (60%). **RMN-¹H** (301 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.78 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.55 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 7.99 (dddd, *J* = 7.9, 2.2, 1.6, 0.5 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.40 (ddd, *J* = 7.9, 4.6, 0.9 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 4.80 (dd, *J* = 11.1, 9.0 Hz, 1H), 4.45 (td, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 1H), 4.34 (ddd, *J* = 10.6, 8.9, 6.3 Hz, 1H), 2.66 (dddd, *J* = 12.3, 9.0, 6.3, 1.9 Hz, 1H), 2.45 – 2.29 (m, 1H). **RMN-¹³C** (76 MHz, Acetone-*d*₆) δ 151.27, 150.27, 137.94, 134.83, 124.63, 123.77, 66.21, 49.42. **MS (DART⁺)** m/z: C₁₂H₁₃N₂O₃ [M+H]⁺; HRMS m/z calculada para C₁₂H₁₃N₂O₃ [M+H]⁺: 233.09262; experimental: 233.09275. **IR (ATR, cm⁻¹):** 3280, 3108, 3069, 1762, 1663, 1633, 1594, 1456, 1338, 1180, 974

10.3.5.9. (S)-(M)-2-oxotetrahidrofuran-3-il)-5-fenilpenta-2,4-dienamida (38.II.i).



Obtenido con el método general 1. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema Hex-AcOEt 45:55. Sólido blanco en un rendimiento de (61%). **RMN-¹H** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.45 – 7.37 (m, 3H), 7.34 – 7.25 (m, 3H), 6.84 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 6.58 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 6.04 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 4.73 (ddd, *J* = 11.6, 8.7, 6.5 Hz, 1H), 4.49 (td, *J* = 9.0, 1.3 Hz, 1H), 4.32 (ddd, *J* = 11.2, 9.2, 5.9 Hz, 1H), 2.84 (dddd, *J* = 12.5, 8.8, 5.9, 1.3 Hz, 1H), 2.31 – 2.18 (m, 1H). **RMN-¹³C** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 176.12, 166.71, 142.46, 140.28, 136.19, 129.01, 128.87, 127.25, 126.19, 122.55, 66.40, 49.45, 30.40. **MS (DART⁺)** m/z: C₁₅H₁₆N₁O₃ [M+H]⁺; HRMS m/z calculada para C₁₅H₁₆N₁O₃ [M+H]⁺: 258.11302; experimental: 258.11290. **IR (ATR, cm⁻¹):** 3303, 3058, 3027, 1771, 1650, 1612, 1530, 1449, 1174, 999, 692

**10.3.5.10.(S)-3,7-dimetil-N-(2-oxotetrahidrofuran-3-il)octa-2,6-dienamida
(38.III.j).**



Obtenido con el método general 2. Purificado por cromatografía en columna flash, sistema Hex-AcOEt 7:3. Aceite amarillo en un rendimiento de (53%).

RMN-¹H (301 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.32 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.60 (dt, $J = 2.7, 1.3$ Hz, 1H), 5.16 – 5.01 (m, 1H), 4.61 (ddt, $J = 11.6, 8.7, 6.1$ Hz, 1H), 4.43 (tdd, $J = 9.0, 3.8, 1.4$ Hz, 1H), 4.32 – 4.20 (m, 1H), 2.82 – 2.70 (m, 1H), 2.62 (td, $J = 7.6, 4.7$ Hz, 1H), 2.13 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.82 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 1.65 (dd, $J = 3.1, 1.5$ Hz, 3H), 1.58 (d, $J = 1.5$ Hz, 3H). **RMN-¹³C** (76 MHz, Chloroform-*d*) δ 176.14, 167.35, 156.84, 132.50, 123.14, 116.83, 66.22, 49.02, 40.97, 30.41, 26.15, 25.73, 18.58, 17.74 (d, $J = 2.2$ Hz). **MS (DART+)** m/z : C₁₄H₂₂N₁O₃ [M+H]⁺; HRMS m/z calculada para C₁₄H₂₂N₁O₃ [M+H]⁺: 252.15997; experimental: 252.15883. **IR (ATR, cm⁻¹):** 3312, 2967, 2914, 1772, 1659, 1632, 1165, 1019

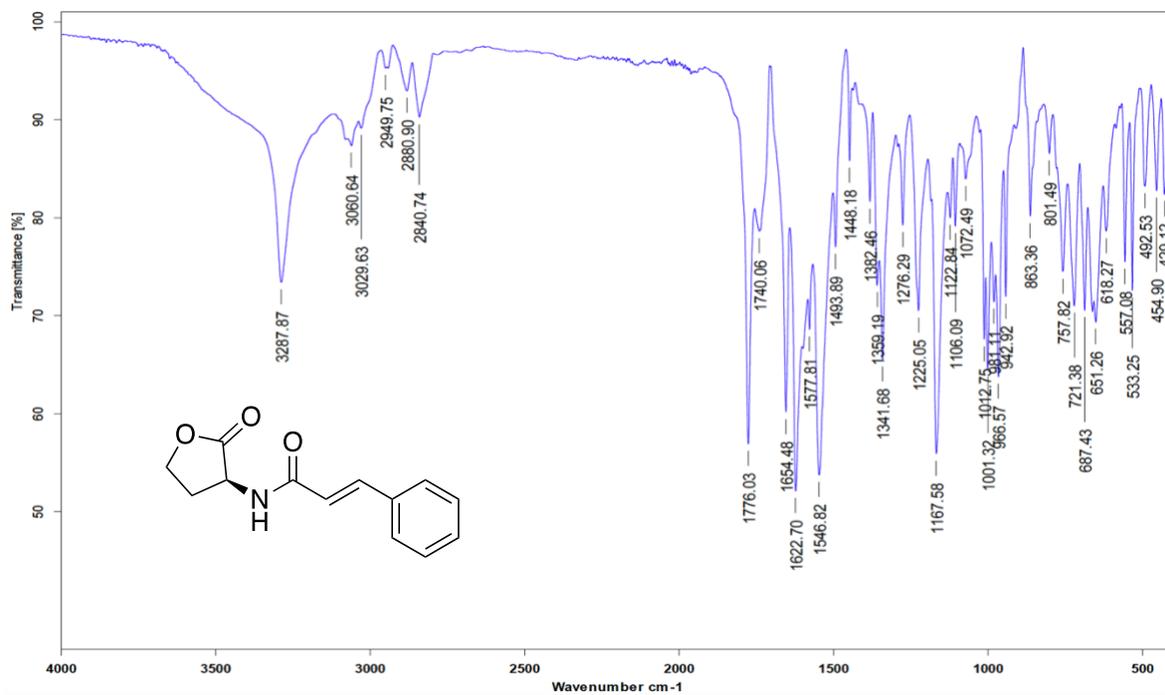
11.4.1. Ensayo biológico para determinar la inhibición de biopelícula.

Se distribuyeron los pozos de 4x6 de las microplacas de tal manera que cada uno tuviera tres concentraciones diferentes. Una vez que se tienen las concentraciones del compuesto a probar, y la cepa PAO1 (obtenida del laboratorio de investigación clínica y ambiental de la escuela nacional de ciencias biológicas del IPN) desarrollada en un tubo con caldo TSA, previamente inoculada con una colonia, se procedió a llenar los pozos con 2 mL de caldo TSA. Se agregaron 20 μ L del compuesto y se inocularon con otros 20 μ L de la cepa. Se llevó a incubar a 37°C por 24. La solución se inactivó con cloro al 1 %. Se procedió a realizar un lavado con agua destilada, se desechó y se fijó con metanol absoluto por 15 minutos. Posteriormente se desechó, se dejó secar y se realizó una tinción con cristal violeta al 0.4 % por 15 min, se desechó, se dejó secar y se resuspendió con ácido acético al 33 %, finalmente se leyó la absorbancia a 570nm lo que permitió comparar los resultados con la cepa que no contenía ningún compuesto.

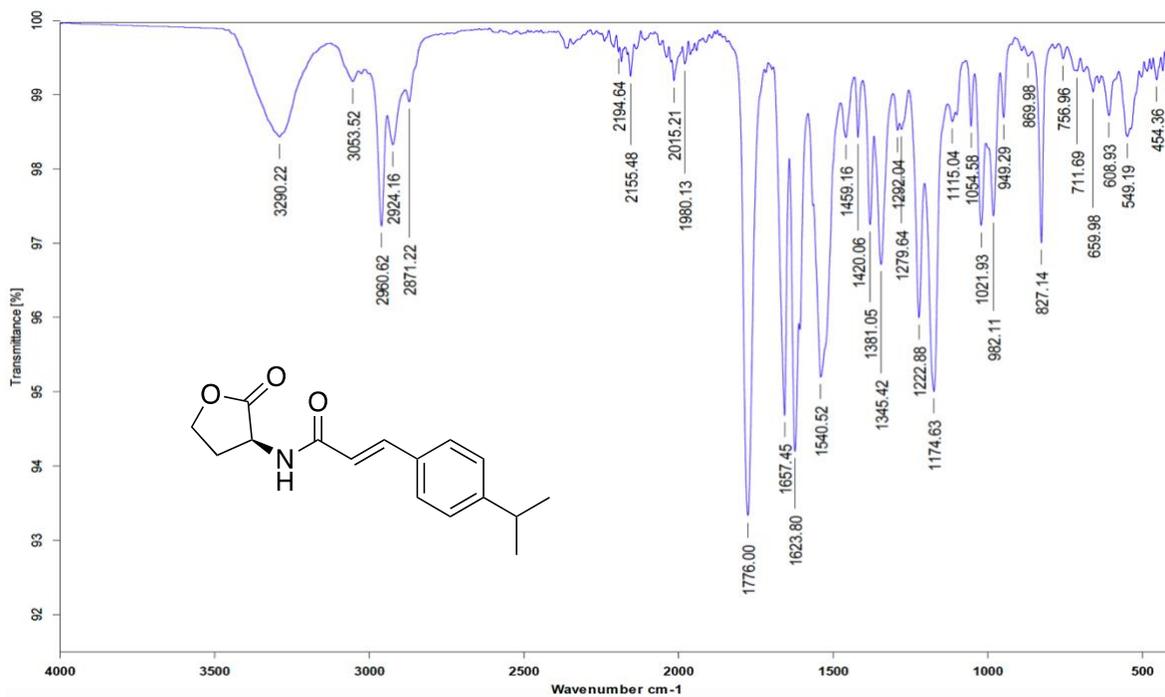
11. ANEXOS.

11.1. Espectroscopía y espectrometría.

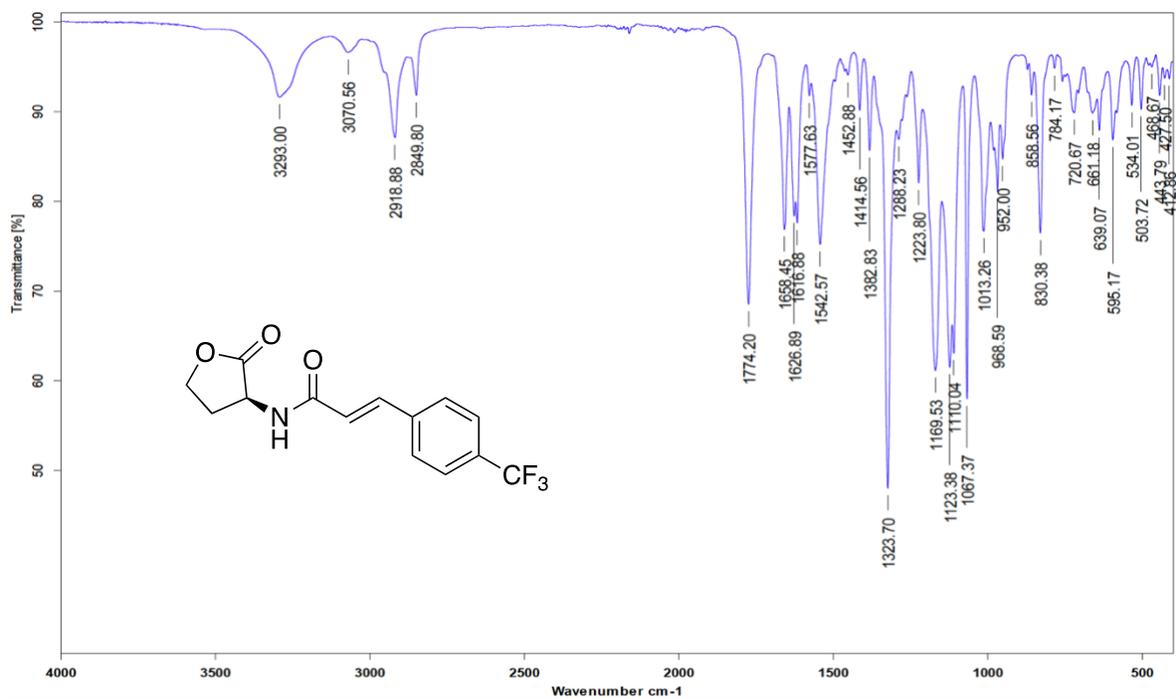
11.1.1. Espectroscopia de infrarrojo.



