ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Rafael
Canabal Falcón

Tese de doutoramento

Novas Aproximacións para afrontar o desafío das Superbacterias baseadas na Detección Química das Carbapenemasas e na Inhibición da biosíntese dos Aminoácidos Esenciais

Santiago de Compostela, 2024

Programa de Doutoramento en Ciencia e Tecnoloxía Química

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESE DE DOUTORAMENTO

NOVAS APROXIMACIÓNS PARA AFRONTAR O DESAFIO DAS SUPERBACTERIAS BASEADAS NA DETECCIÓN QUÍMICA DAS CARBAPENEMASAS E NA INHIBICIÓN DA BIOSÍNTESE DOS AMINOÁCIDOS ESENCIAIS

Autor

Rafael Canabal Falcón

Director: Concepción González Bello

Titora: Concepción González Bello

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA E TECNOLOXÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

Á miña querida avoa Tita

Memoria tua in aeternum manebit

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

Abreviaturas e acrónimos

Resumo

1. Introdución 1

1.1 Resistencia aos antibióticos: "Súper-Bacterias" 2

1.1.1 Mecanismos de resistencia aos antibióticos 7

1.1.2 Antibióticos adxuvantes: inhibidores dos mecanismos de resistencia 10

1.2 Enzimas inactivantes: β-lactamasas 11

1.2.1 Inhibidores das β-lactamasas 18

1.3 Métodos para o diagnóstico de "Súper-Bacterias" 23

1.3.1 Probas específicas para a detección de β-lactamasas 26

1.3.2 β-lactámicos cromoxénicos: compostos comerciais 28

1.4 Desenvolvemento de novos antibióticos 33

1.4.1 Ruta biosintética do ácido xiquímico 34

1.4.2 O enzima Xiquimato Quinasa 36

1.4.3 Inhibidores da Xiquimato Quinasa 39

1.4.4 Inhibidores de XQ baseados no substrato natural 41

2. Obxectivos 44

3. Resultados e Discusión 46

3.1 Probas cromoxénicas/fluoroxénicas para a detección de β-lactamasas: antecedentes 47

3.1.1 Reactivos fluoroxénicos 48

3.1.2 Reactivos baseados en carbapenems 58

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2 Carbapenems cromoxénicos obxectivo: Aproximación sintética 66

3.2.1 Nova aproximación sintética: cambio de triflato por iodo e novo grupo protector 67

3.2.2 Cambio do grupo protector bencidrilo (Bzh) por *terc*-butilo 69

3.2.3 Cambio de grupo protector: *para*-azidobencilo (PAB) 74

3.2.4 Cambio de grupo protector: bencidrilo (Bzh) 76

3.3 Cefalosporinas cromoxénicas obxectivo: Aproximación sintética 78

3.4 Análogos do ácido xiquímico de conformación restrinxida que mimetizan a conformación de alta enerxía que recoñece o enzima: antecedentes 80

3.4.1 Aproximación sintética alternativa: adición nucleófila intramolecular 86

4. Metodoloxía: Parte Experimental 90

4.1 Procedementos Xerais: Materiais, Métodos e Equipos 91

4.2 Compostos β-lactámicos sintetizados 93

4.2.1 4-(*terc*-butildimetilsililoxi)but-2-inoato de *terc*-butilo (62) 93

4.2.2 4-hidroxibut-2-inoato de *terc*-butilo (63) 93

4.2.3 4-bromobut-2-inoato de *terc*-butilo (59) 94

4.2.4 4-((2*R*,3*S*)-3-(1-((*terc*-butildimetilsililoxi)etil)-4-oxoazetidin-2-il)but-2-inoato de *terc*-butilo (64) 94

4.2.5 4-((2*R*,3*S*)-3-(1-hidroxietil)-4-oxoazetidin-2-il)but-2-inoato de *terc*-butilo (65) 95

4.2.6 4-((2*R*,3*S*)-4-oxo-3-(1-(trietilsililoxi)etil)azetidin-2-il)but-2-inoato de *terc*-butilo (66) 96

4.2.7 (*E*)-2,3-diiodo-4-((2*R*,3*S*)-3-(1-((*terc*-butildimetilsililoxi)etil)-4-oxoazetidin-2-il)but-2-inoato de *terc*-butilo (58) 97

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.8 4-((2*R*,3*S*)-3-(1-((*terc*-butildimetilsililoxi)etil)-4-oxoazetidin-2-il)-2-diazo-3-oxobutanoato de *terc*-butilo (69) 97

4.2.9 2-Diazo-4-((2*R*,3*S*)-3-(1-hidroxietil)-4-oxoazetidin-2-il)-3-oxobutanoato de *terc*-butilo (70) 98

4.2.10 2-Diazo-3-oxo-4-((2*R*,3*S*)-4-oxo-3-(1-((trietilsililoxi)etil)azetidin-2-il)butanoato de *terc*-butilo (71) 99

4.2.11 (5*R,*6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-trifluorometanosulfoniloxi-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (72) 100

4.2.12 Procedemento xeral para a reacción de acoplamento de Stille . 101

4.2.13 (5*R,*6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-(2,4-dinitrofenil)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (82a)..... 101

4.2.14 (5*R,*6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-(1,6-dinitronaftalen-2-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (82b) 102

4.2.15 (5*R,*6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (85a)..... 103

4.2.16 (5*R,*6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaphthalen-2-il)vinil)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (85b).....104

4.2.17 (5*R,*6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-hidroxiprop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (83) 105

4.2.18 (5*R,*6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-((1,6-dinitronaftalen-2-il)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (86b)..... 106

4.2.19 (5*R,*6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-((etoxicarbonil)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (87) 107

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.20 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-(2,4-dinitrofenoxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (86a) 108

4.2.21 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (88a).....108

4.2.22 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de 4–azidobencilo (97).....109

4.2.23 (5*R*,6*R*)-6-(1hidroxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de 4–azidobencilo (98).....110

4.2.24 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaphthalen-2-il)vinil)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (103b) 111

4.2.25 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-hidroxiprop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (104).....112

4.2.26 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-((metoxicarbonil)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (107) 113

4.2.27 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-(2,4-dinitrofenoxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (108a) 114

4.2.28 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaftalen-2-il)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (108b) 115

4.2.29 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (106a) 116

4.2.30 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaftalen-2-il)vinil)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (106b) ..117

4.2.31 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-3-(2,4-dinitrofenoxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (109a) 118

4.2.32 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaftalen-2-il)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (109b) 119

4.2.33 (6*R*,7*R*)-3-(((metoxicarbonil)oxi)metil)-8-oxo-7-(2-(tiofen-2-il)acetamido)-5-tia-1-azabiciclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (115) 120

4.3 Derivados de ácido xiquímico sintetizados 121

4.3.1 (3a*S*,7*R*,7a*S*)-3a-etinil-2,2-difenil-7-hidroxi-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo [*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (126).....121

4.3.2 (3a*S*,7*R*,7a*S*)-3a-etinil-2,2-difenil-7-oxo-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo [*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (129).....121

4.3.3 (3a*S*,7*R*,7a*S*)-2,2-difenil-7-hidroxi-3a-vinil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo [*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (127).....122

4.3.4 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-(4-(benzoiloxi)but-1-in-1-il)-7-(*terc*-butildimetilsilil)oxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (137) 123

4.3.5 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-((*Z*)-4-(benzoiloxi)but-1-en-1-il)-7-hidroxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (138) 124

4.3.6 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-((*Z*)-4-(benzoiloxi)but-1-en-1-il)-7-(*terc*-butildimetilsilil)oxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (139) 124

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.7 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-7-(*terc*-butildimetilsilil)oxi-3a-((*Z*)-4-hidroxibut-1-en-1-il)-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (140) 125

4.3.8 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-((*Z*)-4-bromobut-1-en-1-il)-7-(*terc*-butildimetilsilil)oxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (141) 126

4.3.9 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-7-hidroxi-3a-((*Z*)-4-hidroxibut-1-en-1-il)-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (143) .. 127

4.3.10 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-((*Z*)-4-bromobut-1-en-1-il)-7-hidroxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (142) .. 128

4.3.11 (3a*R*,7a*R*)-3a-((*Z*)-4-bromobut-1-en-1-il)-2,2-dimetil-7-oxo-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (131) .. 129

5. Conclusións 130

6. Bibliografía e Referencias 133

Anexo I: Espectros de RMN 143

Anexo II: Listado de estruturas 188

Anexo III: Publicación 198

Anexo IV: Permisos de reprodución 200

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Abreviaturas e acrónimos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AmpC	Ampicilina cefalosporinasa
BlaC	β-lactamasa cromosómica (Clase A)
BODIPY	Difluoruro de borodipirrometeno
CFU	Unidades formadoras de colonias
CTX-M	Cefotaximasa illada en Múnic
DABCYL	Ácido (4-(4'-dimetilaminofenilazo) benzoico
dba	Dibencilidenacetona
2,2-DMP	2,2-dimetoxipropano
dppb	1,4-bis(difenilfosfino)butano
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ESBL	β-lactamasas de espectro estendido
IMP	Imipenemasa
IC_{50}	Concentración inhibidora media máxima
KPC	Carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*
LID	Dominio de inserción do bucle
MBLs	Metalo-β-lactamasas
MIC	Concentración mínima inhibitoria
NDM	Metalo-β-lactamasa de Nova Delhi
OMS	Organización mundial da saúde
OXA	Oxacilinasa
PAB	*para*-azidobencilo
PBP	Proteínas de unión de Penicilina
PDB	Banco de datos de proteínas
PNB	*para*-nitrobencilo
SB	Dominio de unión do ácido xiquímico
SHV	Variable sulfhidrilo (β-lactamasa)
TB	Tuberculosis
TEM	Temoniera (β-lactamasa)
TMP	Tetrametilpiperidina
VIM	Metalo-β-lactamasa codificada por integrón de Verona
XQ	Xiquimato quinasa
XQ-*Hp*	Xiquimato quinasa procedente de *H. pylori*
XQ-*Mt*	Xiquimato quinasa procedente de *M. tuberculosis*
XQ-*Sa*	Xiquimato quinasa procedente de *Staphylococcus aureus*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resumo

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

O descubrimento das sulfamidas e a penicilina, fai case un século, marcou un fito histórico no campo da medicina. Estes primeiros fármacos antibacterianos permitiron tratar con éxito as enfermidades causadas por infección bacterianas, que ata ese momento eran potencialmente mortais. Ademais de salvar innumerables vidas, estes fármacos e os que posteriormente se desenvolveron, permitiron algúns dos maiores e mais importantes avances da medicina moderna, converténdose en ferramentas fundamentais para levar a cabo con éxito diversas intervención cirúrxicas e tratamentos hospitalarios prolongados e invasivos, axudando a protexer aos pacientes das infeccións secundarias derivadas de eses tratamentos e favorecendo a súa correcta recuperación.

Sen embargo, a aparición de cepas cada vez máis resistentes aos antibióticos, especialmente nas últimas décadas, é un motivo de gran preocupación, xa que a capacidade dos antibióticos actualmente dispoñibles para tratar estas infeccións comeza a verse moi limitada en algúns casos. As chamadas "súper-bacterias" son microorganismos multiresistentes a varios tipos dos antibióticos que compoñen o arsenal terapéutico do que se dispón, e a propagación de este tipo de microorganismos por todo o mundo ameaza con converterse en un dos maiores problemas de saúde pública a nivel global. Preocupa en especial a crecente incidencia das infeccións nosocomiais, asociadas á asistencia sanitaria, xa que nestes casos o debilitado sistema inmune dos pacientes facilita a patoxenicidade das bacterias.

Segundo varias estimacións da Organización Mundial da Saúde e dos Centros para a prevención e control de enfermidades dos Estados Unidos de América e da Unión Europea, para o ano 2050 morrerán máis de 10 millóns de persoas cada ano a causa de infeccións bacterianas intratables, producidas por estas "súper-bacterias". Ademais, é posible que a recente pandemia causada pola COVID-19 axudase a adiantar esta fecha, debido ao gran número de hospitalizacións que esta enfermidade causou en todo o mundo, e ás infeccións bacterianas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

secundarias, sobre todo de carácter respiratorio, que se produciron nos enfermos con sistemas inmunitarios debilitados polo virus.

Urxe pórlle freo ao avance deste problema, e deben tomarse medidas a nivel global, tanto na prevención e vixilancia da evolución das bacterias resistentes, como na investigación para o desenvolvemento de terapias alternativas que permitan gañar tempo e finalmente vencer este perigoso desafío, o cal require de un gran esforzo, tanto de investigación como de investimento económico, por parte tanto de organismos públicos como do sector da industria farmacéutica.

A inversión das principais compañías farmacéuticas na investigación de este tipo de terapias foi decrecendo dende a década dos 90 e ademais a súa estratexia basease principalmente en aumentar a potencia dos fármacos xa existentes, mediante a introdución de pequenas modificacións nas estruturas químicas dos seus principios activos, indo todos os fármacos que saíron ao mercado nas últimas décadas dirixidos aos mesmos obxectivos biolóxicos para os que as bacterias xa desenvolveron, ou están a desenvolver resistencia. A innovación nas grandes compañías farmacéuticas en este ámbito brilla pola súa ausencia, debido ao enorme esforzo económico que supón a busca e validación de novas dianas terapéuticas, tarefa que recae principalmente sobre grupos de investigación académica, pequenas empresas biotecnolóxicas e asociacións público-privadas.

Ademais do desenvolvemento de terapias alternativas que vaian dirixidas a dianas terapéuticas non explotadas, e que presenten mecanismos de acción novidosos para os que as bacterias aínda non desenvolveron resistencia, é fundamental o correcto diagnóstico das bacterias que están a causar a infección, e saber que mecanismos de resistencia presentan para poder xestionar mellor a enfermidade, evitando a prescrición de antibióticos ineficaces ou innecesarios, segundo o caso, o cal é un dos factores que promoven a aparición de resistencias.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A maioría dos métodos existentes de caracterización de cepas bacterianas, e por tanto de detección de mecanismos de resistencia, baséanse en largos

procedementos que requiren ou ben da realización de cultivos bacterianos, ou de complicados procesamentos de mostras a fin de obter illados bacterianos. Todos estes procedementos requiren de laboratorios e equipamentos custosos e de persoal altamente cualificado, o que restrinxe o seu uso só a casos hospitalarios, e ademais presentan en algúns casos baixa sensibilidade, polo que os falsos negativos son habituais.

Debido a que a maioría dos antibióticos que se prescriben na actualidade, aproximadamente o 70%, pertencen á familia dos β-lactámicos, e que o principal mecanismo de resistencia que presentan as bacterias contra estes é a produción de enzimas que os hidrolizan, as chamadas β-lactamasas, nas últimas décadas estase a realizar un gran esforzo de investigación para desenvolver métodos de detección químicos cada vez máis rápidos, sensibles, sinxelos de realizar, e custosamente asumibles para os sistemas de saúde de todo o mundo. A identificación visual da actividade das β-lactamasas mediante o uso de reactivos cromoxénicos e fluoroxénicos, especialmente os baseados en carbapenems, preséntase como unha alternativa rápida e eficaz aos análises microbiolóxicos clásicos. Os reactivos fluoroxénicos mostran un bo perfil de selectividade e sensibilidade, especialmente fronte as metalocarbapenemasas clinicamente relevantes, permitindo detectar β-lactamasas a niveis incluso femtomolares. Algúns dos reactivos fluoroxénicos presentan limitacións, como o seu custo de síntese ou o uso de instrumentación sofisticada e persoal cualificado para realizar os ensaios e interpretar os resultados. Os métodos cromoxénicos pola súa banda, son algo menos sensibles pero permiten detectar a presenza destes enzimas facilmente de xeito visual, mediante un cambio de cor do dispositivo empregado, o que fai de estes os mellores candidatos para o desenvolvemento de tests rápidos e economicamente asumibles que permitan o seu uso en centros de saúde de atención primaria, sen necesidade de sofisticados laboratorios nin persoal cualificado para a súa interpretación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Esta tese de doutoramento pretende contribuír ao desenvolvemento de detectores químicos altamente sensibles, que permitan a realización de probas de diagnóstico clínico rápidas, eficientes e economicamente accesibles, da presencia de cepas multi-resistentes aos antibióticos β-lactámicos, especialmente para aquelas cepas que presentan resistencia aos carbapenems, os antibióticos β-lactámicos de último recurso. Os novos sensores permitirán: (i) o seguimento da resistencia bacteriana e a súa evolución *in vivo*; (ii) facilitar a elección do tratamento mais axeitado para cada paciente; (ii) frear a expansión da resistencia bacteriana aos antibióticos; así como (iii) preservar o uso de antibióticos de último recurso.

Para este fin deseñáronse unha serie de compostos cromoxénicos, baseados no imipenem e en cefalosporinas, en ambos casos con grupos cromóforos dinitroaromáticos inspirados na Nitrocefina. A estratexia sintética empregada, implica como etapas clave a reacción de acoplamento cruzado de Stille, así como a reacción de acoplamento entre alcohois de Mitsunobu ou a alquilación alílica de Tsuji-Trost.

Ademais tamén se pretende en esta tese de doutoramento o desenvolvemento de novas entidades químicas con mecanismos de acción innovadores capaces de modular a actividade de dianas terapéuticas non explotadas e relevantes para a supervivencia das bacterias. En concreto, abordase a interrupción da biosíntese dos aminoácidos aromáticos mediante a inhibición do quinto enzima da ruta do ácido xiquímico, a xiquimato quinasa. Esta ruta biolóxica é esencial en certas bacterias patóxenas e está ausente nos animais, o que a converte en unha diana terapéutica atractiva para o descubrimento de antibióticos novidosos.

O enzima xiquimato quinasa é esencial na supervivencia de varias bacterias patóxenas moi relevantes que hoxe en día mostran altos niveis de resistencia a moitos antibióticos de uso clínico, como son: (i) *Mycobacterium tuberculosis*, responsable da tuberculose, unha prioridade establecida a nivel mundial pola Organización Mundial da Saúde (OMS); (ii) *Helicobacter pylori*, que é o axente

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

causante das úlceras gástricas e duodenais e tamén foi clasificado como axente carcinóxeno tipo I; e (iii) *Pseudomonas aeruginosa*, que é un dos patóxenos mais comúns nas infeccións asociadas á atención sanitaria, prioritario segundo a OMS.

Para este fin tratouse de levar a cabo a síntese de compostos bicíclicos rixidificados que mimetizan a conformación de alta enerxía que o substrato natural adopta no centro activo do enzima, a fin de explorar o seu potencial inhibitorio fronte a este enzima e axudar ao desenvolvemento de inhibidores posteriores mais eficaces. As estratexias sintéticas empregadas implican como etapa clave a reacción de acoplamento cruzado intramolecular tipo Heck, ou ben a formación do biciclo mediante unha reacción de adición nucleófila intramolecular tipo Barbier.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. Introdución

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1 Resistencia aos antibióticos: "Súper-Bacterias"

Os fármacos antibacterianos, ou antibióticos, levan case un século empregándose para tratar con éxito enfermidades infecciosas causadas por diversos patóxenos bacterianos, infeccións que antes do descubrimento e desenvolvemento destas terapias eran potencialmente mortais. Ademais de salvar millóns de vidas, estes fármacos impulsaron grandes e importantísimos avances no campo da medicina moderna, e contribuíron ao aumento da esperanza de vida e á mellora da calidade da mesma, ao converterse nunha ferramenta indispensable para levar a cabo con maior éxito diversos procedementos hospitalarios, como as intervencións cirúrxicas, os transplantes de órganos, e tratamentos como a quimioterapia contra o cancro ou a diálise renal, procedementos nos cales os antibióticos xogan un papel clave, prevendo e tratando infeccións secundarias, facilitando así a recuperación dos pacientes.

Sen embargo, a capacidade intrínseca de adaptación das bacterias e o uso excesivo e inadecuado de estes fármacos durante décadas, tanto en humanos como especialmente no sector gandeiro, que emprega grandes cantidades como medio profiláctico e promotores do crecemento,[1] levou ao desenvolvemento de resistencias por parte de algunhas bacterias. A isto hai que sumar outros factores como son a falta de inversión e innovación en novos tratamentos, xa que dende os anos 90 o investimento das grandes farmacéuticas no desenvolvemento de antibióticos foi decaendo, debido aos baixos beneficios que estes tratamentos de corta duración lles aportan en comparación con outros tipos de fármacos. A resistencia aos antibióticos é un problema crecente, especialmente nas últimas dúas décadas, que ameaza a eficacia e seguridade de procedementos médicos nos cales estes fármacos seguen a ser unha ferramenta fundamental. Especialmente preocupantes son aquelas cepas bacterianas causantes de infeccións graves que mostran resistencia a varios tipos de antibióticos, incluso a algúns dos máis potentes dispoñibles, a estas cepas denomináselles multirresistente, ou tamén "Súper-Bacterias".[2]

USC DE COMPOSTELA

No ano 2017, a Organización Mundial da Saúde (OMS) publicou unha lista dos patóxenos resistentes a antibióticos máis perigosos,[3] fronte ós que se deben tomar medidas urxentes, clasificándoos por orde de prioridade para a investigación e desenvolvemento de novos antibióticos (Táboa 1).

Táboa 1 Lista da OMS de patóxenos prioritarios para I + D de novos antibióticos.

Prioridade 1: Crítica
Acinetobacter baumannii, resistente a carbapenems
Pseudomonas aeruginosa, resistente a carbapenems
Enterobacteriaceae,[a] resistentes a carbapenems e produtoras de β-lactamasas de espectro extendido (ESBL)
Prioridade 2: Elevada
Enterococcus faecium, resistente á vancomicina
Staphylococcus aureus, resistente á meticilina e á vancomicina
Helicobacter pylori, resistente á claritromicina
Campylobacter spp., resistente ás fluoroquinolonas
Salmonellae, resistentes ás fluoroquinolonas
Neisseria gonorrhoeae, resistente a cefalosporinas e fluoroquinolonas
Prioridade 3: Media
Streptococcus pneumoniae, sen sensibilidade á penicilina
Haemophilus influenzae, resistente á ampicilina
Shigella spp., resistente ás fluoroquinolonas

[a] *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* entre outras

Preocupan especialmente as infeccións causadas por bacterias Gram-negativas asociadas aos ambientes hospitalarios, como son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e a familia das Enterobacteriaceae, cuxo tratamento é cada vez mais difícil, posto que presentan un dos mecanismos de resistencia más amplo e complicado de evadir, a produción de β-lactamasas. Estes enzimas confírenlles resistencia aos antibióticos β-lactámicos, a familia de antibióticos máis ampla e prescrita en clínica e en algúns casos incluso aos carbapenems, considerados antibióticos β-lactámicos de último recurso. Na lista non se inclúe *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo causante da tuberculose, xa que está considerada pola OMS como unha prioridade global dende fai moitos anos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Segundo a OMS e os Centros para a Prevención e Control de Enfermidades dos Estados Unidos e de Europa (CDC e ECDC respectivamente), a propagación da resistencia aos antimicrobianos (RAM) representa unha grave ameaza para a saúde humana en todo o mundo e está comprometendo perigosamente a nosa capacidade para curar as infeccións bacterianas.[4] Estimacións da OMS sitúan á RAM como unha das principais causas de mortalidade para o ano 2050, que igualará, ou incluso superará, á do cancro, situándose en torno aos 10 millóns de mortos por ano (Figura 1).

No ano 2022, publicouse na revista médica *The Lancet* un amplísimo análise estatístico acerca do impacto na saúde producido pola resistencia bacteriana en todo o mundo no ano 2019.[5] Para este estudo os seus autores recompilaron datos procedentes de diversas fontes, tales como publicacións e revisións bibliográficas, rexistros hospitalarios, e datos de sistemas de vixilancia sanitaria de todo o mundo. Con estes datos, e aplicando modelos estatísticos preditivos, puideron estimar a importancia da RAM en diversas rexións do mundo, así como estimar o impacto que esta tivo na mortalidade desas rexións. Os resultados extraídos desta análise estimaron que, en 2019, ocorreron aproximadamente 4.95 millóns de mortes asociadas a infeccións bacterianas a nivel mundial, das cales 1.27 millóns foron directamente atribuíbles á resistencia aos antibióticos (Figura 1).

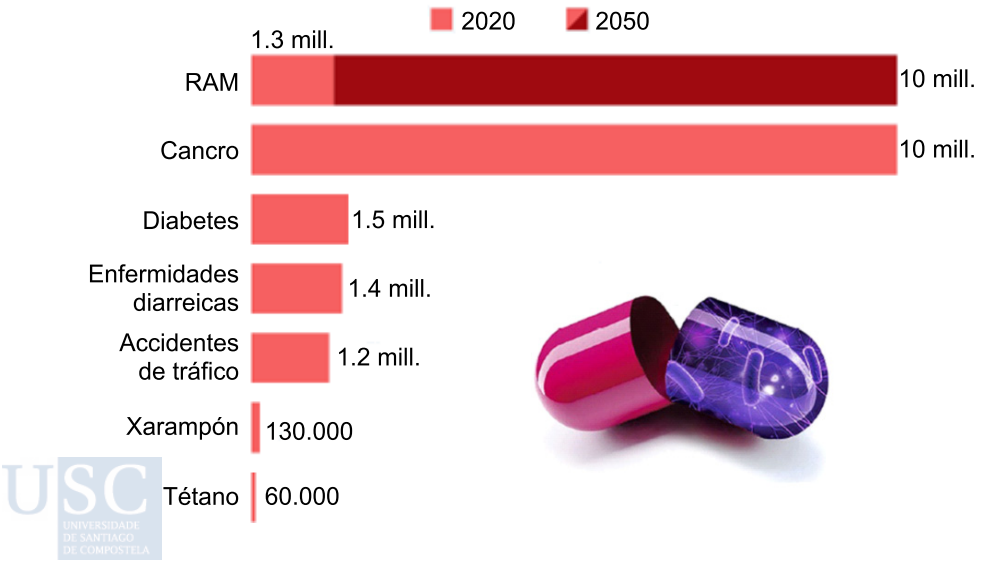


Figura 1. Mortes asociadas á resistencia bacteriana aos antibióticos (RAM). Previsión 2050.

A distribución xeográfica de estas mortes varía significativamente, coa taxa de mortalidade mais alta rexistrada na rexión occidental da África subsahariana, con 27.3 mortes por cada 100.000 habitantes, e a mais baixa en Australasia, con 6.5 mortes por cada 100.000 habitantes. As catro rexións da África subsahariana, e a rexión do sur de Asia (Rexións GBD *"Global Burden of Disease"*)[6] son as que concentran a maior incidencia deste tipo de enfermidades (Figura 2). Convertendo a RAM non só en un importante problema de saúde a nivel mundial, senón en un problema particularmente grave para algúns dos países máis pobres do mundo.

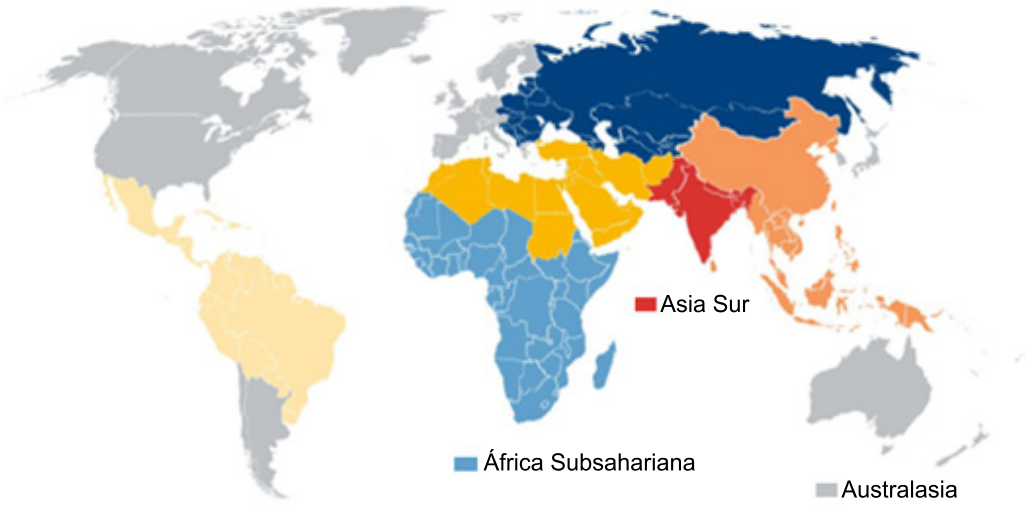


Figura 2. Mapa das macrorexións GBD.

Ademais, de este estudo extráense outros datos de gran interese, como son: (i) o tipo de infeccións, e (ii) os patóxenos máis perigosos. As infeccións das vías respiratorias inferiores son responsables de preto do 30% das mortes atribuíbles á RAM, seguidas das infeccións do torrente sanguíneo (sepse) e as infeccións intraabdominais, en conxunto estes tres síndromes infecciosos son causantes do 78.8% das mortes. Ademais, identificáronse seis págotenos principais como responsables da maioría das mortes asociadas á resistencia bacteriana: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. En conxunto, estes

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

patóxenos foron responsables de 929.000 das 1.23 millóns de mortes atribuíbles directamente á RAM, e de 3.57 millóns das mortes relacionadas con infeccións bacterianas en 2019.

Estes achados, poñen de manifesto a importancia de implementar programas efectivos de vixilancia, prevención e control das infeccións, así como a implementación de políticas de saúde pública que aborden de maneira efectiva a ameaza da resistencia aos antimicrobianos. É de vital importancia, sobre todo no caso dos países mais afectados, unha correcta implementación de programas centrados na purificación de augas para a súa potabilidade, así como nos sistemas de saneamento e a hixiene, que son o principal foco de transmisión destes patóxenos. Tamén é fundamental, como marca a OMS, redobrar os esforzos na investigación sobre estes patóxenos, sendo de especial interese o desenvolvemento de novos fármacos e tratamentos máis efectivos contra eles, así como, na medida do posible o desenvolvemento de vacinas que permitan a prevención de estas infeccións, reducindo con elo a necesidade do uso de antibióticos.

Actualmente só se dispón de unha vacina para *Mycobacterium tuberculosis*, que data de 1921, o coñecido como bacilo Calmette-Guerin (BCG),[7] unha forma atenuada de *M. bovis* que axuda na prevención do desenvolvemento da enfermidade en nenos, aínda que actualmente se están a investigar outras vacinas para este patóxeno que se atopan en diversas fases de desenvolvemento.[8]

Para os seis patóxenos mais perigosos antes mencionados, só se dispón de vacina para *S. pneumoniae*,[9] recentemente aprobada pola FDA (administración de alimentos e medicamentos, USA) e a EMA (axencia europea de medicamentos).[10] Para outros patóxenos perigosos como *E. coli* existen vacinas que se atopan en fase III de ensaios clínicos,[11] e para *S. aureus* aínda se atopan en fases previas de desenvolvemento.[12]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ademais, a todo isto hai que engadir a recente pandemia provocada pola COVID-19, que deu lugar a unha gran cantidade de hospitalizacións e

tratamentos en coidados intensivos de pacientes que sufriron diversas infeccións bacterianas secundarias, principalmente das vías respiratorias. De algúns análises estatísticos realizados ata a fecha,[13] extraese que durante a pandemia produciuse un aumento dos casos de infeccións causadas por organismos Gram-negativos resistentes a antibióticos (Enterobacteriaceae resistentes a carbapenems, *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems e múltiples fármacos, ou *Acinetobacter baumannii* resistente). É posible que a pandemia de COVID-19 acelerase a aparición e transmisión da RAM, sobre todo no caso dos organismos Gram-negativos asociados aos medios hospitalarios.

1.1.1 Mecanismos de resistencia aos antibióticos

As terapias antibacterianas baséanse no concepto da interrupción da viabilidade bacteriana, é dicir, impedir que estas sobrevivan e/ou se reproduzan. Os antibióticos en uso clínico actúan a través de diversos mecanismos e van dirixidos a interromper un reducido número de procesos biolóxicos esenciais ou a atacar estruturas críticas para a supervivencia das bacterias (Figura 3).

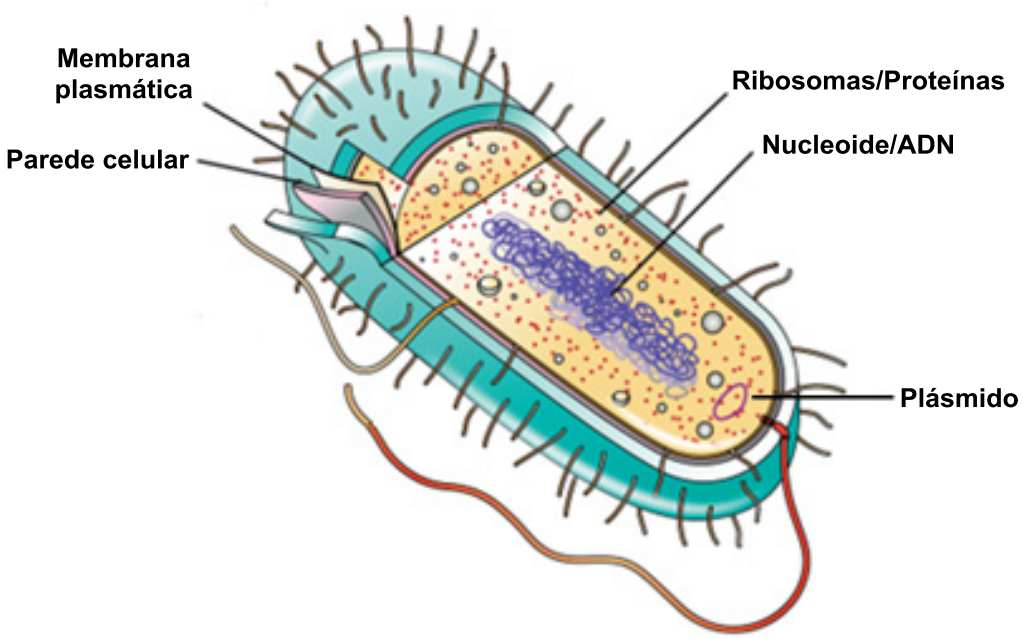


Figura 3. Partes fundamentais das bacterias, obxectivos dos fármacos antibacterianos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Algúns antibióticos, como por exemplo os β-lactámicos, atacan a síntese da parede celular das bacterias, estes fármacos únense a unhas proteínas que

reciben o nome de Proteínas de unión de Penicilina (PBP) inhibindo a súa acción. Estas proteínas xogan un papel fundamental na biosíntese de peptidoglicano ou mureína, un compoñente esencial da parede celular bacteriana, impedindo así a renovación ou reparación da mesma, o que acaba por causar a morte da bacteria. Outros antibióticos, como as tetraciclinas, os aminoglucósidos e os macrólidos, únense aos ribosomas bacterianos impedindo a síntese de proteínas necesarias para a súa supervivencia e reprodución. As sulfamidas bloquean vías metabólicas esenciais, como a biosíntese de folatos, interferindo na súa capacidade de reprodución e crecemento. Outros tipos como as polimixinas afectan á integridade da membrana plasmática, e as quinolonas interfiren no metabolismo dos ácidos nucleicos, impedindo a correcta transcrición de ARN e replicación do ADN. No caso de algúns patóxenos difíciles de eliminar, como *Mycobacterium tuberculosis* ou *Helicobacter pylori*, son necesarias combinacións de máis de un tipo dos devanditos antibióticos.

Sen embargo, as bacterias son microorganismos altamente especializados e que posúen unha gran capacidade de adaptación, o que lles permitiu mutar e desenvolver sofisticados mecanismos de defensa cos que evadir a acción dos antibióticos. Ademais, as bacterias posúen a capacidade de intercambiar material xenético que codifica a produción destes mecanismos de resistencia cos seus conxéneres, o que facilita a propagación de estas características perigosas entre membros da mesma especie, e tamén en algúns casos a outras.[14]

Entre eses mecanismos inclúense: (i) a modificación química da membrana externa, facéndoa menos permeable á entrada dos fármacos; (ii) a excreción dos mesmos mediante a activación de bombas de expulsión; (iii) a modificación da secuencia de aminoácidos ou da estrutura da diana terapéutica á que os antibióticos van dirixidos, alterando así o seu modo de unión e reducindo a súa eficacia; (iv) a produción de enzimas inactivantes que captan e modifican os antibióticos dando lugar a moléculas inocuas para a bacteria[15] (Figura 4).

USC DE COMPOSTELA

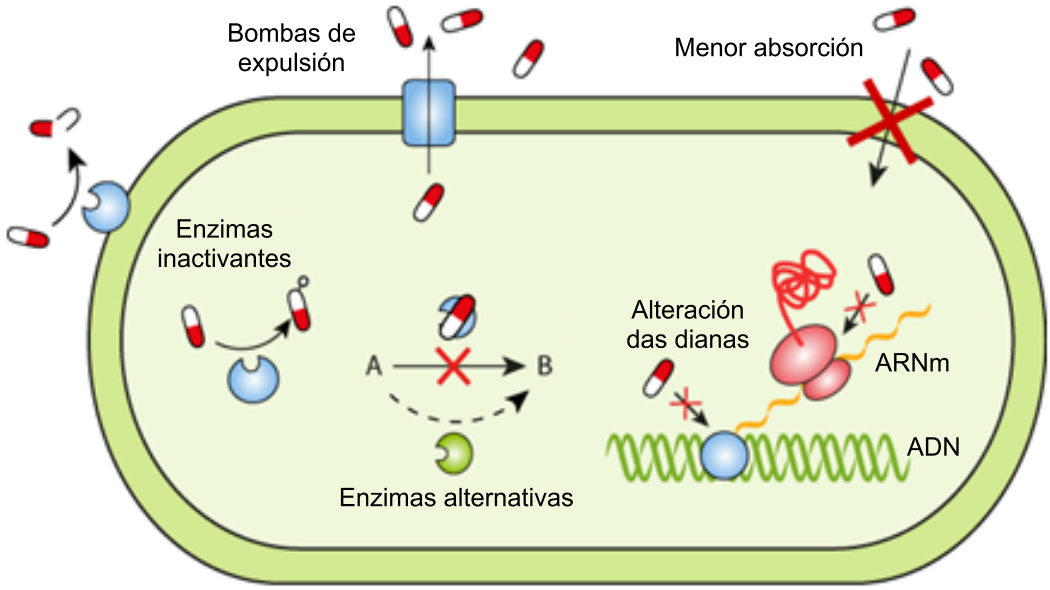


Figura 4. Mecanismos de resistencia das bacterias fronte aos fármacos.

A biosíntese de enzimas inactivantes dos antibióticos é o mecanismo de resistencia mais estendido entre as bacterias Gram-negativas, principalmente mediante a produción de β-lactamasas, enzimas que hidrolizan os antibióticos β-lactámicos impedindo así a inhibición da súa diana terapéutica (PBP, Penicillin-Binding Proteins)[16] (Figura 5). O aumento exponencial do número e variantes deste tipo de enzimas é o motivo de maior preocupación actual, posto que esta clase de antibióticos representan en torno ao 70% dos prescritos en todo o mundo, con unha eficacia e seguridade máis que demostradas ao longo de mais de 50 anos.

Estes sistemas de resistencia son cada vez máis difíciles de combater, facendo incluso en algúns casos que os antibióticos sexan inútiles[17] e requirindo o uso de cócteles de fármacos. A estratexia terapéutica que máis éxito está a ter a día de hoxe, consiste na combinación dos antibióticos propiamente ditos, con outros fármacos que actúan como inhibidores dos mecanismos de resistencia bacterianos, coñecidos como antibióticos adxuvantes.[18]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

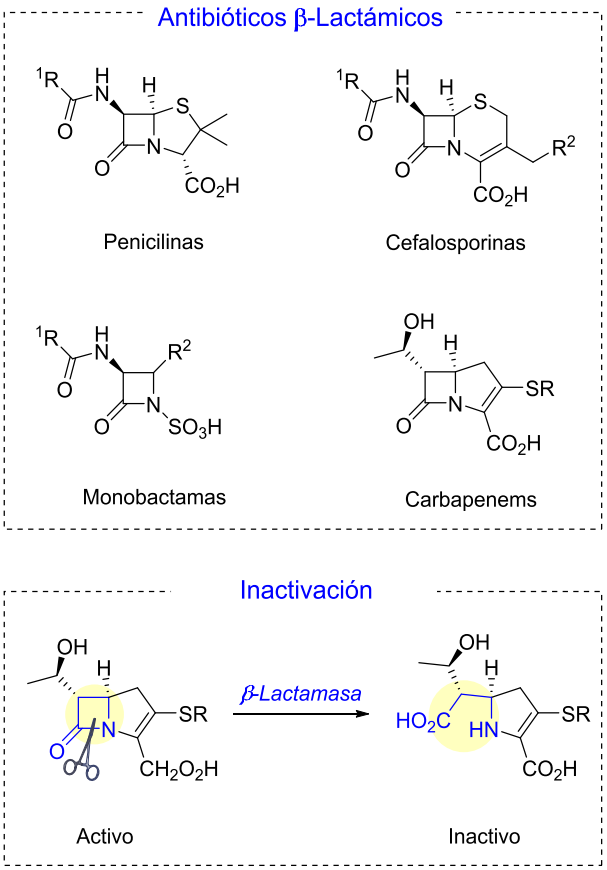


Figura 5. Estrutura química dos antibióticos β-lactámicos e representación esquemática da súa inactivación catalizada por enzimas β-lactamasas.

1.1.2 Antibióticos adxuvantes: inhibidores dos mecanismos de resistencia

Estes fármacos non presentan unha gran potencia antibiótica por si sos, ou ningunha, pero actúan permitindo que o antibiótico empregado eluda os mecanismos de resistencia desenvoltos pola bacteria, recuperando así a súa eficacia, ou incluso aumentándoa.

Dependendo da diana bacteriana sobre a que actúan e da acción que levan a cabo, os antibióticos adxuvantes (AA) clasifícanse en dúas clases, Clase I e Clase II. Os AA de Clase I á súa vez divídense en dúas subclases, en función do seu mecanismo de acción, os de Clase IA actúan sobre os mecanismos de resistencia activos (enzimas inactivantes), mentres que os de Clase IB actúan sobre os mecanismos pasivos das bacterias (bombas de efluxo, redución da permeabilidade da membrana, etc.), actuando de forma sinérxica cos antibióticos e aumentando a susceptibilidade das bacterias aos mesmos. Os de Clase II pola súa banda, son

tamén coñecidos como "moduladores do hóspede" e teñen como obxectivo producir unha mellora na resposta inmunitaria do paciente, así como provocar aumentos dos procesos de fagocitose por parte do organismo.[19]

Actualmente só se atopan en uso clínico algúns AA de Clase IA mentres que os das outras clases aínda se atopan en diversas fases de investigación. Os mellores exemplos de AA son os inhibidores das β-lactamasas, os enzimas que inactivan aos antibióticos β-lactámicos. Estes adminístranse xunto cos antibióticos e actúan uníndose ás β-lactamasas, impedindo que os enzimas inactiven o antibiótico. Esta estratexia de combinación (antibiótico β-lactámico + inhibidor de β-lactamasas) é eficaz contra un amplo espectro de microorganismos e está a permitir non só gañar tempo para descubrir e validar novas dianas terapéuticas, senón que tamén alarga a "vida útil" do arsenal terapéutico dispoñible.

1.2 Enzimas inactivantes: β-lactamasas

Aínda que este tipo de enzimas se coñecen dende os anos 70 do século XX, o seu número foi crecendo rapidamente nas últimas décadas, converténdose no principal mecanismo de resistencia entre os patóxenos bacterianos Gram-negativos, así como en algunhas especies de patóxenos Gram-positivos como é o caso de *S. aureus*. Estes enzimas poden estar codificados xenéticamente nos cromosomas das bacterias, e por tanto ser intrínsecos á especie, ou ben poden estar codificados en plásmidos. Estes elementos xenéticos son movibles e poden ser transmitidos entre membros da mesma especie, e incluso entre membros de diferentes especies (resistencia adquirida).[20] A crecente incidencia e continua evolución destes enzimas son consecuencia directa da devandita transmisibilidade xenética e da selección natural por exposición a axentes β-lactámicos.

O coñecemento dos tipos máis comúns de β-lactamasas producidas por cada patóxeno pode axudar a interpretar a susceptibilidade de estes aos diferentes antibióticos, tomando así a mellor decisión clínicas e permitindo un maior control das infeccións. A presenza das β-lactamasas mais sofisticadas e difíciles de eludir

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fan que se reduzan significativamente as opcións terapéuticas e, nalgún caso, non hai solucións posibles.[21]

Gracias ao gran avance das técnicas de secuenciación e computación actualmente están identificadas mais de 8.200, segundo se contabiliza en Beta-Lactamase Data Base (BLDB).[22] O obxectivo de esta completa base de datos web é o de recompilar toda a información posible (secuencia de aminoácidos, estruturas cristalográficas, perfís cinéticos, etc.) de todas as β-lactamasas coñecidas na actualidade, e das que se vaian descubrindo no futuro, a fin de conformar unha ferramenta útil para a mellor comprensión destes enzimas por parte de investigadores de todo o mundo.

A inmensa cantidade e variedades existentes de este tipo de enzimas fan da súa clasificación unha ardua e complicada tarefa.[23] Ao longo das décadas realizáronse múltiples esquemas de clasificación, sendo un dos primeiros e mais empregado o sistema de clasificación de Ambler (1980).[24] Este sistema agrupa os enzimas en 4 clases (A, B, C e D) atendendo á súa secuencia de aminoácidos. As clases A e C representan os grupos mais numerosos (24 e 47% respectivamente), seguidas das clase D (16%) e as B (12%). Outro dos sistemas que mais éxito tivo é o proposto por Bush, Jacoby e Medeiros (1995), posteriormente modificado e actualizado por Bush e Jacoby (2010).[25] Este sistema de clasificación realizase en grupos e subgrupos de acordo a características funcionais dos enzimas: (i) a capacidade para hidrolizar clases específicas de β-lactámicos e (ii) a capacidade doa inhibidores dispoñibles para bloquear a súa actividade. Este sistema de clasificación resulta máis práctico no ámbito clínico, posto que facilita a comprensión e correlación das propiedades enzimáticas cós perfís de resistencia observados nos microorganismos[26] (Táboa 2).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Táboa 2. Principais esquemas de clasificación e exemplos característicos de β-lactamasas que inclúen.

Bush-Jacoby (2009)	Clase de Ambler (subclase)	Substratos característicos	Enzimas representativos
1	C	Cefalosporinas	P99, ACT-1, CMY-2, *E. coli* AmpC
1e	C	Cefalosporinas	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	PC1, BlaC
2b	A	Penicilinas e primeiras cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactamas	TEM-3, PER-1, SHV-2, CTX-M-15
2d	D	Cloxacilina, Oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de amplio espectro	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenems	OXA-23, OXA-48
2f	A	Carbapenems	KPC-2, SME-1, IMI-1
3a	B (B1)	Carbapenems	IMP-1, VIM-1
3b	B (B2)	Carbapenems	L1, CphA

Os enzimas das clases A, C e D son coñecidos como serina-β-lactamasas, xa que empregan un residuo catalítico de serina como nucleófilo para levar a cabo a hidrólise, mediante un proceso de acilación/desacilación. A catálise iniciase por desprotonación do residuo de serina, asistida por un residuo veciño que actúa como base, e posterior ataque nucleófilo ao carbonilo do anel β-lactámico. Isto dá lugar á formación de un aduto covalente que posteriormente é hidrolizado por acción de unha molécula de auga, dando lugar ao produto degradado e rexenerando o enzima (Figura 6A). Os enzimas da clase B son coñecidos como metalo-β-lactamasas, xa que dependen de un (subclase B2) ou dous (subclases B1 e B3) ións Zn (II) para levar a cabo a hidrólise, empregando un anión hidróxido como nucleófilo. As subclases B1 e B3 son as mais abundantes, en este caso a catálise iniciase por coordinación do carboxilo a un dos ións zinc, provocando o ataque nucleófilo do hidróxido coordinado a ambos ións. Este ataque sobre o carbonilo desencadea a ruptura do anel β-lactámico, dando lugar a un intermedio aniónico que se ve estabilizado pola presencia de ambos ións zinc. Finalmente prodúcese a protonación de este intermedio dando lugar ao produto degradado e rexenerando o enzima (Figura 6B). Ambos mecanismos de hidrólise transcorren a través de un estado de transición tetraédrico, ETT1 e ETT2 respectivamente.[27]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

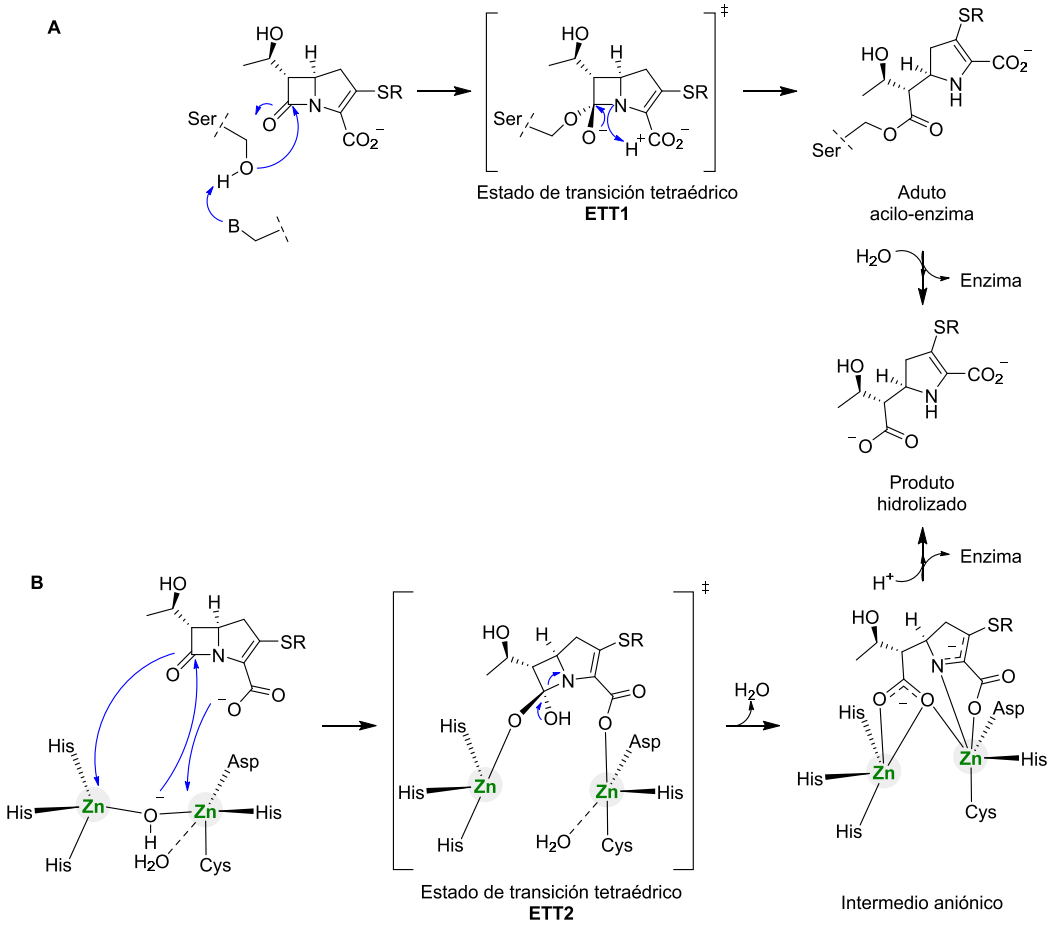


Figura 6. Hidrólise enzimática de **(A)** serina β-lactamasas **(B)** metallo β-lactamasas exemplificada con un carbapenem. R = cadea lateral.

Como se pode apreciar na táboa 2 exposta anteriormente, as clases de Ambler constitúen un grupo moi diverso en termos de especificidade de substrato e na eficacia e capacidade catalítica dos enzimas, incluso dentro da mesma clase ou tipo de enzima (Figura 7).

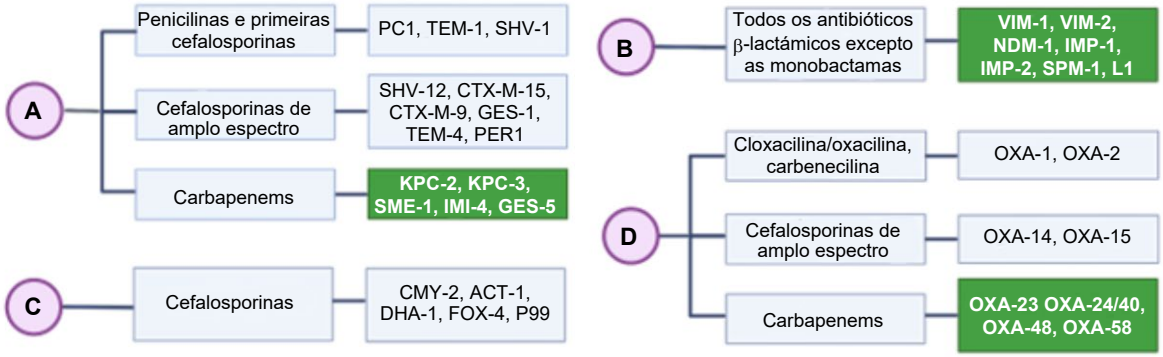


Figura 7. Clasificación de Ambler das β-lactamasas, incluídos substratos distintivos e algúns enzimas característicos. As carbapenemasas mais difíciles, producidas por patóxenos Gram-negativos multirresistentes, aparecen con fondo verde.

Así por exemplo os enzimas TEM-1 e TEM-3 (Clase A) presentan diferentes capacidades hidrolíticas fronte a penicilinas e cefalosporinas respectivamente. Isto é debido a pequenas diferencias nas secuencias de aminoácidos, en este caso 4, pero que lle confiren a capacidade de hidrolizar unha gama mais ampla de antibióticos. A clase A representa a mais variada de todas, xa que dentro desta clase atopamos enzimas capaces de hidrolizar dende penicilinas ata cefalosporinas de amplo espectro, e incluso carbapenems. Motivo polo cal se está a propoñer a división de esta clase en varias subclases ou grupos, a fin de diferenciar mellor os enzimas que a compoñen actualmente.[28]

Os enzimas de clase A, coñecidos inicialmente como penicilinasas, atópanse codificados principalmente en plásmidos, motivo polo cal se propagan e mutan facilmente. Isto levou á aparición de enzimas capaces de hidrolizar un amplo abanico de β-lactámicos, dende penicilinas ata cefalosporinas de terceira xeración, o que lles valeu o nome de β-lactamasas de espectro estendido (ESBL). Esta clase de enzimas atópanse principalmente en enterobacterias como *Klebsiella* spp. e *E. coli*, sendo os tipos mais representativos TEM, BlaC, SHV, CTX-M e GES. Ademais, tamén se identificaron dentro de esta clase enzimas capaces de hidrolizar os carbapenems, como son as carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) ou variedades como GES-5, que son os mais complicados.

Os enzimas de clase B son capaces de hidrolizar un amplísimo espectro de substratos, salvo as monobactamas (aztreonam), practicamente todos os antibióticos β-lactámicos son substratos das subclases B1 e B3, mentres que a subclase B2 desactiva especificamente carbapenems. As metalo-β-lactamasas (MBL) como IMP (B1), VIM (B1), NDM (B1), CphA (B2) e L1 (B3) representan actualmente un enorme risco para os pacientes hospitalizados, xa que confiren ás bacterias que as xeran un espectro extremadamente amplo de resistencia aos antibióticos β-lactámicos, e aínda non se aprobou ningún inhibidor destes enzimas por parte da FDA nin da EMA. As MBL poden estar codificadas nos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cromosomas de algúns microorganismos, como a L1 de *Stenotrophomonas maltophilia*, ou poden ser adquiridas mediante plásmidos, como ocorre con microorganismos Gram-negativos (*Klebsiella pneumoniae* ,*Pseudomonas aeruginosa* e especies de*Acinetobacter*).[29]

Os enzimas de clase C son coñecidos como cefalosporinasas, xa que as cefalosporinas son o seu substrato preferido. De elas, a β-lactamasa cromosómica AmpC, tamén coñecida como (*Pseudomonas*-derived cephalosporinase, PDC), é especialmente problemática nos illados clínicos da especie *Pseudomonas aeruginosa*, xa que presentan un baixo nivel basal de expresión deste enzima, pero que se dispara tras a exposición a algúns antibióticos β-lactámicos, o que convirte a esta bacteria en intrinsecamente resistente a estes fármacos. Este tipo de enzimas foi adquirido por plásmidos transmisibles, polo que agora pode atoparse entre bacterias que inicialmente carecían do xene *ampC* que o codifica, ou que o expresaban de forma deficiente como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, entre outras. Outros exemplos relevantes de enzimas de esta clase son as tipo FOX, P99, CMY e DHA.

Por último, os enzimas da clase D coñecidos como oxacilinasas (OXA), son as β-lactamasas xenéticamente mais diversas.[30] En xeral, caracterízanse pola súa destacada capacidade para hidrolizar oxacilina, cloxacilina e carbecilina (penicilinas), pero tamén evolucionou un gran grupo de OXAs para hidrolizar cefalosporinas de amplo espectro (cefotaxima, ceftazima e cefepima), como a OXA-14 e 15 que se atopan principalmente en *P. aeruginosa*. Entre os enzimas de clase D, o grupo mais perigoso en termos de epidemioloxía e incidencia é o dos enzimas hidrolizantes de carbapenems, tamén chamados carbapenemasas. A maioría das carbapenemasas están mediadas por plásmidos e atópanse con frecuencia en patóxenos multirresistentes potencialmente mortais como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e en cepas da familia das Enterobacteriaceae. As infeccións causadas por bacterias que producen este tipo de enzimas son motivo de gran preocupación, xa que están comprometendo seriamente o uso de

USC DE COMPOSTELA

carbapenems, considerados os antibióticos de último recurso.[31] A maioría destas carbapenemasas (OXA-23, 24/40 e 58) identificáronse en illados clínicos de *Acinetobacter baumannii*,[32] mentres que a OXA-48 é a máis notable en *Klebsiella pneumoniae* e outras Enterobactericiae.[33] Estes enzimas caracterízanse por empregar un residuo de lisina carbamilado como residuo catalítico e por ter un centro activo altamente hidrófobo (Figura 8A).

Así pois, factores como a accesibilidade, a topoloxía e a hidrofobicidade dos sitios clave de recoñecemento, xunto coa presencia/ausencia de ións catalíticos, poden explicar a diversidade de eficacias e especificidades catalíticas destes enzimas, o cal se pode ver analizando as estruturas tridimensionais dispoñibles en Protein Data Bank (PDB)[34] (Figura 8A).

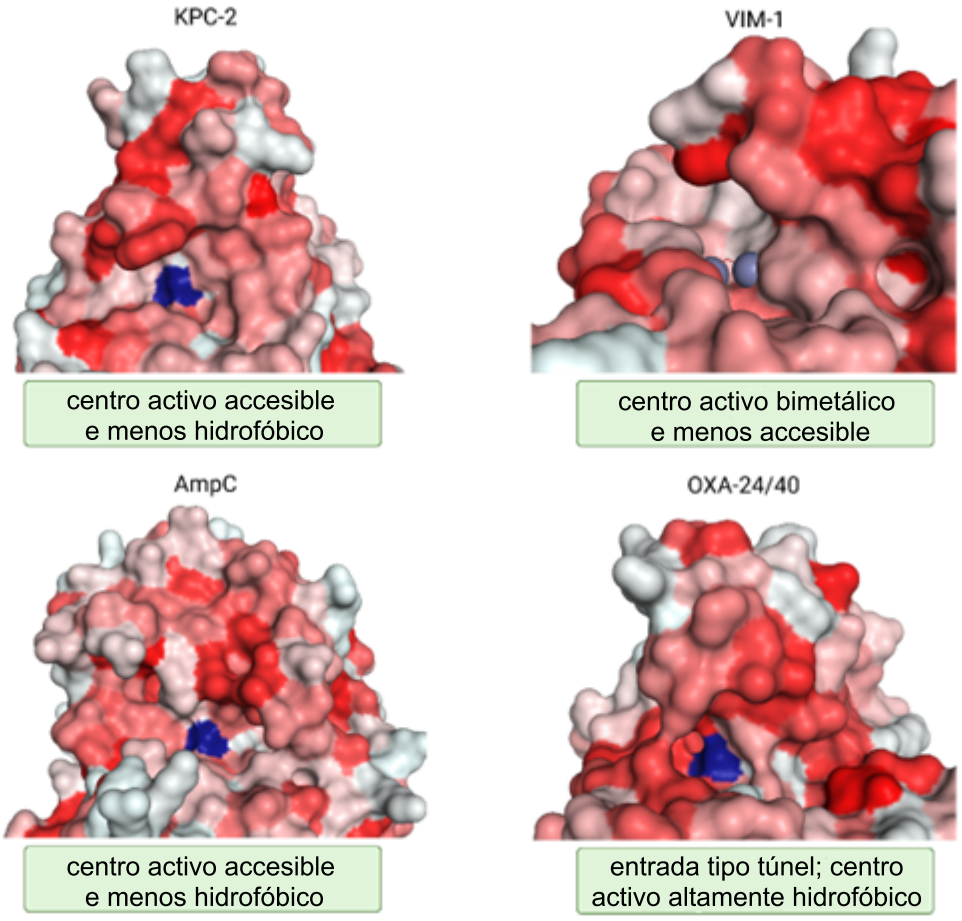


Figura 8. (A) Vista en primeiro plano do sitio activo de exemplos representativos das clases A (KPC-2, PDB: 4ZBE), B (VIM-1, PDB: 5N5I), C (AmpC, PDB: 4HEF) e D (OXA-24/40, PDB: 3FV7). A superficie hidrofóbica mostrase en vermello e a hidrofílica en gris. O residuo catalítico de serina resaltase en azul e os ións Zn^{2+} represéntanse como esferas.

1.2.1 Inhibidores das β-lactamasas

Os primeiros inhibidores destes enzimas que se descubriron, ác. clavulánico e sulbactam, están baseados na estrutura dos antibióticos β-lactámicos e levan empregándose con bastante éxito dende a súa aprobación nos anos 70–80. O ácido clavulánico inhibe eficazmente os enzimas da clase A (excepto ESBLs e carbapenemasas), pero non funciona contra as de clase B, C e D. Adminístrase xunto ao antibiótico amoxicilina (Augmentine™) como tratamento fronte a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilinas, causantes de infeccións de oído (otite), dos seos nasais (sinusite), do tracto respiratorio superior (amigdalite, bronquite) e inferior (pneumonía) e infeccións do tracto urinario (cistite, pielonefrite), entre outras. Ademais empregase habitualmente por administración intravenosa (IV) como medio de profilaxe en cirurxías maiores.[35] Adminístrase tamén xunto á ticarcilina (Timentin™) por vía IV para o tratamento de septicemias, infeccións das vías respiratorias inferiores (pneumonía), infeccións intraabdominais (peritonite) e infeccións urinarias complicadas causadas por cepas de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacterias (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*) resistentes a penicilinas.[35b]

O sulbactam adminístrase xunto a ampicilina (Unasyn™) por vía intramuscular ou IV para o tratamento hospitalario das devanditas infeccións, amais de infeccións xinecolóxicas e gonocócicas (Gonorrea), e tamén se emprega en profilaxe en cirurxías abdominais e de pelve. O sulbactam protexe á ampicilina da maioría das β-lactamasas estafilocócicas e das codificadas por plásmidos de clase A (TEM, SHV, CTX-M) e tamén de determinadas β-lactamasas cromosómicas (AmpC, clase C) de bacterias Gram-negativas como *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Haemophilus influenzae*. Sen embargo, hai algúns organismos que son intrinsecamente resistentes á ampicilina como son *E. cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* (resistente á meticilina) polo que esta combinación é ineficaz.[35]

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

O último inhibidor de este tipo en saír ao mercado foi o tazobactam, que se aprobou en 1993 en asociación co antibiótico piperacilina (Zosyn™) e mais recentemente, en 2014, con ceftolozano (Zerbaxa™) unha cefalosporina de 4ª xeración. Ambas combinacións restrínxense a uso hospitalario para tratamento de pneumonías graves, incluíndo as adquiridas no hospital e as asociadas ao respirador, para infeccións intraabdominais e do tracto urinario complicadas, e infeccións complicadas da pel e os tecidos brandos. Tazobactam inhibe numerosas β-lactamasas de clase A que confiren resistencia ás penicilinas e cefalosporinas, incluindo CTX-M, SHV e TEM, pero non inhibe ESBLs nin carbapenemasas (KPC) da clase A, enzimas AmpC (clase C) producidas por Enterobacterales, metalo β-lactamasas (NDM) nin as de clase D (OXA-carbapenemasas).

Polo momento só estes tres inhibidores están dispoñibles no mercado,[18] pero estanse a desenvolver outros inhibidores deste tipo, xa que os aprobados e comercializados ata a fecha non son especialmente eficaces contra algunhas das β-lactamasas mais evolucionadas e perigosas, presentes en cepas dos patóxenos de prioridade crítica para a OMS. Actualmente atópase en fase III de ensaios clínicos outro inhibidor deste tipo, o enmetazobactam[36] (Figura 9).

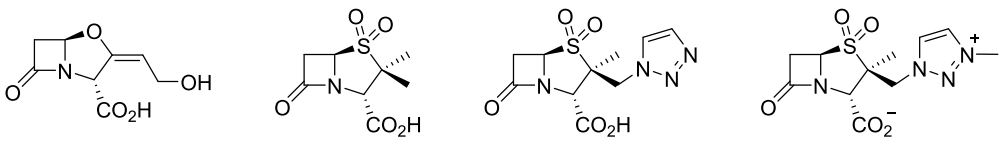


Figura 9. Antibióticos adxuvantes baseados en β-lactámicos.

Ademais dos inhibidores cuxa estrutura se basea na dos antibióticos β-lactámicos, descubríronse compostos con outros tipos de estruturas capaces de inhibir eficazmente a estes enzimas, este é o caso dos 1,6-Diazabiciclo[3.2.1]octanos (DBO) (Figura 10). Estes compostos desenvolveronse na década dos 90 como potenciais antibióticos, esperando que a súa estrutura puidese mimetizar á do anel β-lactámico. Sen embargo estes compostos demostraron unha baixa capacidade antibacteriana, pero mostraron un gran potencial inhibidores reversibles dos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

enzimas β-lactamasas. Durante os primeiros anos do século XXI sintetizáronse varios de estes compostos, identificándose entre eles o avibactam, que acabaría por ser o primeiro desta clase en ser aprobado. En 2015 autorizouse o seu uso xunto á cefalosporina ceftazidima (Avycaz™), comercializado en España por Pfizer co nome de Zavicefta™. Esta combinación está indicada para o tratamento hospitalario de infeccións intraabdominais complicadas (en combinación con metronidazol), infeccións do tracto urinario causadas por patóxenos Gram-negativos como *E. coli, K. pneumoniae, Enterobacter cloacae* ou *P. aeruginosa*, e tamén pneumonías adquiridas no hospital e asociadas a ventilación mecánica. Avibactam inhibe as β-lactamasas das clases A e C, incluíndo as ESBLs, as AmpC e algunhas carbapenemasas (KPC) ademais de algúns enzimas da clase D (OXA-48), pero non é capaz de inhibir moitas da clase D e ningunha metalo β-lactamasa (clase B). Ademais as especies *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter* spp. non mostran sensibilidade á combinación ceftazidima/avibactam.[35] Outras combinacións de antibióticos con este inhibidor atópanse en diversas fases de ensaio e/ou desenvolvemento.[16c]

Avibactam actúa establecendo fortes interaccións electrostáticas entre o grupo sulfato e os residuos co centro activo do enzima e formando un enlace covalente entre a serina catalítica e o carbonilo do anel "β-lactámico" que é estable á hidrólise. O novidoso mecanismo de acción que presenta xunto coa súa efectividade ante un amplo número de β-lactamasas, impulsou a busca de novos análogos do avibactam nos seguintes anos. Como resultado das investigacións identificáronse novos inhibidores de esta clase, como o relebactam, o durlobactam e o zidebactam, que se atopa en ensaios clínicos de fase III en combinación co antibiótico cefepime[37] (Figura 10).

O relebactam mostrou ser un bo inhibidor contra varios tipos destes ezimas, como as β-lactamasas de espectro extendido (ESBL), as carbapenemasas KPC (clase A) e as AmpC (clase C), producidas por cepas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* resistentes a imipenem. A recente incorporación deste inhibidor á

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

combinación Primaxin™ (imipenem + cilastatina)[38] mostrou ser moi eficaz para restaurar a actividade de este antibiótico fronte aos patóxenos Gram-negativos antes mencionados, polo que foi aprobado en 2019 e comercializase co nome Recarbrio™. A cilastatina é á súa vez un inhibidor do enzima dehydropeptidasa I, un metaloenzima dependente de zinc que se atopa nos riles dos mamíferos, e que é capaz de degradar o imipenem. Este dipéptido mostrou tamén ter unha boa capacidade inhibitoria contra metalo-β-lactamasas como a CphA,[39] o que fai de esta triple combinación unha potente ferramenta para combater unha ampla gama de bacterias resistentes.

No ano 2019 identificouse o composto ETX2514, tamén coñecido como durlobactam, que mostrou ser un potente inhibidor de unha ampla gama de β-lactamasas das clases A e C, e ademais é capaz de inhibir eficazmente as carbapenemasas OXA (clase D). Actualmente este composto, en combinación con sulbactam, atopase en unha fase moi avanzada de ensaios clínicos (fase III) para o tratamento de infeccións causadas por *Acinetobacter*.[18]

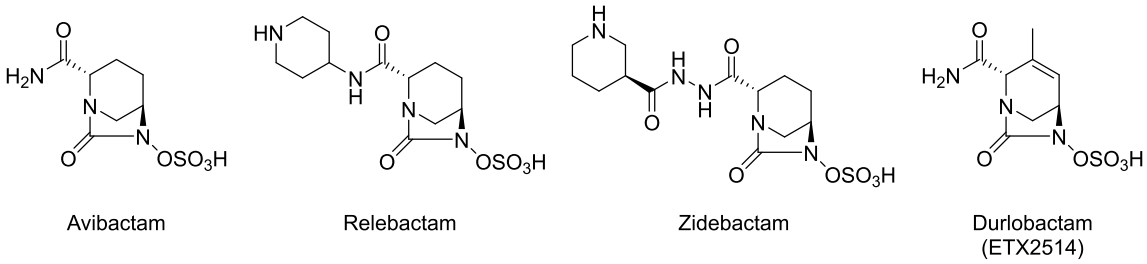


Figura 10. Inhibidores non baseados en compostos β-lactámicos. 1,6-Diazabiciclo[3.2.1]octanos (DBO)

Outro caso de compostos, non baseados en β-lactámicos, que presentan unha alta capacidade inhibitoria fronte a estes enzimas é o dos inhibidores borónicos ou boronatos cíclicos (Figura 11). A incorporación do átomo "máxico" de boro é unha estratexia en auxe no campo da química médica debido ás propiedades únicas de este átomo: (i) alta biocompatibilidade e (ii) versatilidade á hora de formar enlaces coas dianas biolóxicas. Os compostos que conteñen boro, especialmente heterociclos de seis membros, son inhibidores competitivos das serina β-lactamasas, e ademais presentan un inmenso potencial anti-TB ou

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

antimalaria, entre outras aplicacións.[40] O átomo de boro forma un enlace dativo reversible coa serina catalítica dos enzimas, impedindo así a hidrólise do antibiótico β-lactámico e restablecendo a súa efectividade.[41]

En 2017 aprobouse a comercialización do Vabomere™ (en España Vaborem™), o primeiro fármaco en incorporar un inhibidor de β-lactamasas baseado en boronatos cíclicos, concretamente o vaborobactam, en combinación co antibiótico meropenem.[42] Esta combinación é altamente efectiva en infeccións intraabdominais e do tracto urinario complicadas, ademais de pneumonía, especialmente fronte ás causadas por *K. pneumoniae*. Vaborobactam mostrou ser un potente inhibidor das serinacarbapenemasas de clase A como CTX-M, SHV, TEM, e en especial das KPC, e tamén de enzimas de clase C, pero non inhibe metalo-β-lactamasas nin carbapenemasas de clase D.[35a]

Actualmente non hai inhibidores dispoñibles contra as metalo-β-lactamasas (NDM, VIM, IMP, etc.), e resulta complicado desenvolver inhibidores universais, debido ás grandes diferencias mecanísticas e estruturais entre estas e as serina-β-lactamasas. Sen embargo, estudos recentes con boronatos bicíclicos como o taniborbactam (xunto con cefepime; fase III) mostran que este tipo de compostos poderían ter o potencial para selo. Estes inhibidores teñen un amplo espectro de actividade e poden inhibir unha gran diversidade de β-lactamasas, incluídas as ESBL como CTX-M-15, os enzimas de clase C, os clase B como NDM-1, e algunhas variantes das carbapenemasas de clase D como OXA-23 e OXA-48. Isto é debido a que actúan como análogos do primeiro intermedio tetraédrico común a ambas vías de hidrólise.

Outro prometedor composto de esta clase é o Xeruborbactam (QPX7728) que presenta un espectro de inhibición *in vitro* ultraamplio, sendo capaz de inhibir tanto serina como metalo-β-lactamasas en un rango nanomolar.[43] Este composto mostrou unha capacidade superior a taniborbactam para inhibir as carbapenemasas de clase D, como OXA-23 e OXA-24/40, que se atopan habitualmente en

A. baumannii e atópase actualmente en fase I de ensaios clínicos fronte a infeccións causadas por *Acinetobacter* e *Pseudomonas*.[43a]

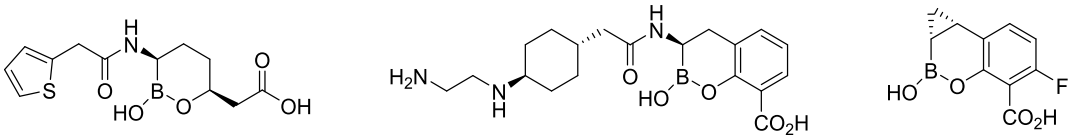


Figura 11. Inhibidores non baseados en compostos β-lactámicos. Boronatos cíclicos

1.3 Métodos para o diagnóstico de "Súper-Bacterias"

Aínda que as bacterias sempre desenvolverán certa resistencia aos antibióticos, é necesario contar con mecanismos de vixilancia que permitan seguir a evolución da resistencia bacteriana e manter baixo control estes procesos. Un diagnóstico preciso da cepa bacteriana que está a causar a infección, axudaría a orientar aos facultativos permitíndolles decidir o tratamento mais eficaz en cada caso, evitándose a prescrición de antibióticos ineficaces ou incluso innecesarios. Isto reduciría a presión que estes exercen tanto sobre o patóxeno a tratar como sobre a microbiota (microorganismos beneficiosos que conviven no nosos organismo), o que reduciría as posibilidades de desenvolver e/ou aumentar a resistencia fronte aos fármacos mediante a produción de enzimas inactivantes, mellorándose así a xestión das enfermidades infecciosas.

Ademais, a identificación de bacterias multirresistentes resulta clave para a correcta recuperación dos pacientes hospitalizados, especialmente en aqueles que se atopan en estados graves ou con sistemas inmunes deprimidos, xa que é neste ámbito no que se producen as infeccións polos patóxenos Gram-negativos mais preocupantes e difíciles de tratar como son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*.

Esta labor lévase a cabo en laboratorios de microbioloxía clínica mediante diversos procedementos, sendo os máis clásicos e habituais as chamadas técnicas fenotípicas. Estes métodos permiten identificar as bacterias baseándose en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

características observables: (i) morfoloxía; (ii) resposta á tinguidura de Gram; (iii) crecemento das colonias en diferentes condicións; (iv) metabolismo; e son os mais empregados en laboratorios de todo o mundo.[44] Estas técnicas requiren de un procesamento das mostras para illar as bacterias e a posterior realización de cultivos durante 12-24 h, tempo que incluso pode chegar a ser de varios días en casos de bacterias de crecemento moi lento.

Algunhas das probas de este tipo son o test de sinerxía de dobre disco (DDST),[45] o Test modificado de Hodge (MHT)[46] e o método modificado de inactivación de carbapenemasas (mCIM).[47] Estes métodos, que se poden empregar para detectar a presencia de β-lactamasas, implican a colocación de discos impregnados con diferentes axentes antimicrobianos sobre unha placa de agar inoculada coa bacteria a estudar e a posterior observación da interacción que se produce entre esta e os discos. Baseándose na supervivencia, ou morte, da bacteria en torno a estes discos pódese valorar a súa susceptibilidade fronte a cada fármaco ou valorar se esta presenta enzimas inactivantes, o que permite seleccionar o tratamento mais axeitado.

Aínda que estas técnicas son fundamentais na práctica clínica para a identificación de patóxenos e a aplicación de terapias antimicrobianas axeitadas, presentan limitacións como: (i) longos prazos; (ii) requiren de persoal altamente cualificado para realizalas e interpretalas; (iii) os resultados non sempre son os mais correctos.

Co avance da tecnoloxía, os métodos moleculares e a proteómica están complementando, e en algúns casos substituíndo ás técnicas fenotípicas, ofrecendo maior precisión e rapidez na identificación dos patóxenos e da presencia de enzimas que lles confiren resistencia.

Os métodos moleculares baséanse na detección da expresión xénica de β-lactamasas,[48] mediante a secuenciación do ARNm que as codifican, empregando as coñecidas técnicas de reacción en cadea de polimerasa (PCR) e a PCR

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cuantitativa con transcriptasa inversa en tempo real (rt qRT-PCR). Unha vez obtidas, as secuencias compáranse coas previamente identificadas e que se atopan depositadas en bases de datos. Esta metodoloxía empregase de forma complementaria ás técnicas fenotípicas, e aínda que permite sortear algunhas das súas limitacións[49] e aporta resultados mais precisos, esta tamén presenta inconvenientes. Ás veces prodúcense erros no aliñamento das secuencias xenéticas, dando como resultado falsos negativos, ou xorden discrepancias entre os resultados de esta técnica e os obtidos mediante as técnicas fenotípicas. Ademais, posto que requiren da existencia de bases de datos actualizadas de secuencias xenéticas previamente confirmadas, presentan a gran limitación de que non permiten detectar patóxenos ou enzimas con secuencias xenéticas novas ou descoñecidas.

Os métodos proteómicos, como a espectrometría de masas MALDI-TOF, revolucionaron a identificación de bacterias nos laboratorios de microbioloxía. A aplicación de esta técnica para tal fin é relativamente recente e permite obter de maneira rápida e fiable o perfil proteico das bacterias, o que facilita a súa identificación de un xeito mais preciso que as técnicas fenotípicas tradicionais. Ademais, a capacidade de identificar bacterias de difícil cultivo ou con fenotipos atípicos mediante a análise de proteínas é especialmente valiosa no diagnóstico clínico, onde a rapidez e a exactitude son cruciais para o tratamento efectivo das infeccións. Debido a que as mostras non requiren da realización de cultivos, nin de longos e complicados procesamentos previos, e ao curto tempo de análise que requiren os equipos actuais, estas técnicas permiten procesar un gran número de mostras e obter resultados en pouco tempo.[50] Isto tradúcese nunha redución do coste por mostra en comparación con outras técnicas como a PCR ou os ensaios fenotípicos antes mencionados.

Ademais da rapidez e baixo coste por mostra, estas técnicas presentan unha elevadísima reproducibilidade, o que convirte a este método no mais fiable e preciso para a identificación de patóxenos, e especialmente para o caso da

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

detección de enzimas inactivantes que lles confiren resistencia aos antibióticos β-lactámicos. Sen embargo estes métodos tamén presentan algunhas desvantaxes, sendo a principal o elevado coste económico dos equipos de altas prestacións que se requiren e a necesidade de persoal cualificado para realizar o mantemento e calibrado de estes equipos. Isto dificulta a implantación de estas técnicas en laboratorios de microbioloxía de todo o mundo e o seu emprego como unha práctica de rutina. Ademais disto, e ao igual que pasa coas técnicas moleculares, as técnicas proteómicas están suxeitas á limitación das bases de datos dispoñibles, polo que non resulta posible detectar enzimas β-lactamasas novas, nin cepas mutadas dos patóxenos aínda descoñecidas, o que limita o seu uso no seguimento da evolución do problema da resistencia aos antimicrobianos.

