



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Laboratorio de Desarrollo de Fármacos

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Pablo Ignacio Parra Flores

“Modelación Molecular de una serie de compuestos FENILFURANOXIBENZAMIDAS; Síntesis y Evaluación de la actividad antibacteriana de una serie de compuestos intermediarios de núcleo químico 5-FENILFURANO”

DIRECTOR DE MEMORIA
Dr. David Reinaldo Vásquez Velásquez
Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

PROFESOR PATROCINANTE:
Dr. David Reinaldo Vásquez Velásquez
Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

CODIRECTOR DE MEMORIA
Dr. Oney Oscar Ramírez Rodríguez
Depto. de Química Orgánica y Físicoquímica

SANTIAGO, CHILE 2014

AGRADECIMIENTOS

Este espacio quisiera dedicarlo a todos mis seres queridos, compañeros, amigos y profesores que me han acompañado en todo este difícil camino que ha sido la universidad, ya que sin su apoyo en todo momento, no hubiera podido llegar hasta el final.

Quisiera agradecer a mi director de tesis, el profesor David Vásquez por la oportunidad para poder alcanzar mis metas y seguir creciendo en la parte académica.

A mi codirector el profesor Oney Ramírez quien fue la persona que me apoyó en todo momento y brindó ánimos durante la tesis, con quien aprendí muchísimo y que de no ser por él probablemente no hubiera terminado este trabajo. Gracias Totales!!!

Para mi mamá Myriam y mi ita Luisa, quienes han dado todo por mí para que me vaya bien y por quienes he llegado tan lejos para retribuirles todo el amor y cariño que me han brindado y cumplirles el sueño de verme titulado. Las amo.

A mi María Luisa, mi hermosa polola de quién me enamoré en el último año de la carrera y que trajo la felicidad a mi vida. Hemos compartido y disfrutado de tantos momentos bonitos y maravillosos, y eso que nos quedan muchos más jejeje, y siempre en todo momento me acompañó y brindó todo su amor, cariño y apoyo en las buenas y en las malas, sobre todo en este proceso de tesis, y no puedo sino estar más agradecido de la vida de poder estar con ella, cuidarla, hacerla feliz y amarla. Te Amo Mucho mi gansita.

A mi querido hermano Rodrigo de quien me siento muy orgulloso porque está cumpliendo su sueño en la Escuela de Especialidades de la Fuerza Aérea de Chile; A mi tío Mauricio, mi tía Marcela, mi abuelo Eduardo, mi papá Pablo, mis queridos primos Felipe, Claudio, Agustina, mi tío Paulo y mi tía Magdalena, a quienes les agradezco todo el cariño y apoyo que me han dado siempre; A mis amigos Rodrigo Osorio y Francisco Muñoz por compartir conmigo, preocuparse de mí y por la buena onda.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí mi espacio de trabajo: Javier, Diana, Karla y Juan, gracias por su apoyo, buena onda y simpatía, les deseo mucho éxito a todos en lo profesional y en su vida.

A mis queridos compañeros y amigos de la universidad Felipe Muñoz, Pedro Lobos, Carlos Muñoz, Rodrigo Banda, y a los "Tomeros Crew", porque la pasamos muy bien y nos reímos cuantas veces juntos durante la carrera; A mi grupo del Carnaval favorito Vania y Patricia por hacer muy entretenidos los laboratorios; A todos los integrantes y a los profesores Christian Villena y Cristina Padilla de la Selección de Básquetbol, a la cual le dediqué mis 5 años de universidad.

A los profesores María Teresa Andonaegui, Oscar Rojo, Hernán Vergara, Julio de la Fuente, Inés Ruiz y al grupo HYGEA por su apoyo, simpatía y confianza en mí.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	2
TABLA DE CONTENIDOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ABREVIATURAS DE SIGLAS	6
ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. EL PROBLEMA MUNDIAL DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS ACTUALMENTE UTILIZADOS.	9
1.2. DISMINUCIÓN EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (I+D) DE NUEVOS ANTIBACTERIANOS POR PARTE DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.	10
1.3. NUEVOS BLANCOS FARMACOLÓGICOS PARA DESARROLLAR ANTIBACTERIANOS CON NOVEDOSOS MECANISMOS DE ACCIÓN: FTSZ Y LA DIVISIÓN CELULAR BACTERIANA.	12
1.4. DISEÑO Y DESARROLLO DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE FTSZ.	14
1.5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS 5-FENILFURANO.	18
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVO GENERAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. MATERIALES Y EQUIPOS	21
5.1. MATERIALES.	21
5.2. EQUIPOS.	22
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
6.1. SÍNTESIS DE COMPUESTOS QUÍMICOS.	23
6.1.1. PREPARACIÓN DE LOS ARILFURFURALES (3): MÉTODO GENERAL.	23
6.1.2. PREPARACIÓN DE LOS ALCOHOLES (4) POR REDUCCIÓN DE LOS ALDEHÍDOS (3): MÉTODO GENERAL.	26
6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM).	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
7.1. ESTUDIOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR DE LOS COMPUESTOS FENILFURANOXIBENZAMIDAS EN FTSZ DE <i>S. aureus</i> .	31
7.2. ESTUDIO DE LA SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS DE NÚCLEO 5-FENILFURANO.	40

7.3. ESTUDIO DE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS COMPUESTOS DE NÚCLEO 5-FENILFURANO.	44
8. CONCLUSIONES	46
9. PERSPECTIVAS	47
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
11. ANEXO	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Descubrimiento de nuevas clases de agentes antibacterianos.	11
Figura 2 Nuevos agentes antibacterianos aprobados en los Estados Unidos, 1983-2002, por un periodo de 5 años.	11
Figura 3 Estructura cristalizada del monómero de FtsZ de <i>Bacillus subtilis</i> unido a GTP- γ -S.	13
Figura 4 Ensamblaje de FtsZ en el proceso de división celular bacteriano.	14
Figura 5 Ejemplos de compuestos inhibidores de FtsZ de cada grupo químico.	15
Figura 6 Complejos FtsZ-Compuesto Cristalográficos.	16
Figura 7 Estructuras químicas de derivados 5-fenilfurano.	18
Figura 8 Estructuras químicas de compuestos.	19
Figura 9 Diagrama general de síntesis de los 5-fenilfuranos.	23
Figura 10 Esquema de las microplacas usadas para realizar el ensayo de microdilución en caldo y determinar la CIM.	30
Figura 11 Aminoácidos que forman parte del bolsillo donde se une PC190723 a FtsZ de <i>S. aureus</i> .	32
Figura 12 Posicionamiento y conformación solución del <i>docking</i> molecular de 1 (amarillo), en el sitio activo de la FtsZ de <i>S. aureus</i> . Conformación y posición cristalográfica de PC190723 (celeste).	32
Figura 13 Interacciones del ligando en el sitio activo de FtsZ de <i>S. aureus</i> .	33
Figura 14 Posicionamiento y conformaciones soluciones del <i>docking</i> molecular de 1 (amarillo), compuestos 2a-e (rosados) en el sitio activo. Conformación y posición cristalográfica de PC190723 (celeste).	34

Figura 15	Interacciones de la conformación solución del <i>docking</i> molecular del compuesto 2a en el sitio activo de FtsZ de <i>S. aureus</i> .	35
Figura 16	Interacciones de la conformación solución del <i>docking</i> molecular del compuesto 2b en el sitio activo de FtsZ de <i>S. aureus</i> .	35
Figura 17	Interacciones de la conformación solución del <i>docking</i> molecular del compuesto 2c en el sitio activo de FtsZ de <i>S. aureus</i> .	36
Figura 18	Interacciones de la conformación solución del <i>docking</i> molecular del compuesto 2d en el sitio activo de FtsZ de <i>S. aureus</i> .	36
Figura 19	Interacciones de la conformación solución del <i>docking</i> molecular del compuesto 2e en el sitio activo de FtsZ de <i>S. aureus</i> .	37
Figura 20	Orientación de la mitad benzamida de PC190723 cristalográfico (naranja) y de las conformaciones soluciones del <i>docking</i> molecular de los compuestos 1 (amarillo) y 2a-e (fucsia).	38
Figura 21	Mecanismo de la reacción de diazotación.	41
Figura 22	Mecanismo de reacción de la arilación del furfural con sales de diazonio catalizada por Cu(I).	42
Figura 23	Mecanismo de la reacción de reducción con NaBH ₄ .	43

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Concentraciones de los compuestos 5-fenilfuranos expresadas en µg/mL del primer pocillo de cada fila, columna 1, de las microplacas.	29
Tabla 2	Puntuación <i>docking</i> de cada compuesto.	33
Tabla 3	Concentración inhibitoria mínima (CIM) en µg/mL de los compuestos 3a-e y 4a-e sobre las cepas <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM) y <i>Enterococcus faecalis</i> sensible a vancomicina (EFSV)	44

ABREVIATURAS DE SIGLAS

ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutant (Mutante de Ataxia-Telangiectasia)
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)
CTPM	(6-cloro-tiazolopiridin-2-il)metoxi
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades)
EFSV	<i>Enterococcus faecalis</i> sensible a vancomicina
EMA	European Medicines Agency (Agencia de Medicinas Europea)
FtsZ	Filamentous Temperature-Sensitive Z (Filamento Z sensible a la Temperatura)
GDP	Difosfato de Guanosina
GOLD	Genetic Optimization for Ligand Docking (Optimización Genética para Acoplamiento del Ligando)
GTP	Trifosfato de Guanosina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
HTS	High-Throughput Screening (Selección de Alto Rendimiento)
Hz	Hertz
IC_{50}	Inhibitory Concentration 50 (Concentración Inhibitoria 50)
I+D	Investigación y Desarrollo
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baja Densidad)
3-MBA	3-Metoxi-Benzamida
NPC	Niemann-Pick tipo C
PDB	Protein Data Bank (Banco de Datos de Proteína)
ppm	partes por millón
$^1\text{H-RMN}$	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
$^{13}\text{C-RMN}$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SAMDR	<i>Staphylococcus aureus</i> multi-droga-resistente
SAR	Structure-Activity Relationship (Relación Estructura-Actividad)
TMS	Tetrametilsilano

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Asn	Asparagina	Leu	Leucina
Gln	Glutamina	Met	Metionina
Gly	Glicina	Thr	Treonina
Ile	Isoleucina	Val	Valina

RESUMEN

“MODELACIÓN MOLECULAR DE UNA SERIE DE COMPUESTOS FENILFURANOXIBENZAMIDAS; SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UNA SERIE DE COMPUESTOS INTERMEDIARIOS DE NÚCLEO QUÍMICO 5-FENILFURANO”

La Resistencia Bacteriana es un problema de salud pública mundial que ha ido mermando la eficacia de muchos de los antibióticos actualmente utilizados, reduciendo enormemente las posibilidades de tratar las enfermedades infecciosas severas de manera efectiva, lo que sumado a la tendiente disminución de la investigación y desarrollo (I+D) de agentes antibacterianos con nuevos mecanismos de acción por parte de la Industria Farmacéutica, conllevaría a una escasez de alternativas terapéuticas en un futuro cercano. Por esto surge la urgente necesidad de promover la investigación hacia nuevos blancos moleculares entre los que se destaca la proteína FtsZ (del inglés *Filamentous Temperature-Sensitive Z*) cuyo papel es fundamental en la citocinesis celular bacteriana, pues polimeriza en protofilamentos para ensamblar el anillo Z en medio de la bacteria, permitiendo así el reclutamiento de proteínas necesarias para formar el complejo divisor que lleva a cabo el proceso de la división celular, convirtiéndose en un blanco atractivo para el diseño de agentes antimicrobianos. Al respecto se han desarrollado diversos Inhibidores de FtsZ entre los que se destaca PC190723 (**1**) que presenta una potente y selectiva actividad antiestafilocócica con eficacia en modelos *in vivo* de infección y con un perfil farmacocinético muy parecido al de un fármaco. Con el objetivo de generar nuevos ligandos capaces de inhibir esta proteína se diseñaron los compuestos fenilfuranoxibenzamidas (**2**), que son análogos estructurales de **1** y que incluyen el núcleo 5-fenilfurano que tiene potencial actividad biológica, a los cuales se les llevó a cabo un estudio de *docking* molecular en el sitio de unión de PC190723 a la FtsZ de *S. aureus*, cuyas soluciones señalan que el modo de unión y las interacciones generadas en el bolsillo son favorables para cada uno de estos compuestos ya que son similares a las de **1** obtenidas por cristalografía de rayos-X, y con puntajes *docking* semejantes en magnitud a las del patrón de **1** relacionados con el volumen o lipofilia por sobre la polaridad del sustituyente aceptor de electrones. Posteriormente se sintetizaron las series **3** y **4**, que contienen el núcleo 5-fenilfurano. Primeramente se empleó la reacción de arilación de Meerwein sobre el furfural (obtención de la serie **3**), seguido por la reducción del aldehído utilizando borohidruro de sodio (obtención de la serie **4**). Se evaluó la actividad antibacteriana para todos los derivados sobre cocáceas Gram-positivas y se encontró actividad sólo para el compuesto **3c** contra *S. aureus* resistente a meticilina, un auspicioso resultado que establece un primer paso para investigar el desarrollo de derivados con potencial actividad antiestafilocócica incluyendo cepas resistentes. Aunque la serie **4** no presentó actividad biológica, distintos antecedentes indicarían que contribuirían a la actividad antibacteriana de la serie **2** y a la unión en el bolsillo de la FtsZ.

Palabras Claves: Resistencia Bacteriana. I+D. FtsZ. *Docking* Molecular. Actividad Antibacteriana.

SUMMARY

“MOLECULAR MODELING OF A SERIES OF COMPOUNDS PHENYLFURANOXIBENZAMIDES; SYNTHESIS AND EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF A SERIES OF COMPOUNDS CHEMICAL INTERMEDIARIES OF CORE 5-PHENYLFURAN”

Bacterial Resistance is a worldwide public health problem that has been weakening the effectiveness of many of the antibiotics currently used, greatly reducing the chances of treating severe infectious diseases effectively, which joined the aimed decrease of the research and development (R&D) of antibacterial agents with new mechanisms of action on the part of the Pharmaceutical Industry, would lead to a shortage of therapeutic alternatives in the near future. This prompts the urgent need to promote research toward new molecular targets the most significant of which is the FtsZ (Filamentous Temperature-Sensitive Z) protein whose role is crucial in the bacterial cell cytokinesis, because polymerizes in protofilaments to join the Z ring in the middle of the bacterium, thus allowing the recruitment of proteins needed to form the complex divisome that carried out the process of cell division, becoming an attractive target for the design antimicrobial agents. In this regard have developed various inhibitors of FtsZ prominent among them being PC190723 (**1**) which provides a potent and selective antistaphylococcal activity with effectiveness *in vivo* models of infection and with a pharmacokinetic profile very similar to that of a drug. With the aim of generating new ligands capable of inhibiting this protein were designed phenylfuranoxybenzamides compounds (**2**), which are structural analogues of **1** and to include the core 5-phenylfuran which has the potential biological activity, all of which have been carried out a study of molecular docking at the site of union of PC190723 to the FtsZ of *S. aureus*, whose solutions indicate that the mode of union and interactions generated in your pocket are favorable for each one of these compounds because they are similar to those of **1** obtained by X-ray crystallography, and docking scores similar in magnitude to **1** pattern related to the volume or lipophilicity by on the polarity of the substituent electron acceptor. Subsequently, the series **3** and **4**, containing the core 5-phenylfuran were synthesized. First the Meerwein arylation reaction of furfural (obtaining serie **3**), followed by reduction of the aldehyde using sodium borohydride (obtaining serie **4**) was used. The antibacterial activity was assessed for all derivatives on coccus Gram-positive and activity was found only for the compound **3c** against *S. aureus* resistant to methicillin, an auspicious result that provides a first step to investigate the development of derivatives with skimming antistaphylococcal activity including strains resistant. Although the **4** series did not present biological activity, different background would indicate that would contribute to the antibacterial activity of the series **2** and to the union in the pocket of the FtsZ.

Key Words: Bacterial Resistance. R&D. FtsZ. Molecular Docking. Antibacterial Activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PROBLEMA MUNDIAL DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS ACTUALMENTE UTILIZADOS.

Los antibióticos están entre los descubrimientos médicos más importantes, y su introducción representa una historia de éxito notable. Son indispensables en prácticamente toda la medicina moderna, donde la cirugía mayor, trasplante de órganos, tratamiento de bebés prematuros y quimioterapia del cáncer, entre otros ejemplos, no podrían ser posibles sin un efectivo tratamiento y prevención de las infecciones bacterianas[1]. Sin embargo, el extenso uso y abuso humano de éstos en la clínica, comunidad, cría de animales y agricultura, ha resultado en una fuerte presión de selección para la generación y propagación de varios mecanismos de resistencia en las bacterias patógenas[2], los cuales se han desarrollado por mutación espontánea o a través de la transferencia de genes de resistencia desde el inicio de la era antibiótica, permitiendo que las bacterias resistentes sean seleccionadas y amplificadas gracias a que el tratamiento antibiótico mata sólo a las bacterias susceptibles[3], reduciendo enormemente las posibilidades de tratar las enfermedades infecciosas efectivamente e incrementando el riesgo de complicaciones y pronósticos fatales para pacientes con infecciones severas.

El reporte técnico[4] de la ECDC/EMEA europea del año 2009 señaló que la emergente y creciente resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema de salud pública mundial, siendo la segunda causa principal de muerte en el mundo[5], y que los esfuerzos deben concentrarse en la disponibilidad de nuevos tratamientos que pudieran ser efectivos contra infecciones causadas por bacterias multirresistentes ya que nos encontramos ante la posibilidad cierta de un futuro cercano sin ellos. Además indica que cerca de unos 25.000 pacientes mueren al año en Europa a causa de infecciones que no se pueden tratar con los antibacterianos disponibles; la resistencia a los antibióticos es alta tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas que causan serias infecciones en humanos y ha alcanzado un 25% o más en muchos Estados miembros de la Unión Europea (UE); y que las infecciones debidas a estas bacterias multirresistentes en la UE resulta en costos extras en cuidados a la salud y pérdida de al menos 1,5 billones de euros por año.

Diversos estudios realizados en otras partes del mundo también señalan que las bacterias resistentes son un grave riesgo para las personas, como uno realizado en Tanzania que mostró que un 43,5% de la mortalidad por infecciones sanguíneas fueron causadas por bacterias Gram-negativas siendo preponderante la resistencia antibiótica[6]. Las infecciones en infantes, como diarrea y neumonía, son la causa del 40% de las muertes en este grupo etáreo en las regiones más desfavorecidas. La diarrea es causada por shigella, salmonella y cólera, y la resistencia a los antibióticos (como ciprofloxacino) se incrementa rápidamente en estos patógenos[3]. En países de bajos recursos, la situación es más preocupante debido a que factores como la pobreza, sobrepoblación, viviendas

extremadamente pobres, malnutrición, comida contaminada y ausencia de agua limpia e higiene crean además las condiciones propicias para la transmisión de patógenos[3].

1.2. DISMINUCIÓN EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (I+D) DE NUEVOS ANTIBACTERIANOS POR PARTE DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.

El aumento en todo el mundo de bacterias resistentes a los tratamientos actualmente utilizados exige la disponibilidad y desarrollo de nuevos antibióticos que sean efectivos. Sin embargo, la tendencia en investigación innovadora de éstos decae a partir de 1970 (Figura 1) debido a que las industrias farmacéuticas deciden cambiar el enfoque de la investigación y desarrollo (I+D) hacia la modificación de las clases de antibióticos existentes, y pese a que tales acciones han sido importantes para mejorar el espectro antibacterial, la farmacocinética y la farmacodinamia, estos antibióticos modificados tienen básicamente el mismo mecanismo acción para atacar a las bacterias que sus predecesores, facilitando que éstas desarrollen resistencia a los fármacos, trayendo como consecuencia una potencial corta durabilidad de los antibióticos desarrollados[7], haciéndolos poco rentables para la industria farmacéutica.

Ésta es una de las razones por las que la cantidad de nuevos agentes antibacterianos desarrollados ha ido disminuyendo a través de los años (Figura 2). Otras razones tienen que ver con que el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos presenta significativos obstáculos. Por mencionar algunos, los costos por I+D farmacéuticos son estimados entre \$400-\$800 millones de dólares por agente aprobado[9], el cual supone una considerable barrera para el desarrollo de un nuevo fármaco en general; El uso mayoritario de los antibacterianos es para terapias de corta duración, pero existen áreas más costo-efectiva para descubrimientos de fármacos en una variedad de niveles como las enfermedades crónicas específicas, donde pacientes pueden tener perspectivas con meses, incluso años, de tratamiento (por ejemplo, para artritis reumatoide o depresión)[10]; El retorno de la inversión dado por las ganancias de las ventas es bastante disminuido debido a las políticas nacionales e internacionales para la regulación en el uso restringido y racionalizado de los antibióticos (en particular los de primera línea), el control del precio y la expiración de las patentes que resultan en la proliferación de genéricos de bajo precio[10].

En los últimos 40 años, sólo 3 antibióticos administrados en forma sistémica (quinupristina-dalfopristina, linezolid, daptomicina), incluyendo dos de las nuevas clases (oxazolidinonas y lipopéptidos) han sido promovidos en la UE para tratar infecciones causadas por bacterias Gram-positivo multirresistentes, mientras que los otros antibióticos administrados sistémicamente, ninguno para bacterias Gram-negativas multirresistentes, que han alcanzado el mercado de la UE durante este periodo pertenecen a las clases existentes de antibióticos, y no son eficaces contra la mayoría de los organismos ya resistentes a otros agentes en la misma clase[4].

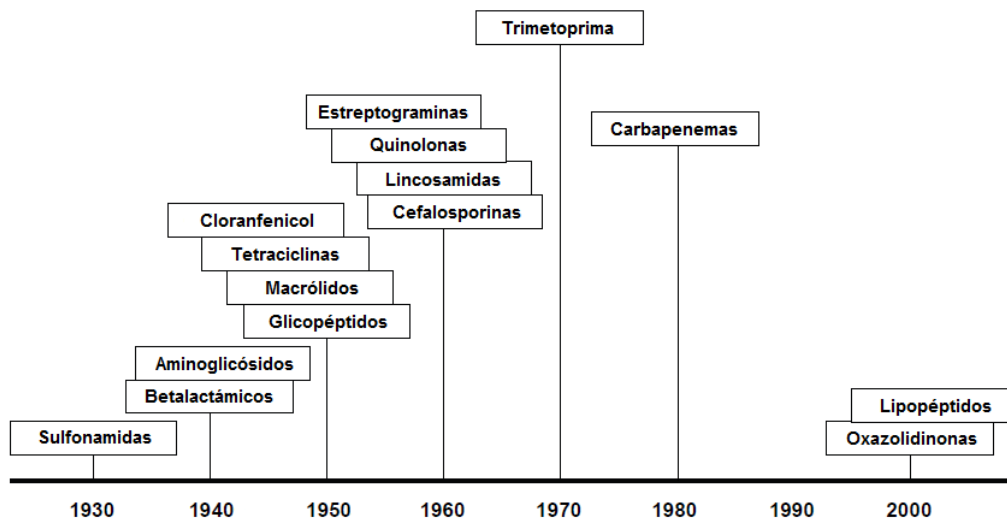


Figura 1. Descubrimiento de nuevas clases de agentes antibacterianos[7].

Se requiere, por lo tanto, que la industria farmacéutica tenga los incentivos suficientes como para regresar a la investigación de nuevos antibióticos con nuevos mecanismos de acción. Esto requiere medidas concretas, incluyendo reducción en los costos de I+D así como también asegurar el uso prolongado de los productos[7].