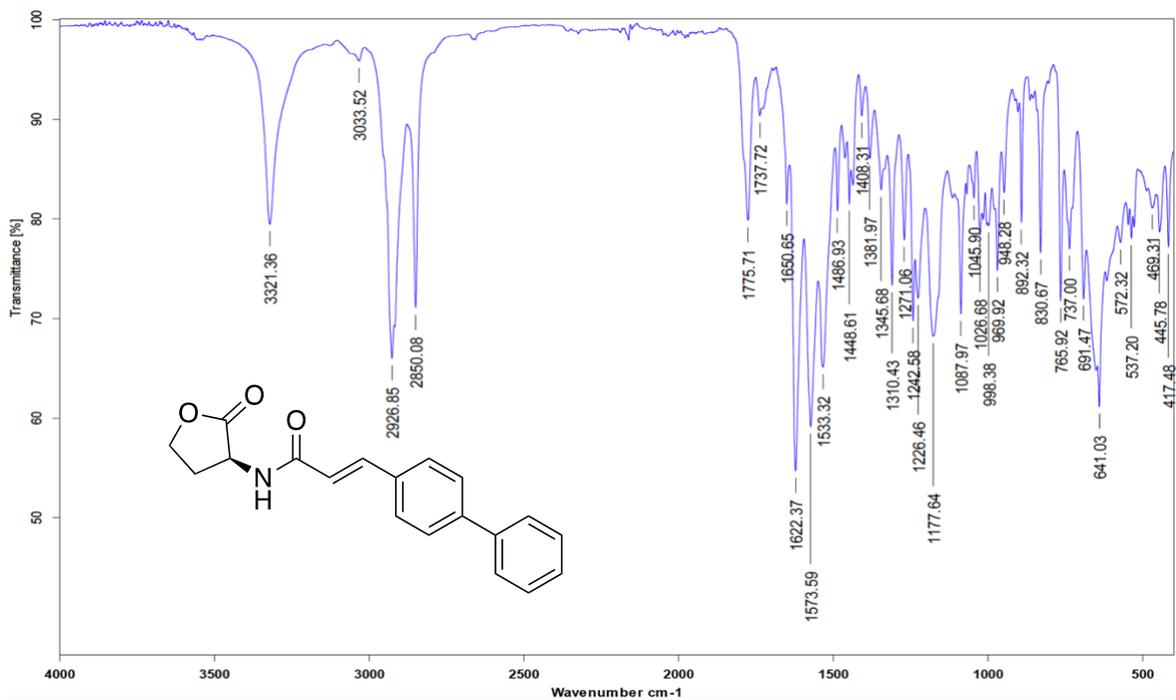
Espectro 9. Espectro IR del compuesto **38.I.a.**



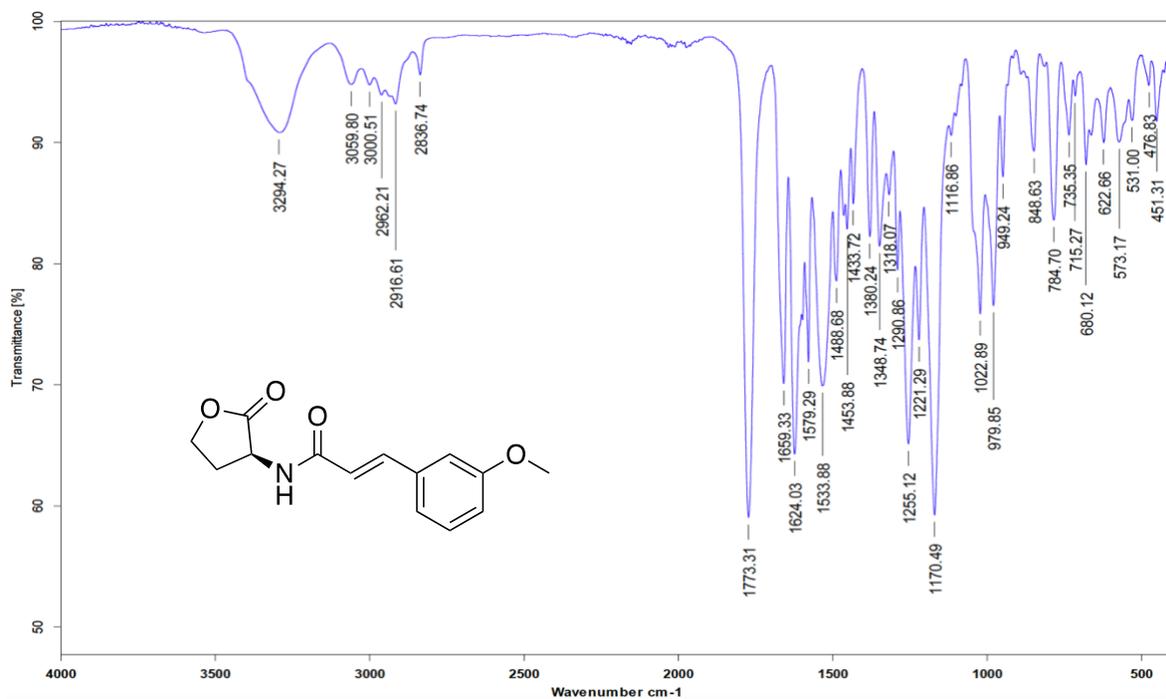
Espectro 10. Espectro IR del compuesto **38.I.b.**



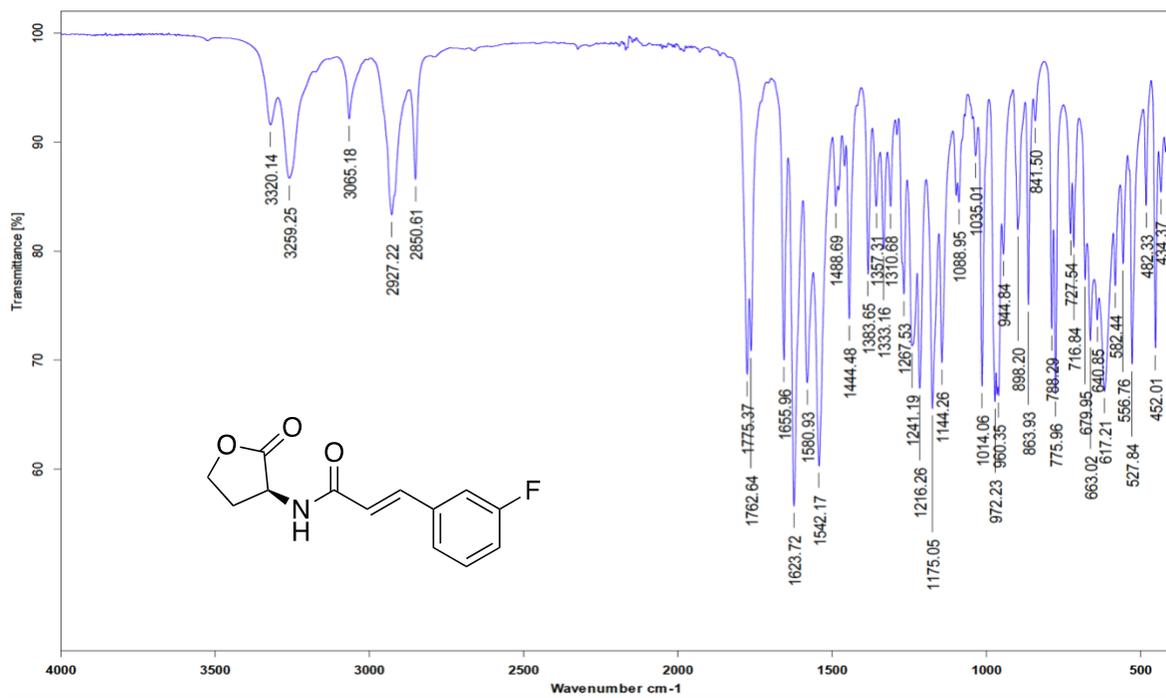
Espectro 11. Espectro IR del compuesto **38.i.c.**



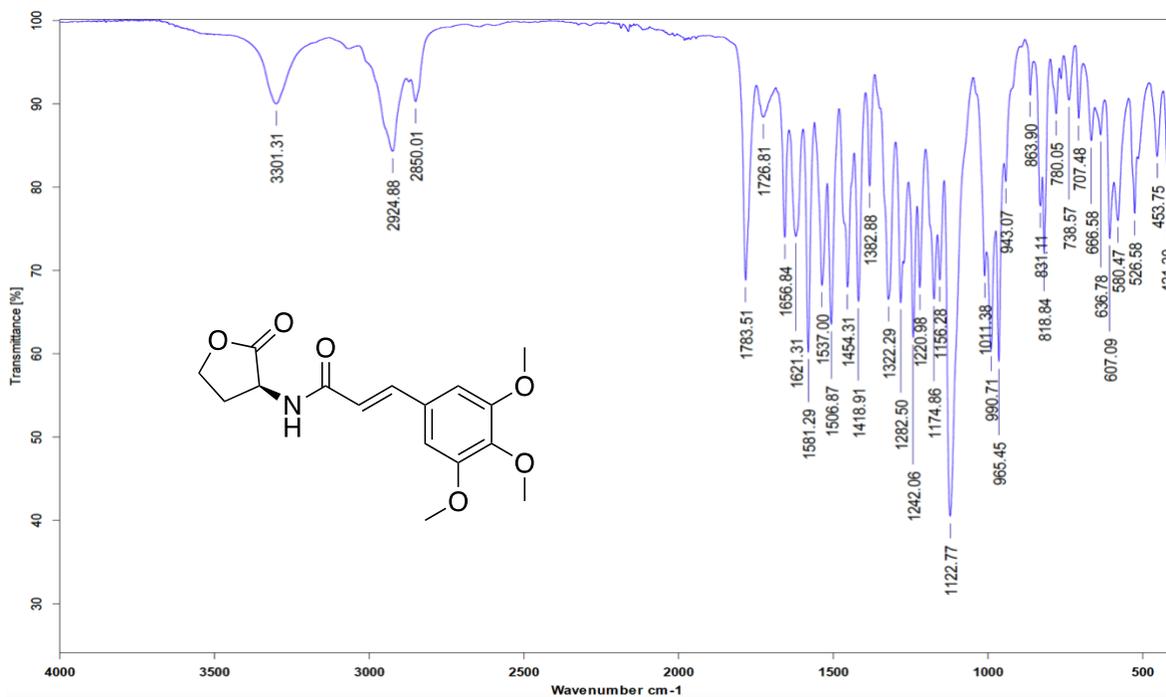
Espectro 12. Espectro IR del compuesto **38.i.d.**



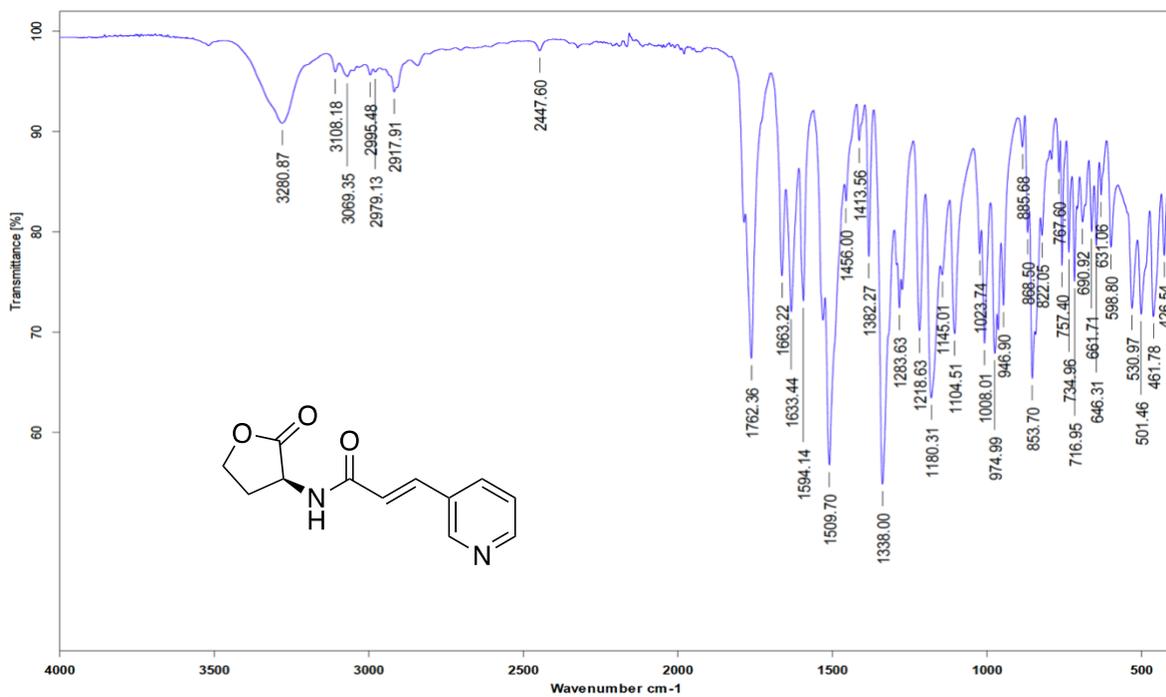
Espectro 13. Espectro IR del compuesto **38.i.e.**