1.3.1 Probas específicas para a detección de β-lactamasas

Nos últimos anos, xurdiron os ensaios inmunocromatográficos de fluxo lateral como un método alternativo e fiable para a detección das principais carbapenemasas producidas por Enterobacterales.[51] Este método basease na detección dos enzimas mediante a súa interacción con anticorpos monoclonais, xerados por ratos inmunizados, que son específicos para cada β-lactamasa. Este tipo de tests son altamente sensibles e permiten detectar a presenza destes enzimas en uns 15 min, a partir de illados clínicos previamente cultivados. Actualmente a empresa belga Coris BioConcept comercializa varios tests deste tipo para a realización de ensaios en laboratorios de microbioloxía,[52] sendo o mais recente e completo do seu catálogo o test RESIST-4 O.K.N.V. que permite detectar as carbapenemasas tipo OXA-48 (clase D), as da familia KPC (clase A) e as metalocarbapenemasas de tipo NDM e VIM (clase B). Ademais tamén está dispoñible no mercado o NG-Test CARBA 5, comercializado pola empresa francesa NG Biotech, que permite, xunto coas catro antes mencionadas, detectar as imipenemasas (IMP, clase B). Os estudos realizados con ambos tests confirman que estes presentan unha alta sensibilidade e que os seus resultados son fiables, mostrando en ambos casos unha concordancia do 100% cos métodos de secuenciación por PCR.[53]

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estes tests presentan grandes vantaxes fronte a outros tipos de ensaios, principalmente o tempo para a súa realización, xa que permiten obter resultados tras un día de cultivo e 15 min de análise, recortando en varias horas, ou incluso días, o tempo necesario para obter ditos resultados por métodos moleculares (PCR) ou mediante os ensaios fenotípicos clásicos, presentando ademais un custo mais reducido. Sen embargo presentan algunhas desvantaxes, xa que só permiten detectar certos tipos de carbapenemasas, polo que se seguen requirindo ensaios adicionais para descartar a presenza de outros tipos de enzimas, especialmente si se trata de novos tipos de carbapenemasas producidas por patóxenos evolucionados. Ademais, como xa se comentou anteriormente, estes tests non eluden a necesidade de illar e cultivar os patóxenos, xa que non foron deseñados para o análise directo de mostras clínicas, polo que de momento, o seu uso vese restrinxido aos laboratorios de microbioloxía clínica e non poden ser efectuados nos centros de atención primaria por persoal non cualificado.

Para unha identificación rápida da presenza de carbapenemasas, as probas colorimétricas cualitativas, como o test Nordmann-Poirel (RAPIDEC® Carba NP)[54] e o test β CARBA®,[55] poden resultar útiles. Carba NP é a única proba rápida (≈2h) especifica para detección de carbapenemasas implementada polo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Esta baséase na detección da hidrólise do antibiótico carbapenémico imipenem usando vermello de fenol como indicador, que pasa de vermello a laranxa/amarelo ao producirse un cambio de pH tras a hidrólise por parte dos enzimas. Pola súa banda, β CARBA® é unha proba moi rápida (≈ 30 min) que se pode realizar directamente con illados clínicos de Enterobacterales. Esta proba, desenvolta pola empresa Bio-Rad, basease nun cambio de cor debido á hidrólise de un substrato cromoxénico (non publicado) en presenza de carbapenemasas. Estes métodos colorimétricos son rápidos, baratos e fáciles de realizar, pero mostran unha baixa sensibilidade e especificidade, polo que ás veces ofrecen como resultado falsos negativos.[56]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

O test β LACTA™ (Bio-Rad) é un novo método cromoxénico, que en un tempo arredor dos 30 min, permite descartar, ou confirmar, a presenza de cepas produtoras de ESBLs. A proba é axeitada tanto para colonias illadas de Enterobacteriaceae como para precipitados bacterianos procedentes de hemocultivos ou ouriños. Sen embargo este test non resulta axeitado para descartar cepas bacterianas que albergan enzimas AmpC mediadas por plásmidos ou cromosomas.[57]

Nos últimos anos estase a realizar un gran esforzo para desenvolver sensores químicos con un espectro de actividade ultraamplio, baseados en compostos β-lactámicos unidos a sondas cromoxénicas ou fluoroxénicas, que permitan detectar de xeito rápido e fiable a produción de β-lactamasas, e especialmente de carbapenemasas. Ademais de permitiren a vixilancia precisa da produción de novas carbapenemasas en patóxenos potencialmente mortais, estes sensores permitirían levar a cabo outro tipo de ensaios, tales como: (i) determinación do perfil cinético de novas β-lactamasas illadas; (ii) realización de ensaios de cribado de alto rendemento (HTS) para a busca de novos inhibidores ou antibióticos.

Este tipo de compostos representan a gran esperanza para conseguir desenvolver probas diagnósticas altamente sensibles, rápidas, baratas, e sobre todo, fáciles de realizar a partir de mostras clínicas, e que permitan a súa interpretación de xeito visual. Sen embargo, a ampla variedade de β-lactamasas e as marcadas diferencias entre elas, sobre todo no que á súa especificidade de substrato se refire, fan desta unha tarefa complicada.

1.3.2 β-lactámicos cromoxénicos: compostos comerciais

En 1971 Glaxo Laboratories Ltd. comezou a comercializar a Nitrocefina, unha cefalosporina cromoxénica que reacciona coas β-lactamasas presentes en mostras biolóxicas.[58] A Nitrocefina produce unha resposta visible fácil de ver sen necesidade de modernos equipos nin sofisticados experimentos, cambiando de cor amarelo a vermello intenso ao seren hidrolizado o seu anel β-lactámico (Figura 12). Isto explica o seu éxito e que se convertese en unha alternativa, ou

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

complemento, ás probas fenotípicas dispoñibles naquel momento nos laboratorios de microbioloxía. A cadea de (*E*)-2,4-dinitro-1-(prop-1-en-1-il)fenilo na posición C3 do corpo betalactámico de cefalosporina é a responsable do cambio de cor, ao estenderse a súa cadea de conxugación tras a hidrólise. Os ensaios con Nitrocefina soen consistir na detección do desprazamento da lonxitude de onda de absorción, de uns 380 nm a uns 485 nm, en un espectrómetro UV-Vis (Figura 12).

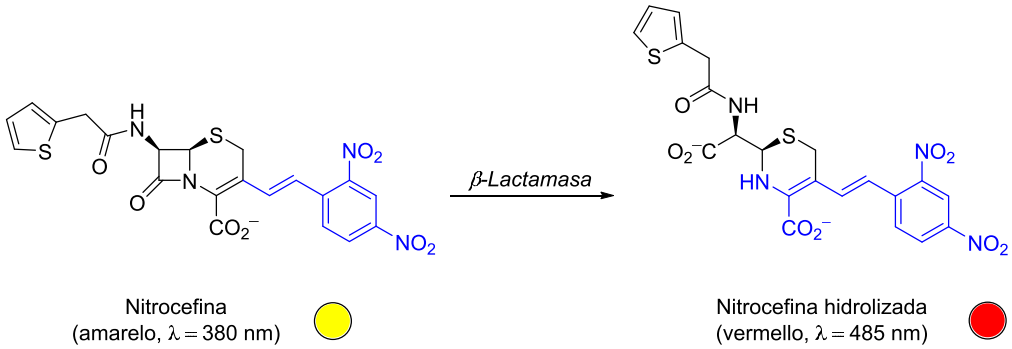


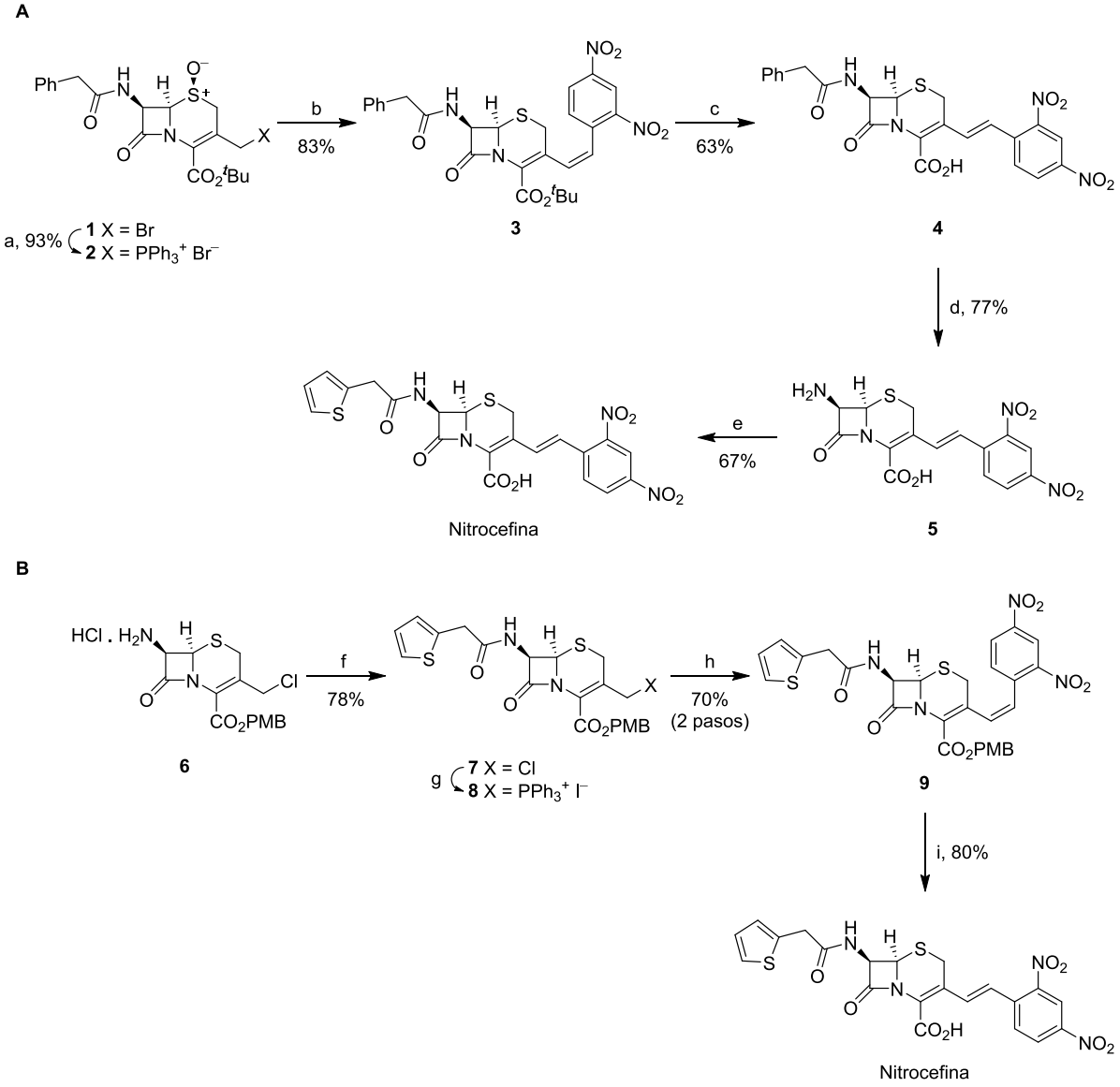
Figura 12. Hidrólise da Nitrocefina catalizada por β-lactamasas. Indícase en azul a parte cromoxénica e tamén se indican as λ empregadas habitualmente para monitorizar o proceso en UV-Vis.

A Nitrocefina resulta un reactivo moi caro debido á súa elevada demanda e a problemas de reactividade asociados á súa síntese. Os principais problemas do enfoque inicial de Glaxo son: (i) a obtención maioritaria do isómero Z tras a incorporación do cromóforo mediante reacción de Wittig;[59] (ii) a indesexable isomerización que sofren as cefalosporinas no anel de dihidrotiazina durante a protección do grupo carboxilato.[60] A oxidación do xofre a sulfóxido produce a inversión de dita isomerización, segundo informaron Kaiser e colaboradores,[61] obténdose unicamente o isómero desexado tras a redución do mesmo.

Con esta información, Barendse e colaboradores levaron a cabo unha mellora na síntese da Nitrocefina, permitindo realizar o proceso a gran escala en cinco pasos a partir do sulfóxido comercial **1**[62] (Esquema 1A). Posteriormente, Lee e colaboradores publicaron unha versión mellorada do procedemento orixinal de Glaxo, no que o uso dunha base de trimetilsilanolato potásico resulta ser clave tanto no paso de acilación para formar a amida **7**, como na reacción de Wittig[63]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Esquema 1B). Esta ruta sintética ademais facilita a isomerización *Z*/*E* axitando o produto da desprotección do carboxilo durante 24 h en unha disolución de cloroformo con un 10% de DMSO, evitando expoñer o composto a ácidos de Lewis como o $TiCl_4$.



Esquema 1. (A) Ruta de Barendse *et al.* **(B)** Ruta de Lee *et al. Reactivos e condicións:* (a) Ph_3P, MeOAc, MeOH, Δ. (b) 1. PCl_3, CH_2Cl_2, –10 °C; 2. 2,4-dinitrobenzaldehído, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2, t.a. (c) $TiCl_4$, CH_2Cl_2, 0 °C. (d) *Penicillin acilasa*, 32 °C, pH = 7.5. (e) 1. 1,3-Bis(trimetilsilil)urea, CH_2Cl_2, Δ; 2. Cloro 2-tiofenoacetilo, –10 °C. (f) KOTMS, cloro 2-tiofenoacetilo, CH_3CN/CH_2Cl_2, 0 °C → t.a. (g) NaI, PPh_3, butanona, t.a., escuridade. (h) 1. KOTMS, CH_3CN, –10 °C, escuridade; 2. 2,4-dinitrobenzaldehído, CH_2Cl_2, –10 °C → t.a. (i) 1. TFA, anisol, CH_2Cl_2, 0 °C, escuridade; 2. DMSO/$CHCl_3$.

O éxito da Nitrocefina espertou o interese por desenvolver cefalosporinas cromoxénicas similares, dando como resultado os compostos Cefesona-S1 (OXIS

International, USA), CENTA™ e PADAC® (Hoechst AG, Alemaña). A Cefesona-S1 é un análogo da Nitrocefina reportado por Sutton e colaboradores[64] no que se cambia a cadea lateral 2-tiofenilacetil por 2-fenilacetil, polo que presenta o mesmo comportamento ante a hidrólise. Sen embargo, non resulta tan útil debido á súa menor sensibilidade, sendo os resultados de detección de cepas produtoras de β-lactamasas peores para algúns patóxenos Enterobacteriaceae.

No caso de CENTA™ e PADAC®, estes cambian de cor tras liberar a sonda cromoxénica no medio (Figura 13). CENTA™ proporciona un cambio de cor amarelo claro (λ = 340 nm) a amarelo cromo (λ =405 nm), asociado á xeración de ác. 2-mercapto-5-nitrobenzoico.[65] PADAC® é un reactivo púrpura (λ = 570 nm) que cambia de cor a amarelo claro tras a hidrólise, asociado á liberación de (*E*)-*N,N*-dimetil-4-(piridin-4-ildiazenil)anilina.[66] A pesar de que ambos compostos mostraron ser mais estables que a Nitrocefina nos medios fisiolóxicos empregados en microbioloxía e ante a presenza de proteínas, estes úsanse menos, xa sexa por un cambio de cor pouco pronunciado (CENTA™) ou por un cambio de cor mais lento debido á súa menor reactividade(PADAC®).[66a]

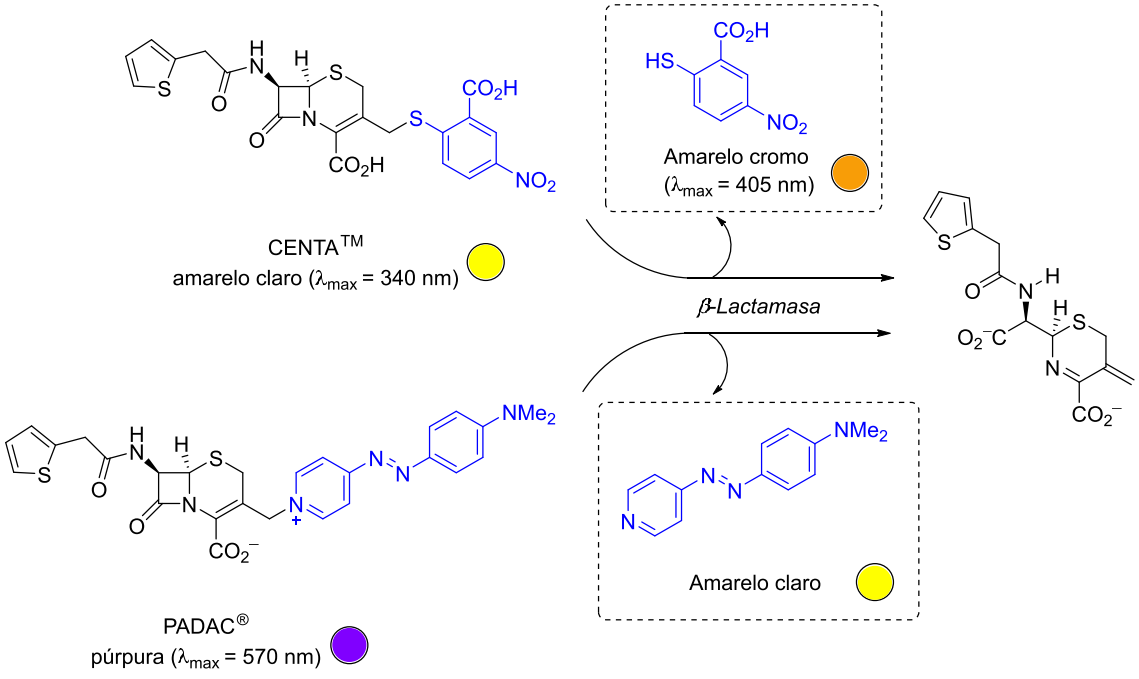


Figura 13. Hidrólise de CENTA™ e PADAC® catalizada por β-lactamasas. Indícase en azul a parte cromoxénica e tamén se indican as λ empregadas habitualmente para monitorizar o proceso en UV-Vis.

Os esforzos por lograr compostos cromoxénicos máis sensibles e específicos para a gran diversidade de β-lactamasas existentes, deron lugar ao composto HMRZ-86, que é o principal reactivo do test βLACTA™ (Bio-Rad, Francia). Este análogo da Nitrocefina produce a mesma resposta de cambio de cor (amarelo a vermello), sen embargo presenta unhas sensibilidades e especificidades moi diferentes. Os estudos levados a cabo por Hanaki e colaboradores demostraron que este composto permite diferenciar entre β-lactamasas de diferentes clases. A cadea lateral máis complexa que presenta na posición C7 confírelle a este composto resistencia á hidrólise por parte das β-lactamasas mais básicas. A diferencia da Nitrocefina, que é hidrolizada por unha ampla gama de β-lactamasas (penicilinasas de Clase A, ESBLs de clase A, cefalosporinasas de clase C como as AmpC, oxacilinasas de clase D, etc.), o HMRZ-86 só se hidroliza por ESBLs de clase A e D, e por metalo-β-lactamasas de clase B.[67]

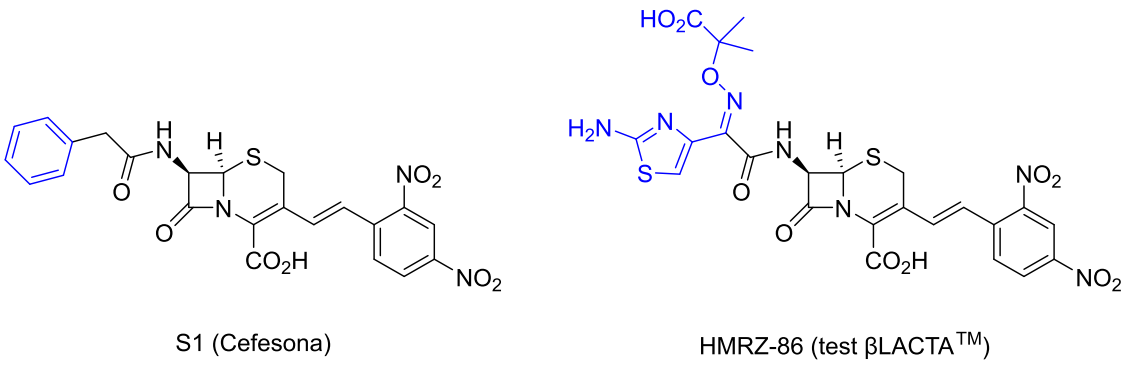


Figura 14. Cefalosporinas cromoxénicas análogas á Nitrocefina. Resáltanse en azul as diferencias estruturais con respecto á Nitrocefina.

Estes compostos, foron durante décadas a referencia para a realización de probas e ensaios en laboratorios de todo o mundo, e seguen a ser hoxe en día amplamente empregados e estudados. A principal utilidade que se lle está tratando de dar a estes compostos nos últimos anos, é a de desenvolver dispositivos baratos e desbotables (discos de papel impregnados con eles), destinados a permitir a detección rápida e fiable da presenza de bacterias resistentes a antibióticos β-lactámicos en centros de saúde e hospitais de todo o mundo, de xeito que non se requira instrumentación sofisticada nin persoal de laboratorio capacitado

para analizalos.[68] Estes dispositivos, contendo Nitrocefina, mostraron resultados moi similares en canto a sensibilidade (límite de detección, LOD) respecto a métodos de laboratorio mais lentos e unhas 100 veces mais custosos, polo que prometen ser unha ferramenta rápida e barata que permita guiar as decisións de tratamento á espera de resultados adicionais.

1.4 Desenvolvemento de novos antibióticos

Para poder atallar o problema crecente que representan as cepas multiresistentes é fundamental, ademais de un correcto diagnóstico, o desenvolvemento de novos antibióticos. Sen embargo, diversas análises realizadas por *The Pew Charitable Trust* sobre as terapias actualmente en desenvolvemento,[69] (43 pequenas moléculas) revelan a falta de innovación en este campo por parte da industria farmacéutica. Soamente 10 destes fármacos, en diversas fases de desenvolvemento, presentan mecanismos de acción alternativos con respecto ás terapias clásicas ou van dirixidos a dianas terapéuticas diferentes, para as cales as bacterias aínda non desenvolveron resistencia. A maioría dos compostos en ensaios clínicos son modificacións de clases anteriores, co fin de facelos máis potentes e eficaces contra as cepas resistentes, pero que van dirixidos a inhibir as mesmas dianas terapéuticas para as que as bacterias xa desenvolveron resistencia.[70]

Actualmente esta tarefa de innovación lévana a cabo principalmente pequenas empresas biotecnolóxicas, grupos de investigación académica ou grandes asociacións público-privadas como CARB-X (Combating Antibiotic Resistant Bacteria Biopharmaceutical Accelerator).[71] Grazas ao desenvolvemento do campo da xenómica, hoxe en día disponse de unha gran cantidade de información sobre o metabolismo microbiano, o que se traduciu na identificación de novas dianas esenciais para a supervivencia dos patóxenos e na identificación de aquelas que son compartidas co hóspede, o que permite ademais minimizar as interaccións fármaco-hospedador a fin de evitar efectos secundarios indesexados.[72]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cabe esperar que nos vindeiros anos toda esta información se traduza en novas e mellores terapias, que permitan volver a manter a raia ás enfermidades causadas por infeccións bacterianas.

Un dos procesos biolóxicos identificados como fundamentais para a supervivencia bacteriana é a biosíntese dos aminoácido aromáticos, que se producen a través da coñecida como ruta do ácido xiquímico. Esta ruta bioquímica está presente en bacterias, plantas, fungos e en algúns parasitos do xénero apicomplexa,[73] como: (i) *Toxoplasma gondii,* causante da toxoplasmose; (ii) *Cryptosporidium parvum*, causante da criptosporodiose e (iii) *Plasmodium falciparum*, causante da malaria. Ademais, este proceso non está presente nas células dos mamíferos, motivo polo cal espertou un gran interese no desenvolvemento de fármacos capaces de alteralo e/ou interrompelo. No caso dos tratamentos antimicrobianos, estes potenciais fármacos presentarían un novidoso mecanismo de acción sen contrapartidas.[74]

1.4.1 Ruta biosintética do ácido xiquímico

O ácido xiquímico é un fundamental precursor do ácido corísmico, á súa vez precursor dos aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina e fenilalanina), de vitaminas como a E e K, ademais de outros compostos de vital importancia para diversos organismos como son o ácido fólico e as ubiquinonas, entre outros metabolitos secundarios[75] (Figura 15A).

Dos sete enzimas que compoñen esta ruta biolóxica, seis mostraron ser esenciais na supervivencia do bacilo causante da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, calcúlase que esta bacteria infecta arredor de unha cuarta parte da poboación mundial, pero só un 5–10% dos infectados presenta síntomas e desenvolve a enfermidade, a cal se trata con un cóctel de 5 fármacos durante un período prolongado de 4–6 meses. A falta de medios económicos e sanitarios nas zonas do planeta onde esta enfermidade é mais persistente, unida aos prolongados tempos de tratamento, o cal facilita o seu abandono, fan que esta

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

enfermidade infecciosa siga sendo potencialmente mortal. No ano 2022 esta enfermidade matou a 1.3 millóns de persoas en todo o mundo.[76]

Catro dos enzimas desta ruta son esenciais en *Helicobacter pylori*, bacteria causante de gastritis crónica e que causa úlceras gastroduodenais, considerada ademais pola OMS como axente carcinóxeno tipo I, xa que se lle relaciona co cancro de estómago.[77] E o quinto enzima da ruta, a Xiquimato Quinasa (XQ), tamén é esencial en *Pseudomonas aeruginosa*,[74] un dos patóxenos mais comúns nas infeccións nosocomiais e clasificado como de carácter crítico pola OMS (Figura 15B).

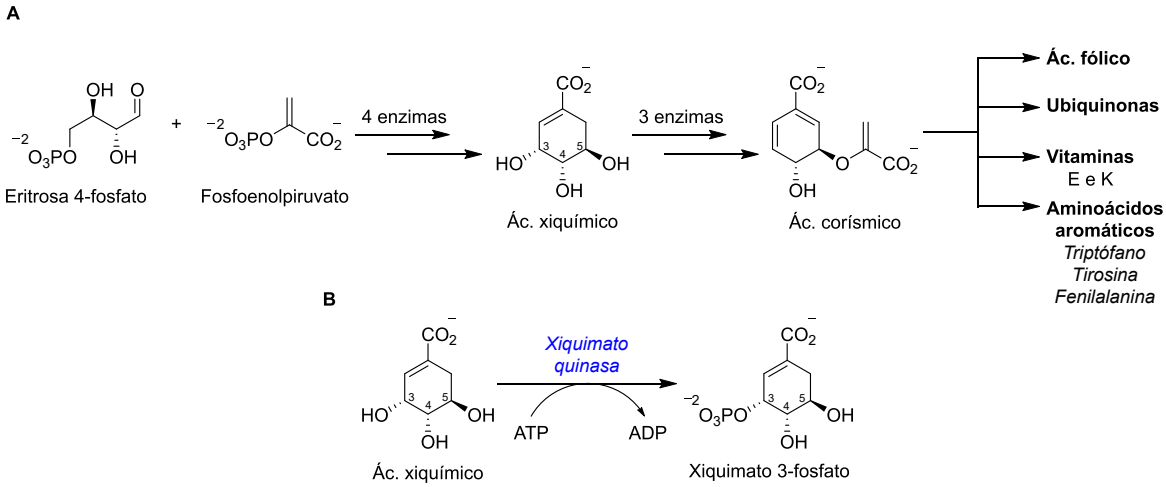


Figura 15. (A) Esquema resumido da ruta biolóxica do ác. xiquímico. **(B)** Transformación do ác. xiquímico catalizada polo enzima XQ.

O coñecemento dos procesos enzimáticos involucrados en esta ruta biolóxica, e o deseño e desenvolvemento de inhibidores selectivos para os mesmos, leva sendo obxecto de estudo no noso grupo de investigación dende fai varios anos. De especial interese resulta o enzima Xiquimato Quinasa, xa que, o desenvolvemento de inhibidores selectivos para este enzima, podería resultar na obtención de antibióticos contra diversas bacterias, especialmente *M. tuberculosis* e *H. pylori,* que resultan complicadas de eliminar e requiren longos tratamentos con varios fármacos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.2 O enzima Xiquimato Quinasa

Este é un enzima dependente de Mg^{2+} que cataliza a fosforilación selectiva do grupo hidroxilo da posición C3 do ácido xiquímico, mediante a transferencia do γ-fosfato do ATP, proporcionando xiquimato 3-fosfato e ADP (Figura 15B).

O enzima presenta unha estrutura global formada por cinco láminas β paralelas e oito hélices α rodeándoas, e no cal se distinguen tres dominios clave para a súa actividade catalítica: (i) o dominio CORE, contén as láminas β e o bucle P, unha secuencia conservada de aminoácidos que tamén é coñecida como motivo Walker A[78] e no cal se une o ATP; (ii) o dominio LID, composto por un bucle helicoidal que se pecha sobre o centro activo, a modo de tapa, este dominio contén residuos que son clave para a unión do ATP e a catálise; (iii) o dominio SB, formado por tres hélices α, no que se fixa o substrato (ác. xiquímico) (Figura 16).

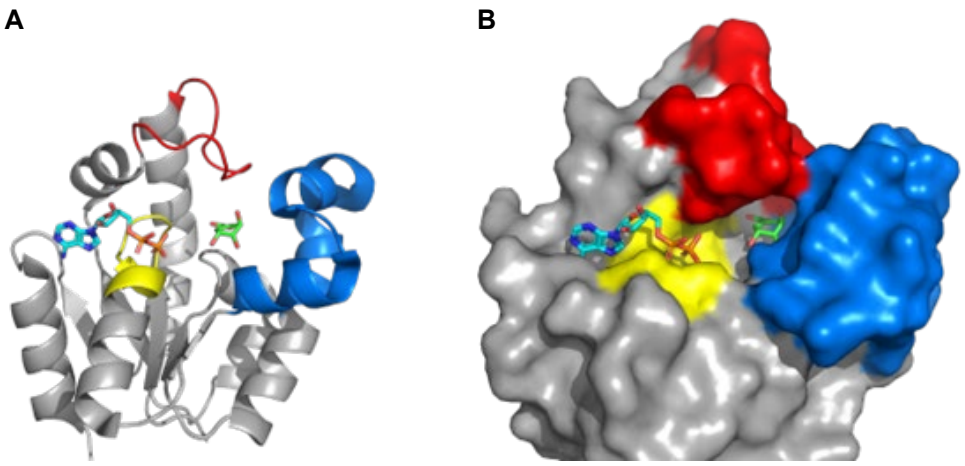


Figura 16. (A) Estruturas cristalinas do complexo XQ-*Mt*/ADP/ác. xiquímico (PDB: 2IYQ). Represéntanse os tres dominios importantes: CORE (amarelo), LID (vermello) e SB (azul). Mostrase a posición dos substratos, ATP (celeste), e ác. xiquímico (verde). **(B)** Representación da superficie na que se observa o peche dos dominios LID e SB sobre o substrato natural.

En base aos datos extraídos da estrutura cristalográfica do enzima, procedente de *M. tuberculosis* (XQ-*Mt*), con ADP e o ác. xiquímico no centro activo (PDB: 2IYQ), e a estudos computacionais e de RMN levados a cabo no noso grupo de investigación, demostrouse que a reacción enzimática se inicia pola ruptura do enlace γ-O-P do ATP, producíndose un metafosfato (PO_3^-) intermedio. A continuación prodúcese o ataque nucleófilo do hidroxilo en C3 seguido da desprotonación mediante un residuo de ác. aspártico.[79]

Observase que, en ausencia de ADP, o dominio LID atópase totalmente aberto e a Arg117, residuo esencial para a fixación do ATP na súa posición e que establece fortes interaccións co γ-fosfato desencadeando a catálise, sitúase a mais de 20 Å do centro activo. Estas probas suxiren que primeiro se une o ATP ao enzima, inducindo o pregamento do dominio LID sobre o centro activo e a continuación únese o ác. xiquímico ao dominio SB, provocando á súa vez que o LID se pregue por completo, pechando o centro activo e iniciándose a catálise (Figura 16B).

O ácido xiquímico únese ao centro activo a través de contactos directos e indirectos, coas cadeas laterais de Arg136 e Asp34 e unha rede de augas. O substrato permanece fortemente unido pola formación de unha ponte salina co grupo guanidinio da Arg136 e por enlaces de hidróxeno entre o residuo Asp34 e o hidroxilo da posición C4, ademais este residuo Asp34 actuaría como unha base para desprotonar o grupo hidroxilo C3 tras o ataque nucleófilo.

Como se pode observar nas estruturas cristalinas dispoñibles do enzima XQ procedente de *M. tuberculosis* (XQ-*Mt*) complexado co substrato natural, e durante as Dinámicas Moleculares realizadas,[80] o ác. xiquímico adopta unha conformación de alta enerxía na que se forzan as disposicións axiais dos hidroxilos en C4 e C5, quedando así o grupo hidroxilo C3 en disposición ecuatorial, axeitada para a reacción de fosforilación selectiva (Figura 17).

O grupo hidroxilo C4 queda fixado en disposición axial mediante enlaces de hidróxeno co residuo conservado Asp34 e con unha molécula de auga estrutural (WAT1), a cal se atopa inmobilizada a través de unha serie de interaccións de enlace de hidróxeno cos aminoácidos conservados Glu61, Arg58 e Gly80, presentes no dominio SB do enzima. A disposición axial do grupo hidroxilo C5 está fixada por dúas moléculas de auga, que crean unha ponte entre o carboxilato C1 e o grupo hidroxilo C5, a auga que se atopa máis preto do grupo hidroxilo C5 ademais interactúa co residuo conservado Leu119 situado no dominio LID, fixando a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

disposición do substrato entre ambos dominios, e achegándoos para que teña lugar a reacción de catálise enzimática (Figura 17A).

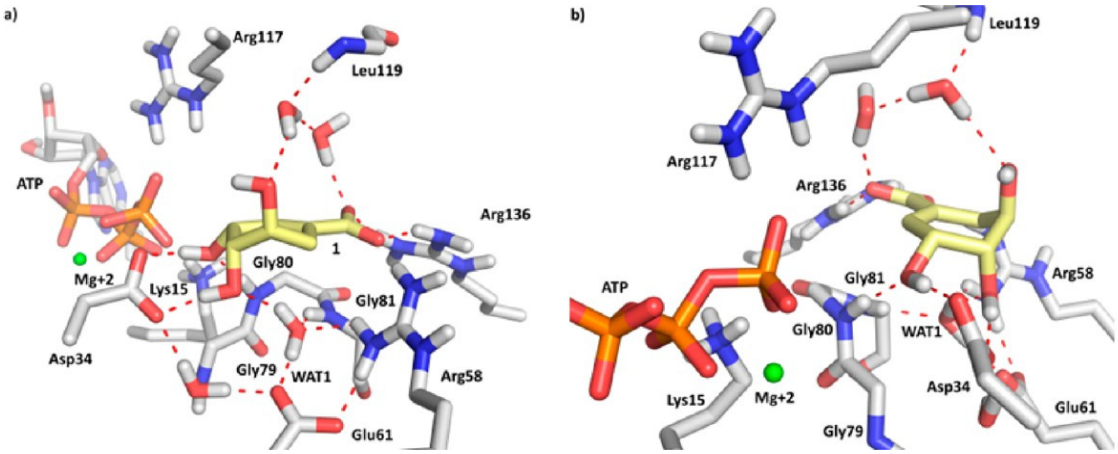


Figura 17. Complexo de Michaelis XQ-*Mt*/ATP/ác. xiquímico obtido tras substitución manual do ADP por ATP no complexo XQ-*Mt*/ADP/ác. xiquímico (PDB: 2IYQ). Dúas perspectivas das interaccións relevantes entre o ác. xiquímico e o centro activo do enzima XQ-*Mt*. Están etiquetados e representadas as cadeas laterais dos residuos relevantes. Adaptada con permiso desde Blanco, B.; Prado, V.; Lence, E.; Otero, J. M.; Garcia-Doval, C.; Van Raaij, M. J.; Llamas-Saiz, A. L.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12366–12376. Copyright ©2013 American Chemical Society.

Durante as simulacións de Dinámica Molecular (MD) realizadas no noso grupo de investigación,[80] observouse que a distancia entre o γ-fosfato do ATP e o oxíxeno do grupo hidroxilo C3 varía entre 4,4 e 6,4 Å, debido principalmente a un movemento de vaivén do dominio SB que resulta esencial para a catálise, xa que é a forma na que o enzima aproxima ambos substratos para que teña lugar a reacción. Ademais, ditas simulacións poñen de manifesto que tres son os factores clave para que teña lugar a reacción de catálise deste enzima: (i) a conformación diaxial dos hidroxilos C4 e C5 de alta enerxía; (ii) a forma pechada dos dominios LID e SB, para activar o fosfato γ do ATP, e manter próximos aos substratos dentro dunha cavidade apolar; (iii) a flexibilidade dos dominios LID e SB, que se abren para liberar o produto tras a reacción. En base a este coñecemento, no noso grupo de investigación levamos anos deseñando compostos capaces de alterar estes factores clave, co fin de inhibir a capacidade catalítica do enzima.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.3 Inhibidores da Xiquimato Quinasa

Durante a última década, identificáronse varias moléculas, con diversas estruturas químicas, que resultaron ter unha boa capacidade inhibitoria fronte a este enzima. A gran maioría dos inhibidores identificáronse a partir de quimiotecas, e as súas estruturas químicas non presentan ningunha similitude co substrato natural, o ác. xiquímico.

Un caso curioso é o das Manzaminas, unha familia de alcaloides procedentes de varias especies de esponxas mariñas Indo-Pacíficas que posúe unha potente actividade antiparasitaria e antibacteriana, entre outras, polo que están a ser obxectivo de investigación para o desenvolvemento de fármacos contra a malaria e contra a tuberculose. O motivo polo cal estes alcaloides presentan tal diversidade, e tal potencia, de actividades biolóxicas aínda non está del todo claro. Un amplo estudo cinético e computacional, levado a cabo por Simithy e colaboradores,[81] puxo de manifesto que a actividade das Manzaminas contra *Mycobacterium tuberculosis* débese a que estas son inhibidores non competitivos do enzima XQ. Aínda que inicialmente mostran un enlace lento ao enzima, resultan ser fortes inhibidores da mesma, especialmente a Manzamina A e o seu derivado 6-ciclohexamidomanzamina A (Figura 18), que mostraron os valores de IC_{50} mais baixos (10 e 0.06 µM respectivamente), sen embargo estes alcaloides presentan unha elevada citotoxicidade e baixa especificidade para este enzima, polo que aínda se segue a estudar a súa utilidade como fármaco anti-TB.

A partir de unha quimioteca de 404 compostos con recoñecida actividade antimicobacteriana, Simithy e colaboradores identificaron 3 compostos que presentan unha potente inhibición do enzima XQ-*Mt*. Dous de estes compostos presentan un anel central oxadiazol-amida (**10** e **11**, Figura 18), con valores de IC_{50} de 3.79 e 3.43 µM e valores de MIC, fronte á cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, iguais a 1.68 e 0.86 µg/mL respectivamente. O terceiro composto, bis(aminobenzotiazol) **12**, mostrou valores de IC_{50} de 1.94 µM e valores de MIC inferiores a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

0.20 µg/mL. O estudos computacionais realizados, suxiren que ambos heterociclos son os responsables da súa actividade, aínda que se descoñece o mecanismo.[82]

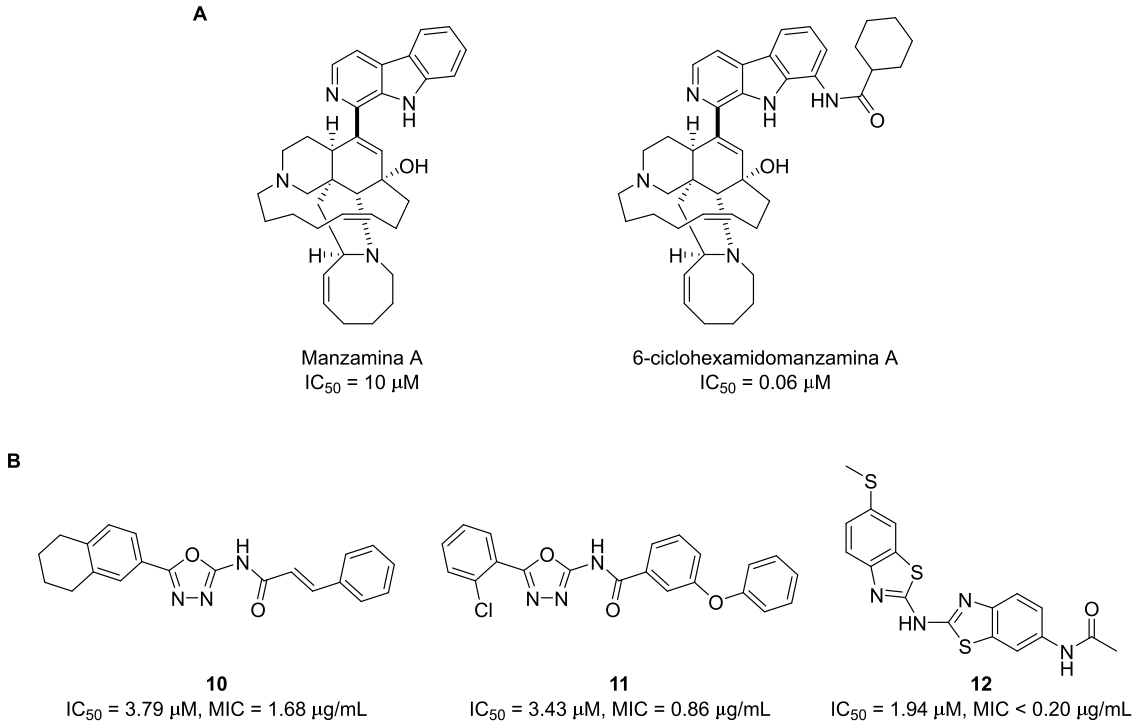


Figura 18. (A) Inhibidores de XQ-*Mt* de orixe natural. **(B)** Inhibidores de XQ-*Mt* sintéticos.

En base ás evidencias previas de que os derivados de pirazolonas presentan potencial antimicrobiano, e a que bibliografía mostraba que as hidrazonas (-NH-N=CH-) e as amidas estaban presentes en varios compostos con actividade fronte a diversos microorganismos, Krishnasamy e colaboradores[83] decidiron "fusionar" estes farmacóforos a fin de obter unha serie de compostos con unha boa actividade anti-TB. Entre a trintena de compostos sintetizados e ensaiados, destacou o inhibidor de XQ-*Mt* **13**, con un valor IC_{50} de 5.84 µM e unha MIC inferior a 0.10 µg/mL. Baseándose en este traballo, Rahul Reddy e colaboradores empregaron estudos computacionais de Docking para deseñar unha serie de derivados da pirazolona **13**. Como resultado deste traballo deseñaron, sintetizaron e avaliaron varios compostos, entre os que destacaron os derivados **14** e **15** (Figura 19) con valores IC_{50} de 25 µg/mL,[84] demostrando o potencial dos cribados *in silico* para a identificación de potenciais inhibidores par XQ-*Mt.*

Recentemente reportáronse os primeiros inhibidores descubertos fronte o enzima XQ procedente de *Staphylococcus aureus*, un patóxeno que mostra un preocupante aumento de resistencia á meticilina. O estudo levado a cabo por Rios-Soto e colaboradores,[85] demostrou que a actividade antibacteriana dos derivados de benzimidazol fronte a *S. aureus* se debe a que estes compostos presentan capacidade inhibitoria do enzima XQ-*Sa*. Entre os 170 derivados estudados atoparon que os compostos **16** e **17** (Figura 19) eran os mais potentes, con valores IC_{50} de 70 e 100 μM respectivamente e valores de MIC superiores a 60 μg/mL. Os estudos de Docking e dinámica molecular, mostraron que estes compostos actúan como inhibidores competitivos fronte ao ATP. Aínda que elevados, estes valores marcan un bo punto de partida para a busca e deseño de inhibidores selectivos de este enzima, e o consecuente desenvolvemento de fármacos novidosos para atallar a resistencia deste patóxeno.

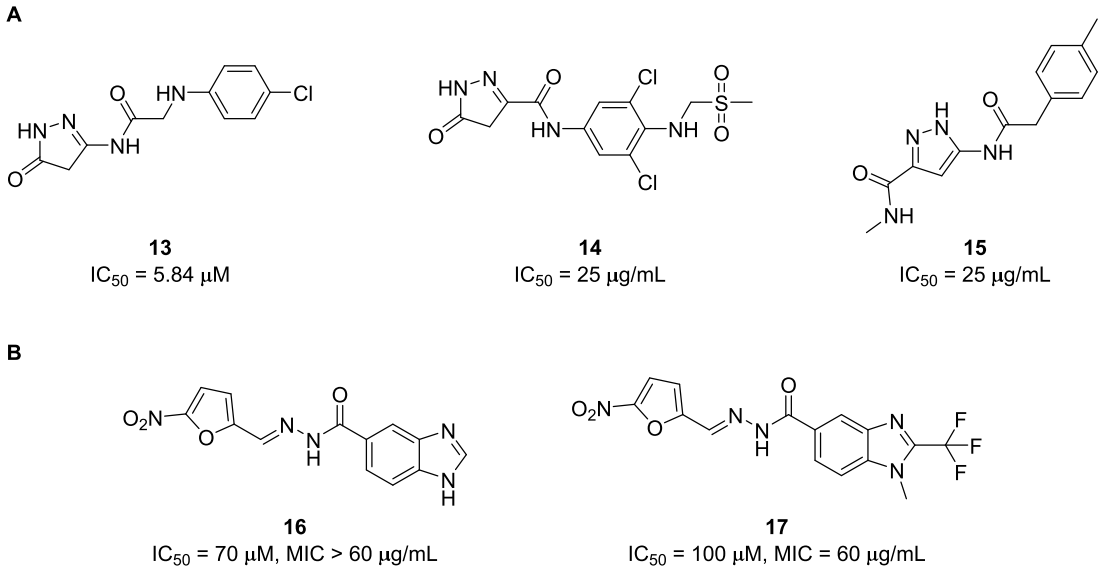


Figura 19. (A) Inhibidores de XQ-*Mt* baseados en pirazolonas. **(B)** Inhibidores de XQ-*Sa*.

1.4.4 Inhibidores de XQ baseados no substrato natural

Tendo en conta os grandes movementos que se producen nos dominios LID e SB do enzima durante o proceso de catálise e rexeneración enzimática, no noso grupo de investigación deseñáronse inhibidores baseados no substrato natural capaces de fixar unha conformación inactiva do enzima. Esta conformación pode

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ser aberta, evitándose a aproximación dos substratos e por tanto a catálise, ou pechada, o que evitaría a recuperación da conformación activa inicial do enzima.

A fin de lograr estabilizar unha configuración aberta e inactiva do enzima sintetizáronse unha serie de análogos substituídos na posición C5 con diversas cadeas bencílicas. Ditos grupos irían dirixidos a establecer interaccións cos residuos lipofílicos conservados das hélices α do dominio SB, principalmente Phe48, Phe56, Ile36 e Val44 en XQ-*Hp*, e Phe49, Phe57, Ile37 e Ile45 en XQ-*Mt,* que conforman un bolsillo apolar. Todos os compostos desenvoltos mostraron ser mais potentes fronte a *H. pylori* que fronte a *M. tuberculosis*, destacando os compostos **18**, **19** e **21** (Figura 20). Estes compostos mostraron valores de k_i iguais a 0.46, 0.56 e 0.3 μM respectivamente fronte ao enzima XQ-*Hp*, sendo este último o inhibidor competitivo reversible mais potente publicado ata a fecha. Ademais, a proforma de **19**, o éster etílico **20**, mostrou ser o derivado mais eficaz fronte a *H. pylori* con unha MIC de 4 μg/mL.[86]

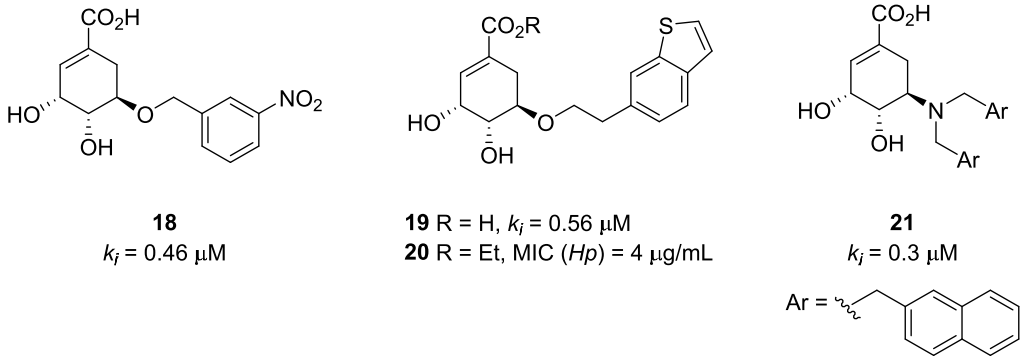


Figura 20. Inhibidores de XQ-*Hp* baseados no substrato natural que estabilizan unha conformación aberta e inactiva do enzima.

Por outra banda, e tendo en conta a conformación de alta enerxía que o substrato natural adopta no centro activo, sintetizáronse os análogos bicíclicos **22** e **23** (Figura 21A). Estes compostos presentan unha ponte éter entre as posicións C3 e C5 que foi deseñada para fixar a conformación diaxial requirida. Ambos compostos demostraron ser inhibidores competitivos reversibles do enzima XQ-*Mt* con valores de k_i iguais a 46 e 62 μM respectivamente, ambos inferiores á constante de Michaelis do enzima (k_m = 544 μM). A resolución cristalográfica do

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

composto **23** xunto co enzima XQ-*Mt* e ADP (PDB: 4BQS, 2.15 Å), mostrou que este ocupa o mesmo lugar e presenta interaccións polares similares ao substrato natural (Figura 21B). Ademais a estrutura demostrou que dito composto reducía a flexibilidade do LID e o SB, establecendo unha conformación pechada do centro activo e evitando a recuperación da conformación inicial do enzima. O dominio LID mantense pechado sobre o centro activo do enzima debido ás favorables interaccións apolares que se establecen entre a ponte de carbonos e a cadea carbonada da arxinina esencial e outros residuos de aminoácido.[80]

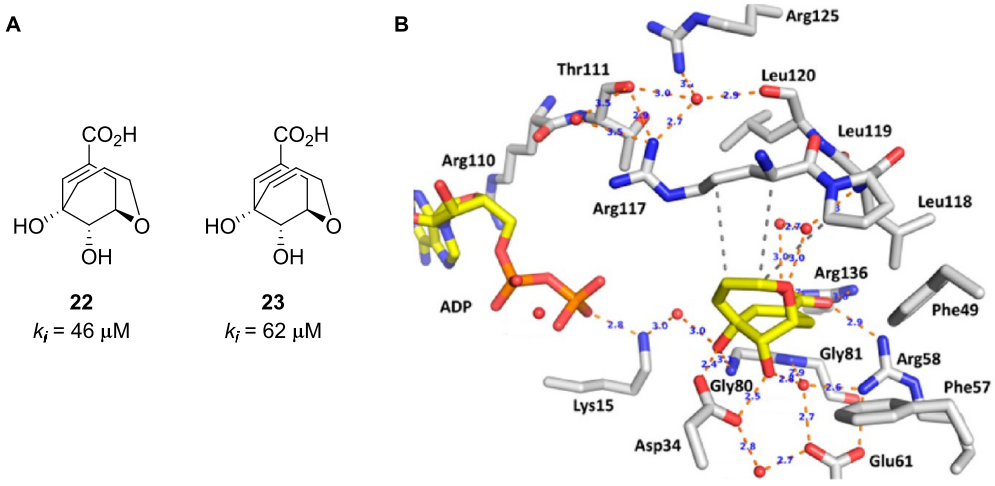


Figura 21. (A) Inhibidores bicíclicos de XQ-*Mt* baseados no substrato natural que estabilizan unha conformación pechada e inactiva do enzima. **(B)** Complexo XQ-*Mt*/ADP/**23** (PDB: 4BQS, 2.15 Å). Están etiquetados e representadas as cadeas laterais dos residuos relevantes. As interaccións polares márcanse mediante liñas punteadas laranxas, as interaccións lipofílicas márcanse mediante liñas punteadas grises. Adaptada con permiso desde Blanco, B.; Prado, V.; Lence, E.; Otero, J. M.; Garcia-Doval, C.; Van Raaij, M. J.; Llamas-Saiz, A. L.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12366–12376. Copyright ©2013 American Chemical Society.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Obxectivos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Esta tese de doutoramento ten dous obxectivos:

Obxectivo 1: Por un lado preténdese optimizar unha ruta sintética que permita obter satisfactoriamente carbapenems cromoxénico para a detección específica de carbapenemasas en novas probas de diagnóstico clínico. Para este fin explorarase a síntese de unha serie de compostos derivados do imipenem, modificados na posición C3 con sondas cromoxénicas dinitroaromáticas unidas a través de diversos espazadores. Tras seren hidrolizados polas carbapenemasas estes compostos producirían unha resposta visible, cambio de cor, ao estenderse a súa cadea de conxugación, ou ben ao liberarse a sonda cromoxénica no caso dos compostos tipo éter. Tamén se pretende a síntese das cefalosporinas **24**, que se empregarían xunto á Nitrocefina como compostos de control nos ensaios cos enzimas illados.

Obxectivo 2: Por outra banda preténdese desenvolver antibióticos que inhiban o enzima xiquimato quinasa (XQ), esencial en varias bacterias patóxenas perigosas e resistentes. Explorarase a ruta sintética mais axeitada que permita obter satisfactoriamente os análogos de conformación restrinxida do ácido xiquímico, **25** e **26**, nos cales se inverte a disposición do substituínte en C5 a fin de lograr unha maior interacción cos residuos do dominio SB do enzima.

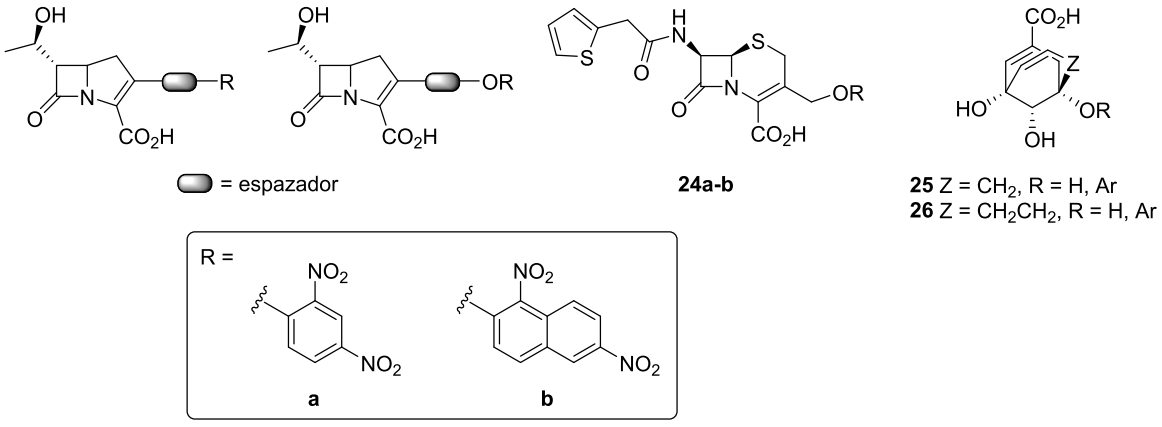


Figura 22.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Resultados e Discusión

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1 Probas cromoxénicas/fluoroxénicas para a detección de β-lactamasas: antecedentes

Os esforzos por lograr compostos cromoxénicos, ou fluoroxénicos, máis asumibles economicamente que a Nitrocefina, pero sobre todo máis sensibles e específicos para a gran diversidade de β-lactamasas existentes, deron lugar ao desenvolvemento de gran número de estes compostos. Nas últimas dúas décadas reportáronse algúns como o Chromacef, o CLS405 ou os compostos UW-57, UW-58 e UW-154 (Figura 23).

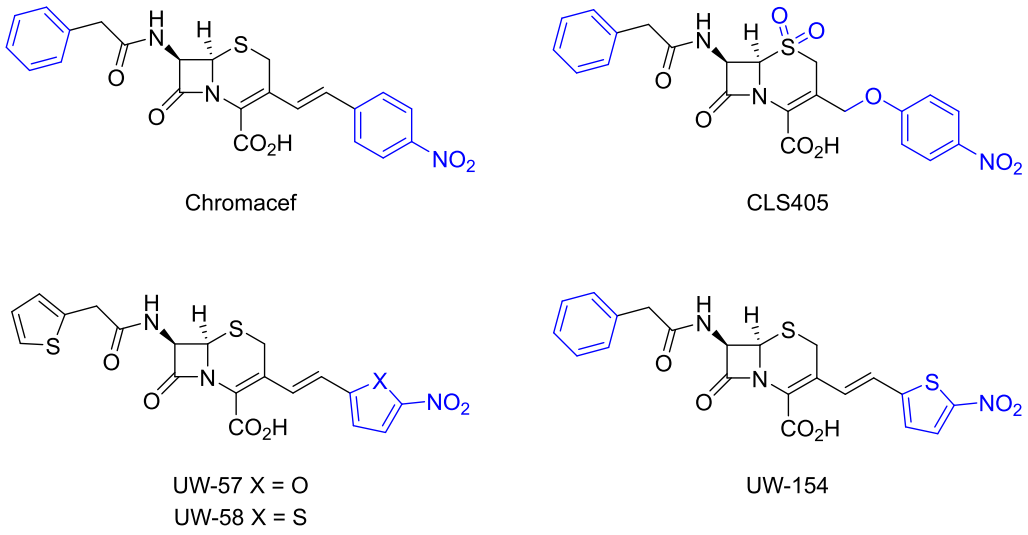


Figura 23. Cefalosporinas cromoxénicas análogas á Nitrocefina. Resáltanse en azul as diferencias estruturais con respecto á Nitrocefina.

O Chromacef, reportado recentemente por Yu e colaboradores,[87] pretende ser unha alternativa máis económica de producir que a Nitrocefina, para seren empregada en ensaios de *high-troughput screening* (HTS) de inhibidores de β-lactamasas. Así como o CLS405, sintetizado por Makena e colaboradores,[88] que se desenvolveu especificamente para detectar metalo-β-lactamasas (MBLs) en ensaios de HTS para inhibidores de estes enzimas. O CLS405 é o primeiro composto cromoxénico tipo sulfona e mostrou ser un substrato mais sensible e eficiente para as MBLs testadas (NDM, VIM-1, VIM-2, IMP-1, SMP-1 e Bc-II) que a Nitrocefina ou o CENTA™.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Os compostos UW-57, UW-58 e UW-154 desenvoltos por Ghavami e colaboradores,[89] son tres análogos da Nitrocefina nos que se substitúe o grupo cromóforo dinitrofenilo por 5-nitrofuran-il ou 5-nitrotiofen-il, ademais no UW-154 tamén se substitúe o 2-tiofenilo por un grupo fenilo, facéndoo sinteticamente mais accesible. Unha vez hidrolizados, estes compostos producen un cambio de cor dende o amarelo a púrpura, mostrando amplos cambios na lonxitude de onda medidas en espectro UV-Vis dende 426, 437 e 434 nm a 498, 529 e 520 nm respectivamente. Estes compostos presentan un elevado coeficiente de extinción molar polo que presentan unha excelente relación sinal-ruído para a detección de β-lactamasas. Estes compostos foron ensaiados fronte enzimas da clase A (KPC-2), clase B (VIM-2, LMP-1, NDM-1, SPM-1, L1), clase C (GC-1) e clase D (OXA-10), e en xeral a súa eficiencia catalítica (k_{cat}/k_m) é comparable coa da Nitrocefina.

3.1.1 Reactivos fluoroxénicos

Nos últimos 20 anos describíronse tamén múltiples substratos fluoroxénicos baseados en cefalosporinas para a detección da actividade de β-lactamasas, nestes casos, tras a hidrólise, prodúcese un composto fluorescente ou liberase unha sonda fluorescente ao medio (Figura 24).

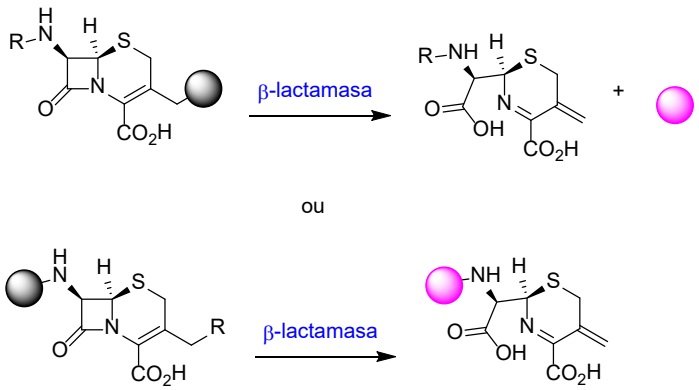
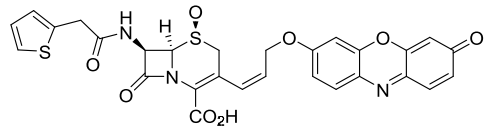
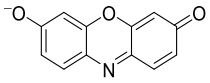
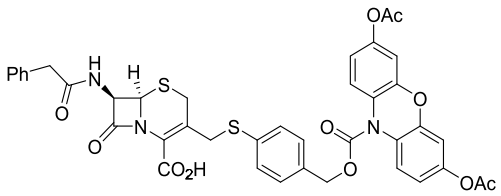
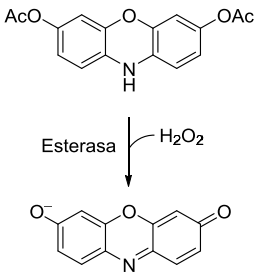
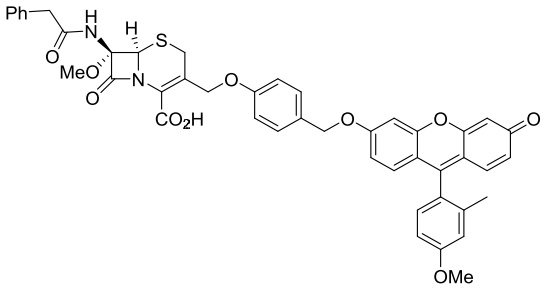
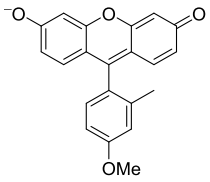
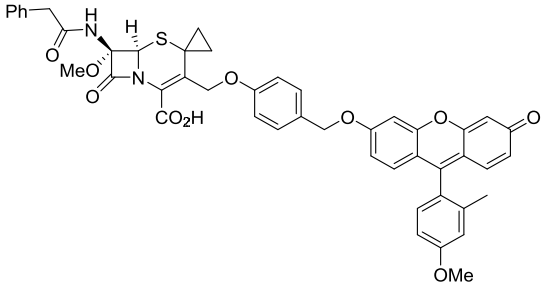
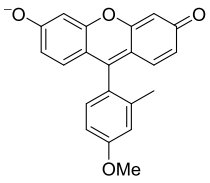


Figura 24. Representación esquemática do proceso de hidrólise e produción da fluorescencia. Representase con unha esfera gris a sonda "apagada" e con unha esfera fucsia a sonda emitindo fluorescencia.

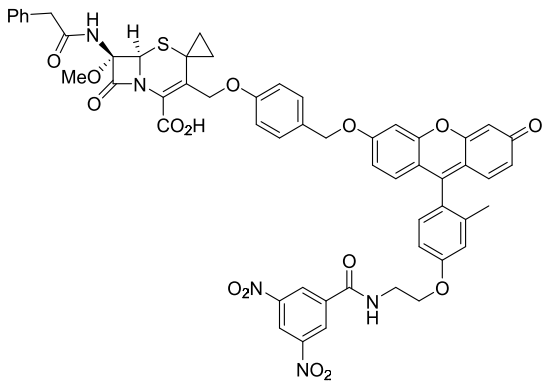
Na maioría dos casos, a sonda fluorescente está unida covalentemente á cadea lateral na posición C3 da cefalosporina. Os exemplos mais relevantes resúmense na táboa 3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

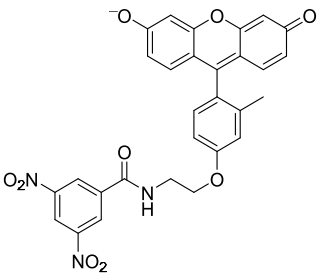
Táboa 3. Exemplos de reactivos fluoroxénicos a base de cefalosporinas nos que se detecta a sonda liberada.

Reactivo Cefalosporina	Especies ou procesos detectados / β-lacta-masas detectadas
 **27**	
	TEM-1
 **28**	
	TEM-1, KPC-3, IMP-1
 **29**	
	TEM-1, BlaC
 **30**	
	TEM-1, BlaC

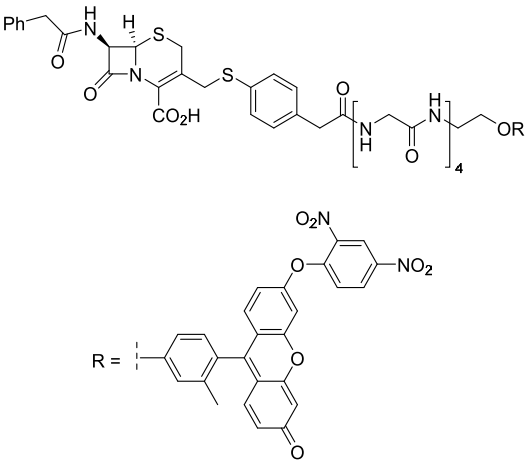
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



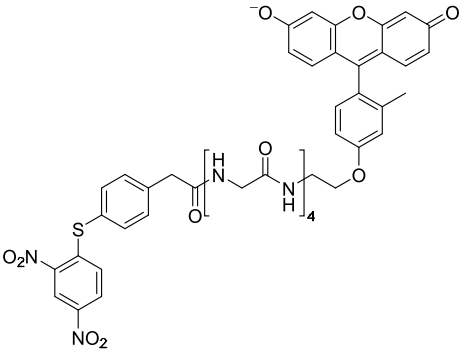
31



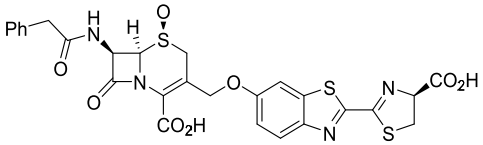
TEM-1, BlaC



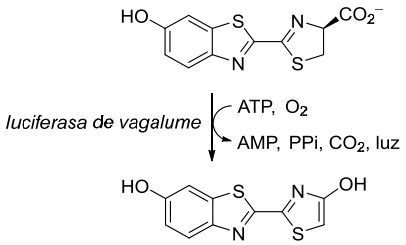
32



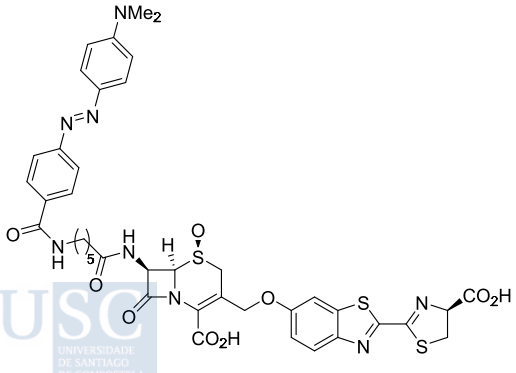
VIM-27, IMP-1, NDM-1



33

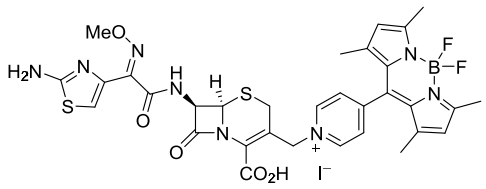
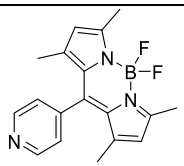
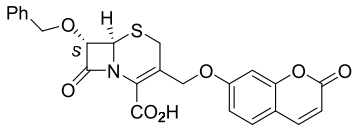
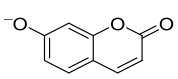
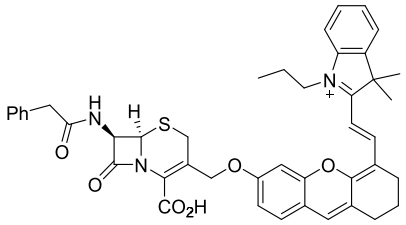
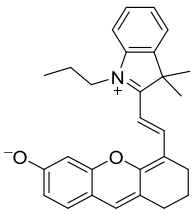
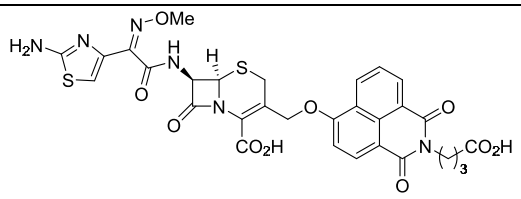
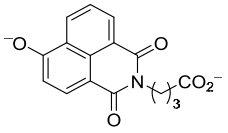
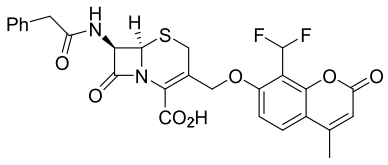
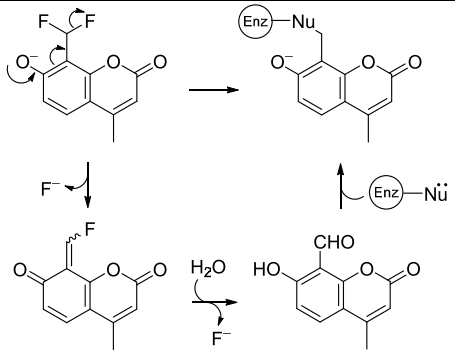


Bioluminiscencia; TEM-1



34

Bioluminiscencia; KPC-3, TEM-1, BlaC, IMP-1

 **35**	 TEM-1, SHV-12, CTX-M-14, SHV-28
 **36**	 IMP-1, VIM-21, NDM-1, KPC-3
 **37**	
 **38**	 CTX-M-9, TEM-3, VIM-1, NDM-1
 **39**	 TEM-1, VIM-1, NDM-1

O composto **27**, descrito por Gao e colaboradores[90] é un biosensor fluoroxénico que libera resorufina, un colorante fenólico que emite fluorescencia a 585 nm cando é excitado a 550 nm. Tras a hidrólise, a intensidade da fluorescencia aumente unhas 153 veces, resultando nun proceso moi sensible que permite a detección da produción de β-lactamasas a concentracións inferiores a 500 fM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

O sulfóxido confírelle ao composto unha maior estabilidade en medios de cultivo e en tecidos vivos. Os autores demostraron a utilidade deste composto para obter imaxes da expresión xénica de β-lactamasas TEM-1 (clase A).

Recentemente, Xie e colaboradores describiron o composto **28**,[91] unha variante do composto de Gao, no cal a resorufina se atopa na súa forma precursora 3,7-diesterfenoxazina. O proceso require de unha secuencia de reaccións para poder detectar a fluorescencia: (i) hidrólise e liberación da 3,7-diesterfenoxazina; (ii) desacetilación mediada enzimas esterasa; (iii) oxidación da resorufina con H_2O_2 (1 mM). Este ensaio resulta útil para detectar cepas bacterianas produtoras de enzimas como TEM-1 (clase A), KPC-3 (clase A) e IMP-1 (clase B) en mostras de ouriños de pacientes en un tempo aproximado de 2 horas.

O composto fluoroxénico **29** incorpora a sonda fluorescente TokyoGreen, a cal emite a 535 nm cando é excitada a 490 nm. Este composto foi especificamente deseñado para detectar *in vitro* e en ratos vivos a presenza de *Mycobacterium tuberculosis* e o bacilo Calmette-Guérin (BCG),[92] forma atenuada de *Mycobacterium bovis* que se emprega como vacina fronte á tuberculose. Este ensaio basease na detección específica do enzima cromosómico BlaC (serina-β-lactamasa de clase A),codificado polo xene *blaC*, que lle confire a estas bacterias unha resistencia intrínseca ás cefalosporinas e constitúe un excelente biomarcador para o diagnóstico da tuberculose (TB). A introdución de un grupo metoxi con configuración *S* na posición C7 da cefalosporina resultou ser clave para lograr unha selectividade 8.900 veces maior para BlaC respecto a TEM-1. A posterior optimización de **29**, mediante a introdución dun grupo ciclopropilo na posición C4 do núcleo cefem, conduciu ao composto **30**, que presenta aínda maior selectividade para o enzima BlaC (120.000 veces maior que para TEM-1).[93] A especificidade deste composto por bacterias que expresan BlaC é excelente, xa que non se observa sinal fluorescente en ensaios de incubación con outras bacterias que expresan β-lactamasas de outro tipo como KPC, AmpC e SHV-18 (10^6 CFU mL^{-1}). Este composto permite a detección de mostras positivas para TB con unha

sensibilidade do 90% e de mostras negativas para TB con unha especificidade do 73%. A posterior optimización do composto **30** deu lugar á cefalosporina **31**, que mostrou un bo perfil de diagnóstico, xa que: (i) discrimina eficazmente o BCG vivo do morto; (ii) mostra unha alta especificidade para *M. tuberculosis* fronte a outras especies bacterianas, incluídas 43 micobacterias non tuberculosas; e (iii) é capaz de obter imaxes de *M. tuberculosis* no esputo dos pacientes e da fagocitose do BCG en tempo real.[94]

A cefalosporina **32** contén un fluoróforo TokyoGreen en unha forma inactiva (non fluorescente) ao estar ligado a un dinitrofenilo.[95] A activación da fluorescencia ten lugar tras a hidrólise debido a que o grupo tiofenilo liberado experimenta unha reacción de substitución nucleófila intramolecular co grupo dinitrofenilo,[96] liberando así a capacidade fluorescente do TokyoGreen. Este composto mostrou unha boa selectividade para as metalo-β-lactamasas VIM-27, IMP-1 e NDM-1, fronte a outras carbapenemasas como KPC-3 (clase A) e OXA-48 (clase D) e fronte a ESBLs como TEM-1 e BlaC (clase A). Este composto demostrou utilidade para detectar metalocarbapenemasas en illados clínicos de patóxenos Enterobacteriaceae resistentes a carbapenems (10^5 CFU mL^{-1}).

Yao e colaboradores notificaron a síntese do primeiro substrato bioluminoxénico deseñado para a detección *in vivo* de β-lactamasas, o composto **33**.[97] A base deste ensaio consiste no emprego do enzima luciferasa de vagalume, que cataliza a oxidación de D-luciferina a oxiluciferina, emitindo luz no proceso. A D-luciferina atópase unida a través dun enlace éter que se rompe ao producirse a hidrólise, liberándose así o substrato ao medio, que posteriormente reacciona co enzima luciferasa dando lugar ao sinal luminiscente. Este composto ensaiouse para visualizar a actividade de TEM-1 en ratos vivos, sen embargo presenta un inconveniente, a elevada emisión de fondo inicial que se dá pola oxidación da pro-lucifereina aínda unida á cefalosporina, o que reduce a súa sensibilidade. Recentemente publicouse un estudo no que os autores incluíron un grupo atenuador DABCYL na posición C7 do núcleo de cefalosporina, que reduce esta emisión

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de fondo inicial por efecto BRET (Transferencia de enerxía de resonancia de bioluminiscencia), o que mellora a relación sinal/fondo inicial en mais de 1.200 veces. O composto **34** presenta unha elevadísima sensibilidade en comparación co composto**33**, podendo identificar a produción de β-lactamasas a nivel femtomolar, detectando de 10^2 a 10^3 CFU mL^{-1}de Enterobacteriaceaes produtoras de β-lactamasas en mostras de ouriños en tan só 30 min.[98] A avaliación da eficacia catalítica de varias β-lactamasas de relevancia clínica fronte a este composto, revelou que **34** é un bo substrato para os enzimas ensaiados KPC-3, TEM-1, BlaC (clase A) e IMP (clase B), pero menos eficaz para AmpC (clase C) e OXA-48 (clase D).

Inspirándose na estrutura química do antibiótico ceftazidima (cefalosporina de 3ª xeración), Thai e colaboradores, desenvolveron o derivado **35** que contén un grupo piridil-BODIPY como fluoróforo. Este composto pode empregarse para detectar cepas bacterianas resistentes a cefotaxima e ceftazidima, mediante a produción de ESBLs. Durante os ensaios obtiveron un aumento de 2.5 veces a intensidade de fluorescencia intrínseca de **35**, cuantificada a 512 nm, ao reaccionar con enzimas como CTX-M-14, CTX-M-15, SHV-28, TEM-1 e CTX-M-9.[99]

Tendo en conta que os carbapenems presentan unha configuración *S* no substituínte do anel β-lactámico, fronte á configuración *R* en cefalosporinas e penicilinas, e que é esta diferenza estrutural a que lle confire aos carbapenems unha maior resistencia á hidrólise fronte á maioría das β-lactamasas (excepto as carbapenemasas), Shi e colaboradores deseñaron a cefalosporina fluoroxénica **36**. Este composto, que contén unha 7-hidroxicumarina como sonda fluorescente e un grupo éter con configuración *S* en C7, mostrou unha boa especificidade e sensibilidade para a detección de cepas de Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemasas, concretamente IMP-1, VIM-27, NDM-1 (clase B) e KPC-3 (clase A), con un límite de detección (LOD) menor a 5 fmol.[100]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

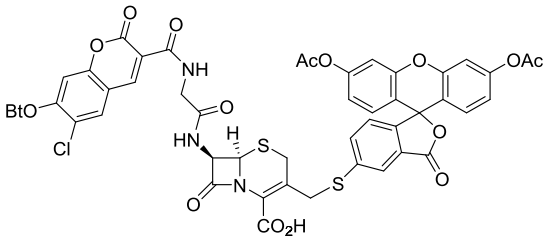
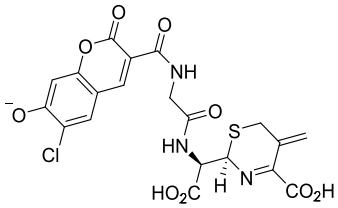
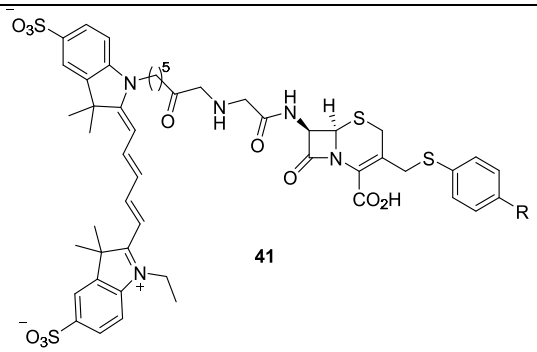
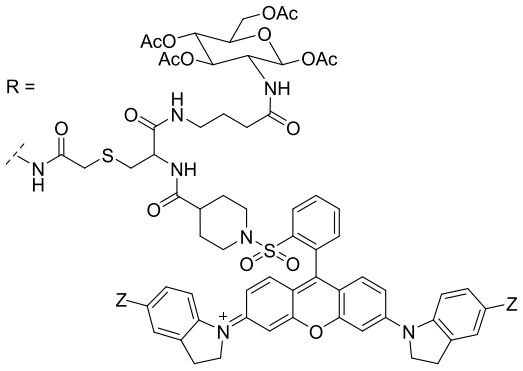
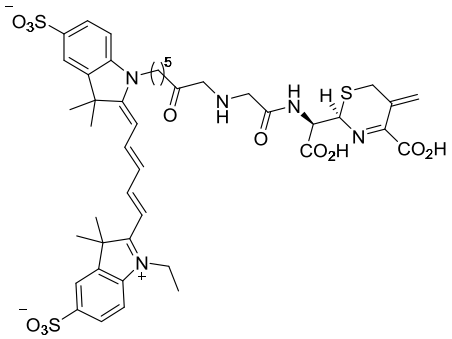
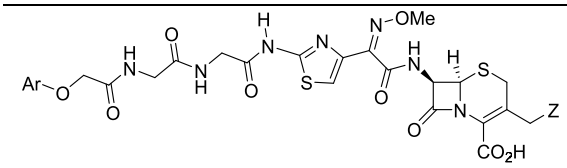
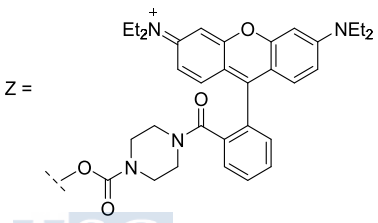
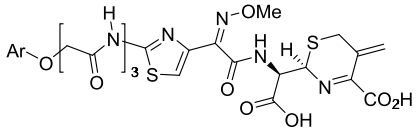
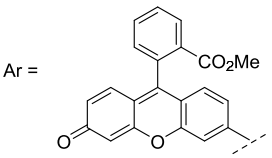
O composto **37**, contén unha sonda fluorescente altamente sensible que emite preto do infravermello, a 707 nm cando se excita a 680 nm. Este composto utilizouse para detectar e cuantificar diferentes niveis de expresión de produción de β-lactamasas en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes á meticilina e á penicilina, con un LOD de 0.02 nM.[101] Mao e colaboradores describiron o composto **38**, un derivado de cefotaxima que contén unha sonda fluorescente ratiométrica, a cal presenta un cambio na proporción de fluorescencia de mais de 2.500 veces tras a hidrólise. Este composto probouse para a detección selectiva de cepas bacterianas produtoras de ESBL, como *Enterobacter cloacae* que expresa CTX-M-9, *E. coli* que expresa TEM-3, *A. baumanni* multirresistente, *Klebsiella pneumoniae* que expresa VIM-1 e *K. pneumoniae* que expresa NDM-1.[102]

O substrato fluoroxénico **39** contén unha sonda autoinmovilizante, a cal se desenvolveu para detectar e etiquetar cepas bacterianas produtoras de ezimas β-lactamasas.[103] A hidrólise inicial desencadea a liberación de un precursor fluorescente de metil-quinona que é hidrolizado a aldehido, e finalmente sufre o ataque nucleófilo de un residuo do enzima diana. Os autores validaron a súa proposta en ensaios con cepas multirresistentes de *A. baumanni e K. pneumoniae* produtoras dos enzimas VIM-1 e NDM-1. Non se revelaron detalles dos lugares do enzima que experimentaban as modificacións covalentes, nin o tipo de residuos implicados.