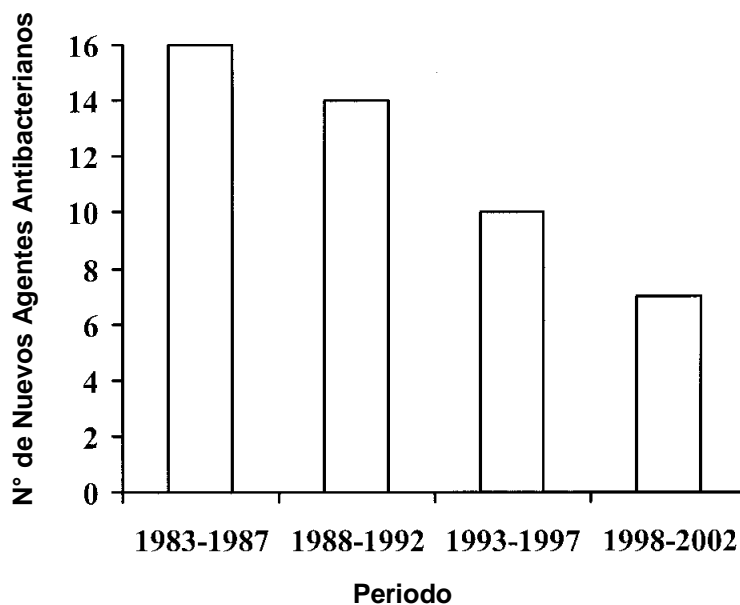


Figura 2. Nuevos agentes antibacterianos aprobados en los Estados Unidos, 1983-2002, por un periodo de 5 años[8].

1.3. NUEVOS BLANCOS FARMACOLÓGICOS PARA DESARROLLAR ANTIBACTERIANOS CON NOVEDOSOS MECANISMOS DE ACCIÓN: FTSZ Y LA DIVISIÓN CELULAR BACTERIANA.

De acuerdo con lo anteriormente mencionado, hoy en día surge la necesidad urgente de desarrollar agentes antibacterianos con nuevos mecanismos de acción efectivos, y de promover la investigación hacia nuevos blancos moleculares. En los recientes años, la división celular bacteriana ha atraído considerablemente la atención como un potencial objetivo para el tratamiento antibiótico.

La división celular en bacterias se consigue a través del divisoma, un complejo macromolecular el cual es altamente dinámico y está caracterizado por un ensamblaje tiempo-dependiente de proteínas específicas de división celular[11]. La formación del divisoma es llevado a cabo por la proteína FtsZ (del inglés *Filamentous Temperature-Sensitive Z*) cuyo papel es fundamental porque inicia el proceso al polimerizarse en una estructura conocida como anillo Z en medio de la célula, marcando el sitio de división y proporcionando un centro para el reclutamiento subsecuente de las proteínas esenciales para llevarla a cabo[12].

La FtsZ se encuentra conservada en casi todas las bacterias y es un análogo procariótico de la tubulina eucariótica[12]. Los genes que la codifican fueron denominados genes “*Fts*” (del inglés *Filament-forming temperature-sensitive*) y fueron confirmados por análisis mutacional en 1960, pero no fue sino hasta 1991 que se descubrió su función en la división celular[13]. Estructuralmente, la FtsZ (Figura 3) está compuesta de 2 dominios plegados independientemente y una hélice central (H7). Uno de los dominios globulares es el N-terminal enzimático que forma el sitio de unión de nucleótidos, como trifosfato de guanosina (GTP); y un dominio globular C-terminal, cuyo residuo del extremo, ubicado en la base del dominio, forma el sitio de unión para muchas proteínas de división. A continuación de H7, está el lazo sinérgico o T7 catalítico[14]. Su estructura y estilo de plegamiento es muy similar a la de la β -tubulina (que también une GTP), pero sin embargo, la secuencia de alineamiento basado en las estructuras de ambas difiere significativamente, ya que los residuos comunes para α -tubulina, β -tubulina y FtsZ constituyen cerca del 7% de la secuencia de tubulina, y la identidad entre las tres secuencias, considerando sólo el dominio de unión de nucleótidos, es de un 10%[15], lo que podría sustentar la factibilidad de desarrollar agentes antibacterianos selectivos para FtsZ y con pocos efectos adversos. Además, ciertas mutaciones que alteren la forma del anillo Z en la célula, por ejemplo produciendo estructuras helicoidales, tienen un efecto similar considerable sobre la morfología de la división celular[16].

Ahora bien, durante la citocinesis celular bacteriana (Figura 4) la FtsZ auto-activa la actividad GTP-asa al asociarse dos monómeros unidos a GTP uniendo el lazo T7 de la subunidad superior en el bolsillo de unión de nucleótidos de la unidad inferior[17] para crear el sitio activo que hidroliza el GTP a GDP, tras lo cual se irán incorporando más subunidades de FtsZ unidos a GTP de la misma manera, siendo el GTP hidrolizado en los

nuevos sitios de hidrólisis generados, formándose polímeros de protofilamentos de FtsZ[18] que darán lugar al anillo Z en medio de la región bacteriana.

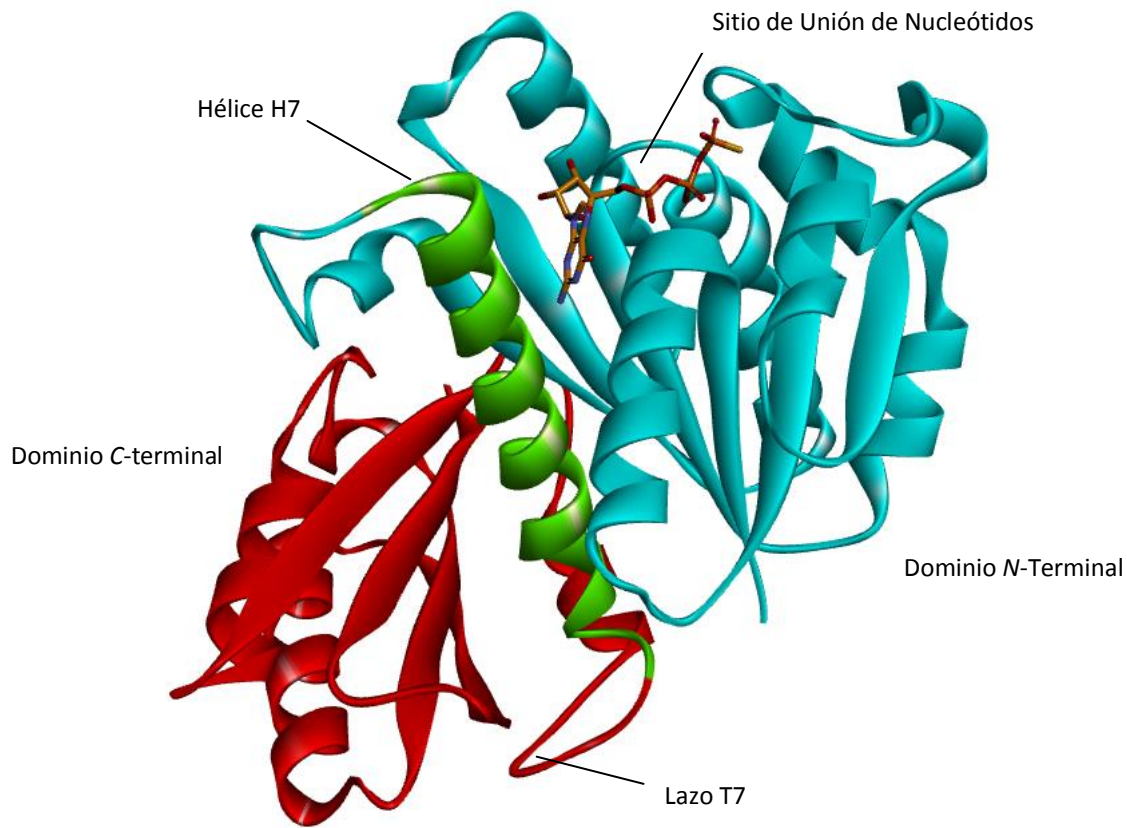


Figura 3. Estructura cristalizada del monómero de FtsZ de *Bacillus subtilis* unido a GTP-γ-S (Código PDB = 2RHO).

Su estructura es altamente dinámica porque se ensambla de manera rápida[19], y continuamente está remodelándose a sí mismo a través de intercambios de subunidades monoméricas entre el anillo y el citoplasma[20]. Así mismo, el anillo Z provee un centro de reclutamiento de un cierto número de proteínas de división celular esenciales para el éxito de este proceso, formar el divisoma y anclarse a la membrana[14], siendo la más importante FtsA, que tiene interacción con el residuo del dominio C-terminal de FtsZ[21]. Finalmente, el anillo Z y las proteínas reclutadas (como divisoma) organizan coordinadamente la constricción anular de la membrana citoplasmática, pared celular y cualquier otra capa celular presente, formando el *septum* y terminando con el proceso de división celular bacteriano[22], donde se sugiere un modelo en el cual los polímeros del anillo Z generan la fuerza de constricción de la membrana a través de ciclos iterativos conducidos por hidrólisis de GTP de polimerización, unión a la membrana, cambios

conformacionales de los protofilamentos, de lineales a curvos; despolimerización e intercambio de nucleótidos[23].

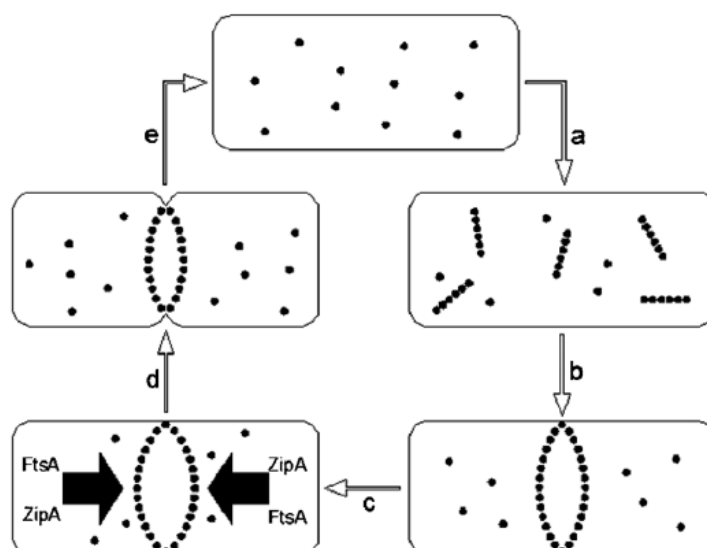


Figura 4. Ensamblaje de FtsZ en el proceso de división celular bacteriano. a) Polimerización de FtsZ en protofilamentos; b) Auto-ensamblaje de FtsZ al anillo Z en la mitad celular; c) Reclutamiento de otras proteínas de división; d) Constricción del anillo Z y formación del *septum*; e) Desensamblaje del anillo Z y división celular[24].

1.4. DISEÑO Y DESARROLLO DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE FTSZ.

La función primordial que cumple la FtsZ en la división celular bacteriana, y las cualidades estructurales distintivas que posee, la hacen un blanco biológico atractivo para el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antibacteriana.

Los compuestos químicos que inhiben funcionalmente a la FtsZ en bacterias, traen como consecuencia una falla en el proceso de división, causando filamentación en bacilos o morfología esférica en cocos, lo que eventualmente es seguido por apoptosis[25]. Existen más de 40 moléculas de diversa potencia y especificidad que se pueden clasificar en 6 grupos químicos: derivados de Guanina, Ácidos carboxílicos, Fenoles y Polifenoles, derivados de Benzamida, *N*-heterociclos y otros[26], tal y como se muestra en la Figura 5 con algunos ejemplos.

El origen de estos compuestos es variado: HTS (del inglés *High-Throughput Screening*) de bibliotecas de compuestos químicos, descubrimiento a partir de productos naturales, compuestos antibacterianos previamente conocidos, derivados de inhibidores de Tubulina y compuestos sintéticos desarrollados específicamente para inhibir FtsZ, por mencionarse

algunos. Muchos de ellos se obtuvieron sobre la base de un diseño racional de inhibidores selectivos de FtsZ a través de estudios *in silico* con herramientas computacionales que permitieran realizar modelación molecular de la estructura 3D de FtsZ en complejo o no con compuestos químicos. Dentro de estas herramientas se encuentra el *Docking* Molecular o Acoplamiento Molecular inducido, un método que permite predecir el posicionamiento, las conformaciones y las orientaciones de grupos químicos de moléculas pequeñas dentro de alguna cavidad determinada de una macromolécula, logrando visualizar las interacciones intermoleculares en el sitio de unión y cuantificar la energía de unión receptor-ligando[27]. En general, los estudios de *docking* tienen 2 objetivos: (i) modelación estructural precisa y (ii) correcta predicción de la actividad.

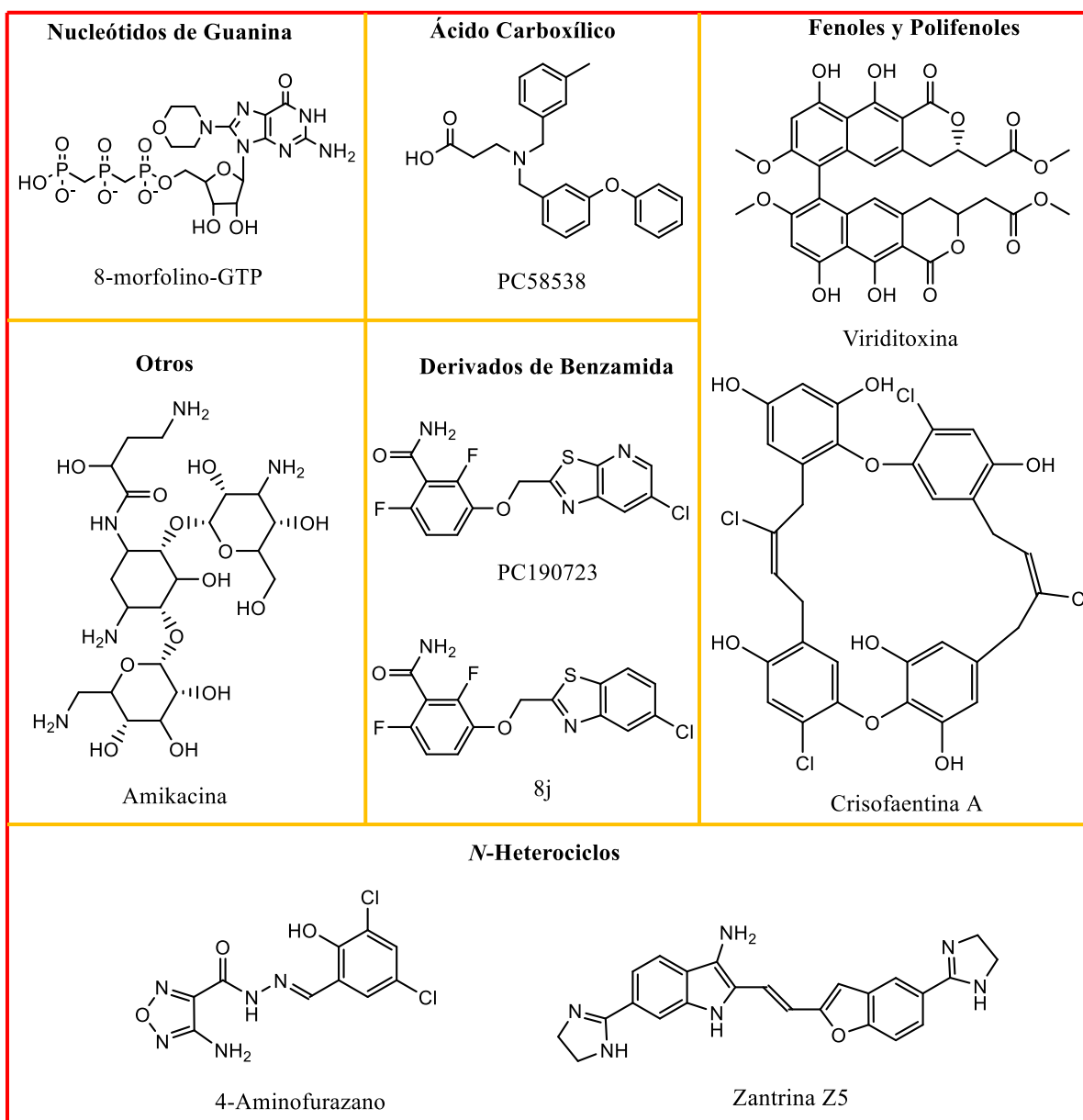


Figura 5. Ejemplos de compuestos inhibidores de FtsZ de cada grupo químico.

Las estructuras cristalográficas disponibles de FtsZ (Arqueas, Gram-positivos, Gram-negativos) en complejo con algunos compuestos inhibidores de FtsZ han permitido visualizar que estos se unen en el sitio de unión de nucleótidos y en la hendidura interdominio (Figura 6), mientras que estudios de *docking* molecular realizados en estas cavidades con otros inhibidores de FtsZ han mostrado resultados positivos[26]. Ambas regiones están relacionadas con la actividad GTP-asa y la polimerización, las cuales resultan fundamentales para la formación y contracción del anillo Z, por lo que la alteración en cualquiera de ellas conllevaría a la inhibición de la funcionalidad de FtsZ, conduciendo a la muerte bacteriana. Sin embargo, pese a los resultados promisorios que han mostrado los estudios *in silico* de *docking* molecular y selección virtual de una gran biblioteca de compuestos químicos para desarrollar inhibidores selectivos de FtsZ, no ha habido una buena correlación con sus efectos sobre cepas bacterianas en ensayos biológicos estandarizados[26], donde además es escasa la cantidad de información que existe respecto de la relación estructura-actividad (SAR) de estos compuestos.

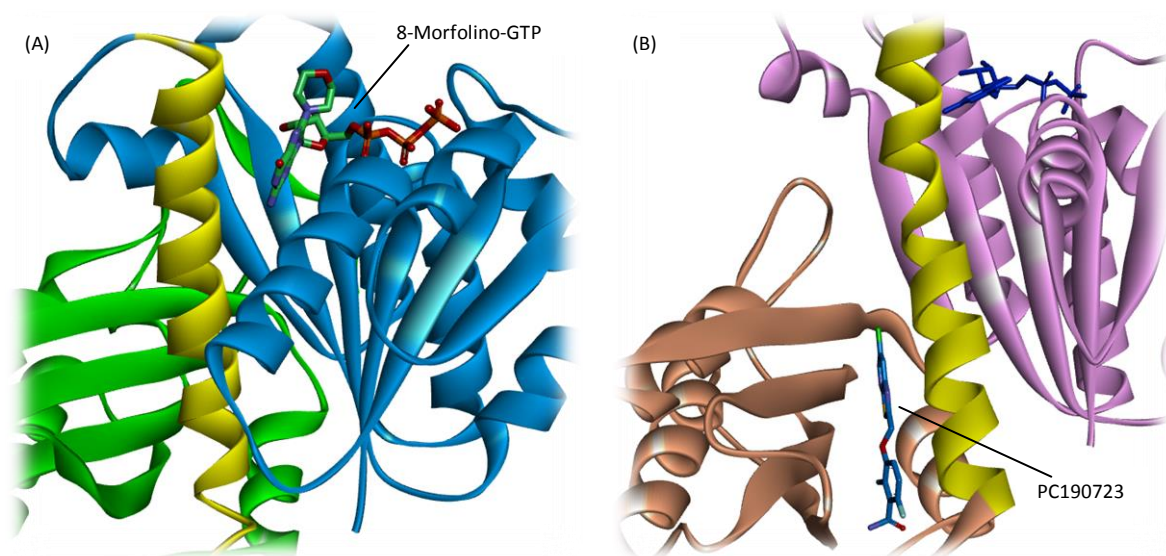


Figura 6. Complejos FtsZ-Compuesto Cristalográficos. (A) Compuesto 8-morfolino-GTP ligado en el sitio de unión de nucleótidos de FtsZ de *Aquifex aeolicus* (Código PDB = 2R75). (B) Compuesto PC190723 ligado a la hendidura interdominio de FtsZ de *Staphylococcus aureus* (Código PDB = 3VOB).

PC190723 (Figura 8B), un derivado benzamídico, fue el primer inhibidor de FtsZ que mostró ser eficaz en un modelo *in vivo* de infección, protegiendo a ratones de una dosis letal de *Staphylococcus aureus*[25]. Ha demostrado ser un potente bactericida selectivo contra *Bacillus subtilis* así como también contra varias cepas y especies de Estafilococos, incluyendo *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y *S. aureus* multi-droga-resistente (SAMDR), en una concentración inhibitoria mínima (CIM) en el rango de 0,5 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$,

pero ha sido inactivo contra otras bacterias Gram-positivas y Gram-negativas patógenas. No inhibió levaduras ni hepatocitos humanos mostrando baja toxicidad, y ensayos *in vitro* demostraron que PC190723 puede inhibir la actividad GTP-asa de FtsZ de una forma concentración-dependiente con una concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de 55 ng/mL[25].

Este compuesto fue desarrollado a partir de 3-metoxi-benzamida (3-MBA, Figura 8A) el cual tiene una débil actividad antibacteriana contra *B. subtilis* con una CIM de 4.000 µg/mL, pero que debido a su bajo peso molecular puede fácilmente penetrar las células bacterianas y unirse a FtsZ con alta eficiencia como ligando[28], lo que sirvió como punto de partida para el descubrimiento de fármacos antibacterianos. Las exploraciones de la relación estructura-actividad de 3-MBA hacia PC190723 indicaron que los grupos amida y éter en posición 3 son críticos para la inhibición bacteriana; la sustitución con pequeños halógenos como flúor en las posiciones 2 y 6 de la benzamida confieren mayor potencia, y que el reemplazo de 3-alquilo por sustituyentes con una variedad de grupos heteroarilmetoxi mejoraban tanto la actividad antibacteriana como las propiedades ADME, optimizando una potente y selectiva actividad antiestafilocócica por inhibición de FtsZ[29,30].

La Figura 6B muestra a la FtsZ de *S. aureus* en complejo cristalizado con PC190723. Éste se encuentra en una cavidad de carácter hidrofóbico entre el dominio C-terminal y la Hélice H7, cerca del lazo T7, donde tanto la mitad 2,6-difluoro-benzamida como la mitad tiazolopiridina presentan interacciones importantes, mientras que el puente de éter funciona como un espaciador que coloca apropiadamente a las dos mitades en el sitio de unión[31]. La unión del compuesto en esta hendidura trae como consecuencia el movimiento de la hélice H7 y la reorientación de los dominios N- y C-terminal, lo que conlleva a un cambio conformacional en la FtsZ desde un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad que permite estabilizar el ensamblaje polimérico, reflejándose en polimerización a concentraciones más bajas que la concentración crítica[32]. Esto resulta en la inducción y mejora del ensamblaje cooperativo de FtsZ en filamentos, paquetes y otros condensados; la estabilización de los protofilamentos poliméricos, y la inhibición del comportamiento dinámico funcional *in vivo* de los polímeros de FtsZ, en forma análoga a como lo hace Taxol sobre la tubulina[33], suprimiendo la funcionalidad del anillo Z y la división bacteriana.

Cabe destacar que PC190723 tiene una balanceada actividad antibacteriana, unión a proteína plasmática (85,4%) y estabilidad metabólica (100 ± 10,3% de remanencia después de 24 horas), además de una baja velocidad de depuración renal en hepatocitos y en microsomas (9,51 ± 1,6 µL/min/10⁶ células y <15 µL/min/mg respectivamente), demostrando que tiene propiedades farmacocinéticas similares a las de un fármaco, y agregando que es eficaz en un modelo *in vivo* de infección estafilocócica[30], sin duda queda considerado a ser optimizado como alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones por estafilococos.

1.5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS 5-FENILFURANO.

En la literatura científica se han reportado compuestos con diversas actividades biológicas que en su estructura química tienen el núcleo químico 5-fenilfurano, algunos de los cuales se describen a continuación y se pueden observar en la Figura 7: (i) Derivados de furano con mitad rodanina (A) que presentan actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas incluyendo cepas clínicas multirresistentes con valores de CIM en el rango de 2 a 16 $\mu\text{g/mL}$, baja citotoxicidad y cuyo mecanismo de acción se desconoce[34]. (ii) Análogos neonicotinoides con grupos 5-fenilfurano en su estructura (B) que presentan significativa actividad insecticida sobre pulgón del frijol (*Aphis craccivora*), pulgón del algodón (*Aphis gossypii*), y pulgón pardo (*Nilaparvata lugens*) con una mejorada estabilidad al agua y a la luz debido a su gran sistema de conjugación[35]. (iii) Series de arilfuranos basados en 2,5-bis-(4-acetamidofenil)furano (C) que muestran actividad inhibitoria *in vitro* sobre la enzima tripanotona reductasa del parásito *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas[36]. (iv) Una serie de *N*-aril-3-alquilidenpirrolinonas con derivados 5-fenilfurano (D) en su estructura química como potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad autosómica recesiva de Niemann-Pick tipo C (NPC), que causa un desorden en el almacenamiento de los lípidos, presentando actividad biológica al disminuir la captación de LDL e incrementar el eflujo de colesterol en células mutantes NPC1 y normales[37]. (v) Derivados 2-heteroaril-1,3-ceto-enol (E) preparados por reordenamiento de Claisen como nuevos inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa con potencial actividad herbicida[38]. (vi) Derivados 5-fenilfurano de RTC14 que inducen la lectura de codones de terminación prematuros como potenciales nuevos fármacos para la Ataxia-telangiectasia, enfermedad neurodegenerativa recesiva autosómica que afecta al cerebelo, restaurando la funcionalidad de la proteína quinasa ATM la cual se encuentra deficitaria[39].

