

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**Diseño, síntesis, docking y evaluación de la actividad antimicrobiana de una serie de *N*-alquil-pirimidoisoquinolinquinonas**

**THOMAS ALONSO ESQUIVEL SAN MARTÍN**

**Director de memoria: Dr. David Vásquez Velásquez**

## **Agradecimientos**

*Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi madre, quien siempre ha sido mi apoyo incondicional en mi camino. Comprendo que las circunstancias a menudo nos han presentado desafíos significativos, pero su constante aliento y sabios consejos han sido faros en mi vida. Recuerdo vivamente una de sus frases que ha dejado una profunda huella en mí desde mi infancia: 'En este momento yo les traigo el pescado para que coman, pero no pueden vivir esperando el pescado siempre, tienen que aprender a pescar'. Sus analogías siempre han sido una fuente de inspiración, guiándome hacia la independencia y el entendimiento de la importancia de una educación formal. Cuando era niño, no comprendía completamente el significado de estas palabras, pero con el tiempo y la madurez, he llegado a apreciar la realidad de la vida, su costo y el esfuerzo que todos hacen para sobrevivir. Mi madre, a quien considero una persona sabia e inteligente, ha dejado un impacto perdurable en mi vida, y sus consejos son invaluable.*

*Mi profesora de enseñanza media, Javiera Quiroz, merece un agradecimiento especial. Su influencia despertó mi verdadera pasión por la química, inspirándome a dedicarme a una carrera en Química y Farmacia. Gracias a ella, descubrí mi deseo de enfocarme en esta disciplina.*

*A lo largo de mi carrera universitaria, conocí a muchos con quienes intercambié conocimientos y apoyo mutuo. En el último año, descubrí la esencia del trabajo en equipo gracias a personas cuya valiosa contribución y aprecio por la colaboración marcaron una diferencia significativa para mí.*

*Quiero expresar mi profundo agradecimiento a Sara por ser mi pilar durante los últimos años de mi carrera universitaria. Su apoyo ha sido mi consuelo en los momentos difíciles y el motor que necesitaba para completar esta etapa académica. A pesar de las complejidades de nuestro amor en dos culturas diferentes, hemos superado desafíos juntos. En este momento de gratitud, reconozco el papel esencial que Sara ha tenido en mi vida; es mi reina egipcia, una persona llena de fuerza, elegancia y sabiduría. Estoy completamente comprometido a dar lo mejor de mí por ella. Valoro su apoyo y miro con esperanza hacia los caminos que exploraremos juntos en el futuro.*

*أود أن أعبر عن امتناني العميق لسارة، لكونها ركيزتي خلال السنوات الأخيرة من حياتي الجامعية. دعمها كان عونًا لي في اللحظات الصعبة والدافع الذي كنت بحاجة لإكمال هذه المرحلة الأكاديمية. على الرغم من تعقيدات حبنا لكوننا من ثقافتين مختلفتين، إلا أننا تجاوزنا التحديات سويًا. في هذه اللحظة من الامتنان، أدرك الدور الأساسي الذي لعبته سارة في حياتي؛ إنها ملكتي المصرية، شخص مليء بالقوة والأناقة والحكمة. وأنا على عهدي لأقدم أفضل ما لدي من أجلها. أقدر دعمها وأتطلع وكلي أمل إلى دروبنا التي سنمشي فيها معًا في المستقبل.*

*Quiero agradecer especialmente a mi profesor guía, David. Desde el primer día, su amistad y apoyo me hicieron sentir cómodo. David no solo destaca como un brillante profesor, sino como una persona excepcionalmente inteligente en su campo. Su dedicación va más allá de lo académico, mostrando interés genuino en el éxito integral de sus estudiantes. Siempre disponible para escuchar y respaldar tanto en lo académico como en lo personal, a pesar de sus múltiples responsabilidades. Agradezco profundamente haberlo conocido y espero mantener esta relación valiosa.*

## Listado de abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, del inglés High Performance Liquid Chromatography
<b>Ag<sub>2</sub>O</b>	Óxido de plata	<b>IDSA</b>	Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas, del inglés Infectious Diseases Society of America
<b>Ala</b>	Alanina	<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>Arg</b>	Arginina	<b>IR</b>	Espectrometría de infrarrojo
<b>ASC</b>	Agar Sangre Cordero	<b>KBr</b>	Bromuro de potasio
<b>Asp</b>	Ácido Aspártico	<b>Leu</b>	Leucina
<b>ATCC</b>	Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química, del inglés Anatomical, Therapeutic, Chemical classification system	<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnesio
<b>ATP</b>	Adenosín Trifosfato	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b><sup>13</sup>C RMN</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono-13	<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado	<b>PA</b>	Para Análisis
<b>CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	Tricloruro de cerio (III) heptahidratado	<b>PBP</b>	Proteína de unión a la penicilina
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano	<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>CIM</b>	Concentración Inhibitoria Mínima	<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>CLSI</b>	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, del inglés Clinical and Laboratory Standards Institute	<b>Pro</b>	Prolina
<b>CTeB</b>	Cadena Transportadora de electrones Bacteriana	<b>R<sup>2</sup></b>	Coficiente de determinación
<b>2D-RMN</b>	Resonancia magnética nuclear bidimensional	<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>ROS</b>	Especies Reactivas del Oxígeno
<b>EtOH</b>	Etanol	<b>SAMR</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> metilino resistente
<b>FAD</b>	Flavina Adenina Dinucleótido	<b>SAMS</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> metilino susceptible
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos, del inglés Food and Drug Administration	<b>SDH</b>	Succinato deshidrogenasa
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Resonancia magnética nuclear de protones	<b>Ser</b>	Serina
<b>His</b>	Histidina	<b>TMS</b>	Trimetilsilano
		<b>Trp</b>	Triptófano
		<b>Tyr</b>	Tirosina
		<b>UCI</b>	Unidad de Cuidados Intensivos
		<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
		<b>Val</b>	Valina

## ÍNDICE

1. <u>RESUMEN</u>	8
2. <u>SUMMARY</u>	9
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	10
4. <u>DISEÑO</u>	17
4.1. <u>Estructura en común</u>	17
4.2. <u>Cambio bioisostérico</u>	17
4.3. <u>Alargamiento de cadena alquílica</u>	18
5. <u>HIPÓTESIS</u>	19
6. <u>OBJETIVOS</u>	19
7. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	21
7.1. <u>Reactivos e insumos</u>	21
7.2. <u>Síntesis</u>	21
7.3. <u>Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima</u>	21
8. <u>RESULTADOS</u>	25
8.1. <u>Síntesis de los compuestos 1 a 8</u>	25
8.2. <u>Puntos de fusión</u>	26
8.3. <u>Resultados microbiológicos</u>	28
9. <u>MODELAMIENTO MOLECULAR DOCKING</u>	29
10. <u>DISCUSIÓN</u>	42
11. <u>CONCLUSIONES</u>	51
12. <u>PROYECCIONES</u>	52
13. <u>REFERENCIAS</u>	53
14. <u>ANEXO</u>	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Cronología del lanzamiento de los antibióticos al mercado (arriba) y el reporte de aparición de resistencia (abajo) dejando en evidencia que, tras la introducción de nuevos agentes antibacterianos, la resistencia no tarda en manifestarse. 12
- Figura 2:** Mecanismo de acción de la ubiquinona en la cadena transportadora de electrones, resaltando su relevancia como transportador molecular. La ubiquinona desempeña un papel crucial entre los complejos I, II y III. Estos complejos hacen reacciones químicas que liberan protones al espacio intermembrana para la producción de ATP a través de la ATP sintasa. Además, se identifica el posible sitio de acción de los compuestos quinónicos que se están investigando. 16
- Figura 3:** Estructura del núcleo tricíclico quinónico propuesto como precursor. 17
- Figura 4:** Compuestos que mostraron un cambio significativo de actividad antibacteriana al presentar el reemplazo bioisotérico de un átomo de azufre por uno de nitrógeno. 17
- Figura 5:** Resumen de la estructura propuesta para el estudio, que abarca los tres aspectos del diseño: la cadena alquílica, el cambio bioisotérico y el núcleo quinónico precursor. 18
- Figura 6:** Esquema que ilustra la distribución de los pocillos en las placas utilizadas al momento de realizar el ensayo de microdilución en caldo, destinadas a la determinación de la actividad antibacteriana de distintos compuestos quinónicos frente a cepas bacterianas prototipo. 22
- Figura 7:** Ataque nucleofílico de la amina alquílica al compuesto 1. No se observó la presencia del isómero C-9 ni el di-adicionado C-8,9. Se detectó solo la formación del isómero C-8. 25
- Figura 8:** Fotografías de los compuestos 1 a 8 sintetizados. 26
- Figura 9:** Ubiquinona representada en color amarillo en su sitio de unión del complejo II. En la parte superior se encuentran etiquetados residuos de aminoácidos TYR 83 y TRP 164 que hacen interacción con el oxígeno O1 de la Ubiquinona. 30
- Figura 10:** Estructura química de la ubiquinona representada en 2D. 31
- Figura 11:** Representación 2D que visualiza el sitio de unión cercano a la ubiquinona, detallando los aminoácidos constituyentes y destacando, mediante flechas, aquellos que interactúan con esta molécula. 32
- Figura 12:** Representación visual que exhibe las restricciones definidas a partir de la ubiquinona en color amarillo. Las dos esferas de color naranja ilustran las restricciones posicionales para los átomos de oxígeno, mientras que las restricciones de puente de hidrógeno, que se originan con el O1 de la ubiquinona, están delineadas con líneas punteadas. 33

**Figura 13:** El Compuesto 7 con hexilamina en la posición 8 (color celeste), muestra en su modelado molecular que el oxígeno del carbonilo en posición 1 interactúa con Tyr 83 y Trp 164, cumpliendo con la restricción posicional O1 de la ubiquinona (color amarillo). Además, el nitrógeno en la posición 5 satisface la restricción posicional O4. El oxígeno del carbonilo en posición 3 forma una interacción adicional con Ser 27. En ambos modelos de acoplamiento, este compuesto alcanzó un puntaje uniforme de -6.149. 37

**Figura 14:** El compuesto con hexiltio en la posición 8 (color rosado), muestra en su modelado molecular que el oxígeno del carbonilo en posición 1 interactúa con Tyr 83 y Trp 164, cumpliendo con la restricción posicional O1 de la ubiquinona (color amarillo) e incluso el oxígeno de la posición 10 también forma interacciones con Tyr 83. Además, el nitrógeno en la posición 5 satisface la restricción posicional O4. El oxígeno del carbonilo en posición 3 forma una interacción adicional con Ser 27. En ambos modelos de acoplamiento, este compuesto alcanzó un puntaje uniforme de -6,869. 38

**Figura 15:** El compuesto 5 con butilamino en la posición 8 (color verde), muestra en su modelado molecular que el nitrógeno de la butilamina en posición 8 interactúa solo con Tyr 83, cumpliendo con la restricción posicional O1 de la ubiquinona (color amarillo). Además, el oxígeno del carbonilo de la posición 10 satisface la restricción posicional O4. Esta molécula es la que tiene el puntaje más bajo observado, y fue incluida solo en el modelo beta, obteniendo un puntaje de docking de -5.922. 39

**Figura 16:** El compuesto con butiltio en la posición 8 (color azul), muestra en su modelado molecular que el oxígeno del carbonilo en posición 7 interactúa con Tyr 83 y Trp 164, cumpliendo con la restricción posicional O1 de la ubiquinona (color amarillo). Además, el oxígeno del carbonilo de la posición 10 satisface la restricción posicional O4. El anillo del uracilo presente en la estructura forma una interacción adicional con Phe 20. Obteniendo así el mayor puntaje de docking en el modelo de *E.Faecalis*, el cual fue de -7,567. 40

**Figura 17:** Representación del mecanismo de reacción propuesto para la formación de los compuestos N-alquílicos pirimidoisoquinolinquinonas. En este proceso, la amina realiza un ataque nucleofílico en la posición 8, reduciendo el núcleo quinónico. Posteriormente, mediante oxidación aeróbica, se conduce a la obtención del producto final. 42

**Figura 18:** Comparación 3D entre dietilamina (una amina secundaria) y butilamina (una amina alquílica primaria), observando cómo las cadenas alquílicas generan impedimento estérico alrededor del nitrógeno, donde reside el par de electrones responsables del ataque nucleofílico. 43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b><u>Tabla 1:</u></b> Antibacterianos aprobados por la FDA en los últimos 10 años.	<b>14</b>
<b><u>Tabla 2:</u></b> CIM de los compuestos tioalquílicos donde los compuestos activos son destacados en color verde.	<b>18</b>
<b><u>Tabla 3:</u></b> Concentraciones alcanzadas en cada pocillo de los compuestos testeados en los ensayos para la determinación de la CIM. Los compuestos <b>1</b> y <b>2</b> presentaron una concentración de 32 a 0,25 µg/mL, en cambio para los compuestos <b>3</b> al <b>8</b> las concentraciones estudiadas fueron de 64 a 0,5 µg/mL. Las concentraciones de los antibióticos control fueron de 8 a 0,0625 µg/mL.	<b>23</b>
<b><u>Tabla 4:</u></b> Propiedades químicas de los compuestos.	<b>27</b>
<b><u>Tabla 5:</u></b> Valores de CIM expresado en µg/mL de los compuestos quinónicos sintetizados frente a cada bacteria prototipo.	<b>28</b>
<b><u>Tabla 6:</u></b> Matriz de radios de esferas de inclusión para la bacteria SAMS, detallando los valores de R <sup>2</sup> correspondientes a cada combinación posible. En color verde se representa el máximo valor de R <sup>2</sup> obtenido.	<b>34</b>
<b><u>Tabla 7:</u></b> Matriz de radios de esferas de inclusión para la bacteria SAMR, detallando los valores de R <sup>2</sup> correspondientes a cada combinación posible. En color verde se representa el máximo valor de R <sup>2</sup> obtenido.	<b>35</b>
<b><u>Tabla 8:</u></b> Matriz de radios de esferas de inclusión para la bacteria <i>E.Faecalis</i> , detallando los valores de R <sup>2</sup> correspondientes a cada combinación posible. En color verde se representa el máximo valor de R <sup>2</sup> obtenido.	<b>35</b>
<b><u>Tabla 9:</u></b> Comparación entre los puntajes de docking obtenidos en el programa Maestro y los valores reales de CIM para los compuestos alquílicos, tanto del modelo alfa (SAMS y SAMR) como del modelo beta ( <i>E.Faecalis</i> ).	<b>36</b>
<b><u>Tabla 10:</u></b> Utilización de modelos alfa y beta en el proceso de docking molecular, enfocado en la interacción con moléculas que presentan una sustitución en la posición 8 mediante derivados alquílicos nitrogenados aún no sintetizados.	<b>41</b>
<b><u>Tabla 11:</u></b> Tabla comparativa de compuestos alquílicos que incluye aquellos con presencia de azufre y nitrógeno.	<b>45</b>

## Resumen

La resistencia a los antimicrobianos plantea un desafío global crítico. La OMS y otras instituciones internacionales llaman insistentemente al desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos, advirtiendo que, si no abordamos este problema hoy podría dejarnos sin opciones efectivas para tratar enfermedades infecciosas a corto plazo. En 2019, se registraron 13.7 millones de muertes por síndromes infecciosos, y se proyecta que la resistencia cause 10 millones anuales para 2050.

Los diseños estructurales de antibióticos se enfocan en blancos clásicos, como la pared de peptidoglicano, las subunidades ribosomales para inhibir la síntesis proteica y el ADN bacteriano. No obstante, estos blancos convencionales enfrentan el problema de que las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia, lo que resulta en que los diseños tradicionales sean fácilmente susceptibles a los mecanismos de resistencia de estas bacterias. En consecuencia, el desarrollo de compuestos con estructuras similares o pertenecientes a la misma familia también enfrentará dicha problemática.

En este contexto, esta investigación se centra en el desarrollo de potenciales agentes antibacterianos pertenecientes a una nueva familia de antimicrobianos. Estos agentes están estructurados con una pirimidoisoquinolinquinona diseñada a partir de la ubiquinona, la cual desempeña un papel esencial en la cadena transportadora de electrones bacteriana (CTeB), siendo fundamental para la generación de energía y, por ende, crucial para el sustento de la vida bacteriana. Se llevaron a cabo la síntesis y evaluación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de siete compuestos quinónicos frente a bacterias prototipo.

Los resultados revelaron que cinco de siete compuestos sintetizados exhibieron actividad antibacteriana en cepas Gram Positivas, con CIM que variaron entre 2  $\mu\text{g/mL}$  y 64  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que no se observó actividad en cepas Gram negativas. Además, se compararon los compuestos nitrogenados frente a compuestos azufrados y se destacó que los derivados alquílicos nitrogenados demostraron una mejor actividad en comparación con los tioalquílicos, y se notó que los compuestos activos presentan un rango de lipofilia.

La ubiquinona se une al sitio de unión del complejo Succinato Deshidrogenasa (SDH) bacteriano, teniendo un rol importante la prevención de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Residuos específicos, como Tyr D83 y Trp B164, que interactúan directamente con la ubiquinona y cumplen funciones importantes en la CTeB. La conservación evolutiva de ciertos aminoácidos para la funcionalidad del SDH representa potenciales blancos terapéuticos. Se utilizó un modelo de docking molecular con restricciones específicas para simular las interacciones y orientaciones moleculares relacionadas a la ubiquinona, con el fin de predecir la interacción de los compuestos estudiados. Sin embargo, se reconoce la variabilidad en resultados de la CIM debido a factores como la morfología bacteriana y las barreras estructurales, así como las diferencias intrínsecas entre especies bacterianas.

## Summary

Antimicrobial resistance poses a critical global challenge. The World Health Organization (WHO) and other international institutions urgently call for the development of new antimicrobial drugs, warning that failure to address this issue today could leave us without effective options to treat infectious diseases in the short term. In 2019, 13.7 million deaths were recorded due to infectious syndromes, and it is projected that resistance will cause 10 million deaths annually by 2050.

The structural designs of antibiotics focus on classic targets, such as the peptidoglycan wall, ribosomal subunits to inhibit protein synthesis, and bacterial DNA. However, these conventional targets encounter the issue of bacterial resistance mechanisms, rendering traditional designs highly susceptible to these bacteria's resistance mechanisms. Consequently, the development of compounds with similar or related structures within the same family will also face this challenge.

In this context, this research focuses on the development of potential antibacterial agents belonging to a new family of antimicrobials. These agents are structured with a pyrimidoisoquinolinquinone designed from ubiquinone, which plays an essential role in the bacterial electron transport chain, being vital for energy generation and therefore crucial for bacterial life sustenance. The synthesis and evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) of seven quinonic compounds against prototype bacteria were conducted.

The results revealed that five out of seven synthesized compounds exhibited antibacterial activity against Gram-positive strains, with MIC ranging between 2  $\mu\text{g/mL}$  and 64  $\mu\text{g/mL}$ , while no activity was observed against Gram-negative strains. Additionally, a comparison between nitrogenated and sulfurated compounds was carried out, highlighting that nitrogenated alkyl derivatives showed better activity compared to thioalkyl derivatives and it was noted that the active compounds exhibited a range of lipophilicity.

Ubiquinone binds to the binding site of the bacterial Succinate Dehydrogenase (SDH) complex, playing a significant role in preventing the formation of Reactive Oxygen Species (ROS). Specific residues, such as Tyr D83 and Trp B164, interact directly with ubiquinone and perform crucial functions in the bacterial electron transport chain. The evolutionary conservation of certain amino acids for the functionality of SDH represents potential therapeutic targets. A molecular docking model with specific constraints was utilized to simulate the interactions and molecular orientations related to ubiquinone, aiming to predict the interaction of the studied compounds. However, the variability in MIC results is acknowledged due to factors such as bacterial morphology, structural barriers, and intrinsic differences between bacterial species.

## Introducción

Los antibióticos son medicamentos utilizados para tratar infecciones bacterianas provocando la muerte de la bacteria, o bien dificultando el crecimiento y multiplicación de las mismas. Estos se utilizan en seres humanos y en animales, abarcando tanto a mascotas como a animales de cría.

A lo largo de la historia, las infecciones bacterianas han representado una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, lo que ha generado un constante desafío para combatirlas. Uno de los primeros tratamientos infecciosos aparece en 1910, donde el médico y bacteriólogo Alemán Paul Ehrlich descubrió la arsfenamina, conocida desde entonces con el nombre de Salvarsán, como tratamiento para la sífilis, una enfermedad infecciosa de transmisión sexual que causaba numerosas muertes en esa época. Este compuesto, fue apodado como el mismo Ehrlich como "Zauberkegel" o "bala mágica", por su rápido impacto, y su capacidad casi milagrosa para curar la enfermedad de manera sorprendente, especialmente en un periodo en el que no existían avances en medicamentos antibacterianos [1].

Tiempo después, en 1928, el bacteriólogo Escocés Sir Alexander Fleming descubrió accidentalmente la penicilina a partir del hongo "*Penicillium notatum*", logrando así un hito histórico en la medicina al proporcionar un tratamiento efectivo para las infecciones bacterianas, que eran una de las principales causas de muerte en el siglo XX [2]. Gracias a la llegada de los antibióticos, las enfermedades por infección dejaron de ser la principal causa de muerte, marcando así el inicio de lo que hoy en día se conoce como la "Época dorada de los antibacterianos". Durante las décadas de 1940 y 1960, se inició la búsqueda de nuevos agentes y familias provenientes de fuentes naturales, logrando identificar 9 de las 19 familias de agentes antibacterianos que hoy en día se conocen [3], que incluyen compuestos ampliamente empleados en el ámbito clínico como los betalactámicos, glucopéptidos, aminoglucósidos y macrólidos, entre otros.

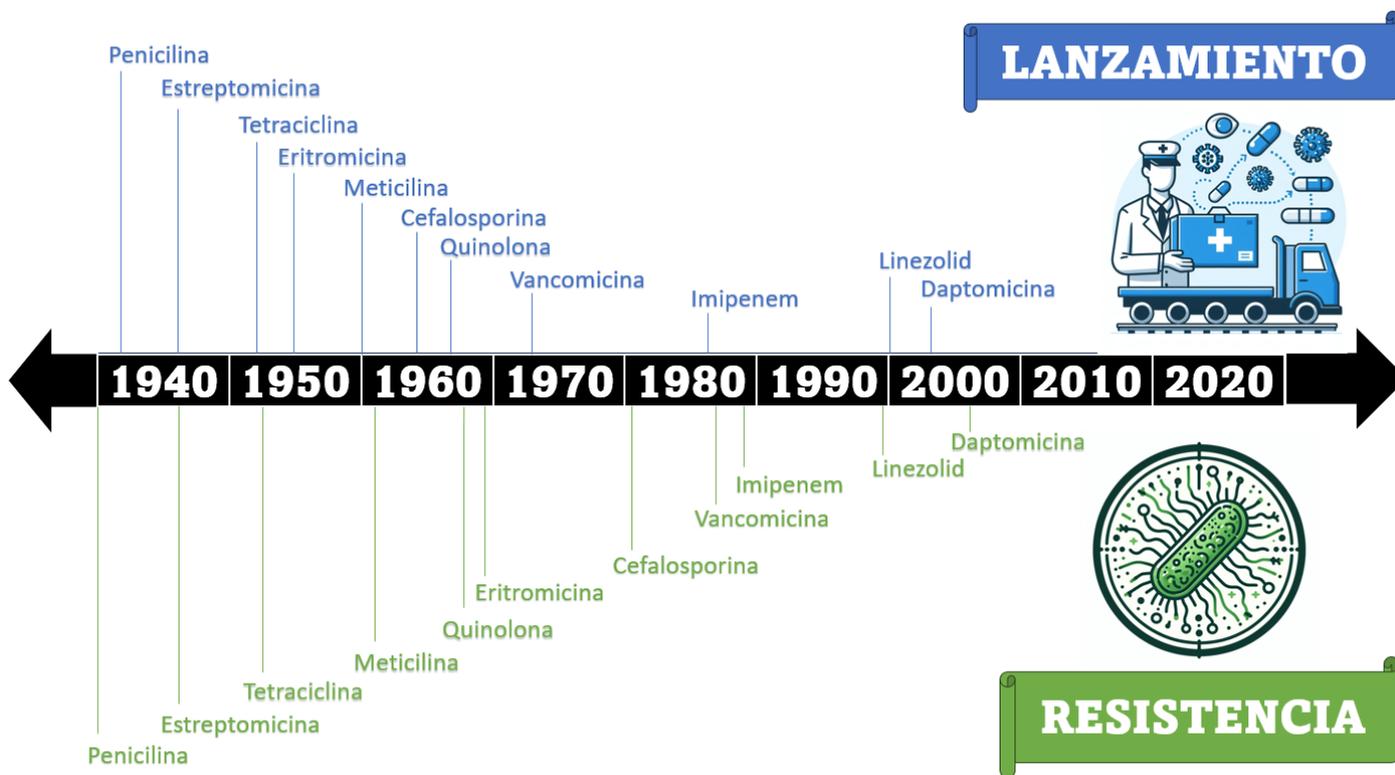
Durante este periodo, que engloba décadas de investigaciones profundas, se observó el surgimiento de numerosos antibióticos que se convirtieron en herramientas esenciales en la lucha contra las infecciones. Este auge no solo se atribuyó a la innovación de estos medicamentos, sino también a su capacidad para tratar, y sobre todo curar, enfermedades previamente carentes de tratamientos efectivos. En 1943, se logró aislar la actinomicina y la estreptomycinina de la bacteria *Streptomyces griseus*, marcando así el surgimiento del primer representante de la familia de los aminoglucósidos, efectiva contra la tuberculosis. En años posteriores, en 1947 se descubrió el cloranfenicol de la bacteria *Streptomyces venezuelae*, primer antibiótico de la familia de los fenicoles. La primera tetraciclina, clortetraciclina fue descubierta en 1948, la cual se obtuvo de *Streptomyces aureofaciens*. En 1952, la Eritromicina, el primer macrólido derivado de la bacteria *Streptomyces erythreus*. La vancomicina, el primer glucopéptido, se descubrió en 1956. Además, se comenzaron a desarrollar nuevos antibióticos sintéticos, es decir, no eran producidos de forma natural. En 1959, se sintetizó el primer nitroimidazol, el metronidazol. La meticilina en 1960 marcó el surgimiento del primer antibiótico betalactámico sintético. En 1964, se logró obtener mediante síntesis la primera

cefalosporina. En 1976, se descubrió la tienamicina, dando origen a la familia de los carbapenémicos. En 1987 se introduce al mercado el ciprofloxacino dando origen a la familia de las fluoroquinolonas. Sin embargo, tras la época dorada, se evidenció un marcado estancamiento en el descubrimiento de nuevos antibióticos, lo que resultó en una disminución progresiva del número de antibióticos nuevos. Posteriormente, pasaron 13 años hasta la aparición de otro antibiótico, siendo el año 2000 cuando se aprobó linezolid, el primer antibiótico de la familia de las oxazolidinonas. En 2003, se presentó la daptomicina, perteneciente a la familia de los lipopéptidos. Finalmente, en 2009, se aprobó la telavancina, descubriéndose la familia de los lipoglucopeptidos y desde entonces, no se han introducido nuevos antibióticos que presenten mecanismos de acción innovadores en el mercado, ya que los pocos antibióticos lanzados pertenecen a modificaciones estructurales de familias descubiertas previamente.