Tamén se describiron algúns compostos nos que a sonda fluoroxénica se atopa unida pola posición C7 e nos que a especie detectada é a cefalosporina hidrolizada (Táboa 4).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Táboa 4. Exemplos de reactivos fluoroxénicos a base de cefalosporinas nos que se detecta a cefalosporina hidrolizada.

Reactivo Cefalosporina	Especies ou procesos detectados / β-lactamasas detectadas
 **40**	 TEM-1
 **41**  Z = H, SO_3^-	 BlaC
 **42**  Z =	  Ar = TEM-1, NDM-1, AmpC, ESBL

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Zlokarnik e colaboradores desenvolveron o composto **40**, que permite visualizar a expresión xénica en células de mamíferos vivas empregando a β-lactamasa TEM-1 como informante.[104] O ensaio basease no feito de que a β-lactamasa TEM-1 se secreta normalmente no espazo periplásmico, pero acumulase no citoplasma bacteriano cando se suprime xenéticamente a súa secuencia de sinalización.[105] O composto **40** é unha proforma éster que se activa por hidrólise da esterasa no citosol e que presenta dous fluoróforos, un donante (derivado da 7-hidroxicumarina) e un aceptor (fluoresceína), que se solapan producindo un efecto FRET (transferencia de enerxía por resonancia de fluorescencia). Tras a hidrólise do anel β-lactámico por parte do enzima TEM-1 prodúcese a liberación ao medio da fluoresceína, cancelandose así o efecto FRET e dando como resultado a cefalosporina hidrolizada, que se detecta pola súa forte sinal de fluorescencia a 447 nm cando se excita a 409 nm. Shao e colaboradores[106] aplicaron esta mesma estratexia FRET para desenvolver reactivos fluoroxénicos baseados en cefalosporinas mediante a incorporación do fluoróforo (fluoresceína, Cy3 soluble en auga ou Cy5.5 de infravermello cercano) e un quencher [DABCYL ác. (4-([4-(dimetilamino)fenil]azo)benzoico, BHQ2 (black hole quencher-2) e BHQ3 (black hole quencher-3)] na posición C3 do núcleo cefem. Estes reactivos son compoñentes esenciais para os ensaios con tecnoloxía GeneBLAzer™ para a detección da expresión xénica en células vivas de mamíferos mediante microscopía de fluorescencia.

A cefalosporina **41** foi creada por Xing e colaboradores para seguir a expresión de β-lactamasas en células vivas de mamíferos[107] concretamente mediante a detección do enzima cromosómico BlaC. Este composto presenta unha sonda fluoroxénica na posición C7 que emite preto do infravermello, a 670 nm cando se excita a 650 nm, e un grupo atenuador (QSY21) unido a través de un tiol, na posición C3 do núcleo cefem. Este último grupo está funcionalizado con unha D-glucosamina peracetilada que facilita a internalización celular. É importante destacar que se empregou a forma sulfóxida da cefalosporina para mellorar a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estabilidade do composto, que tamén demostrou ser útil para o seguimento en tempo real de infeccións pulmonares causadas por *M. tuberculosis* e BCG, así como para a cuantificación rápida en ratos vivos sen necesidade de sacrificalos.[108]

Empregando este mesmo enfoque de aproveitar o efecto FRET, Zhang e colaboradores desenvolveron a cefalosporina fluorescente **42**, que presenta un único pico de emisión a 590 nm cando se excita a 440 nm.[109] En presenza de β-lactamasas de espectro extendido (ESBL), a sonda situada na posición C7 liberase ao medio, terminándose así o efecto FRET e permitindo cuantificar a actividade enzimática mediante a relación de intensidade da fluorescencia a dúas lonxitudes de onda. Este enfoque ratiométrico proporciona unha detección máis precisa e fiable en comparación co análise da intensidade absoluta de fluorescencia. O composto **42** demostrou ser útil para detectar selectivamente dúas β-lactamasas de importancia clínica, a NDM-1 (metalo-β-lactamasa, clase B), e a AmpC (β-lactamasa cromosómica codificada polo xene *ampC*, clase C), que pode ser inducida na maioría dos illados clínicos por algúns dos propios antibióticos β-lactámicos.

3.1.2 Reactivos baseados en carbapenems

Unha análise comparativa da xeometría global dos carbapenems e as cefalosporinas mostra importantes diferencias entre ambos substratos. A superposición das conformacións de mínima enerxía dos núcleos de cefalosporina (^{1}R = Me, ^{2}R =H) e de carbapenem (R = Me), obtidos mediante cálculos de modelado molecular usando o método AM1 no programa Gaussian 09W, revelou unha configuración pregada máis pronunciada nos carbapenems, con un ángulo entre os aneis de uns 109º en comparación cos 128º das cefalosporinas (Figura 25A), e como consecuencia, a posición do grupo carboxilato, clave nos procesos de recoñecemento e unión aos enzimas, está desprazada. Ambas características, xunto coa estequiometría oposta do substituínte do anel β-lactámico, inducirían diferencias no patrón de recoñecemento (principalmente grupos carboxilato e

carbonilo) e na súa reactividade fronte a nucleófilos [residuos de serina (serina-β-lactamasas) ou anión hidróxido (metalo-β-lactamasas)] en reaccións de adición-eliminación que conducen á hidrólise (Figura 25B e 25C).

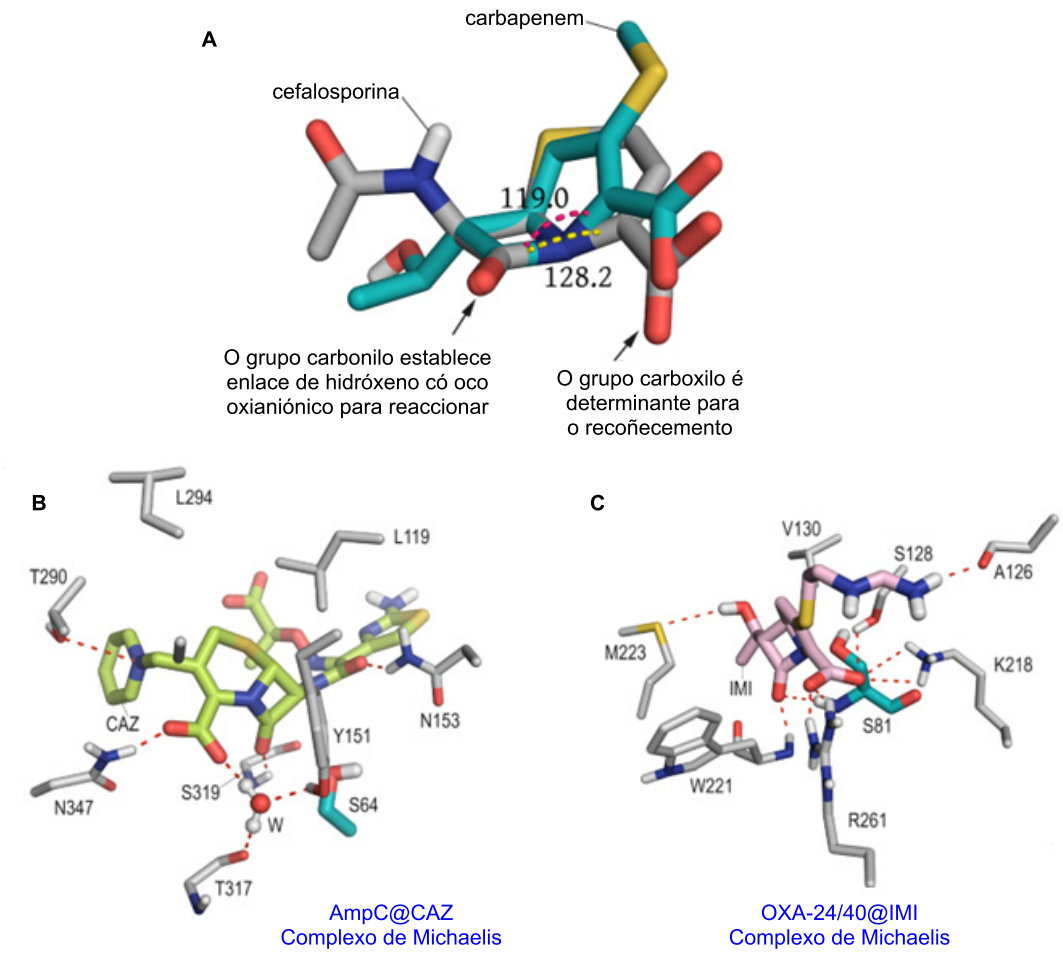


Figura 25. **(A)** superposición das conformacións de mínima enerxía dos núcleos de cefalosporina e de carbapenem. **(B)** Modo de unión do ceftazidima (CAZ, cefalosporina de 3ª xeración) no centro activo de AmpC para a reacción de acilación (complexo de Michaelis) obtido por estudios computacionais de dinámica molecular.[110] **(C)** Modo de unión de Imipenem (IMI) no centro activo da OXA-24/40 para a reacción de acilación (complexo de Michaelis) obtido por *docking* molecular.[111] Móstranse e etiquétanse as posicións das serinas catalíticas (celeste) e os residuos relevantes. Os enlaces de hidróxeno relevantes márcanse mediante liñas punteadas vermellas.

É por isto que, para a detección e cuantificación específicas da actividade de carbapenemasas, as sondas cromoxénicas/fluoroxénicas baseadas en carbapenems parecen ser mellor opción. A continuación analízanse os recente esforzos de investigación para desenvolver dispositivos para a detección especifica de carbapenemasas, baseados en carbapenems.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Mao e colaboradores describiron o composto **43**, un derivado de carbapenem modificado con un BODIPY, cuxo espectro UV-Vis mostra unha banda de absorción ancha centrada a 544 nm en disolución con tampón de fosfato sódico (pH 7.4) e é principalmente non fluorescente (Figura 26).[112] En presenza da metalocarbapenemasa IMP-1, o intermedio I detectase inicialmente por espectroscopía UV-Vis pero rapidamente se degrada para dar o derivado de BODIPY **44** (estrutura detallada non divulgada). Tras a incubación durante uns 40 min, a cor da solución cambia de púrpura a rosa, e ademais prodúcese un incremento de 200 veces no sinal de fluorescencia verde a 512 nm ($\lambda_{exc.}$ =365 nm), correspondente a **44**. O carbapenem **43** tamén demostrou ser específico para outras carbapenemasas como VIM-27 (clase B), NDM-1 (clase B), KPC-3 (clase A) e OXA-48 (clase D), con unha selectividade relativa entre elas: IMP-1, NDM-1 >> VIM-27, KPC-3>> OXA-48. Só se detectou unha fluorescencia insignificante tras a incubación con ESBLs, como TEM-1, TEM-3 e CTX-M-9, que son enzimas que confiren resistencia a penicilinas, cefalosporinas e á monobactama aztreonam.

Recentemente, no ano 2023, Li e colaboradores publicaron a síntese do composto **45** que presenta un fenilo *para* substituído con un grupo captador de electróns (-NMe_3^+; Figura 26).[113] Este composto presenta un cambio de cor (amarelo pálido a vermello) similar ao da Nitrocefina, cando é hidrolizado por carbapenemasas. Este composto foi posto a proba fronte a diversas β-lactamasas, mostrando unha alta sensibilidade e selectividade fronte ás metalo-carbapenemasas NDM-1, IMP-4 e VIM-27, e fronte ás serina-carbapenemasas KPC-3 e OXA-48. Ademais, os autores probaron a eficacia deste composto en mostras clínicas de esputo de pacientes que presentaban sepse e/ou infeccións pulmonares, e compararon os resultados con outra probas establecida para este fin, como é o test Carba NP. O composto **45** mostrou ter unha sensibilidade e especificidade do 100 %, tras a confirmación dos resultados mediante outras técnicas como PCR e cultivos bacterianos. A introdución de este reactivo cromoxénico en discos de papel, xunto co análise dos resultados empregando un software de recoñecemento de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cor instalado en un smartphone, prometen ser unha alternativa rápida, barata e fiable para a detección de carbapenemasas nos centros de atención primaria.

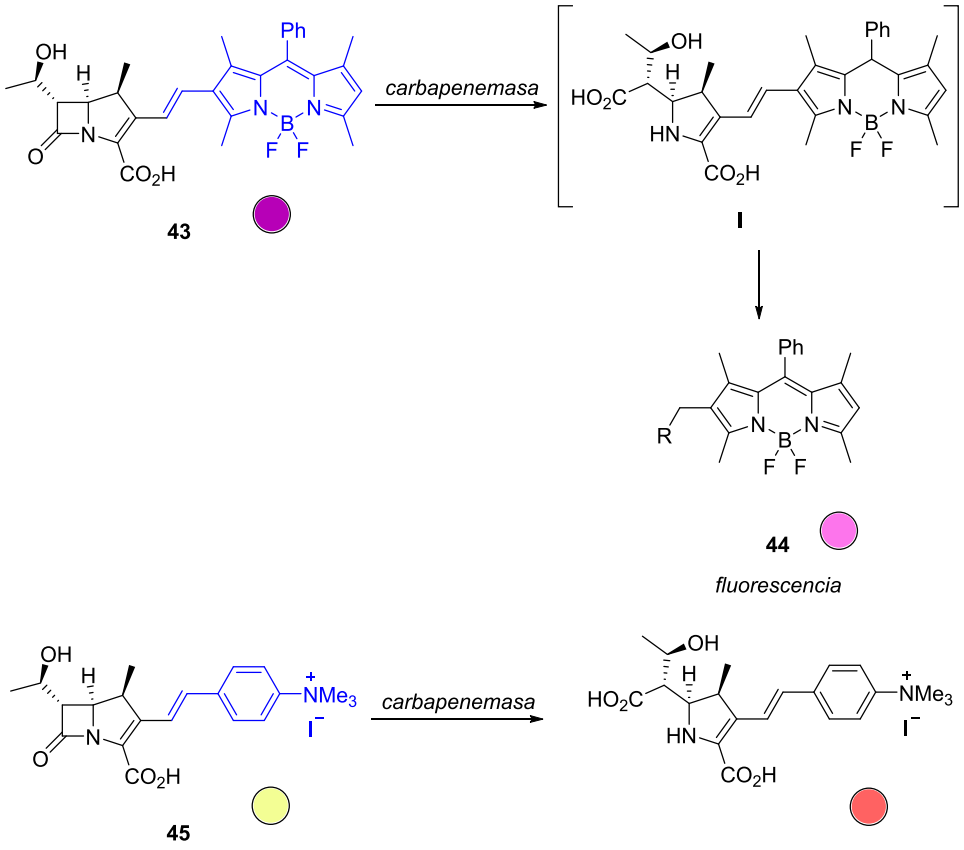


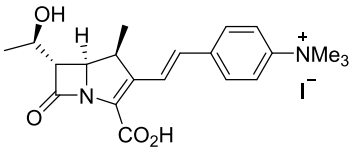
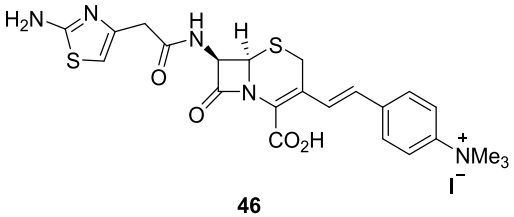
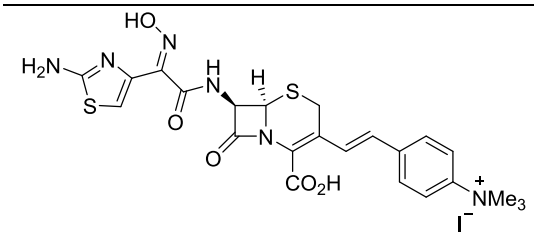
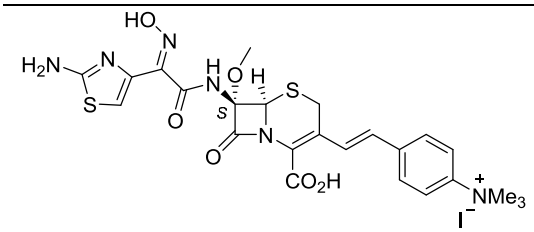
Figura 26. Reactivos baseados en carbapenems para a detección de carbapenemasas, nos que a sinal se detecta tras a hidrólise do núcleo do carbapenem, xa sexa por fluorescencia ou cambio de cor. Resáltanse en azul as sondas químicas.

Inspirados pola alta sensibilidade e especificidade do composto **45** para a detección de carbapenemasas, e nos estudos antes comentados con cefalosporinas para detectar outros tipos de β-lactamasas, os autores decidiron incorporar o mesmo grupo cormoxénico 4-(NMe_3^+)fenilo na posición C3 da cefalosporina co fin de explorar a especificidade de estes compostos, **46–48**, e a súa utilidade na detección de outros tipos de β-lactamasa en mostras clínicas, incluíndo β-lactamasa de amplio espectro (BSBL), β-lactamasa de espectro extendido (ESBL) e AmpC (Táboa 5). As pequenas modificacións realizadas na cadea da posición C7 resultaron clave para lograr unha maior selectividade de cada composto fronte aos diversos enzimas estudados. Así, o composto **46** mostrou ser capaz de detectar todos os tipos de β-lactamasas exploradas; o composto **48**, que está

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

substituído con un grupo metoxi con configuración *S* en C7, reacciona especificamente con cepas produtoras de AmpC e carbapenemasas; o composto **47** presenta unha reactividade intermedia, sendo substrato de todos os tipos de β-lactamasas ensaiadas salvo as BSBL.[114]

Táboa 5. Axentes cromoxénicos que conteñen o grupo 4-(NMe_3^+)fenilo e a súa capacidade para detectar a produción de diferentes tipos de β-lactamasas en illados clínicos.

Composto	BSBL[a]	ESBL[b]	AmpC	Carbapenemasas
 **45**	×	×	×	√
 **46**	√	√	√	√
 **47**	×	√	√	√
 **48**	×	×	√	√

[a]BSBL = broad-spectrum β-lactamase; [b]ESBL = extended-spectrum β-lactamase

Os autores desenvolveron un dispositivo, con discos de papel impregnados con estes compostos, capaz de detectar bacterias produtoras de β-lactamasa en 100 mostras clínicas de varios fluídos corporais con una precisión do 100% en un tempo de 0.25–3 h, aumentando a precisión do diagnóstico do 48% ao 83%, e aínda máis, do 50,6% ao 97,6% tras eliminar as interferencias fúnxicas.

Este sensor é capaz de detectar multiresistencia aos antibióticos en illados clínicos coa concentración detectable máis baixa a 10^4 CFU mL^{-1}, aproximadamente de 1 a 2 ordes de magnitude inferior aos dispositivos de papel impregnados co reactivo de Nitrocefina.[88]

Alternativamente, describíronse substratos baseados en carbapenems con sondas unidas mediante enlaces éter susceptibles a sufrir unha eliminación conxugada para liberar dita sonda no medio (Figura 27). O composto **49**, que contén 7-hidroxicumarina como sonda fluorescente, mostrou unha boa especificidade para as metalocarbapenemasas, VIM-27, NDM-1 e IMP-1, pero fallou na detección das serina-carbapenemasas KPC-3 (clase A) e OXA-48 (clase D).[103] A introdución de diversos espazadores entre o núcleo de carbapenem e a sonda de cumarina (éteres bencílicos, carbamatos alílicos, éteres alílicos e aminas secundarias) levaron ao descubrimento do composto **50**, que ten un alcohol 4-hidroxibencilico como espazador, o cal resultou ser a mellor opción en termos de estabilidade.[115] Este composto **50** resultou ser un sensor químico con unha boa sinal de fluorescencia, rápida e altamente sensible para o diagnóstico de carbapenemasas, mostrando unha sensibilidade máis de 10 veces superior que o test Carba NP e proporcionando unha sensibilidade do 100% na detección das carbapenemasas KPC-2 e NDM-1. Ao comparar os compostos **49** e **50**, hai que destacar a relevante mellora de sensibilidade de **50** no que respecta á detección de OXA-48 (66,7%, clase D) e KPC-2 (100%, clase A).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

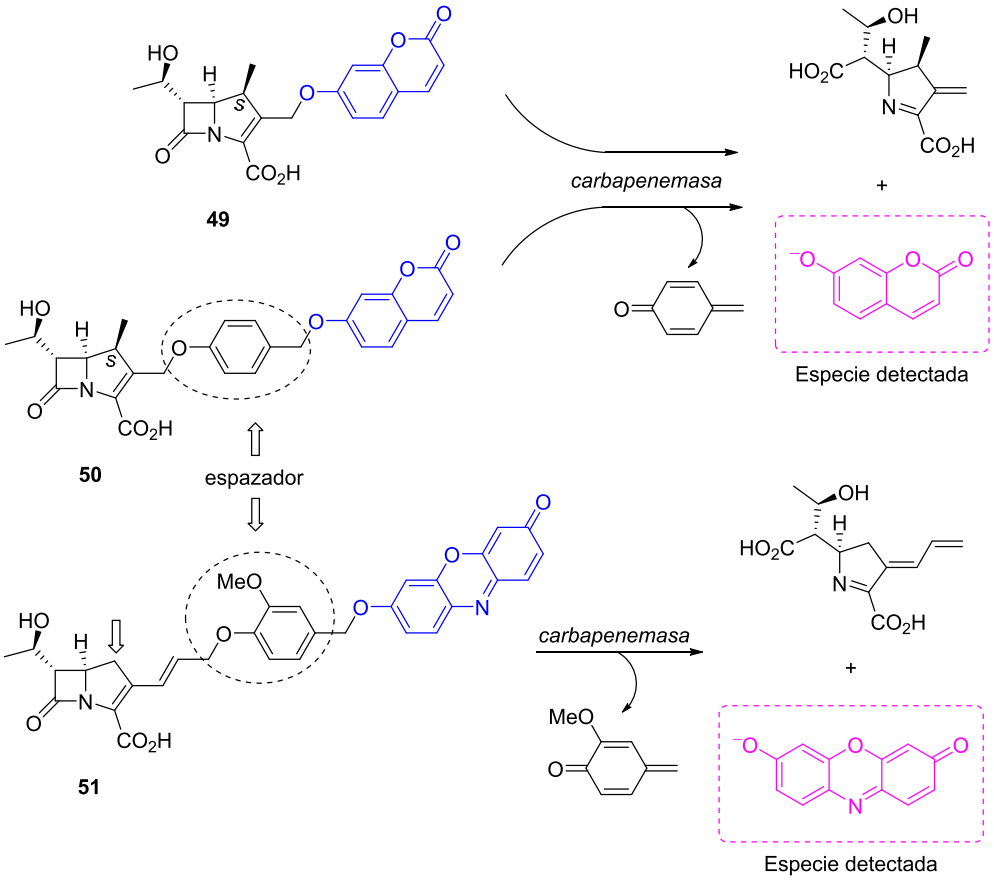


Figura 27. Reactivos baseados en carbapenems para a detección de carbapenemasas, nos cales a especie detectada é liberada no medio. Os fragmentos fluoroxénicos resáltanse en azul/rosa.

O composto **51** foi desenvolto por Ma e colaboradores, co fin de mellorar a sensibilidade deste tipo de sensores químicos fronte ás carbapenemasas de clase D como a OXA-48[116] (Figura 27). A diferencia dos exemplos anteriores, o núcleo de carbapenem do composto **51** carece do grupo *S*-metilo no anel de cinco membros, como no imipenem, o feropenem e panipenem. Considerouse que o impedimento estérico introducido por este metilo era responsable da súa eficacia máis limitada, o que se corrobora pola eficiencia catalítica dúas ordes de magnitude superior da OXA-48 fronte ao imipenem e panipenem en comparación con meropenem, ertapenem ou doripenem, que si levan este grupo *S*-metilo.[117] Unha comparación das estruturas cristalinas dispoñibles para os aductos acil-enzima da OXA-48 inhibida por imipenem (PDB: 6P97, 1.80 Å),[118] faropenem (PDB: 6PSG, 2.13 Å),[119] meropenem (PDB: 6ZRP, 1.74 Å)[120] e ertapenem (PDB: 6ZRJ, 1.94 Å),[121] revela diferentes interaccións con algúns dos residuos clave,

implicados no recoñecemento e a unión, mais concretamente R250 (hélice α10) e T209 (motivo III; K208, T209, G210, Y211), así como diferencias na disposición das cadeas laterais dos carbapenems (Figura 28).[122] A cadea lateral dos carbapenems que carecen do grupo *S*-metilo establece unha ponte salina entre o grupo carboxilato e o grupo guanidinio de R250 (Figura 28A), mentres que nos que si levan o *S*-metilo, o carboxilato únese á parte inferior do centro activo a través dun dos seus átomos de osíxeno (Figura 28B). O composto **51**, que inclúe unha sonda de resorufina unida ao núcleo do carbapenem mediante un espazador máis longo que o dos compostos **49** e **50**, resultou ter unha sensibilidade excelente fronte ás metalocarbapenemasas NDM-1 e IMP-1, unhas 10 veces menor fronte a VIM-2 e KPC-2, e unhas 100 veces menor fronte a OXA-48, pero en todos os casos no intervalo picomolar.

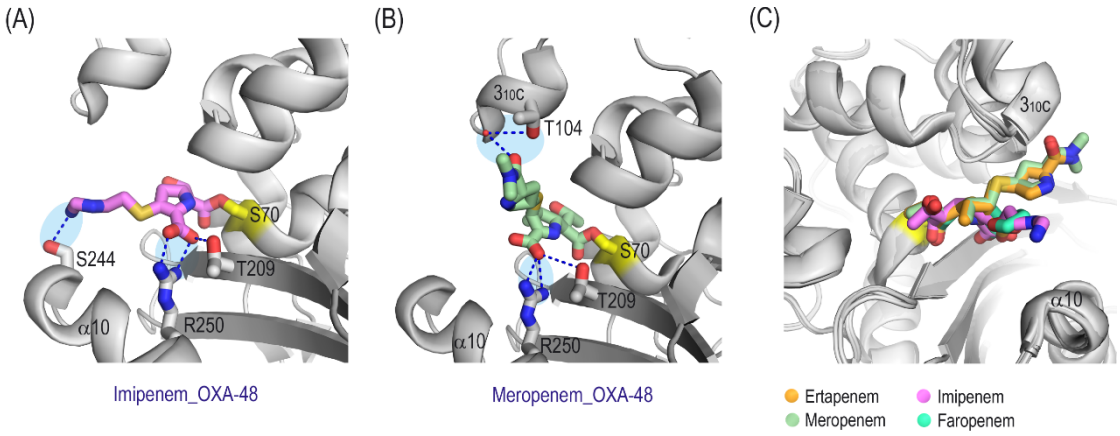


Figura 28. (A,B) Vista detallada do centro activo de OXA-48 (complexo acil-enzima) tras reaccionar con imipenem (PDB: 6P97, 1.80 Å) e meropenem (PDB: 6ZRP, 1.74 Å). Os enlaces de hidróxeno e as interacción electrostáticas relevantes entre ligando e enzima márcanse mediante liñas punteadas azuis. Móstranse e etiquétanse os residuos mais relevantes. **(C)** Superposición das estruturas cristalinas de OXA-48 modificada covalentemente con ertapenem (PDB: 6ZRJ, 1.94 Å), faropenem (PDB: 6PSG, 2.13 Å), imipenem **(A)** e meropenem **(B).** O residuo de serina catalítica S70 móstrase en amarelo.

Por último, Das e colaboradores[123] publicaron a realización de un ensaio quimioluminiscente para a detección da actividade de carbapenemasas baseado no composto **52**, mediante a introdución no carbapenem dun luminóforo de fenoxidioxetano, axeitado para o seu emprego en condicións fisiolóxicas (Figura 29). Este ensaio basease na liberación ao medio do intermedio fenolato-dioxietano **I** tras a hidrólise catalizada por unha carbapenemasa, que se descompón

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

rapidamente para dar lugar ao éster de benzoato excitado II, cuxo deterioro ao seu estado basal libera enerxía en forma de fotón verde que se mide como quimioluminiscencia. Os ensaios realizados con cepas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* que albergan os enzimas IMP-2 e KPC-2 respectivamente, xunto con cepas de *E. coli* non resistentes a carbapenemasas, demostraron a utilidade deste composto para a detección de carbapenemasas, observándose unha maior sensibilidade fronte a IMP-2 (clase B) que fronte a KPC-2 (clase A).

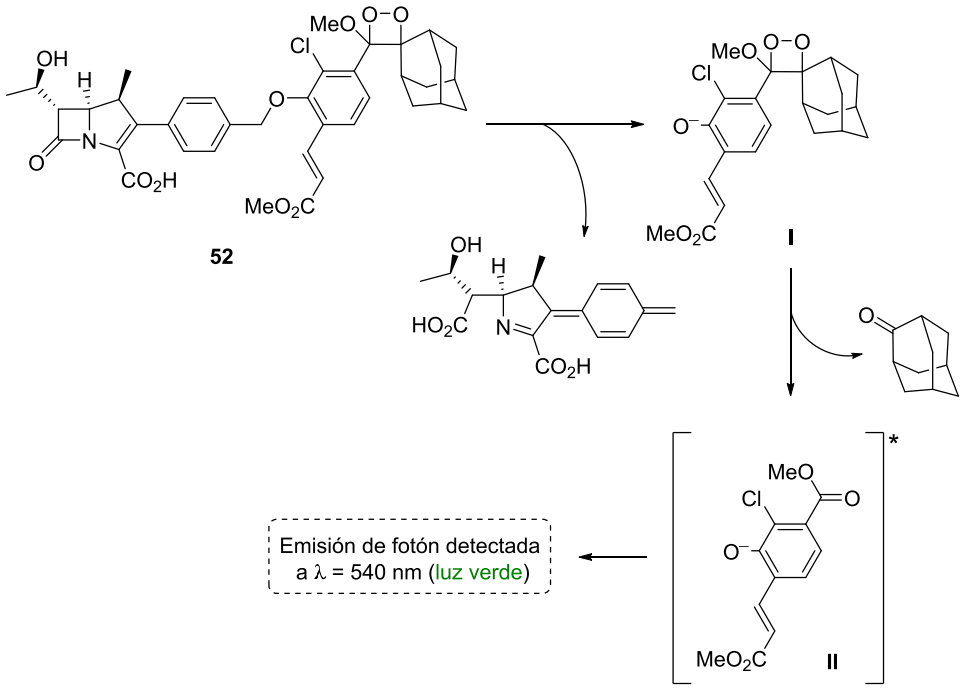
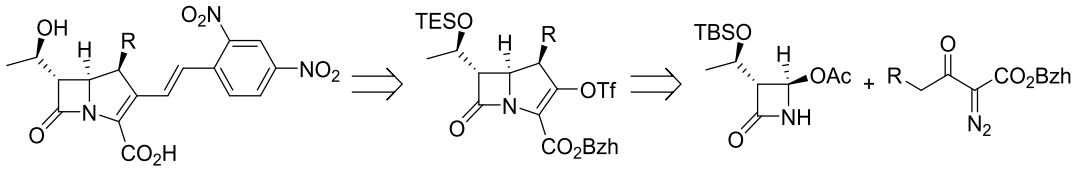


Figura 29. Ensaio baseado en carbapenem quimioluminiscente para a detección da produción de carbapenemasas. Representación esquemática do mecanismo de activación por excitación química.

3.2 Carbapenems cromoxénicos obxectivo: Aproximación sintética

Previamente levouse a cabo no noso grupo de investigación a síntese dos compostos **53**.[124] A metodoloxía establecida implica 8 etapas de síntese, sendo a etapa clave unha reacción de acoplamento cruzado C-C de Stille, entre os triflatos **54** e os correspondentes organoestannanos. Os triflatos **54** obtéñense mediante ciclación intramolecular catalizada por Rh, e posterior transformación da cetona resultante, dos diazocompostos produto do acoplamento entre a lactama comercial **55** e os diazocompostos **56**, que á súa vez se preparan en dous pasos a partir de compostos comerciais (Esquema 2).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



53 R = H, Me **54** R = H, Me **55** **56** R = H, Me

Esquema 2. Procedemento de síntese vía acoplamento de Stille previamente establecido.

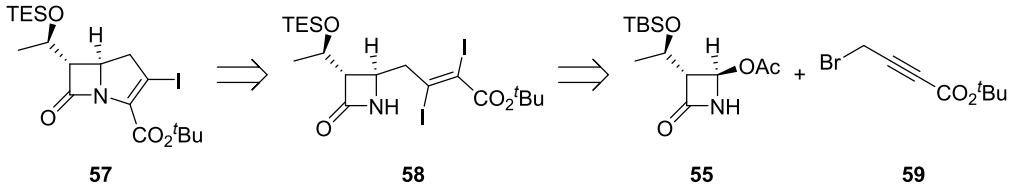
Sen embargo, esta ruta sintética presenta algúns inconvenientes como (i) a estabilidade dos triflatos illados, (ii) moderados rendementos e reproducibilidade dos acoplamentos de Stille, (iii) baixos rendementos, inferiores ao 25%, na etapa de desprotección dos grupos hidroxilo e carboxilo.

Debido a isto, decidiuse explorar a posibilidade de empregar un ioduro en lugar do triflato, o que proporcionaría unha maior estabilidade e versatilidade ao composto previo á reacción de acoplamento cruzado. Isto permitiría explorar outro tipo de unións e acoplamentos, como por exemplo vía reacción de Suzuki ou Sonogashira. Ademais, a fin de conseguir mellorar os baixos rendementos previamente obtidos na etapa final de desprotección, decidiuse empregar un grupo máis lábil como é o *terc*-Butilo.

3.2.1 Nova aproximación sintética: cambio de triflato por iodo e novo grupo protector

A ruta sintética proposta para a obtención do ioduro **57**, ten como pasos clave a obtención do diioduro **58** e a súa posterior ciclación intramolecular. O diioduro **58**, obteríase á súa vez por iodación do alquino produto do acoplamento por substitución nucleófila, con retención de configuración, entre a monobactama comercial **55** e o bromuro **59**, que se obtería facilmente a partir do alcohol proparxílico comercial (Esquema 3).

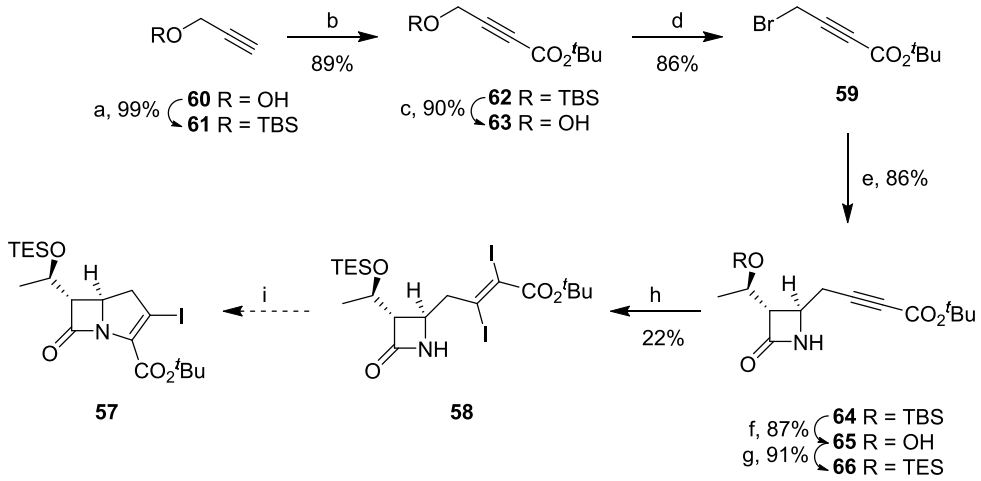
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Esquema 3. Análise retrosintético da aproximación proposta.

A síntese do composto diiodado **58** levouse a cabo como se indica no esquema 4. A protección do alcohol proparxílico comercial **60**, como éter de silicio, e o posterior tratamento do alquino resultante con base de litio e anhídrido de Boc, proporcionou o éster **62**. Eliminación do sililéter en medio ácido e posterior reacción de Apple sobre o alcohol obtido **63**, proporcionou o bromuro **59** con un rendemento do 86%. A adición do bromuro **59** sobre unha disolución da β-lactama comercial **55**, previamente tratada con Zn activo, proporcionou o composto **64** con un excelente rendemento.

A continuación realizouse o cambio de grupo sililo por un máis lábil, xa que previamente se reportaron dificultades á hora de desprotexelo nas etapas finais da síntese. Finalmente levouse a cabo a reacción de iodación do composto **66**, seguindo as condicións de Jiang e colaboradores,[125] obténdose o diioduro desexado **58**.



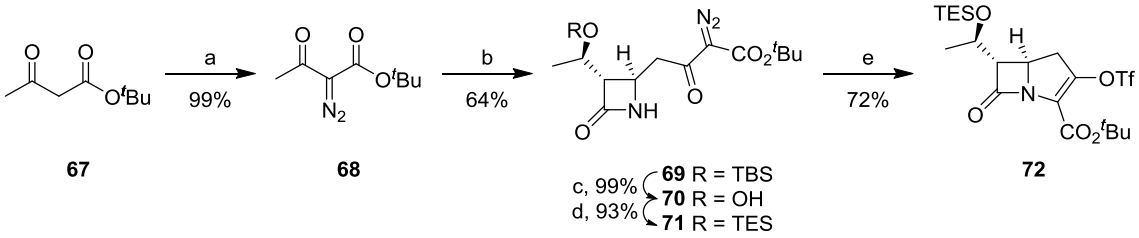
Esquema 4. *Reactivos e condicións:* (a) Imidazol, TBSCl, t.a. (b) 1. *n*BuLi, THF, –78 °C. 2. Boc_2O, THF, t.a. (c) HF·Pi, CH_3CN, t.a. (d) CBr_4, PPh_3, CH_2Cl_2, 0 °C. (e) **55**, Zn, THF, 45 °C. (f) HF·Pi, CH_3CN, t.a. (g) Imidazol, TESCl, AcOEt, t.a. (h) NaI, I_2, CH_2Cl_2, 30 °C. (i) CuI, bpy, K_3PO_4, H_2O, Tolueno, 40 °C.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Os baixos rendementos obtidos para esta etapa clave da síntese, xunto cos bos resultados que se estaban a obter paralelamente mediante as modificacións realizadas no procedemento previamente establecido, fixeron que optásemos por continuar por dita vía.

3.2.2 Cambio do grupo protector bencidrilo (Bzh) por *terc*-butilo

O tratamento do acetoacetato de *terc*-butilo comercial **67** con *p*-ABSA, segundo as condicións descritas previamente por Xu e colaboradores,[126] proporcionou o diazocomposto **68**, o cal se tratou con base e TBSOTf para obter un silil enol éter que se engadiu sobre a lactama comercial **55** en presenza de $ZnCl_2$, dando lugar ao composto **69** con un rendemento do 64%. A ciclación intramolecular do diazocomposto **71**, en presenza de catalizador de Rh, seguida do tratamento a baixa temperatura con bases e anhídrido tríflico, proporcionou o triflato **72** con un rendemento do 72% (Esquema 5).



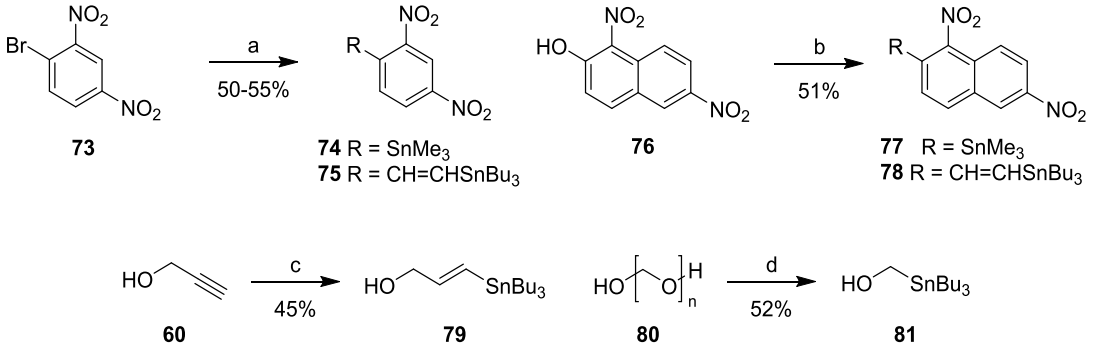
Esquema 5. *Reactivos e condicións:* (a) p-ABSA, Et_3N, CH_3CN, t.a. (b) 1. TBSOTf, Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C. 2. **55**, $ZnCl_2$, CH_2Cl_2, t.a. (c) HF·Pi, CH_3CN, t.a. (d) Imidazol, TESCl, AcOEt, t.a. (e) 1. $Rh_2(Oct)_4$, CH_2Cl_2, Δ. 2. DIPEA, TMP, Tf_2O, –78 °C.

Finalmente, levaríanse a cabo as reaccións de acoplamento de Stille, empregando $Pd_2(dba)_3$ como catalizador, entre o triflato **72** e os correspondentes organoestannanos.

A síntese dos estannanos resúmese no esquema 6. Os estannanos **74** e **75** obtivéronse por tratamento do bromuro comercial **73** con bis(trimetilestaño) e (*E*)-1,2-bis(tributilestannil)eteno respectivamente, en presenza de cantidades catalíticas de Paladio (0).[127] Os estannanos **77** e **78** obtivéronse de xeito análogo a partir do dinitronaftol **76**, mediante a formación *in situ* de un triflato e posterior tratamento cos diestannanos comerciais antes comentados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Os hidroxiestannanos **79** e **81**, obtivéronse mediante hidroestannación do alcohol proparxílico **60**,[128] e o paraformaldehído **80**,[129] ambos comercialmente dispoñibles.

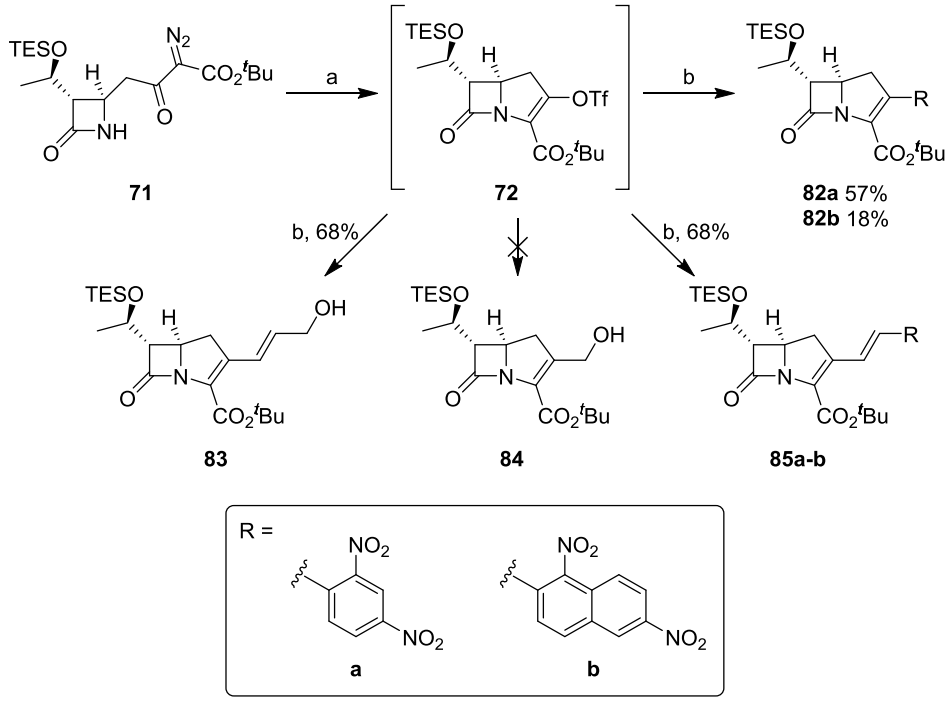


Esquema 6. *Reactivos e condicións:* (a) $(SnMe_3)_2$ ou $(CHSnBu_3)_2$, $Pd(Ph_3)_4$, Tolueno, 80 °C. (b) 1. Tf_2O, Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C. 2. $(SnMe_3)_2$ ou $(CHSnBu_3)_2$, LiCl, $Pd(Ph_3)_4$, Tolueno, 80 °C. (c) Bu_3SnH, AIBN, Hexano, Δ. (d) Bu_3SnH, LDA, THF, 0 °C→t.a.

As reaccións de acoplamento carbono-carbono de Stille transcorreron con rendementos baixos, sendo ademais pouco reproducibles. Debido a isto, decidíronse introducir cambios no procedemento empregado: (i) desoxixenación do disolvente, *N*-metil-2-pirrolidona, previamente ao seu uso e (ii) o emprego do triflato **72** sen purificación previa.

As modificacións realizadas mostraron unha alta reproducibilidade, ademais de un aumento significativo dos rendementos globais. Desafortunadamente, a formación do composto **82b** non superou o 18% de rendemento, e en ningún dos intentos realizados se observou a formación do composto **84** (Esquema 7).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

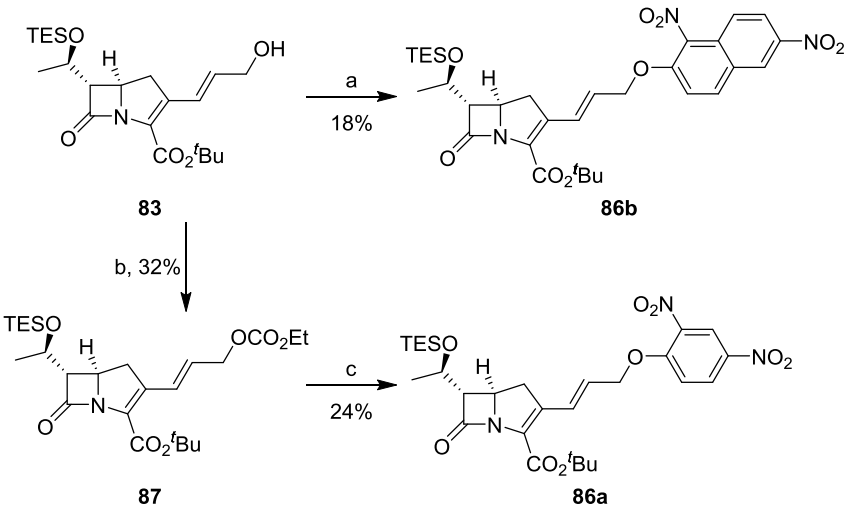


Esquema 7. *Reactivos e condicións*: (a) 1. $Rh_2(Oct)_4$, CH_2Cl_2, Δ. 2. DIPEA, TMP, Tf_2O, –78 °C. (b) **74–81**, $ZnCl_2$, P(2-furil)$_3$, $Pd_2(dba)_3$, NMP, 30 °C.

A continuación, explorouse a obtención dos compostos éter obxectivo mediante acoplamento de Mitsunobu ou alquilación alílica de Tsuji-Trost,[130] entre o vinilalcohol **83** e os alcohois comerciais 2,4-dinitrofenol e 1,6-dinitronaftalen-2-ol (**76**).

O procedemento empregado para levar a cabo a reacción de Mitsunobu deu lugar ao composto desexado **86b** con baixos rendementos, mentres que a formación do éter **86a** non se observou por este método. Sen embargo, a reacción de Tsuji-Trost entre o carbonato **87** e os alcohois antes mencionados, en presenza de cantidades catalíticas de Paladio e trietilfosfito, transcorreu cos resultados inversos, obténdose unicamente o composto **86a** (Esquema 8).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Esquema 8. *Reactivos e condicións*: (a) 2,4-dinitrofenol ou 1,6-dinitronaftalen-2-ol, PPh_3, DIAD, THF, 0 $^oC \rightarrow$t.a. (b) Pi, CO_2EtCl, CH_2Cl_2, 0 ^oC. (c) 2,4-dinitrofenol ou 1,6-dinitronaftalen-2-ol, $Pd_2(dba)_3 \cdot CHCl_3$, $P(OEt)_3$, Tolueno/THF, t.a.

Finalmente leváronse a cabo os intentos de desprotección dos grupos hidroxilo e carboxilo. Inicialmente tratouse de realizar as desprotecciónsen unha única etapa empregando o procedemento previamente reportado no noso grupo de investigación[124] (Entrada 1, táboa 6). Sen embargo non se obtiveron por este método os ácidos desexados, polo que se exploraron diversas condicións de reacción empregando ácido trifluorometanosulfónico, xa fose só,[131] diluído ou en presenza de *scavengers,* como Anisol ou trietilsilano.[132] Tamén se probou o uso de un ácido de Lewis como o $TiCl_4$[62] (Táboa 6).

Desafortunadamente en ningún dos casos se obtivo o produto desexado, comprobándose mediante ^{1}H-RMN e HPLC-MS a obtención de produtos de degradación das substancias de partida.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Táboa 6. Intentos de desprotección dos grupos TES e ^{t}Bu. *Reactivos e condicións.*

	Reactivos	Disolvente [ ]	Temperatura	Tempo
1	TFA (26 eq.)	CH_2Cl_2 (0.15 M)	0 ^{o}C	2h
2	TFA (20 mM)		0 ^{o}C → t.a.	0.5h
3	TFA (0.15 M)	CH_2Cl_2 (15 mM)	t.a	2h
4	TFA/SiO_2 (25% p/p)	CH_2Cl_2 (0.12 M)	t.a.	2h
5	TFA (50 mM), Anisol (7 eq.)	CH_2Cl_2 (50 mM)	0 ^{o}C → t.a.	2h
6	TFA (13 eq.), TESH (2.5 eq.)	CH_2Cl_2 (50 mM)	0 ^{o}C	
7	$TiCl_4$ (4.5 eq, *ca.* 1M en CH_2Cl_2)	CH_2Cl_2 (50 mM)	–25 ^{o}C → 0 ^{o}C	1h

Debido aos resultados anteriormente expostos decidiuse abordar as desprotecciónsen dúas etapas, eliminando en primeiro lugar o grupo trietilsililo. Inicialmente tratouse de desprotexer o hidroxilo empregando o procedemento previamente reportado no noso grupo de investigación[124] (Entrada 1, táboa 7).

Este procedemento resultou ser demasiado agresivo para estes substratos, observándose un inmediato cambio de cor, de amarelo a vermello intenso, tras a adición do ácido. Corroborándose mediante probas de ^{1}H-RMN e HPLC-MS a completa degradación dos mesmos e a formación de produtos de hidrólise do anel β-lactámico. A continuación exploráronse condicións de desprotección mais suaves, tales como: (i) o emprego de HCl diluído,[133] (ii) o uso de resinas ácidas DOWEX®[134] ou (iii) o uso de axentes fonte de flúor como $NH_4{\cdot}HF_2$[135] e TBAF (Entradas 2-7, táboa 7).

Todos os intentos deron lugar a produtos de degradación e/ou apertura do anel β-lactámico. No caso 6, incluso despois de 48 h, non se observou un avance significativo da reacción, recuperándose a práctica totalidade da sustancia de partida. O tratamento do éter de silicio **85a** con unha mestura de AcOH/TBAF[116] (Entrada 8, táboa 7) proporcionou o resultado desexado con baixo rendemento. Probas de TLC e HPLC-MS mostraron que a prolongación do tempo de reacción leva consigo a degradación por apertura do anel β-lactámico, tanto da sustancia de partida coma do produto, sendo en todos os casos unha reacción incompleta. Tras un proceso de optimización, reducindo o número de equivalentes e a

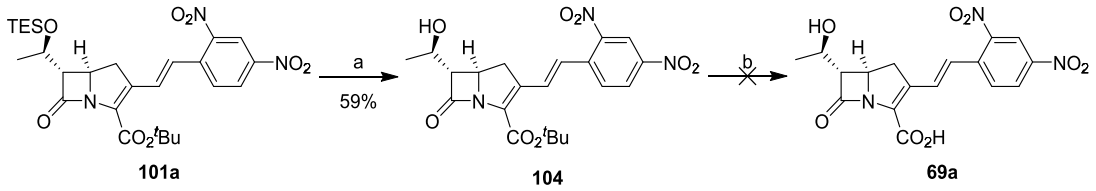
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

temperatura (Entrada 9, táboa 7), obtívose o alcohol **88** con un rendemento do 59%, tendo en conta a sustancia de partida recuperada (Esquema 9).

Táboa 7. Intentos de desprotección do grupo TES. *Reactivos e condicións*

	Reactivos	Disolvente [ ]	Temperatura	Tempo
1	HF·Pi (10 eq.)	CH_3CN (0.2M)	t.a.	0.5h
2	1%HCl en EtOH (0.1M)		t.a	2h
3	HCl (1M, 0.5 eq.)	THF/H_2O (2:1; 0.1 M)	t.a.	2h
4	DOWEX-50W-X8-400	MeOH (50 mM)	t.a.	2h
5	$NH_4{\cdot}HF_2$ (10 eq.)	NMP/DMF (1:3, 50 mM)	t.a.	24h
6	$NH_4{\cdot}HF_2$ (4 eq.)	NMP/DMF (1:3, 0.1 M)	t.a.	48h
7	TBAF (*ca.* 1M, 2.5 eq.)	THF (15 mM)	t.a.	0.5h
8	AcOH (10 eq.), TBAF (10 eq.)	THF/CH_2Cl_2 (2:1, 40 mM)	t.a.	0.5h
9	AcOH (3 eq.), TBAF (3 eq.)	THF/CH_2Cl_2 (2:1, 40 mM)	0 °C	0.5h

Finalmente tratouse de desprotexer o *terc*-butilcarboxilato en medio ácido, empregando ácidos suaves como o acético glacial ou o fórmico, con e sen *scavengers*. Desafortunadamente ningunha das condicións probadas deu o resultado esperado, identificándose en todos os casos o produto da hidrólise do anel β-lactámico (Esquema 9).



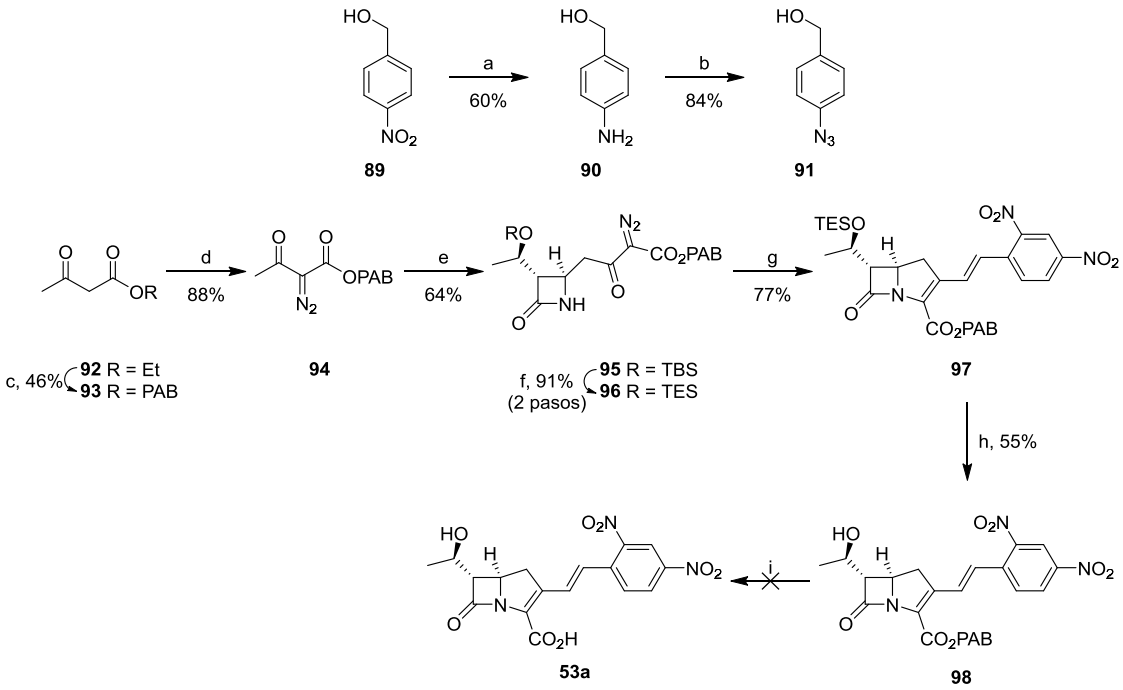
Esquema 9. *Reactivos e condicións:* (a) AcOH, TBAF, THF/CH_2Cl_2 (2:1), 0 °C. (b) AcOH ou HCO_2H, TESH, t.a.

3.2.3 Cambio de grupo protector: *para*-azidobencilo (PAB)

No recente traballo de síntese do composto carbapenémico CARBA-H,[116] Ma e colaboradores, describiron o uso do grupo *para*-azidobencilo (PAB) como protector do carboxilo, o cal ofrece excelentes rendementos ao ser eliminado mediante unha reacción tipo redución de Staudinger. Animados polos excelentes resultados presentados en esta publicación decidimos poñer a proba o seu procedemento con algún dos nosos substratos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

O (*p*-azidofenil)metanol **91** preparouse en dous pasos a partir do (*p*-nitrofenil)metanol **89** dispoñible no noso laboratorio: (i) hidroxenación catalítica e (ii) diazotación da amina **90**. Transesterificación de Fisher entre o alcohol **91** e acetoacetato de etilo comercial **92** proporcionou o composto **93** con un rendemento do 46%. O resto da síntese realizouse seguindo os procedementos previamente establecidos, obténdose o composto **98** en seis etapas e con un rendemento global do 21%. Finalmente probáronse as condicións descritas por Ma e colaboradores para a desprotección do grupo carboxilo. Tras 5 min de reacción e observar mediante TLC a completa desaparición da sustancia de partida, realizouse unha purificación en fase reversa, empregando unha columna de C18 como fase estacionaria e H_2O Mili-Q/0.1 % de ác. fórmico e acetonitrilo como fases móbiles. Desafortunadamente ningunha das fraccións illadas resultou ser o produto desexado, observándose novamente mediante probas de ^{1}H-RMN e HPLC-MS a obtención de produtos de degradación (Esquema 10).



Esquema 10. *Reactivos e condicións*: (a) H_2, Pd/C, MeOH, t.a. (b) H_2SO_4, $NaNO_2$, NaN_3, H_2O, 0 °C. (c) **91**, DMAP (cat.), Tolueno, Δ. (d) p-ABSA, Et_3N, CH_3CN, t.a. (e) 1. TBSOTf, Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C. 2. **55**, $ZnCl_2$, CH_2Cl_2, t.a. (f) 1. HF·Pi, CH_3CN, t.a. 2. Imidazol, TESCl, AcOEt, t.a. (g) 1. $Rh_2(Oct)_4$, CH_2Cl_2, Δ. 2. DIPEA, TMP, Tf_2O, –78 °C. 3. **75**, $ZnCl_2$, P(2-furil)$_3$, $Pd_2(dba)_3$, NMP, 30 °C. (h) AcOH, TBAF, THF/ CH_2Cl_2 (2:1), 0 °C. (i) PEt_3 (*ca.* 10% en Hexano), AcOH, Dioxano/H_20 (10:1), t.a.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

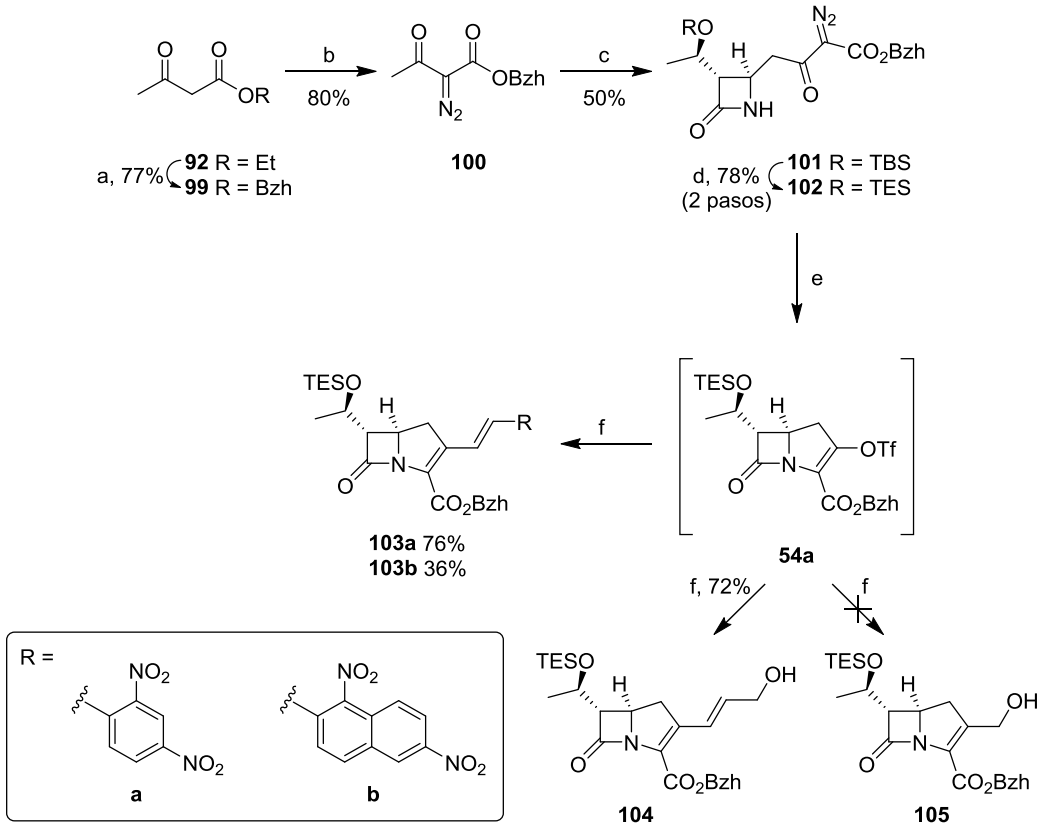
3.2.4 Cambio de grupo protector: bencidrilo (Bzh)

Tendo en conta os resultados obtidos previamente no grupo de investigación con este grupo protector para a síntese dos compostos **53**,[124] e debido á falta de alternativas mais viables, decidiuse empregalo na ruta xa optimizada para obter, aínda que con baixos rendementos, os ácidos obxectivo e poder probar a capacidade de detección de estes compostos fronte ós enzimas capaces de hidrolizar carbapenems.

A síntese dos compostos que non presentan espazadores entre o corpo de carbapenem e o cromóforo descartouse finalmente, posto que como se viu na revisión bibliográfica realizada resulta fundamental para a obtención de unha boa selectividade e intensidade de sinal.

A síntese dos éteres de silicio **103–105** levouse a cabo mediante o procedemento xa descrito. O difenilmetanol, necesario para a transesterificación de Fisher, preparouse por redución de benzofenona comercial con $NaBH_4$ (Esquema 11).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



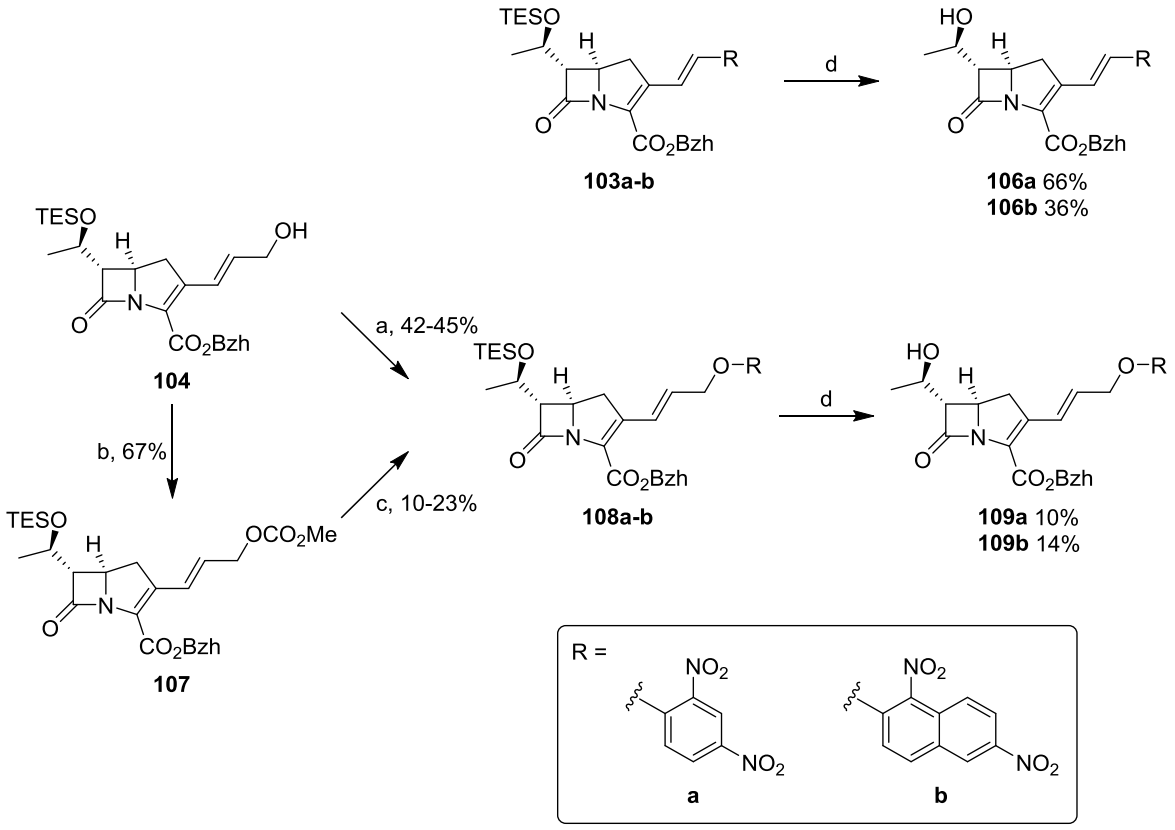
Esquema 11. *Reactivos e condicións*: (a) difenilmetanol, DMAP (cat.), Tolueno, Δ. (b) p-ABSA, Et_3N, CH_3CN, t.a. (c) 1. TBSOTf, Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C. 2. **55**, $ZnCl_2$, CH_2Cl_2, t.a. (d) 1. HF·Pi, CH_3CN, t.a. 2. Imidazol, TESCl, AcOEt, t.a. (e) 1. $Rh_2(Oct)_4$, CH_2Cl_2, Δ. 2. DIPEA, TMP, Tf_2O, –78 °C. (f) **77–81**, $ZnCl_2$, P(2-furil)$_3$, $Pd_2(dba)_3$, NMP, 30 °C.

A formación dos éteres **108** levouse a cabo mediante os procedementos previamente establecidos, acoplamento de Mitsunobu e alquilación alílica de Tsuji-Trost, obténdose en esta ocasión ambos compostos polos dous métodos. A alquilación de Tsuji-Trost presentou dous inconvenientes: (i) baixos rendementos e (ii) produtos impuros, mesturados con dba procedente do catalizador de paladio. A reacción de Mitsunobu transcorreu con rendementos aceptables e os produtos puideron illarse sen problema (Esquema 12).

Finalmente, leváronse a cabo os intentos de desprotección dos compostos **103** e **108**. O procedemento de desprotección en unha única etapa, empregando TFA a 0 °C,[124] resultou en unha mestura de produtos de hidrólise do anel β-lactámico, mediante seguimento da reacción por HPLC-MS. A eliminación do éter de silicio mediante o procedemento anteriormente descrito proporcionou os compostos **106** e **109**, sendo en estes últimos casos os rendementos moi inferiores e

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

observándose a liberación das sondas ao medio, producíndose unha cor amarelo intenso (Esquema 12).



Esquema 12. *Reactivos e condicións*: (a) **76** ou 2,4-dinitrofenol, PPh_3, DIAD, THF, 0 ºC→t.a. (b) Pi, CO_2MeCl, CH_2Cl_2, 0 ºC. (c) **76** ou 2,4-dinitrofenol, $Pd_2(dba)_3{\cdot}CHCl_3$, $P(OEt)_3$, Tolueno/THF, t.a. (d) AcOH, TBAF, THF/CH_2Cl_2 (2:1), 0 ºC.

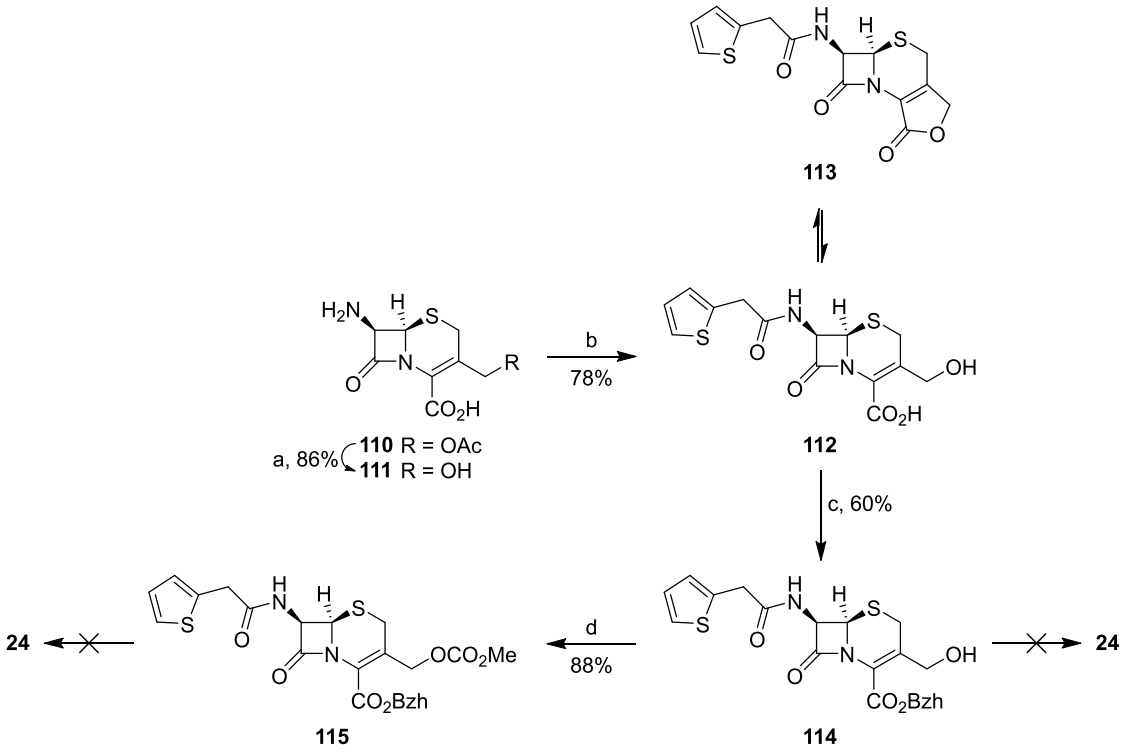
Debido aos resultados obtidos e á falta de tempo, non se puideron acadar os ácidos obxectivo e avaliar a súa capacidade como detectores cromoxénicos de carbapenemasas.

3.3 Cefalosporinas cromoxénicas obxectivo: Aproximación sintética

A fin de poder comparar a sensibilidade dos carbapenems deseñados con este tipo de sondas fronte aos compostos baseados en cefalosporinas, deseñáronse os compostos **24** os cales se empregarían xunto á Nitrocefina como substratos de control nos ensaios con enzimas. A síntese dos compostos levaríase a cabo a partir do alcohol **114** mediante acoplamento de Mitsunobu ou alilación de Tsuji-Trost, empregando a metodoloxía anteriormente descrita para os carbapenems obxectivo. O alcohol **114** obtívose en tres etapas a partir do ácido 7-

amino-3-acetoximetilcefalosporánico comercial **110**, mediante procedementos descritos en bibliografía: (i) desacetilación; (ii) funcionalización da amina primaria co grupo tiofenilacetilo; (iii) protección do ácido carboxílico co grupo bencidrilo.

A etapa final de protección transcorreu con rendementos moderados debido a que os grupos carboxilo e hidroxilo tenden a condensar, producíndose un equilibrio entre a forma ácida e a lactonizada **113**,[136] o que dificulta a formación do carboxilato. O diazodifenilmetano obtívose mediante oxidación con MnO_2 da benzofenona hidrazona comercial. O alcohol **114** tratouse con cloroformiato de metilo en presencia de base proporcionando o carbonato **115** con un rendemento do 88%. Finalmente leváronse a cabo os acoplamentos de Mitsunobu entre o alcohol **114** e os alcohois 2,4-dinitrofenol e 1,6-dinitronaftalen-2-ol (**76**), así como as reaccións de Tsuji-Trost entre os devanditos alcohois e o carbonato **115** (Esquema 13).



Esquema 13. *Reactivos e condicións*: (a) NaOH (ac., 3M), MeOH/H_2O, –30 ºC. (b) 1. $NaHCO_3$, H_2O/Acetona (3:1), pH = 7, 0 ºC. 2. cloruro de 2-(tiofen-2-il)acetilo, 0 ºC. 3. HCl (ac.), pH =2–3, 0 ºC. (c) diazodifenilmetano, THF/AcOEt, 0 ºC→t.a. (d) Pi, CO_2MeCl, CH_2Cl_2, 0 ºC.

Desafortunadamente, ningún dos intentos realizados empregando o método de Mitsunobu deu lugar á obtención dos produtos desexados, observándose sempre mediante TLC e HPLC-MS as substancias de partida intactas. A adición de mais equivalentes de trifenilfosfina e azodicarboxilato de diisopropilo, así como o cambio de orde de adición dos reactivos, non alterou en absoluto o resultado. A alilación de Tsuji-Trost tampouco transcorreu como se esperaba, polo que se buscaron condicións alternativas a fin de mellorar a reactividade. Desafortunadamente as condicións probadas non deron resultado, observándose mediante técnicas de HPLC-MS a formación de trazas dos produtos desexados (entrada 1, táboa 8). A falta de tempo non nos permitiu realizar máis probas nin buscar métodos alternativos para a obtención dos compostos obxectivo **24**.

Táboa 8. Intentos de alilación de Tsuji-Trost. *Reactivos e condicións.*

	Reactivos	Disolvente [ ]	Temperatura	Tempo
1	$Pd_2(dba)_3{\cdot}CHCl_3$, $P(OEt)_3$	Tolueno/THF (2:1)	30 ºC	48h
2	$Pd_2(dba)_3$, dppb	THF	60 ºC	24h
3	$Pd_2(dba)_3$, BINAP, K_2CO_3	THF	50 ºC	18h
4	$Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3	DMF/THF (1:2)	t.a.	16h
5	$Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3	DMF/THF (1:2)	50 ºC	24h

3.4 Análogos do ácido xiquímico de conformación restrinxida que mimetizan a conformación de alta enerxía que recoñece o enzima: antecedentes

É bastante habitual que, á hora de interactuar coa súa diana biolóxica, os substratos adopten conformacións estruturais forzadas, en comparación coas que adoptan en disolución, co fin de establecer interaccións mais fortes cos residuos de aminoácidos ou para favorecer reaccións específicas e selectivas (enzimas), chegando a acadar en algúns casos conformacións altamente enerxéticas.[137] É debido a isto, que os análogos de compostos naturais moi flexibles non sempre mostren a afinidade esperada pola súa diana, dado que non chegan a adoptar a conformación axeitada. A introdución de restricións estruturais

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

específicas, mediante a adición de enlaces adicionais, a introdución de grupos voluminosos ou a formación de aneis, pode reducir o número de conformacións posibles dun ligando, có fin de favorecer a adopción de unha conformación bioactiva fronte á súa diana terapéutica.

Estas estratexias de rixidificación son habitualmente empregadas no campo do descubrimento de fármacos, coa finalidade de optimizar candidatos a fármaco,[138] ou para mellorar a potencia e/ou eficacia de fármacos xa existentes.[139] Esta estratexia de síntese permite tamén diminuír a súa degradación ao bloquearse sitios metabólicamente lábiles, e incluso se pode lograr facelos específicos para un receptor fronte aos seus subtipos ou variantes.

O ácido xiquímico é un destes casos nos que o substrato adopta unha conformación altamente enerxética ao interactuar coa súa diana. No seu caso, esta conformación vese forzada polo enzima xiquimato quinasa (XQ), co fin de favorecer a fosforilación selectiva do hidroxilo en C3.