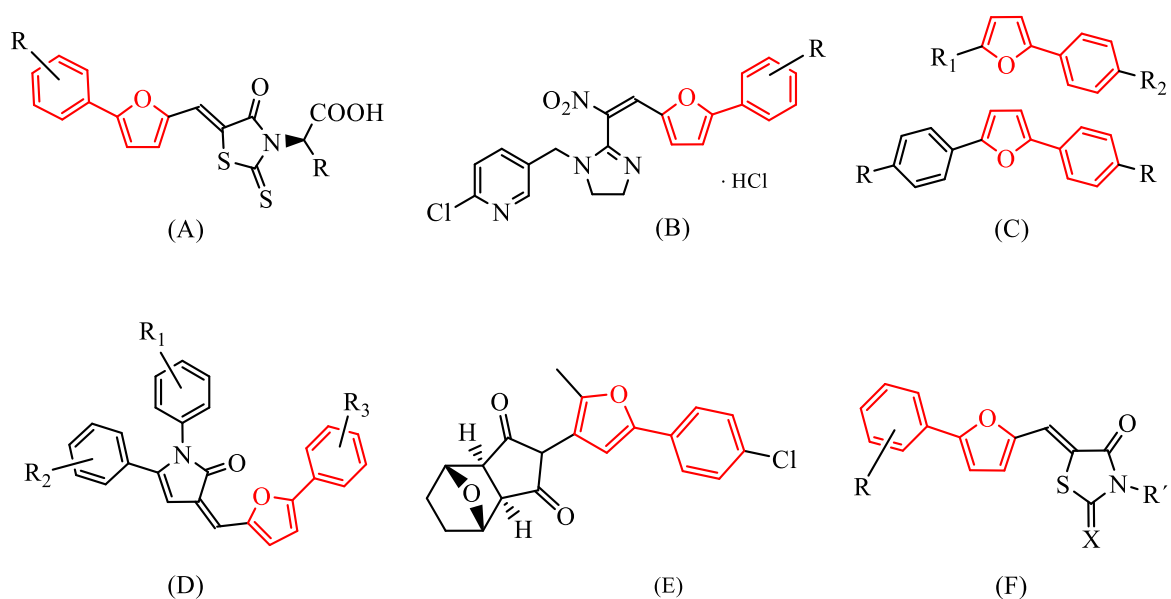


Figura 7. Estructuras químicas de derivados 5-fenilfurano.

Dada la relevancia científica y clínica que tiene PC190723 por todo lo anterior expuesto, y teniendo presente el potencial del núcleo químico 5-fenilfurano de generar derivados con actividad biológica, en el presente trabajo se diseñaron compuestos análogos a su estructura (Figura 8C, compuestos **2a-e**) de núcleo fenilfuranoxibenzamida sin átomos de flúor en la posiciones 2 y 6 de la benzamida, y variando el sustituyente de la posición 4 del benceno con grupos aceptores de electrones, a los cuales se les hará un estudio de *docking* molecular para analizar las interacciones y su modo de unión en el bolsillo hidrofóbico de FtsZ comparándolo al de PC190723 como referencia. Posteriormente se procederá a sintetizar una parte de la estructura química de estos compuestos: el núcleo 5-fenilfurano, variando la sustitución en la posición 2 del furano por hidroximetilo o formilo, y en la posición 4 del benceno por sustituyentes electroaceptores, con el fin de obtener series de 5-(4R-fenil)-furfurales y de [5-(4R-fenil)-2-furil]metanol (Figura 8D, compuestos **3a-e** y **4a-e** respectivamente), a los cuales se les evaluará su actividad antibacteriana en ensayos biológicos sobre cepas bacterianas Gram-positivas de relevancia clínica a fin de poder estudiar la relación estructura-actividad y analizar si contribuyen en alguna medida a la actividad de los compuestos **2a-e**, tal y como lo hace la ya descrita porción 3-MBA.

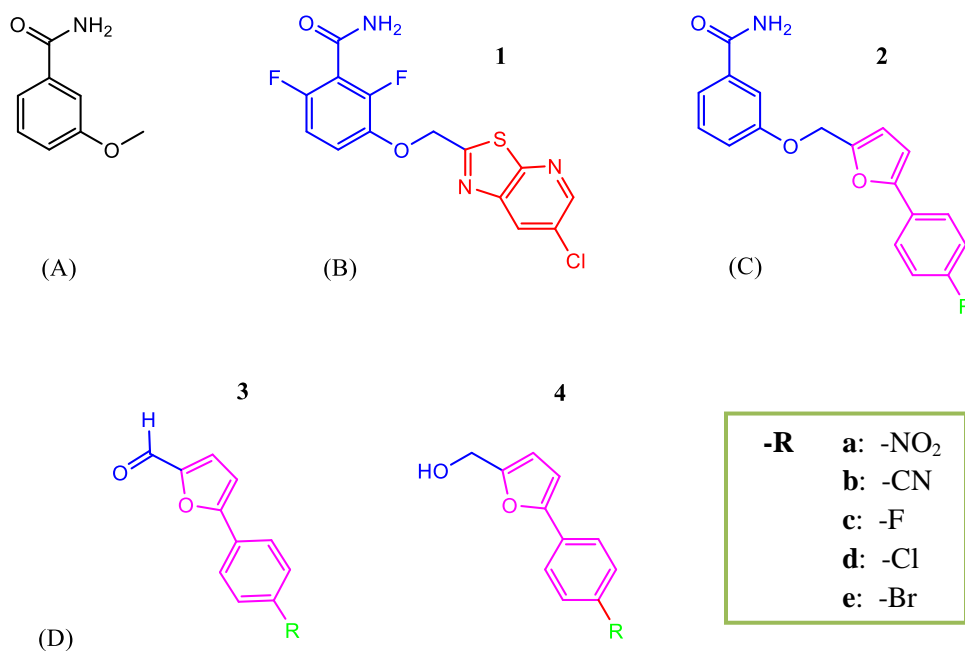


Figura 8. Estructuras químicas de compuestos. (A) 3-metoxi-benzamida. (B) PC190723. (C) Compuestos 2a-e. (D) Compuestos 3a-e y 4a-e.

2. HIPÓTESIS

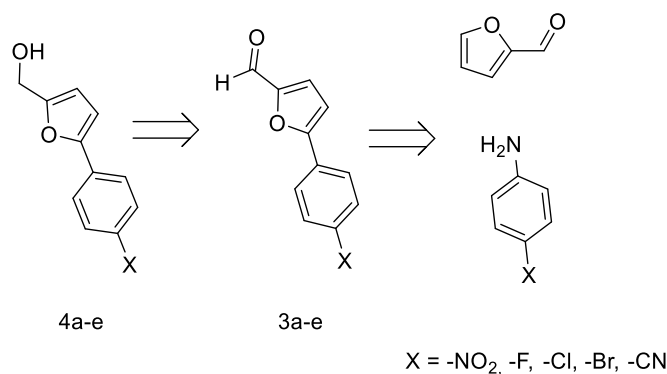
Los derivados de núcleo químico 5-fenilfurano tienen actividad antibacteriana contra las cepas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina, contribuyendo a la potencia de los compuestos fenilfuranoxibenzamidas, los cuales presentan interacciones y acoplamiento favorables en la cavidad hidrofóbica de la FtsZ.

3. OBJETIVO GENERAL

Realizar un *docking* molecular a una serie de fenilfuranoxibenzamidas en el sitio de unión de PC190723 a FtsZ, y sintetizar derivados de núcleo químico 5-fenilfurano para evaluar su actividad antibacteriana frente a cepas Gram-positivas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar un *docking* molecular de los compuestos **1** y **2a-e** en FtsZ de *S. aureus* teniendo como referencia al complejo cristalográfico del ligando PC190723 con FtsZ de *S. aureus*.
2. Realizar un análisis post-*docking* considerando los puntajes obtenidos por cada compuesto, y comparando las conformaciones obtenidas como soluciones del *docking* molecular y las interacciones intermoleculares en el sitio activo resultantes para cada uno de ellos.
3. Sintetizar los compuestos **3a-e** y **4a-e** a partir de furfural y diferentes anilinas comerciales.



4. Caracterizar los compuestos sintetizados mediante ¹H-RMN y ¹³C-RMN.
5. Medir la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los compuestos sintetizados sobre las cepas prototipo Gram-positivas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina.

5. MATERIALES Y EQUIPOS

5.1 MATERIALES.

Solventes

Se utilizaron solventes de calidad HPLC Sigma-Aldrich[®] y Merck[®] (p.a.): acetato de etilo y éter de petróleo para cromatografía en capa fina y cromatografía preparativa en columna de gel de sílice flash; etanol (≥99,8%), tetrahidrofurano, acetona, incluyendo el acetato de etilo, como disolventes de los compuestos.

Reactivos

- *p*-Bromo-anilina (Aldrich 97%)
- *p*-Nitro-anilina (Aldrich ≥99%)
- *p*-Cloro-anilina (Aldrich 98%)
- *p*-Amino-benzonitrilo (Aldrich 98%)
- *p*-Fluoro-Anilina (Aldrich 99%)
- Furfural (Aldrich 99%)
- Bromuro Cuproso, CuBr (Aldrich 98%)
- Nitrito de Sodio, NaNO₂ (Aldrich ≥97.0%)
- Ácido Clorhídrico fumante, HCl (Merck 37%)
- Borohidruro de Sodio, NaBH₄ (Aldrich 98%)

Insumos para Cromatografía en columnas y en capa fina

En la purificación de los compuestos sintetizados se utilizó gel de sílice flash (Silicagel 60, 0,015-0,040 mm, Merck) para cromatografía en columnas preparativas, y TLC Silicagel 60 (Merck) para cromatografía en capa fina.

Insumos para los Ensayos Biológicos

El antibiótico patrón gentamicina fue adquirido desde Sigma-Aldrich[®]. El medio de cultivo Mueller Hinton fue adquirido desde Lab-Diagnostic[®], preparado según recomendación del fabricante. La tripticasa de soya con 5 % sangre cordero (AES Chemunex) fue obtenida de Lab-Diagnostic[®]. Las placas de agar McConkey (AES Chemunex) fueron obtenidas de Lab-Diagnostic[®]. Las placas de cultivo de 96 pocillos estériles de fondo U (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) fueron adquiridas desde Fermelo Biotec[®].

5.2 EQUIPOS.

Los análisis de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (^1H RMN y ^{13}C RMN) se realizaron en un espectrómetro Bruker modelo Advance DRX-300. Se utilizó dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) al 99,9% y cloroformo deuterado (CDCl_3) al 99,9% para estos análisis. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). El estándar interno que se utilizó para la determinación de los espectros fue tetrametilsilano (TMS).

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. SÍNTESIS DE COMPUESTOS QUÍMICOS.

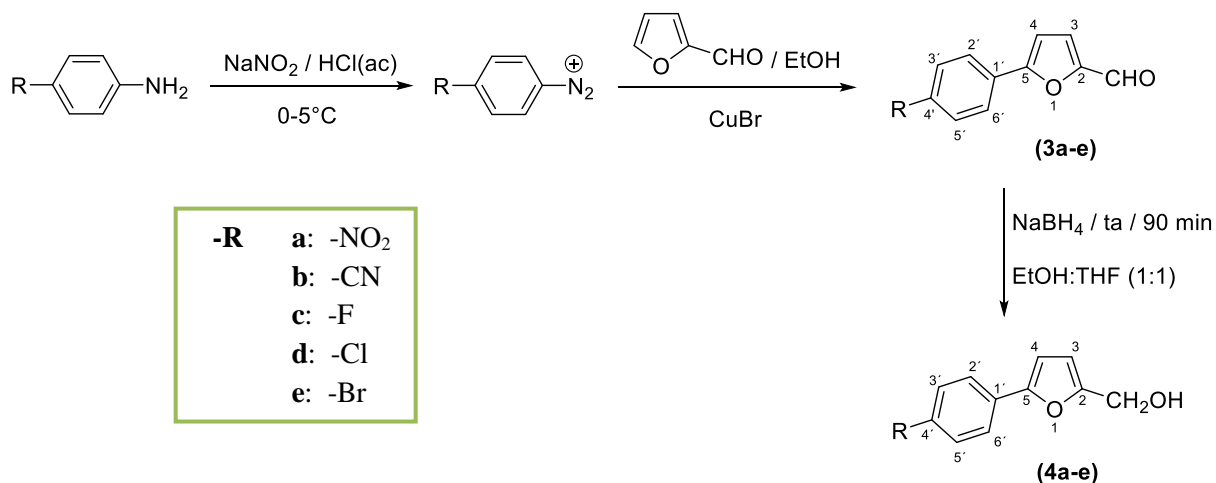


Figura 9. Diagrama general de síntesis de los 5-fenilfuranos.

6.1.1. PREPARACIÓN DE LOS ARILFURFURALES (3): MÉTODO GENERAL.

Preparación de las sales de diazonio.

En un vaso de precipitado de 400 mL se disuelven 0,1 mol de la anilina en 25 mL de ácido clorhídrico concentrado y 13 mL de agua destilada. Se agita y se calienta para ayudar a la disolución. Cuando todo se encuentra disuelto, se enfría y precipita el clorhidrato de la anilina.

Se agita la solución y, a una temperatura entre 0 y 5°C, se añaden gota a gota 0,1 mol de nitrito de sodio disueltos en 20 mL de agua. Después de terminada la adición, se continúa agitando a una temperatura inferior a 5°C durante 10 minutos. Se filtra rápidamente a vacío evitando que la temperatura exceda los 10°C (enfriar el kitasato en baño de hielo) y se procede a la arilación.

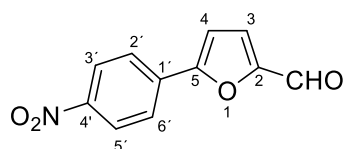
Arilación del furfural.

Al vaso de precipitado que contiene la solución fría de la sal de diazonio se le añaden agitando 8,3 mL (0,1 mol) de furfural recién destilado disueltos en 16 mL de etanol o

acetona. Posteriormente se añaden, gota a gota y bajo agitación, 0,01 mol de CuBr disueltos en 10 mL de agua. La temperatura se eleva lentamente a 30°C. Se agita a temperatura ambiente durante 4 horas y se deja en reposo hasta el día siguiente. El precipitado formado se filtra a vacío y se procede a su recrystalización.

Los espectros $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ de los compuestos sintetizados **3a-e** y **4a-e** se encuentran en el anexo.

Síntesis del 5-(*p*-nitrofenil)-furfural (**3a**).



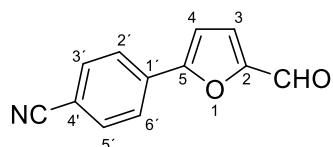
PM = 217,18 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando 0,1 mol (13,8 g) de *p*-nitroanilina. El 5-(*p*-nitrofenil)-furfural obtenido se recrystaliza

de una mezcla de acetona:etanol (3:1) utilizando carbón activado.

Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{O}_4\text{N}$. Sólido amarillo. Rendimiento: 90%. $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) δH 7,05 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H, H4); 7,37 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H, H3); 7,98 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H2' y H6'); 8,32 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H3' y H5'); 9,74 (s, 1H, CHO). $^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-}d_6$) δC 110,14; 122,54; 123,12(2x); 124,68(2x); 133,45; 146,45; 151,63; 154,85; 176,48.

Síntesis del 4-(5-formil-2-furil)benzoniitrilo (**3b**).



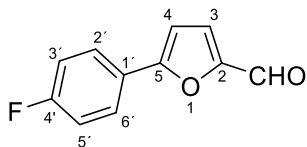
PM = 197,19 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando 0,03 mol (3,5 g) de *p*-aminobenzoniitrilo. El 4-(5-formil-2-furil)benzoniitrilo obtenido se recrystaliza de etanol utilizando carbón activado. Al filtrado calentado a ebullición

se le adiciona agua caliente hasta opalescencia, dejando precipitar el sólido por enfriamiento.

Fórmula molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$. Sólido amarillo. Rendimiento: 68%. $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) δH 6,99 (s, 1H, H4); 7,35 (s, 1H, H3); 7,73 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H3' y H5'); 7,91 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H2' y H6'); 9,71 (s, 1H, CHO). $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3) δC 110,04; 112,77; 118,28; 122,74; 125,52(2x); 132,75(2x); 132,82; 152,81; 156,63; 177,45.

Síntesis del 5-(*p*-fluorofenil)-furfural (3c).



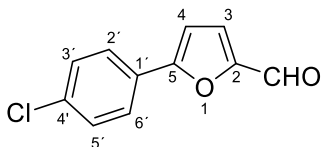
PM = 190,17 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando 0,1 mol (11,1 g) de *p*-fluoroanilina. El 5-(*p*-fluorofenil)-furfural obtenido se recristaliza de etanol utilizando carbón activado. Al filtrado calentado a ebullición se le adiciona agua caliente hasta

opalescencia, dejando precipitar el sólido por enfriamiento.

Fórmula molecular: C₁₁H₇O₂F. Sólido café. Rendimiento: 87%. ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δH 6,78 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H, H₄); 7,13 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H, H_{3'} y H_{5'}); 7,31 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H, H₃); 7,80 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H, H_{2'} y H_{6'}); 9,63 (s, 1H, CHO). ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δC 107,30; 116,1 (d, *J* = 22,0 Hz, 2C, C_{3'} y C_{5'}); 123,52; 125,30 (d, *J* = 2,9 Hz, 1C, C_{1'}); 127,24 (d, *J* = 8,8 Hz, 2C, C_{2'} y C_{6'}); 151,99; 158,41; 163,43 (d, *J* = 251,0 Hz, 1C, C_{4'}); 177,04.

Síntesis del 5-(*p*-clorofenil)-furfural (3d).



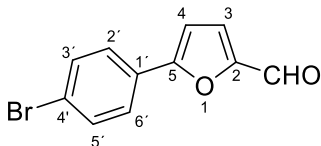
PM = 206,62 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando 0,1 mol (12,7 g) de *p*-cloroanilina. El 5-(*p*-clorofenil)-furfural obtenido se recristaliza de etanol utilizando carbón activado. Al

filtrado calentado a ebullición se le adiciona agua caliente hasta opalescencia, dejando precipitar el sólido por enfriamiento.

Fórmula molecular: C₁₁H₇O₂Cl. Sólido amarillo. Rendimiento: 89%. ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δH 6,83 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H, H₄); 7,32 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H, H₃); 7,42 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H_{3'} y H_{5'}); 7,75 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H_{2'} y H_{6'}); 9,65 (s, 1H, CHO). ¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δC 107,93; 123,37; 126,46(2x); 127,42; 129,22(2x); 135,62; 152,11; 158,16; 177,16.

Síntesis del 5-(*p*-bromofenil)-furfural (3e).



PM = 251,08 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando

0,1 mol (17,2 g) de *p*-bromoanilina. El 5-(*p*-bromofenil)-furfural obtenido se recristaliza de etanol utilizando carbón activado. Al filtrado calentado a ebullición se le adiciona agua caliente hasta opalescencia, dejando precipitar el sólido por enfriamiento.

Fórmula molecular: C₁₁H₇O₂Br. Sólido café. Rendimiento: 87%. ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δH 6,85 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H,

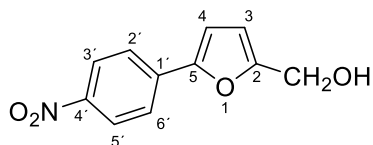
H4); 7,32 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H, H3); 7,58 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H2' y H6'); 7,69 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H3' y H5'); 9,66 (s, 1H, CHO).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δC 108,01; 123,51; 123,87; 126,62(2x); 127,77; 132,13(2x); 152,03; 158,15; 177,20.

6.1.2. PREPARACIÓN DE LOS ALCOHOLES (4) POR REDUCCIÓN DE LOS ALDEHÍDOS (3): MÉTODO GENERAL.

En un balón de 500 mL se disuelven 1 equivalente de aldehído (3) en 100 mL de etanol absoluto y cantidad suficiente de THF hasta completa disolución, manteniendo agitación. Luego se agregan 2,4 equivalentes de NaBH_4 , y se deja agitando durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se elimina la mitad del disolvente a presión reducida, y la mezcla resultante se hidroliza con 300 mL de agua destilada. La solución acuosa se extrae cuatro veces con porciones de 200 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se seca con MgSO_4 y el solvente es removido bajo presión reducida. El residuo es purificado por columna cromatográfica usando gel de sílice flash.

Síntesis de [5-(4-nitrofenil)-2-furil]metanol (4a).



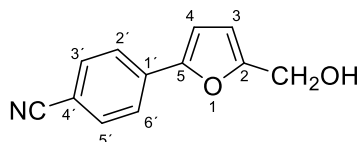
PM = 219,20 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando 5,53 mmol (1,2 g) de 5-(*p*-nitrofenil)-furfural y 13,64 mmol (516 mg) de NaBH_4 , y se purificó por cromatografía en sílica

flash utilizando como fase móvil una mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (4:1).

Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_4\text{N}$. Sólido naranja. Rendimiento: 86%. $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) δH 4,63 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, CH_2); 4,86 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, OH); 6,44 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H, H3); 6,88 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H, H4); 7,81 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H2' y H6'); 8,22 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H3' y H5'). $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3) δC 56,22; 109,24; 109,45; 123,13(2x); 123,65(2x); 135,93; 145,47; 150,24; 156,79.

Síntesis de 4-[5-(hidroximetil)-2-furil]benzonitrilo (4b).



PM = 199,21 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando

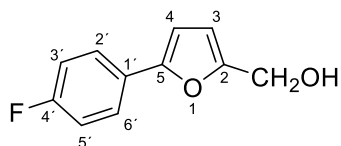
6,08 mmol (1,2 g) de 4-(5-formil-2-furil)benzonitrilo y 14,27 mmol (540 mg) de NaBH_4 , y se purificó por cromatografía en sílica flash utilizando como fase móvil una mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (4:1).

Fórmula molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$. Sólido amarillo pálido. Rendimiento: 76%. $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) δH 2,79 (s, 1H, OH); 4,67 (s, 2H, CH_2); 6,42 (d, $J = 3,4$

Hz, 1H, H3); 6,74 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H, H4); 7,59 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H3' y H5'); 7,68 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H2' y H6'). $^{13}\text{C-NMR}$:

(100 MHz, CDCl_3) δC 57,16; 108,84; 109,83; 110,10; 118,76; 123,65(2x); 132,33(2x); 134,32; 151,48; 155,37.

Síntesis de [5-(4-fluorofenil)-2-furil]metanol (4c).



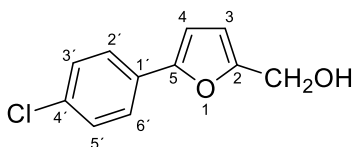
PM = 192,19 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando 6,84 mmol (1,3 g) de 5-(*p*-fluorofenil)-furfural y 14,86 mmol (562 mg) de NaBH_4 , y se purificó por cromatografía en sílica flash utilizando como fase móvil una

mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (7:1).

Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_2\text{F}$. Sólido amarillo pálido. Rendimiento: 68%. $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) δH 1,94 (s, 1H, OH); 4,65 (s, 2H, CH_2); 6,37 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H, H3); 6,53 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H, H4); 7,07 (t, $J = 8,8$ Hz, 2H, H3' y H5'); 7,63 (dd, $J = 5,3, 8,8$ Hz, 2H, H2' y H6'). $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3) δC 57,52; 105,28; 109,96; 115,61 (d, $J = 22,0$ Hz, 2C, C3' y C5'); 125,49 (d, $J = 8,1$ Hz, 2C, C2' y C6'); 126,97 (d, $J = 3,4$ Hz, 1C, C1'); 153,12; 153,49; 162,13 (d, $J = 247,2$ Hz, 1C, C4').

Síntesis de [5-(4-clorofenil)-2-furil]metanol (4d).



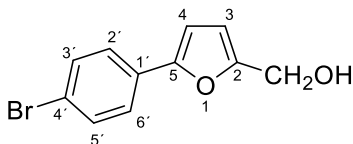
PM = 208,64 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando 4,84 mmol (1 gramo) de 5-(*p*-clorofenil)-furfural y 5,55 mmol (210 mg) de NaBH_4 , y se purificó por cromatografía en sílica

flash utilizando como fase móvil una mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (6:1).

Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_2\text{Cl}$. Sólido blanco. Rendimiento: 70%. $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) δH 1,89 (s, 1H, OH); 4,66 (s, 2H, CH_2); 6,38 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H, H3); 6,58 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H, H4); 7,34 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H3' y H5'); 7,59 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H2' y H6'). $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3) δC 57,53; 106,09; 110,03; 124,96(2x); 128,81(2x); 129,08; 133,05; 152,90; 153,80.

Síntesis de [5-(4-bromofenil)-2-furil]metanol (4e).



PM = 253,09 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo la marcha descrita anteriormente utilizando 5,18 mmol (1,3 g) de 5-(*p*-bromofenil)-furfural y 12,42 mmol (470 mg) de NaBH_4 , y se purificó por cromatografía en sílica flash utilizando como fase móvil una

mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (4:1).

Fórmula molecular: $C_{11}H_9O_2Br$. Sólido blanco. Rendimiento: 64%. ^1H-NMR : (400 MHz, $CDCl_3$): δH 1,92 (s, 1H, OH); 4,65 (s, 2H, CH_2); 6,38 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H, H3);

6,60 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H, H4); 7,49 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H3' y H5'); 7,53 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H2' y H6'). $^{13}C-NMR$: (100 MHz, $CDCl_3$) δC 57,53; 106,21; 110,04; 121,16; 125,21(2x); 129,49; 131,73(2x); 152,89; 153,85.

6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM).

La actividad antibacteriana de los compuestos de núcleo 5-fenilfurano se midió a través de ensayos para la determinación de la CIM por microdilución en caldo frente a cepas prototipo Gram-positivas, los cuales fueron realizados en el Laboratorio de Desarrollo de Fármacos sección Microbiología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, siguiendo el protocolo para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)[40]. A continuación se detallan las condiciones de estos ensayos:

Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas prototipo Gram-positivas utilizadas fueron de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM, ATCC 43300) y *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina (EFSV, ATCC 29212), obtenidas a partir del cepario del Servicio de Laboratorio Clínico, Unidad de Microbiología, del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Éstas se conservaron congeladas en viales a $-20^\circ C$ en leche descremada estéril. Para obtener cepas puras se realizaron cultivos bacterianos en agar de sangre de cordero incubándose por 18 a 24 horas a $36^\circ C$. Posteriormente, en forma independiente para cada cepa, se preparó un inóculo bacteriano en caldo Mueller Hinton (Beckton Dickinson, Ltda. USA) hasta alcanzar una concentración bacteriana aproximada a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, lo que equivale a una turbidez de 0,5 Mc Farland, la cual fue medida usando un nefelómetro (Grant-Bio DEN-1).

Antibiótico Control

Se utilizó el antibiótico de uso habitual gentamicina (Sigma-aldrich[®]) como control de ensayo, el cual fue adquirido comercialmente. Se preparó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, considerando la potencia del antibiótico para obtener una concentración inicial patrón de 1000 $\mu g/mL$.

Derivados 5-fenilfurano

Se ensayaron diez derivados 5-fenilfurano, los cuales se masaron en triplicado en una cantidad aproximada entre 0,9 y 1,5 mg. Estos se disuelven en la cantidad suficiente de dimetilsulfóxido (DMSO) para después diluir 20 μL de la disolución anterior en 980 μL de

agua estéril. Luego se colocan 200 μL en los primeros pocillos de las placas que contienen 100 μL de caldo de cultivo y 100 μL de suspensión bacteriana para obtener una concentración final de hasta 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al 1% de DMSO. Se realizó un Test de Solubilidad preliminar con el fin de poder determinar la cantidad de DMSO necesaria para mantener disueltos a los compuestos en las posteriores diluciones en agua estéril, siguiendo el protocolo de dilución descrito, siendo preparadas soluciones nuevas de cada uno de ellos antes de cada ensayo. La Tabla 1 resume la concentración máxima obtenida para cada compuesto en el primer pocillo de cada fila (columna 1).

Tabla 1. Concentraciones de los compuestos 5-fenilfuranos expresadas en $\mu\text{g}/\text{mL}$ del primer pocillo de cada fila, columna 1, de las microplacas.

Compuesto	3b	3c	4b	4c	4d	3d	3e	4a	4e	3a
Conc. $\mu\text{g}/\text{mL}$	128	128	128	128	128	64	64	64	64	32

Medio de cultivo

El medio de cultivo usado para realizar los ensayos de microdilución fue caldo Mueller Hinton, el cual se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, siendo posteriormente autoclavado.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se realizaron ensayos en triplicado para determinar la actividad antibacteriana de los compuestos frente a cada una de las cepas bacterianas prototipo Gram-positivas. La Figura 10 muestra un esquema que representa las microplacas usadas para realizar los ensayos de microdilución; éstas son placas de cultivo de 96 pocillos estériles (8 filas y 12 columnas) (Ultracruz TM Polystyrene Microplates, 96 well, U bottom Santa Cruz Biotechnology, inc.) a los cuales se les agregaron 100 μL de caldo Mueller Hinton, para luego adicionar 200 μL de un compuesto a ensayar en las 3 filas de la primera columna (A1, B1, C1), 200 μL de otro compuesto en las 3 filas siguientes de la primera columna (D1, E1, F1), y 200 μL del antibiótico control en las últimas 2 filas de la primera columna (G1, H1), para continuar haciendo diluciones seriadas de 100 μL por vez hasta la columna 10. Los pocillos de las columnas 11 y 12 se utilizaron para controles de crecimiento y de esterilidad respectivamente. Una vez preparada la placa, se agregaron 100 μL de la suspensión bacteriana a evaluar, ajustada a 0,5 Mc Farland, en cada uno de los pocillos exceptuando los de la columna 12.

Finalmente, las placas fueron tapadas y llevadas a incubar a 36°C por 18 a 24 horas, tiempo tras el cual se observa cada una a contra luz blanca para ver si hay o no crecimiento de colonias en forma de “circunferencia” o turbidez dentro de los pocillos. Se

considera que el antibiótico control o compuesto tiene actividad antibacteriana frente a una determinada cepa si no hay crecimiento bacteriano en el pocillo, y el último pocillo de la fila donde se observe esto se considerará como la CIM.

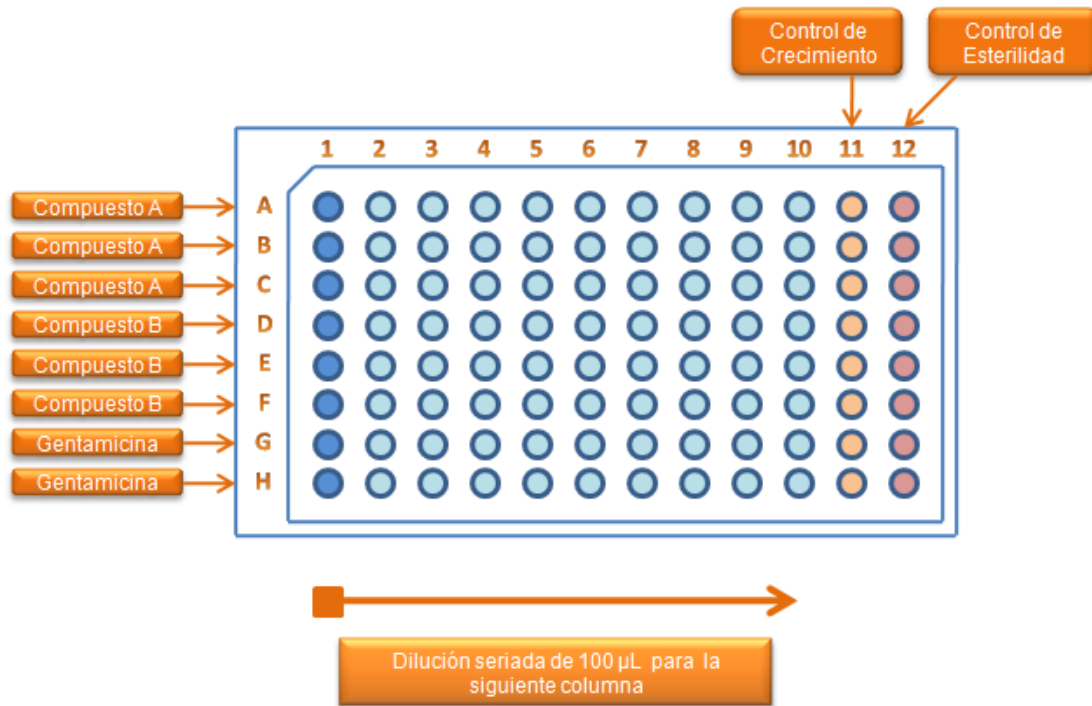


Figura 10. Esquema de las microplacas usadas para realizar el ensayo de microdilución en caldo y determinar la CIM.

Se consideraron como resultados válidos aquellos en los cuales los controles internos de cada placa (control de crecimiento y de esterilidad) fueran adecuados, así como también que los resultados del antibiótico control (gentamicina) frente a las cepas prototipo estuvieran dentro de los rangos de control de calidad dados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. ESTUDIOS DE DOCKING MOLECULAR DE LOS COMPUESTOS FENILFURANOXIBENZAMIDAS EN FTSZ DE *S. aureus*.

El objetivo de este estudio es poder analizar la posición, la conformación y las interacciones de los compuestos **1** y **2a-e** en el sitio donde se une PC190723 a la FtsZ de *S. aureus*, y poder comparar el grado de similitud en el modo de unión entre estos y el de PC190723 en el complejo cristalográfico FtsZ-PC190723.

Los compuestos **1** y **2a-e** fueron dibujados en el programa *ChemBioDraw Ultra 12.0 2010* seguido de una *minimización de energía (MM2)* a la conformación de la estructura química en el programa *ChemBio3D Ultra 12.0 2010* donde no se aplicó un nivel de cálculo más preciso de optimización porque la variación conformacional era despreciable al realizarla sobre estas estructuras moleculares con pocos grados de libertad.

Se utilizó la proteína FtsZ de *S. aureus*, que se encuentra formando un complejo cristalográfico con PC190723 (código PDB = 3VOB, resolución de 2.7 Å), como blanco molecular. El programa GOLD[®] 5.2 fue el empleado para realizar el *docking* molecular, el cual contempló la preparación del blanco molecular con (i) la adición de átomos de hidrogeno, (ii) la eliminación de las moléculas de agua (excepto 506 y 524); y (iii) la extracción del ligando cristalográfico PC190723. El sitio activo fue definido como una esfera con radio de 10 Å en torno al átomo C6 del ligando cristalográfico PC190723, el cual se puede apreciar en la Figura 11. También se le dio flexibilidad a la cadena lateral de los residuos del sitio activo, así como también libertad de rotación a las moléculas de agua consideradas estructurales (506 y 524). Se empleó la función de puntuación *GoldScore* para evaluar y clasificar las conformaciones propuestas. Cada molécula fue acoplada 10 veces y fueron consideradas las 2 mejores de cada una. El análisis de los resultados fue realizado con el programa de Modelación Molecular *Discovery Studio v3.5.0*.

El primer paso consistió en validar la precisión del programa GOLD 5.2 para predecir el modo de unión de una molécula, comparando la conformación solución del *docking* molecular y las interacciones de PC190723 patrón (**1**) en el sitio activo de la FtsZ de *S. aureus* con respecto a las de PC190723 obtenidas experimentalmente por cristalografía de rayos-X. La Figura 12 muestra los resultados del *docking* molecular preliminar de **1** en el sitio activo de la FtsZ, realizado de acuerdo con las características señaladas anteriormente, donde se puede observar que la conformación, posición y orientación de los grupos químicos de **1** son similares a las de PC190723 cristalográfico, tanto en la porción benzamida como en las porción tiazolopiridina.

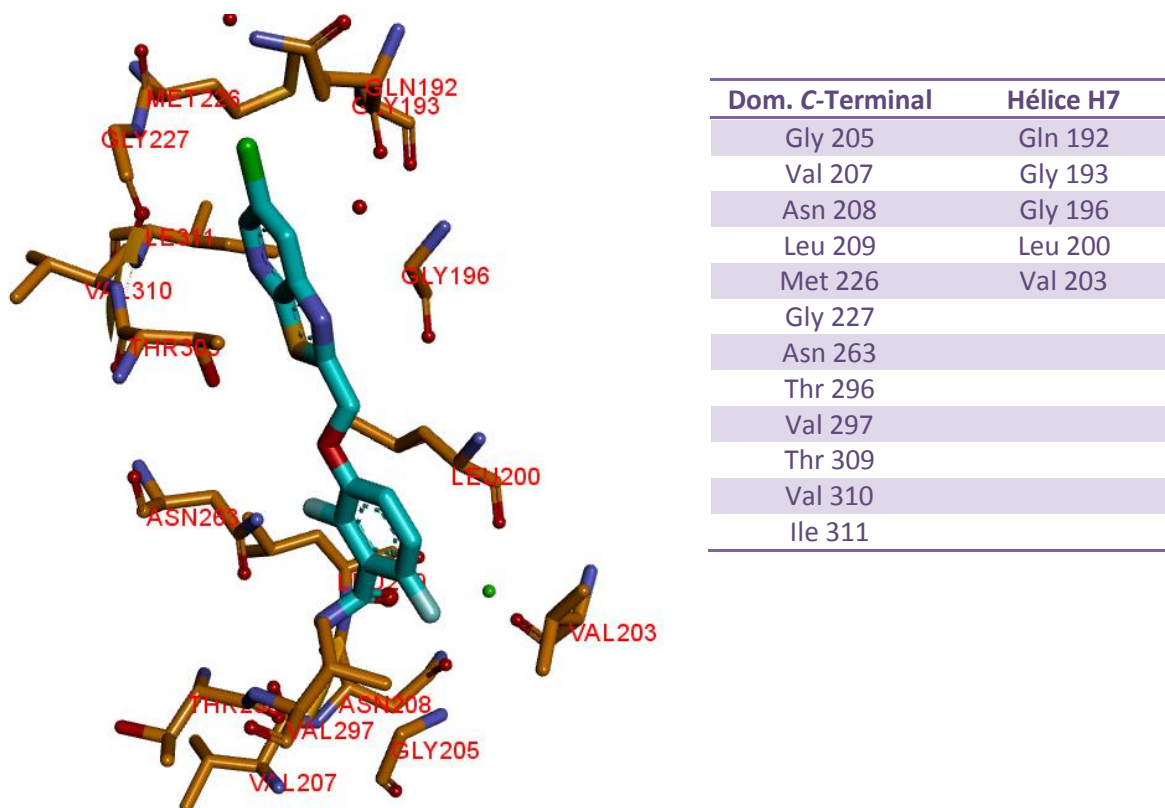


Figura 11. Aminoácidos que forman parte del bolsillo donde se une PC190723 a FtsZ de *S. aureus*. También se observan moléculas de agua (rojo) e ion calcio (verde).

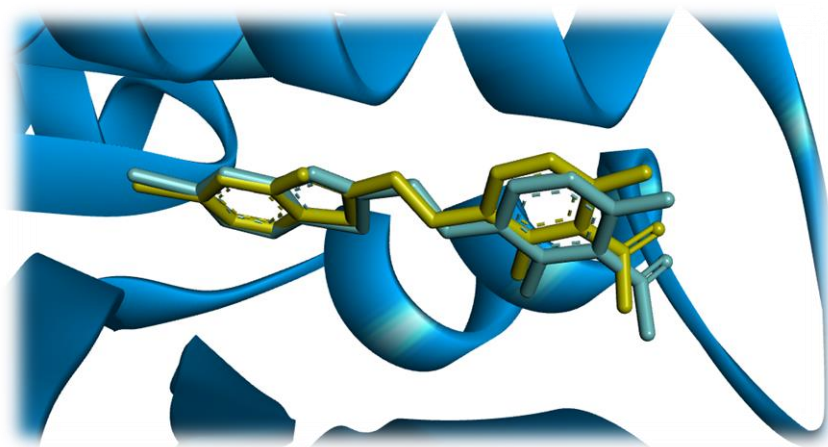


Figura 12. Posicionamiento y conformación solución del *docking* molecular de 1 (amarillo), en el sitio activo de la FtsZ de *S. aureus*. Conformación y posición cristalográfica de PC190723 (celeste).

En cuanto a las interacciones generadas en el sitio activo, la Figura 13 muestra que el ligando PC190723 presenta interacciones por puente de hidrógeno en el complejo cristalográfico entre el grupo amida y los residuos Leu209 (2,77 Å) y Val207 (2,87 Å); entre el átomo de oxígeno del puente del éter y el residuo Asn263 (3,13 Å); y entre el átomo de azufre de la mitad tiazolopiridina y el residuo Thr309 (3,11 Å), mientras que **1** patrón sólo pudo reproducir la interacción con Thr309 (3,05 Å), ya que las distancias con los residuos Leu209 (3,88 Å), Asn263 (3,26 Å) y Val207 (3,73 Å) eran mayores. Además, se generó una nueva interacción entre el átomo de cloro sustituyente con el residuo Gly227 (3,14 Å), la cual no está presente en el complejo cristalográfico porque la distancia entre estos átomos es mayor (3,89 Å).

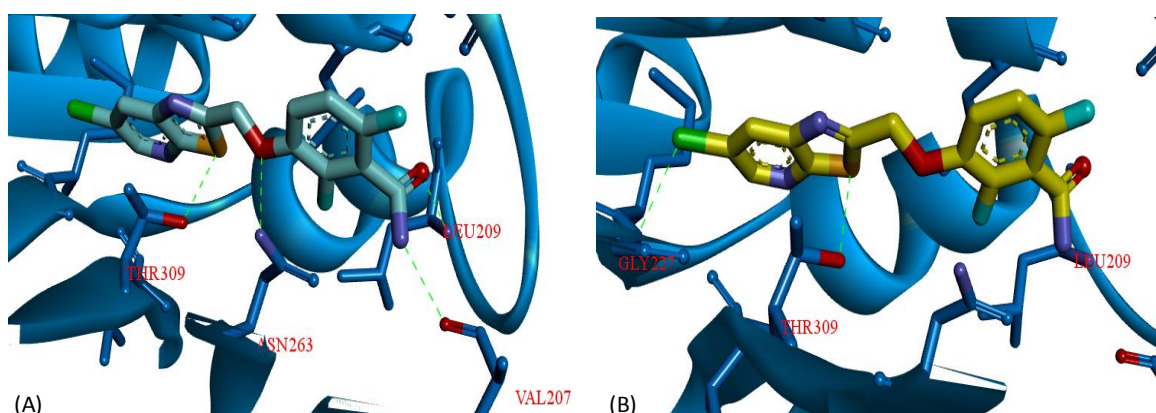


Figura 13. Interacciones del ligando en el sitio activo de FtsZ de *S. aureus*. (A) Interacciones de PC190723 en el sitio de unión. (B) Interacciones de la conformación solución del *docking* molecular de **1** en el sitio activo.

Esto demuestra la buena precisión del programa GOLD[®] 5.2 para predecir el modo de unión de PC190723 en el sitio de unión a la FtsZ de *S. aureus*, validándose el *docking* molecular realizado en este software, lo cual es muy importante si se quieren obtener datos confiables y buenas aproximaciones para los fenilfuranoxibenzamidas.

La Tabla 2 muestra la puntuación *docking* de los compuestos **2a-e**, usando a **1** como patrón, en orden de mayor a menor:

Tabla 2. Puntuación *docking* de cada compuesto.

Compuesto	Puntaje <i>Docking</i>
2e	87,40
2b	87,30
2a	87,04
2d	86,56
1	83,07
2c	82,86

El puntaje *docking* es el resultado de calcular la energía libre de interacción ligando-receptor por parte de la función de puntuación *Goldscore*, el cual debería predecir la actividad biológica. La función de puntuación *Goldscore* está basada en “campos de fuerza” que cuantifica la suma de la energía de interacción ligando-receptor y la energía interna del ligando, las cuales se obtienen a través de la combinación del término de energía de Van der Waals dado por el potencial de Lennard-Jones y por el término de energía electrostática dado por la ley de Coulomb[27].

Por lo tanto, de acuerdo a los puntajes obtenidos, el compuesto más activo debería ser **2e** y el menos activo **2c**. No obstante, la diferencia entre magnitudes no es significativa por lo que se podría pensar que las actividades serían similares, aunque es interesante destacar que 4 de los 5 compuestos obtuvieron un puntaje *docking* mayor al de **1** que es el patrón de PC190723.

Las soluciones del *docking* molecular muestran que los compuestos **2a-e** fueron posicionados espacialmente y con conformaciones análogas a las de PC190723 cristalográfico y a **1** patrón, donde los distintos grupos funcionales fueron orientados de la misma manera, tanto en las porciones benzamidas, como en las porciones tiazolopiridina de PC190723 con las porciones 5-(4R-fenil)furano de los fenilfuranoxibenzamidas (Figura 14), lo que sin duda es un auspicioso resultado de la predicción del modo de unión de estos últimos a la FtsZ de *S. aureus*.

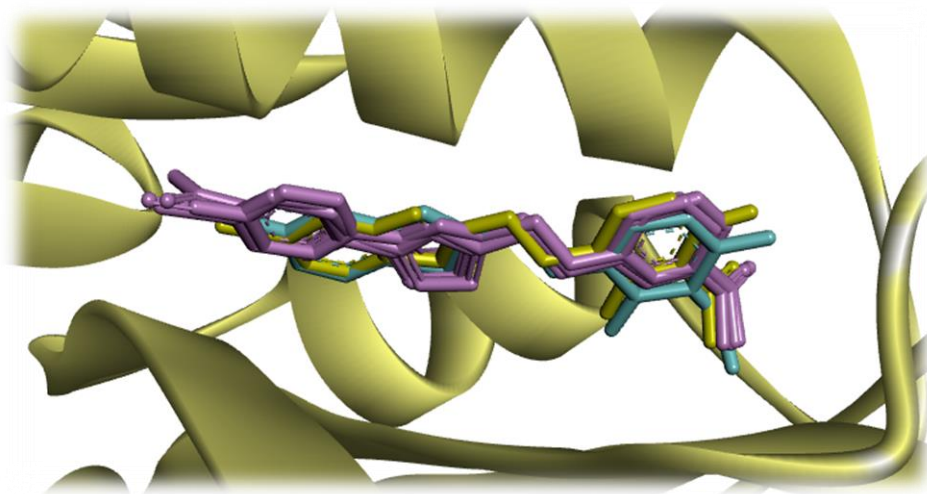


Figura 14. Posicionamiento y conformaciones soluciones del *docking* molecular de **1** (amarillo), compuestos **2a-e** (rosados) en el sitio activo. Conformación y posición cristalográfica de PC190723 (celeste).

Las interacciones de las conformaciones soluciones del *docking* molecular de los compuestos **2a-e** en el sitio activo de la FtsZ se muestran a continuación.