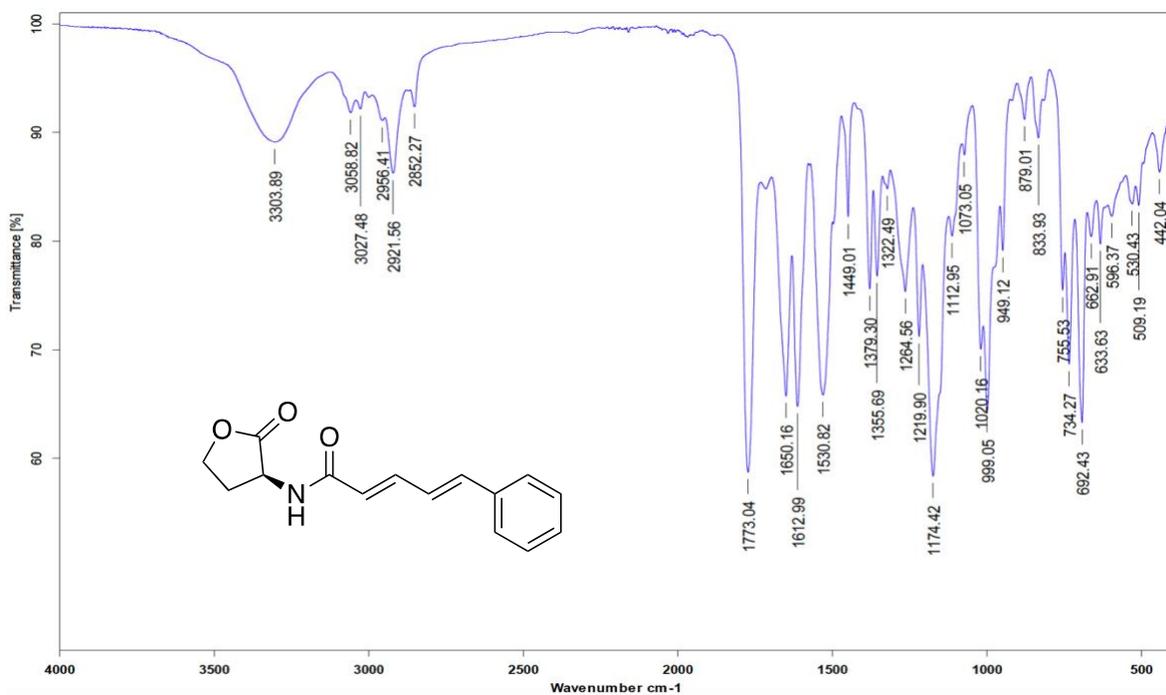
Espectro 14. Espectro IR del compuesto **38.i.f.**



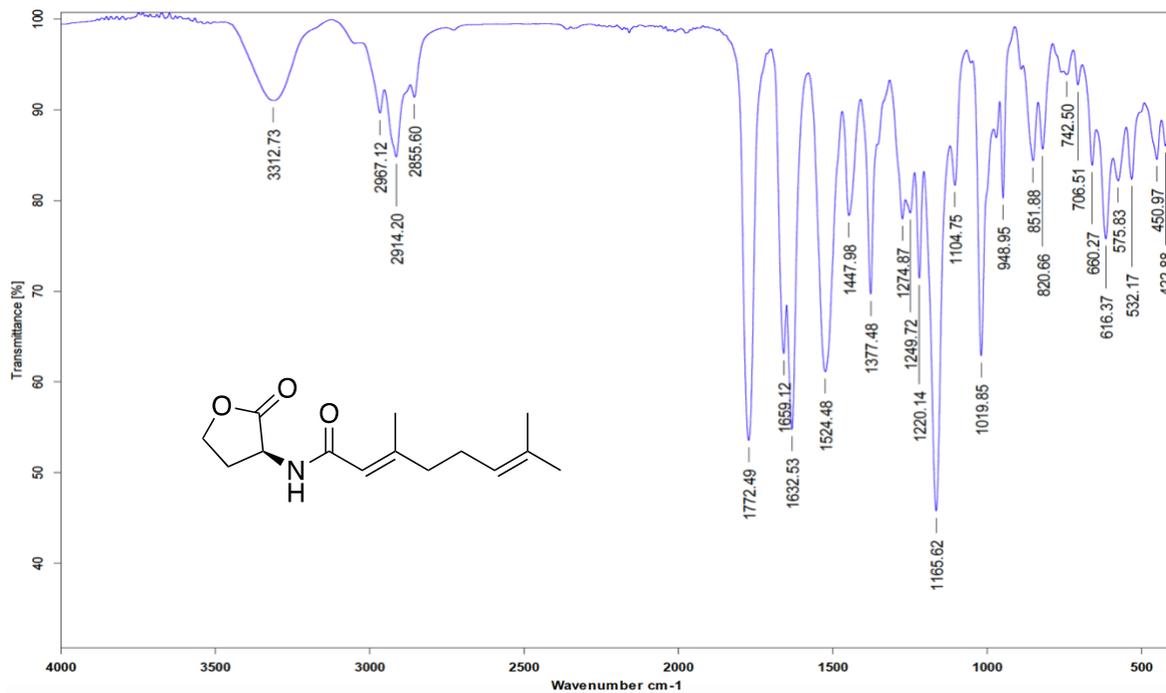
Espectro 15. Espectro IR del compuesto 38.i.g.



Espectro 16. Espectro IR del compuesto 38.i.h.

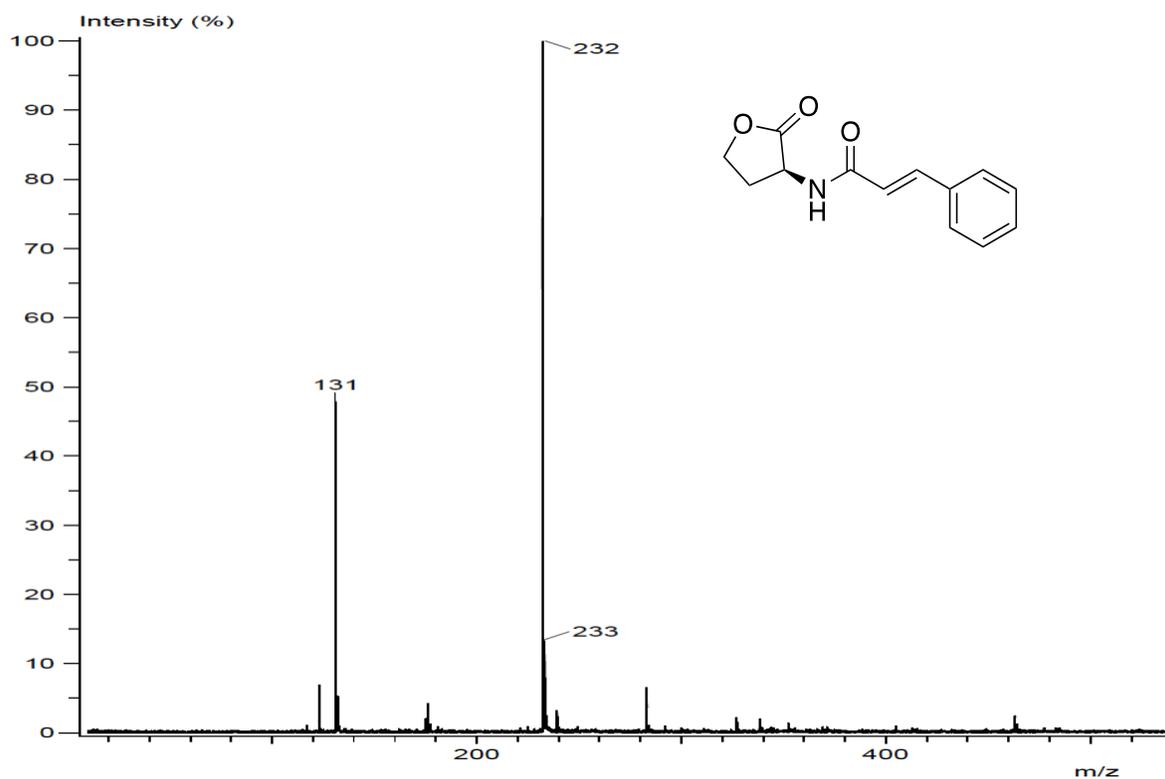


Espectro 17. Espectro IR del compuesto 38.II.i.

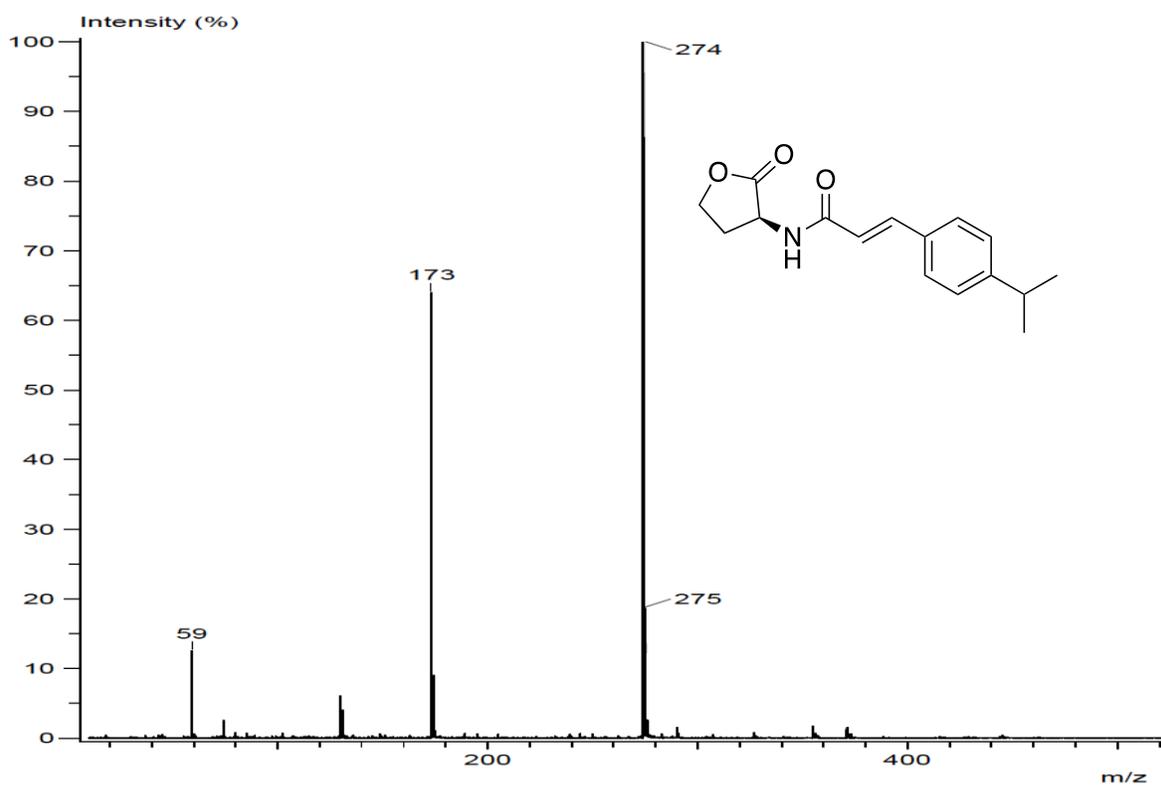


Espectro 18. Espectro IR del compuesto 38.III.j.

