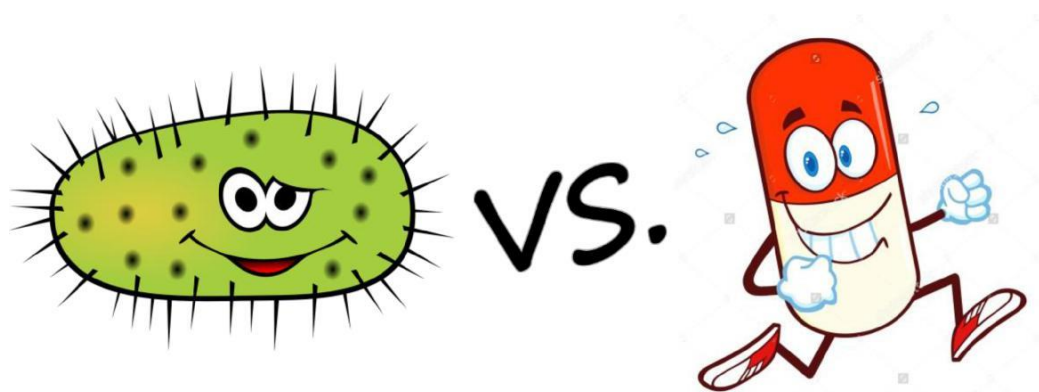


Nuevos derivados de pregnenolona con actividad antibiofilm

Alejandra Espíndola



Tutor. Dr. Guzmán Álvarez

Laboratorio de Moléculas Bioactivas

CENUR Litoral Norte sede Paysandú

Universidad de la República.

Agradecimientos

Agradezco a todas aquellas personas que me acompañaron en este camino y me han ayudado a que este proyecto salga adelante:

A *Guzmán Álvarez*, por abrirme las puertas de su laboratorio, porque sus exigencias lograron explotar mi potencial y por siempre alentarme a seguir adelante.

A mi abuela *Teodora Novas*, por enseñarme todos los valores que tengo, por darme ese apoyo incondicional, por ser mi cómplice, mi bastón, mi motor, mi pilar y mi todo.

A mi hermana *Vanessa Espíndola*, por vivir a flor de piel cada triunfo y derrota, por ayudarme en la recta final y porque tu otra mitad se recibió conmigo.

A mi madre *Rossana Quinteros*, por apoyarme, acompañarme y entenderme a lo largo de mi carrera, dándome fuerzas y confianza.

A mi padre *Jorge Espíndola*, por aceptarme y quererme como soy.

A mis amigos de siempre, *Eliana Marichal*, *Mariángeles García*, *Agustina Irazusta*, *Facundo Tabó* y *Sofía Baez*, simplemente por estar en mi vida.

A mis amigos que me dejó la facultad, *Ivanna Marini*, *Florencia Klein*, *Diego Pérez*, *Virginia Cantera*, *Maximiliano Torres*, *María Jesús Acquistapace*, por los momentos vividos.

A mis compañeros de laboratorio en Paysandú, *Cecilia Pérez*, *Germán Fierro*, *Florencia Ferraro*, *Andrés López* y *Florencia Jesús*, por acompañarme en esa etapa.

A *Paola Scavone* y *Victoria Iribarnegaray*, ambas del Departamento de Microbiología, por su colaboración en los ensayos biológicos.

A *Gustavo Salinas* y *Gastón Risi* del IPMont, por realizar los ensayos toxicológicos en *C. elegans*.

A Paola Hernández, por encargarse de la corrección y evaluación de la tesina.

Resumen

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis* son patógenos oportunistas que causan algunas de las infecciones más frecuentes en pulmones, ojos, oídos y heridas. Estos patógenos son capaces de formar una matriz biológica (biofilm) que actúa como barrera para los fármacos, causando resistencia a los antibióticos. Se ha identificado una molécula esteroidea aislada de la cáscara del huevo de la garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus* con actividad inhibitoria en la formación de biofilm de *P. aeruginosa*. Esta molécula (Boofilina) es responsable de defender al huevo del ataque microbiano cuando éste se encuentra en el suelo. Además, muchas moléculas esteroideas se reportaron con actividad citotóxica en diversos modelos biológicos infecciosos. Como alternativa se plantea el diseño de nuevas moléculas análogas más sencillas a Boofilina. En el presente trabajo se realiza la síntesis, caracterización química y biológica de dichas moléculas. La síntesis de estos derivados es sencilla, con reacciones en menos de tres pasos. Una veintena de moléculas fueron probadas en tres diferentes especies de bacterias patógenas formadoras de biofilms: *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *P. mirabilis*. Cuatro de ellas mostraron inhibición de biofilm en las tres especies bacterianas, a su vez estas moléculas demuestran baja toxicidad inespecífica en el modelo toxicológico de *Caenorhabditis elegans*. De esta forma queda demostrada la potencialidad de estos compuestos como posibles nuevos fármacos antibacterianos de amplio espectro, evadiendo uno de los mecanismos de resistencia más importante, la formación de biofilms.

Palabras claves: Antibacterianos, Biofilms, Análogos de Boofilina.

Contenido

1. Introducción	5
1.1 Antecedentes	5
1.2 Biofilm	6
1.3 Bacterias patógenas	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	9
<i>Proteus mirabilis</i>	10
Formación de biofilm en las tres cepas bacterianas:	11
1.4 Búsqueda de nuevos antibacterianos	14
2. Propuesta de trabajo y objetivos	17
2.1 Propuesta de trabajo	17
2.2 Objetivo general	18
2.3 Objetivos específicos	18
3. Materiales y métodos	19
3.1 Química.....	19
3.1.1 Generalidades.....	19
3.2 Síntesis de compuestos	20
3.2.1 Síntesis de derivados chalconílicos (serie A)	20
3.2.2 Síntesis de análogos de Boofilina (serie B)	21
3.3 Biología	23
3.3.1 Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición de biofilm	23
3.3.2 Estudio de selectividad en un modelo toxicológico validado <i>Caenorhabditis elegans</i>	25
4. Resultados y discusión.....	26
4.1 Química.....	26
4.2 Biología	39
6. Conclusión.....	49
7. Bibliografía	50

1. Introducción

1.1 Antecedentes

El descubrimiento de los antibióticos se encuentra entre los mayores logros de la medicina (Lehar 2015); (Rogers 2012). Desde la penicilina que fue descubierta por Fleming en 1928, un gran número de antibióticos han sido identificados, desarrollados y utilizados clínicamente en terapias antimicrobianas (Donlan 2002). En la actualidad existen múltiples antibacterianos de uso clínico, como la ampicilina, gentamicina, streptomycin, entre otros. Gran parte de ellos son derivados de productos naturales complejos, que fueron modificados químicamente para obtener mejoras en sus aspectos farmacológicos. Existen antibióticos para una amplia gama de tipos bacterianos, tanto gram-positivos como gram-negativos, sin embargo sus mecanismos de acción no son tan diferentes (Holmes 2016).

Aunque el uso de estos agentes ha jugado un papel importante en el tratamiento de las infecciones, las bacterias continúan siendo una constante amenaza para la salud humana. Esto se debe a la aparición y el incremento en el número de aislados clínicos resistentes a fármacos, junto a la baja tasa de desarrollo de nuevos antibióticos. Algunas bacterias son frecuentemente resistentes por lo menos a uno de los antibióticos convencionales, dando lugar a un aumento significativo en la morbilidad y mortalidad (Fernández 2012).

Además existen microorganismos con la capacidad de resistir a múltiples antibióticos (bacterias hospitalarias). La capacidad de generación de resistencia es más rápida que la del descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos. A pesar de que existen muchos tratamientos para estos agentes, desafortunadamente la terapia antibiótica prolongada induce resistencia bacteriana, ya que algunas bacterias han desarrollado formas de burlar los efectos de los antibióticos (Figueroa 2010). Otros factores de inducción son el uso indebido (automedicación), prescripción inadecuada y un incorrecto seguimiento del tratamiento. Sumado al constante y fácil intercambio de información entre diferentes especies bacterianas, que conlleva a la incesante y urgente búsqueda de nuevos fármacos. La aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos amenaza con provocar la regresión a la era pre-antibiótica (Breidenstein 2011); (Eyal 2015); (Fernebrot 2011).

1.2 Biofilm

Uno de los mecanismos de resistencia comúnmente desarrollados por los patógenos es la formación de biofilms. Los biofilms son comunidades microbianas que se adhieren a diversas superficies, tanto bióticas como abióticas. (Park 2011). Las bacterias en los biofilms poseen tasas de crecimiento y expresión de genes que difieren de sus contrapartes planctónicas (Donlan 2002), que expresan factores de protección específicos, como por ejemplo bombas de eflujo a múltiples fármacos (Zimmer 2012). Las bacterias en los biofilms se encuentran incrustadas dentro de una matriz compuesta por sustancia extracelular polimérica (EPS). Ésta actúa como un “pegamento” que mantiene juntas a las células, facilitando la unión microbiana, actúa también como soporte estructural, ya que contribuyen al esqueleto general del biofilm (Samira 2015). Además dicha sustancia puede aumentar la resistencia a antibióticos hasta 1000 veces más (Park 2011).

Por lo tanto los patógenos que viven en los biofilms exhiben alta resistencia a los antibióticos y a las defensas inmunes del huésped, por este motivo son difíciles de erradicar (Zimmer and Macedo 2013). Los biofilms se pueden formar en una amplia variedad de superficies tales como tejidos vivos, dispositivos médicos, tuberías del sistema de agua industrial o potable, así como sistemas acuáticos naturales (Seo 2008).

La formación de biofilm (Figura 1) es generalmente iniciada por la unión de las células planctónicas a una superficie a través de fuerzas débiles de Van der Waals (1). Las colonias están ancladas irreversiblemente por el pili (2). Para facilitar la llegada y la unión de otras planctónicas, las células iniciales construyen varios sitios de adhesión a la matriz (3). Las células bacterianas son luego integradas dentro de una matriz compuesta por EPS, que se compone de ADN extracelular, proteínas, lípidos y polisacáridos. Posteriormente, el biofilm crecido proporciona una mayor resistencia a los antibióticos hacia las colonias bacterianas a través de la división celular y el reclutamiento (4). Finalmente, los biofilms se dispersan y las bacterias se mueven a otras superficies, tales como otros órganos y tejidos (5), donde el proceso de la formación de biofilm comienza nuevamente (Park 2011).

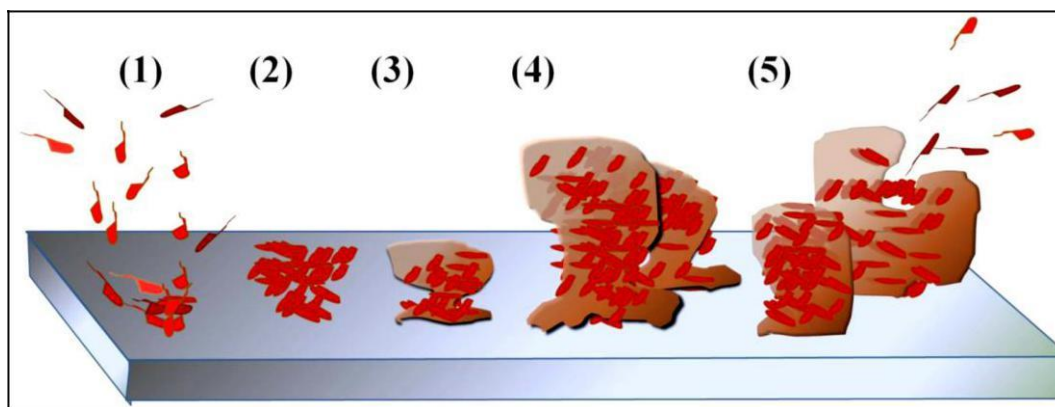


Figura 1. Visión general del desarrollo de biofilm bacteriano. (1) Adsorción reversible de bacterias; (2) fijación irreversible por el pili; (3) producción de sustancia extracelular polimérica (EPS), y biofilm en crecimiento; (4) maduración; (5) dispersión donde las bacterias hacia otros órganos o tejidos generando un nuevo biofilm, repitiendo las etapas 1 – 5 (Park 2011).

Los procesos infecciosos en los biofilms están relacionados con diversas vías tales como tracto urinario, infecciones de catéter, formación de placa dental e implante artificial de cadera, como muestra la (Figura 2).

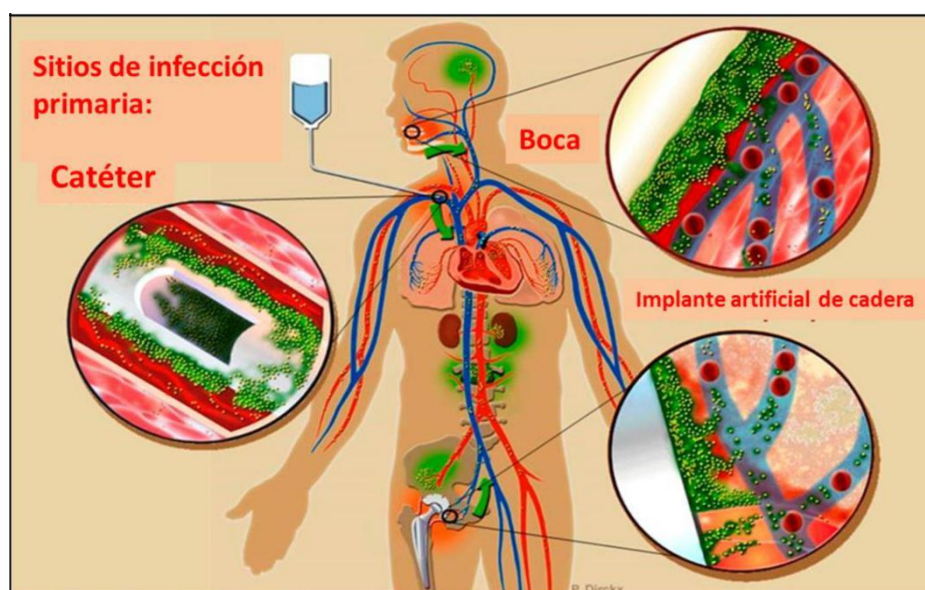


Figura 2. Sitios comunes de infección de biofilms, una vez que alcanza el torrente sanguíneo se pueden propagar a cualquier superficie del cuerpo humano (Dirckx 2003).

Un tipo de biofilm es la placa dental que se forma sobre los dientes y tejidos orales, el cual se compone de diferentes especies bacterianas y causan caries odontológicas. También provocan enfermedades periodontales, como son gingivitis y periodontitis crónicas (Park 2011).

La importancia del biofilm ha incrementado en el área de veterinaria debido a la gran cantidad de infecciones asociadas a biofilms por bacterias como *S. epidermidis*, patógeno relevante en mastitis bovina, como así *P. aureuginosa* en heridas equinas (Zimmer and Seixas 2013).

Estos motivos ponen en evidencia la importancia de hallar nuevos compuestos capaces de inhibir la formación de biofilms, los que afectan al menos el 65% de las infecciones bacterianas humanas (Zimmer and Macedo 2013).

Los biofilms son la principal causa de infecciones crónicas debido a la resistencia de estas bacterias a múltiples fármacos, dando como resultado un tratamiento fallido. Por ejemplo personas con úlceras diabéticas suelen experimentar infecciones causadas tanto por microorganismos gram-positivos como ***S. aureus*** y por gram-negativos como ***P. aeruginosa***, ***E. coli***, y ***Proteus spp.*** (Figura 3).