Acoplamiento Molecular del Compuesto 2a

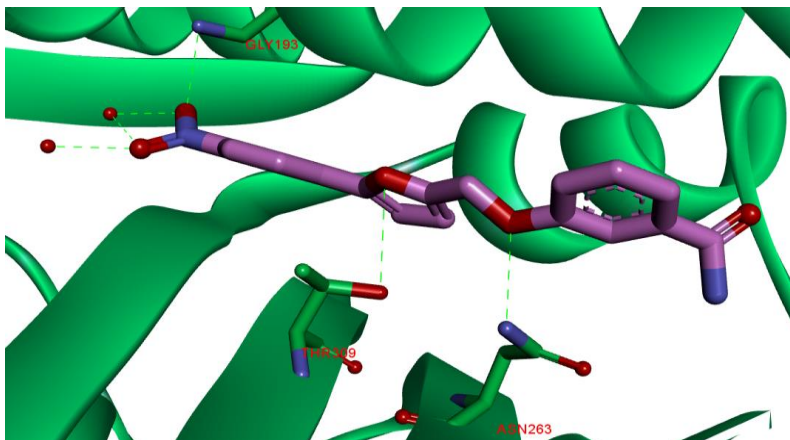


Figura 15. Interacciones de la conformación solución del *docking* molecular del compuesto **2a** en el sitio activo de FtsZ de *S. aureus*.

El compuesto 2a mostró interacciones entre el átomo de oxígeno del puente de éter con el residuo Asn263 (2,92 Å), entre el átomo de oxígeno del anillo furánico y el aminoácido Thr309 (3,17 Å), y entre el grupo nitrógeno y el residuo Gly193 (2,71 Å). Además, se observa interacción con las moléculas de agua presentes (2,20-2,80 Å).

Acoplamiento Molecular del compuesto 2b

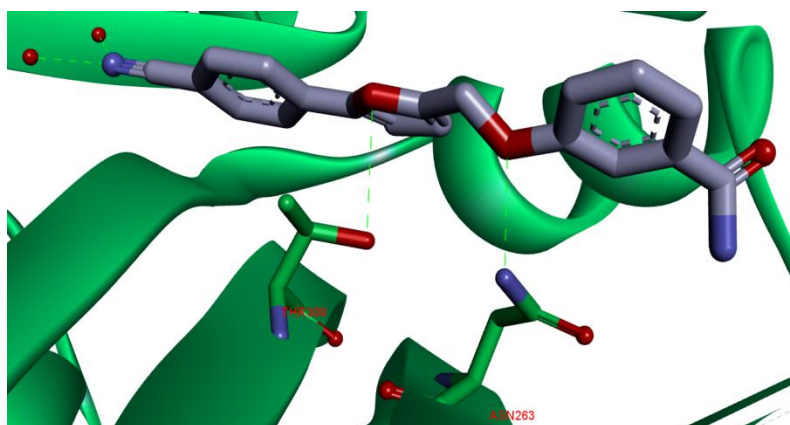


Figura 16. Interacciones de la conformación solución del *docking* molecular del compuesto **2b** en el sitio activo de FtsZ de *S. aureus*.

El compuesto 2b mostró interacciones entre el átomo de oxígeno del puente de éter y el residuo Asn263 (2,96 Å), entre el átomo de oxígeno del furano y el aminoácido Thr309 (3,21 Å), y entre el grupo ciano y las moléculas de agua presentes (2,20 Å).

Acoplamiento Molecular del compuesto 2c

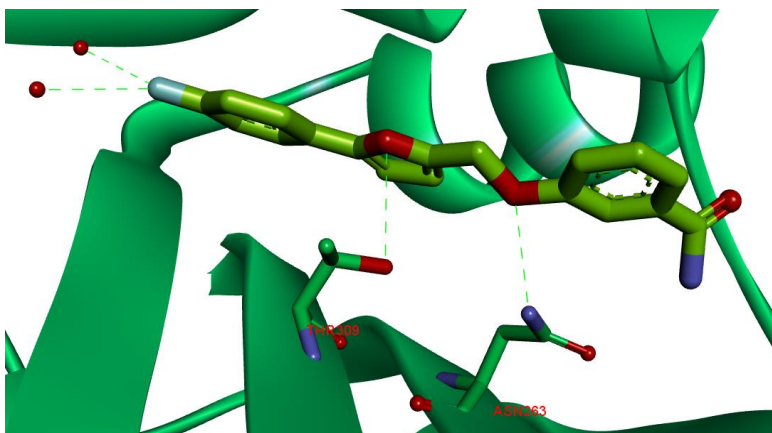


Figura 17. Interacciones de la conformación solución del *docking* molecular del compuesto **2c** en el sitio activo de FtsZ de *S. aureus*.

El compuesto 2c mostró interacciones entre el átomo de oxígeno del puente de éter y el aminoácido Asn263 (3,12 Å), entre el átomo de oxígeno del furano y el residuo Thr309 (3,18 Å), y entre el átomo de flúor y las moléculas de agua presentes (2,90 Å).

Acoplamiento Molecular del compuesto 2d

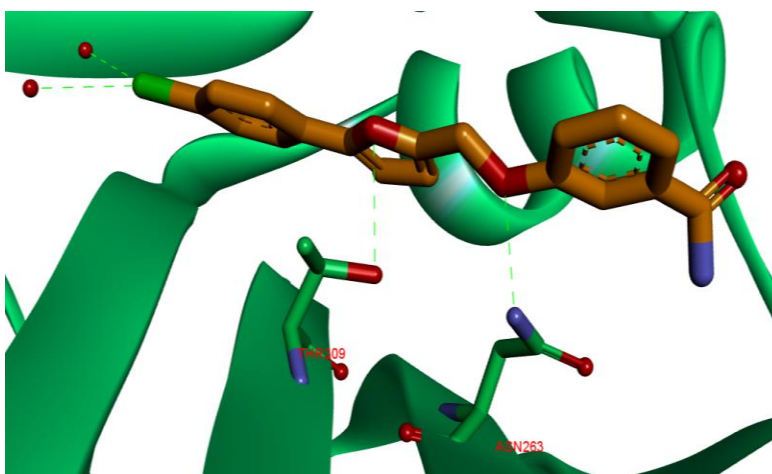


Figura 18. Interacciones de la conformación solución del *docking* molecular del compuesto **2d** en el sitio activo de FtsZ de *S. aureus*.

El compuesto 2d mostró interacciones entre el átomo de oxígeno del puente de éter y el residuo Asn263 (3,01 Å), entre el átomo de oxígeno del furano y el aminoácido Thr309 (3,11 Å), y entre el átomo de cloro y las moléculas de agua presentes (2,70 Å).

Acoplamiento Molecular del compuesto 2e

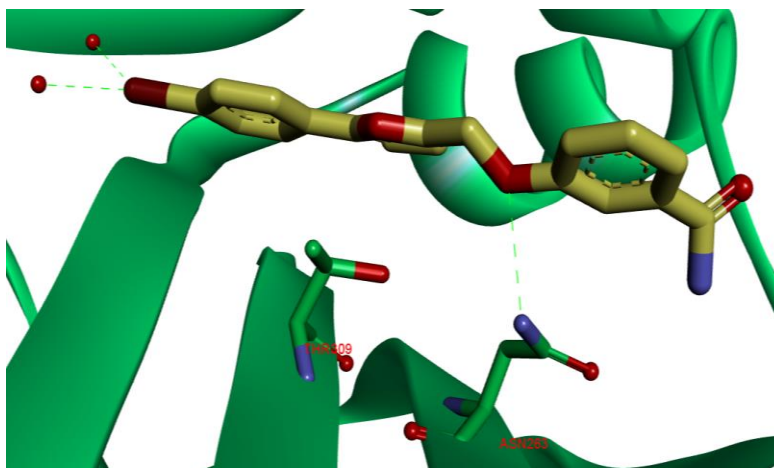


Figura 19. Interacciones de la conformación solución del *docking* molecular del compuesto **2e** en el sitio activo de FtsZ de *S. aureus*.

El compuesto **2e** mostró interacciones entre el átomo de oxígeno del puente de éter con el residuo Asn263 (3,17 Å), y entre el átomo de bromo y las moléculas de agua presentes (2,47 Å).

Como los compuestos **2a-e** presentan el mismo núcleo estructural fenilfuranoxibenzamida, ellos generaron las mismas interacciones por puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del puente de éter y el residuo Asn263 (2,92- 3,17 Å), y entre el átomo de oxígeno del anillo de furano y el aminoácido Thr309 (3,11-3,21 Å); siendo excepción a esto último **2e** por presentar una distancia relativamente un poco mayor (3,25 Å); las cuales están presentes en el complejo cristalográfico FtsZ-PC190723. Además, todos los compuestos mostraron interacciones por puente de hidrógeno entre el sustituyente aceptor de electrones de la posición 4 del benceno y las mismas dos moléculas de agua presentes en el sitio activo (2,20-2,90 Å). Adicionalmente, **2a** muestra una interacción con el residuo de Gly193 (2,71 Å), lo que viene demostrar la importante contribución que hacen estos grupos para que los compuestos puedan unirse de mejor manera en el sitio activo, comparado al átomo de cloro de la mitad tiazolopiridina de PC190723 que no presenta interacciones en el complejo con FtsZ de *S. aureus* obtenido por cristalografía de rayos-X. No obstante, ninguno presentó interacciones por puente de hidrógeno en su porción benzamida (distancias similares a las de **1**).

Ahora bien, la única diferencia entre las estructuras químicas de los compuestos **2a-e** es el sustituyente aceptor de electrones de la posición 4 del benceno, lo cual se relaciona directamente con la variación del puntaje *docking*, y por ende, con la actividad biológica. Si bien las interacciones que presentan en el sitio activo son muy similares por ser aceptores de enlace de hidrógeno, la naturaleza química de cada uno de ellos es diferente. Los átomos flúor, cloro y bromo son aceptores débiles, que pertenecen al grupo de los halógenos, donde en ese orden van de mayor a menor electronegatividad y de

menor a mayor tamaño, mientras que los grupos nitro y ciano son grupos fuertemente y muy fuertemente aceptores de electrones, respectivamente, debido al efecto resonante y a la electronegatividad de los átomos que los constituyen (efectos $-M$ y $-I$, respectivamente).

De acuerdo con los puntajes *docking* y las conformaciones soluciones del *docking* molecular, el sustituyente que contribuiría en mayor medida a la potencia de la actividad biológica sería el bromo; incluso mayor que el grupo nitro, que generó la mayor cantidad de interacciones; y el que lo haría en menor medida sería el flúor, dando cuenta de una tendencia favorable para el volumen y/o lipofilia por sobre la polaridad en el sitio activo hidrofóbico de la FtsZ dado por los aminoácidos que lo conforman.

Otro punto relevante a comparar es la sustitución con átomos de flúor en las posiciones 2 y 6 de la benzamida de PC190723, que no están presentes en los compuestos **2a-e**. De acuerdo a la literatura científica revisada, los estudios SAR realizados señalan que estos contribuirían a aumentar la potencia de PC190723, pero la razón no queda clara. El análisis de las estructuras 3D del ligando cristalográfico y las conformaciones soluciones del *docking* molecular de los compuestos **1** y **2a-e** (Figura 20) muestran que los átomos de flúor no presentan interacciones en el sitio activo de la FtsZ y tampoco tendrían relación con la orientación del grupo amida, por lo que su participación probablemente sea de reconocimiento a distancia para que PC190723 pueda posicionarse efectiva y selectivamente en el bolsillo.

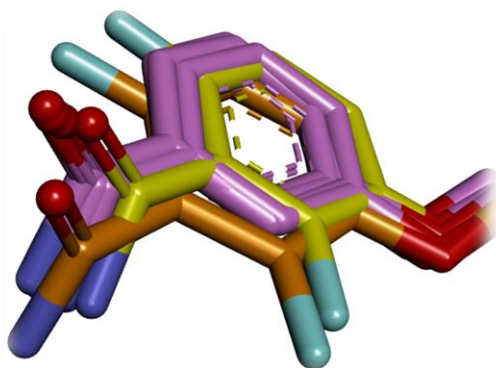


Figura 20. Orientación de la mitad benzamida de PC190723 cristalográfico (naranja) y de las conformaciones soluciones del *docking* molecular de los compuestos **1** (amarillo) y **2a-e** (fucsia).

En resumen, el *docking* molecular realizado indica que los fenilfuranoxibenzamidas tienen un modo de unión en el sitio activo de FtsZ de *S. aureus* similar al de PC190723 obtenido por cristalografía de rayos-X, mostrando similitudes y diferencias en las interacciones generadas en el bolsillo, sobre todo en los sustituyentes aceptores de electrones que

además se relacionan directamente con los puntajes *docking* de **2a-e**, cuya magnitud es similar al del patrón de PC190723 (**1**), reflejando promisorias actividades biológicas para estos compuestos. Por lo tanto, se hace necesario sintetizar la serie de fenilfuranoxibenzamidas con la benzamida sustituida en las posiciones 2 y 6 por átomos de flúor (de acuerdo con los estudios SAR que los consideran indispensables en los derivados de 3-MBA y PC190723 con potente actividad antibacteriana) para confirmar experimentalmente su efectividad contra cepas sensibles y resistentes de *S. aureus* (también pueden ser sobre otras cepas Gram-positivas y Gram-negativas) usando a PC190723 como referencia, el SAR dado por los tipos de sustituyentes aceptores de electrones, y corroborar si hay filamentación celular por inhibición de la FtsZ.

Otro aspecto relevante es poder contrastar el *docking* molecular obtenido a través del programa GOLD[®] 5.2 con los que puedan obtenerse mediante otros programas para que se evite encausar una respuesta favorable. Los programas de *docking* molecular se clasifican en 3 categorías de acuerdo a los algoritmos usados para tratar la flexibilidad del ligando: Métodos sistemáticos (Construcción incremental, Búsqueda conformacional, bases de datos); Métodos aleatorios o estocásticos (Monte Carlo, algoritmos genéticos, búsqueda tabú); y métodos de simulación (dinámica molecular, minimización de energía). El programa GOLD[®] (del inglés *Genetic Optimization for Ligand Docking*) se basa en un método aleatorio o estocástico, que utiliza un algoritmo genético (basado en los conceptos de la teoría de la evolución y en la variabilidad dada por las diferentes combinaciones y mutaciones posibles entre cromosomas) para hacer cambios aleatorios, tanto a un único ligando como a una población de ligandos, y así obtener como solución un conjunto de posibles conformaciones de estos; mientras que programas basados en métodos sistemáticos (FlexX[®], DOCK[®]) intentan explorar todos los grados de libertad en una molécula a través de una búsqueda incremental al acoplar varios fragmentos moleculares dentro de la región del sitio activo y unirlos covalentemente (por ejemplo, estrategia de diseño de ligandos *de novo*), o dividir el ligando acoplado en partes rígidas (fragmento central) y partes flexibles (cadenas laterales)[27].

Es importante recalcar que el *docking* molecular es una simulación o modelo predictivo basado en softwares que tienen sus propias limitaciones y que tratan de acercarse lo más posible a la realidad. El proceso de unión del ligando al receptor es muy complejo y desarrolla una gran cantidad de eventos los cuales son conducidos por una combinación de efectos entálpicos (energías electrostáticas y de Van Der Waals) y entrópicos (como la solvatación), donde tanto uno como el otro pueden dominar interacciones específicas. Sin embargo, la mayoría de las funciones de puntuación actuales se enfocan más en los factores energéticos que en los entrópicos y utilizan cálculos simplificados para evaluar las interacciones en complejos proteína-ligando y para predecir la afinidad de unión. Por otro lado, la resolución limitada de blancos cristalográficos, la limitada flexibilidad y dinámica inherente de las proteínas y aminoácidos al estar cristalizados, la inducción del encaje u otro cambio conformacional que ocurra en la unión, y la participación de moléculas de agua en las interacciones proteína-ligando son algunos de los factores que dificultan la precisión en la predicción de las conformaciones de unión y de la actividad biológica del compuesto[27].

7.2. ESTUDIO DE LA SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS DE NÚCLEO 5-FENILFURANO.

Las reacciones químicas empleadas para obtener las series **3** y **4** fueron estudiadas respecto de las diferencias en el avance de la reacción dadas por el sustituyente aceptor de electrones, y se compararon los espectros RMN de ambas series.

La serie de 5-(4R-fenil)-furfurales (**3a-e**) se obtuvo a través de la metodología conocida como arilación de Meerwein de derivados de furano, la cual consiste en una reacción catalizada por cobre (I o II) entre el furano sustituido en posición 2 y los haluros de benceno diazonio, donde el grupo arilo de la sal de diazonio sustituye al hidrógeno de la posición 5 del anillo furano, eliminándose nitrógeno gaseoso[41].

De acuerdo con el procedimiento utilizado, en una primera etapa se obtuvieron las sales de diazonio a partir de anilinas sustituidas en la posición 4 (**5**, Figura 21B) por nitro (**a**), ciano (**b**), flúor (**c**), cloro (**d**) y bromo (**e**) a través de la reacción de diazotación, que consiste en nitrosar arilaminas primarias para formar sales de diazonio. Se disuelve anilina sustituida (**5a-e**) en ácido clorhídrico, se enfría a una temperatura entre 0 a 5°C, y después se agrega nitrito de sodio gota a gota. El mecanismo señalado en la Figura 21 muestra que el ion nitrito en solución ácida se protona formando el ácido nitroso, el cual da origen al ion nitrosonio cuando desprende una molécula de agua. Posteriormente, se produce un ataque nucleofílico de la amina primaria aromática sobre el nitrógeno del ion nitrosonio, formándose un intermediario que pierde un protón para formar una *N*-nitrosamina; la cual sigue reaccionando, y tras una serie de pasos, se obtiene el ion arildiazonio o sal de diazonio. Éstas se caracterizan por ser mucho más estables que las sales de alquildiazonio, y se pueden conservar en solución acuosa a una temperatura entre 0 y 5°C durante un tiempo razonable[42].

A continuación, en una segunda etapa, se procedió a agregar furfural disuelto en etanol a las sales de diazonio preparadas, seguido de bromuro cuproso, produciéndose la arilación del anillo furano. La Figura 22 muestra un esquema simplificado del mecanismo de esta etapa, el cual tiene como eje central al par redox $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$, que cataliza la transferencia de electrones. El paso inicial consiste en la oxidación de cobre (I) a cobre (II) y la reducción de la sal de diazonio a radical arilo, con liberación de nitrógeno. Este radical arilo reacciona con el furfural formándose un enlace entre el átomo de carbono del anillo bencénico y el carbono de la posición 5 del anillo furano, generando un radical aducto. Posteriormente, el radical aducto dona un electrón al ion cobre (II), el cual se reduce a cobre (I), formando los productos **3a-e** junto con la pérdida de un protón[41].

Luego de haber llevado a cabo las reacciones de ambas etapas variando el sustituyente aceptor de electrones, se pudo apreciar que todas las anilinas se disuelven en la solución ácida al calentar, y que precipitan en forma de clorhidratos al enfriar; para el caso de la arilación del furfural, al adicionar el bromuro de cobre (I) se observó la aparición del producto de la reacción de arilación; cuya velocidad y rendimiento están directamente relacionados con el sustituyente que se encuentre en posición *-para-* a la función

diazonio. Se comprobó que mientras más electroceptor es el sustituyente, más rápido aparece el producto de la reacción de arilación y en mayor cantidad, lo cual viene a corroborar lo reportado en la literatura[43]. Como los sustituyentes más electroceptores son el nitro (-NO₂) y el ciano (-C≡N), son esos los productos de la arilación que más rápido aparecen.

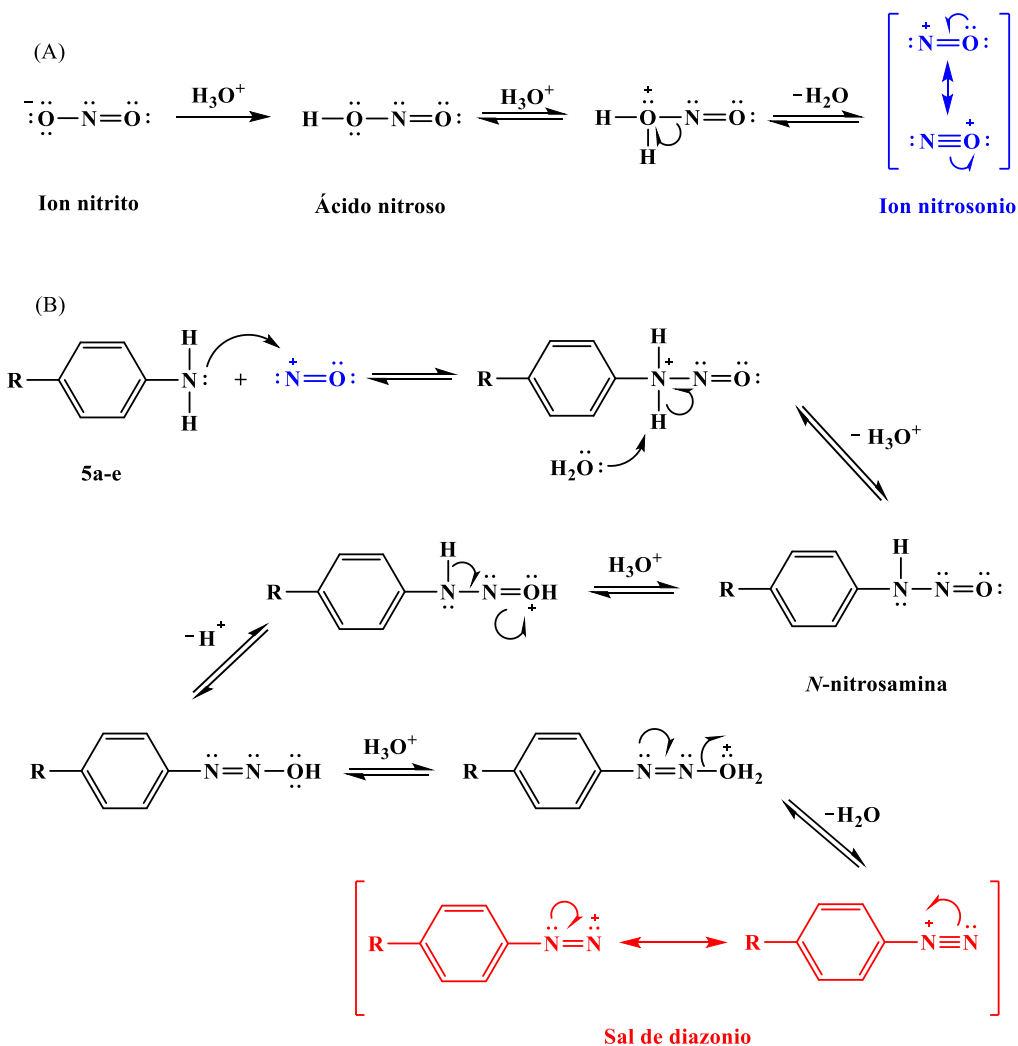


Figura 21. Mecanismo de la reacción de diazotación. (A) Formación del ion nitrosonio. (B) Formación de la sal de diazonio a partir de la nitrosación de una amina primaria aromática.

Los espectros ¹H-RMN y ¹³C-RMN de los compuestos sintetizados presentan señales características para el grupo aldehído (hidrógeno ≈ 9,7 ppm, carbono ≈ 177 ppm), anillo furano (hidrógenos entre 6,8-7,3 ppm; carbonos entre 107-110; 122-123 y 150-158 ppm) y

anillo bencénico (hidrógenos entre 7,1-8,3 ppm; carbonos entre 125-140 ppm).