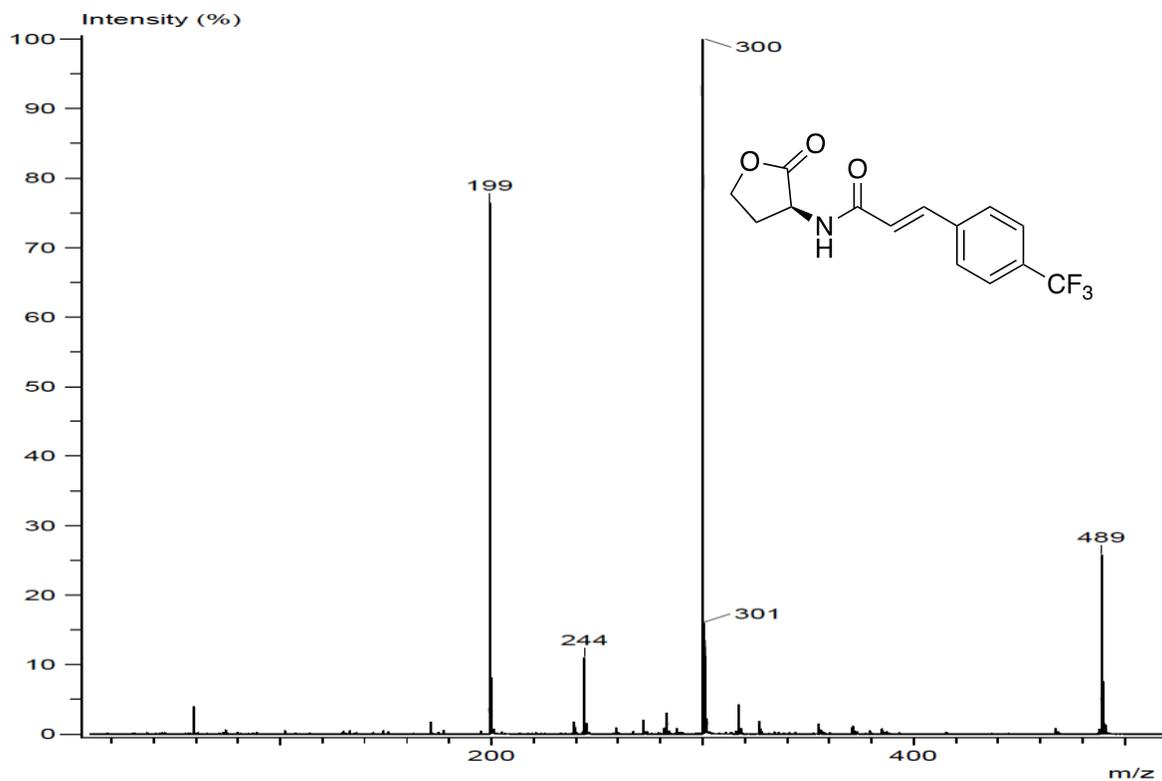
11.1.2. Masas



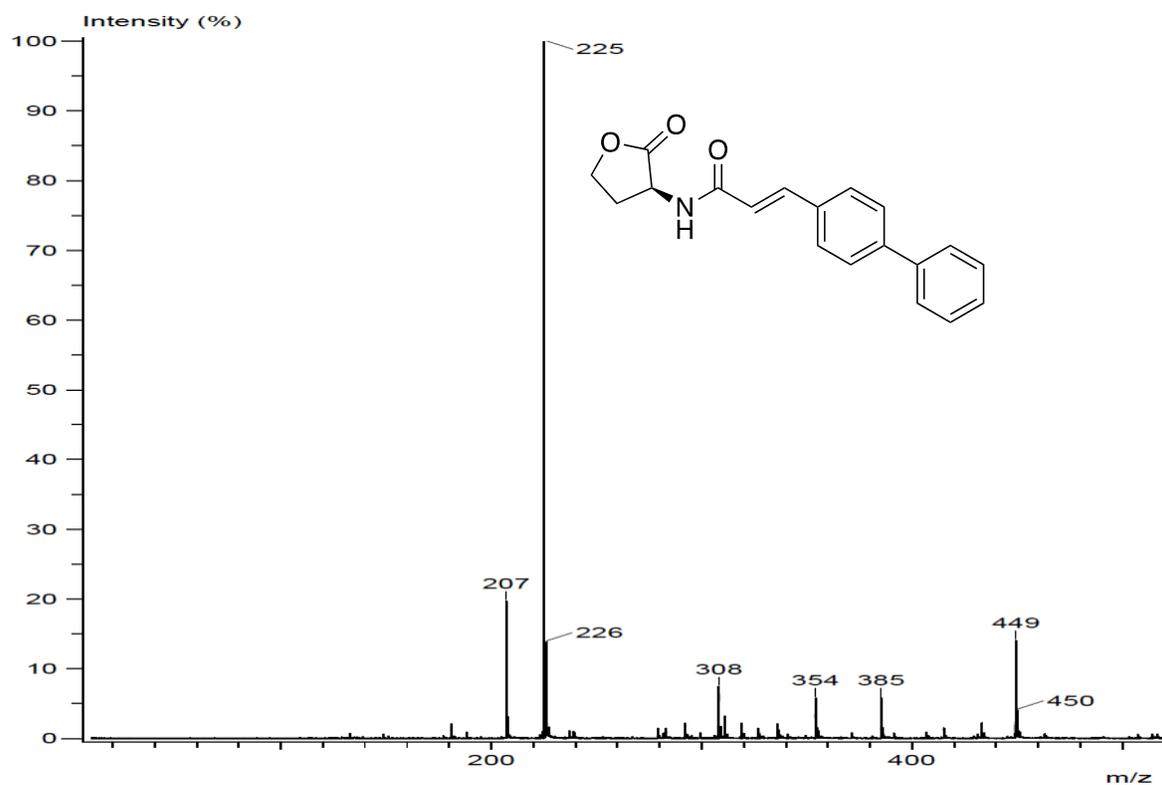
Espectro 19. Espectro de masas del compuesto 38.I.a.



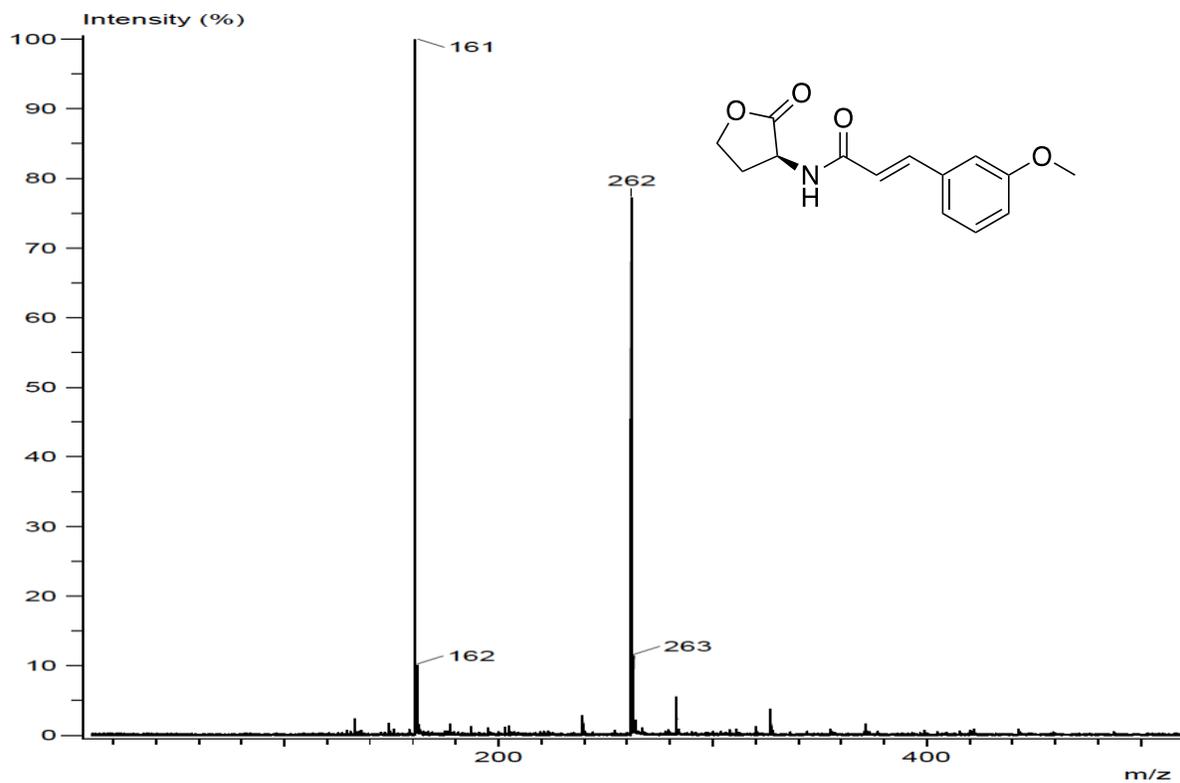
Espectro 20. Espectro de masas del compuesto 38.I.b.



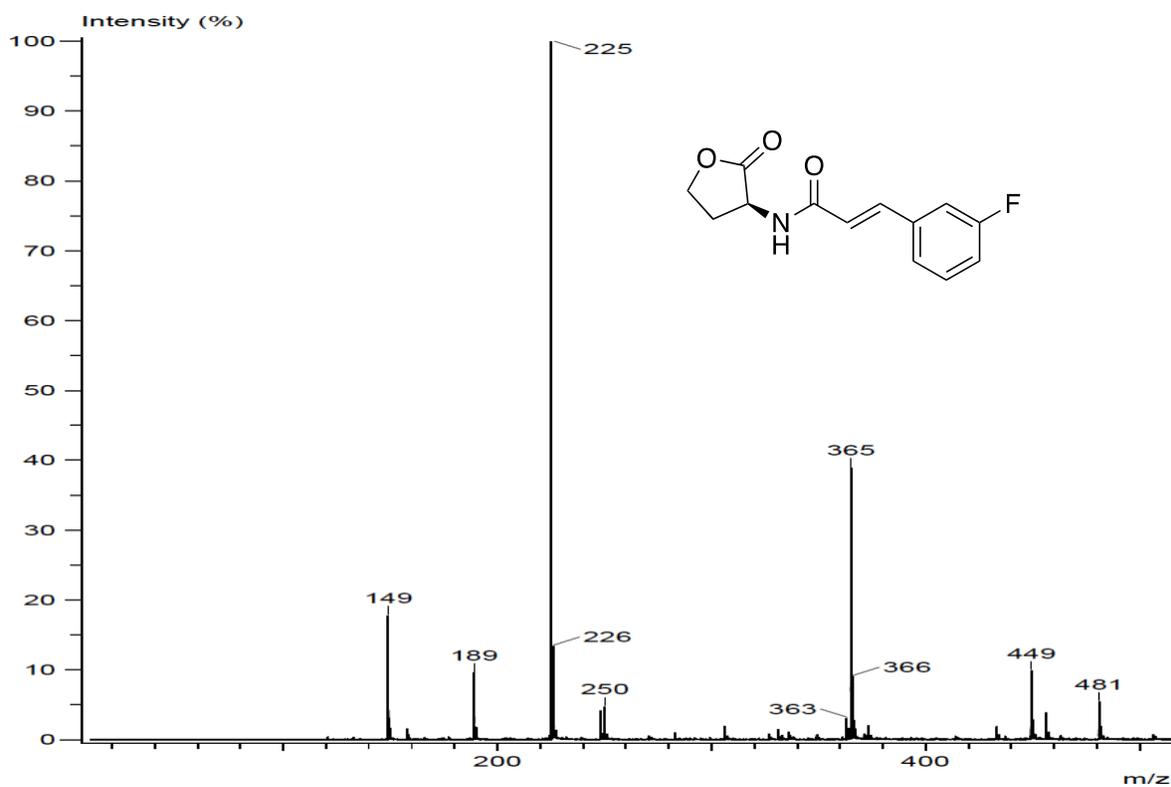
Espectro 21. Espectro de masas del compuesto 38.l.c.