En base aos datos cristalográficos e de Dinámica Molecular recollidos sobre as interaccións enzima-substrato, antes mencionados, e aplicando as técnicas de rixidificación da conformación, no noso grupo de investigación sintetizouse o composto **23**, que foi deseñado para fixar a conformación diaxial requirida e para reducir a flexibilidade dos dominios SB e LID. En base aos bos resultados de inhibición que mostrou este composto, deseñáronse e sintetizáronse os compostos **116**,[140] nos que se introduciron diversas cadeas apolares en un dos carbonos ponte co fin de potenciar interaccións lipofílicas favorables entre o ligando e os residuos do dominio LID (Figura 30).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

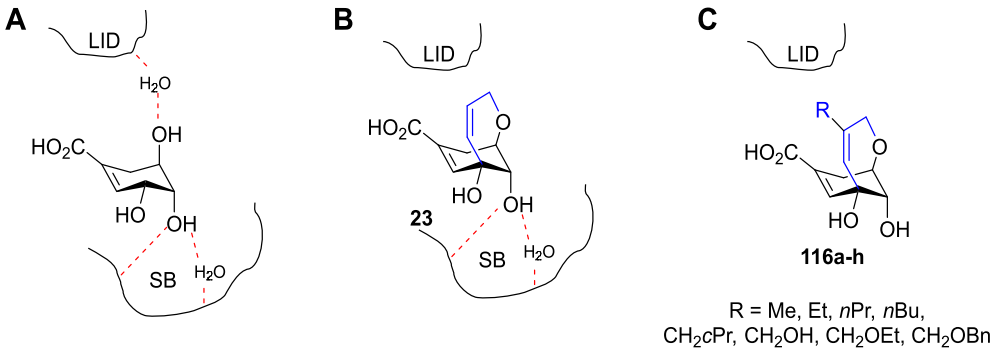
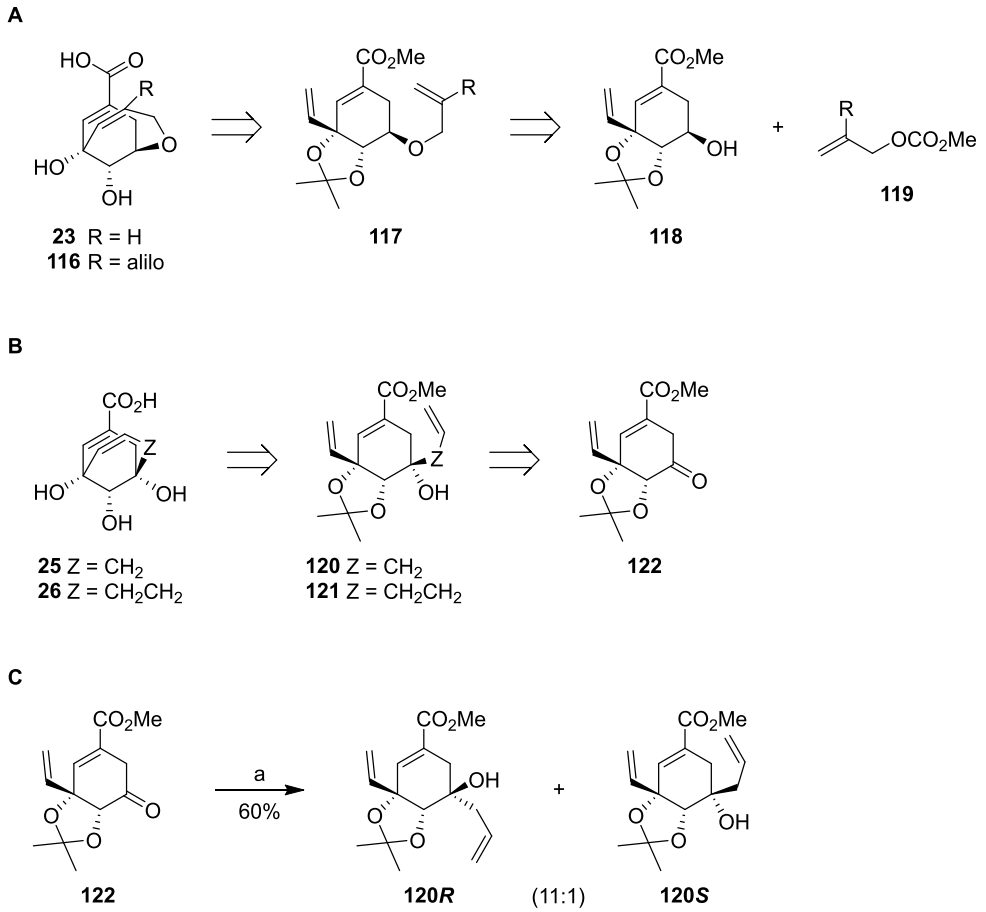


Figura 30. Representación gráfica da conformación de alta enerxía do substrato natural **(A)**, e dos análogos bicíclicos **23 (B)** e **116 (C)**.

A serie de análogos **116** ensaiouse fronte á XQ procedente de *M. tuberculosis* (*Mt*) e *H. pylori* (*Hp*), obténdose os mellores resultados da serie para o composto **116a** (R = Me) fronte a XQ-*Mt* (k_i = 28 µM), e o composto **116f** (R = CH_2OEt) fronte a XQ-*Hp* (k_i = 5 µM), sendo esta menor á constante de Michaelis-Menten do enzima (k_m = 39 µM). Polo xeral os resultados dos compostos **116** foron mellores fronte a *H. pylori* (*Hp*) que fronte a *M. tuberculosis* (*Mt*). Ademais de esta serie de compostos, tratouse previamente de sintetizar os biciclos **25** e **26**,[140] que presentan unha ponte ríxida totalmente carbonada e nos cales o hidroxilo da posición C5 muda a súa configuración, o que permitiría unha maior interacción deste cos residuos do dominio SB do enzima, ou a funcionalización do mesmo con diversos grupos aromáticos para lograr tal fin. De obterse uns resultados prometedores, posteriormente estudaríase a incorporación de grupos apolares nos carbonos da ponte C3–C5 ao igual que se fixo coa serie de compostos **116**. Buscando así obter inhibidores selectivos para XQ-*Mt* e XQ-*Hp* capaces de estabilizar unha conformación pechada e inactiva dos dominios LID e SB, claves para a catálise.

A primeira aproximación sintética que se empregou para tratar de obter os devanditos compostos foi similar á empregada para a síntese dos compostos **23** e **116**, consistente na formación do biciclo a través de unha reacción de metátese cruzada entre os vinil derivados **117**, que á súa vez se obtiveron mediante unha reacción de alilación de Tsuji-Trost a partir do alcohol **118** e os alilcarbonatos **119**[141] (Esquema 14A).

Para os compostos **25** e **26** a reacción de metátese levaríase a cabo nos compostos **120** e **121**, que á súa vez se obterían por adición nucleófila dos vinilos sobre a cetona **122** (Esquema 14B). Desafortunadamente, o tratamento da cetona có organozinc derivado de bromuro de alilo proporcionou maioritariamente o diastereoisómero indesexado *R* fronte ao *S* en unha proporción de 11 a 1 (Esquema 14C).

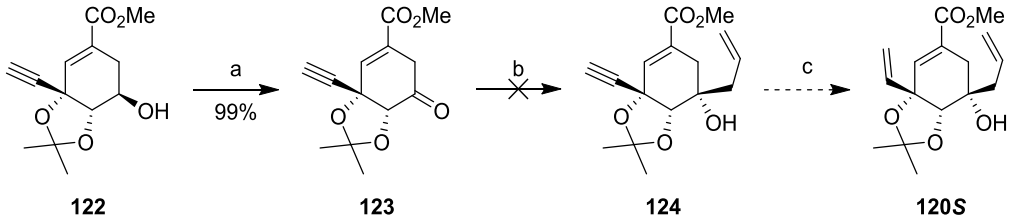


Esquema 14. (A) Análise retrosintética dos compostos **23** e **116**. **(B)** Análise retrosintética dos compostos **25** e **26**. **(C)** Síntese previa do composto **120**. *Reactivos e condicións:* (a) Zn polvo, alilBr, THF, 0 ^{o}C → t.a.

En base a cálculos computacionais da conformación de mínima enerxía da cetona **122**, empregando o Hamiltoniano AM1 no programa Gaussian 09, propúxose como hipótese para estes resultados que a presencia do grupo vinilo na posición C3 estaba a bloquear a cara *Si* do carbonilo, favorecéndose o ataque nucleófilo pola cara *Re*.[140]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A fin de comprobar esta hipótese propuxémonos realizar a adición nucleófila na posición C5 sobre a cetona **123**, a cal se obtivo por oxidación con periodinano de Dess-Martin do alcohol **122**, precursor do alcohol **118** previamente descrito no grupo.[79] O tratamento da cetona **123** con organozinc derivados do bromuro de alilo e posterior redución selectiva do alquino **124** en atmosfera de hidróxeno e en presenza de catalizador de Lindlar, proporcionaría o desexado diastereoisómero **120*S*** (Esquema 15).



Esquema 15. *Reactivos e condicións:* (a) Dess-Martin, CH_2Cl_2, t.a. (b) Zn polvo, alilBr, THF, 0 ºC → t.a. (c) H_2, Lindlar (cat.), EtOH.

Os intentos realizados para obter o composto **124** mediante o procedemento previamente descrito non deron resultado, e tampouco se observou a formación do diastereoisómero *S.* Isto puido deberse á capacidade do zinc para coordinarse a alquinos e activalos, dando lugar a diversas reaccións químicas,[142] interferindo deste xeito na produción do composto desexado. Tratouse por tanto de levar a cabo a reacción empregando reactivos de Grignard, xerando os magnesianos *in situ* ou ben usando os comerciais (*ca* 1 M en Et_2O). As condicións probadas resúmense na táboa 9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

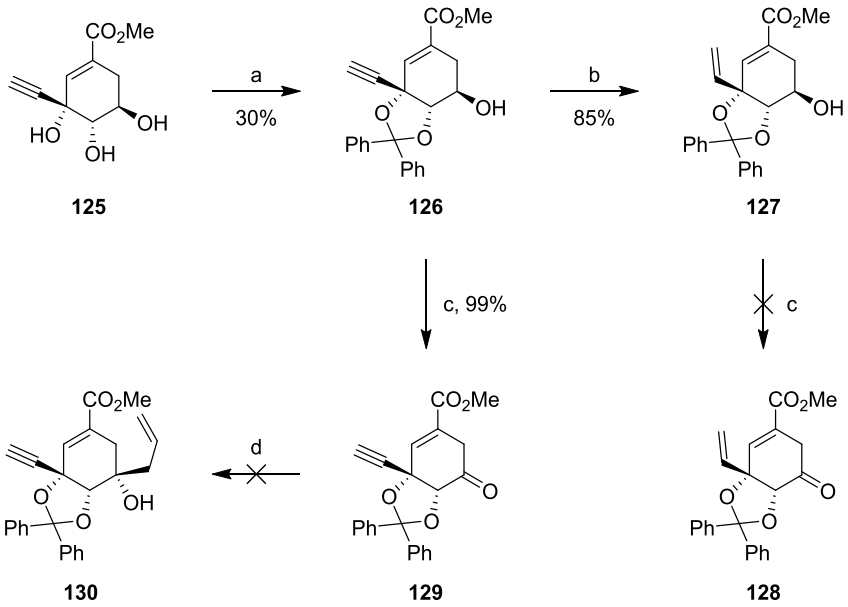
Táboa 9. Intentos de obtención de **124**. *Reactivos e condicións.*

Entrada	Reactivos	Disolvente [ ]	Temperatura	Tempo
1	alilMgBr (3.5 eq.)	THF (0.1 M)	0 ºC → t.a.	3h
2	alilMgBr (2 eq.), $CeCl_3$ (1.5 eq.)	THF (0.2 M)	– 78 ºC	3h
3	1. $BF_3{\cdot}OEt_2$ (4 eq.) 2. alilMgBr (2.5 eq.)	THF (0.2 M)	0 ºC → t.a.	1.5h
4	alilMgBr (2.5 eq.), $BF_3{\cdot}OEt_2$ (4 eq.)	THF (0.2 M)	0 ºC → t.a.	1.5h

Todos os intentos realizados deron como resultado mesturas de produtos de difícil separación e en ningún caso se puido identificar, mediante ^{1}H-RMN e HPLC-MS, a formación de ningún dos diastereoisómeros de **124**.

En unha segunda aproximación propúxose a substitución do grupo acetal da cetona **122** por un mais voluminoso, de forma que a reactividade pola cara *Re* do carbonilo se vise imposibilitada e se forzase o ataque nucleófilo desexado pola cara *Si*. A protección do alcohol **125**, previamente descrito no noso grupo,[79] co acetal seleccionado e a posterior redución selectiva do alquino proporcionou o vinilo **127**. A oxidación de Dess-Martin non resultou na obtención da cetona **126**, recuperándose integramente a sustancia de partida incluso tras 72h de reacción. A oxidación do alcohol **127** con PDC e mediante oxidación de Swern tampouco deu lugar á cetona desexada. Decidiuse por tanto oxidar o alcohol **126** e tratar de introducir a cadea en C5 empregando as condicións expostas previamente (Entrada 1, táboa 9). Desafortunadamente non se obtivo o resultado desexado e a falta de tempo non nos permitiu probar outras condicións de oxidación para obter a cetona **128** (Esquema 16).

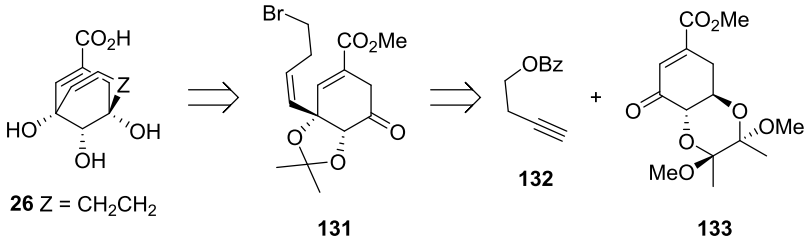
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Esquema 16. *Reactivos e condicións*: (a) difenildimetoximetano, CSA (cat.), DMF, Δ. (b) H_2, Lindlar (cat.), EtOH, t.a. (c) Dess-Martin, CH_2Cl_2, t.a. (d) alilMgBr, THF, 0 → t.a.

3.4.1 Aproximación sintética alternativa: adición nucleófila intramolecular

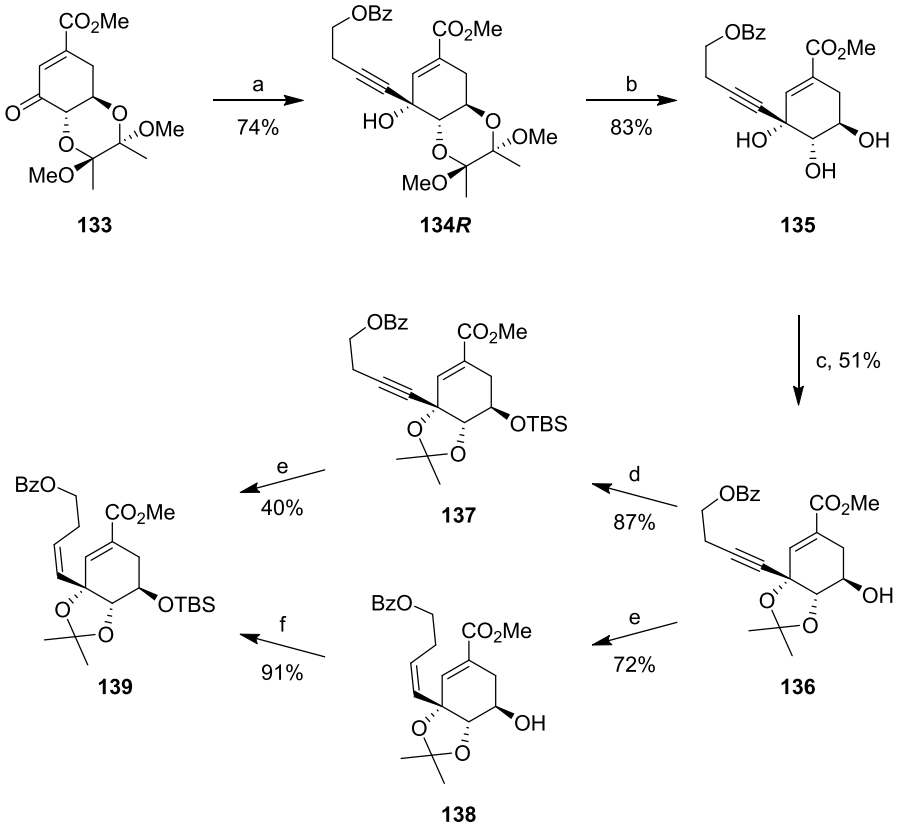
Tendo en conta os problemas de reactividade anteriormente expostos da cetona **121**, propúxose previamente no noso grupo de investigación a síntese destes compostos mediante a introdución da cadea desexada na posición C3 e posterior peche do biciclo mediante unha adición nucleófila intramolecular sobre a posición C5.[140] A ponte carbonada introduciríase na posición C3 por adición nucleófila do alquino **132** sobre a cetona **133**, previamente descrita (Esquema 17).



Esquema 17. Análise retrosintética do composto **26** vía adición nucleófila intramolecular.

A optimización das condicións de formación do acetiluro de litio e a súa posterior adición nucleófila sobre a cetona **133**, proporcionou o diastereoisómero desexado **134*R*** con un alto rendemento, sendo mínima a formación do diastereoisómero *S*. Desprotección do bisacetal en **134*R*** e posterior protección do *cis*-

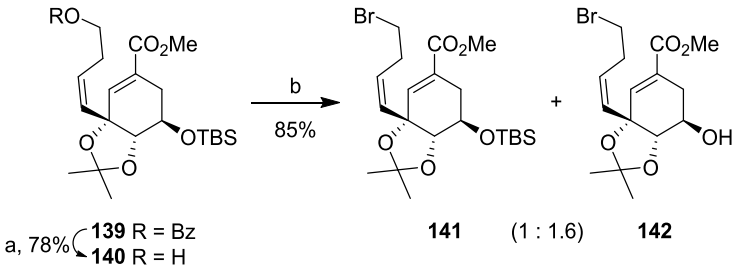
1,2-diol en **135** proporcionou o composto **136** con rendementos moderados. A redución estereoselectiva do alquino a alqueno *Z* empregando as condicións de hidroxenación de Lindlar non tivo lugar, recuperándose a sustancia de partida intacta. Optouse entón por unha hidroxenación por transferencia, catalizada por Pd e usando ácido fórmico como donante do hidróxeno,[143] o que proporcionou o alqueno **138** coa configuración desexada en baixo rendemento (12%).[140] Debido a que os alcohois tamén poden actuar como donantes de hidróxeno en este tipo de reaccións,[144] decidiuse explorar a necesidade de protección do hidroxilo libre en C5 a fin de comprobar a súa posible influencia nos baixos rendementos previamente obtidos. Sen embargo, observouse experimentalmente que a redución por transferencia proporcionou mellores resultados a partir do substrato co hidroxilo libre fronte ao hidroxilo protexido (Esquema 18).



Esquema 18. *Reactivos e condicións*: (a) **132**, LiHMDS, THF, –78 ºC → t.a. (b) TFA/H_2O (20:1), 0 ºC. (c) 2,2-DMP, CSA, acetona, Δ. (d) Imidazol, TBSCl, DMF, t.a. (e) $Pd_2(dba)_3$, dppb, HCO_2H, dioxano, 80 ºC. (f) 2,6-lutidina, TBSOTf, CH_2Cl_2, t.a.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A desprotección do grupo benzoilo seguida de reacción de Apple, usando CBr_4 ou *N*-bromosuccinimida como axentes haloxenantes, proporcionou unha mestura dos compostos **141** e **142**, en proporcións 1.5:1 e 1:1.6 respectivamente, sendo o rendemento global das reaccións do 85% en ambos casos (Esquema 19).



Esquema 19. *Reactivos e condicións*: (a) K_2CO_3, MeOH, t.a. (b) NBS, PPh_3, t.a.

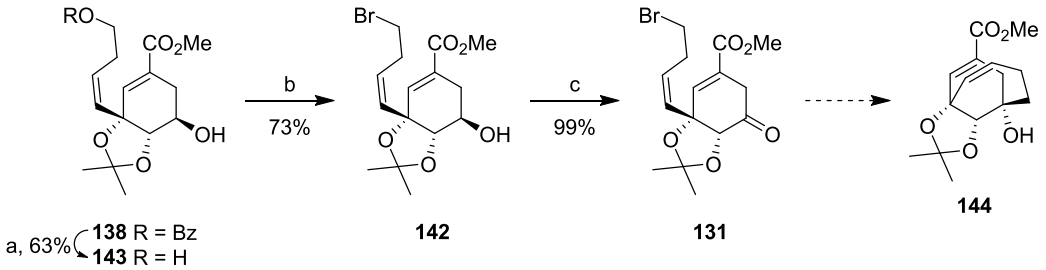
Os intentos posteriores de transformar **141** en **142** (Táboa 10) non deron o resultado esperado, as probas de RMN e HPLC-MS parecían indicar que ademais do sililéter tamén se producía a eliminación do bromo, dando lugar a un dieno.

Táboa 10. Intentos de obter **142** a partir de **141** *Reactivos e condicións.*

	Reactivos	Disolvente [ ]	Temperatura	Tempo
1	TBAF (1.2 eq.)	THF (0.2 M)	t.a.	1.5h
2	AcOH (3 eq.), TBAF (2 eq.)	THF (0.05 M)	0 $^oC \rightarrow$ t.a.	24h
3	NBS (2.2 eq)	THF (0.05 M)	t.a.	48h

Debido ás dificultades antes mencionadas para desprotexer o composto **141**, probouse a realizar a ruta a partir do composto **138** mantendo o hidroxilo libre, obténdose así o composto **142** en dúas etapas con un rendemento global do 46%. A oxidación do alcohol **142** con periodinano de Dess-Martin proporcionou a cetona **131**, intermedio clave previo á ciclación intramolecular para obter o biciclo desexado **144** (Esquema 20).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Esquema 20. *Reactivos e condicións*: (a) K_2CO_3, MeOH, t.a. (b) NBS, PPh_3, t.a. (c) Dess-Martin, CH_2Cl_2, t.a.

Finalmente, leváronse a cabo os intentos de obtención do biciclo **144** mediante unha reacción de ciclación intramolecular, empregando as condicións descritas na táboa 11. A formación *in situ* de derivados organometálicos de Zn ou Mg, previamente activados, sobre o bromuro da cadea lateral non resultou na obtención do composto desexado, observándose en ambos casos o que podería ser o resultado de homoacoplamento. As probas realizadas de ^{1}H-RMN, IR e HPLC-MS mostraron algunhas sinais duplicadas, unha banda ancha e intensa na zona dos hidroxilos e o patrón isotópico de bromo respectivamente.

Intentouse entón a ciclación mediante unha reacción intramolecular tipo Barbier, empregando samario (II) como metal de transición.[145] En este caso observouse a formación dunha mestura de produtos complexa, sen embargo, e a pesar de lograr illar algúns deles mediante cromatografía, non se detectou mediante RMN e HPLC-MS a formación do produto desexado.

Táboa 11. Intentos de obter o biciclo **160** *Reactivos e condicións.*

	Reactivos	Disolvente [ ]	Temperatura	Tempo
1	Mg (2 eq.)	THF (20 mM)	t.a.	16-24h
2	Zn (2 eq.)	THF (20 mM)	t.a	16-24h
3	SmI_2 (2 eq.)	THF (33 mM)	t.a.	16-24h

Desafortunadamente, a falta de tempo non nos permitiu determinar a estrutura química dos compostos obtidos, nin explorar condicións ou rutas alternativas para a obtención dos compostos bicíclicos obxectivo **25** e **26**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. Metodoloxía: Parte Experimental

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1 Procedementos Xerais: Materiais, Métodos e Equipos

Todas as sustancias de partida dispoñibles comercialmente empregáronse tal e como se reciben do provedor correspondente. En xeral, utilizáronse disolventes secos comerciais (THF, DMF, DMSO, metanol, diclorometano, tolueno, dioxano e cloroformo) ou de calidade HPLC nos casos en que non foi necesaria atmosfera inerte (acetonitrilo, acetato de etilo e hexano). As aminas empregadas (piridina, trietilamina e *N,N*-diisopropiletilamina) secáronse previamente ao seu uso, por destilación dende un axente desecante axeitado (CaH_2). Os metais empregados (Mg e Zn) activáronse previamente ao seu uso, segundo os procedementos descritos por Amarego e Perrin.[146]

O seguimento das reaccións efectuouse mediante cromatografía en capa fina empregando placas de aluminio con xel de sílice 60 F_{254} (Merck). As manchas visualizaronse con luz UV (254 nm) e por revelado con disolucións de Ce-Mo, ninhidrina, ou permanganato potásico, segundo o caso.

A purificación dos compostos realizouse mediante cromatografía en columna a presión reducida sobre xel de sílice, Normasil 60 (40–63 μm, VWR) como fase estacionaria. Ou mediante o uso dun equipo de purificación automática, Büchi Pure C-810 Flash, equipado con columnas Claricep Flash Silica Amorphous (40–60 μm, 60 Å, Agela).

As reaccións a baixa temperatura leváronse a cabo nun criocool Julabo FT-902 ou en baños de xeo-auga para reaccións a 0 ^{o}C e acetona-xeo seco para –78 ^{o}C.

As liofilizacións realizáronse en un liofilizador Termo Savant MODULYOD-230 acoplado a unha bomba Edwards RV de alto baleiro.

Os espectros de RMN rexistráronse con espectrómetos VARIAN Mercury 300 ou Innova 500 ás frecuencias indicadas e en disolventes deuterados. A asignación das sinais realizouse mediante unha combinación de experimentos (^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN, con desacoplamento de banda ancha e Dept-135) e, nalgúns casos,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mediante experimentos de espectroscopía de correlación homonuclear (COSY) e de efecto nuclear Overhauser (NOE). Os desprazamentos químicos (δ) indícanse en unidades de ppm e as constantes de acoplamento (*J*) en Herzios.

Os espectros de masas realizados rexistráronse nun espectrómetro BRUKER Microtof utilizando electrospray (ESI) como procedemento de ionización. Os datos obtidos exprésanse en unidades de masa (*m*/z).

Os espectros de IR rexistráronse en un espectrofotómetro FT/IR Perkin Elmer con reflectancia total atenuada (ATR).

Os puntos de fusión determináronse nun equipo Büchi M-560.

As rotacións ópticas específicas ($[\alpha]_D^{20}$) medíronse nun polarímetro automático Jasco P-2000 e exprésanse en 10^{-1} grados cm^2g^{-1}.

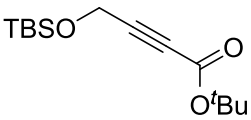
Empregouse auga desionizada e purificada (Mili-Q) en un equipo Millipore Mili-Q-POD.

As representacións gráficas das proteínas realizáronse co programa PyMOL.[147]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2 Compostos β-lactámicos sintetizados

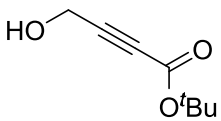
4.2.1 4-(*terc*-butildimetilsililoxi)but-2-inoato de *terc*-butilo (62)



62

Unha disolución do alquino **61** (7.35 g, 43 mmol) en tetrahidrofurano seco (86 mL), baixo atmosfera inerte e a –78 °C, tratouse con *n*BuLi (17 mL, 43 mmol, *ca* 2.5 M en hexano). Axitouse durante 30 min a –78 °C, engadiuse di-*terc*-butil dicarbonato (9.42 g, 43 mmol) e axitouse a temperatura ambiente durante 1.5 h. Engadiuse auga fría e extraeuse con dietil éter (x3). Os extractos orgánicos combinados laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (5:95) acetato de etilo/hexano, proporcionou o éster **62** (10.4 g, 89%) en forma de líquido amarelo. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.40 (s, 2H, CH_2), 1.49 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.90 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) e 0.12 (s, 6H, 2×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 152.5 (C), 83.6, (C), 83.5 (C), 78.1 (C), 51.6 (CH_2), 28.1 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 25.9 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 18.4 ($\underline{C}(CH_3)_3$) e –5.1 (2×CH_3) ppm. IR (ATR): 2237 (C≡C) e 1713 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 293 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{14}H_{26}O_3SiNa$ (MNa^+): 293.1543; encontrado, 293.1545.

4.2.2 4-hidroxibut-2-inoato de *terc*-butilo (63)



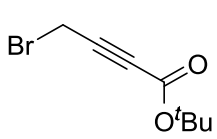
63

Unha disolución do éster **62** (10.4 g, 38.5 mmol) en acetonitrilo (100 mL), en un vial de plástico e a temperatura ambiente, tratouse con unha disolución de ácido fluorhídrico en piridina (10 mL, 0.39 mol, *ca* 3.85 M) e axitouse durante 1.5 h. A mestura de reacción verteuse sobre unha disolución saturada de $NaHCO_3$ e axitouse durante 30 min. Separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (×3). Os extractos orgánicos combinados laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (20:80) acetato de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

etilo/hexano, proporcionou o alcohol **63** (5.44 g, 90%), en forma de líquido incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.36 (s, 2H, CH_2), 2.54 (s ancho, 1H, OH) e 1.48 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 152.6 (C), 84.1 (C), 83.2 (C), 78.6 (C), 50.7 (CH_2) e 28.1 ($C(\underline{C}H_3)_3$) ppm. IR (ATR): 3402 (OH), 2237 (C≡C) e 1707 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 179 (MNa^+). EMAR calculado para $C_8H_{12}O_3Na$ (MNa^+): 179.0679; encontrado, 179.0677.

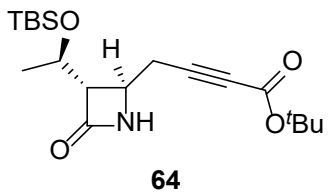
4.2.3 4-bromobut-2-inoato de *terc*-butilo (59)



59

Unha disolución do alcohol **63** (5.44 g, 34.8 mmol) en diclorometano seco (87 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 °C, tratouse con tetrabromuro de carbono (18.48 g, 55.7 mmol) e trifenilfosfina (10.7 g, 40.8 mmol). A mestura axitouse a 0 °C durante 1.5 h. Eliminouse o disolvente a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (5:95) acetato de etilo/hexano, proporcionou o bromuro **59** (6.58 g, 86%), en forma de líquido incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.93 (s, 2H, CH_2) e 1.49 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 151.9 (C), 84.2 (C), 79.1 (C), 78.7 (C), 20.1 ($C(\underline{C}H_3)_3$) e 12.1 (CH_2) ppm. IR (ATR): 2243 (C≡C) e 1707 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 241 e 243 (MNa^+). EMAR calculado para $C_8H_{11}{}^{79}BrO_2Na$ (MNa^+): 240.9835; encontrado, 240.9832.

4.2.4 4-((2*R*,3*S*)-3-(1-((*terc*-butildimetilsililoxi)etil)-4-oxoazetidin-2-il)but-2-inoato de *terc*-butilo (64)

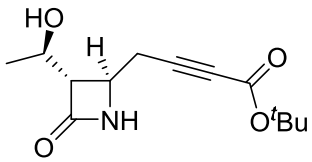


64

Unha suspensión de (3*R*,4*R*)-4-acetoxi-3-[(*R*)-1-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil]-2-acetidinona **55** (450 mg, 1.58 mmol) e polvo de zinc activo (470 mg, 7.12 mmol) en tetrahidrofurano seco (10 mL), baixo atmosfera inerte, tratouse co bromuro **59** (1.04 g, 4.74 mmol) e quentouse a 45 °C durante 1 h. Tras arrefriar a temperatura ambiente, diluíuse con disolución saturada de NH_4Cl. Separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (×3). Os extractos orgánicos combinados secáronse ($MgSO_4$ anh.), filtráronse e

concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (30:70) acetato de etilo/hexano, proporcionou a lactama **64** (500 mg, 86%), en forma de sólido branco. $[\alpha]_D^{20}$= + 7.7 (*c* 1.0, $CHCl_3$). Pf: 149–151 °C. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.95 (s, 1H, NH), 4.21 (m, 1H, CHO), 3.91 (td, *J* = 6.3 e 2.2 Hz, 1H, H4), 2.90 (dd, *J* = 3.9 e 2.1 Hz, 1H, H3), 2.65 (dd, *J* = 6.3 e 1.7 Hz, 2H, CH_2), 1.49 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.23 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH_3), 0.87 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) e 0.07 (d, *J* = 1.6 Hz, 6H, 2×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.7 (C), 152.5 (C), 83.7 (C), 81.7 (C), 76.5 (C), 65.0 (CH), 64.5 (CH), 48.2 (CH), 28.1 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 25.9 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 25.1 (CH_2), 22.7 (CH_3), 18.1 ($\underline{C}(CH_3)_3$), –4.1 (CH_3) e –4.9 (CH_3) ppm. IR (ATR): 2954 (NH), 2237 (C≡C), 1755 (C=O) e 1717 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 390 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{19}H_{33}NO_4SiNa$ (MNa^+): 390.2071; encontrado, 390.2070.

4.2.5 4-((2*R*,3*S*)-3-(1-hidroxietil)-4-oxoazetidin-2-il)but-2-inoato de *terc*-butilo (65)



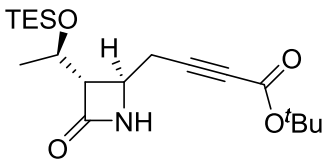
65

Unha disolución da lactama **64** (300 mg, 0.89 mmol) en acetonitrilo (4 mL), en un vial de plástico e a temperatura ambiente, tratouse con unha disolución de ácido fluorhídrico en piridina (0.21 mL, 8.11 mmol, *ca* 3.85 M) e axitouse durante 5 h. A mestura de reacción verteuse sobre unha disolución saturada de $NaHCO_3$ e axitouse durante 30 min. Separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (×3). Os extractos orgánicos combinados laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (50:50) acetato de etilo/hexano, proporcionou o alcohol **65** (182 mg, 87%), en forma de sólido branco. $[\alpha]_D^{20}$= + 13.3 (*c* 1.0, $CHCl_3$). Pf: 100–101 °C. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.71 (s, 1H, NH), 4.19 (m, 1H, C<u>H</u>OH), 3.90 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, H3), 3.08 (s, 1H, OH) 2.95 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H4), 2.67 (d, *J* = 6.0, 2H, CH_2), 1.46 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) e 1.28 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH_3)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 168.5 (C), 152.6 (C), 83.8 (C), 81.9 (C), 76.5 (C), 64.3 (CH), 63.6 (CH), 48.4 (CH), 28.0 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 24.8 (CH_2) e 21.7 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3329 (OH), 2237 (C≡C), 1743 (C=O) e 1700 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 276 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{13}H_{19}NO_4Na$ (MNa^+): 276.1206; encontrado, 276.1203.

4.2.6 4-((2*R*,3*S*)-4-oxo-3-(1-(trietilsililoxi)etil)azetidin-2-il)but-2-inoato de *terc*-butilo (66)

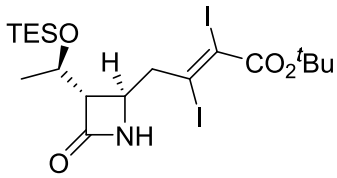


66

Unha disolución do alcohol **65** (0.24 g, 0.95 mmol) e imidazol (0.13 g, 1.9 mmol), en acetato de etilo (5 mL), tratouse con clorotrietilsilano (0.18 mL, 1.0 mmol) e axitouse a temperatura ambiente durante 1.5 h. Diluíuse con acetato de etilo/auga, separáronse as fases, e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (×3). Os extractos orgánicos combinados laváronse con disolución saturada de NaCl (×3), secáronse ($MgSO_4$ anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (25:75) acetato de etilo/hexano, proporcionou a lactama **66** (0.32 g, 91%), en forma de sólido branco. $[\alpha]_D^{20}$ = + 10.5 (*c* 1.0, $CHCl_3$). Pf: 99–100 ^{o}C. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.07 (s, 1H, NH), 4.20 (m, 1H, CHO), 3.88 (dt, *J* = 6.3 e 2.0 Hz, 1H, H4), 2.88 (dd, *J* = 4.5 e 2.0 Hz, 1H, H3), 2.68 (dd, *J* = 17.2 e 5.8 Hz, 1H, C$\underline{H}$H), 2.60 (dd, *J* = 17.2 e 6.7 Hz, 1H, CH$\underline{H}$), 1.48 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.23 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH_3), 0.94 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.59 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.7 (C), 152.5 (C), 83.7 (C), 81.7 (C), 76.5 (C), 65.2 (CH), 64.4 (CH), 48.5 (CH), 28.1 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 25.9 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 25.1 (CH_2), 22.8 (CH_3), 6.9 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.1 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 3219 (NH), 2237 (C≡C) e 1707 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 390 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{19}H_{33}NO_4SiNa$ (MNa^+): 390.2071; encontrado, 390.2070.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

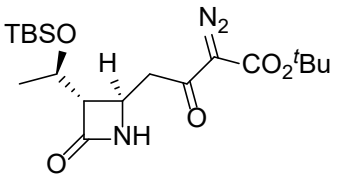
4.2.7 (*E*)-2,3-diiodo-4-((2*R*,3*S*)-3-(1-((*terc*-butildimetilsililoxi)etil)-4-oxoazetidin-2-il)but-2-inoato de *terc*-butilo (58)



58

Unha disolución da lactama **66** (100 mg, 0.27 mmol) en diclorometano seco (1 mL), baixo atmosfera inerte e tapada da luz, tratouse con ioduro sódico (130 mg, 0.84 mmol) e iodo (80 mg, 0.33 mmol). A mestura quentouse a 30 ^{o}C durante 24 h. Tras arrefriar a temperatura ambiente, diluíuse en diclorometano e 10% Na_2SO_3 (ac.), separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con diclorometano (x3). Os extractos orgánicos combinados laváronse con disolución saturada de NaCl (x2), secáronse ($MgSO_4$ anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (25:75) acetato de etilo/hexano, proporcionou o dioduro **58** (37 mg, 22%). $[\alpha]_D^{20}$ = –5.1 (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.06 (s, 1H, NH), 4.24 (m, 1H, CHO), 4.10 (m, 1H, H3), 2.10 (m, 3H, H4 + CH_2), 1.53 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.25 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 0.96 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.61 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.9 (C), 165.2 (C), 96.5 (C), 88.5 (C), 84.3 (C), 65.2 (CH), 64.3 (CH), 52.6 (CH_2), 49.7 (CH), 27.8 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 22.9 (CH_3), 7.0 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.2 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 3250 (NH), 1752 (C=O) e 1726 (C=O) cm^{-1}.

4.2.8 4-((2*R*,3*S*)-3-(1-((*terc*-butildimetilsililoxi)etil)-4-oxoazetidin-2-il)-2-diazo-3-oxobutanoato de *terc*-butilo (69)



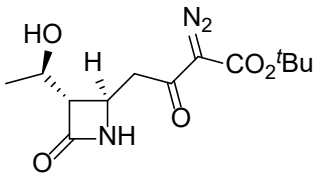
69

Unha disolución do diazocomposto **68** (0.55 g, 2.99 mmol) en diclorometano seco (5 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 ^{o}C, tratouse con trietilamina seca (1.66 mL, 11.9 mmol) e trifluorometanosulfonato de *terc*-butildimetilsililo (0.82 mL, 3.58 mmol), a mestura axitouse durante 1 h a temperatura ambiente. Eliminouse o disolvente a presión reducida. O residuo obtido disolveuse en diclorometano seco (5 mL) e engadiuse, vía cánula, sobre unha

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

disolución de (3*R*,4*R*)-4-acetoxi-3-[(*R*)-1-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil]-2-acetidinona (0.43 g, 1.49 mmol) e cloruro de zinc (0.2 g, 1.49 mmol) en diclorometano seco (10 mL). Axitouse a temperatura ambiente durante 2 h. Engadiuse disolución saturada de NH_4Cl, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con diclorometano (×3). Os extractos orgánicos xuntáronse, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (40:60) acetato de etilo/hexano, proporcionou a lactama **69** (0.39 g, 64%), en forma de sólido branco. $[\alpha]_D^{20}$ = 53.1 (*c* 0.21, $CHCl_3$). Pf: 114–116 °C. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.00 (s, 1H, NH), 4.20 (quint, *J* = 5.6 Hz, 1H, CHO), 4.02 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H4), 3.37 (dd, *J* = 17.8 e 2.9 Hz, 1H, CH<u>H</u>), 2.97 (dd, *J* = 17.8 e 10.0 Hz, 1H, C<u>H</u>H), 2.86 (m, 1H, H3), 1.53 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.20 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 0.87 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) e 0.06 (s, 6H, 2×CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 190.5 (C), 168.0 (C), 160.0 (C), 83.1 (C), 76.5 (C), 65.2 (CH), 63.5 (CH), 46.2 (CH), 45.1 (CH_2), 28.0 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 25.5 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 22.2 (CH_3), 17.6 ($\underline{C}(CH_3)_3$), – 4.6 (CH_3) e – 5.3 (CH_3) ppm. IR (ATR): 2128 (N≡N), 1754 (C=O) e 1713 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 412 (MH^+). EMAR calculado para $C_{19}H_{34}N_3O_5Si$ (MH^+): 412.2262; encontrado, 412.2269.

4.2.9 2-Diazo-4-((2*R*,3*S*)-3-(1-hidroxietil)-4-oxoazetidin-2-il)-3-oxobutanoato de *terc*-butilo (70)

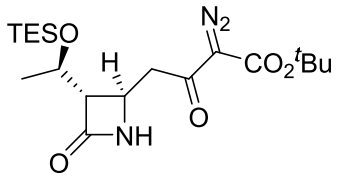


70

Unha disolución do diazocomposto **69** (275 mg, 0.67 mmol) en acetonitrilo (3.35 mL), en un recipiente de plástico e a temperatura ambiente, tratouse con unha disolución de ácido fluorhídrico en piridina (0.17 mL, 6.7 mmol, *ca* 3.85 M). A disolución resultante axitouse durante 1.5 h e verteuse gota a gota sobre disolución saturada de $NaHCO_3$ (20 mL). A mestura resultante axitouse durante 30 min e extraeuse con acetato de etilo (×3). Os extractos orgánicos combinados laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida, proporcionando o alcohol

70 (198 mg, 99%), en forma de espuma branca. $[\alpha]_D^{20}$= 0.9 (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.47 (s, 1H, NH), 4.12 (quint, *J* = 6.3 Hz, 1H, CHO), 3.94 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H4), 3.47 (s, 1H, OH), 3.21 (m, 2H, CH_2), 2.83 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, H3), 1.49 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) e 1.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 191.4 (C), 168.0 (C), 160.0 (C), 83.9 (C), 65.8 (CH), 64.3 (CH), 47.9 (CH), 45.2 (CH_2), 28.3 ($C(\underline{C}H_3)_3$) e 21.3 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3360 (OH), 2134 (N≡N), 1743 (C=O) e 1707 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 298 (MH^+). EMAR calculado para $C_{13}H_{20}N_3O_5$ (MH^+): 298.1397; encontrado, 298.1399.

4.2.10 2-Diazo-3-oxo-4-((2*R*,3*S*)-4-oxo-3-(1-((trietilsililoxi)etil)azetidin-2-il)butanoato de *terc*-butilo (71)



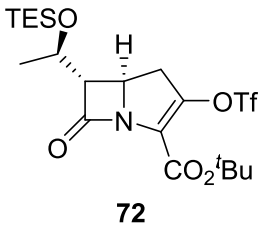
71

Unha disolución do alcohol **70** (1.54 g, 5.18 mmol) e imidazol (0.71 g, 10.36 mmol), en acetato de etilo (25 mL) e a temperatura ambiente, tratouse con clorotrietilsilano (0.98 mL, 5.70 mmol) e axitouse durante 1.5 h. A mestura de reacción diluíuse con (50:50) acetato de etilo/auga, separáronse as fases, e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (×3). Os extractos orgánicos combinados laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (50:50) dietil éter/hexano, proporcionou a lactama **71** (1.98 g, 93%), en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20}$= 52.3 (*c* 1.0, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.06 (s, 1H, NH), 4.18 (quint, *J* = 5.6 Hz, 1H, CHO), 3.99 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H4), 3.36 (dd, *J* = 17.8 e 2.6 Hz, 1H, C$\underline{H}$H), 2.96 (dd, *J* = 17.8 e 10.0 Hz, 1H, C$\underline{H}$H), 2.83 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H3), 1.52 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.21 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 0.93 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.58 (q, *J* = 8.0 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 191.2 (C), 168.2 (C), 160.4 (C), 83.8 (C), 65.6 (CH), 63.9 (CH), 46.8 (CH), 45.5 (CH_2), 28.4 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 22.8 (CH_3), 6.9 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.1 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 3280 (NH), 2132 (N≡N), 1760 (C=O) e

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1711 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 412 (MH^+). EMAR calculado para $C_{19}H_{34}N_3O_5Si$ (MH^+): 412.2262; encontrado, 412.2263.

4.2.11 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-trifluorometanosulfoniloxi-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (72)



72

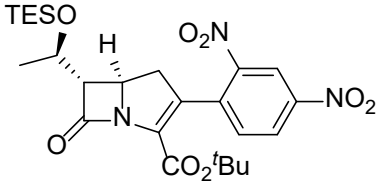
Unha disolución da diazolactama **71** (100 mg, 0.24 mmol) e octanoato de rodio (1 mg, 1.2 μmol) en diclorometano seco (0.6 mL), baixo atmosfera inerte, quentouse a refluxo durante 30 min. Esta mestura arrefriouse a –78 °C, tratouse con *N*,*N*-diisopropiletilamina (0.05 mL, 0.29 mmol), tetrametilpiperidina (0.10 mL, 0.58 mmol) e anhídrido trifluorometanosulfónico (0.04 mL, 0.27 mmol), e deixouse axitando a esa temperatura durante 15 min. A mestura de reacción diluíuse con (50:50) diclorometano/auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con diclorometano (×3). Os extractos orgánicos xuntáronse, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (5:95) acetato de etilo/hexano, proporcionou o triflato **72** (90 mg, 72%), en forma de aceite amarelo.$[\alpha]_D^{20} = -13.9$ (*c* 4.5, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.21 (m, 2H, CH + H5), 3.25 (dd, *J* = 5.6 e 3.2 Hz, 1H, H6), 3.11 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H4), 3,08 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, H4), 1.53 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.24 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 0.94 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.59 (q, *J* = 7.8 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 176.2 (C), 157.6 (C), 145.4 (C), 127.0 (C), 84.3 (C), 68.8 (CH), 65.6 (CH), 50.4 (CH), 35.8 (CH_2), 28.0 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 22.6 (CH_3), 6.9 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.0 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. ^{19}F RMN (282 MHz, $CDCl_3$) δ: – 74.33 (s, 3F, CF_3). IR (ATR): 1725 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 481 (MNa^+–^{t}Bu). EMAR calculado para $C_{16}H_{23}F_3NO_7SSiNa$ (MNa^+–^{t}Bu): 481.0935; encontrado, 481.1801.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.12 Procedemento xeral para a reacción de acoplamento de Stille

Unha disolución da diazolactama **71** (1 mmol) e octanoato de rodio (5 μmol) en diclorometano seco (0.4 M), baixo atmosfera inerte, quentouse a refluxo durante 30 min. Esta mestura arrefriouse a –78 °C, tratouse con *N*,*N*-diisopropiletilamina (1.2 mmol), tetrametilpiperidina (2.4 mmol) e anhídrido trifluorometanosulfónico (1.1 mmol), e deixouse axitando a esa temperatura durante 15 min. A mestura de reacción diluíuse con (50:50) diclorometano/auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con diclorometano (×3). Os extractos orgánicos xuntáronse, laváronse con disolución saturada de NaCl (x3), secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. O crudo de reacción obtido, que contén o triflato **72**, empregouse de inmediato e sen purificación previa. Unha disolución do triflato **72** (1 mmol) en *N*-metilpirrolidona (0.2–0.4 M), previamente desoxixenada e baixo atmosfera inerte, tratouse con cloruro de zinc (1.8 mmol), tris(2-furil)fosfina (90 μmol), tris(dibencilidenacetona) dipaladio (90 μmol) e o correspondente estannano (1.1–1.3 mmol). A mestura final quentouse a 30 °C durante 3 h. Tras arrefriar a temperatura ambiente, diluíuse en auga e acetato de etilo, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos xuntáronse, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, neutralizada con trietilamina (1%), proporcionou os compostos desexados.

4.2.13 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-(2,4-dinitrofenil)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (82a)

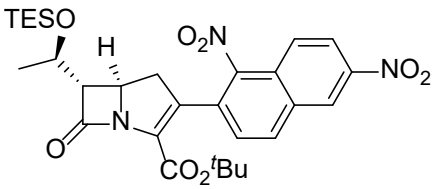


82a

Preparouse seguindo o procedemento xeral de Stille descrito na páxina 101, usando diazolactama **71** (320 mg, 0.77 mmol), octanoato de rodio (3 mg, 3.84 μmol), diclorometano seco (2 mL), *N*,*N*-diisopropiletilamina (0.16 mL, 0.92 mmol), tetrametilpiperidina (0.31 mL, 1.84 mmol),

anhídrido trifluorometanosulfónico (0.14 mL, 0.84 mmol), *N*-metilpirrolidona (2 mL), cloruro de zinc (190 mg, 1.38 mmol), tris(2-furil)fosfina (16 mg, 69 μmol), tris(dibencilidenacetona) dipaladio (63 mg, 69 μmol) e o estannano **74** (330 mg, 1 mmol). Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (30:70) dietil éter/hexano, proporcionou o composto **82a** (235 mg, 57%), en forma de espuma laranxa. $[\alpha]_D^{20}$= –75.1 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.87 (s, 1H, ArH), 8.45 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 4.39 (m, 1H, *J* = 10.4, 7.7 e 2.7 Hz, H5), 4.24 (m, 1H, *J* = 11.9 e 5.9 Hz, CH), 3.33 (dd, *J* = 5.6 e 3.3 Hz, 1H, H6), 3.21 (ddd, *J* = 10.3, 8.1 e 7.7, Hz, 2H, CH_2), 1.26 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 1.23 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.93 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.59 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.9 (C), 159.0 (C), 147.9 (C), 147.3 (C), 137.3 (C), 135.8 (C), 131.7 (CH), 127.4 (CH), 120.1 (CH), 83.1 (C), 68.0 (CH), 65.8 (CH), 52.9 (CH), 42.3 (CH_2), 27.6 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 22.6 (CH_3), 6.8 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 4.9 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 1784 (C=O), 1719 (C=O), 1600 (NO_2) e 1532 (NO_2) cm^{-1} EM (ESI) *m/z* = 534 (MH^+). EMAR calculado para $C_{25}H_{36}N_3O_8Si$ (MH^+): 534. 2266; encontrado, 534. 2268.

4.2.14 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-(1,6-dinitronaftalen-2-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (82b)

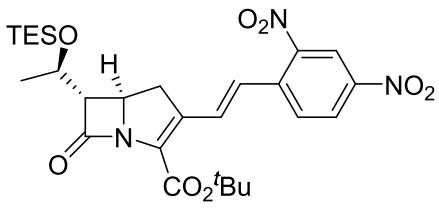


82b

Preparouse seguindo o procedemento xeral de Stille descrito na páxina 101, usando diazolactama **71** (170 mg, 0.40 mmol), octanoato de rodio (2 mg, 2.02 μmol), diclorometano seco (1 mL), *N*,*N*-diisopropiletilamina (80 μL, 0.49 mmol), tetrametilpiperidina (0.17 mL, 0.97 mmol), anhídrido trifluorometanosulfónico (70 μL, 0.44 mmol), *N*-metilpirrolidona (1 mL), cloruro de zinc (99 mg, 0.73 mmol), tris(2-furil)fosfina (8 mg, 36 μmol), tris(dibencilidenacetona) dipaladio (33 mg, 36 μmol) e o estannano **77** (200 mg, 0.53 mmol). Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (30:70) dietil éter/hexano,

proporcionou o composto **82b** (43 mg, 18%), en forma de espuma laranxa. $[\alpha]_D^{20}$ = 77.4 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.87 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, ArH), 8.40 (dd, 1H, *J* = 9.4 e 2.2 Hz, ArH), 8.22 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 8.06 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, ArH), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 4.37 (dt, 1H, *J* = 9.7 e 3.1 Hz, H5), 4.26 (quint, 1H, *J* = 6.2 Hz, CH), 3.31 (dd, *J* = 6.0 e 3.1 Hz, 1H, H6), 3.28 (dd, *J* = 18.2 e 8.6 Hz, 1H, CHH), 3.20 (dd, *J* = 18.2 e 10.0 Hz, 1H, CHH), 1.29 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 1.16 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.97 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.62 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.8 (C), 158.7 (C), 146.5 (C), 135.3 (C), 133.2 (C), 133.1 (CH), 132.1 (C), 131.2 (C), 127.8 (CH), 127.1 (C), 124.6 (CH), 124.5 (CH), 122.4 (CH), 83.0 (C), 68.0 (CH), 66.0 (CH), 53.1 (CH), 42.7 (CH_2), 30.4 (C), 27.6 ($C(CH_3)_3$), 22.7 (CH_3), 6.9 (CH_2CH_3) e 5.1 (CH_2CH_3) ppm. IR (ATR): 1783 (C=O), 1718 (C=O), 1599 (NO_2) e 1531 (NO_2) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 606 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{29}H_{37}N_3O_8SiNa$ (MNa^+): 606.2242; encontrado, 606.2241.

4.2.15 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (85a)



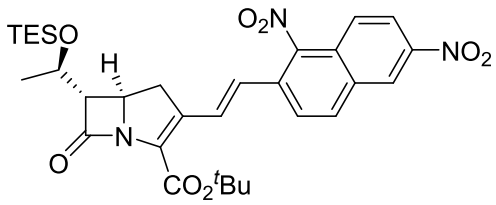
85a

Preparouse seguindo o procedemento xeral de Stille descrito na páxina 101, usando diazolactama **71** (200 mg, 0.49 mmol), octanoato de rodio (2 mg, 2.43 μmol), diclorometano seco (1.2 mL), *N*,*N*-diisopropiletilamina (0.1 mL, 0.58 mmol), tetrametilpiperidina (0.2 mL, 1.17 mmol), anhídrido trifluorometanosulfónico (90 μL, 0.54 mmol), *N*-metilpirrolidona (1.2 mL), cloruro de zinc (119 mg, 0.87 mmol), tris(2-furil)fosfina (10 mg, 44 μmol), tris(dibencilidenacetona) dipaladio (41 mg, 44 μmol) e o estannano **75** (270 mg, 0.63 mmol). Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (15:85) dietil éter/hexano, proporcionou o composto **85a** (185 mg, 68%), en forma de aceite amarelo. $[\alpha]_D^{20}$ = – 40.5 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.76 (s, 1H, ArH), 8.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 8.12 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CH), 7.97 (d, *J* = 8.8 Hz,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1H, ArH), 7.07 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 4.24 (m, 2H, CH + H5), 3.19 (dd, *J* = 5.2 e 3.3 Hz, 1H, H6), 3.12 (t, *J* = 9.2 Hz, 2H, H4), 1.55 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.26 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH_3), 0.96 (t, *J* = 7.8 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.60 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.9 (C), 160.4 (C), 147.4 (C), 146.5 (C), 139.0 (C), 138.1 (C), 133.4 (C), 130.9 (CH), 129.3 (CH), 127.2 (CH), 126.2 (CH), 120.8 (CH), 83.1 (C), 67.6 (CH), 65.6 (CH), 52.2 (CH), 36.4 (CH_2), 28.1 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 22.6 (CH_3), 6.9 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.0 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 1788 (C=O), 1703 (C=O), 1596 (NO_2) e 1528 (NO_2) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 582 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{27}H_{37}N_3O_8SiNa$ (MNa^+): 582.2242; encontrado, 582.2247.

4.2.16 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaphthalen-2-il)vinil)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (85b)

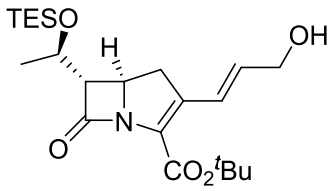


85b

Preparouse seguindo o procedemento xeral de Stille descrito na páxina 101, usando diazolactama **71** (75 mg, 0.18 mmol), octanoato de rodio (1 mg, 0.9 μmol), diclorometano seco (1 mL), *N*,*N*-diisopropiletilamina (40 μL, 0.22 mmol), tetrametilpiperidina (70 μL, 0.44 mmol), anhídrido trifluorometanosulfónico (30 μL, 0.2 mmol), *N*-metilpirrolidona (2 mL), cloruro de zinc (45 mg, 0.32 mmol), tris(2-furil)fosfina (4 mg, 16 μmol), tris(dibencilidenacetona) dipaladio (15 mg, 16 μmol) e o estannano **78** (123 mg, 0.24 mmol). Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (15:85) dietil éter/hexano, proporcionou o composto **85b** (77 mg, 69%), en forma de espuma laranxa. $[\alpha]_D^{20} = -103.2$ (*c* 1, $CHCl_3$). ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.78 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.32 (dd, *J* = 9.3 e 2.3 Hz, 1H, ArH), 8.24 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 8.08 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.79 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, ArH), 6.55 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 4.25 (m, 2H, CH + H5), 3.20 (dd, *J* = 5.4 e 3.1 Hz, 1H, H6), 3.02 (m, 2H, H4), 1.59 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 0.98 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.62 (q, *J* = 7.8 Hz, 6H, 3×CH_2)

ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.9 (C), 160.5 (C), 146.4 (C), 146.2 (C), 139.0 (C), 138.1 (C), 133.1 (C), 132.3 (CH), 131.9 (C), 130.1 (C), 130.0 (CH), 127.3 (C), 124.9 (CH), 124.7 (CH), 124.5 (CH), 123.9 (CH), 122.4 (CH), 83.1 (C), 67.7 (CH), 65.7 (CH), 52.2 (CH), 36.3 (CH_2), 28.2 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 22.7 (CH_3), 6.9 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.1 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 1786 (C=O), 1700 (C=O) e 1531 (NO_2) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 632 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{31}H_{39}N_3O_8SiNa$ (MNa^+): 632.2399; encontrado, 632.2383.

4.2.17 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-hidroxiprop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (83)



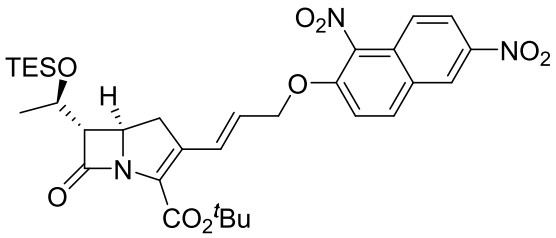
83

Preparouse seguindo o procedemento xeral de Stille descrito na páxina 101, usando diazolactama **71** (600 mg, 1.46 mmol), octanoato de rodio (6 mg, 7.3 μmol), diclorometano seco (3.65 mL), *N*,*N*-diisopropiletilamina (0.30 mL, 1.75 mmol), tetrametilpiperidina (0.60 mL, 3.50 mmol), anhídrido trifluorometanosulfónico (0.26 mL, 1.6 mmol), *N*-metilpirrolidona (3.65 mL), cloruro de zinc (358 mg, 2.62 mmol), tris(2-furil)fosfina (30 mg, 0.13 mmol), tris(dibencilidenacetona) dipaladio (124 mg, 0.13 mmol) e o estannano **79** (660 mg, 1.90 mmol). Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (35:65) dietil éter/hexano, proporcionou o composto **83** (420 mg, 68%), en forma de aceite amarelo. $[\alpha]_D^{20} = -7.7$ (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.31 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, C$\underline{H}$=CH), 5.93 (dt, *J* = 16.0 e 5.6 Hz, 1H, CH=C$\underline{H}$), 4.27 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, C$\underline{H}_2$OH), 4.19 (dt, *J* = 12.4 e 6.3 Hz,, 1H, CH), 4.10 (td, *J* =9.4 e 2.7 Hz, 1H, H5), 3.07 (dd, *J* = 6.3 e 2.8 Hz, 1H, H6), 2.96 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H, H4), 1.93 (s ancho, 1H, OH), 1.52 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.25 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 0.94 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.59 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.7 (C), 160.8 (C), 140.4 (C), 135.9 (CH), 129.5 (C), 124.2 (CH), 82.5 (C), 67.1 (CH), 66.3 (CH), 63.6 (CH_2), 52.4 (CH), 37.0 (CH_2), 28.2 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 22.8 (CH_3), 6.9 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.1 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 3439 (OH), 1778

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(C=O) e 1706 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 424 (MH^+). EMAR calculado para $C_{22}H_{38}NO_5Si$ (MH^+): 424.2514; encontrado, 424.2510.

4.2.18 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-((1,6-dinitronaftalen-2-il)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (86b)

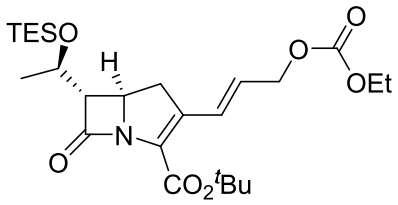


86b

Unha disolución do alcohol **83** (0.50 g, 1.18 mmol), dinitronaftol **76** (0.30 g, 1.3 mmol) e trifenilfosfina (0.34 g, 1.3 mmol) en tetrahidrofurano seco (10 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 °C, tratouse con diisopropil azodicarboxilato (0.37 mL, 1.77 mmol) disolto en tetrahidrofurano seco (10 mL). A mestura final axitouse a 0 °C durante 15 min e a temperatura ambiente durante 4–5 h. Diluíuse en auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (20:80) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **86b** (137 mg, 18%) en forma de espuma rosa. $[\alpha]_D^{20} = -181.4$ (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.38 (dd, *J* = 9.4 e 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.17 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 7.97 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, ArH), 7.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 6.96 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 6.39 (td, *J* = 16.9 e 10.2 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 5.53 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H, C<u>H</u>H), 5.44 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, CH<u>H</u>), 4.64 (m, 1H, H5), 4.38 (m, 1H, CH), 3.04 (ddd, *J* = 18.1, 7.4 e 2.3 Hz, 1H, H6), 2.75 (m, 2H, CH_2), 1.60 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.37 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH_3), 1.01 (t, *J* = 7.8 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.68 (q, *J* = 7.8 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 169.8 (C), 165.6 (C), 161.9 (C), 146.2 (C), 144.2 (C), 139.8 (C), 134.2 (CH), 133.7 (CH), 130.3 (C), 129.0 (CH), 127.8 (C), 125.1 (CH), 124.7 (CH), 123.9 (CH), 123.6 (CH_2), 122.3 (CH), 83.2 (C), 71.7 (CH), 69.2 (CH), 60.2 (CH), 34.6 (CH_2), 28.3 ($C(\underline{C}H_3)_3$),

22.4 (CH_3), 7.0 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.2 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 1774 (C=O), 1721 (C=O) e 1536 (NO_2) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 640 (MH^+). EMAR calculado para $C_{32}H_{42}N_3O_9Si$ (MH^+): 640.2685; encontrado, 640.2682.

4.2.19 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-((etoxicarbonil)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (87)

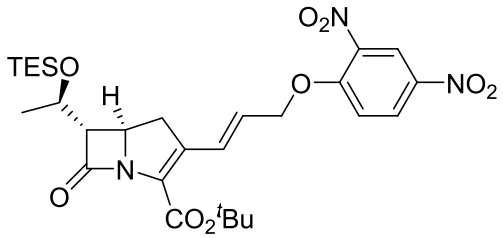


87

Unha disolución do alcohol **83** (160 mg, 0.38 mmol) en diclorometano seco (2.5 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 °C, tratouse con piridina (0.12 mL, 1.51 mmol) e cloroformiato de etilo (0.11 mL, 1.13 mmol). A disolución resultante axitouse a 0 °C durante 2 h. Eliminouse o disolvente a baleiro. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (30:70) dietil éter/hexano, proporcionou o carbonato **87** (60 mg, 32%).^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.37 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, C$\underline{H}$=CH), 5.82 (dt, *J* = 16.0 e 6.3 Hz, 1H, CH=C$\underline{H}$), 4.71 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, $C\underline{H}_2O$), 4.20 (m, 3H, $C\underline{H}_2CH_3$ + CH), 4.10 (td, *J* = 9.2 e 3.0 Hz, 1H, H5), 3.09 (m, 1H, H6), 2.95 (m, 2H, H4), 1.52 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, $CH_2C\underline{H}_3$), 1.24 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 0.94 (t, *J* = 7.8 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.58 (q, *J* = 7.8 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.4 (C), 160.5 (C), 155.0 (C), 139.2 (C), 130.5 (CH), 129.4 (C), 127.4 (CH), 82.6 (C), 67.9 ($\underline{C}H_2CH_3$), 67.2 (CH), 66.2 (CH), 64.3 (CH_2), 52.3 (CH), 36.7 (CH_2), 28.2 ($C(\underline{C}H_3)_3$), 22.7 (CH_3), 14.4 ($CH_2\underline{C}H_3$), 6.9 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.0 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

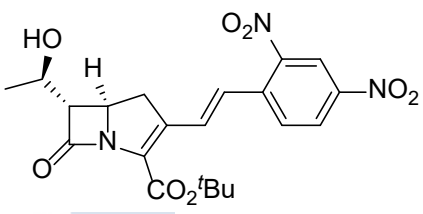
4.2.20 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-(2,4-dinitrofenoxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (86a)



86a

Unha disolución do catalizador tris(dibencilidenacetona) dipaladio complexado con cloroformo (7 mg, 6.66 μmol) e trietilfosfito (10 μL, 0.48 μmol) en unha mestura de tolueno/tetrahidrofurano secos (2:1; 4 mL), previamente desoxixenados e baixo atmosfera inerte, axitouse a temperatura ambiente durante 2 h. Esta mestura tratouse con 2,4-dinitrofenol (25 mg, 0.13 mmol) e o carbonato **87** (60 mg, 0.12 mmol). A mestura final quentouse a 30 ^{o}C durante 18 h. Eliminároнse os disolventes a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (10:90) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **86a** (17 mg, 24%), en forma de espuma rosada. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.90 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, ArH), 8.46 (dd, *J* = 9.0 e 2.7 Hz, 1H, ArH), 7.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 6.93 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 6.39 (td, *J* = 16.8 e 10.5 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 5.54 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H, C<u>H</u>H), 5.45 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, CH<u>H</u>), 4.63 (m, 1H, H5), 4.42 (m, 1H, CH), 3.05 (ddd, *J* = 18.1, 7.4 e 2.3 Hz, 1H, H6), 2.76 (m, 2H, CH_2), 1.60 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.41 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H, CH_3), 1.01 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3), 0.68 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm.

4.2.21 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de *terc*-butilo (88a)



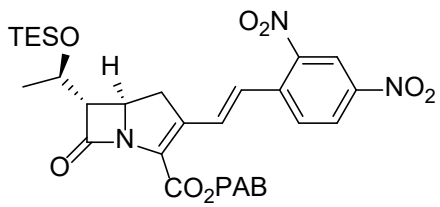
88a

Unha disolución do composto **85a** (43 mg, 77 μmol) en diclorometano seco (0.7 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 ^{o}C, tratouse con ácido acético glacial (13 μL, 0.23 mmol) disolto en tetrahidrofurano seco (1.3 mL) e con fluoruro de tetrabutilamonio (0.23 mL, 0.23 mmol, *ca* 1M en THF). A mestura axitouse a 0 ^{o}C

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

durante 30 min. Diluíuse en acetato de etilo e auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (50:50) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **88a** (20 mg, 59%) en forma de aceite amarelo. $[\alpha]_D^{20} = -116.9$ (*c* 0.4, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.40 (dd, *J* = 8.8 e 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.13 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 7.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.12 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 4.27 (m, 2H, CH + H5), 3.26 (dd, *J* = 6.4 e 3.3 Hz, 1H, H6), 3.15 (m, 2H, H4), 1.83 (s ancho, 1H, OH), 1.58 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) e 1.37 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.5 (C), 160.3 (C), 147.6 (C), 146.7 (C), 139.2 (C), 138.1 (C), 130.8 (CH), 129.4 (CH), 127.3 (CH), 126.6 (CH), 120.9 (CH), 83.5 (C), 67.1 (CH), 65.7 (CH), 52.6 (CH), 36.6 (CH_2), 28.3 ($C(\underline{C}H_3)_3$) e 21.9 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3512 (OH), 1780 (C=O) e 1700 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 446 (MH^+). EMAR calculado para $C_{21}H_{24}N_3O_8$ (MH^+): 446.1558; encontrado, 446.1552.

4.2.22 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de 4–azidobencilo (97)



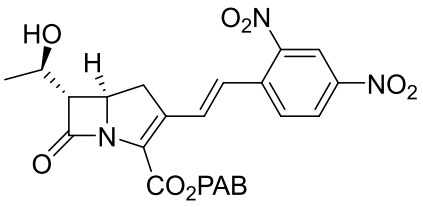
97

Preparouse seguindo o procedemento xeral de Stille descrito na páxina 101, usando diazolactama **96** (225 mg, 0.46 mmol), octanoato de rodio (1.8 mg, 2.3 μmol), diclorometano seco (2.3 mL), *N*,*N*-diisopropiletilamina (96 μL, 0.55 mmol), tetrametilpiperidina (0.19 mL, 1.10 mmol), anhídrido trifluorometanosulfónico (85 μL, 0.51 mmol), *N*-metilpirrolidona (4.6 mL), cloruro de zinc (113 mg, 0.83 mmol), tris(2-furil)fosfina (9.5 mg, 41 μmol), tris(dibencilidenacetona) dipaladio (38 mg, 41 μmol) e o estannano **75** (246 mg, 0.51 mmol). Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (40:60) dietil

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

éter/hexano, proporcionou o composto **97** (224 mg, 77%), en forma de aceite amarelo. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.76 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 8.35 (dd, *J* = 8.8 e 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.07 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 7.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.13 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 5.31 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H, OC<u>H</u>H), 5.21 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H, OCH<u>H</u>), 4.27 (m, 2H, CH + H5), 3.24 (dd, *J* = 5.7 e 3.1 Hz, 1H, H6), 3.13 (m, 2H, H4), 1.28 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 0.95 (t, *J* = 7.8 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.61 (q, *J* = 7.8 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.4 (C), 160.6 (C), 147.7 (C), 147.5 (C), 146.8 (C), 142.5 (C), 142.2 (C), 137.6 (C), 130.6 (C), 129.9 (CH), 129.4 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 127.2 (CH), 123.7 (CH), 120.8 (CH), 67.6 (CH), 65.6 (CH_2), 65.5 (CH), 52.4 (CH), 36.4 (CH_2), 22.5 (CH_3), 6.8 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 4.9 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 1783 (C=O), 1703 (C=O) e 1527 (NO_2) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 657 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{30}H_{34}N_6O_8SiNa$ (MNa^+): 657.2100; encontrado, 657.2089.

4.2.23 (5*R,*6*R*)-6-(1hidroxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de 4–azidobencilo (98)

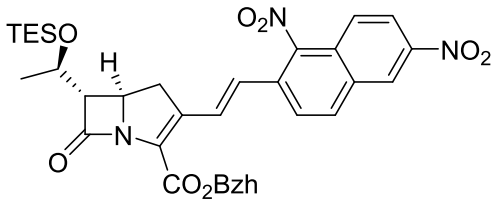


98

Unha disolución do composto **97** (114 mg, 0.18 mmol) en tetrahidrofurano seco (4.5 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 ºC, tratouse con ácido acético glacial (31 µL, 0.54 mmol) e fluoruro de tetrabutilamonio (0.36 mL, 0.36 mmol, *ca* 1M en THF). Tras 45 min, a mestura diluíuse en auga/acetato de etilo e separáronse as fases. A fase orgánica lavouse con disolución saturada de NaCl (x3), secouse (Na_2SO_4 anh.), filtrouse e concentrouse a sequidade. Purificación mediante cromatografía en xel de sílice, eluíndo con (30:70) acetato de etilo/hexano, proporcionou o alcohol **98** (100 mg, 55%). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 8.38 (dd, *J* = 8.8 e 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.07 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 7.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.48 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.16 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 5.37 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, OC<u>H</u>H), 5.24 (d, *J* =

12.5 Hz, 1H, OCHH), 4.30 (m, 2H, CH + H5), 3.29 (dd, *J* = 6.2 e 3.1 Hz, 1H, H6), 3.21 (m, 2H, H4) e 1.38 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3) ppm. IR (ATR): 3408 (OH), 1788 (C=O), 1709 (C=O), 1596 (NO_2) e 1528 (NO_2) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 543 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{24}H_{20}N_6O_8Na$ (MNa^+): 543.1240; encontrado, 543.1243.

4.2.24 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaphthalen-2-il)vinil)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (103b)



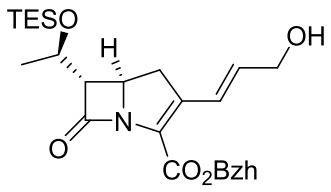
103b

Preparouse seguindo o procedemento xeral de Stille descrito na páxina 101, usando diazolactama **102** (250 mg, 0.48 mmol), octanoato de rodio (2 mg, 2.4 μmol), diclorometano seco (2.4 mL), *N*,*N*-diisopropiletilamina (100 μL, 0.58 mmol), tetrametilpiperidina (200 μL, 1.15 mmol), anhídrido trifluorometanosulfónico (86 μL, 0.53 mmol), *N*-metilpirrolidona (4.8 mL), cloruro de zinc (120 mg, 0.86 mmol), tris(2-furil)fosfina (10 mg, 43 μmol), tris(dibencilidenacetona) dipaladio (41 mg, 43 μmol) e o estannano **78** (280 mg, 0.53 mmol). Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (15:85) dietil éter/hexano, proporcionou o composto **103b** (124 mg, 36%), en forma de espuma laranxa. $[\alpha]_D^{20} = -206.9$ (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.36 (dd, *J* = 9.4 e 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.29 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CH), 8.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.84 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, ArH), 7.64 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2xArH), 7.53 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, 2xArH), 7.44 (m, 6H, 6xArH), 6.97 (s, 1H, $CHPh_2$), 6.63 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CH), 4.36 (m, 2H, CH + H5), 3.29 (dd, *J* = 5.0 e 3.1 Hz, 1H, H6), 3.17 (m, 2H, H4), 1.33 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH_3), 1.02 (t, *J* = 7.7 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.68 (q, *J* = 7.7 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.1 (C), 160.3 (C), 146.4 (C), 143.3 (C), 141.5 (C), 140.3 (C), 140.2 (C), 140.0 (C), 132.3 (CH), 132.1 (C), 131.2 (C), 129.9 (C), 129.7 (CH), 128.7 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.3 (CH), 126.9 (CH), 125.7 (CH), 124.9 (CH),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

124.5 (CH), 124.0 (CH), 122.5 (CH), 79.1 (CH), 67.7 (CH), 65.5 (CH), 52.3 (CH), 36.4 (CH_2), 22.7 (CH_3), 7.0 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.1 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 1785 (C=O), 1706 (C=O) e 1531 (NO_2) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 720 (MH^+). EMAR calculado para $C_{40}H_{42}N_3O_8Si$ (MH^+): 720.2736; encontrado, 720.2734.

4.2.25 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-hidroxiprop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (104)

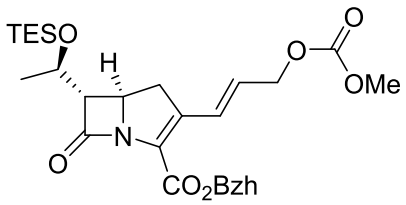


104

Preparouse seguindo o procedemento xeral de Stille descrito na páxina 101, usando diazolactama **102** (500 mg, 0.96 mmol), octanoato de rodio (4 mg, 4.8 μmol), diclorometano seco (4.8 mL), *N*,*N*-diisopropiletilamina (0.20 mL, 1.15 mmol), tetrametilpiperidina (0.40 mL, 2.30 mmol), anhídrido trifluorometanosulfónico (0.30 mL, 1.05 mmol), *N*-metil-pirrolidona (9.6 mL), cloruro de zinc (240 mg, 1.73 mmol), tris(2-furil)fosfina (20 mg, 86 μmol), tris(dibencilidenacetona) dipaladio (81 mg, 86 μmol) e o estannano **79** (370 mg, 1.05 mmol). Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (35:65) dietil éter/hexano, proporcionou o composto **104** (370 mg, 72%), en forma de aceite amarelo. $[\alpha]_D^{20} = -40.0$ (*c* 0.5, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.60 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2x ArH), 7.49 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2x ArH), 7.33 (m, 7H, 6xArH + C$\underline{H}$=CH), 6.93 (s, 1H, $CHPh_2$), 5.97 (dt, *J* = 16.0 e 5.6 Hz, 1H, CH=C$\underline{H}$), 4.25 (m, 4H, C$\underline{H}_2$OH + CH + H5), 3.18 (dd, *J* = 5.6 e 2.9 Hz, 1H, H6), 2.99 (m, 2H, H4), 1.93 (s ancho, 1H, OH), 1.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH_3), 1.01 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3), 0.59 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.9 (C), 160.5 (C), 143.3 (C), 140.4 (C), 140.3 (C), 137.2 (CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (C), 127.4 (CH), 126.9 (CH), 123.8 (CH), 78.44 (CH), 67.0 (CH), 65.8 (CH), 63.4 (CH_2), 52.3 (CH), 36.9 (CH_2), 22.8 (CH_3), 6.9 ($CH_2\underline{C}H_3$) e 5.1 ($\underline{C}H_2CH_3$) ppm. IR (ATR): 3433 (OH), 1780 (C=O) e 1711 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 534 (MH^+). EMAR calculado para $C_{31}H_{40}NO_5Si$ (MH^+): 534.2670; encontrado, 534.2669.

USC UNIVERSIDADE

4.2.26 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-((metoxicarbonil)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (107)

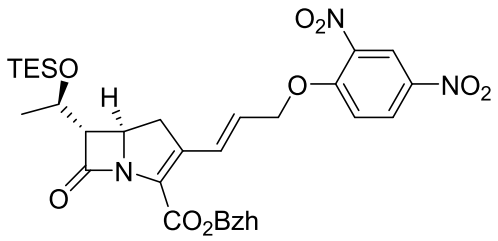


107

Unha disolución do alcohol **104** (400 mg, 0.75 mmol) en diclorometano seco (1.9 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 °C, tratouse con piridina (0.19 mL, 2.25 mmol) e cloroformiato de metilo (0.12 mL, 1.5 mmol). A disolución resultante axitouse a 0 °C durante 2 h. Diluíuse con disolución saturada de NaCl, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con diclorometano (x3). Os extractos orgánicos combinados laváronse con disolución saturada de $CuSO_4$ (x3), secáronse ($MgSO_4$ anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con acetato de etilo/hexano, proporcionou o carbonato **107** (295 mg, 67%) en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20} = -38.2$ (*c* 0.75, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2xArH), 7.48 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2xArH), 7.32 (m, 7H, C<u>H</u>=CH + 6xArH), 6.94 (s, 1H, $CHPh_2$), 5.90 (dt, *J* = 16.0 e 6.3 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 4.74 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$OH), 4.30 (m, 1H, CH), 4.22 (td, *J* = 9.5 e 3.0 Hz, 1H, H5), 3.80 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, OCH_3), 3.17 (dd, *J* = 5.6 e 2.9 Hz, 1H, H6), 3.01 (m, 2H, H4), 1.32 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3), 1.0 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H, 3×CH_3), 0.65 (q, *J* = 8.0 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.6 (C), 160.3 (C), 142.0 (C), 140.4 (C), 140.2 (C), 130.3 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 127.4 (CH), 126.9 (CH), 78.6 (CH), 68.0 (CH_2), 67.3 (CH), 65.9 (CH), 55.0 (CH_3), 52.4 (CH), 36.8 (CH_2), 22.8 (CH_3), 6.9 (CH_2<u>C</u>H_3) e 5.1 (<u>C</u>H_2CH_3) ppm. IR (ATR): 1781 (C=O), 1754 (C=O) e 1260 (C-O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 592 (MH^+). EMAR calculado para $C_{33}H_{42}NO_7Si$ (MH^+): 592.2725; encontrado, 592.2724.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.27 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-3-(2,4-dinitrofenoxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1- azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (108a)

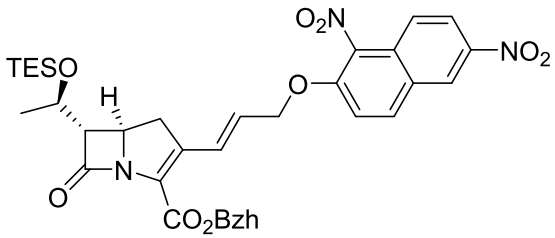


108a

Unha disolución do alcohol **104** (100 mg, 0.19 mmol), 2,4-dinitrofenol (40 mg, 0.21 mmol) e trifenilfosfina (50 mg, 0.21 mmol) en tetrahidrofurano seco (1 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 °C, tratouse con diisopropil azodicarboxilato (50 μL, 0.24 mmol) disolto en tetrahidrofurano seco (1 mL). A mestura final axitouse a 0 °C durante 15 min e a temperatura ambiente durante 4–5 h. Diluíuse en auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (20:80) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **108a** (58 mg, 45%) en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20} = -181.3$ (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.80 (s, 1H, ArH), 7.64 (m, 2H, 2xArH), 7.35 (d, *J* = 10.5 Hz, 8H, 8xArH), 7.08 (s, 1H, $CHPh_2$), 6.98 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 6.38 (dt, *J* = 16.9 e 10.0 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 5.46 (m, 2H, CH_2O), 4.72 (m, 1H, H5), 4.47 (m, 1H, CH), 3.08 (ddd, *J* = 18.3, 7.6 e 2.8 Hz, 1H, H6), 2.80 (m, 2H, H4), 1.42 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH_3), 1.03 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.70 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 169.3 (C), 164.5 (C), 161.8 (C), 148.9 (C), 144.9 (C), 139.6 (C), 139.4 (C), 139.3 (C), 134.1 (CH), 129.5 (CH), 128.9 (CH), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.5 (CH), 124.1 (CH_2), 121.1 (CH), 78.6 (CH), 72.1 (CH), 69.3 (CH), 60.6 (CH), 35.0 (CH_2), 23.0 (CH_3), 7.0 (CH_2<u>C</u>H_3) e 5.3 (<u>C</u>H_2CH_3) ppm. IR (ATR): 1770 (C=O), 1727 (C=O), 1534 (NO_2) e 1346 (C-O-C) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 700 (MH^+). EMAR calculado para $C_{37}H_{42}N_3O_9Si$ (MH^+): 700.2685; encontrado, 700.2686.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.28 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-trietilsililoxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaftalen-2-il)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (108b)



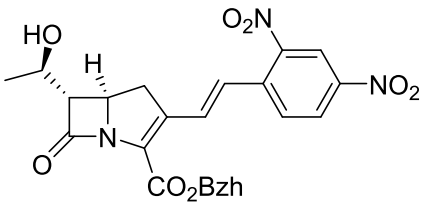
108b

Unha disolución do alcohol **104** (100 mg, 0.19 mmol), dinitronaftol **76** (50 mg, 0.21 mmol), e trifenilfosfina (50 mg, 0.21 mmol) en tetrahidrofurano seco (1 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 ^{o}C, tratouse con diisopropil azodicarboxilato (50 μL, 0.24 mmol) disolto en tetrahidrofurano seco (1 mL). A mestura final axitouse a 0 ^{o}C durante 15 min e a temperatura ambiente durante 4–5 h. Diluíuse en auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (20:80) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **108b** (59 mg, 42%) en forma de espuma branca. $[\alpha]_D^{20} = -181.2$ (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.71 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 8.39 (dd, *J* = 9.4 e 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.99 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, ArH), 7.79 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.51 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 7.37 (m, 9H, 9xArH), 7.11 (s, 1H, $CHPh_2$), 7.01 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 6.41 (dt, *J* = 16.7 e 10.6 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 5.48 (m, 2H, CH_2O), 4.77 (m, 1H, H5), 4.45 (m, 1H, CH), 3.10 (ddd, *J* = 18.2, 7.4 e 2.6 Hz, 1H), 2.82 (m, 2H, H4), 1.42 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH_3), 1.06 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H, 3×CH_3) e 0.74 (q, *J* = 7.9 Hz, 6H, 3×CH_2) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 169.6 (C), 164.4 (C), 161.8 (C), 146.2 (C), 139.7 (C), 139.6 (C), 139.5 (C), 134.1 (CH), 133.8 (CH), 130.2 (C), 129.4 (CH), 128.8 (CH), 128.8 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.7 (C), 127.5 (CH), 127.5 (CH), 125.0 (CH), 124.6 (CH), 124.0 (CH_2), 123.9 (CH), 122.3 (CH), 78.4 (CH), 72.0 (CH), 69.2 (CH), 60.5 (CH), 34.7 (CH_2), 22.7 (CH_3), 7.0 (CH_2<u>C</u>H_3) e 5.2 (<u>C</u>H_2CH_3) ppm. IR (ATR): 1776 (C=O), 1727 (C=O), 1534 (NO_2) e 1346 (C-O-C) cm^{-1}. EM (ESI)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

m/z = 750 (MH^+).EMAR calculado para $C_{41}H_{43}N_3O_9Si$ (MH^+): 750.2769; encontrado, 750.2772.