Al poco andar se comenzó a observar que los antibióticos, frente a las mismas bacterias perdían su eficacia de forma natural, un fenómeno que se conoce hoy como resistencia a los antimicrobianos. Este proceso se encuentra ligado a la naturaleza evolutiva de las bacterias, representando el mayor desafío en la investigación y aplicación de nuevos agentes antibacterianos. Esta capacidad genética, dinámica y flexible permite a los microorganismos adaptarse rápidamente a los ambientes hostiles, generando un filtro natural en las bacterias, que se conoce como “presión selectiva”. Este proceso se desarrolla mediante diversos mecanismos que incluyen alteraciones en la permeabilidad celular, activación de bombas de eflujo para expulsar el fármaco, modificaciones en la molécula del antibiótico, cambios en el sitio de acción, y diversos cambios genéticos, como mutaciones en los nucleótidos bacterianos o la adquisición de genes promotores de resistencia [4]. Estas adaptaciones han permitido la aparición y desarrollo de cepas resistentes que prevalecen sobre las bacterias susceptibles.

El patrón observado en la resistencia antimicrobiana es alarmante y predecible: cada vez que se introduce un nuevo agente antibacteriano, la resistencia emerge con sorprendente rapidez. Esto se evidenció en 1940 con la penicilina, donde se detectó resistencia incluso antes de su comercialización en 1942. Esta tendencia se ha mantenido constante con todos los antibióticos lanzados posteriormente. Pronto después de su introducción en el mercado, se comienza a reportar resistencia al nuevo antibiótico. Un ejemplo notable es la metilicina, un antibiótico sintético diseñado para ser resistente a las enzimas que destruyen el anillo betalactámico, donde la primera cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SAMR) fue identificada en 1961 [5]. Esta bacteria es resistente debido a la generación de una proteína de unión a la penicilina (PBP) de baja afinidad, y sigue siendo un problema y una amenaza para la salud mundial en la actualidad.

Este fenómeno, acelerado por la exposición continua de bacterias a agentes antimicrobianos, ha llevado al surgimiento de cepas multirresistentes que pueden llegar a desafiar todos los tratamientos convencionales. La falta de descubrimientos sustanciales en el desarrollo de nuevos antibacterianos agrava aún más la situación, creando un escenario donde las infecciones comunes podrían volverse, en corto tiempo, intratables.



**Figura 1:** Cronología del lanzamiento de los antibióticos al mercado (arriba) y el reporte de aparición de resistencia (abajo) dejando en evidencia que, tras la introducción de nuevos agentes antibacterianos, la resistencia no tarda en manifestarse.

En el 2019, se registraron 13.7 millones de defunciones a nivel mundial debido a síndromes infecciosos [6] y la Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que para el año 2050, la resistencia antimicrobiana será responsable de provocar 10 millones de muertes al año [7]. En el caso de Chile, la principal causa de ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) en el 2007 fue por sepsis grave, teniendo una letalidad del 27%, valor que se estima que se verá incrementado por año [8]. Y en efecto, entre el 2012 y 2013, la sepsis severa fue la segunda causa de ingreso, teniendo la mayor mortalidad en el período [9].

Esta resistencia se origina por diversos factores, como la mala prescripción médica, terapias incompletas, el uso excesivo de antibióticos en la industria ganadera, la automedicación y, en el contexto de la pandemia de 2020, es posible que muchas personas hayan hecho un uso inadecuado de los antibióticos, creyendo erróneamente que podrían tratar el virus SARS-CoV-2. De hecho, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), “el SARS-CoV-2 ha tenido consecuencias directas en la resistencia de los antimicrobianos, que ha contribuido en particular al incremento de esta problemática a nivel global”. Esa resistencia impacta en la mortalidad. “Algunos estudios

señalan que hasta el 50% de los pacientes con infección grave por SARS-CoV-2 han fallecido en los hospitales por causa de resistencia bacteriana y no necesariamente por la infección por la COVID-19" [10].

Dentro de la categoría de patógenos resistentes a los antimicrobianos, la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA del inglés *Infectious Diseases Society of America*) ha identificado un grupo de bacterias que son responsables de infecciones hospitalarias frecuentes en los Estados Unidos [11]. Estas bacterias incluyen *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y varias especies de enterobacterias. Este conjunto de bacterias ha sido apodado "ESKAPE". El surgimiento de tales bacterias resistentes evidencia la necesidad urgente de nuevos antimicrobianos efectivos.

Sin embargo, ha habido un estancamiento en el avance de nuevos antimicrobianos, el cual puede atribuirse al enfoque de las industrias farmacéuticas en la creación de análogos de las familias de antibióticos existentes, en lugar de desarrollar nuevas familias. Quizás esto se debe a que los análogos presentarían una toxicidad menor en comparación con los nuevos antibióticos. Además, el costo asociado con el desarrollo de un nuevo antibiótico es considerablemente más arriesgado que trabajar con una familia ya conocida [12]. Además, desde el punto de vista económico/competitivo los antibióticos como producto no retribuyen la inversión debido a su alto costo de desarrollo y tiempo prolongado para obtener aprobación, combinado con una vida útil acortada por la resistencia bacteriana. Su uso restringido para prevenir resistencia, la competencia con genéricos que reducen los precios, y la falta de incentivos económicos comparativos con medicamentos para enfermedades crónicas, hacen que su rentabilidad sea limitada. Además, los antibióticos de "último recurso" se usan escasamente y las regulaciones de salud pública pueden limitar aún más su mercado, disuadiendo la inversión de la industria farmacéutica en su desarrollo [13].

Los diseños estructurales de antibióticos se enfocan en blancos clásicos, como la pared de peptidoglicano, las subunidades ribosomales para inhibir la síntesis proteica y el ADN bacteriano. Sin embargo, estos blancos clásicos presentan el problema de que las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia contra ellos, ya que muchos de los antibióticos usados hoy en día provienen de las mismas bacterias, lo que hace que los diseños antiguos sean fácilmente susceptibles a los mecanismos de depuración de los organismos que los producen, y, por lo tanto, el desarrollo de compuestos estructuralmente similares o de la misma familia, presentarán el mismo problema.

**Tabla 1:** Antibacterianos aprobados por la FDA en los últimos 10 años.

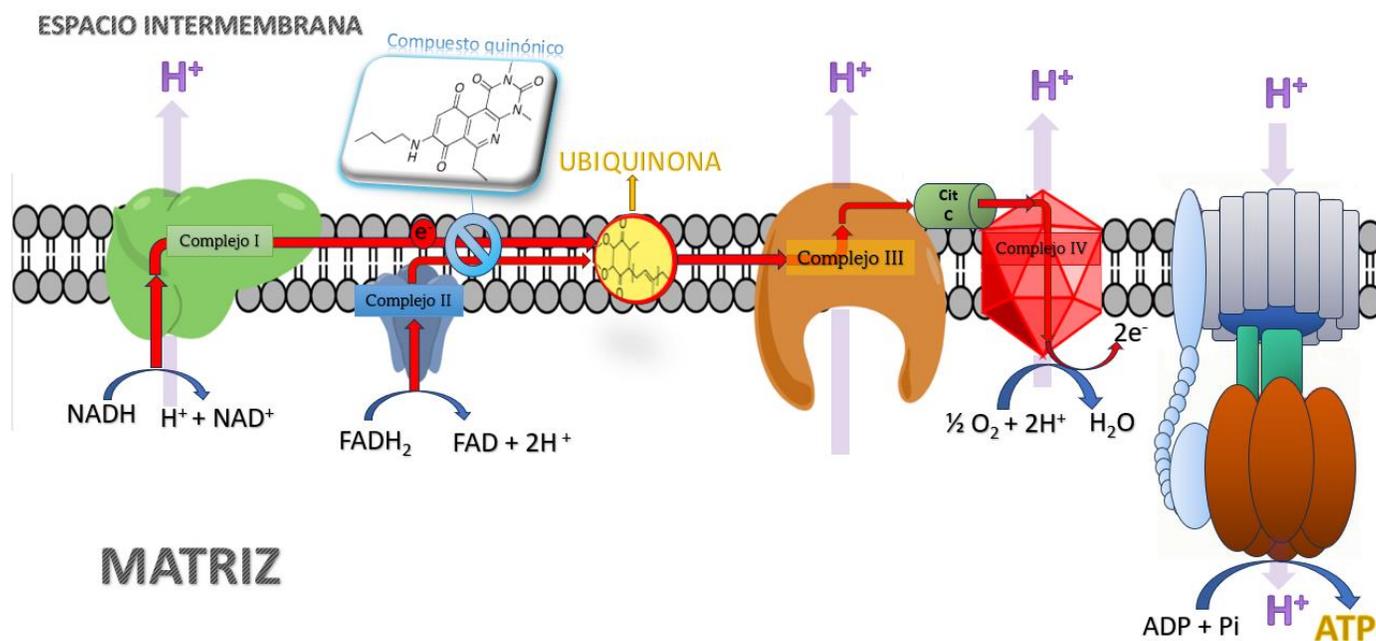
Año	Nombre	Principio activo	Familia	Mecanismo nuevo
2013	Ningún medicamento antibacteriano fue aprobado este año			
2014	Xtoro®	Finofloxacino	Quinolona	No
	Zerbaxa®	Ceftolozano + Tazobactam	Cefalosporina + Inh. betalactamasa	No
	Orbactiv®	Oritavancina	Lipoglucopeptido	No
	Dalvance®	Dalbavancina	Lipoglucopeptido	No
	Sivextro®	Tedizolid	Oxazolidinona	No
2015	Avycaz®	Ceftazidima + avibactam	Cefalosporina + Inh. betalactamasa	No
2016	Ningún medicamento antibacteriano fue aprobado este año			
2017	Baxdela®	Delafloxacino	Quinolona	No
	Vabomere®	Meropenem + vaborbactam	Carbapenémico + Inh. betalactamasa	No
	Solosec®	Secnidazol	Nitroimidazol	No
	Benznidazole®	Benzonidazol	Nitroimidazol	No
	Xepi®	Ozenoxacina	Quinolona	No
2018	Zemdri®	Plazomicina	Aminoglucósido	No
	Xerava®	Eravaciclina	Tetraciclina	No
	Seysara®	Sareciclina	Tetraciclina	No

	Nuzyra®	Omadaciclina	Tetraciclina	No
	Aemcolo®	Rifamicina	Ansamicina	No
2019	Recarbrio®	Imipenem, Cilastatina y Relebactam	Carbapenémico + Inh. dehidropeptidasa + Inh. betalactamasa	No
	Xenleta®	Lefamulina	Pleuromutilina	No
	Fetroja®	Cefiderocol	Cefalosporina	No
2020	Ningún medicamento antibacteriano fue aprobado este año			
2021	Fexinidazole®	Fexinidazol	Nitroimidazol	No
2022	Voquezna®	Vonoprazan, amoxicilina y claritromicina	Inh. Bomba de protones + Betalactámico + Macrólido	No
2023	Xacduro®	sulbactam, durlobactam	Inh. betalactamasa	No

Por lo tanto, los nuevos diseños de antibióticos deben enfocarse en blancos novedosos que sean fundamentales para la supervivencia de las bacterias y que no hayan experimentado modificaciones significativas en el proceso evolutivo de las bacterias patógenas. Uno de los blancos que cumple con estos requisitos es la cadena transportadora de electrones (CTeB), la cual desempeña un papel crucial en la generación de energía en las bacterias. La CTeB cuenta con un componente llamado ubiquinona, también conocida como Coenzima Q que desempeña múltiples funciones. La ubiquinona corresponde a un transportador molecular de los electrones entre distintos complejos macromoleculares de la CTeB. Su estructura química consta de una benzoquinona y una cadena de isoprenos, que le permiten adherirse a la membrana y facilitar la captura y transferencia de electrones. La ubiquinona tiene la capacidad de captar electrones y protones del entorno, lo que la convierte en hidroquinona, y luego puede regresar a su estado oxidado liberando los electrones a otro aceptor. El equilibrio redox de este proceso depende de la estabilidad de las diferentes especies químicas involucradas.

Es factible intervenir en la función de la ubiquinona si se encuentra una estructura que pueda captar y transferir electrones a un aceptor distinto al complejo III o bien no permitir el transporte de electrones. Esto podría generar la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Desde hace

tiempo, se ha observado que las quinonas tienen actividad antibacteriana y una de las explicaciones propuestas para este mecanismo es la generación de ROS [14].



**Figura 2:** Mecanismo de acción de la ubiquinona en la cadena transportadora de electrones, resaltando su relevancia como transportador molecular. La ubiquinona desempeña un papel crucial entre los complejos I, II y III. Estos complejos hacen reacciones químicas que liberan protones al espacio intermembrana para la producción de ATP a través de la ATP sintasa. Además, se identifica el posible sitio de acción de los compuestos quinónicos que se están investigando.

Entre las quinonas naturales, los derivados con el núcleo 1,4-naftoquinónico, como la shikonina y alkanina, han demostrado actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* y *Bacillus subtilis*, aunque no son eficaces contra bacterias Gram negativas [15].

En nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado una nueva familia de antimicrobianos basada estructuralmente en un núcleo de pirimidisoquinolinquinona. Mediante el estudio de Campanini *et al.* [16] donde se desarrolló una serie de arilmercaptoquinonas, se reveló que existen compuestos de esta familia que muestran una importante actividad contra bacterias Gram positivas, incluso superando a vancomicina.

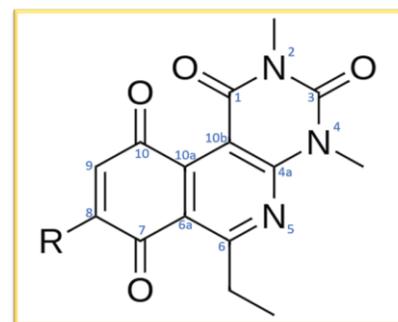
En estudios posteriores Andrades *et al.* [17] realizó diferentes sustituciones sobre el núcleo tricíclico quinónico en el cual la actividad de estos compuestos iba aumentando a medida que se extendía la cadena alquílica unida en posición 8, además se evidenció que un reemplazo bioisostérico del átomo de azufre por un átomo de nitrógeno aumentaba significativamente la actividad.

## Diseño

El diseño corresponde a la propuesta estructural del estudio, que se fundamenta en los antecedentes previos de relación estructura-actividad de los compuestos estudiados anteriormente por nuestro grupo de investigación. A continuación, se realiza un resumen que fundamenta las secciones estructurales del prototipo de estudio. Cabe destacar que la obtención de los compuestos es exploratoria para el análisis de la actividad antibacteriana, por tanto, la optimización del proceso sintético no se abordará en este trabajo.

**Estructura en común:** Se prioriza un núcleo tricíclico quinónico para interferir en la cadena de electrones, específicamente una pirimidisoquinolinquinona que ha sido previamente investigada y utilizada como precursor para obtener diferentes compuestos.

Se observó que la introducción de un grupo etilo en la posición 6 mejoró significativamente la actividad antibacteriana. Por lo tanto, para los compuestos en este estudio, se mantendrá constante el grupo etilo, centrándose exclusivamente en variar el sustituyente en la posición 8 para la obtención de nuevos compuestos.



**Figura 3:** Estructura del núcleo tricíclico quinónico propuesto como precursor.

<b>BACTERIA</b>	<b>CIM [µg/mL]</b>	<b>CIM [µg/mL]</b>
SAMS	4	1
SAMR	4	1
E.Faecalis	4	4
<b>BACTERIA</b>	<b>CIM [µg/mL]</b>	<b>CIM [µg/mL]</b>
SAMS	4	0,5
SAMR	8	0,5
E.Faecalis	8	4

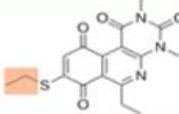
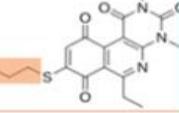
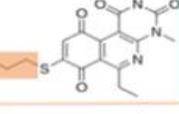
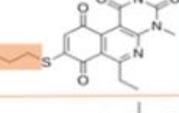
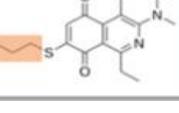
**Figura 4:** Compuestos que mostraron un cambio significativo de actividad antibacteriana al presentar el reemplazo bioisostérico de un átomo de azufre por uno de nitrógeno.

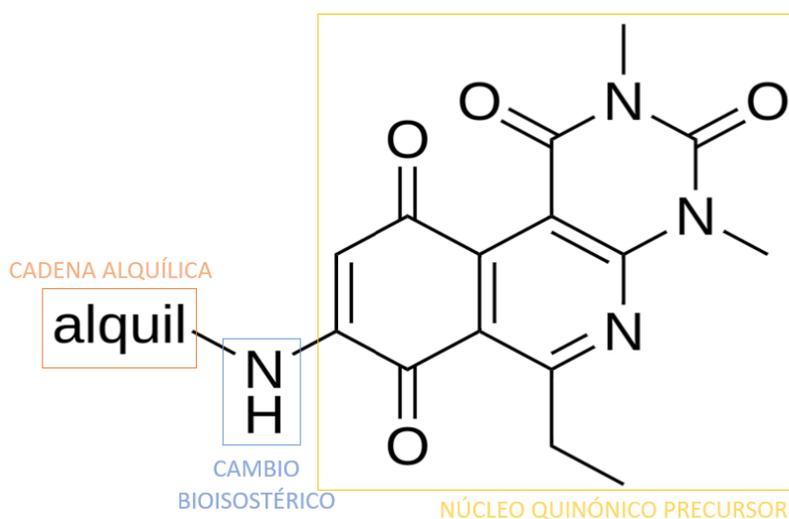
**Cambio bioisostérico:** En la posición 8, se experimentó con la sustitución de varios grupos de tioaril halogenados, y se descubrió que los grupos tioaril halogenados mostraron una actividad antibacteriana notable solo frente a bacterias Gram positivas. Posteriormente, al realizar un cambio bioisostérico al reemplazar el átomo de azufre por uno de nitrógeno, se observó un aumento significativo en la actividad. Se observó que los derivados de anilina son entre 2 y 16 veces más potentes que sus análogos tiofenólicos. Además, la actividad antibacteriana de estos compuestos es el doble que frente a vancomicina 0,5 µg/mL vs. 1,0 µg/mL en SAMS y SAMR, respectivamente. Este resultado experimental evidencia que el cambio bioisostérico de un átomo de azufre por uno de nitrógeno genera un compuesto con mayor actividad.

**Alargamiento de la cadena alquílica:** Se buscó evaluar la adición de las cadenas tioalquílicas de 2 a 6 átomos de carbono al núcleo tricíclico quinónico de pirimidoisoquinolinquinona como una alternativa a los derivados tiofenólicos. Esto dio lugar a dos compuestos activos, los derivados (propiltio) y (butiltio), que presentaron actividad antibacteriana en bacterias Gram positivas con valores de CIM entre 4 y 8 µg/mL, estableciendo el número ideal de carbonos como cuatro carbonos. Los compuestos con menos átomos de carbono (etiltio) o más (pentiltio y hexiltio) no presentaron actividad antibacteriana en ninguna de las bacterias evaluadas. Se evidencia que, al incrementar de 3 a 4 carbonos, la actividad se duplica; así, el aumento en el número de carbonos de la cadena alquílica se correlaciona con un incremento en la actividad. Sin embargo, después de alcanzar 5 carbonos, se observa una pérdida de actividad.

Esto sugiere que hay un límite en el aumento de la longitud de la cadena alquílica para la obtención de compuestos activos.

**Tabla 2:** CIM de los compuestos tioalquílicos donde los compuestos activos son destacados en color verde.

COMPUESTO	CIM [µg/mL]		
	SAMS	SAMR	E. Faecalis
	>8	>8	>8
	8	4	8
	4	4	4
	>16	>16	>16
	>16	>16	>16



**Figura 5:** Resumen de la estructura propuesta para el estudio, que abarca los tres aspectos del diseño: la cadena alquílica, el cambio bioisostérico y el núcleo quinónico precursor.

## Hipótesis

El reemplazo bioisostérico del átomo de azufre por uno de nitrógeno en los derivados alquil-heteropirimidoisoquinolinquinona, genera compuestos con mejor espectro antimicrobiano que los compuestos de origen.

## Objetivos

### Objetivo General

Estudiar la obtención de una serie de *N*-alquil-pirimidoisoquinolinquinonas y evaluarla en 6 cepas bacterianas, 3 Gram positivas y 3 Gram negativas. Comparar los resultados con los derivados mercaptoalquilderivados obtenidos previamente en el grupo de trabajo.

### Objetivos Específicos

1. Obtener el precursor 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (1) en cantidad suficiente para realizar las reacciones posteriores con los *N*-alquil derivados.
2. Estudiar la obtención del compuesto 8-metilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (2).
3. Estudiar la obtención del compuesto 8-dietilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (3).
4. Estudiar la obtención del compuesto 8-propilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (4).
5. Estudiar la obtención del compuesto 8-butilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (5).
6. Estudiar la obtención del compuesto 8-pentilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (6).
7. Estudiar la obtención del compuesto 8-hexilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (7).
8. Estudiar la obtención del compuesto 8-isopentilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (8).
9. Realizar la caracterización de los compuestos obtenidos mediante RMN.

10. Realizar la determinación de la CIM mediante microdilución en las bacterias prototipo *Staphylococcus aureus* meticilino sensible, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.
11. Estudiar mediante modelamiento molecular docking, la influencia de las diferentes interacciones de los derivados alquílicos-nitrogenados en el sitio de unión de la enzima SDH y compararlos con los resultados previos de los alquil-azufrados.

## Materiales y métodos

### **Reactivos e insumos**

Los compuestos derivados de quinonas fueron obtenidos mediante la síntesis orgánica utilizando reactivos comerciales de calidad Para Análisis (PA) adquiridos desde Sigma-Aldrich® y Merck®. Asimismo, los solventes que han sido utilizados tienen una calidad de HPLC y fueron adquiridos de Merck®. Los antibióticos que se utilizaron como control al momento de hacer el estudio microbiológico fueron vancomicina y gentamicina los cuales fueron adquiridos de Sigma-aldrich®. El medio de cultivo de Müeller Hinton fue adquirido desde Lab-Diagnostic®, y fue preparado según las recomendaciones del mismo fabricante. Placas de Agar sangre de cordero. Las placas de cultivo de 96 pocillos estériles de fondo U (Santa Cruz biotechnology, inc.) fueron adquiridas desde Fermelo Biotec®.

### **Síntesis**

La síntesis de los compuestos se realizó en el laboratorio de Desarrollo de Fármacos de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile ubicado en el Edificio Luis Ceruti. La quinona precursora se obtuvo utilizando el método *one-pot* descrito anteriormente para el cual ya estaba optimizado. Todos los compuestos finales obtenidos se realizaron mediante goteo lento del derivado nitrogenado alquílico sobre la solución de la quinona precursora durante toda la noche. Todos los compuestos se purificaron mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel Merck (70-230 Mesh). Los puntos de fusión de los compuestos fueron medidos con un equipo modelo Electrothermal. Su caracterización estructural se llevó a cabo mediante técnicas de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en un equipo Bruker AVANCE III HD de 300 MHz usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna a temperatura ambiente.

### **Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)**

La actividad antimicrobiana de los compuestos *N*-alquílicos quinónicos frente a cepas bacterianas prototipo fueron realizados en el Laboratorio de desarrollo de fármacos sección microbiología de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile usando el protocolo para la determinación la CIM recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Para el control de ensayo en forma paralela se midió la CIM frente a antibióticos de uso clínico tales como vancomicina para bacterias Gram positivas y gentamicina para Gram negativas.

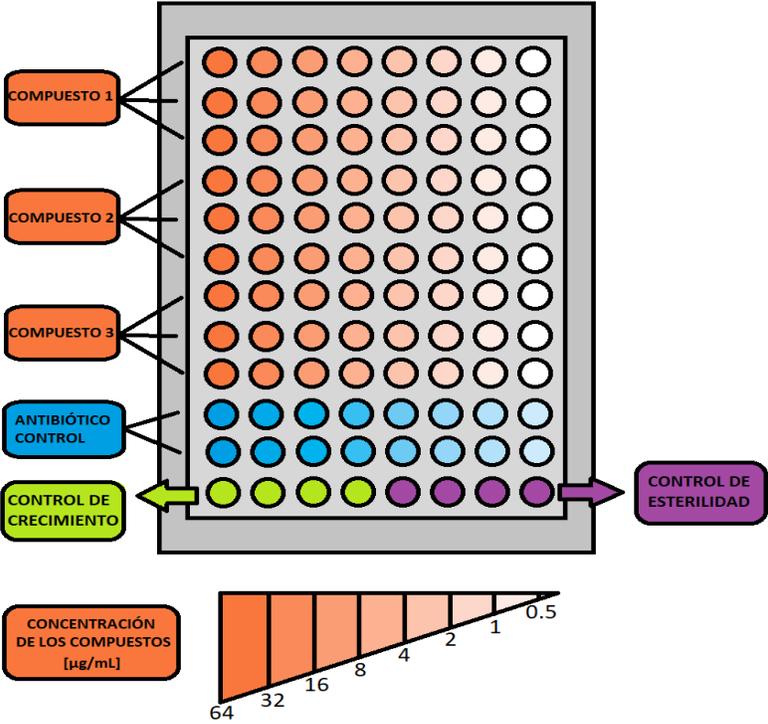
Las cepas bacterianas prototipo utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible (ATCC® 29213), *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (ATCC® 43300), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212), *Escherichia coli* (ATCC® 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 700603). Cada una de estas cepas fueron obtenidas de viales de conservación que estaban congelados a -20°C en leche estéril y descremada. Se utilizaron placas de agar sangre cordero (ASC) para cultivar las cepas y conseguir cepas puras luego de dejarlas 24 horas a 37°C en incubadora.

Luego de obtener las cepas puras se prepara una solución de bacterias de una concentración aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL que se obtiene cuando un nefelómetro entrega una turbidez de

0.5 McFarland. Posteriormente se preparó un inóculo bacteriano en caldo Müller Hinton hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $1 \times 10^5$  UFC en cada pocillo U de la placa del ensayo. En cuanto a los antibióticos de control, se utilizaron gentamicina y vancomicina. Se prepararon soluciones siguiendo las indicaciones del fabricante para lograr una concentración inicial estándar de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ambos antibióticos. Estos compuestos de control se emplearon para validar el ensayo de acuerdo con las recomendaciones de la CLSI [18].

Los siete compuestos obtenidos se ensayaron para determinar su CIM en las cepas bacterianas. Antes de realizar el ensayo, se prepararon soluciones frescas para cada uno de ellos, disolviéndolos en agua esterilizada con un 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración máxima alcanzada sin observar precipitación fue de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El medio de cultivo empleado fue caldo Müller Hinton, que se preparó y esterilizó conforme a las instrucciones del fabricante. El ensayo de microdilución se llevó a cabo en placas de cultivo de 96 pocillos estériles dispuestos en 8 filas y 12 columnas (Ultracruz TM Polystyrene Microplates, 96 well, U bottom de Santa Cruz biotechnology, inc.). Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de compuesto quinónico o antibiótico control a la primera columna, mientras que al resto de los pocillos se les añadieron 50  $\mu\text{L}$  de caldo Müller Hinton. Luego, se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 2. La última fila se utilizó para control de crecimiento y de esterilidad.



**Figura 6:** Esquema que ilustra la distribución de los pocillos en las placas utilizadas al momento de realizar el ensayo de microdilución en caldo, destinadas a la determinación de la actividad antibacteriana de distintos compuestos quinónicos frente a cepas bacterianas prototipo.