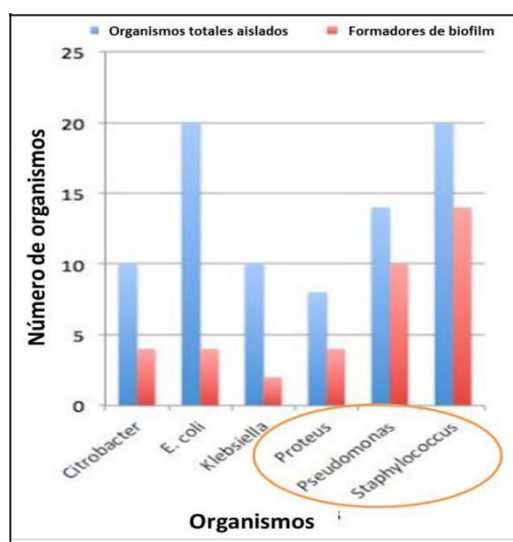


Figura 3. Comparación de organismos formadores de biofilm. Adaptado de (Banu 2015).

1.3 Bacterias patógenas

Los microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) son conocidos por ser patógenos oportunistas que causan algunas de las infecciones más frecuentes en pulmones, ojos, oídos y heridas (Zimmer and Macedo 2013); (Park 2011).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa se encuentra dentro de los bacilos gram-negativos no fermentadores de glucosa (Figura 4) y puede provocar infecciones graves como neumonía, inflamación del tracto urinario y bacteriemia. Estas que suelen ser difíciles de tratar debido a la alta resistencia intrínseca que presenta *P. aeruginosa* y a su extraordinaria capacidad de adquirir mecanismos de resistencia. Ceftazidima e imipenem representan la mejor opción contra infecciones por *Pseudomonas spp.*, ya sea como monoterapia o terapia combinada (Piersigilli 2009).

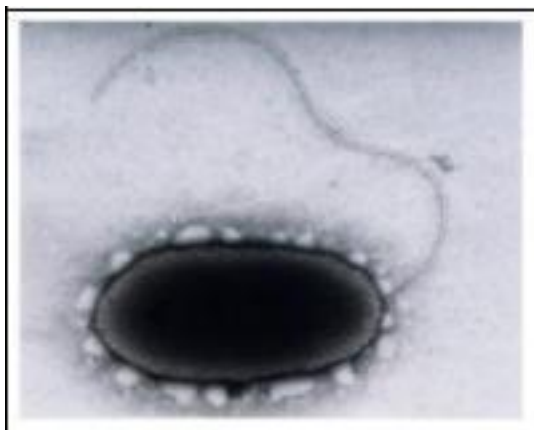


Figura 4. Micrografía electrónica de *P. aeruginosa* (Zimmer 2012).

El constante incremento de las tasas de resistencia de *P. aeruginosa* complejiza el hallazgo de nuevos fármacos y por esta razón es importante comprender sus mecanismos de resistencia (Breidenstein 2011). Uno de ellos ocurre cuando disminuye la permeabilidad de la membrana externa, junto a las porinas ineficientes de las células, limitando la penetración de los antibióticos (Piersigilli 2009).

P. aeruginosa es uno de los microorganismos más importantes y problemáticos en las bacteriemias causando del 10% al 20% de ellas. Se presenta con más frecuencia en pacientes inmunodeprimidos, con largos períodos de hospitalización y antecedentes de infecciones graves, así como también en pacientes con un uso previo de antibióticos de amplio espectro. En este último caso, es capaz de alcanzar una tasa de mortalidad del 30% al 40%, fundamentalmente en las primeras 24 a 48 horas de su inicio, el cual se agudiza con un inadecuado tratamiento antimicrobiano (Gómez 2002).

Hay que mencionar que además de las enfermedades pulmonares y de oído, *P. aeruginosa* causa infección en heridas donde las bacterias resistentes a múltiples fármacos a menudo desarrollan biofilms que pueden tener un efecto significativo sobre la inflamación, infección y cicatrización (Breidenstein 2011); (Gopal 2013); (Strateva 2011).

Staphylococcus aureus

S. aureus es un coco gram-positivo que infecta comúnmente a niños pequeños con fibrosis quística, provocando inflamación de las vías respiratorias (Figura 5). Su tratamiento es con antibióticos antiestafilocócicos que a menudo conduce a una mejoría clínica (Hoffman 2006). Actualmente muchas infecciones son causadas por cepas bacterianas resistentes de *S. aureus*, siendo uno de los patógenos más versátiles y potencialmente agresivos (Eyal 2015).

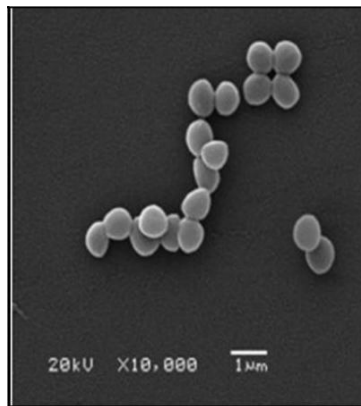


Figura 5. Morfología de *Staphylococcus aureus* bajo microscopía electrónica de barrido (SEM), adaptado de (Li 2011).

El incremento de las infecciones causadas por *S. aureus*, su rápido desarrollo y exhibición de resistencia a varios antibióticos, junto a su capacidad de transformar una infección aguda a una persistente, crónica y recurrente, hace que este microorganismo continúe recibiendo considerable atención (Archer 2011).

Staphylococcus spp. mediante la formación de biofilm pone en evidencia su importancia en la industria médica y alimenticia, por ejemplo mastitis bovina e implantación de dispositivos médicos, entre otros. La formación de biofilms también tiene consecuencias económicas relevantes, se ha estimado que el 65% de las infecciones intrahospitalarias en Estados Unidos asociadas a biofilms provoca pérdidas millonarias (Seo 2008).

Proteus mirabilis

P. mirabilis es una bacilo gram-negativo (Figura 6), y al igual que los anteriores es un patógeno oportunista, que causa diarrea en seres humanos y animales (Yu 2015).

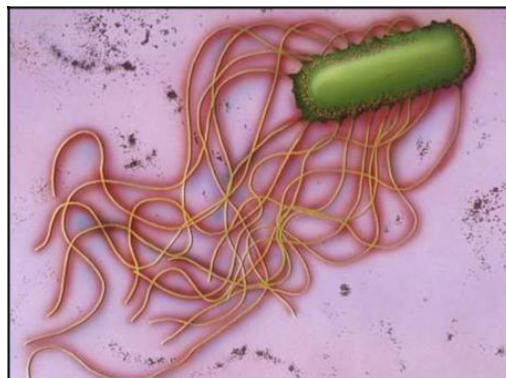


Figura 6. Micrografía electrónica coloreada de *P. mirabilis* (Henderson 2007).

P. mirabilis es el agente etiológico más común en infecciones del tracto urinario, sobre todo aquellas asociadas con la cateterización, que es un importante problema para la salud hospitalaria. Esto se relaciona con la capacidad de este microorganismo en formar biofilms sobre distintas áreas. Existen diferentes proteínas de superficie en células bacterianas que pueden ejercer un papel clave en el desarrollo de dichos biofilms (Scavone 2016).

P. mirabilis utiliza ureasa para catalizar la formación de cálculos renales y vesiculares que se incrustan en el cuerpo. Tal obstáculo puede conducir a pielonefritis aguda, fiebre y bacteriemia. Este patógeno igualmente es causa común de diarrea en lactantes, así como también se pueden encontrar en aislados de infección de la herida. (Yu 2015).

Estos tres patógenos están dotados de una amplia gama de propiedades de resistencia a fármacos y son capaces de formar biofilms, que actúan como barrera para los antibióticos, células del sistema inmune y factores del complemento (Donlan 2002).

Formación de biofilm en las tres cepas bacterianas:

P. aeruginosa

Este patógeno es capaz de adherirse a una variedad de células epiteliales, lo que es crucial en la colonización del pulmón en fibrosis quística. Al examinarse muestras de esputo de pacientes con dicha enfermedad, *P. aeruginosa* (Figura 7) predominó en los aislados, quedando encerrada en la matriz extracelular característica del biofilm (Deligianni 2010).

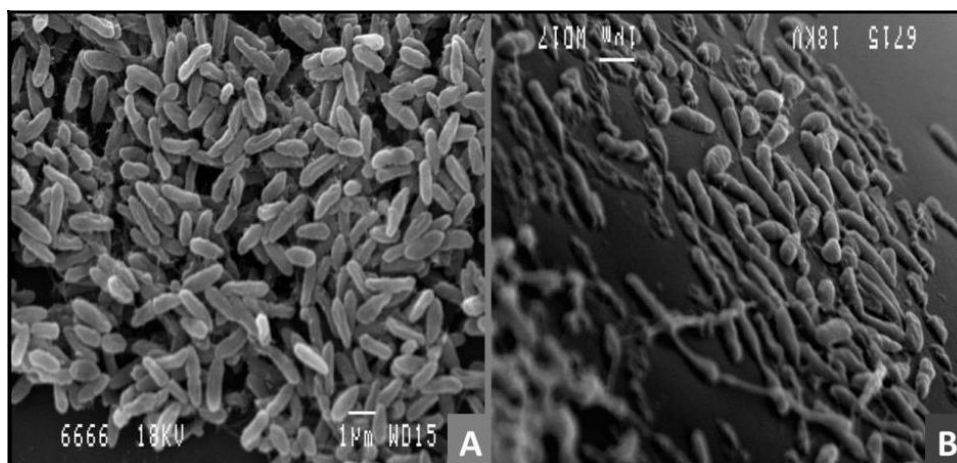


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido de aislados de *P. aeruginosa* que se adhieren a superficies de vidrio. Los aislados manifiestan una adhesión moderada a fuerte, formando grupos de células, como se visualiza en el cuadrante A. Mientras que otros aislados muestran una adhesión lábil, formando una monocapa, como se observa en el cuadrante B (Deligianni 2010).

S. aureus

Puede producir biofilms de varias capas embebido dentro de un glicocalix, que es un componente sólido conformado principalmente por ácidos teicoicos (80%) y proteínas heterogéneas tanto de estafilococos como del huésped (Figura 8), (Archer 2011).

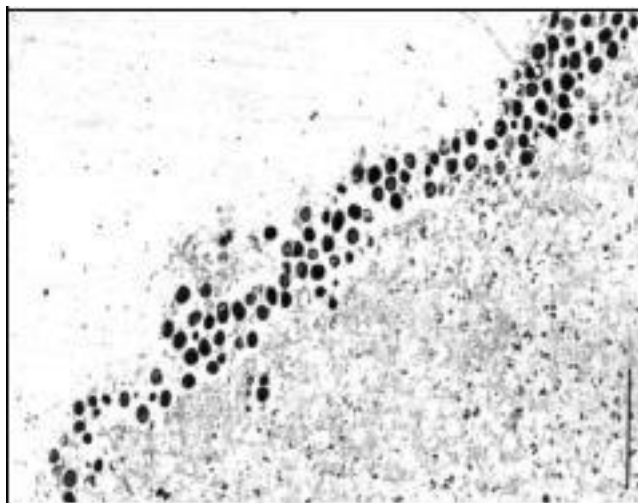


Figura 8. Micrografía electrónica de transmisión (TEM) de la sección transversal de un biofilm recuperado en un dispositivo médico implantado en el peritoneo de una rata. Donde se visualizan bacterias en la superficie del biofilm que se intercalan con el material huésped, así como también bacterias lisadas dentro del biofilm (Archer 2011).

La formación de biofilm y factores de virulencia son muy diversos y dependen de la capacidad de las adhesinas y el origen de los aislados. Dentro de los *Staphylococcus*: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* exhiben mayor potencial patógeno (Seo 2008).

P. mirabilis

Demuestra una formación de biofilms en diversos ambientes tanto en superficies biológicas como en superficies inertes incluyendo polietileno, vidrio, látex y silicona. Estos organismos se han encontrado en biofilm monomicrobiano y también polimicrobiano (Jacobsen 2011); (Schlapp, and Scavone 2011); (Trautner 2004).

La formación de biofilms es un proceso complejo que depende de una amplia gama de genes. Sin embargo diferentes proteínas de superficie de células bacterianas pueden ejercer un papel clave en el desarrollo del biofilm. Particularmente *P. mirabilis* codifica 17 operones putativos fimbriales, la cantidad más alta que se encuentra en cualquiera de las especies bacterianas secuenciadas hasta el momento (Scavone 2016).

Los biofilms desarrollados durante infecciones del tracto urinario asociadas a *P. mirabilis*, representan hasta el 30% de los cálculos en las vías urinarias. El pH de la orina puede ser esencial para la fijación de bacterias sobre las superficies del polímero, junto a cristales de fosfato de calcio y magnesio, que se forman en la orina alcalina, e inician el desarrollo del biofilm cristalino (Figura 9). Por lo tanto, impedir el aumento del pH urinario y la posterior cristalización podría ser un paso crítico en la prevención de la formación de biofilm de los pacientes infectados con *P. mirabilis* (Jacobsend 2011).

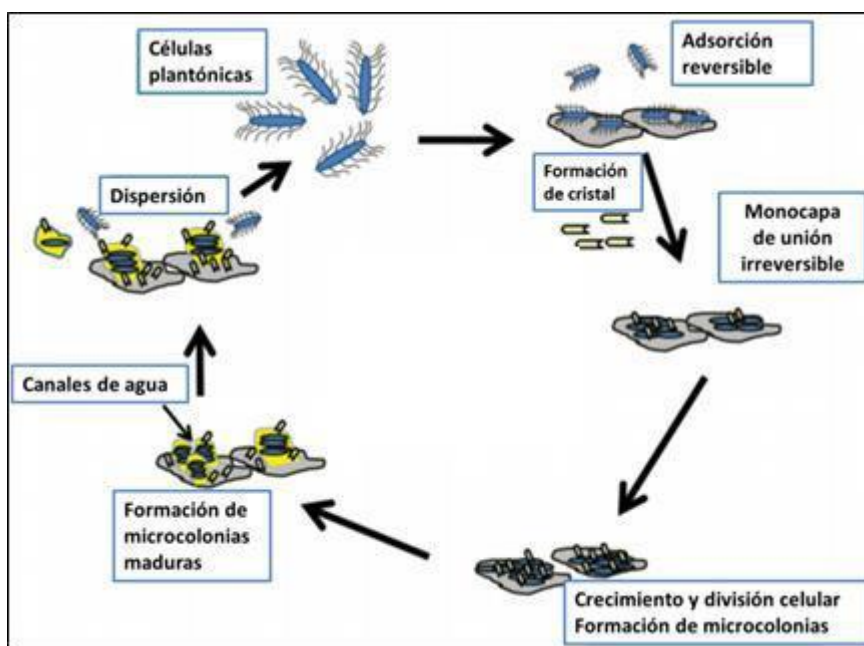


Figura 9. Mecanismo de formación de biofilm durante infecciones del tracto urinario asociadas a *P. mirabilis*. Para establecer una infección dicho microorganismo debe permanecer unido de manera irreversible al polímero y a los cristales, formando una monocapa. La cual luego dará lugar a la formación de microcolonias, que posteriormente van a convertirse en microcolonias maduras. Para lograr perpetuar la infección, estos organismos deben dispersarse, mediante canales de agua, desde el foco hasta sitios adyacentes del tracto urinario. Adaptado de (Jacobsend 2011).

Existen múltiples variables que explican la resistencia presentada por las bacterias del biofilm a los antibióticos (Figura 10). Una de ellas es que la matriz de EPS puede actuar como un adsorbente o reactivo, reduciendo así la cantidad de agente antimicrobiano que está disponible para interactuar con las células del biofilm. Asimismo la estructura del biofilm podría reducir físicamente la penetración del antimicrobiano. Otra variable es la reducción de las tasas metabólicas y de crecimiento, especialmente de células presentes en la profundidad del biofilm, haciéndolas menos susceptibles a los agentes antimicrobianos. Mientras que otra variante son los microambientes como zonas de oxígeno reducido, que conducen a una disminución en el crecimiento bacteriano (Zimmer 2012); (Davies, 2003).