4.2.29 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-2,4-dinitrostiril-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (106a)

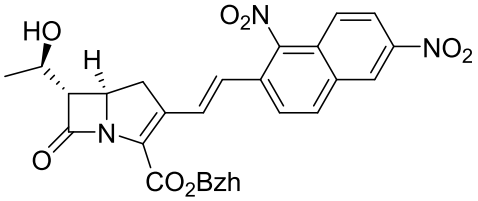


106a

Unha disolución do composto **103a** (100 mg, 0.15 mmol) en tetrahidrofurano seco (3.7 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 ºC, tratouse con ácido acético glacial (26 µL, 0.45 mmol) e con fluoruro de tetrabutilamonio (0.3 mL, 0.3 mmol, *ca* 1M en THF). A mestura axitouse a 0 ºC durante 30 min. Diluíuse en acetato de etilo e auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (50:50) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **106a** (46 mg, 55%) en forma de aceite amarelo. $[\alpha]_D^{20} = -170.5$ (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.78 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 8.33 (dd, *J* = 8.8 e 2.3 Hz, 1H, ArH), 8.10 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 7.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.57 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, ArH), 7.47 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, ArH), 7.33 (m, 6H, ArH), 7.14 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 6.97 (s, 1H, C<u>H</u>Ph_2), 4.32 (m, 2H, H5 + CH), 3.33 (dd, *J* = 6.4 e 3.1 Hz, 1H, H6), 3.19 (m, 2H, CH_2) e 1.40 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.8 (C), 160.1 (C), 147.5 (C), 146.8 (C), 141.7 (C), 139.9 (C), 139.7 (C), 137.7 (C), 134.2 (CH), 131.3 (C), 130.3 (CH), 129.5 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 127.5 (CH), 127.3 (CH), 127.2 (CH), 126.9 (CH), 120.8 (CH), 79.1 (CH), 67.0 (CH), 65.6 (CH),, 52.9 (CH), 36.5 (CH_2) e 21.9 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3517 (OH), 1779 (C=O) e 1709 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 578 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{30}H_{25}N_3O_8Na$ (MNa^+): 578.1534; encontrado, 578.1530.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.30 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaftalen-2-il)vinil)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (106b)

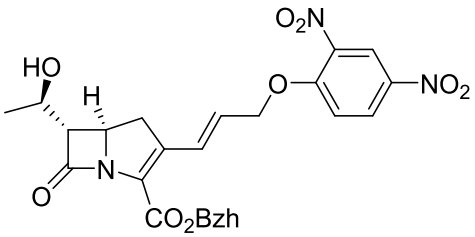


106b

Unha disolución do composto **103b** (53 mg, 74 μmol) en tetrahidrofurano seco (1.8 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 ^{o}C, tratouse con ácido acético glacial (13 μL, 0.22 mmol) e con fluoruro de tetrabutilamonio (0.15 mL, 0.15 mmol, *ca* 1M en THF). A mestura axitouse a 0 ^{o}C durante 30 min. Diluíuse en acetato de etilo e auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (50:50) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **106b** (14 mg, 30%) en forma de espuma laranxa. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.36 (dd, *J* = 9.8 e 2.8 Hz, 1H, ArH), 8.25 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 8.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.85 (m, 2H, 2xArH), 7.57 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2xArH), 7.48 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2xArH), 7.34 (m, 6H, 6xArH), 6.97 (s, 1H, $CHPh_2$), 6.64 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 4.31 (m, 2H, CH + H5), 3.30 (dd, *J* = 6.3 e 3.1 Hz, 1H, H6), 3.17 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$O), 1.67 (s ancho, 1H, OH) e 1.40 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 169.6 (C), 164.4 (C), 160.2 (C), 141.6 (C), 140.0 (C), 132.4 (CH), 129.6 (CH), 128.8 (CH), 128.8 (CH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 127.5 (CH), 127.0 (CH), 126.2 (C), 124.9 (CH), 124.5 (CH), 124.1 (C), 122.5 (CH), 79.2 (CH), 67.0 (CH), 65.7 (CH), 52.8 (CH), 36.6 (CH_2), 22.0 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3522 (OH), 1776 (C=O), 1711(C=O), 1523 (NO_2) e 1346 (C-O-C) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 606 (MH^+). EMAR calculado para $C_{34}H_{28}N_3O_8$ (MH^+): 606.1871; encontrado, 606.1874.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.31 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-3-(2,4-dinitrofenoxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (109a)

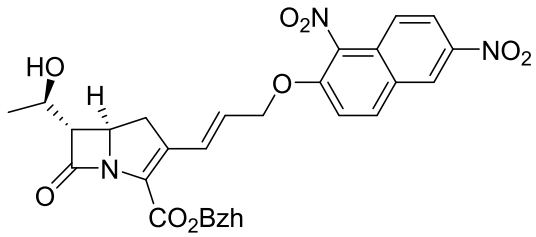


109a

Unha disolución do composto **108a** (150 mg, 0.21 mmol) en tetrahidrofurano seco (5.4 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 °C, tratouse con ácido acético glacial (37 µL, 0.64 mmol) e con fluoruro de tetrabutilamonio (0.43 mL, 0.43 mmol, *ca* 1M en THF). A mestura axitouse a 0 °C durante 30 min. Diluíuse en acetato de etilo e auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (50:50) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **109a** (13 mg, 10%) en forma de aceite incoloro. ^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.86 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, ArH), 7.90 (dd, *J* = 9.0 e 2.7 Hz, 1H, ArH), 7.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.37 (m, 10H), 7.07 (s, 1H, $CHPh_2$), 6.95 (dt, *J* = 16.7 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 6.40 (ddd, *J* = 16.7 e 10.0 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 5.45 (m, 2H, CH_2O), 4.85 (m, 1H, H5), 4.54 (m, 1H, CH), 3.13 (ddd, *J* = 17.8, 7.8 e 2.6 Hz, 1H, H6), 2.99 (dd, *J* = 7.2 e 5.9 Hz, 1H, C<u>H</u>H), 2.79 (dt, *J* = 17.8 e 3.7 Hz, 1H, CH<u>H</u>), 1.59 (s ancho, 1H, OH) e 1.52 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RNM (126 MHz, CDCl3) δ 169.3 (C), 164.9 (C), 161.6 (C), 148.7 (C), 145.1 (C), 141.9 (C), 139.4 (C), 139.3 (C), 134.1 (CH), 129.9 (CH), 129.1 (CH), 128.9 (CH), 128.9 (CH), 128.9 (CH), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 127.4 (CH), 127.3 (CH), 124.4 (CH_2), 121.4 (CH), 78.6 (CH), 69.5 (CH), 68.4 (CH), 57.6 (CH), 34.1 (CH_2) e 22.2 (CH_3) ppm. EM (ESI) *m/z* = 586 (MH^+). EMAR calculado para $C_{31}H_{28}N_3O_9$ (MH^+): 586.1820; encontrado, 586.1827.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.32 (5*R*,6*R*)-6-(1-(*R*)-hidroxietil)-3-((*E*)-2-(1,6-dinitronaftalen-2-il)oxi)prop-1-en-1-il)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hetp-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (109b)

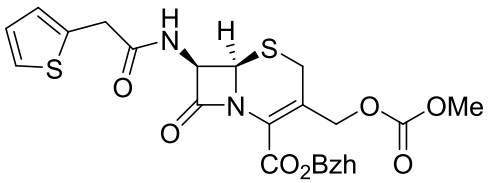


109b

Unha disolución do composto **108b** (200 mg, 0.27 mmol) en tetrahidrofurano seco (6.7 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 °C, tratouse con ácido acético glacial (46 µL, 0.80 mmol) e con fluoruro de tetrabutilamonio (0.53 mL, 0.53 mmol, *ca* 1M en THF). A mestura axitouse a 0 °C durante 30 min. Diluíuse en acetato de etilo e auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (50:50) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **109b** (24 mg, 14%) en forma de aceite incoloro. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.74 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.39 (dd, *J* = 9.3 e 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.00 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, ArH), 7.69 (m, 2H, 2xArH), 7.34 (m, 10H, 10xArH), 7.07 (s, 1H, $CHPh_2$), 6.96 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 6.41 (dt, *J* = 16.8 e 10.6 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 5.44 (m, 2H, CH_2O), 4.86 (m, 1H, H5), 4.51 (m, 1H, CH), 3.13 (ddd, *J* = 17.9, 7.7 e 2.6 Hz, 1H, H6), 2.97 (m, 1H, C<u>H</u>H), 2.78 (m, 1H, CH<u>H</u>), 1.63 (s ancho, 1H, OH) e 1.50 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 169.5 (C), 164.9 (C), 161.6 (C), 146.3 (C), 144.1 (C), 139.6 (C), 139.5 (C), 139.4 (C), 134.1 (CH), 130.4 (C), 129.9 (CH), 128.8 (CH), 128.8 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 127.8 (C), 127.4 (CH), 127.4 (CH), 124.8 (CH), 124.7 (CH), 124.2 (CH_2), 124.1 (CH), 122.5 (CH), 78.5 (CH), 69.7 (CH), 68.5 (CH), 57.7 (CH), 33.9 (CH_2) e 22.1 (CH_3) ppm. EM (ESI) *m/z* = 636 (MH^+). EMAR calculado para $C_{35}H_{30}N_3O_9$ (MH^+): 636.1977; encontrado, 636.1985.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.33 (6*R*,7*R*)-3-(((metoxicarbonil)oxi)metil)-8-oxo-7-(2-(tiofen-2-il)acetamido)-5-tia-1-azabiciclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilato de bencidrilo (115)



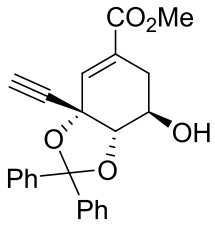
115

Unha disolución do alcohol **114** (250 mg, 0.48 mmol) en diclorometano seco (1.2 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 ºC, tratouse con piridina (0.12 mL, 1.44 mmol) e cloroformiato de metilo (74 µL, 0.96 mmol). A disolución resultante axitouse a 0 ºC durante 3 h. Diluíuse con disolución saturada de NaCl, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con diclorometano (x3). Os extractos orgánicos combinados laváronse con disolución saturada de $CuSO_4$ (x3), secáronse ($MgSO_4$ anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (30:70) acetato de etilo/hexano, proporcionou o carbonato **115** (230 mg, 82%). en forma de sólido branco. $[\alpha]_D^{20}$ = 27.4 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.42 (dd, *J* = 8.1 e 1.7 Hz, 2H, 2xArH), 7.32 (m, 9H, 9xArH), 6.99 (m, 2H, 2xArH), 6.93 (s, 1H, $CHPh_2$), 6.34 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, NH), 5.87 (dd, *J* = 9.1 e 4.9 Hz, 1H, H7), 5.14 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H, C<u>H</u>HO), 4.97 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H6), 4.85 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H, CH<u>H</u>O), 3.85 (s, 2H, CH_2-tiofeno), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.55 (d, *J* = 18.6 Hz, 1H, S-C<u>H</u>H) e 3.37 (d, *J* = 18.6 Hz, 1H, S-CH<u>H</u>) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 170.1 (C), 164.8 (C), 160.7 (C), 155.4 (C), 139.3 (C), 139.1 (C), 134.8 (C), 128.9 (C), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.3 (C), 127.2 (CH), 127.0 (C), 126.3 (C), 126.3 (CH), 125.9 (C), 80.1 (CH), 66.5 (CH_2), 59.3 (CH), 57.5 (CH), 55.3 (CH_3), 37.2 (CH_2) e 26.3 (CH_2) ppm. IR (ATR): 3300 (NH), 1785 (C=O), 1748 (C=O) e 1261 (C-O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 601 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{29}H_{26}N_2O_7S_2$ Na (MNa^+): 601.1074; encontrado, 601.1073.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3 Derivados de ácido xiquímico sintetizados

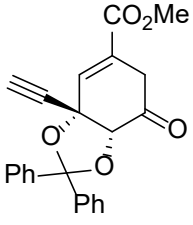
4.3.1 (3a*S*,7*R*,7a*S*)-3a-etinil-2,2-difenil-7-hidroxi-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo [*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (126)



126

Unha disolución do composto **125** (1.02 g, 4.8 mmol) en dimetilformamida seca (19.2 mL), baixo atmosfera inerte, tratouse con difenildimetoximetano (2.51 g, 11.0 mmol) e ácido D-(+)-alcanforsulfónico (110 mg, 0.46 mmol). A mestura quentouse a refluxo durante 24 h. Arrefriouse a temperatura ambiente, diluíuse con disolución saturada de $NaHCO_3$ e extraeuse con acetato de etilo (x3). Os extractos orgánicos laváronse con auga (x3), secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (25:75) acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **126** (540 mg, 30%) en forma de sólido branco. $[\alpha]_D^{20}$= 58.2 (*c* 1, $CHCl_3$). Pf: 177–179 °C. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.65 (m, 2H, 2xArH), 7.35 (m, 8H, 8xArH), 6.91 (s, 1H, H2),4.39 (s, 2H, H6), 3.76 (s, 3H, OMe), 2.66 (m, 2H, H4 + H5), 2.60 (s, 1H, CH) e 2.09 (s ancho, 1H, OH) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.0 (C), 141.8 (C), 141.8 (C), 134.5 (CH), 128.5 (CH), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 128.1 (CH), 127.0 (C), 126.9 (CH), 126.2 (CH), 111.0 (C), 81.6 (C), 81.0 (CH), 76.1 (C), 73.0 (C), 66.6 (CH), 52.3 (OCH_3) e 27.8 (CH_2) ppm. IR (ATR): 3479 (OH) e 1714 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 377 (MH^+). EMAR calculado para $C_{23}H_{21}O_5$ (MH^+): 377.1384; encontrado, 377.1387.

4.3.2 (3a*S*,7*R*,7a*S*)-3a-etinil-2,2-difenil-7-oxo-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo [*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (129)



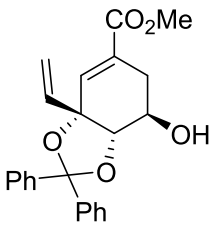
129

Unha disolución do alcohol **126** (71 mg, 0.19 mmol) en diclorometano seco (1 mL), baixo atmosfera inerte, tratouse con periodinano de Dess-Martin (120 mg, 0.28 mmol) e axitouse a temperatura ambiente durante 20 h. Diluíuse en dietil éter-auga,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con dietil éter (x2). Os extractos orgánicos laváronse con disolucións saturadas de $Na_2S_2O_3$ e $NaHCO_3$, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. O composto **129** (70 mg, 99%) empregouse para a seguinte reacción sen purificar. $[\alpha]_D^{20}$ = 42.0 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.58 (m, 2H, 2xArH), 7.35 (m, 8H, 8xArH), 6.85 (s, 1H, H2),4.43 (s, 1H, H4), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.50 (dd, *J* = 19.7 e 2.8 Hz, 1H, CHH), 3.26 (d, *J* = 19.7 Hz, 1H, CHH) e 2.73 (s, 1H, CH) ppm. IR (ATR): 1725 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 375 (MH^+). EMAR calculado para $C_{23}H_{19}O_5$ (MH^+): 375.1227; encontrado, 375.1225.

4.3.3 (3a*S*,7*R*,7a*S*)-2,2-difenil-7-hidroxi-3a-vinil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo [*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (127)

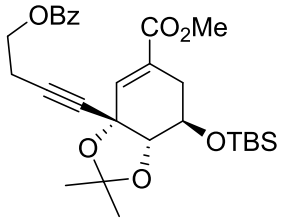


127

Unha disolución do alquino **126** (60 mg, 0.16 mmol) en etanol (2.6 mL), baixo atmosfera inerte, tratouse con catalizador de Lindlar (9 mg). A mestura resultante axitouse a temperatura ambiente e baixo atmosfera de hidróxeno durante 48 h. Diluíuse en metanol, filtrouse sobre Celita® e concentrouse a presión reducida. Obtívose o composto **127** (51 mg, 85%) en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20}$ = 53.7 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.58 (m, 2H, 2xArH), 7.30 (m, 8H, ArH), 6.81 (s, 1H, H2), 5.96 (dd, *J* = 17.5 e 10.8 Hz, 1H, CH=CH_2), 5.43 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H, CH=CHH), 5.21 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, CH=CHH), 4.43 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H, H5), 4.15 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H4), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 2.68 (ddd, *J* = 18.0, 4.2 e 2.4 Hz, 1H. CHH), 2.54 (dd, *J* = 18.0 e 3.7 Hz, 1H, CHH) e 1.86 (s ancho, 1H, OH) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.2 (C), 143.2 (C), 142.9 (C), 138.1 (CH), 136.5 (CH), 128.2 (CH), 128.2 (CH), 128.0 (CH), 127.0 (C), 126.4(CH), 126.1 (CH), 116.7 (CH_2), 109.7 (C), 81.2 (C), 79.9 (CH), 66.9 (CH), 52.11 (OCH_3) e 28.3 (CH_2) ppm. IR (ATR): 3463 (OH) e 1714 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 379 (MH^+).EMAR calculado para $C_{23}H_{23}O_5$ (MH^+): 379.1540; encontrado, 379.1540.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.4 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-(4-(benzoiloxi)but-1-in-1-il)-7-(*terc*-butildimetilsilil)oxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (137)

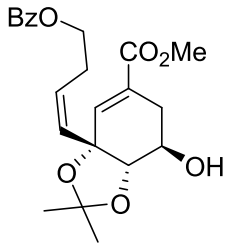


137

Unha disolución do composto **136** (130 mg, 0.32 mmol) en dimetilformamida seca (0.30 mL), baixo atmosfera inerte, tratouse con imidazol (55 mg, 0.81 mmol). A disolución resultante axitouse a temperatura ambiente durante 15 min. Engadíuselle cloruro de *terc*-butildimetilsilano (59 mg, 0.39 mmol) e a mestura resultante axitouse a temperatura ambiente durante 6 h. Diluíuse con acetato de etilo e auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x2). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (20:80) dietil éter/hexano, proporcionou o composto **137** (145 mg, 87%) en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20}$= 62.7 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.02 (m, 2H, 2xAr), 7.52 (m, 1H, Ar), 7.39 (m, 2H, 2xAr), 6.72 (s, 1H, H2), 4.37 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, $OC\underline{H}_2CH_2$), 4.24 (m, 2H, H5), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 2.66 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, $OCH_2C\underline{H}_2$), 2.43 (dd, *J* = 3.5 e 1.8 Hz, 2H, H6), 1.45 (s, 3H, CH_3), 1.29 (s, 3H, CH_3), 0.85 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.07 (s, 3H, $SiCH_3$) e 0.04 (s, 3H, $SiCH_3$) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.4 (C), 166.2 (C), 135.6 (CH), 133.1 (CH), 130.1 (C), 129.7 (CH), 128.4 (CH), 125.9 (C), 110.0 (C), 82.6 (C), 81.1 (C), 80.7 (CH), 72.9 (C), 67.4 (CH), 62.4 (CH_2), 52.0 ($O\underline{C}H_3$), 28.0 (CH_2), 27.9 (CH_3), 26.5 (CH_3), 25.7 (CH_3), 19.7 (CH_2), 18.1 (C),-4.8 (CH_3) e-4.9 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1723 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 537 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{28}H_{38}O_7SiNa$ (MNa^+): 537.2284; encontrado, 537.2266.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

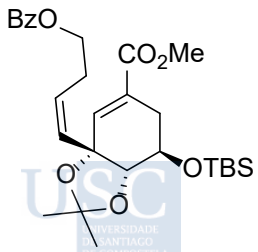
4.3.5 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-((*Z*)-4-(benzoiloxi)but-1-en-1-il)-7-hidroxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (138)



138

Unha disolución do composto **136** (1.79 g, 4.47 mmol) en dioxano (4.5 mL), tratouse con tris(dibencilidenacetona)dipaladio (41 mg, 44.7 µmol), 1,4-bis(difenilfosfin)butano (76 mg, 0.18 mmol) e ácido fórmico (0.36 mL, 9.39 mmol). A disolución resultante quentouse a 80 °C durante 16 h. Despois de arrefriar a temperatura ambiente, eliminouse o disolvente a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (50:50) dietil éter/hexano, proporcionou o composto **138** (1.30 g, 72%) en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20}$ = 124.7 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.05 (m, 2H, 2xAr), 7.55 (m, 1H, Ar), 7.43 (m, 2H, 2xAr), 6.78 (s, 1H, H2), 5.63 (m, 2H, CH=CH), 4.37 (m, 3H, OCH_2 + H5), 4.11 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H4), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 2.86 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, $OCH_2C\underline{H}_2$), 2.63 (ddd, *J* = 17.9, 4.1 e 2.4 Hz, 1H, H6), 2.48 (dd, *J* = 17.9 e 3.7 Hz, 1H, H6), 1.42 (s, 3H, CH_3), 1.34 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.5 (C), 166.8 (C), 137.9 (CH), 133.0 (CH), 131.6 (CH), 129.7 (CH), 129.2 (CH), 128.5 (CH), 125.5 (C), 109.8 (C), 80.2 (C), 80.0 (CH), 67.3 (CH), 64.7 (CH_2), 52.1 ($O\underline{C}H_3$), 28.4 (CH_2), 28.3 (CH_3), 28.0 (CH_2) e 27.2 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3482 (OH) y 1718 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 403 (MH^+). EMAR calculado para $C_{22}H_{27}O_7$ (MH^+): 403.1751; encontrado, 403.1737.

4.3.6 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-((*Z*)-4-(benzoiloxi)but-1-en-1-il)-7-(*terc*-butildimetilsililoxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (139)

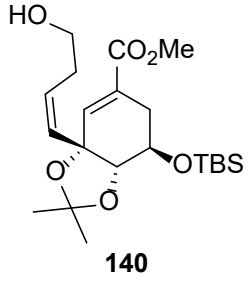


139

Unha disolución do composto **138** (320 mg, 0.80 mmol) en diclorometano seco (0.80 mL), baixo atmosfera inerte, tratouse con 2,6-lutidina (0.19 mL, 1.59 mmol). A disolución resultante axitouse a temperatura ambiente durante 15 min. Engadiuse trifluorometanosulfonato de *terc*-

butildimetilsilano (0.28 mL, 1.19 mmol) e deixouse axitando a temperatura ambiente durante 30 min. Diluíuse con acetato de etilo e auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x2). Os extractos orgánicos laváronse con disolución saturada de NaCl, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (20:80) dietil éter/hexano, proporcionou o composto **139** (373 mg, 91%) en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20}$= 126.8 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.01 (m, 2H, 2xAr), 7.53 (m, 1H, Ar), 7.36 (m, 2H, 2xAr), 6.69 (s, 1H, H2), 5.56 (m, 2H, CH=CH), 4.33 (m, 3H, OC$\underline{H}_2$CH$_2$ + H5), 3.95 (dd, *J* = 4.0 e 1.4 Hz, 1H, H4), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 2.90-2.80 (m, 2H, $OCH_2C\underline{H}_2$), 2.44-2.42 (m, 2H, H6), 1.36 (s, 3H, CH_3), 1.26 (s, 3H, CH_3), 0.81 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.03 (s, 3H, $SiCH_3$) e 0.02 (s, 3H, $SiCH_3$) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.4 (C), 166.4 (C), 137.7 (CH), 133.0 (CH), 132.7 (CH), 131.1 (CH), 130.4 (C), 129.6 (CH), 128.2 (CH), 128.0 (CH), 125.0 (C), 109.1 (C), 80.3 (C), 79.2 (CH), 67.4 (CH), 64.6 (CH_2), 51.7 (O$\underline{C}H_3$), 28.3 (CH_2), 28.0 (CH_3), 27.9 (CH_2), 26.9 (CH_3), 25.7 (CH_3), 18.0 (C),-5.0 (CH_3) e-5.0 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1718 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 539 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{28}H_{40}O_7SiNa$ (MNa^+): 539.2441; encontrado, 539.2448.

4.3.7 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-7-(*terc*-butildimetilsilil)oxi-3a-((*Z*)-4-hidroxibut-1-en-1-il)-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (140)



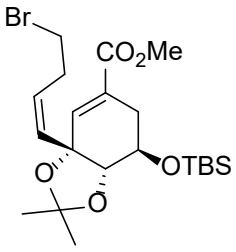
140

Unha disolución do composto **139** (370 mg, 0.72 mmol) en metanol (7.2 mL), tratouse con carbonato potásico (110 mg, 0.79 mmol) e axitouse a temperatura ambiente durante 2.5 h. Eliminouse o disolvente a presión reducida e diluíuse con acetato de etilo e auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x2). Os extractos orgánicos secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (25:75) acetato de etilo/hexano, proporcionou o alcohol **140** (231 mg, 78%) en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20}$= 138.1 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.65 (s, 1H, H2), 5.65 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 5.48 (dt, *J* = 11.6 e 7.9 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 4.33 (m, 1H, H5), 3.92 (d, *J* = 4.0, 1H, H4), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 3.59 (m, 2H, HOC<u>H</u>$_2$CH$_2$), 2.66 (m, 1H, HOCH$_2$C<u>H</u>H), 2.62 (s, 1H, OH), 2.50 (m, 1H, HOCH$_2$CH<u>H</u>), 2.39 (s, 2H, H6), 1.34 (s, 3H, CH_3), 1.24 (s, 3H, CH_3), 0.78 (s, 9H, C(CH_3)$_3$), 0.01 (s, 3H, SiCH_3) e 0.00 (s, 3H, SiCH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.4 (C), 137.7 (CH), 130.5 (CH), 129.3 (CH), 124.8 (C), 109.0 (C), 80.0 (C), 79.0 (CH), 67.2 (CH), 61.7 (CH_2), 51.7 (OCH_3), 32.0 (CH_2), 27.9 (CH_3), 27.7 (CH_2), 26.9 (CH_3), 25.6 (CH_3), 17.9 (C),-5.1 (CH_3) e-5.2 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3440 (OH) e 1723 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 413 (MH^+). EMAR calculado para $C_{21}H_{37}O_6$ (MH^+): 413.2354; encontrado, 413.2350.

4.3.8 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-((*Z*)-4-bromobut-1-en-1-il)-7-(*terc*-butildimetilsilil)oxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (141)



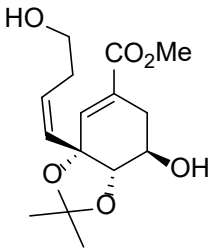
141

<u>Procedemento 1</u>: Unha disolución do alcohol **140** (220 mg, 0.54 mmol) e trifenilfosfina (160 mg, 0.60 mmol) en diclorometano seco (1.2 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 ^{o}C, tratouse con N–bromosucinimida (110 mg, 0.60 mmol), sacouse do baño e deixouse axitando a temperatura ambiente durante 12 h. Diluíuse en hexano, filtrouse sobre Celita e eliminouse o disolvente a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **141** (84 mg, 33%) e o alcohol **142** (100 mg, 51%) en forma de aceites incoloros.

<u>Procedemento 2</u>: Unha disolución do alcohol **140** (150 mg, 0.36 mmol) e trifenilfosfina (100 mg, 0.40 mmol) en diclorometano seco (0.8 mL), baixo atmosfera inerte, tratouse con tetrabromuro de carbono (130 mg, 0.40 mmol). A

mestura axitouse a temperatura ambiente durante 12 h. Eliminouse o disolvente a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con acetato de etilo/hexano, proporcionou o composto **141** (90 mg, 52%) e o alcohol **142** (44 mg, 33%) en forma de aceites incoloros. $[\alpha]_D^{20}$= 98.7 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.68 (s, 1H, H2), 5.63 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, C<u>H</u>=CHCH$_2$), 5.48 (dt, *J* = 11.8 e 7.2 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>CH$_2$), 4.39 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H, H5), 3.96 (d, *J* = 4.0, 1H, H4), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, BrC<u>H</u>$_2$CH$_2$), 3.04 (m, 1H, BrCH$_2$C<u>H</u>H), 2.90 (m, 1H, BrCH$_2$C<u>H</u>H), 2.46 (m, 2H, H6), 1.41 (s, 3H, CH_3), 1.31 (s, 3H, CH_3), 0.85 (s, 9H, C(CH_3)$_3$), 0.08 (s, 3H, SiCH_3) e 0.07 (s, 3H, SiCH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.7 (C), 137.7 (CH), 131.1 (CH), 129.1 (CH), 125.3 (C), 109.3 (C), 80.5 (C), 79.2 (CH), 67.4 (CH), 52.0 (OCH_3), 33.0 (CH_2), 32.0 (CH_2), 28.2 (CH_3), 28.0 (CH_2), 27.1 (CH_3), 25.9 (CH_3), 18.2 (C),-4.8 (CH_3) e-4.9 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1723 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 497 (MNa$^+$). EMAR calculado para $C_{21}H_{35}{}^{79}BrO_5Na$ (MNa$^+$): 497.1329; encontrado, 497.1329.

4.3.9 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-7-hidroxi-3a-((*Z*)-4-hidroxibut-1-en-1-il)-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (143)



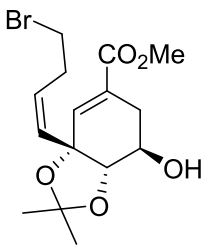
143

Unha disolución do composto **138** (600 mg, 1.49 mmol) en metanol (15 mL), tratouse con carbonato potásico (450 mg, 3.28 mmol) e axitouse a temperatura ambiente durante 2.5 h. Eliminouse o disolvente a presión reducida e diluíuse con acetato de etilo e auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con acetato de etilo (x2). Os extractos orgánicos secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (50:50) acetato de etilo/hexano, proporcionou o alcohol **143** (275 mg, 63%) en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20}$= 139.4 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.78 (s, 1H, H2), 5.70 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, C<u>H</u>=CH), 5.55 (dt, *J* = 11.8 e 7.8 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>), 4.36 (m, 1H, H5), 4.09 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H4), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.65 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, HOC<u>H</u>$_2$CH$_2$),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.85 (s ancho, 1H, OH), 2.58 (m, 3H, $HOCH_2C\underline{H}_2$ + C<u>H</u>H), 2.47 (dd, *J* = 18.0 e 3.1 Hz, 1H, CH<u>H</u>), 1.41 (s, 3H, CH_3) e 1.31 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.7 (C), 138.1 (CH), 131.7 (CH), 130.7 (CH), 125.5 (C), 109.7 (C), 79.8 (C), 79.5 (CH), 66.8 (CH), 62.0 (CH_2), 52.2 (OCH_3), 32.0 (CH_2), 28.2 (CH_3), 27.9 (CH_2) e 27.2 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3400 (OH) e 1714 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 321 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{15}H_{22}O_6Na$ (MNa^+): 321.1309; encontrado, 321.1312.

4.3.10 (3a*R*,7*R*,7a*S*)-3a-((*Z*)-4-bromobut-1-en-1-il)-7-hidroxi-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (142)

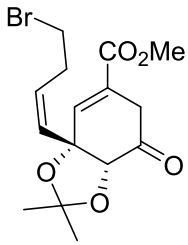


142

Unha disolución do alcohol **143** (30 mg, 0.10 mmol) e trifenilfosfina (29 mg, 0.11 mmol) en diclorometano seco (0.25 mL), baixo atmosfera inerte e a 0 °C, tratouse con N–bromosucinimida (20 mg, 0.11 mmol), sacouse do baño e deixouse axitando a temperatura ambiente durante 12 h. Diluíuse en Hexano, filtrouse sobre Celita e eliminouse o disolvente a presión reducida. Purificación mediante cromatografía en columna de xel de sílice, eluíndo con (10:90) acetato de etilo/hexano, proporcionou o alcohol **142** (35 mg, 97%) en forma de aceite incoloro. $[\alpha]_D^{20}$ = 128.7 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.71 (s, 1H, H2), 5.63 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, C<u>H</u>=CHCH$_2$), 5.51 (dt, *J* = 11.7 e 7.2 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>CH$_2$), 4.39 (q, *J* = 4.1 Hz, 1H, H5), 4.07 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H4), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, BrC<u>H</u>$_2$CH$_2$), 2.93 (m, 2H, BrCH$_2$C<u>H</u>$_2$), 2.59 (ddd, *J* = 18.0, 4.1 e 2.4 Hz, 1H, C<u>H</u>H), 2.45 (dd, *J* = 18.0 e 3.6 Hz, 1H, CH<u>H</u>), 2.15 (s ancho, 1H, OH), 1.40 (s, 3H, CH_3) e 1.31 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 167.5 (C), 137.8 (CH), 131.4 (CH), 130.2 (CH), 125.5 (C), 109.7 (C), 80.2 (C), 79.7 (CH), 67.1 (CH), 52.1 (OCH_3), 32.8 (CH_2), 31.9 (CH_2), 28.2 (CH_3), 27.9 (CH_2) e 27.1 (CH_3) ppm. IR (ATR): 3472 (OH) e 1718 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 383 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{15}H_{21}{}^{79}BrO_5Na$ (MNa^+): 383.0465; encontrado, 383.0458.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.11 (3a*R*,7a*R*)-3a-((*Z*)-4-bromobut-1-en-1-il)-2,2-dimetil-7-oxo-3a,6,7,7a-tetrahidrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-carboxilato de metilo (131)



131

Unha disolución do alcohol **142** (50 mg, 0.17 mmol) en diclorometano seco (0.8 mL), baixo atmosfera inerte, tratouse con periodinano de Dess-Martin (110 mg, 0.25 mmol) e axitouse a temperatura ambiente durante 20 h. Diluíuse en dietil éter-auga, separáronse as fases e a fase acuosa extraeuse con dietil éter (x2). Os extractos orgánicos laváronse con disolucións saturadas de $Na_2S_2O_3$ e $NaHCO_3$, secáronse (Na_2SO_4 anh.), filtráronse e concentráronse a presión reducida. O composto **131** (50 mg, 99%) empregouse para a seguinte reacción sen purificar. $[\alpha]_D^{20}$ = 137.7 (*c* 1, $CHCl_3$). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.77 (s, 1H, H2), 5.60 (dt, *J* = 11.7 e 7.4 Hz, 1H, CH=C<u>H</u>CH_2), 5.40 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, C<u>H</u>=CHCH_2), 4.08 (s, 1H, H4), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.48 (dd, *J* = 19.5 e 2.7 Hz, 1H, CH<u>H</u>), 3.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, Br<u>CH_2</u>CH_2), 3.14 (d, *J* = 19.5 Hz, 1H, C<u>H</u>H), 2.81 (m, 2H, BrCH_2<u>CH_2</u>), 1.43 (s, 3H, CH_3) e 1.42 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 203.5 (C), 166.0 (C), 137.9 (CH), 132.0 (CH), 127.7 (CH), 125.3 (C), 86.3 (C), 82.5 (CH), 52.6 (OCH_3), 35.9 (CH_2), 32.1(CH_2), 31.7 (CH_2), 27.9 (CH_3) e 27.1 (CH_3) ppm. IR (ATR): 1719 (C=O) cm^{-1}. EM (ESI) *m/z* = 381 (MNa^+). EMAR calculado para $C_{15}H_{19}{}^{79}BrO_5Na$ (MNa^+): 381.0308; encontrado, 381.0317.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. Conclusións

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Explorouse unha ruta alternativa para a síntese dos derivados cromoxénicos de imipenem, empregando un ioduro (**57**) como intermedio clave previo ás reaccións de acoplamento cruzado C-C, en lugar do triflato (**54**) previamente establecido. Este procedemento alternativo foi descartado debido aos baixos rendementos obtidos na etapa clave de formación do diioduro (**58**).
2. Desenvolveuse unha síntese eficiente e reproducible para a obtención dos carbapenems precursores (**82**, **83**, **85**, **97**, **103** e **104**) mediante unha reacción de Stille optimizada: (i) formación *in situ* do triflato (**72** ou **54a**); (ii) desoxixenación do disolvente *N*-metil-2-pirrolidona; (iii) acoplamento carbono-carbono de Stille cos correspondentes estannanos (**74**,**75**, **77**, **78** e **79**). A introdución das modificacións provocou a un aumento significativo dos rendementos, chegando a duplicarse nalgúns casos.
3. Ensaiáronse dous procedementos para a obtención dos compostos tipo éter (**108**): (i) alquilación alílica de Tsuji-Trost e (ii) acoplamento de Mitsunobu; sendo este último o mais satisfactorio, permitindo obter os compostos (**108**) en bo rendemento e de maneira reproducible.
4. Optimizouse un procedemento efectivo para a desprotección selectiva do éter de silicio (TES), empregando unha mestura de AcOH/TBAF. Este procedemento permitiu obter os alcohois **98**, **104**, **106** e **109,** precursores dos carbapenems obxectivo, de maneira satisfactoria.
5. Explorouse o uso de diferentes grupos protectores do ácido carboxílico en busca de un procedemento de desprotección eficiente e reproducible. O estudo realizado permitiu concluír que os métodos empregados proporcionaron os produtos da apertura do anel β-lactámico, demostrando a inestabilidade de dito anel en estes compostos ao tratarse con medios ácidos ou básicos.
6. Os procedementos empregados para a formación do enlace éter nas cefalosporinas **24** non resultaron satisfactorios, observándose unicamente trazas mediante alilación de Tsuji-Trost entre o carbonato **115** e os

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dinitroalcohois aromáticos. A reacción de Mitsunobu non mostrou reactividade en este caso.

7. Conseguiuse unha estratexia sintética eficaz e reproducible que permite obter o bromuro **131** en 7 etapas a partir da cetona **133**. Dito bromuro é un precursor avanzado para a obtención dos derivados bicíclicos do ác. xiquimico (**26**). A optimización da redución estereoselectiva do alquino **136**, mediante transferencia de hidróxeno catalizada por Pd, para obter a olefina **138** coa configuración Z desexada resultou clave en dita síntese.
8. A reacción de ciclación intramolecular tipo Barbier no bromuro **131** deu lugar a unha mestura de produtos complexa que non se puideron identificar.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. Bibliografía e Referencias

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 Lekshmi, M.; Ammini, P.; Kumar, S.; Varela, M. F. *Microorganisms* 2017, *5*, 11.

2 Hall, W.; McDonnell, A.; O'Neil, J. *Superbugs: An Arms Race Against Bacteria*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts; 2018.

3 https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed

4 a) Brown, E.D.; Wright, G.D. *Nature* 2016, *529*, 336–343. b) Gilbert, N. *Nature* 2018, *555*, S5–S7. c) Larsson, D. G. J.; Flach, C. F. *Nat. Rev. Microbiol*. 2022, *20*, 257-269. d) Baker, R. E.; Mahmud, A. S.; Miller, I. F.; Rajeev, M.; Rasambainarivo, F.; Rice, B. L.; Takahashi, S.; Tatem, A. J.; Wagner, C. E.; Wang, L. F.; Wesolowski, A.; Metcalf, C. J. E. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022, *20*, 193–205.

5 *Lancet* 2022, *399*, 629–655.

6 https://www.iapb.org/learn/vision-atlas/about/definitions-and-regions/

7 Fatima, S.; Kumari, A.; Das, G.; Dwivedi, V. P. *Life Sci.* 2020, *252,* 117594.

8 Bouzeyen, R.; Javid, B. *Front. Immunol.* 2022, *13*, 878471.

9 Briles, D. E.; Paton, J. C.; Mukerji, R.; Swiatlo, E.; Crain, M. J. *Microbiol. Spectr*. 2019, *7*.

10 Shirley, M. *Paediatr. Drugs* 2023, *25*, 613–619.

11 Zhao, F. H.; Wu, T.; Hu, Y. M.; Wei, L. H.; Li, M. Q.; Huang, W. J.; Chen, W.; Huang, S. J.; Pan, Q. J.; Zhang, X.; Hong, Y.; Zhao, C.; Li, Q.; Chu, K.; Jiang, Y. F.; Li, M. Z.; Tang, J.; Li, C. H.; Guo, D. P.; Ke, L. D.; Wu, X.; Yao, X. M.; Nie, J. H.; Lin, B. Z.; Zhao, Y. Q.; Guo, M.; Zhao, J.; Zheng, F. Z.; Xu, X. Q.; Su, Y. Y.; Zhang, Q. F.; Sun, G.; Zhu, F. C.; Li, S. W.; Li, Y. M.; Pan, H. R.; Zhang, J.; Qiao, Y. L.; Xia, N. S. *Lancet Infect. Dis.* 2022, *22*, 1756–1768

12 Clegg, J.; Soldaini, E.; McLoughlin, R. M.; Rittenhouse, S.; Bagnoli, F.; Phogat, S. *Front. Immunol.* 2021, *12*, 705360.

13 Langford, B. J.; Soucy, J. P. R.; Leung, V.; So, M.; Kwan, A. T. H.; Portnoff, J. S.; Bertagnolio, S.; Raybardhan, S.; MacFadden, D. R.; Daneman, N. *Clin. Microbiol. Infect.* 2023, *29*, 302–309.

14 Ellabaan, M. M. H.; Munck, C.; Porse, A.; Imamovic, L.; Sommer, M. O. A. *Nat. Commun.* 2021, *12*, 2435.

15 a) Walsh, C. *Nature* 2000, *406*, 775–781. b) Khameneh, B.; Diab, R.; Ghazvini, K.; Fazly Bazzaz, B.S. *Microb. Pathog*. 2016, *95*, 32–42.

16 a) Bush, K. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2018, *62*, e01076–18. b) Bush, K.; Bradford, P. A. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019, *17*, 295–306. c) González-Bello, C.; Rodríguez, D.; Pernas, M.; Rodríguez, Á.; Colchón, E. *J. Med. Chem*. 2020, *63*, 1859–1881.

17 a) D'Costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W. L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; Golding,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

G. B.; Poinar, H. N.; Wright, G. D. *Nature* 2011, *477*, 457–461. b) González-Bello, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, *27*, 4221–4228.

18 Douafer, H.; Andrieu, V.; Phanstiel, O.; Brunel, J. M. *J. Med. Chem.* 2019, *62*, 8665–8681.

19 Kumar, V.; Yasmeen, N.; Pandey, A.; Ahmad Chaudhary, A.; Alawam, A. S.; Ahmad Rudayni, H.; Islam, A.; Lakhawat, S. S.; Sharma, P. K.; Shahid, M. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2023, *13*, 1293633.

20 Morrison, L.; Zembower, T. R. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 2020, *30,* 619–635.

21 Poole, K. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, *61*, 2200–2223.

22 Naas, T.; Oueslati, S; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B. I. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2017, *32*, 917–919. http://www.bldb.eu/

23 Joji, R. M.; Al-Mahmeed, A.; Dar, F. K.; Shahid, M. Trends in Beta-Lactamase Classification. pp. 17–24, in: Shahid, M.; Singh, A.; Sami, H. (Eds.) *Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Threats and Challenges*, Springer Nature Singapore, Singapore, 2022.

24 Ambler, R. P. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1980, *289*, 321–331.

25 a) Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, *39*, 1211–1233. b) Bush, K.; Jacoby, G. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, *54*, 969–976.

26 Akhtar, A.; Fatima, N.; Khan, H. M. Beta-Lactamases and Their Classification: An Overview, pp. 25–33, in: Shahid, M.; Singh, A.; Sami, H. (Eds.) *Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Threats and Challenges*, Springer Nature Singapore, Singapore, 2022.

27 Lence, E.; González-Bello, C. *Adv. Therap.* 2021, *4*, 2000246.

28 Philippon, A.; Jacquier, H.; Ruppé, E.; Labia, R. *Curr. Res. Transl. Med.* 2019, *67*, 115–122.

29 https://www.msdmanuals.com/

30 a) Yoon, E. J.; Jeong, S. H. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020, *76*, 836–864. b) Khan, F.; Chaudhary, B.; Khan, A. U. Class D Type Beta-Lactamases, pp. 125-138, in: Shahid, M.; Singh, A.; Sami, H. (Eds.) *Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Threats and Challenges*, Springer Nature Singapore, Singapore, 2022.

31 Papp-Wallace, K. M.; Endimiani, A.; Taracila, M. A.; Bonomo, R. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, *55*, 4943–4960.

32 a) Pitout, J. D. D.; Peirano, G.; Kock, M. M; Strydom, K. A.; Matsumura, Y. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2019, *33*, e00102–19. b) Bush, K.; Bradford, P. A. *Clin. Microbiol. Rev.* 2020, *33*, e00047–19.

33 a) Stewart, A.; Harris, P.; Henderson, A.; Paterson, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018, *62*, e01195–18. b) Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. *J Mol Biol* 2019, *431*, 3472–3500.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

34 http://www.rcsb.org/

35 a) CIMA-Centro de información de medicamentos (aemps.es) https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html b) https://www.vademecum.es/

36 https://www.pewtrusts.org/es/research-and-analysis/data-visualizations/2019/five-year-analysis-shows-continued-deficiencies-in-antibiotic-development

37 ICTRP Search Portal. https://trialsearch.who.int/

38 Blizzard, T. A.; Chen, H.; Kim, S.; Wu, J.; Bodner, R.; Gude, C.; Imbriglio, J.; Young, K.; Park, Y. W.; Ogawa, A.; Raghoobar, S.; Hairston, N.; Painter, R. E.; Wisniewski, D.; Scapin, G.; Fitzgerald, P.; Sharma, N.; Lu, J.; Ha, S.; Hermes, J.; Hammond, M. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, *24*, 780–785.

39 Keynan, S.; Hooper, N. M.; Felici, A.; Amicosante, G.; Turner, A. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, *39*, 1629–1631.

40 Das, B. C.; Adil Shareef, M.; Das, S.; Nandwana, N. K.; Das, Y.; Saito, M.; Weiss, L. M. *Bioorg. Med. Chem.* 2022, *63*, 116748.

41 a) Liu, B.; Trout, R. E. L.; Chu, G. H.; Mcgarry, D.; Jackson, R. W.; Hamrick, J. C.; Daigle, D. M.; Cusick, S. M.; Pozzi, C.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Docquier, J. D.; Weiss, W. J.; Pevear, D. C.; Xerri, L.; Burns, C. J. *J. Med. Chem.* 2020, *63*, 2789–2801. b) Hamrick, J. C.; Docquier, J. D.; Uehara, T.; Myers, C. L.; Six, D. A.; Chatwin, C. L.; John, K. J.; Vernacchio, S. F.; Cusick, S. M.; Trout, R. E. L.; Pozzi, C.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Liu, B.; Jackson, R. W.; Moeck, G.; Xerri, L.; Burns, C. J.; Pevear, D. C.; Daigle, D. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020, *64*, e01963–19. c) Lomovskaya, O.; Tsivkovski, R.; Nelson, K.; Rubio-Aparicio, D.; Sun, D.; Totrov, M.; Dudley, M. N. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020, *64*, e00212–20.

42 Novelli, A.; Del Giacomo, P.; Rossolini, G. M.; Tumbarello, M. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2020, *18*, 643–655.

43 a) Lence, E.; González-Bello, C. *Front. Microbiol.* 2021, *12*, 721826. b) Lomovskaya, O.; Castanheira, M.; Lindley, J.; Rubio-Aparicio, D.; Nelson, K.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Totrov, M.; Loutit, J.; Dudley, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2023, *67*, e0044023.

44 a) Bou, G.; Fernández-Olmos, A.; García, C.; Sáez-Nieto, J. A.; Valdezate, S. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* 2011, *29*, 601–608. b) Lee, Y. L.; Chen, H. M.; Hii, I. M.; Hsueh, P. R. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2022, *59*, 106528. c) Del Corpo, O.; Senécal, J.; Hsu, J. M.; Lawandi, A.; Lee, T. C. *Clin. Microbiol. Infect.* 2023, *29*, 1516–1527.

45 Arakawa, Y.; Shibata, N.; Shibayama, K.; Kurokawa, H.; Yagi, T.; Fujiwara, H.; Goto, M. *J. Clin. Microbiol.* 2000, *38*, 40–43.

46 Lee, K.; Chong, Y.; Shin, H. B.; Kim, Y. A.; Yong, D.; Yum, J. H. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001, *7*, 88–91.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

47 Pierce, V. M.; Simner, P. J.; Lonsway, D. R.; Roe-Carpenter, D. E.; Johnson, J. K.; Brasso, W. B.; Bobenchik, A. M.; Lockett, Z. C.; Charnot-Katsikas, A.; Ferraro, M. J.; Thomson, R. B.; Jenkins, S. G.; Limbago, B. M.; Das, S. *J. Clin. Microbiol*. 2017, *55*, 2321–2333.

48 Miglietta, L.; Moniri, A.; Pennisi, I.; Malpartida-Cardenas, K.; Abbas, H.; Hill-Cawthorne, K.; Bolt, F.; Jauneikaite, E.; Davies, F.; Holmes, A.; Georgiou, P.; Rodriguez-Manzano, J. *Front. Mol. Biosci.* 2021, *8*, 775299.

49 Savli, H.; Karadenizli, A.; Kolayli, F.; Gundes, S.; Ozbek, U.; Vahaboglu, H. *J. Med. Microbiol.* 2003, *52*, 403–408.

50 Burckhardt, I.; Zimmermann, S. *J. Clin. Microbiol*. 2011, *49*, 3321-3324.

51 a) Glupczynski, Y.; Jousset, A.; Evrard, S.; Bonnin, R. A.; Huang, T. D.; Dortet, L.; Bogaerts, P.; Naas, T. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017, *72*, 1955–1960. b) Wareham, D. W.; Momin, M. H. F. A. *J. Clin. Microbiol.* 2017, *55*, 1223–1225. c) Saleh, A.; Göttig, S.; Hamprecht, A. G. *J. Clin. Microbiol.* 2018, *56*, e01140–18. d) Greissl, C.; Saleh, A.; Hamprecht, A. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019, *38*, 331–335.

52 Coris BioConcept https://www.corisbio.com/index

53 Bogaerts, P.; Berger, A. S.; Evrard, S.; Huang, T. D. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020, *75*, 1491–1494.

54 a) Poirel, L.; Nordmann, P. *J. Clin. Microbiol.* 2015, *53*, 3003–3008. b) Literacka, E.; Herda, M.; Baraniak, A.; Żabicka, D.; Hryniewicz, W.; Skoczyńska, A.; Gniadkowski, M. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017, *36*, 2281–2287.

55 Bernabeu, S.; Dortet, L.; Naas, T. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017, *72*, 1646–1658.

56 a) Dortet, L.; Poirel, L.; Nordmann, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, *56*, 6437–6440. b) Sadek, M.; Poirel, L.; Nordmann, P. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2021, *99*, 115280.

57 a) Renvoise, A.; Decre, D.; Amarsy-Guerle, R.; Huang, T. D.; Jost, C.; Podglajen, I.; Raskine, L.; Genel, N.; Bogaerts, P.; Jarlier, V.; Arlet, G. *J. Clin. Microbiol.* 2013, *51*, 4012–4017. b) Morosini, M. I.; García-Castillo, M.; Tato, M.; Gijón, D.; Valverde, A.; Ruiz-Garbajosa, P.; Cantón, R. *J. Clin. Microbiol.* 2014, *52*, 1741–1744.

58 O'Callaghan, C. H.; Morris, A.; Kirby, S. M.; Shingler, A. H. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1972, *1*, 283–288.

59 O'Callaghan, C.H.; Clark, J.C.; Kennedy, J.; Kirby, S.M; Heath, I.; Long, A.G.; Morris, A.; Shingler, A.H.; Weir, N G. Test for Beta-Lactamase Activity Using Chromogenic Cephalosporin Compound. US3830700A, 1972.

60 Mobashery, S.; Johnston, M. *J. Org. Chem.* 1986, *51*, 4723–4726.

61 Kaiser, G. V.; Cooper, R. D. G.; Koehler, R. E.; Murphy, C. F.; Webber, J. A.; Wright, I. G.; Van Heyninqen, E. M. *J. Org. Chem.* 1970, *35*, 2430–2433.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

62 Barendse, N. C. M. E.; Van Der Klein, P. A. M.; Verweij, J.; Witkamp, H. A.; Van Zoest, W. J.; De Vroom, E. *Synthesis* 1998, *2*, 145–147.

63 Lee, M.; Hesek, D.; Mobashery, S. A. *J. Org. Chem.* 2005, *70*, 367–369.

64 Sutton, L. D.; Biedenbach, D. J.; Yen, A.; Jones, R. N. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1995, *21*, 1–8.

65 a) Jones, R. N.; Wilson, H. W.; Novick, W. J.; Barry, A. L.; Thornsberry, C. *J. Clin. Microbiol.* 1982, *15*, 954–958. b) Bebrone, C.; Moali, C.; Mahy, F.; Rival, S.; Docquier, J. D.; Rossolini, G. M.; Fastrez, J.; Pratt, R. F.; Frère, J. M.; Galleni, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, *45*, 1868–1871.

66 a) Jones, R. N.; Wilson, H. W.; Novick, W. J. *J. Clin. Microbiol.* 1982, *15*, 677–683. b) Kobayashi, S.; Arai, S.; Hayashi, S.; Sakaguchi, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988, *32*, 1040–1045.

67 a) Hanaki, H.; Kubo, R.; Nakano, T.; Kurihara, M.; Sunagawa, K. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004, *53*, 888–889. b) Hanaki, H.; Koide, Y.; Yamazaki, H.; Kubo, R.; Nakano, T.; Atsuda, K.; Sunakawa, K. *J. Infect. Chemother.* 2007, *13*, 390–395.

68 Boehle, K. E.; Gilliand, J.; Wheeldon, C. R.; Holder, A.; Adkins, J. A.; Geiss, B. J.; Ryan, E. P.; Henry, C. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, *56*, 6886–6890.

69 https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development

70 a) Theuretzbacher, U. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016, *15*, 812–813. b) Yip, A. Y. G.; King, O. G.; Omelchenko, O.; Kurkimat, S.; Horrocks, V.; Mostyn, P.; Danckert, N.; Ghani, R.; Satta, G.; Jauneikaite, E.; Davies, F. J.; Clarke, T. B.; Mullish, B. H.; Marchesi, J. R.; McDonald, J. A. K. *Nat. Commu*n. 2023, *14*, 5094.

71 https://carb-x.org/

72 da Cunha, B. R.; Fonseca, L. P.; Calado, C. R. C. *Antibiotics* 2019, *8*, 45.

73 Roberts, F.; Roberts, C. W.; Johnson, J. J.; Kyle, D. E.; Krell, T.; Coggins, J. R.; Coombs, G. H.; Milhous, W. K.; Tzipori, S.; Ferguson, D. J. P.; Chakrabarti, D.; McLeod, R. *Nature.* 1998, *393*, 801–805.

74 González-Bello, C. *Curr. Top. Med. Chem.* 2016, *16*, 960–977.

75 a) Haslam, E. *The Shikimate pathway: Metabolism and Metabolites*; Wiley, New York, 1974. b) Abell, C. *Enzymology and molecular biology of the shikimate pathway. En: Comprehensive Natural Products Chemistry.* Sankawa, U., Ed. Elsevier Science Ltd.: Oxford, 1998, *1*,573–607. c) Herrmann, K.; Weaver, L. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1999, *50*, 473–755.

76 https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis

77 Bang-Le, Z.; Cheng-Qi, F.; Lei, D.; Fang-Dao, W. Y.; Jian-Min, Y. *Eur. J. Med. Chem*. 2010, *45*, 5285–5264.

78 Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M.; Gay, N. J. *EMBO J.* 1982, *1*, 945–951.

79 Prado, V.; Lence, E.; Vallejo, J. A.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. - Eur. J.* 2016, *22*, 2758–2768.

80 Blanco, B.; Prado, V.; Lence, E.; Otero, J. M.; Garcia-Doval, C.; Van Raaij, M. J.; Llamas-Saiz, A. L.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, *135*, 12366–12376.

81 Simithy, J.; Fuanta, N. R.; Alturki, M.; Hobrath, J. V.; Wahba, A. E.; Pina, I.; Rath, J.; Hamann, M. T.; Deruiter, J.; Goodwin, D. C.; Calderón, A. I. *Biochemistry* 2018, *57*, 4923–4933.

82 Simithy, J.; Reeve, N.; Hobrath, J. V.; Reynolds, R. C.; Calderón, A. I. *Tuberculosis* 2014, *94*, 152–158.

83 Krishnasamy, S. K.; Namasivayam, V.; Mathew, S.; Eakambaram, R. S.; Ibrahim, I. A.; Natarajan, A.; Palaniappan, S. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2016, *349*, 383–397.

84 Rahul Reddy, M. B.; Krishnasamy, S. K.; Kathiravan, M. K. *Bioorg. Chem.* 2020, *102*, 104083.

85 Rios-Soto, L.; Hernández-Campos, A.; Tovar-Escobar, D.; Castillo, R.; Sierra-Campos, E.; Valdez-Solana, M.; Téllez-Valencia, A.; Avitia-Domínguez, C. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, *25*, 5077.

86 a) Prado, V.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. - Eur. J.*2016, *22*, 17988–18000. b) Prado, V.; Lence, E.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* 2016, *59*, 5471–5487. c) González-Bello, C. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2019, *48*, 17–23.

87 Yu, S.; Vosbeek, A.; Corbella, K.; Severson, J.; Schesser, J.; Sutton, L. D. *Anal. Biochem.* 2012, *428*, 96–98.

88 Makena, A.; Van Berkel, S. S.; Lejeune, C.; Owens, R. J.; Verma, A.; Salimraj, R.; Spencer, J.; Brem, J.; Schofield, C. J. *ChemMedChem* 2013, *8*, 1923–1929.

89 Ghavami, A.; Labbé, G.; Brem, J.; Goodfellow, V. J.; Marrone, L.; Tanner, C. A.; King, D. T.; Lam, M.; Strynadka, N. C. J.; Pillai, D. R.; Siemann, S.; Spencer, J.; Schofield, C. J.; Dmitrienko, G. I. *Anal. Biochem.* 2015, *486*, 75–77.

90 Gao, W.; Xing, B.; Tsien, R. Y.; Rao, J. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 11146–11147.

91 Xie, J.; Mu, R.; Fang, M.; Cheng, Y.; Senchyna, F.; Moreno, A.; Banaei, N.; Rao, J. *Chem. Sci.* 2021, *12*, 9153–9161.

92 Xie, H.; Mire, J.; Kong, Y.; Chang, M.; Hassounah, H. A.; Thornton, C. N.; Sacchettini, J. C.; Cirillo, J. D.; Rao, J. *Nat. Chem.* 2012, *4*, 802–809.

93 Cheng, Y.; Xie, H.; Sule, P.; Hassounah, H.; Graviss, E. A.; Kong, Y.; Cirillo, J. D.; Rao, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, *53*, 9360–9364.

94 Cheng, Y.; Xie, J.; Lee, K. H.; Gaur, R. L.; Song, A.; Dai, T.; Ren, H.; Wu, J.; Sun, Z.; Banaei, N.; Akin, D.; Rao, J. *Sci. Transl. Med.* 2018, *10*, 4470.

95 Song, A.; Cheng, Y.; Xie, J.; Banaei, N.; Rao, J. *Chem. Sci.* 2017, *8*, 7669–7674.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

96 Shaltiel, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967, *29*, 178–183.
97 Yao, H.; So, M. K.; Rao, J. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, *46*, 7031–7034.
98 Dai, T.; Xie, J.; Buonomo, J. A.; Moreno, A.; Banaei, N.; Bertozzi, C. R.; Rao, J. *Anal. Chem.* 2023, *95*, 7329–7335.
99 Thai, H. B. D.; Yu, J. K.; Park, B. S.; Park, Y. J.; Min, S. J.; Ahn, D. R. *Biosens. Bioelectron.* 2016, *77*, 1026–1031.
100 Shi, H.; Cheng, Y.; Lee, K. H.; Luo, R. F.; Banaei, N.; Rao, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, *53*, 8113–8116.
101 Li, L.; Li, Z.; Shi, W.; Li, X.; Ma, H. *Anal. Chem.* 2014, *86*, 6115–6120.
102 Mao, W.; Qian, X.; Zhang, J.; Xia, L.; Xie, H. *ChemBioChem* 2017, *18*, 1990–1994.
103 Mao, W.; Xia, L.; Wang, Y.; Xie, H. A. *Chem. Asian J.* 2016, *11*, 3493–3497.
104 Zlokarnik, G.; Negulescu, P. A.; Knapp, T. E.; Mere, L.; Burres, N.; Feng, L.; Whitney, M.; Roemer, K.; Tsien, R. Y. *Science* 1998, *279*, 84–88.
105 Kaderabkova, N.; Bharathwaj, M.; Furniss, R. C. D.; Gonzalez, D.; Palmer, T.; Mavridou, D. A. I. *Microbiology* 2022, *168*, 001217.
106 Shao, Q.; Zheng, Y.; Dong, X.; Tang, K.; Yan, X.; Xing, B. *Chem. - Eur. J.* 2013, *19*, 10903–10910.
107 Xing, B.; Khanamiryan, A.; Rao, J. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 4158–4159.
108 Kong, Y.; Yao, H.; Ren, H.; Subbian, S.; Cirillo, S. L. G.; Sacchettini, J. C.; Rao, J.; Cirillo, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2010, *107*, 12239–12244.
109 Zhang, J.; Shen, Y.; May, S. L.; Nelson, D. C.; Li, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, *51*, 1865–1868.
110 Arca-Suárez, J.; Vázquez-Ucha, J. C.; Fraile-Ribot, P. A.; Lence, E.; Cabot, G.; Martínez-Guitián, M.; Lasarte-Monterrubio, C.; Rodríguez-Iglesias, M.; Beceiro, A.; González-Bello, C.; Galán-Sánchez, F.; Oliver, A.; Bou, G. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020, *75*, 3209–3217.
111 Rodríguez, D.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* 2020, *63*, 3737–3755.
112 Mao, W.; Xia, L.; Xie, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, *56*, 4468–4472.
113 Li, W.; Wang, J.; Li, C.; Zong, Z.; Zhao, J.; Gao, H.; Liu, D. *JACS Au* 2023, *3*, 227–238.
114 Li, W.; Li, J.; Xu, H.; Gao, H.; Liu, D. *Nat. Commun.* 2024, *15*, 1–14.
115 a) Kim, H. S.; Kim, J. O.; Lee, J. E.; Park, K. G.; Lee, H. K.; Kim, S. Y.; Min, S. J.; Kim, J.; Park, Y. J. *J. Clin. Microbiol.* 2019, *58*, e01026–19. b) Kim, J.; Kim, Y.; Abdelazem, A. Z.; Kim, H. J.; Choo, H.; Kim, H. S.; Kim, J. O.; Park, Y. J.; Min, S. J. *Bioorg. Chem.* 2020, *94*, 103405.
116 Ma, C. W.; Ng, K. K. H.; Yam, B. H. C.; Ho, P. L.; Kao, R. Y. T.; Yang, D. *J. Am. Chem. Soc.* 2021, *143*, 6886–6894.
117 a) Docquier, J. D.; Calderone, V.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Giuliani, F.; Bellucci, L.; Tafi, A.; Nordmann, P.; Botta, M.; Rossolini, G. M.;

Mangani, S. *Chem. Biol.* 2009, *16*, 540–547. b) Papp-Wallace, K. M.; Kumar, V.; Zeiser, E. T.; Becka, S. A.; van den Akker, F. *Antibiotics* 2019, *8*, 145.

118 Smith, C. A.; Stewart, N. K.; Toth, M.; Vakulenko, S. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019, *63*, e01202–19.

119 Akhtar, A.; Pemberton, O. A.; Chen, Y. *ACS Infect. Dis.* 2020, *6*, 261–271.

120 Tassone, G.; De Luca, F.; Pozzi, C.; Di Pisa, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Doquier, J.D.; Crystal structure of class D β-lactamase OXA-48 in complex with meropenem, https://doi.org/10.2210/pdb6ZRP/pdb

121 Tassone, G.; De Luca, F.; Pozzi, C.; Di Pisa, F.; Benvenuti, M.; Mangani, S.; Doquier, J.D.; Crystal structure of class D β-lactamase OXA-48 in complex with ertapenem, https://doi.org/10.2210/pdb6ZRJ/pdb

122 a) Stojanoski, V.; Hu, L.; Sankaran, B.; Wang, F.; Tao, P.; Prasad, B. V. V.; Palzkill, T. *ACS Infect. Dis.* 2021, *7*, 445–460. b) Chiou, J.; Cheng, Q.; Shum, P. T. F.; Wong, M. H. Y.; Chan, E. W. C.; Chen, S. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, *22*, 11480.

123 Das, S.; Ihssen, J.; Wick, L.; Spitz, U.; Shabat, D. *Chem. - Eur. J.* 2020, *26*, 3647–3652.

124 Robles Baños, A. Nuevos Métodos de Diagnóstico Clínico e Inhibidores de La Viabilidad Bacteriana Para La Identificación y El Control de Las Súper Bacterias. Universidade de Santiago de Compostela, España, 2019.

125 Jiang, B.; Tian, H.; Huang, Z. G.; Xu, M. *Org. Lett.* 2008, *10*, 2737–2740.

126 Xu, X.; Zhu, S.; Cui, X.; Wojtas, L.; Zhang, X. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, *52*, 11857–11861.

127 Anselmi, E.; Abarbri, M.; Duchêne, A.; Langle-Lamandé, S.; Thibonnet, J. *Synthesis* 2012, *44*, 2023–2040.

128 Nishimaru, T.; Eto, K.; Komine, K.; Ishihara, J.; Hatakeyama, S. *Chem. - Eur. J.* 2019, *25*, 7927–7934.

129 Lohse-Fraefel, N.; Carreira, E. M. *Chem. - Eur. J.* 2009, *15*, 12065–12081.

130 Mao, W.; Wang, Y.; Qian, X.; Xia, L.; Xie, H. *ChemBioChem* 2019, *20*, 511–515.

131 Guest, A. W.; Branch, C. L.; Finch, S. C.; Kaura, A. C.; Milner, P. H.; Pearson, M. J.; Ponsford, R. J.; Smale, T. C. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 1987, *0*, 45–55.

132 Mehta, A.; Jaouhari, R.; Benson, T. J.; Douglas, K. T. *Tetrahedron Lett.* 1992, *33*, 5441–5444.

133 Cunico, R. F.; Bedell, L. *J. Org. Chem.* 1980, *45*, 4797–4798.

134 Corey, E. J.; Ponder, J. W.; Ulrich, P. *Tetrahedron Lett.* 1980, *21*, 137–140.

135 Wang, J.; Xu, W.; Xue, S.; Yu, T.; Xie, H. *Org. Biomol. Chem.* 2020, *18*, 4029–4033.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

136 Jiang, J. A.; Zhai, J. J.; Yu, X. H.; Teng, X.; Ji, Y. F. *Synthesis (Stuttg)* 2012, *44*, 207–214.

137 Sitzmann, M.; Weidlich, I. E.; Filippov, I. V.; Liao, C.; Peach, M. L.; Ihlenfeldt, W. D.; Karki, R. G.; Borodina, Y. V.; Cachau, R. E.; Nicklaus, M. C. *J. Chem. Inf. Model.* 2012, *52*, 739–756.

138 de Sena M. Pinheiro, P.; Rodrigues, D. A.; do Couto Maia, R.; Thota, S.; Fraga, C. A. M. *Curr. Top. Med. Chem.* 2019, *19*, 1712–1733.

139 Fang, Z.; Song, Y.; Zhan, P.; Zhang, Q.; Liu, X. *Future Med. Chem.* 2014, *6*, 885–901.

140 Pernas Marín, M. Control de la conformación de la diana y el ligando para el desarrollo de nuevos antibióticos - aplicación a la inhibición del enzima siquimato quinasa, Universidade de Santiago de Compostela, España, 2019.

141 Pernas, M.; Blanco, B.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Org. Chem. Front.* 2019, *6*, 2514–2528.

142 Vicente Arroyo, R. *AnQuimRSEQ* 2015, *111*, 41–47.

143 a) Shen, R.; Chen, T.; Zhao, Y.; Qiu, R.; Zhou, Y.; Yin, S.; Wang, X.; Goto, M.; Han, L. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, *133*, 17037–17044. b) Iwasaki, R.; Tanaka, E.; Ichihashi, T.; Idemoto, Y.; Endo, K. *J. Org. Chem.* 2018, *83*, 13574–13579.

144 Baráth, E. *Catalysts* 2018, *8*, 671.

145 a) Molander, G. A.; Harris, C. R.; Charette, A. B. Samarium(II) Iodide. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* 2005. b) Molander, G. A.; Etter, J. B. *J. Org. Chem.* 1986, *51*, 1778–1786. c) Molander, G. A.; McKie, J. A. A. *J. Org. Chem.* 1991, *56*, 4112–4120.

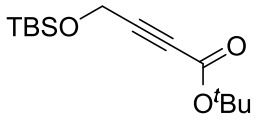
146 Amarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*; Butterworth Heinemann: Oxford, 1996.