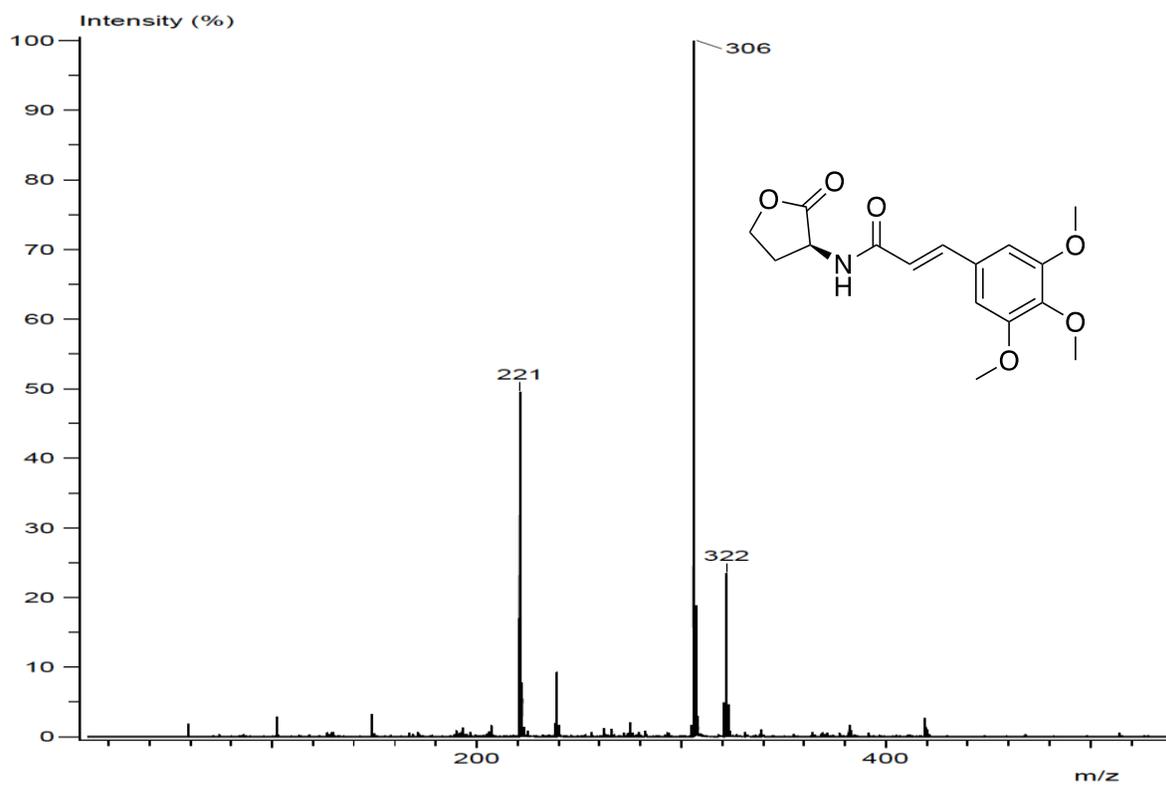
Espectro 22. Espectro de masas del compuesto 38.l.d.



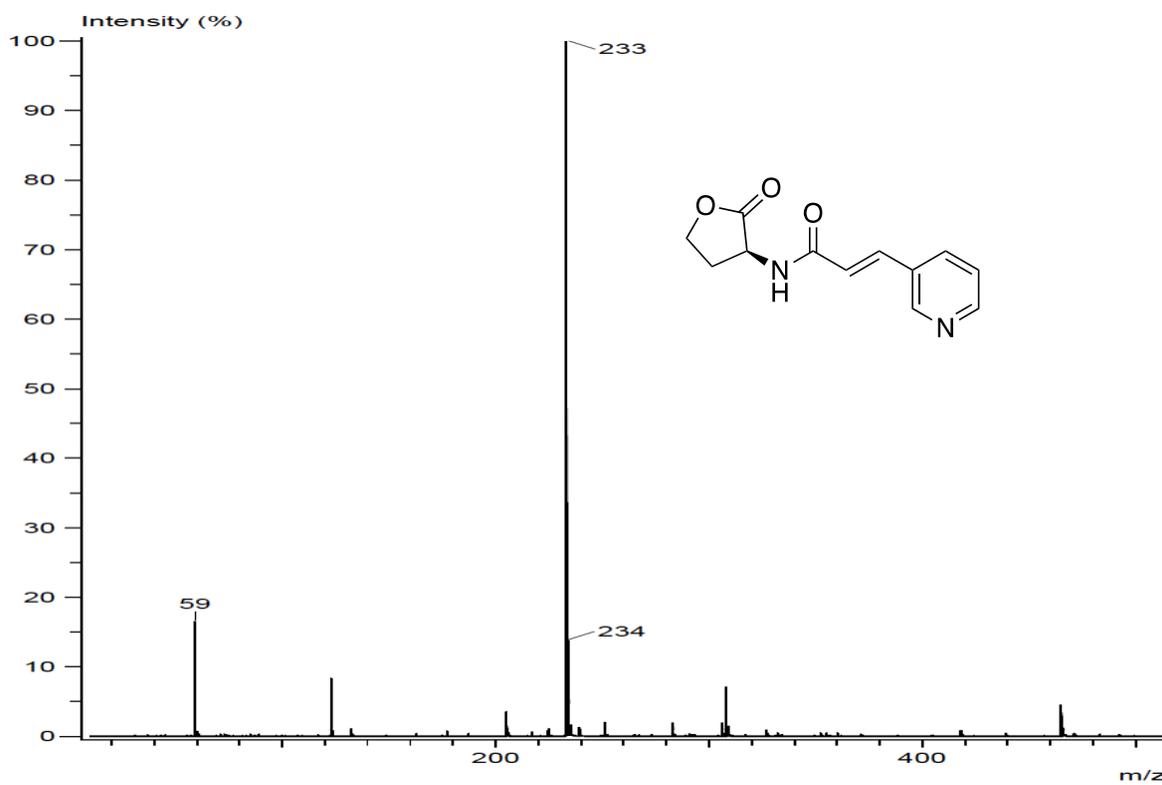
Espectro 23. Espectro de masas del compuesto 38.i.e.



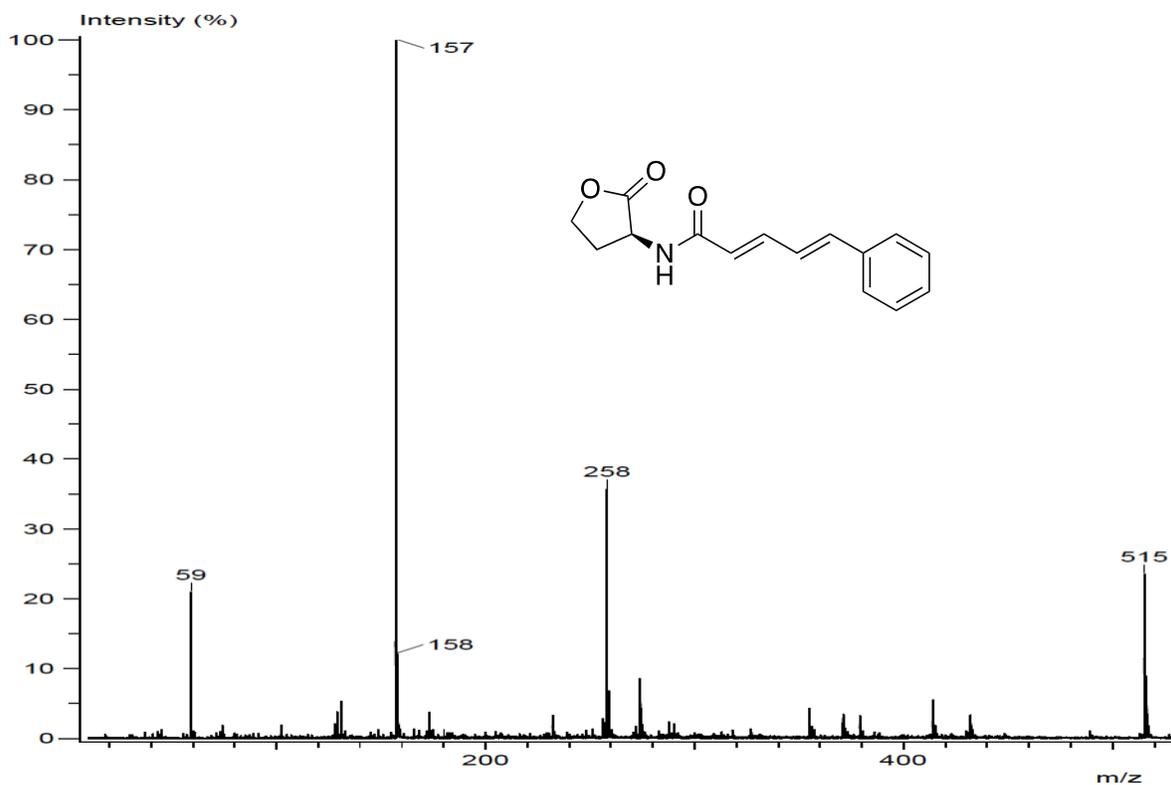
Espectro 24. Espectro de masas del compuesto 38.i.f.



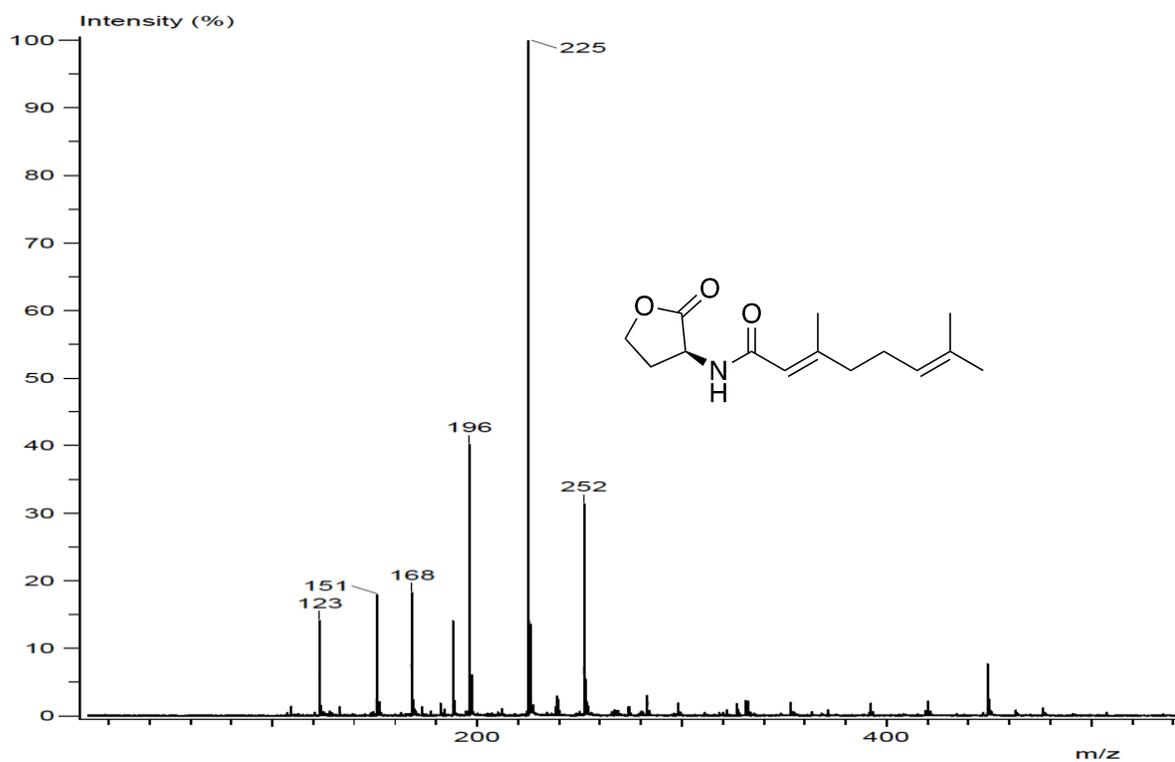
Espectro 25. Espectro de masas del compuesto 38.i.g.



Espectro 26. Espectro de masas del compuesto 38.i.h.