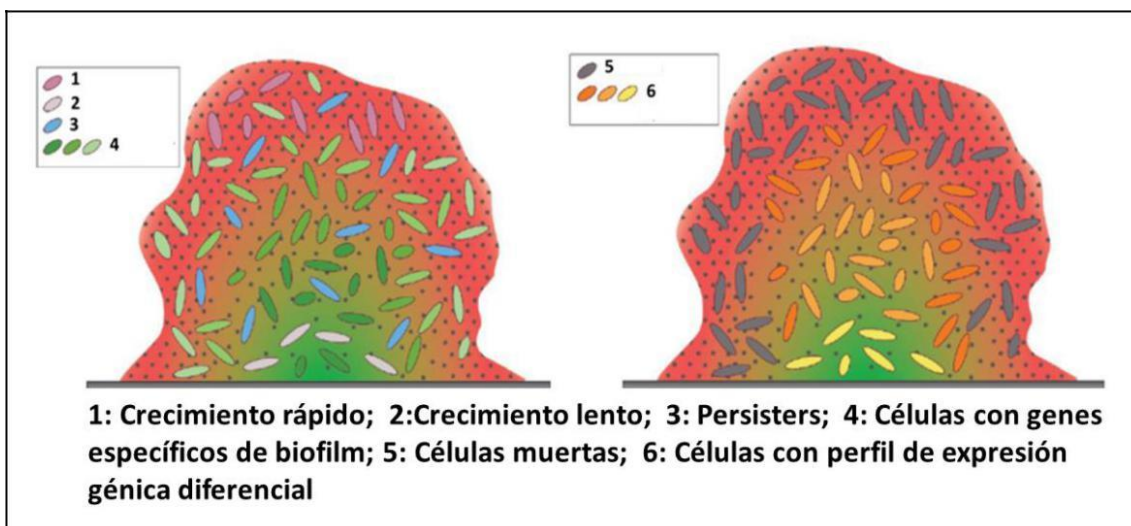


Figura 10. Formas de resistencia de biofilm a los fármacos. Dentro de los mecanismos se encuentran en primer lugar una difusión limitada de los antibióticos a través de la matriz que protege a las bacterias en la parte interna del biofilm pero expone los microorganismos presentes en el exterior, que pueden ser atacados rápidamente por el antibiótico, lo que conllevaría a la muerte celular (5: elipses grises). En segundo lugar, concentraciones de nutrientes y oxígeno que disminuyen en las partes más profundas del biofilm, simbolizado por el gradiente de color rojo (altas concentraciones de nutrientes y capacidad aeróbica) a color verde (bajas concentraciones de sustratos y condiciones anaeróbicas). Las bacterias de crecimiento lento (2: elipses púrpura) facilitan su supervivencia en presencia de antibióticos, que atacan rápidamente a los organismos con altas tasas de proliferación (1: elipses violetas). Además, se encuentran en dicho biofilm células persisters, las que presentan un bajo a nulo crecimiento (3: elipses azules). En tercer lugar, la expresión diferencial de genes específicos de biofilm en respuesta a señales ambientales (4: elipses verdes) puede influir en la resistencia a fármacos. Por último, un gradiente antibiótico sobre las células (6: elipses naranja y amarillo) puede provocar una expresión génica diferencial inducida por factores de antibióticos (Anderson 2008).

1.4 Búsqueda de nuevos antibacterianos

Por todo lo antes descrito la resistencia a antibióticos es considerada una grave amenaza para la salud humana. Por ello constantemente se está buscando alternativas para el tratamiento de estas infecciones persistentes.

Se identificó una molécula esteroidea aislada de la cáscara del huevo de la garrapata del ganado (*Rhipicephalus microplus*), la cual pasa todos sus estadios de vida en un animal (Figura 11). Los huevos hacen eclosión en el medio ambiente y las larvas se arrastran por el pasto para encontrar un huésped, las que no pueden encontrarlo finalmente mueren de inanición. Las garrapatas recién nacidas (larvas) se encuentran adheridas a los muslos, patas traseras, abdomen y pecho del animal. Después de alimentarse las larvas sufren dos mudas y se convierten en ninfas y posteriormente en garrapatas adultas. Una garrapata hembra adulta que se ha alimentado y apareado, se

separa de su huésped y deposita una gran cantidad de huevos sobre el suelo. La garrapata hembra muere después de la oviposición. Las garrapatas en el subgénero *Boophilus* pueden completar su ciclo de vida en un plazo de 3 a 4 semanas, esta característica logra causar una gran carga de garrapatas en los animales vacunos (Zimmer 2012).

Boofilina (N-(3-sulfooxy-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoileucina) fue identificada en el huevo de *R. microplus*. Este compuesto es un sulfato de colesterol unido a un residuo de L-isoileucina a través de un enlace amida (Figura 11 A) (Potterat 1997). Además es responsable de defender al huevo del ataque microbiano cuando éste se encuentra en el suelo y a su vez de inhibir la formación de biofilm en *P. aeruginosa*, sin afectar la viabilidad de la bacteria (Zimmer Macedo and Giordani 2013).

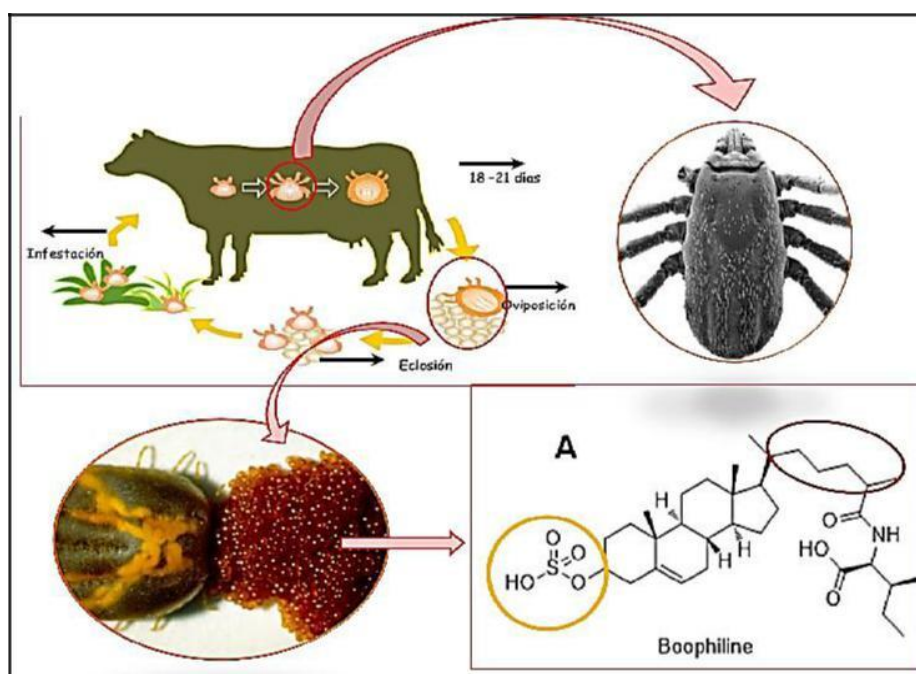


Figura 11. Esquema del ciclo de vida de *R. microplus*, la garrapata hembra adulta se separa de su huésped y deposita sus huevos sobre el suelo. Los cuales quedan expuestos al ataque microbiano, una de las moléculas encargadas de su protección es Boofilina. Como se indica en el cuadrante A, se plantea sustituir el motivo pentanoico (círculo rojo) por un linker tiazólico, y el grupo sulfato (círculo amarillo) por un grupo hidroxilo, sin modificar el core esteroideo.

Otras moléculas esteroideas como el Prototipo II, (Figura 12) fueron descritas con actividad antibacteriana (Figuroa 2010) y con actividad biológica en diversos modelos infecciosos, actuando como antifúngica, antiparasitaria y en algunos tipos de cáncer (Lone 2013); (Banday 2011); (Potterat 1997). Estos compuestos resultan ser poco tóxicos para las células de mamíferos, menos vulnerables a la resistencia a múltiples fármacos y altamente biodisponibles por su capacidad de penetración a la membrana celular (Mohareb 2012), (Mohareb and Omran 2012).

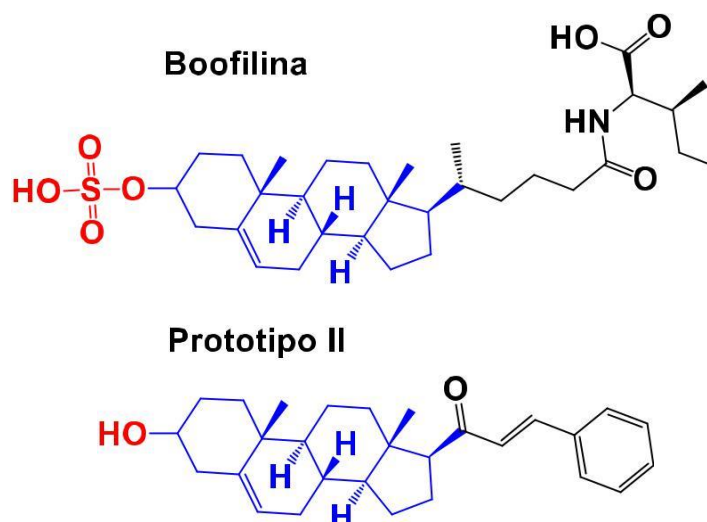


Figura 12. Estructura de **Boofilina** (prototipo I) y del esteroide con actividad antimicrobiana **Prototipo II**, que puede ser sustituido con distintos R a nivel del grupo fenilo. Adaptado de (Potterat 1997); (Banday 2011).

Investigaciones con Boofilina revelan su poder de inhibición en la formación de biofilm en *P. aeruginosa* (Figura 13) sin afectar la viabilidad celular. Lo que sugiere que un ataque a una vía específica en la formación de biofilm, en lugar de matar a la bacteria, esta actividad no se debe a un efecto físico (Zimmer Macedo and Giordani 2013).

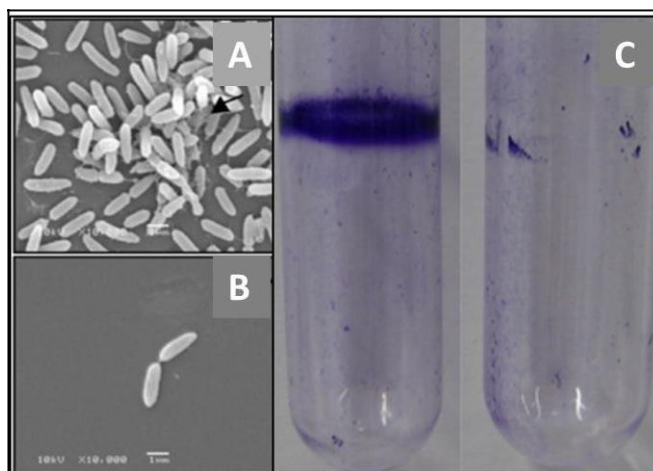


Figura 13. Cepas de *P. aeruginosa* no tratadas con Boofilina muestran una adhesión fuerte, formando una matriz de biofilm (flecha negra) (cuadrante A). Mientras que cepas tratadas con Boofilina (4.0 mM) mostraron una defectuosa adhesión (cuadrante B). Del mismo modo se observa un efecto similar (cuadrante C) entre el control (donde se visualiza el biofilm como una elipse violeta) y el extracto de huevo que presenta una elevada inhibición. Adaptado de (Zimmer Macedo and Giordani 2013); (Zimmer and Macedo 2013).

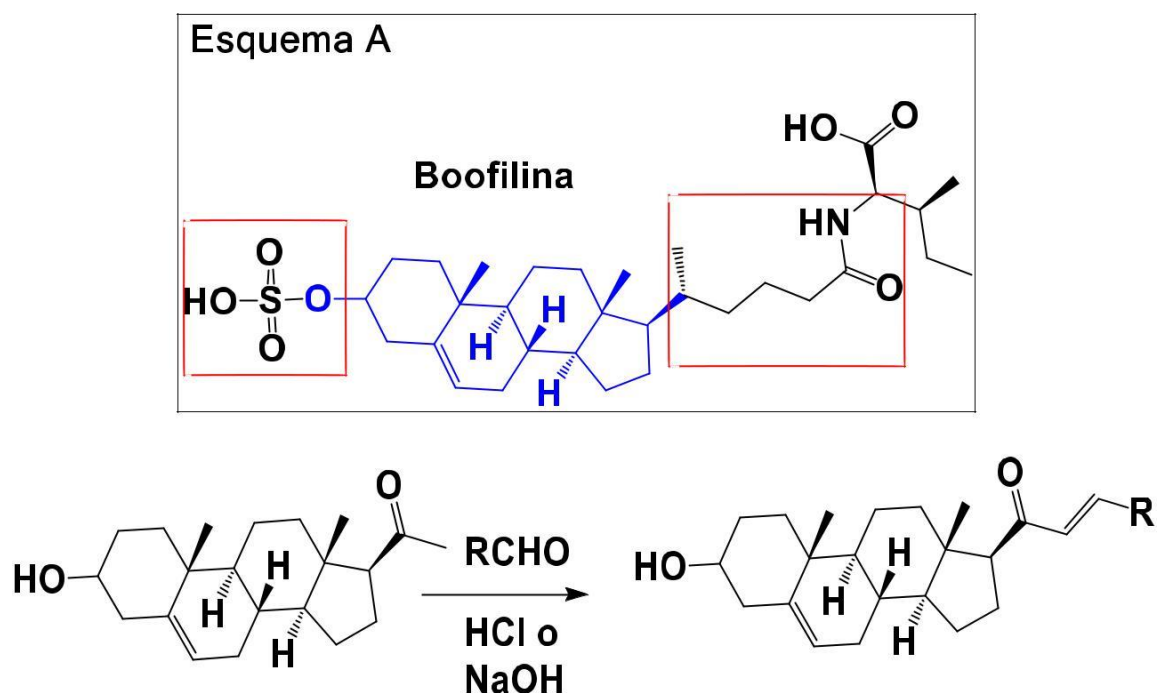
Finalmente queda demostrada de esta manera la relevancia de las moléculas esteroideas, con la perspectiva de desarrollar posibles nuevos fármacos antibacterianos de amplio espectro y con capacidad de evasión de uno de los mecanismos más importantes de resistencia.