147 http://www.pymol.org

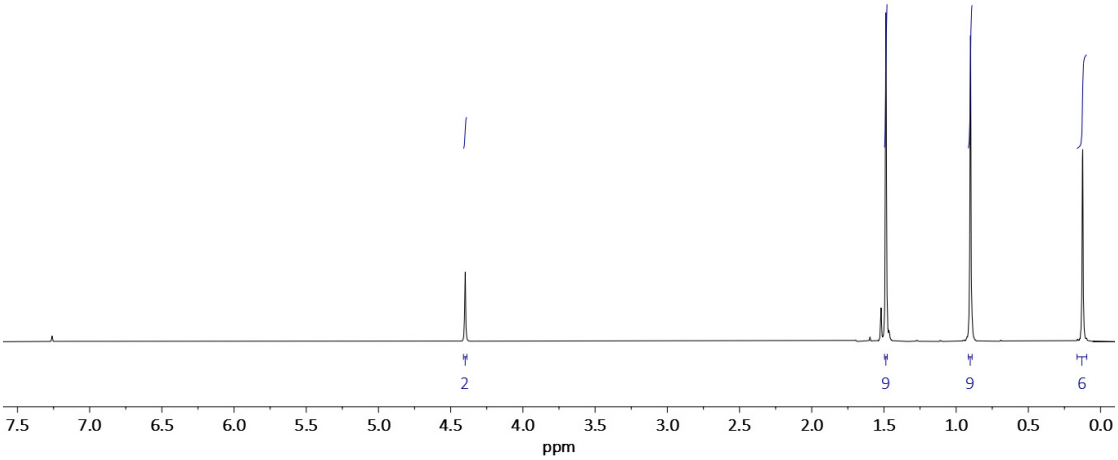
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

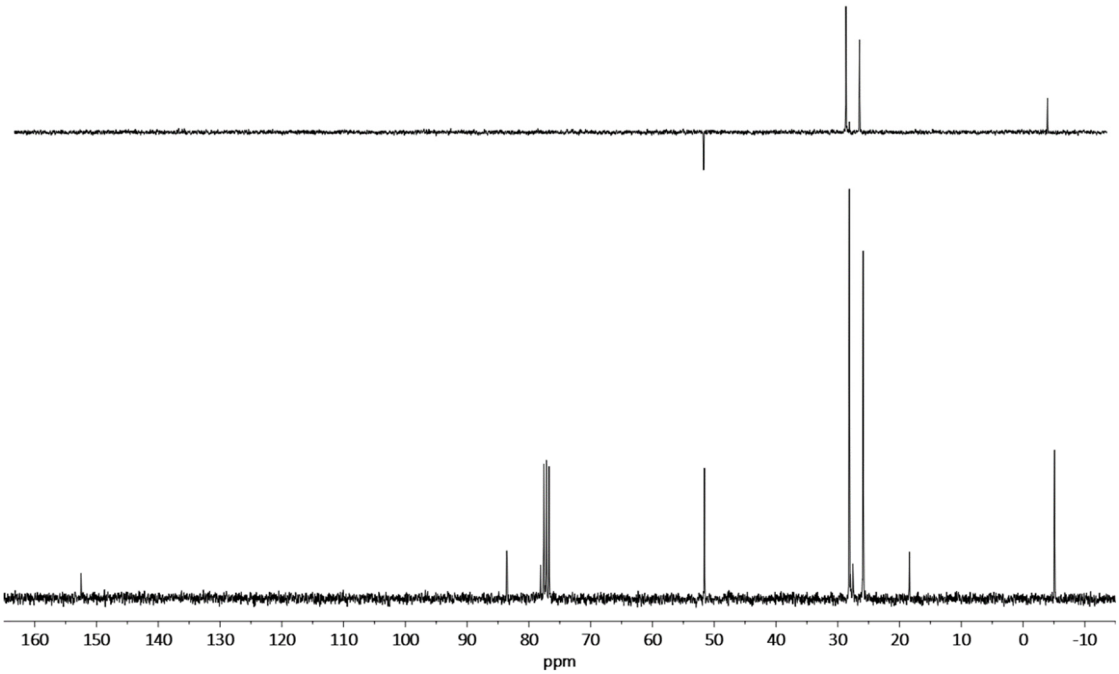
Anexo I: Espectros de RMN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

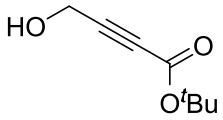


62

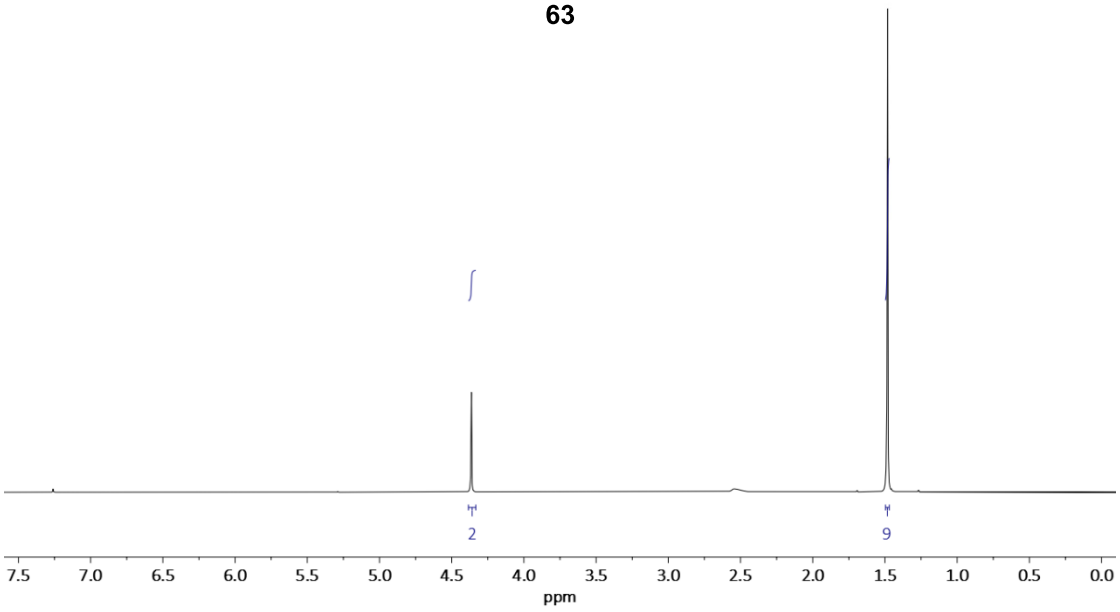


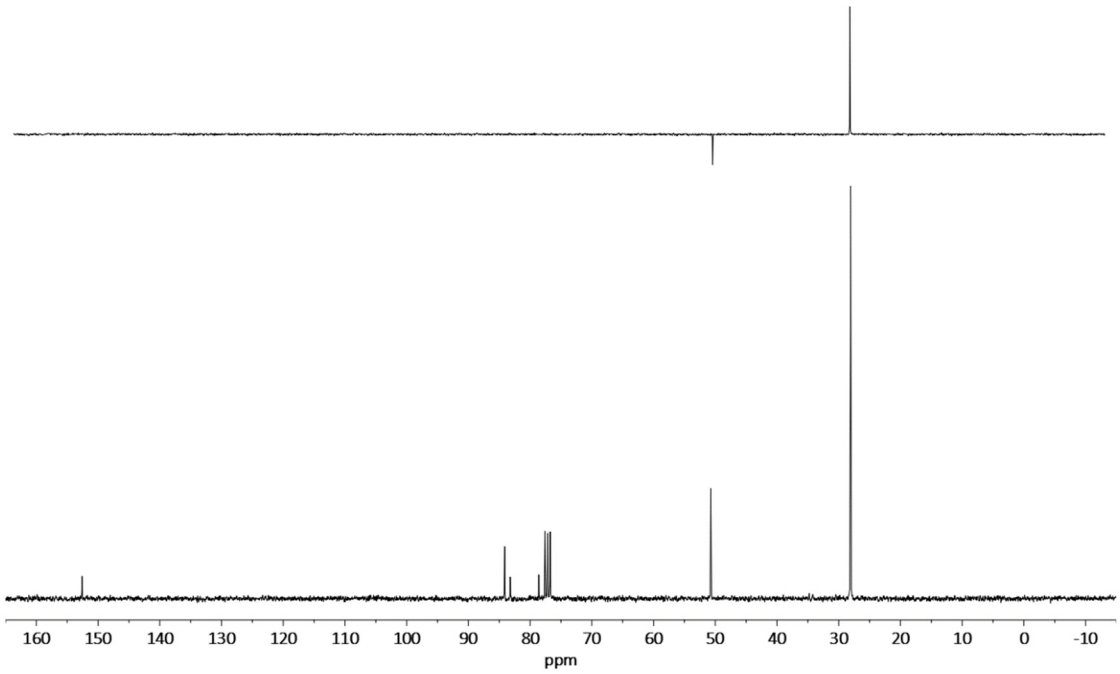


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

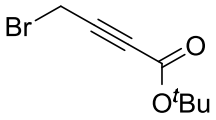


63

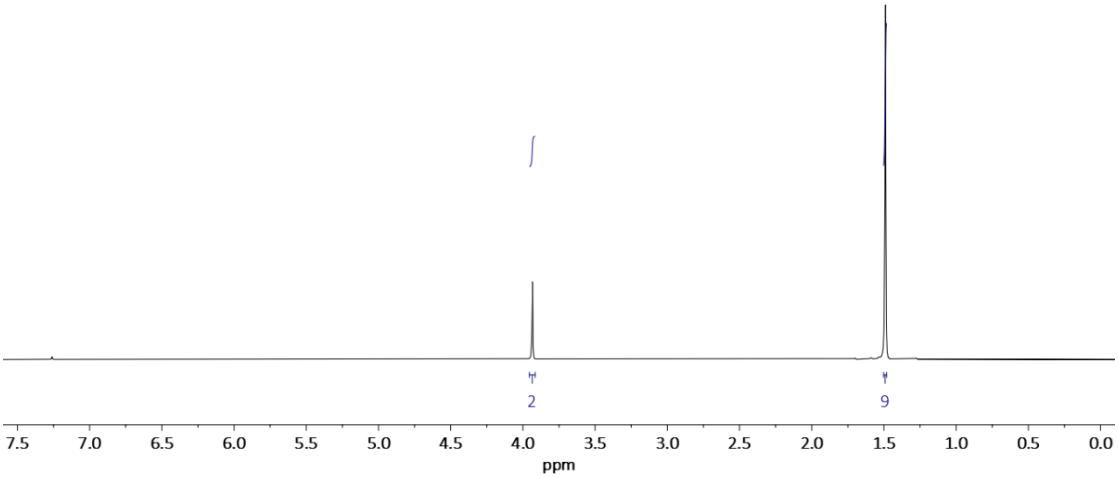


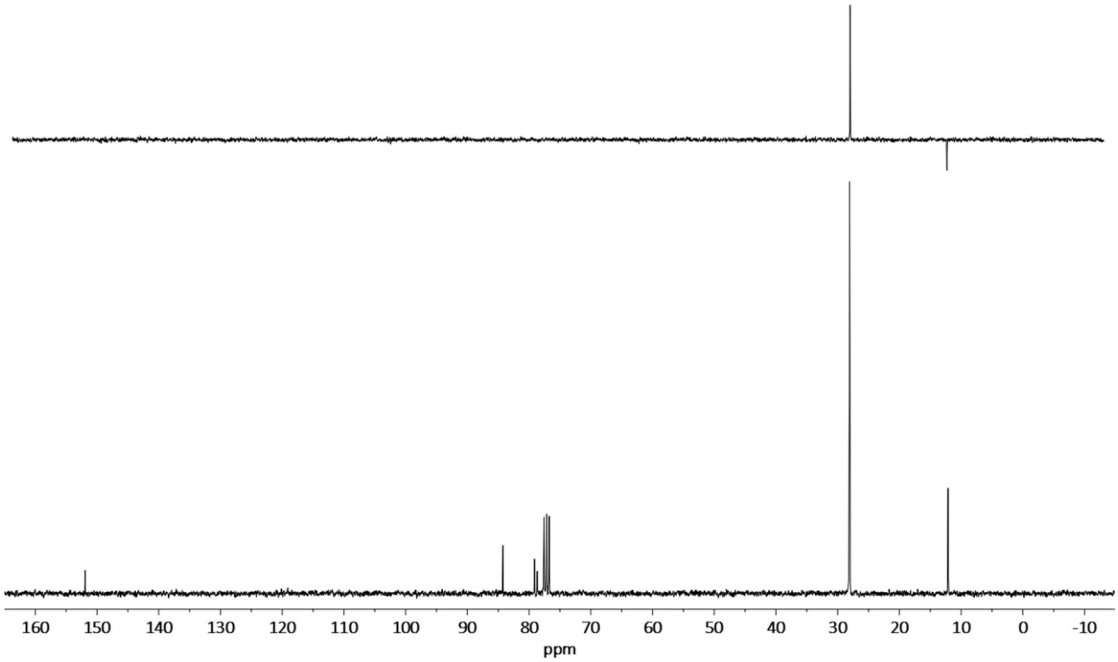


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

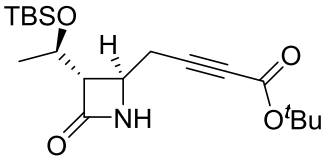


59

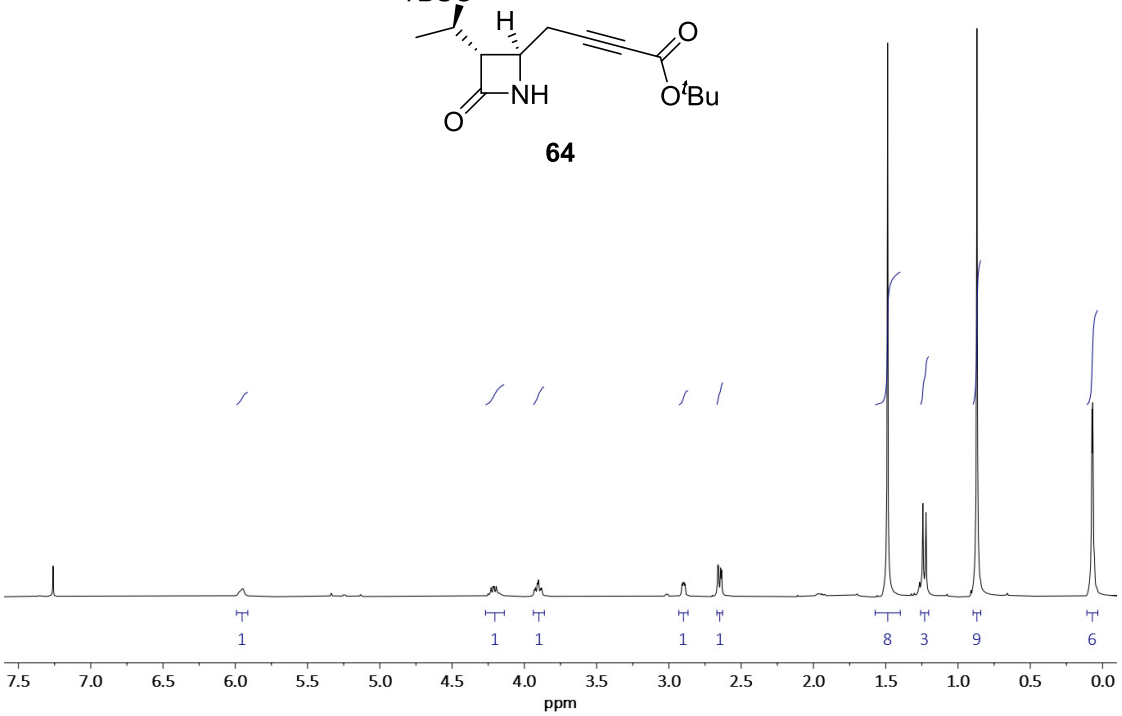


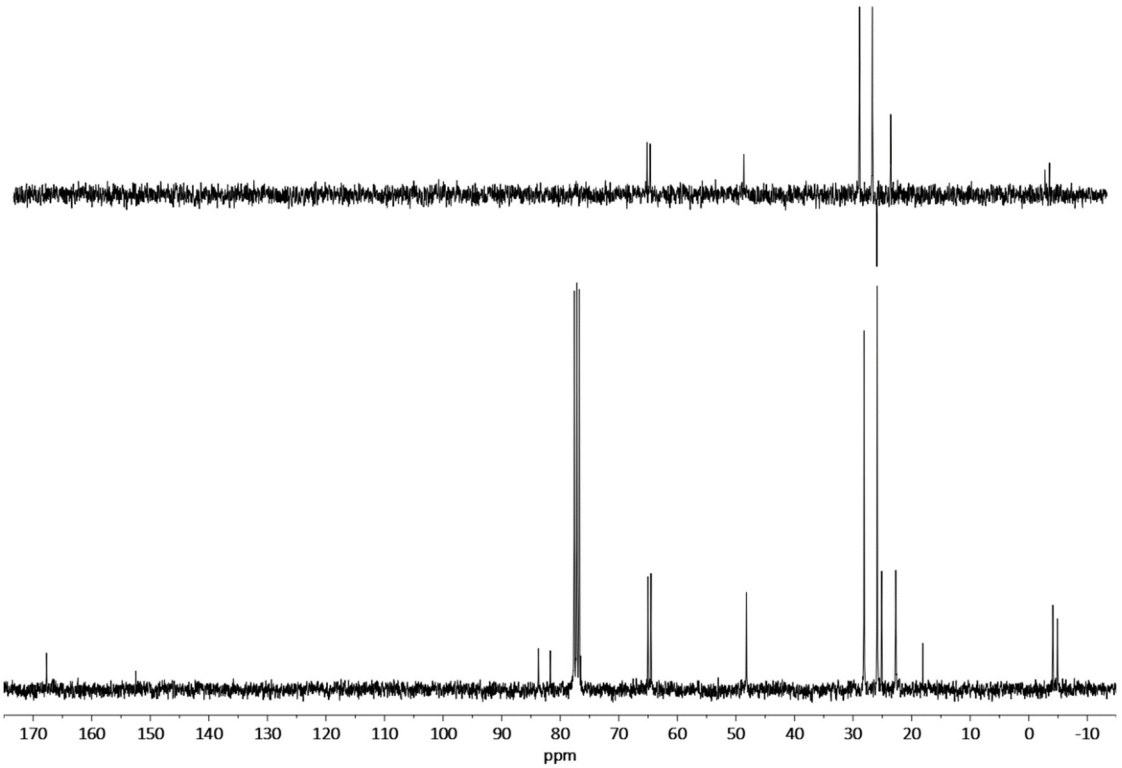


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

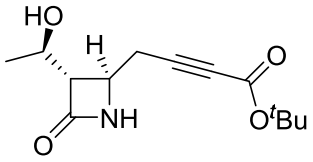


64

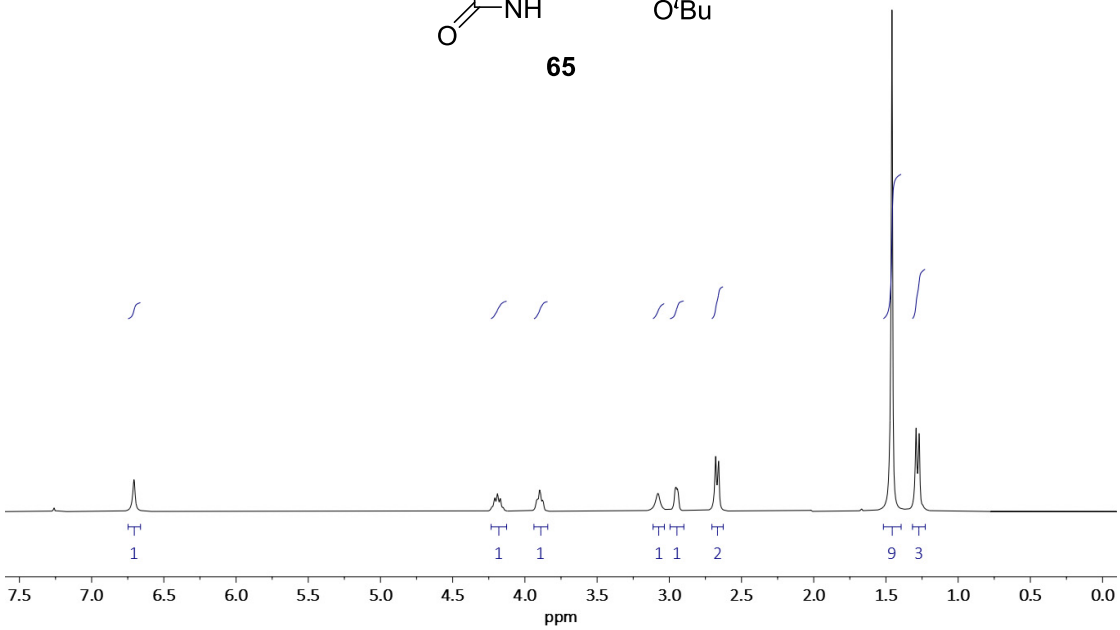


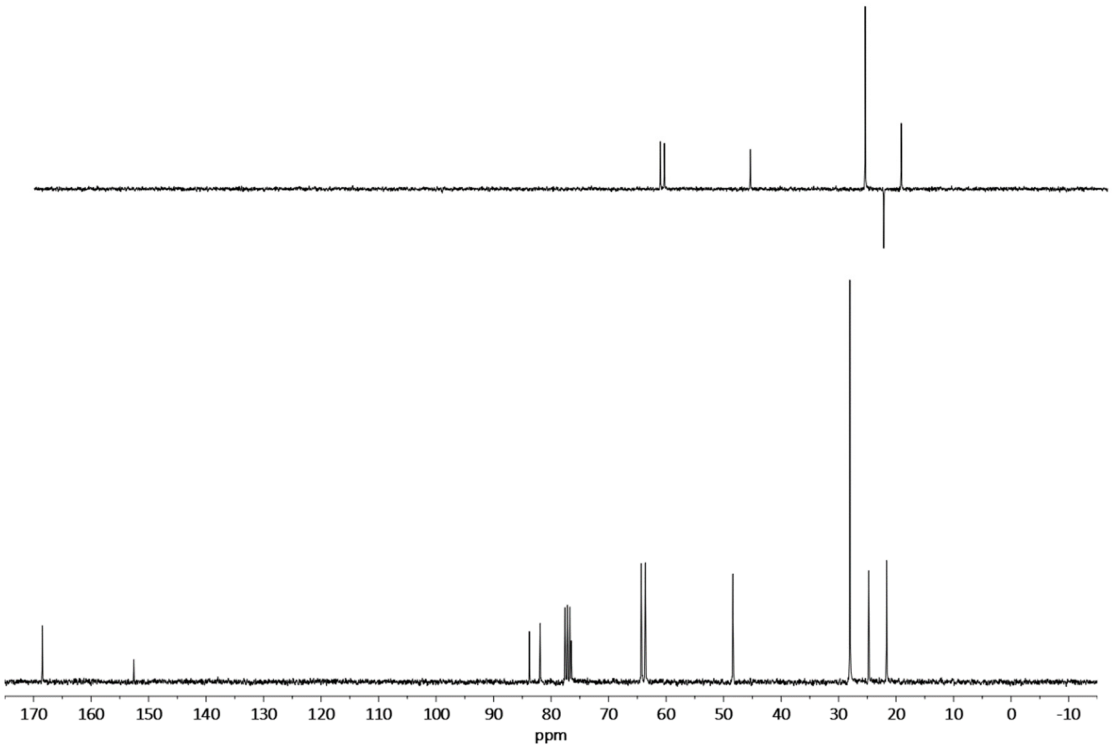


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

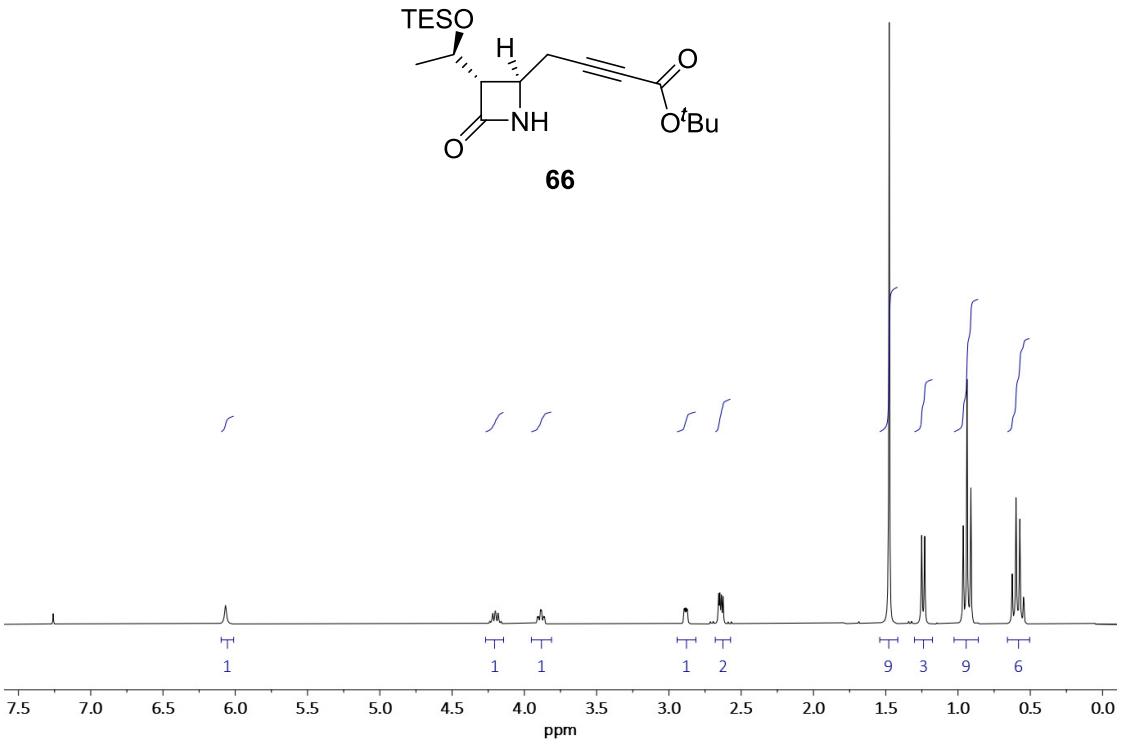


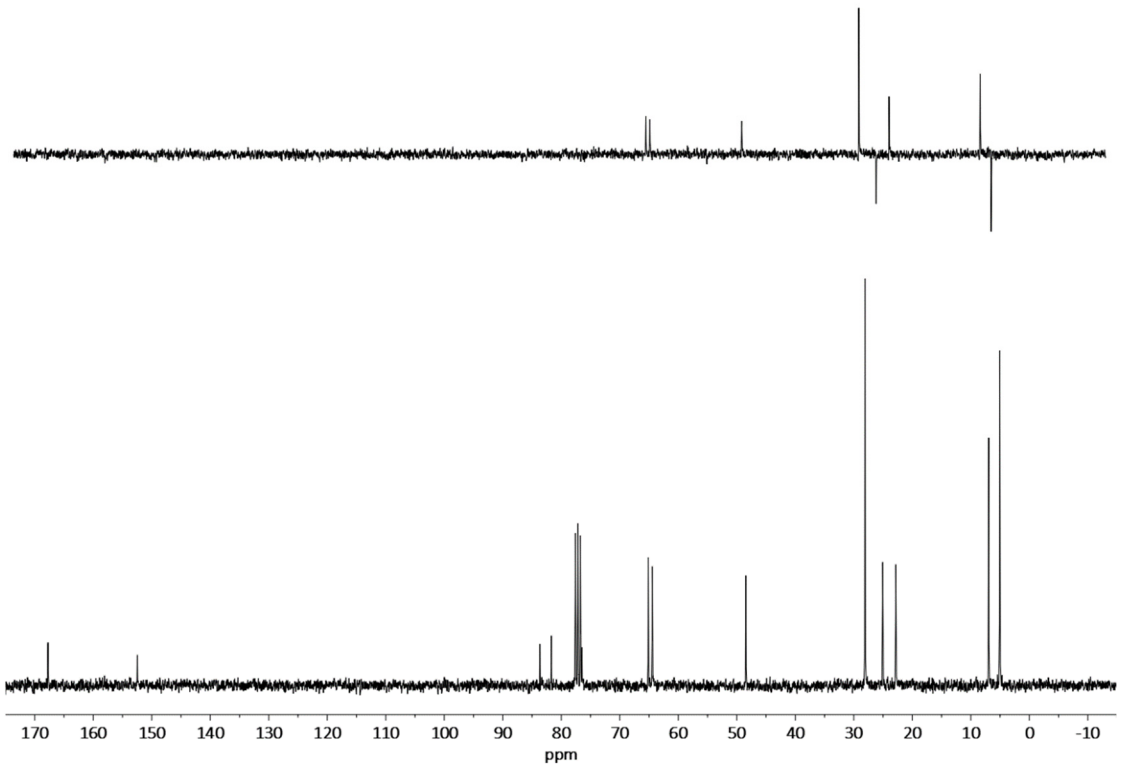
65



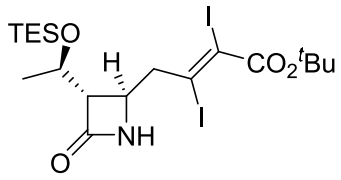


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

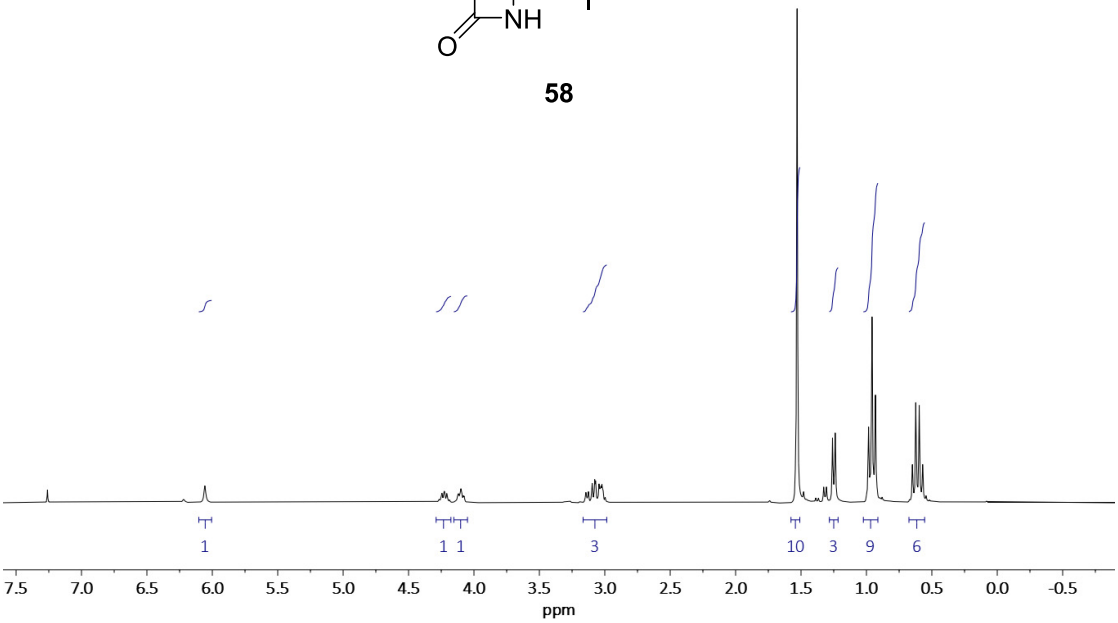


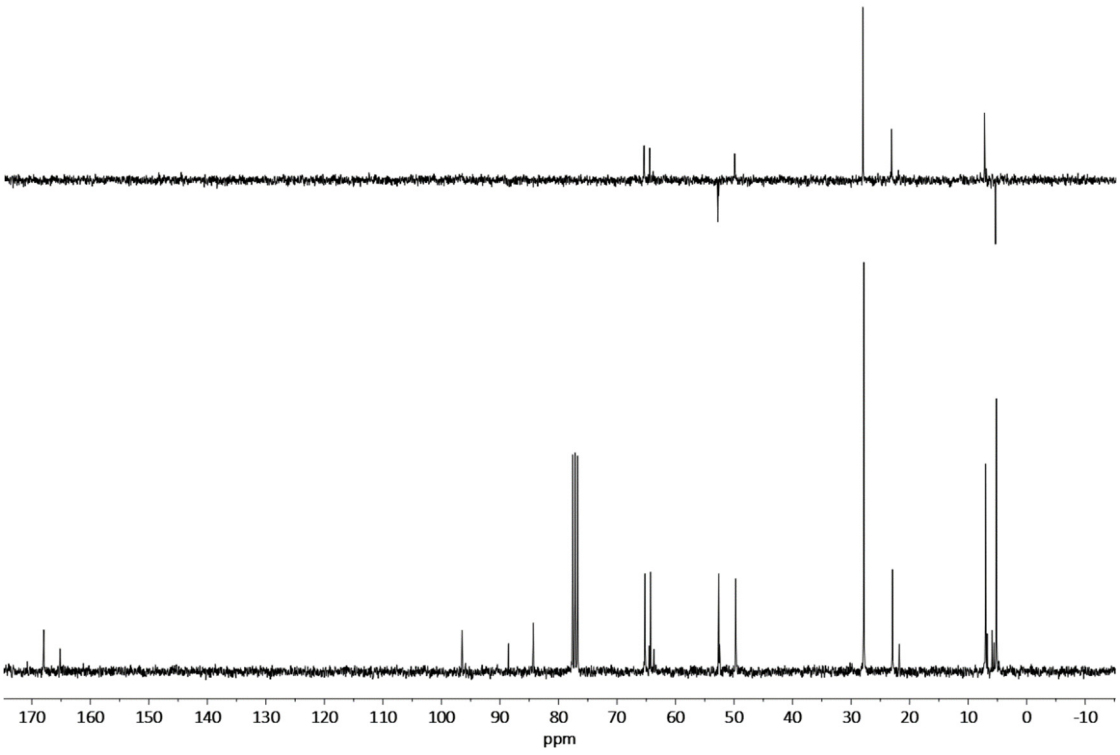


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

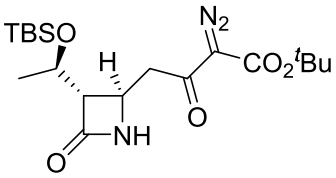


58

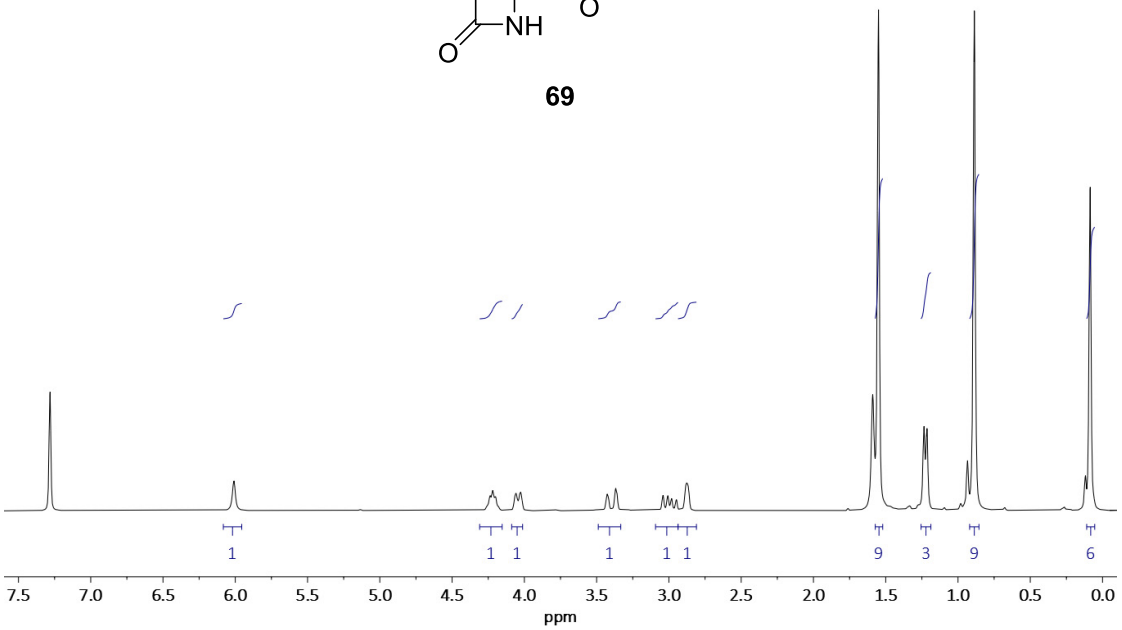


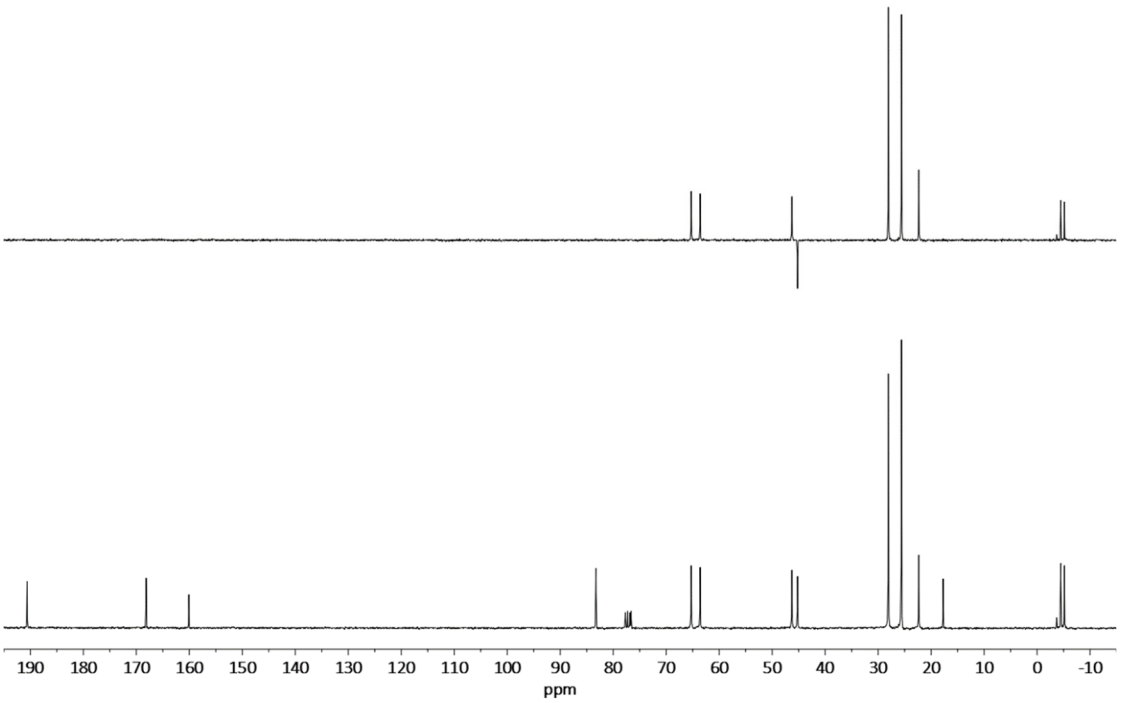


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



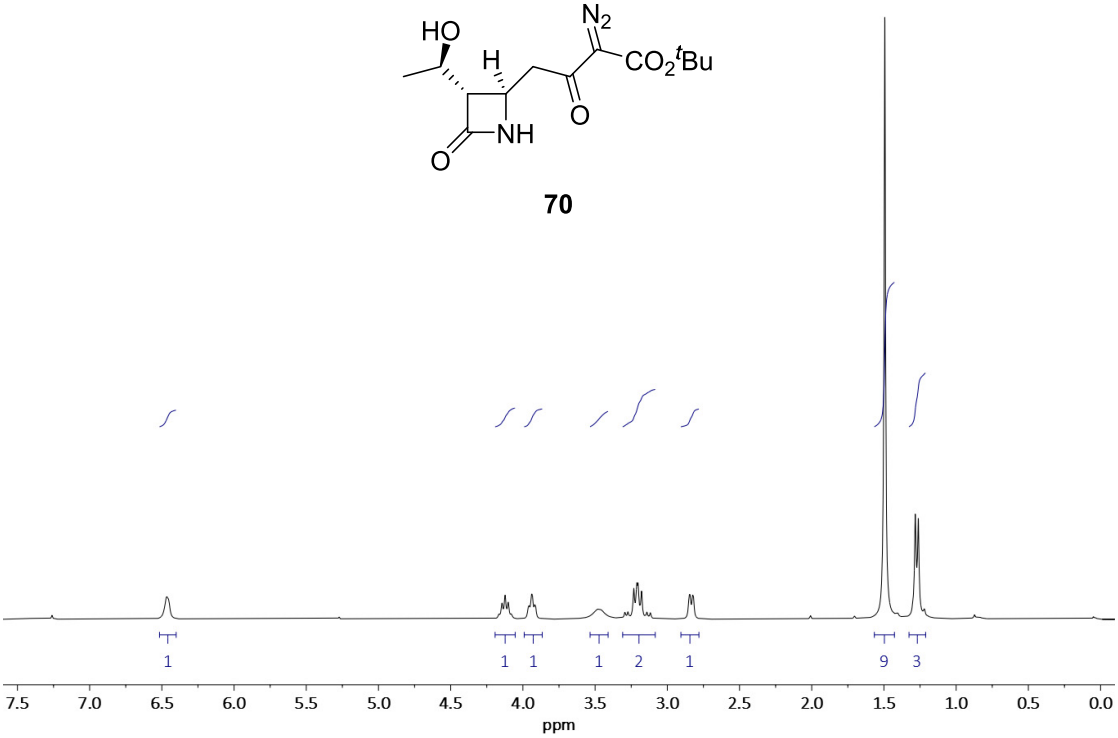
69

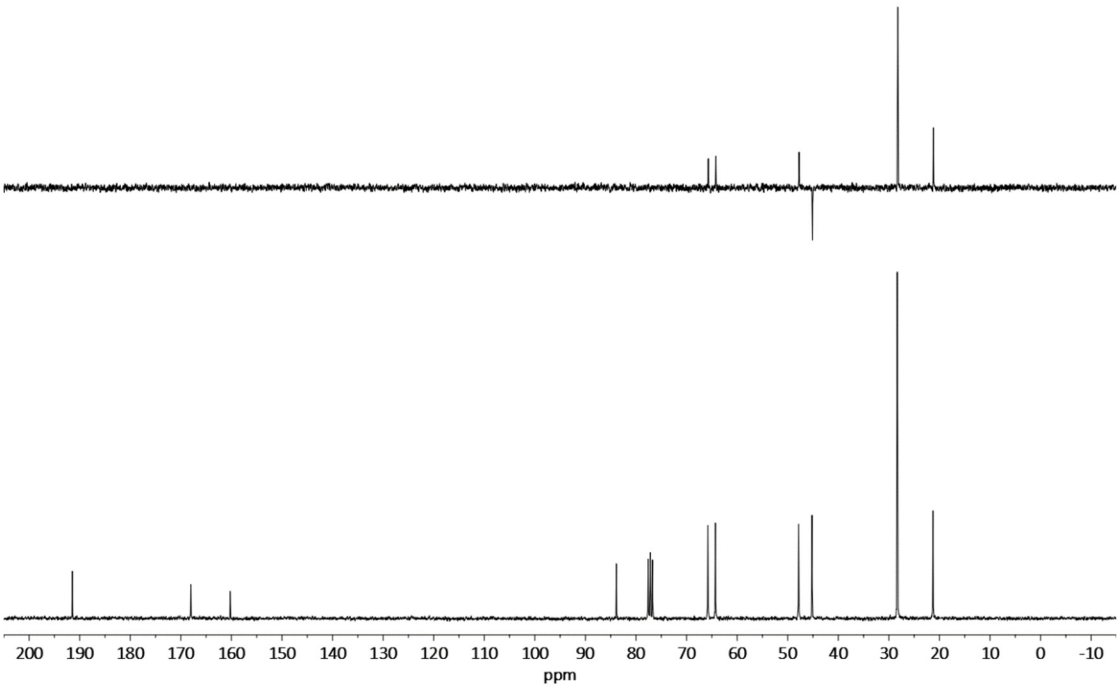




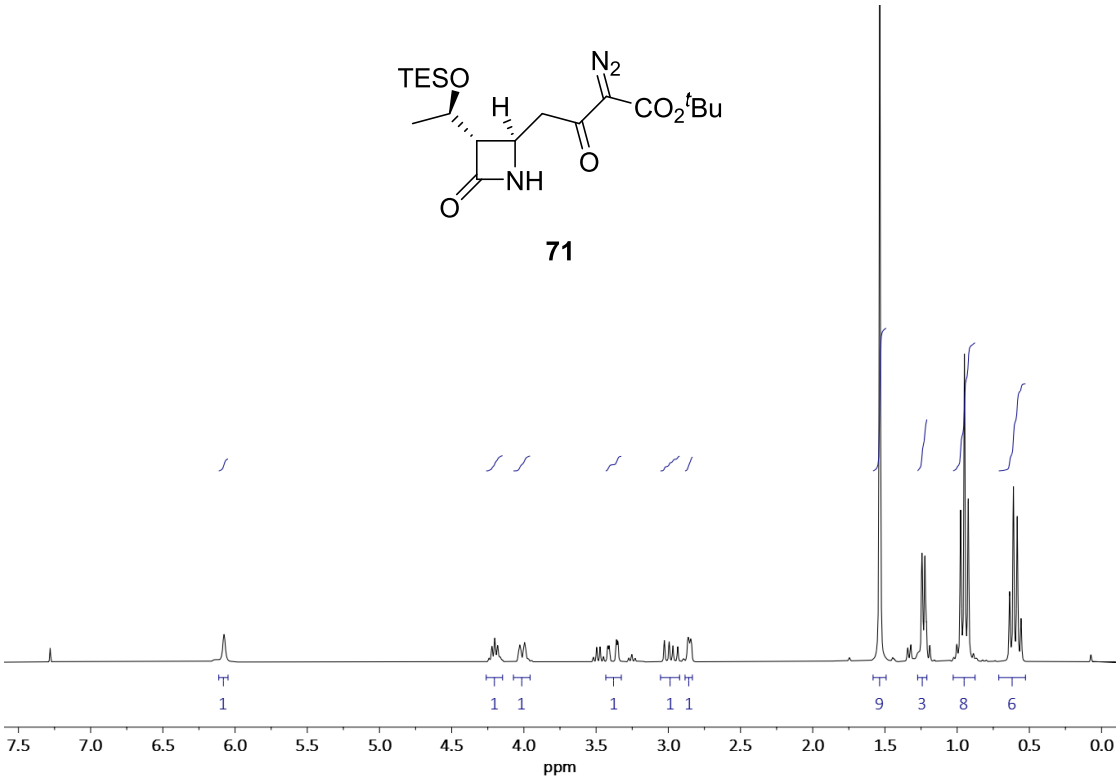
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

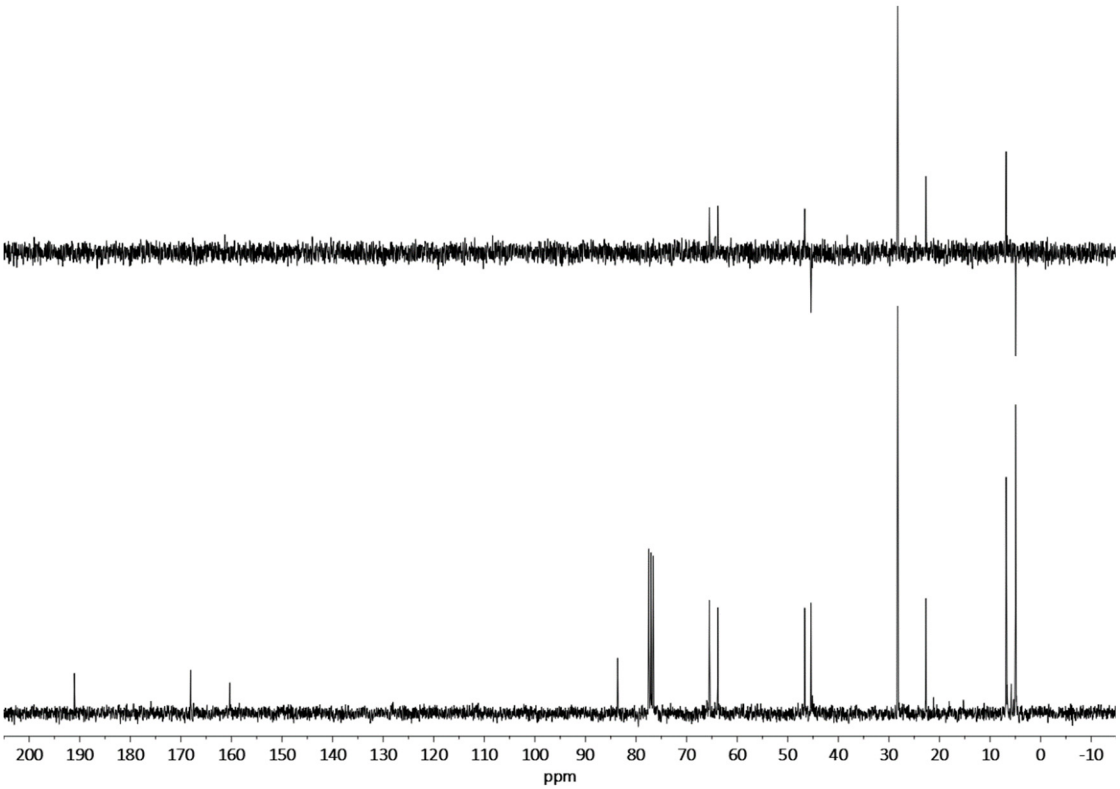
70



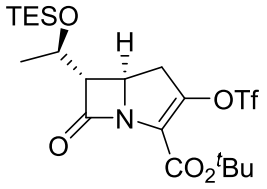


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

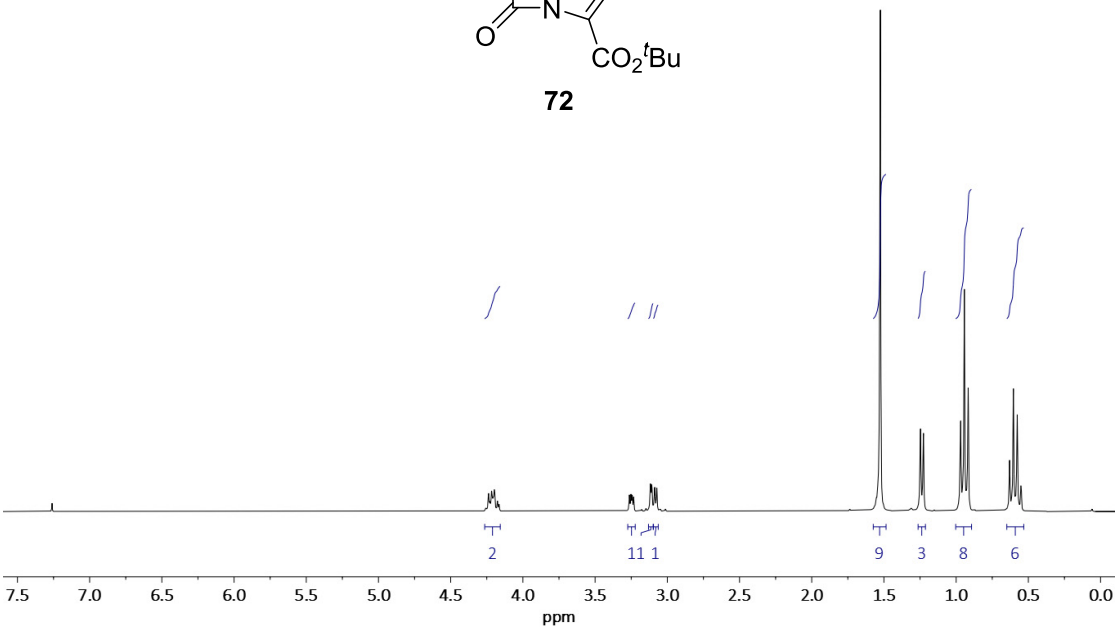


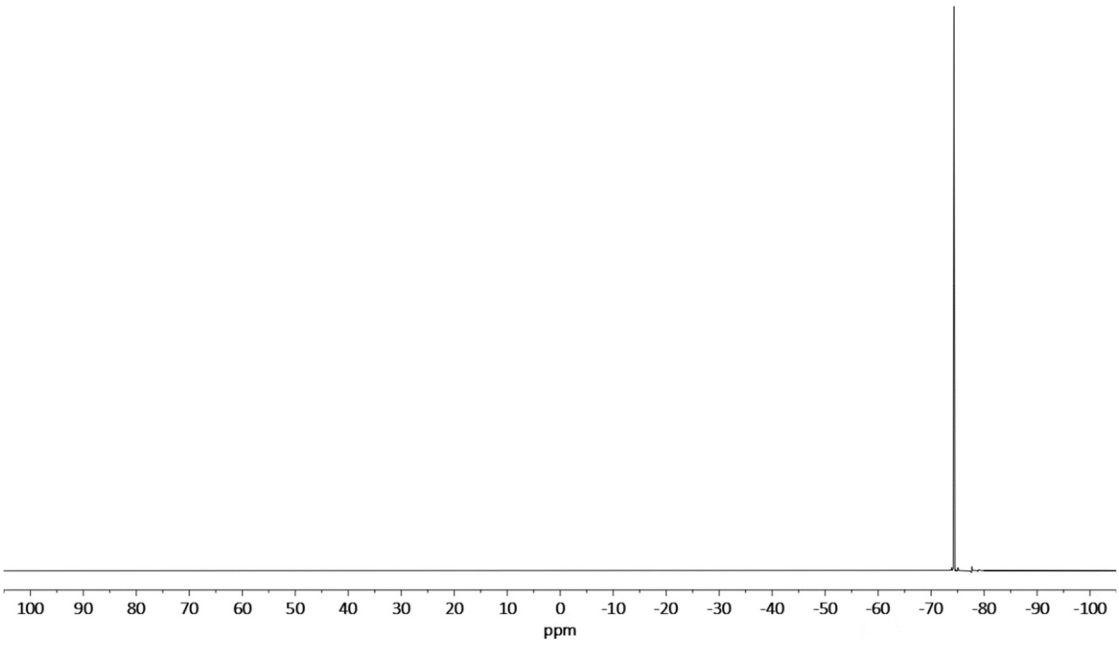


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

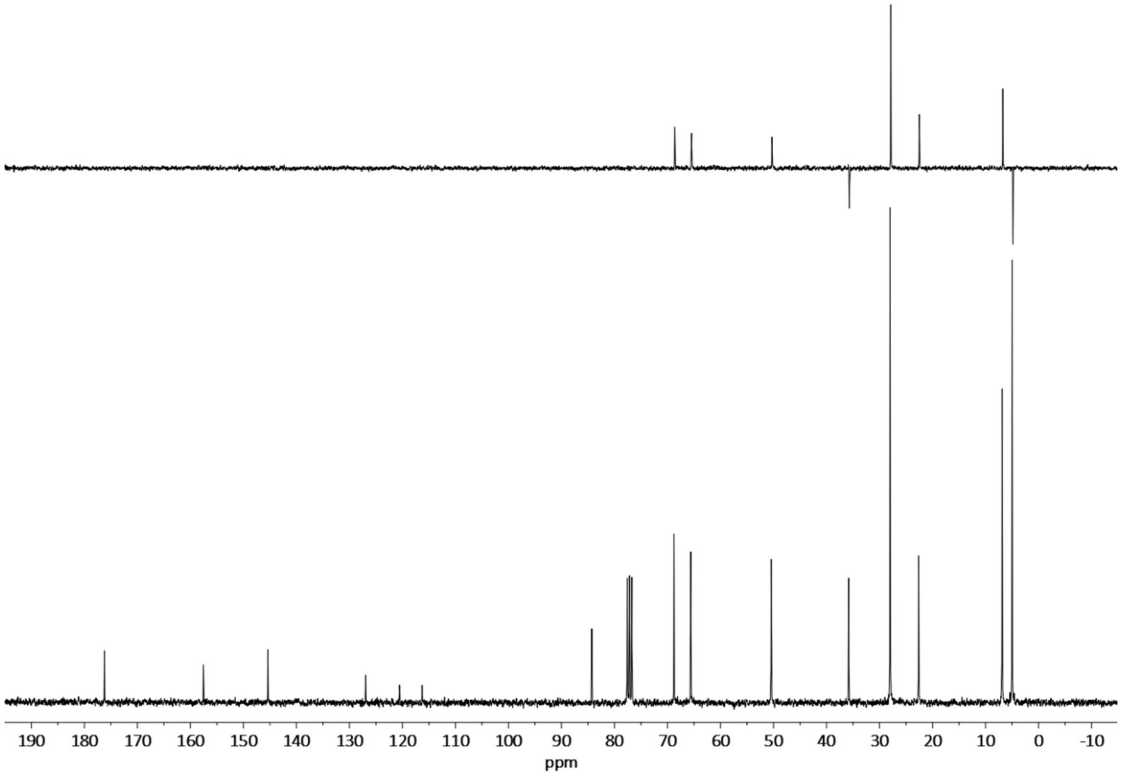


72

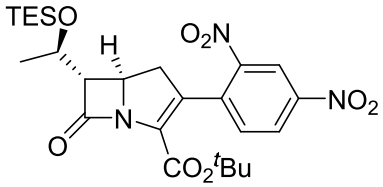




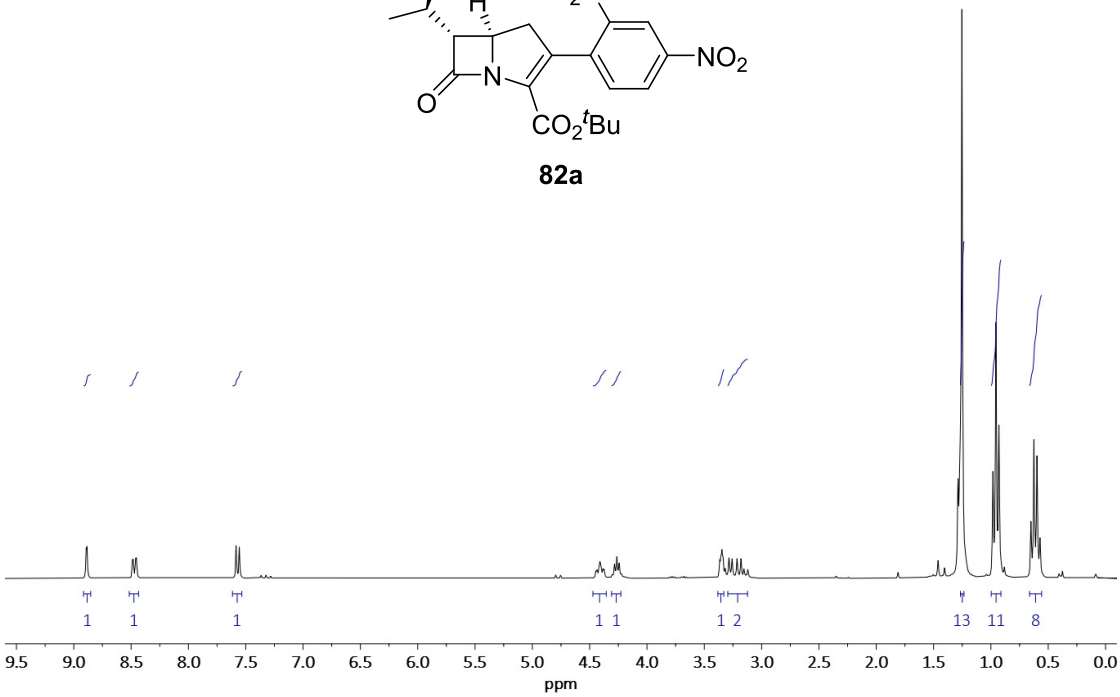
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

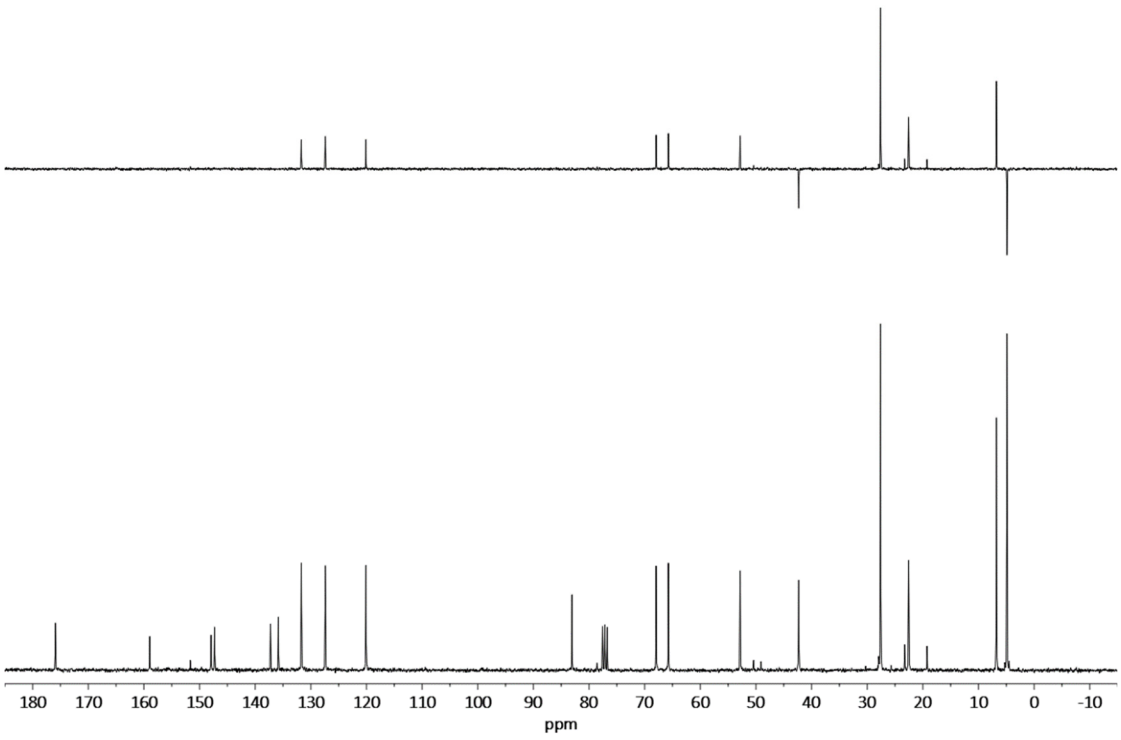


USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

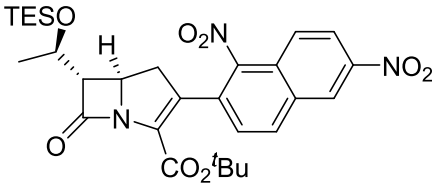


82a

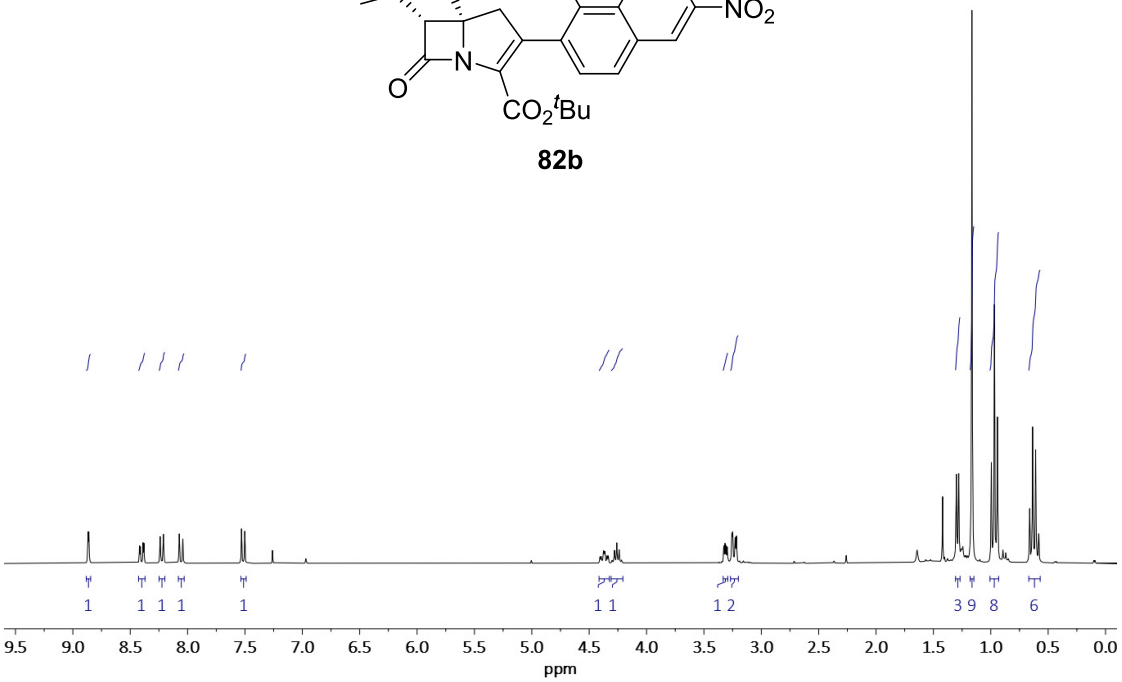


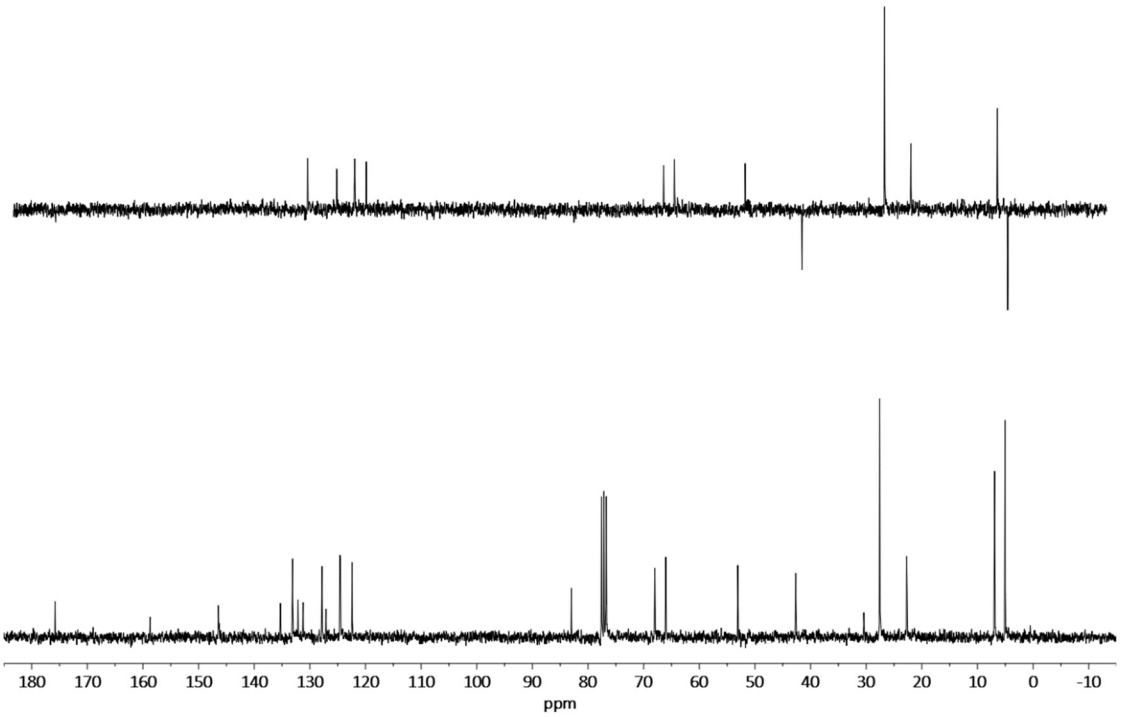


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

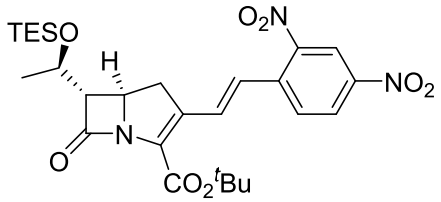


82b

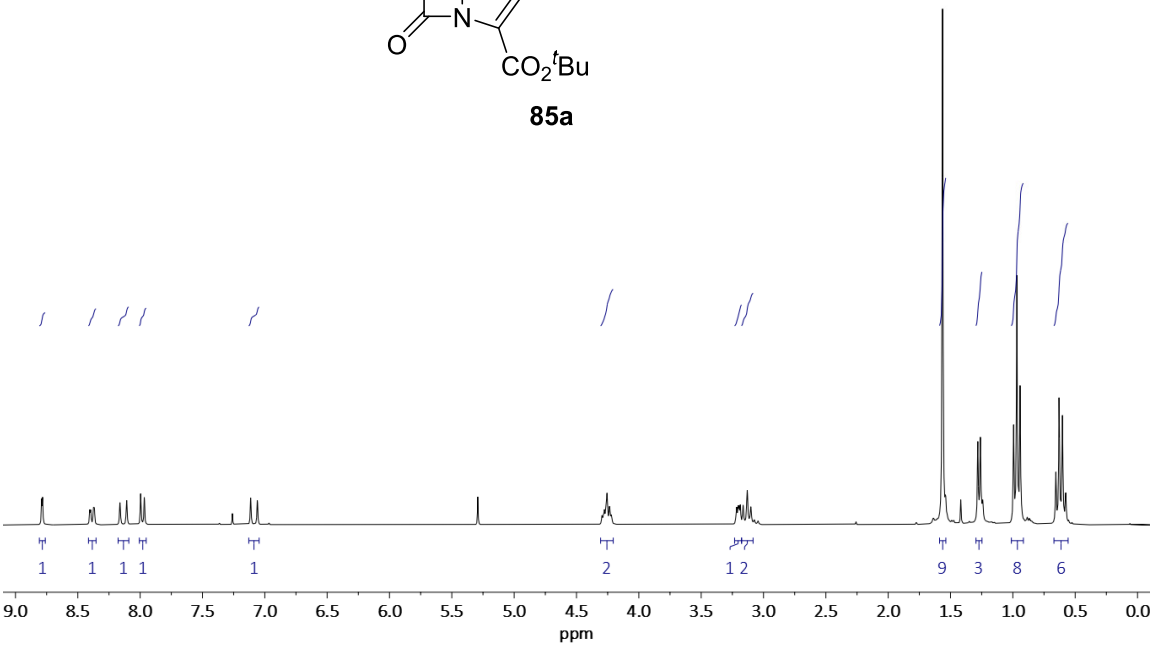


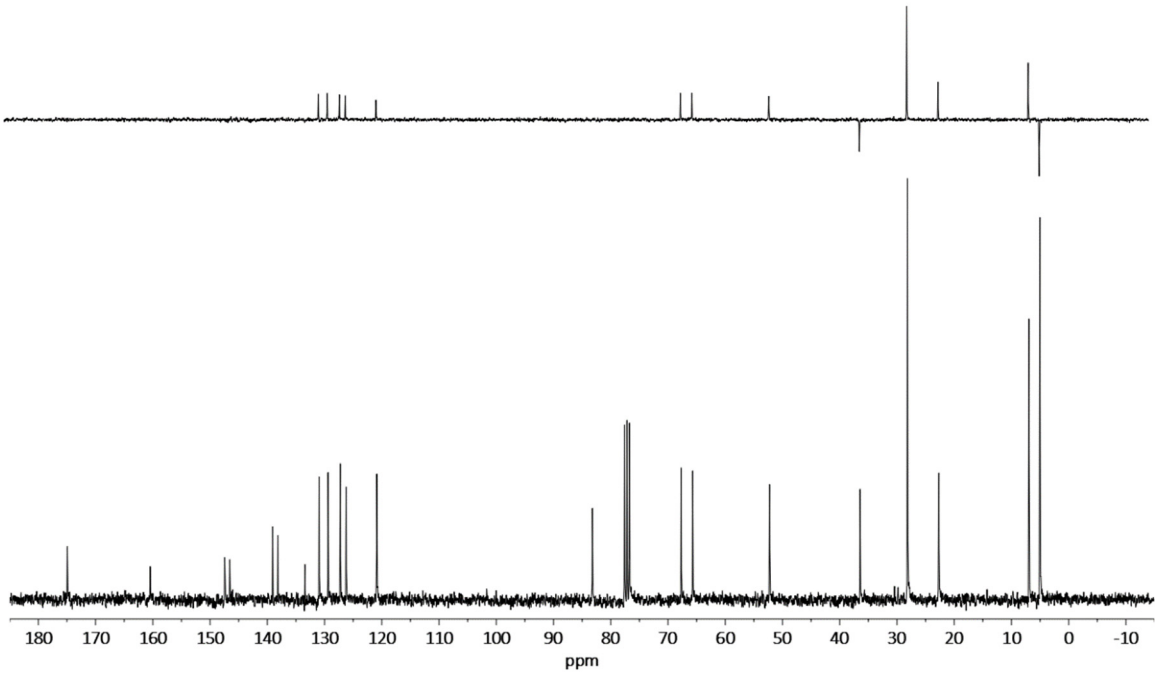


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



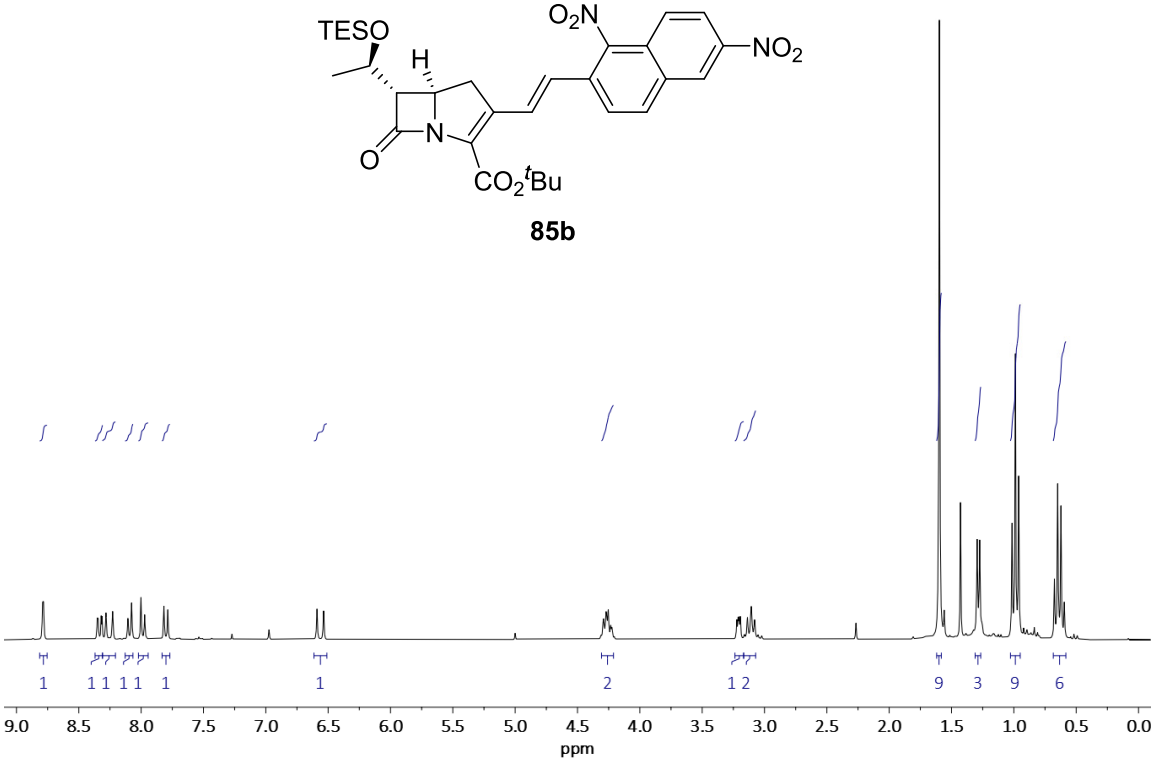
85a

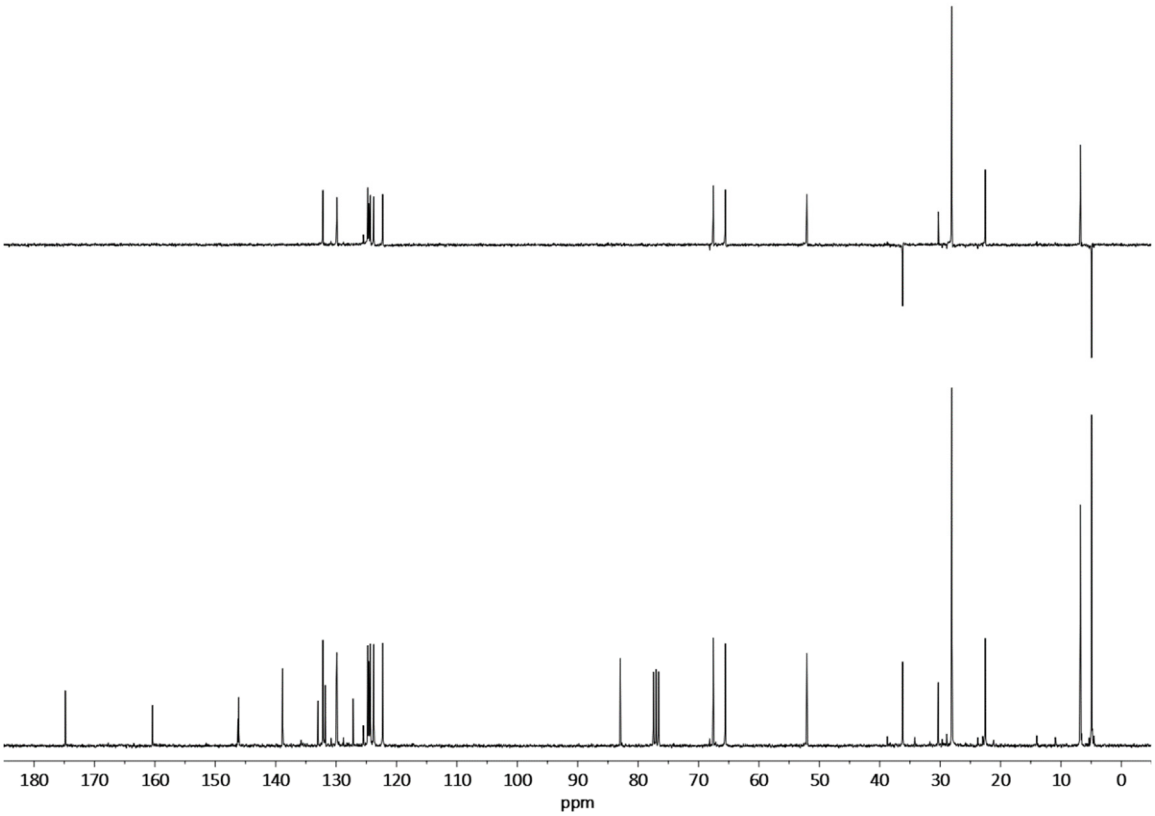




USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

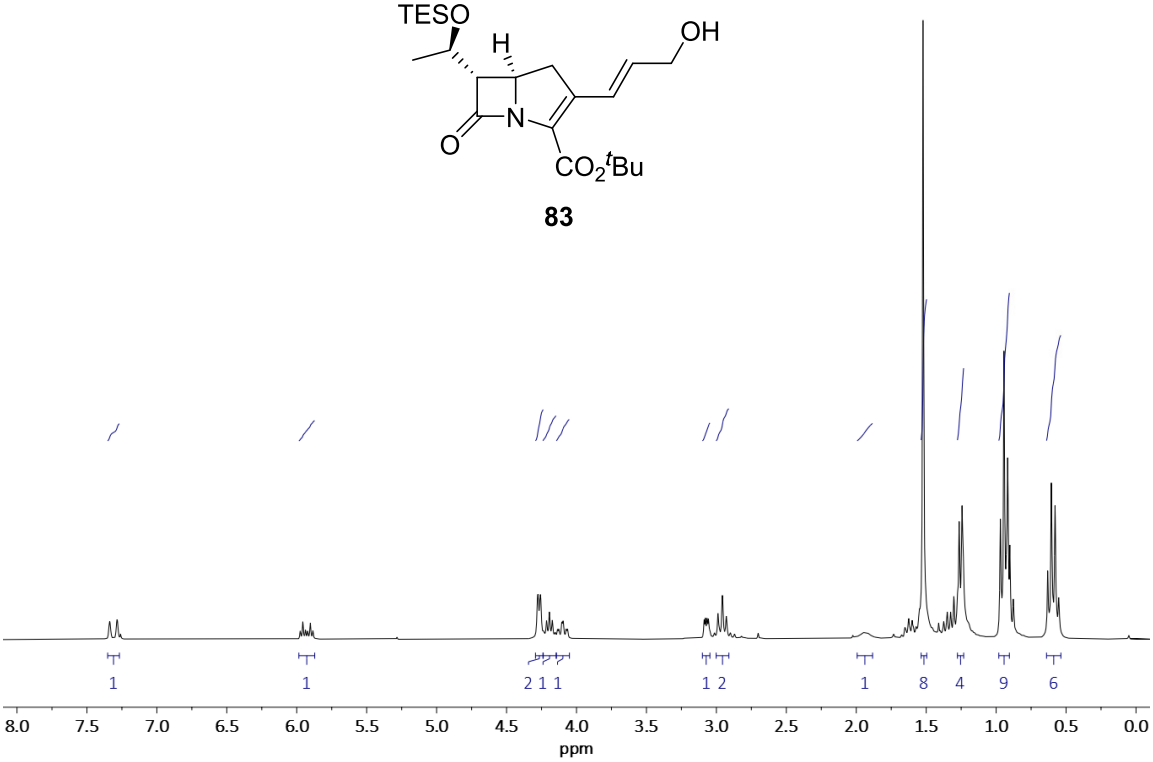
85b

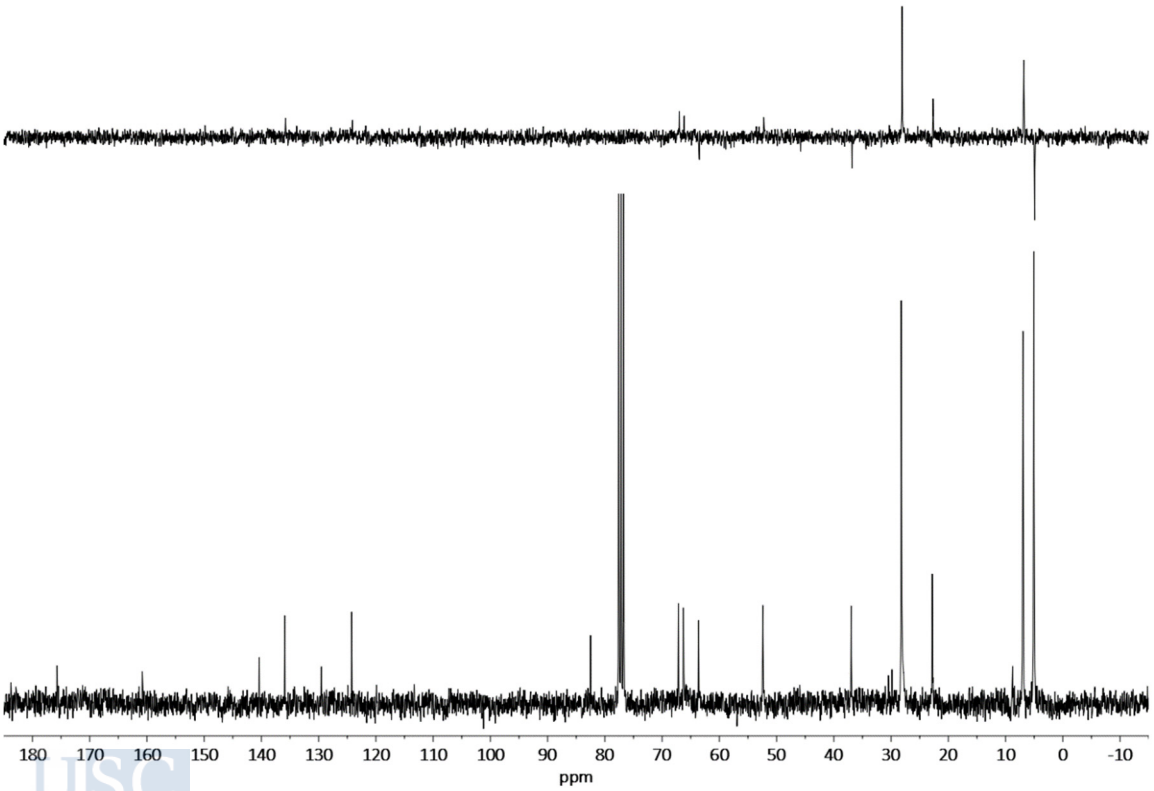




USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

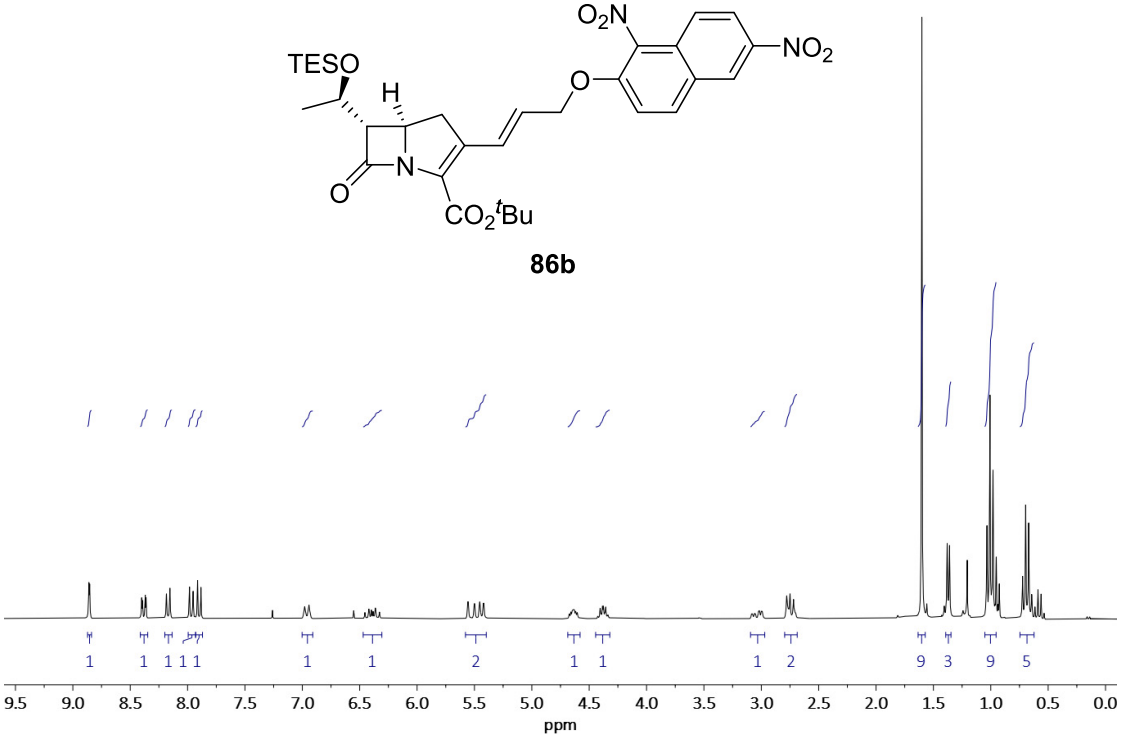
83

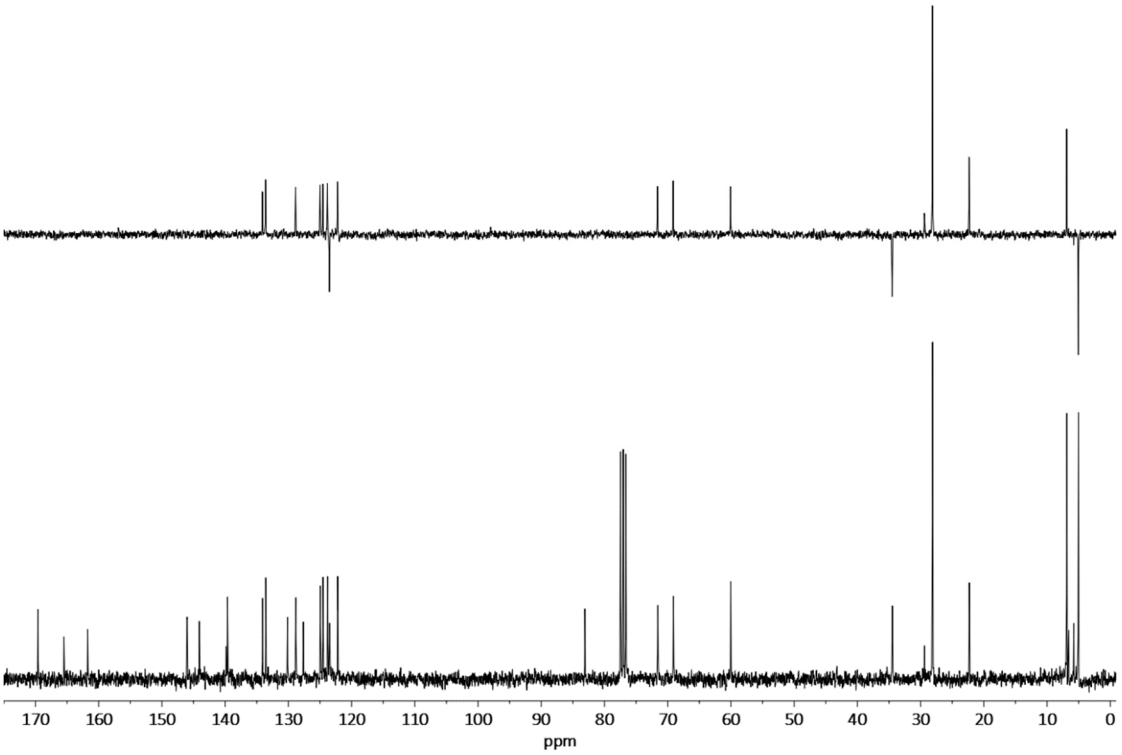




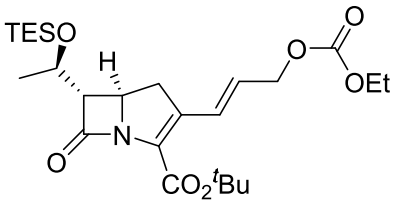
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