**Tabla 3:** Concentraciones alcanzadas en cada pocillo de los compuestos testeados en los ensayos para la determinación de la CIM. Los compuestos **1** y **2** presentaron una concentración de 32 a 0,25 µg/mL, en cambio para los compuestos **3** al **8** las concentraciones estudiadas fueron de 64 a 0,5 µg/mL. Las concentraciones de los antibióticos control fueron de 8 a 0,0625 µg/mL.

	Concentración de los compuestos quinónicos y antibióticos (µg/mL)							
Compuesto <b>1</b>	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Compuesto <b>2</b>	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Compuesto <b>3</b>	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Compuesto <b>4</b>	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Compuesto <b>5</b>	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Compuesto <b>6</b>	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Compuesto <b>7</b>	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Compuesto <b>8</b>	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Vancomicina	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Gentamicina	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625

Finalmente, luego de colocar los compuestos y controles, se adicionó el inóculo bacteriano, colocando 50 µL de esta solución bacteriana preparada a todos los pocillos, exceptuando los pocillos del control de esterilidad. Así se obtuvo un volumen final de 100 µL con una concentración bacteriana de  $1 \times 10^5$  UFC en cada pocillo. Luego, la placa se cubre y se deja incubando por 24 horas a 37°C. Al finalizar la incubación se observan los resultados utilizando una luz de contraste para ver si existe crecimiento bacteriano el cual se evidencia mediante la presencia de un botón blanco en el fondo del pocillo. El primer pocillo que no presenta crecimiento corresponderá al valor de la CIM.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado con un  $n=3$ . Se consideraron resultados válidos cuando los controles de esterilidad revelaron un máximo de 1 pocillo con crecimiento bacteriano y todos los controles de crecimiento fueron positivos. Además, se utilizaron antibióticos de control,

específicamente vancomicina y gentamicina, frente a las cepas bacterianas prototipo. Los resultados debían estar dentro del rango de control de calidad establecido por la CLSI.

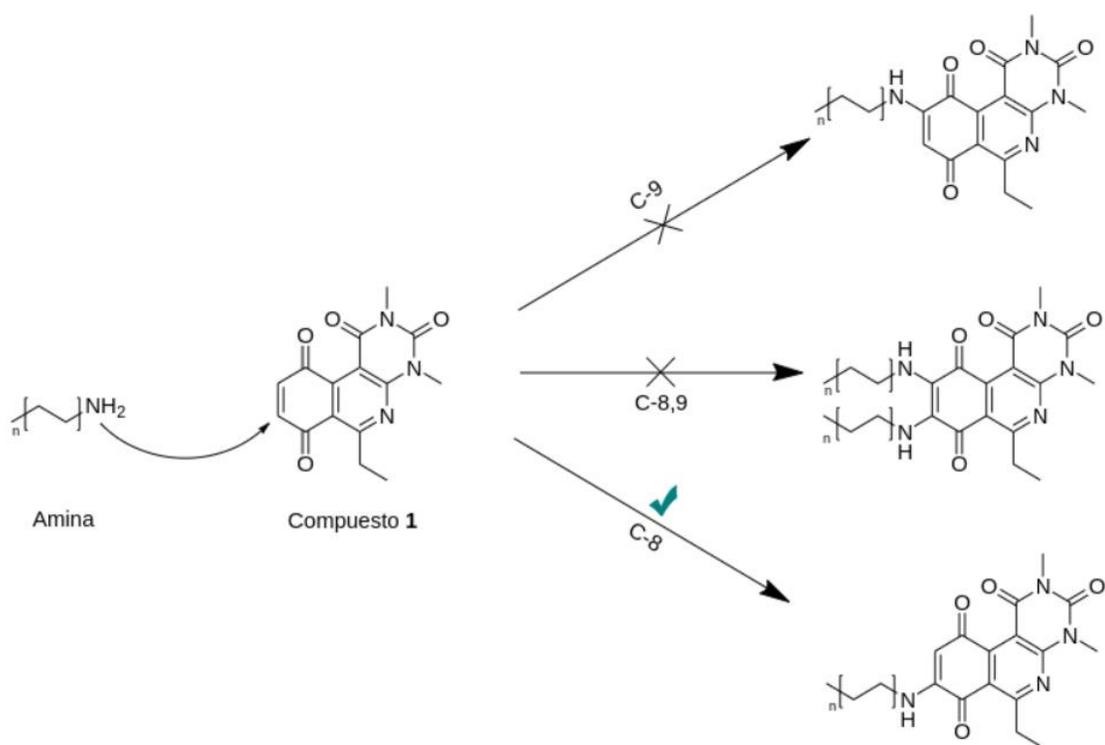
### **Definición de Concentración inhibitoria mínima**

La CIM de forma práctica corresponde a aquella concentración en  $\mu\text{g/mL}$  donde no se detecta la presencia de crecimiento bacteriano, mediante la aparición de un botón en el fondo del pocillo. El valor de CIM utilizado en esta tesis corresponde a la concentración obtenida de acuerdo a lo descrito previamente y según la recomendación de la CLSI, mientras que el valor real de CIM se encuentra entre la concentración de compuesto en el cual se observa inhibición completa de crecimiento bacteriano (sin botón en el fondo) y el valor de la concentración inmediatamente inferior.

## Resultados

### Síntesis de los compuestos 1 a 8

La síntesis del precursor quinónico o compuesto **1**, se llevó a cabo por el método *one-pot*, descrito por Valderrama *et. al.* [19], obtenido con un 82% de rendimiento. Por otra parte, para la síntesis de los aminoderivados, los compuestos **2** al **8**, se usaron las condiciones descritas anteriormente para las arilaminas [20]. La síntesis de los compuestos **2** a **8** se realizaron con una adición de goteo que dio a lugar solo al ataque del derivado de amina en posición 8 del compuesto **1**. A diferencia de los derivados tiofenólicos, no se formó ningún producto di-adicionado.

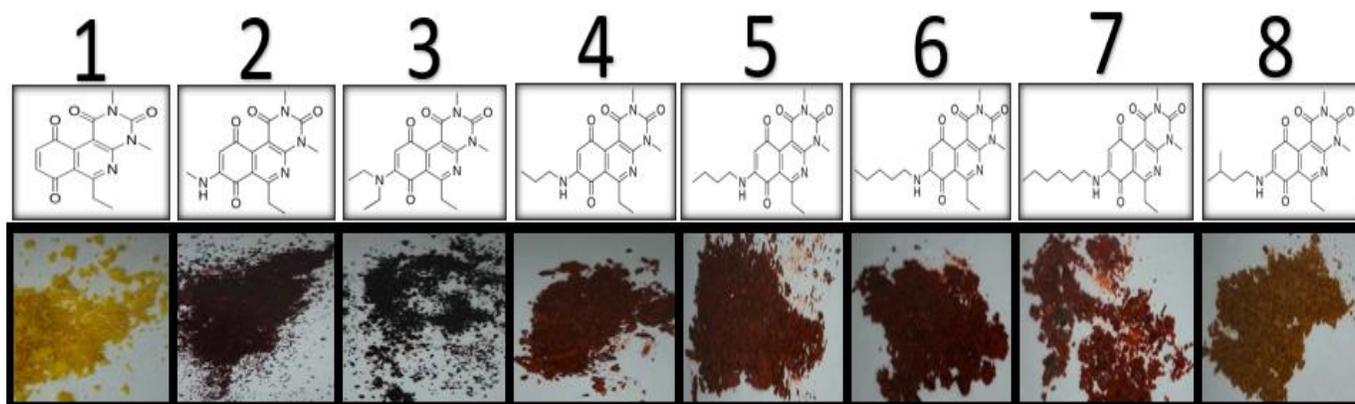


**Figura 7:** Ataque nucleofílico de la amina alquímica al compuesto **1**. No se observó la presencia del isómero C-9 ni el di-adicionado C-8,9. Se detectó solo la formación del isómero C-8.

La obtención de todos los productos se logró mediante una mono-adición en el carbono 8 del precursor y se identificó la sustitución en la posición 8 utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear bidimensional (2D-RMN). Los compuestos obtenidos se presentan en la [Figura 7](#).

Debido a que el objetivo principal de la obtención de los compuestos es el estudio de su actividad antimicrobiana, no se procedió a optimizar las reacciones. La cantidad sintetizada resultó suficiente para llevar a cabo todos los análisis y ensayos biológicos realizados *a posteriori*.

# COMPUESTOS

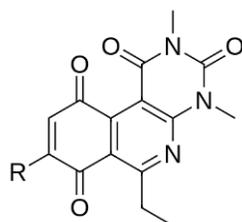


**Figura 8:** Fotografías de los compuestos 1 a 8 sintetizados.

## Puntos de fusión

Para la medición del punto de fusión, se empleó el ácido acetilsalicílico como patrón de referencia del equipo para garantizar la precisión y confiabilidad de las mediciones de fusión de sustancias químicas. Este patrón presentó un valor de fusión de 135°C, el que es coherente con lo reportado. Los puntos de fusión de los compuestos sintetizados estuvieron entre 135,8°C y 211,3°C. De los cuales, cabe señalar que el compuesto 2 mostró el punto de fusión más alto, mientras que el compuesto 7 registró el punto de fusión más bajo. En relación al compuesto 3, durante la determinación de su punto de fusión, se observó su descomposición a una temperatura de 130°C. Este fenómeno se evidenció con un cambio de color del compuesto, pasando de un tono burdeos a negro, lo que impidió una medición precisa del punto de fusión.

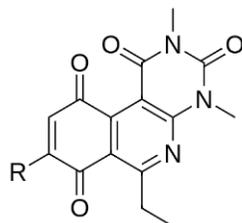
**Tabla 4:** Propiedades químicas de los compuestos.



Compuesto	R	Peso Molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)
1		299,0906	167,5 - 168,8	82
2		328,1172	211,3 - 212,1	25,5
3		370,1641	130 (descomposición)	24,8
4		356,1485	171,2 - 172,3	59,9
5		370,1641	145,6 - 146,7	62,1
6		384,1798	141,2 - 142,4	44,9
7		398,1954	135,8 - 137,8	50,6
8		384,1798	153,7 - 155,0	53,7

## Resultados microbiológicos

**Tabla 5:** Valores de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) expresada en  $\mu\text{g/mL}$  de los compuestos quinónicos sintetizados frente a cada bacteria prototipo.



Comp.	R	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )					
		MSSA	MRSA	<i>E.faecalis</i>	<i>E.Coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>
1		>32	>32	>32	>32	>32	>32
2		>32	>32	32	>32	>32	>32
3		>64	>64	32	>64	>64	>64
4		>64	>64	64	>64	>64	>64
5		>64	>64	>64	>64	>64	>64
6		16	16	>64	>64	>64	>64
7		2	2	2	>64	>64	>64
8		>64	>64	>64	>64	>64	>64

Los compuestos **2**, **3**, **4**, **6** y **7** presentaron actividad frente a cepas Gram positivas, con valores de CIM entre 2 y 64 µg/mL. En contraposición, en cepas Gram negativas, la CIM de todos los compuestos fue >64 µg/mL, indicando la falta de actividad dentro de las concentraciones ensayadas.

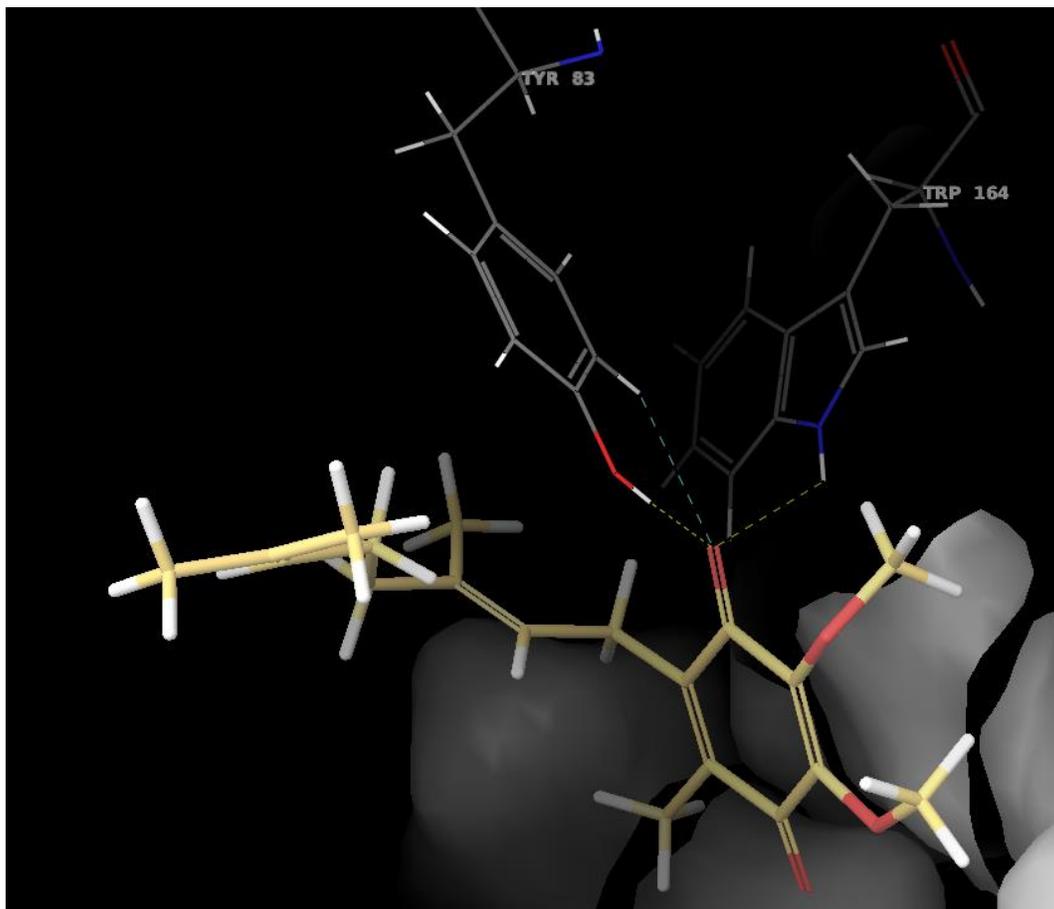
El compuesto **1**, reconocido como el núcleo tricíclico para el desarrollo de la serie, no exhibió actividad antibacteriana frente a las cepas estudiadas. Asimismo, los compuestos **5** y **8** no mostraron actividad antibacteriana en ninguna de las cepas evaluadas.

Los compuestos **2**, **3** y **4** solo demostraron actividad frente a *Enterococcus faecalis*, con valores de CIM de 32, 32 y 64 µg/mL, respectivamente. Por otro lado, los compuestos **6** y **7** sobresalieron como los más activos de la serie, presentando actividad contra las cepas SAMR y SAMS, con CIM de 16 y 2 µg/mL, respectivamente. Además, el compuesto **7** también exhibió actividad frente a *Enterococcus faecalis*, con una CIM de 2 µg/mL, mientras que el compuesto **6** no mostró actividad contra esta cepa.

### **Modelamiento Molecular Docking**

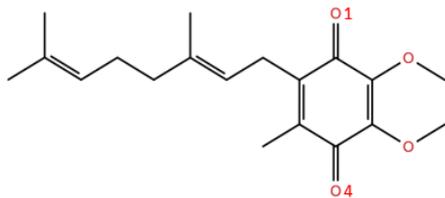
Con el objeto de estudiar las interacciones moleculares involucradas en el sitio de unión del mecanismo de acción propuesto, se realizó un estudio de modelamiento molecular docking, basándose en el modelo cristalizado del complejo II, succinato deshidrogenasa (SDH) obtenido desde la base de datos Protein Data Bank (PDB) con código 1NEK. La SDH, también conocida como complejo II de la cadena respiratoria, es una enzima clave que funciona como un nexo entre el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. Su función principal es catalizar la oxidación del succinato a fumarato, un paso crucial en el ciclo de Krebs que contribuye a la generación de energía celular en bacterias. La SDH es una enzima compleja, compuesta por cuatro subunidades principales. Estas subunidades trabajan juntas para anclar la enzima a la membrana y para formar el sitio activo donde ocurre la reacción bioquímica. La subunidad SdhA contiene un grupo prostético de flavina adenina dinucleótido (FAD), que juega un papel crucial en la captura y transferencia de electrones durante la reacción. Las subunidades SdhB, SdhC y SdhD contribuyen a la formación del sitio de unión de la ubiquinona, un componente esencial en la transferencia de electrones hacia la cadena respiratoria. La ubiquinona, también conocida como coenzima Q, se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y actúa como un transportador de electrones. Durante la oxidación del succinato en fumarato, los electrones son transferidos del FADH<sub>2</sub> en la SDH a la ubiquinona. Esta transferencia de electrones reduce la ubiquinona en ubiquinol, un paso crucial en la cadena de transporte de electrones. La ubicación y la estructura del sitio de unión de la ubiquinona en la SDH son particularmente importantes para su función. Los residuos específicos de aminoácidos en la SDH, como Tyr D83 y Trp B164, forman enlaces directos con la ubiquinona, asegurando su correcta orientación y unión para la transferencia eficiente de electrones. Además, la ubicación estratégica de la ubiquinona en la enzima ayuda a prevenir la formación no deseada de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden ser perjudiciales para la célula.

La unión de la ubiquinona ocurre en una cavidad formada por las subunidades SdhB, SdhC y SdhD, cerca del grupo [3Fe-4S]. Los residuos de aminoácidos Tyr D83 y Trp B164 son ligandos directos del átomo O1 de la ubiquinona, facilitando su unión. El Arg C31, cercano a la ubiquinona, podría desempeñar un papel importante en la especificidad del sustrato de la ubiquinona, y forma una interacción electrostática con un propionato del grupo hemo b, sugiriendo una interacción entre estos dos sitios. La estructura del sitio de unión de la ubiquinona revela que el anillo de quinona está apilado por los residuos Ile C28 y Pro B160, formando un entorno hidrofóbico que contribuye a la estabilidad de la unión. Los residuos en este sitio de unión, como His B207, Pro B160, Trp B163, Trp B164, Ile B209, Ile C28, Arg C31 y Tyr D83, son conservados en diversas especies, lo que indica su importancia funcional.



**Figura 9:** Ubiquinona representada en color amarillo en su sitio de unión del complejo II. En la parte superior se encuentran etiquetados residuos de aminoácidos TYR 83 y TRP 164 que hacen interacción con el oxígeno O1 de la Ubiquinona.

En las cercanías del O4, no se observan cadenas laterales de proteína. En el trabajo de Iwata *et al.*[27] Se describe que es posible que una molécula de agua sea el ligando de O4, como se observa en el sitio de unión de menaquinona en la formiato *N*-deshidrogenasa. El átomo O4 está cerca de la superficie y podría estar conectado directamente al citoplasma por una cadena de agua [21].



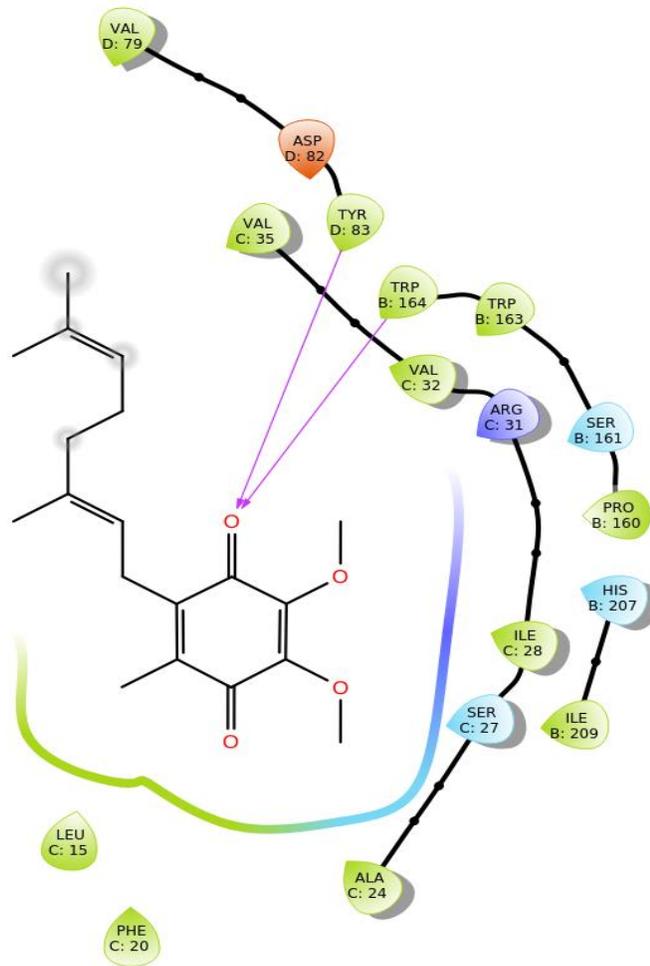
**Figura 10:** Estructura química de la ubiquinona representada en 2D.

### **Descripción de Ubiquinona en el bolsillo del Complejo II**

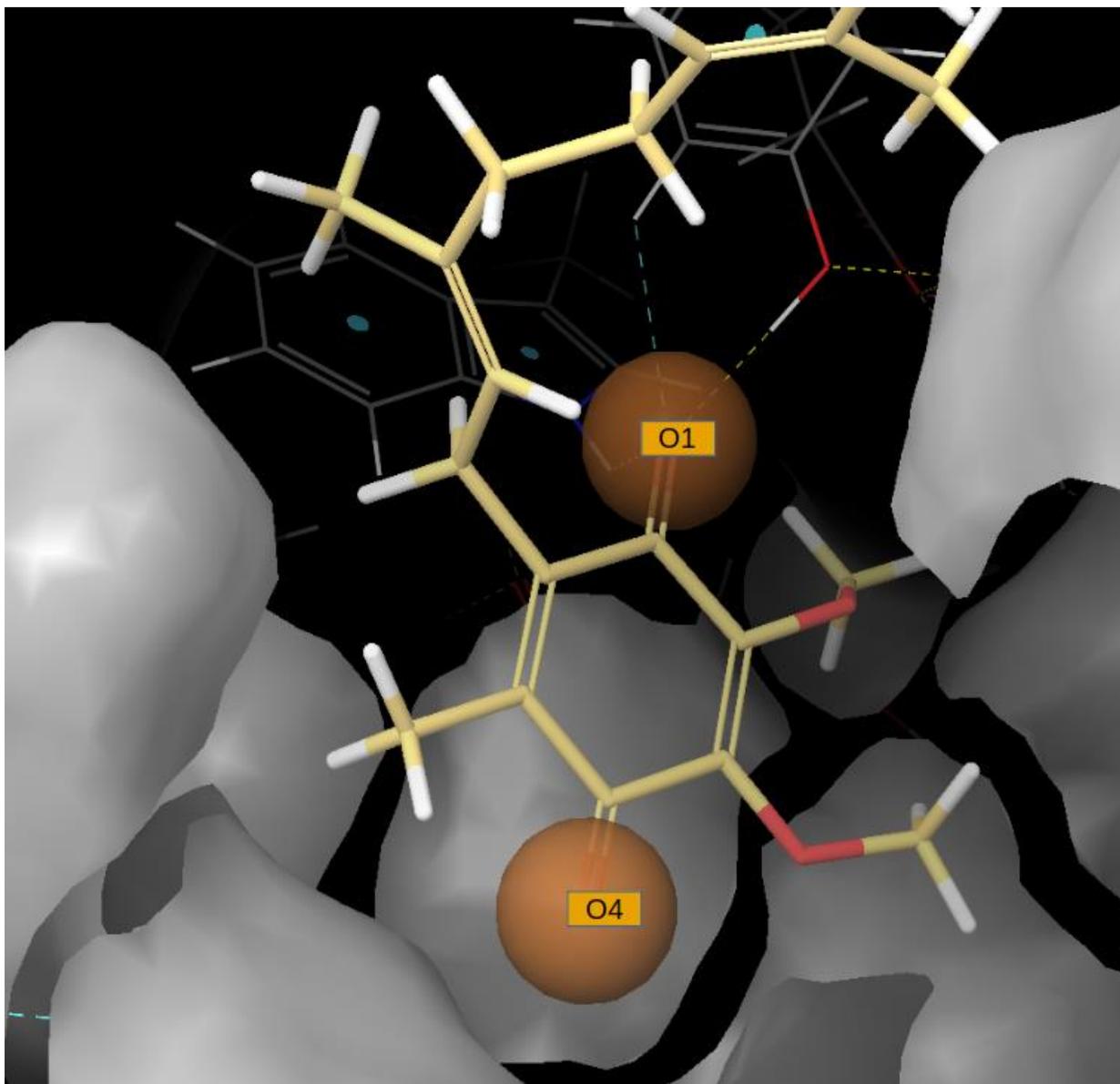
Existen 2 aminoácidos en la región superior que son TYR 83 y TRP 164, el nitrógeno del indol actúa como donador de puente de hidrógeno, y el oxígeno del fenol de la tirosina actúa como donador de puente de hidrógeno. Los grupos metoxilos se orientan hacia el interior del bolsillo que observa hacia la HIS 207. El oxígeno 4 interactúa con una molécula de agua según la descripción de Yankovskaya *et al.* Sin embargo, en el modelo no se observa esta interacción. El grupo Q2 (2 isoprenilos) queda orientado hacia el exterior del bolsillo sin ninguna interacción con algún residuo aminoacídico.

Basado en esta información se establecieron los parámetros del docking molecular, los cuales incluyeron las siguientes restricciones para selecciones de las poses finales a las nuevas moléculas:

- **Formación de Puentes de Hidrógeno:** Se implementó una restricción específica para favorecer la formación de puentes de hidrógeno entre los residuos de aminoácidos Tyr D83 y Trp B164 y el átomo de oxígeno (O1) en la estructura quinónica de la ubiquinona. Esta restricción se diseñó de manera que los ligandos capaces de establecer estas interacciones específicas reciban una puntuación más alta en el score de docking. Esta estrategia permite identificar ligandos que replican el patrón de unión clave observado en la interacción natural de la ubiquinona con la SDH, aumentando la relevancia de los resultados obtenidos en el proceso de docking
- **Posiciones de los oxígenos de la quinona:** Se definieron las posiciones de los oxígenos de la ubiquinona en el cristal original, como restricciones posicionales con áreas de movimiento para los oxígenos definidos como O1 y O4. Debido a que son en esas posiciones donde el oxígeno de O1 forma puentes de hidrógeno con los residuos descritos anteriormente y es en esa posición de O4 donde se sugiere que existe la posibilidad de una interacción con una molécula de agua.



**Figura 11:** Representación 2D que visualiza el sitio de unión cercano a la ubiquinona, detallando los aminoácidos constituyentes y destacando, mediante flechas, aquellos que interactúan con esta molécula.



**Figura 12:** Representación visual que exhibe las restricciones definidas a partir de la ubiquinona en color amarillo. Las dos esferas de color naranja ilustran las restricciones posicionales para los átomos de oxígeno, mientras que las restricciones de puente de hidrógeno, que se originan con el O1 de la ubiquinona, están delineadas con líneas punteadas.

Los tamaños de las esferas posicionales de inclusión son críticos en el desarrollo del modelo, establecidos para los átomos de oxígeno, ya que, cuando los radios son pequeños, se excluyen del análisis un gran número de moléculas, mientras que, si los radios son muy grandes, existe el riesgo de que el modelo pierda precisión, ya que podría incluir moléculas distintas a las deseadas.

