

**CENTRO DE QUÍMICA BIOMOLECULAR
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**OBTENCIÓN DE NUEVAS CEFALOSPORINAS DERIVADAS
DE ÁCIDOS α,β INSATURADOS CON ACTIVIDAD FRENTE A
*STAPHYLOCOCCUS SPP.***

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas.

**Autor: MSc. Zalua Rodríguez Riera
Tutor: Dr. Miguel Antonio López López**

Ciudad de La Habana

2010

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Miguel López, por su ayuda y asesoría constante, por todo lo que me ha enseñado en los últimos 15 años de mi vida en que hemos compartido tareas científicas y una gran amistad. Por no dudar ni un instante de que con todo el trabajo experimental que habíamos realizado en esta temática, pudiera escribirse una tesis de doctorado y de mis capacidades para defenderlo con éxito. Saber que contaba con su absoluta confianza fue el mayor compromiso para llegar al final.

A Blanca Tolón, compañera de trabajo y amiga, por la ayuda incondicional, la gentileza y los conocimientos de química orgánica avanzada que siempre me ha brindado.

A Yoanna Álvarez, mi asesora en el estudio QSAR quien me enseñó con mucha paciencia y sencillez cada uno de los pasos necesarios para llegar al final. Por sus palabras de aliento, *”no te angusties más Zaluita que tú verás que con todos esos datos que tú tienes siempre vas a llegar a un buen modelito”*. Eran palabras mágicas que llenaban mi corazón de aliento y esperanza.

A Maritza González, con quien compartí durante varios años el trabajo experimental en esta temática y de quien aprendí sus primeras particularidades. Por su gran amistad de tantos años que en mi corazón permanece tan intacta como en sus mejores momentos.

A Vallín, Ileana, Leonora, Leonor, Loreta por la cooperación en los ensayos biológicos realizados.

A Herman Vélez, por su cooperación científica en todos estos años de trabajo, por el apoyo administrativo brindado como responsable del grupo de Análisis, a mi desempeño como Jefa del Departamento de Química del CQF. Por sus amplios conocimientos científicos, de arte y cultura en general. Cada conversación con él, es un viaje en la historia y en el tiempo.

A Ulises Jaureguí, amigo y compañero, catalizador fundamental, desde su posición como Vice-Director de Investigaciones del CQF, de que esta tarea se cumpliera con éxito. Por su amistad y confianza en mí para continuar, cuando las dudas y los temores me atormentaban.

A Alberto Núñez, por su apoyo como Director del CQF, a los proyectos de investigación relacionados con la obtención de cefalosporinas, aún cuando las condiciones económicas no eran las más favorables y por su ayuda en la búsqueda de apoyo internacional para su financiamiento.

A Armando Paneque, colega de estudios universitarios y amigo, por asumir en varias ocasiones la Jefatura del Departamento de Química del CQF, con su sonrisa característica, lo que me permitió concentrarme en la realización del trabajo experimental.

A Mayra y José, compañeros de causa en esta última etapa, por todas las sugerencias brindadas y todos los años de trabajo compartidos.

A Ariadna y Yuli por su amistad y por la ayuda que permitió alcanzar un diseño y una mayor estética en el trabajo

A mis compañeros del CQF Isabel, Miriam, Pellón, Taimirys, Osmell, Tony, Lisbet, Ritsie, Lauro, Amaro, Alain, Harilyn, Alién, Alexander, Marlén, Cary, René, Anais, Janet, Harold, Pablo, Alina, Estrada, Lidia, Emilia y Bertica por su cariño y sostén espiritual.

A todos los trabajadores del CQF, donde se desarrolló la parte experimental de este trabajo, por su cooperación desde cada uno de los departamentos de apoyo a la investigación.

A Ileana Filgueira y Gisela Castanedo por todos los trámites oficiales para la confección del expediente de doctorado, realizados de forma rápida y satisfactoria y por la asesoría brindada.

A Violeta Fernández, Vicedirectora del CQB por brindarme su apoyo personal y logístico en la fase final de este trabajo.

A Vicente Vérez, Director del CQB, por el apoyo brindado en estos dos últimos años de la tesis.

A mis nuevos colegas de trabajo Abel, Diamela, Maryeris, Yoanna, Majela y Mercedes por todo el interés y ayuda brindada.

A los oponentes de mi predefensa, la Dra. Julieta Coro y el Dr. Armando Cuellar por la revisión tan exhaustiva que hicieron al primer documento escrito, por sus valiosas sugerencias que jugaron un papel protagónico en esta última etapa del proceso.

A todos los profesores de la Facultad de Química en la UH que contribuyeron a mi formación como profesional y como máster. En especial a mi primer profesor de Química en la facultad el Dr. José Blanco Prieto y a mi primera profesora de Química Orgánica la Dra. Margarita Suarez.

Al Prof. Adamo Fini por toda su colaboración en la realización de este trabajo.

Al Prof. GianCarlo Cravotto y su equipo de trabajo por el apoyo brindado en la caracterización estructural de los compuestos y por la acogida que me brindó en su laboratorio.

A Rizette Ávila mi amiga ausente solo físicamente porque siempre esta aquí (en mi pensamiento y corazón) de quien aprendí los primeros “*recursos*” para este oficio de convertirme en doctora. Ya sé, que si tú le hubieras “*pasado la mano*” a mi presentación en “*Power Point*” hubiera quedado insuperable.

A Anailien Boza, amiga de muchos años, por estar siempre pendiente de mi doctorado desde cerca y lejos, por su cariño y por todos los años de alegría vividos.

A Julieta Coro, amiga muy cercana y querida, compañera de estudios universitarios. Tu perseverancia, gran disciplina y concentración para lograr tus metas, siempre han sido un ejemplo para mí. Gracias por tu apoyo, amistad y cariño en todos estos años.

A mi amiga Marquiza Sablón, por su humildad, por su cariño, por acercarme con tanto amor a la Química, por todos los años de estudio y trabajo compartidos.

A mi amiga la Dra. Mary Conchy por mantenerme con la salud en buenas condiciones, por brindarme toda la fuerza espiritual, la confianza en mí y el cariño necesario para llegar al final de este viaje.

A mi vecina Chavela y su lavadora automática que con tanta gentileza me recibieron en estos últimos meses, lo que me ahorró mucho tiempo y esfuerzo que puede dedicar a la tesis. Juro, que cuando sea grande y gane dinero me compraré una igual.

A mi linda hermana Layla, siempre pendiente de mí y los míos con tanto amor y dulzura.

A mi tía Lourdes, una mujer especial en mi corazón, por todo su amor incondicional.

A mi mamá querida a quien dedicar esta tesis es bastante poco comparado con todo el amor, la comprensión y el apoyo infinito que siempre me ha brindado en todas las esferas de mi vida.

A mi amado hijo Ernesto que lleva dentro de sí lo mejor de mí, por ser el hijo que es, por soportar con paciencia mis días de madre “*superexigente*”, por todo su apoyo y tolerancia, a quien dedico esta tesis no para que siga mi ejemplo, pues no es mi interés que sea mejor que yo, solamente que “sea” y siempre para bien suyo.

A todos los que de una forma u otra colaboraron con este trabajo,

MUCHAS GRACIAS.

A mi mamá querida

A mi amado hijo

*No es la inteligencia recibida y casual lo que da al hombre honor,
sino el modo con que la usa y la salva.*

José Martí

Publicaciones y eventos científicos relacionados con la tesis

Publicaciones

1. M. A. López, **Z. Rodríguez**, M. González, B. Tolón, R. Avila, I. González, L. Garmendía, T. Mamposo, R. Carrasco, R. Pellón, H. Vélez and A. Fini. Novel Cephalosporin Derivatives Possessing a Substituted Cinnamoyl Moiety at the 7 β -Position. Synthesis, Structural Characterization and Antibacterial Activity of 3-Acetoxymethyl Cephalosporin Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 657-664, (2004)
2. M. A. López, **Z. Rodríguez**, M. González, B. Tolón, R. Avila, T. Mamposo, R. Carrasco, H. Vélez and A. Fini. ¹H and ¹³C spectral assignments of 7 β -(cinnamoyl-substituted)amino-3-acetoxymethyl-cephalosporins. *Magnetic Resonance in Chemistry* 43(3), 261-263, (2005).
3. **Z. Rodríguez**, M. A. López, M. González, B. Tolón, , L. Nadal, L. González, H. Vélez, A. Fini. Synthesis, structural characterization and antibacterial activity of novel 7 β -{[3-(substituted phenyl)-2-propenoyl]amino}-3-[(2,5-dihydro-6-hydroxy-2-methyl)-5-oxo-cis-triazin-3-yl]-thiomethyl-cefalosporins. *Medicinal Chemistry*, 5(3), 283-292, (2009).

Eventos

- 1) XXVII CLAQ y VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, Cuba, (2006).
 - Síntesis, caracterización estructural y determinación de la actividad antibacteriana in vitro de nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos 3-fenil-2-propenoicos sustituidos. **Z. Rodríguez**, B. Tolón, M. A. López, M. González, L. González, L. Nadal, A. Fernández, H. Vélez y A. Fini.
- 2) III Simposio Internacional de Química, Cuba, (2007).
 - Obtención y caracterización estructural y determinación de la actividad antibacteriana in vitro de nuevas 7ACT cefalosporinas derivadas de ácidos 3-fenil-2-propenoicos sustituidos. **Zalua Rodríguez**, Miguel A. López, Blanca Tolón, Maritza González, Loreta Nadal, Leonora González, Anais Fernández y Hermán Vélez-Castro.
- 3) 3rd International Congress of Pharmacology and Therapeutics. Pharmacology, Havana, (2007).
 - Obtención de nuevas cefalosporinas activas frente a gérmenes gram positivos. **Zalua Rodríguez**, Miguel A. López, Maritza González, Blanca Tolón, Loreta Nadal, Leonora González, Anais Fernández y Hermán Vélez.
- 4) VII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química. I Congreso Iberoamericano de Química, Bioquímica e Ingeniería Química, Cuba, (2009).
 - Síntesis y caracterización de nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos α , β insaturados con actividad selectiva frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. **Zalua Rodríguez**, Miguel A. López, Blanca Tolón, Maritza González, Leonora González y Hermán Vélez.

SINTESIS

Las cefalosporinas son los antibióticos más utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas por su amplio espectro de acción, buenas propiedades farmacocinéticas y baja toxicidad. En la actualidad, las bacterias del género *Staphylococcus spp.* (agentes etiológicos de patologías muy severas y diversas) han incrementado su resistencia frente a la acción de numerosos antimicrobianos. La búsqueda de nuevas cefalosporinas efectivas contra estas bacterias es una línea de investigación actual. Por esta razón se propone como hipótesis de trabajo que nuevas cefalosporinas derivadas de diferentes ácidos α,β insaturados portadores de sistemas aromáticos, tienen actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus spp.* Para demostrar esta hipótesis se trazó como objetivo general obtener nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos α,β insaturados y evaluar sus propiedades antibacterianas “*in vitro*” frente a cepas de *Staphylococcus spp.* Como resultado se sintetizaron 51 nuevos compuestos de este tipo cuya estructura fue confirmada por RMN y Espectrometría de Masas y de los cuales 16 exhibieron una Concentración Mínima Inhibitoria “*in vitro*” igual o inferior a 2 $\mu\text{g/mL}$ frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo sensibles a meticilina, aunque ninguno puede considerarse efectivo frente a cepas resistentes de estas bacterias. Además, a partir de los datos experimentales se obtuvo un modelo matemático lineal predictivo de relación estructura química-actividad biológica para este tipo de cefalosporinas frente a cepas de *Staphylococcus spp.* sensibles a meticilina, que posibilitará orientar el trabajo químico-sintético encaminado hacia la búsqueda de compuestos más potentes. Todos estos resultados no solo implican un aporte novedoso al conocimiento científico, sino que además pueden constituir el punto de partida para la aplicación futura de este tipo de cefalosporinas en la terapia anti-infecciosa contra estos gérmenes patógenos.

Abreviaturas y siglas

7-ACA	Ácido 7 β -amino-3-acetoximetil-3-cefem-4-carboxílico
7-ACT	Ácido 7 β -amino-3-[(2,5dihidro-6-hidroxi-2-metilo)-5-oxo-cis-triazin-3-il]tiometil-3-cefem-4-carboxílico
AC	Análisis de conglomerados o <i>clusters</i>
AcOEt	Acetato de etilo
ASA	Área superficial aproximada
ASG	Área superficial de la rejilla
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)acetamida
CCD	Cromatografía de capa delgada
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DMA	<i>N,N</i> -dimetilacetamida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EDCI	Hidrocloreuro de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilcarbodiimida
EM	Espectrometría de masa
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electrospray)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
Log P	Coefficiente de partición octanol/ agua
m/z	Relación masa/ carga
MeOH	Metanol
MM	Mecánica Molecular
PBP_s	<i>Protein Binding Penicillin</i> (Proteínas ligadoras de penicilinas)
PPR	Penicilinas penicilinasas resistentes
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
QC	Química Cuántica
QSAR	<i>Quantitative Structure Activity Relationships</i> (Relación estructura actividad).
RLM	Regresión lineal múltiple
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SaRM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SaRV	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
SaSM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
SCoNRM	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo resistente a meticilina
SCoNSM	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo sensible a meticilina
SeRM	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente a meticilina
SaRV	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMSA	Trimetilsilacetamida

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 GENERALIDADES	5
2.2 CLASIFICACIÓN DE LAS CEFALOSPORINAS	6
2.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS CEFALOSPORINAS	9
2.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS FRENTE A LA ACCIÓN DE LAS CEFALOSPORINAS	10
2.5 RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	11
2.6 PRINCIPALES PROBLEMAS QUE ENFRENTA LA TERAPIA ANTI-INFECCIOSA FRENTE A STAPHYLOCOCCUS SPP EN LA ACTUALIDAD. NUEVAS CEFALOSPORINAS EN ESTUDIO.....	17
2.7 MÉTODOS DE SÍNTESIS.....	22
2.8. ESTUDIOS DE MODELACIÓN MOLECULAR EN CEFALOSPORINAS.....	28
2.9 CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO.....	30
3. MATERIALES Y METODOS	32
3.1 REACTIVOS Y DISOLVENTES UTILIZADOS.....	32
3.2 MÉTODOS GENERALES.	33
3.3 PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS.	34
3.4 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS CEFALOSPORINAS SINTETIZADAS. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).....	43
3.5 ESTUDIO QSAR A PARTIR DE CEFALOSPORINAS DERIVADAS DEL 7-ACA Y DEL 7-ACT CON DIFERENTES ÁCIDOS α,β INSATURADOS.	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1 ÁCIDOS CARBOXÍLICOS α,β INSATURADOS.	47
4.2 SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN “ <i>IN VITRO</i> ” DE LAS NUEVAS CEFALOSPORINAS DERIVADAS DEL 7-ACA Y DIFERENTES ÁCIDOS α,β INSATURADOS	60
4.3 SÍNTESIS DE NUEVAS CEFALOSPORINAS DERIVADAS DEL 7-ACT Y DIFERENTES ÁCIDOS (2E)-3-(FENIL)ACRÍLICOS SUSTITUIDOS (COMPUESTOS 68-85).	86
4.4 DESARROLLO DE UN MODELO QSAR PARA CEFALOSPORINAS DERIVADAS DE DIFERENTES ÁCIDOS α,β INSATURADOS.	98
4.5 PREDICCIÓN DE LA CMI DE DIFERENTES COMPUESTOS MEDIANTE EL MODELO QSAR ESTABLECIDO.	109
4.6 SÍNTESIS DE NUEVAS CEFALOSPORINAS A PARTIR DE NÚCLEOS CEFALOSPORÁNICOS MODIFICADOS EN LA POSICIÓN C-3 (COMPUESTOS 89-94).....	112
4.7 CONSIDERACIONES GENERALES DE LA DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	118
5. CONCLUSIONES	122
6. RECOMENDACIONES	124
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	125

1. INTRODUCCIÓN

Las cefalosporinas son el grupo de antibióticos más utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Su importancia radica en la combinación de una potente acción bactericida y un amplio espectro de acción, con buenas propiedades farmacocinéticas y una baja toxicidad.

Las bacterias del género *Staphylococcus spp.* son los agentes etiológicos de patologías muy severas y diversas tales como, infecciones de la piel y los tejidos blandos, vías respiratorias, sistema nervioso central, tracto genitourinario, otitis, osteomielitis y artritis.

En la actualidad, se manifiesta la proliferación de bacterias de este género multiresistentes a la acción de numerosos antimicrobianos tales como el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SaRM) que clasifica como “supermicrobio”. Este fenómeno ha hecho impostergable la necesidad de disponer de nuevos antibióticos con actividad antimicrobiana selectiva frente a estas bacterias.

La búsqueda de nuevas cefalosporinas efectivas contra estas bacterias patógenas es una línea de investigación actual debido a las ventajas terapéuticas y perfil de seguridad de esta familia de antibióticos. Así el primer antibiótico β -lactámico con actividad bacteriana frente a SaRM es una cefalosporina, denominada ceftobiprol medocaril introducida en el mercado durante el 2008, mientras que otras cefalosporinas como la ceftarolina fosamil y las denominadas *BMS-247243* y *RWJ-54428* se encuentran en diferentes fases de ensayo clínico.

Por otra parte, el uso indiscriminado de estos antibióticos en la práctica médica dadas sus ventajas terapéuticas, ha provocado el incremento de cepas antes sensibles a la acción de las cefalosporinas comerciales, que resurgen como resistentes. Por esta razón, se hace necesario encontrar nuevos compuestos activos que puedan constituir una futura alternativa al arsenal terapéutico existente.

Los antecedentes de este trabajo se basan en una tesis de doctorado¹ donde se obtienen varias cefalosporinas derivadas de ácidos (2E)-3-(3-fenil)acrílicos sustituidos con acción selectiva frente a bacterias Gram positivas, algunas de las cuales desplegaron una actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus spp.* próxima a la cefazolina. Debido a los resultados alcanzados así como a la relativa poca complejidad de la estructura y procedimientos de preparación de estos compuestos, en este estudio se recomienda ampliar la gama de modificaciones estructurales, con la introducción de nuevos sustituyentes en el grupo fenilo, la obtención de nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos α,β insaturados portadores de otros sistemas aromáticos y realizar la evaluación “*in vitro*” de todos los compuestos con el objetivo de buscar nuevos derivados más efectivos frente a cepas de *Staphylococcus spp.*

Por todo lo anterior se plantea el siguiente **problema científico**:

Es posible obtener mediante síntesis química nuevas cefalosporinas derivadas de diferentes ácidos α,β insaturados portadores de sistemas aromáticos, con actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus spp.*

En consideración a lo anterior se asume la siguiente **hipótesis de trabajo**:

Nuevas cefalosporinas derivadas de diferentes ácidos α,β insaturados portadores de sistemas aromáticos, tienen actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus spp.*

Para dar respuesta al problema científico planteado y demostrar la hipótesis anterior se propone como **objetivo general**:

Obtener nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos α,β insaturados y evaluar sus propiedades antibacterianas “*in vitro*” frente a cepas de *Staphylococcus spp.*

Para alcanzar este objetivo general se trazaron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Sintetizar diferentes ácidos α,β insaturados portadores de sistemas aromáticos en su estructura como intermedios para la preparación de nuevas cefalosporinas.
2. Sintetizar nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos α,β insaturados portadores de sistemas aromáticos en su estructura y de núcleos cefalosporánicos con diferentes sustituyentes en la posición C-3.
3. Realizar la caracterización estructural de los compuestos obtenidos mediante la combinación de las técnicas espectroscópicas de RMN y EM.
4. Determinar las propiedades antibacterianas “*in vitro*” de las cefalosporinas obtenidas frente a cepas bacterianas pertenecientes al género *Staphylococcus spp.*
5. Obtener un modelo lineal predictivo de relación estructura química-actividad biológica para este tipo de cefalosporinas frente a cepas de *Staphylococcus spp.* sensibles a meticilina.

La **Novedad científica** de este trabajo se centra en los siguientes aspectos:

- Se sintetizaron un total de 51 nuevas cefalosporinas, derivadas de diferentes ácidos α,β insaturados portadores de sistemas aromáticos en su estructura, no descritas con anterioridad en la literatura científica a nivel mundial.
- Se obtuvo una cartoteca con los datos espectroscópicos de todas las nuevas cefalosporinas obtenidas, a partir de diferentes ácidos α,β insaturados.
- Se evaluaron las propiedades antibacterianas de las cefalosporinas obtenidas frente a cepas del género *Staphylococcus spp* y se demostró que 16 compuestos tienen actividad frente a cepas de *Staphylococcus* sensibles a meticilina, hecho que los convierte en candidatos promisorios para la terapia anti-infecciosa.

- Se estableció por vez primera un modelo QSAR lineal predictivo capaz de correlacionar la estructura química con la actividad biológica, para una serie de cefalosporinas derivadas de ácidos α,β insaturados. Este resultado constituye una herramienta muy eficaz que posibilitará orientar el trabajo químico-sintético encaminado hacia la síntesis racional de compuestos de este tipo.

Los resultados de la síntesis, caracterización estructural y determinación de las propiedades antibacterianas “*in vitro*” de estas cefalosporinas han formado parte de tres artículos científicos publicados en revistas de impacto y han sido presentados en varios congresos internacionales.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades.

Las cefalosporinas se consideran agentes de primera línea en situaciones clínicas variadas como infecciones cutáneas y de partes blandas, septicemia intrabdominal, infecciones del pie diabético, meningitis aguda, neumonía, endocarditis y en la profilaxis de la cirugía cardiorácica, ortopédica, abdominal y pélvica.²

La era de los antibióticos cefalosporánicos comienza en el año 1945 con el aislamiento de la cefalosporina C (**Figura 1**) del hongo *Cephalosporium acremonium*. La identificación del 7-ACA (**Figura 2**) como núcleo de la cefalosporina C y el desarrollo de métodos factibles para su obtención a gran escala, propicia la síntesis de numerosas cefalosporinas con propiedades antibacterianas y espectro de actividad mayores que la de origen natural.^{3,4}

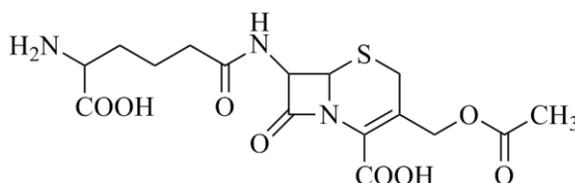


Figura 1. Estructura química de la cefalosporina C.

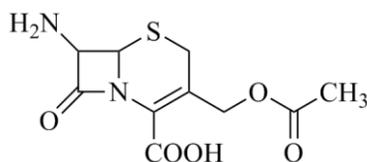


Figura 2. Estructura química del 7-ACA.

La estructura química básica de las cefalosporinas consiste en un sistema β -lactámico acoplado a un anillo de dihidrotiazina que en su conjunto se denomina núcleo cefem (**Figura 3**). La introducción de diferentes sustituyentes, fundamentalmente en las posiciones 3 (R_3) y 7 (R_7) de

dicho núcleo, posibilita obtener una amplia gama de cefalosporinas con diferente espectro antimicrobiano, propiedades farmacocinéticas y grado de estabilidad química.⁵

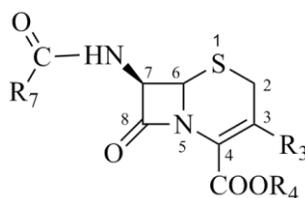


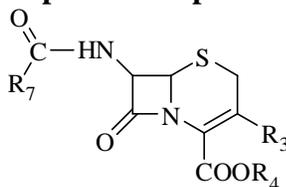
Figura 3. Estructura básica de las cefalosporinas.

2.2 Clasificación de las cefalosporinas.

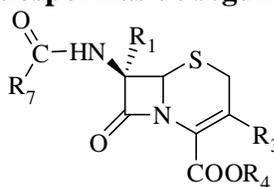
Con relación a la clasificación de las cefalosporinas, la más utilizada (desde el punto de vista clínico) agrupa a estos compuestos en "generaciones" sobre la base del espectro de actividad frente a diferentes gérmenes y su desarrollo histórico.⁶

Las cefalosporinas de primera generación o de espectro reducido (**Tabla I**) son las más activas frente a las bacterias Gram positivas. Las de segunda generación o de espectro expandido (**Tabla II**) tienen menor actividad frente a *Staphylococcus spp.* sensible a meticilina, pero son más efectivas frente a bacterias Gram negativas. Las cefamicinas, compuestos con un grupo metoxi en la posición C-7 α del núcleo cefem, se clasifican dentro de esta generación.⁶

Tabla I. Cefalosporinas de primera generación.



Nombre genérico	Nombre comercial	R ₇	R ₃	R ₄
Cefazolina	Ancef, Kefzol			Na
Cefalotina	Keflin			Na
Cefapirina	Cefadyl			Na

Tabla II. Cefalosporinas de segunda generación.

Nombre genérico	Nombre comercial	R ₇	R ₃	R ₁
Cefuroxima	Ceftin			H
Cefamandol	Mandol			H
Cefoxitina*	Mefoxin			OCH ₃
Cefotetan*	Cefotan			OCH ₃
Cefmetazol*	Cemetol			OCH ₃

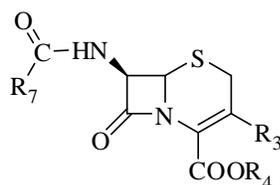
* pertenecen al grupo de las cefamicinas

Las cefalosporinas de tercera generación o de amplio espectro (**Tabla III**) son muy activas contra bacterias Gram negativas y muy resistentes a la acción de las β -lactamasas de amplio espectro. Las de cuarta generación (**Tabla IV**) son compuestos zwitteriónicos portadores de un centro de amonio cuaternario en la posición C-3, responsable del mayor espectro de estas cefalosporinas frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Son estables frente a cepas productoras de algunas β -lactamasas de espectro ampliado.⁶

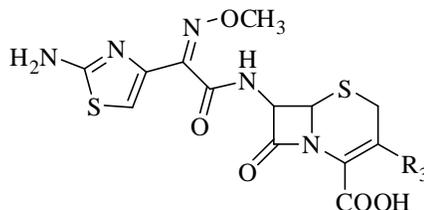
En términos generales, a medida que las cefalosporinas evolucionan de la primera a la tercera generación ganan actividad frente a bacterias Gram negativas, la reducen frente a Gram positivas y mejoran su estabilidad frente a la acción de las β -lactamasas. Las cefalosporinas de cuarta

generación tienen una acción similar a las de tercera generación frente a bacterias Gram negativas y alcanzan una actividad contra bacterias Gram positivas análoga a las de primera generación.

Tabla III. Cefalosporinas de tercera generación.



Nombre genérico	Nombre comercial	R ₇	R ₃	R ₄
Ceftioxima	Cefizox		H	Na
Cefotaxima	Claforan			Na
Ceftriaxona	Rocephin			Na
Cefmenoxima	Cefonicid			H
Cefoperazona	Cefobid			H
Ceftazidima	Fortaz Ceftaz Tazicef Tazidima			H/ Na

Tabla IV. Cefalosporinas de cuarta generación.

Nombre genérico	Nombre comercial	R ₃
Cefoselis (FK-037)	Wincef	
Cefpiroma (HR-810)	Cefrom	
Cefepima (BMY- 28142)	Maxipime	
Cefaclidina (E1040)	Cefclidin	

2.3 Mecanismo de acción de las cefalosporinas

Es bien conocido que las cefalosporinas son antibióticos bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular y que su mecanismo de acción se basa en la acilación de un residuo de serina presente en las enzimas PBP_s (transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas) que controlan la etapa final de la biosíntesis del péptidoglicano, un polímero esencial para la fortaleza de la pared bacteriana.⁷

Los antibióticos β -lactámicos causan la muerte de la bacteria porque inhiben la acción de las enzimas PBPs dada la analogía que existe entre su estructura espacial y la del dipéptido D-alanina-D-alanina presente en el péptidoglicano. Debido a la elevada reactividad química del carbonilo β -lactámico, las cefalosporinas se unen de forma covalente e irreversible al residuo de

serina de las PBPs, el cual resulta acilado como resultado de la apertura del anillo β -lactámico con formación de un complejo acil-enzima que bloquea e impide su acción.⁵

2.4 Mecanismos de resistencia de las bacterias frente a la acción de las cefalosporinas.

En la literatura está bien definido que los mecanismos de resistencia que desarrollan las bacterias frente a las cefalosporinas actúan en cada una de las etapas implicadas en el despliegue de su actividad antibacteriana, que son independientes entre sí pero también pueden actuar sinérgicamente.⁸

El primer mecanismo de resistencia se basa en la modificación de la membrana externa de la bacteria con disminución de la permeabilidad de la pared microbiana lo que dificulta la llegada del antibiótico a su sitio de acción. Este fenómeno ocurre fundamentalmente en las bacterias Gram negativas porque tienen una membrana externa formada por múltiples capas de lípidos, proteínas y polisacáridos que dificultan la penetración de sustancias hidrofílicas como las cefalosporinas. Estos compuestos deben penetrar a través de unos canales de naturaleza proteica denominados porinas, que al modificarse o desaparecer provoca resistencia.

El segundo mecanismo consiste en la inactivación enzimática debido a la producción de β -lactamasas, enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico lo que ocasiona su destrucción antes de que el antibiótico llegue al sitio de acción.⁹ Constituye el mecanismo de resistencia más importante a la acción de las cefalosporinas porque provoca su total inactivación.

El tercer mecanismo es el surgimiento de cambios estructurales en las PBPs, el sitio de acción de estos antibióticos. Este mecanismo de resistencia se manifiesta principalmente en las bacterias Gram positivas, como es el caso de SaRM.¹⁰

Otro factor que también provoca resistencia a las cefalosporinas es el denominado eflujo activo del antimicrobiano, un mecanismo de membrana que expulsa hacia el medio externo de la célula

bacteriana el antibiótico que ha podido entrar para evitar que alcance el sitio de acción. Ocurre fundamentalmente en las bacterias Gram negativas.^{11,12}

En las últimas décadas se ha puesto de manifiesto el incremento de cepas cada vez más resistentes a las cefalosporinas, ya que por sus ventajas terapéuticas son fármacos de primera línea en la terapia intensiva hospitalaria o se utilizan de forma indiscriminada en la práctica médica lo que favorece la diseminación intrahospitalaria y en la comunidad de bacterias multiresistentes.¹³ Cada tratamiento con estos fármacos contribuye al proceso evolutivo por el que surgen nuevas bacterias resistentes o muchas que antes eran sensibles al arsenal terapéutico existente reaparecen como cepas resistentes.

2.5 Relación estructura química-actividad biológica.

En un inicio, se considera que los elementos estructurales responsables de la actividad antibacteriana (farmacóforo) son el anillo β -lactámico y el grupo ácido de la molécula.¹⁴ Con posterioridad, los estudios químico teóricos permiten concluir que los aspectos básicos que determinan la actividad antibacteriana están relacionados con: (a) la reactividad del anillo β -lactámico y su estabilidad química; (b) el grado de penetrabilidad en las bacterias y la farmacocinética; (c) las interacciones intermoleculares con el sitio activo. Sobre cada uno de estos aspectos tienen una marcada influencia los sustituyentes de las posiciones C-3 y C-7 del núcleo cefem.¹⁵

2.5.1 Reactividad del anillo β -lactámico y estabilidad química.

El factor fundamental que determina la actividad antimicrobiana de las cefalosporinas es la reactividad del anillo β -lactámico, que se relaciona estrechamente con la tensión originada como resultado de la unión de los dos heterociclos que conforman el núcleo cefalosporánico. A causa de esta tensión, el átomo del nitrógeno β -lactámico adopta una conformación piramidal, de forma tal que disminuye la participación de su par de electrones libres en la resonancia del grupo amida

(Figura 4). Como resultado, el enlace del grupo carbonilo posee un mayor carácter de doble enlace que en las amidas alicíclicas y por lo tanto una mayor reactividad.¹⁶

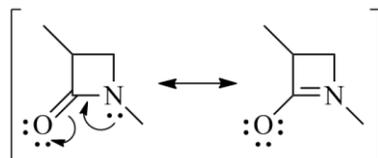


Figura 4. Resonancia del grupo amida.

Otro rasgo estructural que incide sobre la reactividad del anillo β -lactámico es el doble enlace ubicado entre las posiciones C-3 y C-4. Debido a la participación del par electrónico libre del átomo de nitrógeno β -lactámico en la resonancia enamínica del ciclo de dihidrotiazina (Figura 5), el enlace carbono-nitrógeno de la β -lactama es aún más débil que en el caso de las amidas normales, factor que contribuye de forma adicional a incrementar la reactividad del grupo carbonilo.¹⁷ Una prueba de lo anterior es la escasa actividad biológica de los isómeros 2(3) de las cefalosporinas (Figura 6), donde el doble enlace del ciclo dihidrotiazínico se localiza entre las posiciones C-2 y C-3 y no existe la posibilidad de interacción con el átomo de nitrógeno.¹⁸

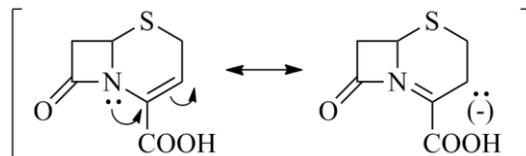


Figura 5. Resonancia enamínica del ciclo dihidrotiazina.

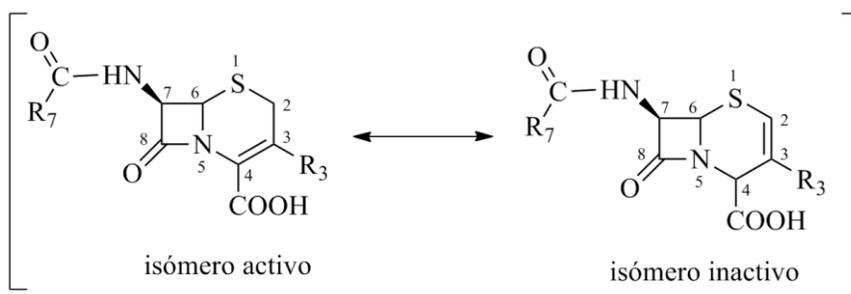


Figura 6. Isomerismo en cefalosporinas.

El efecto inductivo del sustituyente ubicado en la posición C-3 (R_3) del núcleo cefalosporánico influye sobre la actividad antibacteriana. En general, los grupos electroaceptores confieren una mayor reactividad al anillo β -lactámico y como consecuencia una actividad biológica superior.¹⁹

Un buen grupo saliente en esta posición dificulta la resonancia electrónica del carbonilo β -lactámico e induce una mayor acción antibacteriana. En este sentido, existen evidencias de que el mecanismo de acilación responsable de la acción biológica está concertado con la salida del grupo sustituyente de la posición C-3,²⁰ como se muestra en la **Figura 7**.

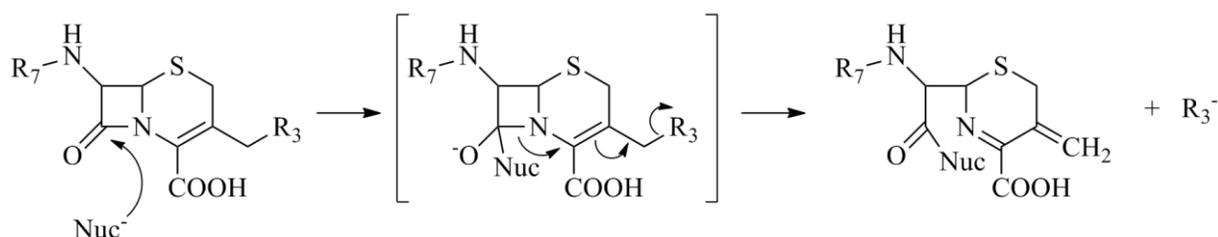


Figura 7. Mecanismo de acilación concertado con la salida del grupo en C-3.

No obstante, una mayor reactividad del anillo β -lactámico no siempre es sinónimo de una actividad antimicrobiana superior. El enlace amida debe ser lo suficientemente reactivo para acilar el residuo serina del sitio activo, pero no hasta el punto de que la cefalosporina sea químicamente inestable o se hidrolice por la acción de otros nucleófilos presentes en el medio biológico antes de alcanzar su sitio de acción en las PBP

Por otra parte, es necesario que el anillo β -lactámico sea estable frente a la acción hidrolítica de las β -lactamasas secretadas por la bacteria. En este sentido, la naturaleza química y la configuración espacial del sustituyente unido a posición C-7 β del núcleo cefem ejerce una influencia decisiva. El amplio espectro de las cefalosporinas de tercera generación frente a las bacterias Gram negativas se debe, en gran medida, a la presencia en la cadena acilamino de un grupo alcoximino de configuración *syn* que al estar unido al anillo 2-aminotiazol dificulta (por impedimento estérico) el acceso de las β -lactamasas al carbonilo β -lactámico.²¹

2.5.2. Grado de penetrabilidad en las bacterias y farmacocinética de las cefalosporinas.

La estructura química y la configuración espacial de la cadena acilamino enlazada a la posición C-7 β del núcleo cefem son los factores que ejercen una mayor influencia sobre el grado de penetrabilidad del antibiótico y por lo tanto definen su espectro antibacteriano. El grado de lipofilidad del sustituyente en esta posición determina la penetrabilidad en uno u otro tipo de bacteria.²²

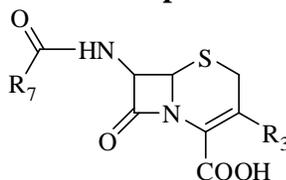
La pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas tiene diferente composición y características. En las bacterias Gram positivas son efectivos los compuestos con un alto carácter lipofílico, como las cefalosporinas de primera generación. En las bacterias Gram negativas el alto contenido lipídico de la pared celular impide la penetración de moléculas lipofílicas que quedan retenidas en la pared bacteriana y no pueden alcanzar su sitio de acción. Por esta razón las cefalosporinas de tercera generación, portadoras de una cadena acilamino más hidrofílica (grupo aminotiazol) son capaces de atravesar la membrana y ejercer su actividad antibacteriana.

La introducción de grupos portadores de átomos de azufre o nitrógeno en la posición C-3 del núcleo cefem también influye sobre el grado de penetración, aunque en mucho menor grado que el sustituyente de la posición C-7. Así, la presencia de tioéteres de pentaheterociclos aromáticos como el 1,3,4-tiadiazol de la cefazolina (**Tabla I**) y N-metiltiotetrazol del cefamandol (**Tabla II**) y de grupos que contienen un átomo de nitrógeno cuaternario (**Tabla IV**), ha conducido a un aumento de la actividad frente a gérmenes Gram negativos.²³

Con respecto a la farmacocinética, las cefalosporinas son esencialmente hidrofílicas por lo que su nivel de absorción en el tracto gastrointestinal es bajo y la mayoría deben ser administradas de forma intravenosa o intramuscular. Para obtener cefalosporinas orales existen diferentes estrategias. En un inicio, la introducción de fragmentos moleculares específicos en la posición C-7 β (ej. grupo α -aminofenilglicina) y de grupos lipofílicos poco voluminosos y no cargados en la posición C-3 del núcleo cefem (cloro, metilo) conducen a la obtención de cefalosporinas orales pertenecientes a la

primera y segunda generación. Con posterioridad, mediante la introducción del grupo metoxiimino aminotiazol por la posición C-7 β y del grupo vinilo en la posición C-3 surgen las cefalosporinas orales de tercera generación. En la **Tabla V** se muestran ejemplos de cefalosporinas orales.

Tabla V. Cefalosporinas orales.

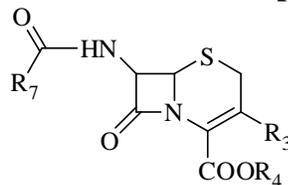


Nombre genérico	Nombre comercial	R ₇	R ₃	Generación
Cefalexina	Keflex		CH ₃	Primera
Cefadrina	Anspor Velosef		CH ₃	Primera
Cefadroxilo	Duricef		CH ₃	Primera
Cefaclor	Ceclor		Cl	Segunda
Cefixima	Suprax		-CH=CH ₂	Tercera
Cefdinir	Omnicef		-CH=CH ₂	Tercera

Una segunda estrategia para incrementar la absorción oral es la obtención de profármacos mediante la formación de ésteres inactivos “*in vitro*” que aumentan la liposolubilidad de la molécula y garantizan su rápida absorción. Las características estructurales de estos ésteres

permiten su rápida hidrólisis por las carboxiesterasas de la mucosa intestinal y la liberación de la molécula activa,²⁴ Ejemplo de estos compuestos se muestra en la **Tabla VI**.

Tabla VI. Profármacos de cefalosporinas orales.



Nombre genérico	Nombre Comercial	R ₇	R ₃	R ₄
Cefuroxima axetilo (Primera Generación)	Ceftin Zinacef			
Cefotiam hexetilo (Segunda Generación)	Cefotiam hexetil dihydrochloride			
Cefpodoxima Proxetilo (Tercera Generación)	Vantin			
Ceftidoren pivoxilo (Tercera Generación)	Spectracef			
Cefetamet pivoxilo (Tercera Generación)	-		CH ₃	
Cefteran pivoxilo (Tercera Generación)	-			

2.5.3 Interacciones con el sitio activo.

El sitio activo de las cefalosporinas son las enzimas PBP_s que se unen al fármaco mediante la acilación de un residuo de serina presente en su estructura. Para favorecer la interacción con el sitio activo, el farmacóforo debe reunir características estereoquímicas específicas que le permitan

fijarse selectivamente a éste y no a las β -lactamasas que ocasionan la degradación del antibiótico. Un elemento estructural indispensable para alcanzar actividad antibacteriana es la función ácida unida a la posición C-4 del anillo β -lactámico que debe permanecer libre porque es un punto de anclaje del antibiótico al sitio activo. La distancia interatómica de este grupo ácido con el carbonilo β -lactámico debe ser tal que permita al grupo farmacóforo encajar en el sitio activo e interaccionar preferiblemente con los residuos de serina que allí encuentre. En los compuestos activos esta distancia es menor que en los inactivos. La cara del anillo β -lactámico debe estar accesible, desde el punto de vista estérico, de forma tal que la molécula se encuentre lo suficientemente cerca para lograr activar el sitio serina y que ocurra la acilación.²⁵

La cadena acilamino unida a la posición C-7 β y el sustituyente en C-3, si bien no constituyen puntos de anclaje adicionales, influyen sobre la interacción con el sitio activo por cuanto su configuración espacial y volumen afectan la accesibilidad de la molécula al sitio de acción.