86b

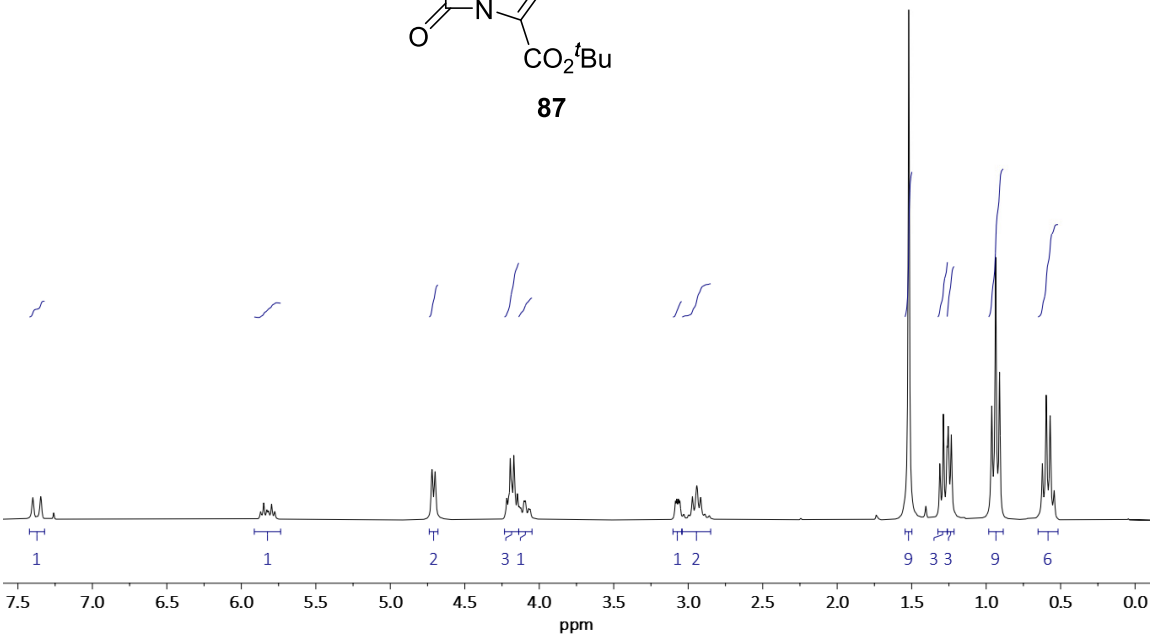


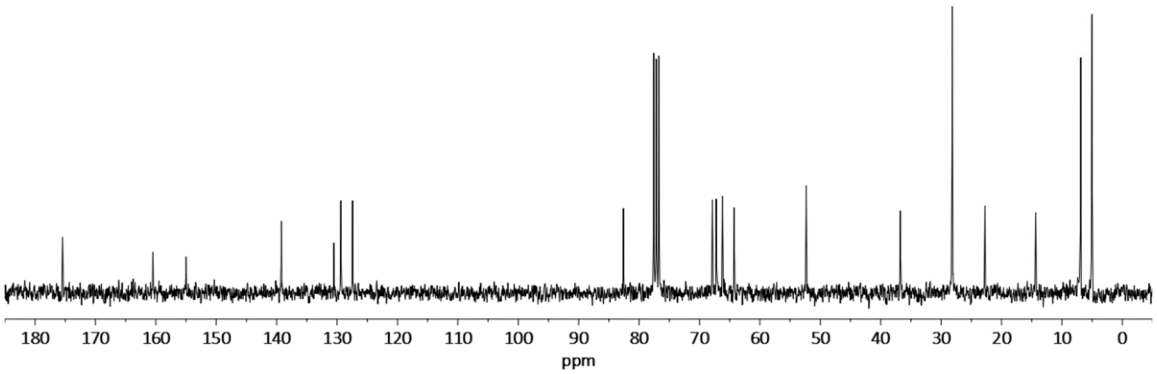


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

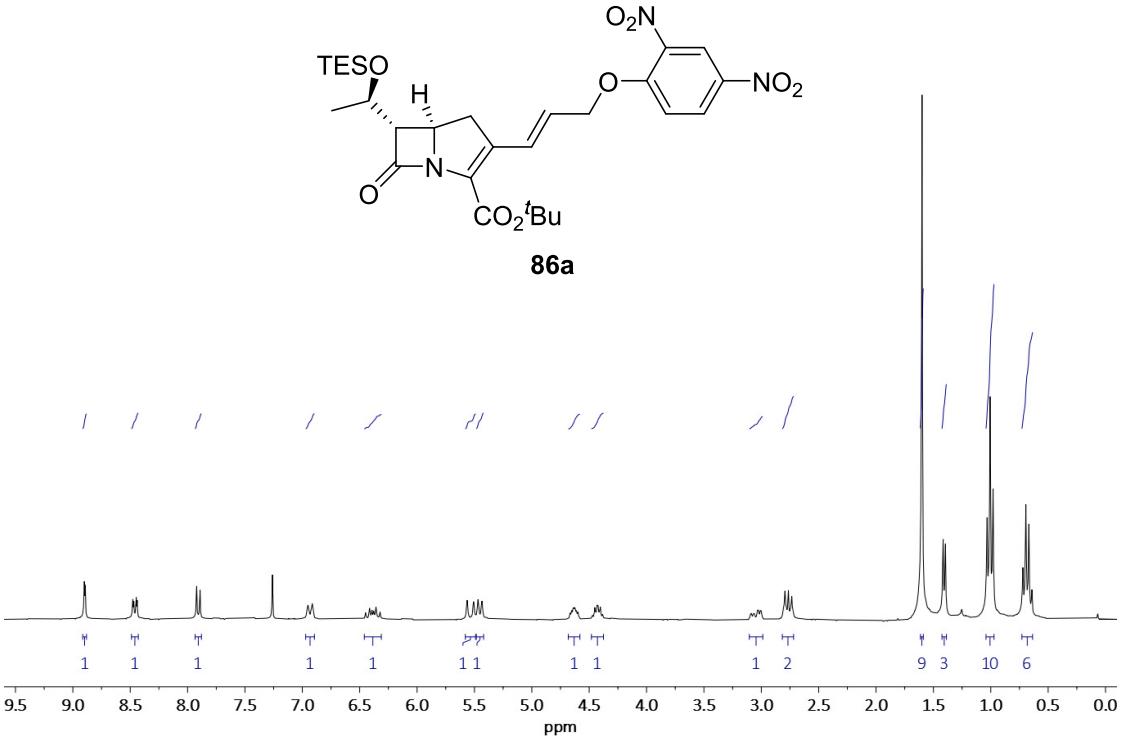


87



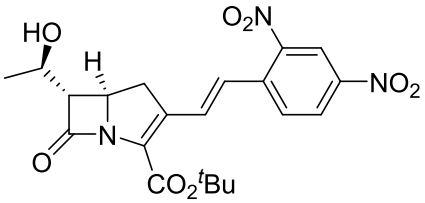


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

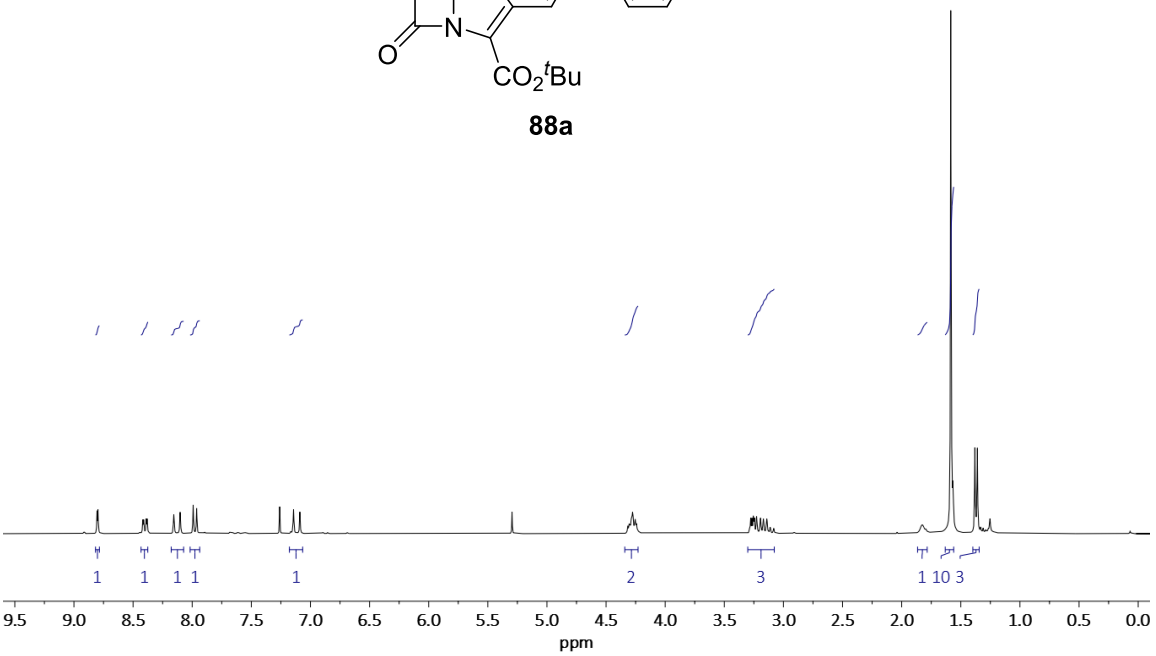


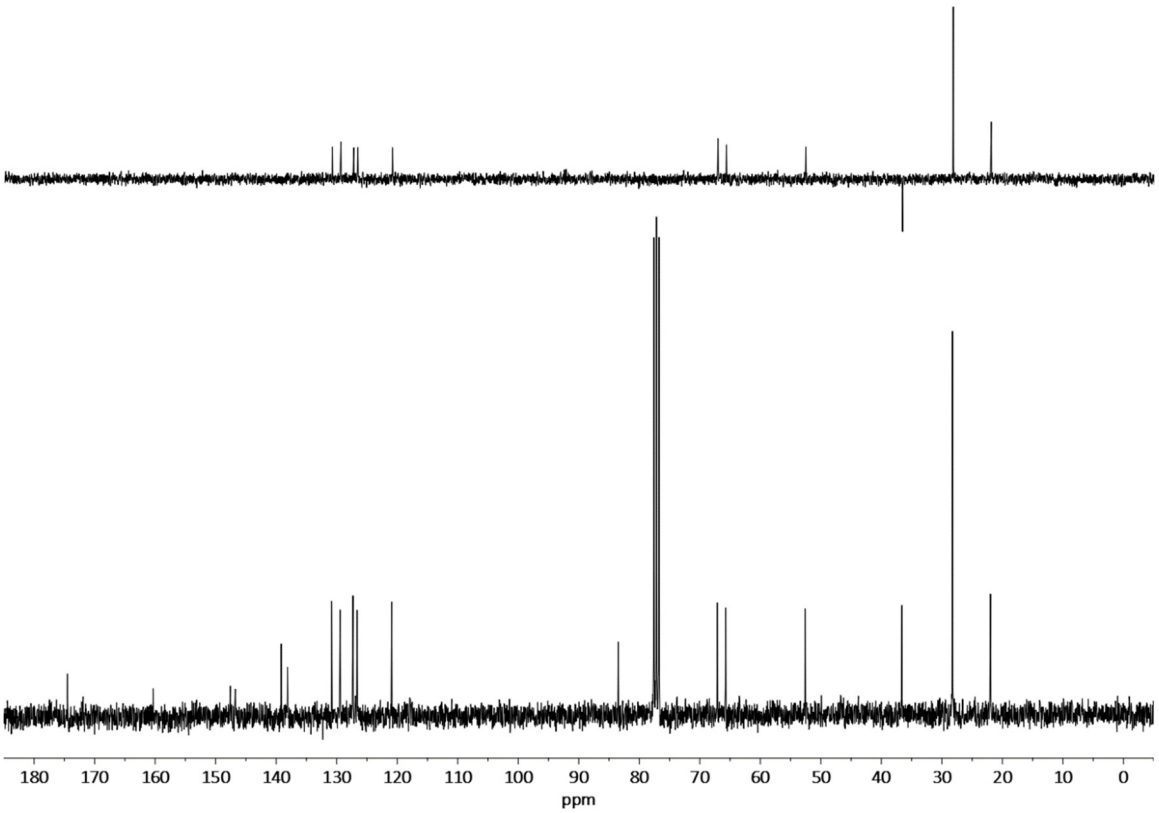
86a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

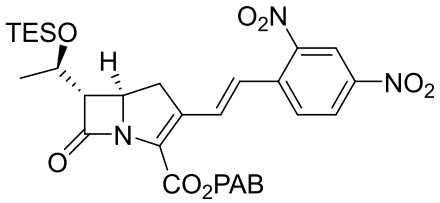


88a

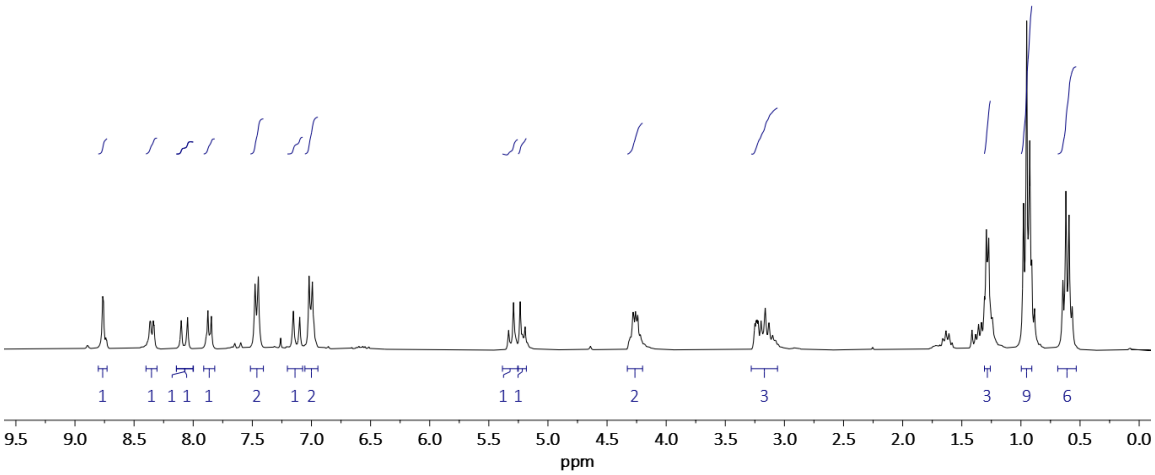


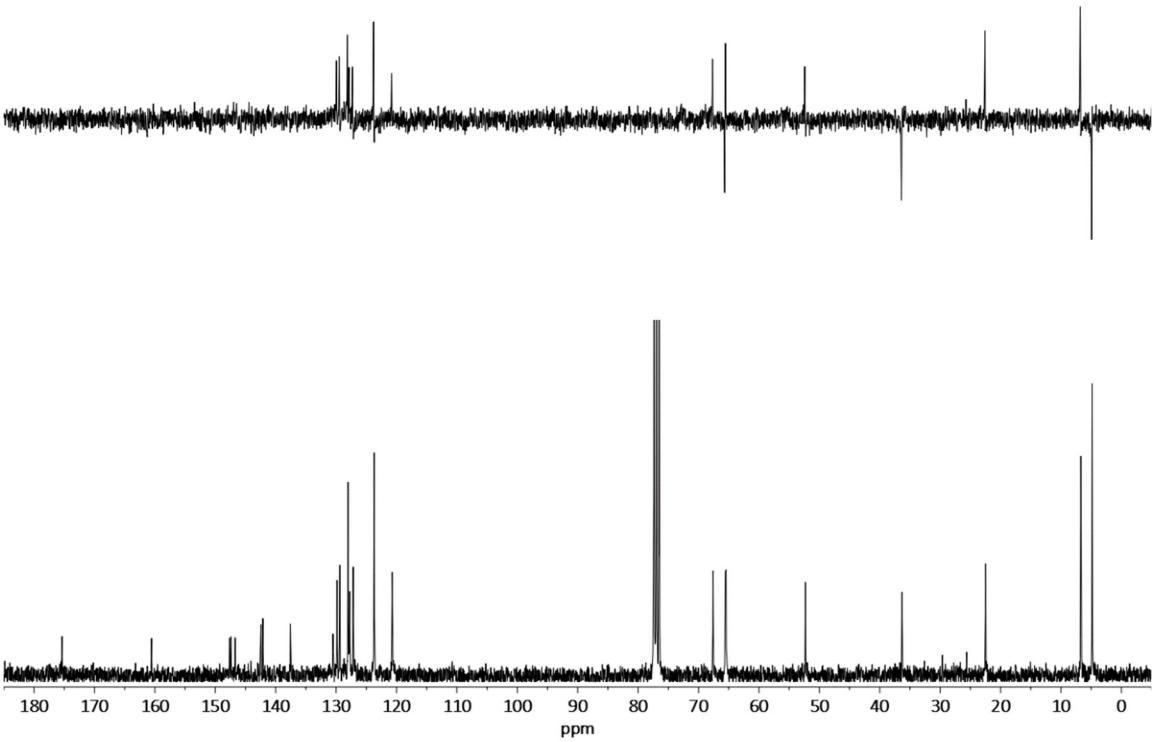


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

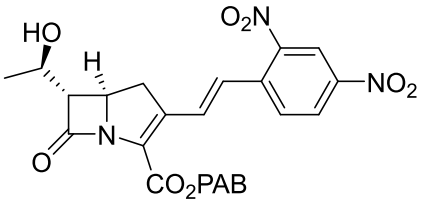


97

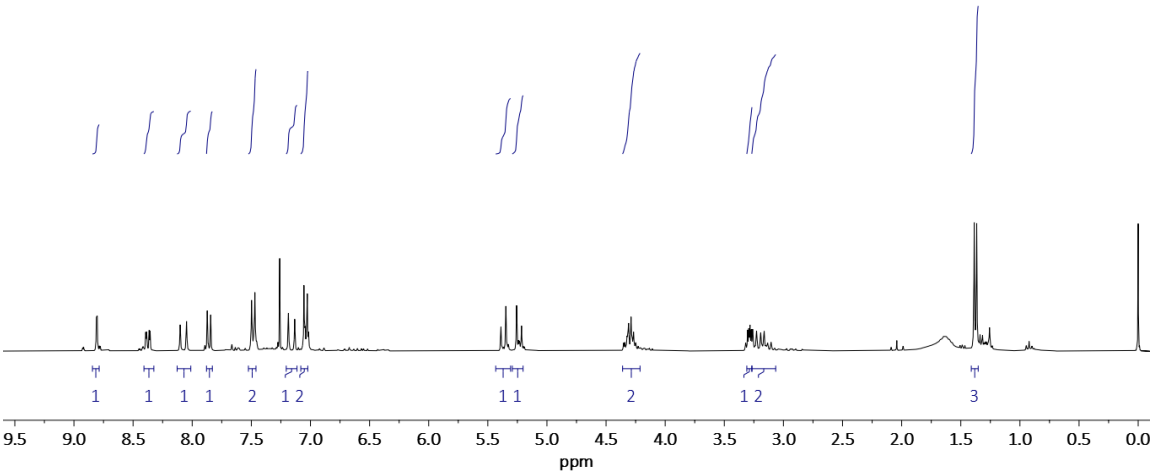




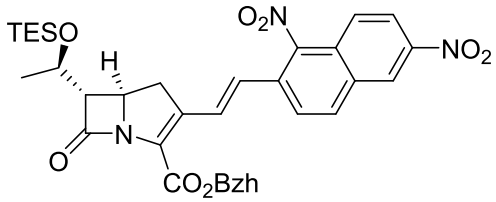
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



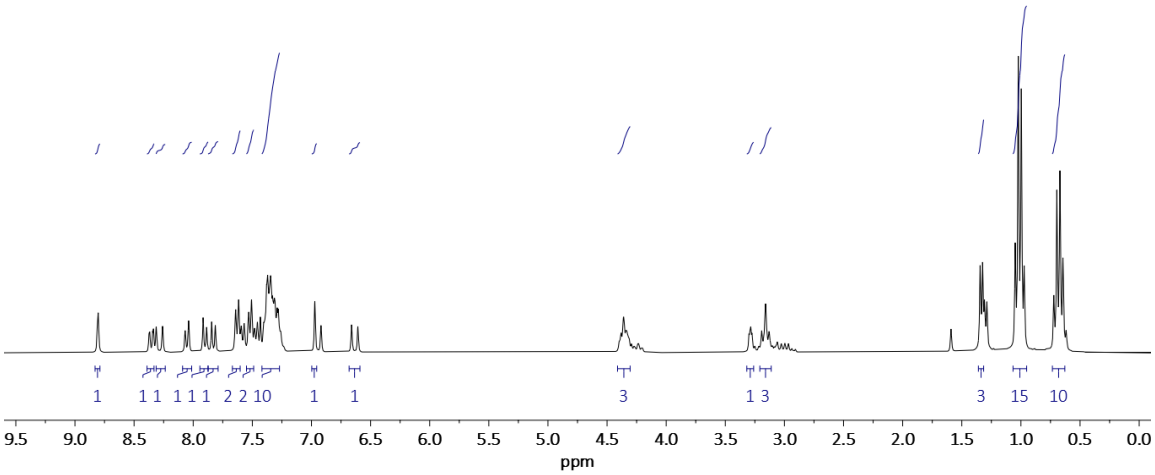
98

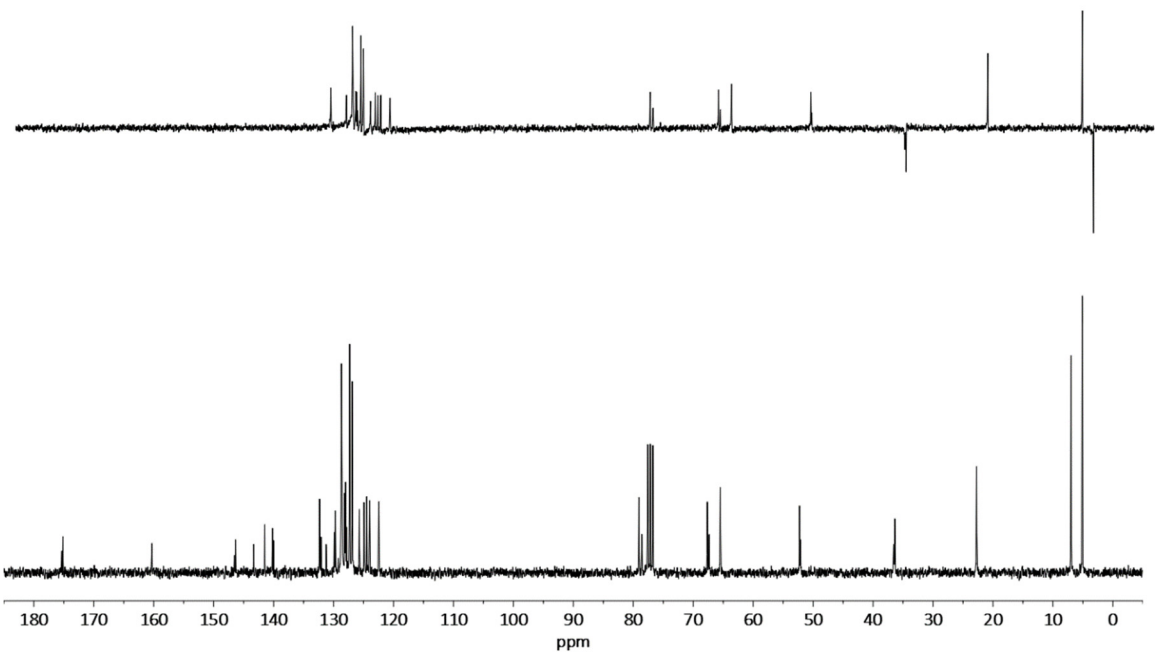


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

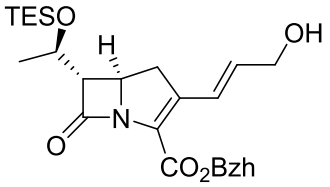


103b

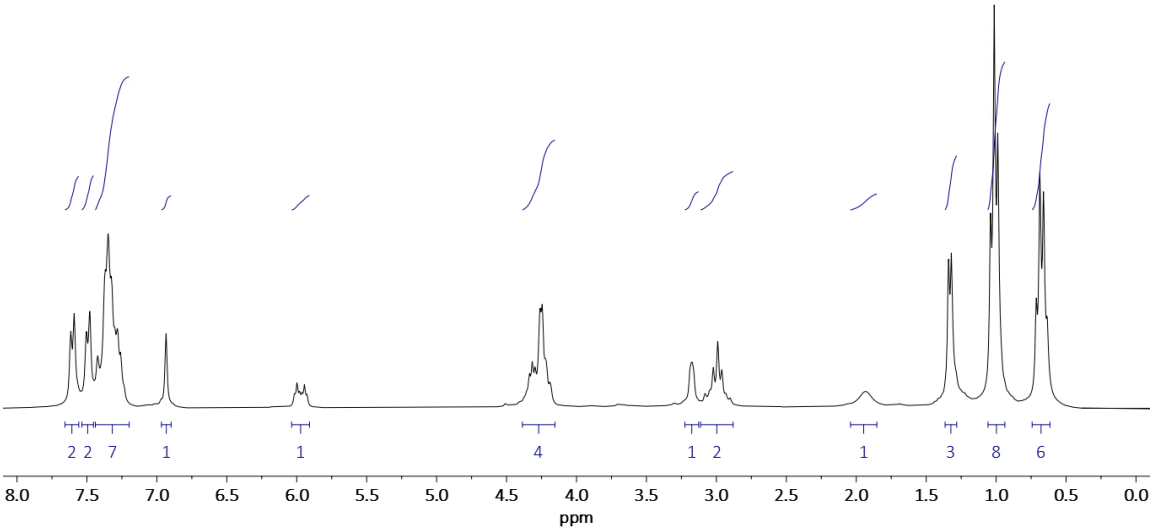


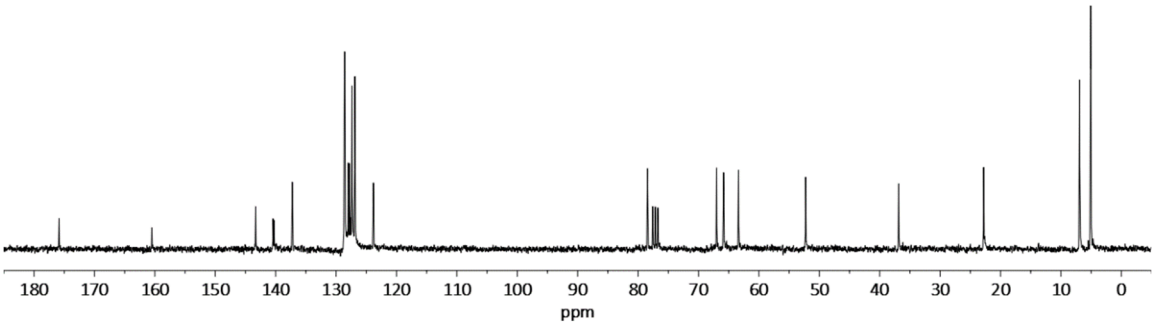


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

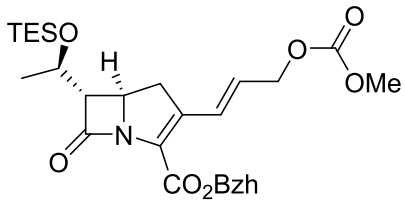


104

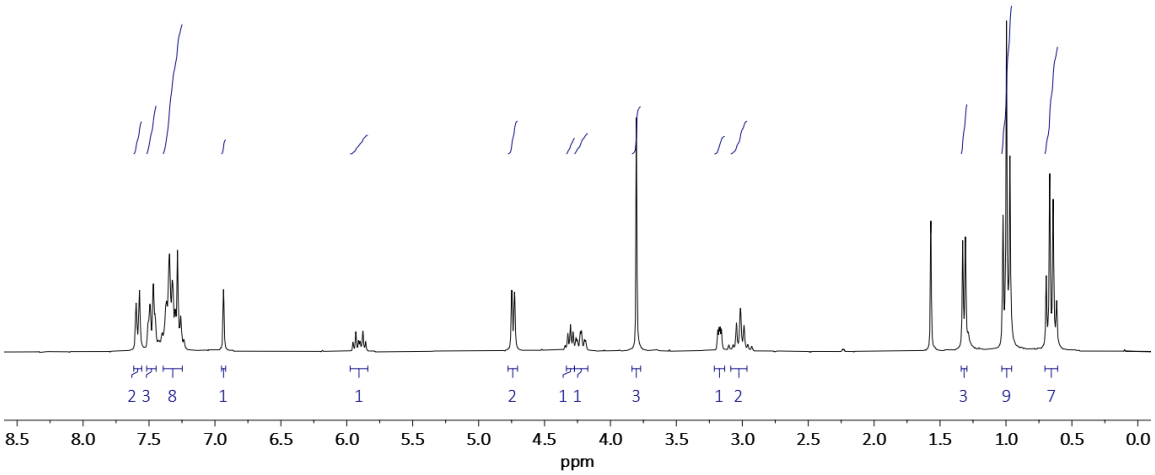


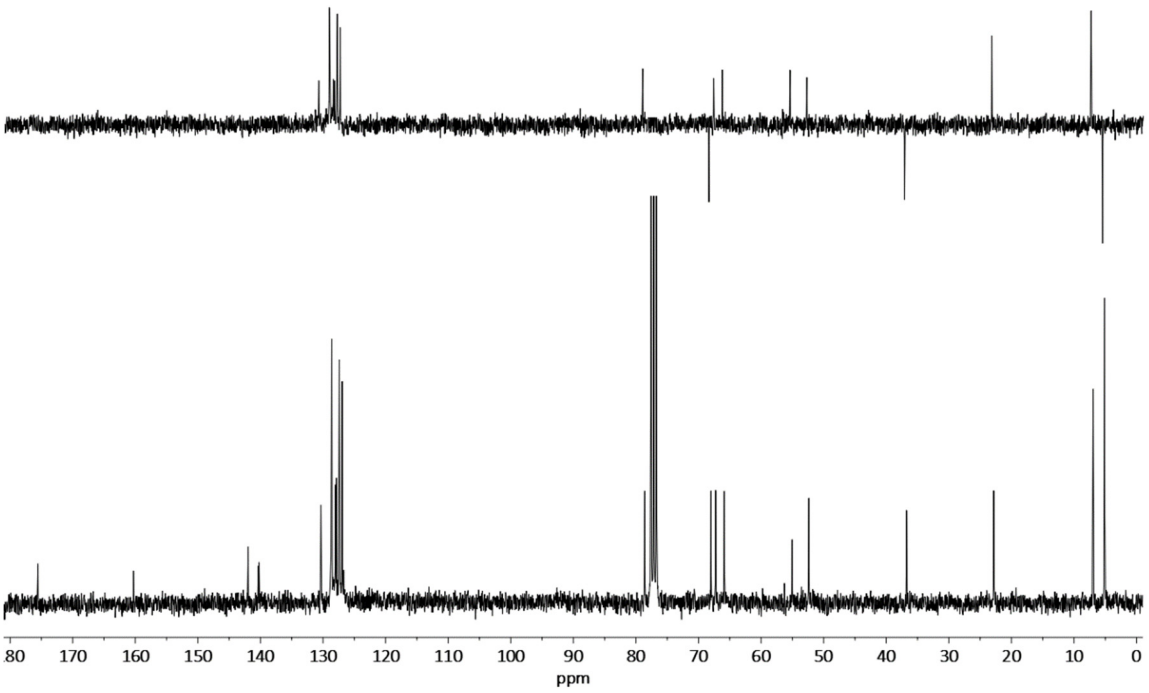


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

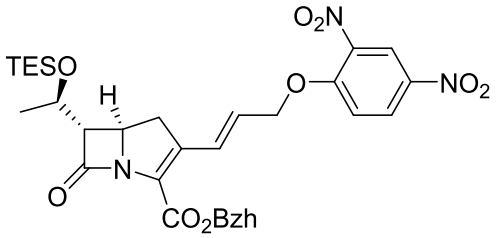


107

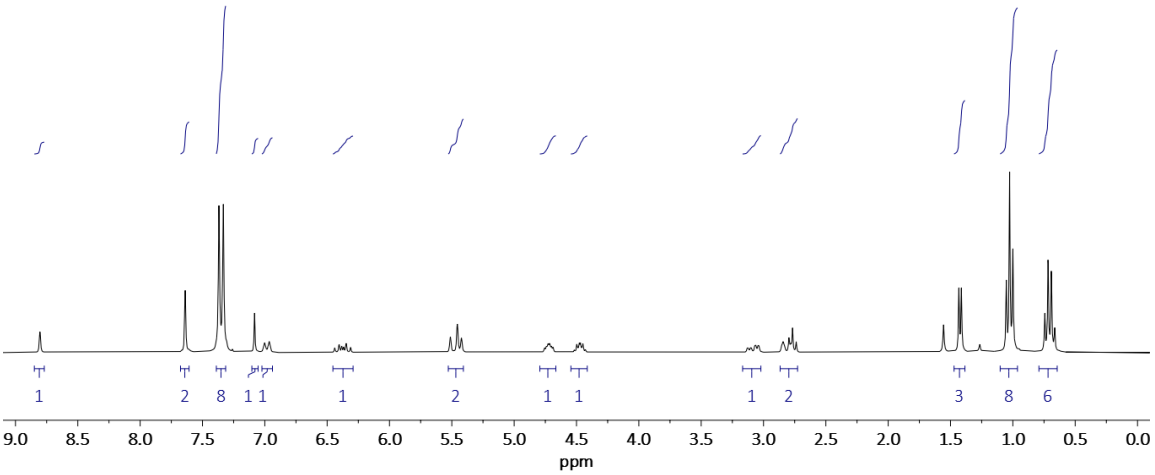


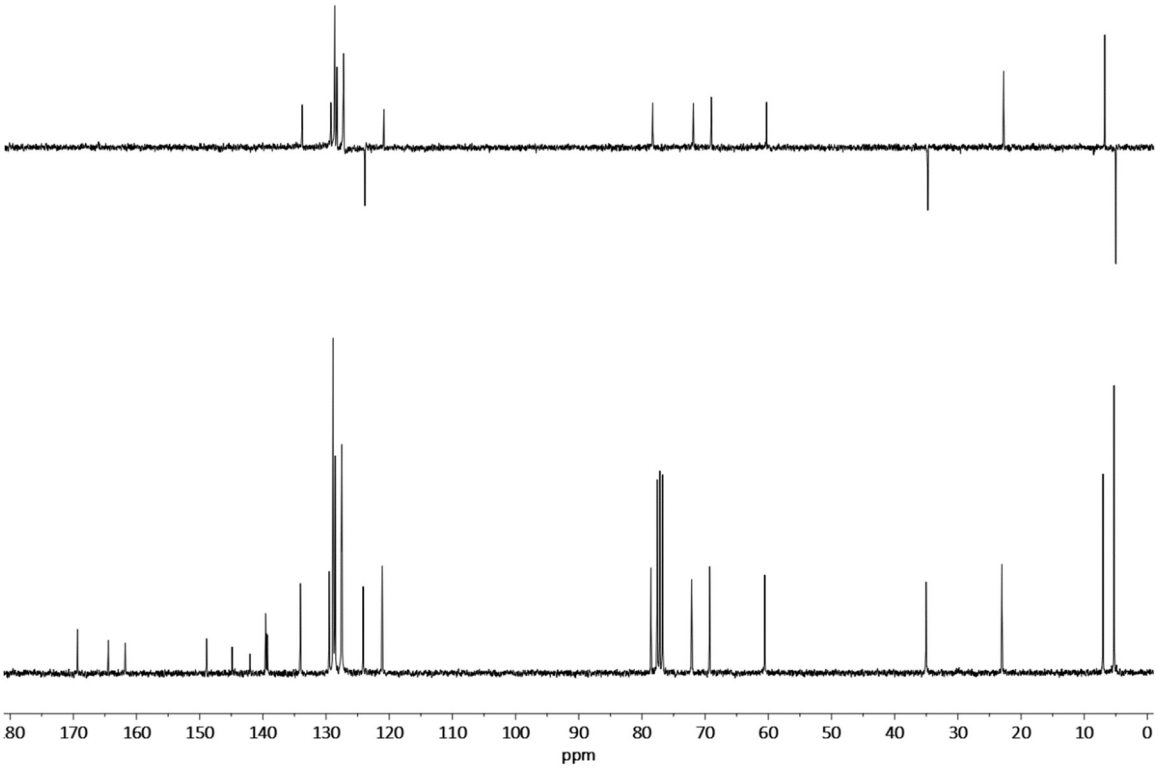


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

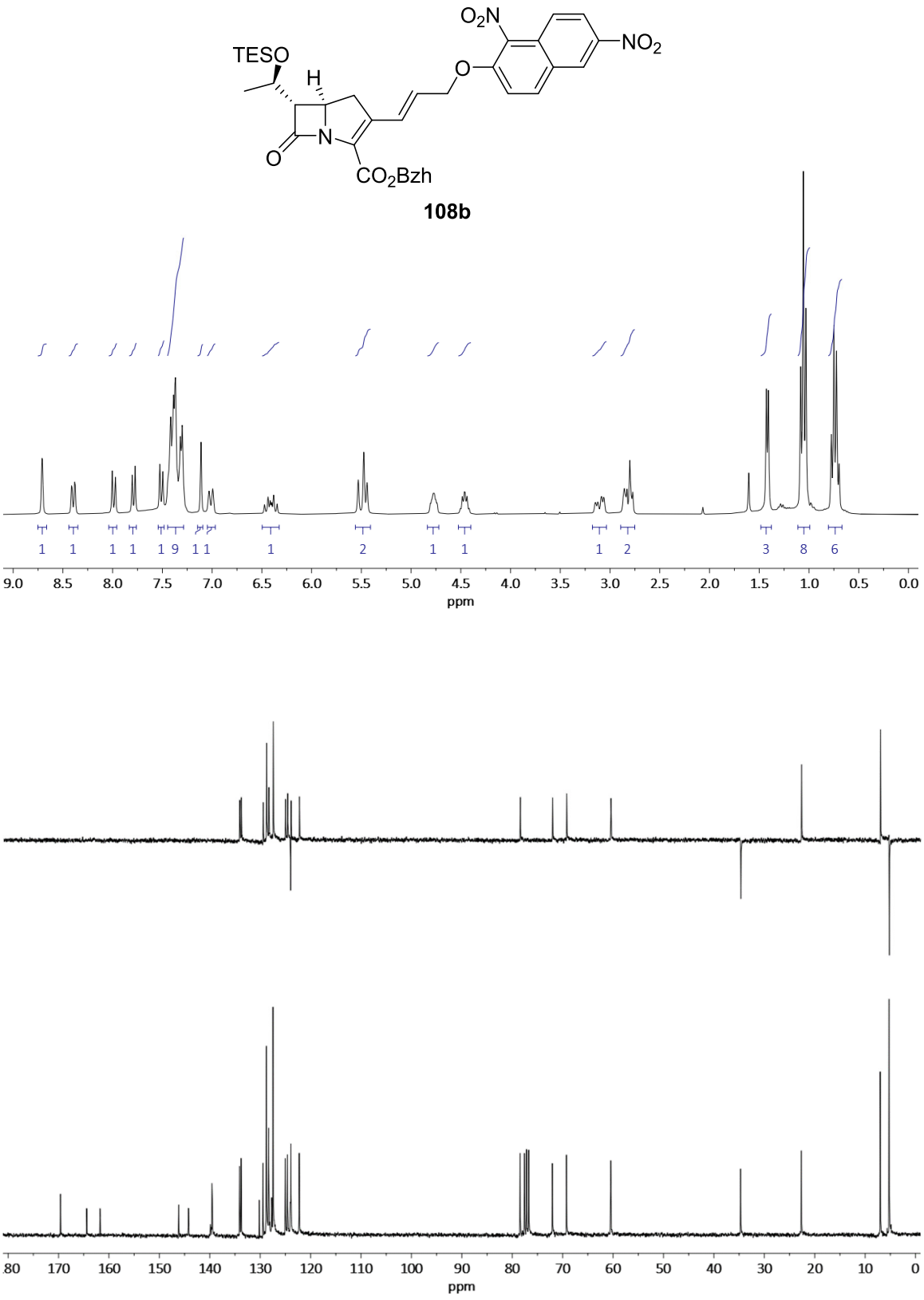


108a

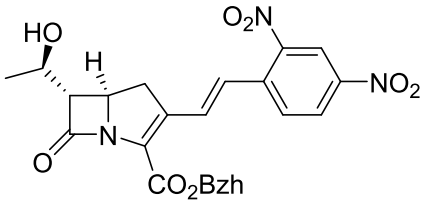




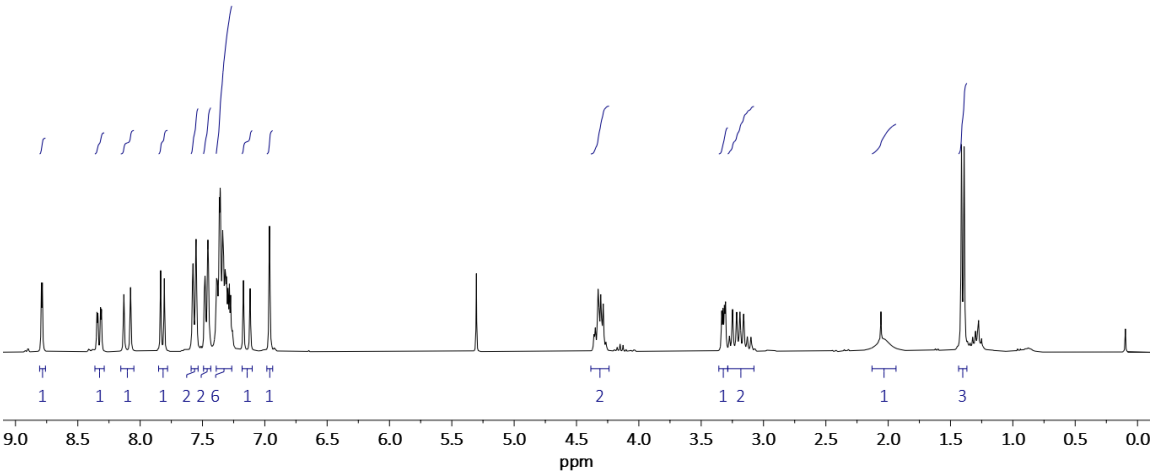
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

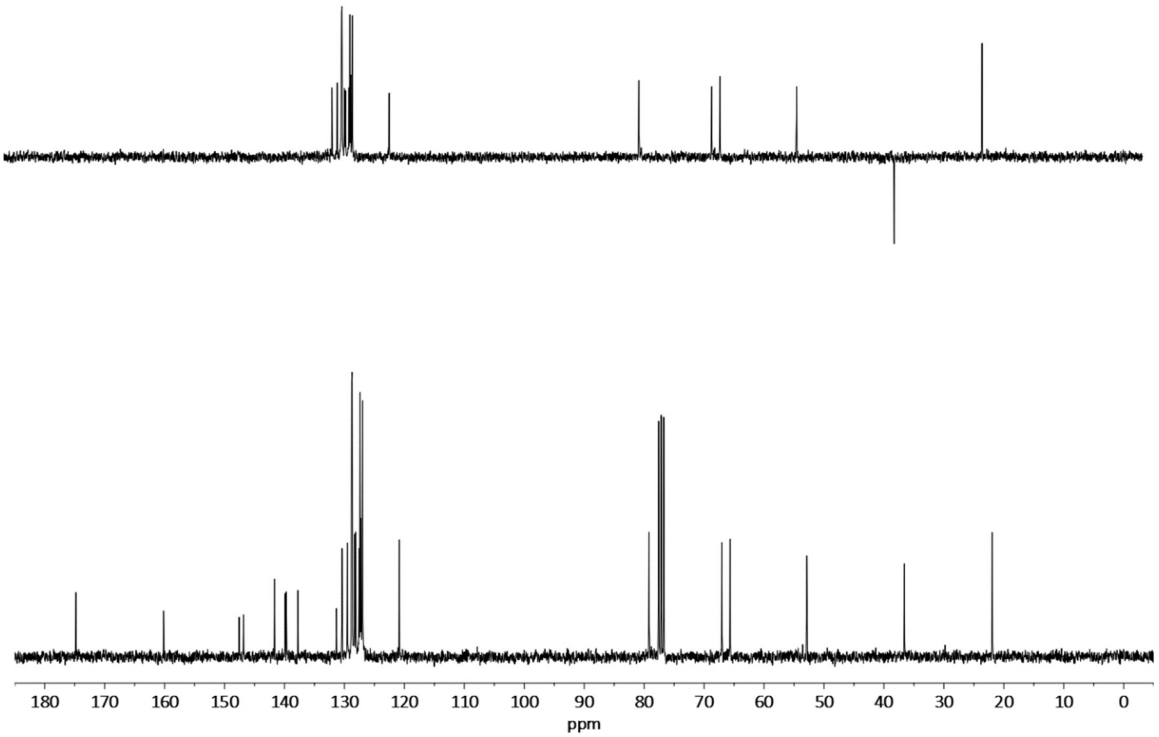


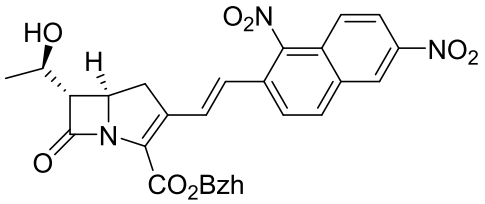
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA


HO
H
O2N
NO2
N
O
CO2Bzh

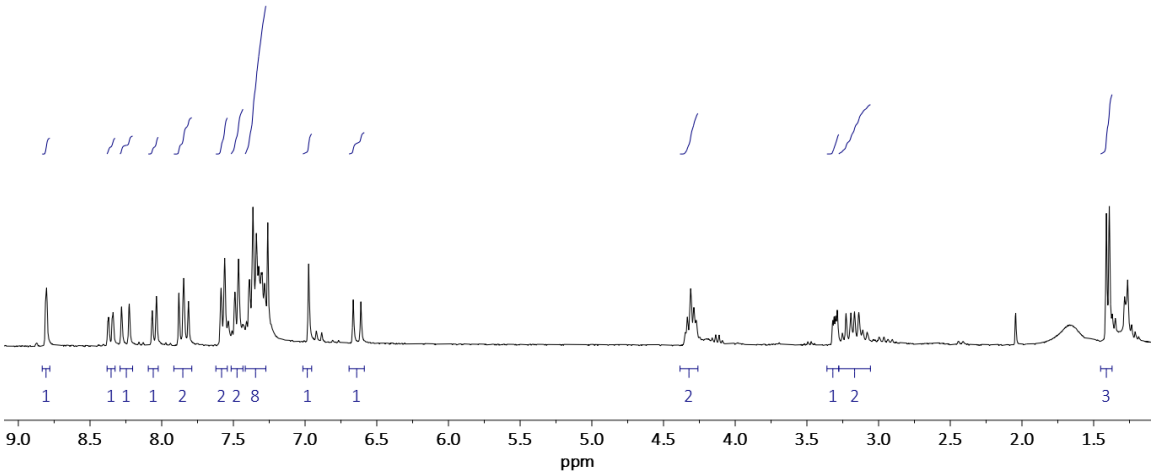
106a

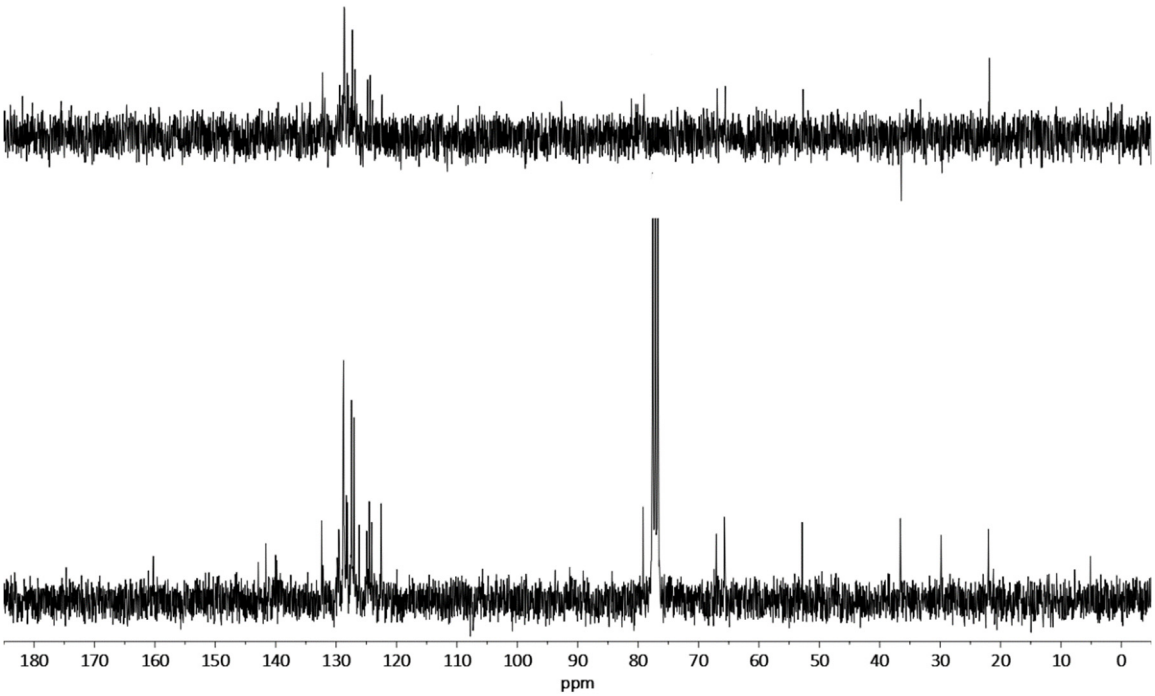

1 1 1 1 2 2 6 1 1 2 1 2 1 3
9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
ppm


180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
ppm

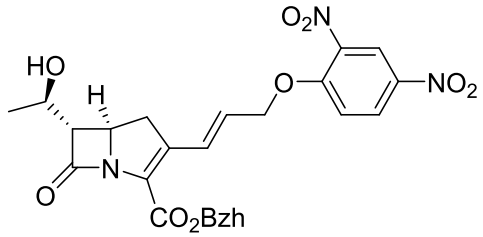


106b

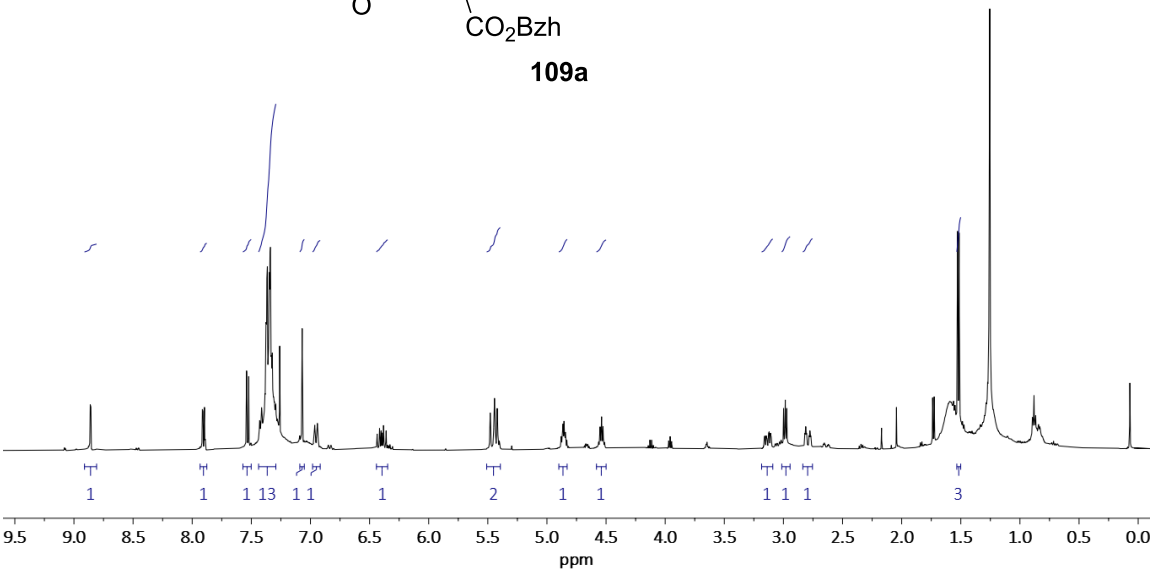


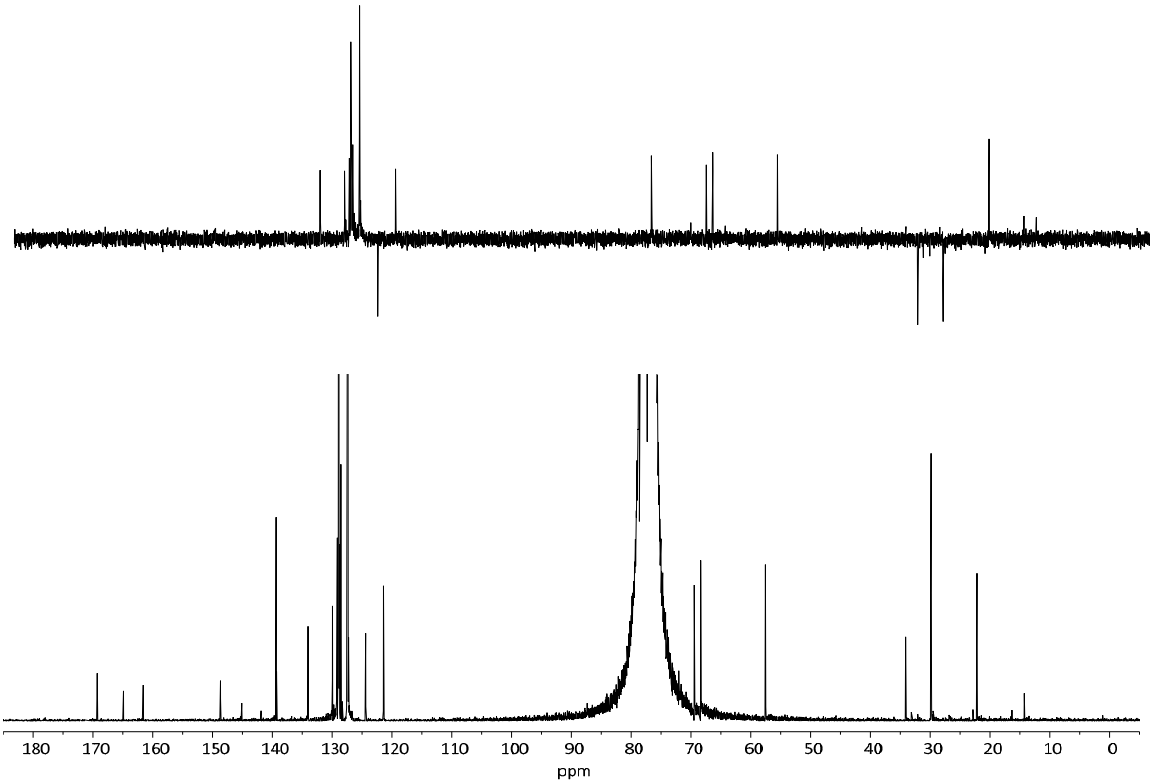


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

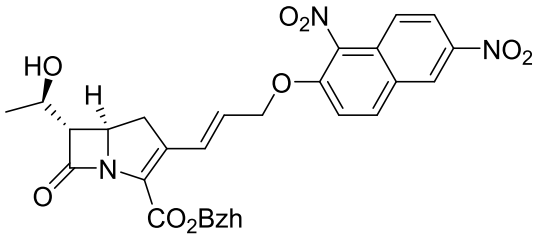


109a

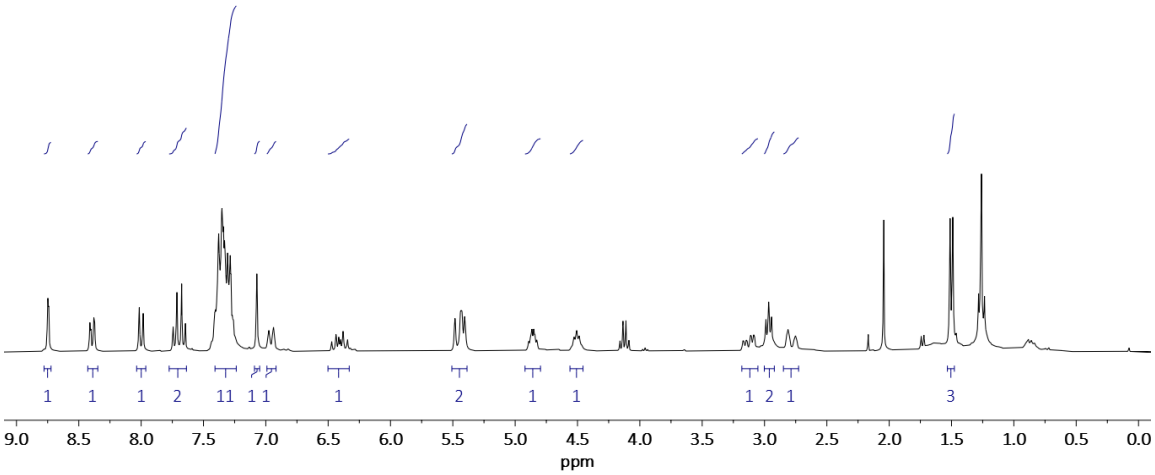


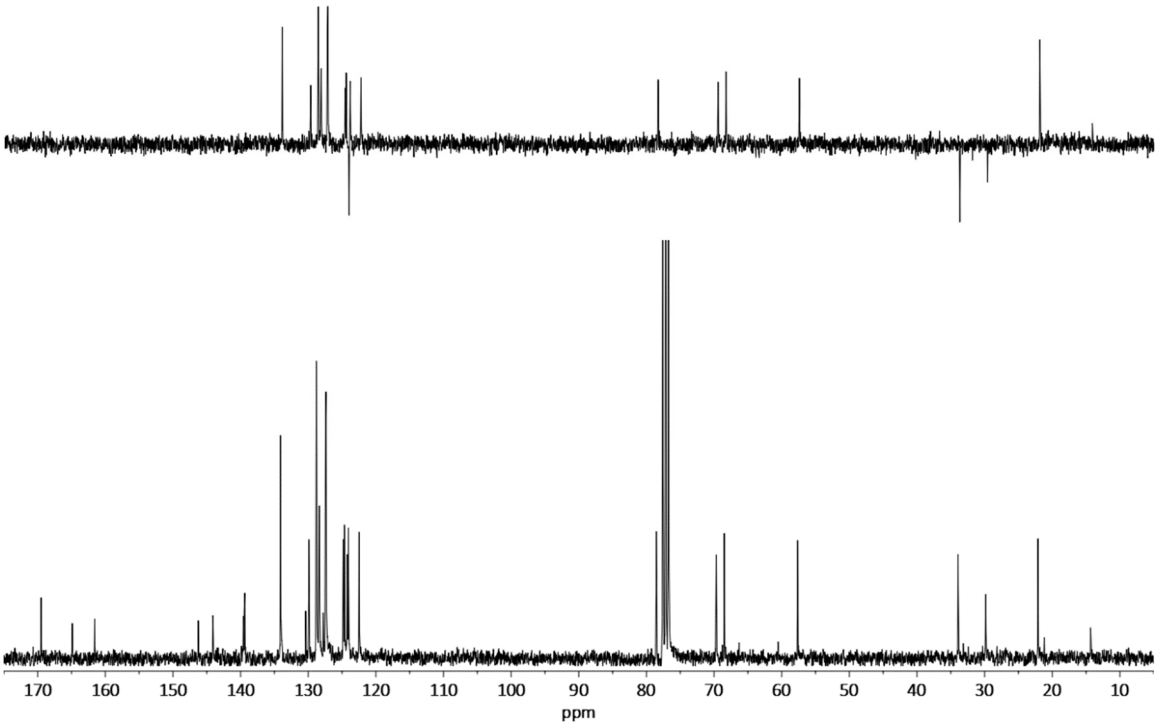


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

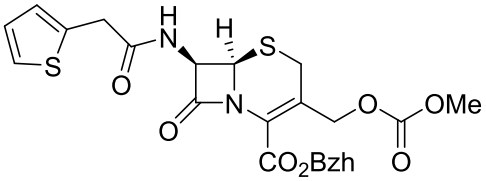


109b

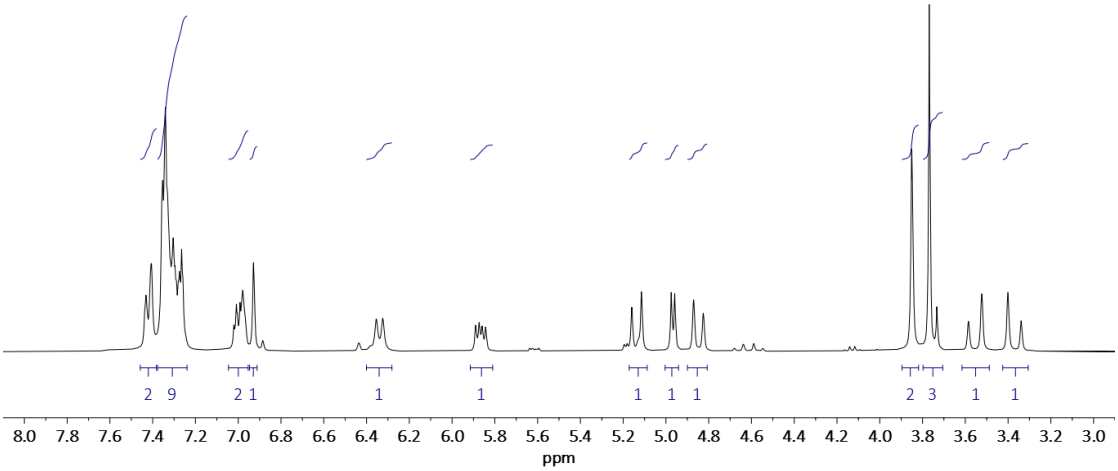


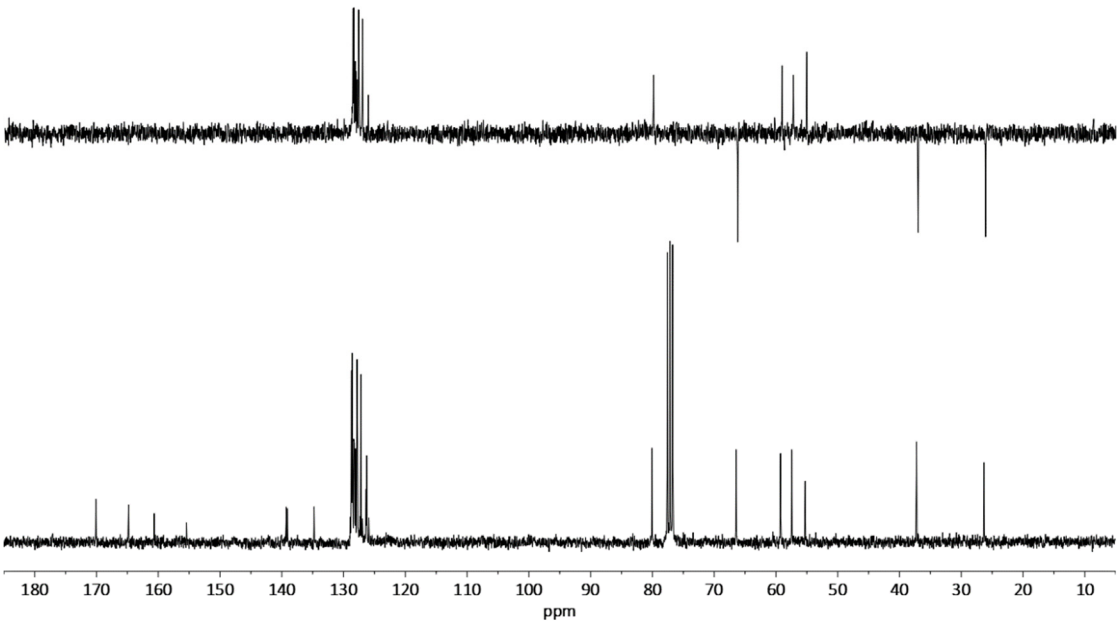


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

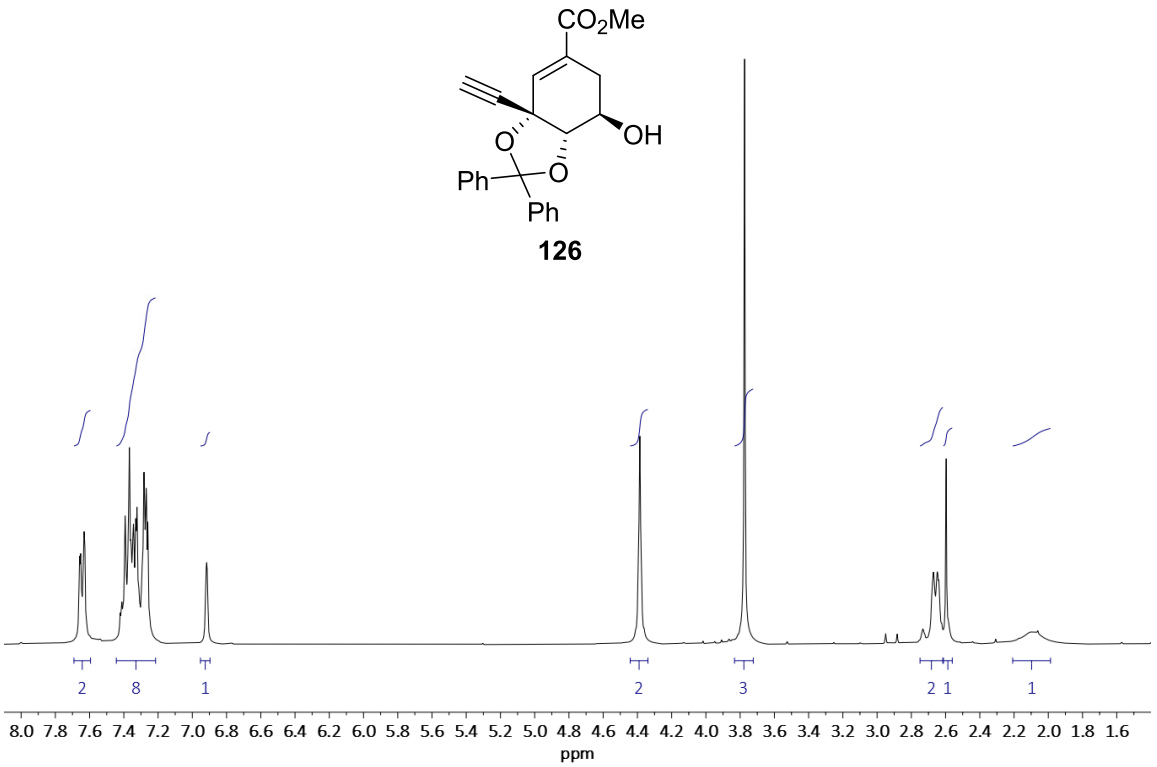


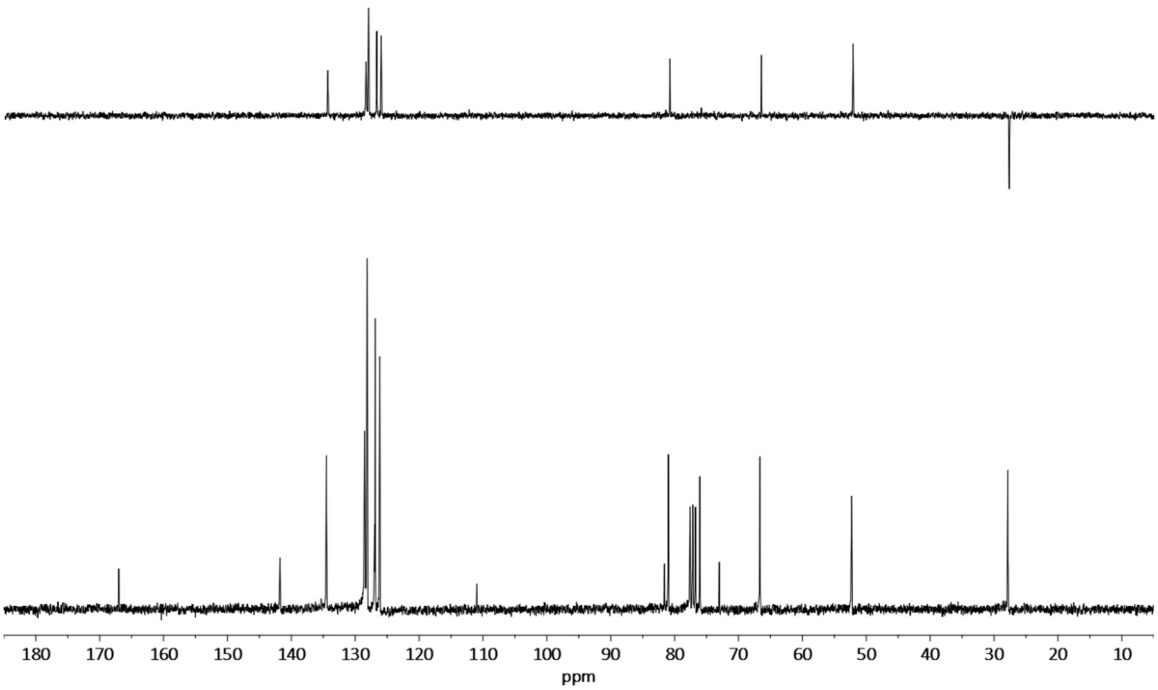
115



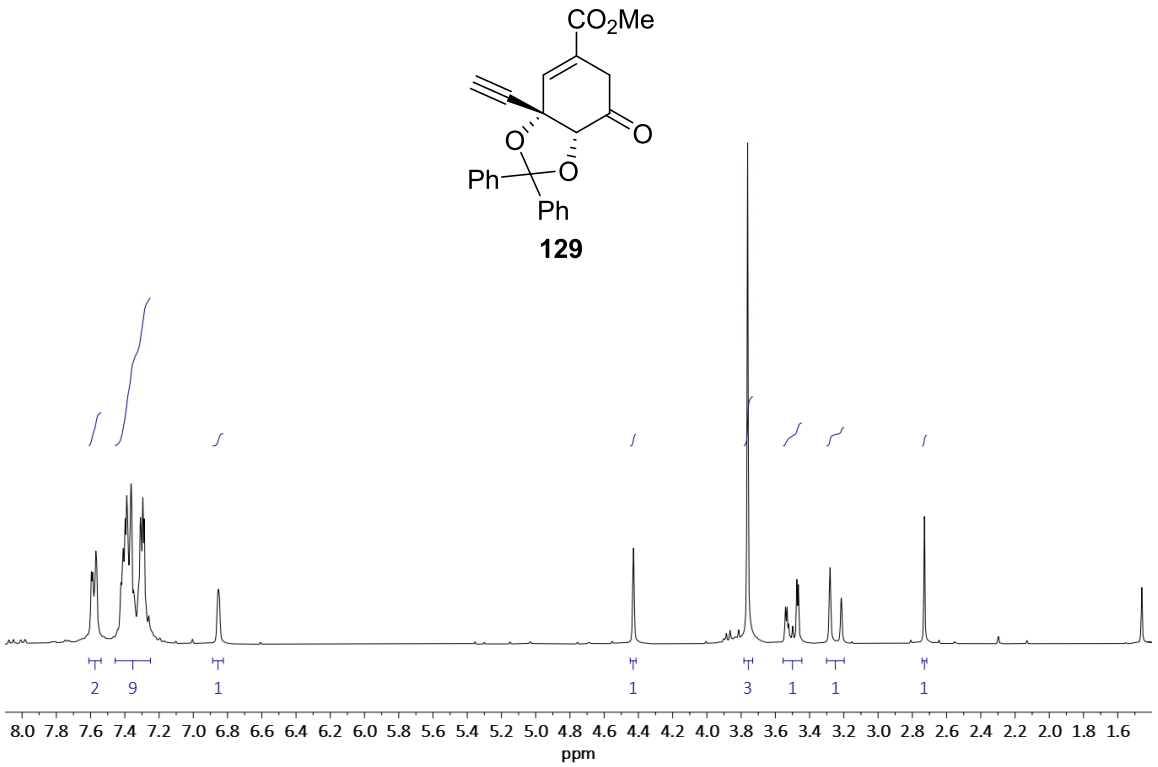


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

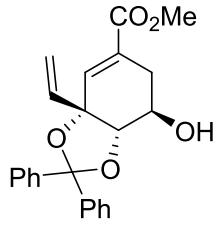




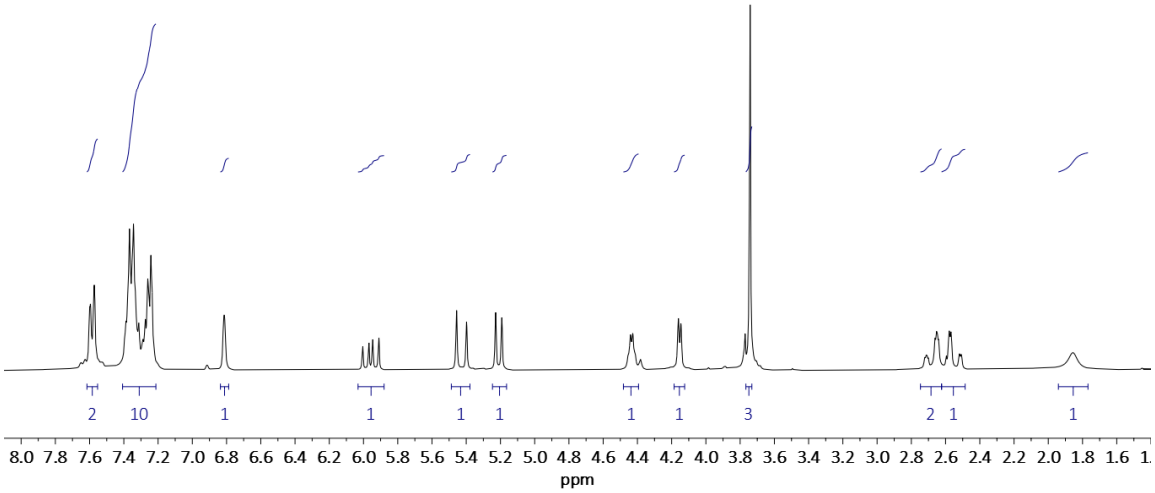
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