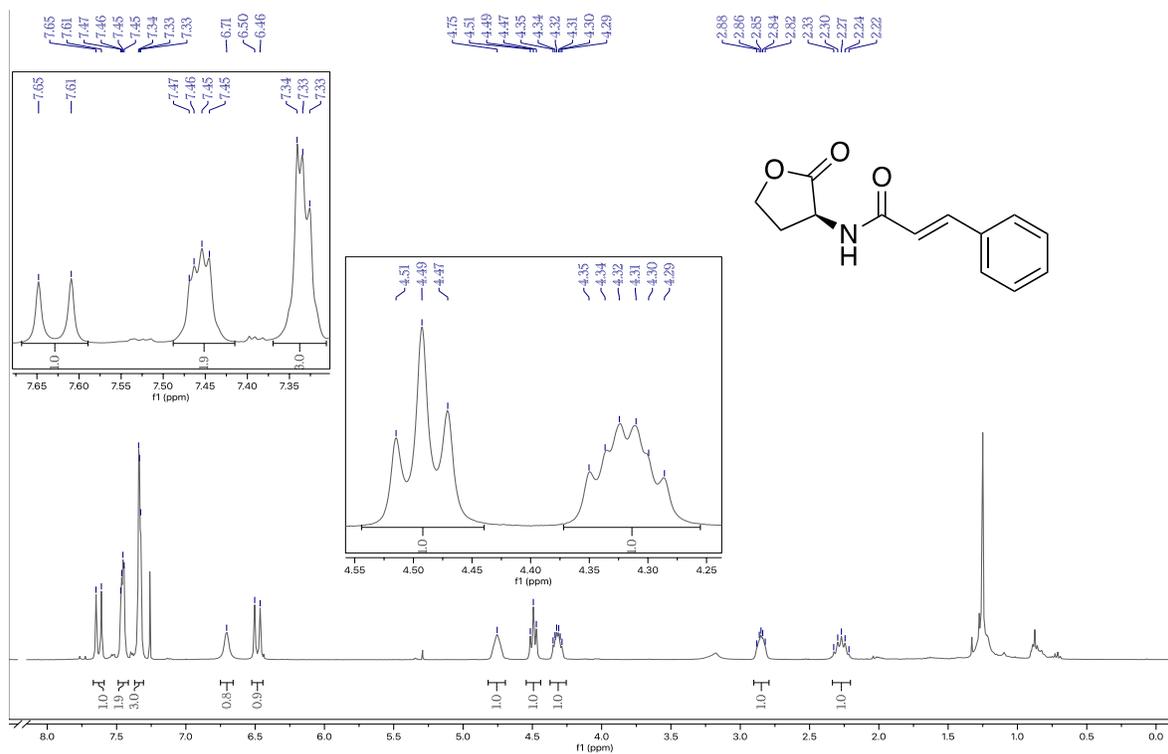


Espectro 27. Espectro de masas del compuesto 38.II.i.

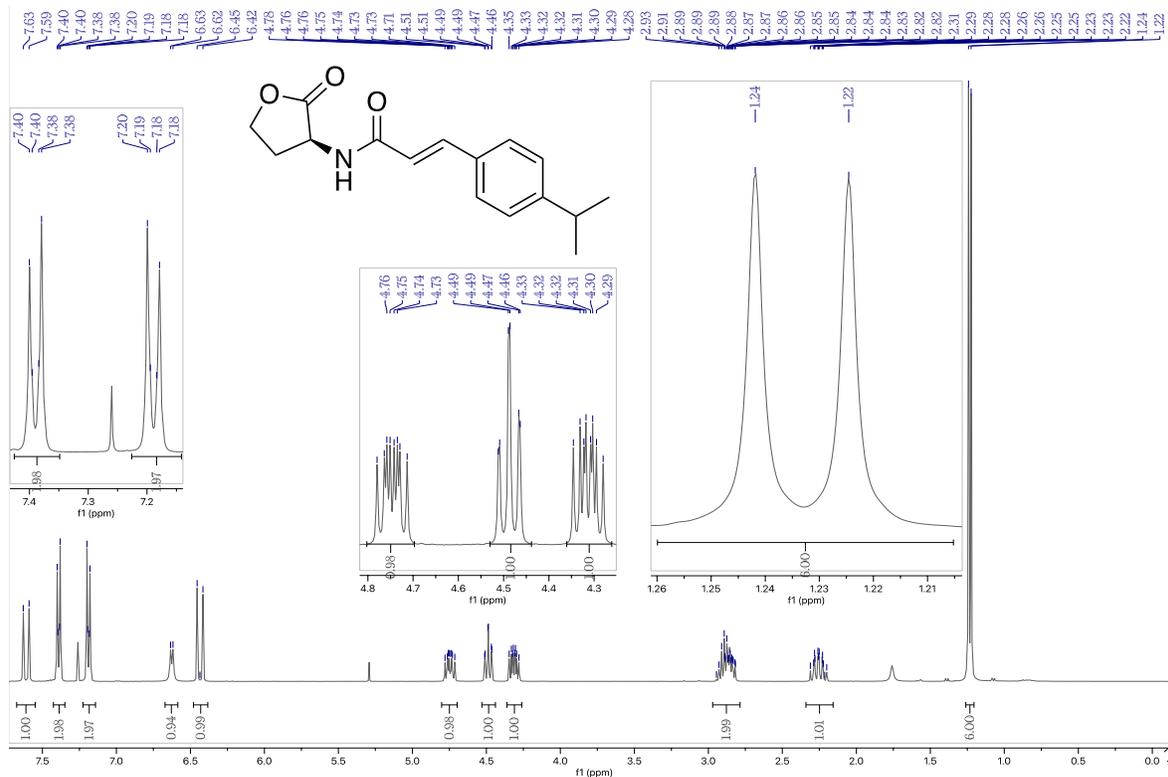


Espectro 28. Espectro de masas del compuesto 38.III.j.

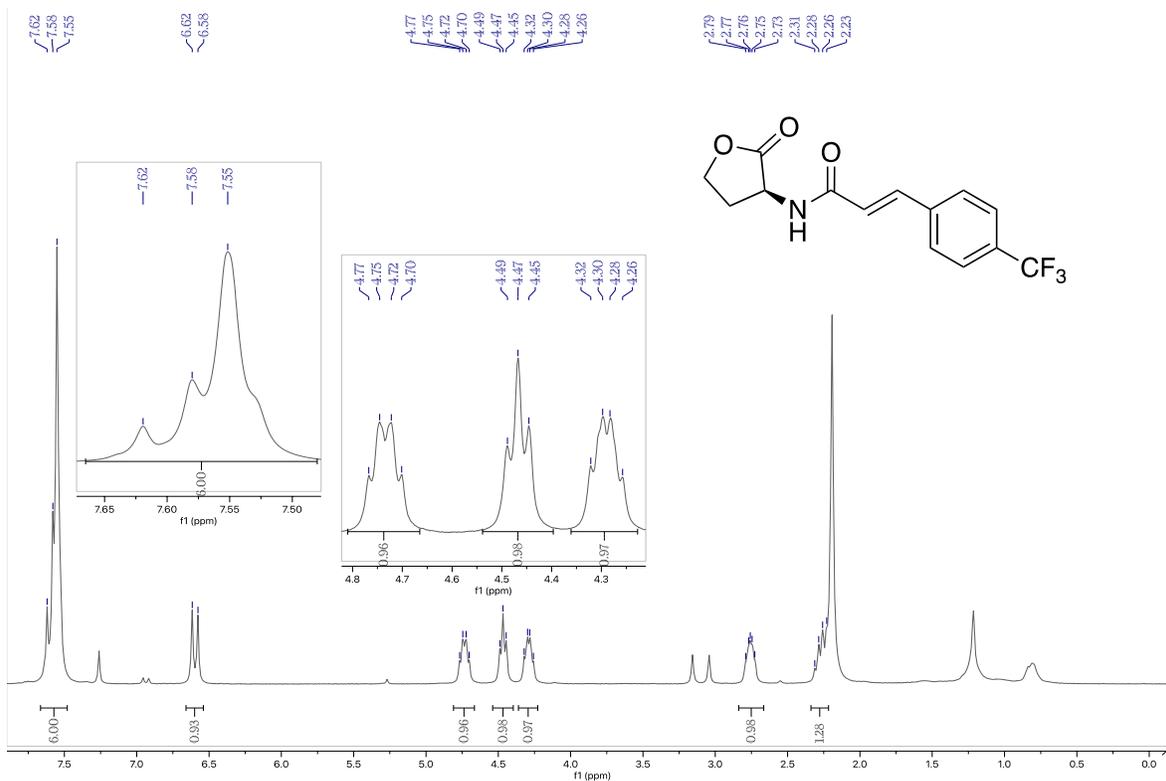
11.1.3. RMN-¹H



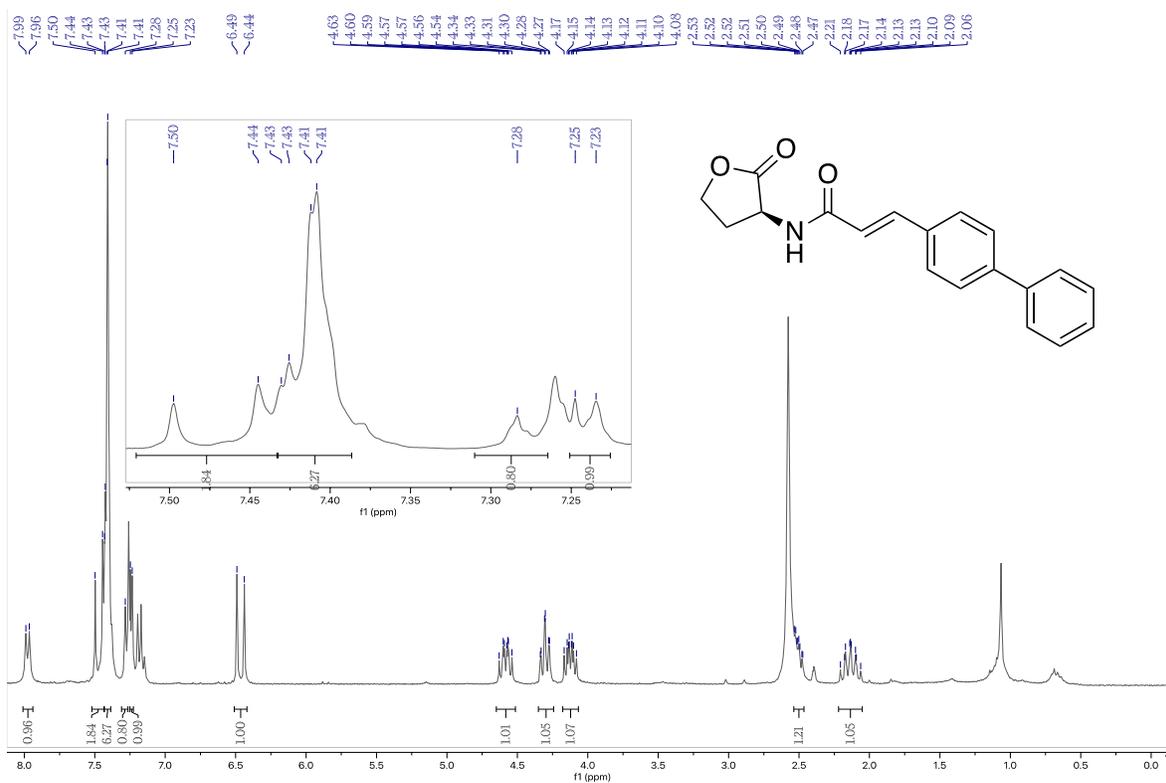
Espectro 29. Espectro de RMN-¹H del compuesto 38.I.a.



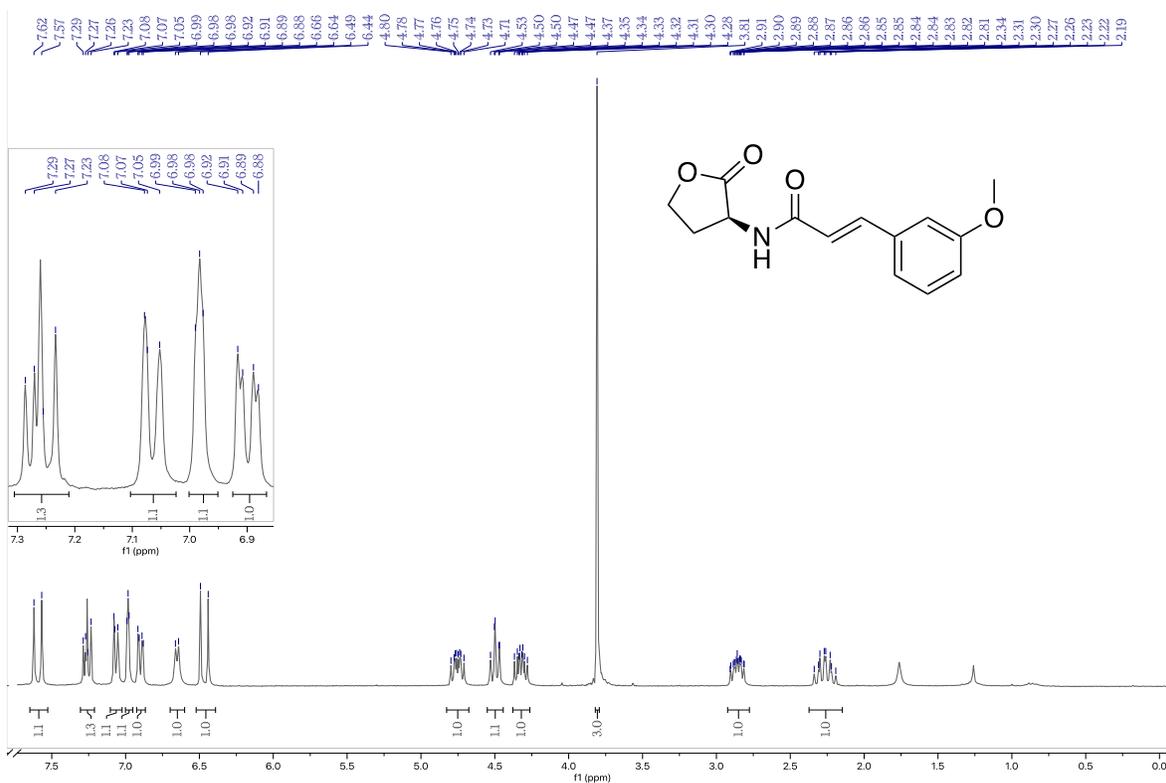
Espectro 30. Espectro de RMN-¹H del compuesto 38.I.b.