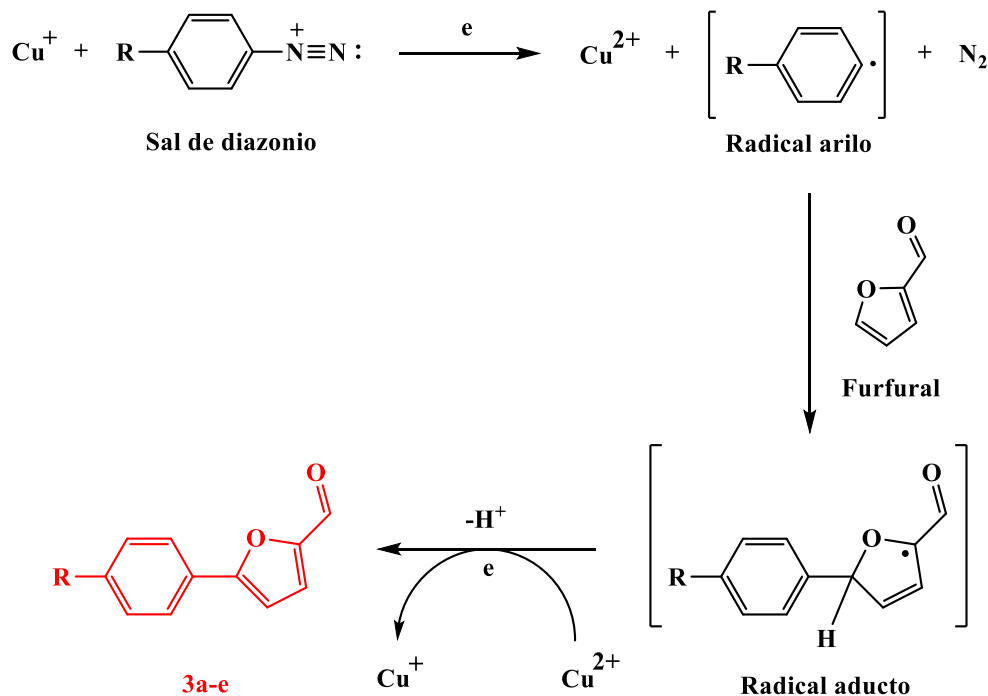


Figura 22. Mecanismo de reacción de la arilación del furfural con sales de diazonio catalizada por Cu(I).

Es importante destacar que los procedimientos usados para la síntesis de **3a-e** son semejantes a los utilizados en algunos artículos científicos donde se sintetizan 5-fenil-furfurales con sustituyentes aceptores de electrones en el benceno, empleando cloruro de cobre (II) y acetona en algunos casos, lo cual es indicativo de la preferencia por este esquema sintético debido a la baja complejidad y a la factibilidad de llevarlo a cabo sin ocupar gran cantidad de recursos, por sobre otras posibilidades menos eficientes[34,41,44].

La serie de [5-(4R-fenil)-2-furil]metanol (**4a-e**) se obtuvo a través de la reducción del grupo carbonilo de los compuestos **3a-e** a carbinol empleando borohidruro de sodio (NaBH_4). Se disuelve el arilfurfural (AF-CHO) en una mezcla de etanol:tetrahidrofurano (THF) y luego se agrega NaBH_4 seco a la solución. El mecanismo de la reducción se muestra en la Figura 23 donde el hidruro (hidrógeno + dos electrones) del ion borohidruro es transferido del boro al carbono polarizado positivamente del grupo carbonilo, y el oxígeno de éste se enlaza al boro para formar el alcoxiborohidruro, el cual reacciona con 3 moléculas más de AF-CHO debido a que tiene hidrógenos para donar, dando origen al tetraalcoxiborato. Una vez comprobada la desaparición del aldehído por cromatografía, se agrega agua a la

mezcla de reacción para que se produzca la hidrólisis del tetraalcoxiborato y se obtengan los productos **4a-e** junto al ion borato[41].

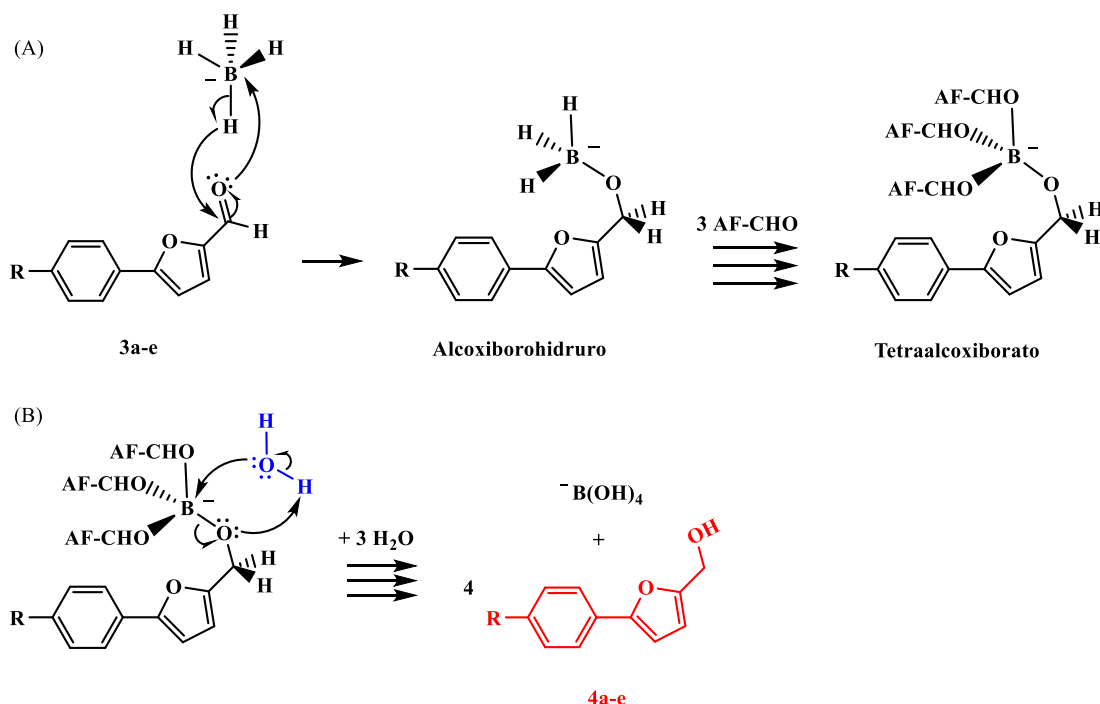


Figura 23. Mecanismo de la reacción de reducción con NaBH₄. (A) Formación del tetraalcoxiborato. (B) Hidrólisis acuosa del tetraalcoxiborato origina los productos **4a-e** y el ion borato.

Después de llevar a cabo esta reacción sobre todos los derivados 5-(4R-fenil)-furfurales, se pudo apreciar que el producto sintetizado con el sustituyente nitro (-NO₂) obtuvo el mayor rendimiento y un color anaranjado característico, mientras que los productos obtenidos con los otros sustituyentes electroaceptores tuvieron menor rendimiento pero con un color semejante. En cuanto a los espectros ¹H-RMN y ¹³C-RMN, los compuestos **4a-e** mostraron similitudes en las señales características de los anillos de furano y benceno ya descritas para los aldehídos. A diferencia de los precursores carbonílicos, los alcoholes muestran un singulete alrededor de los 4,6 ppm correspondientes a los hidrógenos metilénicos enlazados al carbono carbinólico, y un singulete para la señal del protón hidroxílico en el espectro de protones. En el espectro de carbono 13 desaparece la señal por encima de 175 ppm del carbono carbonílico y aparece la del carbono carbinólico cerca y por debajo de los 60 ppm.

7.3. ESTUDIO DE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS COMPUESTOS DE NÚCLEO 5-FENILFURANO.

La evaluación de la actividad antibacteriana de los 10 compuestos 5-fenilfuranos se hizo a través de la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) sobre las cepas bacterianas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina (EFSV), cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima (CIM) en µg/mL de los compuestos 3a-e y 4a-e sobre las cepas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina (EFSV). Se usó gentamicina (G) como antibiótico control.

	3a	3b	3c	3d	3e	4a	4b	4c	4d	4e	G
SARM	>32	>128	128	>64	>64	>64	>128	>128	>128	>64	500
EFRV	>32	>128	>128	>64	>64	>64	>128	>128	>128	>64	125

De acuerdo con los valores obtenidos, el compuesto **3c** fue el único que presentó actividad biológica con una CIM de 128 µg/mL contra SARM, dejando en evidencia que las series de núcleo 5-fenilfuranos en general no tienen actividad biológica contra las bacterias Gram-positivas ensayadas. No obstante, es interesante que al menos uno de ellos haya sido efectivo contra una cepa específica ya que abre paso a la discusión y análisis.

De la serie de derivados 5-(4R-fenil)-furfural, sólo el compuesto que tenía como sustituyente aceptor de electrones al átomo de flúor presentó actividad antibacteriana, y de la serie [5-(4R-fenil)-2-furil]metanol ninguno presentó actividad a pesar de que uno de ellos estuviera sustituido con flúor, lo cual parece indicar que el grupo carbonilo en la posición 2 del furano y el flúor (el más pequeño de este grupo de sustituyentes aceptores de electrones) en la posición 4 del benceno del núcleo 5-fenilfuranos son indispensables para que el compuesto tenga actividad sobre SARM, pero no sobre EFSV.

Por otro lado, sólo la serie [5-(4R-fenil)-2-furil]metanol se diseñó a partir de la porción (6-cloro-tiazolopiridin-2-il)metoxi (CTPM) de PC190723, el cual es estructuralmente muy importante ya que de acuerdo con los estudios de relación estructura-actividad (SAR) contribuye en gran medida a la potente y selectiva actividad antiestafilocócica y al buen perfil farmacocinético que posee este compuesto, el que además es 4000 veces más potente que la 3-metoxi-benzamida (3-MBA) original sobre *B. subtilis*. No obstante, CTPM se ensayó como (6-cloro-tiazolopiridin-2-il)metanol sobre la formación de polímeros de FtsZ de *B. subtilis* y no indujo empaquetamiento a 1 mM, como sí lo hizo la porción 2,6-difluoro-3-MBA[33], antecedente que indica que no se une a los polímeros de FtsZ y en tal caso no tendría actividad sobre la proteína por sí solo. Por lo tanto, si bien los compuestos **4a-e** análogos a CTPM no presentaron actividad antibacteriana contra algunas especies

Gram-positivas, no implica que no vayan a contribuir a la actividad de los compuestos finales fenilfuranoxibenzamidas, ya que además en el estudio de *docking* molecular realizado se pudo apreciar como las partes de las estructuras químicas que corresponden a los derivados [5-(4R-fenil)-2-furil]metanol se orientan y posicionan en forma análoga a como lo hace CTPM de PC190723 en el bolsillo de la FtsZ de *S. aureus* de acuerdo con lo obtenido por cristalografía de rayos-X, generando incluso interacciones que no están presentes en este complejo cristalográfico, lo cual se relaciona estrechamente con que los compuestos **2a-e** obtuvieran puntajes *docking* bastante similares en magnitud al patrón de PC190723 (**1**). Otro antecedente señala favorablemente que hay derivados heteroariloxibenzamidas inhibidores de FtsZ, análogos a PC190723, con 4-feniltiazol en su estructura química que tienen actividad sobre *S. aureus* con una CIM de 4 µg/mL[30].

Sin duda el hecho de que el compuesto **3c** haya mostrado actividad antibacteriana sobre SARM genera expectativas para investigar el blanco biológico sobre el que actúa, y también en poder desarrollar una línea de derivados del 5-(*p*-fluorofenil)-furfural con potencial actividad antiestafilocócica que incluye cepas resistentes. Es importante señalar que este acotado estudio SAR realizado para los compuestos de núcleo químico 5-fenilfurano utilizó un pequeño grupo de sustituyentes aceptores de electrones (NO₂, CN, F, Br, Cl) en la posición 4 del benceno, variando la posición 2 del furano con un formilo y un metanol, y que la evaluación de la actividad antibacteriana se realizó sobre 2 cepas Gram-positivas de relevancia clínica, ante lo cual se hace necesario ampliar el estudio SAR hacia una mayor variedad de estructuras químicas utilizando un mayor número de sustituyentes aceptores de electrones (I, CF₃, Ac) o dadores de electrones (MeO, R, Ar), variando las posiciones de sustitución en los distintos anillos y haciendo mono-, di- o tri-sustituciones con distintas combinaciones; utilizar otros anillos heterociclos aromáticos bioisostéricos (Piridinas, Tiazoles) y evaluar su actividad antibacteriana sobre otras cepas Gram-positivas y Gram-negativas, a fin de identificar un mayor número de compuestos con actividad biológica y poder establecer estudios SAR más completos.

Por último, cabe señalar que si bien las series 5-(4R-fenil)-furfurales y [5-(4R-fenil)-2-furil]metanol no tuvieron en general actividad antibacteriana frente a estas cepas Gram-positivas, es posible que tengan efecto sobre otros blancos moleculares de acuerdo con lo descrito en la literatura científica sobre las diversas actividades biológicas que presentan los compuestos que en su estructura química poseen un núcleo 5-fenilfurano.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se realizó un estudio de modelación molecular de una serie de compuestos fenilfuranoxibenzamidas en el bolsillo hidrofóbico de la FtsZ de *S. aureus* como potenciales nuevos inhibidores de este blanco biológico, y se llevo a cabo la síntesis de intermediarios con núcleo químico 5-fenilfurano a los cuales se les evaluó su actividad antibacteriana sobre cepas Gram-positivas para así poder establecer algún tipo de relación estructura-actividad. A continuación se señalan las conclusiones más relevantes:

- De acuerdo con los resultados del *docking* molecular, la serie de compuestos fenilfuranoxibenzamidas se unirían al sitio activo de la FtsZ de *S. aureus* con conformaciones, orientaciones de los grupos funcionales e interacciones similares a las de PC190723 cristalográfico, donde el tipo de sustituyente aceptor de electrones contribuiría en mayor o menor medida a la actividad biológica, favoreciendo el factor del volumen o lipofilia por sobre la polaridad.
- En la síntesis química, mientras más fuerte sea el grupo aceptor de electrones se obtendrá un mayor rendimiento tanto en la serie 5-(4R-fenil)-furfural como en la serie [5-(4R-fenil)-2-furil]metanol. Dependiendo del grupo electroceptor que se utilice se tendrán condiciones experimentales y avance de reacción particulares.
- En los ensayos biológicos realizados sobre cepas Gram-positivas para las series 5-fenilfurano, sólo el compuesto 5-(*p*-fluorofenil)-furfural presentó actividad sobre *S. aureus* resistente a meticilina, donde la relación estructura-actividad indica que el grupo formilo en la posición 2 del furano junto con el flúor en la posición 4 del benceno son indispensables para la actividad antibacteriana.
- Si bien la serie [5-(4R-fenil)-2-furil]metanol no presentó actividad antibacteriana contra cepas Gram-positivas, distintos antecedentes indicarían que al formar parte de la estructura química de las fenilfuranoxibenzamidas contribuirían de buena manera a su actividad biológica y a la unión favorable de éstos en el bolsillo hidrofóbico de la FtsZ.

9. PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo la síntesis de la serie de fenilfuranoxibenzamidas con la benzamida sustituida en las posiciones 2 y 6 por átomos de flúor para conseguir una actividad antibacteriana potente, a fin de poder confirmar experimentalmente su efectividad contra distintas cepas de *S. aureus*, empleando a PC190723 como patrón, corroborando si hay o no filamentación celular por inhibición de la FtsZ, y si se cumple el SAR de los sustituyentes aceptores de electrones.
- Investigar el mecanismo de acción por el cual el compuesto 5-(*p*-fluorofenil)-furfural ejerce su actividad sobre *S. aureus* resistente a meticilina, como primer paso hacia el desarrollo de una serie de derivados con potencial actividad antiestafilocócica incluyendo cepas resistentes a través de estudios SAR más completos.
- Realizar estudios de relación estructura-actividad sobre el núcleo químico 5-fenilfurano en búsqueda de derivados con potencial actividad antibacteriana u otras actividades biológicas.

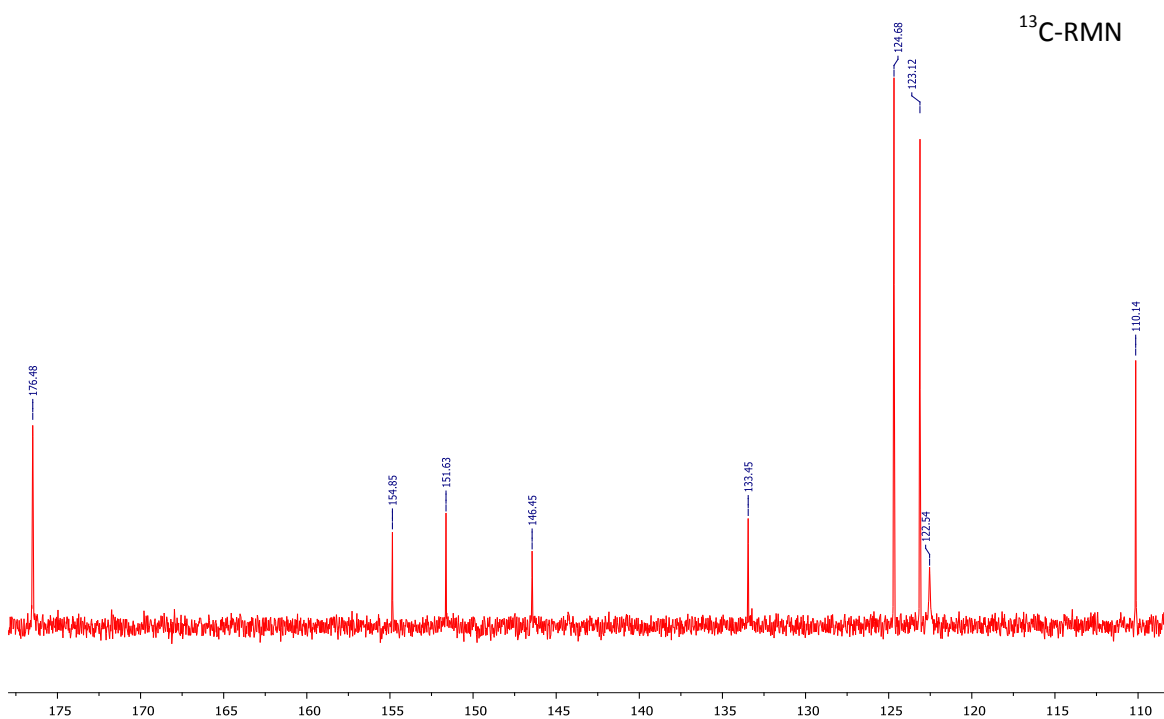
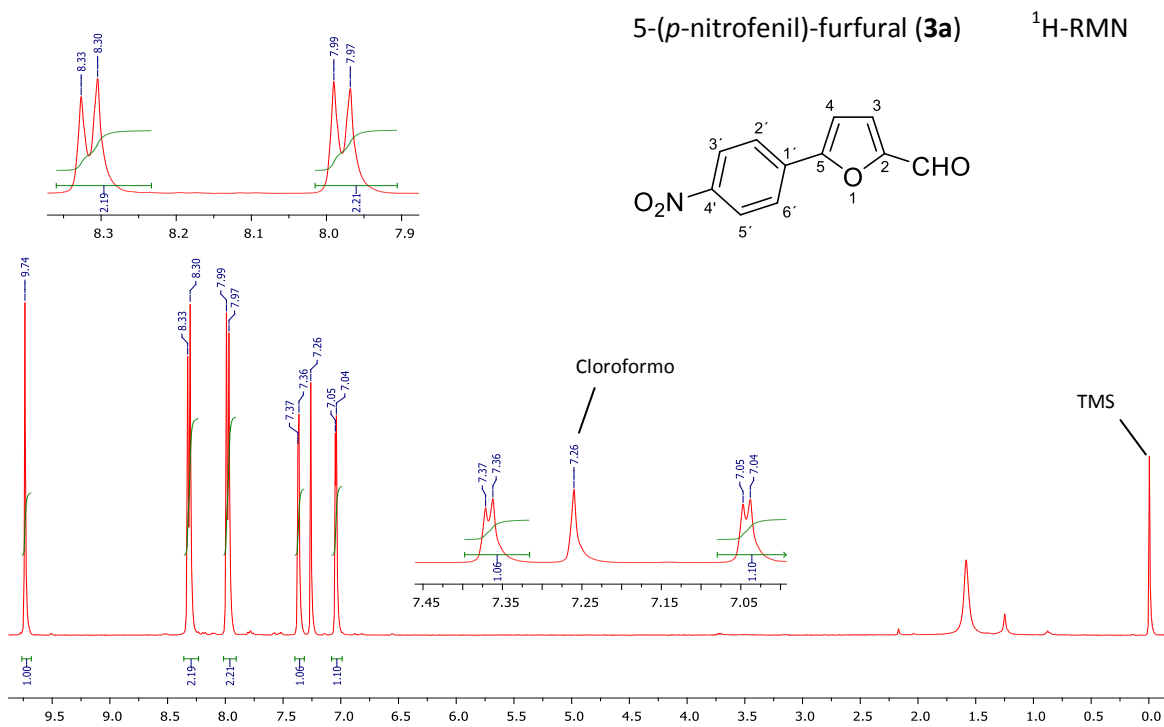
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARS O., HEDIN A., HEDDINI A. The global need for effective antibiotics—Moving towards concerted action. Drug Resistance Updates, 14(2): 68–69, abr. 2011.
2. ANDERSSON D., HUGHES D. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. Drug Resistance Updates, 15(3): 162–172, jun. 2012.
3. ALVAN G., EDLUND C., HEDDINI A. The global need for effective antibiotics—A summary of plenary presentations. Drug Resistance Updates, 14(2): 70–76, abr. 2011.
4. ECDC/EMEA. ECDC/EMEA Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react. Stockholm, 2009.
5. World Health Organization (WHO). World Health Report 2004: Changing History. [en línea] Geneva, Suiza, 2004. <<http://www.who.int/whr/2004/en/>> [Consulta: 23 Agosto 2014].
6. BLOMBERG B., MANJI K.P., URASSA W.K., TAMIM B.S., MWAKAGILE D.S., JUREEN R., MSANGI V., TELLEVIK M.G., HOLBERG-PETERSEN M., HARTHUG S., MASELLE S.Y. LANGELAND N. Antimicrobial resistance predicts death in Tanzanian children with bloodstream infections: a prospective cohort study. BMC Infectious Diseases, 7(43), may. 2007.
7. NORDBERG P., MONNET D., CARS O. Antibacterial drug resistance [Background document for the WHO project: Priority Medicines for Europe and the World. 'A Public Health Approach to Innovation']. 2004.
8. SPELLBERG B., POWERS J., BRASS E., MILLER L., EDWARDS J. Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. Clinical Infectious Diseases, 38: 1279–1286, mar. 2004.
9. DIMASSA J., HANSEN R., GRABOWSKI H. The price of innovation: new estimates of drug development costs. Journal of Health Economics, 22(5): 151–185, sep. 2003.
10. PROJAN S. Why is Big Pharma getting out of antibacterial drug discovery?. Current Opinion in Microbiology, 6(5): 427–430, oct. 2003.
11. GAMBA P., VEENING J., SAUNDERS N., HAMOEN L., DANIEL R. Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. Journal of Bacteriology, 191(13): 4186-4194, may. 2009.
12. HARRY E., MONAHAN L., THOMPSON L. Bacterial Cell Division: The Mechanism and Its Precision. International Review of Cytology, 253: 27– 94, nov. 2006.
13. BI E., LUTKENHAUS. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. Nature, 354(6349): 161 –164, nov. 1991.
14. ADAMS D., ERRINGTON J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. Nature Reviews Microbiology, 7(9): 642-653, sep. 2009.
15. NOGALES E., DOWNING K., AMOS L., LOWE J. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. Nature Structural Biology, 5(6): 451– 458, jun. 1998.
16. ADDINALL S., LUTKENHAUS J. FtsZ-spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology, 22(2): 231–237, oct. 1996.
17. LOWE J., AMOS L. Tubulin-like protofilaments in Ca⁺²-induced FtsZ sheets. The European Molecular Biology Organization Journal, 18(9): 2364-2371, may. 1999.
18. SCHEFFERS D., DRIESSEN A. The polymerization mechanism of the bacterial cell division protein FtsZ. FEBS Letters, 506(1): 6-10, sep. 2001.