De forma general, el conocimiento de los requisitos indispensables para la actividad antibacteriana de las cefalosporinas se ha basado en el estudio de sus propiedades electrónicas, de sus características químico-estructurales, la relación entre ellas, así como los mecanismos moleculares que sustentan su acción.

2.6 Principales problemas que enfrenta la terapia anti-infecciosa frente a *Staphylococcus spp* en la actualidad. Nuevas cefalosporinas en estudio.

2.6.1 Evolución de la resistencia de *Staphylococcus spp.* a la acción de los β -lactámicos.

Las bacterias del género *Staphylococcus spp.* son una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. De forma general, se puede apreciar que en la literatura existe un estudio pormenorizado de la evolución de la resistencia de *Staphylococcus spp.* en correspondencia con la introducción de los diferentes antibióticos en la práctica médica.

La penicilina resulta efectiva en el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus* y a partir de 1940 se comienza a utilizar como medicamento, pero ya en 1946 la frecuencia de resistencia de este germen alcanza un 60 % debido a la acción de las β -lactamasas (penicilinasas), hecho que limita la posibilidad de utilizar las penicilinas naturales como agentes terapéuticos. En la actualidad, más del 95 % de las cepas de *Staphylococcus* son resistentes a la penicilina.²⁶

Esta situación propicia el surgimiento de las penicilinas penicilinasas resistentes (PPR), obtenidas mediante la modificación de la estructura química de las penicilinas naturales. La introducción de la meticilina en 1961 resulta un gran avance en el tratamiento de infecciones estafilocócicas ya que constituye la primera penicilina semi-sintética que tiene la propiedad de evadir la acción de las β -lactamasas. Entre 1960-1964 aparecen otras PPR como la oxacilina y comienza el desarrollo de las cefalosporinas de origen sintético que también resultaron estables frente a las β -lactamasas estafilocócicas.²⁷ Sin embargo, pasados unos años se identifican las primeras cepas de SaRM, que inicialmente son sólo resistentes a los antibióticos β -lactámicos pero que posteriormente se convierten en una virulencia que se disemina en los hospitales de muchos países.²⁸

El SaRM clasifica como “supermicrobio”, ya que posee un mecanismo que confiere resistencia absoluta a múltiples agentes antibacterianos como macrólidos, aminoglucósidos, cefalosporinas, carbapenems y quinolonas.²⁹ La vancomicina es el único antibiótico frente al que estas bacterias son sensibles por lo que constituye el fármaco de elección. El uso frecuente de la vancomicina conduce al surgimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* con susceptibilidad reducida o francamente resistentes a este antibiótico.³⁰

El fenómeno de resistencia en las cepas de SaRM ocurre porque en el ADN de esta bacteria aparece un nuevo gen cromosómico adquirido, denominado *mecA* (nuevo fragmento de ADN), que induce la hiperproducción de la PBP2a, una nueva proteína fijadora de penicilina que es capaz de mantener

la integridad de la pared celular bacteriana aún cuando las PBP_s habituales sean inhibidas por los antibióticos β -lactámicos. La infección por SaRM se manifiesta inicialmente a nivel nosocomial, pero en los últimos años devino en una infección adquirida en la comunidad.³¹

El *Staphylococcus epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativos constituyen la primera causa de infección nosocomial. Muchos de estos aislados son resistentes a meticilina, con marcada resistencia también frente a aminoglucósidos, quinolonas y vancomicina.³²

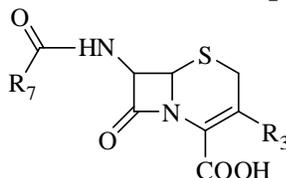
La incidencia cada vez mayor de infecciones causadas por estas bacterias multiresistentes provoca la necesidad urgente de descubrir y desarrollar nuevos antibióticos con mecanismos de acción efectivos para su control. En años recientes el linezolid (oxazolidinona), la daptomicina (lipopéptido) y la tigeciclina (glicilciclina, similar a las tetraciclinas) han sido aprobados como fármacos por la FDA de Estados Unidos para el tratamiento de diferentes tipos de infección ocasionados por el SaRM.^{33,34} Otros nuevos agentes como el sinercide, la quinupristina/dalfopristina, una combinación de estreptograminas, y nuevos lipoglicopéptidos como la dalbavancina y la telavancina se encuentran en diferentes fases de estudio clínico.^{35,36}

2.6.2 Nuevas cefalosporinas para enfrentar la acción de bacterias Gram positivas multiresistentes.

Las cefalosporinas también constituyen una familia que resulta de interés para la búsqueda de nuevos agentes con actividad frente a las bacterias Gram positivas multiresistentes, debido a su potencia antibacteriana y elevado perfil de seguridad. En la década del 90 comienza el desarrollo de compuestos mediante la introducción de nuevos sustituyentes en las posiciones C-3 y C-7 del núcleo cefem con la finalidad de incrementar la reactividad química del anillo β -lactámico y alcanzar un mayor grado de afinidad por las PBP_s que caracterizan a las bacterias resistentes a los antibióticos β -lactámicos en general.³⁷

La evaluación “*in vitro*” e “*in vivo*” y los ensayos clínicos de las nuevas cefalosporinas están ampliamente descritos en la literatura.^{38,39} En la actualidad, dos compuestos están introducidos en el mercado y otros se encuentran en diferentes fases de estudio clínico⁴⁰ (Tabla VII).

Tabla VII. Nuevas cefalosporinas.



Nombre genérico	R ₇	R ₃
Ceftobiprol medocaril (BAL 5788)		
Ceftarolina fosamil (TAK-599)		
BMS-247243		
RWJ-54428		
S-3578		

El ceftobiprol medocaril es el primer antibiótico β -lactámico con actividad bacteriana frente a SaRM.⁴¹ Se trata de una cefalosporina inyectable de amplio espectro que posee actividad “*in vitro*” frente a bacterias multiresistentes.⁴² Su actividad frente a las cepas resistentes a meticilina se explica por la combinación de una gran afinidad por las PBP2a (*Staphylococcus aureus*) y las PBP2x (*Streptococcus pneumoniae*) con una gran estabilidad frente a un amplio rango de β -lactamasas. Este aspecto unido a la velocidad de penetración en las bacterias Gram negativas, su farmacocinética y perfil de seguridad la convierten en un importante agente antimicrobiano.⁴³ Los ensayos clínicos Fase III avalan su utilización en el tratamiento de la neumonía nosocomial,⁴⁴ e infecciones severas de la piel que incluye el pie diabético.⁴⁵ Este compuesto recibió su aprobación como fármaco por la FDA en el 2008.⁴⁶

La ceftarolina fosamil es una cefalosporina inyectable con potente actividad frente a bacterias Gram positivas y negativas. Las cepas de SaRM y SeRM muestran sensibilidad a la ceftarolina con valores de CMI₉₀ que varían entre 0,25-2 μ g/mL. Este compuesto también se muestra efectivo frente a SaRV, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina y *Haemophilus influenzae*.⁴⁷ Su desarrollo se encuentra en la Fase III de ensayo clínico y los resultados demuestran que esta cefalosporina puede constituir un potente antibiótico para el tratamiento de las infecciones resistentes a nivel hospitalario y de la comunidad.^{48,49}

Si bien el desarrollo de estas cefalosporinas constituye un logro incuestionable de la química farmacéutica, la amplitud de su espectro antibacteriano (que incluye también a las bacterias Gram negativas) constituye un riesgo potencial en cuanto a la generación del fenómeno de la multiresistencia derivado de su futura aplicación en la práctica clínica. En este sentido, también se trabaja en la denominada estrategia de obtención de cefalosporinas de espectro reducido contra

patógenos específicos o grupos específicos de bacterias con el objetivo de minimizar la aparición de nuevos tipos de cepas resistentes.

Esta estrategia se basa en la concepción de obtener cefalosporinas estructuralmente relacionadas con las de primera generación para aprovechar la actividad inherente de estos compuestos frente a bacterias Gram positivas y con esta premisa introducir modificaciones estructurales efectivas contra los SaRM. Un ejemplo es la cefalosporina denominada BMS-247243 que posee una buena afinidad por la PBP2a lo que explica sus propiedades bactericidas frente a cepas de SaRM (valores de $\text{CMI}_{90} = 0,25\text{-}1 \mu\text{g/mL}$). Este derivado posee un sistema del tipo feniltioacetamido enlazado a la posición C-7 β del núcleo cefalosporánico el cual es portador de dos átomos de cloro que le proporcionan un elevado carácter lipofílico a la molécula y un grupo morfolino cuaternario en C-3, características que influyen de forma positiva, sobre su potencia bacteriana y solubilidad.^{50,51,52}

Otra cefalosporina que se desarrolla bajo este principio es el compuesto denominado RWJ-54428, que posee un alto nivel de actividad frente a bacterias Gram positivas resistentes debido a su alta afinidad por la PBP2a y PBP5. En particular resulta importante el hecho de que despliega una actividad 100 veces superior a la vancomicina contra cepas de *Enterococcus faecalis* resistente.⁵³

2.7 Métodos de Síntesis.

2.7.1 Síntesis de ácidos carboxílicos α,β insaturados.

Los ácidos carboxílicos α,β -insaturados pueden obtenerse a partir de aldehídos mediante dos procedimientos clásicos de la síntesis orgánica: (a) la reacción de *Knoevenagel-Doebner* y (b) la reacción de *Perkin*.⁵⁴ Debido a las condiciones de reacción más suaves, el método más utilizado es la condensación de *Knoevenagel-Doebner* que consiste en calentar el aldehído con ácido malónico (compuesto portador de un grupo metileno activo) en piridina como disolvente y en la presencia de aminas primarias o secundarias como catalizadores. Como subproductos de la

reacción se generan agua y dióxido de carbono.⁵⁵ Debido al inconveniente que implica la utilización de la piridina, se han desarrollado procedimientos más amigables con el medio ambiente donde se emplea etanol como disolvente y que permiten sintetizar diferentes ácidos 3-fenil-acrilicos sustituidos con buenos rendimientos y una pureza adecuada.⁵⁶

2.7.2 Síntesis de cefalosporinas

Los procedimientos de síntesis química en cefalosporinas se caracterizan por evitar medios básicos o ácidos fuertes, así como por el empleo de bajas temperaturas debido a la extrema labilidad química y térmica del núcleo cefalosporánico. Además, existen múltiples centros reactivos en la molécula lo que requiere, por lo general, del uso intensivo de grupos protectores que puedan ser eliminados bajo condiciones suaves. A continuación se resumen las características de las principales reacciones utilizadas durante el presente trabajo.

2.7.2.1 Acilación de la función amino unida a la posición C-7 β del núcleo cefalosporánico.

La acilación de la función amino unida al C-7 β del núcleo cefalosporánico es una de las principales reacciones durante la síntesis de cefalosporinas por cuanto permite introducir la cadena lateral que determina (en gran medida) las principales propiedades del antibiótico. El procedimiento a utilizar se selecciona sobre la base de las características estructurales, tanto del agente acilante portador de dicha cadena, como del núcleo cefem.

2.7.2.1.1 Método del reactivo de *Vilsmeier*.

En este procedimiento el agente acilante es el cloruro de ácido, que se obtiene por tratamiento con sales de clorometilenoiminio preparadas de acuerdo al procedimiento general de acilación de *Vilsmeier-Haack-Arnold*. Estas sales se pueden preparar por reacción de una *N,N*-formamida disustituida con el oxiclorigenante de fósforo, fosgeno u otro agente halogenante.⁵⁷ La etapa 1 de este método consiste en preparar el denominado reactivo de *Vilsmeier* (sal de clorometilenoiminio)

por reacción de la DMF con oxiclورو de fósforo a temperaturas entre 0 y 5 °C, en ausencia⁵⁸ o presencia de un disolvente como el THF,⁵⁹ acetato de etilo,⁶⁰ o diclorometano.⁶¹ Como agente halogenante también se utiliza el cloroformiato de triclorometilo.⁶² El mecanismo de la reacción de formación del reactivo de *Vilsmeier* se muestra en la **Figura 8**.

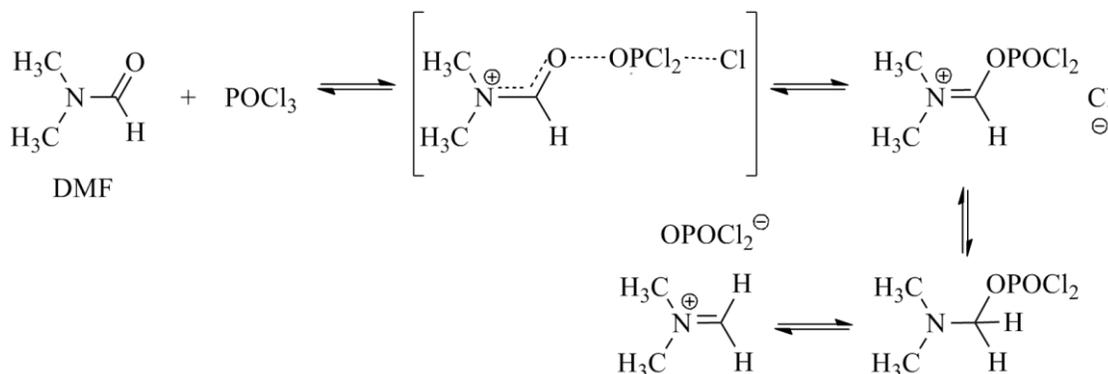


Figura 8. Mecanismo de reacción de la formación del Reactivo de *Vilsmeier*.

En la etapa 2, se adiciona el ácido portador de la cadena lateral sobre el reactivo de *Vilsmeier* a temperaturas entre 0-5°C para garantizar la formación exclusiva del cloruro de ácido y excluir la posibilidad de que ocurra la formilación de la cadena lateral como reacción colateral.

Finalmente, en la etapa 3 se realiza la acilación del núcleo cefalosporánico por adición de la disolución obtenida en la etapa anterior sobre el núcleo cefalosporánico disuelto en una mezcla disolvente acuoso-orgánica o en un medio totalmente orgánico, en dependencia de la estabilidad del agente acilante frente al agua. Cuando se emplea un medio acuoso-orgánico, el disolvente de elección es el THF en presencia de TEA⁶¹ o hidrógenocarbonato de sodio⁶³ como bases que cumplen con la doble función de disolver al núcleo cefalosporánico y capturar el ácido formado. En el caso de efectuar la reacción en un medio orgánico se pueden utilizar el THF, el acetato de etilo o el diclorometano como disolventes y la BSA⁶⁴ o la TMSA⁶⁵ para disolver al núcleo.

En la **Figura 9** se muestra un esquema de este procedimiento de acilación. Su principal desventaja radica en que, dada la elevada reactividad de este tipo de derivados, es necesario

proteger temporalmente el resto de las funciones activas de las moléculas involucradas, para evitar reacciones colaterales que impurifican el producto de interés y reducen los rendimientos.

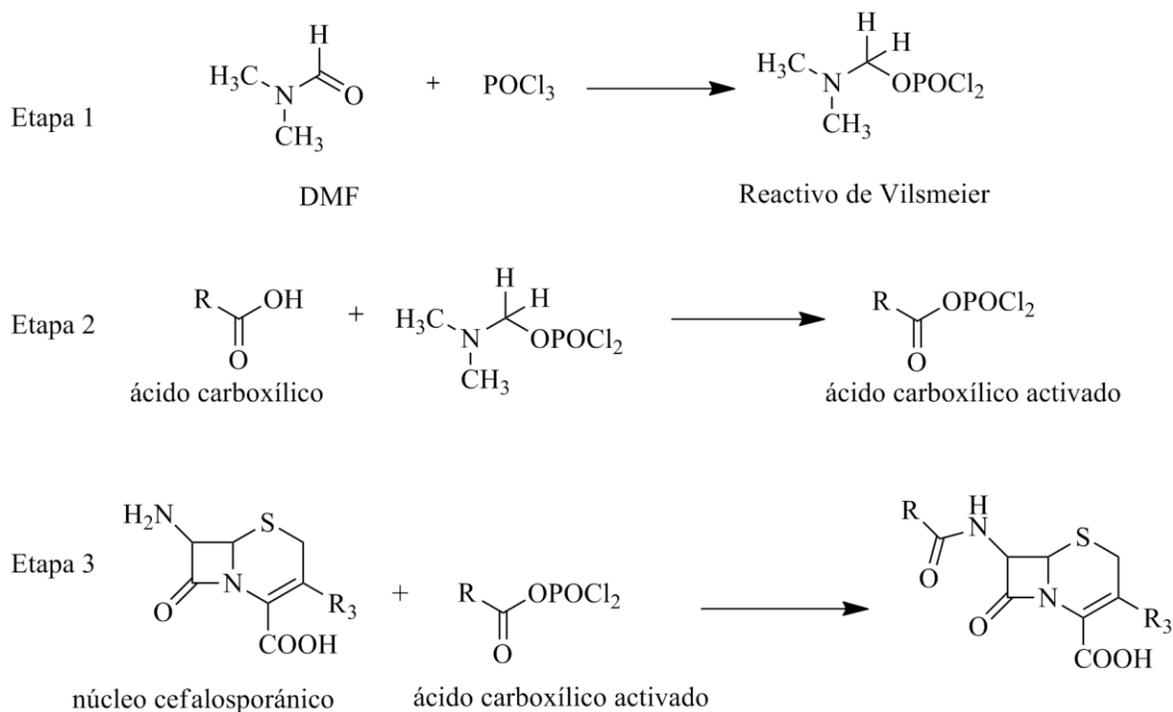


Figura 9. Método de acilación por el reactivo de Vilsmeier.

2.7.2.1.2 Método de condensación directa.

Consiste en acilar el núcleo cefalosporánico por reacción del ácido portador de la cadena lateral sin derivatizar en presencia de DCC como agente condensante.^{66,67} Otros agentes condensantes utilizados son el EDCI^{68,69} y el oxiclورو de fósforo. En este último caso es preciso emplear una amina terciaria, tal como la piridina,^{70,71} o la *N,N*-dietilnilina⁷² con el objetivo de eliminar el ácido formado. Los procedimientos de condensación directa, aunque proporcionan buenos rendimientos están limitados al caso de que el núcleo cefalosporánico tenga protegida la función ácida unida al C-4, ya que de estar libre competiría con el ácido portador de la cadena lateral.

2.7.2.2 Protección de grupos amino presentes en la cadena lateral de los ácidos a introducir por la posición C-7 β del núcleo cefalosporánico.

Cuando se aplican técnicas de acilación con derivados reactivos de los ácidos portadores de la cadena lateral, es necesario proteger los grupos amino presentes en su estructura para evitar reacciones colaterales. La extrema labilidad del núcleo cefalosporánico excluye la posibilidad de utilizar grupos protectores cuya eliminación se realice en un medio básico y por esta causa, los más usados son el trifenilmetilo (tritilo), el cloroacetilo y el formilo.

El grupo trifenilmetilo se introduce por tratamiento con trifenilclorometano (cloruro de tritilo) en diclorometano o cloroformo como disolventes y en la presencia de TEA como base aceptora del cloruro de hidrógeno formado.^{73,74} Este grupo protector se puede eliminar por dos vías fundamentales, ya sea por tratamiento con TFA en presencia de anisol o por reacción con ácido fórmico acuoso en proporciones que varían entre un 50-98 %.

2.7.2.3 Protección de la función ácida unida a la posición C-4 del núcleo cefalosporánico.

La protección temporal de la función ácida unida a la posición C-4 es, en muchas ocasiones, una operación imprescindible con el objetivo de realizar modificaciones en las restantes posiciones del núcleo cefalosporánico. En la literatura los grupos protectores más utilizados son los ésteres de *p*-nitrobencilo, de *p*-metoxibencilo, de *tert*-butilo y de difenilmetilo. Este último es el más empleado y se introduce por tratamiento con difenildiazometano. Con relación a posterior eliminación de estos grupos protectores, el *p*-nitrobencilo se puede eliminar por hidrogenólisis en presencia de paladio sobre carbón como catalizador y mediante el uso de diferentes disolventes como metanol, THF o sus mezclas. Los grupos protectores *p*-metoxibencilo, *tert*-butilo y difenilmetilo se eliminan por tratamiento con TFA en presencia de anisol como auxiliar de la desprotección.⁷⁵

2.7.2.4 Síntesis del difenildiazometano.

El difenildiazometano es un reactivo relativamente poco estable y que no se puede adquirir comercialmente. En la literatura se describen diversos métodos para la obtención de este compuesto, cuya diferencia fundamental radica en el agente oxidante utilizado para tratar la benzofenona hidrazona que es la materia prima empleada (**Figura 10**).

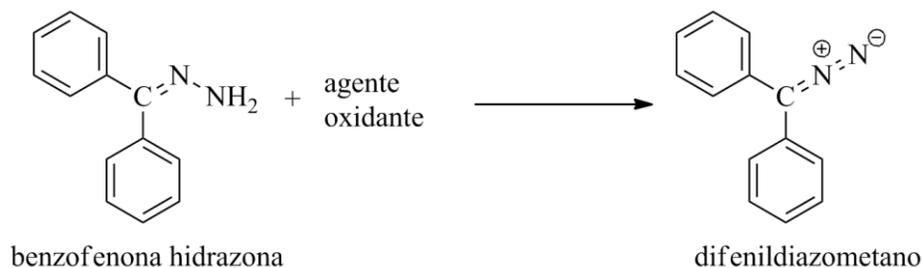


Figura 10. Método de síntesis del difenildiazometano.

Los oxidantes más utilizados son los óxidos metálicos, tales como el óxido de mercurio (II), el de plata y el de manganeso.⁷⁶ Otros agentes oxidantes son el ácido peracético o la cloramina T y en ambos casos se requiere de la presencia de yodo metálico como catalizador del proceso.⁷⁷

La ventaja de utilizar cloramina T, en comparación con el resto de los procedimientos descritos, consiste en que es posible alcanzar rendimientos de difenildiazometano próximos al 80 % sin necesidad de utilizar bases en el proceso. Esta técnica fue modificada con posterioridad en la etapa de purificación, al demostrarse que el reactivo contenía como impureza *p*-toluenosulfonamida (subproducto generado por la reducción de la cloramina T).⁷⁸

2.7.2.5 Introducción de sustituyentes en la posición C-3 del núcleo cefalosporánico por sustitución nucleofílica con tioles.

Durante la síntesis de cefalosporinas, la modificación de la posición C-3 del núcleo cefalosporánico mediante la introducción de diferentes sustituyentes, tiene un marcado interés

dada la influencia positiva que ejercen los grupos electroaceptores y los buenos grupos salientes sobre la reactividad del núcleo β -lactámico.

Con este propósito, en la literatura se describen dos estrategias de síntesis (**Figura 11**) cuya diferencia fundamental radica en el sustrato sobre el cual se realiza la modificación: **(a)** una 3-acetoximetilcefalosporina (donde la posición C-7 β se encuentra previamente acilada con la cadena lateral deseada; **(b)** el 7-ACA, que luego de efectuarse la modificación en C-3 se acila por la posición C-7 β para sintetizar la cefalosporina de interés.⁷⁹ Los agentes nucleofílicos portadores de un átomo de azufre en su estructura más utilizados son los tioles alquílicos y heteroarílicos, aunque también se han empleado tiosulfatos, carbamatos, tioureas y tioamidas.⁸⁰ La cefazolina y el cefamandol son ejemplos de cefalosporinas con tioles heterocíclicos en su estructura.

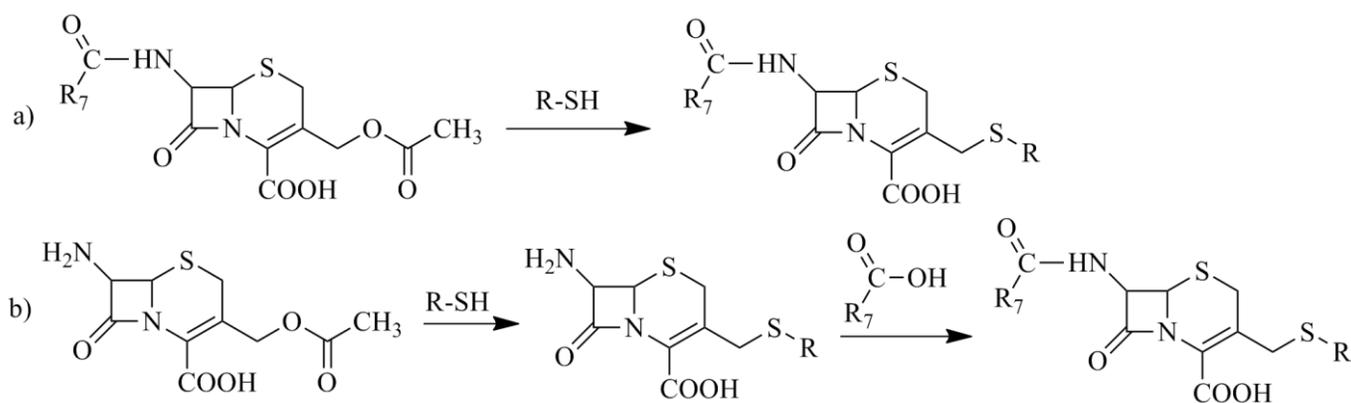


Figura 11. Estrategias de síntesis para la introducción de sustituyentes en la posición C-3 del núcleo cefem.

2.8. Estudios de modelación molecular en cefalosporinas.

El diseño empírico y tradicional de nuevas cefalosporinas tiene su mayor auge en las décadas del 60 y 70 del siglo XX donde muy pocos cálculos teóricos proporcionan informaciones útiles. En la década del 80 los estudios teóricos (computacionales) en cefalosporinas comienzan a desarrollarse con la expectativa de contribuir al diseño de nuevos antibióticos cada vez más potentes.^{81,82}

La reactividad química del anillo β -lactámico frente a los nucleófilos y su influencia en la interacción enzima-sustrato en cefalosporinas, ha sido objeto de estudio de varios grupos de expertos en química computacional. *Donald B. Boyd*, uno de los líderes indiscutibles en este campo, demuestra que la fortaleza del enlace C-N y la carga sobre el grupo carbonilo son factores que influyen en la actividad biológica. De igual modo, basado en el estudio de los mapas de densidad electrónica, sostiene que la deficiencia de densidad electrónica en las cercanías del grupo carbonílico del anillo β -lactámico se relaciona con la susceptibilidad de este sitio al ataque nucleofílico y utiliza la energía del estado de transición en la reacción de acilación como un índice de reactividad teórico del anillo β -lactámico.¹⁵

Otros especialistas evalúan, mediante métodos de cálculo *ab initio*, la reactividad química del grupo carbonilo del anillo β -lactámico frente al ataque nucleofílico de los grupos hidroxilo y la influencia de los disolventes en esta reacción.^{83,84}

Numerosos estudios con diferentes aproximaciones teóricas, en su mayoría de naturaleza semiempírica modelan la geometría molecular de las cefalosporinas^{85,86} y evalúan las relaciones entre las propiedades geométricas y electrónicas en cefalosporinas activas e inactivas.⁸⁷

La influencia del sustituyente de la posición C-3 del núcleo cefem sobre el mecanismo de acción de las cefalosporinas y sus propiedades como grupo saliente se estudia mediante el cálculo de los orbitales moleculares por el método CNDO/2 demostrándose que su labilidad es un factor importante en la activación del ataque nucleofílico del núcleo β -lactámico.⁸⁸

El empleo de métodos QSAR basados en el cálculo de descriptores moleculares en cefalosporinas tiene sus orígenes en la década del 80 con el establecimiento de una correlación entre la energía del estado de transición y la actividad biológica frente a bacterias gram negativas.⁸⁹ La utilización de la polarizabilidad y la energía del estado de transición permiten modelar la permeabilidad a

través de la membrana y la reactividad del anillo β -lactámico frente a las PBPs de varias cefalosporinas.⁹⁰ El empleo de otros descriptores electrónicos y lipofílicos permite estudiar las características del mecanismo de resistencia basado en el eflujo activo del antimicrobiano en las bacterias Gram negativas con el objetivo de poder diseñar nuevas cefalosporinas resistentes.⁹¹

La modelación de los parámetros relacionados con la absorción, distribución, metabolismo y eliminación en el organismo permite la búsqueda de nuevos candidatos a fármacos con buenas propiedades farmacocinéticas.^{92,93} La obtención de modelos cuantitativos que de forma simple permiten predecir diferentes parámetros farmacocinéticos de varias cefalosporinas comerciales se realiza mediante el empleo del método de redes artificiales de neuronas⁹⁴ y del cálculo de descriptores topológicos a partir de la estructura bidimensional de estos compuestos.⁹⁵

Al analizar la literatura relacionada con el empleo de métodos computacionales en cefalosporinas, la mayoría se basa en el estudio de la relación existente entre las características estructurales de estos compuestos y la potencia antibacteriana, su espectro de actividad y resistencia a la inactivación enzimática. De forma general es posible concluir que existen muy pocos trabajos basados en el cálculo de modelos matemáticos que relacionen la estructura química con la actividad biológica y que permitan predecir la actividad de nuevos compuestos

2.9 Consideraciones generales del estudio bibliográfico.

Del análisis del estudio bibliográfico realizado se puede concluir que existe el volumen de información necesario para enfrentar el gran reto que constituye desarrollar nuevas cefalosporinas con la finalidad de enfrentar la acción de cepas de *Staphylococcus* resistentes. En particular, la búsqueda de nuevas cefalosporinas activas contra SaRM de acuerdo a la estrategia de obtención de antibióticos de espectro reducido contra patógenos específicos, resulta un campo de sumo interés.

Desde el punto de vista sintético, tanto la química de los ácidos α,β insaturados como de las cefalosporinas es bien conocida y la literatura al respecto es abundante. Existe un amplio arsenal de procedimientos para efectuar modificaciones estructurales en las posiciones C-3 y C-7 del núcleo cefalosporánico, incluidos los métodos requeridos para la protección de grupos funcionales, aspecto crucial durante la preparación de este tipo de agentes antibacteriales. Por lo tanto, se puede afirmar que no hay obstáculos que impidan la búsqueda de nuevas estructuras por complejas que estas puedan resultar.

De forma general se puede apreciar que existe un estudio pormenorizado de la evolución de la resistencia de *Staphylococcus spp.* a la acción de los β -lactámicos, que son bien conocidos los principales problemas que enfrenta en la actualidad la terapia anti-infecciosa frente a estas bacterias y la importancia de las cefalosporinas en este escenario como agentes de primera línea.

Por otra parte, se han publicado una gran cantidad de artículos científicos sobre los diferentes aspectos del mecanismo de resistencia de estas bacterias patógenas Gram positivas frente a la acción de las cefalosporinas y acerca de los requisitos estructurales indispensables para que estos compuestos desplieguen su actividad antibacteriana (reactividad del anillo β -lactámico, estabilidad química, penetrabilidad a través de la membrana de las bacterias, farmacocinética e interacciones con el sitio activo).

Por último, los trabajos de modelación molecular en cefalosporinas están avalados por numerosas publicaciones donde los métodos de la MM como de la QC han jugado un papel fundamental en la determinación de los requisitos estructurales que influyen sobre la actividad antibacteriana y en la farmacocinética de estos compuestos. Sin embargo, los estudios QSAR mediante el empleo de diferentes descriptores son relativamente escasos, en particular los vinculados a la orientación del trabajo químico-sintético encaminado hacia la búsqueda de nuevas estructuras activas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Reactivos y disolventes utilizados.

Reactivos	Fabricante
Acetato de etilo	Merck
Acetato de sodio	Merck
Acetona	Merck
Ácido acético glacial	Panreac PRS
Ácido clorhídrico	Merck
Ácido fórmico	AnalytiCals
Ácido malónico	Merck
Ácido sulfúrico	Merck
BSA	Aldrich
Cloramina T	Merck
Cloroformo	Merck
Cloruro de sodio	Merck
Diciclohexilcabodiimida	Merck
Dicloroetano	Anala R
Diclorometano	Merck
Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- <i>d</i> 6)	Fluka
DMA	Merck
DMF	Merck
Etanol	Merck
Éter dietílico	Merck
Éter diisopropílico	GPR
Hidrocloreuro de hidroxilamina	Merck
Hidrógeno carbonato de sodio	Merck
Hidróxido de sodio	Merck
Metabisulfito de sodio	Merck
Metanol	Merck
n-Hexano	Merck
Nitrito de sodio	Merck
Oxicloruro de fósforo	Aldrich
Paraformaldehido	Aldrich
Piperidina	Merck
Piridina	Merck
Sulfato de cobre	Merck
Sulfato de sodio anhidro	Merck
Sulfito de sodio	Merck
Tetrahidrofurano	Merck
Trietilamina	Merck
Trifenilclorometano	Merck
Iodo	Merck
Ioduro de potasio	Aldrich

3.2 Métodos generales.

3.2.1 Cromatografía Capa Delgada

Los procesos de síntesis descritos se controlan por cromatografía de capa delgada (CCD) utilizando placas pre-elaboradas de gel de sílice Merck GF-254 con indicador de fluorescencia. Como fase móvil se utiliza los sistemas acetato de etilo-*n*-hexano (4:3) para los ácidos α,β insaturados y acetato de etilo:etanol: agua: ácido fórmico (60:25:15:1) para las cefalosporinas. Para el revelado de los cromatogramas se utiliza la luz ultravioleta generada por una lámpara UV-VIS CAMAG a longitudes de onda de 254 nm y 366 nm.

3.2.2) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN -¹H) y carbono 13 (RMN-¹³C).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN-¹H) y carbono 13 (RMN-¹³C) se registran a temperatura ambiente, en un espectrómetro Bruker AC 300. Los corrimientos químicos se expresan en la escala δ (ppm). Las muestras se disuelven en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) o cloroformo deuterado (CDCl₃) y se utilizan las señales del disolvente deuterado como referencia interna. La multiplicidad de las señales para los protones se designa de la siguiente forma: singulete (s), doblete (d), doblete de doblete (dd), triplete (t), cuadruplete (q) y multiplete (m). El tipo de carbono se determina mediante el empleo de la técnica DEPT 135 y la asignación inequívoca de las señales se efectúa mediante el registro de los espectros bidimensionales HH COSY, HMQC y HMBC.

3.2.3) Espectrometría de masa

Los espectros de masa se registran en un instrumento Waters-Micromass ZQ mediante la técnica de ELECTROSPRAY (ESI-MS). El flujo dentro de la fuente fue de 300 nL/min y los compuestos se disuelven en metanol.

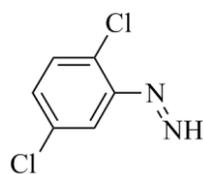
3.3 Procedimientos de síntesis.

3.3.1 Síntesis del 2,5-diclorobenzaldehído (1).

(a) Síntesis de la formaldoxima.

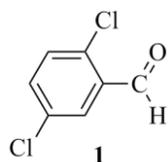
$\text{H}_2\text{C}=\overset{\text{N}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}$ Una mezcla de paraformaldehído (1,5g; 38 mmol) e hidrocloreto de hidroxilamina (2,6 g; 38 mmol) en agua (17 mL) se calienta hasta obtener una disolución transparente, se adiciona acetato de sodio trihidratado (5,1 g; 38 mmol) y se refluxa durante 15 min. para obtener una disolución de formaldoxima al 10 %.⁹⁶

(b) Síntesis de la sal de 2,5-diclorobencenodiazonio.



Sobre una mezcla de 2,5-dicloroanilina (2,6 g; 25 mmol) y agua (5 mL) se añade lentamente ácido clorhídrico al 37 % (5,7 mL), se adiciona hielo (10 g), se enfría entre -5 y 5 °C, se añade gota a gota una disolución de nitrito de sodio (1,8 g; 25 mmol) en agua (2,5 mL) y se agita durante 15 min. La disolución de la sal de diazonio obtenida se neutraliza hasta Rojo Congo con una disolución de acetato de sodio (1,4 g) en agua (3,5mL).

(c) Síntesis del 2,5-diclorobenzaldehído.

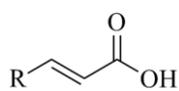


Sobre la formaldoxima preparada en (a) se adicionan, de forma sucesiva, sulfato de cobre hidratado (0,7 g; 26 mmol), sulfito de sodio (0,1 g; 7,9 mmol) y una disolución de acetato de sodio trihidratado (16 g) en agua (18 mL). La mezcla se enfría hasta 10-15 °C y manteniendo esta temperatura (así como una agitación vigorosa) la disolución neutra de la sal de diazonio obtenida en (b) se introduce lentamente por debajo de la superficie de la mezcla. Al finalizar la adición se agita 1 h, se trata con ácido clorhídrico al 37 % (23 mL) y se calienta a reflujo durante 2 h. Concluido este proceso, el producto crudo se separa por destilación con arrastre de vapor, el destilado se satura con cloruro de sodio y se extrae con éter dietílico (3 x 15 mL). La fase orgánica se lava, con disolución saturada de cloruro de sodio (3 x 10 mL), disolución de hidrógenocarbonato de sodio al 10 % (3 x 10 mL) y con disolución saturada de cloruro de sodio (3 x 10 mL). El disolvente se elimina por destilación bajo presión reducida, el residuo se enfría y se trata con una disolución al

40 % de metabisulfito de sodio (9 mL) previamente calentada a 60 °C. La mezcla obtenida se agita durante 1 h, se deja reposar toda la noche, el sólido formado se separa por filtración, se lava con éter dietílico, se suspende en agua (20 mL), se adiciona lentamente ácido sulfúrico concentrado (4 mL) con enfriamiento y se calienta a reflujo durante 2 h. La mezcla se enfría, se extrae con éter dietílico (3 x 10 mL), la fase orgánica se lava con disolución saturada de cloruro de sodio (3 x 10 mL) y se seca sobre sulfato de sodio. El disolvente se elimina por evaporación y el producto se destila bajo presión reducida.

3.3.2 Síntesis de ácidos α,β insaturados mediante el uso de piperidina como catalizador (compuestos 2-18).

3.3.2.1 Mediante el uso de etanol como disolvente.



Se prepara una mezcla del aldehído o carbaldehído correspondiente (20 mmol), ácido malónico (4,16 g; 40 mmol), piperidina (3 mL; 30 mmol), etanol al 95 % (20-25 mL) y se calienta a reflujo durante 5 h. Concluido este período de tiempo, se vierte sobre hielo (40 g), se ajusta hasta pH 4 con ácido clorhídrico concentrado (37 %), el precipitado que se forma se separa por filtración y se lava con agua helada (3 x 20 mL). El sólido que se obtiene se recrystaliza de etanol al 95 % y se seca en una estufa a 100 °C hasta peso constante.⁵⁶

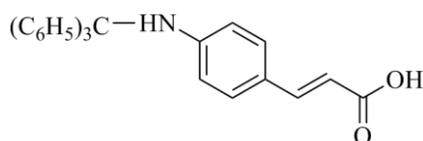
3.3.2.2 Mediante el uso de piridina como disolvente.

Se prepara una mezcla de ácido malónico (4,16 g; 40 mmol), el benzaldehído o carbaldehído correspondiente (20 mmol), piridina (8 mL) y se calienta a 50 °C hasta total disolución. A continuación, se adiciona piperidina (0,3 mL), se calienta a 80-85 °C durante 1 h y con posterioridad se refluja por 1 h adicional. La mezcla se enfría hasta temperatura ambiente, se vierte sobre agua helada (80 mL) y se ajusta hasta pH ácido mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado (10 mL). El sólido que precipita se separa por filtración con vacío, se lava con agua helada (4 x 10 mL) y se redissuelve con una disolución de hidróxido de sodio (1,6 g) en agua (24 mL). La disolución obtenida se filtra con vacío para eliminar cualquier residuo

insoluble y se acidifica por adición de ácido clorhídrico 6 mol/L (12 mL). El sólido que se forma se separa por filtración con vacío, se lava con agua helada (3 x 10 mL) y se seca en una estufa a 60-70 °C hasta peso constante.⁹⁷

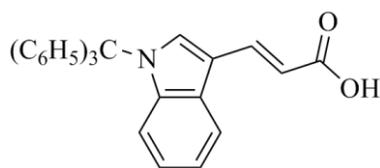
3.3.3 Síntesis de los derivados tritilados de ácidos α,β -insaturados.

3.3.3.1 Síntesis del ácido (2E)-3-[4-(tritolamino)fenil]acrílico (19).



Se prepara una suspensión del hidrocloreuro del ácido (2E)-3-(4-aminofenil)acrílico (2,0 g; 10 mmol) en cloroformo (20 mL), se enfría hasta 0-5 °C, se adiciona TEA (2,9 mL; 20,9 mmol), se agita hasta total disolución, se añade gota a gota una disolución de trifenilclorometano (3,0 g; 10,8 mmol) en cloroformo (10 mL) y se agita durante 90 min. a temperatura ambiente. Concluido este período de tiempo, se vierte sobre una mezcla de cloroformo (50 mL) y agua (100 mL), se agita 5 min. y las fases formadas se separan. La fase orgánica se lava de forma sucesiva con agua (3 x 25 mL), disolución acuosa de ácido clorhídrico 1 mol/L, de nuevo con agua (3 x 25 mL) y finalmente con disolución saturada de cloruro de sodio (30 mL). El extracto orgánico se seca sobre sulfato de sodio anhidro, el agente desecante se elimina por filtración, el disolvente se evapora bajo presión reducida, el residuo se tritura con éter diisopropílico, el sólido formado se separa por filtración, se lava con éter diisopropílico y se seca en estufa a 50 °C hasta peso constante.⁷³

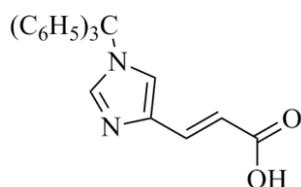
3.3.3.2 Síntesis del ácido (2E)-3-(1-tritol-1H-indol-3-il)acrílico (20).