2. Propuesta de trabajo y objetivos

2.1 Propuesta de trabajo

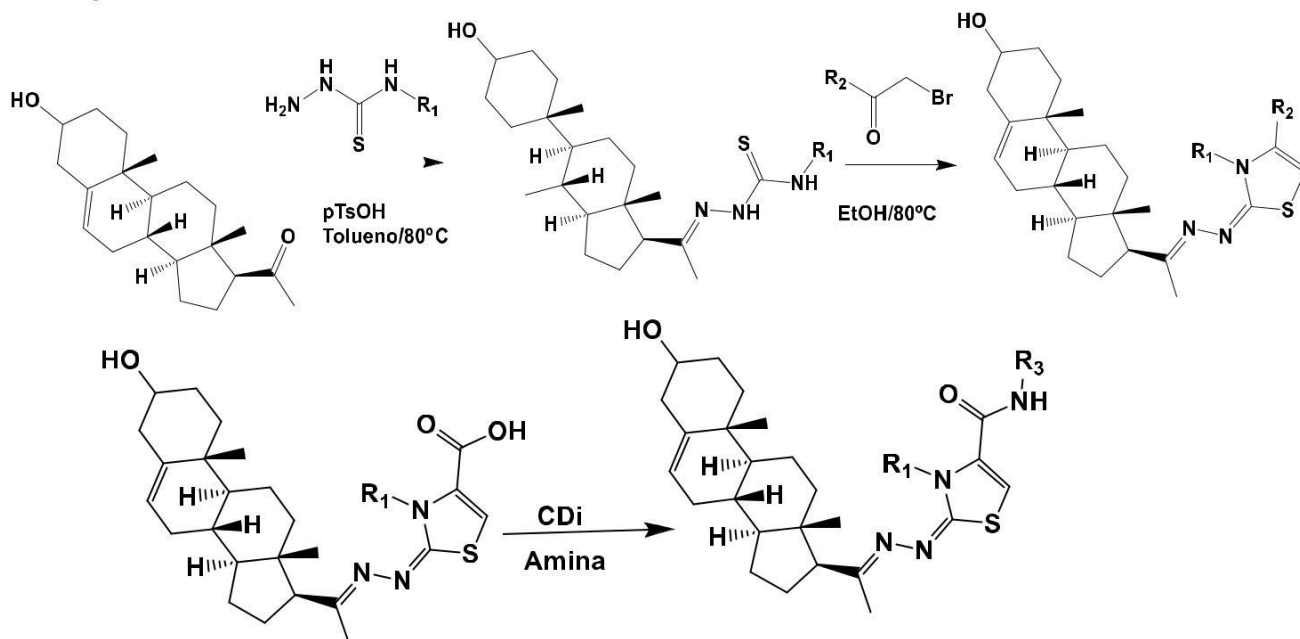
Boofilina (Esquema A) presenta actividad inhibitoria en la formación de biofilms y no afecta el crecimiento bacteriano, además su síntesis es muy compleja y costosa. Otros derivados esteroideos como el **Prototipo II** (Esquema A) presentan actividad antimicrobiana reconocida, son de síntesis sencilla y amigable con el medio ambiente. Combinando estas dos ideas en el presente trabajo se diseñan moléculas análogas a Boofilina más simples, como potenciales antimicrobianos, con capacidad de inhibición en la formación de biofilms.

Moléculas esteroideas con motivo chalcona fueron previamente descritas con actividad antimicrobiana (Prototipo II). En la estrategia de diseño A (Esquema A) se plantea la síntesis de derivados de pregnenolona, esteroide base de la Boofilina con motivos chalcona, utilizando diferentes aldehídos aromáticos.



Esquema A. Estrategia de diseño de los nuevos análogos de Boofilina con potencial actividad antibacteriana. Encuadrado en rojo los principales puntos de cambio, sin modificar la estereoisometría del core esteroideo (azul).

Esquema B



Esquema B. En la estrategia de diseño B se plantea sustituir el motivo pentanoico por un linker tiazólico, generando dos tipos de derivados: uno con aromáticos y carbonilos en R_2 y otro con amidas análogas a Boofilina en R_3 utilizando aminas y aminoácidos.

2.2 Objetivo general

Síntesis y caracterización química y biológica de nuevos derivados de Boofilina con potencial actividad antibiofilm.

2.3 Objetivos específicos

1. Sintetizar al menos una decena de nuevos compuestos de cada serie (Esquema A y B).
2. Realizar la elucidación estructural de los compuestos sintetizados en el objetivo 1.
3. Determinar la actividad antibiofilm *in vitro* de las nuevas moléculas sintetizadas en el objetivo 1.
4. Determinar el índice de selectividad de las moléculas activas.

3. Materiales y métodos

3.1 Química

3.1.1 Generalidades

En el presente trabajo experimental los disolventes empleados son previamente destilados. El etanol absoluto empleado es de origen comercial (DORWIL[®]), al igual que otros de los reactivos empleados como el benzaldehído (BAKER ANALIZED[®]) y pregnenolona (SIGMA-ALDRICH[®]).

Se sigue el avance de las reacciones y pureza de productos mediante cromatografía en capa fina (TLC), estas son placas cubiertas con silica gel. Las fases móviles que se emplean son mezclas en distintas proporciones, de hexano y acetato de etilo.

El revelado de las TLC fue mediante diferentes técnicas:

- Exposición a la luz ultravioleta (254 nm)
- Exposición a vapores de yodo (I₂)
- Rociado con reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidracina etanolito) y posterior quemado.

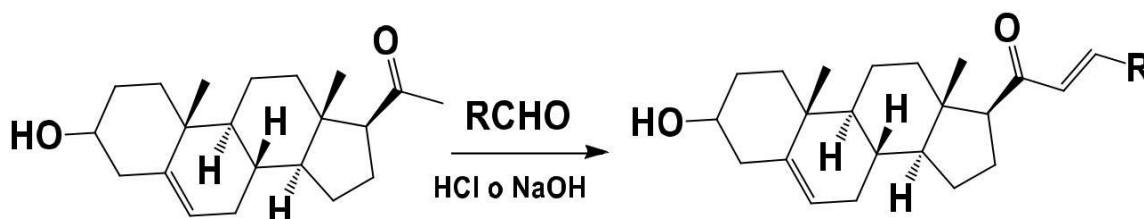
Para proceder al análisis de las propiedades fisicoquímicas del producto, una vez finalizada su síntesis, es importante que éste se encuentre seco, para ello se coloca en un desecador, recipiente con tapa de vidrio esmerilado (cierre hermético) que permite la eliminación excesos de disolventes empleados en la síntesis.

La elucidación estructural de las moléculas sintetizadas se lleva a cabo mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN). Ésta permite estudiar núcleos atómicos, siendo los más utilizados ¹H, ¹³C, estos núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen un espín distinto de 0, lo que hace que resuenen a una frecuencia dada en presencia de un campo magnético. Para los casos planteados se propuso en primera instancia la realización de los experimentos de una dimensión ¹H RMN, ¹³C RMN y luego de dos dimensiones como lo son *Correlation Spectroscopy* (COSY), *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (HSQC) y *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation* (HMBC). Los espectros se realizan en un equipo BRUKER (400 MHz), empleando los disolventes adecuados con cada producto y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. **1D ¹H RMN:** contiene información acerca del desplazamiento químico (δ) y el acoplamiento escalar (J) de los núcleos. Además el área de la señal se corresponde con el número de protones. **1D ¹³C RMN:** ofrece caracterización relacionada directamente al esqueleto carbonado. No es posible emplear ¹²C, debido a que carece de espín

nuclear, por lo cual se utiliza ^{13}C , a pesar de su baja abundancia natural. Por lo general cada señal observada en el espectro corresponde a único átomo de carbono, debido a la baja probabilidad de solapamiento. **2D ^1H - ^1H , COSY**: identifica núcleos que comparten un acople escalar (J), la presencia de picos fuera de la diagonal en el espectro correlaciona directamente los protones acoplados. **2D ^1H - ^{13}C , HSQC**: permite correlacionar los núcleos de ^1H y ^{13}C unidos directamente a través de un enlace. **2D ^1H ^{13}C , HMBC**: identifica acoples a larga distancia entre protones y carbonos, usualmente a 2 o 3 enlaces de por medio, ya que los enlaces directos este experimento no los registra. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm, las multiplicidades según: singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), etc. y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

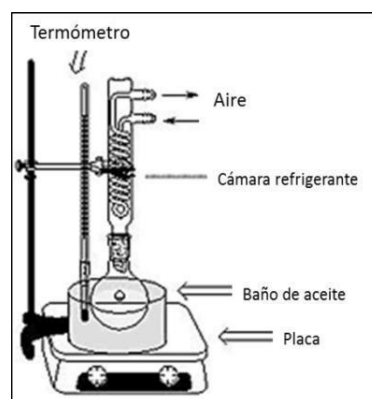
3.2 Síntesis de compuestos

3.2.1 Síntesis de derivados chalconílicos (serie A)



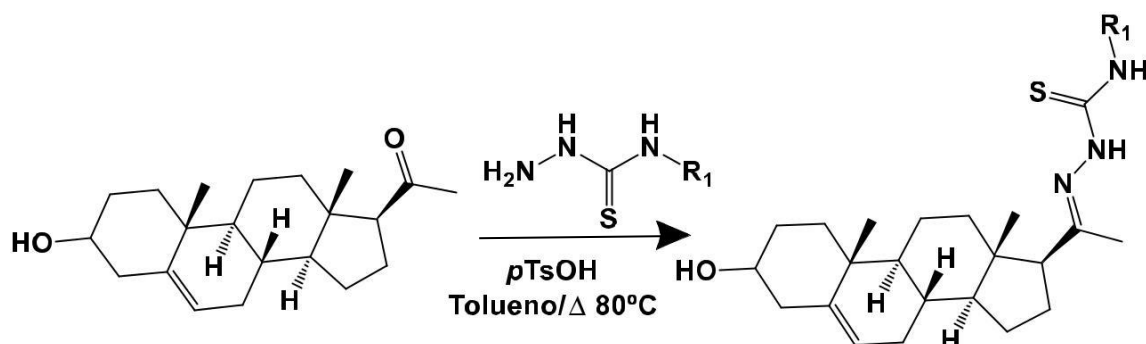
En un balón de 50 mL se colocan a reaccionar $9,48 \times 10^{-4}$ moles del aldehído correspondiente en 5 mL de etanol. Además se agregan 4 eq de hidróxido de sodio NaOH (o HCL en el caso del compuesto 31) disueltos en 2 mL de agua, todo bajo agitación vigorosa. Finalmente se agrega 1 eq de pregnenolona.

La reacción transcurre a $40\text{ }^\circ\text{C}$ entre 24-48 horas en un baño de aceite con cámara refrigerante de aire, hasta observar la desaparición de los reactivos de partida. El seguimiento de la reacción se realiza con TLC de silica en una mezcla de hexano: acetato de etilo (7:3, v:v) como fase móvil. Se lava y filtra a vacío el sólido precipitado, se recristaliza en etanol.



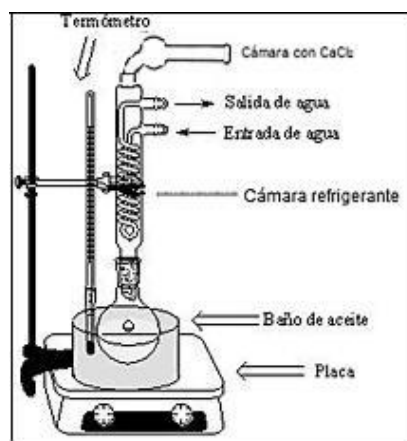
3.2.2 Síntesis de análogos de Boofilina (serie B)

3.2.2.1 Síntesis de tiosemicarbazonas

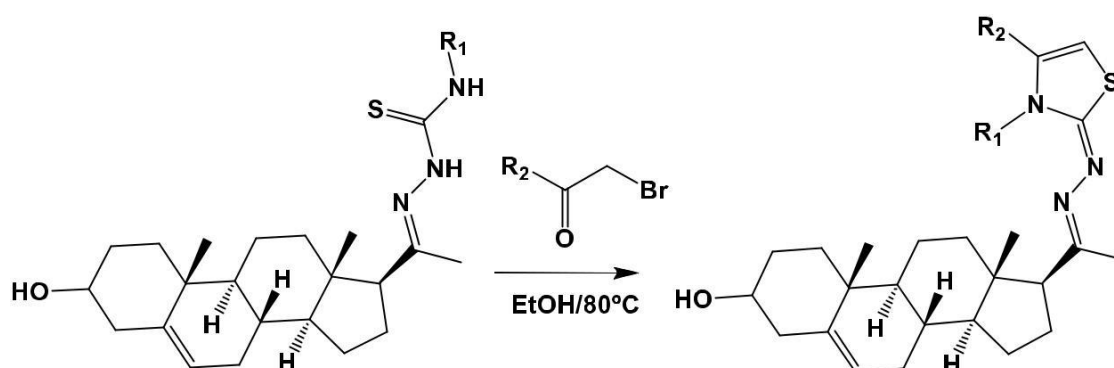


En un balón de 50 mL se colocan a reaccionar $9,48 \times 10^{-4}$ moles de pregnenolona con 1 eq de la tiosemibarbazida correspondiente, en 10 mL de tolueno como disolvente y cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico (*p*TsOH).

La reacción se lleva a cabo en un ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl_2 (cloruro de calcio); y transcurre a una temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante unas 12 horas. El seguimiento de la reacción se realiza por TLC en silica con una mezcla de hexano: acetato de etilo (7:3, v:v) como fase móvil. Se lava con tolueno frío y filtra a vacío el sólido precipitado. Finalmente se realiza una recrystalización en etanol.



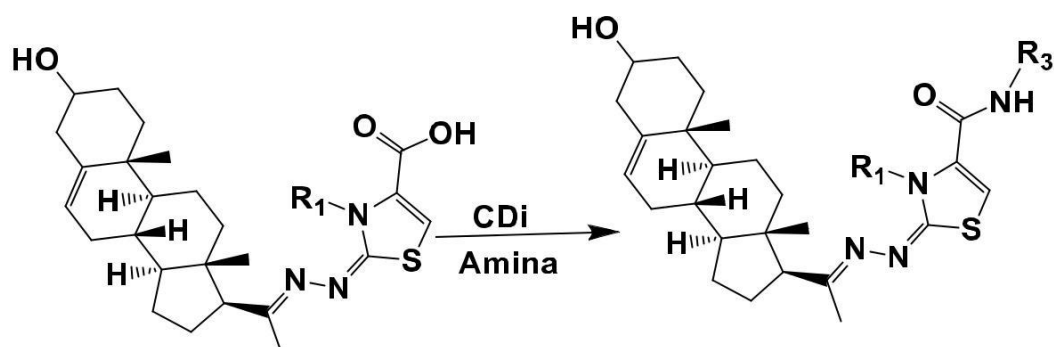
3.2.2.2 Síntesis de tiazol



En un balón de 50 mL se colocan a reaccionar $9,48 \times 10^{-4}$ moles de tiosemicarbazona correspondiente (producto de síntesis del paso anterior) con 1 eq de bromo acetofenona correspondiente, en 20 mL de etanol absoluto

como disolvente. Se trabaja en ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl_2 . Se calienta a reflujo con una temperatura de $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 8 horas (montaje experimental ídem al anterior). El seguimiento de la reacción se realiza por TLC en sílica con una mezcla de hexano: acetato de etilo (7:3, v:v) como fase móvil. Se lava con etanol frío y filtra a vacío el sólido precipitado, se realiza una recristalización en etanol.

3.2.2.3 Síntesis de amida



En un balón de 50 mL se colocan a reaccionar $1,00 \times 10^{-3}$ moles del ácido (producto anterior) con 2 eq de 1,1-carbonildiimidazol (CDi) a temperatura ambiente en diclorometano (DCM) seco por 3 horas. Luego de verificar la desaparición del ácido, se agrega 2 eq de la amina correspondiente. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 48 horas con agitación. El seguimiento de la misma se realiza por TLC en sílica con una mezcla de diclorometano: metanol (95:5, v:v) como fase móvil.

Una vez finalizada la reacción, el crudo se extrae con agua básica y diclorometano, se evapora a vacío la fase orgánica, luego se siembra en una columna en sílica gel (Figura 14) con un aumento gradual de metanol de 0 a 5%, el % restante es DCM. Se toman sucesivas fracciones, se las revela al ultravioleta (UV), se seleccionan las de interés, se las vuelve a evaporar a vacío.



Figura 14. Columna en sílica gel de la amida.