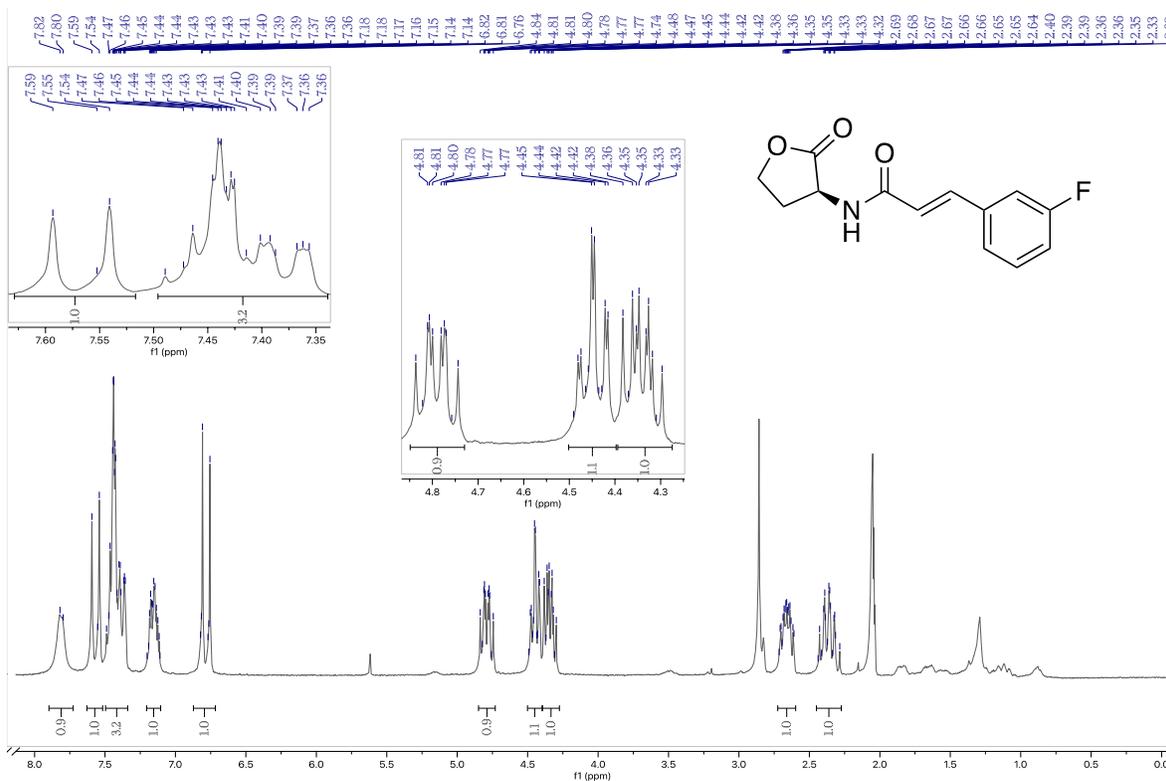
Espectro 31. Espectro de RMN-¹H del compuesto 38.I.c.



Espectro 32. Espectro de RMN-¹H del compuesto 38.I.d.

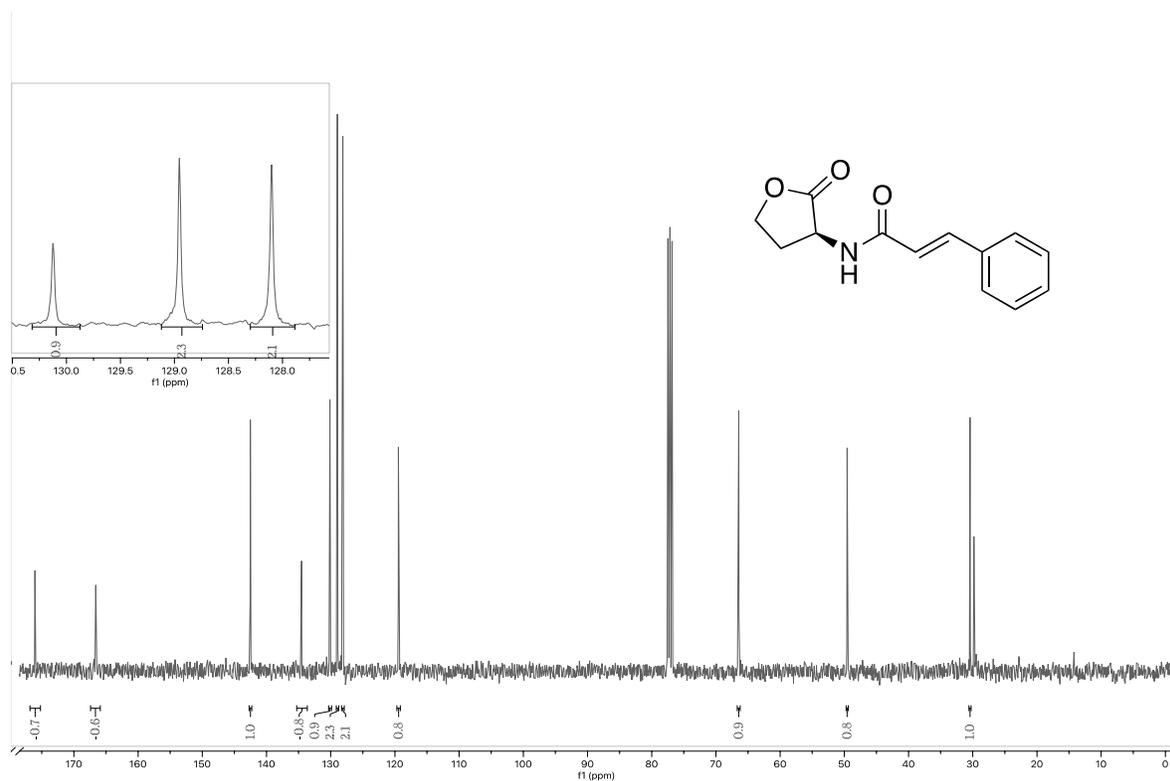


Espectro 33. Espectro de RMN-¹H del compuesto 38.I.e.

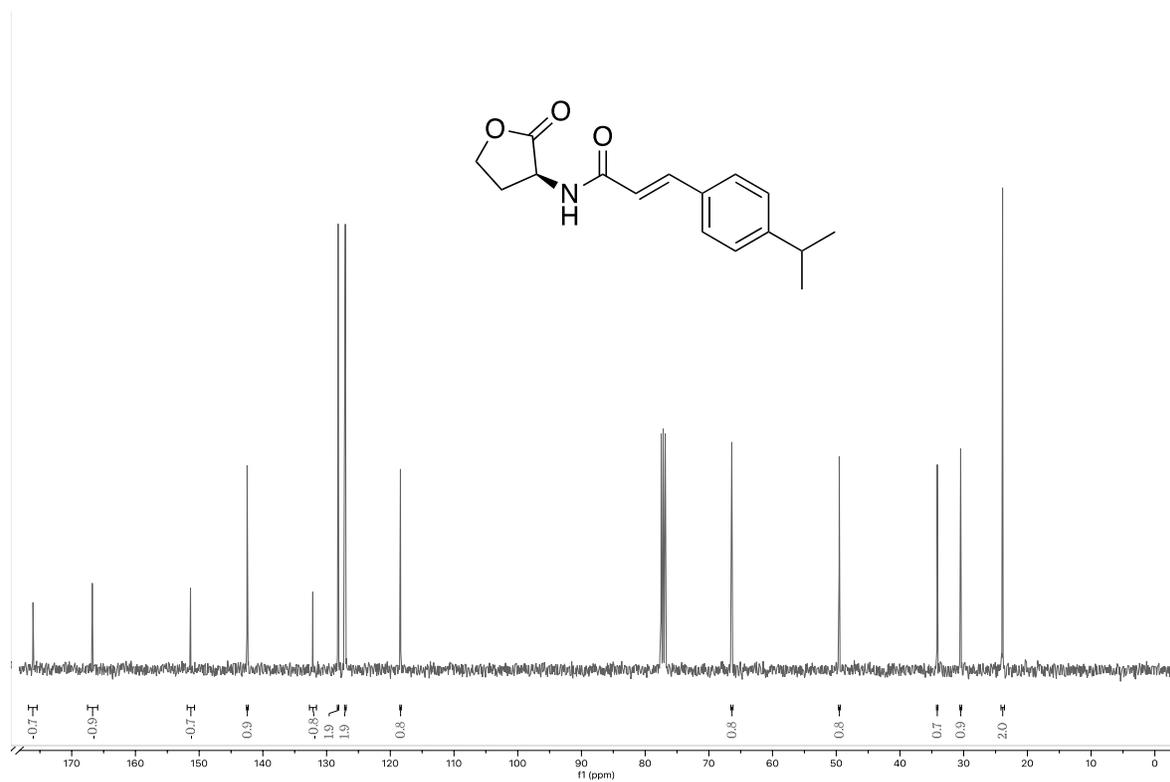


Espectro 34. Espectro de RMN-¹H del compuesto 38.I.f.

11.1.4. RMN- C^{13}



Espectro 39. Espectro de RMN- C^{13} del compuesto **38.I.a.**



Espectro 40. Espectro de RMN- C^{13} del compuesto **38.I.b.**



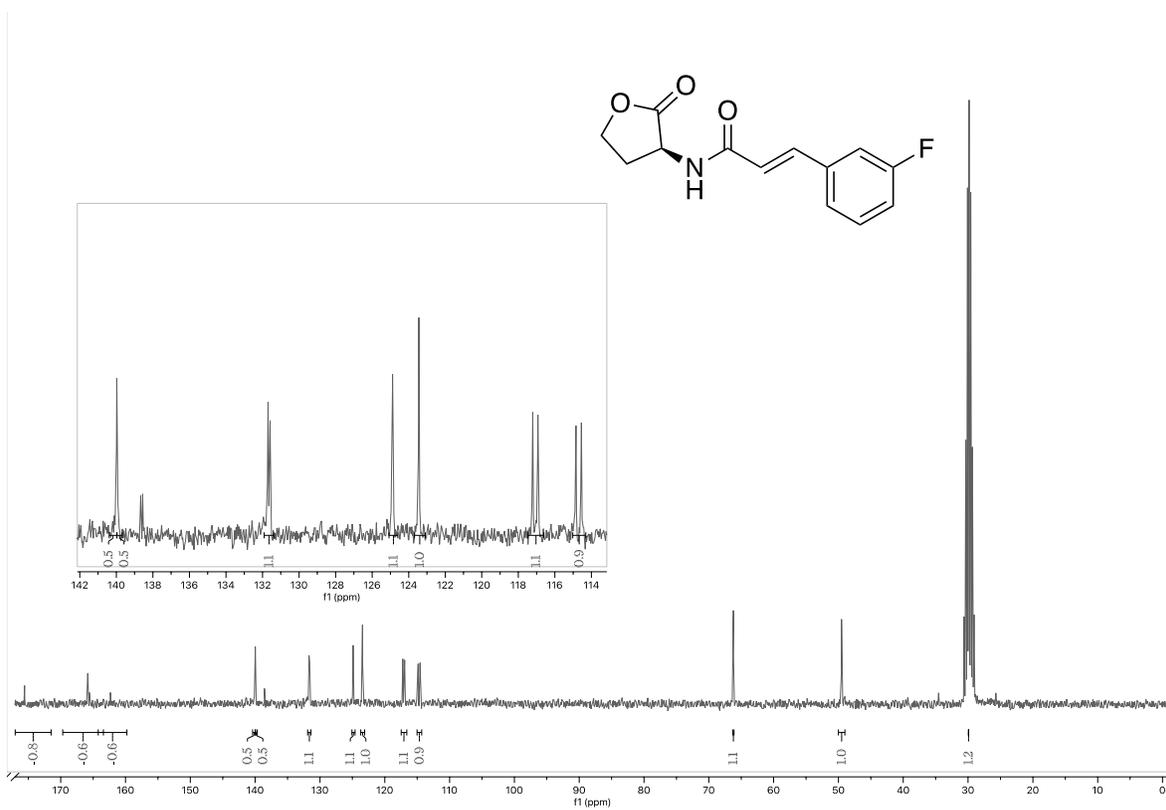
Espectro 41. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 38.I.c.