Se prepara una suspensión del ácido (2E)-3-(1H-indol-3-il)acrílico (1,87 g; 10 mmol) en DCM (15 mL), se enfría hasta 0-5 °C, se adiciona TEA (1,7 mL; 12,3 mmol), se agita hasta total disolución, se añade gota a gota una disolución de trifenilclorometano (3,4 g; 12,2 mmol) en DCM (10 mL) y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Concluido este período de tiempo,

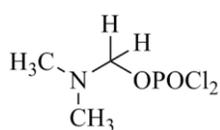
se vierte sobre una mezcla de DCM (50 mL) y agua (100 mL), se agita 5 min. y se separan las fases formadas. La fase orgánica se lava de forma sucesiva con agua (3 x 25 mL), disolución acuosa de ácido clorhídrico 1 mol/L, de nuevo con agua (3 x 25 mL) y finalmente con disolución saturada de cloruro de sodio (30 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, el agente desecante se elimina por filtración, el disolvente evapora bajo presión reducida, el residuo se tritura con éter diisopropílico, el sólido formado se separa por filtración, se lava con éter diisopropílico y se seca en estufa a 50 °C hasta peso constante.⁷³

3.3.3.3 Síntesis del ácido (2E)-3-(1-tritil-1H-imidazol-4-il)acrílico (21).

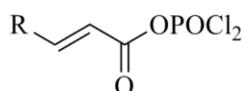


Se prepara una suspensión del ácido (2E)-3-(1H-imidazol-4-il)acrílico (1,38 g; 10 mmol) en cloroformo (20 mL), se adiciona BSA (5,4 mL; 22 mmol) a temperatura ambiente, se agita hasta total disolución, se enfría entre 0-5 °C, se añade trifenilclorometano (3,4 g; 12,2 mmol), se deja que la mezcla alcance la temperatura ambiente y se agita durante 2 h. Concluido este tiempo, se vierte sobre una mezcla fría de cloroformo (130 mL) y agua (100 mL), se agita durante 10 min. y las fases formadas se separan. La fase acuosa se extrae con cloroformo (50 mL), los extractos orgánicos se combinan, se lavan de forma sucesiva con agua (3 x 50 mL), disolución saturada de cloruro de sodio (50 mL) y se secan sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se elimina por filtración, el disolvente se evapora bajo presión reducida hasta obtener un sirope el cual cristaliza por tratamiento con éter diisopropílico. El sólido obtenido se separa por filtración, se lava con éter diisopropílico y se seca en estufa a 50 °C hasta peso constante.

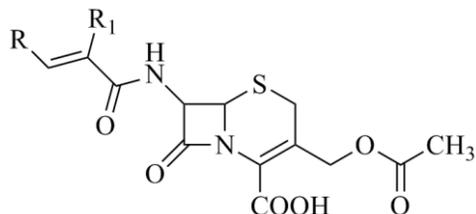
3.3.4 Síntesis de nuevas cefalosporinas a partir del 7-ACA y diferentes ácidos α,β insaturados (compuestos 22-62).



(a) **Preparación del reactivo de Vilsmeier.** Se disuelve DMF (0,35 mL; 12 mmol) en THF (5-15 mL), se enfría hasta 0-5 °C, se adiciona oxidloruro de fósforo (0,4 mL; 12 mmol) y la mezcla se agita a 0-5 °C durante 30 min.⁵⁹

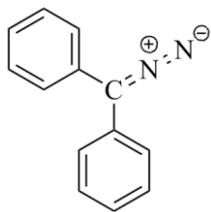


(b) **Activación del ácido α,β insaturado con el reactivo de Vilsmeier.** Sobre el reactivo de *Vilsmeier* frío (0-5 °C) se adiciona el ácido α,β insaturado (4 mmol) y la disolución obtenida se agita durante 1 h a la misma temperatura.



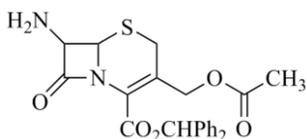
(c) **Acilación del 7-ACA.** Alrededor de 15 min. antes de concluir la activación del ácido α,β insaturado, se prepara una suspensión de 7-ACA (1,0 g; 3,67 mmol) en acetato de etilo (10 mL), se adiciona BSA (2,7 mL; 10,95 mmol) y se agita a temperatura ambiente hasta total disolución del núcleo. A continuación, la mezcla se enfría hasta -30 °C, se adiciona la disolución del ácido α,β insaturado activado y se agita a temperaturas entre -10 °C y -20 °C durante 90 min. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vierte con agitación sobre una mezcla fría (0-5 °C) de agua (80 mL) y acetato de etilo (20 mL) y se agita por 10 min. Las fases se separan y la fase orgánica se lava de forma sucesiva con agua (3 x 10 mL), disolución saturada de cloruro de sodio (10 mL) y se seca sobre sulfato de sodio anhidro. El agente desecante se elimina por filtración y el filtrado se evapora hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo obtenido se agita durante 1 h con 30 mL de éter dietílico o éter diisopropílico (según convenga), el sólido formado se separa por filtración con vacío, se lava con éter dietílico o éter diisopropílico (3 x 10 mL) y se seca a 40 °C durante 1-2 h.⁶⁴

3.3.5 Síntesis del difenildiazometano (63).



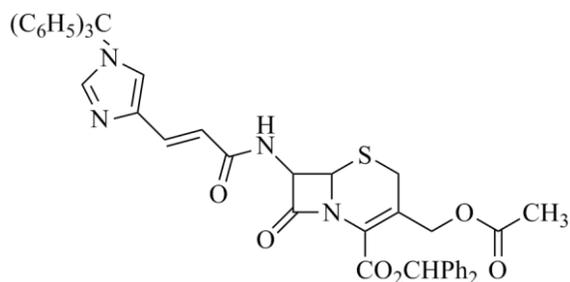
Se disuelve benzofenona hidrazona (10,78 g; 55 mmol) en una mezcla de DMA (55 mL) y agua (5 mL), se añade una disolución de yodo al 1 % (2,2 mL) (Nota) y se enfría a 20 °C. A continuación, se adiciona (durante 30 min. y manteniendo la temperatura en 20 °C) una disolución de cloramina T (15,5 g; 55 mmol) en una mezcla de DMA (55 mL) y agua (5 mL). Al finalizar, se añade diclorometano (110 mL) seguido por una disolución de hidróxido de sodio al 5 % (275 mL), la mezcla se agita durante 15 min. y se separan las fases. La fase orgánica coloreada se lava con agua (1 x 100 mL y 3 x 50 mL), se seca sobre sulfato de sodio y después de eliminar el agente desecante por filtración, la disolución de color rojo vino obtenida se lleva a 200 mL con DCM en un matraz volumétrico. Nota: La disolución de yodo al 1 % se prepara disolviendo yodo (1,0 g) y yoduro de potasio (1,5 g) en agua destilada (100 mL).^{77,78}

3.3.6 Síntesis del 7β-amino-3-acetoximetil-3-cefem-4-carboxilato de difenilmetilo (64).



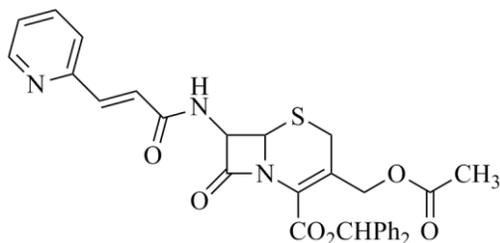
Se prepara una suspensión de 7-ACA (2,6 g; 9,55 mmol) en metanol (4 mL), se adiciona una disolución de **63** (3,15 g; 16,13 mmol) en DCM (14 mL) y la mezcla se agita 24 h a temperatura ambiente. Concluido este tiempo, se añade éter dietílico, el sólido sin disolver (7-ACA) se separa por filtración con vacío, se lava sucesivamente con DCM y con éter dietílico, los lavados se combinan con el filtrado inicial y los disolventes se eliminan por evaporación bajo presión reducida. El residuo que resulta se agita con éter dietílico, el sólido formado se separa por filtración con vacío, se lava con éter dietílico y se seca en estufa con vacío hasta peso constante.

3.3.7 Síntesis del 7β-amino((2E)-3-(1-tritil-1H-imidazol-4-acrilil)-3-acetoximetil-3-cefem-4-carboxilato de difenilmetilo (65).



Se prepara una disolución de **21** (2,9 g; 7,62 mmol) en THF (145 mL), se adiciona **64** (2,78 g; 6,34 mmol), se enfría hasta 0-5 °C, se añade DCC (1,60 g; 7,73 mmol) y la mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente. La diciclohexilurea (DCU) formada se elimina por filtración, el filtrado se evapora bajo presión reducida, el residuo se trata con acetato de etilo (30 mL) y el sólido que queda sin disolver (DCU adicional) se separa por filtración. El filtrado se diluye con acetato de etilo (30 mL), se agita con agua, se separan las fases formadas y la fase orgánica se lava con disolución acuosa de hidrógenocarbonato de sodio al 5 % (2 x 50 mL), seguido por un lavado con disolución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, el agente desecante se elimina por filtración, el filtrado se evapora bajo presión reducida, el residuo se tritura con éter diisopropílico, el sólido formado se separa por filtración, se lava con éter diisopropílico y se seca en estufa para obtener 5,15 g del compuesto crudo. El producto obtenido se purifica por cromatografía flash mediante el uso de gel de sílice 60 (155 g) como adsorbente y una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (1:1) como eluyente. Las fracciones que contienen al compuesto de interés se combinan, los disolventes se eliminan bajo presión reducida, el residuo se tritura con éter diisopropílico, el sólido formado se separa por filtración, se lava con éter diisopropílico y se seca en estufa hasta peso constante.⁶⁷

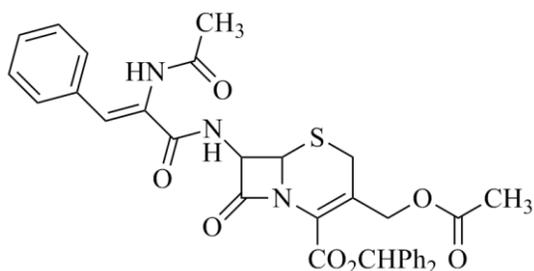
3.3.8 Síntesis del 7β-amino((2*E*)-3-piridin-3-acrilil)-3-acetoximetil-3-cefem-4-carboxilato de difenilmetilo (**66**).



Se prepara una suspensión del ácido (2*E*)-3-piridin-3-il acrílico (0,36 g; 2,41 mmol) y **64** (0,877 g; 2,0 mmol) en THF (30 mL), se adiciona DMF (4-5 mL) hasta

desaparición de la turbidez, se añade DCC (0,495 g; 2,4 mmol) y la mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente. Concluido este tiempo, la mezcla de reacción se trata como para el caso de **65** y se obtienen 1,09 g del producto crudo el cual se purifica por cromatografía flash mediante el uso de gel de sílice 60 (50 g) como adsorbente y una mezcla de acetato de etilo-*n*-hexano (4:1) como eluyente. Las fracciones que contienen el producto de interés se combinan, el disolvente se elimina bajo presión reducida, el residuo se tritura con éter diisopropílico, el sólido formado se separa por filtración, se lava sobre el filtro con éter diisopropílico y se seca en estufa con vacío hasta peso constante.⁶⁷

3.3.9 Síntesis del 7β-amino((*Z*)-2-(acetilamino)-3-fenilacrilil)-3-acetoximetil-3-cefem-4-carboxilato de difenilmetilo (**67**).

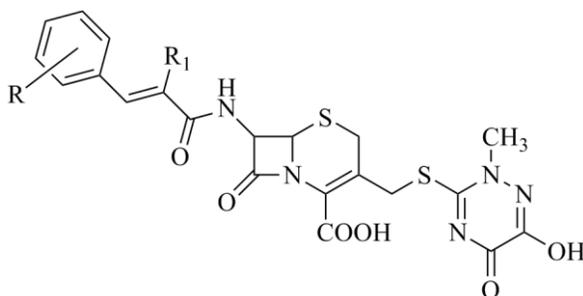


Se prepara una disolución del ácido (*Z*)-2-(acetilamino)-3-fenilacrilico (0,49 g; 2,4 mmol) en THF (10 mL), se adiciona **64** (0,88 g; 2,0 mmol), se enfría hasta 0-5 °C, se añade DCC (0,49 g; 2,4 mmol)

y la mezcla se agita durante 48 h a temperatura ambiente. La DCU formada se elimina por filtración con vacío, el filtrado se vierte sobre una mezcla de acetato de etilo (20 mL) y agua (100 mL), se agita durante 15 min., se separan las fases formadas y la fase orgánica se lava con disolución acuosa de hidrógenocarbonato de sodio al 5 % (2 x 20 mL), seguido por un lavado con disolución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, el agente desecante se elimina por filtración, el filtrado se evapora bajo presión reducida, el residuo se tritura con *n*-hexano, el sólido formado se separa por filtración, se lava con *n*-hexano y se seca para obtener 0,79 g del producto crudo. El producto obtenido se purifica por cromatografía flash mediante el uso de gel de sílice 60 (50 g) como adsorbente y una mezcla de

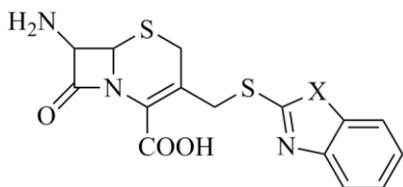
n-hexano-acetato de etilo (4:1) como eluyente. Las fracciones resultantes se combinan, los disolventes se eliminan bajo presión reducida, el residuo se tritura con éter diisopropílico, el sólido formado se separa por filtración, se lava con éter diisopropílico y se seca en estufa con vacío hasta peso constante.⁶⁷

3.3.10 Síntesis de nuevas cefalosporinas a partir del 7-ACT y diferentes ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos sustituidos (compuestos 68-85).



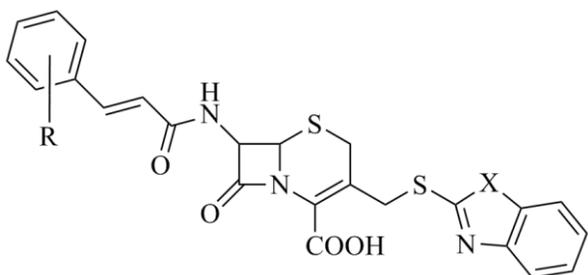
Se utiliza la técnica descrita en el epígrafe 3.3.4 con la diferencia de que el núcleo cefalosporánico de partida es el 7-ACT, que en la etapa de acilación se usó THF como disolvente y la cantidad de BSA es de 3,3 mL (13,48 mmol).

3.3.11 Síntesis de núcleos cefalosporánicos modificados en la posición C-3. Ácidos 7β-amino-3-heteroariltiometil-3-cefem-4-carboxílicos (compuestos 86-88).



Se prepara una suspensión de 7-ACA (2,72 g; 10 mmol) y del tiol correspondiente (12 mmol) en 20 mL de una mezcla agua-acetona (2:1), se ajusta hasta pH 7,5 por adición de una disolución de hidrógenocarbonato de sodio al 10 % y se calienta a 60-65 °C durante 3,5-4,5 h. Concluido este tiempo, se añade carbón activado (0,2 g), se agita durante 10 min., se filtra para eliminar el carbón, el filtrado se enfría a 0-5 °C y se ajusta hasta pH 2,5 con una disolución de ácido clorhídrico 2 mol/L. El sólido que precipita se separa por filtración, se lava sucesivamente con agua (3 x 10 mL), acetona (3 x 10 mL), éter dietílico (2 x 10 mL) y se seca en una estufa con vacío a 30 °C hasta peso constante.⁷⁹

3.3.12 Síntesis de cefalosporinas derivadas de los núcleos modificados en la posición C-3 y los ácidos (2E)-3-(fenil) y (2E)-3-(2,4-diclorofenil)acrílicos (compuestos 89-94).



Se utiliza la misma técnica descrita en el epígrafe

3.3.4 por acilación de los ácidos 7β-amino-3-

heteroariltiometil-3-cefem-4carboxílicos cuya

síntesis se muestra en el epígrafe **3.3.11** con los

derivados reactivos de los ácidos (2E)-3-(fenil) y (2E)-3-(2,4-dicloro fenil)acrílicos. La diferencia consiste en que se usó el THF como disolvente y las cantidades de BSA variaron entre 2,7-3,2 mL (10,95-13 mmol) en dependencia del núcleo cefalosporánico de partida.⁷⁹

3.4 Determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana de las cefalosporinas sintetizadas. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

La actividad antibacteriana se determina “*in vitro*”, según las normas establecidas por el NCCLS.⁹⁸

Preparación de las disoluciones del producto a ensayar. Se prepara una disolución acuosa de la sal sódica de la cefalosporina a ensayar con una concentración de 10 mg/mL.

Preparación del inóculo. A partir de una placa de cultivo, se seleccionan 4 o 5 colonias (de igual morfología) de la bacteria a ensayar, se resuspenden en tubos con 5 mL de caldo Mueller-Hinton y se agita en un mezclador automático. La turbidez se ajusta en el intervalo de 0,5 a 1 en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm (lo que corresponde a 10⁸ cfu), se toma 1 mL y se añade en un tubo que contiene 9,9 mL de caldo Mueller-Hinton. Los ensayos se efectúan utilizando cepas bacteriana depositadas en el cepario del Centro de Química Farmacéutica. Se ensayan 20 cepas de cada uno de las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SaSM), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SaRM), *Staphylococcus coagulasa* negativo sensible a meticilina (SCoNSM) y *Staphylococcus coagulasa* negativo

resistente a meticilina (SCoNRM). Como antibióticos cefalosporánicos de referencia se utilizan la cefazolina (primera generación) y la cefuroxima (segunda generación). A partir de la disolución de la cefalosporina a ensayar (10 mg/mL), se preparan (por dilución con caldo Mueller-Hinton) disoluciones con concentraciones de 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 $\mu\text{g/mL}$. En placas estériles de 96 pozos, se añade a cada pocillo 50 μL de las disoluciones anteriores, seguido por 50 μL del inóculo de bacterias y las placas se colocan en una incubadora a 35 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Trascurrido este período de tiempo, las placas se examinan visualmente y se determina el último pozo donde no se observa crecimiento bacteriano. Este pozo se corresponde con el valor de la mínima concentración del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria o Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). En todos los casos, a partir de los valores de CMI determinados experimentalmente, se calcula la media geométrica correspondiente.

3.5 Estudio QSAR a partir de cefalosporinas derivadas del 7-ACA y del 7-ACT con diferentes ácidos α,β insaturados.

Para desarrollar un modelo QSAR de regresión lineal múltiple a partir de estas cefalosporinas, se efectúan las acciones que se describen a continuación.

Confección de la base de datos utilizada. La base de datos está integrada por 57 cefalosporinas sintetizadas durante el presente trabajo; 39 derivadas del 7-ACA (compuestos **22-31** y **33-61**) y 18 derivadas del 7-ACT (compuestos **68-85**). En la base de datos se incluye la actividad biológica expresada por el logaritmo del inverso de la CMI frente a cepas SaSM ($\log [1/\text{CMI}(\text{SaSM})]$) y SCoNSM ($\log [1/\text{CMI}(\text{SCoNSM})]$) así como descriptores electrónicos, estéricos e hidrofóbicos calculados para cada compuesto como se muestra en los **Anexos 1a y 1b**.

Cálculo de los descriptores moleculares. Los descriptores moleculares utilizados se calculan mediante programas basados en los métodos de la MM y la QC.

Los descriptores correspondientes al coeficiente de partición octanol/agua (*Log P*), Energía de hidratación (E_{H_2O}), Polarizabilidad (P), Area Superficial aproximada (ASA), Area superficial de grid (ASG), Volumen Molar (Vm) y Refractividad molar (Rm), se calculan mediante el programa *HYPERCHEM* versión 7.0,⁹⁹ que también se utiliza para dibujar la estructura de las cefalosporinas incluidas en el estudio QSAR.

Los cálculos químico-cuánticos semiempíricos del tipo PM3 se realizan con el programa MOPAC versión 6.0.¹⁰⁰ En todos los casos se procede a optimizar totalmente la geometría de las moléculas usando el algoritmo *eigenvector following* con una precisión que rebaja la norma de gradiente hasta 0,001 Kcal/Å.

Los descriptores correspondientes al momento dipolar teórico (μ), la energía electrónica (EE), energía total (ET), Energía del HOMO (E_{HOMO}), Energía del LUMO (E_{LUMO}), así como los valores de las cargas atómicas parciales (q_1 hasta q_{28}) se obtienen de los ficheros de salida del programa MOPAC para cada compuesto. La dureza química (η), blandura química (S) potencial químico (U) y el índice electrofílico (W) se calculan a través de las formulas $\eta = (E_{LUMO} - E_{HOMO})/2$, $S = 1/\eta$, $U = (E_{HOMO} + E_{LUMO})/2$ y $\omega = U^2/2\eta$, respectivamente.¹⁰¹

Detección de outliers. La técnica utilizada para la detección de los *outliers* estadísticos fue el análisis de los residuales determinados por el programa STATISTICA 7.0.¹⁰²

Análisis de conglomerados o clusters. Para demostrar la diversidad estructural de la base de datos se realiza un AC jerárquico implementado en el programa STATISTICA versión 7.0. En este estudio se utiliza la distancia *euclidiana* para determinar la diferencia o semejanza entre las moléculas y el enlace completo o vecino más alejado (*complete linkage*) como función de enlace

lo que permite clasificar los compuestos en *clusters* representados en un dendograma. Para la construcción de las series de entrenamiento y prueba se selecciona el 20 % de los compuestos de cada *cluster* que conforman la serie de prueba. El 80 % restante es la serie de entrenamiento.

Análisis estadístico de los datos. Para la selección de variables en el modelo de regresión lineal múltiple (RLM) se realiza la ortogonalización de los descriptores moleculares para eliminar aquellos que correlacionan entre sí y se aplica el algoritmo genético implementado en el programa BUILDQSAR.¹⁰³ En este programa el algoritmo genético tiene la siguiente configuración. (a) operadores genéticos: de mutación, cruzamiento y selección; (b) función de evacuación: el coeficiente de correlación; (c) número de variables: 3; (d) tamaño de la población: 100; (e) número de generaciones: 200 y (f) % de mutación: 10.

Para obtener modelos específicos que relacionan las estructuras químicas con las propiedades cuánticas y químico-físicas de las cefalosporinas incluidas en el estudio QSAR se emplea el análisis de RLM.

El análisis estadístico se efectúa con el programa STATISTICA versión 7.0.¹⁰² La búsqueda del mejor modelo de QSAR se procesa en términos de mayor valor del coeficiente de correlación (R), el valor de la prueba de Fisher, el p-valor ($p < 0,01$) y el menor valor de desviación estándar (S). La calidad del modelo se determina mediante el examen de estos parámetros estadísticos. El poder predictivo del modelo se evalúa mediante la determinación de la robustez del modelo ($q^2 > 0,5$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obtención de nuevas cefalosporinas es una línea de investigación que se mantiene en la actualidad con el objetivo de encontrar compuestos activos frente a las bacterias resistentes a la acción de numerosos antibióticos ya introducidos en la práctica médica.

En el presente trabajo se sintetizaron y caracterizaron estructuralmente nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos α,β insaturados portadores de diferentes sistemas aromáticos en su estructura, tomando como referencia las investigaciones previas realizadas en esta temática.¹

Estos compuestos fueron evaluados biológicamente “*in vitro*” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativo (sensibles y resistentes a meticilina) con el objetivo de encontrar compuestos activos, elaborar una base de datos que permita realizar cálculos cuantitativos de estructura química-actividad biológica y así hallar un modelo matemático lineal que permita predecir la actividad biológica de otros nuevos derivados.

Para acometer el trabajo y cumplir con los objetivos propuestos, se efectuó una cuidadosa selección de los reactivos de partida (ácidos α,β insaturados y núcleos cefalosporánicos).

4.1 Ácidos carboxílicos α,β insaturados.

Los ácidos carboxílicos α,β insaturados utilizados son del tipo (2*E*)-3-(fenil y (2*E*)-3-(heteroaril)acrílicos (**Figura 12**) que se seleccionaron de acuerdo a la concepción de obtener la máxima información posible con un número mínimo de compuestos, lo que supone un menor esfuerzo sintético y menor cantidad de ensayos biológicos.

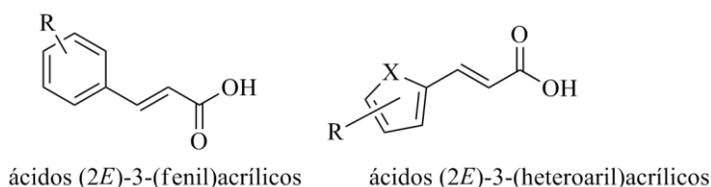


Figura 12. Estructura química general de los ácidos carboxílicos α,β insaturados utilizados.

Para el diseño de series análogas, tales como los ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos, se pueden utilizar el diagrama de *Craig* y el árbol de decisión de *Topliss*, dos métodos semicuantitativos basados en la constante electrónica de *Hammett* (σ) y la constante hidrofóbica (π) para distintos sustituyentes. El método del árbol de decisión de *Topliss* tiene carácter secuencial y se utiliza cuando el ensayo biológico de los compuestos a evaluar consume menos tiempo que su síntesis.¹⁰¹

En este trabajo para seleccionar los ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos se utilizó el diagrama de *Craig* (Figura 13) ya que la determinación de la CMI de cada compuesto consume un tiempo relativamente elevado y muy superior al que precisa la obtención de los compuestos a evaluar.

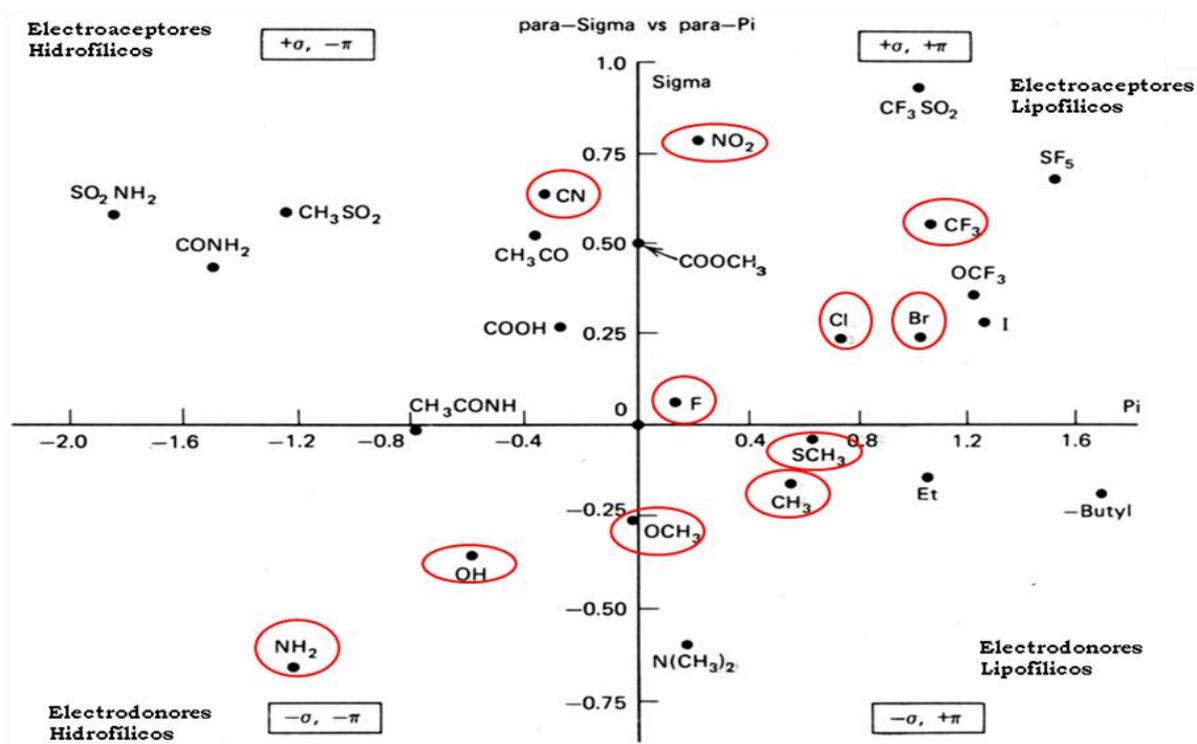


Figura 13. Diagrama de *Craig* utilizado para el diseño de la serie análoga de los ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos.

La utilización de este método permitirá que las cefalosporinas sintetizadas con posterioridad tengan un amplio rango de propiedades electroceptoras ($\sigma > 0$) y electrodonoras ($\sigma < 0$), lipofílicas ($\pi > 0$) e hidrofílicas ($\pi < 0$) en dependencia del sustituyente que tenga cada ácido (2*E*)-3-(fenil)acrílico utilizado.

Con relación a los ácidos (2*E*)-3-(heteroaril)acrílicos, para efectuar la selección se consideró la presencia de diferentes heteroátomos, así como distintos patrones de sustitución en el ciclo de 5 miembros con la finalidad de evaluar su influencia sobre la actividad antibacteriana.

Como criterio de selección adicional, también se tuvo en cuenta la disponibilidad de los mismos en el mercado. La estrategia consistió en adquirir (en una primera etapa) todos los ácidos α,β insaturados de interés ofertados en catálogos de reactivos. En una segunda fase, se adquirieron los aldehídos y carbaldehídos precursores de los ácidos α,β insaturados no disponibles en el mercado, ya que mediante una transformación química relativamente simple (reacción de *Knoevenagel-Doebner*) era posible sintetizar el compuesto seleccionado de interés.

4.1.1 Síntesis de ácidos α,β insaturados (compuestos 2-18).

Los ácidos α,β insaturados portadores de sistemas aromáticos en su estructura pueden sintetizarse mediante la reacción de *Knoevenagel-Doebner* (**Figura 14**) basada en la condensación de benzaldehídos o carbaldehídos con el ácido malónico, catalizada por bases o ácidos de Lewis.

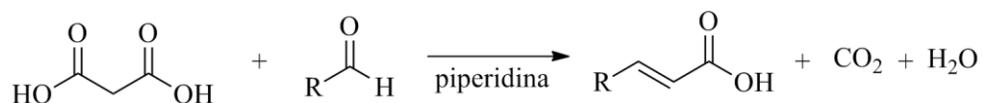


Figura 14. Método de síntesis de los ácidos α,β insaturados.

La variante de este método, desarrollada por Pellón y col.,⁵⁶ que implica el uso de etanol como disolvente y piperidina como catalizador ha sido empleada con éxito durante a la síntesis de ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos y sus derivados.

En el presente trabajo, esta técnica se utilizó inicialmente debido a la ventaja que representa el empleo de un disolvente no tóxico y de bajo costo como el etanol. Sin embargo, cuando se aplicó a la preparación de los ácidos (2*E*)-3-(2-cloro-6-fluorofenil)acrílico (**10**) y (2*E*)-3-(2-tienil)acrílico (**13**) se obtuvieron rendimientos bajos y por CCD (acetato de etilo-*n*-hexano (4:3)) la mancha correspondiente al producto mayoritario de la reacción se detectó en el punto de aplicación, mientras que los valores de *R_f* de los ácidos α,β insaturados sintetizados con anterioridad eran muy superiores y variaban entre 0,6 y 0,8.

La caracterización estructural de los productos de reacción demostró que los compuestos obtenidos no eran los ácidos α,β insaturados esperados. En ambos casos, en los espectros de RMN ^1H (**Anexos 2a y 2c**) se observó la ausencia de los dobletes característicos de este tipo de compuestos, con una constante de acoplamiento ($^1J_{2,3}=16\text{ Hz}$) asignables a los protones del doble enlace alquílico. En su lugar se observaron singuletes en la zona de $\delta\ 7,5\text{-}8,5\text{ ppm}$ indicativos de la ausencia de protones en la posición α de dicha insaturación y por lo tanto de la presencia de un sustituyente en la misma.

En el mecanismo de la reacción de *Knoevenagel* (**Figura 15**) se forman diácidos como intermedios que con posterioridad se descarboxilan (eliminación de una de las funciones ácidas) para obtener los ácidos α,β insaturados de interés.¹⁰⁴

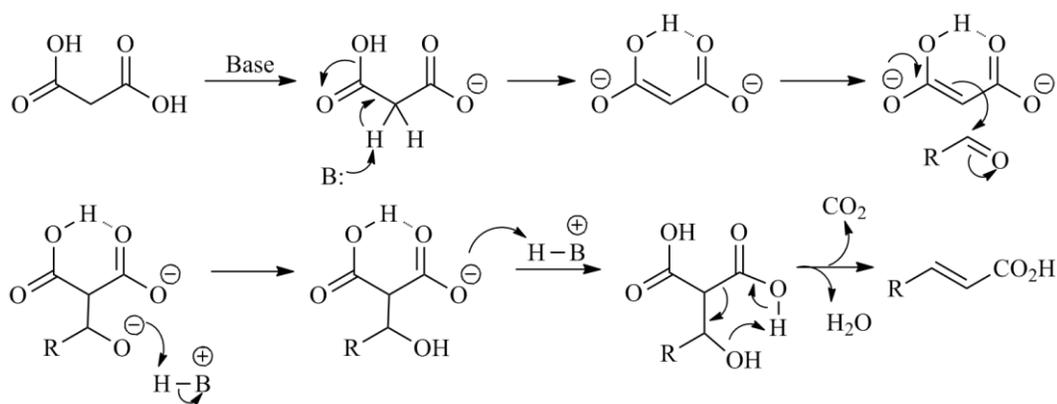


Figura 15. Mecanismo de la Reacción de Knoevenagel-Doebner.

En el caso del producto sintetizado a partir del tiofen-2-carbaldehído, en el espectro de RMN ^{13}C (**Anexo 2b**) se observaron dos señales a δ 167,28 y 165,22 ppm correspondientes a grupos carbonilo de ácido, lo que explica la posibilidad de que el compuesto obtenido sea el diácido (**I**) que se muestra en la **Figura 16**. A partir del resultado alcanzado se puede afirmar que en este caso las condiciones de reacción utilizadas no son suficientes para que ocurra la etapa final de descarboxilación.

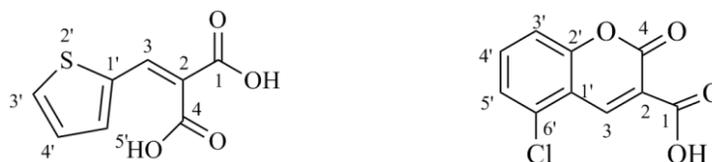


Figura 16. Estructura química del ácido 2-(tiofen-2-ilmetil)malónico (**I**) y del ácido 5-cloro-2-oxo-2H-1-benzopirano-3-carboxílico (**II**).

Con relación al producto sintetizado a partir del 2-cloro-6-fluorobenzaldehído, si bien el espectro de RMN ^1H (**Anexo 2c**) corrobora la obtención de un derivado carente de un protón en la posición α del doble enlace alquílico, no es posible afirmar que se trata del diácido correspondiente, ya que en el espectro de RMN ^{13}C (**Anexo 2d**) se observó una sola señal por encima de δ 160 ppm (indicativa de la presencia de una sola función ácida) y no se detectaron los dobletes que caracterizan a los acoplamiento del átomo de flúor con los átomos de carbono de la molécula.

Todo parece indicar que en este caso ocurre, en primer lugar, la formación del diácido, seguido por una reacción intramolecular donde existe la posibilidad de que se forme el compuesto **II** (**Figura 16**) como resultado de la pérdida del átomo de flúor ubicado en la posición 6 del anillo aromático.

Los resultados del análisis por RMN (**Tablas VIII y IX**) permiten afirmar que la técnica de síntesis donde se emplea etanol como disolvente no conduce en todos los casos a la obtención de los ácidos α,β insaturados de interés.

**Tabla VIII. Datos de RMN-¹H de los compuestos I y II.**

I	7,82 (1H,d,H-3', ³ J _{3'-4'} =4Hz); 7,73(1H,s, H-3); 7,55(1H,d,H-5', ³ J _{4'-5'} =3Hz); 7,16(1H, dd,H-4)
II	8,63(1H, s, H-3); 7,70 (1H,t,H-4', ³ J _{3'-4'} y ³ J _{4'-5'} =8,3Hz); 7,53 (1H, d, H-5', ³ J _{4'-5'} =8, 3Hz); 7,41 (1H,d,H-3', ³ J _{3'-4'} =8,3Hz)

Tabla IX. Datos de RMN-¹³C de los compuestos I y II.

C	1	2	3	4	1'	2'	3'	4'	5'	6'
I	165,28	124,21	134,43	167,34	135,71	-	132,13	127,79	132,27	-
II	163,29	119,50	142,75	155,48	116,0	155,14	115,47	134,48	125,13	132,31

Por esta causa, para la síntesis de los ácidos α,β insaturados se utilizó el procedimiento clásico que implica el uso de la piridina como disolvente y la piperidina como catalizador en la reacción de diferentes benzaldehídos y aldehídos aromáticos heterocíclicos sustituidos con el ácido malónico. Así se obtuvieron, en tiempos de reacción que variaron entre 1-2 h, todos los ácidos α,β insaturados de interés con una pureza elevada y buenos rendimientos. En la **Figura 17** se muestran los compuestos sintetizados y en la **Tabla X** los rendimientos alcanzados en cada caso.

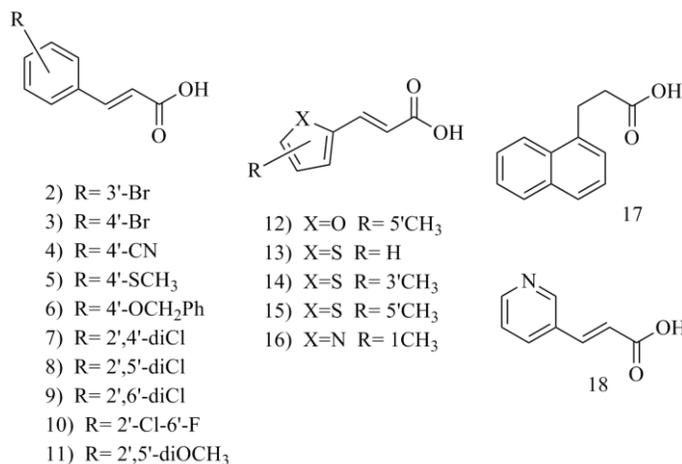
**Figura 17. Estructuras de los ácidos α,β -insaturados sintetizados (compuestos 2-18).**

Tabla X. Rendimientos obtenidos durante la síntesis de los ácidos α,β insaturados.

Compuesto	ácido α,β insaturado	Rendimiento (%)
2	ácido (2E)-3-(3-bromofenil)acrílico	55
3	ácido (2E)-3-(4-bromofenil)acrílico	60
4	ácido (2E)-3-(4-cianofenil)acrílico	61
5	ácido (2E)-3-[4-(metiltio)fenil]acrílico	74
6	ácido (2E)-3-[4-(benciloxi)fenil]acrílico	88
7	ácido (2E)-3-(2,4-diclorofenil)acrílico	87
8	ácido (2E)-3-(2,5-diclorofenil)acrílico	89
9	ácido (2E)-3-(2,6-diclorofenil)acrílico	42
10	ácido (2E)-3-(2-cloro-6-fluorofenil)acrílico	79
11	ácido (2E)-3-(2,5-dimetoxifenil)acrílico	80
12	ácido (2E)-3-(5-metil-2-furil)acrílico	92
13	ácido (2E)-3-(2-tienil)acrílico	88
14	ácido (2E)-3-(3-metil-2-tienil)acrílico	68
15	ácido (2E)-3-(5-metil-2-tienil)acrílico	89
16	ácido (2E)-3-(1-metil-1H-pirrol-2-il)acrílico	48
17	ácido (2E)-3-(1-naftil)acrílico	62
18	ácido (2E)-3-piridin-3-ilacrílico	70

En el caso particular de la síntesis del ácido (2E)-3-(2,5-diclorofenil)acrílico, fue preciso obtener de forma previa el 2,5-diclorobenzaldehído de partida (compuesto **1**), porque este último compuesto no se encuentra disponible en el mercado.

Con este propósito se preparó la correspondiente sal de bencenodiazonio a partir de la 2,5-dicloroanilina, la que se transformó en el benzaldehído de interés por tratamiento con una disolución de formaldoxima preparada previamente de acuerdo a un método clásico descrito en la literatura,⁹⁶ como se muestra en la **Figura 18**.

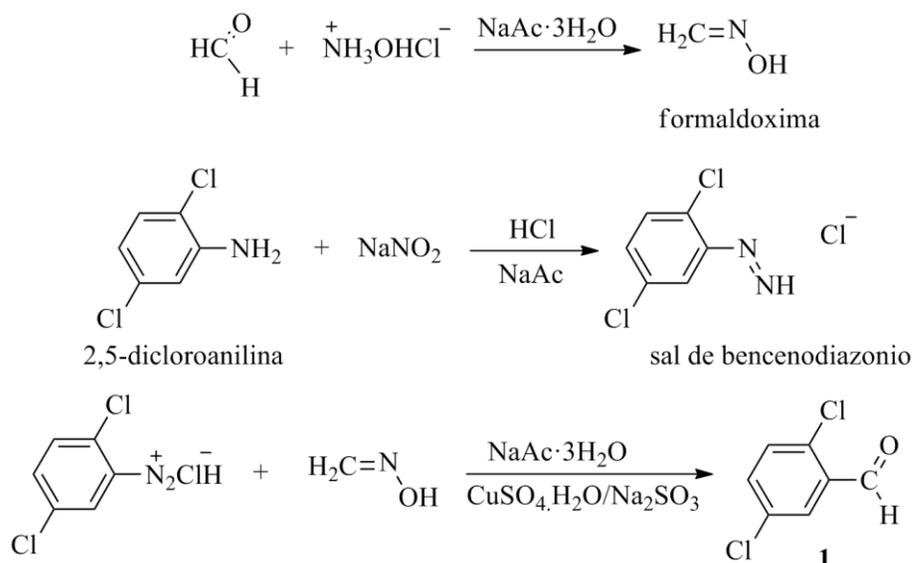


Figura 18. Síntesis del 2,5-diclorobenzaldehído (1).

4.1.2 Síntesis de los derivados tritilados de los ácidos (2E)-3-(4-aminofenil), (2E)-3-(1H-indol-3-il) y (2E)-3-(1H-imidazol-4-il) acrílicos (compuestos 19-21).

En el trabajo también se utilizaron como reactivos de partida varios ácidos carboxílicos α,β insaturados portadores de sistemas aromáticos con uno o más átomos de nitrógeno en su estructura con el objetivo de incrementar la diversidad estructural de las nuevas cefalosporinas a obtener. Entre estos compuestos, los que son portadores de grupos amino libre primarios y secundarios en su estructura, deben ser previamente protegidos con vistas a realizar la acilación del núcleo cefalosporánico sin que ocurran reacciones colaterales indeseables. Este es el caso de los ácidos (2E)-3-(4-aminofenil), (2E)-3-(1H-indol-3-il) y (2E)-3-(1H-imidazol-4-il)acrílicos que se muestran en la **Figura 19**

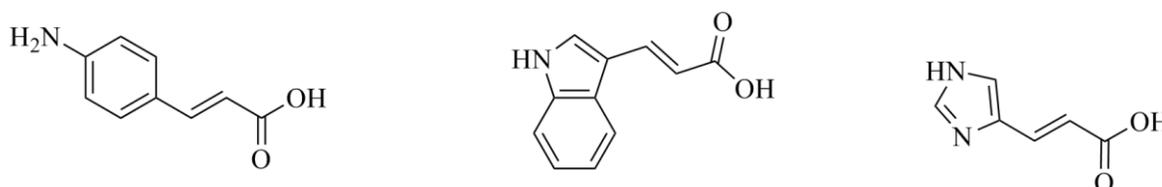


Figura 19. Estructura química de los ácidos (2E)-3-(4-aminofenil), (2E)-3-(1H-indol-3-il) y (2E)-3-(1H-imidazol-4-il) acrílicos.