3.3 Biología

3.3.1 Ensayo *in vitro* de inhibición de biofilm

Para evaluar la capacidad de adhesión a superficies abióticas se emplea una técnica semicuantitativa que permite estimar indirectamente el biofilm adherido, mediante tinción con cristal violeta (CV), (Pratt & Kolter 1998). Este método permite entonces estimar de manera indirecta el biofilm adherido a los pocillos de poliestireno, dado que la medida de la absorbancia óptica a 590 nm es directamente proporcional al tamaño del biofilm (Anderson & O'Toole 2008). En el presente trabajo se emplean placas de microtitulación de poliestireno (Figura 15) para determinar la actividad antibiofilm *in vitro* de las nuevas moléculas sintetizadas, sobre tres cepas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Proteus mirabilis* (2921) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

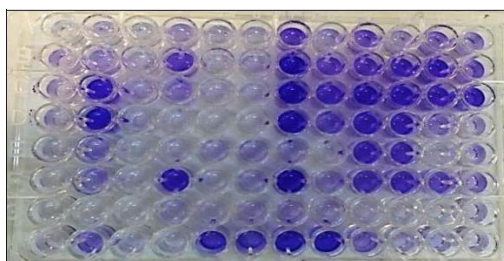


Figura 15. Placa de 96 pocillos aplicando cuantificación por cristal violeta del biofilm, con controles negativo y positivo, así como antibióticos, pregnenlonona y moléculas (ver Tabla 1).

Tinción cristal violeta (CV)

Las cepas *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *S. aureus* se siembran en placas de microtitulación de 96 pocillos, con un volumen final de (200µl/pocillo) de medio Luria Bertani (LB) y se incuban 24 horas a 37 °C, sin agitación. Luego transcurridas las 24 horas, se mide la absorbancia ó densidad óptica (DO) a 600 nm, para confirmar que las tres cepas estén crecidas con misma DO. Posteriormente se transfirieron (20 µl/pocillo) de cada cepa en las siguientes condiciones (Tabla 1).

Tabla 1. Cuadro que resume los controles tanto negativo (A), como positivo (B), así como antibióticos (C), pregnenlonona (D) y moléculas a ensayar (E).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	P. mirabilis			S. aureus			P. aeruginosa		
A	BLANCO			BLANCO			BLANCO		
B	BIOFILM			BIOFILM			BIOFILM		
C	ANTIBIOTICO			ANTIBIOTICO			ANTIBIOTICO		
D	PREGNENOLONA			PREGNENOLONA			PREGNENOLONA		
E	MOLECULAS			MOLECULAS			MOLECULAS		

El ensayo se lleva cabo por triplicado, se realizan blancos de absorbancia (como control negativo o **BLANCO**) donde se coloca sólo medio LB; (como control positivo o **BIOFILM**), donde se coloca en cada pocillo medio de cultivo junto con cada cepa bacteriana correspondiente, por un lado *P. mirabilis*, por otro *S.aureus* y finalmente *P. aeruginosa*. Además se emplean controles con antibióticos específicos para cada patógeno, ampicilina (100 µg/ ml), gentamicina (10 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml), respectivamente, siendo las cepas sensibles a cada **ANTIBIÓTICO**. Por otro lado se evalúa el efecto de la **PREGNENOLONA** por sí sola, para poder visualizar el impacto del core esteroide sobre la formación de biofilm, donde se coloca entonces medio de cultivo, pregnenolona y bacterias.

Mientras que para determinar la capacidad de las **MOLÉCULAS** sintetizadas en disminuir la formación de biofilm, se transfieren 20 µl de cada molécula disueltas previamente en 100% de Dimetilsulfóxido (DMSO), aunque que en los pocillos se trabaja en 10% de DMSO, junto con el medio LB y bacterias.

A continuación la placa de 96 pocillos con los respectivos blancos, controles, y moléculas a ensayar, se incuba durante 48 horas de forma estática a 37 °C. Una vez transcurridas las 48 horas de incubación, se remueve el medio y se realizan 3 lavados con PBS (buffer fosfato salino) 1X, con el fin de eliminar las células planctónicas. Las células adheridas se tiñen con solución de CV al 1% durante 15 minutos. Luego se remueve el exceso de colorante mediante lavados con PBS. Finalmente, el CV asociado a las células adheridas se solubiliza con etanol (95%) y se determina la DO a 590nm empleando un espectrofotómetro de placas (Varioskan, ThermoScientific).

Finalmente para llevar a cabo los cálculos de formación de biofilm (% de BF), se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ formación BF} = \frac{\text{valor promedio de } \mathbf{Molécula Y}}{\text{valor promedio de BF}} \times 100$$

Se utilizan valores promedio debido a que el experimento se realizó por triplicado para cada tipo de **Molécula Y**, en los tres patógenos, donde BF es el porcentaje de crecimiento del biofilm en las bacterias sin tratamiento.

3.3.2 Estudio de selectividad en un modelo toxicológico validado *Caenorhabditis elegans*

Los gusanos *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) son crecidos en medio Nematode Growth Medium (NGM) agar con un césped de la cepa *E. coli* OP50 (auxótrofa a uracilo, esta cepa es usada para prevenir el sobrecrecimiento de las bacterias dado que el medio tiene una cantidad limitada de uracilo) como fuente de alimento, incubadas a 20°C. El medio NGM contiene: 3 g/L NaCl, 2.5 g/L peptona, 17 g/L agar, 5 µg/L colesterol, MgSO₄ 1mM, CaCl₂ y buffer fosfato 0.025 M.

Los gusanos en el estadio L4/pre-adultos se recuperan de las placas con buffer K (32mM KCl; 51mM NaCl) con 0.015% de seroalbumina bovina. Para el ensayo se utilizan 60 gusanos por pocillo en 100 µL de volumen final. El mismo está formado por 60 µL de solución buffer conteniendo a los gusanos y 40 µL de solución del compuesto a probar (200 µM en 0.5% de DMSO/ buffer).

El sistema WMicroTracker permite trabajar con placas multipocillos para las mediciones de movimiento, en este caso fueron utilizadas placas de 96 pocillos. Previo a cada ensayo realizado se lleva a cabo una habituación optimizada y medición de actividad (movimiento) de los gusanos por 30 minutos (min), previa al añadido del compuesto. Luego de agregadas las moléculas se dejan habituar los gusanos en la placa 15 min, antes de registrar la actividad mediante el sistema LED infrarrojo durante 90 min y posteriormente por 16 horas más (17,5 horas en total). Se registra una señal que es directamente proporcional al movimiento del gusano, esto se normaliza a porcentaje según el control gusano, luego se calcula el % de inhibición del movimiento en función de la dosis. (Simonetta & Golombek, 2007)

4. Resultados y discusión

4.1 Química

Se sintetizaron y caracterizaron estructuralmente 20 nuevos compuestos. Los rendimientos fueron de buenos a excelentes. La síntesis en la mayoría de los casos es sencilla, económica y amigable con el medio ambiente.

SERIE A

Síntesis de derivados de pregnenolona, esteroide base de **Boofilina**, con motivos chalcona utilizando diferentes aldehídos aromáticos.

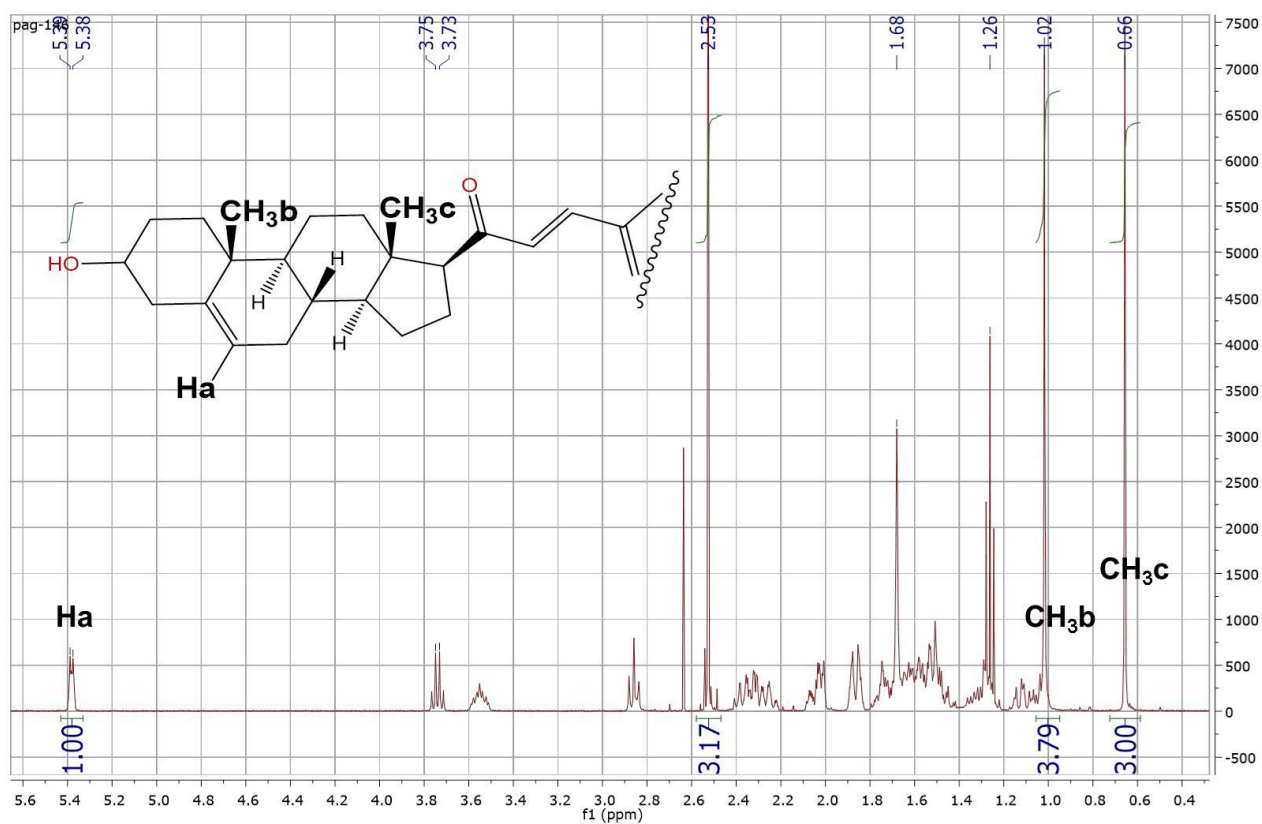
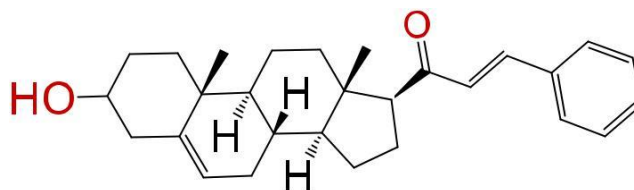


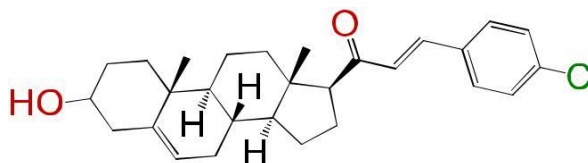
Figura 16. Espectro de ¹H RMN de uno de los compuestos sintetizados, donde se indica las tres señales características fácilmente discernibles del core esteroide: el Ha del doble enlace y los dos metilos CH₃b y CH₃c. El resto de la señales del core están inmersas en multipletes complejos entre 3.0 y 1.0 ppm.

Prototipo II



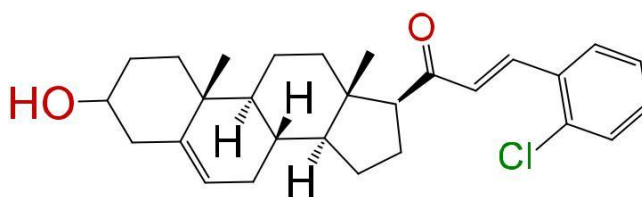
(*E*)-1-((8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il)-3-fenilprop-2-en-1-ona. Sólido blanco (86%). PF: 128–131 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.61–1.90 (m, 6H), 2.20–2.38 (m, 3H), 2.82 (t, $J = 8.80$, 1H); 3.51 (m, 1H); 6.78 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.39 (m, 3H), 7.55 (m, 3H); ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 42, 45, 49, 49, 49, 49, 50, 57, 62, 71, 121, 127, 128, 129, 130, 135, 141, 142, 201. $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{O}_2$. ESI-MS (m/z): 404.27 (100.0%), 405.27 (30.3%), 406.28 (5.0%). Análisis elemental: C, 83.12; H, 8.97; O, 7.91.

Molécula 120



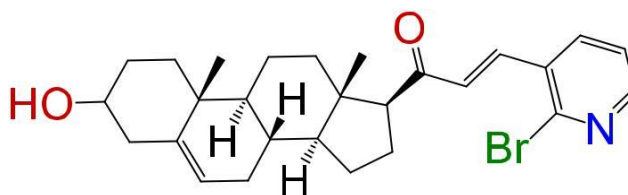
(*E*)-3-(4-clorofenil)-1-((8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il)prop-2-en-1-ona. Sólido blanco (85%). PF: 159-161 °C; ^1H RMN (400 MHz CDCl_3) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, $J = 8.5$ Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz), 6.73 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz), 7.35 y 7.47 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, y d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.49 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz). ^{13}C RMN (400 MHz CDCl_3) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 50, 57, 62, 71, 121, 127, 129, 129, 133, 136, 140, 141, 200. $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{O}_2\text{Cl}$. ESI-MS (m/z): 438.23 (100.0%), 440.23 (32.0%), 439.24 (30.8%), 441.23 (9.7%), 440.24 (5.0%), 442.24 (1.5%). Análisis elemental: C, 76.60; H, 8.04; Cl, 8.08; O, 7.29.

Molécula 140

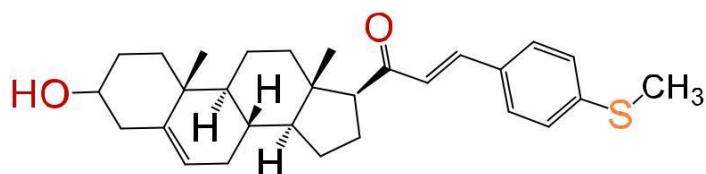


(*E*)-3-(2-clorofenil)-1-((8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-yl)prop-2-en-1-ona. Sólido blanco (86%). PF: 149-151 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz), 6.73 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.49 (m, 4H). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 32, 32, 32, 36, 37, 39, 42, 45, 50, 57, 62, 72, 121, 127, 129, 129, 133, 136, 140, 141, 200. C₂₈H₃₅O₂Cl. ESI-MS (*m/z*): 438.23 (100.0%), 440.23 (32.0%), 439.24 (30.8%), 441.23 (9.7%), 440.24 (5.0%), 442.24 (1.5%). Análisis elemental: C, 76.60; H, 8.04; Cl, 8.08; O, 7.29.

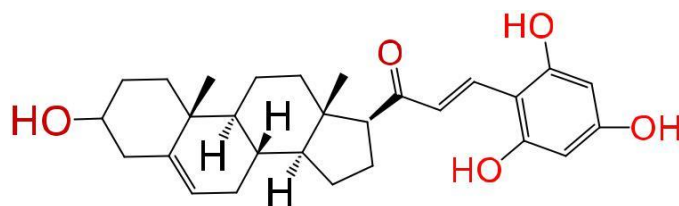
Molécula 142



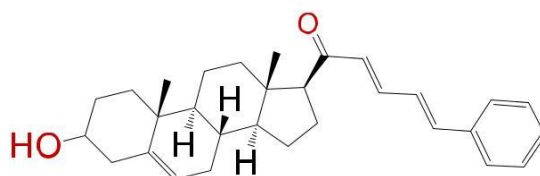
(*E*)-3-(2-bromopiridin-3-il)-1-((8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il)prop-2-en-1-ona. Sólido blanco (86%). PF: 193-195 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz), 6.73 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.5 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.8 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.0 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 22, 24, 31, 31, 32, 36, 37, 39, 42, 45, 50, 57, 62, 72, 121, 123, 132, 136, 139, 140, 142, 148, 204. C₂₇H₃₄O₂NBr. ESI-MS (*m/z*): 485.18 (100.0%), 483.18 (98.1%), 484.18 (29.1%), 486.18 (28.5%), 487.18 (4.5%), Análisis elemental: C, 66.94; H, 7.07; Br, 16.49; N, 2.89; O, 6.60.