19. SUN Q., MARGOLIN W. FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. Journal of Bacteriology, 180(8): 2050–2056, feb. 1998.
20. STRICKER J., MADDOX P., SALMON E., ERICKSON H. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(5): 3171–3175, mar. 2002.
21. YAN K., PEARCE K., PAYNE D. A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 270(2): 387–392, abr. 2000.
22. ERRINGTON J., DANIEL R., SCHEFFERS D. Cytokinesis in Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(1): 52-65, mar. 2003.
23. LI Z., TRIMBLE M., BRUN Y., JENSEN G. The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division. The European Molecular Biology Organization Journal, 26(22): 4694-4708, oct. 2007.
24. MA S., MA S. The development of FtsZ inhibitors as potential antibacterial agents. ChemMedChem, 7(7): 1161-1172, jul. 2012.
25. HAYDON D., STOKES N., URE R., GALBRAITH G., BENNETT J., BROWN D., BAKER P., BARYNIN V., RICE D., SEDELNIKOVA S., HEAL J., SHERIDAN J., AIWALE S., CHAUHAN P., SRIVASTAVA A., TANEJA A., COLLINS I., ERRINGTON J., CZAPLEWSKI L. An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. Science, 321(5896): 1673–1675, sep. 2008.
26. SCHAFFNER C., MARTÍN M., CHACÓN P., ANDREU J. Targeting the Assembly of Bacterial Cell Division Protein FtsZ with Small Molecules. ACS Chemical Biology, 7(2): 269-277, nov. 2011.
27. KITCHEN D., DECORNEZ H., FURR J., BAJORATH J. *Docking* and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nature Reviews Drug Discovery, 3(11): 935-949, nov. 2004.
28. OHASHI Y., CHIJIWA Y., SUZUKI K., TAKAHASHI K., NANAMIYA H., SATO T., HOSOYA Y., OCHI K., KAWAMURA F. The Lethal Effect of a Benzamide Derivative, 3-Methoxybenzamide, Can Be Suppressed by Mutations within a Cell Division Gene, *ftsZ*, in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 181(4): 1348-1351, feb. 1999.
29. CZAPLEWSKI L., COLLINS I., BOYD E., BROWN D., EAST S., GARDINER M., FLETCHER R., HAYDON D., HENSTOCK V., INGRAM P., JONES C., NOULA C., KENNISON L., ROCKLEY C., ROSE V., THOMAIDES H., URE R., WHITTAKER M., STOKES N. Antibacterial alkoxybenzamide inhibitors of the essential bacterial cell division protein FtsZ. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19(2): 524-527, ene. 2009.
30. HAYDON D., BENNETT J., BROWN D., COLLINS I., GALBRAITH G., LANCETT P., MACDONALD R., STOKES N., CHAUHAN P., SUTARIYA J., NAYAL N., SRIVASTAVA A., BEANLAND J., HALL R., HENSTOCK V., NOULA C., ROCKLEY C., CZAPLEWSKI L. Creating an Antibacterial with *in Vivo* Efficacy: Synthesis and Characterization of Potent Inhibitors of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ with Improved Pharmaceutical Properties. Journal of Medicinal Chemistry, 53(10): 3927-3936, abr. 2010.
31. MATSUI T., YAMANE J., MOGI N., YAMAGUCHI H., TAKEMOTO H., YAO M., TANAKA I. Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from

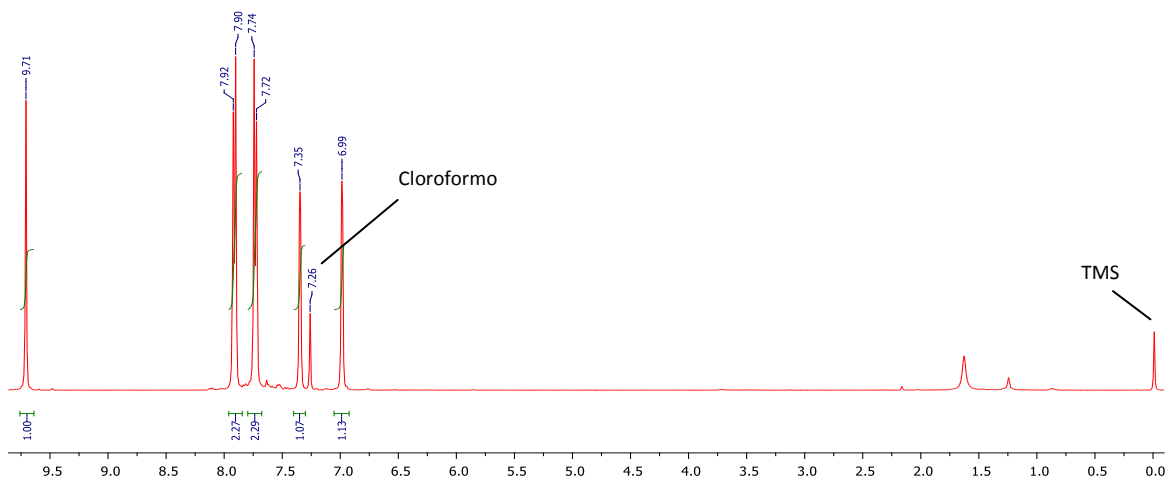
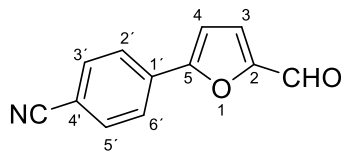
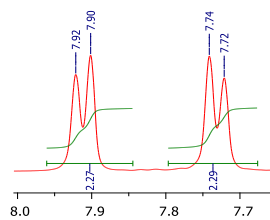
- Staphylococcus aureus*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 68(Pt 9): 1175-1188, sep. 2012.
32. ELSEN N., LU J., PARTHASARATHY G., REID J., SHARMA S., SOISSON S., LUMB K. Mechanism of Action of the Cell-Division Inhibitor PC190723: Modulation of FtsZ Assembly Cooperativity. Journal Of The American Chemical Society, 134(30): 12342-12345, jul. 2012.
 33. ANDREU J., SCHAFFNER C., HUECAS S., ALONSO D., LOPEZ M., RUIZ L., NÚÑEZ R., LLORCA O., MARTÍN A. The Antibacterial Cell Division Inhibitor PC190723 Is an FtsZ Polymer-stabilizing Agent That Induces Filament Assembly and Condensation. The Journal of Biological Chemistry, 285(19): 14239-14246, may. 2010.
 34. CHE J., ZHENG C., SONG M., BI Y., LIU Y., LI Y., WU Y., SUN L., PIAO H. Synthesis and antibacterial evaluation of furan derivatives bearing a rhodanine moiety. Medicinal Chemistry Research, 23(1): 426-435, ene. 2014.
 35. LU S., ZHUANG Y., WU N., FENG Y., CHENG J., LI Z., CHEN J., YUAN J., XU X. Synthesis and Biological Evaluation of Nitromethylene Neonicotinoids Based on the Enhanced Conjugation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(46): 10858-10863, nov. 2013.
 36. DE OLIVEIRA R., ZANI C., FERREIRA R., LEITE R., ALVES T., DA SILVA T., ROMANHA A. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase. Química Nova, 31(2): 261-267, 2008.
 37. COSNER C., MARKIEWICZ J., BOURBON P., MARIANI C., WIEST O., RUJOI M., ROSENBAUM A., HUANG A., MAXFIELD F., HELQUIST P. Investigation of N-Aryl-3-alkylidenepyrrolinones as Potential Niemann-Pick Type C Disease Therapeutics. Journal of Medicinal Chemistry, 52(20): 6494-6498, sep. 2009.
 38. JEANMART S., TAYLOR J., PARSONS R., MATHEWS C., SMITH S. Synthesis of novel heterocyclic acetyl coenzyme-A carboxylase inhibitors via a Claisen rearrangement. Tetrahedron Letters, 54(26): 3378-3383, jun. 2013.
 39. JUNG M., KU J., DU L., HU H., GATTI R. Synthesis and evaluation of compounds that induce readthrough of premature termination codons. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 21(19): 5842-5848, oct. 2011.
 40. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, approved Standard, 2009.
 41. OBUSHAK N., LESYUK A., GORAK Y., MATIICHUK V. Mechanism of Meerwein Arylation of Furan Derivatives. Russian Journal of Organic Chemistry, 45(9): 1375-1381, sep. 2009.
 42. CAREY, Francis A. Química Orgánica. 6ª ed. México, McGraw-Hill, 2006. 1245p.
 43. KRUTOSÍKOVÁ A., DANDÁROVÁ M., ALFOLDI J. 5-Aryl-2-furancarbaldehyde Hydrazones and Related Compounds. Czechoslovak Chemical Communications, 58(8): 1905-1913, 1993.
 44. PAIZS C., TAHTINEN P., LUNDELL K., POPPE L., IRIMIE F., KANERVA L. Preparation of novel phenylfuran-based cyanohydrin esters: lipase-catalysed kinetic and dynamic resolution. Tetrahedron: Asymmetry, 14(13): 1895-1904, jul. 2003.

11. ANEXO

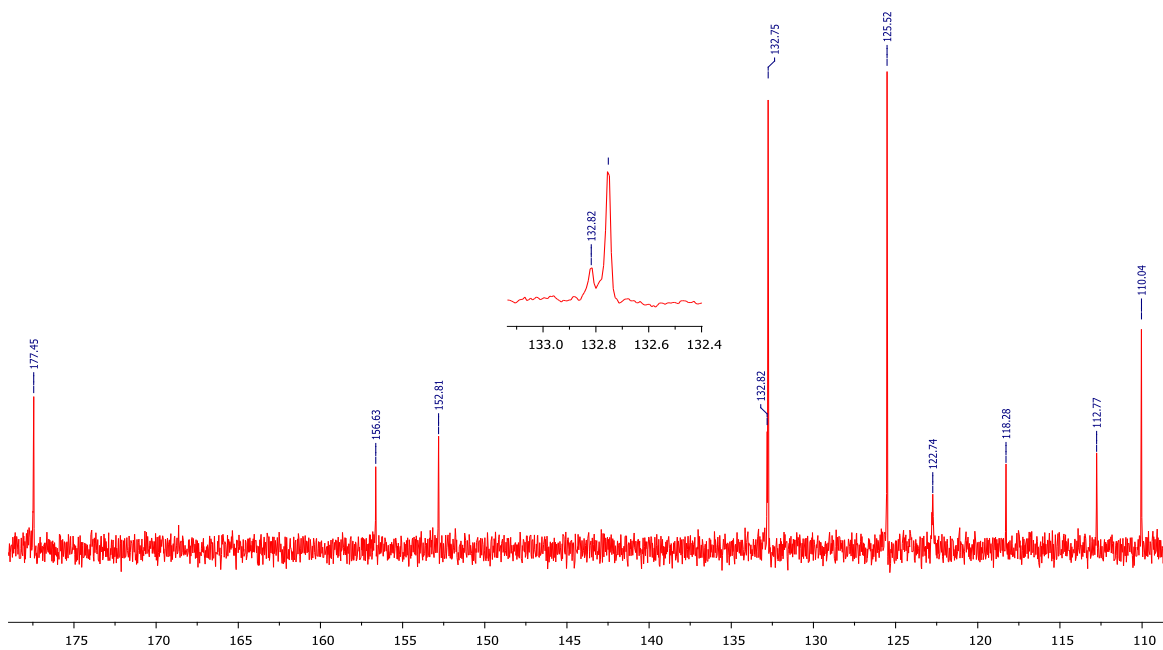


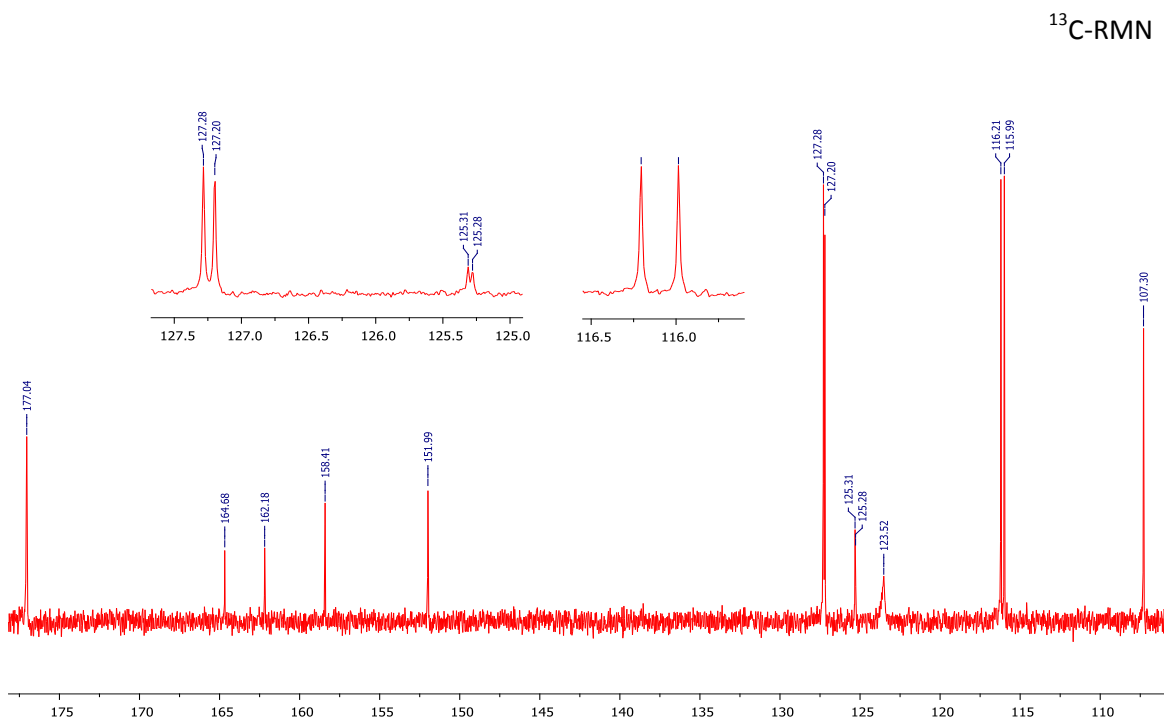
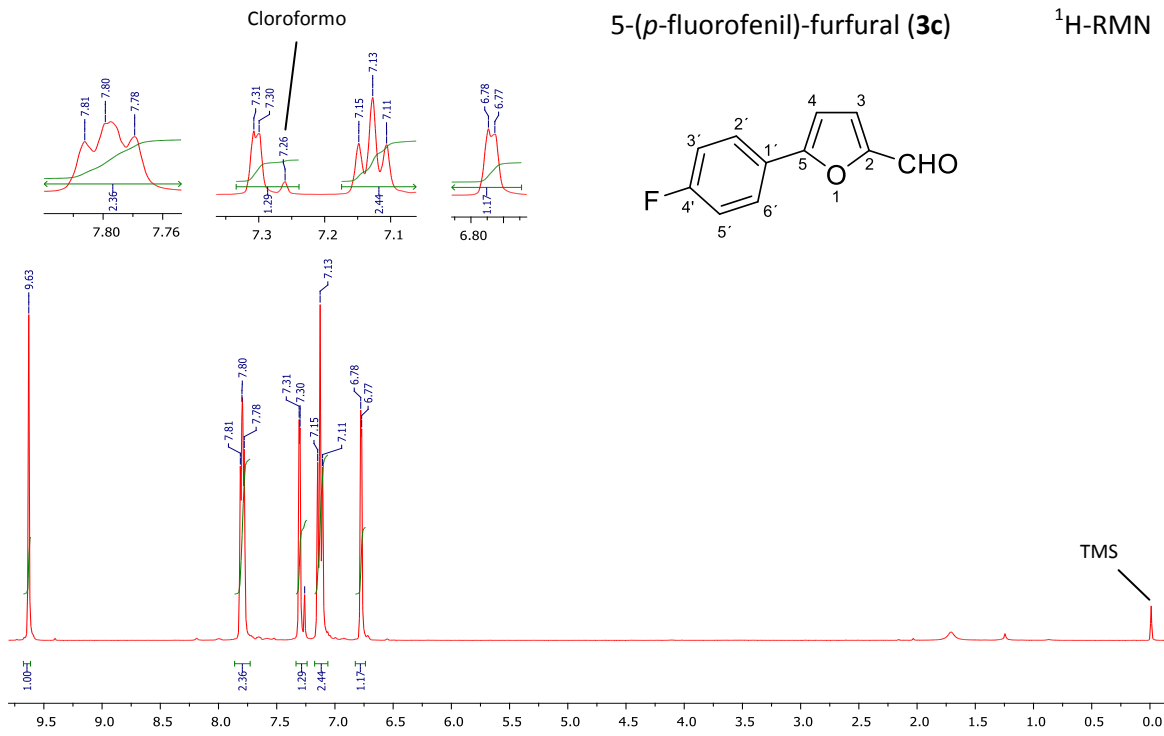
4-(5-formil-2-furil)benzonitrilo (**3b**)

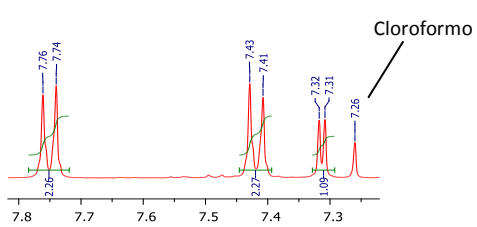
¹H-RMN



¹³C-RMN

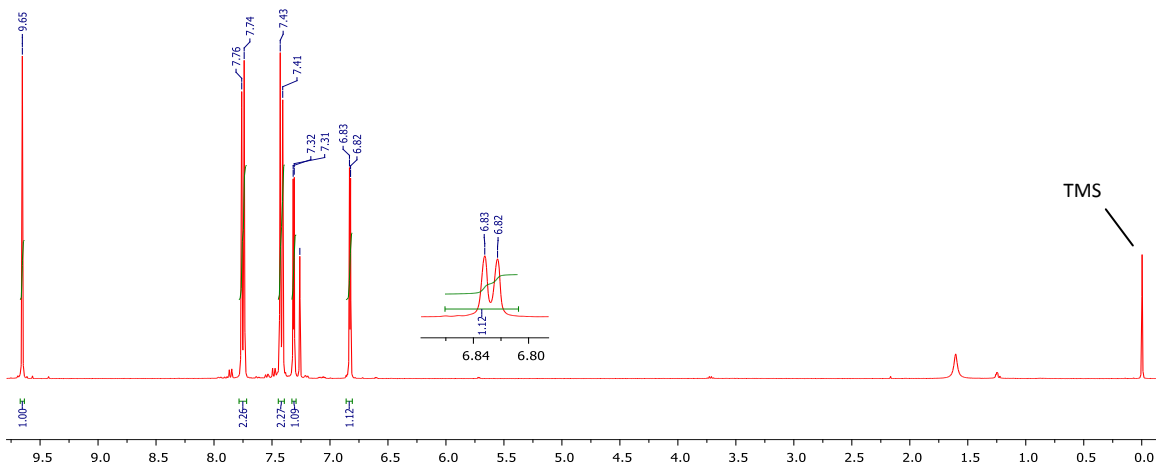
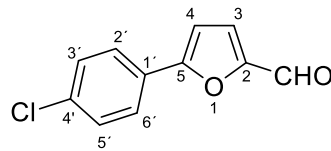




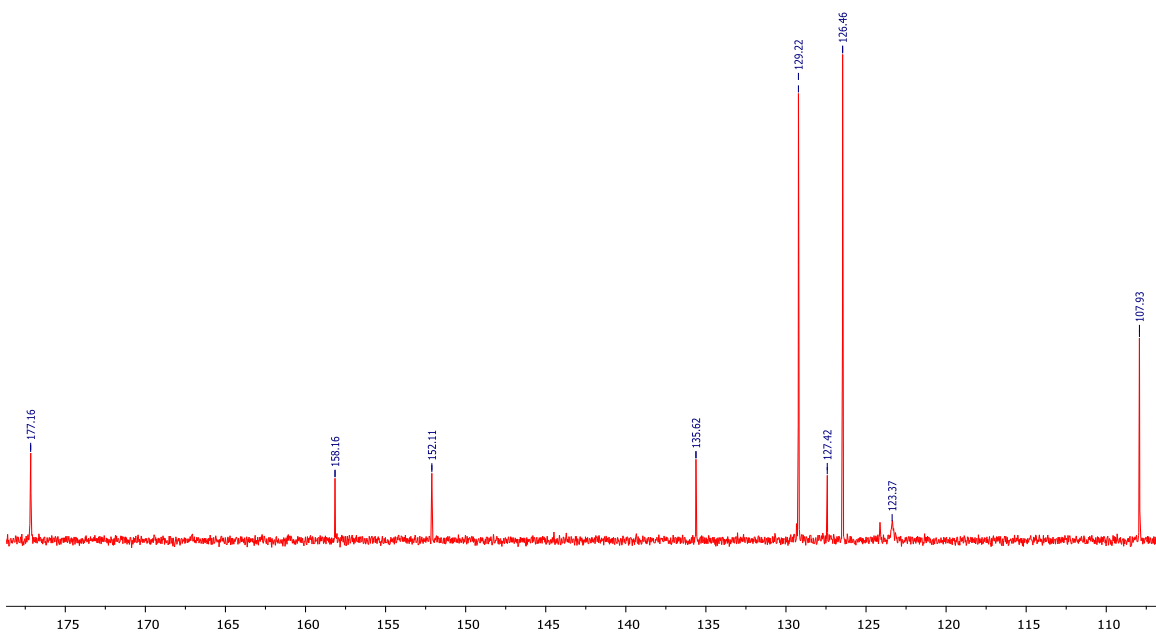


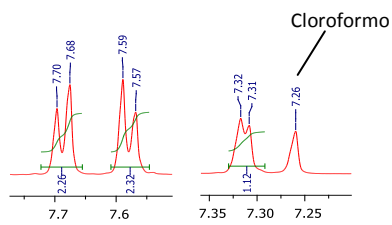
5-(*p*-clorofenil)-furfural (**3d**)

¹H-RMN



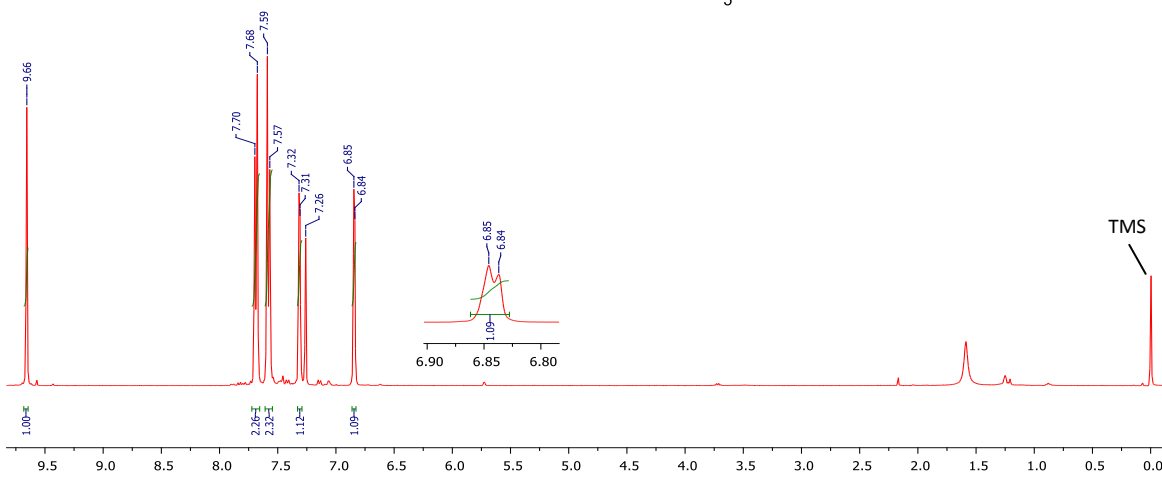
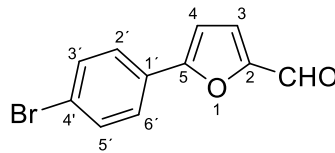
¹³C-RMN