Para bloquear temporalmente la función amino de estos ácidos no era posible introducir ningún grupo protector que requiriese un medio básico con vistas a su posterior eliminación, ya que el núcleo cefalosporánico es inestable bajo este tipo de condiciones y se descompone con facilidad. Por esta causa se seleccionó el grupo trifenilmetilo cuya eliminación final se puede efectuar en un medio ácido y donde los intermediarios cefalosporánicos sintetizados son relativamente estables. En los casos de los ácidos (2*E*)-3-(4-aminofenil) y (2*E*)-3-(1*H*-indol-3-il) acrílicos, la obtención de los derivados tritilados correspondientes (compuestos **19** y **20**) se efectuó por el método tradicional que implica la disolución de los ácidos de partida en cloroformo por tratamiento con TEA seguido por reacción con trifenilclorometano, según se muestra en la **Figura 20**.

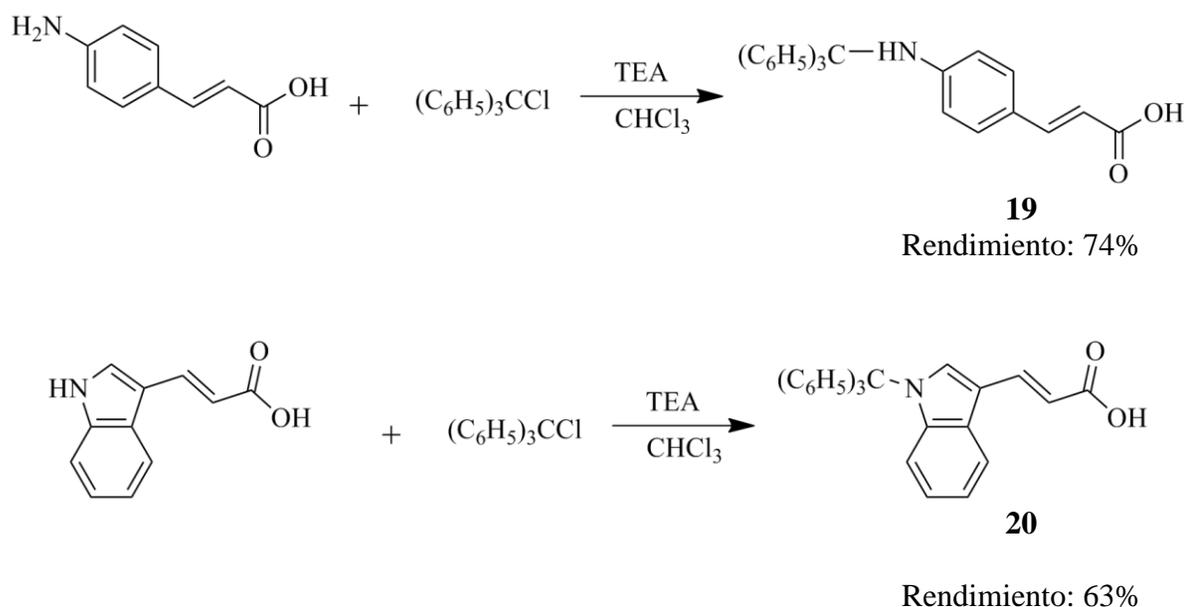


Figura 20. Método de síntesis de los ácidos (2*E*)-3-[4-(tritolamino)fenil y (2*E*)-3-(1-tritol-1*H*-indol-3-il)acrílicos (compuestos **19** y **20**).

La TEA cumple la doble función de disolver ambos ácidos en los disolventes utilizados y catalizar la reacción mediante la captura del cloruro de hidrógeno que se genera durante la tritilación. Bajo estas condiciones los compuestos **19** y **20** se obtuvieron con una buena pureza y rendimientos aceptables.

Cuando esta técnica se trató de utilizar en el caso del ácido (2*E*)-3-(1*H*-imidazol-4-il)acrílico se pudo comprobar que dicho compuesto prácticamente no se disolvía en DCM o cloroformo por tratamiento con TEA y por consiguiente la reacción de tritilación no se completaba quedando compuesto de partida sin reaccionar.

Para solucionar este problema, se desarrolló un procedimiento de tritilación no descrito en la literatura (**Figura 21**), el cual consistió en tratar inicialmente al ácido (2*E*)-3-(1*H*-imidazol-4-il)acrílico con BSA en cloroformo como disolvente, condiciones bajo las cuales ocurre su total disolución por formación del derivado sililado correspondiente. La posterior adición de trifenilclorometano permitió sintetizar al derivado de interés (compuesto **21**) con muy buen rendimiento y un elevado grado de pureza.

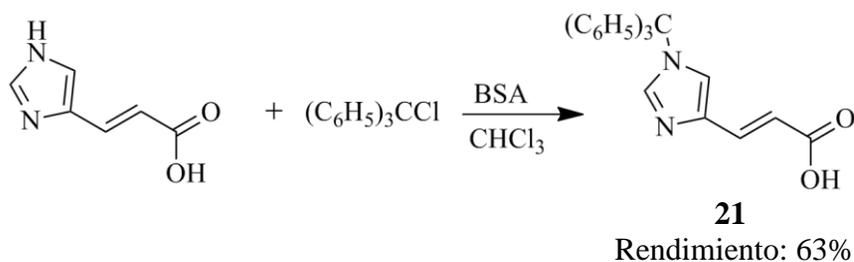


Figura 21. Método de síntesis del ácido (2*E*)-3-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)acrílico (21).

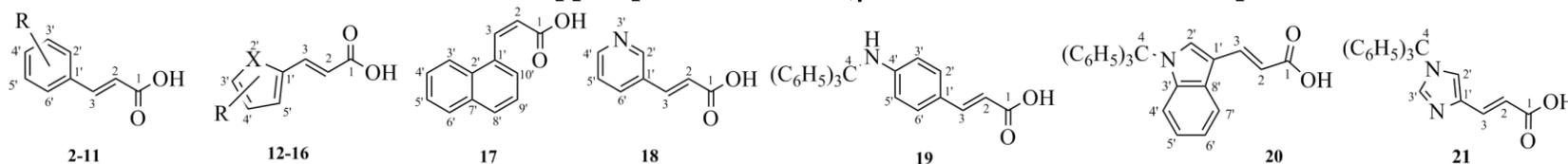
Todo parece indicar que cuando se utiliza la técnica tradicional, la sal de trietilamonio del ácido (2*E*)-3-(1*H*-imidazol-4-il)acrílico que se forma es muy poco soluble en cloroformo lo cual dificulta la tritilación, mientras que a través del método desarrollado no solo ocurre la sililación de la función acida, sino también del grupo amino lo que incrementa notablemente la solubilidad del sustrato en este disolvente y potencia el carácter nucleofílico del átomo de nitrógeno, todo lo cual conlleva a que la tritilación ocurra de manera más eficiente.

4.1.3 Análisis espectroscópico por RMN ^1H y RMN ^{13}C de los ácidos α,β insaturados (compuestos 2-21).

En las **Tablas XI y XII** se muestran los corrimientos químicos correspondientes a los protones y átomos de carbono de los compuestos **2-21**. En RMN ^1H las dos señales que indican la obtención de los ácidos α,β insaturados de interés son dos dobletes (uno en el intervalo de δ 6,0-6,90 ppm y el otro entre δ 7,30-8,40 ppm) pertenecientes a los protones enlazados a las posiciones α y β , del doble enlace formado. El valor de la constante de acoplamiento de estas señales ($^1J_{2-3}=16$ Hz) indica que los compuestos se encuentran en la forma *trans*. En los espectros se observan, además, las señales de los protones correspondientes a los anillos aromáticos característicos de estos ácidos y las pertenecientes a los sustituyentes unidos a dichos sistemas. En el **Anexo 3a** se muestra el espectro RMN ^1H del compuesto **4** como ejemplo de los resultados obtenidos.

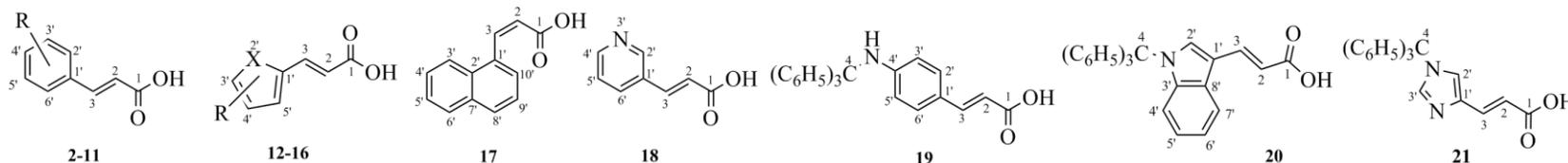
La obtención de los compuestos **19-21** además se pudo verificar por RMN ^1H debido a la presencia en la región aromática de los 15 protones que aporta el grupo trifenilmetilo introducido. En el derivado indólico (compuesto **20**), los protones unidos a las posiciones α y β del doble enlace alquílico (2 y 3, respectivamente) se observan como dos dobletes bien definidos con constantes de acoplamiento ($^1J_{2-3}=16$ Hz). En los otros dos compuestos (**19** y **21**) la señal del protón unido a la posición β (3) aparece sobrelapada con las señales de los protones aromáticos del grupo trifenilmetilo y de los sistemas aromáticos de dichas moléculas. En el intervalo próximo a los δ 12 ppm se detectaron las señales pertenecientes a las funciones ácidas.

En el análisis por RMN ^{13}C (**Tabla XII**) la presencia, en el intervalo comprendido entre δ 166-168 ppm, de la señal correspondiente al grupo carbonilo del ácido carboxílico indica la formación de los productos de interés. Además, se observan todas las señales de los átomos de carbono de

Tabla XI. Datos de RMN ^1H (ppm) para los ácidos α,β insaturados obtenidos (compuestos 2-21).

Compuesto	Protones aromáticos	H-2 ^a	H-3 ^b	R
2	7,33-7,93 (4H)	6,61	7,56	-
3	7,59-7,66 (4H)	6,57	7,56	-
4	7,84-7,90 (4H)	6,70	7,63	-
5	7,27 (2H, <i>d</i> , H-3' y H-5'); 7,61(2H, <i>d</i> , H-2' y H-6')	6,47	7,55	2,49 (3H, <i>s</i> ,SCH ₃)
6	6,95-7,70 (9H)	6,37	7,55	5,16 (2H, <i>s</i> ,OCH ₂ Ph)
7	7,45-7,96 (3H)	6,63	7,80	-
8	7,40-8,03 (3H)	6,69	7,77	-
9	7,37-7,57 (3H)	6,47	7,60	-
10	7,21-7,56 (3H)	6,57	7,68	-
11	6,95-7,25 (3H)	6,55	7,81	3,74(3H, <i>s</i> ,OCH ₃); 3,80(3H, <i>s</i> ,OCH ₃)
12	6,78 (1H, <i>d</i> ,H-3'); 6,24 (1H, <i>d</i> , H-4')	6,05	7,30	2,32 (3H, <i>s</i> ,5-CH ₃)
13	7,69(1H, <i>d</i> ,H-5'); 7,50(1H, <i>d</i> ,H-3'); 7,13 (1H, <i>dd</i> ,H-4')	6,18	7,74	-
14	7,56 (1H, <i>d</i> ,H-5'); 6,98 (1H, <i>d</i> ,H-4')	6,06	7,72	2,30 (3H, <i>s</i> ,3-CH ₃)
15	7,27 (1H, <i>d</i> ,H-3'); 6,83 (1H, <i>d</i> ,H-4')	6,01	7,69	2,46 (3H, <i>s</i> ,5-CH ₃)
16	6,96 (1H, <i>m</i> ,H-5'); 6,71 (1H, <i>m</i> ,H-3'); 6,09 (1H, <i>m</i> ,H-4')	6,10	7,49	3,69 (3H, <i>s</i> ,1-CH ₃)
17	7,59 (3H, <i>m</i>); 7,97 (3H, <i>m</i>); 8,20 (1H, <i>d</i>)	6,60	8,40	-
18	7,43(1H, <i>dd</i> ,H-5'); 8,14(1H, <i>d</i> ,H-6'); 8,84 (1H, <i>d</i> ,H-4'); 8,58(1H, <i>d</i> ,H-2)	6,68	7,62	-
19	7,10-7,50 (18H, <i>m</i> , aromáticos); 11,98 (1H, <i>bs</i> , COOH).	6,06	6,50	-
20	7,15-8,00 (20H, <i>m</i> , aromáticos + H-2'); 11,83 (1H, <i>bs</i> , COOH).	6,62	7,86	-
21	7,00-7,55 (18H, <i>m</i> , aromáticos + H-3+ H-2'+ H-4'); 12,1 (1H, <i>bs</i> , COOH)	5,83		-

a y b: Estas señales integran cada una 1H y aparecen como dobletes con $^3J_{2-3}=16$ Hz.

Tabla XII. Datos de RMN ^{13}C (ppm) para los ácidos α,β insaturados obtenidos (compuestos 2-21).

C	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	167,27	167,40	167,09	167,63	167,52	166,97	166,68	166,60	166,77	167,82	167,39	167,13	167,11	167,10	167,87	167,37	167,17	168,07	165,18	167,81	
2	120,93	120,23	122,83	118,03	116,54	123,00	123,80	127,90	126,03	119,55	114,24	117,38	116,55	115,96	112,66	121,91	121,29	113,14	122,52	115,86	
3	142,19	142,47	141,81	143,39	143,39	137,43	137,14	137,12	131,63	138,38	130,67	136,61	134,69	136,79	132,02	140,12	149,70	144,51	139,37	136,51	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70,54	87,92	74,96
5	-	-	118,55	14,18	69,23	-	-	-	-	55,51	13,37	-	13,60	15,16	34,58	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A R O M A T I C O S	122,25	123,45	112,06	125,58 (2C)	115,06 (2C)	127,94	127,57	129,07 (2C)	115,26	112,53	109,05	128,38	127,68	126,81	108,61	122,94	123,86	116,02 (2C)	106,73	124,69	
	127,05	130,10 (2C)	128,83 (2C)	128,61 (2C)	126,92	129,37	130,91	130,91	120,65	112,95	116,21	129,36	131,34	132,00	111,67	125,18	130,04	122,27	112,34	136,63	
	130,67	131,81 (2C)	132,67 (2C)	130,60	127,47 (2C)	129,48	131,27	131,40	126,30	117,47	148,90	131,50	132,63	136,72	127,25	125,67	134,52	128,37 (2C)	119,95	139,81	
	130,86	133,53	138,80	141,27	159,86	130,92	131,88	133,79 (2C)	133,17	122,99	155,15	138,82	140,98	143,40	128,45	126,24	140,55	149,19	120,93		
	132,65					134,32	132,33		134,34	152,03					127,08	127,08	150,71		124,93		
136,75					135,24	133,61		160,99	153,15					128,68	130,31	130,72	130,79	133,26	127,47		

Compuesto 4 (C-5): grupo 4'-CN; **Compuesto 5 (C-5):** grupo 4'-SCH₃; **Compuesto 6 (C-5):** CH₂ del grupo 4'-OCH₂Ph; **Compuesto 11 (C-5):** CH₃ del grupo 2'-OCH₃, **(C-6):** CH₃ del grupo 5'-OCH₃; **Compuestos 12, 14, 15, 16 (C-5)** grupos CH₃ unidos a los anillos. **Nota :** No se incluyen los corrimientos químicos de los átomos de carbono aromáticos del grupo 4'-OCH₂Ph ni del grupo C(C₆H₅)₃.

estas moléculas, incluidas las debidas a la presencia de los diferentes sustituyentes enlazados a los anillos aromáticos de los compuestos. En el **Anexo 3b** se muestra el espectro RMN ^{13}C del derivado **4** como ejemplo de los resultados obtenidos.

La síntesis de los compuestos **19-21** se comprobó por RMN ^{13}C además por la presencia en los espectros de las señales de los átomos de carbono aromáticos del grupo trifenilmetilo, así como mediante la detección (en el intervalo de δ 70-90 ppm) de la señal correspondiente al átomo de carbono alquílico cuaternario de dicho grupo protector.

En todos los casos, los espectros registrados se correspondieron con las estructuras químicas de los compuestos obtenidos. Sobre la base del análisis por RMN es posible afirmar que la técnica de síntesis utilizada permitió obtener los ácidos α,β insaturados antes citados con un elevado grado de pureza.

4.2 Síntesis, caracterización estructural y evaluación “*in vitro*” de las nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACA y diferentes ácidos α,β insaturados

4.2.1 Síntesis mediante acilación por el método del reactivo de *Vilsmeier* (compuestos 22-62).

Como núcleo cefalosporánico de partida inicialmente se seleccionó el ácido 7 β -amino-3-acetoximetil-3-cefem-4-carboxílico (7-ACA) por constituir la materia prima fundamental para la obtención de antibióticos cefalosporánicos, a partir del cual se han preparado medicamentos de este tipo con comprobada efectividad pertenecientes a las diferentes generaciones y por estar disponible en el mercado con una elevada pureza lo que garantizaría la ejecución de la investigación programada.

Las nuevas cefalosporinas fueron preparadas por acilación del 7-ACA con diferentes ácidos α,β insaturados mediante el método del reactivo de *Vilsmeier* según se muestra en la **Figura 22**.

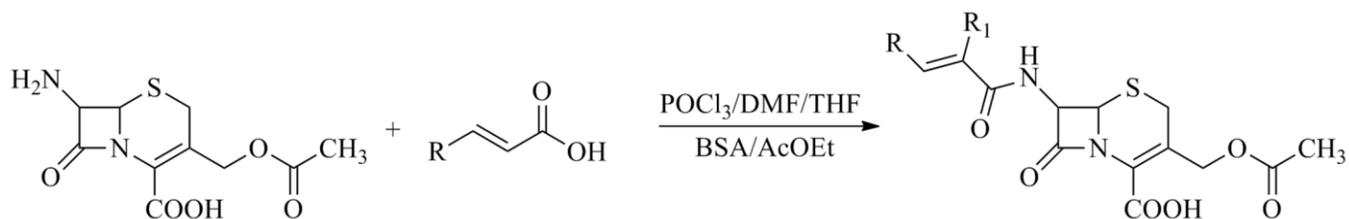


Figura 22. Método de síntesis de 7β-(acrilsustituido)amino-3-acetoximetilcefalosporinas.

En total se sintetizaron 41 compuestos de este tipo, de los cuales 33 son nuevos. Los derivados **22**, **26**, **28**, **37**, **40**, **41**, **44** y **51** habían sido obtenidos con anterioridad,¹ pero fue necesario prepararlos de nuevo para poder realizar una evaluación comparativa válida de la actividad antibacteriana de los nuevos productos frente a un mismo panel de cepas.

Los nuevos compuestos están conformados por 25 obtenidos a partir de ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos sustituidos (**22-54**), 6 derivados de ácidos acrílicos portadores de diferentes heterociclos unidos a la posición β del doble enlace (**55-60**), uno a partir de un ácido acrílico policíclico (**61**) y uno derivado del ácido 3-fenil-2-propiónico (**62**). En la **Figura 23** se muestra la estructura química de las cefalosporinas sintetizadas.

Para efectuar la acilación del 7-ACA, los ácidos α,β insaturados fueron activados con el reactivo de *Vilsmeier* preparado a partir de POCl₃ y DMF en THF como disolvente. La cantidad de THF utilizada varió entre 5-15 mL en dependencia de la solubilidad del ácido α,β insaturado.

La acilación se realizó en un medio no acuoso y la primera etapa consistió en la siliación del 7-ACA mediante el uso de BSA y acetato de etilo como disolvente. Esta reacción tiene como objetivos disolver el núcleo cefalosporánico en medio orgánico por formación del correspondiente éster de trimetilsililo, proteger temporalmente la función ácida y aumentar el carácter nucleofílico del grupo amino. Posteriormente, la disolución del ácido α,β insaturado activado se adicionó sobre el núcleo cefalosporánico disuelto. Esta reacción de acilación es

exotérmica por lo que se hace necesario emplear temperaturas muy bajas de 30°C, -10°C debido a la extrema labilidad térmica del núcleo cefalosporánico.

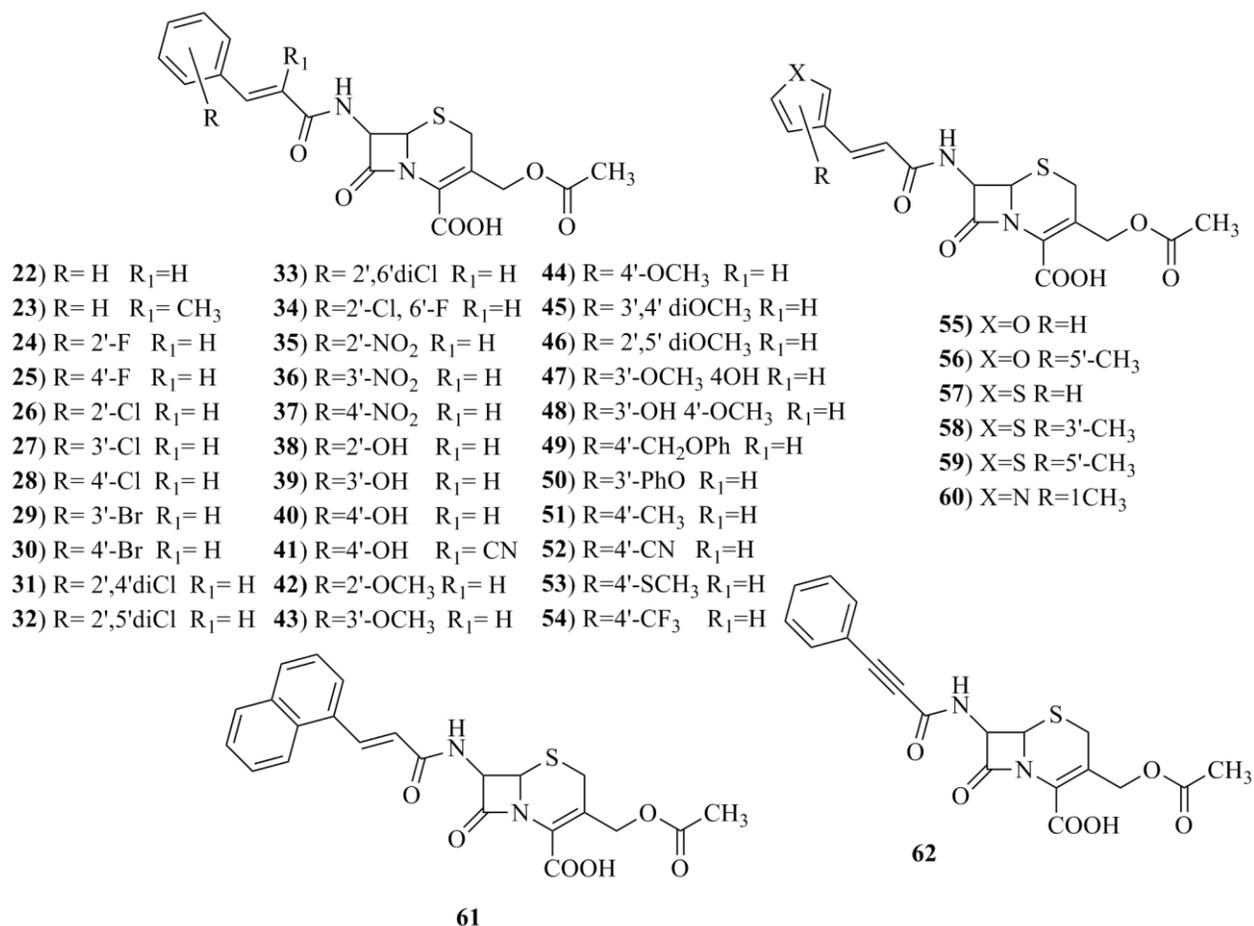


Figura 23. Estructura química de las nuevas cefalosporinas sintetizadas a partir del 7-ACA.

Una vez concluida la acilación, el éster de trimetilsililo de la cefalosporina obtenida se hidrolizó con agua donde el HCl que se genera protona la función amino del núcleo cefalosporánico (7-ACA) que queda sin reaccionar, posibilita su solubilización en medio acuoso y por lo tanto su total eliminación. A continuación se adiciona acetato de etilo lo que permitió extraer en la fase orgánica la cefalosporina resultante en su forma ácida, así como el ácido α,β insaturado en exceso. En la **Figura 24** se muestra un esquema por pasos del método utilizado.

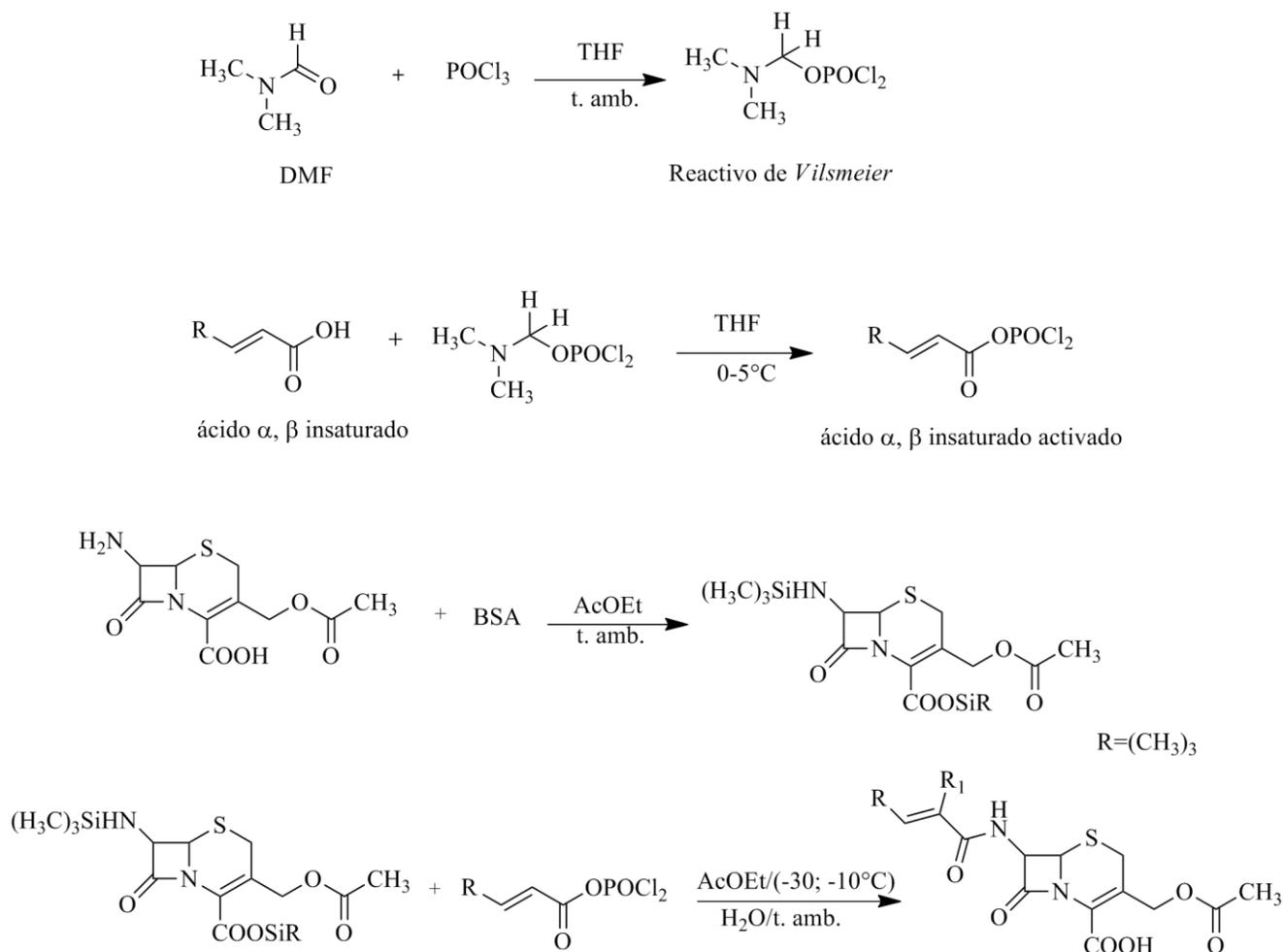


Figura 24. Esquema del método de acilación del 7-ACA con diferentes ácidos α,β insaturados mediante el reactivo de *Vilsmeier*.

Después de eliminar los disolventes, el producto crudo se purificó mediante la extracción del ácido α,β insaturado en exceso con éter dietílico o éter diisopropílico para obtener los compuestos **22-62** con una elevada pureza y rendimientos que variaron entre un 50-87 % en dependencia del ácido α,β insaturado utilizado. En la **Tabla XIII** se muestran los rendimientos de la reacción de los compuestos puros obtenidos en cada caso, así como los resultados del análisis por ESI-MS.

Tabla XIII. Rendimientos y resultados del análisis por ESI-MS de las nuevas cefalosporinas obtenidas a partir del 7-ACA (compuestos 22-62).

Compuesto	R	R ₁	X	Rendimiento (%)	M + 23 (calculada)	M + 23 (por ESI-EM)
22	H	H	-	68	425,41	425,35
23	H	CH ₃	-	50	439,45	439,41
24	2'-F	H	-	67	443,41	443,36
25	4'-F	H	-	60	443,41	443,36
26	2'-Cl	H	-	83	459,86	459,6
27	3'-Cl	H	-	62	459,86	459,6
28	4'-Cl	H	-	72	459,86	459,6
29	3'-Br	H	-	72	504,32	504,31
30	4'-Br	H	-	50	504,32	504,31
31	2',4'-Cl	H	-	71	494,31	494,32
32	2',5'-Cl	H	-	56	494,31	494,32
33	2',6'-Cl	H	-	70	494,31	494,32
34	2'-Cl, 6'-F	H	-	76	477,85	477,84
35	2'-NO ₂	H	-	73	470,42	470,2
36	3'-NO ₂	H	-	67	470,42	470,2
37	4'-NO ₂	H	-	84	470,42	470,2
38	2'-OH	H	-	75	441,41	441,2
39	3'-OH	H	-	52	441,41	441,2
40	4'-OH	H	-	72	441,41	441,2
41	4'-OH	CN	-	65	466,42	466,2
42	2'-OCH ₃	H	-	75	455,44	455,3
43	3'-OCH ₃	H	-	77	455,44	455,3
44	4'-OCH ₃	H	-	81	455,44	455,3
45	3',4'-diOCH ₃	H	-	75	485,46	485,45
46	2',5'-diOCH ₃	H	-	76	485,46	485,45
47	3'-OCH ₃ , 4'-OH	H	-	54	471,44	471,43
48	3'-OH, 4'-OCH ₃	H	-	62	471,44	471,43
49	4'-CH ₂ OPh	H	-	74	531,53	531,52
50	3'-OPh	H	-	50	517,52	517,52
51	4'-CH ₃	H	-	83	439,44	439,30
52	4'-CN	H	-	81	450,42	450,41
53	4'-SCH ₃	H	-	69	471,51	471,50
54	4'-CF ₃	H	-	41	493,07	493,06
55	H	-	O	86	415,37	415,38
56	5'-CH ₃	-	O	86	429,41	429,40
57	H	-	S	87	431,45	431,46
58	3'-CH ₃	-	S	77	445,48	445,47
59	5'-CH ₃	-	S	83	445,48	445,47
60	1'-CH ₃	-	N	20	428,42	428,40
61	-	-	-	28	452,48	452,46
62	-	-	-	61	423,41	423,43

De forma excepcional en la acilación del 7-ACA con los ácidos (2*E*)-3-(1-metil-1*H*-pirrol-2-il)acrílico y (2*E*)-3-(1-naftil)acrílico, si bien se obtuvieron las cefalosporinas correspondientes

(**60** y **61**) con una alta pureza, el rendimiento alcanzado fue sumamente bajo (20 y 28 %, respectivamente). Las posibles causas de este comportamiento anómalo pueden estar relacionadas con el hecho de que durante el proceso de purificación final por extracción del exceso de ácido α,β , insaturado de partida con éter etílico ocurra una mayor solubilización de estas cefalosporinas (**60** y **61**). De forma adicional debido a factores estructurales, la reactividad de estos ácidos acrílicos activados mediante el reactivo de *Vilsmeier* debe ser menor comparada con el resto de los ácidos α,β , insaturados de la serie, como ocurre con el ácido naftilacrilico que contiene dos anillos aromáticos en su estructura. No obstante es necesario efectuar experimentos adicionales para poder alcanzar una conclusión al respecto.

De forma general las nuevas cefalosporinas sintetizadas, tomando como núcleos cefalosporánicos de partida el 7-ACA pueden considerarse químicamente estables ya que la presencia del doble enlace adyacente a un sistema aromático y a un grupo carbonilo genera una intensa conjugación en esta zona de la molécula, factor que proporciona a la función amida unida a C-7 una estabilidad muy superior en comparación a una amida típica.

4.2.2 Síntesis mediante acilación por condensación directa con DCC (compuestos 64-67).

Con el objetivo de ampliar el estudio relacionado con las cefalosporinas derivadas del 7-ACA y ácidos α,β insaturados, así como para aumentar la diversidad estructural de los compuestos de este tipo a incluir en la base de datos QSAR, se consideró conveniente obtener los derivados (**III-VII**) que se muestran en la **Figura 25**.

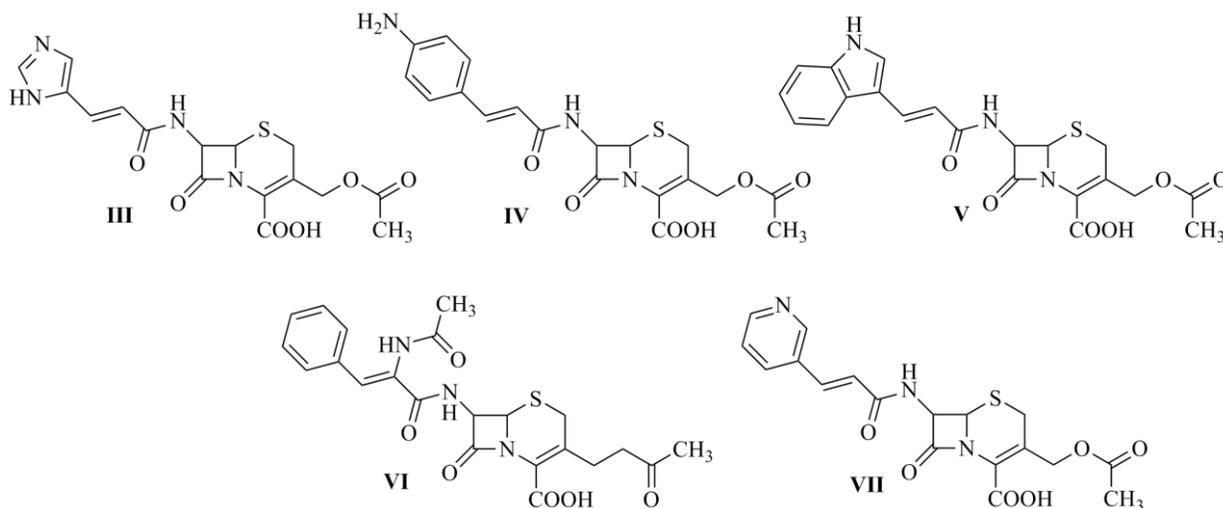


Figura 25. Estructura química de cefalosporinas derivadas del 7-ACA (III-VII).

Los compuestos **III**, **IV**, **V**, y **VII** resultaban de interés debido a que se trata de productos portadores de uno o más átomos de nitrógeno en la cadena acilamino unida a la posición C-7 β y es bien conocido que, por lo general, su presencia en otros antibióticos cefalosporánicos está vinculada no solo a un incremento de la actividad antibacteriana (como ocurre en el caso de las cefalosporinas de tercera generación), sino también a una mayor efectividad frente a cepas de **SaRM**. En el caso del derivado **VI** la presencia de un sustituyente en la posición α del doble enlace permitiría adquirir mayor información sobre la influencia de este tipo de sustitución sobre la actividad antibacteriana.

Inicialmente, la acilación del 7-ACA con los ácidos acrílicos correspondiente se intentó realizar mediante el método del reactivo de *Vilsmeier* utilizado con éxito en la preparación de los compuestos **22-62**. Sin embargo, se comprobó que en algunos casos la reacción no tenía lugar, mientras que en otros los productos de interés se obtenían con muy bajos rendimientos y con elevados niveles de impurezas que no hacían factible su aislamiento y purificación.

Por esta causa, se decidió efectuar la reacción de acilación mediante el método de condensación directa con DCC que transcurre bajo condiciones de reacción más suaves. Para aplicar este

procedimiento de acilación es indispensable bloquear la función ácida del 7-ACA para que la condensación transcurra solamente entre el grupo ácido del derivado α,β insaturado y la función amino del 7-ACA y así evitar, como reacción colateral indeseable, la condensación entre el grupo ácido libre y la función amino de dos moléculas del núcleo cefalosporánico, que conduciría a la generación de impurezas y por lo tanto a la reducción en los rendimientos del producto de interés.

4.2.2.1 Obtención del éster de difenilmetilo del 7-ACA (compuesto 64).

Para bloquear temporalmente la función ácida del 7-ACA, se seleccionó el grupo protector difenilmetilo que puede ser eliminado con posterioridad en un medio ácido donde el núcleo cefalosporánico es estable. El primer paso consistió en la preparación del difenildiazometano (**63**) de acuerdo a la técnica descrita por Adamson y col.⁷⁷ y modificada por López y col.⁷⁸ como se muestra en la **Figura 26**. Este reactivo no se aisló, debido a su relativa inestabilidad, y se utilizó en forma de una disolución con DCM.

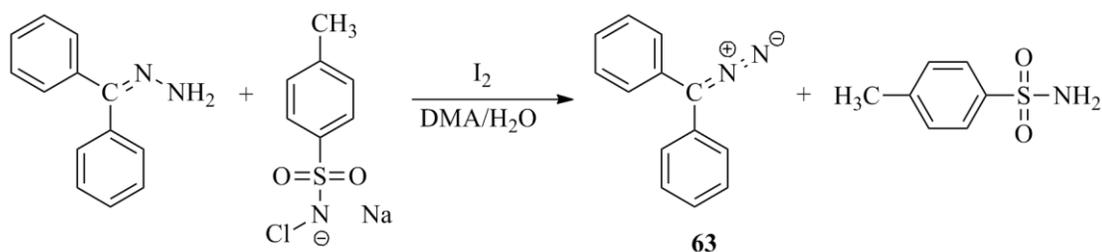


Figura 26. Método de síntesis del difenildiazometano (63).

La etapa de esterificación se efectuó por tratamiento del 7-ACA con el difenildiazometano (**63**) en una mezcla de metanol-DCM como disolventes según se muestra en la **Figura 27**.

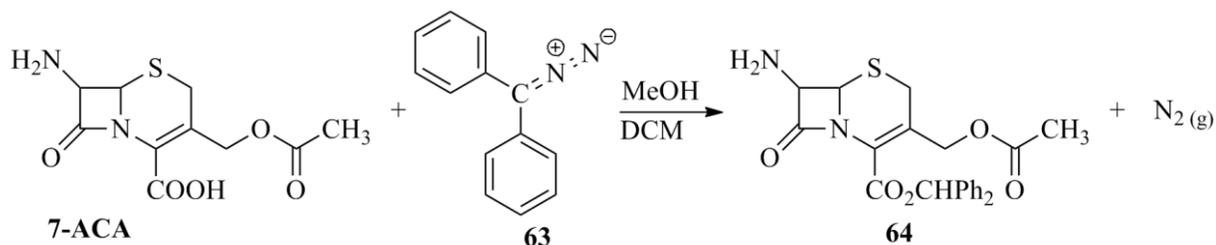


Figura 27. Síntesis del 7 β -amino-3-acetoximetil-3-cefem-4-carboxilato de difenilmetilo (64).

La reacción transcurre en un medio heterogéneo, pues el 7-ACA es insoluble en estos disolventes y solo una parte del mismo se transforma en el éster de difenilmetilo. Luego de eliminar el 7-ACA sin reaccionar (se adiciona éter dietílico a la mezcla reaccionante para garantizar su total precipitación) los disolventes se evaporaron para obtener **64** con un rendimiento del 57 % y un alto grado de pureza, según se comprobó por RMN (**Tablas XIV y XV**).

4.2.2.2 Acilación del éster de difenilmetilo del 7-ACA (64) con los ácidos α,β insaturados.

Obtención de intermedios cefalosporánicos protegidos (compuestos 65-67).

El objetivo de esta etapa consistió en acilar mediante condensación directa el núcleo cefalosporánico protegido (**64**) con los ácidos α,β -insaturados ácido tritilados (**19, 20, 21**) sintetizados previamente como se explico en el epígrafe **4.3.1**, y con los ácidos (2*E*)-3-piridin-3-il acrílico y (2*Z*)-2-(acetilamino)-3-fenilacrílico mediante el uso THF como disolvente y DCC como agente condensante.

El mecanismo a través del cual transcurre el proceso se muestra en la **Figura 28**. La adición del ácido carboxílico al enlace C=N de la carbodiimida, genera un derivado de la urea *O*-acilado (agente acilante) ya que existe una fuerte tendencia para la eliminación de la unidad de urea con la formación del grupo carbonilo amídico. Durante el proceso se genera como subproducto la dicitclohexilurea (DCU), que dada su insolubilidad precipita de la mezcla y constituye un factor esencial para que el equilibrio se desplace hacia la formación de los productos.

Como resultado del estudio realizado, se sintetizaron los intermedios cefalosporánicos protegidos derivados de los ácidos (2*E*)-3-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il (**65**), (2*E*)-3-piridin-3-il (**66**) y (2*Z*)-2-(acetilamino)-3-fenilacrílicos (**67**) que se muestran en la **Figura 29**. Estos compuestos son los precursores de las cefalosporinas **III, VII y VI** respectivamente y su obtención constituye una novedad, debido a que no están referenciados en la literatura consultada hasta el presente.