Molécula 146

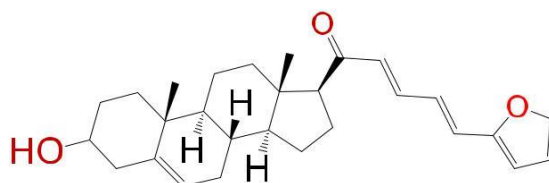
(*E*) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) -3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13, 14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) -3- (4- (metiltio) fenil) prop-2-en-1-ona. Sólido amarillo (98%). PF: 124-126 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz), 6.73 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.35 y 7.47 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, y d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 15, 19, 21, 23, 25, 32, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 50, 57, 62, 71, 121, 127, 129, 129, 133, 136, 140, 140, 200. C₂₉H₃₈O₂S. ESI-MS (*m/z*): 450.26 (100.0%), 451.26 (32.2%), 452.26 (5.2%), 452.27 (4.9%), 453.26 (1.4%) Análisis elemental: C, 77.29; H, 8.50; O, 7.10; S, 7.11.

Molécula 31

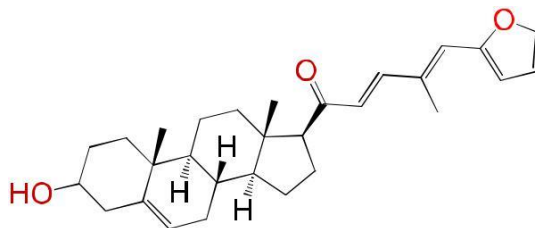
(*E*) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxi - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13, 14,15,16,17 - tetradecahidro - 1*H* - ciclopenta [a] fenantren - 17 - il) - 3- (2,4,6 - trihidroxifenil) prop - 2 - en - 1 - ona. Sólido rosado (68%). PF: 198-200 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz), 5.70 (m, 2H), 6.02 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.02 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 22, 24, 31, 31, 32, 36, 37, 39, 42, 45, 50, 57, 62, 71, 121, 127, 129, 129, 133, 136, 140, 140, 200. C₂₈H₃₆O₅. ESI-MS (*m/z*): 452.26 (100.0%), 453.26 (30.9%), 454.26 (5.5%), Análisis elemental C, 74.31; H, 8.02; O, 17.68.

Molécula 148

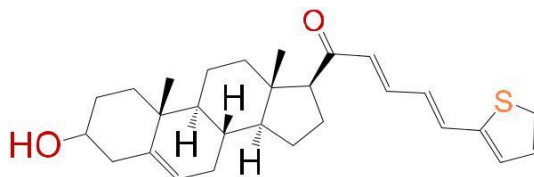
(2*E*, 4*E*) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxil - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7,8,9,10,11,12, 13,14,15,16,17 - tetradeca - hidro - 1*H* - ciclopenta [a] fenantren - 17 - il) - 5 - fenilpenta - 2,4 - dien - 1 - ona. Sólido amarillo (99%). PF: 116-119 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.61–1.90 (m, 6H), 2.20–2.38 (m, 3H), 2.82 (t, *J* = 8.80, 1H); 3.51 (m, 1H); 6.78 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.73 (t, 1H, *J* = 11.0 Hz), 7.39 (m, 3H), 7.55 (m, 3H), 7.49 (t, 1H, *J* = 11.0 Hz). ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 22, 24, 31, 31, 31, 37, 41, 45, 48, 48, 48, 49, 49, 50, 57, 62, 71, 121, 125, 126, 128, 129, 130, 134, 140, 141, 142, 201; C₃₀H₃₈O₂. ESI-MS (m/z): 430.29 (100.0%), 431.29 (33.0%), 432.29 (5.5%). Análisis elemental C, 83.67; H, 8.89; O, 7.43.

Molécula 110

(2*E*, 4*E*) - 5 - (furan - 2 - il) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxil - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7, 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) penta-2,4-dien-1-ona. Sólido amarillo (98%). PF:100-103 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.61–1.90 (m, 6H), 2.20–2.38 (m, 3H), 2.82 (t, *J* = 8.80, 1H); 3.51 (m, 1H); 6.33 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.52 (m, 1H), 6.65 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.71 (m, 1H), 6.75 (m, 1H), 6.78 (m, 1H), 6.95 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7.45 (m, 1H), 7.75 (d, *J* = 8, 1H). ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 42, 45, 49, 49, 49, 49, 50, 57, 62, 71, 109, 109, 112, 121, 130, 139, 140, 144, 147, 151, 200. C₂₈H₃₆O₃ ESI-MS (m/z): 420.27 (100.0%), 421.27 (30.8%), 422.27 (5.1%). Análisis elemental: C, 79.96; H, 8.63; O, 11.41.

Molécula 126

(2*E*, 4*E*) - 5- (furan - 2 - il) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) -3 - hidroxí - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7 , 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) -4-metilpenta-2,4-dien-1-ona. Sólido amarillo (96%). PF: 110-113 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.61–1.90 (m, 6H), 2.20–2.38 (m, 6H), 2.82 (t, *J* = 8.80, 1H); 3.51 (m, 1H); 6.33 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.52 (m, 1H), 6.65 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.75 (m, 1H), 6.78 (m, 1H), 6.95 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7.45 (m, 1H), 7.75 (d, *J* = 8, 1H). ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) d (ppm): 13, 14, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 42, 45, 49, 49, 49, 49, 49, 50, 57, 62, 71, 109, 109, 112, 121, 130, 139, 140, 144, 147, 151, 200. C₂₉H₃₈O₃ ESI-MS (m/z): 434.28 (100.0%), 435.29 (31.9%), 436.29 (5.5%). Análisis elemental: C, 80.14; H, 8.81; O, 11.04.

Molécula 124

(2*E*, 4*E*) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxí - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7,8,9,10,11,12 , 13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) - 5- (tiofen-2-il) penta-2,4-dien-1-ona. Sólido amarillo (53%). PF: 158-164 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.61–1.90 (m, 6H), 2.20–2.38 (m, 3H), 2.82 (t, *J* = 8.80, 1H); 3.51 (m, 1H); 6.33 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.52 (m, 1H), 6.65 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.71 (m, 1H), 6.75 (m, 1H), 6.78 (m, 1H), 7.04 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.69 (d, *J* = 8, 1H). ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 42, 45, 49, 49, 49, 49, 49, 50, 57, 62, 71, 121, 121, 128, 129, 130, 139, 140, 144, 147, 151, 200. C₃₀H₃₈O₂S. ESI-MS (m/z): 436.24 (100.0%), 437.25 (30.8%), 438.25 (5.2%), 438.24 (4.5%), 439.24 (1.4%). Análisis elemental: C, 77.02; H, 8.31; O, 7.33; S, 7.34.

SERIE B

Síntesis de dos tipos de derivados, uno con aromáticos y carbonilos, y otro con amidas análogas a Boofilina utilizando aminas y aminoácidos.

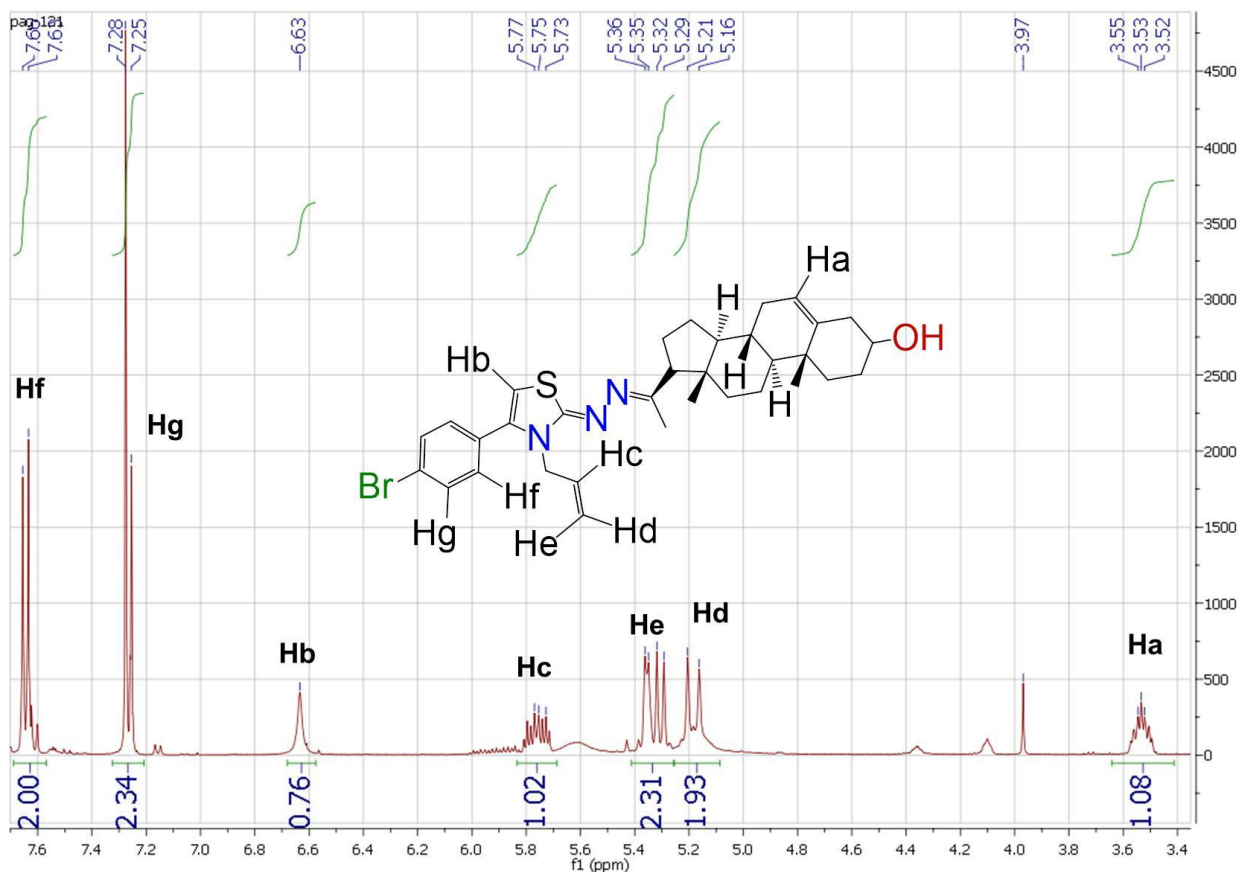
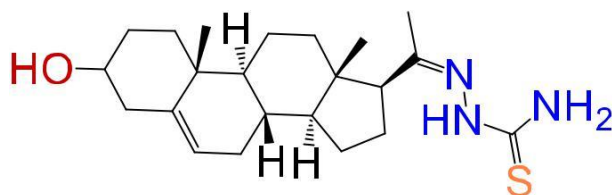


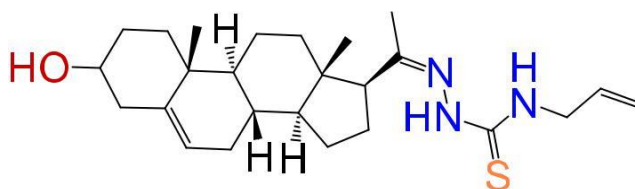
Figura 17. Espectro de ^1H RMN de **121**, donde se indica las señales características fácilmente discernibles de los derivados tiazólicos, el Hb del doble enlace del tiazol características de la ciclación, los aromáticos (Hf y Hg) y alilo (Hc, He y Hd). La señal característica del doble enlace del core esteroide (Ha) está como multiplete en 3.56 ppm. El resto de los protones del core que están a bajos ppm no se muestran en la figura.

Molécula 114



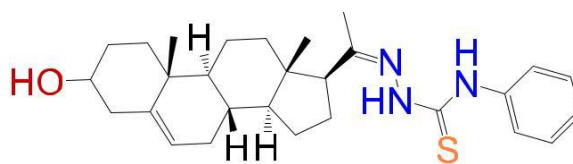
(*E*) - 2- (1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxio - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7,8,9,10,11, 12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) etilideno) hidrazina-1-carbotioamida. Sólido blanco (95%). PF: 245-248 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz), 8.56 (s, 2H). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 50, 57, 62, 71, 121, 165, 181. C₂₂H₃₅N₃OS. ESI-MS (m/z): 389.25 (100.0%), 390.25 (25.7%), 391.25 (5.2%), 391.26 (2.8%), 392.25 (1.1%). Análisis elemental: C, 67.82; H, 9.05; N, 10.79; O, 4.11; S, 8.23.

Molécula 11



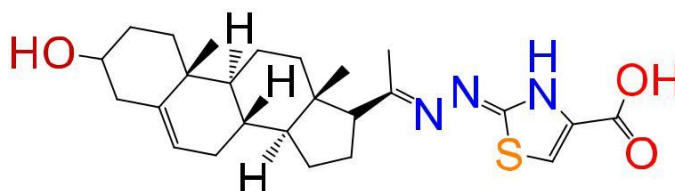
(*Z*) - N - alil - 2- (1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxio - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) etilideno) hidrazina-1-carbotioamida. Sólido blanco (95%). PF: 229-233 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 5.21 (d, 1H, *J* = 16 Hz), 5.32 (d, 1H, *J* = 10 Hz), 5.35 (m, 2H), 5.77 (m, 1H), 8.56 (s, 1H). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 47, 50, 57, 62, 71, 117, 121, 134, 165, 181. C₂₅H₃₉N₃OS. ESI-MS (m/z): 429.28 (100.0%), 430.28 (28.9%), 431.28 (5.1%), 431.29 (3.9%), 432.28 (1.2%). Análisis elemental: C, 69.88; H, 9.15; N, 9.78; O, 3.72; S, 7.46.

Molécula 122

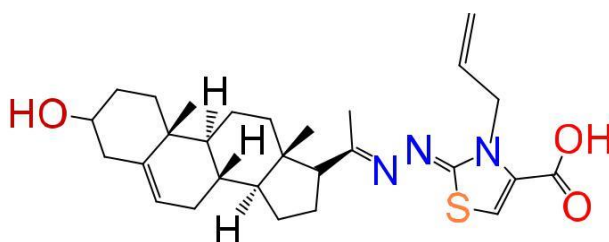


(*E*) - 2- (1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxí - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7,8,9,10,11, 12,13,14,15,16,17 - tetradecahidro - 1*H* - ciclopenta [a] fenantren - 17 - il) etilideno) - *N* - fenilhidrazina - 1 - carbotioamida. Sólido blanco (19 %). PF: 215-217 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 6.81 (m, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.7 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 50, 57, 62, 71, 121, 126, 128, 129, 138, 165, 181. C₂₈H₃₉N₃OS. ESI-MS (*m/z*): 465.28 (100.0%), 466.28 (32.2%), 467.28 (5.1%), 467.29 (4.8%), 468.28 (1.4%). Análisis elemental: C, 72.21; H, 8.44; N, 9.02; O, 3.44; S, 6.89.