Para determinar los tamaños de estas esferas, se creó una matriz que abarca diferentes dimensiones, incluyendo tamaños de 1,0Å; 1,3Å; 1,7Å y 2,0Å. Luego, se realizaron modelos de

acoplamiento ("docking") para cada una de las combinaciones de tamaños en la matriz, utilizando los compuestos alquílicos activos que contenían átomos de azufre y nitrógeno. En cada uno de estos modelos se correlacionó el puntaje docking con sus respectivos valores de pCIM en un análisis de regresión lineal simple, que proporcionó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El modelo docking que presentó el valor más alto de  $R^2$  se seleccionó para definir los tamaños de las esferas de inclusión. Este modelo seleccionado se utilizó posteriormente para evaluar el comportamiento de los compuestos en el sitio de unión.

Se llevaron a cabo un total de 16 procedimientos docking para cada bacteria Gram positiva, seguidos por el análisis correspondiente de regresión lineal. Los resultados revelaron que en el caso de SAMS, la regresión lineal más óptima mostró un  $R^2$  de 0,1908, correspondiente a un radio de 1,3 Å para ambas esferas. Respecto a SAMR, la regresión lineal con el mejor  $R^2$ , con un valor de 0,1001, también coincidió con los radios de ambas esferas establecidos en 1,3 Å. Siendo los modelos para SAMS y SAMR iguales. Finalmente, para *Enterococcus Faecalis*, se identificó que la regresión lineal más adecuada mostró un  $R^2$  de 0,1399. Esto se logró al establecer un radio de 1,7 Å para la esfera que abarca el O1 y un radio de 2,0 Å para la esfera que abarca el O4.

En las tablas 6, 7 y 8 se presentan las matrices de radio de las esferas de inclusión evaluadas para las 3 bacterias Gram positivas.

**Tabla 6:** Matriz de radios de esferas de inclusión para la bacteria SAMS, detallando los valores de  $R^2$  correspondientes a cada combinación posible. En color verde se representa el máximo valor de  $R^2$  obtenido

R <sup>2</sup> SAMS		O1			
		1,0	1,3	1,7	2,0
O4	Radio (Å)				
	1,0	N/A	0,1382	0,1252	0,1252
	1,3	N/A	0,1908	0,1856	0,1856
	1,7	N/A	0,1908	0,1856	0,1856
2,0	N/A	0,0091	0,1126	0,1126	

**Tabla 7:** Matriz de radios de esferas de inclusión para la bacteria SAMR, detallando los valores de  $R^2$  correspondientes a cada combinación posible. En color verde se representa el máximo valor de  $R^2$  obtenido.

$R^2$ SAMR		O1			
	Radio (Å)	1,0	1,3	1,7	2,0
O4	1,0	N/A	0,0091	0,0283	0,0283
	1,3	N/A	0,1001	0,0977	0,0977
	1,7	N/A	0,1001	0,0977	0,0977
	2,0	N/A	0,0780	0,0401	0,0401

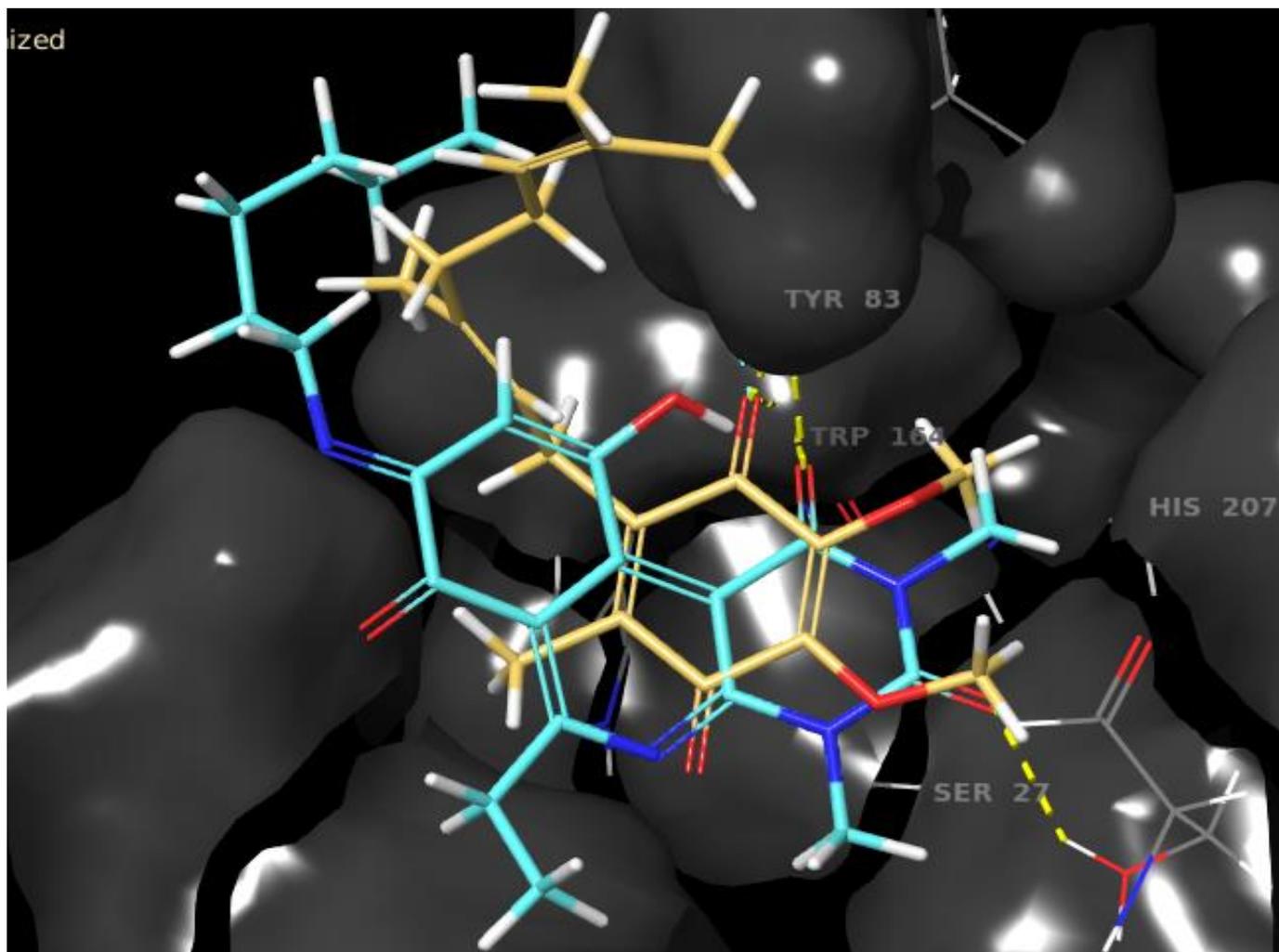
**Tabla 8:** Matriz de radios de esferas de inclusión para la bacteria *E. Faecalis*, detallando los valores de  $R^2$  correspondientes a cada combinación posible. En color verde se representa el máximo valor de  $R^2$  obtenido.

$R^2$ <i>E. Faecalis</i>		O1			
	Radio (Å)	1,0	1,3	1,7	2,0
O4	1,0	N/A	0,0079	0,0114	0,0114
	1,3	N/A	0,0530	0,0507	0,0507
	1,7	N/A	0,0530	0,0507	0,0507
	2,0	N/A	0,1204	0,1399	0,1399

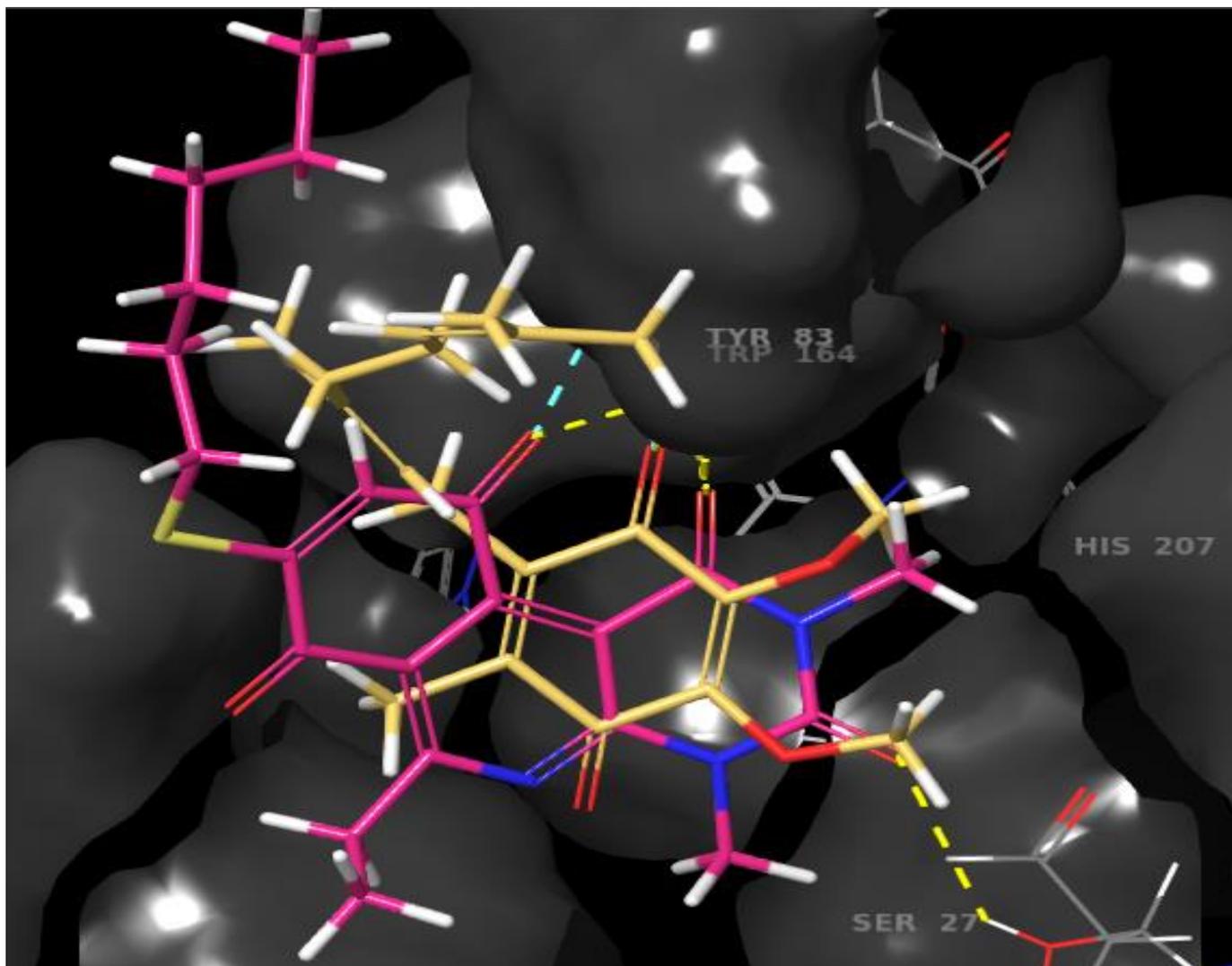
Es importante señalar que en los modelos con un radio de 1,0Å para el O1, se obtuvo de 2 a 3 moléculas dockeadas lo que resultó en un coeficiente cercano a 1. Por lo tanto, estos valores fueron excluidos del análisis.

**Tabla 9:** Comparación entre los puntajes de docking obtenidos en el programa Maestro y los valores reales de CIM para los compuestos alquílicos, tanto del modelo alfa (SAMS y SAMR) como del modelo beta (*E. Faecalis*).

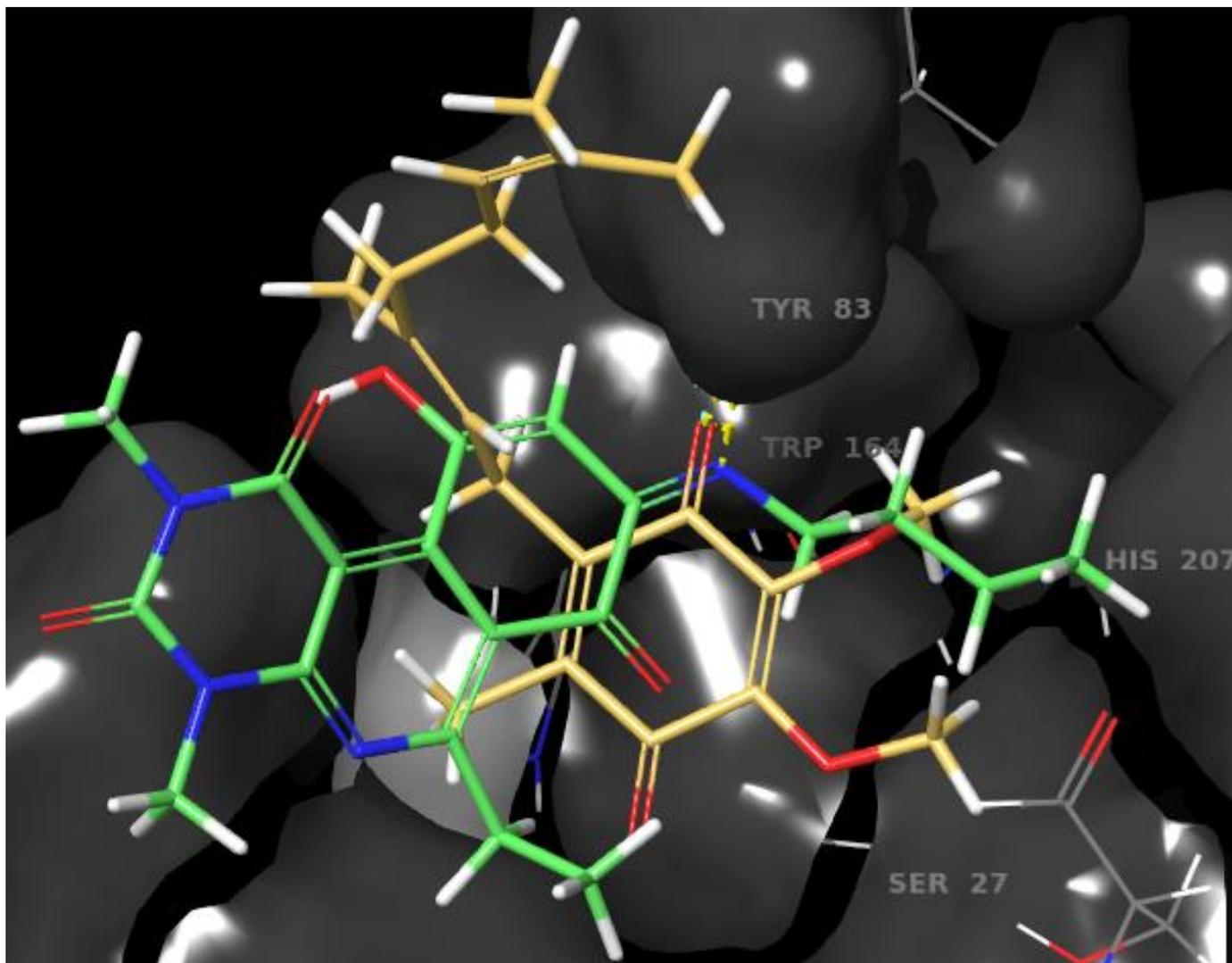
SAMR y SAMS Modelo alfa			<i>E. Faecalis</i> Modelo beta		
R-8	docking score	CIM (µg/mL)	R-8	docking score	CIM (µg/mL)
Etiltio	-8,088	>8	Butiltio	-7,567	4
Metilamino	-7,773	>32	Metilamino	-7,523	32
Butiltio	-7,591	4	Propilamino	-7,346	64
Propiltio	-7,413	8 y 4	Etiltio	-7,024	>8
Propilamino	-7,346	>64	Hexiltio	-6,869	>16
Hexiltio	-6,869	>16	Pentiltio	-6,849	>16
Pentiltio	-6,849	>16	Pentilamino	-6,275	>64
Pentilamino	-6,275	16	Hexilamino	-6,149	2
Hexilamino	-6,149	2	Propiltio	-6,053	8
			Butilamino	-5,922	>64



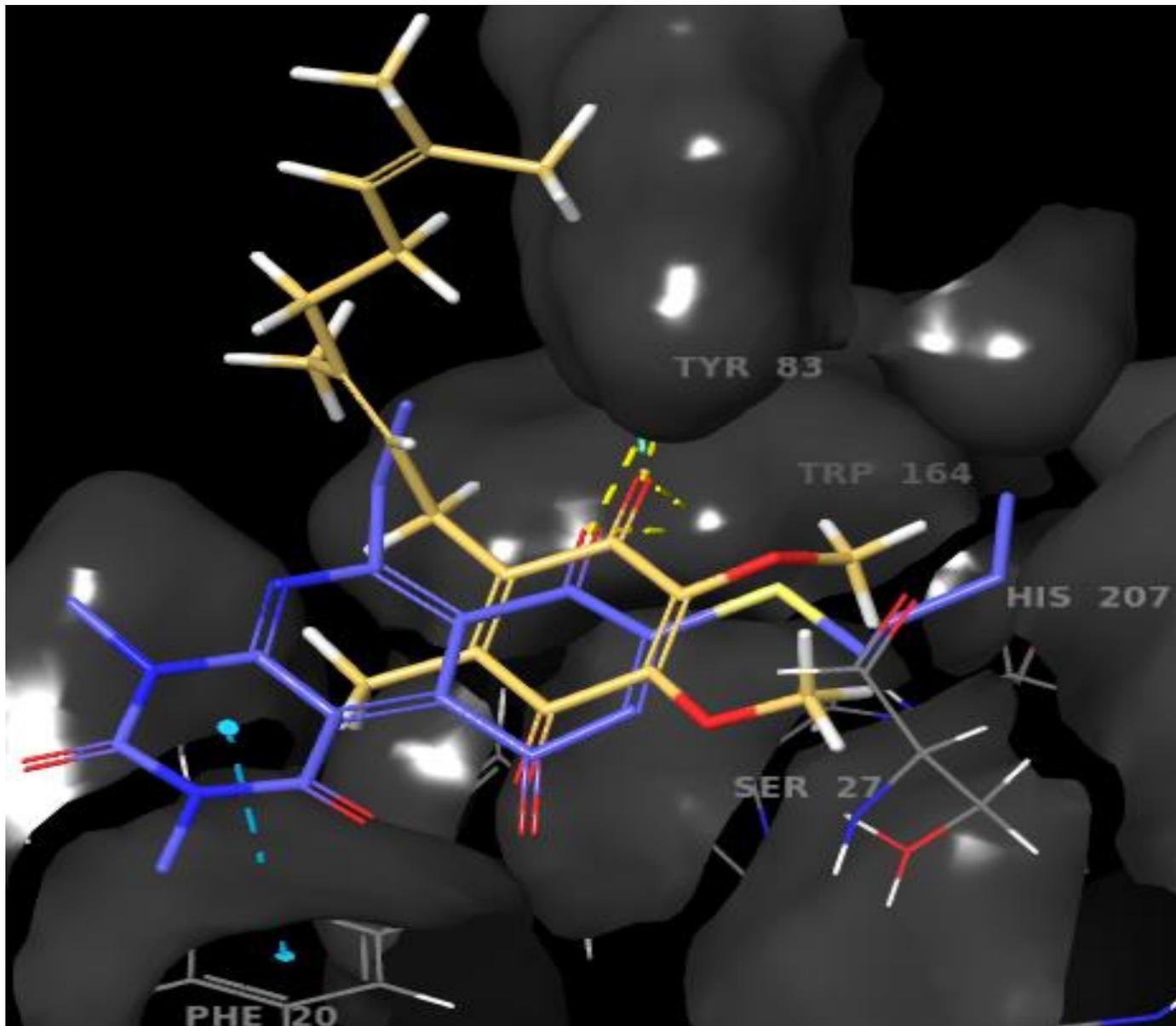
**Figura 13:** El Compuesto 7 con hexilamina en la posición 8 (color celeste), muestra en su modelado molecular que el oxígeno del carbonilo en posición 1 interactúa con Tyr 83 y Trp 164, cumpliendo con la restricción posicional O1 de la ubiquinona (color amarillo). Además, el nitrógeno en la posición 5 satisface la restricción posicional O4. El oxígeno del carbonilo en posición 3 forma una interacción adicional con Ser 27. En ambos modelos de acoplamiento, este compuesto alcanzó un puntaje uniforme de -6.149.



**Figura 14:** El compuesto con hexiltio en la posición 8 (color rosado), muestra en su modelado molecular que el oxígeno del carbonilo en posición 1 interactúa con Tyr 83 y Trp 164, cumpliendo con la restricción posicional O1 de la ubiquinona (color amarillo) e incluso el oxígeno de la posición 10 también forma interacciones con Tyr 83. Además, el nitrógeno en la posición 5 satisface la restricción posicional O4. El oxígeno del carbonilo en posición 3 forma una interacción adicional con Ser 27. En ambos modelos de acoplamiento, este compuesto alcanzó un puntaje uniforme de -6,869.



**Figura 15:** El compuesto **5** con butilamino en la posición 8 (color verde), muestra en su modelado molecular que el nitrógeno de la butilamina en posición 8 interactúa solo con Tyr 83, cumpliendo con la restricción posicional O1 de la ubiquinona (color amarillo). Además, el oxígeno del carbonilo de la posición 10 satisface la restricción posicional O4. Esta molécula es la que tiene el puntaje más bajo observado, y fue incluida solo en el modelo beta, obteniendo un puntaje de docking de -5.922.



**Figura 16:** El compuesto con butilto en la posición 8 (color azul), muestra en su modelado molecular que el oxígeno del carbonilo en posición 7 interactúa con Tyr 83 y Trp 164, cumpliendo con la restricción posicional O1 de la ubiquinona (color amarillo). Además, el oxígeno del carbonilo de la posición 10 satisface la restricción posicional O4. El anillo del uracilo presente en la estructura forma una interacción adicional con Phe 20. Obteniendo así el mayor puntaje de docking en el modelo de *E. Faecalis*, el cual fue de -7,567.

**Tabla 10:** Utilización de modelos alfa y beta en el proceso de docking molecular, enfocado en la interacción con moléculas que presentan una sustitución en la posición 8 mediante derivados alquílicos nitrogenados aún no sintetizados.

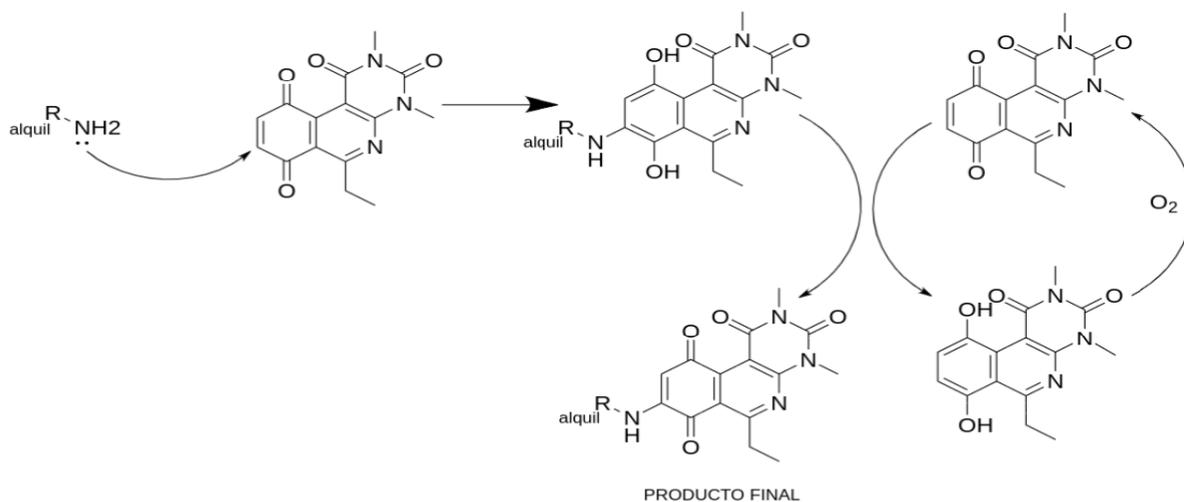
Modelo alfa		Modelo beta	
R-8	docking score	R-8	docking score
Etilamino	-7,221	Etilamino	-7,268
Nonilamino	-7,081	Octilamino	-6,999
Octilamino	-6,999	Decilamino	-6,99
Decilamino	-6,99	Ubiquinona	-6,811
Heptilamino	-6,532	Heptilamino	-6,532
Ubiquinona	-6,308	Nonilamino	-6,168

Los resultados indican que algunos compuestos muestran una fuerte afinidad por el sitio de unión, lo cual se relaciona con su actividad. Sin embargo, también se observa que ciertos compuestos con una buena actividad presentan puntajes de docking más bajos. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que la afinidad por sí sola no necesariamente se correlaciona con la actividad biológica.

## Discusión

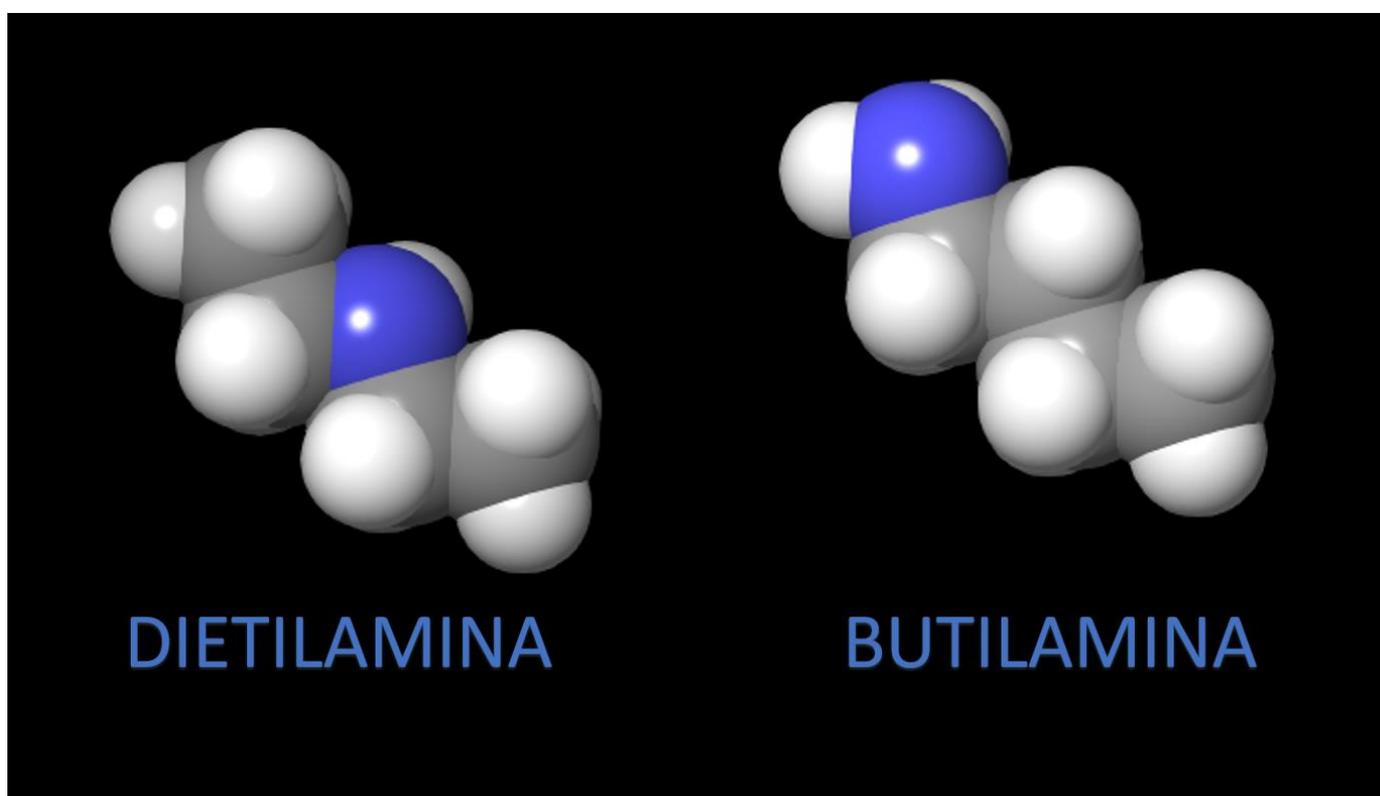
### Síntesis

Los compuestos objetivo fueron sintetizados siguiendo el procedimiento previamente descrito para los derivados alquil-azufrados, en ellos, se describe el empleo de una adición gota a gota para permitir la formación preferente del compuesto mono-sustituido en posición 8. Se sabe que la adición completa al medio de reacción del compuesto azufrado ya sea alquil o aril, resultaba en la formación de productos mono y disustituidos. Sin embargo, al igual que en los compuestos aril-amínicos, los derivados alquil-amino presentan una reacción más rápida, con una regioselectividad dirigida hacia la posición 8. Incluso cuando se adiciona el total del reactivo alquil-amino a la mezcla de reacción, no fue posible detectar la presencia del regioisómero en posición 9 o del compuesto disustituido. Debido a esto se modificó el procedimiento para realizar una adición completa facilitando la síntesis. La formación de producto se evidenciaba, ya que la solución cambia de color rápidamente de amarillo a rojo, indicando adición del alquil-amino al núcleo quinónico. Respecto al tiempo, se mantuvo el período de reacción por 16 horas conforme a los procedimientos anteriores, para permitir la oxidación aeróbica del producto en el medio de reacción, como se muestra en la [Figura 17](#). El color rojo intenso que apareció fue consistente en todas las reacciones, atribuido al grupo amina que confiere esta tonalidad a los compuestos quinónicos, a diferencia de los azufrados que presentaban colores entre amarillos y naranjas. Al momento de llevar a sequedad el producto, presentaban distintas tonalidades de burdeos resultando ser un color característico de la serie *N*-alquílica ([Figura 8](#)).