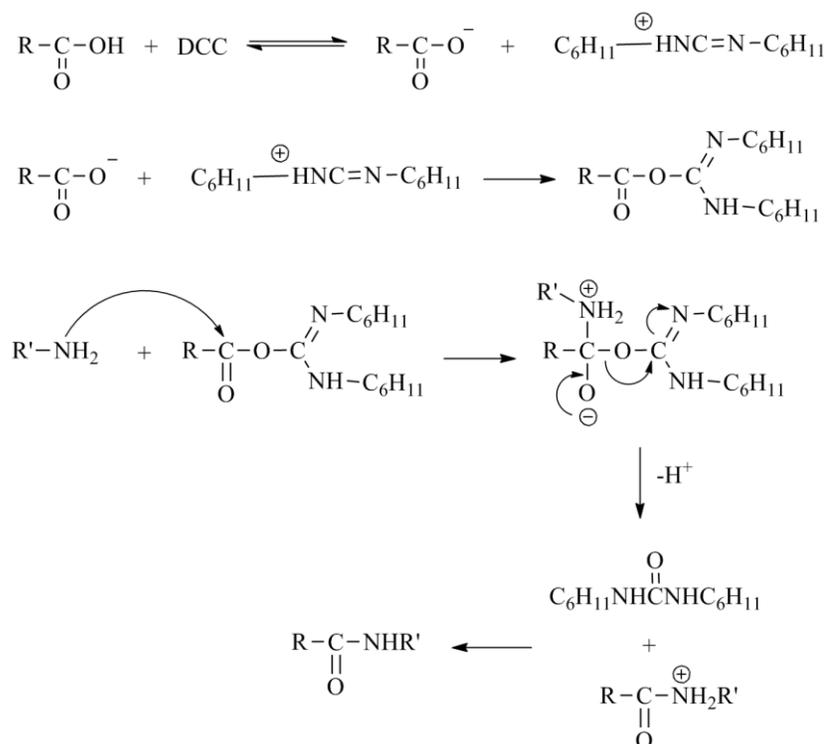


Figura 28. Mecanismo de la condensación directa con DCC.

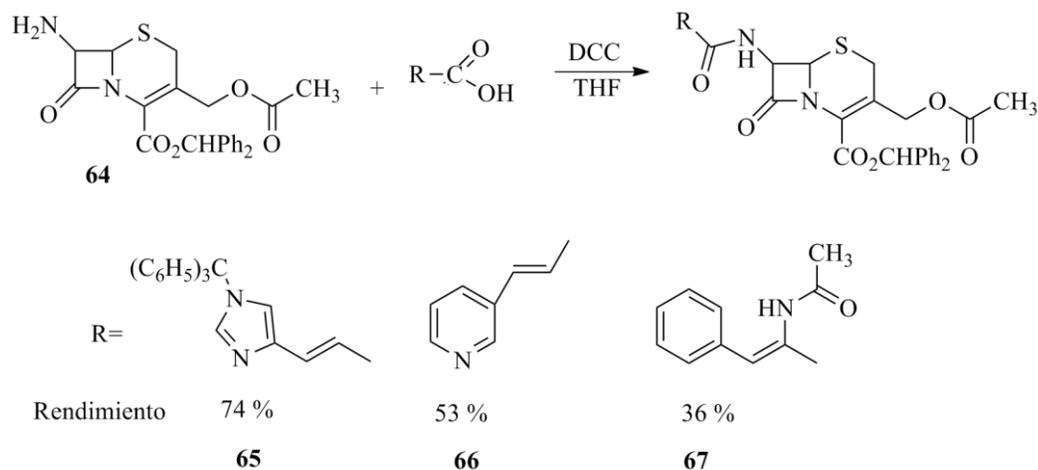


Figura 29. Método de síntesis de los nuevos intermedios cefalosporánicos (65-67).

La reacción de obtención de los productos derivados de los ácidos (2*E*)-3-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il (**21**) y (2*E*)-3-piridin-3-il acrílicos concluyó al término de 24 h a temperatura ambiente según se verificó por CCD. Sin embargo, durante la acilación de **64** con el ácido (2*Z*)-2-(acetilamino)-3-fenilacrílico al término de 24 h (bajo las mismas condiciones) aún quedaba **64** sin reaccionar, a

pesar de que este compuesto constituía la sustancia limitante del proceso, mientras que todo el ácido acrílico se había consumido.

El análisis por CCD de la mezcla reaccionante posibilitó detectar que inicialmente se formaba un intermediario con un alto valor de Rf, el cual con posterioridad se consumía para generar el producto de interés (de menor Rf). En este caso es probable que la reacción no transcurra a través de la condensación directa de ambos reactivos, sino que en primer lugar se forma el anhídrido del ácido (2Z)-2-(acetilamino)-3-fenilacrílico el cual constituye el agente acilante que posteriormente reacciona con **64** para producir el compuesto de interés (**67**).

La técnica de aislamiento y purificación de los compuestos fue similar para todos los casos. Luego de eliminar la DCU que se forma, los productos crudos se obtuvieron por evaporación de los disolventes bajo presión reducida y se purificaron por cromatografía flash.

Los intentos de sintetizar los intermediarios cefalosporánicos derivados de los ácidos (2E)-3-[4-(tritolamino)fenil]acrílico (**19**) y (2E)-3-(1-tritol-1H-indol-3-il)acrílico (**20**) no condujeron a los resultados esperados, ya que en ninguno de los casos se observó por CCD la transformación de los compuestos de partida ni la formación de DCU aún después de transcurridas 48 h.

El último paso para la obtención de las cefalosporinas III-VII es la eliminación de los grupos protectores difenilmetilo y trifenilmetilo de los compuestos 65-67 que se efectuó de acuerdo al procedimiento usual, el cual consiste en tratar el derivado protegido disuelto en DCM con ácido trifluoroacético en presencia de anisol como auxiliar de la desprotección, seguido por reacción del trifluoroacetato formado con hidrógenocarbonato de sodio en medio acuoso con la finalidad de destruir la sal formada y generar la cefalosporina de interés.

Como resultado, el análisis por CCD de los productos obtenidos reveló la presencia de una mezcla compleja donde no era posible identificar al compuesto de interés y por lo tanto proceder a su aislamiento con posibilidades de éxito.

Por este motivo, se decidió detener temporalmente los esfuerzos encaminados hacia la síntesis de las cefalosporinas III-VII con el objetivo de estudiar las causas del comportamiento observado y buscar un procedimiento de desprotección más adecuado.

4.2.3 Caracterización estructural de las nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACA y diferentes ácidos α,β insaturados (compuestos 22-62) y de los intermedios cefalosporánicos sintetizados, (compuestos 64-67)

En las **Tablas XIV y XV** se muestran los corrimientos químicos asignados a los protones y átomos de carbono de los productos sintetizados. En todos los casos los espectros registrados de RMN ^1H , RMN ^{13}C se correspondieron con las estructuras químicas de la cefalosporinas obtenidas.

A partir de los resultados mostrados en la **Tabla XIV** se puede concluir que la introducción del fragmento molecular correspondiente al ácido α,β insaturado tiene muy poca influencia sobre los corrimientos químicos de los protones pertenecientes al núcleo cefalosporánico que son típicos para esta clase de compuestos. Así para todos los compuestos, aparece un singulete que integra 3 protones entre δ 2,03-2,05 ppm asignable al grupo CH_3 del fragmento acetoximetilo. Los dos protones ubicados sobre los átomos de carbono C-2 y C-13 resuenan, en todos los casos, como sistemas AB con constantes de acoplamiento de $^2J_{\text{H-2}}=18$ Hz $^2J_{\text{H-13}}=13$ Hz, respectivamente, lo que indica que estos protones no son equivalentes. El protón unido a la posición C-6 (H-6) se observa como un doblete a δ 5,14-5,21 ppm con una $^3J_{6-7}=5$ Hz mientras que el protón unido a la posición C-7 (H-7) aparece como un doblete de doblete localizado entre δ 5,77 y 5,90 ppm con $^3J_{6-7}=5$ Hz y $^3J_{\text{NH-7}}=8$ Hz. La señal correspondiente al protón de la amida formada (NH) se observa como un doblete en el intervalo de δ 8,78-9,87 ppm, con una $^3J_{\text{NH-7}}=8$ Hz.

La señales de los protones pertenecientes al doble enlace alquílico (H-10 y H-11), resuenan como dobletes en los intervalos de δ 6,38-6,99 ppm y δ 7,26-8,28 ppm, respectivamente. El valor de

$^3J_{10-11}=16$ Hz observado indica que todos los compuestos sintetizados se encuentran en la forma *trans* isomérica. Estas señales no se detectan en el compuesto **67** debido a la presencia del grupo acetamida enlazado a la posición α del doble enlace alquílico y solo se observa el singlete del protón enlazado a la posición β de dicha insaturación.

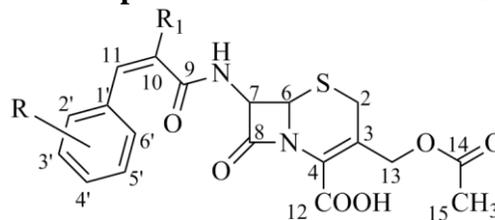
En los espectros registrados, además de observarse las señales características de los protones de los ácidos α,β insaturados acoplados al núcleo cefalosporánico, aparecen las señales correspondientes a los grupos enlazados a estos anillos. Así, en los compuestos del **42** al **48** se observan los singletes pertenecientes a los grupos metoxilo de la moléculas, en el compuesto **49** se detecta la señal del CH₂ del grupo 4'-benciloxi y en los compuestos **23**, **51**, **53**, **56**, **58**, **59** y **60** los singletes asignables a los protones de los grupos metilo ubicados en las diferentes posiciones de estas moléculas.

De forma adicional en los compuestos **64-67** se observó la presencia en el espectro de las señales pertenecientes a los protones aromáticos del grupo difenilmetilo, así como de un singlete a valores de δ 6,92-6,95 ppm correspondiente al CH de este grupo protector que bloquea la función ácida del núcleo cefalosporánico en estos derivados.

De los resultados del RMN ¹³C, (Tabla XV) y DEPT también se puede concluir que el fragmento del ácido α,β insaturado ejerce una influencia escasa o nula sobre los átomos de carbono del núcleo cefalosporánico. Así, todos resuenan en un intervalo muy estrecho con independencia del compuesto de que se trate: C-2 entre δ 25-26 ppm; C-3 entre δ 123-124 ppm; C-4 entre δ 126-127 ppm; C-6 entre δ 57-58 ppm; C-7 entre δ 59-60 ppm; C-8 entre δ 163-165 ppm; C-12 entre δ 162-163 ppm; C-13 entre δ 62-63 ppm; C-14 entre δ 169-171 ppm y C-15 entre δ 20-21 ppm. El átomo de carbono del grupo carbonilo de la amida formada tampoco muestra variaciones significativas y se observa en el rango de δ 164-166 ppm, con la excepción de los compuestos α sustituidos **23** y **41**, así como para el caso del derivado sintetizado a partir del ácido 3-fenil 2-propiólico (**62**).

Los espectros de RMN ^{13}C además de exhibir las señales típicas de los átomos de carbono del fragmento molecular del ácido α,β insaturado acoplado al núcleo cefalosporánico, muestran las correspondientes a los átomos del doble enlace alquílico (C-10 y C-11), las cuales sí son notablemente afectadas por el sistema aromático enlazado a la posición β y finalmente las señales pertenecientes a los sustituyentes ubicados en dichos sistemas. Así, en los compuestos del **42** al **48** se observan las señales de los grupos metoxilo, en el compuesto **49** se detecta la señal asignable al CH_2 del grupo 4'-benciloxi, en los compuestos **41** y **52** la señal del grupo ciano y en los compuestos **23**, **51**, **53**, **56**, **58**, **59** y **60** las señales pertenecientes a los CH_3 unidos en las diferentes posiciones del fragmento del ácido α,β insaturado.

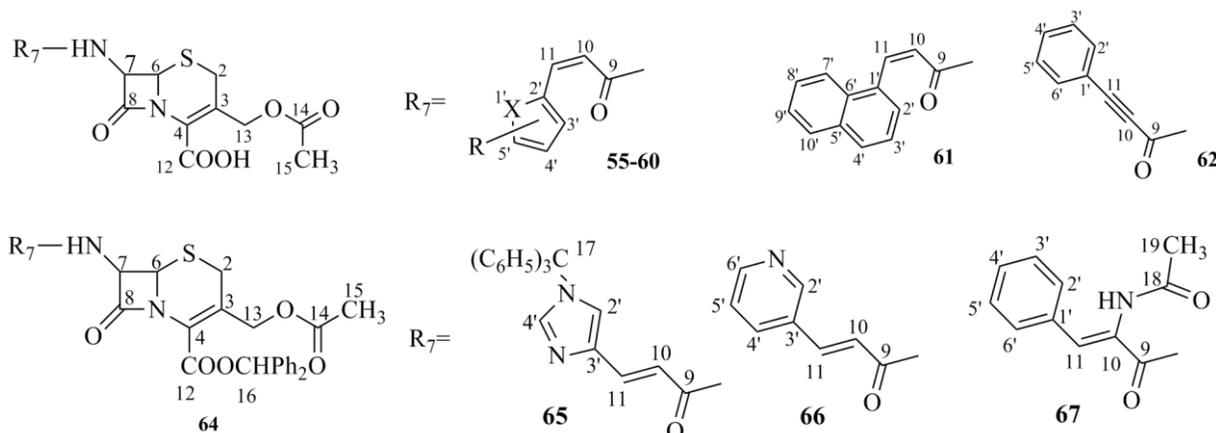
De forma adicional en los compuestos **64-67** se observaron las señales tanto aromáticas como alifáticas de los átomos de carbono de los grupos protectores introducidos. Así, en el compuesto **65** se registran dos señales a δ 78,78 y 74,95 ppm correspondientes a los átomos de carbono alifáticos de los grupos difenilmetilo y trifenilmetilo presentes en la molécula, mientras que en los compuestos **64**, **66** y **67** se detecta en el intervalo de δ 78-79 ppm la señal del CH del grupo difenilmetilo. En el espectro de todos los compuestos se registraron las señales pertenecientes a todos los grupos carbonilo existentes en las estructuras, en particular el asignable al carbonilo de las amidas formadas ($\sim \delta$ 165 ppm). En el producto **67** se observan señales adicionales de carbonilo a δ 169,31 ppm y de metilo a δ 22,69 ppm, las cuales corresponden al grupo acetamido enlazado a la posición α del doble enlace alquílico.

Tabla XIV. Datos de RMN¹H (ppm) de las nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACA (22-62) y de los intermedios sintetizados (64-67).

compuestos 22-54

Compuesto	NH ^a	H-11	H-10 ^d	Aromáticos	H-7 ^f	H-6 ^g	H-13 ^h	H-2 ⁱ	CH ₃ ^j	R
22	9,08	c	6,78	7,35-7,63 (6H,m) ^c	5,86	5,17	5,03 y 4,71	3,66 y 3,50	2,03	-
23	9,03	7,30 (s,1H)	-	7,37-7,45 (5H,m)	5,78	5,16	5,00 y 4,70	3,65 y 3,50	2,03	-
24	9,19	7,59	6,88	7,20-7,73 (4H,m)	5,85	5,17	5,03 y 4,71	3,66 y 3,51	2,03	-
25	9,04	7,54	6,72	7,17-7,78 (4H,m)	5,85	5,17	5,02 y 4,72	3,66 y 3,50	2,03	-
26	9,10	c	6,77	7,45-7,68 (5H,m) ^c	5,85	5,17	5,02 y 4,71	3,66 y 3,50	2,03	-
27	9,09	c	6,82	7,33-7,74 (5H,m) ^c	5,86	5,17	5,02 y 4,71	3,66 y 3,50	2,02	-
28	9,20	7,82 ^b	6,83	7,35-7,76 (4H,m)	5,86	5,18	5,03 y 4,71	3,67 y 3,52	2,03	-
29	9,07	7,51	6,82	7,32-7,83 (4H,m)	5,85	5,17	5,02 y 4,70	3,66 y 3,51	2,03	-
30	9,02	7,58	6,79	7,44-7,68 (4H,m)	5,84	5,17	5,03 y 4,73	3,66 y 3,50	2,04	-
31	9,22	c	6,83	7,47-7,81 (4H,m) ^c	5,85	5,18	5,03 y 4,71	3,67 y 3,51	2,03	-
32	9,08	7,71	6,89	7,42-7,81 (3H,m)	5,85	5,18	5,03 y 4,73	3,67 y 3,51	2,04	-
33	9,25	7,59	6,87	7,32-7,66 (3H,m)	5,86	5,18	5,03 y 4,73	3,67 y 3,51	2,04	-
34	9,33	7,67 ^b	6,99	7,29-7,53 (3H,m)	5,86	5,18	5,02 y 4,71	3,67 y 3,51	2,03	-
35	9,24	c	6,74	7,60-8,12 (5H,m) ^c	5,87	5,18	5,02 y 4,70	3,67 y 3,51	2,03	-
36	9,15	c	6,96	7,58-8,48 (5H,m) ^c	5,87	5,18	5,03 y 4,71	3,67 y 3,50	2,03	-
37	9,24	7,65	6,95	7,76-8,33 (4H,m)	5,87	5,19	5,03 y 4,71	3,67 y 3,50	2,03	-
38	8,95	7,75 ^b	6,81	6,75-7,50 (4H,m)	5,83	5,16	5,02 y 4,73	3,65 y 3,49	2,04	10,03 (bs,1H,OH)
39	9,05	7,45 ^b	6,71	6,87-7,32 (4H,m)	5,86	5,17	5,01 y 4,71	3,67 y 3,50	2,03	9,64 (br s,1H,OH)
40	8,97	c	6,57	6,84-7,44 (5H,m) ^c	5,85	5,18	5,01 y 4,71	3,69 y 3,51	2,04	9,90 (br s,1H,OH)
41	9,36	8,13 (s,1H)	-	6,97-7,89 (4H,m)	5,77	5,21	5,02 y 4,73	3,68 y 3,53	2,05	-
42	9,06	7,74 ^b	6,83	6,92-7,58 (4H,m)	5,85	5,16	5,02 y 4,70	3,66 y 3,50	2,03	3,86 (s,3H,OCH ₃)
43	9,05	7,51 ^b	6,78	6,92-7,42 (4H,m)	5,86	5,17	5,02 y 4,70	3,66 y 3,51	2,03	3,78 (s,3H,OCH ₃)
44	8,96	c	6,63	6,94-7,58 (5H,m) ^c	5,85	5,16	5,02 y 4,71	3,66 y 3,50	2,03	3,79 (s,3H,OCH ₃)
45	8,84	7,48 ^b	6,67	6,96-7,20 (3H,m)	5,84	5,16	5,03 y 4,74	3,65 y 3,49	2,04	3,80 (s,3H,OCH ₃), 3,81 (s,3H,OCH ₃)
46	8,95	7,71	6,84	6,92-7,15 (3H,m)	5,83	5,16	5,03 y 4,73	3,65 y 3,49	2,04	3,75 (s,3H,OCH ₃), 3,82 (s,3H,OCH ₃)
47	8,90	7,44 ^b	6,60	6,77-7,18 (3H,m)	5,85	5,15	5,02 y 4,71	3,66 y 3,50	2,03	3,81 (s,3H,OCH ₃), 9,51 (br s,1H,OH)
48	8,94	7,39 ^b	6,54	6,91-7,04 (3H,m)	5,84	5,15	5,02 y 4,70	3,66 y 3,50	2,03	3,80 (s,3H,OCH ₃), 9,23 (br s,1H,OH)
49	8,89	7,43	6,64	7,00-7,60 (9H,m)	5,84	5,15	5,03 y 4,73	3,66 y 3,50	2,04	5,15 (s,2H,CH ₂)
50	8,97	7,51 ^b	6,73	6,98-7,45 (9H,m)	5,82	5,16	5,02 y 4,72	3,65 y 3,49	2,03	-
51	9,03	c	6,72	7,18-7,61 (5H,m) ^c	5,85	5,16	5,02 y 4,71	3,66 y 3,50	2,03	2,32 (s,3H,CH ₃)
52	9,11	7,59	6,90	7,70-7,95 (4H,m)	5,84	5,17	5,03 y 4,73	3,66 y 3,50	2,03	-
53	9,03	7,42	6,72	7,25-7,55 (4H,m)	5,85	5,16	5,02 y 4,70	3,66 y 3,50	2,03	2,50 (s,2H,SCH ₂)
54	9,11	7,61	6,91	7,75-7,80 (4H,m)	5,85	5,18	5,03 y 4,73	3,67 y 3,50	2,03	-

Tabla X1V. Datos de RMN¹H (ppm) de las nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACA (22-62) y de los intermedios sintetizados (64-67) (continuación).



Comp.	NH ^a	H-11	H-10 ^d	Aromáticos	H-7 ^f	H-6 ^g	H-13 ^h	H-2 ⁱ	CH ₃ ^j	H-16	R
55	9,09	7,34 ^b	6,54	6,60 (1H, <i>dd</i>); 6,84 (1H, <i>d</i>); 7,81 (1H, <i>d</i>)	5,84	5,15	5,02 y 4,70	3,66 y 3,50	2,03	-	-
56	8,91	7,26 ^b	6,47	6,23 (1H, <i>d</i>); 6,71 (1H, <i>d</i>)	5,82	5,14	5,02 y 4,73	3,65 y 3,49	2,04	-	2,32 (3H, <i>s</i> ,5' ^c CH ₃)
57	8,96	7,69 ^b	6,54	7,12(1H, <i>dd</i>); 7,42(1H, <i>d</i>); 7,63(1H, <i>d</i>)	5,83	5,15	5,02 y 4,73	3,65 y 3,49	2,03	-	-
58	8,98	7,66 ^b	6,47	6,97 (1H, <i>d</i>); 7,53(1H, <i>d</i>)	5,83	5,15	5,02 y 4,72	3,66 y 3,50	2,04	-	2,30 (3H, <i>s</i> ,3' ^c CH ₃)
59	8,91	7,59 ^b	6,38	6,82 (1H, <i>d</i>); 7,21(1H, <i>d</i>)	5,82	5,14	5,02 y 4,73	3,65 y 3,49	2,04	-	2,47 (3H, <i>s</i> ,5' ^c CH ₃)
60	8,78	7,44 ^b	6,42	6,09 (1H, <i>dd</i>); 6,54 (1H, <i>d</i>); 6,93 (1H, <i>d</i>)	5,83	5,14	5,02 y 4,72	3,65 y 3,49	2,04	-	3,69 (3H, <i>s</i> ,1' ^c CH ₃)
61	9,19	8,28	6,85	7,42-8,26 (7H, <i>m</i>)	5,90	5,20	5,03 y 4,73	3,67 y 3,52	2,04	-	-
62	9,87	-	-	7,45-7,63 (5H, <i>m</i>)	5,78	5,15	5,01 y 4,72	3,65 y 3,51	2,03	-	-
64	9,04	-	-	7,23-7,52 (10H, <i>m</i>)	5,04	4,90	4,61 y 4,86	3,49 y 3,65	1,97	6,92	-
65	9,02	^c	6,70	7,0-7,6 (28H, <i>m</i> , + H-2' + H-4' + H-11)	5,91	5,19	4,65 y 4,88	3,55 y 3,69	1,97	6,94	-
66	9,22	7,62	6,90	7,25-7,57 (11H, <i>m</i> + H-5')	5,97	5,24	4,65 y 4,89	3,58 y 3,72	1,99	6,95	8,03, 8,58 y 8,81 (aromáticos).
67	9,06	7,03	-	7,20-7,72 (15H, <i>m</i>)	5,86	5,21	4,65 y 4,87	3,57 y 3,69	1,98	6,94	2,01 (1H, <i>s</i> ,H-19); 9,48 (1H, <i>s</i> ,NH)

a Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete con ³J_{NH-7}=8 Hz.

b Esta señal integra 1H y aparece como un doblete con ³J₁₀₋₁₁=16 Hz.

c En estos compuestos el protón H-11 está solapado con los protones aromáticos.

d Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete con ³J₁₀₋₁₁ =16 Hz.

e La señal del protón H-11 está incluida dentro de los protones aromáticos.

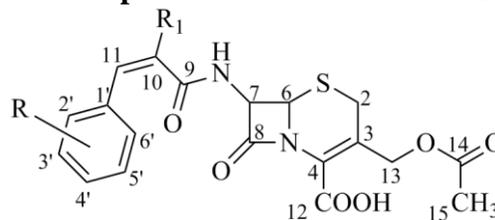
f Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete de doblete con ³J_{NH-7}=8 Hz y ³J₆₋₇=5 Hz.

g Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete con ³J₆₋₇=5 Hz.

h Para todos los compuestos esta señal integra 2H y aparece como un sistema AB con ²J_{H-13}=13 Hz.

i Para todos los compuestos esta señal integra 2H y aparece como un sistema AB con ²J_{H-2}=18 Hz.

j Para todos los compuestos esta señal integra 3H y aparece como un singulete, exceptuando el compuesto **20** donde integra 6H debido a que los protones del grupo α-CH₃ resuenan al mismo valor de δ.

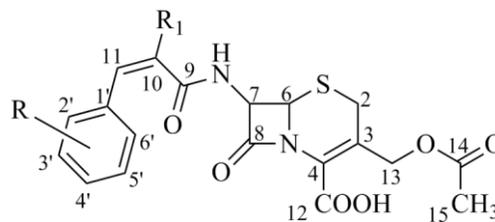
Tabla XV. Datos de RMN ^{13}C (ppm) de las nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACA (22-62) y de los intermedios sintetizados (64-67).

compuestos 22-54

C	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
2	25,55	25,46	25,52	25,53	25,58	25,55	25,57	25,56	25,44	25,61	25,49	25,46	25,53	25,56	25,58	25,58	25,47
3	123,50	122,85	123,39	123,42	123,62	123,55	123,49	123,54	123,39	123,56	123,62	123,55	123,60	123,51	123,64	123,54	123,27
4	126,31	126,66	126,37	126,32	126,26	126,28	126,32	126,28	126,27	126,38	126,21	126,18	126,18	126,30	126,30	126,27	126,32
6	57,45	57,67	57,37	57,40	57,37	57,38	57,43	57,37	57,29	57,39	57,20	57,19	57,31	57,33	57,35	57,35	57,46
7	59,19	59,68	59,19	59,17	59,22	59,15	59,19	59,15	59,13	59,26	59,13	59,18	59,22	59,15	59,17	59,23	59,19
8	164,84	164,24	164,61	164,76	164,66	164,75	164,80	164,75	164,52	164,63	164,36	164,33	164,54	164,62	164,72	164,60	164,76
9	165,40	169,63	165,19	165,33	164,97	165,08	165,23	165,04	165,08	164,85	164,55	165,46	165,01	164,65	164,89	164,78	165,97
10	120,41	131,09	124,98	120,28	123,46	122,07	121,16	122,05	121,23	124,15	125,13	128,59	126,24	124,67	124,07	123,85	119,21
11	140,59	133,77	132,96	139,35	135,81	139,00	139,27	138,91	139,12	134,67	134,29	133,83	130,33	135,89	138,25	138,22	136,36
12	162,81	162,87	162,72	162,76	162,80	162,81	162,84	162,81	162,61	162,87	162,60	162,58	162,78	162,81	162,83	162,79	162,65
13	62,65	62,69	62,63	62,62	62,64	62,65	62,68	62,65	62,51	62,71	62,50	62,48	62,63	62,65	62,67	62,64	62,53
14	170,14	170,16	170,12	170,11	170,15	170,16	170,19	170,16	169,93	170,21	169,95	169,94	170,15	170,16	170,18	170,14	169,96
15	20,51	20,52	20,48	20,45	20,50	20,52	20,55	20,53	20,33	20,58	20,33	20,33	20,51	20,52	20,53	20,49	20,34
16	-	14,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A R O M A T I C O S	127,69 (2C)	127,92	116,08	115,90 (2C)	127,63	126,07	129,03 (2C)	122,24	122,85	128,15	127,09	128,95 (2C)	115,43	124,90	121,78	124,07 (2C)	116,04
	128,95 (2C)	128,40 (2C)	122,10	129,86 (2C)	127,78	127,43	129,41 (2C)	126,47	129,45 (2C)	128,86	130,56	130,47	120,97	128,77	123,26	128,74 (2C)	119,79
	129,84	129,27 (2C)	123,24	131,11	129,99	129,44	133,45	130,29	131,77 (2C)	129,52	131,47	131,58 (2C)	127,29	129,78	130,51	141,25	121,26
	134,48	135,67	129,31	162,85	131,24	130,78	134,31	131,06	133,71	131,41	131,82	133,71	131,49	130,50	133,98	147,68	128,17
		131,66		132,28	133,67		132,33			134,29	132,20		134,55	133,91	136,35		130,69
		160,50		133,45	136,77		137,05			134,90	134,17		161,07	148,24	148,24		156,36

16: átomo de carbono del grupo $\alpha\text{-CH}_3$

Tabla XV. Datos de RMN ^{13}C (ppm) de las nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACA (22-62) y de los intermedios sintetizados (64-67) (continuación).

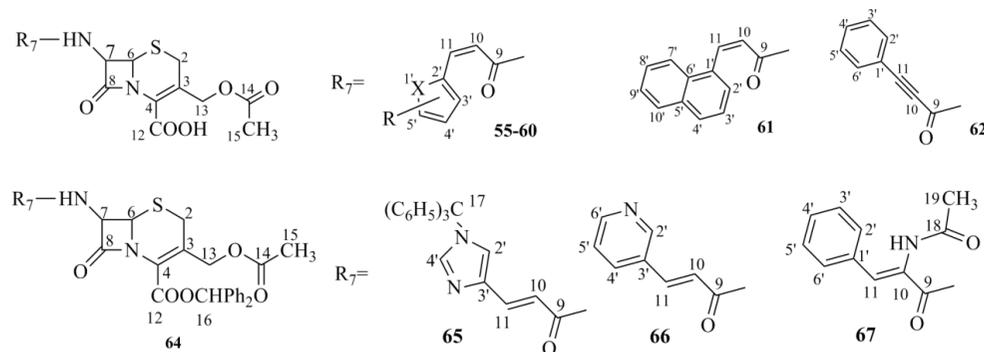


compuestos 22-54

C	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
2	25,56	25,55	25,48	25,55	25,55	25,57	25,49	25,50	25,63	25,59	25,44	25,44	25,57	25,47	25,45	25,44
3	123,36	123,80	123,53	123,43	123,55	123,44	123,46	123,54	123,50	123,37	123,27	123,43	123,49	123,33	123,40	123,29
4	126,39	126,30	126,29	126,31	126,28	126,33	126,34	126,55	126,41	126,43	126,32	126,22	126,32	126,37	126,24	126,36
6	57,46	57,54	57,34	57,50	57,44	57,53	57,45	57,44	57,60	57,57	57,40	57,29	57,49	57,27	57,37	57,26
7	59,18	59,18	59,93	59,20	59,17	59,19	59,17	59,21	59,21	59,23	59,13	59,11	59,21	59,16	59,14	59,14
8	164,86	165,04	163,40	164,92	164,86	165,03	164,78	164,71	165,10	165,05	164,73	164,55	164,90	164,40	164,67	164,41
9	165,44	165,84	162,78	165,84	165,37	165,71	165,62	165,72	165,88	165,77	165,57	165,06	165,56	164,78	165,38	164,85
10	119,00	116,75	116,64	120,69	120,73	117,83	118,18	121,28	117,13	117,65	117,98	121,22	119,36	123,80	119,32	123,17
11	140,83	140,74	150,94	135,71	140,50	140,36	140,44	135,39	141,04	140,85	140,08	139,65	140,56	138,56	139,88	138,68
12	162,88	162,89	162,91	162,84	162,83	162,86	162,64	162,73	162,89	162,92	162,64	162,61	162,82	162,64	162,62	162,61
13	62,69	62,66	62,62	62,65	62,65	62,69	62,63	62,62	62,73	62,75	62,51	62,50	62,66	62,53	62,51	62,53
14	170,19	170,20	170,14	170,16	170,16	170,20	169,95	170,03	170,21	170,24	169,95	169,95	170,14	169,96	169,95	169,95
15	20,54	20,51	20,52	20,52	20,52	20,54	20,32	20,39	20,56	20,58	20,31	20,33	20,50	20,34	20,33	20,33
17	-	-	100,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	118,39	-	-
18	-	-	-	55,51	55,06	55,25	55,45	55,98	55,51	55,60	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	55,33	55,38	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	69,23	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,92	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,17	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	123,87
A	113,75	115,78 (2C)	116,29 (2C)	111,69	112,77	114,43 (2C)	110,39	112,69	111,02	112,09	115,16 (2C)	116,71	127,67 (2C)	111,64	125,75 (2C)	138,46
R	117,13	125,50	122,63	120,85	115,77	127,06	111,89	113,04	115,72	113,36	127,23	119,73	129,54 (2C)	128,22 (2C)	127,98 (2C)	128,15 (2C)
O	120,15	129,50 (2C)	133,06 (2C)	122,81	119,97	129,37 (2C)	121,44	116,61	121,86	120,82	129,16 (2C)	122,90	131,75	132,66 (2C)	130,87	125,63 (2C)
M	129,99	159,22	162,08	128,25	130,01	160,63	127,34	123,17	126,03	127,39	159,59	130,45	139,68	139,04	140,59	129,39
A	135,96			131,25	135,91		148,91	152,10	147,83	146,74		136,42				
T	157,69			157,73	159,53		150,45	153,09	148,73	149,60		157,09				
I																
C																
O																
S																

17: átomo de carbono de los grupos CN; **18** y **19:** átomo de carbono de los grupos OCH₃; **20:** átomo de carbono del CH₂ del grupo OCH₂Ph; **21:** átomo de carbono del grupo CH₃; **22:** átomo de carbono del grupo 4'-SCH₃. **23:** átomo de carbono del grupo CF₃.

Tabla XV. Datos de RMN ^{13}C (ppm) de las nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACA (22-62) y de los intermedios sintetizados (64-67) (continuación).



C	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65	66	67
2	25,64	25,47	25,45	25,53	25,46	25,46	25,57	25,58	25,38	25,89	25,87	25,87
3	123,59	123,53	123,56	123,53	123,49	123,26	123,25	123,84	125,45	126,35	126,26	125,64
4	126,40	126,25	126,22	126,26	126,23	126,31	126,51	126,37	125,21	125,03	124,97	125,23
6	57,54	57,42	57,34	57,43	57,39	57,50	57,46	57,13	59,07	57,80	57,58	57,81
7	59,25	59,13	59,10	59,15	59,12	59,16	59,26	59,07	63,64	59,16	59,17	59,47
8	164,94	164,73	164,66	164,84	164,70	164,95	164,74	163,50	169,99	165,50	165,01	164,59
9	165,46	165,40	165,08	165,31	165,22	166,01	165,42	152,66	-	165,96	165,17	165,76
10	117,45	116,04	118,97	118,29	117,65	114,68	123,13	82,78	-	117,55	122,25	129,20
11	127,91	127,57	133,40	131,57	133,69	128,89	137,10	85,15	-	127,86	137,40	111,49
12	162,93	162,64	162,62	162,76	162,63	162,66	162,83	162,72	160,24	160,58	160,50	160,53
13	62,76	62,52	62,50	62,60	62,50	62,53	62,68	62,60	62,57	62,50	62,45	62,47
14	170,33	169,95	169,96	170,10	169,95	169,96	170,15	170,11	170,51	170,08	170,00	170,01
15	20,60	20,33	20,33	20,45	20,33	20,33	20,50	20,49	20,34	20,40	20,37	20,37
16	-	-	-	-	-	-	-	-	78,57	78,78	78,74	78,77
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	74,95	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	169,31
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,69
24	-	13,31	-	13,67	15,14	33,87	-	-	-	-	-	-
A	112,61	108,81	128,22	127,00	126,70	108,45	123,40	119,34	-	124,28	123,98	127,82
R	115,03	115,89	128,37	131,39	131,62	110,78	124,72	128,92 (2C)	-	133,32	130,26	128,51 (2C)
O	145,32	149,27	131,04	133,16	137,32	126,82	125,70	130,56	-	136,98	134,05	129,45 (2C)
M	150,71	154,41	139,36	140,42	142,49	128,82	126,25	132,26 (2C)	-	-	149,31	133,81
A							126,95				150,48	
T							128,64					
I							129,94					
C							130,76					
O							131,57					
S							133,31					

24: átomos de carbono de los grupos CH_3 .

Para todas las nuevas cefalosporinas obtenidas (**22-62**) se registraron los espectros de masa donde se comprobó la presencia del pico molecular correspondiente a cada compuesto como se observa en la **Tabla XIII**.

En los anexos **4a**, **4b** y **4c** se incluyen los espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT y masa del compuesto **23**, que corresponde al derivado de la serie sin sustituir, como ejemplo de los resultados obtenidos.

4.2.4 Determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana de las cefalosporinas sintetizadas a partir del 7-ACA (compuestos 22-62).

En la **Tabla XVI** se muestran los resultados de la determinación de la actividad antibacteriana “*in vitro*”, de las 41 nuevas cefalosporinas sintetizadas, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo (sensibles y resistentes a meticilina). Esta actividad se compara con la desplegada frente a estas bacterias por una cefalosporina de primera generación (cefazolina) y otra de segunda generación (cefuroxima).

El análisis frente a cepas ATCC permitió definir el espectro antimicrobiano de los productos sintetizados. Todos los compuestos evaluados fueron activos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e inactivos contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (CMI $\geq 256 \mu\text{g/mL}$), por lo que se puede afirmar que muestran una actividad selectiva frente a bacterias Gram positivas.

Este comportamiento era lógico de esperar si se considera su estructura química, ya que las nuevas cefalosporinas obtenidas presentan analogía estructural con los antibióticos cefalosporánicos de primera generación portadores en la posición C-7 β de un fragmento molecular del tipo fenilglicina, el cual se ha demostrado que favorece la actividad frente a bacterias Gram positivas pues, debido a su relativa baja polaridad, facilita la penetrabilidad a través de la pared bacteriana de esta clase de microorganismos.

Tabla XVI. Actividad antibacteriana de las cefalosporinas sintetizadas a partir del 7-ACA (compuestos 22-62).

Compuestos	R	X	CMI (Media geométrica, µg / mL)			
			SaSM	SaRM	SCoNSM	SCoNRM
22	H	-	1,15	256	2,00	256
23	α-CH ₃	-	1,41	119	0,87	169
24	2'-F	-	1,23	104	1,23	158
25	4'-F	-	3,73	73,5	4,59	79
26	2'-Cl	-	3,48	256	4,14	256
27	3'-Cl	-	1,74	78,8	4,29	147
28	4'-Cl	-	137	239	147	147
29	3'-Br	-	1,32	73,5	1,23	97,0
30	4'-Br	-	2,83	97	5,66	90,5
31	2',4'-dicloro	-	6,56	14,7	2,59	29,3
32	2',5'-dicloro	-	N.E	169	N.E	194
33	2',6'-dicloro	-	0,93	110	1,52	256
34	2'-cloro, 6'-fluor	-	147	223	119,4	223
35	2'-NO ₂	-	1,74	78,8	0,93	147
36	3'-NO ₂	-	27,9	158	29,9	194
37	4'-NO ₂	-	84,4	137	119	137
38	2'-OH	-	3,48	59,7	2,64	90,5
39	3'-OH	-	6,06	90,5	2,3	181
40	4'-OH	-	6,35	44,2	11,6	N.E
41	4'-OH, α-CN	-	7,29	48,5	2,41	N.E
42	2'-OCH ₃	-	21,1	147	4,59	174
43	3'-OCH ₃	-	4,92	78,8	2,83	169
44	4'-OCH ₃	-	52	104	52	137
45	3',4'-di-OCH ₃	-	256	256	239	256
46	2',5'-di-OCH ₃	-	137	223	194	256
47	4'-OH, 3'-OCH ₃	-	17,1	169	14,9	194
48	3'-OH, 4'-OCH ₃ ,	-	53,8	174	45,3	256
49	4'-OCH ₂ Ph	-	22,6	137	17,1	194
50	3'-OPh	-	1,15	90,5	2,83	84,4
51	4'-CH ₃	-	169	256	158	256
52	4'-CN	-	73,5	256	36,8	208
53	4'-SCH ₃	-	1	68,6	1,41	97,0
54	4'-CF ₃	-	6,96	104	12,1	137
55	H	O	4,92	128	2,46	239
56	5'-CH ₃	O	39,4	147	26	169
57	H	S	2,83	194	4,59	194
58	3'-CH ₃	S	128	239	119	194
59	5'-CH ₃	S	147	256	137	223
60	1'-CH ₃	N	52	97	137	169
61	-	-	0,66	97	1,59	111
62	H	-	8,38	92,6	N.E	N.E
cefazolina	-	-	0,86	107,6	0,58	128
cefuroxima	-	-	3,17	256	4,29	256

SaSM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina; **SaRM** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; **SCoNSM:** *Staphylococcus coagulasa* negativo sensible a meticilina; **SCoNRM:** *Staphylococcus coagulasa* negativo resistente a meticilina. **N.E.:** no evaluado.

Una excepción la constituyó el compuesto **41** que además exhibió alguna actividad frente a *Escherichia coli* ATCC (CMI=16 µg/mL). Por todo lo anterior, se decidió no incluir en la evaluación de la actividad antibacteriana a cepas de bacterias Gram negativas.

De las cefalosporinas derivadas de los ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos evaluadas (**22-62**), nueve compuestos (**22-24**, **27**, **29**, **33**, **35**, **50** y **53**) alcanzaron, frente a las cepas de SaSM, valores de CMI inferiores 2 µg/mL (considerado por muchos autores como límite para la aplicación de esta clase de antibióticos en la práctica clínica) y por lo tanto próximos a la cefazolina e inferiores a la cefuroxima.

En este caso, la mayor parte de los compuestos exhibieron valores de CMI algo superiores que el derivado sin sustituir (**22**) por lo que es posible plantear que la sustitución, tanto en el anillo aromático como en la posición α del doble enlace alquílico no mejora y en la mayor parte de los casos reduce la actividad antibacteriana. Los derivados de los ácidos (2*E*)-3-(2,6-diclorofenil)acrílico (**33**) y (2*E*)-3-[4-(metiltio)fenil]acrílico (**53**) son una excepción porque exhiben una potencia ligeramente superior al compuesto sin sustituir.