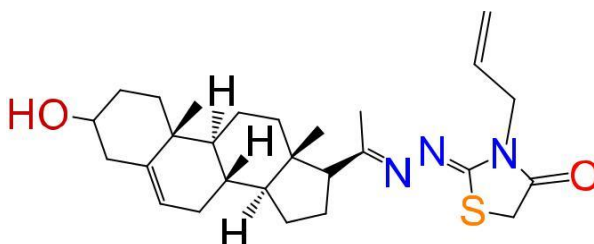
Molécula 128



(*E*) - 3 - alil - 2 - (((*E*) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxí - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7 , 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) etilideno) hidrazono) -2,3-dihidrotiazol-4-carboxílico. Sólido amarillo (99%). PF: 281-283 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz), 7.76 (s, 1H). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 50, 57, 62, 71, 117, 121, 146, 146, 158, 163, 165, 180. C₂₅H₃₅N₃O₃S. ESI-MS (*m/z*): 457.24 (100.0%), 458.24 (29.1%), 459.24 (5.7%), 459.25 (3.7%), 460.24 (1.3%). Análisis elemental: C, 65.61; H, 7.71; N, 9.18; O, 10.49; S, 7.01.

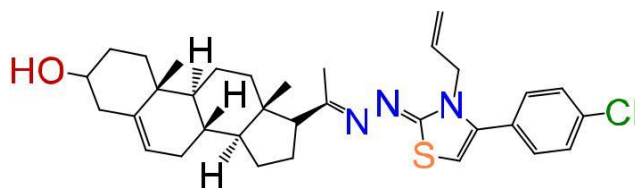
Molécula 21

(*E*) - 3 - alil - 2 - (((*E*) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxí - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7 , 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) etilideno) hidrazono) -2,3-dihidrotiazol-4-carboxílico. Sólido amarillo (99%). PF: 145-149°C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (m, 3H), 5.21 (d, 1H, *J*=16Hz), 5.32 (d, 1H, *J*=10Hz), 5.77 (m, 2H), 7.76 (s, 1H). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 47, 50, 57, 62, 71, 117, 117, 121, 134, 146, 146, 158, 163, 165, 180. C₂₈H₃₉N₃O₃S. ESI-MS (m/z): 497.27 (100.0%), 498.27 (32.2%), 499.28 (5.2%), 499.27 (5.1%), 500.27 (1.5%). Análisis elemental: C, 67.57; H, 7.90; N, 8.44; O, 9.64; S, 6.44

Molécula 27

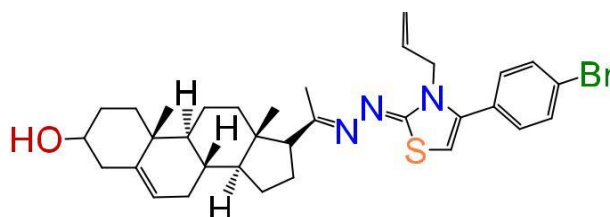
(*E*)-3-alil-2-(((*E*)-1-((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*)-3-hidroxí-10,13-dimetil-2,3,4,7 , 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) etilideno) hidrazono) tiazolidin-4-ona. Sólido blanco (88%). PF: 204-206 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 4.11 (s, 2H), 4.93 (m, 2H), 5.19 (d, 1H, *J* = 16 Hz), 5.22 (d, 1H, *J* = 10 Hz), 5.87 (m, 1H). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 30, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 42, 45, 50, 57, 62, 71, 117, 121, 132, 158, 172. C₂₇H₃₉N₃O₂S. ESI-MS (m/z): 469.28 (100.0%), 470.28 (30.5%), 471.28 (5.1%), 471.27 (4.5%), 472.28 (1.6%), 470.27 (1.1%) Análisis elemental: C, 69.04; H, 8.37; N, 8.95; O, 6.81; S, 6.83.

Molécula 25



((8S, 9S, 10R, 13S, 14S, 17R) -17 - ((E) -1- ((Z) -3-allyl-4- (4-clorofenil) tiazol-2 (3H) -ilideno) hidrazono) Etil) - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 - tetradecahidro - 1H - ciclopenta [a] fenantren - 3 - ol. Sólido amarillo (52%). PF: 140-144 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, J = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (m, 3H), 5.21 (d, 1H, J=16Hz), 5.32 (d, 1H, J=10Hz), 5.77 (m, 2H), 7.32 (d, 2H, J=10Hz), 7.44 (d, 2H, J=10Hz), 7.76 (s, 1H). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 47, 50, 57, 62, 71, 117, 117, 120, 121, 128, 128, 133, 134, 146, 146, 158, 163, 165. C₃₃H₄₂N₃OCl. ESI-MS (m/z): 563.27 (100.0%), 565.27 (36.9%), 564.28 (36.2%), 566.27 (13.7%), 565.28 (6.9%), 567.28 (2.4%), 564.27 (1.9%), 567.27 (1.7%), 566.28 (1.1%) Análisis elemental: C, 70.25; H, 7.50; Cl, 6.28; N, 7.45; O, 2.84; S, 5.68.

Molécula 121



(E) - 1 - ((E) - 3 - alil - 4- (4 - bromofenil) tiazol - 2 (3H) - ilideno) hidrazono (8S, 9S, 10R, 13S, 14S, 17S)) Etil) - 10,13 - dimetil - 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 - tetradecahidro - 1H - ciclopenta [a] fenantren - 3 - ol. Sólido amarillo (85%). PF: 179-183 °C; ¹H RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, J = 8.5 Hz), 3.52 (m, 1H), 5.35 (m, 3H), 5.21 (d, 1H, J=16Hz), 5.32 (d, 1H, J=10Hz), 5.77 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 7.27 (d, 2H, J=10Hz), 7.55 (d, 2H, J=10Hz). ¹³C RMN (400 MHz CDCl₃) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 47, 50, 57, 62, 71, 117, 117, 120, 121, 128, 128, 133, 134, 146, 146, 158, 163, 165. C₃₀H₃₈N₃OSBr. ESI-MS (m/z): 609.22 (100.0%), 607.22 (97.8%), 610.22 (37.4%), 608.23 (35.4%), 609.23 (6.7%), 611.23 (6.6%), 611.22 (5.0%), 608.22 (1.9%), 612.22 (1.6%), 610.23 (1.4%). Análisis elemental: C, 65.12; H, 6.96; Br, 13.13; N, 6.90; O, 2.63; S, 5.27.

Las amidas siguientes simulan los compuestos más similares a la Boofilina. La síntesis es compleja y costosa, además los rendimientos fueron bajos.

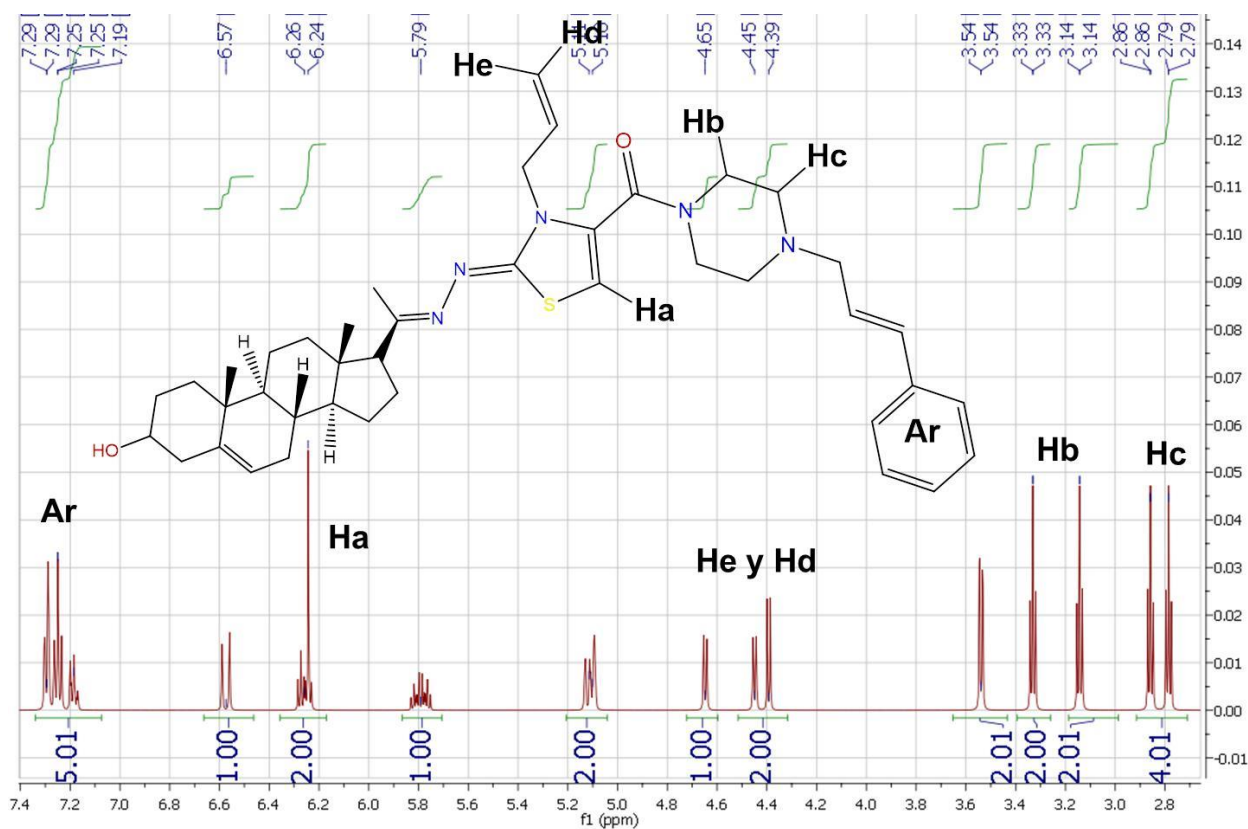
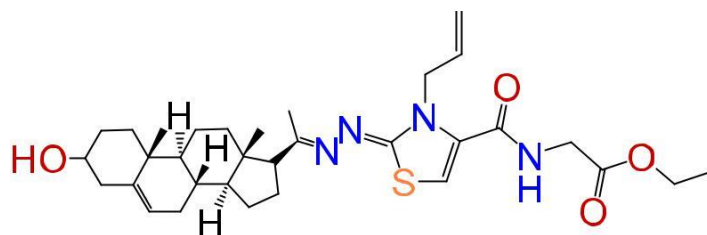
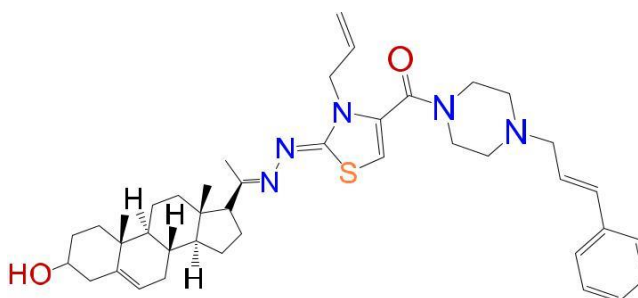


Figura 18. Espectro de ¹H-RMN de la molécula **136**, donde se indica las señales características fácilmente discernibles de los derivados tiazólicos, el Ha del doble enlace del tiazol característico de la ciclación, los aromáticos Ar y alilo (He y Hd). Se indica además la señal característica del anillo piperazina (Hb y Hc).

Molécula 136

((*E*) - 3 - alil - 2 - ((*E*) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxil - 10,13 - dimetil - 2,3,4 , 7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) etilideno) hidrazono) -2,3-dihidrotiazol-4- Carbonil) glicinato. Aceite naranja (30%). ^1H RMN (400 MHz CDCl_3) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 1.29 (m, 3H), 2.83 (t, 1H, $J=8.5$ Hz), 3.52 (m, 1H), 4.13 (m, 2H), 4.23 (s, 2H), 5.35 (m, 3H), 5.21 (d, 1H, $J=16$ Hz), 5.32 (d, 1H, $J=10$ Hz), 5.77 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 8.03 (s, 1H). ^{13}C RMN (400 MHz CDCl_3) d (ppm): 13, 14, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 40, 42, 45, 47, 50, 57, 62, 66, 71, 117, 117, 121, 134, 146, 146, 158, 163, 165, 169. $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$. ESI-MS (m/z): 582.32 (100.0%), 583.33 (35.3%), 584.33 (7.2%), 584.32 (5.1%), 583.32 (2.3%), 585.32 (1.6%), 585.33 (1.1%). Análisis elemental: C, 65.95; H, 7.96; N, 9.61; O, 10.98; S, 5.50.

Molécula 138

((*E*) - 3 - alil - 2 - (((*E*) - 1 - ((8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*S*) - 3 - hidroxil - 10,13 - dimetil - 2,3,4 , 7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta [a] fenantren-17-il) etilideno) hidrazono) -2,3-dihidrotiazol-4-ilo) (4 - cinamilpiperazin - 1 - il) metanona. Aceite naranja (21%). ^1H RMN (400 MHz CDCl_3) d (ppm): 0.63 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 2.83 (t, 1H, $J = 8.5$ Hz), 3.52 (m, 1H), 2.79 (dd, 4H, $J=1.6$ y 4 Hz), 3.02 (s, 2H), 3.33 (dd, 4H, $J=1.6$ y 4 Hz), 5.35 (m, 3H), 5.21 (d, 1H, $J=16$ Hz), 5.32 (d, 1H, $J=10$ Hz), 5.77 (m, 2H), 6.19 (m, 1H), 6.56 (m, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.33 (m, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.76 (s, 1H). ^{13}C RMN (400 MHz CDCl_3) d (ppm): 13, 19, 21, 23, 25, 31, 32, 32, 37, 37, 39, 42, 45, 47, 50, 50, 55, 57, 62, 71, 117, 117, 121, 127, 128, 134, 136, 146, 146, 158, 163, 165, 180. $\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$. ESI-MS (m/z): 681.41 (100.0%), 682.41 (45.9%), 683.41 (11.2%), 683.40 (4.5%), 684.41 (2.3%), 682.40 (1.8%), 684.42 (1.6%). Análisis elemental: C, 72.21; H, 8.13; N, 10.27; O, 4.69; S, 4.70.

4.2 Biología

Se evaluaron los 20 nuevos compuestos en el ensayo de inhibición de formación de biofilm en tres especies bacterianas. Particularmente en *P. aeruginosa* se analizó el efecto del compuesto 11, sobre la formación de biofilm (Figura 19).