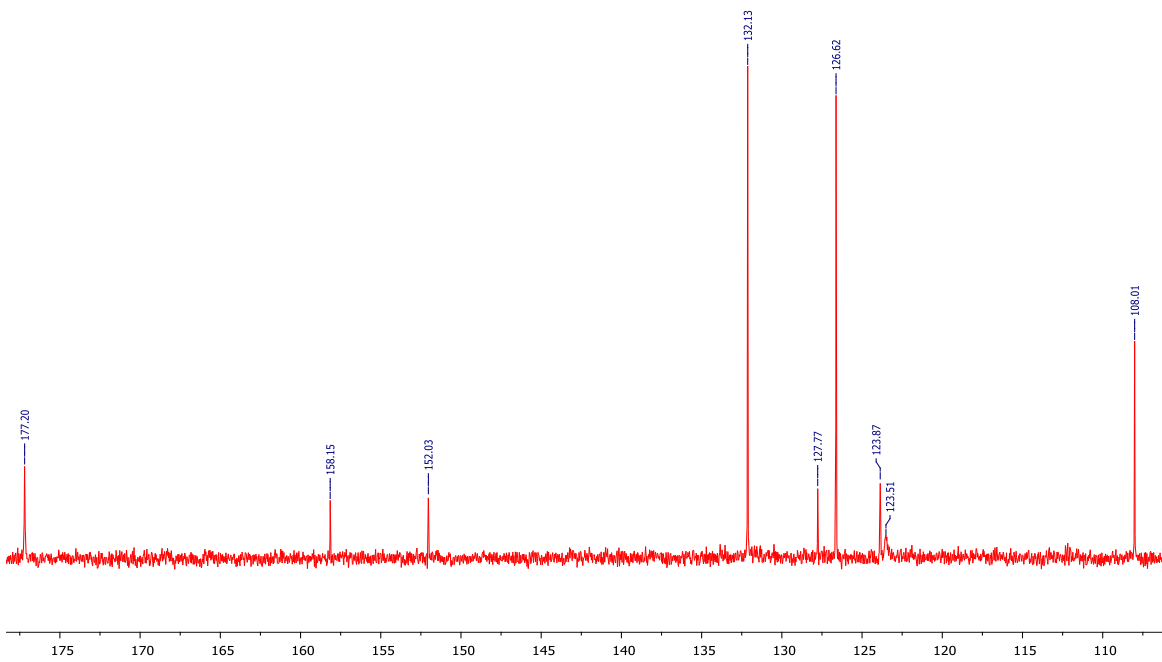


5-(*p*-bromofenil)-furfural (**3e**)

¹H-RMN

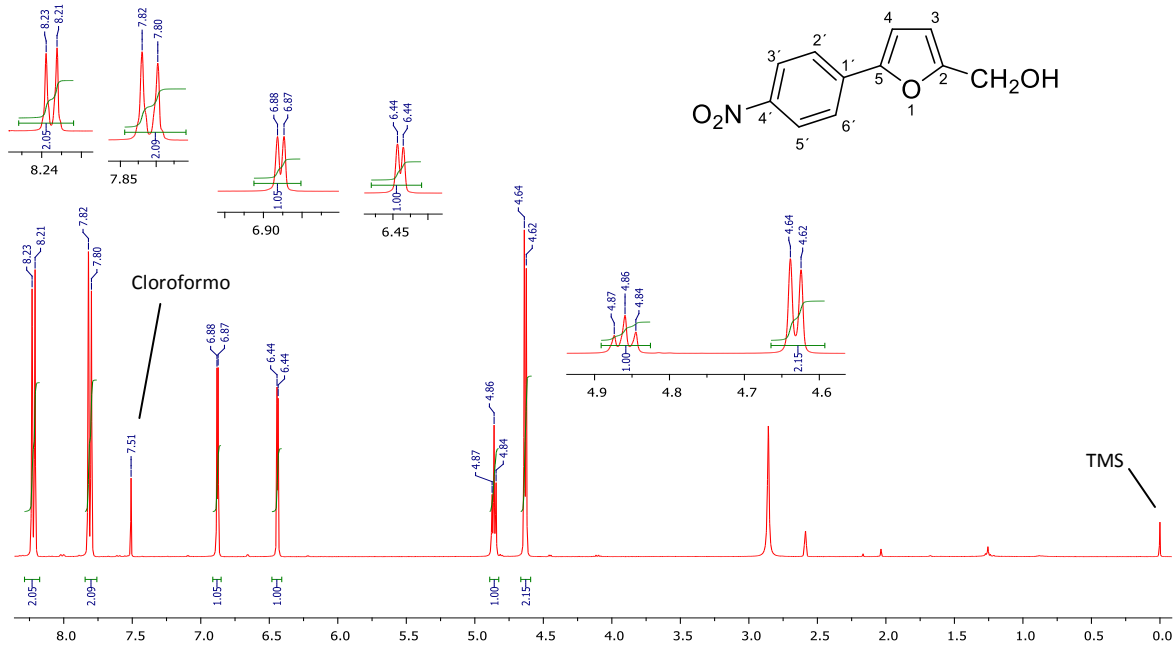


¹³C-RMN

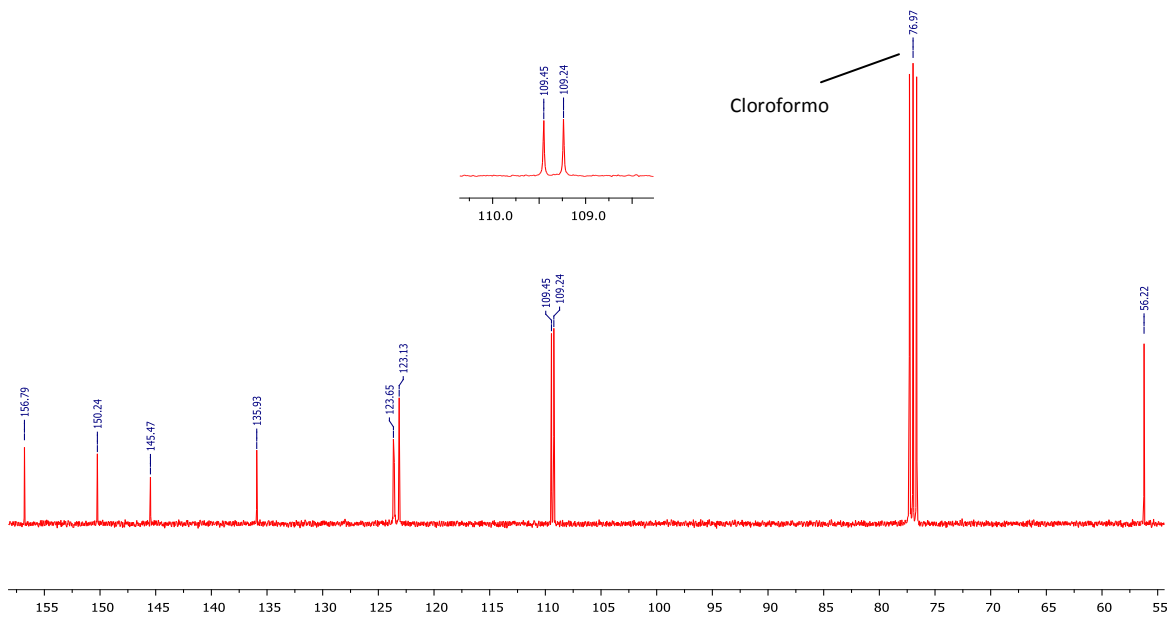


[5-(4-nitrofenil)-2-furil]metanol (**4a**)

¹H-RMN

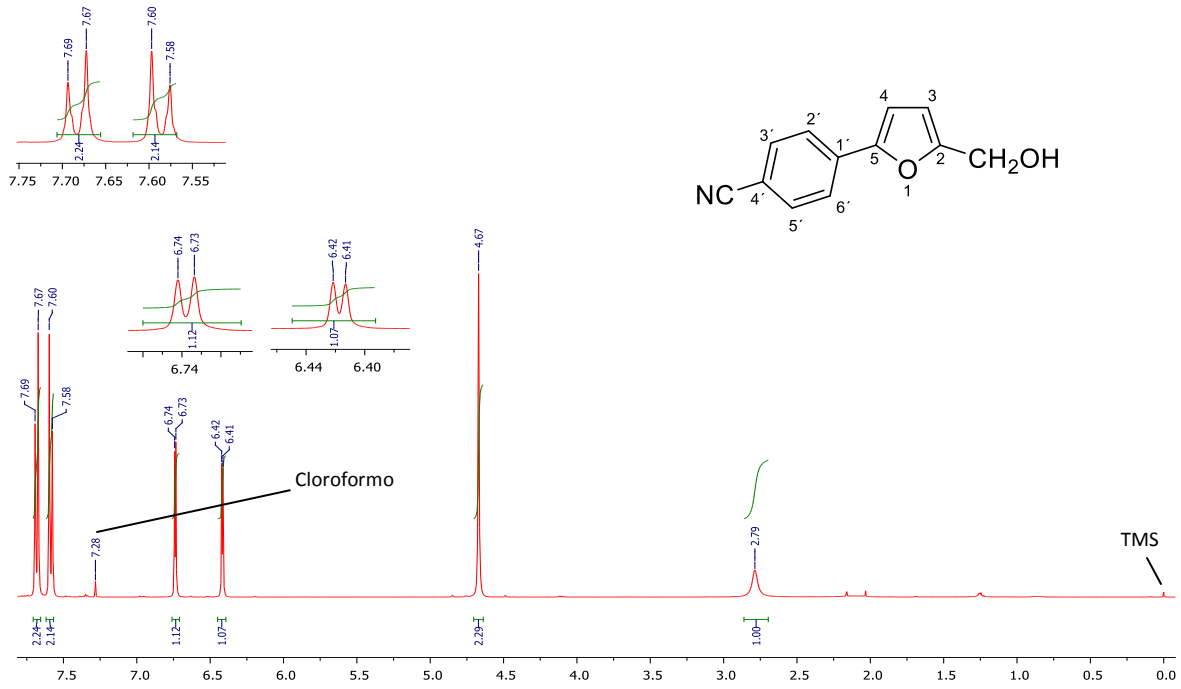


¹³C-RMN

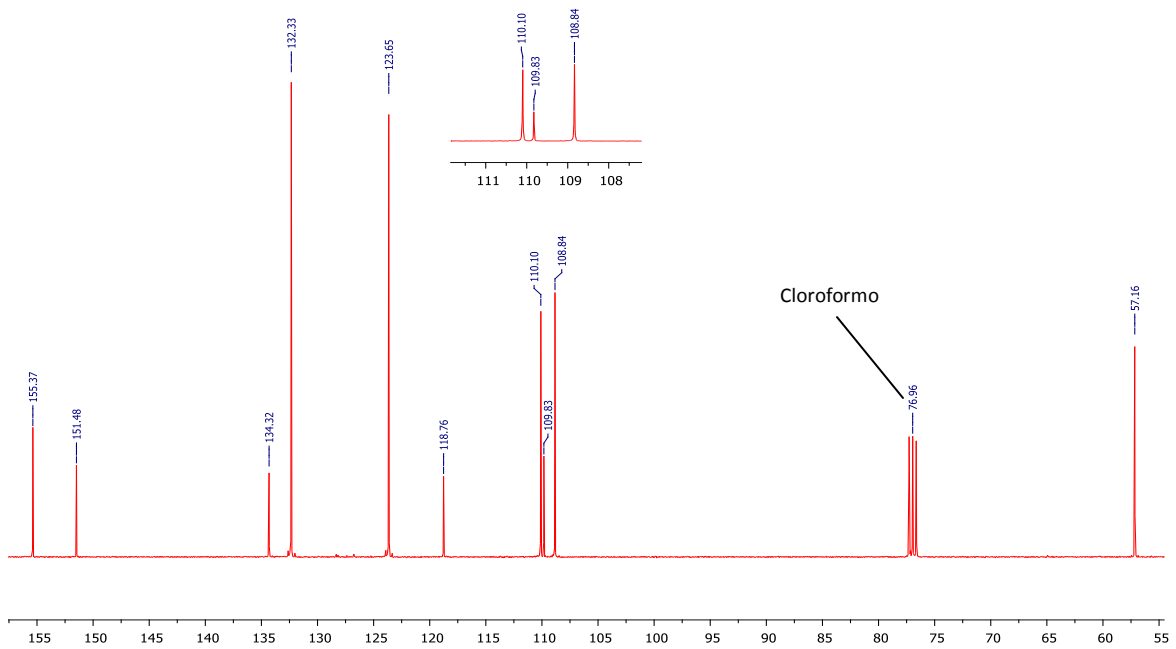


4-[5-(hidroximetil)-2-furil]benzonitrilo (**4b**)

¹H-RMN

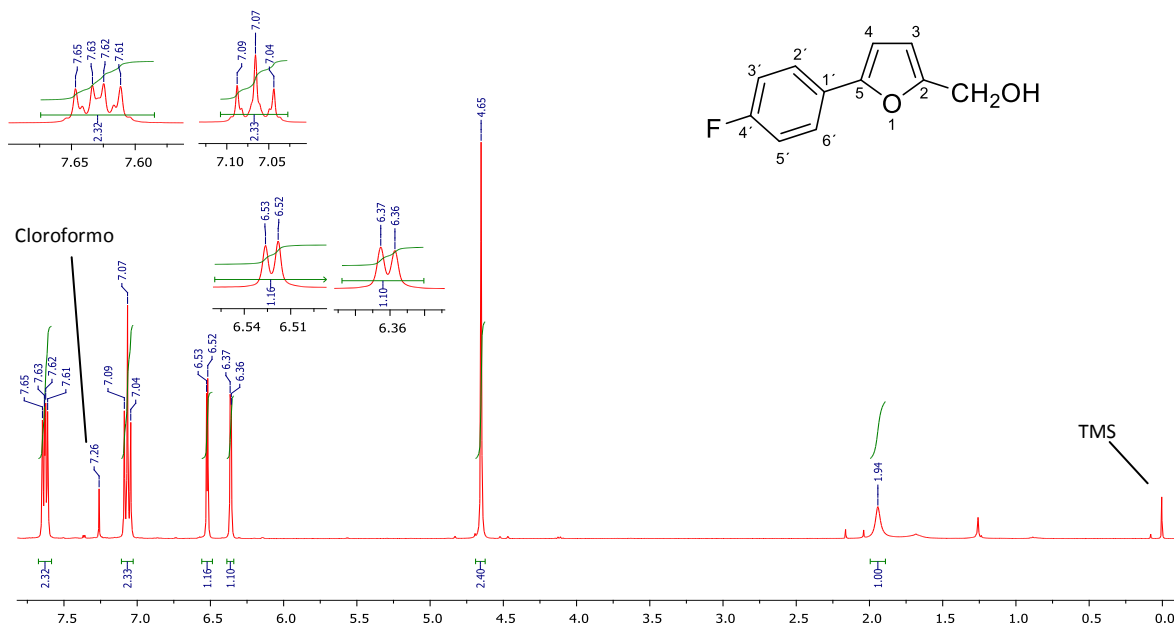


¹³C-RMN

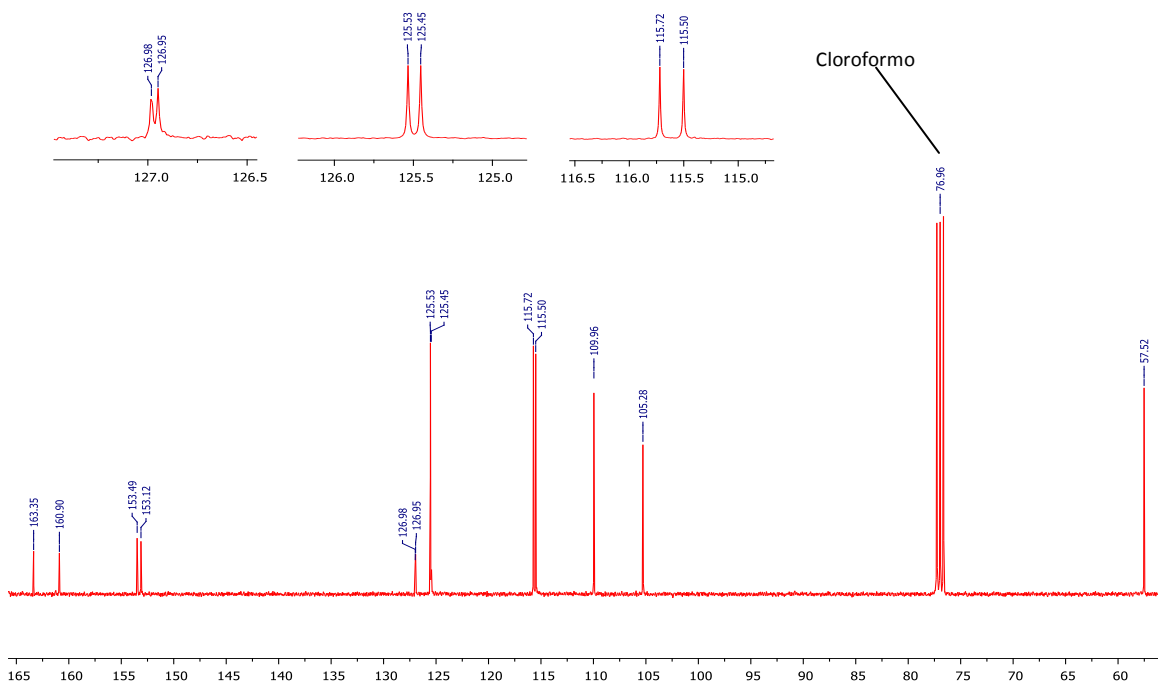


[5-(4-fluorofenil)-2-furil]metanol (**4c**)

¹H-RMN

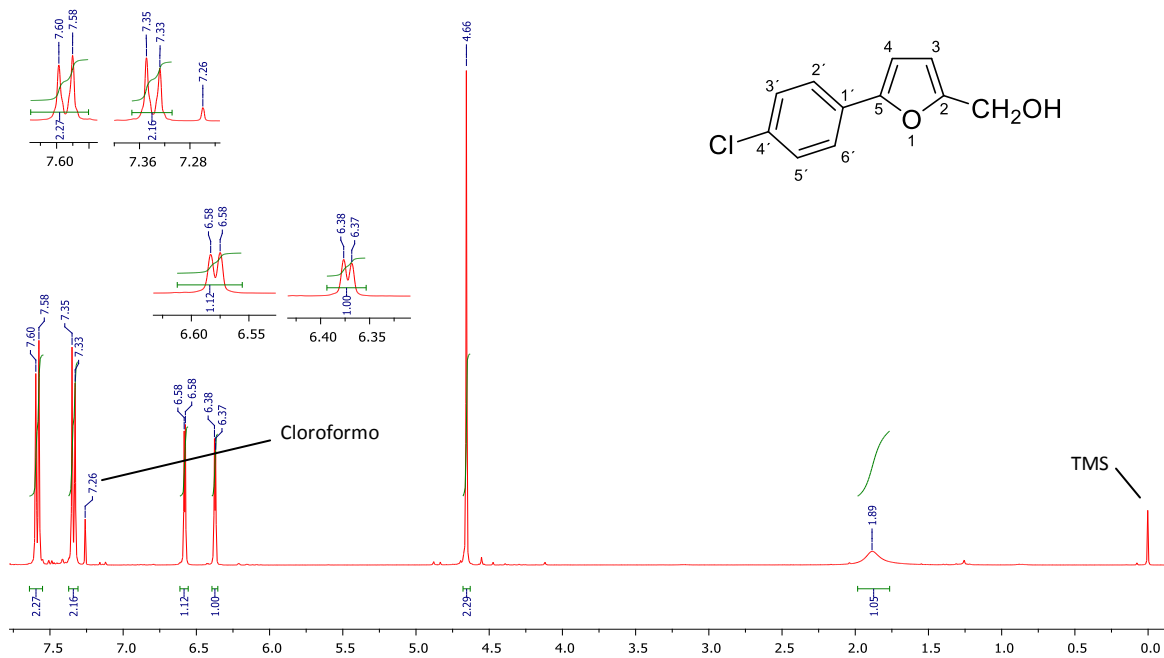


¹³C-RMN

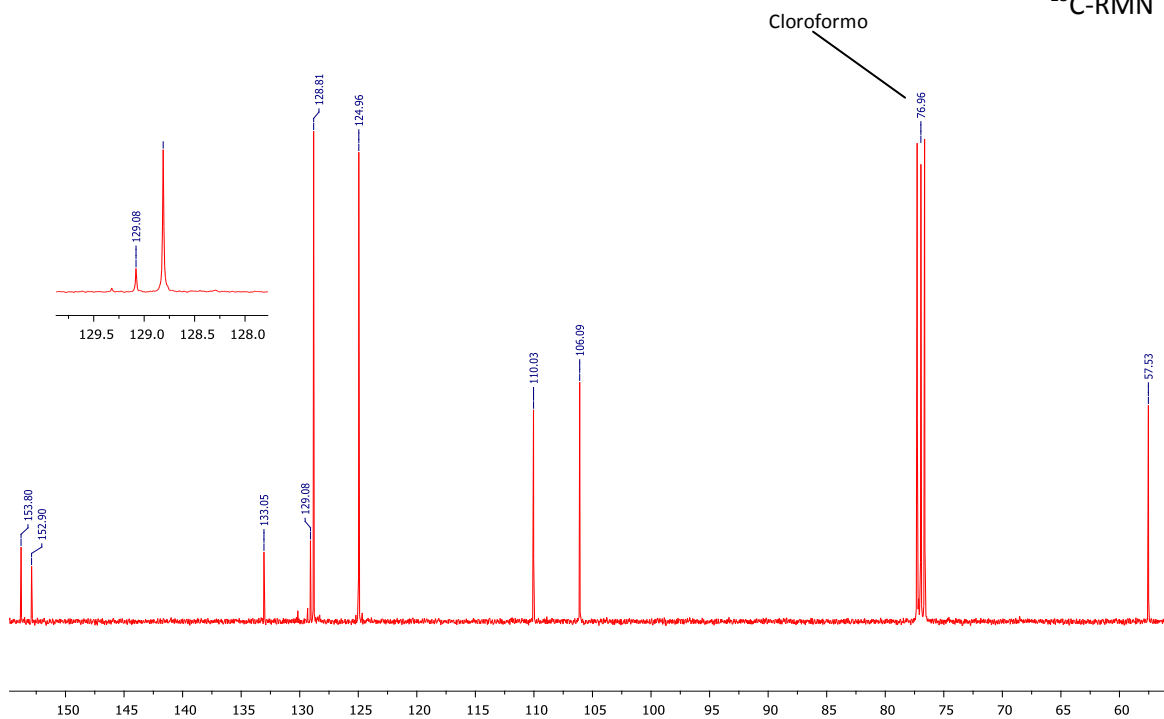


[5-(4-clorofenil)-2-furil]metanol (**4d**)

¹H-RMN

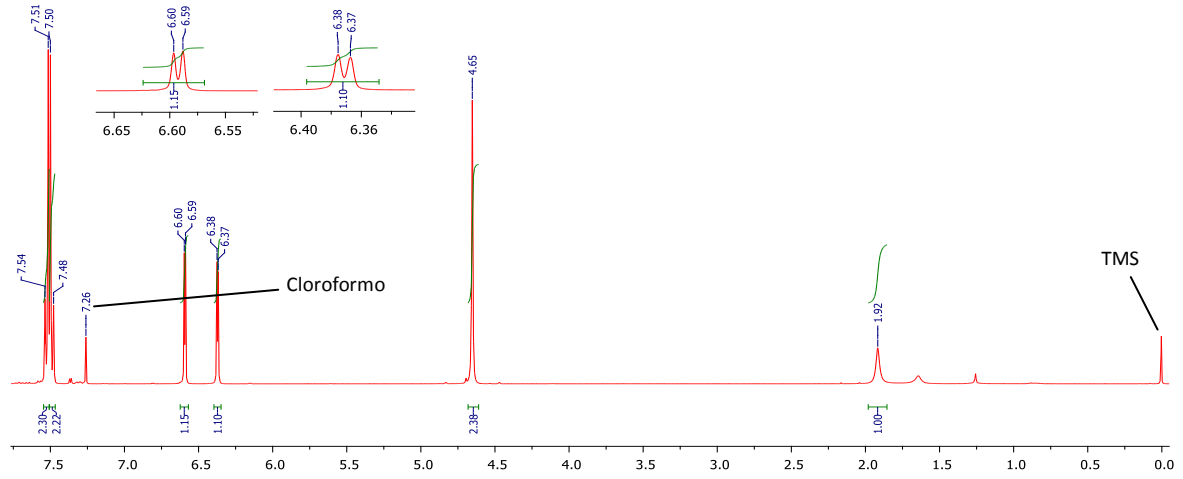
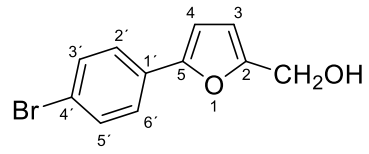
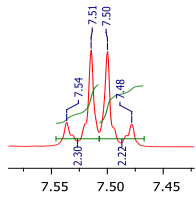


¹³C-RMN



[5-(4-bromofenil)-2-furil]metanol (**4e**)

¹H-RMN



¹³C-RMN