En la evaluación frente a las cepas de SCoNSM, siete compuestos (**22-24**, **29**, **33**, **35** y **53**) exhibieron valores de CMI iguales o inferiores 2 µg/mL. Con relación a este tipo de bacterias, la presencia de sustituyentes, tanto en el anillo aromático (compuestos **24**, **29**, **33**, **35** y **53**) como en la posición α del doble enlace alquílico (compuesto **23**), mejora la actividad antibacteriana en comparación con el derivado sin sustituir (compuesto **22**). En consideración a su comportamiento tanto frente SaSM como a SCoNSM, son precisamente estas siete últimas cefalosporinas las que despliegan una acción antibiótica mejor y más integral dentro de esta familia de compuestos derivada de los ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos.

Con relación a las posiciones del anillo aromático, las más favorables resultaron las posiciones *orto* (2') y *meta* (3') pues es donde se obtienen la mayor cantidad de compuestos (**24**, **27**, **29**, **35** y **50**) con actividad buena o moderada.

La introducción de sustituyentes en la posición *para* (4') del anillo aromático resultó muy desfavorable pues las cefalosporinas correspondientes son prácticamente inactivas frente a estas cepas sensibles. Una excepción la constituyó el derivado portador de un grupo tiometilo en dicha posición (**53**) que fue uno de los compuestos más potentes de todos los sintetizados y en menor medida los productos obtenidos a partir de los ácidos (2*E*)-3-[4-fluorofenil] y (2*E*)-3-[4-bromofenil]acrílicos (**25** y **30**, respectivamente), que exhiben una actividad moderada frente a estas bacterias. Este hecho indica que la naturaleza del grupo presente en la posición *para* (4') del anillo aromático también influye sobre la actividad antibacteriana y que excluir la presencia de un sustituyente en dicha posición no puede considerarse como una condición indispensable para alcanzar una buena acción biológica.

De forma general, siempre y cuando se encuentren en las posiciones más favorables del anillo aromático (2'y 3'), los sustituyentes que proporcionan compuestos más activos son los electroaceptores (en particular los halógenos), mientras que los electrodonores (en especial el grupo metoxilo) reducen de forma significativa la potencia de la cefalosporina resultante.

La presencia de dos sustituyentes en el anillo aromático, con excepción del compuesto 2,6 dicloro sustituido (compuesto **33**), condujo a la obtención de cefalosporinas poco activas. Particularmente desfavorable resultó la presencia de dos grupos metoxilo en el anillo aromático (compuestos **45** y **46**) que podría explicarse debido al incremento del número de sustituyentes electrodonores en la molécula. De igual forma, la combinación de grupos hidroxilo y metoxilo en posiciones contiguas del anillo aromático producen derivados (**47** y **48**) con una actividad antibacteriana más débil que la exhibida por los compuestos mono-sustituidos correspondientes.

En estos casos es probable que la posible formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre ambos sustituyentes constituya un factor adicional que anule el efecto individual de estos grupos sobre la actividad antibacteriana.

La reducción de la actividad antibacteriana del compuesto di-cloro sustituido **31** con relación al derivado mono-sustituido **26** se puede explicar por la presencia del segundo átomo de cloro en la posición *para* que fue la menos favorable para el desarrollo de la actividad antibacteriana. Sin embargo, la total pérdida de actividad del derivado 2'-cloro,6'-fluor di-sustituido **34** en comparación con los derivados mono-sustituidos correspondientes (**24** y **26**) que exhiben potencias antibacterianas buena y moderada, respectivamente, no puede explicarse con total certeza ya que (de manera contradictoria) el derivado 2',6' di-cloro sustituido **33** clasifica entre uno de los más potentes de la serie. Resultaría conveniente sintetizar otros derivados 2',6' di-sustituidos con la finalidad de determinar la verdadera influencia de este patrón de sustitución sobre la actividad antibacteriana.

Con relación a la presencia de un sustituyente en la posición α del doble enlace alquílico (compuestos **23** y **41**) con independencia de su naturaleza química (grupo metilo en **23** y ciano en **41**) influyen negativamente sobre la actividad antibacteriana frente a cepas de SaSM, sin embargo frente a SCoNSM la sustitución en α si mejora los resultados de la actividad al comparar con los correspondientes derivados sin sustituir (compuestos **22** y **40**). Este hecho sugiere que dicha posición puede constituir un centro importante de modificación química con el objetivo de buscar compuestos más efectivos frente a este último tipo de cepas. Para confirmar esta hipótesis sería muy conveniente sintetizar y evaluar nuevos compuestos α sustituidos con diferentes grupos funcionales.

En la evaluación frente a cepas resistentes de *Staphylococcus* (SaRM y SCoNRM) los compuestos derivados de ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos (**22-54**), resultaron inactivos en su totalidad con la excepción del derivado sintetizado a partir del ácido (2*E*)-3-(2,4-diclorofenil)acrílico (**31**) el cual desplegó la mejor actividad antibacteriana frente estas cepas (CMI=14,7 µg/mL y 29,2 µg/mL, respectivamente), comparado con el resto de los compuestos evaluados, aunque no puede considerarse como una cefalosporina efectiva contra esta clase de bacterias multiresistentes.

Los datos reflejados en la literatura³⁷ han demostrado que la presencia de dos átomos de cloro (particularmente la 2',5'-dicloro sustitución) en el anillo aromático de los ácidos feniltioacéticos proporcionan, por acilación de diferentes núcleos cefalosporánicos (incluido el 7-ACA), cefalosporinas con una excelente actividad antibacteriana “*in vitro*” frente a cepas de SaRM. Si se considera que el compuesto **31** posee una configuración espacial próxima a las 2',5'-feniltioacetamido cefalosporinas, entonces este hecho podría explicar el comportamiento observado. En adición, debería esperarse que la cefalosporina obtenida a partir del ácido (2*E*)-3-(2,5-diclorofenil)acrílico (**32**) fuera aún más activa debido a que en este caso la ubicación de los átomos de cloro sería la más favorable de acuerdo a lo descrito en la literatura. Sin embargo, el compuesto **32** resultó totalmente inactivo frente a estas bacterias, por lo que es posible concluir que para esta familia de compuestos la 2',4'-dicloro sustitución es mucho más favorable.

En este sentido, la estrategia más lógica a seguir con la finalidad de mejorar la potencia frente a estas cepas resistentes sería la obtención de derivados del compuesto 2',4'-dicloro sustituido modificados en la posición C-3 del núcleo cefalosporánico, ya que en la literatura se describe que la naturaleza de los grupos funcionales ubicados en esta posición ejercen una influencia, en ocasiones decisiva, para alcanzar dicho objetivo.

Otros derivados de esta clase que mostraron cierta actividad frente a SaRM (aunque muy inferior a la desplegada por **31**) fueron los compuestos **40** y **41**, lo que indica que la ubicación de un hidroxilo en la posición *para* del anillo aromático podría constituir una vía para obtener cefalosporinas activas frente a cepas resistentes, siempre que se realicen modificaciones estructurales posteriores por la posición C-3 del núcleo cefalosporánico.

Con respecto a las cefalosporinas sintetizadas por acilación del 7-ACA con ácidos α,β insaturados portadores, en la posición β del doble enlace alquílico, de sistemas aromáticos heterocíclicos (compuestos **55-60**), policíclicos (**61**) y el caso particular del derivado obtenido a partir del ácido 3-fenil 2-propiónico (**62**), en casi su totalidad fueron menos activas frente a cepas sensibles (SaSM y SCoNSM) que los productos preparados con los ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos (**22-54**), con la excepción del compuesto sintetizado a partir del ácido (2*E*)-3-(1-naftil)acrílico (**61**) el cual desplegó una potente actividad antibacteriana, en particular frente a SaSM (CMI=0,66 $\mu\text{g/mL}$) donde resultó inclusive algo superior a la cefazolina.

El estudio realizado permitió establecer que la presencia de un triple enlace alquílico entre las posiciones α,β (compuesto **62**) conduce a una drástica reducción de la actividad antibacteriana en comparación con el análogo portador de un doble enlace (compuesto **22**). Este hecho sugiere que la presencia de un protón en β resulta un factor de importancia.

Por otra parte fue posible concluir que, en el caso de los productos portadores de un sistema heterocíclico (compuestos **55-60**) la presencia de un grupo metilo en el ciclo aromático ocasiona la inactivación de las cefalosporinas resultantes (**56**, **58** y **59**) con relación a los correspondientes compuestos no sustituidos (**56** y **57**). El derivado obtenido a partir del ácido (2*E*)-3-(1-metil-1*H*-pirrol-2-il)acrílico (**60**), donde el átomo de nitrógeno del sistema pirrólico se encuentra metilado,

tampoco resultó ser activo. Sería de interés sintetizar el análogo sin sustituir para comprobar si el grupo metilo es el responsable de la carencia de actividad antibacteriana de este producto.

De forma general, dada la estructura química de estas nuevas cefalosporinas podría suponerse que en un medio fisiológico pueden ser muy resistentes a la acción de cualquier especie capaz de interactuar con el núcleo cefem y ocasionar su hidrólisis, con la consiguiente destrucción de la cefalosporina. Por otra parte la presencia del doble enlace en la cadena lateral, impediría la libre rotación de este fragmento molecular proporcionando una estructura plana y rígida, factor que puede ejercer una influencia apreciable con relación a la unión de la cefalosporina al sitio de acción y por lo tanto incidiría sobre su actividad. Sin embargo esta afirmación solamente es una hipótesis y por lo tanto se precisa de los ensayos pertinentes para determinar su validez.

Con relación al comportamiento frente a las cepas resistentes de *Staphylococcus* (SaRM y SCoNRM), ninguno de estos compuestos (**55-60**) mostró actividad, por lo que deben ser descartados como posibles puntos de partida para la preparación de cefalosporinas anti-SaRM por modificación estructural de la posición C-3 del núcleo cefalosporánico.

4.3 Síntesis de nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACT y diferentes ácidos (2E)-3-(fenil)acrílicos sustituidos (compuestos 68-85).

El segundo núcleo cefalosporánico de partida utilizado fue el ácido 7 β -amino-3-[(2,5dihidro-6-hidroxi-2-metilo)-5-oxo-cis-triazin-3-il]tiometil-3-cefem-4-carboxílico (7-ACT) con el objetivo de incorporar a los compuestos resultantes un fragmento molecular en la posición C-3 del núcleo cefalosporánico, el cual ha demostrado que proporciona elevados tiempos de vida medio en el organismo, como en el caso de la ceftriaxona. Este hecho es de suma importancia ya que implica una menor frecuencia de administración del antibiótico con las ventajas que esto representa.

Además este compuesto está disponible en el mercado con una elevada pureza lo que simplifica el proceso de obtención de los compuestos de interés.

Los ácidos α , β insaturados seleccionados como reactivos de partida para la obtención de esta serie fueron 18 del tipo (2*E*)-3-(fenil)acrílicos comerciales. Con esta mínima cantidad fue suficiente para conocer las regularidades respecto al comportamiento de su actividad biológica y completar la base de datos necesaria para hacer el estudio QSAR con cefalosporinas de una mayor diversidad estructural.

Como en el caso de las cefalosporinas derivadas del 7-ACA, la técnica utilizada para su preparación fue la acilación del núcleo cefalosporánico con diferentes ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos activados mediante el reactivo de *Vilsmeier* como se muestra en la **Figura 30**.

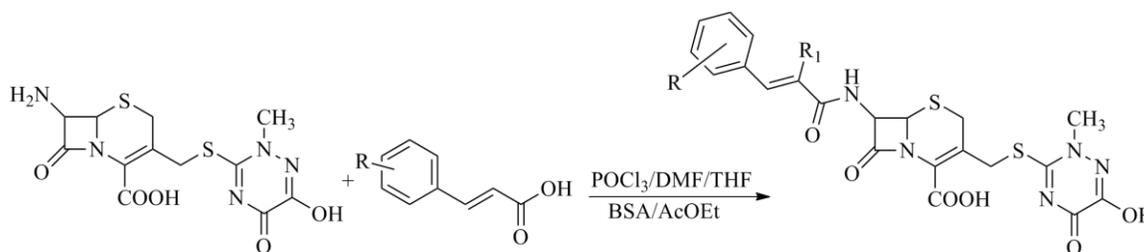


Figura 30. Método de síntesis de nuevas acrilcefalosporinas derivadas del 7-ACT (68-85).

El procedimiento empleado fue en esencia el mismo y las únicas diferencias fueron el disolvente, las cantidades de BSA y el tiempo requeridos para efectuar la sililación y disolver el 7-ACT.

El uso de la combinación acetato de etilo-BSA como medio para disolver el 7-ACT no resultó adecuado debido a que este núcleo no se disuelve aún calentando la mezcla a temperaturas de 65-70 °C. Por esta causa se utilizó un disolvente más polar como el THF a 65-70 °C, condiciones bajo las cuales la sililación con BSA y disolución del 7-ACT ocurrió en un tiempo de 15 min.

En el estudio por CCD de los productos sintetizados, se observó en todos los casos la presencia de una mancha única, sin embargo el análisis por RMN ^1H reveló como rasgo más importante la presencia de un doblete de doblete adicional (de menor intensidad) a campos más altos (entre δ

5,52 y 5,55 ppm) que el correspondiente al doblete de doblete perteneciente al protón H-7 enlazado a la posición C-7 α del anillo β -lactámico del núcleo cefalosporánico (δ 5,80-5,85 ppm). Además, se observaron dos dobletes adicionales de menor intensidad muy próximos a los dobletes correspondientes al protón del grupo amida formado y al protón H-6 unido a la posición C-6 del anillo β -lactámico del núcleo cefalosporánico. El doblete cercano a la señal perteneciente al protón H-6 mostró una constante de acoplamiento (${}^3J_{6-7} = 3,85$ Hz) inferior en 1 Hz a la constante de acoplamiento típica para el doblete del protón H-6 (${}^3J_{6-7} = 4,85$ Hz). En el **Anexo 5** se muestra como ejemplo el espectro de RMN ${}^1\text{H}$ de uno de los compuestos sintetizados bajo las condiciones antes citadas.

Un análisis de los resultados permitió suponer que durante la obtención de estas cefalosporinas, bajo las condiciones de reacción utilizadas, se formaban como productos colaterales los epímeros α correspondientes, es decir, isómeros geométricos cuya única diferencia radica en que el fragmento de ácido fenilacrílico está ubicado en la posición C-7 α , mientras que el protón H-7 del anillo β -lactámico se encuentra en la posición C-7 β . La integración de los dos dobletes de dobletes observados (el más intenso correspondiente al epímero β y el de menor intensidad perteneciente al supuesto epímero α) permitió determinar que este último se encontraba en proporciones que variaron desde 6,5 hasta 17,7 % en dependencia del ácido fenilacrílico utilizado en la reacción.

En la literatura consultada¹⁴ se informa sobre la epimerización de las penicilinas cuando se tratan con BSA a temperatura ambiente durante cinco días. Por otra parte, se describe que en el espectro RMN ${}^1\text{H}$ de los epímeros α de cefalosporinas (obtenidos mediante el empleo de otras condiciones de reacción que no implican el uso de BSA) el doblete de doblete correspondiente al protón H-7 del núcleo cefem aparece a campos más altos que en el caso del epímero β . Además, se informa que el valor de la constante de acoplamiento del doblete perteneciente al protón H-6 del núcleo

cefalosporánico es menor para el epímero α que para el epímero β . Aunque se plantea que, en el caso de las cefalosporinas, no se forma el epímero α por tratamiento con BSA bajo condiciones análogas, es posible que las altas temperaturas utilizadas durante el presente trabajo para efectuar la sililación del 7-ACT sean las responsables de los resultados observados.

Por todo lo anterior, con la finalidad de evitar o reducir al mínimo la posible epimerización, ya que el isómero α es totalmente inactivo, se decidió efectuar la sililación del 7-ACT a temperatura ambiente, lo que implicó la necesidad de utilizar una proporción de BSA / 7-ACT más elevada (5:1), así como un tiempo mayor (1 h) para que ocurriera la total disolución del núcleo. Las cefalosporinas obtenidas bajo estas condiciones presentaron, de acuerdo a los espectros RMN ^1H , una pureza epimérica adecuada y por esta causa fueron las empleadas para efectuar la posterior evaluación biológica.

En total se sintetizaron, a partir de ácidos (2E)-3-(fenil)acrílicos sustituidos, 18 compuestos con una elevada pureza y rendimientos que variaron entre un 46 % y el 86 % en dependencia del ácido utilizado. En la **Figura 31** se muestra la estructura química de las cefalosporinas sintetizadas y en la **Tabla XVII** los rendimientos obtenidos en cada caso.

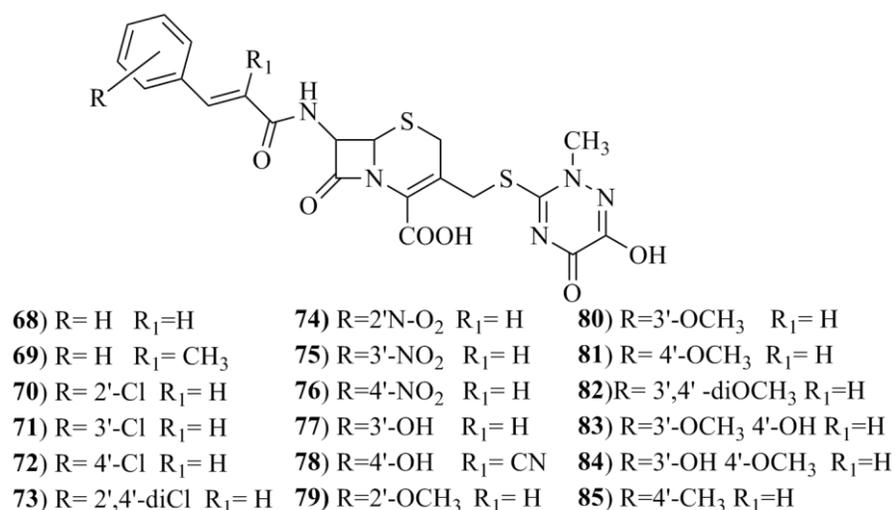


Figura 31. Cefalosporinas sintetizadas a partir del 7-ACT (compuestos 68-85).

Tabla XVII. Rendimientos y resultados del análisis por ESI-MS de las cefalosporinas obtenidas a partir del 7-ACT (compuestos 68-85).

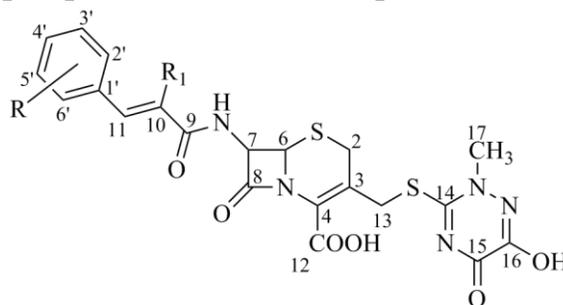
Compuesto	R	R ₁	Rendimiento (%)	M + 23 (calculada)	M + 23 (por ESI-EM)
68	H	H	69	524,53	524,20
69	H	CH ₃	86	538,56	538,57
70	2'-Cl	H	58	558,97	558,9
71	3'-Cl	H	83	558,97	558,9
72	4'-Cl	H	54	558,97	558,8
73	2',4' -Cl	H	65	593,43	593,40
74	2'-NO ₂	H	82	569,53	569,48
75	3'-NO ₂	H	82	569,53	569,40
76	4'-NO ₂	H	79	569,53	569,40
77	3'-OH	H	72	540,53	540,53
78	4'-OH	CN	72	566,54	566,52
79	2'-OCH ₃	H	70	554,56	554,50
80	3'-OCH ₃	H	70	554,56	554,50
81	4'-OCH ₃	H	63	554,55	554,50
82	3',4'-diOCH ₃	H	46	584,59	584,62
83	3'-OCH ₃ ,4'-OH	H	68	570,56	570,54
84	3'-OH, 4'-OCH ₃	H	68	570,56	570,54
85	4'-CH ₃	H	69	538,55	538,30

De todos los compuestos 12 son nuevos, ya que los derivados **68, 70, 72, 76, 81 y 85** fueron sintetizados con anterioridad.¹ Al igual que para el caso de las cefalosporinas derivadas del 7-ACA, los compuestos antes citados se sintetizaron nuevamente durante el presente trabajo con vistas a realizar un estudio comparativo válido frente a un mismo panel de cepas bacterianas.

4.3.1 Caracterización estructural de los derivados del 7-ACT y diferentes ácidos α,β insaturados (compuestos 68-85).

En las **Tablas XVIII y XIX** se muestran los valores de corrimiento químico asignados a los protones y átomos de carbono de las moléculas correspondientes a los productos sintetizados (**68-85**). En todos los casos, los espectros registrados se correspondieron con las estructuras químicas de la cefalosporinas obtenidas.

A partir de los resultados mostrados en la **Tabla XVIII** se puede concluir que la introducción del fragmento molecular correspondiente al ácido α,β insaturado tiene muy poca influencia sobre los corrimientos químicos de los protones pertenecientes al núcleo cefalosporánico. Así, los protones del CH_3 del heterociclo unido a la posición C-3 aparecen, para todos los compuestos, entre δ 3,58-3,61 ppm. Los dos protones ubicados sobre los átomos de carbono C-2 y C-13 resuenan, en todos los casos, como sistemas AB con constantes de acoplamiento ${}^2J_{\text{H-2}}=18$ Hz (J) y ${}^2J_{\text{H-13}}=13$ Hz, respectivamente, hecho indicativo de que estos protones no son equivalentes. El protón H-6 se observa como un doblete a δ 5,13-5,17 ppm con una ${}^3J_{6-7}=5$ Hz y el protón H-7 aparece como un doblete de doblete localizado entre δ 5,74-5,86 ppm. La señal correspondiente al protón de la amida formada (NH) se observa como un doblete en el intervalo de δ 8,75-9,33 ppm, con una ${}^3J_{\text{NH-7}}=8$ Hz. El protón H-10, con la excepción de los compuestos **69** y **78**, aparece en el intervalo de δ 6,55-6,94 ppm como un doblete con una constante de acoplamiento ${}^3J_{10-11}=16$ Hz. Este valor

Tabla XVIII. Datos de RMN ^1H (ppm) para las nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACT (compuestos 68-85).

Comp.	NH ^a	H-11	H-10 ^d	Aromáticos	H-7 ^f	H-6 ^g	H-13 ^h	H-2 ⁱ	CH ₃ ^j	R
68	9,07	c	6,76	7,34-7,64 (6H, <i>m</i>) ^c	5,85	5,16	4,10 y 4,39	3,59 y 3,77	3,59	-
69	9,00	7,39 (<i>s</i> ,1H)	-	7,25-7,46 (5H, <i>m</i>)	5,77	5,14	4,10 y 4,38	3,63 y 3,75	3,58	2,01 (<i>s</i> ,3H, α -CH ₃)
70	9,20	7,82 ^b	6,81	7,36-7,75 (4H, <i>m</i>)	5,85	5,16	4,11 y 4,40	3,58 y 3,77	3,60	-
71	9,07	c	6,79	7,39-7,69 (5H, <i>m</i>) ^c	5,84	5,16	4,10 y 4,39	3,59 y 3,77	3,59	-
72	9,08	c	6,75	7,41-7,69 (5H, <i>m</i>) ^c	5,83	5,13	4,09 y 4,38	3,59 y 3,77	3,59	-
73	9,19	c	6,81	7,44-7,80 (4H, <i>m</i>) ^c	5,84	5,16	4,11 y 4,39	3,59 y 3,77	3,58	-
74	9,21	c	6,72	7,58-8,10 (5H, <i>m</i>) ^c	5,85	5,17	4,11 y 4,39	3,59 y 3,78	3,59	-
75	9,14	c	6,94	7,58-8,48 (5H, <i>m</i>) ^c	5,86	5,17	4,11 y 4,39	3,59 y 3,78	3,59	-
76	9,21	7,65 ^b	6,92	7,76-8,38 (4H, <i>m</i>)	5,85	5,17	4,12 y 4,40	3,60 y 3,79	3,59	-
77	8,88	7,44 ^b	6,68	7,28-6,85 (4H, <i>m</i>)	5,81	5,15	4,15 y 4,43	3,60 y 3,77	3,61	-
78	9,33	8,10 (<i>s</i> ,1H)	-	6,88-7,80 (4H, <i>m</i>)	5,74	5,15	4,10 y 4,30	3,62 y 3,75	3,58	-
79	9,05	7,73 ^b	6,81	6,93-7,12 (4H, <i>m</i>)	5,84	5,15	4,11 y 4,39	3,59 y 3,77	3,59	3,86 (<i>s</i> ,3H,OCH ₃)
80	8,96	7,50 ^b	6,77	6,91-7,34 (4H, <i>m</i>)	5,83	5,16	4,13 y 4,42	3,60 y 3,77	3,60	3,79 (<i>s</i> ,3H,OCH ₃)
81	8,86	c	6,62	6,94-7,60 (5H, <i>m</i>) ^c	5,83	5,15	4,14 y 4,42	3,59 y 3,77	3,60	3,80 (<i>s</i> ,3H,OCH ₃)
82	8,93	7,51 ^b	6,64	6,90-7,50 (3H, <i>m</i>)	5,84	5,14	4,10 y 4,39	3,58 y 3,76	3,58	3,77 (<i>s</i> ,3H,OCH ₃) 3,79 (<i>s</i> ,3H,OCH ₃)
83	8,88	7,42 ^b	6,57	6,74-7,18 (3H, <i>m</i>)	5,83	5,13	4,10 y 4,39	3,58 y 3,76	3,58	3,79 (<i>s</i> ,3H,OCH ₃) 9,51 (<i>br s</i> ,1H,OH)
84	8,94	7,37 ^b	6,51	6,88-7,06 (3H, <i>m</i>)	5,82	5,13	4,10 y 4,38	3,58 y 3,76	3,58	3,78 (<i>s</i> ,3H,OCH ₃) 9,23 (<i>br s</i> ,1H,OH)
85	8,92	c	6,71	7,15-7,57 (5H, <i>m</i>) ^c	5,83	5,15	4,13 y 4,42	3,60 y 3,77	3,60	2,32 (<i>s</i> ,3H,CH ₃)

a Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete con $^3J_{\text{NH-7}}=8$ Hz

b Esta señal integra 1H y aparece como un doblete con $^3J_{10-11}=16$ Hz

c En estos compuestos el protón H-11 está solapado con los protones aromáticos.

d Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete con $^3J_{10-11}=16$ Hz.

e La señal del protón H-11 está incluida dentro de los protones aromáticos.

f Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete de doblete con $^3J_{\text{NH-7}}=8$ Hz y $^3J_{6-7}=5$ Hz.

g Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete con $^3J_{6-7}=5$ Hz.

h Para todos los compuestos esta señal integra 2H y aparece como un sistema AB con $^2J_{\text{H-13}}=13$ Hz.

i Para todos los compuestos esta señal integra 2H y aparece como un sistema AB con $^2J_{\text{H-2}}=18$ Hz

j Para todos los compuestos esta señal integra 3H y aparece como un singulete.

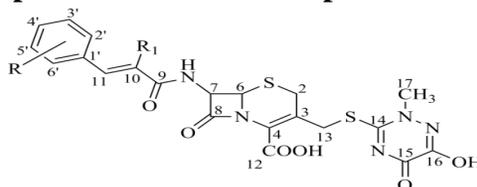
de J indica que en todos los casos el fragmento del ácido (2*E*)-3-(fenil)acrílico se encuentra en la forma *trans* isomérica.

En dependencia del patrón de sustitución del anillo aromático, la señal del protón H-11 aparece como un doblete bien definido $^3J_{10-11}=16$ Hz en el rango de δ 7,42-7,82 ppm, o se encuentra sobrelapada con las señales de los protones aromáticos. En los compuestos **69** y **78** este protón resuena como un singulete debido a la ausencia de un protón en la posición C-10.

En los espectros registrados, además de observarse las señales características de los protones de los ácidos α,β insaturados acoplados al núcleo cefalosporánico, aparecen las señales correspondientes a los grupos enlazados a estos anillos. Así, en los compuestos **79-84** se observan los singuletes pertenecientes a los grupos metoxilo presentes y en los compuestos **69** y **85** los singuletes asignables a los protones de los grupos metilo ubicados en las diferentes posiciones de estas moléculas.

De los resultados del RMN ^{13}C , mostrados en la **Tabla XIX** y del DEPT, se puede concluir que el fragmento del ácido α,β insaturado ejerce una influencia escasa o nula sobre los átomos de carbono del núcleo cefalosporánico. Así, todos resuenan en un intervalo muy estrecho con independencia del compuesto de que se trate: C-2 entre δ 26-27 ppm; C-3 entre δ 125-126 ppm; C-4 entre δ 125-126 ppm; C-6 entre δ 57-58 ppm; C-7 entre δ 59-60 ppm; C-8 entre δ 164-165 ppm; C-12 entre δ 162-163 ppm; C-13 entre δ 32-33 ppm; C-14 entre δ 155-157 ppm; C-15 entre δ 160-161 ppm; C-16 entre δ 153-154 ppm y C-17 entre δ 42-43 ppm. El átomo de carbono del grupo carbonilo de la amida formada tampoco muestra variaciones significativas y se observa en el rango de δ 164-166 ppm, con la excepción de los compuestos α -sustituidos **69** y **78**.

Los espectros de RMN ^{13}C , además de exhibir las señales típicas de los átomos de carbono del fragmento molecular del ácido α,β insaturado acoplado al núcleo cefalosporánico, muestran las correspondientes a los átomos del doble enlace alquílico (C-10 y C-11), las cuales sí son

Tabla XIX. Datos de RMN ^{13}C (ppm) para las nuevas cefalosporinas derivadas del 7-ACT (compuestos 68-85).

C	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
2	26,67	26,60	26,64	26,64	26,63	26,69	26,69	26,72	26,66	26,66	26,69	26,67	26,67	26,67	26,66	26,72	26,67	26,66
3	125,80	125,48	125,75	125,75	125,76	125,80	125,80	125,86	125,78	125,58	126,00	125,63	125,71	125,63	125,80	125,74	125,55	125,64
4	125,80	126,06	125,85	125,87	125,85	125,83	125,86	125,94	125,89	125,98	126,06	125,84	125,89	125,92	125,86	125,94	125,97	125,89
6	57,48	57,71	57,33	57,36	57,39	57,35	57,33	57,39	57,32	57,38	57,41	57,54	57,41	57,47	57,49	57,69	57,56	57,42
7	59,21	59,68	59,17	59,15	59,16	59,21	59,18	59,20	59,19	59,15	59,92	59,24	59,15	59,17	59,16	59,20	59,20	59,15
8	164,81	164,21	164,56	164,66	164,68	164,53	164,57	164,68	164,51	164,39	163,44	164,89	164,58	164,68	164,91	165,03	164,95	164,60
9	165,45	169,70	164,93	165,07	165,21	164,82	164,66	164,92	164,77	165,31	163,01	165,89	165,30	165,62	165,68	165,89	165,76	165,47
10	120,47	131,16	123,46	122,10	121,16	124,15	124,70	121,86	124,63	120,23	116,71	120,75	119,90	117,94	118,12	117,16	117,68	119,40
11	140,66	133,78	135,81	139,01	139,27	135,04	135,89	138,31	137,96	140,55	150,94	135,78	140,36	140,17	140,68	141,06	140,86	140,40
12	163,05	163,10	162,95	162,98	162,99	163,01	163,00	163,06	162,98	162,66	163,04	163,09	162,84	162,81	163,06	163,10	163,09	162,81
13	32,80	32,81	32,73	32,73	32,73	32,77	32,78	32,80	32,80	32,83	32,81	32,81	32,81	32,83	32,81	32,83	32,84	32,80
14	156,23	156,22	156,14	156,15	156,27	156,20	156,20	156,23	156,17	155,87	156,25	156,25	156,02	156,00	156,16	156,25	156,26	156,01
15	160,35	160,36	160,28	160,29	160,29	160,33	160,33	160,34	160,29	160,22	160,34	160,36	160,25	160,26	160,28	160,37	160,36	160,24
16	153,73	153,72	153,66	153,67	153,68	153,72	153,70	153,75	153,67	153,47	153,75	153,75	153,59	153,56	153,70	153,75	153,75	153,58
17	42,41	42,40	42,34	42,36	42,36	42,40	42,40	42,43	42,36	42,12	42,41	42,43	42,26	42,23	42,38	42,43	42,43	42,24
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55,59	55,03	55,16	55,56	55,51	55,62	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55,60	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,79
A	127,74	127,97	127,62	126,06	129,00	128,12	124,97	123,32	123,83 (2C)	113,73	116,36	111,76	112,73	114,35	110,15	111,07	112,10	127,53
R	(2C)	128,46	127,79	127,42	(2C)	128,94	128,79	124,12	128,98 (2C)	116,89	(2C)	120,94	115,58	(2C)	111,73	115,74	113,37	(2C)
O	129,01	(2C)	129,99	129,44	129,39	129,49	129,81	130,58	140,96	118,67	122,69	122,88	120,81	127,07	121,62	121,85	120,81	129,41
M	(2C)	129,29	131,25	130,77	(2C)	131,40	130,53	134,02	147,69	129,65	133,13	128,30	129,88	129,18	127,29	126,05	127,40	(2C)
A*	129,89	(2C)	132,27	133,65	133,28	134,26	133,95	136,40		135,68	(2C)	131,34	135,91	(2C)	148,86	147,83	146,74	131,73
	134,53	135,73	133,43	136,78	133,44	134,69	148,27	148,29		157,52	162,15	157,80	159,25	160,55	150,39	148,71	149,61	139,53

18: átomo de carbono del grupo $\alpha\text{-CH}_3$ (grupo CH_3 -10); **19**: átomo de carbono del grupo $\alpha\text{-CN}$ (grupo CN -10); **20** y **21**: átomos de carbono de los grupos OCH_3 ; **22** átomo de carbono del grupo 4-CH_3 . AROMAT*: átomos de carbono aromáticos.

notablemente afectadas por el sistema aromático enlazado a la posición β . Si se compara con el compuesto **68**, los grupos electroaceptores unidos al anillo aromático desblindan la señal de C-10 (3-4 ppm), particularmente para los derivados 2' y 4' nitro, así como cuando un átomo de cloro está ubicado en la posición 2'.

De forma contraria, los sustituyentes electrodonores (en especial cuando se encuentran enlazados a la posición 4' del anillo aromático) blindan esta señal (~ 3-4 ppm). La señal del C-11 es poco afectada por los grupos electroaceptores, exceptuado los casos en que están localizados en la posición 2' del anillo aromático (corrimiento de 4-5 ppm hacia campos más altos). Los sustituyentes electodadores no inciden sobre la resonancia de la señal C-11, con la excepción del grupo metoxilo en la posición 2', que blindan esta señal (~ 5 ppm). En comparación con el correspondiente derivado no sustituido en α (**68**) la presencia del grupo metilo en dicha posición tiene un efecto notable sobre los corrimientos químicos de los átomos de carbono C-10 y C-11 pues produce un blindaje (~ 7 ppm) de la señal del carbono C-11, así como un fuerte desblindaje de la señal de C-10 (~ 11 ppm).

Finalmente, en los espectros se observan todas las señales correspondientes a los sustituyentes ubicados en dichos sistemas. Así, en los compuestos **79-84** se observan las señales de los grupos metoxilo, en el compuesto **78** se detecta la señal asignable al grupo ciano y en los compuestos **69** y **85** las señales pertenecientes a los CH₃ unidos en las diferentes posiciones del fragmento del ácido α,β insaturado.

Para todas las nuevas cefalosporinas obtenidas (**68-85**) se registraron los espectros de masa donde se comprobó la presencia del pico molecular correspondiente a cada compuesto como se observa en la **Tabla XVII**. En los **Anexos 6a-c** se incluyen los espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT y masa del derivado **68** como ejemplo de los resultados obtenidos.

4.3.2 Determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana de las cefalosporinas sintetizadas a partir del 7-ACT (compuestos 68-85).

En la **Tabla XX** se muestran los resultados de la determinación de la actividad antibacteriana “*in vitro*” de todas las cefalosporinas evaluadas frente a cepas de SaSM, SCoNSM, SaRM y SCoNRM, en comparación con la actividad desplegada frente a estas bacterias por una cefalosporina de primera generación (cefazolina) y otra de segunda generación (cefuroxima).

Tabla XX. Actividad antibacteriana de las cefalosporinas sintetizadas a partir del 7-ACT (68-85).

Compuestos	R	R ₁	CMI (Media geométrica, µg / mL)			
			SaSM	SaRM	SCoNSM	SCoNRM
68	H	H	1,74	144,0	1,14	120,0
69	H	CH ₃	0,42	181,0	0,5	181,0
70	2'-Cl	H	0,59	256,0	0,84	256,0
71	3'-Cl	H	1,68	256,0	2,0	256,0
72	4'-Cl	H	16,2	228,0	19,6	248,0
73	2',4'-di-Cl	H	3,36	256,0	8,0	256,0
74	2'-NO ₂	H	1,68	256,0	1,68	256,0
75	3'-NO ₂	H	1,0	181,0	1,41	181,0
76	4'-NO ₂	H	5,02	203,0	3,61	233,0
77	3'-OH	H	2,0	181,0	2,0	181,0
78	4'-OH	CN	2,38	128,0	2,38	256,0
79	2'-OCH ₃	H	1,0	256,0	1,41	181,0
80	3'-OCH ₃	H	2,38	256,0	4,76	181,0
81	4'-OCH ₃	H	4,76	128,0	8,0	181,0
82	3',4'-di-OCH ₃	H	13,9	256,0	12,7	256,0
83	3'-OCH ₃ , 4'-OH	H	4,76	256,0	6,73	128,0
84	3'-OH, 4'-OCH ₃ ;	H	64,0	256,0	45,3	256,0
85	4'-CH ₃	H	16,0	256,0	64,0	256,0
cefazolina	-	-	0,86	107,6	0,58	128,0
cefuroxima	-	-	3,17	256,0	4,29	256,0

SaSM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina; **SaRM** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; **SCoNSM:** *Staphylococcus coagulasa* negativo sensible a meticilina; **SCoNRM:** *Staphylococcus coagulasa* negativo resistente a meticilina.

Al igual que en el caso de las cefalosporinas derivadas del 7-ACA, el análisis frente a las cepas ATCC permitió definir el espectro antimicrobiano de los productos sintetizados. Todos los compuestos sintetizados fueron activos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e inactivos contra *Escherichia coli* ATCC 25922, por lo que se puede afirmar que muestran una actividad

selectiva frente a las bacterias Gram positivas, comportamiento esperado dada su similitud estructural con los antibióticos cefalosporánicos de primera generación. Por todo lo anterior, se decidió no incluir en la evaluación de la actividad antibacteriana cepas de bacterias Gram negativas. De los 18 compuestos evaluados, 8 de ellos (**68**, **69**, **70**, **71**, **74**, **75**, **77** y **79**) alcanzaron valores de CMI inferiores o iguales a 2 µg/mL frente a cepas de SaSM y SCoNSM,. En la evaluación frente a cepas de SaSM, a diferencia de los compuestos derivados del 7-ACA, la sustitución, tanto en el anillo aromático del ácido (2*E*)-3-(fenil)acrílico como en la posición α del doble enlace alquílico, condujo (por lo general) a la obtención de compuestos más efectivos que el derivado sin sustituir (**68**), en particular los derivados **69** y **70** cuya potencia antibacteriana resultó comparable a la cefazolina y superior a la cefuroxima. Por el contrario, frente a SCoNSM, el efecto beneficioso de la sustitución se limitó solamente a los derivados **69** y **70**, mientras que el resto de los compuestos fueron menos potentes que el derivado no sustituido.

Con relación a las posiciones del anillo aromático más favorables para la sustitución, se mantuvo la tendencia ya observada con anterioridad de que las posiciones *orto* (2') y *meta* (3') (compuestos **70**, **71**, **74**, **77** y **79**) resultan las más propicias, mientras que la ubicación de un sustituyente en la posición *para* (4') fue nuevamente la más desfavorable, pues las cefalosporinas correspondientes son muy poco activas frente a estas cepas sensibles. De igual modo se observó que los sustituyentes que proporcionan compuestos más activos son los electroaceptores, si bien la presencia de grupos electrodonores en el anillo aromático no puede descartarse pues dos compuestos con estas características estructurales (**77** y **79**) exhibieron una buena actividad frente a estas cepas sensibles.

La presencia de dos sustituyentes en el anillo aromático condujo, una vez más, a la obtención de cefalosporinas poco activas, en particular las derivadas de los ácidos (2*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil) y (2*E*)-3-(4-metoxi-3-hidroxifenil)acrílicos (compuestos **82** y **84**, respectivamente). Una posible

explicación de este fenómeno se ofreció durante la discusión de la actividad antibacteriana de las cefalosporinas obtenidas a partir del 7-ACA.

En cuanto al comportamiento de los compuestos sintetizados frente a cepas resistentes de *Staphylococcus* (SaRM y SCoNRM), de la **Tabla XX** se observa que en su totalidad resultaron inactivos contra este tipo de bacterias. A diferencia del compuesto obtenido a partir del 7-ACA y el ácido (2*E*)-3-(2,4-diclorofenil)acrílico, el análogo derivado del 7-ACT (**73**) no mostró actividad alguna frente a este tipo de bacterias.

De todo lo expuesto con anterioridad es posible concluir que para esta clase de cefalosporinas, el sustituyente ubicado en la posición C-3 del núcleo cefalosporánico ejerce una influencia diferente al grupo acetoximetilo sobre la actividad antibacteriana, lo cual se sustenta por el hecho de que en comparación con los productos obtenidos a partir del 7-ACA, los derivados sintetizados con el 7-ACT muestran, por lo general, una mayor potencia antibacteriana frente a cepas sensibles de *Staphylococcus* (SaSM y SCoNSM), mientras que se observa una tendencia a la reducción de la actividad contra cepas resistentes de estas bacterias (SaRM y SCoNRM).

Queda por determinar si este fenómeno se debe a una alteración de la penetrabilidad de estas cefalosporinas a través de la pared bacteriana, al acople de las mismas a las PBPs que constituyen el sitio activo para los antibióticos β -lactámicos o a una diferencia de reactividad del carbonilo β -lactámico ocasionada por el diferente carácter de grupo saliente del fragmento molecular unido a la posición C-3 del núcleo cefalosporánico.