**Figura 17:** Representación del mecanismo de reacción propuesto para la formación de los compuestos *N*-alquílicos pirimidoisoquinolinquinonas. En este proceso, la amina realiza un ataque nucleofílico en la posición 8, reduciendo el núcleo quinónico. Posteriormente, mediante oxidación aeróbica, se conduce a la obtención del producto final.

Respecto a la diferencia entre los sustituyentes alquilo, se evidenció una disminución en el rendimiento de la reacción al emplear derivados más voluminosos, como en el caso de la dietilamina, cuyo rendimiento fue de 24,8%. Esto contrasta con el rendimiento alcanzado por sus derivados alquílicos lineales, que se situó entre el 45% y el 62%. A pesar de compartir una estructura alquílica similar a otros derivados, la presencia de dos cadenas alquílicas voluminosas resultó en una clara disminución del doble de rendimiento cuando se utilizó una amina secundaria, como la dietilamina, en comparación con las aminas primarias lineales restantes. Esto se atribuye a la posibilidad de un impedimento estérico durante el ataque nucleofílico al núcleo quinónico, especialmente debido a la naturaleza secundaria de la dietilamina en contraste con las aminas primarias utilizadas como reactivos (Figura 18). Ya que el resto de los reactivos son aminas primarias, mientras que dietilamina es una amina secundaria y estas cadenas pueden ocasionar un impedimento estérico al momento de realizar el ataque nucleofílico al núcleo quinónico [22].



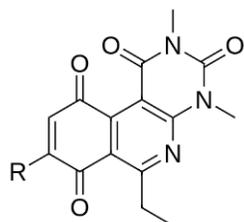
**Figura 18:** Comparación 3D entre dietilamina (una amina secundaria) y butilamina (una amina alquílica primaria), observando cómo las cadenas alquílicas generan impedimento estérico alrededor del nitrógeno, donde reside el par de electrones responsables del ataque nucleofílico.

## Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana fue determinada mediante la cuantificación de la CIM de los compuestos mediante la técnica de microdilución. Aquí se encontró que varios de los compuestos objetivo demostraron actividad contra cepas Gram positivas. Sin embargo, durante el ensayo, se evidenció un desafío significativo en cuanto a su solubilidad. Todos los compuestos mostraron una baja solubilidad en agua, lo que requirió el uso de un cosolvente. Dentro de los utilizados en ensayos bacterianos el más inocuo es el dimetilsulfóxido (DMSO) [23], cuya concentración máxima fue de 5% en el primer pocillo. Se sabe que el DMSO puede alterar la permeabilidad de las membranas celulares. Estudios han mostrado que el DMSO puede alterar la conformación del ADN hacia la forma Z, lo que a su vez puede afectar la transcripción y otros procesos biológicos. Además, se observó que el DMSO puede inducir cambios en las estructuras secundarias de las proteínas, pasando de conformaciones alfa-hélice a beta-lámina [24]. Así mismo se ha descrito que el DMSO en bacterias Gram negativas como *S. paratyphi*, *S. flexneri*, *V. cholerae*, *P. oleovorans* y Gram positivas como *S. epidermidis* afecta la viabilidad bacteriana a 5%. Esto significa que podría incrementar la entrada de ciertos compuestos en las células bacterianas mejorando su susceptibilidad, por tanto, incrementar este porcentaje podría potencialmente afectar la actividad, generando falsos positivos. Sin embargo, en el ensayo de microdilución el pocillo donde se determinó la CIM, correspondía a la 4ta o 5ta posición dentro de la placa. Debido a que, al realizar el procedimiento de preparación de la placa, se realiza una dilución seriada, es decir, en el pocillo siguiente se diluye a la mitad la concentración, la cantidad de DMSO inicial fue diluida 16 o 32 veces, presentándose una concentración de  $5/16 = 0,31\%$  de DMSO en el pocillo de la CIM. A estas concentraciones no se ha descrito efecto sobre la susceptibilidad o viabilidad bacteriana. Todos los compuestos requirieron tanto DMSO como el uso del sonicador.

Inicialmente los compuestos se prepararon en soluciones y se almacenaron días antes de llevar a cabo el ensayo microbiológico. Este periodo de almacenamiento afectó a las soluciones ya que al realizarse el ensayo se observó precipitación de los compuestos en los pocillos. Esto sugiere que, con el tiempo, los compuestos pierden estabilidad en la solución, lo que afecta negativamente en su actividad. Por este motivo se optó por preparar las disoluciones acuosas de los compuestos justo antes de realizar el ensayo y usarlas de manera inmediata, obteniendo así los valores de CIM que fueron reproducibles.

**Tabla 11:** Tabla comparativa de actividad antimicrobiana entre compuestos alquil azufrados vs alquil nitrogenados.



N°	R	LogP*	CIM (µg/mL)		
			MSSA (ATCC 43300)	MRSA (ATCC 43300)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)
A		1,72	8	4	8
B		2,17	4	4	4
C		2,61	>16	>16	>16
D		3,06	>16	>16	>16
4		0,72	>64	>64	64
5		1,17	>64	>64	>64
6		1,61	16	16	>64
7		2,05	2	2	2

\*Calculada con el software Marvin Sketch, método consensus [25].

El análisis comparativo revela una correlación entre la longitud de la cadena alquílica y su eficacia antibacteriana. Los compuestos que contienen azufre y poseen cadenas con 3 y 4 átomos de carbono demostraron ser efectivos, con el compuesto de 4 átomos exhibiendo mayor actividad que el de 3. No obstante, al alargar la cadena a 5 y 6 átomos de carbono, se observa una disminución en la actividad antibacteriana. Esto sugiere que existe un umbral máximo en la longitud de la cadena alquílica más allá del cual no se incrementa la actividad antibacteriana.

En relación con los compuestos que contienen nitrógeno, se ha detectado nula actividad antibacteriana en aquellos con cadenas de 3 y 4 átomos de carbono. Sin embargo, esta actividad se incrementa de manera notable al extender la cadena a 5 y 6 átomos de carbono. Específicamente, el compuesto con una cadena de 6 átomos de carbono mostró ser hasta ocho veces más potente que su análogo de 5 átomos. Además, al analizar los valores de CIM, se observa una mayor eficacia antibacteriana de los compuestos nitrogenados en comparación con los azufrados. Esto apoya la hipótesis de que la sustitución del azufre por nitrógeno en estas estructuras conduce a la creación de compuestos con una mayor potencia antibacteriana.

Al analizar la lipofilia como LogP de los compuestos de la Tabla 11, se observa que los compuestos activos se encuentran dentro del rango de lipofilia entre 1,61 y 2,17. Fuera de este rango no se observa actividad (compuestos **C**, **D**, **4** y **5**), independientemente si el compuesto presenta azufre o nitrógeno. Aun así, es posible observar que la presencia del átomo de nitrógeno contribuye de mejor manera a la actividad, presentando los compuestos más potentes que los derivados azufrados.

### **Estudio de Docking Molecular**

Considerando que las interacciones con el sitio de unión, que corresponde al complejo SDH, son fundamentales para unir a la ubiquinona y que esta realice su función. Es importante establecer las restricciones necesarias en el modelo docking para que el posicionamiento en el sitio de unión permita reproducir las potenciales uniones que se establecerán los compuestos objetivo.

### **Funcionamiento del complejo Succinato Deshidrogenasa (SDH) bacteriana.**

Dentro de la SDH bacteriana, las cadenas laterales de Tyr D83 y Trp B164 son ligandos directos del átomo O1 de la ubiquinona. Además de su unión directa con la ubiquinona, Tyr D83 también forma un puente de hidrógeno adicional con Arg C31, por lo tanto, un protón podría ser transportado directamente desde Tyr D83 al átomo O1 de la ubiquinona cuando se reduce. El residuo Arg C31 se encuentra en proximidad a un grupo metoxi de la ubiquinona, lo que contribuye a la especificidad del sustrato en el sitio de unión. Arg C31 también interactúa con un propionato de heme b, lo que indica su papel esencial en la estabilización del sitio de unión y en la correcta orientación de la ubiquinona para la transferencia eficiente de electrones. Además, el entorno hidrofóbico está formado por residuos como Ile C28, Pro B160, Trp B163, Trp B164 e Ile B209, que rodea el anillo de la ubiquinona. Este entorno resulta fundamental para mantener la ubiquinona en una orientación

adecuada y para prevenir reacciones no deseadas, asegurando así que la transferencia de electrones se lleve a cabo de manera eficiente y específica. La transferencia ordenada de electrones desde el FAD, pasando por los centros de hierro-azufre, hasta la ubiquinona, asegura una reducción progresiva y controlada, minimizando los estados intermedios reactivos. La Tyr D83 también participa en la estabilización de la semiquinona, un intermediario inestable durante el proceso de reducción de la ubiquinona. La Tyr D83 estabiliza el estado intermedio semiquinona de la ubiquinona, lo que es importante para un paso eficiente a ubiquinol. Una semiquinona inestable podría liberar electrones prematuramente, interrumpiendo la cadena de transporte. y estos electrones formando ROS. La formación de ROS generalmente ocurre cuando los electrones se desvían hacia el oxígeno molecular, formando superóxido y otros radicales. De esta manera, las interacciones con los ligandos directos de la ubiquinona se vuelven fundamentales, ya que facilitan la orientación adecuada de la ubiquinona, desempeñando correctamente el mecanismo de transporte de electrones previniendo a su vez la formación de ROS. Por lo tanto, nuestras moléculas deben tener la capacidad de participar en estas interacciones para influir en dicho proceso de manera efectiva.

Del punto de vista evolutivo, los residuos de His B207 y Pro B160 son altamente conservados y desempeñan un papel crítico en la funcionalidad óptima de la succinato deshidrogenasa (SDH). Estos residuos se mantienen invariables en una variedad de especies, incluyendo humanos, ratones, *Paracoccus denitrificans* y *E. coli* SQRs, particularmente en el sitio de unión a la quinona, para la transferencia de electrones. Dicha conservación sugiere que estos residuos representan blancos terapéuticos potencialmente universales, manteniendo su relevancia a través de diversas especies y, por ende, ostentando una robustez notable debido a su invariabilidad evolutiva. Sin embargo, esta misma universalidad implica que cualquier mutación en estos residuos podría tener efectos perjudiciales significativos en la salud del organismo. Además, esta conservación plantea retos específicos en el diseño de intervenciones dirigidas a inhibir la cadena de transporte de electrones, ya que podría impactar adversamente la función de la SDH en humanos. Por lo tanto, la constancia de estos residuos a lo largo de múltiples especies, aunque representa una oportunidad para el desarrollo de tratamientos ampliamente aplicables, también exige un enfoque meticuloso y considerado para evitar efectos colaterales indeseados en la función celular humana normal.

## Restricciones para el modelo docking.

Basado en la relevancia de las interacciones previamente descritas, se aplicaron dos restricciones en nuestro modelo de docking. La primera restricción se refiere al puente de hidrógeno, que implica la necesidad de contar con un aceptor de puente de hidrógeno capaz de formar dicho puente con los residuos aminoácidos relevantes (Tyr D83 y Trp B164) para la estabilización y funcionalidad de la ubiquinona. Esta restricción asegura que el compuesto se encuentre presente en el sitio de unión y, en caso de no cumplirla, el modelo penaliza la molécula otorgándole una puntuación de docking más baja. A medida que incrementa el número de interacciones y enlaces formados con los residuos de aminoácidos en el bolsillo de unión, se observa un correspondiente aumento en la puntuación de docking. Un ejemplo destacado es el compuesto que contiene butiltio en su estructura, ya que, durante la simulación de su unión, demostró la capacidad de formar interacciones adicionales, como un puente  $\pi$ - $\pi$  stacking con el residuo Phe 20 (Figura 16). Esto resultó en una puntuación más alta debido a la presencia de un mayor número de interacciones con los residuos en el sitio de unión.

La segunda restricción se relaciona con las posiciones espaciales, donde se restringe al compuesto a adoptar una posición específica. Si la molécula no cumple con esta condición, es descartada. Es importante destacar que las restricciones sobre los oxígenos O1 y O4 son estáticas, lo que significa que la molécula debe ser capaz de adaptarse a ambas posiciones simultáneamente. Esto se debe a que la mejor posición para la ubiquinona es estricta y, dado que el diseño de las moléculas se basa en la quinona, se espera que estas moléculas se orienten en el sitio de unión de forma muy cercana a la ubiquinona. Sin embargo, no todos los compuestos cumplirán de manera uniforme con estas restricciones. Algunos pueden cumplir la restricción posicional a través de los oxígenos quinónicos, mientras que otros pueden utilizar átomos de nitrógeno u otros donantes de puentes de hidrógeno que puedan presentar en su estructura. Esto se evidenció en el caso del hexilamino (Figura 13) y el hexiltio (Figura 14), donde lograron cumplir con las restricciones posicionales con el oxígeno del carbonilo de la posición 1 y un nitrógeno de la posición 5, en lugar de emplear los oxígenos quinónicos presentes en sus propias estructuras. Esto influyó en sus puntuaciones de docking, ya que al no encajar de la misma manera que la ubiquinona, se sugiere que la transferencia de electrones en estos casos se ve especialmente afectada. Esto se reflejó en la actividad microbiana, que mostró correlación con la puntuación del docking real de hexilamina, designado como compuesto **7** de la serie. La necesidad de cumplir con estas restricciones puede influir en la orientación adoptada por los compuestos dentro del sitio de unión, lo que, a su vez, puede tener un impacto en su puntuación de docking, afectando otras posibles interacciones o incluso el mecanismo mismo del transporte de electrones. Se seleccionaron las esferas de inclusión que obtuvieron el mejor coeficiente de determinación ( $R^2$ ), ya que este valor nos indica que tan alejados están los valores de una línea de tendencia, un  $R^2$  elevado garantiza que la variabilidad en la respuesta del modelo está siendo adecuadamente representada y minimizada, conduciendo a predicciones más precisas y confiables. Por ende, la selección de esferas de inclusión basada en la maximización de  $R^2$  es una estrategia para mejorar la fiabilidad y precisión de nuestro modelo predictivo. y al mismo tiempo, se optó por mantenerlas lo más pequeñas posible en lugar de grandes, aunque ambas

presentaron  $R^2$  similares. Se otorgó preferencia a las esferas de menor tamaño debido a su capacidad para restringir la variabilidad y, por consiguiente, para aumentar la precisión del modelo. A pesar de que las esferas mayores abarcan una mayor cantidad de moléculas, tienden a introducir mayor variabilidad, pudiendo así afectar la exactitud en futuras predicciones. Por ende, se optó por esferas más pequeñas para asegurar una mayor rigurosidad y consistencia en el modelo.

La fuerte unión de algunos compuestos al sitio de unión no garantiza necesariamente una inhibición efectiva de la enzima o el bloqueo eficiente del transporte de electrones. Esto puede deberse a varias razones, como que la unión no interrumpe la función de la enzima, o porque el compuesto es expulsado o metabolizado rápidamente por la bacteria, lo que permite que el transporte de electrones continúe sin obstáculos. Este caso ocurrió en moléculas como la que tenía etiltio en su estructura, ya que cumplía con todas las restricciones del modelo, sin embargo, no tiene actividad biológica frente a bacterias. Como también ocurrió el caso contrario, que compuestos con baja afinidad mostraron alta actividad. Esta falta de correlación podría indicar simplemente que el compuesto no se ajusta adecuadamente al sitio de unión, lo que podría dificultar la entrada de la ubiquinona, y por ende tener la actividad antibacteriana.

### **Diferencia de actividad entre bacterias.**

A pesar de obtener puntajes de docking similares en los estudios realizados con SAMS, SAMR y *Enterococcus faecalis*, las variaciones observadas en las CIM indican que factores adicionales más allá de la afinidad de unión en el sitio que están influyendo en la actividad antibacteriana de los compuestos. Estos pueden atribuirse a diferencias en la morfología bacteriana y las barreras estructurales específicas, como la composición y la estructura de las membranas celulares. Aunque el sitio de unión, succinato deshidrogenasa (SDH) permanece constante en diversas bacterias, las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de estos compuestos varían significativamente dependiendo de la especie bacteriana. Esta variabilidad en la CIM puede atribuirse a las diferencias entre las distintas cepas bacterianas. En particular, las bacterias Gram negativas poseen una barrera externa adicional en su estructura celular, una membrana externa que actúa como un obstáculo físico, impidiendo que muchos compuestos lleguen eficazmente a este sitio de unión. Esto podría explicar la ausencia de actividad de los compuestos contra cepas Gram negativas.

Además, se han identificado compuestos, como el compuesto **6** de la serie estudiada, que muestra actividad contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR) y sensible a meticilina (SAMS), pero no contra *Enterococcus faecalis*. Esta variabilidad en la actividad, teniendo el mismo mecanismo de acción, refleja un fenómeno similar al observado en antibióticos de uso clínico, como la clindamicina cuya susceptibilidad varía entre diferentes bacterias [26]. Esto indica que, más allá del mecanismo de acción común, factores intrínsecos de cada bacteria, como la morfología, el metabolismo y la presencia de mecanismos de resistencia específicos, juegan un papel crucial en determinar la susceptibilidad a los compuestos antimicrobianos. Por lo tanto, una comprensión

profunda de estas diferencias es esencial para el diseño y la selección de terapias antimicrobianas más efectivas y precisas.

A pesar de que el docking puede predecir la unión de compuestos, no siempre garantiza la predicción precisa de la actividad antibacteriana debido a la complejidad de los sistemas bacterianos y su dinámica, en cambio el modelo fue construido en un estado estático de la molécula de ubiquinona. La interacción de un compuesto con una enzima específica no necesariamente conlleva la inhibición del transporte de electrones correspondiente o induce la muerte celular. Además, el modelo de docking actual se construyó a partir de un número limitado de moléculas. Si se ampliara el conjunto de datos para incluir una variedad más amplia de moléculas, esto podría influir significativamente en el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), mejorando la línea de tendencia y proporcionando una representación más precisa y robusta de la relación entre la estructura del compuesto y su actividad antibacteriana. Por lo tanto, la expansión del conjunto de datos es fundamental para refinar y fortalecer la capacidad predictiva del modelo, permitiendo así una evaluación más precisa de la potencial eficacia antibacteriana de los compuestos. Sin un entendimiento claro del mecanismo por el cual un antimicrobiano ejerce su efecto, es difícil predecir cómo las modificaciones o las diferencias en los compuestos influirán en la actividad. Los modelos pueden hacer suposiciones erróneas sobre qué interacciones son críticas para la actividad antibacteriana, lo que podría llevar a la sobreestimación o subestimación de la eficacia de un compuesto.

Aunque las SDH pueden ser conservadas a nivel de secuencia, pueden existir diferencias en su conformación o en su entorno inmediato debido a la variabilidad entre especies bacterianas, la morfología, la permeabilidad de la membrana, los mecanismos de resistencia y el metabolismo pueden variar significativamente entre diferentes bacterias, afectando cómo un compuesto interactúa y penetra en la bacteria. Los compuestos podrían interactuar con otras moléculas o estructuras dentro de la célula, influenciando su efectividad o causando efectos secundarios no previstos. Los compuestos podrían competir con sustratos naturales o interactuar con otras rutas metabólicas de maneras que no se contemplan en el modelo de docking. Las células son entornos altamente dinámicos y complejos. Factores como el pH, la presencia de otras biomoléculas, y la dinámica celular no se capturan completamente en los modelos de docking. Los modelos de docking generalmente consideran una instantánea estática de las interacciones y no pueden simular la dinámica completa de las proteínas y complejos moleculares en el tiempo. Estas limitaciones subrayan la diferencia entre las predicciones computacionales y las realidades experimentales o clínicas. Es fundamental que los hallazgos de los modelos de docking se validen con experimentos biológicos y clínicos.

## Conclusiones

1. Los compuestos **2**, **3**, **4**, **6** y **7** revelaron actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas, con CIM fluctuando entre 2 y 64  $\mu\text{g/mL}$ . En contraposición, en cepas Gram negativas, la CIM de todos los compuestos fue  $>64 \mu\text{g/mL}$ .
2. La síntesis de los aminoderivados (compuestos **2** al **8**) mostró una regioselectividad marcada hacia la posición 8 del compuesto **1**.
3. El incremento de la cadena alquílica en la posición 8 genera compuestos más activos, y el límite de esta cadena va a depender del átomo que tenga ya sea azufre o nitrógeno.
4. El reemplazo bioisostérico del átomo de azufre por un átomo de nitrógeno aumenta la actividad antibacteriana.
5. Los compuestos de esta serie exhiben actividad antibacteriana óptima cuando su coeficiente de partición (LogP) se sitúa entre 1,61 y 2,17. Esta efectividad se mantiene independientemente de la presencia de azufre o nitrógeno en la cadena alquílica. Exceder este rango de LogP conlleva a una pérdida notable de la actividad antibacteriana.
6. Residuos como Tyr D83, Trp B164 y Arg C31 son importantes para la correcta orientación y estabilización de la ubiquinona en el sitio de unión de la SDH, permitiendo el transporte efectivo de electrones y previniendo la formación de ROS.
7. Aunque algunos compuestos mostraron una alta afinidad por el sitio de unión de la SDH, no siempre se correlacionó con una alta actividad antibacteriana. Por lo que hay una complejidad en el entorno bacteriano no considerada en el modelo molecular docking utilizado en este estudio.

## **Proyecciones**

Este estudio revela la presencia de compuestos con actividad antibacteriana en una novedosa familia, dirigidos hacia la cadena transportadora de electrones bacteriana (CTeB), un objetivo distinto a los tradicionales de los antibióticos. Estos compuestos aún no han sido investigados en términos de farmacocinética y toxicidad, lo que resalta la necesidad de futuras investigaciones para evaluar al menos los compuestos más activos de esta familia. Los resultados del análisis de docking señalan la importancia de explorar el impacto del alargamiento de la cadena alquílica en los compuestos nitrogenados, lo que podría ampliar su eficacia en el ataque a la CTeB. La CTeB tiene residuos conservados a lo largo de la evolución de los organismos, lo que puede tener implicaciones significativas tanto para el diseño de compuestos como para su efecto en diferentes organismos.

Se propone la realización de ensayos *in vivo* para validar la actividad antibacteriana de estos compuestos y de explorar la inclusión de grupos polares en su estructura para mejorar su solubilidad, lo cual es fundamental para su potencial aplicación clínica. Se plantea una investigación preclínica para evaluar compuestos derivados en modelos de infección bacteriana, proporcionando información crucial sobre su potencial terapéutico y viabilidad como agentes antibacterianos.

En cuanto a las proyecciones futuras, se sugiere la derivación de análogos para mejorar las propiedades farmacocinéticas y de seguridad de los compuestos. Profundizar en los mecanismos de acción específicos dirigidos a la CTeB podría permitir el diseño de fármacos más específicos y efectivos. La combinación de estos compuestos con antibióticos existentes representa una estrategia potencial para mejorar la eficacia antibacteriana y reducir la resistencia. La evaluación de la actividad frente a biofilms bacterianos emerge como un área prometedora para futuras aplicaciones clínicas, al igual que comprender en detalle la estructura-actividad y los mecanismos de resistencia. Integrar estos compuestos con terapias alternativas, como la inmunoterapia, para mejorar el tratamiento antibacteriano. Además, se propone realizar estudios para evaluar el impacto de estos compuestos en la microbiota humana y desarrollar formulaciones farmacéuticas específicas para mejorar su biodisponibilidad y estabilidad. La comprensión detallada de los mecanismos de penetración celular podría servir para optimizar su eficacia y minimizar los posibles efectos secundarios.

En resumen, este estudio presenta una nueva familia de compuestos con actividad antibacteriana dirigida a la CTeB. Si bien son prometedores, estos compuestos requieren investigaciones más amplias y específicas para evaluar su potencial terapéutico, mecanismos de acción, resistencia bacteriana, interacciones con la microbiota y formulaciones farmacéuticas para su posible aplicación clínica como agentes antibacterianos eficaces y seguros.