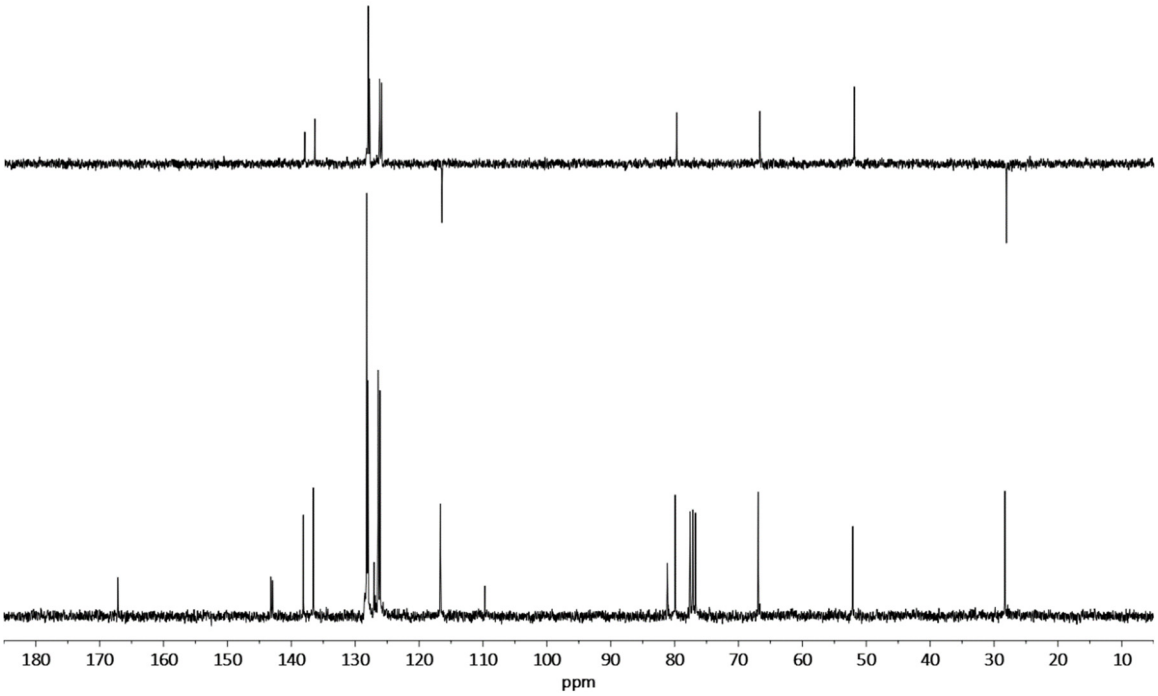


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

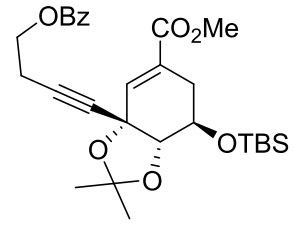


127

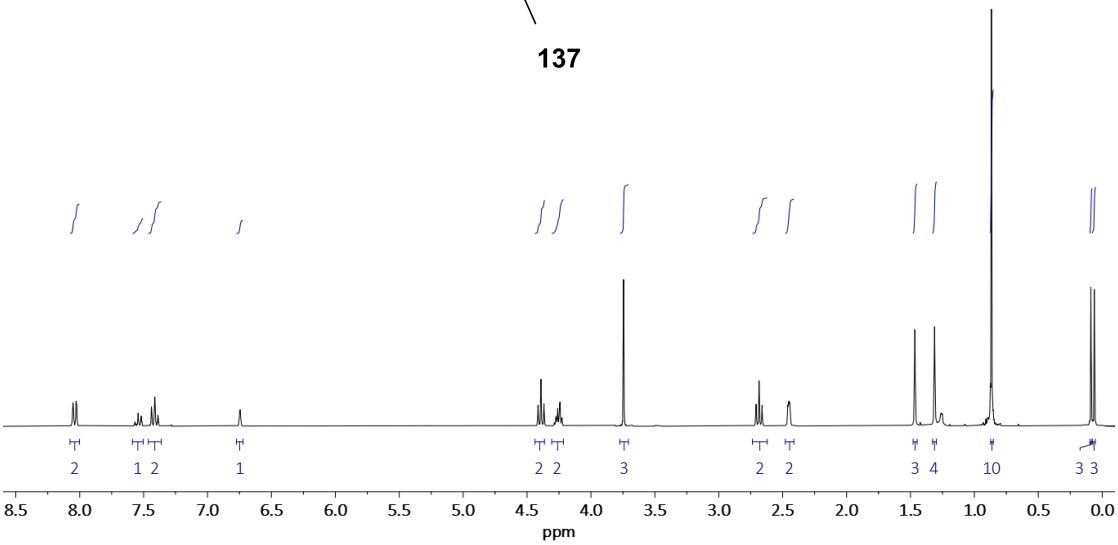


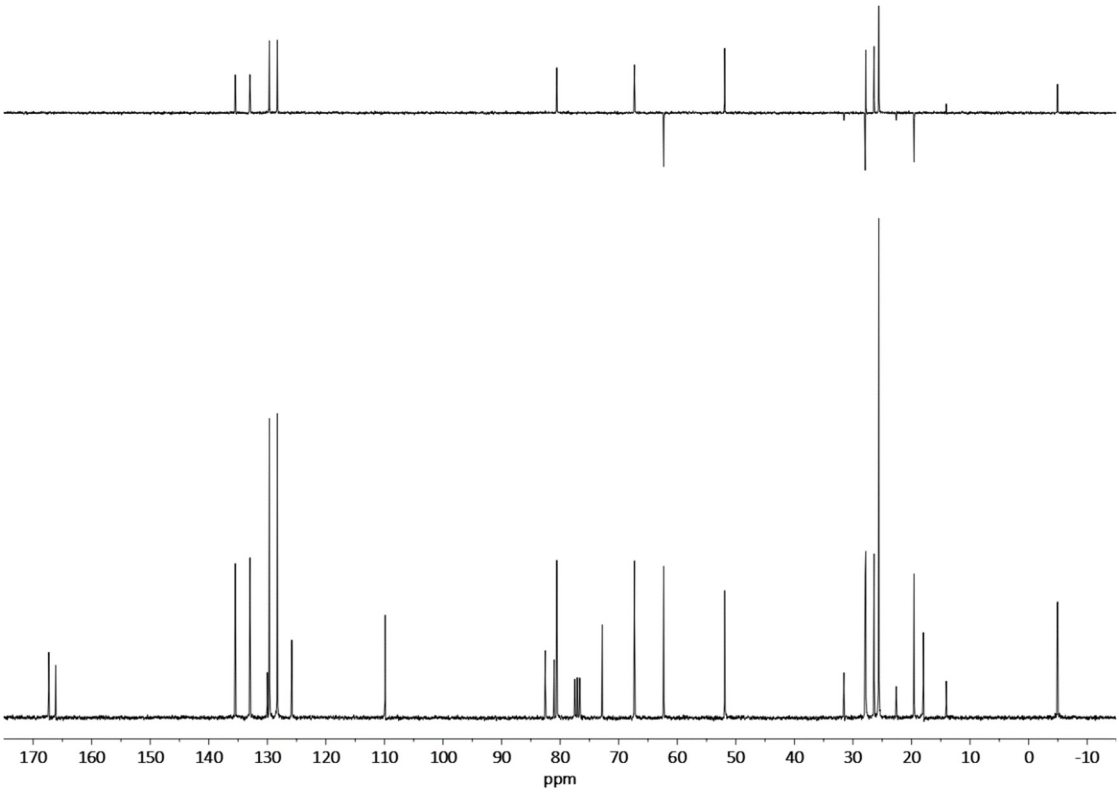


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

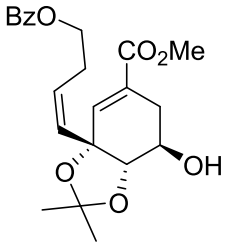


137

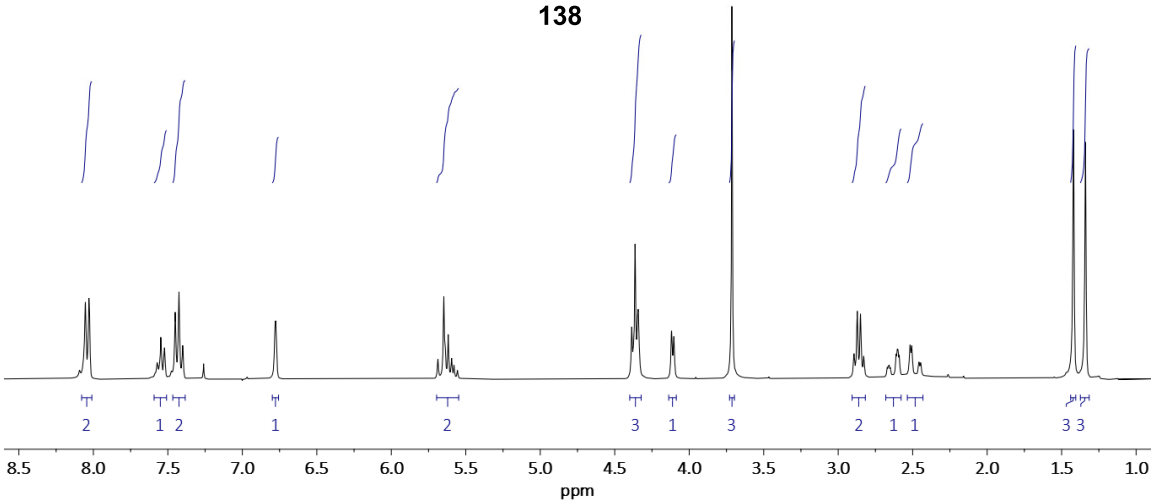


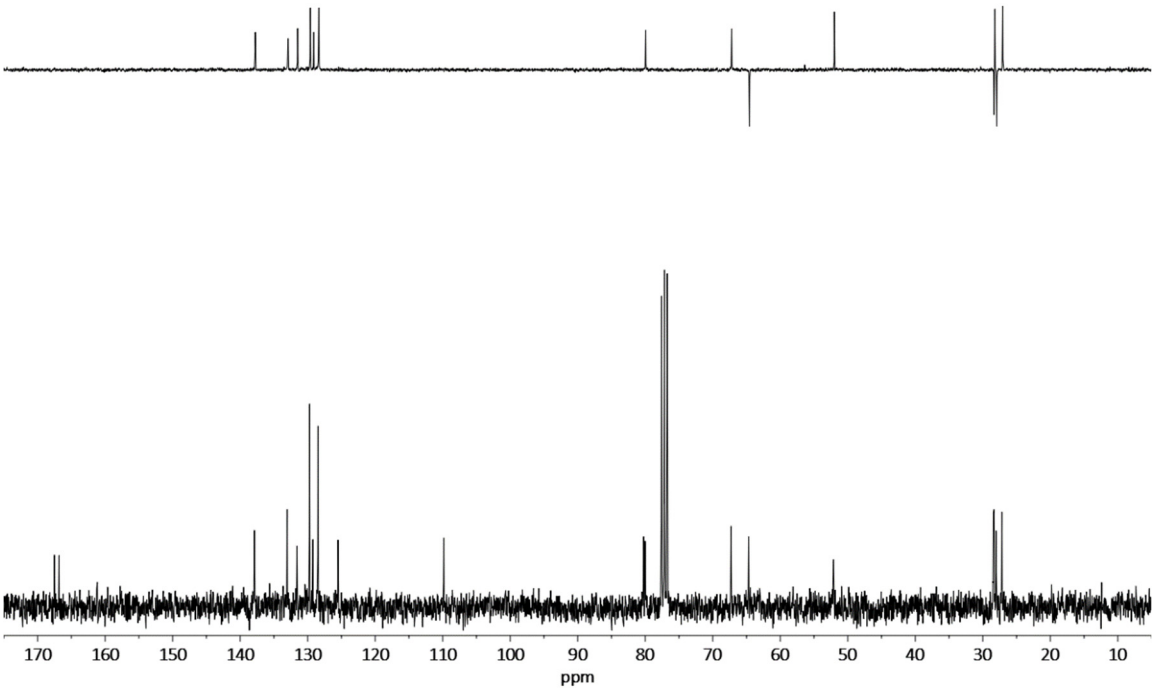


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



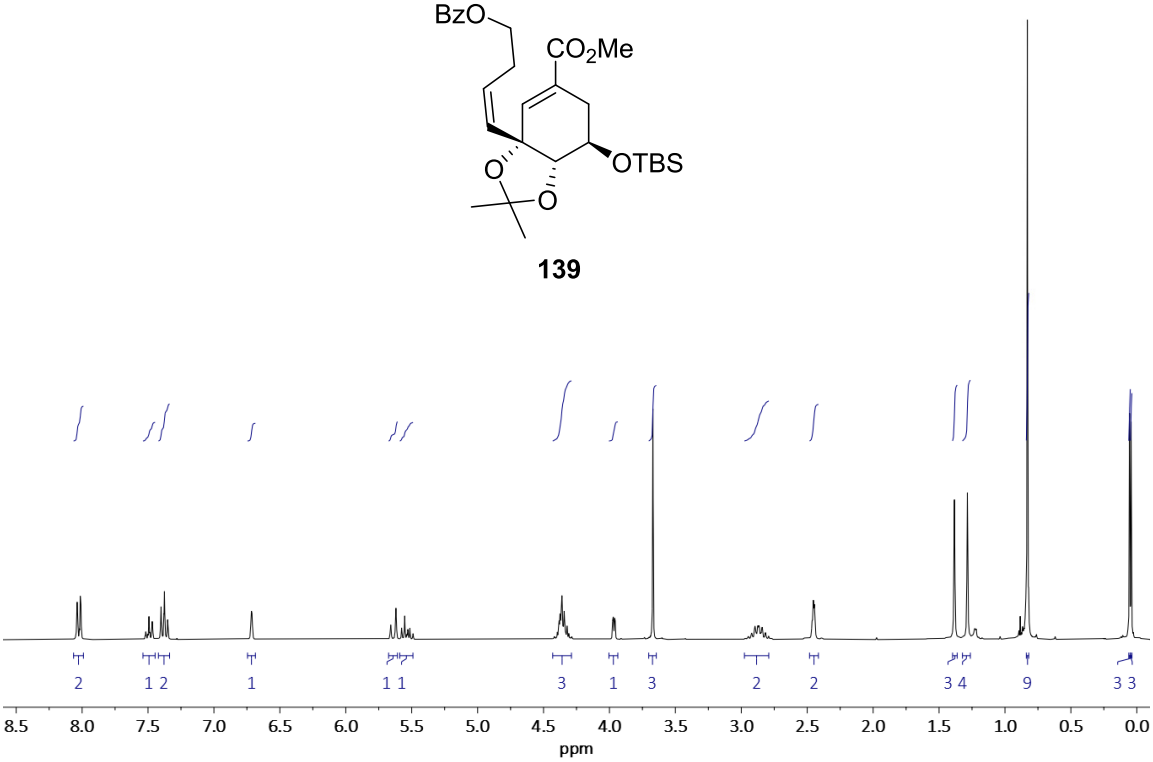
138

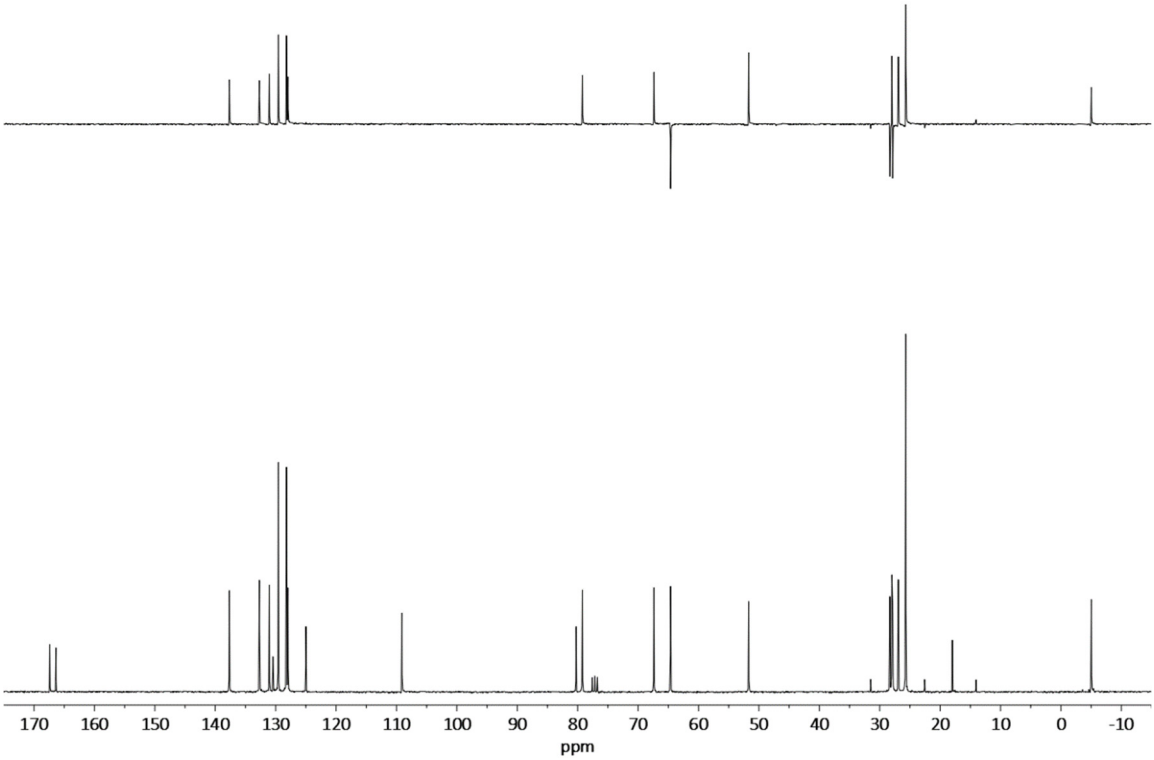




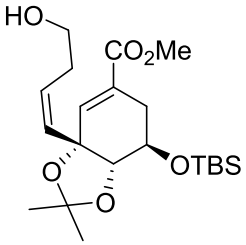
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

139

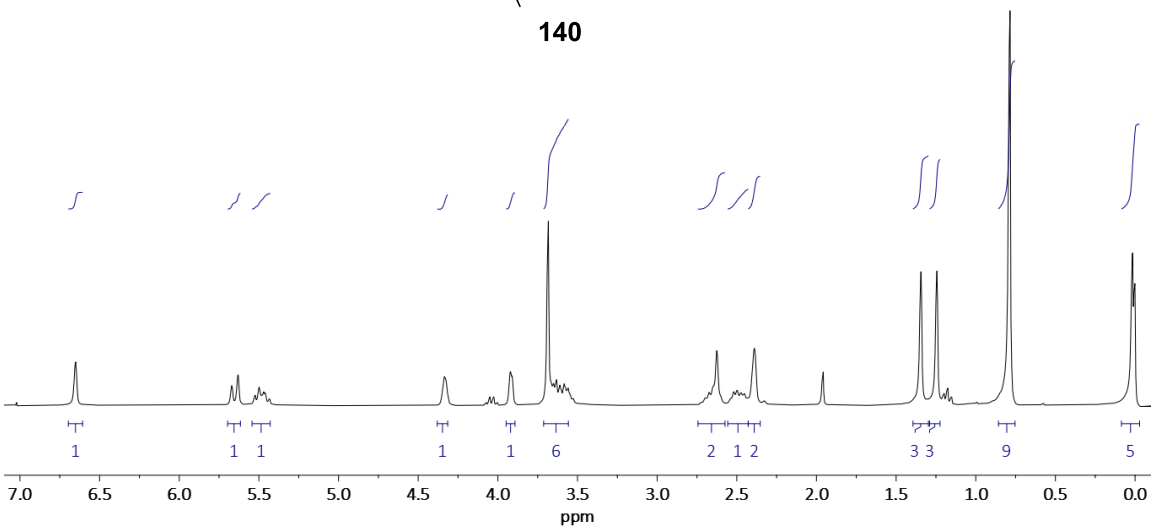


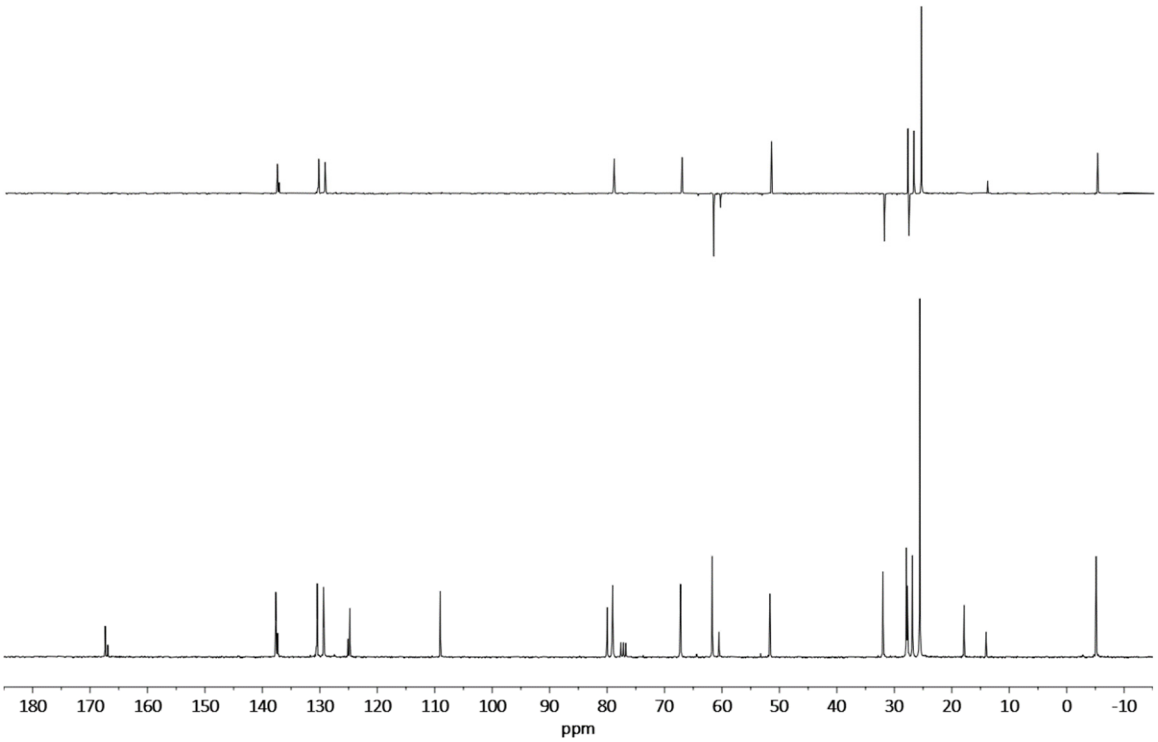


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

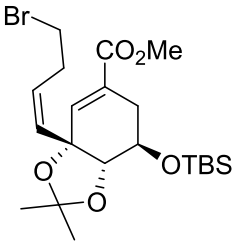


140

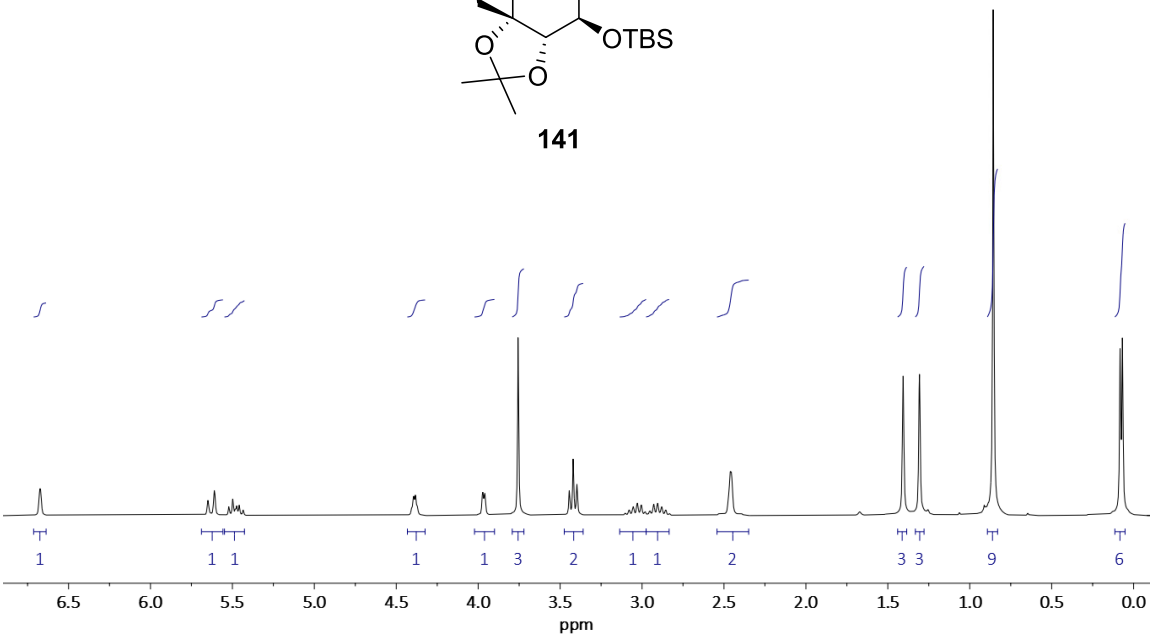


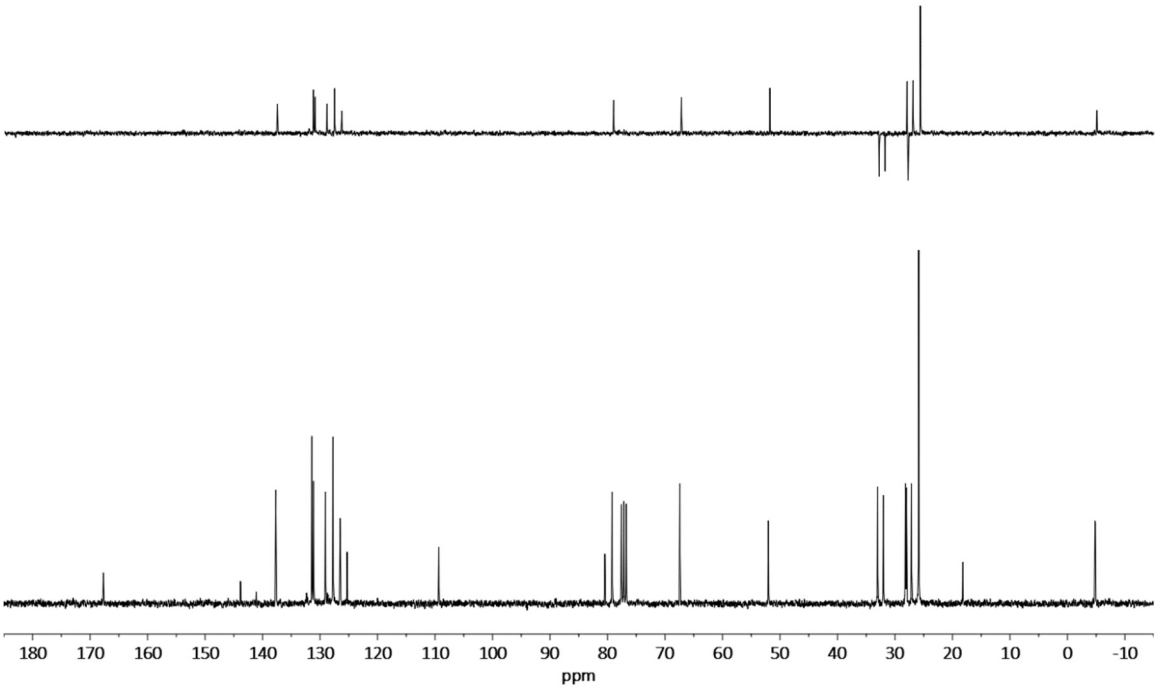


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

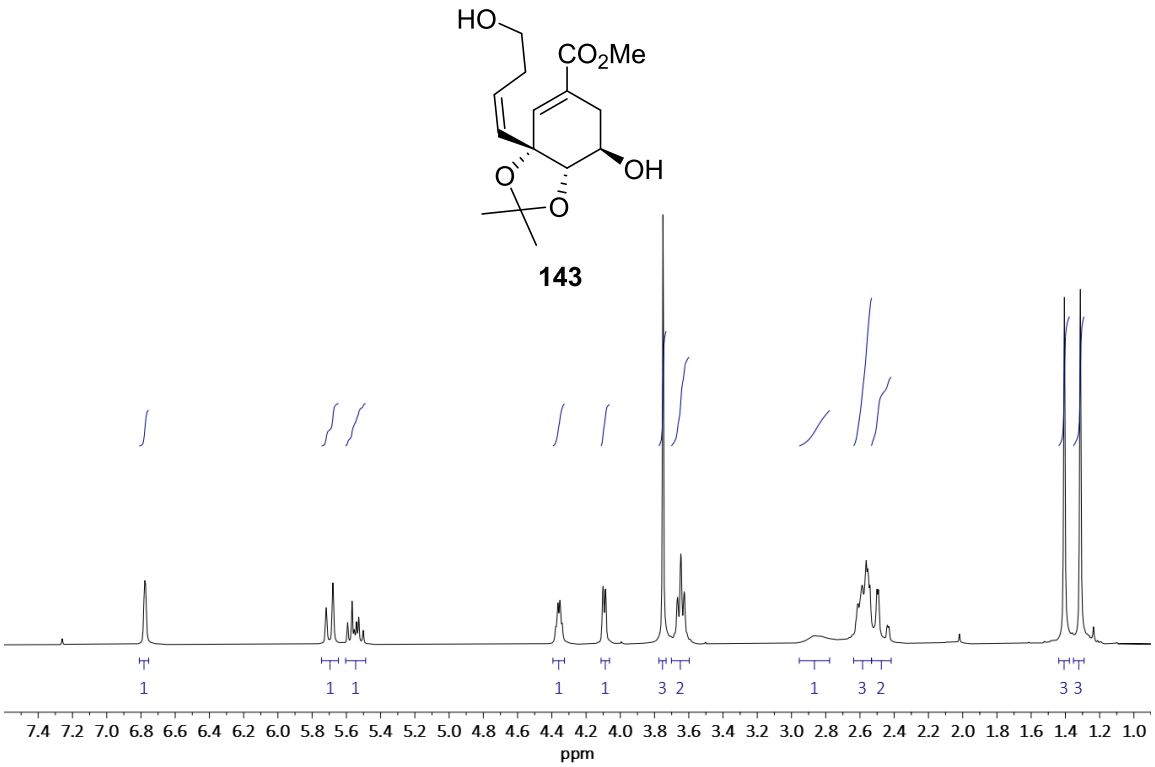


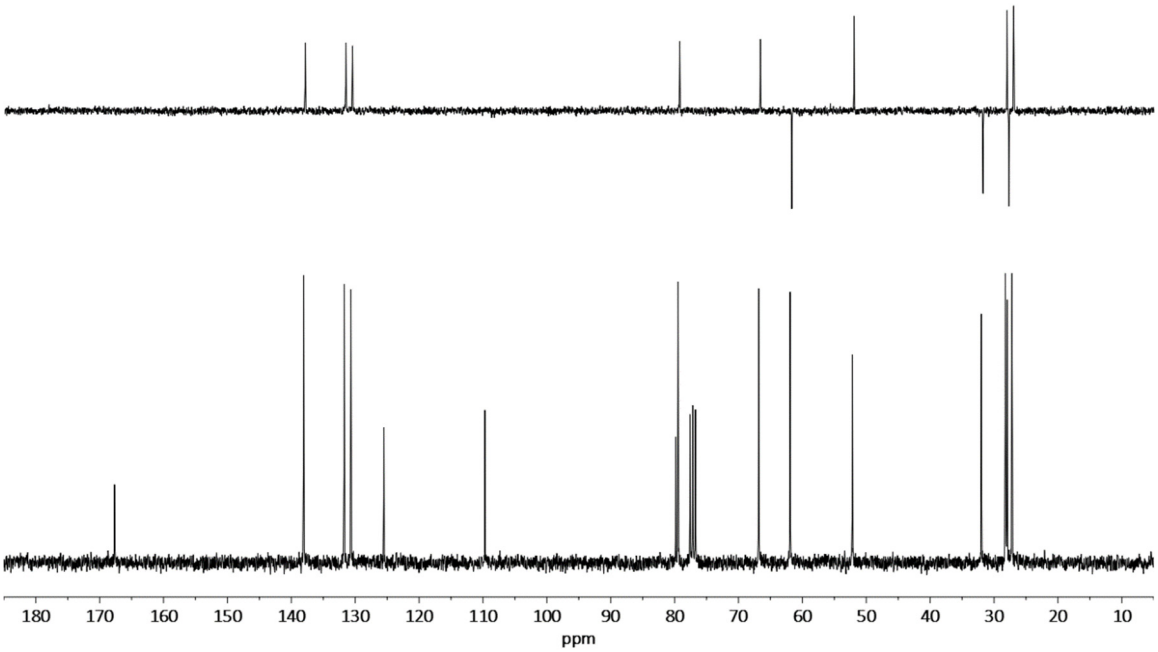
141



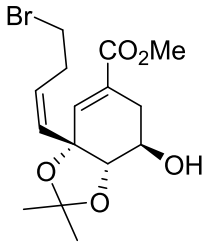


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

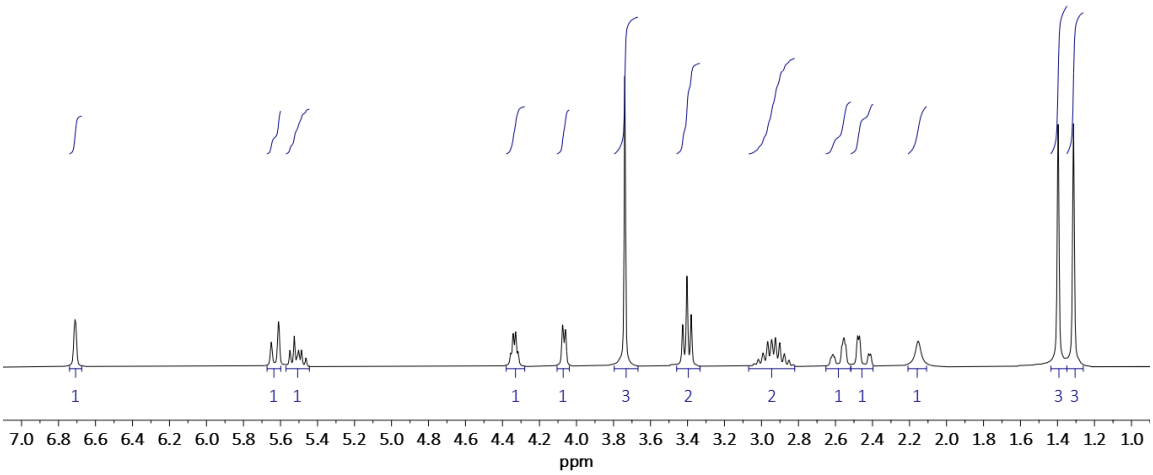


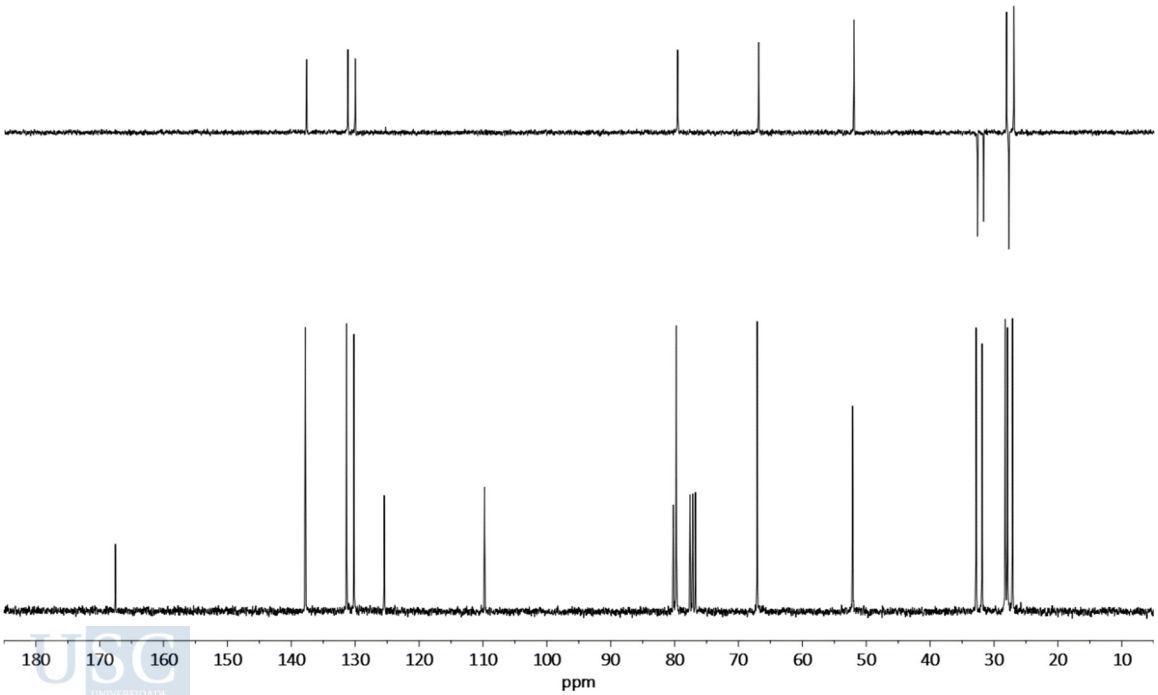


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

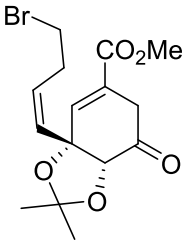


142

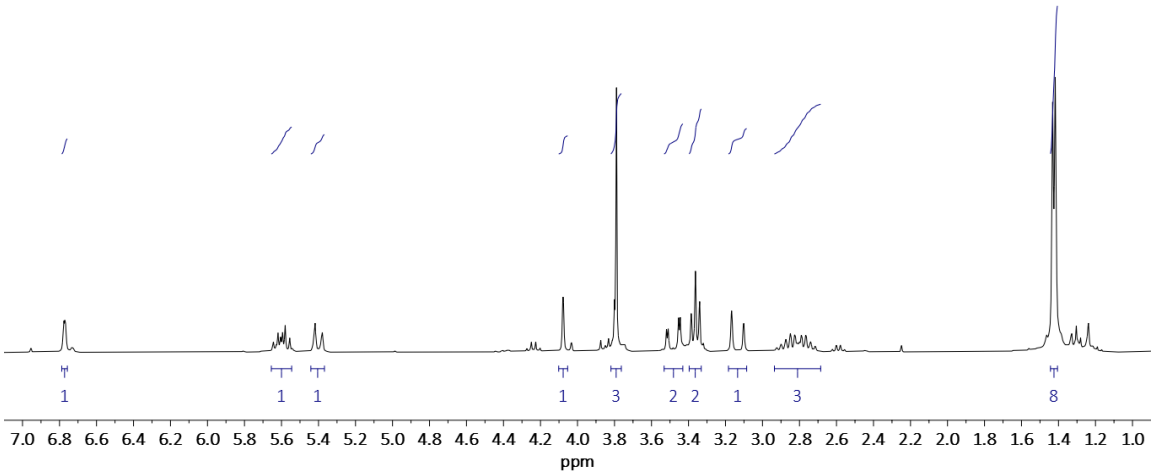


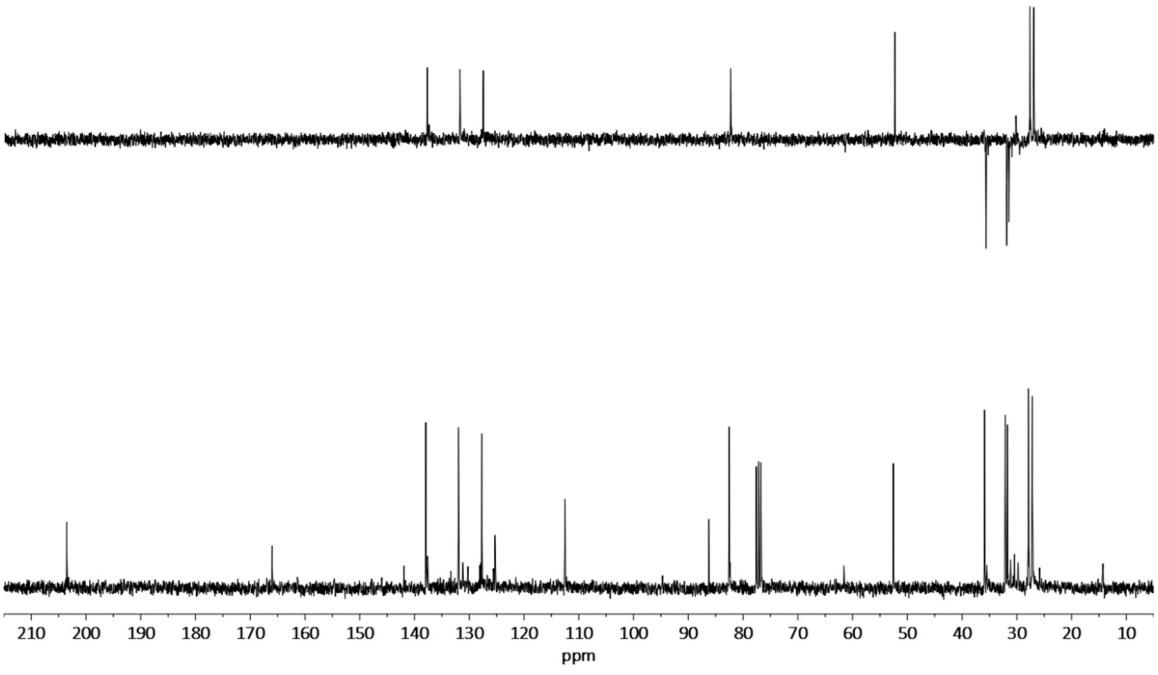


USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



131

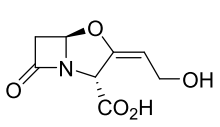




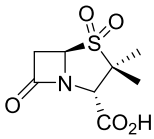
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexo II: Listado de estruturas

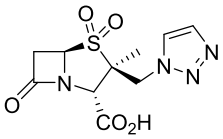
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



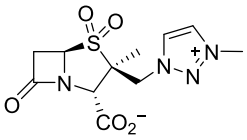
Ác. Clavulánico



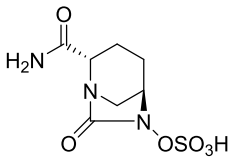
Sulbactam



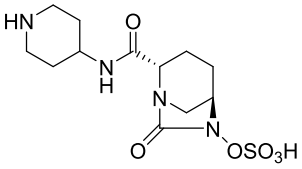
Tazobactam



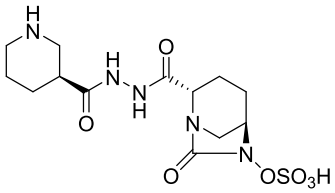
Enmetazobactam



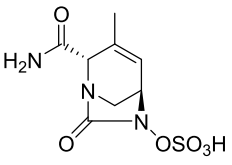
Avibactam



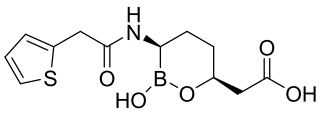
Relebactam



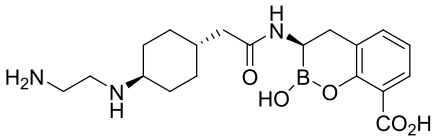
Zidebactam



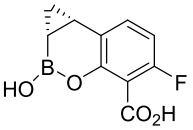
Durlobactam
(ETX2514)



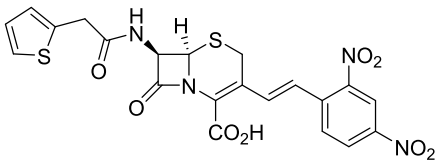
Vaborbactam



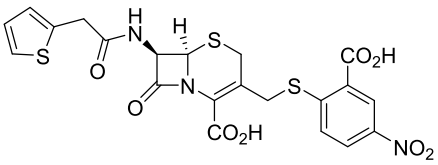
Taniborbactam



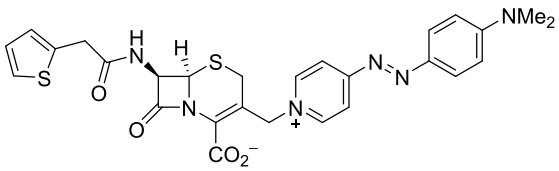
Xeruborbactam
(QPX7728)



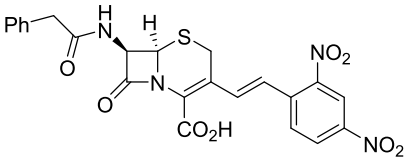
Nitrocefina



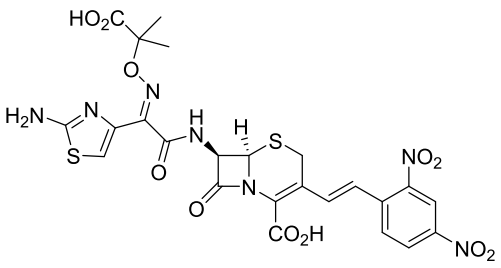
CENTA™



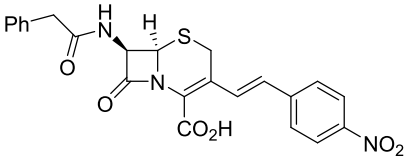
PADAC®



S1 (Cefesona)

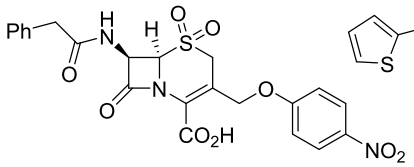


HMRZ-86 (test βLACTA™)

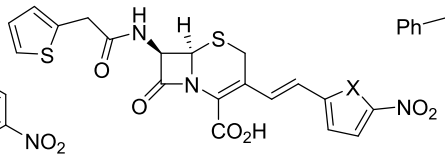


Chromacef

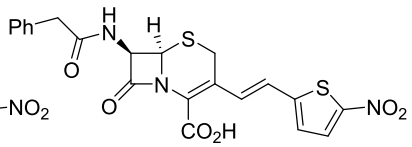
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



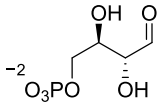
CLS405



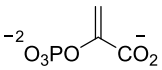
UW-57 X = O
UW-58 X = S



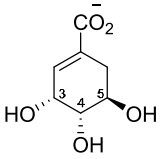
UW-154



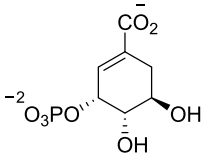
Eritrosa 4-fosfato



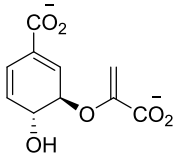
Fosfoenolpiruvato



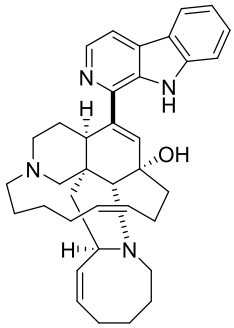
Ác. xiquímico



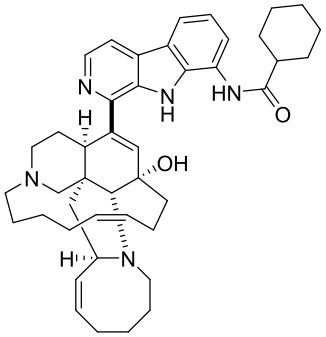
Xiquimato 3-fosfato



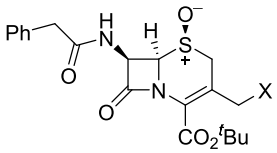
Ác. corísmico



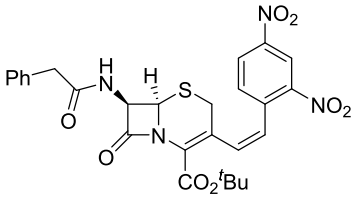
Manzamina A



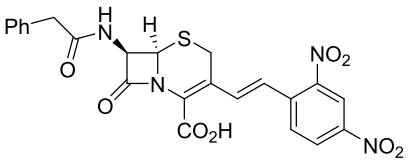
6-ciclohexamidomanzamina A



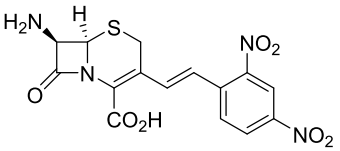
1 X = Br
2 X = PPh_3^+ Br^-



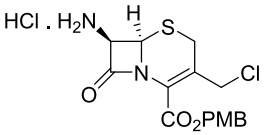
3



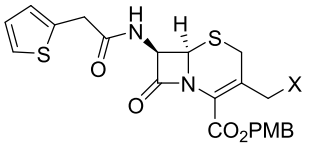
4



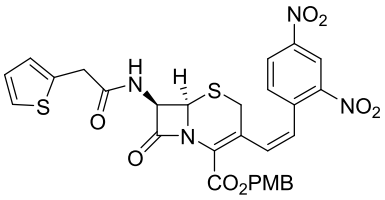
5



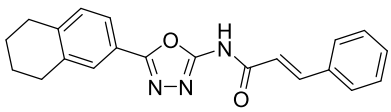
6



7 X = Cl
8 X = PPh_3^+ I^-

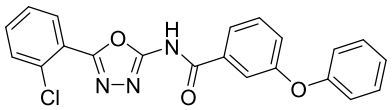


9

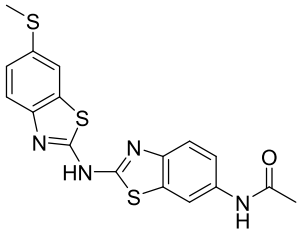


10

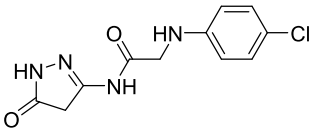
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



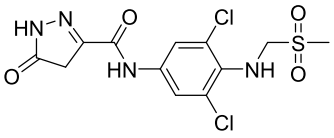
11



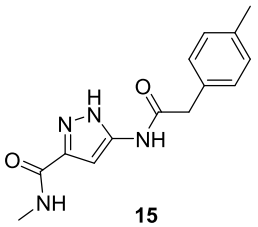
12



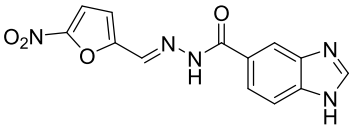
13



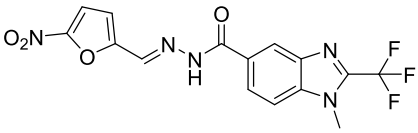
14



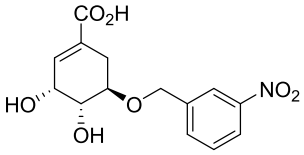
15



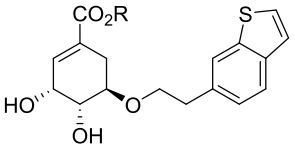
16



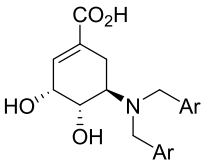
17



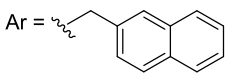
18



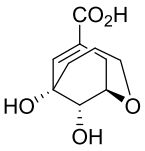
19 R = H
20 R = Et



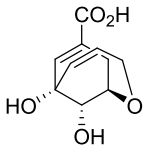
21



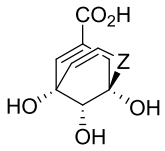
Ar =



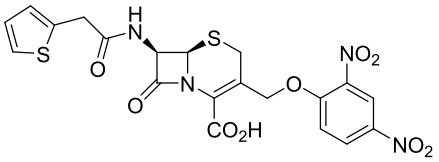
22



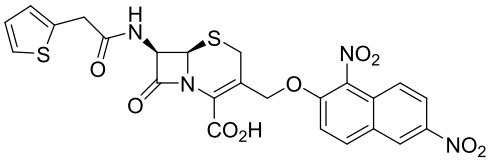
23



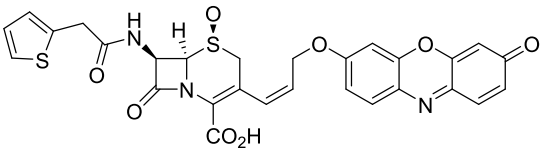
25 Z = CH_2
26 Z = CH_2CH_2



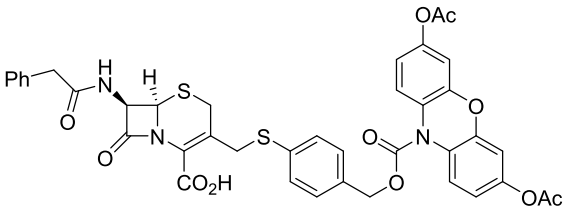
24a



24b

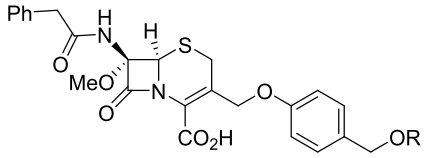


27

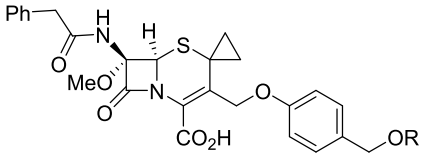


28

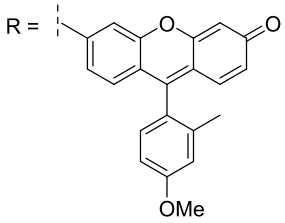
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

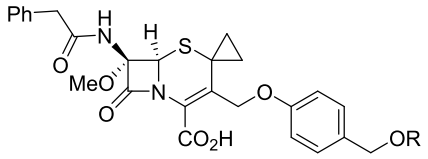


29

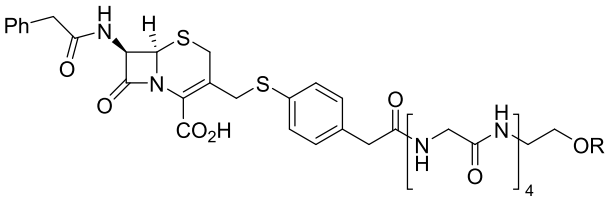


30

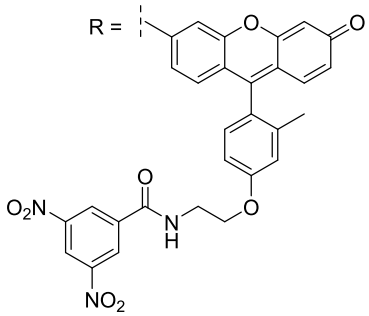


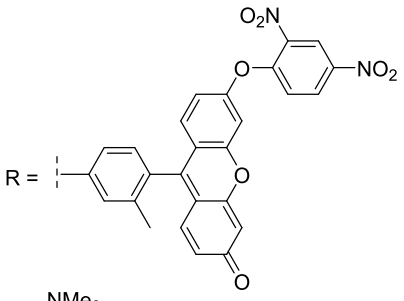


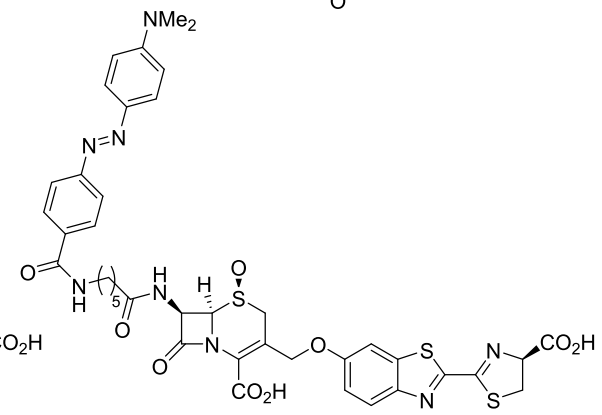
31



32

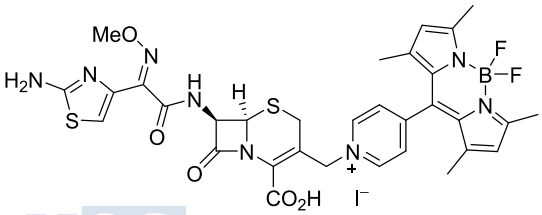




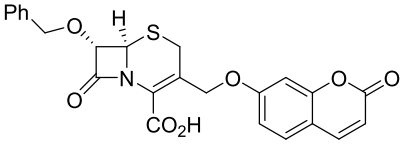


33

34

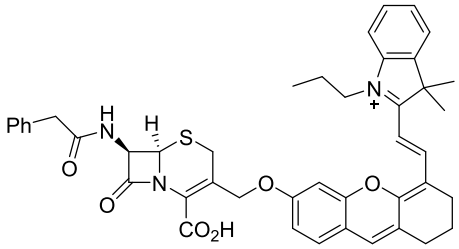


35

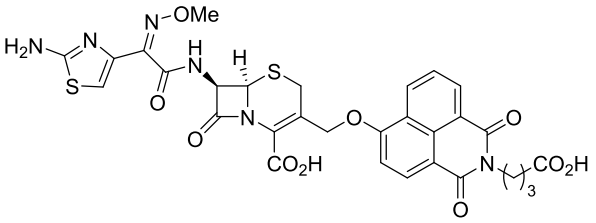


36

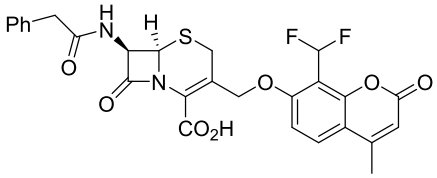
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



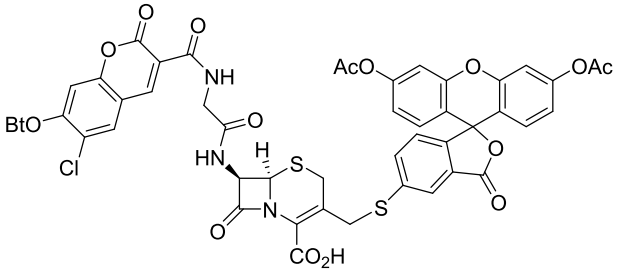
37



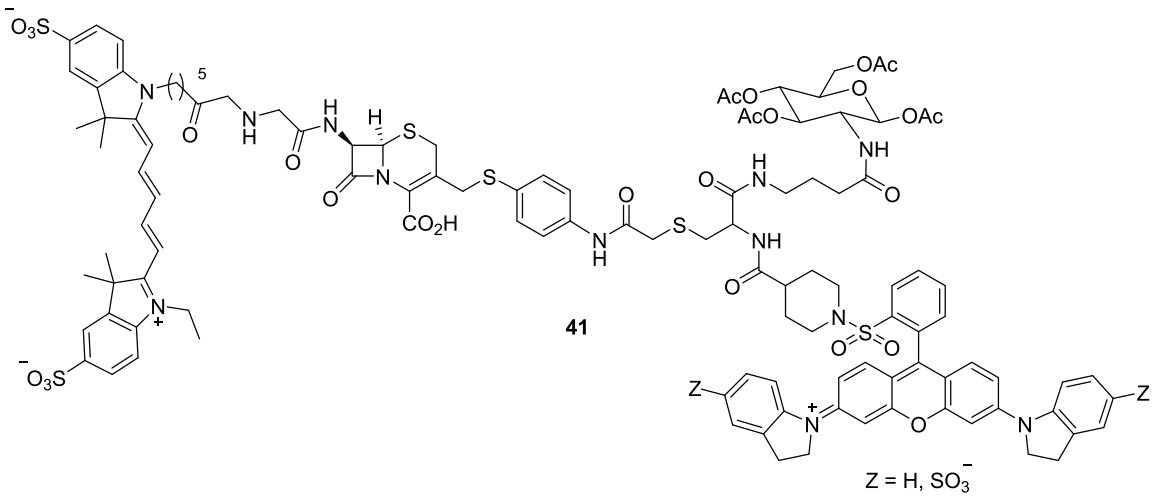
38



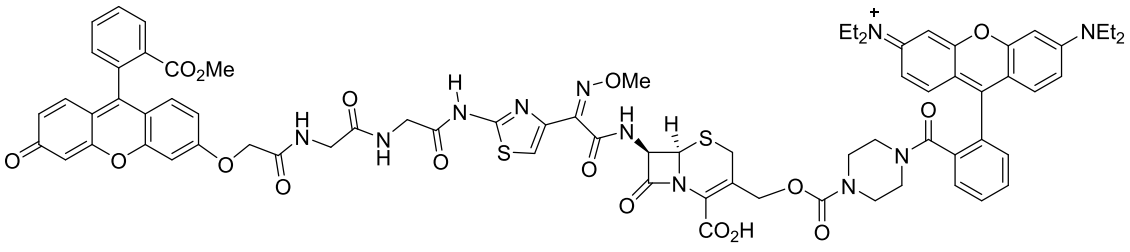
39



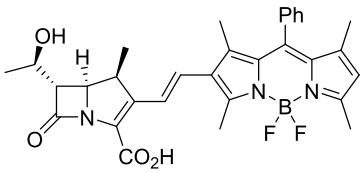
40



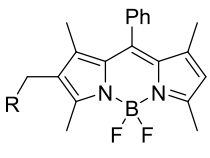
41



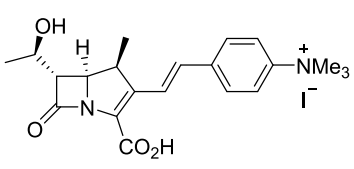
42



43

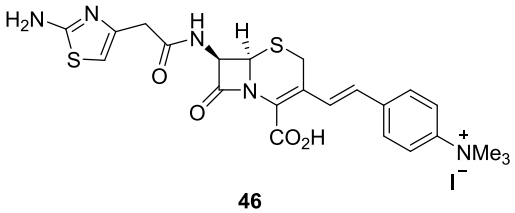


44

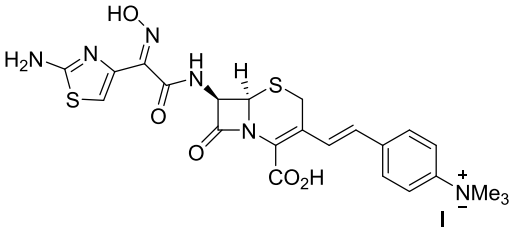


45

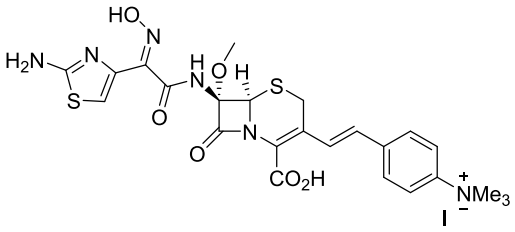
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



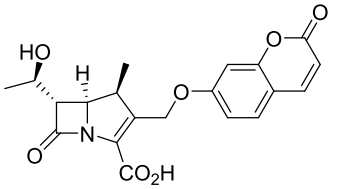
46



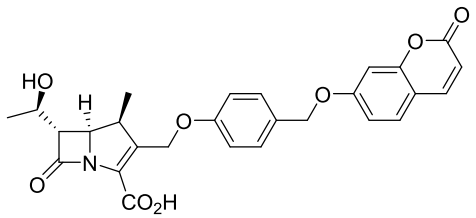
47



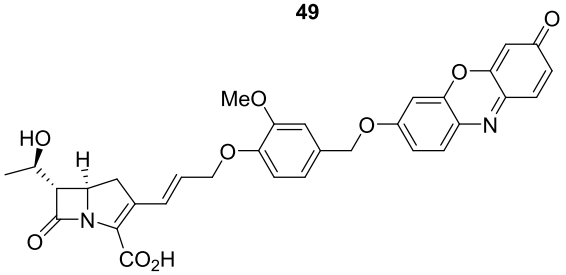
48



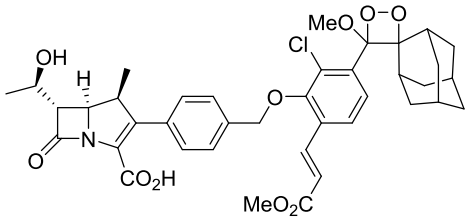
49



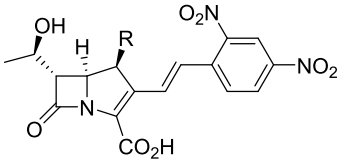
50



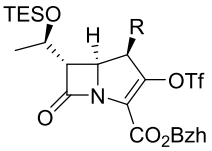
51



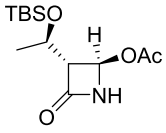
52



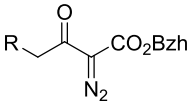
53 R = H, Me



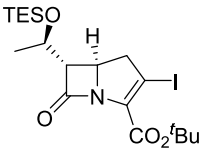
54 R = H, Me



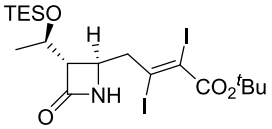
55



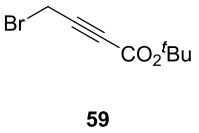
56 R = H, Me



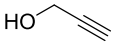
57



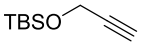
58



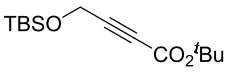
59



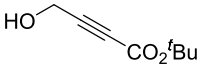
60



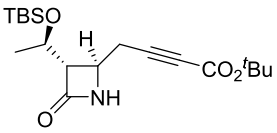
61



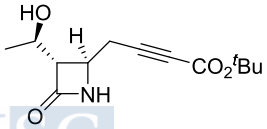
62



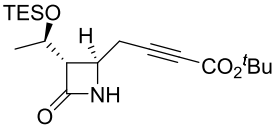
63



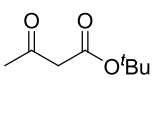
64



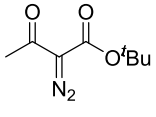
65



66

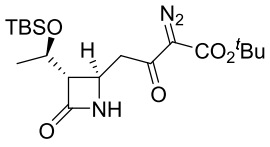


67

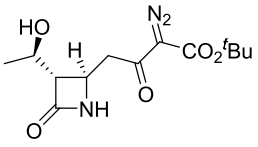


68

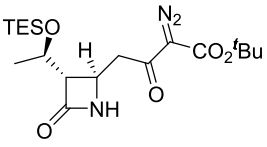
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



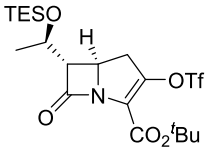
69



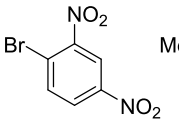
70



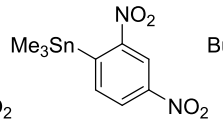
71



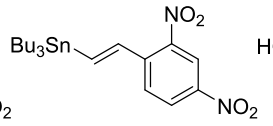
72



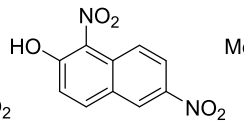
73



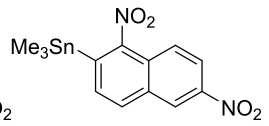
74



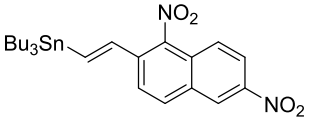
75



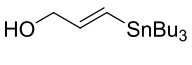
76



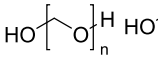
77



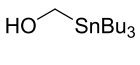
78



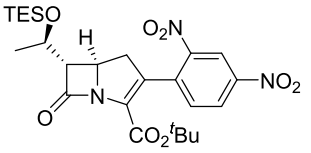
79



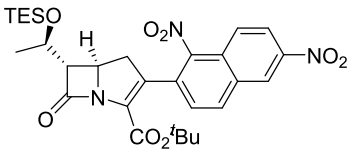
80



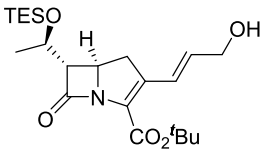
81



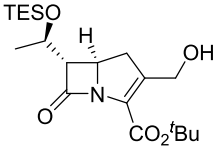
82a



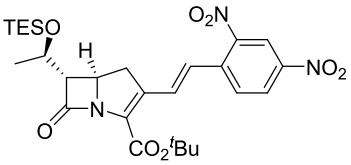
82b



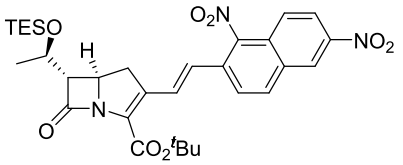
83



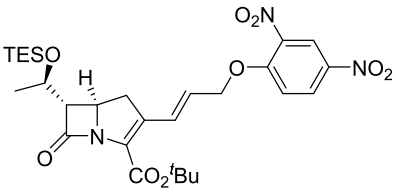
84



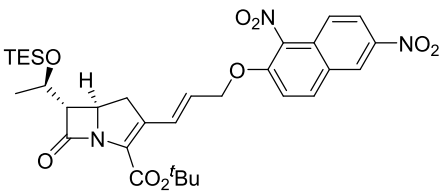
85a



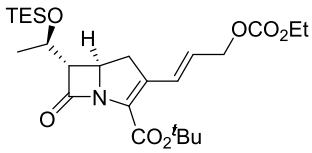
85b



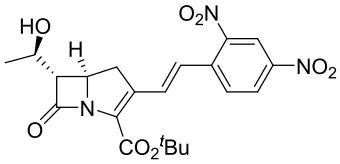
86a



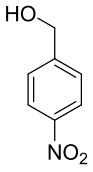
86b



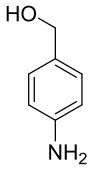
87



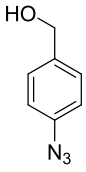
88



89

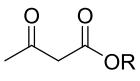


90

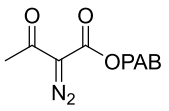


91

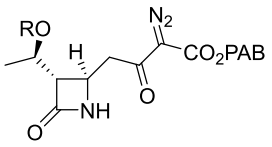
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



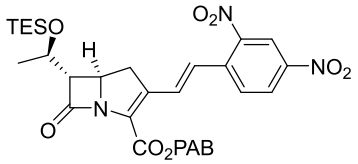
92 R = Et
93 R = PAB



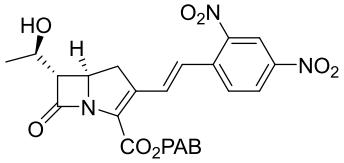
94



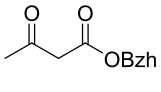
95 R = TBS
96 R = TES



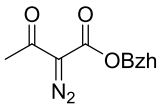
97



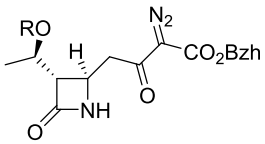
98



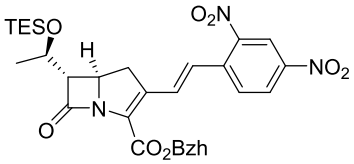
99



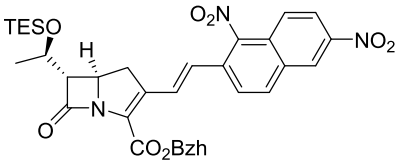
100



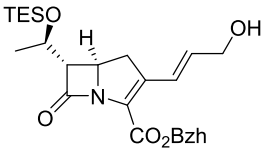
101 R = TBS
102 R = TES



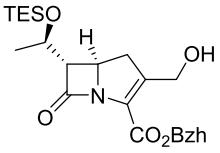
103a



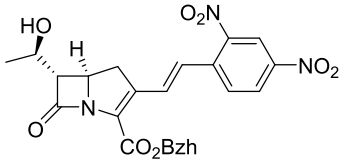
103b



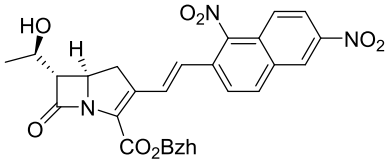
104



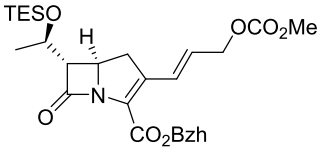
105



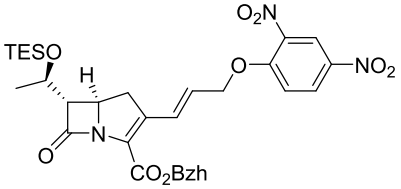
106a



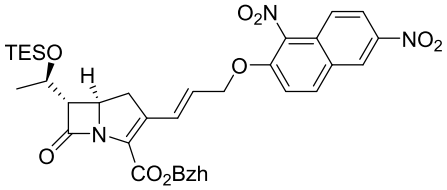
106b



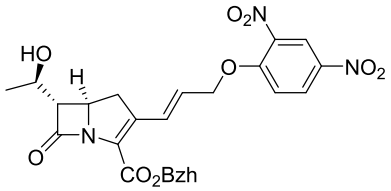
107



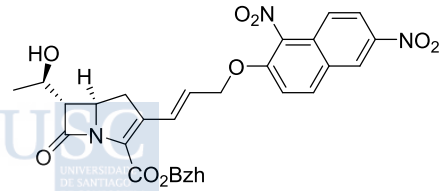
108a



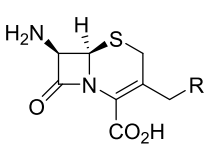
108b



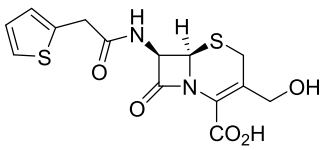
109a



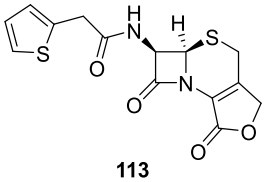
109a



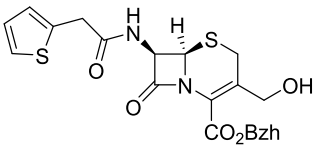
110 R = OAc
111 R = OH



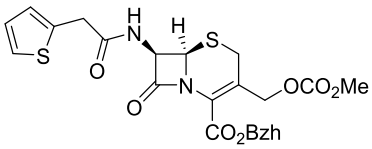
112



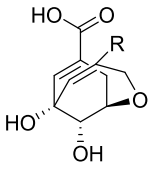
113



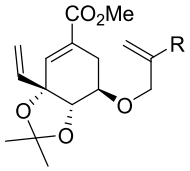
114



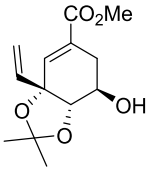
115



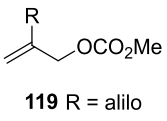
116 R = alilo



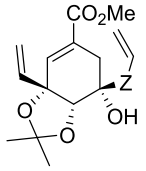
117 R = alilo



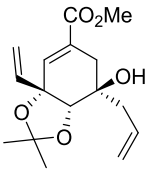
118



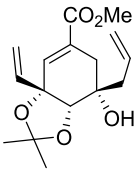
119 R = alilo



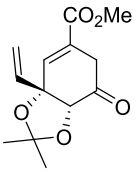
120 Z = CH_2
121 Z = CH_2CH_2



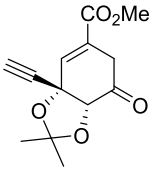
120*R*



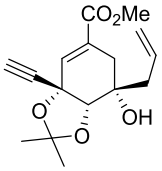
120*S*



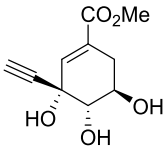
122



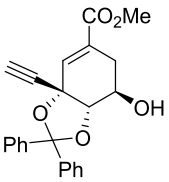
123



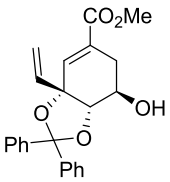
124



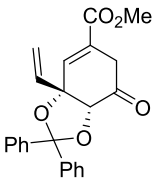
125



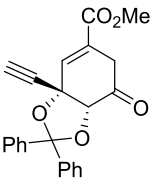
126



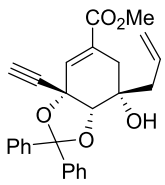
127



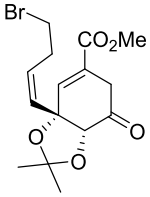
128



129



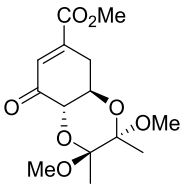
130



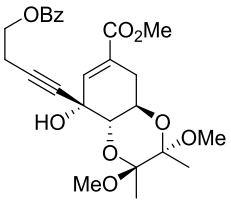
131



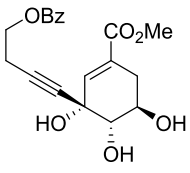
132



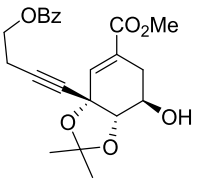
133



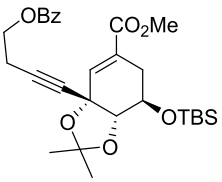
134*R*



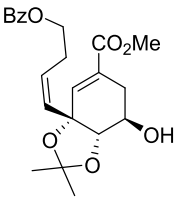
135



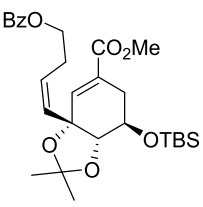
136



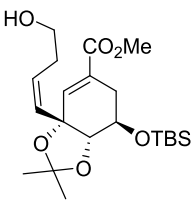
137



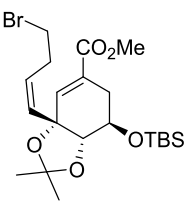
138



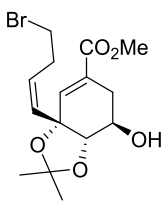
139



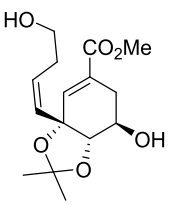
140



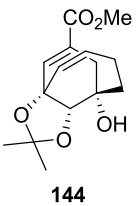
141



142



143



144

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexo III: Publicación

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Parte da información recollida nos apartados ***Introdución*** e ***Resultados e Discusión*** foi publicada na revista científica *Bioorganic Chemistry* pertencente á editorial Elsevier.

Canabal, R.; González-Bello, C. Chemical Sensors for the Early Diagnosis of Bacterial Resistance to β-Lactam Antibiotics. *Bioorg. Chem.* 2024, *150*, 107528. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107528; ISSN 0045-2068

Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, C/ Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, España.

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045206824004334

A contribución do autor de esta tese a dita publicación foi a de busca bibliográfica, recompilación de información, etc. en calidade de coautor.

índices de calidade: A revista presenta actualmente un Factor de Impacto (IF) de 4.5 e un índice de CiteScore de 9.7 (calculados por Scopus en 2023); un valor SNIP (Source Normalized Impact per Paper) de 1.137 e un valor SJR (Scimago Journal Rank) de 0.745 calculados por Scopus (Scopus preview- Scopus- Sources). Ademais presenta un H-Index de 86 e ocupa o cuartil 1 (Q1) na categoría de Química Orgánica e cuartil 2 (Q2) nas categorías de Bioquímica e Descubrimento de fármacos segundo Scimago [Bioorganic Chemistry (scimagojr.com)].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexo IV: Permisos de reprodución

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Permiso para a reprodución do artigo propio

A revista *Bioorganic Chemistry*, pertencente á editorial Elsevier, permite o uso do artigo por parte do autor como parte da súa tese de doutoramento.



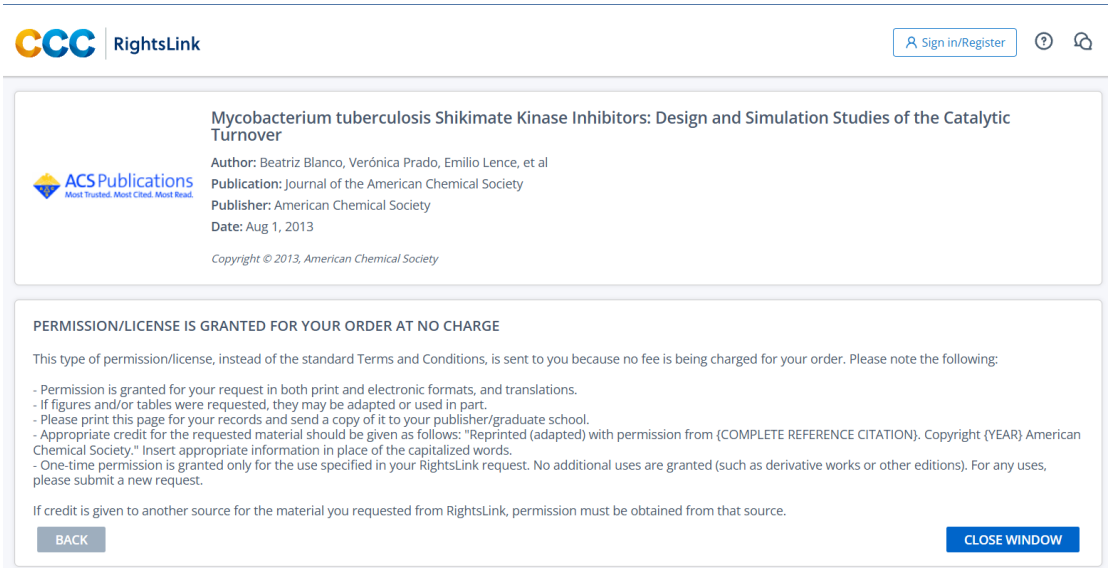
Imaxe 1. Permiso para a reprodución parcial ou total do artigo: Canabal, R.; González-Bello, C. Chemical Sensors for the Early Diagnosis of Bacterial Resistance to β-Lactam Antibiotics. *Bioorg. Chem.* **2024**, *150*, 107528. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107528

Permiso para a reprodución de imaxes: Figura 17 e Figura 21B

Cóntase con permiso da editorial American Chemical Society (ACSPublications) para o uso, segundo as condicións indicadas, de imaxes publicadas no seguinte artigo:

Blanco, B.; Prado, V.; Lence, E.; Otero, J. M.; Garcia-Doval, C.; Van Raaij, M. J.; Llamas-Saiz, A. L.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. Mycobacterium Tuberculosis Shikimate Kinase Inhibitors: Design and Simulation Studies of the Catalytic Turnover. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12366–12376. https://doi.org/10.1021/ja405853p

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CCC RightsLink

Sign in/Register

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Mycobacterium tuberculosis Shikimate Kinase Inhibitors: Design and Simulation Studies of the Catalytic Turnover

Author: Beatriz Blanco, Verónica Prado, Emilio Lence, et al
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Aug 1, 2013

Copyright © 2013, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW

Imaxe 2. *Permiso para a reprodución de imaxes do artigo:* Blanco, B.; Prado, V.; Lence, E.; Otero, J. M.; Garcia-Doval, C.; Van Raaij, M. J.; Llamas-Saiz, A. L.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. Mycobacterium Tuberculosis Shikimate Kinase Inhibitors: Design and Simulation Studies of the Catalytic Turnover. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12366–12376. https://doi.org/10.1021/ja405853p

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A capacidade dos antibióticos para curar as infeccións bacterianas atópase en risco debido á aparición das “Súper-Bacterias”, cepas resistentes a múltiples antibióticos, que se estima serán as causantes de mais de 10 millóns de mortes cada ano para o 2050. É crucial o desenvolvemento de métodos de diagnóstico rápidos, fiables e económicos que permitan a identificación visual da actividade das β-lactamasas. O uso de reactivos cromoxénicos e fluoroxénicos preséntase como unha alternativa rápida e eficaz aos análises microbiolóxicos clásicos. O problema exixe tamén o desenvolvemento de terapias novidosas e alternativas. Esta tese de doutoramento céntrase no desenvolvemento de carbapenems cromoxénicos e de inhibidores do enzima xiquimato quinasa, esencial para a supervivencia de bacterias patóxenas resistentes.