4.4 Desarrollo de un modelo QSAR para cefalosporinas derivadas de diferentes ácidos α,β insaturados.

Con los datos experimentales obtenidos correspondientes a la evaluación antibacteriana “*in vitro*” frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus spp.*, de las cefalosporinas derivadas de diferentes

ácidos α,β insaturados sintetizadas, es posible desarrollar un modelo matemático que permita correlacionar la estructura química con la actividad biológica encontrada con el fin de diseñar de forma racional nuevos derivados con una mayor exactitud y un menor costo en la investigación.

Como metodología de trabajo se siguió el procedimiento descrito en la literatura para el desarrollo de un modelo QSAR en una serie de análogos estructurales.¹⁰⁵ Así, una vez definidos los compuestos con sus valores de actividad biológica experimentales a incluir en la base de datos, se seleccionaron y calcularon teóricamente los parámetros químicos físicos a correlacionar con la actividad, se estableció la correlación matemática mediante un análisis estadístico y se interpretó desde el punto de vista químico farmacéutico la relación matemática establecida.

La serie escogida para desarrollar el modelo QSAR de regresión lineal múltiple incluyó 57 cefalosporinas, 39 derivadas del 7-ACA (compuestos **22-31** y **33-61**) y las 18 obtenidas a partir del 7-ACT (compuestos **68-85**), las cuales fueron sintetizadas y evaluadas “*in vitro*” durante el presente trabajo (**Anexos 1a y 1b**). Las cefalosporinas derivadas del 7-ACA y los ácidos (2*E*)-3-(2,5-diclorofenil)acrílico (compuesto **32**) y fenilpropiónico (compuesto **62**) fueron excluidas de la base de datos debido a que en el primer caso la determinación de su actividad antibacteriana estaba incompleta (el compuesto 32 solo se evaluó frente a cepas de SaRM), mientras que el producto 62 es portador de un triple enlace entre las posiciones α y β , por lo tanto no clasifica como un análogo estructural válido para incluir en el estudio QSAR.

Para el desarrollo del modelo se seleccionó como variable dependiente la actividad biológica frente a cepas de SaSM expresada como el inverso del logaritmo de la CMI ($\log [1/\text{CMI}(\text{SaSM})]$). Como variables independientes se utilizaron descriptores moleculares del tipo electrónicos, estéricos e hidrofóbicos que se calcularon teniendo en cuenta los sustituyentes específicos de las posiciones R_3 y R_7 en cada compuesto como se observa en los **Anexos 1a y 1b**.

Para los cálculos de los descriptores se emplearon el *Hyperchem*,⁹⁹ y el *MOPAC*¹⁰⁰ que son los programas de modelación molecular más utilizados para realizar cálculos de mecánica molecular y químico cuánticos mediante métodos semiempíricos (AM1, PM3) respectivamente.^{106,107} Estos descriptores representan las propiedades electrónicas, estéricas e hidrofóbicas de la molécula en estudio, varían en función de los diferentes sustituyentes que la constituyen y permiten explicar su capacidad para interactuar con el sitio activo.¹⁰⁸

Los descriptores electrónicos seleccionados fueron el momento dipolar (μ), la polarizabilidad molecular (α), la energía de los orbitales moleculares fronteras (E_{HOMO}) y (E_{LUMO}), la carga atómica (q), dureza (η) y suavidad (S) química y el índice electrofílico (ω).

Los descriptores del tamaño de los sustituyentes (estéricos) utilizados fueron el área superficial aproximada (ASA), el área superficial de la rejilla (ASG), y la refractividad molar, mientras que como descriptor hidrofóbico se seleccionó la constante hidrofóbica del sustituyente (π).

En el caso del descriptor correspondiente a la carga atómica (q_x) (**Anexo 1b**) para el análisis se calcularon solamente 28 posiciones que son comunes a todas las cefalosporinas de la serie. El valor de la carga atómica correspondiente al resto de los átomos pertenecientes a los sustituyentes ubicados en las posiciones C-3 y C-7 no se incluyó en el estudio. Los descriptores correspondientes a las cargas atómicas q_1 , q_{12} , q_{19} , q_{20} , y q_{23} se eliminaron del análisis porque sus valores fueron iguales para todos los compuestos considerados.

Durante el desarrollo del modelo QSAR, 9 compuestos (el 15,8 % del total de la serie) fueron detectados como valores atípicos (*outliers*) porque no se ajustan al modelo y afectan sus parámetros estadísticos. Este tipo de anomalía existe en cualquier correlación estadística donde la complejidad determina el resultado esperado en la variable dependiente. Este análisis contribuye

a validar la predicción porque establece que las correlaciones se han hecho de forma transparente, donde la complejidad del sistema ha tenido un espacio de consideración.¹⁰⁹

Las cefalosporinas identificadas como *outliers* fueron las derivadas del 7-ACA y los ácidos (2*E*)-3-(4-clorofenil) (**28**), (2-cloro-6-fluorofenil) (**34**), (4-metilfenil) (**51**), (4-cianofenil) (**52**) y (2-tienil)acrílicos (**57**), así como las obtenidas a partir del 7-ACT y los ácidos (2*E*)-3-(4-clorofenil) (**72**), (3-nitrofenil) (**75**), (3-hidroxi-4-metoxifenil), (**84**) y (4-metilfenil)acrílicos (**85**).

Una vez eliminados los 9 *outliers*, se aplicó el análisis de conglomerados o *clusters* a las cefalosporinas restantes con la finalidad de conformar tanto la serie de entrenamiento (80 % de los compuestos), como la serie de prueba (20 % de los compuestos)

Para demostrar la diversidad estructural de las moléculas seleccionadas, en la base de datos se realizó un análisis de conglomerados (*clusters*) jerárquico.¹¹⁰ Este tipo análisis permitió reestructurar los objetos (compuestos) en un árbol (dendograma) como se muestra en la **Figura 32**. En este gráfico los compuestos (n=48) se representan de acuerdo con sus valores de la distancia de enlace expresado como enlace completo o vecino más alejado. Como se observa, existe un gran número de subconjuntos diferentes lo que demuestra la variabilidad estructural de las moléculas seleccionadas para el estudio.

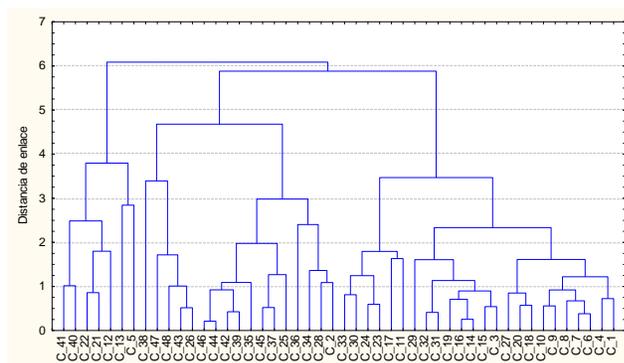


Figura 32. Dendrograma del análisis jerárquico de conglomerados correspondiente al modelo.

Para asignar a cada conglomerado los compuestos correspondientes, se realizó un análisis de conglomerados (*clusters*) no jerárquico donde a partir de un análisis de varianza de todos los descriptores cuánticos y químico-físicos no ortogonales utilizados en el estudio, se seleccionaron los descriptores Vm, Log P y μ con valor $p < 0,001$ según se muestra en la **Tabla XXI**. Los compuestos se agruparon en 4 conglomerados como se muestra en la **Tabla XXII**. De cada cluster se seleccionó el 20 % para integrar la serie de prueba que permitió la validación externa del modelo propuesto.

Tabla XXI. Análisis de varianza para los conglomerados de las cefalosporinas del modelo.

Variable	VEC ^a	VIC ^b	Radio de Fisher	p-level ^c
Vm	44,042	10,255	62,986	0,000
Log P	30,395	15,552	28,665	0,000
MD	30,318	35,630	12,480	0,000
E homo	0,299	2,884	1,522	0,222
E Lumo	0,914	9,163	1,464	0,237
q3	0,002	0,005	4,658	0,007
q4	0,001	0,003	5,131	0,004
q5	0,000	0,001	2,411	0,080
q7	0,000	0,001	0,306	0,821
q8	0,005	0,014	5,266	0,003
q9	0,000	0,001	6,083	0,001
q10	0,001	0,053	0,192	0,901
q11	0,011	0,038	4,230	0,010
q16	0,000	0,001	4,845	0,005
q17	0,000	0,004	1,566	0,211
q25	0,002	0,014	2,049	0,121
q27	0,005	0,164	0,442	0,724
q28	0,000	0,003	1,637	0,194

^aVEC: Variabilidad entre conglomerados

^bVIC: variabilidad dentro de los conglomerados

^c nivel de significancia

Como se observa en la **Tabla XXII**, la serie de entrenamiento resultante (n=38) incluyó a las cefalosporinas **22-27, 29-30, 33, 35-38, 40-43, 45, 47, 48, 50, 53, 55, 56, 60, 61, 68-71, 74, 76, 78-83**, mientras que la serie de prueba seleccionada quedó integrada por 10 compuestos correspondientes a las cefalosporinas **31, 39, 44, 46, 49, 54, 58, 59, 73 y 77**.

Tabla XXII. Distribución de cefalosporinas del modelo según cada *cluster*.

No	cefalosporinas	Cluster	distancia
5	26	1	0,60
12	36	1	0,36
13	37	1	0,47
21	45	1	0,30
22	48*	1	0,26
40	74	1	0,33
41	76	1	0,30
1	22	2	0,23
2	23	2	0,24
4	25	2	0,21
6	27	2	0,05
7	29	2	0,10
8	30	2	0,17
9	31*	2	0,11
10	33	2	0,20
18	42	2	0,20
20	44*	2	0,22
27	53	2	0,22
28	54*	2	0,42
34	61	2	0,24
25	49*	3	0,19
26	50	3	0,42
35	68	3	0,22
36	69	3	0,63
37	70	3	0,30
38	71	3	0,56
39	73*	3	0,14
42	77*	3	0,16
43	78	3	0,36
44	79	3	0,10
45	80	3	0,36
46	81	3	0,08
47	82	3	0,33
48	83	3	0,48
3	24	4	0,23
11	35	4	0,41
14	38	4	0,18
15	39*	4	0,11
16	40	4	0,16
17	41	4	0,31
19	43	4	0,15
23	47	4	0,25
24	48	4	0,20
29	55	4	0,27
30	56	4	0,11
31	58*	4	0,22
32	59*	4	0,14
33	60	4	0,22

*cefalosporinas de la serie de prueba

La división de los compuestos en dos conjuntos, uno de entrenamiento o calibración y otro de prueba o validación externa que no fue incluido en el desarrollo del modelo QSAR es una de las herramientas utilizadas para poder estimar el poder predictivo del un modelo. De esta forma para la serie de prueba se compararon los valores predichos por el modelo con los observados y se determinó el coeficiente de correlación entre ambos como plantea la literatura¹¹¹

Para seleccionar el número óptimo de variables (descriptores) a incluir en la ecuación, se utilizó el algoritmo genético por ser un método que permitió de forma rápida eliminar todas aquellas que no fueran independientes entre sí (ortogonales) con el fin de eliminar la propagación de errores sistemáticos lo que contribuyó a una mejor interpretación estadística del modelo obtenido. El modelo seleccionado cumple con el principio de parsimonia.¹¹² que plantea que un fenómeno debe ser descrito con el número mínimo de elementos posibles. Es decir se debe elegir el modelo más simple manteniendo su calidad

Las variables del modelo seleccionado fueron el coeficiente de reparto octanol-agua ($\log P$), el momento dipolar teórico (μ) y las cargas de los átomos de carbono (q_{11}) e hidrógeno (q_{28}) correspondientes a la posición β del doble enlace alquílico, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\log [1/\text{CMI (SaSM)}] = + 0,56419 (\pm 0,11126) \log P - 0,20807 (\pm 0,09209) \mu - 9,02218 (\pm 3,45182) q_{11} (\text{C } \beta) + 32,97821 (\pm 13,80152) q_{28} (\text{H } \beta) - 2,89650 (\pm 1,499810)$$

$$(\mathbf{n}=38; \mathbf{R}=0,89; \mathbf{R}^2= 0,79 \quad \mathbf{s}=0,325; \mathbf{F}=30,912; \mathbf{q}^2=0,721$$

$$\mathbf{Serie de prueba: n}=10; \mathbf{R}=0,904; \mathbf{R}^2= 0,82 \quad \mathbf{s}=0,337; \mathbf{F}=35,896$$

Los resultados de este modelo indican que la actividad antibacteriana frente a las cepas de SaSM, expresada como $\log [1/\text{CMI(SaSM)}]$, en esta serie de compuestos es una función de 4 descriptores moleculares que describen las características estructurales y electrónicas de las cefalosporinas seleccionadas para la serie de entrenamiento. Esta ecuación indica que la actividad antibacteriana se favorece al aumentar el valor de $\log P$ (descriptor hidrofóbico) dentro de un

rango fisiológico, mientras que el momento dipolar (descriptor electrónico) tiene una contribución negativa. Estos compuestos (como es típico para las cefalosporinas) tienen un valor negativo del log P, por lo tanto, una vía para incrementar su actividad biológica frente a gérmenes Gram positivos como SaSM y SCoSM, consiste en aumentar la penetrabilidad a través de la pared bacteriana de estos microorganismos, que dada su naturaleza, se verá favorecida por un aumento de la lipofilidad del compuesto, hecho que se logra con la inclusión de sustituyentes que disminuyan la polaridad de las moléculas.

En este sentido, los resultados que brinda el modelo desarrollado son lógicos, pues es bien conocido que en las bacterias Gram positivas son efectivos los compuestos con un mayor carácter lipofílico, como las cefalosporinas de primera generación. Más aun, el modelo permite explicar el hecho observado de que las cefalosporinas derivadas del 7-ACT por lo general fueron más activas que las obtenidas a partir del 7-ACA, pues si se analizan los valores del log P mostrados en el **Anexo 1a** se puede concluir que las primeras poseen un mayor carácter lipofílico que las últimas debido a que los valores de este parámetro son superiores (menos negativos).

De forma adicional, la actividad antibacteriana se favorece con un aumento de la densidad electrónica (valores de q_{11} más negativos) sobre átomo de carbono β y una disminución de la densidad electrónica (valores de q_{28} más positivos) del átomo de hidrógeno β del doble enlace alquílico, lo cual está asociado a la habilidad del sustituyente (R_7) enlazado a dicha posición de causar los efectos antes citados en dependencia de la naturaleza del o los sustituyentes, así como del patrón de sustitución del sistema aromático.

Es importante destacar que en el modelo establecido, la carga del átomo de hidrógeno ubicado en la posición β del doble enlace (q_{28}) aparece con una contribución positiva sobre la actividad antibacteriana. Este hecho pudiera estar asociado a los resultados observados en la práctica y

discutidos en el **Epígrafe 4.2.4**, donde se comprobó que la cefalosporina derivada del ácido fenilpropiónico (compuesto **62**), la cual posee un triple enlace entre los carbonos α y β (ausencia de átomos de hidrogeno en dichas posiciones) resultó ser mucho menos activa que el análogo portador de un doble enlace (compuesto **22**). El modelo desarrollado parece confirmar la conclusión, de que es indispensable la presencia de un átomo de hidrogeno en la posición β para que la cefalosporina resultante despliegue una buena actividad antibacteriana.

En la **Tabla XXIII** se muestran los valores de la actividad antibacteriana observados (medidos de forma experimental), y expresados como ($\log [1/\text{CMI}(\text{SaSM})]$), con los predeterminados por el modelo, así como los residuales obtenidos para cada compuesto de la serie de prueba y de la serie de entrenamiento.

Mediante el análisis estadístico del modelo establecido se determinó el coeficiente de regresión de la serie de entrenamiento ($R=0,89$ para valores experimentales del $\log [1/\text{CMI}(\text{SaSM})]$), lo que significa que es aplicable al 79 % ($R^2= 0,79$) de los compuestos de dicha serie ($n=30$). Este modelo tiene un valor de coeficiente de determinación del procedimiento de validación cruzada correspondiente (q^2) de 0,72. Este valor de $q^2 > 0,5$ se considera una prueba del buen poder predictivo del modelo lo que se corrobora con el alto valor del coeficiente de determinación de la serie de prueba externa ($R^2= 0,82$), indicativo de que el modelo fue capaz de predecir con certeza el 82 % de los compuestos incluidos en esta serie.

La validación constituye una herramienta fundamental para evaluar la validez y el poder predictivo de los modelos. El método QSAR tradicional incluye el tratamiento estadístico de los datos por métodos multivariados, tales como el análisis de regresión y el análisis de *cluster*.¹¹³

Tabla XXIII. Valores de actividad antibacteriana observada vs predeterminada por el modelo y residuales.

Cefal.	R ₃	R ₇	log 1/CMI observado	log 1/CMI predeterminada	Residual
22	-CH ₂ R-	fenil	-0,06	-0,64	0,58
23	-CH ₂ R-	α-CH ₃ fenil	-0,15	-0,56	0,41
24	-CH ₂ R-	2'-F-fenil	-0,09	-0,83	0,74
25	-CH ₂ R-	4'-F fenil	-0,57	-0,96	0,39
26	-CH ₂ R-	2'-Cl fenil	-0,71	-0,85	0,14
27	-CH ₂ R-	3'-Cl fenil	-0,60	-0,68	0,08
29	-CH ₂ R-	3'-Br fenil	-0,12	-0,58	0,46
30	-CH ₂ R-	4'-Br fenil	-0,45	-0,61	0,16
31*	-CH ₂ R-	2',4'-di-Cl fenil	-0,82	-0,43	-0,39
33	-CH ₂ R-	2',6'-di-Cl fenil	0,03	-0,47	0,50
35	-CH ₂ R-	2'-NO ₂ fenil	-0,24	-0,70	0,46
36	-CH ₂ R-	3'-NO ₂ fenil	-1,44	-1,60	0,16
37	-CH ₂ R-	4'-NO ₂ fenil	-1,93	-1,55	-0,38
38	-CH ₂ R-	2'-OH fenil	-0,54	-1,20	0,66
39*	-CH ₂ R-	3'-OH fenil	-0,78	-0,99	0,21
40	-CH ₂ R-	4'-OH fenil	-0,80	-1,27	0,48
41	-CH ₂ R-	α-CN,4'-OH fenil	-0,86	-1,61	0,75
42	-CH ₂ R-	2'-OCH ₃ fenil	-1,32	-1,26	-0,05
43	-CH ₂ R-	3'-OCH ₃ fenil	-0,69	-1,01	0,32
44*	-CH ₂ R-	4'-OCH ₃ fenil	-1,72	-1,14	-0,58
45	-CH ₂ R-	3',4'-di-OCH ₃ fenil	-2,41	-1,50	-0,92
46*	-CH ₂ R-	2',5'-di-OCH ₃ fenil	-2,35	-1,32	-1,03
47	-CH ₂ R-	4'-OH, 3'-OCH ₃ fenil	-1,23	-1,43	0,20
48	-CH ₂ R-	3'-OH, 4'-OCH ₃ fenil	-1,73	-1,49	-0,24
49*	-CH ₂ R-	4'-OCH ₂ Ph fenil	-1,35	-0,99	-0,35
50	-CH ₂ R-	3'-OPh fenil	-0,06	-0,61	0,55
53	-CH ₂ R-	4'-SCH ₃ fenil	0,00	-0,85	0,84
54*	-CH ₂ R-	4'-CF ₃ fenil	-0,84	-0,43	-0,41
55	-CH ₂ R-	furil	-0,69	-1,17	0,48
56	-CH ₂ R-	5-CH ₃ furil	-1,60	-1,29	-0,31
58*	-CH ₂ R-	3-CH ₃ tiofenil	-2,11	-1,25	-0,86
59*	-CH ₂ R-	5-CH ₃ tiofenil	-2,17	-1,27	-0,90
60	-CH ₂ R-	1-CH ₃ pirrol	-1,99	-1,77	-0,22
61	-CH ₂ R-	naftil	0,18	-0,47	0,65
68	-CH ₂ S-	fenil	-0,24	-0,34	0,10
69	-CH ₂ S-	α-CH ₃ fenil	0,38	-0,08	0,46
70	-CH ₂ S-	2'-Cl fenil	0,23	-0,33	0,56
71	-CH ₂ S-	3'-Clfenil	-0,23	-0,37	0,14
73*	-CH ₂ S-	2',4' -di-C lfenil	-0,53	-0,35	-0,18
74	-CH ₂ S-	2'-NO ₂ fenil	-0,23	-0,44	0,21
76	-CH ₂ S-	4'-NO ₂ fenil	-0,70	-0,93	0,23
77*	-CH ₂ S-	3'-OH fenil	-0,30	-0,51	0,21
78	-CH ₂ S-	α-CN, 4'-OH fenil	-0,38	-0,97	0,59
79	-CH ₂ S-	2'-OCH ₃ fenil	0,00	-0,53	0,53
80	-CH ₂ S-	3'-OCH ₃ fenil	-0,38	-0,76	0,38
81	-CH ₂ S-	4'-OCH ₃ fenil	-0,68	-0,69	0,01
82	-CH ₂ S-	3',4'-di-OCH ₃ fenil	-1,14	-0,97	-0,17
83	-CH ₂ S-	3'-OCH ₃ , 4'-OH fenil	-0,68	-0,87	0,19

* cefalosporinas pertenecientes a la serie de prueba

La calidad de un modelo QSAR de regresión múltiple se evalúa atendiendo a diferentes parámetros estadísticos. Los más comúnmente aceptados son el coeficiente de regresión al cuadrado (R^2), la desviación estándar (S) y la varianza predictiva o de validación cruzada (q^2).¹¹⁴

Los valores de R^2 varían entre 0 y 1, cuanto más tienda a la unidad, mejor ajuste tendrán los datos al modelo. La S es una medida de cuanto se alejan los valores calculados de los predichos por el modelo. La tendencia a cero de este valor pudiera presuponer mayor calidad en la predicción. Sin embargo, esto puede conducir a modelos sobrepredictivos no útiles. La robustez del modelo, también nombrado varianza predictiva o de validación cruzada (q^2) define la habilidad del modelo para realizar la predicción. Un modelo donde se obtenga un valor de $q^2 > 0,5$ puede ser considerado como un modelo predictivo.¹¹⁵

Para que el estudio de relación estructura-actividad se concluya con éxito debe obtenerse un modelo significativo y predictivo. Aun así, la validez del modelo estará siempre limitada al rango de parámetros explorados por la serie de exploración, fuera del cual nunca debe considerarse válido. El modelo así obtenido ha de ser analizado en función de su calidad estadística, para poder evaluar su capacidad de predicción. Cuanta mayor calidad estadística tenga el modelo, más confiables y exactas serán las predicciones a realizar.

Por otra parte, con el objetivo de conocer si el modelo desarrollado era también aplicable al caso de las cepas de SCoNSM, se correlacionaron los valores experimentales de $\log 1/\text{CIM}(\text{SaSM})$ y $\log 1/\text{CIM}(\text{SCoNSM})$ correspondientes a las 57 cefalosporinas de la serie mediante el uso del programa BUILDQSAR. Como resultado se obtuvo la ecuación que se muestra a continuación:

$$\log(1/\text{CIM}(\text{SaSM})) = +0,98675 (\pm 0.08931) \log(1/\text{CIM}(\text{SCoNSM})) - 0,00457 (\pm 0.103142)$$

$$\mathbf{n}=57; \mathbf{R}=0,948; \mathbf{R}^2=0,90 \quad \mathbf{s}=0,248; \mathbf{F}=492,665; \mathbf{q}^2=0,893$$

El alto valor de R^2 permite afirmar que existe una correlación lineal entre ambas series de valores experimentales lo que implica que el modelo QSAR establecido también es aplicable para predecir la actividad antibacteriana de estos compuestos frente a SCoNSM.

Dada la poca actividad desplegada por los compuestos sintetizados en el presente trabajo frente a cepas resistentes de *Staphylococcus* (SaRM y SCoNRM), no fue posible disponer de una base de datos para realizar estudios QSAR frente a este tipo de bacterias. En un futuro sería interesante compilar la data existente en la literatura sobre cefalosporinas efectivas frente a bacterias SaRM e intentar desarrollar un modelo matemático predictivo hacia la búsqueda de nuevos derivados anti-SaRM pertenecientes a esta familia de antibióticos β -lactámico.

4.5 Predicción de la CMI de diferentes compuestos mediante el modelo QSAR establecido.

Para dar continuidad al objetivo de buscar cefalosporinas de este tipo más efectivas y disponiendo como herramienta de un modelo matemático lineal con una buena capacidad predictiva, se decidió utilizar este resultado para guiar el trabajo químico-sintético posterior.

En el epígrafe **4.2.2** y sus correspondientes sub-epígrafes, se describió como no fue posible sintetizar las cefalosporinas derivadas del 7-ACA y diferentes ácidos α,β insaturados, denominadas como **III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII** de la **Figura 25**, ya sea porque no ocurría la acilación o debido a que en los casos particulares de los intermediarios cefalosporánicos protegidos **65-67**, la eliminación de los grupos protectores conducía a la obtención de una mezcla de componentes compleja. Como consecuencia de estos problemas se decidió posponer su síntesis hasta tanto se encontraran rutas sintéticas factibles.

Por otra parte, en consideración a los resultados alcanzados durante la evaluación de la actividad antibacteriana “*in vitro*” de las cefalosporinas sintetizadas a partir del 7-ACA y el 7-ACT (con relación a que el fragmento molecular enlazado a la posición C-3 del núcleo incide de forma

significativa sobre la actividad) y sobre la base de la información existente en la literatura en cuanto a que la introducción de los grupos tiometil-benzotiazol, benzoxazol y benzoimidazol en dicha posición favorecen la actividad antibacteriana frente a cepas SaSM y en particular contra SaRM,^{37,39} era de interés acometer la síntesis de derivados de este tipo.

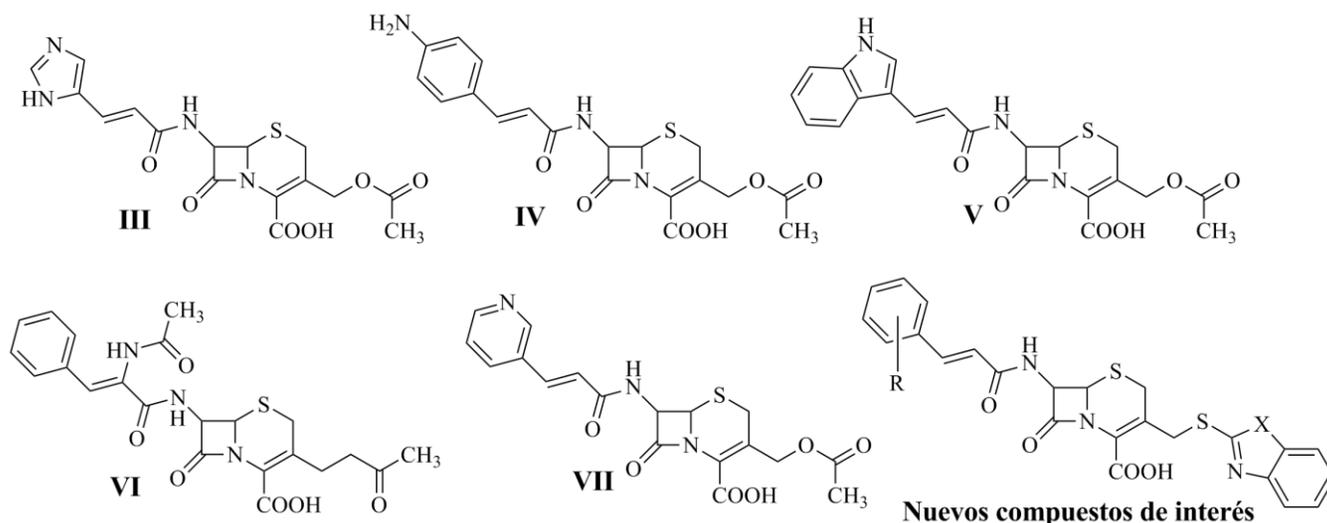
Como sustituyentes en la posición C-7 β se seleccionaron los ácidos (2E)-3-(fenil) y (2E)-3-(2,4-diclorofenil)acrílicos, ya que el primero proporcionó cefalosporinas cabezas de serie efectivas frente a cepas sensibles de *Staphylococcus* (SaSM y SCoNSM) (tanto a partir del 7-ACA como del 7-ACT, compuestos **22** y **68**) y el segundo porque condujo a la síntesis de la cefalosporina más activa (compuesto **31**) frente a cepas resistentes de estas bacterias (SaRM y SCoNRM).

Por todo lo anterior y con la finalidad de tomar una decisión en cuanto a proceder o no a su síntesis, se calculó mediante el modelo QSAR establecido la actividad antibacteriana de todos los compuestos antes citados. En la **Tabla XXIV** se muestran los resultados obtenidos en la predicción de la CMI de estas cefalosporinas mediante el modelo QSAR desarrollado.

Como se observa de la **Tabla XXIV** con la excepción del compuesto derivado del 7-ACA y el (2Z)-2-(acetilamino)-3-fenilacrílico (**VI**) el resto de los compuestos que se pretendió sintetizar (**III**, **IV**, **V** y **VII**) deben ser, de acuerdo a los resultados de la predicción, biológicamente inactivos frente SaSM y SCoNSM y por lo tanto carece de sentido acometer su preparación con la finalidad de obtener derivados más potentes frente a este tipo de cepas. Como consecuencia de lo anterior, durante el presente trabajo se decidió cancelar, la búsqueda de vías más apropiadas para su síntesis. Para los derivados sustituidos en la posición C-3 por grupos tiometil-benzotiazol, benzoxazol y benzoimidazol, la actividad predicha por el modelo QSAR establecido, indicó que estos compuestos deben desplegar una buena actividad antibacteriana frente a SaSM y SCoNSM, particularmente potente en tres de los seis derivados calculados (CMI < 0,3 \square g/mL). En

consideración a lo anterior, se decidió proceder a la síntesis de estas cefalosporinas, aspecto que se discute en el siguiente epígrafe.

Tabla XXIV. Actividad antibacteriana predicha por el modelo QSAR desarrollado.



Compuestos derivados del 7-ACA cuya síntesis se intentó en el epígrafe 4.2.2							
Compuesto	Log P	μ	q_{11}	q_{28}	log 1/CMI predeterminada	CMI	
III	-2,76	3,04	0,030	0,09	-2,31	200	
IV	-2,65	3,75	0,033	0,12	-1,51	33,3	
V	-3,41	3,45	0,051	0,11	-2,36	250	
VI	-2,40	2,34	0,016	0,12	-0,93	8,33	
VII	-2,70	2,28	-0,089	0,12	-0,14	1,39	
Nuevos compuestos de interés modificados en la posición C-3							
R	X	Log P	μ	q_{11}	q_{28}	log 1/CMI predeterminada	CMI
H	S	0,19	1,48	-0,008	0,11	0,58	0,26
H	O	-0,16	6,07	0,025	0,12	-0,51	0,23
H	N	-0,33	2,83	0,027	0,12	0,029	0,93
2',4'-di-Cl	S	-0,26	1,83	-0,027	0,12	0,75	0,18
2',4'-di-Cl	O	-0,60	5,94	-0,009	0,13	-0,11	1,28
2',4'-di-Cl	N	-0,78	2,68	0,011	0,12	-0,05	1,12

4.6 Síntesis de nuevas cefalosporinas a partir de núcleos cefalosporánicos modificados en la posición C-3 (compuestos 89-94).

De los métodos reportados en la literatura^{79,80} para preparar estos derivados se seleccionó como estrategia de síntesis la obtención de los núcleos modificados en C-3 mediante la introducción de los grupos tiometil-benzotiazol, benzoxazol y benzoimidazol y a continuación proceder a la acilación de los mismos con los ácidos fenilacrílicos seleccionados.

4.6.1 Síntesis de los núcleos cefalosporánicos modificados en la posición C-3 (compuestos 86-88).

Los núcleos modificados se sintetizaron por tratamiento del 7-ACA con los tioles portadores de los sistemas bicíclicos aromáticos ya descritos, en una mezcla de acetona-agua como disolvente a pH prácticamente neutro (alcanzado por adición de hidrógenocarbonato de sodio) y a temperaturas entre 60-65 °C como se muestra en la **Figura 33**.

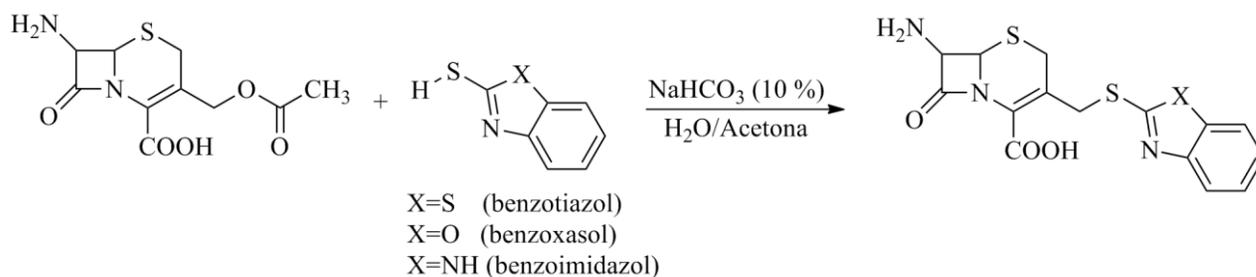


Figura 33. Método de síntesis de los núcleos cefalosporánicos modificados en la posición C-3

Bajo estas condiciones, los tioles actúan como nucleófilos y desplazan al grupo acetoximetilo de la posición C-3 del 7-ACA mediante un mecanismo de reacción que corresponde a una sustitución nucleofílica unimolecular (S_N1) (**Figura 34**).

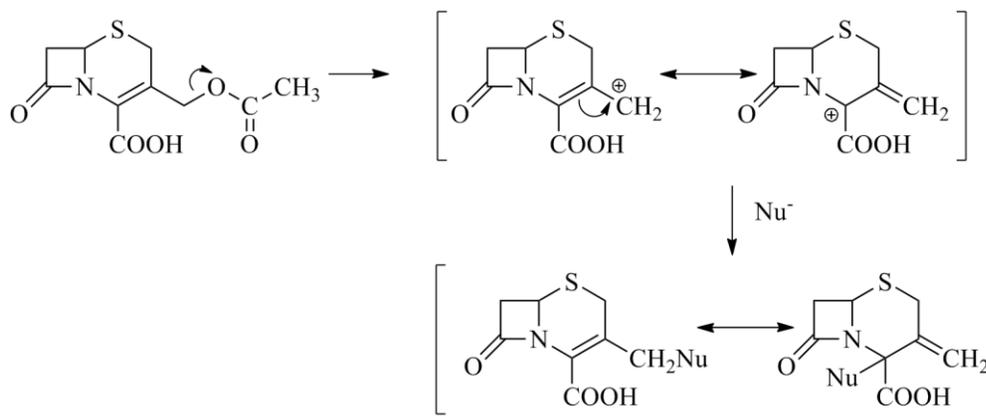


Figura 34. Mecanismo de la reacción de sustitución nucleofílica (SN₁) en la posición C-3 de las cefalosporinas.

En la **Figura 35** se muestran los ácidos 7β-amino-3-heteroariltiometil-3-cefem-4carboxílicos de interés (**86-88**) sintetizados, y el rendimiento alcanzado en cada caso.

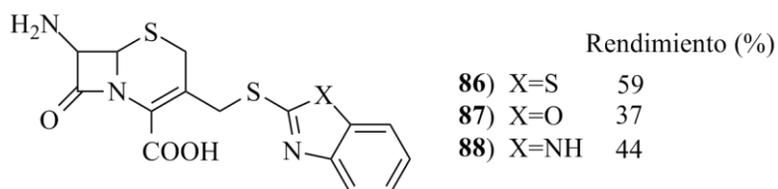


Figura 35. Núcleos cefalosporánicos modificados en la posición C-3 obtenidos (86-88).

Por lo general, se obtuvieron bajos rendimientos debido a que la reacción ocurre en presencia de una base y temperaturas de 60-65 °C, que pueden considerarse altas teniendo en cuenta la extrema labilidad química y térmica del núcleo cefalosporánico. Estas condiciones conllevan a reacciones colaterales relacionadas con la hidrólisis del ciclo β-lactámico. Estos compuestos no fueron caracterizados por RMN dada su insolubilidad en agua y en disolventes orgánicos.

4.6.2 Síntesis de nuevas acrilcefalosporinas a partir de los núcleos modificados en C-3 (compuestos 89-94).

Para sintetizar las cefalosporinas de interés se decidió seleccionar, en principio, el mismo procedimiento utilizado durante la preparación de los compuestos derivados del 7-ACA y el 7-

ACT, es decir la acilación de los núcleos con los ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos activados mediante el reactivo de *Vilsmeier* como se muestra en la **Figura 36**.

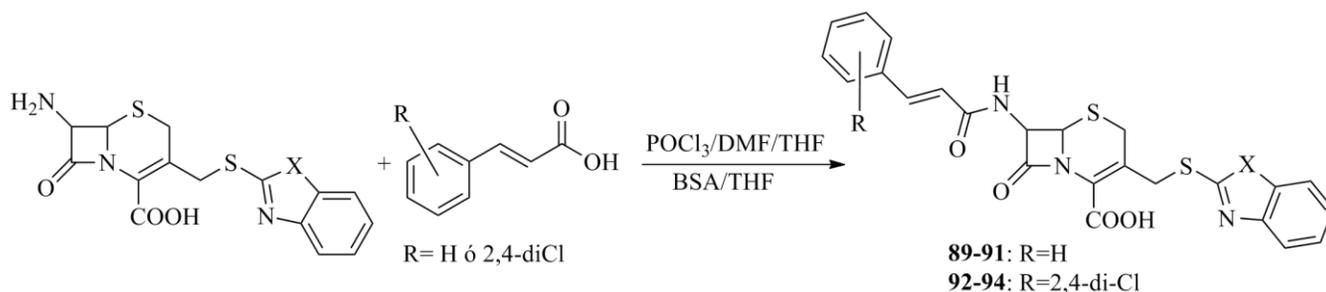


Figura 36. Síntesis de nuevas acrilcefalosporinas con núcleos modificados en C-3 (89-94).

Por tratarse de núcleos cefalosporánicos portadores en la posición C-3 de sistemas enlazados a través de un grupo tiometilo (al igual que el 7-ACT), la práctica demostró que la técnica empleada en el caso de la obtención de los derivados del 7-ACT resultó la más adecuada. De esta manera se usó el THF como disolvente durante la acilación y una relación molar de BSA/núcleo cefalosporánico (5:1) para lograr su disolución a temperatura ambiente en un tiempo prudencial.

La selección de los ácidos α, β insaturados utilizados ácidos (2*E*)-3-(fenil) y (2*E*)-3-(2,4-diclorofenil)acrílicos se corresponde con lo discutido en el **epígrafe 4.6**. En la **Figura 37** se muestran las cefalosporinas sintetizadas y los rendimientos alcanzados en cada caso.

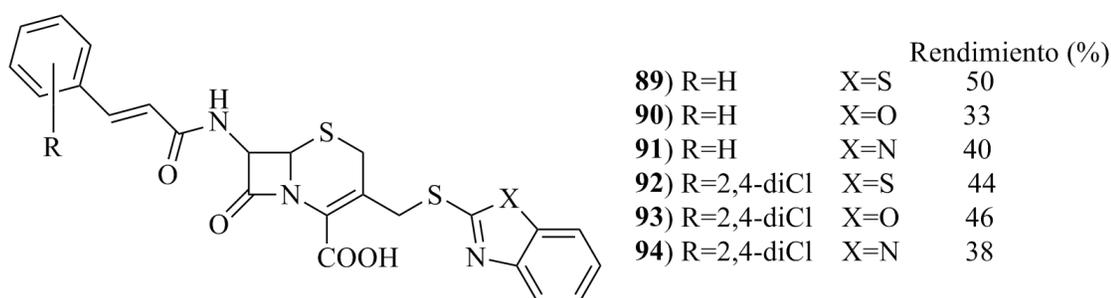


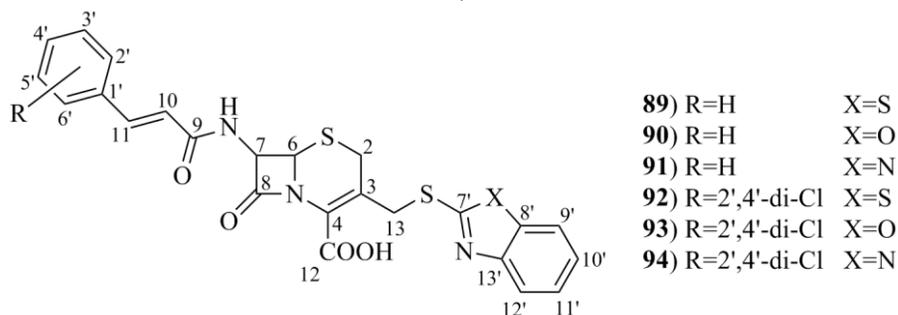
Figura 37. Nuevas acrilcefalosporinas a partir de los núcleos modificados en C-3 (89-94).

4.6.3 Análisis espectroscópico por RMN ^1H y RMN ^{13}C de los compuestos 89-94.

En las **Tablas XXV y XXVI** se muestran los valores de corrimiento químico asignados a los protones y átomos de carbono de las moléculas correspondientes a los productos sintetizados (**89-**

94). En todos los casos los espectros obtenidos se correspondieron con las estructuras químicas de la cefalosporinas sintetizadas.

Tabla XXV. Datos de RMN ^1H (ppm) de nuevas acrilcefalosporinas modificadas en C-3 (89-94).



Comp.	NH ^a	H-10 ^c	Aromáticos ^d	H-7 ^e	H-6 ^f	H-13 ^g	H-2 ^h
89	9,00	6,77	7,30-8,05 (10H, <i>m</i>)	5,82	5,16	4,79 y 4,28	3,84 y 3,63
90	9,01	6,77	7,27-7,70 (10H, <i>m</i>)	5,83	5,16	4,67 y 4,28	3,86 y 3,65
91	9,00	6,76	7,05-7,75 (10H, <i>m</i>)	5,82	5,18	4,50 y 4,40	3,83 y 3,67
92	9,21	6,81	7,31-8,15 (8H, <i>m</i>)	5,82	5,16	4,80 y 4,24	3,83 y 3,67
93	9,20	6,81	7,24-7,76 (8H, <i>m</i>)	5,82	5,16	4,66 y 4,25	3,86 y 3,64
94	9,19	6,82	7,00-7,90 (8H, <i>m</i>)	5,82	5,17	4,46 y 4,32	3,80 y 3,67

a Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete con $^3J_{\text{NH-7}}=8$ Hz

b Para todos los compuestos el protón H-11 está solapado con los protones aromáticos.

c Esta señal integra 1H y aparece como un doblete con $^3J_{10-11}=16$ Hz.

d La señal del protón H-11 está incluida dentro de los protones aromáticos.