## Referencias

1. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. *History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins*. J Invest Surg. 2012 Apr;25(2):67-77.
2. José Antonio García Rodríguez JPP, J. González. *Una historia verdaderamente fascinante: 75 años del descubrimiento de los antibióticos*. Madrid, 2004.
3. Nicolaou, K., Rigol, S. *A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis*. J Antibiot 71, 153–184 (2018).
4. Walsh, C. *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*. Nature 406, 775–781 (2000).
5. Ayliffe G. *The Progressive Intercontinental Spread of Methicillin-Resistant Staphylococcus*. Clinical Infection Disease 1997:74-9.
6. Global and regional sepsis and infectious syndrome mortality in 2019: a systematic analysis
7. O'Neill, J.I.M. *Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations; Review on Antimicrobial Resistance*: London, UK, 2014.
8. Dougnac L, Alberto, Mercado F, Marcelo, Cornejo R, Rodrigo, Cariaga V, Mario, Hernández P, Glenn, Andresen H, Max, Bugedo T, Guillermo, & Castillo F, Luis. (2007). *Prevalencia de sepsis grave en las Unidades de Cuidado Intensivo: Primer estudio nacional multicéntrico*. Revista médica de Chile, 135(5), 620-630.
9. Ruiz, Carolina, Díaz, Miguel Ángel, Zapata, Juan Marcelo, Bravo, Sebastián, Panay, Sergio, Escobar, Cristina, Godoy, Jorge, Andresen, Max, & Castro, Ricardo. (2016). *Características y evolución de los pacientes que ingresan a una Unidad de Cuidados Intensivos de un hospital público*. Revista médica de Chile, 144(10), 1297-1304.
10. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. (2021, 17 de noviembre). *Impacto de COVID-19 en la resistencia antimicrobiana*. Organización Panamericana de la Salud.
11. Boucher HW, T.G., Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al, *bad drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America*. Clinical infections diseases, 2009. 48: p. 1-12.
12. Coates AR, Halls G, Hu Y. *Novel classes of antibiotics or more of the same?* Br J Pharmacol. 2011 May
13. Spellberg B, Gidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. *The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America*. Clinical Infectious Diseases 2008;46:155-64.
14. Lown JW. *The mechanism of action of quinone antibiotics*. Mol Cell Biochem. 1983;55(1):17-40.
15. Shen CC, Syu WJ, Li SY, Lin CH, Lee GH, Sun CM. *Antimicrobial activities of naphthazarins from Arnebia euchroma*. J Nat Prod. 2002 Dec;65(12):1857-62.
16. Campanini-Salinas, J.; Andrades-Lagos, J.; González-Rocha, G.; Choquesillo-Lazarte, D.; Dragnic, S.B.; Faúndez, M.; Alarcón, P.; Silva, F.; Vidal, R.; Salas-Huenuleo, E.; et al. *A new*

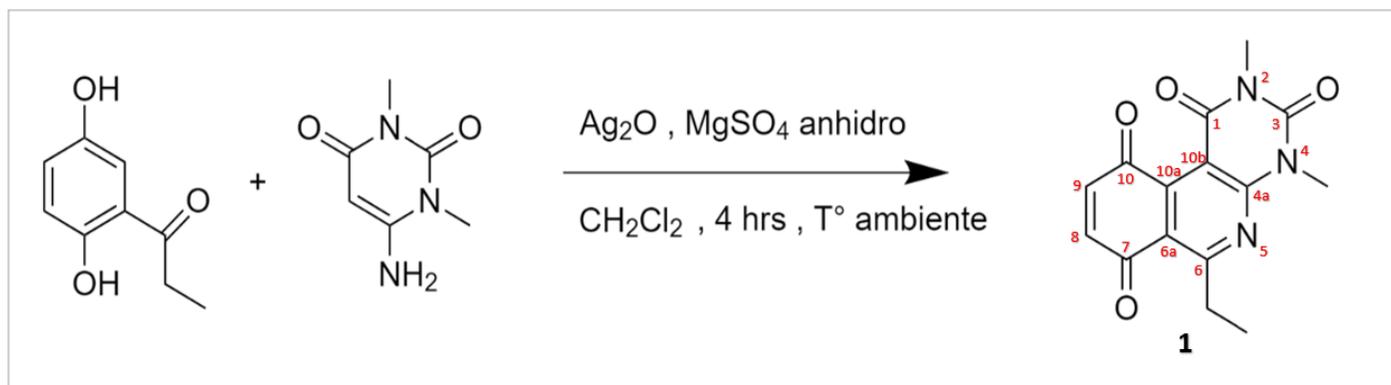
*kind of quinonic-antibiotic useful against multidrug-resistant S. aureus and E. faecium infections.* Molecules 2018, 23, 1776.

17. Andrades-Lagos, J.; Campanini-Salinas, J.; Pedreros-Riquelme, A.; Mella, J.; Choquesillo-Lazarte, D.; Zamora, P.P.; Pessoa-Mahana, H.; Burbulis, I.; Vásquez-Velásquez, D. *Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Studies of New Quinone Derivatives as Antibacterial Agents.* Antibiotics 2023, 12, 1065.
18. CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, approved Standard.* 8<sup>o</sup> ed. Vol. 29. 2009. 85.
19. Valderrama JA, Vasquez D. *Design and synthesis of angucyclinone AB-pyrido[2,3-d]pyrimidine analogues.* Tetrahedron Lett 2008;49:703-6.
20. Vásquez D, Rodríguez JA, Theoduloz C, Calderon PB, Valderrama JA. *Studies on quinones. Part 46. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of aminopyrimidoisoquinolinequinones.* European Journal of Medicinal Chemistry 2010;45:5234-42.
21. Jormakka M, Törnroth S, Byrne B, Iwata S. *Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N.* Science. 2002 Mar 8;295(5561):1863-8.
22. Kanavarioti A, Stronach MW, Ketner RJ, Hurley TB. *Large steric effect in the substitution reaction of amines with phosphoimidazolide-activated nucleosides.* J Org Chem. 1995 Feb 10;60(3):632-7.
23. T Wadhvani, K Desai, D Patel, D Lawani, P Bahaley, P Joshi, V Kothari. *Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials.* The Internet Journal of Microbiology. 2008 Volume 7 Number 1.
24. Tunçer, S., Gurbanov, R., Sheraj, I. et al. *Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes.* Sci Rep 8, 14828 (2018).
25. Klopman, G., Li, J.-Y., Wang, S., & Dimayuga, M. (1994). *Computer Automated log P Calculations Based on an Extended Group Contribution Approach.* Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 34(4), 752-781.
26. Badr MT, Blümel B, Baumgartner S, Komp JMA, Häcker G. *Antimicrobial Susceptibility Patterns and Wild-Type MIC Distributions of Anaerobic Bacteria at a German University Hospital: A Five-Year Retrospective Study (2015-2019).* Antibiotics (Basel). 2020 Nov 18;9(11):823.
27. Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S. *Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation.* Science. 2003 Jan 31;299(5607):700-4.

## Anexo

### Marchas

#### Compuesto 1: 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (**1**)

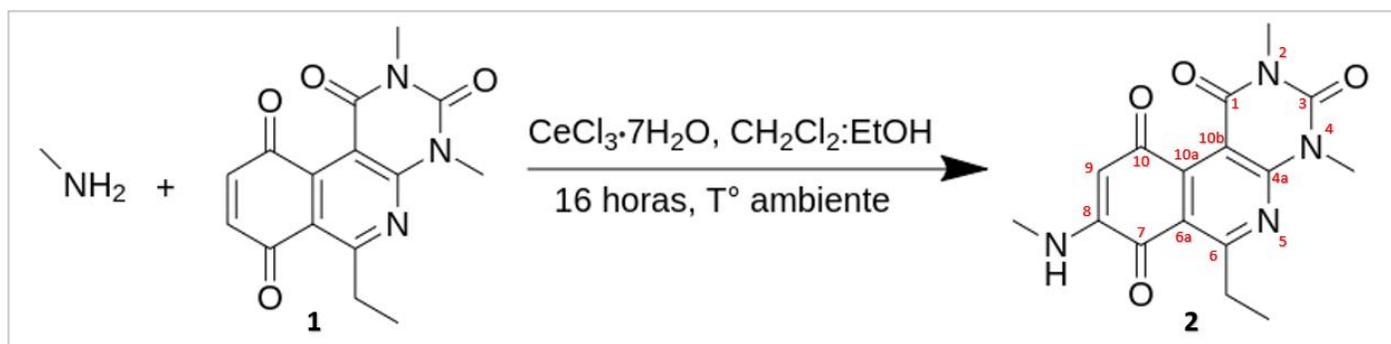


En un balón de 100 mL se prepara una suspensión de  $\text{Ag}_2\text{O}$  (2406,0 mg; 10,38 mmol), 1-(2,5-dihidroxifenil)propan-1-ona (570,6 mg; 3,36 mmol),  $\text{MgSO}_4$  (2350,0 mg; 10,14 mmol), 6-amino-1,3-dimetilpirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (586,6 mg; 3,71 mmol), disueltos en 40 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se mantiene en agitación vigorosa durante 3 horas. El crudo de la reacción se filtró al vacío con celite 545 en un embudo Büchner arrastrando el producto con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se evapora el filtrado hasta sequedad y se purifica en columna de cromatografía con 45 g sílica gel (0,063 - 0,200 mm) utilizando como fase móvil diclorometano:acetato de etilo 9:1. Se obtiene un sólido de color amarillo (825,7 mg; 2,76 mmol), 82% de rendimiento. Punto Fusión: 167,5-168,8 °C. Peso molecular = 299,09061 g/mol; masa encontrada  $m/z = 299,0907$ . IR (KBr): 1666,2  $\text{cm}^{-1}$  C=O en 7 y 10; 1720,19  $\text{cm}^{-1}$  C=O en 1 y 3.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1.36 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 3H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.42 (dd,  $^3J=7.3$  Hz, 2H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.48 (s, 3H, 2- $\text{NCH}_3$ ). 3.78 (s, 3H, 4- $\text{NCH}_3$ ), 6.83 (d,  $^3J=10.3$  Hz, 1H, 8-H), 7.13 (d,  $^3J=10.3$  Hz, 1H, 9-H).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  12.2 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 29.2 (4- $\text{NCH}_3$ ), 30.3 (2- $\text{NCH}_3$ ), 31.7 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 105.1 (10b), 121.0 (6a), 138.4 (9), 138.5 (8), 146.3 (10a), 151.2 (3), 152.6 (1), 158.7 (4a), 170.9 (6), 183.6 (7), 184.7 (10).

**Compuesto 2:** 8-metilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (2)

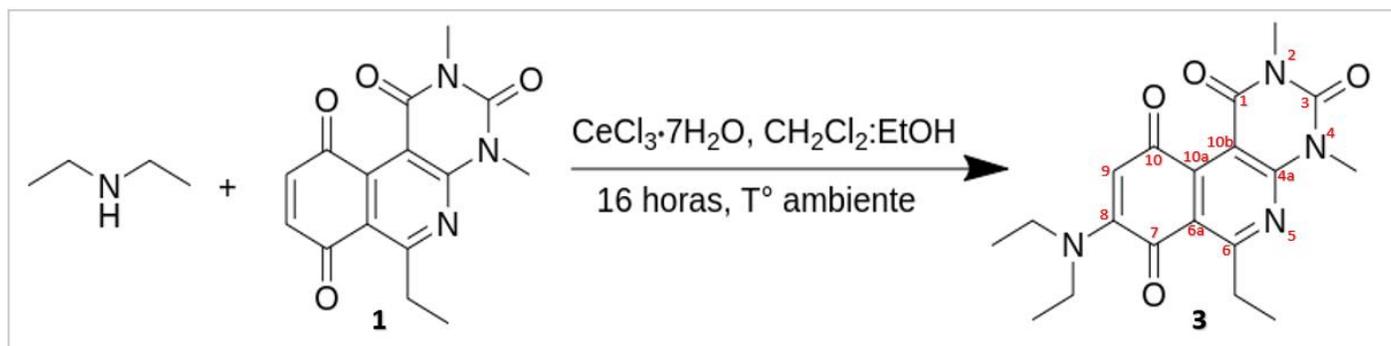


En un balón de 50 mL se prepara una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **1** (350,3 mg; 1,17 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado ( $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (5% mol de **1**) en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}=1:1$  (20 mL), se adiciona mediante goteo una solución de metilamina 40% (103,6 mg; 1,33 mmol), disuelto en 10 mL de EtOH. Una vez adicionada, se deja reaccionar por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 45 g de sílica gel (0,063 - 0,200 mm) utilizando fase móvil metanol:diclorometano=2:2. Se obtiene un sólido de color rojo burdeos (98,0 mg; 0,3 mmol), 25,5% de rendimiento. Punto de fusión: 211,3-212,1°C. Peso molecular = 328,1172 g/mol.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1.35 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 3H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.95 (d,  $^3J=5.4$  Hz, 3H, 8- $\text{NHCH}_3$ ), 3.37 (q,  $^3J=7.3$  Hz, 2H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.48 (s, 3H, 2- $\text{NCH}_3$ ), 3.76 (s, 3H, 4- $\text{NCH}_3$ ), 5.79 (s, 1H, 9-H), 5.99 (s, 1H, 8- $\text{NHCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  12.03 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 29.08 (2- $\text{NCH}_3$ ), 29.32 (8- $\text{NHCH}_3$ ), 30.11 (4- $\text{NCH}_3$ ), 31.63 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 100.40 (9), 106.16 (10b), 119.69 (6a), 148.97 (8), 149.98 (10a), 151.29 (3), 152.97 (4a), 158.82 (1), 169.87 (6), 179.90 (7), 181.04 (10).

**Compuesto 3:** 8-dietilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (**3**)

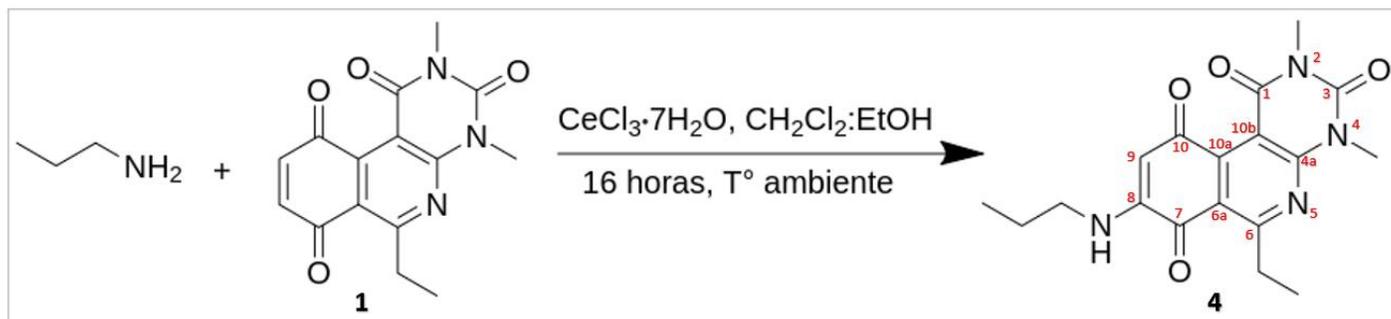


En un balón de 50 mL se prepara una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **1** (221,3 mg; 0,74 mmol),  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5% mol de **1**) en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}=1:1$  (20 mL), se adiciona mediante goteo una solución de dietilamina (60,6 mg; 0,78 mmol) disuelto en 10 mL de EtOH. Una vez adicionada, se deja reaccionar por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 45 g de sílica gel (0,063 - 0,200 mm) utilizando fase móvil diclorometano:acetato de etilo=4:1. Se obtiene un sólido de color rojo burdeos (68,0 mg; 0,18 mmol); 24,8% de rendimiento. Punto de fusión: 130°C descompuesto. Peso molecular = 370,1641 g/mol.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1.31 (t,  $^3J=7.0$  Hz, 6H, 8- $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 1.37 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.25 (q,  $^3J=7.3$  Hz, 2H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.48 (q,  $^3J=7.0$  Hz, 4H, 8- $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 3.48 (s, 3H, 2- $\text{NCH}_3$ ), 3.74 (s, 3H, 4- $\text{NCH}_3$ ), 5.82 (s, 1H, 9H).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  12.64 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 13.02 (s, 2C, 8- $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 28.99 (2- $\text{NCH}_3$ ), 30.01 (4- $\text{NCH}_3$ ), 30.80 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 46.35 (s, 2C, 8- $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 102.07 (9), 104.54 (10b), 121.35 (6a), 148.34 (8), 151.37 (10a), 152.42 (3), 154.34(4a), 158.72 (1), 168.16 (6), 180.39 (7), 182.58 (10).

**Compuesto 4:** 8-propilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (**4**)

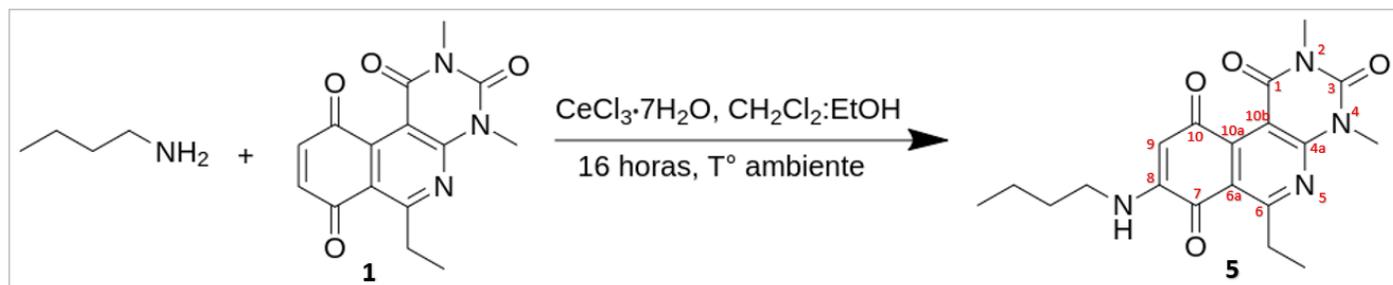


En un balón de 50 mL se prepara una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **1** (108,6 mg; 0,36 mmol),  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5% mol de **1**) en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}=1:1$  (20 mL), se adiciona mediante goteo una solución de propilamina (46,2 mg; 0,78 mmol) disuelto en 10 mL de EtOH. Una vez adicionada, se deja reaccionar por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 45 g de sílica gel (0,063 - 0,200 mm) utilizando fase móvil diclorometano:acetato de etilo=3:1. Se obtiene un sólido de color rojo burdeos, (76,8 mg; 0,22 mmol), 59,9% de rendimiento. Punto de fusión: 171,2-172,3°C. Peso molecular = 356,1485 g/mol.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1.05 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 3H, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.35 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 3H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.76 (h,  $^3J=7.3$  Hz, 2H, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.16 (q,  $^3J=7.3$  Hz, 2H, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.37 (q,  $^3J=7.3$  Hz, 2H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.48 (s, 3H, 2- $\text{NCH}_3$ ), 3.75 (s, 3H, 4- $\text{NCH}_3$ ), 5.79 (s, 1H, 9-H), 5.94 (s, 1H, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  11.52 (8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 12.06 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 21.59 (8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 29.08 (2- $\text{NCH}_3$ ), 30.10 (4- $\text{NCH}_3$ ), 31.64 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 44.41 (8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 100.45 (9), 106.14 (10b), 119.72 (6a), 147.99 (8), 149.97 (10a), 151.30 (3), 152.97 (4a), 158.82 (1), 169.84 (6), 180.03 (7), 181.00 (10).

**Compuesto 5:** 8-butilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (**5**)

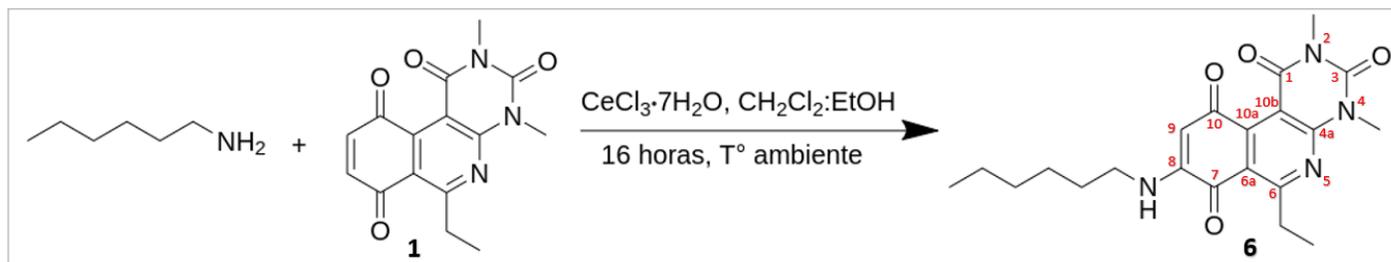


En un balón de 50 mL se prepara una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **1** (105,9 mg; 0,35 mmol),  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5% mol de **1**) en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}=1:1$  (20 mL), se adiciona mediante goteo una solución de butilamina (60,1 mg; 0,82 mmol) disuelto en 10 mL de EtOH. Una vez adicionada, se deja reaccionar por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 45 g de sílica gel (0,063 - 0,200 mm) utilizando fase móvil diclorometano:acetato de etilo=4:1. Se obtiene un sólido de color rojo burdeos (80,5 mg; 0,22 mmol), 62,1% de rendimiento. Punto de fusión: 145,6-146,7°C. Peso molecular = 370,1641 g/mol.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.98 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 3H, 8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.32 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 3H, 6-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.44 (m, 2H, 8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.69 (m, 2H, 8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.18 (td,  $^3J=7.3, 5.7$  Hz, 2H, 8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.34 (q,  $^3J=7.3$  Hz, 2H, 6-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.46 (s, 3H, 2-NCH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 3H, 4-NCH<sub>3</sub>), 5.76 (s, 1H, 9-H), 5.95 (t,  $^3J=5.7$  Hz, 1H, 8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  12.03 (6-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.69 (8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.18 (8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29.04 (2-NCH<sub>3</sub>), 30.08 (4-NCH<sub>3</sub>), 30.22 (8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 31.61 (6-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 42.42 (8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 100.34 (9), 106.11 (10b), 119.69 (6a), 147.98 (8), 149.94 (10a), 151.27 (3), 152.94 (4a), 158.79 (1), 169.78 (6), 180.01 (7), 180.92 (10).

**Compuesto 6:** 8-pentilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (**6**)

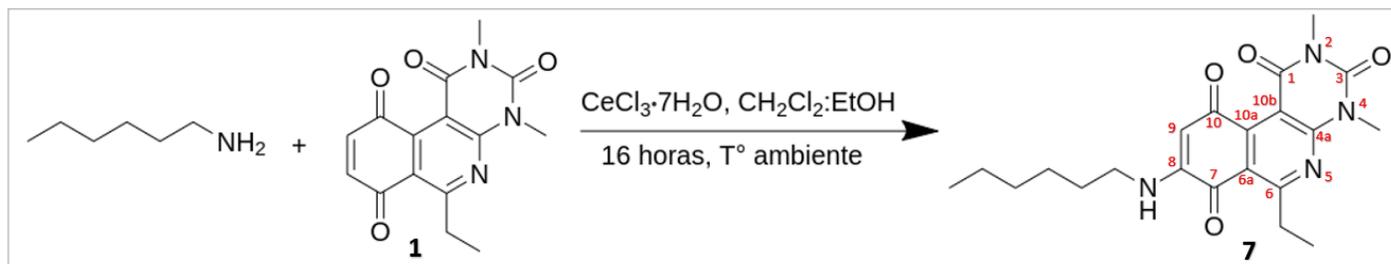


En un balón de 50 mL se prepara una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **1** (163,5 mg; 0,55 mmol),  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5% mol de **1**) en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}=1:1$  (20 ml), se adiciona mediante goteo una solución de pentilamina (54,6 mg; 0,63 mmol) disuelto en 10 mL de EtOH. Una vez adicionada, se deja reaccionar por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 45 g de sílica gel (0,063 - 0,200 mm) utilizando fase móvil diclorometano:acetato de etilo=6:1. Se obtiene un sólido de color rojo burdeos (95,0 mg; 0,25 mmol), 44,9% de rendimiento. Punto de fusión: 141,2-142,4°C. Peso molecular = 384,1798 g/mol.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.95(m, 3H, 8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.35 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 3H, 6-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.40 (m, 4H, 8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.70 (m, 2H, 8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.17 (m, 2H, 8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.37 (q,  $^3J=7.3$  Hz, 2H, 6-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.48 (s, 3H, 2-NCH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 3H, 4-NCH<sub>3</sub>), 5.78 (s, 1H, 9-H), 5.93 (t,  $^3J=5.8$  Hz, 1H, 8-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  12.06 (6-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.94 (8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.32 (8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 27.93 (8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29.07 (2-NCH<sub>3</sub>), 29.13 (8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 30.10 (4-NCH<sub>3</sub>), 31.64 (6-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 42.71 (8-MHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 100.41 (9), 106.14 (10b), 119.73 (6a), 147.97 (8), 149.99 (10a), 151.30 (3), 152.97 (4a), 158.81 (1), 169.83 (6), 180.04 (7), 180.98 (10).

**Compuesto 7:** 8-hexilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (**7**)

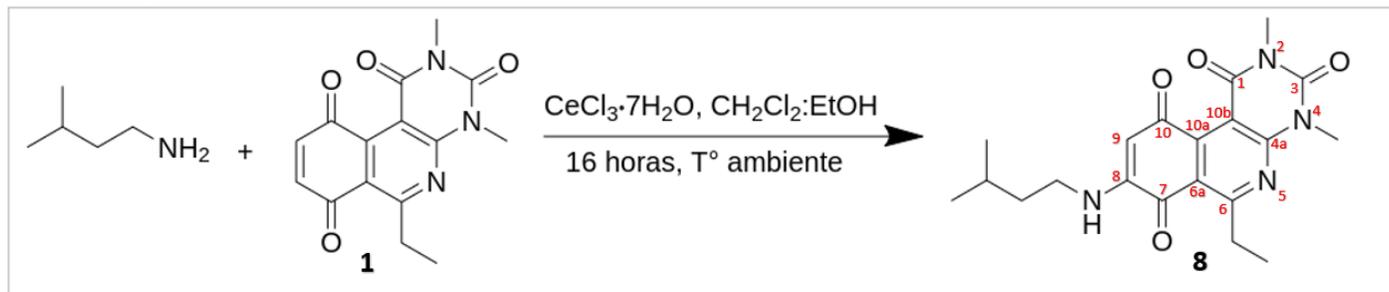


En un balón de 50 mL se prepara una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **1** (200,1 mg; 0,67 mmol),  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5% mol de **1**) en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}=1:1$  (20 mL), se adiciona mediante goteo una solución de hexilamina (76,1 mg; 0,75 mmol) disuelto en 10 mL de EtOH. Una vez adicionada, se deja reaccionar por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 45 g de sílica gel (0,040-0,063 mm) utilizando fase móvil diclorometano:acetato de etilo=9:1. Se obtiene un sólido de color rojo burdeos (135,1 mg; 0,34 mmol) 50,6% de rendimiento. Punto de fusión: 135,8-137,8°C. Peso molecular = 398,1954 g/mol.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.93(m, 3H, 8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.33 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 3H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.35 (m, 6H, 8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.71 (h,  $^3J=6.7$  Hz, 2H, 8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.18 (q,  $^3J=6.7$  Hz, 2H, 8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.36 (q,  $^3J=7.3$  Hz, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.47 (s, 3H, 2- $\text{NCH}_3$ ), 3.75 (s, 3H, 4- $\text{NCH}_3$ ), 5.78 (s, 1H, 9-H), 5.93 (t,  $^3J=5.8$  Hz, 1H, 8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  12.06 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 13.99 (8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22.52 (8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 26.68 (8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 28.19 (8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 29.07 (2- $\text{NCH}_3$ ), 30.09 (4- $\text{NCH}_3$ ), 31.39 (8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 31.63 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 42.74 (8- $\text{MHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 100.40 (9), 106.14 (10b), 119.72 (6a), 147.97 (8), 149.98 (10a), 151.29 (3), 152.96 (4a), 158.81 (1), 169.82 (6), 180.04 (7), 180.96 (10).