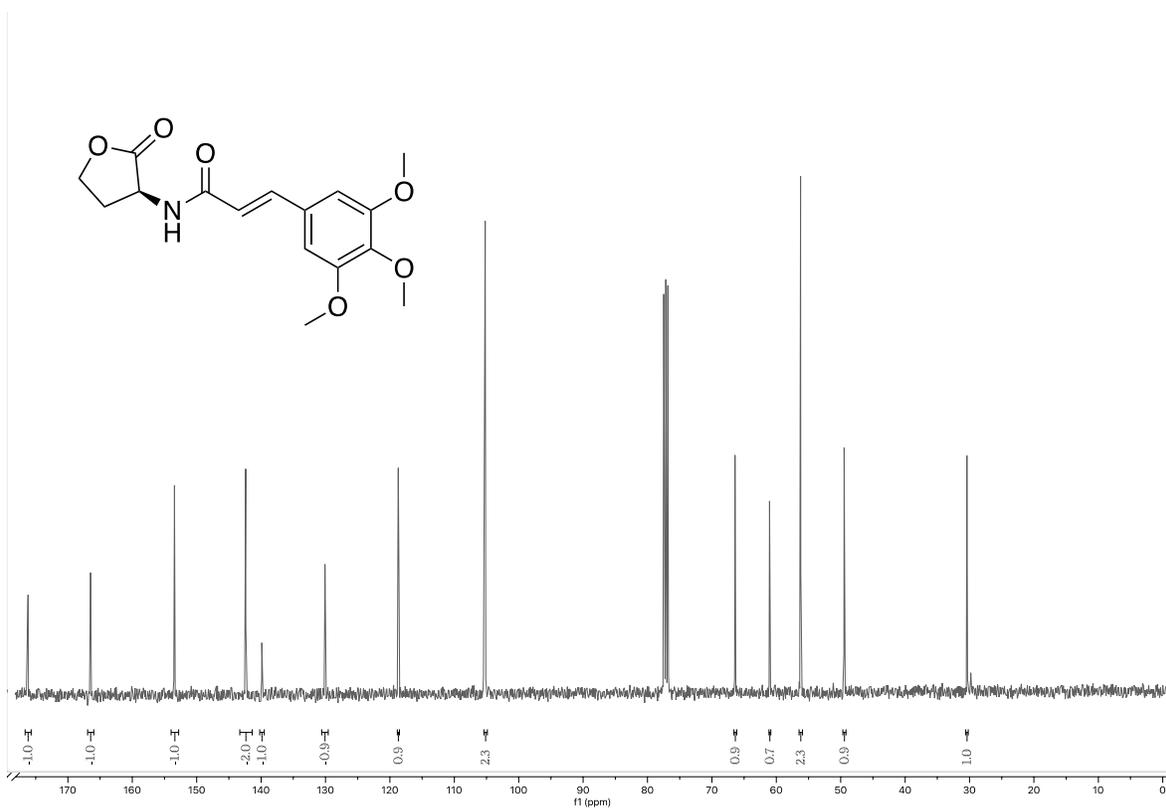
Espectro 42. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 38.I.d.



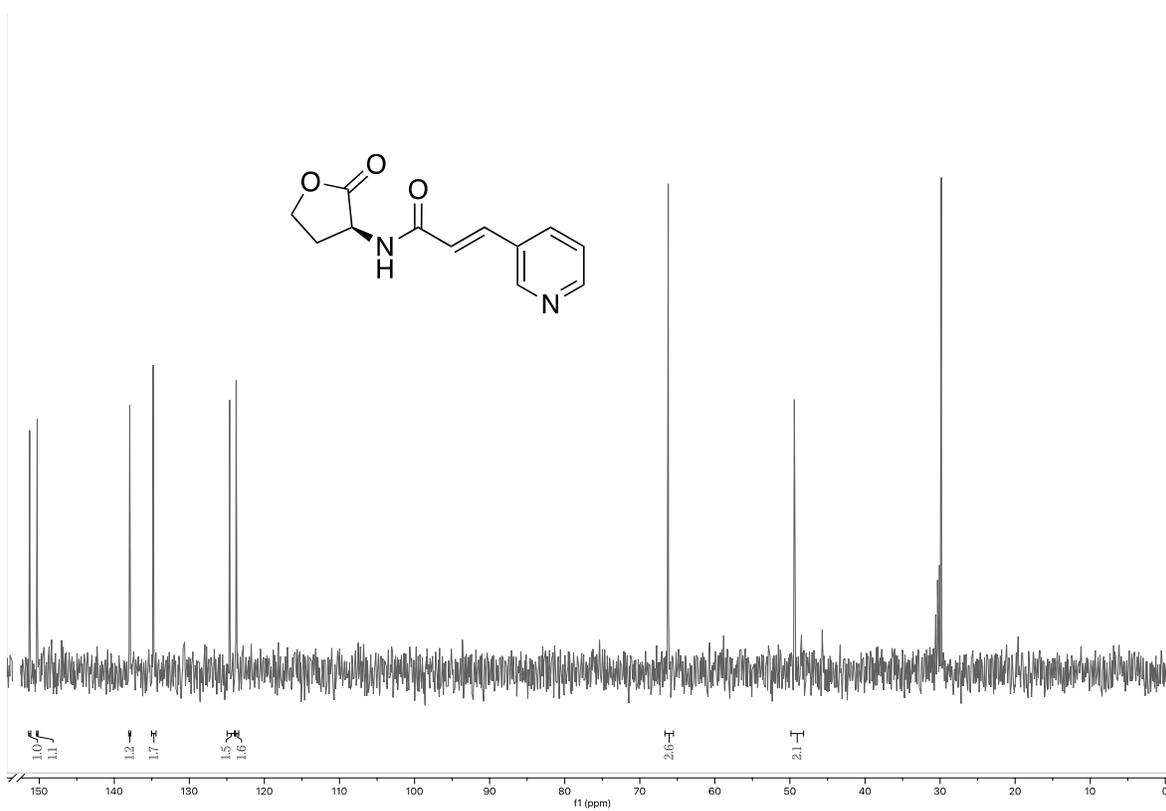
Espectro 43. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 38.i.e.



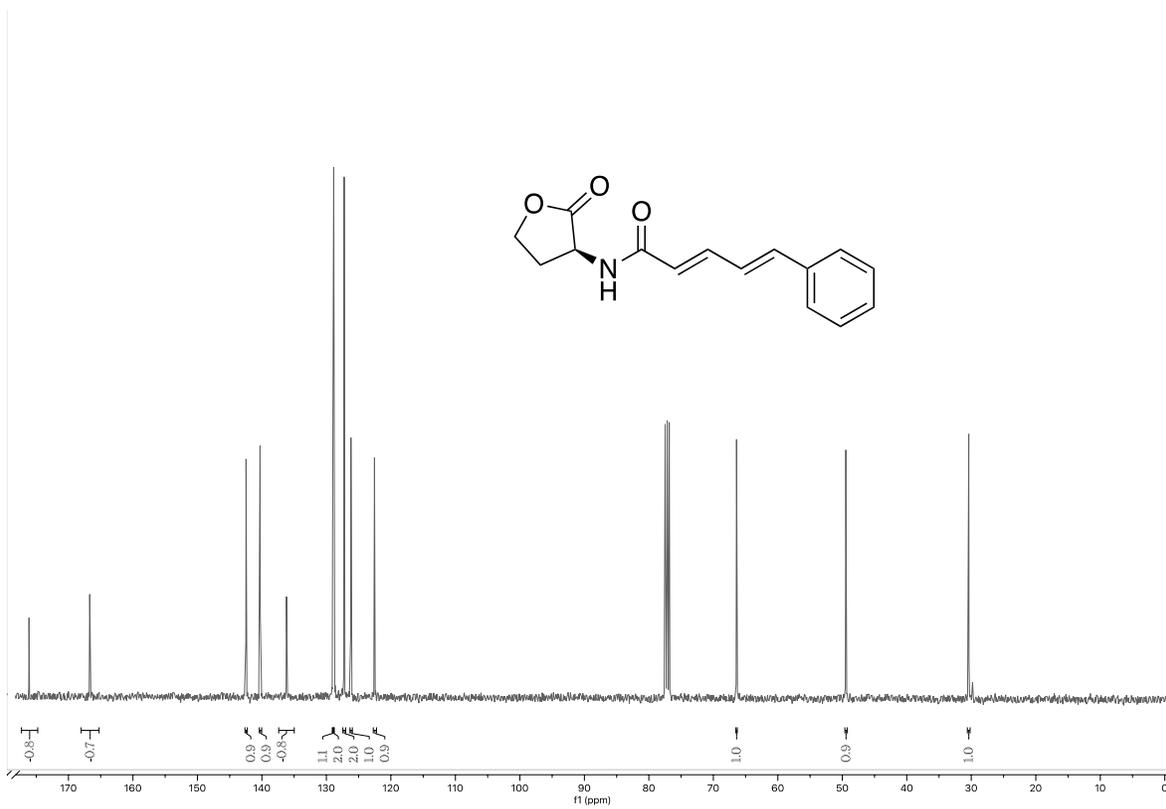
Espectro 44. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 38.i.f.



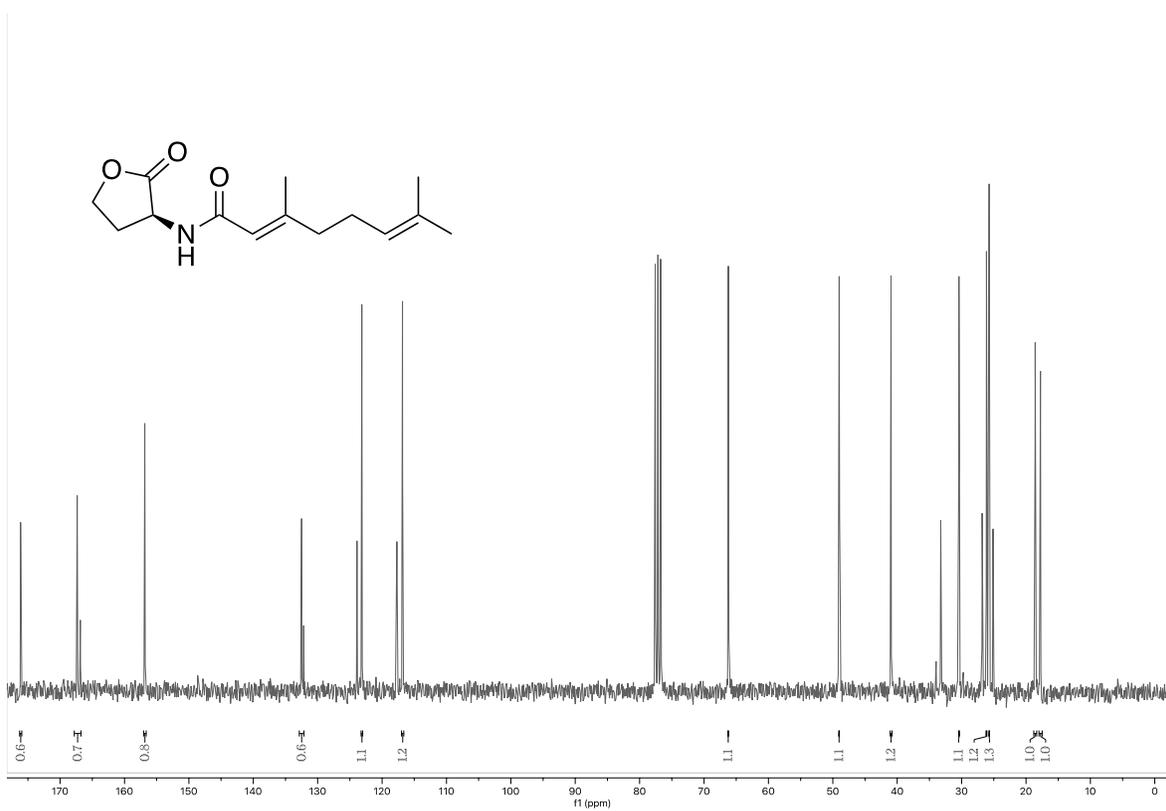
Espectro 45. Espectro de RMN-¹³C del compuesto **38.i.g.**



Espectro 46. Espectro de RMN-¹³C del compuesto **38.i.h.**



Espectro 47. Espectro de RMN-¹³C del compuesto **38.II.i**.



Espectro 48. Espectro de RMN-¹³C del compuesto **38.III.j**.