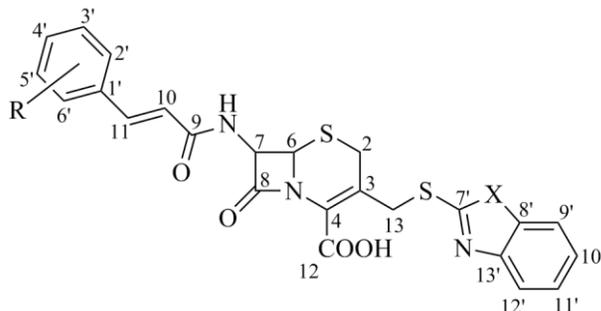
e Para todos esta señal integra 1H y aparece como un doblete de doblete con $^3J_{\text{NH-7}}=8$ Hz y J y $^3J_{6-7}=5$ Hz

f Para todos los compuestos esta señal integra 1H y aparece como un doblete con $^3J_{6-7}=5$ Hz.

g Para todos los compuestos esta señal integra 2H y aparece como un sistema AB con $^2J_{\text{H-13}}=13$ Hz

h Para todos los compuestos esta señal integra 2H y aparece como un sistema AB con $^2J_{\text{H-2}}=18$ Hz

Tabla XXVI. Datos de RMN ^{13}C (ppm) de nuevas acrilcefalosporinas modificadas en C-3 (89-94).



- 89) R=H X=S
 90) R=H X=O
 91) R=H X=N
 92) R=2',4'-di-Cl X=S
 93) R=2',4'-di-Cl X=O
 94) R=2',4'-di-Cl X=N

C	89	90	91	92	93	94
2	27,03	26,90	26,73	27,09	26,94	27,15
3	125,12	124,75	124,50	125,09	124,78	124,61
4	126,18	126,23	126,17	126,19	126,19	126,44
6	57,60	57,54	57,54	57,60	57,49	57,58
7	59,04	59,06	59,09	59,08	59,09	59,10
8	164,57	164,60	164,47	164,51	164,51	164,49
9	165,23	165,26	165,29	164,71	165,70	165,32
10	120,40	118,17	120,42	121,25	118,27	120,56
11	140,37	140,40	140,39	134,81	134,77	134,79
12	162,79	162,85	162,70	162,96	162,99	162,97
13	34,96	34,10	34,43	34,93	34,11	34,62
7'	165,54	163,63	149,33	165,70	163,75	149,87
A	121,14	110,05	113,48 (2C)	121,75	110,18	113,35 (2C)
R	121,55	120,41	122,96 (2C)	124,10	124,08	122,82 (2C)
O	124,42	124,16	127,52 (2C)	124,56	124,24	128,07
M	126,13	124,43	128,78 (2C)	126,27	124,56	128,90
A	127,50	127,52	129,64	128,08	128,05	129,45
(2C)	(2C)	(2C)	134,43	128,88	128,87	131,33
T	128,75	128,77	136,47 (2C)	129,44	129,41	134,18
I	(2C)	(2C)		131,33	131,32	134,61
C	129,60	129,62		134,20	134,17	136,22 (2C)
O	134,39	134,41		134,60	134,58	
S	134,68	141,06		134,75	141,11	
	152,30	151,25		152,36	151,32	

La síntesis de las cefalosporinas **89-94** se verificó por RMN ^1H debido a la presencia en los espectros registrados de las señales típicas pertenecientes al núcleo cefalosporánico: sistemas AB con $^2J_{\text{H-2}}=18\text{ Hz}$ y $^2J_{\text{H-13}}=13\text{ Hz}$ asignables a los protones de los grupos CH_2 de la posición C-2 y del grupo tiometilo, respectivamente; doblete con $^3J_{6-7}=5\text{ Hz}$ correspondiente al protón unido

a la posición C-6; doblete de doblete con valores de ${}^3J_{6-7}=5$ Hz y ${}^3J_{\text{NH}-7}=8$ Hz y perteneciente al protón enlazado a la posición C-7.

En todos los casos se observó la ausencia del singulete característico del CH₃ del grupo acetoximetilo del 7-ACA en la zona próxima a δ 2 ppm, hecho que confirmó la sustitución de este fragmento molecular por los tioles utilizados y por lo tanto la obtención de los núcleos modificados en C-3. En el espectro de todos los compuestos se observó, en el intervalo de δ 9,0-9,21 ppm, un doblete con ${}^3J_{\text{NH}-7}=8$ Hz correspondiente al grupo NH de la amida formada. Para todos los derivados la señal del protón unido a la posición α del enlace insaturado se registró en el rango de δ 6,76-6,82 ppm como un doblete con ${}^3J_{10-11}=16$ Hz, mientras que la señal perteneciente al protón enlazado a la posición β está sobrelapada con las señales correspondientes a los protones aromáticos del fragmento molecular introducido en la posición C-7 β .

El análisis por RMN ¹³C confirmó la síntesis de estos compuestos, pues además de las señales habituales de los átomos de carbono del núcleo cefalosporánico y las características del fragmento de los ácidos α,β insaturados con los que se realizó la acilación, se registraron las señales pertenecientes a todos los grupos carbonilo existentes en las estructuras, en particular el asignable al carbonilo de las amidas formadas (entre δ 164-165 ppm). De igual modo, se detectó la presencia de una señal a δ 34-35 ppm típica del CH₂ del grupo tiometilo de estos núcleos y relacionada con la preparación de las cefalosporinas de interés.

En los **Anexos 7a-b** se incluyen los espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C y DEPT del compuesto **89** como ejemplo de los resultados obtenidos.

La actividad antibacteriana de los derivados sintetizados no pudo ser determinada de forma experimental durante el presente trabajo, por lo que queda como un aspecto pendiente de suma importancia, ya que además de constituir una validación adicional del modelo QSAR establecido,

posibilitaría definir en gran medida el camino a seguir con la finalidad de disponer de cefalosporinas más activas frente a cepas tanto sensibles como resistentes de *Staphylococcus*.

4.7 Consideraciones generales de la Discusión de los Resultados

En la presente tesis se propuso como objetivo general, obtener nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos α,β insaturados y evaluar sus propiedades antibacterianas *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus spp.* La finalidad del trabajo consistía en encontrar compuestos activos frente a este tipo de cepas bacterianas y a partir de la determinación de los datos de su acción biológica, conformar una base de datos que posibilitara desarrollar un modelo matemático lineal capaz de orientar la síntesis de nuevos derivados más potentes de manera eficiente.

Los resultados iniciales se relacionaron con el estudio de preparación de los ácidos α, β insaturados (reactivos de partida) mediante la reacción de *Knoevenagel-Doebner* donde se demostró que el uso de etanol como disolvente no conduce a la síntesis de los ácidos (2*E*)-3-(2-cloro-6-fluorofenil)acrílico (**10**) y (2*E*)-3-(2-tienil)acrílico (**13**). En su lugar se utilizó la piridina como disolvente en presencia de piperidina como catalizador lo que permitió obtener 18 compuestos de este tipo con una alta pureza.

Durante el trabajo se obtuvieron tres ácidos α,β insaturados tritilados y se comprobó que la tritilación del ácido (2*E*)-3-(1*H*-imidazol-4-il)acrílico mediante la técnica tradicional que implica la reacción con trifenilclorometano en presencia de TEA, procede con una baja conversión. En este sentido se desarrolló un nuevo procedimiento para la tritilación donde se utiliza la BSA en lugar de la amina terciaria y que posibilitó sintetizar el derivado tritilado de interés (compuesto **60**) con muy buen rendimiento.

De forma adicional, se obtuvieron tres intermedios cefalosporánicos (compuestos **65**, **66** y **67**), no descritos con anterioridad en la literatura, mediante el condensación directa con DCC que condujo a buenos resultados.

En relación con las cefalosporinas portadoras de ácidos α,β insaturados aromáticos obtenidas en el documento de tesis se muestra la síntesis de 65 compuestos de este tipo distribuidos en tres grupos: 41 cefalosporinas derivadas del 7-ACA, 18 obtenidas a partir del 7-ACT y seis preparadas con núcleos cefalosporánicos modificados en la posición C-3. De todos estas cefalosporinas, 51 se describen por primera vez en la literatura científica.

Del total de compuestos, 57 pertenecientes a los dos primeros grupos (cefalosporinas derivadas del 7-ACA y el 7-ACT) fueron evaluados biológicamente “*in vitro*” mediante la determinación de su CMI frente a cepas sensibles y resistentes de *Staphylococcus*.

En la evaluación frente a cepas sensibles a *Staphylococcus* (SaSM y SCoSM), se pudo comprobar que, por lo general, las cefalosporinas obtenidas a partir del 7-ACT desplegaron una actividad antibacteriana superior a las derivadas del 7-ACA.

En el caso de las cefalosporinas procedentes del 7-ACA, se pudo apreciar que los compuestos obtenidos por acilación con ácidos (2E)-3-(fenil)acrílicos exhibieron una mayor potencia que los preparados a partir de ácidos α,β insaturados portadores de otros sistemas aromáticos en su estructura, con la excepción del derivado del ácido (2E)-3-(1-naftil)acrílico (compuesto **58**). Además, la presencia de sustituyentes en los ácidos (2E)-3-(fenil)acrílicos, por lo general no condujo a un aumento de la actividad antibacteriana frente a SaSM (en comparación con el derivado sin sustituir), aunque contra SCoSM este factor influyó de manera más favorable y un mayor número de compuestos resultaron más efectivos que el derivado sin sustituir.

Con respecto a los derivados del 7-ACT (todos obtenidos a partir de ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos), la presencia de sustituyentes resultó más favorable y proporcionó un mayor número de derivados con potencia superior frente a SaSM que el compuesto sin sustituir.

Como resultados generales de la relación estructura actividad en las acrilcefalosporinas evaluadas se pudo apreciar que el patrón de sustitución del anillo aromático influye sobre la actividad antibacteriana donde las posiciones *orto* y *meta* fueron las más favorables así como la presencia de sustituyentes, principalmente electroaceptores, en estas posiciones. Los compuestos con sustituyentes en la posición *para* o disustituídos, en la mayor parte de los casos, fueron prácticamente inactivos.

Ninguna de las cefalosporinas sintetizadas fue activa frente a cepas resistentes de *Staphylococcus* (SaRM y SCoRM) con la excepción del compuesto obtenido a partir del 7-ACA y el ácido (2*E*)-3-(2,4-diclorofenil)acrílico (**31**), que desplegó la mejor actividad antibacteriana frente a este tipo de bacterias, comparado con el resto de los compuestos evaluados. Por su valor de CIM no es un producto efectivo para el control de estas bacterias resistentes, sin embargo puede ser considerado como un punto de partida para, realizar modificaciones estructurales en la posición C-3 con el objetivo de obtener derivados más potentes.

Como otro resultado novedoso se logró establecer un modelo QSAR lineal predictivo, a partir de la determinación de la CMI frente a cepas sensibles y el cálculo de varios descriptores electrónicos, estéricos y lipofílicos en los compuestos evaluados. El modelo obtenido se ajustó al 79 % de los compuestos pertenecientes a la serie de entrenamiento y permitió predecir correctamente el 82 % de los derivados seleccionados como serie de prueba.

Los seis compuestos correspondientes al tercer grupo (obtenidos a partir de núcleos con modificaciones en la posición C-3) se sintetizaron tomando en consideración los resultados favorables de la actividad antibacteriana predicha por el modelo matemático antes citado.

Todos los compuestos sintetizados fueron debidamente caracterizados estructuralmente, lo que constituye un aporte a la data espectroscópica que servirá de base a la comunidad científica mundial para trabajos futuros.

A modo de resumen, durante el desarrollo del trabajo reflejado en la presente tesis se lograron obtener un total de 16 cefalosporinas con una CMI “*in vitro*” frente a cepas sensibles de *Staphylococcus* (SaSM y SCoSM) igual o inferior a 2 µg/mL. En particular resultaron potentes los productos obtenidos a partir del 7-ACT y los ácidos α -metil (2*E*)-3-(fenil) y (2*E*)-3-(2-clorofenil) acrílicos (compuestos **69** y **70**, respectivamente), así como el derivado del 7-ACA y el ácido (2*E*)-3-(1-naftil)acrílico (compuesto **61**), los cuales exhibieron una actividad antibacteriana similar a la cefazolina y superior a la cefuroxima.

En consideración a todo lo anterior, se puede afirmar que la síntesis de las nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos α,β insaturados con actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus spp.* implica un aporte novedoso al conocimiento científico y además permite disponer de resultados que pueden constituir la base de la utilización de estos compuestos como una futura alternativa al arsenal terapéutico existente.

5. CONCLUSIONES

1. Se demostró que la acilación del 7-ACA y el 7-ACT con diferentes ácidos α,β insaturados mediante el método del reactivo de *Vilsmeier* permite obtener cefalosporinas activas frente a bacterias sensibles del género *Staphylococcus spp*. En total se sintetizaron 45 nuevos compuestos de este tipo cuya estructura fue confirmada por RMN y espectrometría de masa, de los cuales 16 derivados desplegaron una actividad notable frente a este tipo de cepas.
2. Se demostró que en las nuevas cefalosporinas obtenidas, las señales de RMN correspondientes a los protones y átomos de carbono del núcleo cefalosporánico mantienen sus valores de corrimiento químico independientemente de los sustituyentes presentes en las posiciones C-3 y C-7 β de la molécula.
3. Se demostró que las cefalosporinas derivadas del 7-ACT poseen una mayor actividad antibacteriana “*in vitro*” frente a cepas sensibles de *Staphylococcus* (SaSM y SCoNSM) que los análogos sintetizados a partir del 7-ACA. La presencia de sustituyentes en el sistema aromático unido a la posición C-7 β condujo con mayor frecuencia a una actividad superior en el caso de los compuestos obtenidos con el 7-ACT en comparación con los derivados del 7-ACA.
4. Se demostró que en la relación estructura actividad en las cefalosporinas obtenidas a partir del 7-ACA y el 7-ACT con diferentes ácidos (2*E*)-3-(fenil)acrílicos, la presencia de sustituyentes (particularmente electroaceptores) en las posiciones *orto* y *meta* del anillo aromático resulta mucho más favorable para el despliegue de la actividad antibacteriana *in vitro* que la sustitución en la posición *para*, la cual por regla general conduce a compuestos biológicamente inactivos.

5. Se determinó que ninguna de las cefalosporinas obtenidas resultó efectiva frente a cepas resistentes de *Staphylococcus* (SaRM y SCoNRM). El compuesto obtenido a partir del 7-ACA y el ácido (2*E*)-3-(2,4-diclorofenil)acrílico (**28**) desplegó la mejor actividad antibacteriana *in vitro* contra este tipo de bacterias de todas las cefalosporinas evaluadas y pudiera constituir un punto de partida para la búsqueda de compuestos anti-SaRM más potentes.
6. Se obtuvo un modelo lineal predictivo que relaciona la estructura química de cefalosporinas derivadas de ácidos α,β insaturados y portadoras de diferentes sustituyentes en las posiciones C-3 y C-7 β del núcleo cefalosporánico, con su actividad antibacteriana frente a cepas sensibles de *Staphylococcus* (SaSM y SCoNSM). El modelo matemático obtenido fue aplicable a un 79 % de los compuestos de la serie de entrenamiento y fue capaz de predecir correctamente la CMI del 82 % de la serie de prueba seleccionada.

6. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de las 6 cefalosporinas sintetizadas a partir de los núcleos modificados en la posición C-3 por introducción de los fragmentos tiometil-benzotiazol, benzoxazol y benzoimidazol (compuestos **89-94**) frente a cepas sensibles y resistentes de *Staphylococcus* como otra vía para validar la capacidad predictiva del modelo QSAR establecido, y para definir si la estrategia utilizada conduce a la obtención de compuestos más potentes frente a SaRM y SCoNRM, en particular los derivados del ácido (2E)-3-(2,4-diclorofenil)acrílico.
2. Sintetizar nuevos análogos de la cefalosporina derivada del 7-ACA y el ácido (2E)-3-(2,4-diclorofenil)acrílico, mediante la introducción en la posición C-3 de grupos, que de acuerdo a la literatura, potencien la actividad antibacteriana frente a cepas resistentes de *Staphylococcus* (SaRM y SCoNRM).
3. Compilar la data existente en la literatura sobre cefalosporinas efectivas bacterias SaRM e intentar desarrollar un modelo matemático predictivo que posibilite guiar un trabajo químico-sintético encaminado hacia la búsqueda de nuevos derivados anti-SaRM pertenecientes a esta familia de antibióticos β -lactámicos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

-
- ¹ López, M. Desarrollo de Nuevos Procedimientos para la Obtención de cefalosporinas de tercera generación y síntesis de nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos cinámicos. Tesis en opción al título de doctor en Ciencias Farmacéutica. Ciudad de la Habana, (2003).
- ² Beers, M.H. *El Manual Merck de diagnóstico y tratamiento*. 11th editions, Elsevier, España, S.A. Madrid, 1555-58, (2007).
- ³ Abraham, E. P. Cephalosporins 1945–1986. *Drugs*, 34 (Suppl. 2), 1–14, (1987).
- ⁴ Hamilton-Miller, J.M.T. Development of the semi-synthetic penicillins and cephalosporins. *Int J. Antimicrob. Agents*, 31, 189–92, (2008).
- ⁵ Petri, W.A. Jr. Chemotherapy of Microbial Diseases, Antimicrobial Agents: Penicillins, Cephalosporins, and other β -Lactam Antibiotics. *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, Laurence Brunton, John Lazo and Keith Parker Eds. New York, McGraw-Hill, 200-57, (2005).
- ⁶ Karchmer, A. W.; Mandell, G. L.; Douglas, R. Cephalosporins principles and practice of Infectious diseases, Bennett's, J. E. Eds., Livingstone, Inc, Philadelphia, 274–91, (2000).
- ⁷ Waxman, D. J.; Strominger, J. L. β lactams antibiotics. Biochemical modes of action. *Chemistry and Biology of β -lactam antibiotics*, R.B. Morin and M. Gorman Eds, Academic Press Inc., New York Vol. 3, 210-85, (1982).
- ⁸ Fisher, J. D.; Samy, O.; Shahriar, M. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunity. *Chem. Rev.*, 105, 395-424, (2005).
- ⁹ Bush, K.; Jacoby, G.A.; Medeiros, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.*, 39, 1211–33, (1995).
- ¹⁰ Macheboeuf, P.; Contreras, C.; Job, V.; Dideberg, O.; Dessen, A. Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30, 673–691, (2006).
- ¹¹ Butaye, P.; Cloeckert, A.; Schwartz, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22, 205–10, (2003).

-
- ¹² Kamicker, B. J.; Sweeney, M. T.; Kaczmarek, F.; Dib-Hajj, F.; Shang W.; Crimin, K.; Duignan, J.; Gootz, T. D. Bacterial Efflux Pump Inhibitors, *Methods in Molecular Medicine. New Antibiotic Targets*, Human Press Inc. Champney, 187-204, (2008).
- ¹³ Dancer, S.D. The problem with cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 48, 463-78, (2001).
- ¹⁴ Flynn, E. H. Cephalosporins and penicillins, Chemistry and Biology. Academic Press, New York, London, 533-79, (1972).
- ¹⁵ Boyd, D.B. Theoretical and physicochemical studies on β -lactam antibiotics. *β -lactam antibiotics: Chemistry and Biology of β -lactam antibiotics*, Academic Press Inc., NY, Vol. 1, Cap. 5, 437-545 (1982).
- ¹⁶ Herranz, R. Desarrollo y avances recientes en el campo de los antibióticos β -lactámicos. 1^{ra} Parte. *Farmacia Clínica*, 3 (5), 12-33, (1986).
- ¹⁷ Page, M. I.; Proctor, P. Mechanism of β -lactam ring opening in cephalosporins. *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 3820-3825, (1984).
- ¹⁸ Pop, E.; Brewster, M. E.; Bodor, N. Theoretical aspects of cephalosporin isomerism. *Int J Quant Chem.*, 16, 291-300, (1989).
- ¹⁹ Boyd, D. B. Electronic structures of cephalosporins and penicillins. 15. Inductive effect of the 3-position side chain in cephalosporins. *J. Med. Chem.*, 27, 63-66, (1984).
- ²⁰ Boyd, D. B.; Lunn, H. W. Electronic structures of cephalosporins and penicillins. 9. Departure of a leaving group in cephalosporins. *J. Med. Chem.*, 22, 778-784, (1979).
- ²¹ Boyd, D. B.; Snoddy, J. D. Insight into lactam antibiotics and their receptors from computational chemistry. *Molecular aspects of chemotherapy*, Shugar, D., Rode, W., Borowski, E., Eds.; Polish Scientific Publishers: Warsaw, Poland; Springer-Verlag, NY, 1-22, (1992).
- ²² Roche, A.; Zito, S.W. Foye's Principles of medicinal chemistry. 6th edition, Lippincott William and Wilkins Ed., London, 1046-52 (2007).
- ²³ Bentley, P.H; Southgate, R. Recent advance in the chemistry of β -lactams antibiotics. The Royal Society Chemistry, London, 108-112, (1988).
- ²⁴ Cazzola, M. Novel oral cephalosporins. *Expert Opin Inv Drug.*, 9(2), 237-46, (2000).
- ²⁵ Cohen, N. C. β -lactam antibiotics. Geometrical requirements for antibacterial activities. *J. Med. Chem.*, 26, 259-264, (1983).
- ²⁶ Walsh, C. Antibiotics: actions, origins and resistance, ASM Press; 1495-1504, (2003).

-
- ²⁷ Suárez, C.; Gudiol, F. Beta-lactams antibiotics. *Enferm. Infecc Microbiol. Clin.*, 27(2), 116-29, (2009).
- ²⁸ Enright, M.C.; Robinson, D.A.; Randle, G.; Feil, E.J.; Grundmann, H.; Spratt, B.G. Evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.*, 99, 7687-692, (2002).
- ²⁹ Appelbaum, P.C. MRSA—the tip of the iceberg. *Clin Microbiol Infect.*, 12, 3–10, (2006).
- ³⁰ Hiramatsu, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.*, 1,147-55, (2001).
- ³¹ Barret, J. F. MRSA- what is it, and how do we deal with the problem? *Expert Opin. Ther. Targets.*, 9(2), 253-265, (2005).
- ³² Gould I.M. Antibiotics, skin and soft tissue infection and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: cause and effect. *Int J Antimicrob Agent*, 34 (Suppl 1), S8-11, (2009)
- ³³ Aksoy, D.Y.; Unal, S. New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14(5), 411-20, (2008).
- ³⁴ Anstead, G.M.; Quinones-Nazario, G.; Lewis, J.S. Treatment of infections caused by resistant *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol. Biol.*, 391, 227-58, (2007).
- ³⁵ Pan, A.; Lorenzotti, S.; Zoncada, A. Registered and investigational drugs for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 3(1),10-33, (2008).
- ³⁶ Stryjewski, M. E.; Corey, G.R. New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Crit. Care*, 15(5), 403-412, (2009).
- ³⁷ Glinka, T.W. Novel cephalosporins for the treatment of MRSA infections. *Curr. Opin. Invest Dr.*, 3, 206-17, (2002).
- ³⁸ Guignard, B.; Entenza, J.M.; Moreillon, P. β lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5, 479-89, (2005).
- ³⁹ Page, M.G.P. Anti- MRSA β -lactams in development. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 6, 480-85, (2006).
- ⁴⁰ Shahid, M. Beta-lactams and Beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: A comprehensive update. *Crit. Rev. Microbiol.*, 35(2), 81–108, (2009).
- ⁴¹ Bush, K.; Heep, M.; Macielag, M.J.; Noel, G.J. Anti-MRSA beta-lactams in development, with a focus on ceftobiprole: The first anti-MRSA beta-lactam to demonstrate clinical efficacy. *Expert Opin. Inv. Drug*, 16, 419–29, (2007).

-
- ⁴² Zhanel, G.G.; Lam, A.; Schweizer, F.; Thompson, K.; Walkty, A.; Rubinstein, E.; Gin, A.S.; Hoban, D.J. Noreddin, A.M.; Karlowsky, J.A. Ceftobiprole: A review of a broad spectrum and anti-MRSA cephalosporin. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 9, 245-54, (2008).
- ⁴³ Anderson, S.D.; Gums, J.G. Ceftobiprole: an extended-spectrum anti methicillin resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin. *Ann. Pharmacother.*, 42, 806–16, (2008).
- ⁴⁴ Noel, G.J.; Strauss, R.S.; Shah, A.; Bagchi, P. Ceftobiprole versus ceftazidime combined with linezolid for treatment of patients with nosocomial pneumonia [abstract #K-486]. 48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting; Washington, District of Columbia, (2008).
- ⁴⁵ Noel, G.J.; Strauss, R.S., Amsler, K. Results of a double-blind, randomized trial of ceftobiprole treatment of complicated skin and skin structure infections caused by gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 7–44, (2008).
- ⁴⁶ Vidailiac, C.; Rybak, M.J. Ceftobiprole: first cephalosporins with activity again methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacotherapy*, 29(5), 511-25, (2009).
- ⁴⁷ Sader, H. S.; Fritsche, T. R.; Jones, R. N. Antimicrobial activity of ceftaroline and ME1036 tested against clinical strains of community–acquired methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Ch.*, 52, 1153–55, (2008).
- ⁴⁸ Parish, D.; Scheinfeld, N. Ceftaroline fosamil, a cephalosporin derivative for the potential treatment of MRSA infection. *Curr. Opin. Invest. Dr.*, 2, 201-9, (2008).
- ⁴⁹ Kanafani, Z.A.; Corey, G.R. Ceftaroline: a cephalosporin with expanded grampositive activity. *Future Microbiol.*, 4, 25–33, (2009).
- ⁵⁰ Abbanat, D.; Morrow, B.; Bush, K. New agents in development for the treatment of bacterial infections. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 8(5),582-92, (2008).
- ⁵¹ Fung–Tomc, J. C.; Clark, J.; Minassian, B.; Pucci, M.; Tsai, Y. H; Gradelski, E.; Lamb, L.; Medina, I.; Huczko, E.; Kolek, B.; Chaniewski, S.; Ferraro, C.; Washo, T.; Bonner, D. P. *In vitro* and *in vivo* activities of a novel cephalosporin, BMS–247243, against Methicillin–resistant and –susceptible *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Ch.*, 46, 971–76, (2002).
- ⁵² Johnson, M.D.; Decker, C.F. Antimicrobial agents in treatment of MRSA infections. *Dis. Mon.*, 54(12),793-800, (2008).

-
- ⁵³ Johnson, A. P.; Warner, M.; Carter, M.; Livermore, D. M. *In Vitro Activity of Cephalosporin RWJ-54428 (MC-02479) against Multidrug-Resistant Gram-Positive Cocci*, *Antimicrob. Agents Ch.*, **46**, 321-6, (2002).
- ⁵⁴ Carey, F. A.; Sundberg, J. *Advanced Organic Chemistry. Part A. Structure and Mechanisms*, 5th Ed. Springer, New York, 237, 466-468, 477-478, (2007).
- ⁵⁵ Pellón, R. F.; Mamposo, T. Empleo de la reacción de Knoevenagel en la síntesis de ácidos cinámicos. *Revista CENIC, Ciencias Químicas*, **25 -26 (1-2-3)**,15-17, (1994-95).
- ⁵⁶ Pellón, R. F.; Mamposo, T.; Gonzalez, E. Synthesis of cinnamic acids derivatives using ethanol as solvent microwave asisted methods. *Synthetic Comm.*, **30(20)**, 3769-74, (2000).
- ⁵⁷ Just, C., *Iminium Salts in Organic Chemistry*, H. Böhme and H. G. Viehe (Eds.), Vol. 9, *Advances in Organic Chemistry: Methods and Results*, Wiley-Interscience, NY, 225-342, (1976).
- ⁵⁸ Takaya, T.; Takasugi, H.; Masugi, T.; Kochi, H.; Nakano, H. Studies on β -lactam antibiotics. II. Synthesis and structure-activity relationships of α -hydroxyminoarylacetyl cephalosporins. *J. Antibiot.*, **34(10)**, 1290-99, (1981).
- ⁵⁹ Takasugi, H.; Kochi, H.; Masugi, T.; Nakano, H.; Takaya, T. Studies on β -lactam antibiotics. VII. Effect on antibacterial activity of the oxime O-substituents with various functional groups in the 7 β -[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-oxyminoacetamido] cephalosporins. *J. Antibiot.*, **36 (7)**, 846-54, (1983).
- ⁶⁰ Takasugi, H.; Takaya, T.; Murakawa, T.; Nakano, H. Studies on β -lactam antibiotics. III. Synthesis and enzymatic stability of 3-acyloxymethyl-7 β -[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-(methoxymino)acetamido]-3-cephem-4-carboxylic acids. *J. Antibiot.*, **34 (10)**, 1300-18, (1981).
- ⁶¹ Iwamatsu, K.; Atsumi, K.; Sakagami, K.; Ogino, H.; Yoshida, T.; Tsuruoka, T.; Inouye, S.; Kondo, S. A new antipseudomonal cephalosporin CP 6162 and its congeners. *J. Antibiot.*, **43 (11)**, 1450-63, (1990).
- ⁶² Iwamatsu, K.; Tushima, M.; Tamura, A.; Shihabara, S. Novel cephalosporin derivatives possessing a bicyclic heterocycle at the 3-position. Part I: Synthesis and biological activities of 3-(benzothiazol-2-yl) thiocephalosporin derivatives, CP 0467 and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 1009-17, (1998).

-
- ⁶³ Nishimura, S.; Yasuda, N.; Sasaki, H.; Sakane, K.; Takaya, T. Synthesis and antibacterial activity of 7 β -[1-(2-aminothiazol-4-yl)-1-cyclopropanecarboxyamido] cephem derivatives. *J. Antibiot.*, 43(10), 1278-85, (1990).
- ⁶⁴ Yamada, H.; Ueda, S.; Mutoh, M.; Nagata, H.; Nouda, H.; Fukasawa, M.; Okuda, T. New orally active cephalosporin esters *J. Antibiot.*, 43 (5), 578-83, (1990).
- ⁶⁵ Yamanaka, H.; Kawabata, K.; Miyai, K.; Takasugi, H., Kamimura, T.; Mine, Y.; Takaya, T. Studies on β -lactam antibiotics. X. Synthesis and structure-activity relationships of 7 β -[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(carboxymethoxymino) acetamido] cephalosporin derivatives. *J. Antibiot.*, 39 (1), 101-110, (1986).
- ⁶⁶ Mochizuki, H.; Oikawa, Y.; Yamada, H.; Kusakabe, S.; Shihara, T.; Murakami, K.; Kato, K.; Ishiguro, J.; Kosuzume, H. Antibacterial and pharmacokinetic properties of M 14659, a new injectable semisynthetic cephalosporin. *J. Antibiot.*, 41 (3), 377-91, (1988).
- ⁶⁷ Goi, M.; Yokoo, C.; Onodera, A.; Murata, M.; Nagate, T.; Watanabe, Y.; Sota, K., Studies on cephalosporin antibiotics. I. Synthesis, antibacterial activity and oral absorption of new 3-(O-substituted)-7 β [D- α -amino- α -(4-hydroxyphenyl) acetamido] cephalosporins. *J. Antibiot.*, 41 (2), 170-80, (1988).
- ⁶⁸ Macchia, M.; Menchini, E.; Orlandini, E.; Rosello, A. Synthesis and antimicrobial activity of 7 β -[N-(arylmethoxyimino) acetamido] cephalosporanic acid derivatives. *IL Fármaco*, 50, 713-18, (1995).
- ⁶⁹ Gentili, D.; Macchia, M.; Menchini, E.; Nencetti, S.; Orlandini, E.; Rosello, A.; Broccali, G.; Limonta, D. Synthesis and antimicrobial properties of cephalosporin derivatives substituted on the C(7) nitrogen with arylmethoxyimino or arylmethoxyamino alkanoyl groups. *IL Fármaco*, 54, 224-231, (1999).
- ⁷⁰ Katano, K.; Ogino, H.; Iwamatsu, K.; Nakabuyashi, S.; Yoshida, T.; Shibahara, S.; Tsuruoka, T.; Inouye, S.; Kondo, S. New aminothiazolylglycyl cephalosporins with a 1,5-dihydroxy-4-pyridone-2-carbonyl group. II. Synthesis and biological activity of MT 0703 and its diastereomers. *J. Antibiot.*, 43 (2), 189-198, (1990).
- ⁷¹ Yokoo, C.; Goi, M.; Onodera, A.; Murata, M.; Nagate, T.; Watanabe, Y. Studies on cephalosporin antibiotics. III. Synthesis, antibacterial activity and oral absorption of new 3-

(substituted-alkylthio)-7 β -[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(carboxymethoxyimino) acetamido] cephalosporins. *J. Antibiot.*, 44 (5), 498-506, (1991).

⁷² Jung, M. H.; Choo, K-W.; Park, J-G.; Kim, Y. H. Synthesis and pharmacokinetic profile of 3-methoxymethyl cephalosporin prodrugs. *Arch. Pharm. Res.*, 21 (5), 559-564, (1998).

⁷³ Draheim, S. E.; Pfeil-Doyle, J.; Kukulja, S.; Ott, J. L.; Counter, F. T. Oral absorption of cephalosporin antibiotics 2. Expanded structure-activity relationships of 7-(arylacetamido)-3-substituted-cephalosporins. *J. Med. Chem.*, 31, 1993-97, (1988).

⁷⁴ Blumbach, J.; Latrell, R.; Duerckheimer, W.; Fehlhaber, H. W.; Fleischmann, K.; Kirrstetter, R.; Mencke, B.; Scheunemann, K. H.; Schrunner, E.; Schwab, W.; Seeger, K.; Seibert, G.; Wieduwitt, M. Synthesis and structure-activity relationships in the cefpirome series. I. 7-[2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(Z)-oxyminoacetamido]-3-[(substituted-1-pyridinio)methyl]-cephem-4-carboxylates. *J. Antibiot.*, 41(10), 1374-94, (1988).

⁷⁵ Kawabata, K.; Ohki, H.; Inamoto, Y.; Okuda, S.; Kamimura, T.; Sakane, K. Studies on 3'-quaternary ammonium cephalosporins. III Synthesis and antibacterial activity of 3'-(3-aminopyrazolium) cephalosporins. *Bioorg. Med. Chem.*, 5 (3), 557-67, (1997).

⁷⁶ Smith, L. I.; Howard, K. L. Diphenyldiazomethane. *Org. Synth.*, 3, 351-52. John Wiley & Sons, Inc. NY, (1955).

⁷⁷ Adamson, J. R.; Bywood, R.; Easlick, D. T.; Gallagher, G.; Walker, D.; Wilson, E. M. Aminoacids and peptides. Part II. A new method for preparation of diphenyldiazomethane and related compounds. *J. C. S. Perkin I*, 2030-33, (1975).

⁷⁸ López, M. A.; Rodríguez, Z., González, M.; Valdés, B.; Vélez, H.; Agüero, J., Fini, A. Improvements of the synthesis of diphenylmethyl 7 β -(o-hydroxy) benzylidene amino-3-hydroxymethyl-3-cephem-4-carboxylate. *IL Fármaco*, 58 (8), 629-31, (2001).

⁷⁹ Valenci, M.; Japelf, M. The synthesis and antibacterial activity of 3-heteroarylthiomethyl substituted aminothiazole cephalosporins antibiotics. *Acta Pharm.*, 44, 133-43, (1994).

⁸⁰ Valenci, M.; Japelf, M.; Vroom, E. Synthesis of 3-thiosubstituted cephalosporins. *Acta Chim. Slov.* 43(2), 181-88, (1996).

⁸¹ Morin, R.B.; Gorman, M. Chemistry and Biology of β -lactams antibiotics. Vol 1-3, Academic Press, (1982).

-
- ⁸² Boyd, D. B.; Snoddy, J. D. Insight into lactam antibiotics and their receptors from computational chemistry. *Molecular aspects of chemotherapy*, Shugar, D.; Rode, W.; Borowski, E., Eds.; Polish Scient Publish: Warsaw, Poland; Springer-Verlag: NY, 1-22, (1992).
- ⁸³ Frau, J.; Donoso, J.; Munoz, F; García, B. F. Semiempirical and *ab initio* calculations on the basis hydrolysis of β -lactam ring. Influence of the solvent. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 390, 247-9, (1997).
- ⁸⁴ Bounaim, L.; Smeyeres, N. J.; González-Jonte, R.H.; Alvarez-Idaboy, J.R.; Ezzamarty, A; Smeyer Y. G. A study of the nucleophilic attack of the beta-lactamic bond of antibiotics in water solution. *J.Mol. Struct. (Theochem)*, 539, 223-7, (2001).
- ⁸⁵ Massova, I ; Mobashery, S. Molecular Bases for interaction between β -lactam antibiotics and β -lactamases, *Acc. Chem. Res.* 30, 162-67, (1997)
- ⁸⁶ Leon, S.; Aleman, C.; García, M.; Muñoz, S. Theoretical Study of the Conformational and Electrostatic Properties of C4-Monosubstituted 2-Azetidinones. *Struct. Chem.*, 8, 39, (1997).
- ⁸⁷ Boyd, D. B. Computer-assisted molecular design studies of β -lactam antibiotics. *Frontiers of antibiotic research*, Academic Press Inc., 339-56, (1987).
- ⁸⁸ Boyd, D. B. β -lactam antibacterial agents: computational chemistry investigations. *The amide linkage: selected structural aspects in chemistry, biochemistry and material science*. Ed.Greenbergs, A. John Wiley & Sons, Inc, USA, 337-75, (2000).
- ⁸⁹ Boyd, D. B.; Herron, D.K.; Lunn, W.H., Spitzer, W.A. Parabolic relationship between antibacterial activity of cephalosporins and β -lactams reactivity predicted from molecular orbital calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 1812-15, (1980).
- ⁹⁰ Choi, J. H.; Kim, H. Structure-Activity relationship, study on cephalosporins with mechanism based descriptors. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 14: 631-35, (1993).
- ⁹¹ Ferreira, M.M.; Kiralj, R. QSAR Study of β -lactam Antibiotic Efflux by the Bacterial Multidrug Resistance Pump AcrB, *J Chemometr.*, 18: 242-252, (2004).
- ⁹² Van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET *in silico* Modeling: Towards Prediction or Paradise?, *Nat Rev Drug Discov.*, 2: 192-204, (2003).
- ⁹³ Mager, D. E. Quantitative structure-pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships. *Adv Drug Deliver Rev.* 58, 1326-1356, (2006).

-
- ⁹⁴ Turner, J.V.; Maddalena, D.J.; Cutler, D.J.; Agatonovic-Kustrin, S. Multiple Pharmacokinetic Parameter Prediction for a Series of Cephalosporins. *J. Pharmaceut. Sci.*, 92(3), 552-9, (1983).
- ⁹⁵ Dureja H.; Gupta, S.; Kumar A. Topological Models for Prediction of Pharmacokinetic Parameters of Cephalosporins using Random Forest, Decision Tree and Moving Average Analysis *Sci Pharm.*, 76, 377-394, (2008).
- ⁹⁶ Johnson, J.R.; Sandborn, L.T. Synthesis of 2Br-4-methylbenzaldehyde. *Org Synth, Coll. Vol.* 46, 13 (1966), 5(139) John Wiley & Sons, Inc (1973).
- ⁹⁷ Koo J. in *Org. Synth. Coll. Vol.* 4, 327-328, John Wiley & Sons, Inc. (1963).
- ⁹⁸ Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard, *National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)*.5th Ed. Document M7-A5. NCCLS, West Valley Road, Wayne, PA , (2000).
- ⁹⁹ HyperCube. Inc. Hyperchem Release 7.0 for Windows, (2002)
- ¹⁰⁰ Stewart, J. J. P. MOPAC, 6.0, (1993-1997).
- ¹⁰¹ Gareth, T. Medicinal Chemistry. John Wiley&Sons Ltd. Second Edition, 75-110, (2007).
- ¹⁰² Stat Soft, STATISTICA for Windows, v 7.0, Stat Soft, Inc, (2004)
- ¹⁰³ Barbosa, D.; Anderson, C. BuildQSAR release 1.0.0, (2000).
- ¹⁰⁴ Jones, G. *Organic Reactions*, Vol. 15, Chapter 2, 204-599. John Wiley & Sons, Inc, (1967).
- ¹⁰⁵ Grover, M.; Singh, B.; Bakshi, M.; Singh, S. Quantitative structure–property relationships in pharmaceutical research, Part I., *Pharm. Sci. Technol. Today* 3, 28-35, (2000).
- ¹⁰⁶ Eiji,O.; Musso, H. Molecular Mechanic calculations in organic chemistry: Examples of the usefulness of this simple non-quantum mechanical model. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 22(1), 1-12, (1983).
- ¹⁰⁷ James, J.; Stewart P. Optimization of parameters for semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* 10(2), 209-221, (1989).
- ¹⁰⁸ Todeschini, R.; Consonni, V. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics* Wiley-VCH; 2ed., (2009).
- ¹⁰⁹ Temesgen, Z.; Jacky, G. A unified approach on residuals, leverages and outliers in the linear mixed model. *Test*, 16 (1), 58-75, (2007).
- ¹¹⁰ Karypis, Y. Data clustering in life science. *Mol. Biotechnol.*, 31(1), 55-80, (2005).
- ¹¹¹ Kolossov, E. The quality of QSAR models: problems and solution. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 18(1), 89-100, (2007).

-
- ¹¹² Höltje, H; Sippl, W; Rognan, D.; Folkers, G. Molecular Modeling: Basic Principles and Applications. Wiley-VCH; 3ed., 9-46, (2008)
- ¹¹³ Gramatica, P. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR & Combinatorial Science.*, 26 (5), 694–701, (2007).
- ¹¹⁴ Young, D. C. Computational Drug Design: A Guide for Computational and Medicinal Chemists. Wiley-Interscience, 12, 105-119, 171-181, (2009).
- ¹¹⁵ Golbraikh, A.; Tropsha, A. Beware of q². *J. Mol. Graph. Model.*, 20(4), 269-276, (2002).