**Compuesto 8:** 8-isopentilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (**8**)



En un balón de 50 mL se prepara una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **1** (103,0 mg; 0,34 mmol),  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5% mol de **1**) en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}=1:1$  (20 mL), se adiciona mediante goteo una solución de isopentilamina (50;2 mg; 0,58 mmol), disuelto en 10 mL EtOH. Una vez adicionada, se deja reaccionar por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 45 g de sílica gel (0,063 - 0,200 mm) utilizando fase móvil diclorometano:acetato de etilo=6:1 Se obtiene un sólido de color rojo burdeos (70,9 mg; 0,18 mmol), 53,7% de rendimiento. Punto de fusión: 153,7-155,0°C. Peso molecular = 384,1798 g/mol.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.98 (d,  $^3J=6.4$  Hz, 6H, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.34 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 3H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.60 (q,  $^3J=7.1$  Hz, 2H, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.73 (dt,  $^3J=12.9, 6.4$  Hz, 1H, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.20 (q,  $^3J=6.7$  Hz, 2H, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.36 (q,  $^3J=7.3$  Hz, 2H, 6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.48 (s, 3H, 2- $\text{NCH}_3$ ), 3.75 (s, 3H, 4- $\text{NCH}_3$ ), 5.79(s, 1H, 9-H), 5.91 (t,  $^3J=5.7$  Hz, 1H, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  12.06 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22.38 (s, 2C, 8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 25.94 (8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 29.07 (2- $\text{NCH}_3$ ), 30.10 (4- $\text{NCH}_3$ ), 31.64 (6- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 36.98 (8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 40.95 (8- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 100.39 (9), 106.14 (10b), 119.71 (6a), 147.95 (8), 149.99 (10a), 151.29 (3), 152.97 (4a), 158.82 (1), 169.84 (6), 180.02 (7), 180.99 (10).

# ESPECTROS

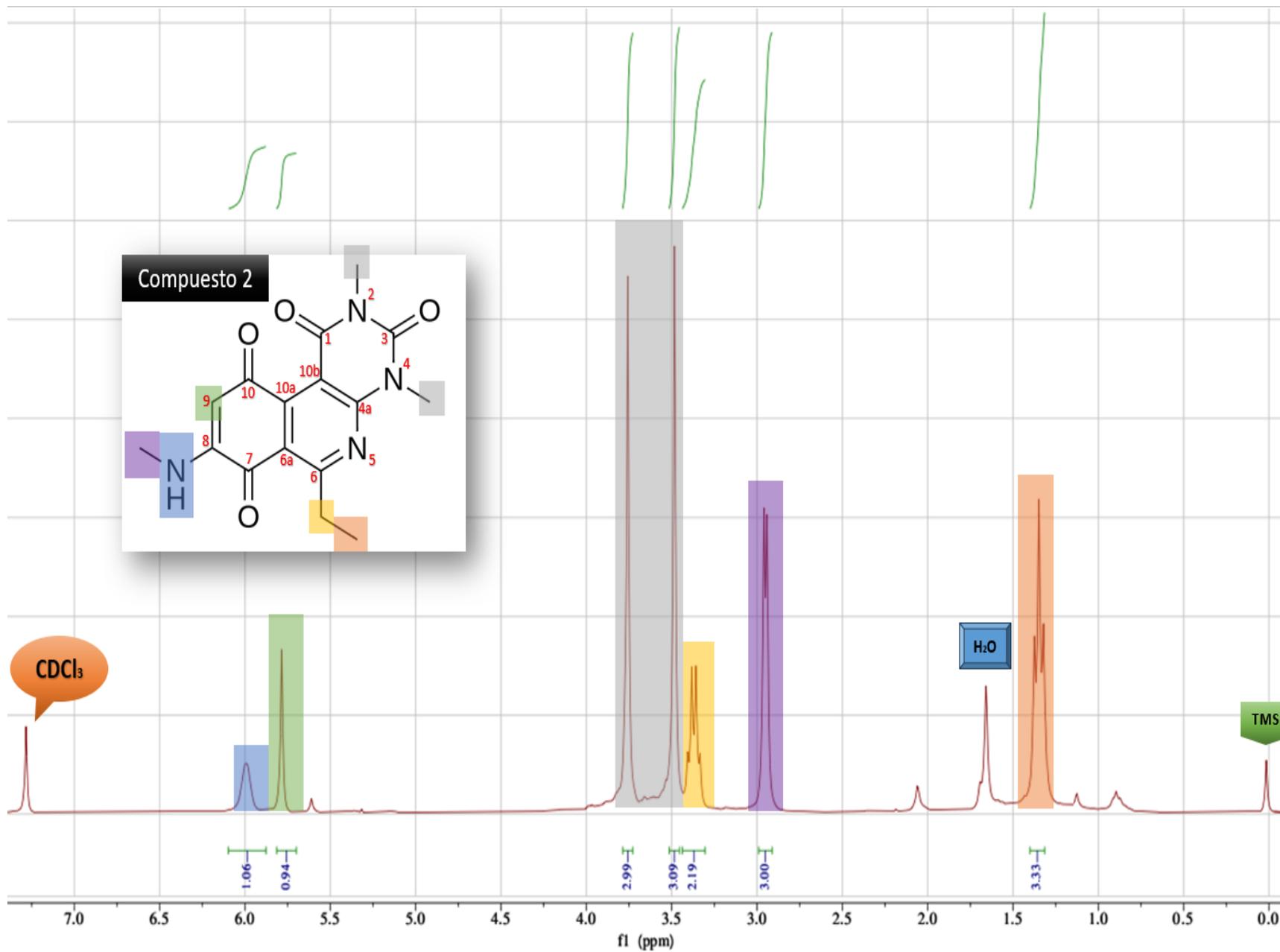


Figura 1A: Espectro <sup>1</sup>H RMN del compuesto 8-metilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (2).

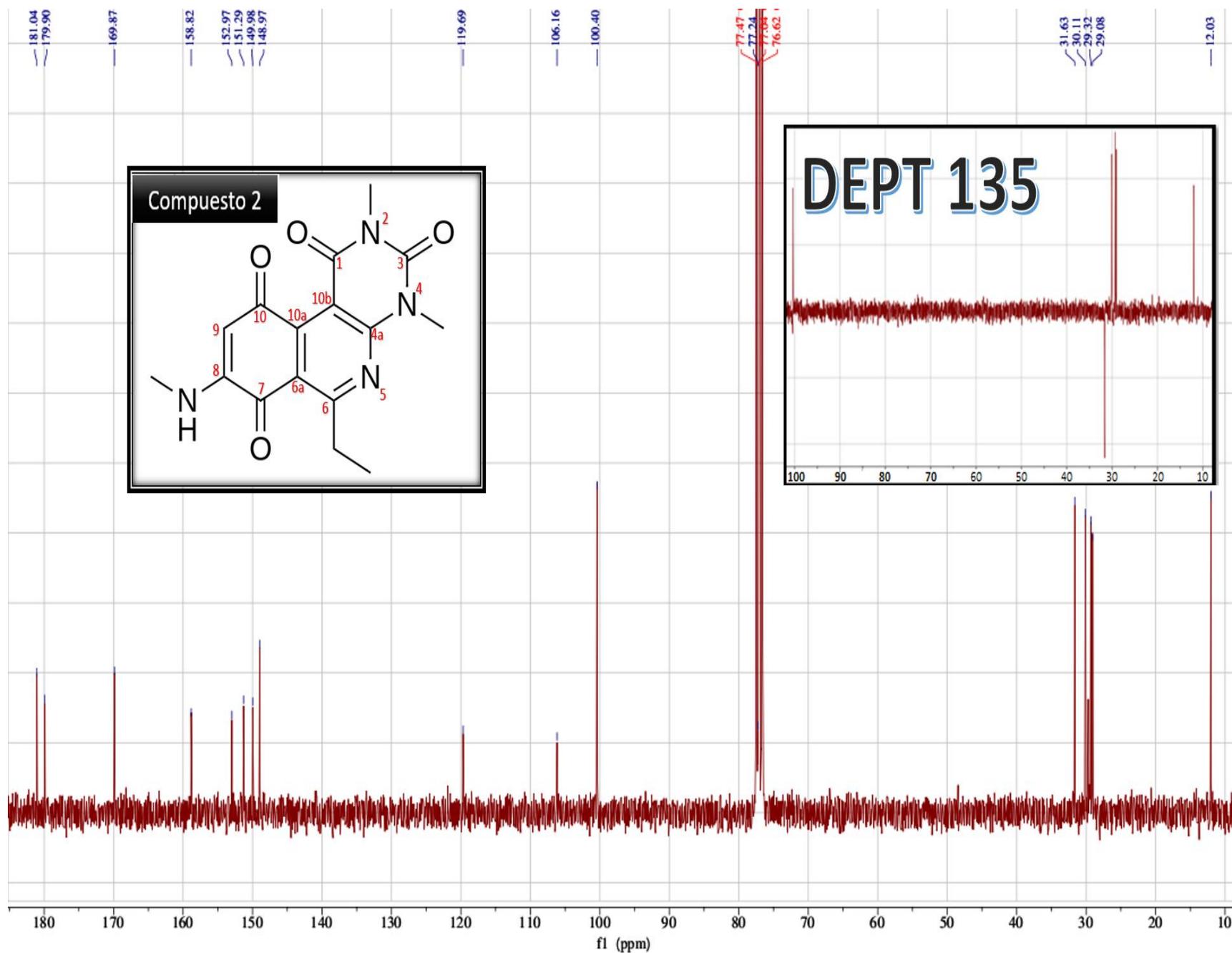


Figura 2A: Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT 135 del compuesto 8-metilamino-6-etil-2,4-dimetilpirido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (2).

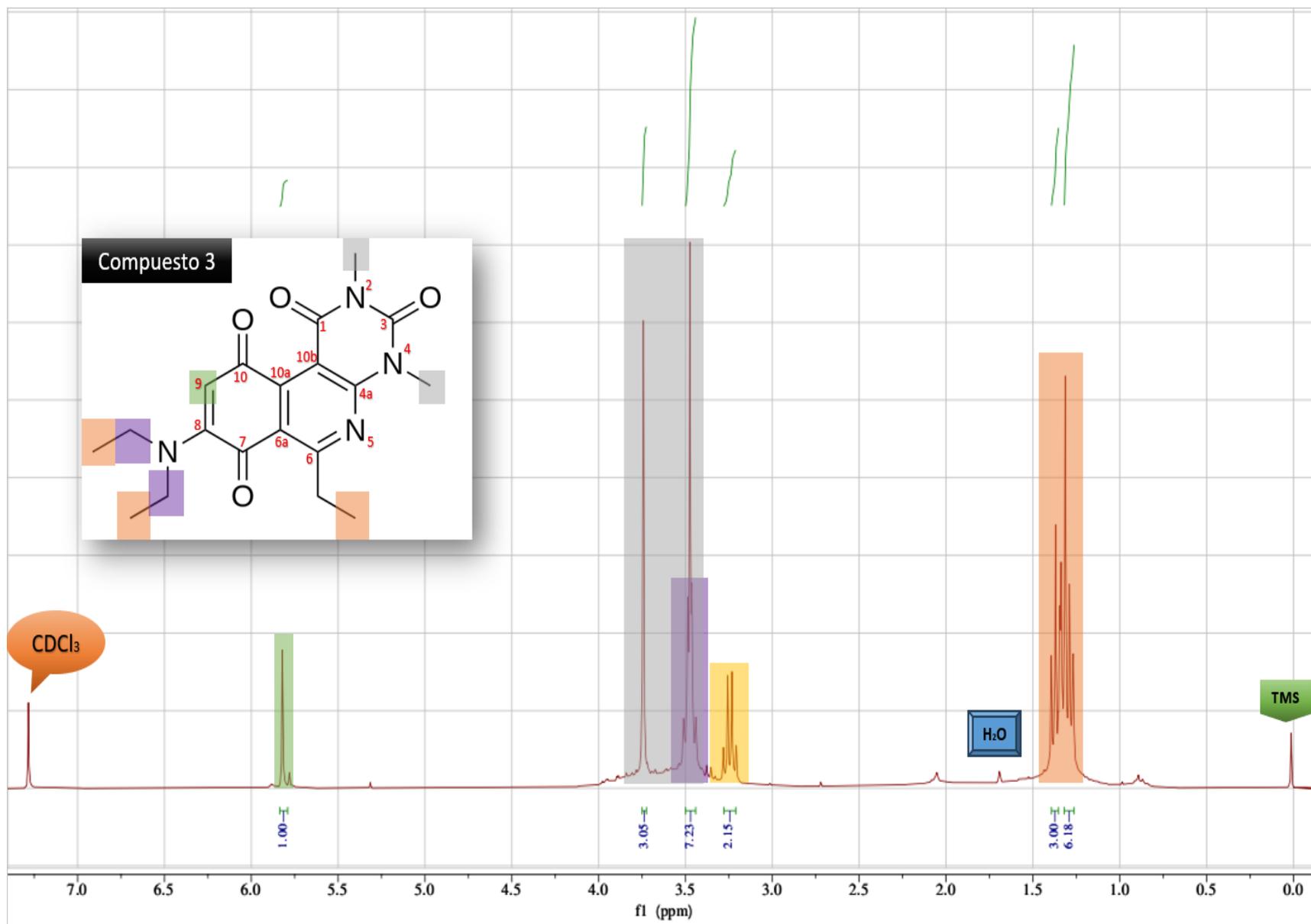


Figura 3A: Espectro <sup>1</sup>H RMN del compuesto 8-diethylamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (**3**).

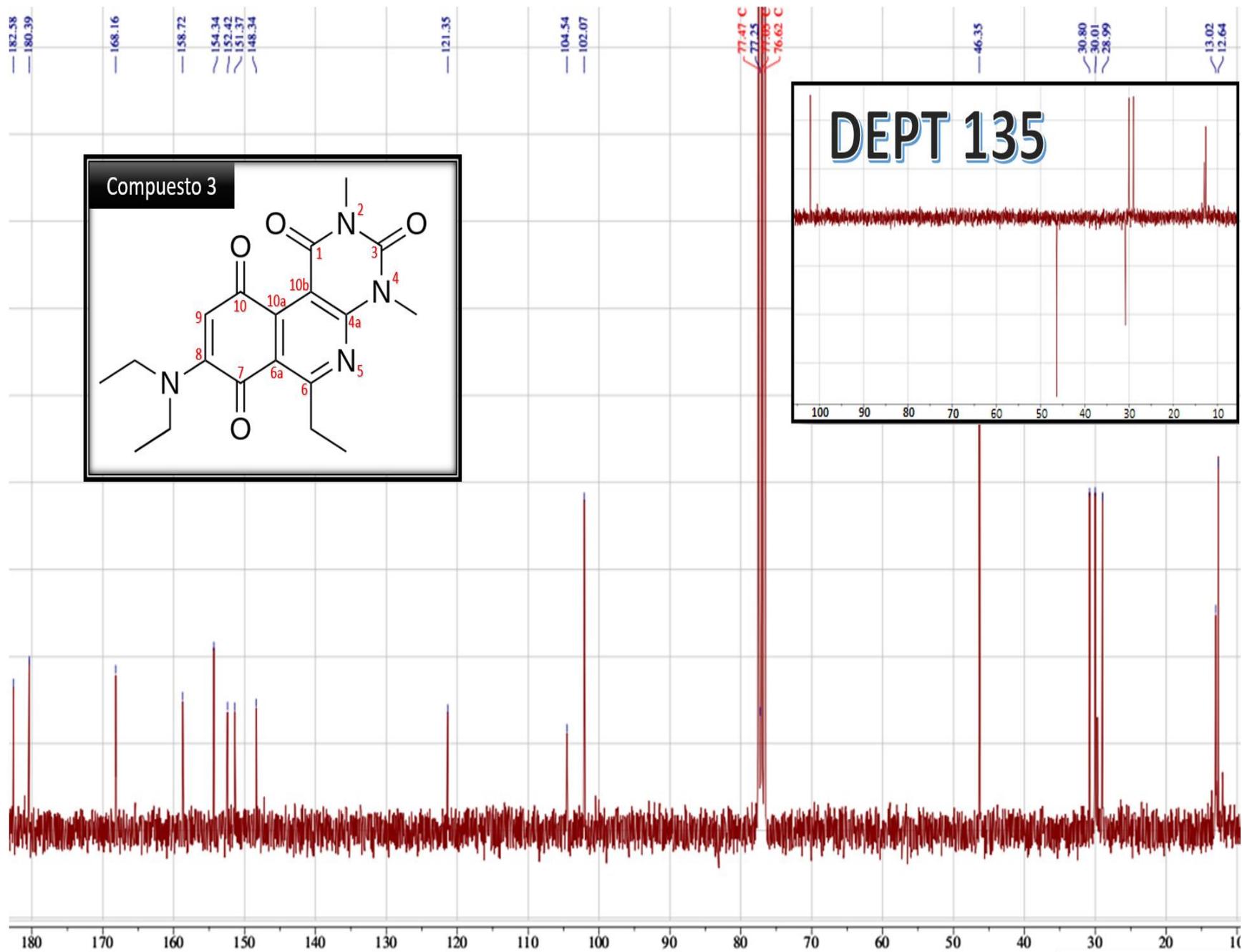


Figura 4A: Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT 135 del compuesto 8-dietilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (**3**).

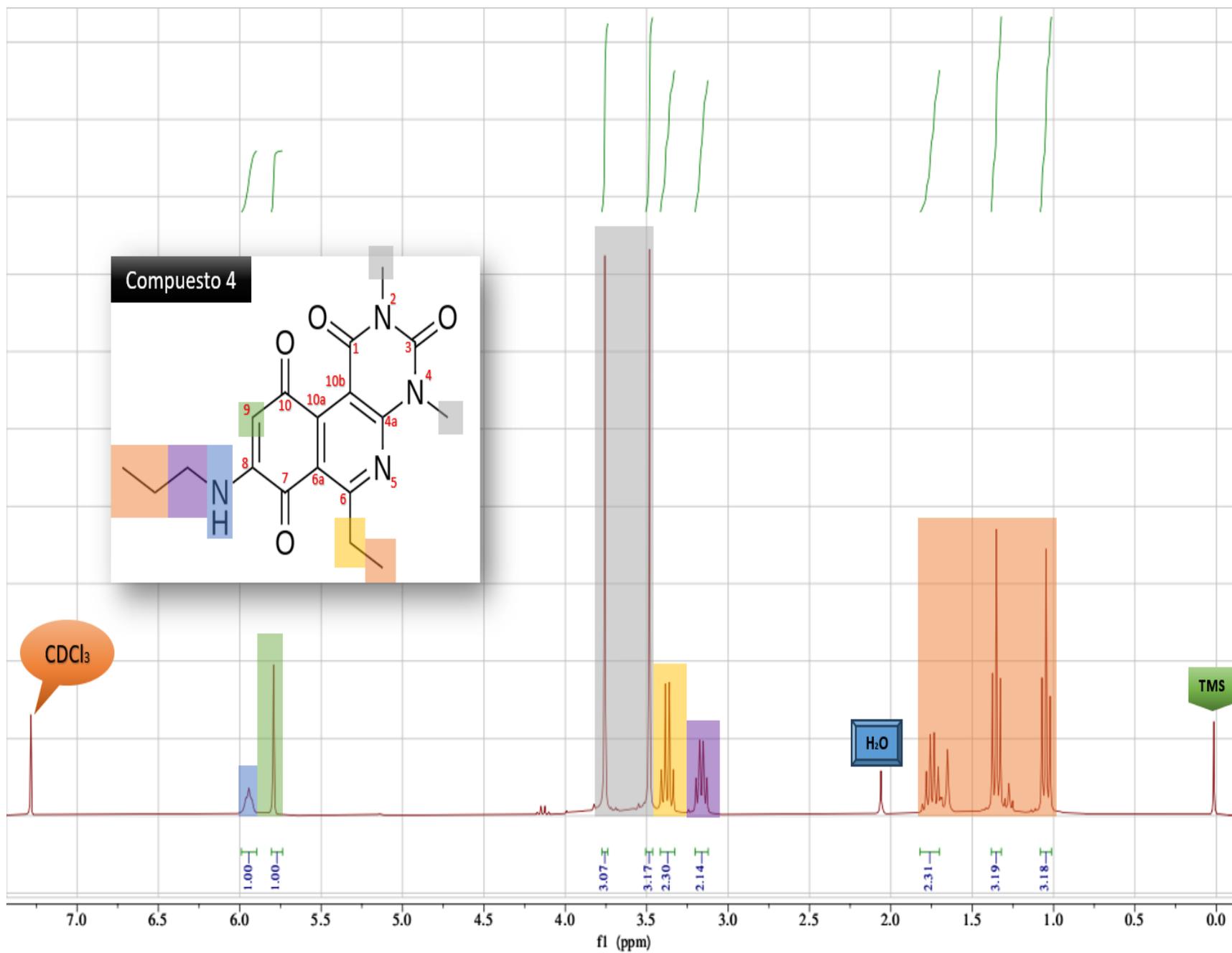


Figura 5A: Espectro <sup>1</sup>H RMN del compuesto 8-propilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (4).

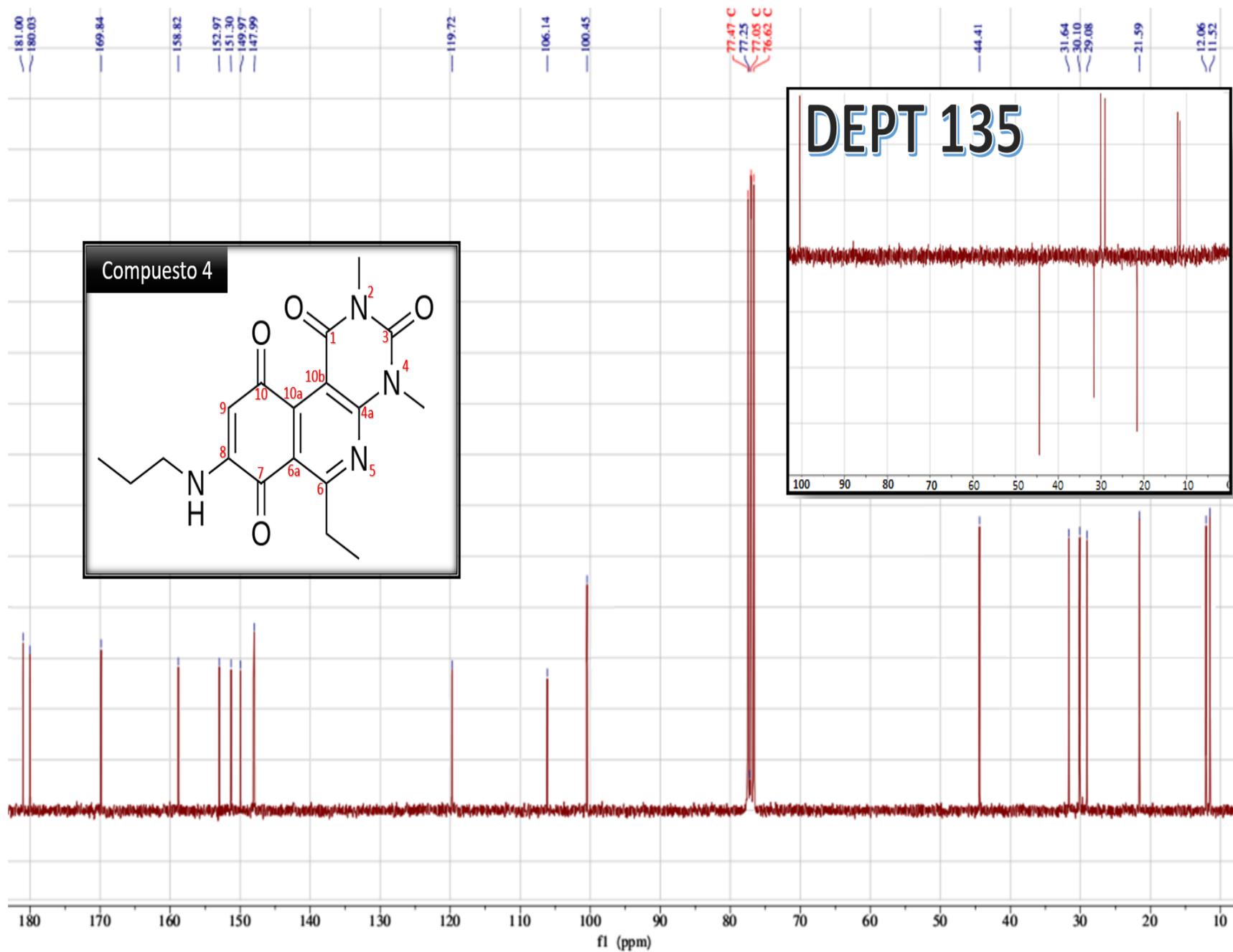


Figura 6A: Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT 135 del compuesto 8-propilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (4).

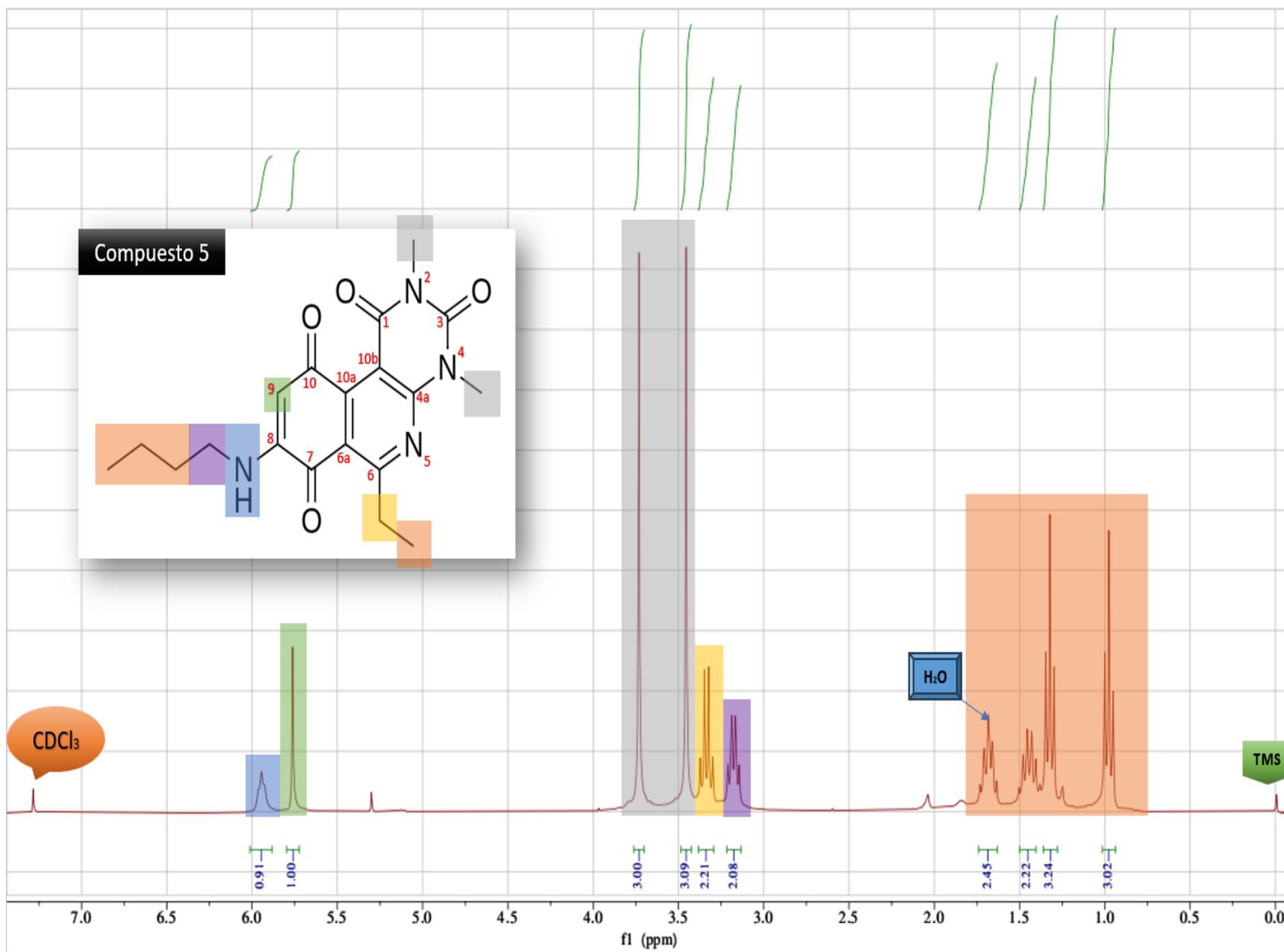


Figura 7A: Espectro <sup>1</sup>H RMN del compuesto 8-butilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (5).

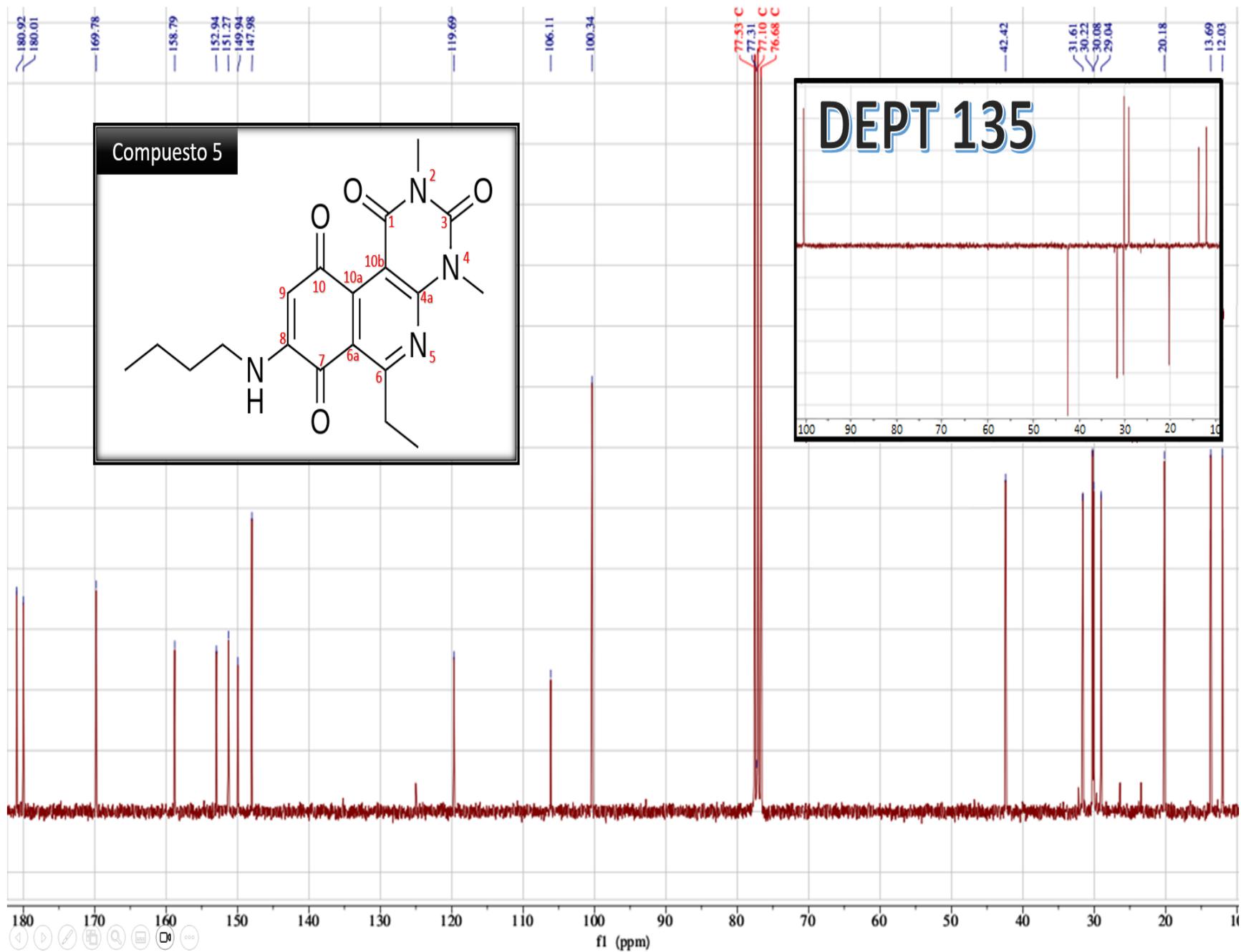


Figura 8A: Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT 135 del compuesto 8-butilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (5).

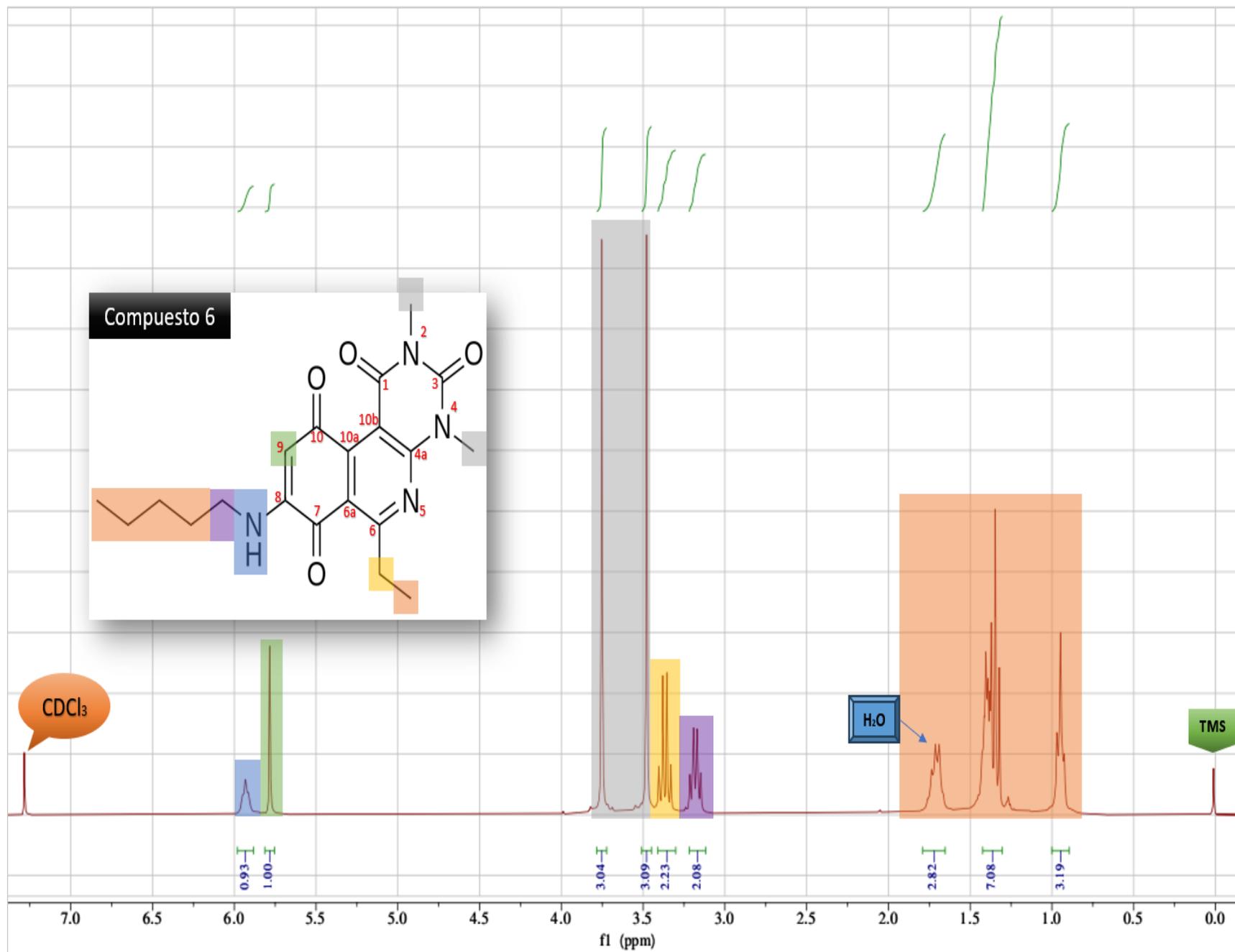


Figura 9A: Espectro <sup>1</sup>H RMN del compuesto 8-pentilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (6).

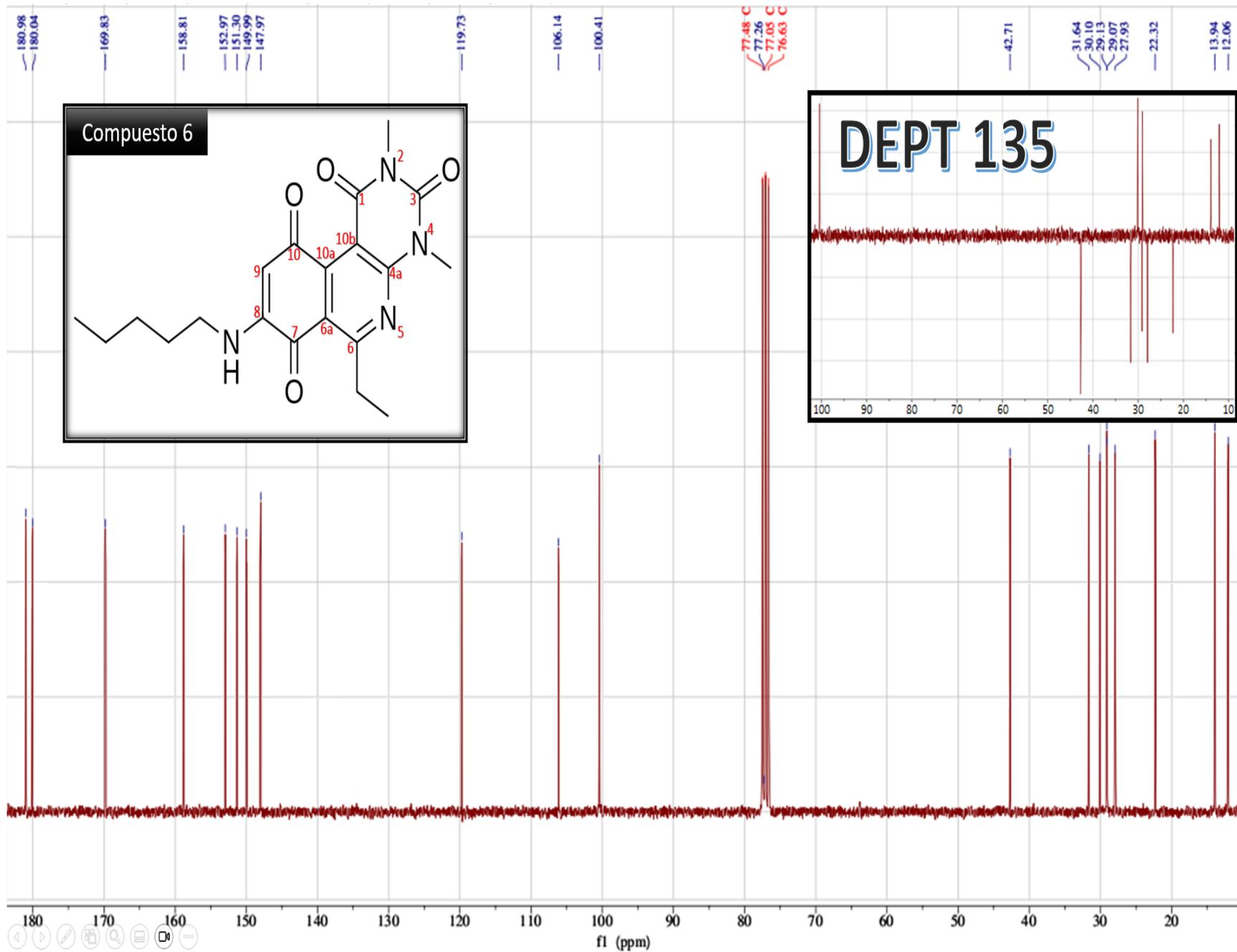


Figura 10A: Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT 135 del compuesto 8-pentilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (6).

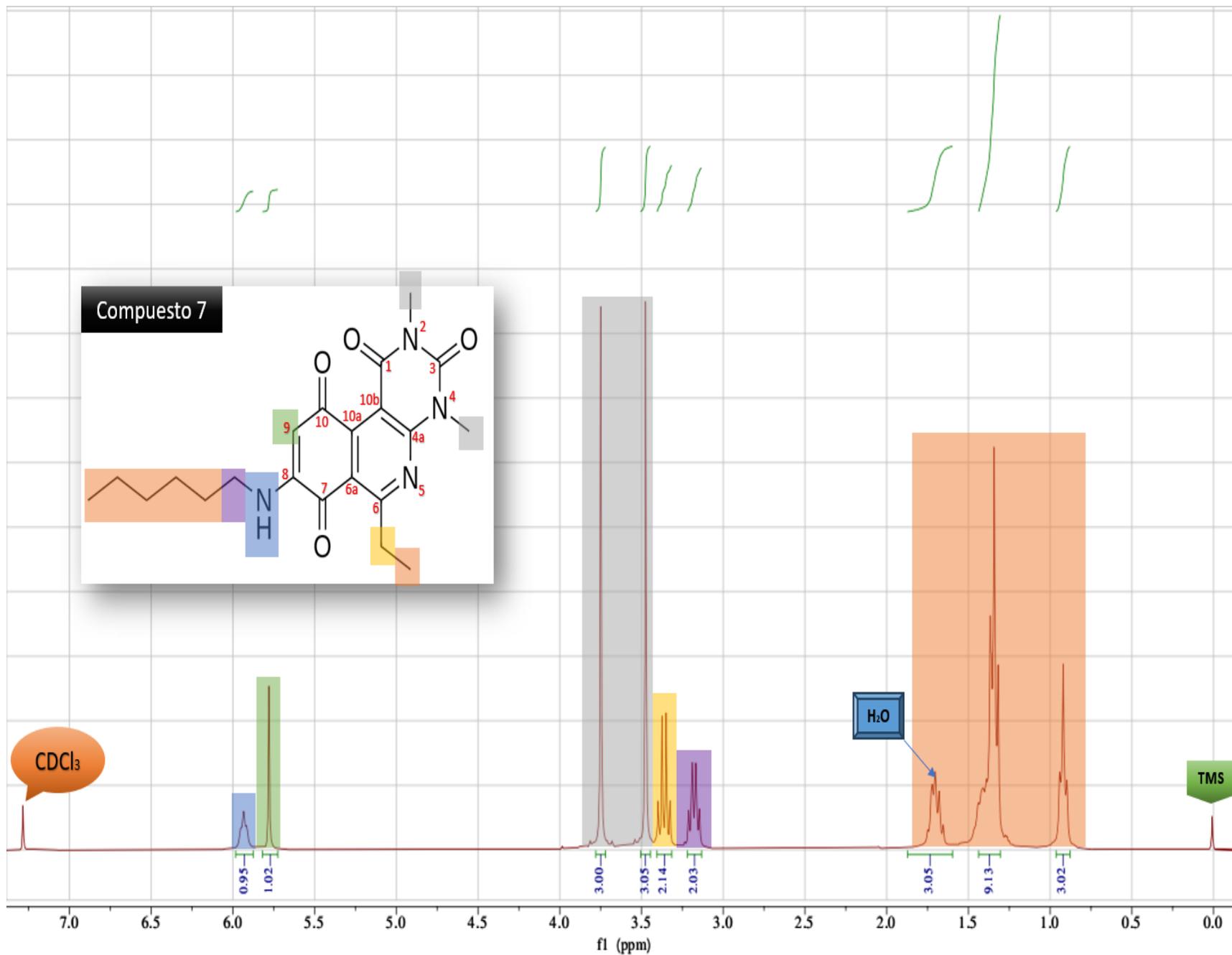


Figura 11A: Espectro <sup>1</sup>H RMN del compuesto 8-hexilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (7).

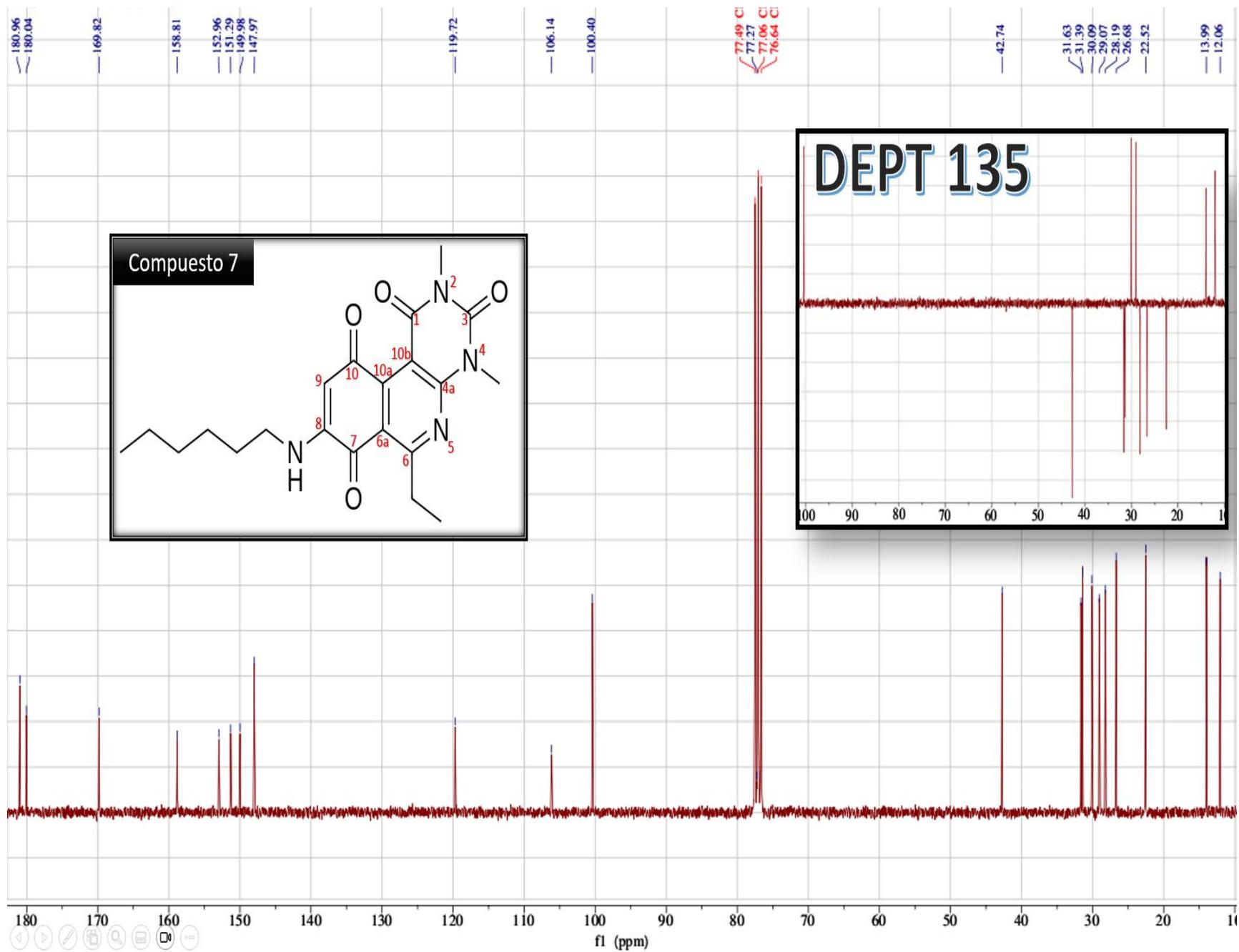


Figura 12A: Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT 135 del compuesto 8-hexilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (7).

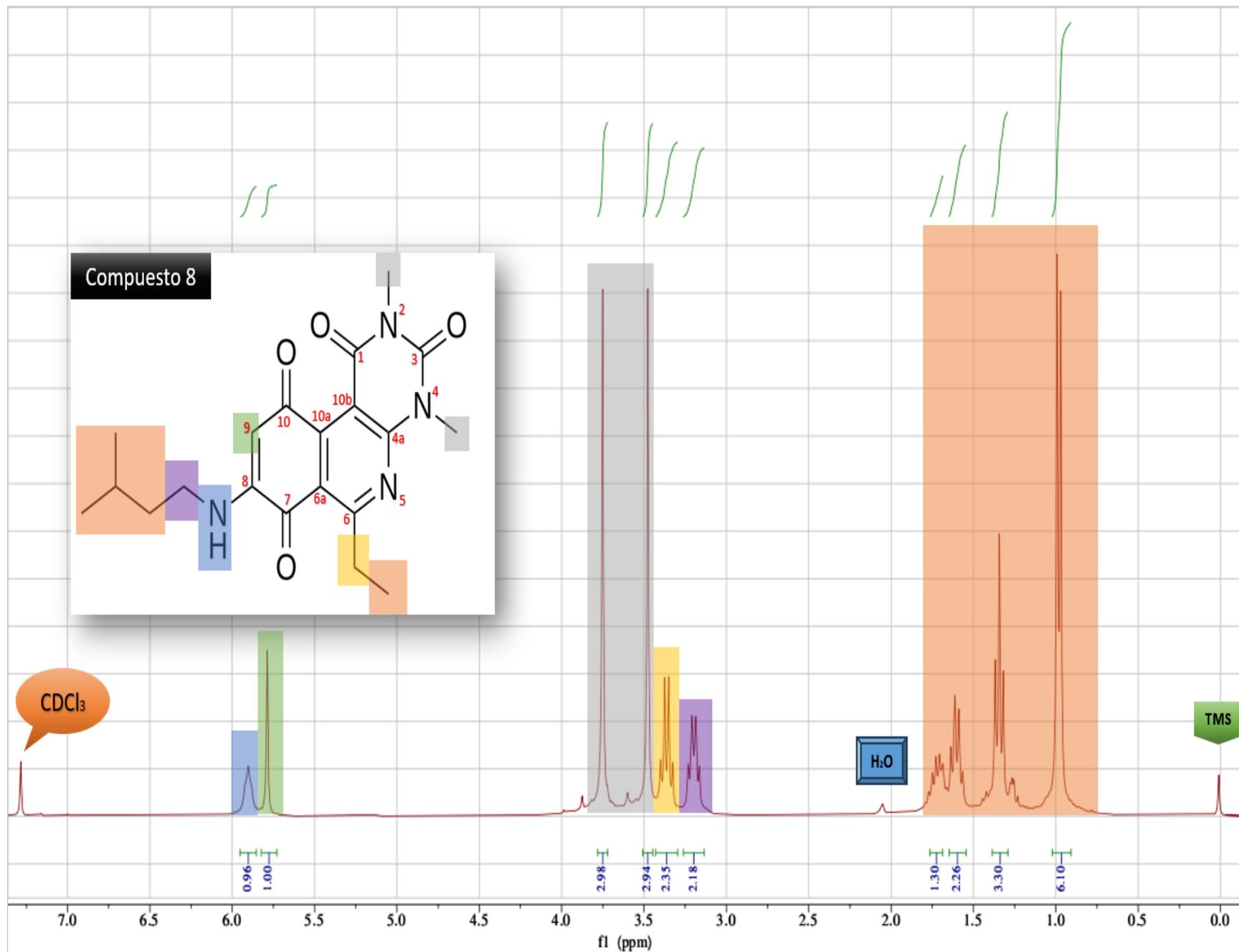


Figura 13A: Espectro <sup>1</sup>H RMN del compuesto 8-isopentilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (8).

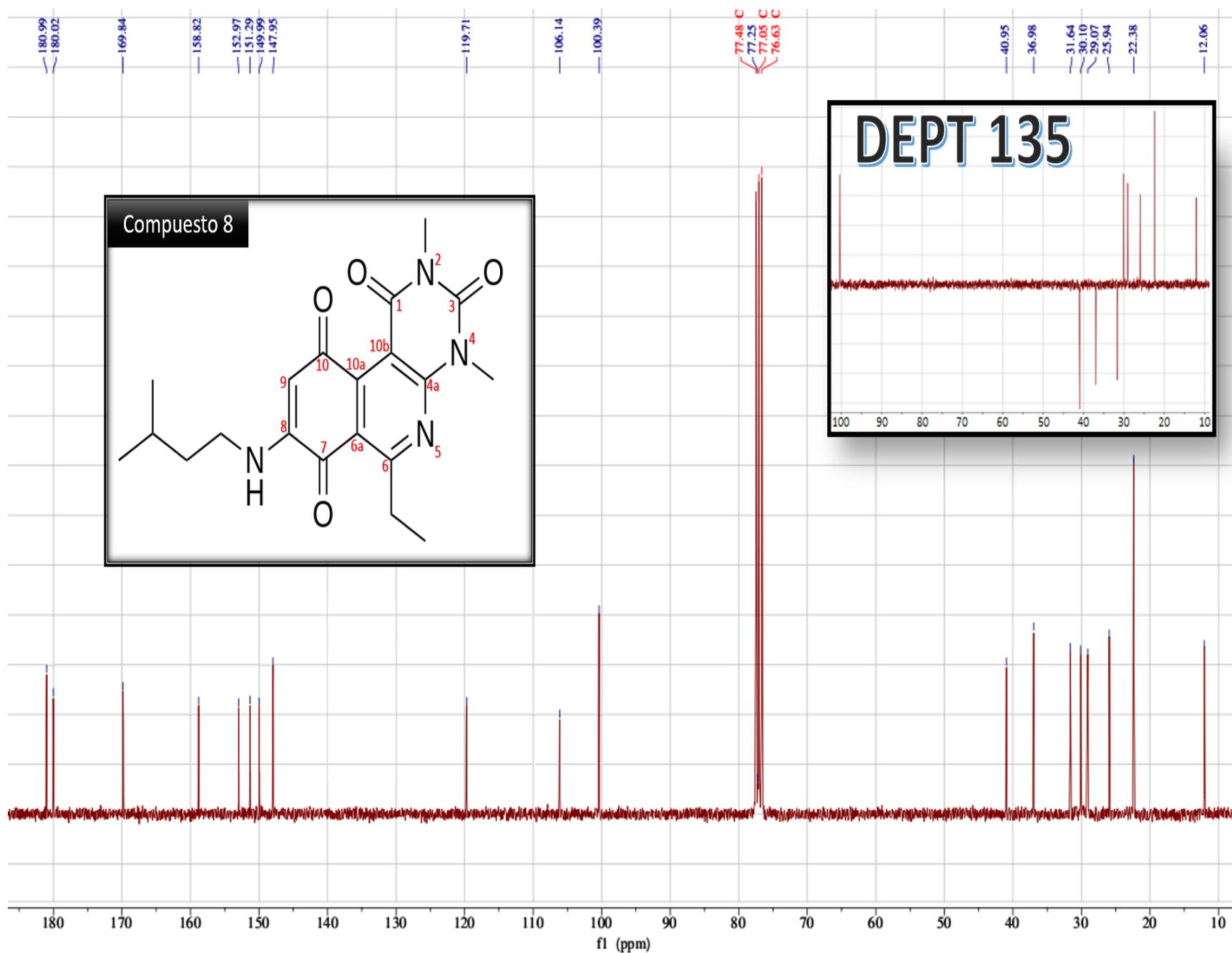


Figura 14A: Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT 135 del compuesto 8-isopentilamino-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (**8**).