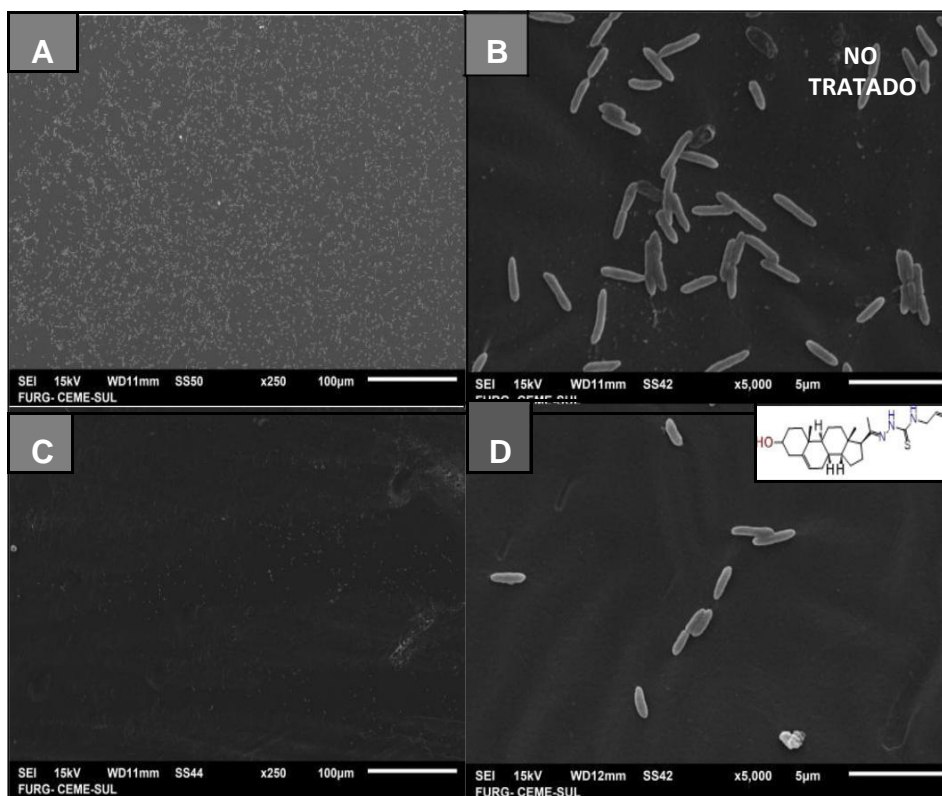


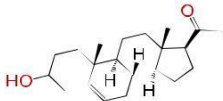
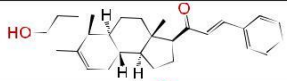
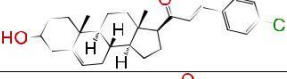
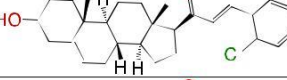
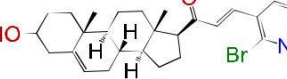
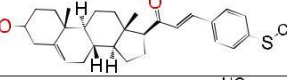
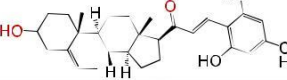
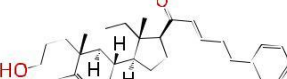
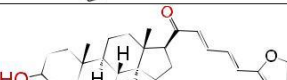
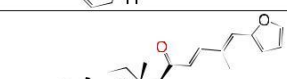
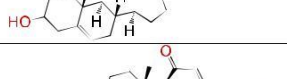
Figura 19. Imágenes de microscopía electrónica de biofilms de *P. aeruginosa* PA14, cuadrante A, sin tratamiento con magnificación 250x, cuadrante B la misma cepa no tratada con magnificación 5000x, donde se puede observar la formación de biofilm. Cuadrante C, tratado con el compuesto 11 (250x), cuadrante D, misma cepa tratada con el compuesto 11 (5000x), donde se puede visualizar la disminución en el número de bacterias junto a la inhibición en la formación de biofilm de *P. aeruginosa* con una de las moléculas sintetizadas.

La síntesis de las nuevas moléculas desarrolladas en el presente trabajo es sencilla y se lleva a cabo mediante reacciones de química verde, mayoritariamente para la serie A. Cuando se intenta aproximarse a la estructura de la Boofilina, la química se hace más compleja, costosa e incluso los rendimientos de las reacciones son menores. Además, la actividad biológica no parece mejorar con estas moléculas más complejas.

Las moléculas mantienen la isomería óptica incambiada, ya que se parte de un reactivo comercial con dicha isomería fija. En cuanto a la isomería generada en las reacciones, para el caso de las condensaciones es siempre *E*. Cuando se forma el anillo tiazólico la isomería generada es *Z*.

A continuación se resume el efecto de los compuestos sintetizados en la formación de biofilm. Para ello se detalla el porcentaje de formación de biofilm de las tres cepas bacterianas tratadas con las moléculas ensayadas (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de las moléculas sintetizadas en la formación de biofilms. Porcentaje de formación de biofilm de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *P. mirabilis* en presencia de 50µM de dichos compuestos, pertenecientes a la **SERIE A**.

Tratamiento ^	<i>P. mirabilis</i> *	<i>S. aureus</i> *	<i>P. aeruginosa</i> *	Compuesto
BF**	100	100	100	
Ampicilina (300µM)	30 ⁺			
Kanamicina (20 µM)			100***	
Gentamicina (100 µM)		8		
Pregnenolona	57	60	70	
Serie A				
Prototipo II	64	14	59	
120	42	29	41	
140	76	24	182	
142	51	8	63	
146	79	21	64	
31	54	6	54	
148	78	22	78	
110	72	9	74	
126	49	53	78	
124	131	2	54	

^ El ensayo se realizó por triplicado, se muestra en la tabla los valores promedio para cada cepa, teniendo en cuenta el desvío estándar (σ). * Porcentaje de formación de biofilms de las diferentes especies de bacterias utilizadas. ** Control de formación de biofilm (BF), compuesto por medio LB junto a las cepas bacterianas. +Se resaltan con color verde las más activas y con color amarillo las de actividad moderada. *** La Kanamicina a esta concentración es un inductor de la producción de biofilm (Jones & Filloux, 2013).

En primera instancia se analizan los derivados chalconilicos, los cuales se comparan con el **prototipo II**, que estructuralmente es la combinación de pregnenlonona con chalcona (dos anillos fenilo unidos por un carbonil α - β -insaturado). La evaluación muestra que algunos de los compuestos son activos contra todos los microorganismos con distintos grados de inhibición. En el siguiente esquema se presentan los sustituyentes o grupos R de los derivados chalconilicos (Figura 20).

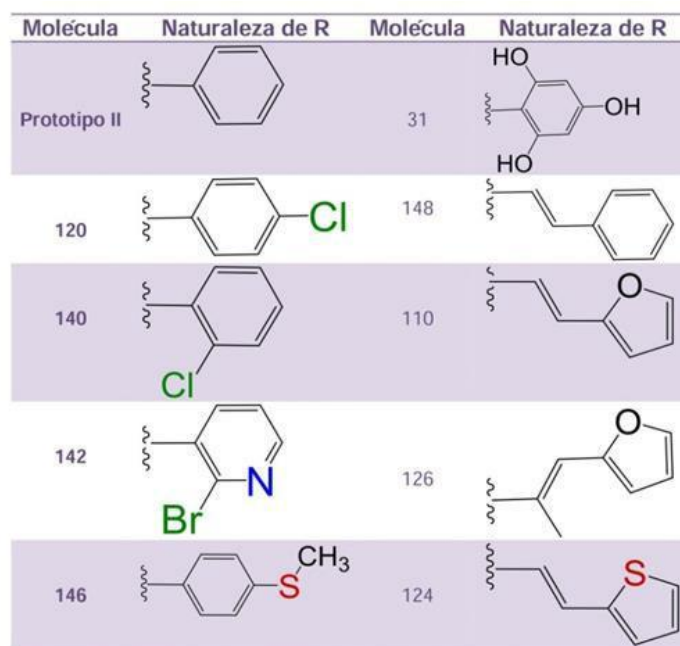


Figura 20. Naturaleza de los sustituyentes de cada derivado chalconilico.

Al comparar el % de BF de cada molécula sintetizada con el **prototipo II** utilizado como referencia para los tres patógenos. Al sustituir un halógeno en posición *para*, molécula **120** (R-4-Cl) tanto en *P. mirabilis* como en *P. aeruginosa* el porcentaje de formación de biofilm disminuye. La presencia del Cloro en posición *para* conduce a un aumento en la actividad antibiofilm, en comparación con el compuesto no sustituido (R-H) prototipo II (Kakati 2013). En cambio el porcentaje de biofilm en *S. aureus* aumenta, esto podría atribuirse a que los dos primeros son gram-negativos, mientras que el último es gram-positivo.

Al variar la posición del Cloro en *orto*, molécula **140** (R-2-Cl) se evidencia un relevante aumento en el % de BF en las tres cepas, más pronunciada aún en *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*.

La incorporación de heteroátomos (Oxígeno o Nitrógeno) tiende a mejorar las actividades biológicas, entre ellas actividad antibiofilm de las moléculas, como se ha visto anteriormente (Banday 2010). En complemento la alteración en la posición del mismo sustituyente del anillo aromático puede mostrar diferencias

en la actividad, como sucede con las moléculas **120** y **140**, donde el Cloro cambia de posición *para* a *orto*, respectivamente.

Al sustituir el Cloro por otro halógeno como el Bromo (Br) en la misma posición que la molécula anterior (*orto*), pero sustituido con un Nitrógeno (N) en posición *meta* del anillo aromático, molécula **142** (R-2-Br,3-piridina). En *P. aeruginosa* el aumento en el % de BF es apenas marcado, reduciendo entonces la actividad antibiofilm, posiblemente debido a la presencia del Br (Kakati 2013). Esto no sucede en *P. mirabilis*, donde existe una disminución leve; mientras que en *S. aureus* el descenso es rotundo, alcanzando un % de BF= 8, lo que denota en dicha cepa una buena actividad antibiofilm.

Por otro lado al sustituir un azufre (S) en posición *para* del anillo aromático, unido a un metilo, molécula **146** (R-4-S-Me), muestra un aumento no significativo en el % de BF para las tres especies microbianas.

Esto no sucede en la molécula **31** (R-2,4,6-OH) que al adicionar tres hidroxilos, dos en *orto* y uno en *para* al anillo aromático, los tres patógenos presentan un descenso, leve en gram-negativos, mientras que *S. aureus* es contundente, alcanzando un % de BF= 6.

Si se compara el **prototipo II** con la molécula **148 (R-cinamil)** que son muy similares estructuralmente, solo que ésta última posee un doble enlace conjugado adicional, el cual puede ser responsable del aumento medio en la formación de biofilm para las tres cepas, repitiéndose el mayor incremento en los patógenos gram-negativos.

Similarmente cuando el R (en lugar de ser un benceno como en la molécula anterior) es un furano, molécula **110 (R-furilacrolein)** se mantiene el mismo aumento para los gram-negativos. Pero para el estafilococo el descenso es contundente adquiriendo un % de BF= 6, esto puede asociarse con la presencia de un átomo electronegativo como el oxígeno (Banday 2010).

Al comparar la estructura de la molécula **148**, simplemente al adicionar un metilo entre medio del carbonilo y el furano, molécula **126**, las tres cepas sufren cambios en su actividad biológica, presentando una disminución en el % de BF en *P. mirabilis*, y un incremento en *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Para finalizar los compuestos de la **serie A**, la molécula **124 (R-tiofenilacrolein)** similar estructuralmente a la molécula **110**, con el hecho de sustituir un furano por un tiofeno, se observa el efecto de éste último, causando en *P. aeruginosa* una reducción en el % de BF. En contraparte *P. mirabilis* presenta un aumento del doble en la formación de biofilm. Mientras que *S. aureus* posee una determinante disminución, logrando un % de BF= 2, el menor de todos datos recaudados, como se puede visualizar en el siguiente gráfico de barras (Figura 21).

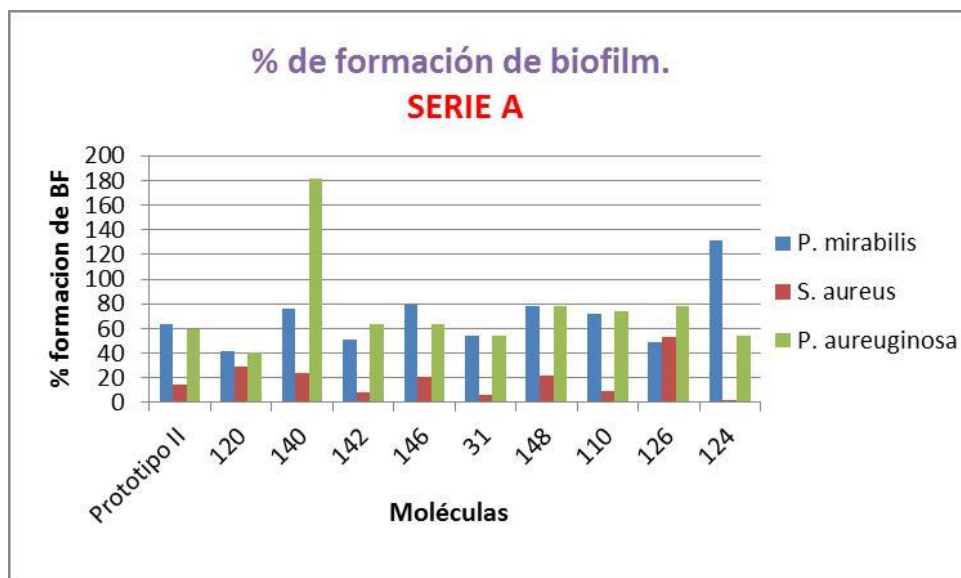


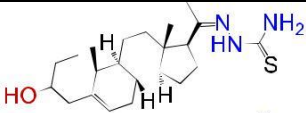
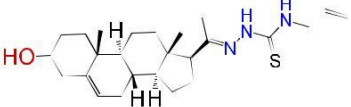
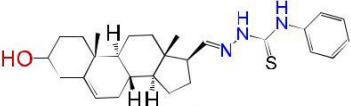
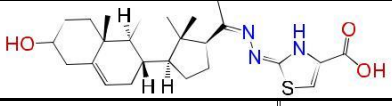
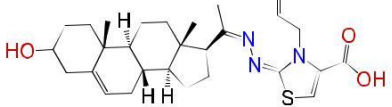
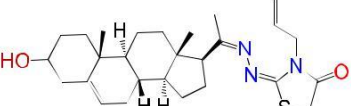
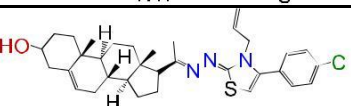
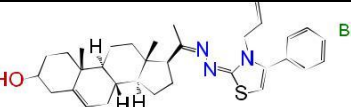
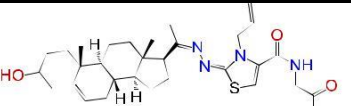
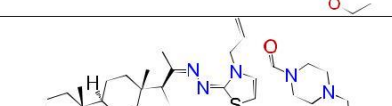
Figura 21. Porcentaje de formación de biofilm de los compuestos chalconílicos y el prototipo II para las tres cepas bacterianas.

El patógeno que se ve mayormente afectado por esta serie de compuestos es *S. aureus* (como se observa en las barras rojas del gráfico). Se destaca que las moléculas con mayor actividad antibiofilm en dicha cepa son: **124, 31, 142 y 110**, alcanzando los menores % de formación de BF respectivamente.

Por otro lado, las amidas son sintéticamente más complejas y costosas, presentan bajos rendimientos y no demuestran mejorar la actividad biológica con respecto a la Boofilina.

La modificación estructural de los esteroides proporcionaría un escenario propicio en la síntesis de nuevos potenciales fármacos, para hacer frente a relevantes problemas biológicos (Lone 2013). Pese a esto contemplando los precedentes de la literatura, pocos esfuerzos se han realizado hacia la síntesis eficiente y análisis biológico simultáneo de derivados de chalcona con base esteroidea. Éstos compuestos poseen varias actividades biológicas, entre ellas la actividad antibiofilm (Banday 2011). Se puede realizar una evaluación de dicha actividad en los compuestos sintetizados de las tres cepas bacterianas. Comparando de este modo los porcentajes de formación de biofilm (% de BF) de las cepas microbianas con las moléculas: tiosemicarbazonas, tiazoles y amidas (serie B), como resume la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de las moléculas sintetizadas en la formación de biofilms. Porcentaje de formación de biofilm de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *P. mirabilis* en presencia de 50µM de dichos compuestos, pertenecientes a la **SERIE B**.

Tratamiento [^]	<i>P. mirabilis</i> *	<i>S. aureus</i> *	<i>P. aeruginosa</i> *	Compuesto
Serie B				
114	39	42	49	
11	76	95	45	
122	48	32	47	
128	66	107	54	
21	58	13	75	
27	155	134	36	
25	62	86	38	
121	45	27	54	
136	78	56	91	
138	205	43	161	

[^] El ensayo se realizó por triplicado, se muestra en la tabla los valores promedio para cada cepa, teniendo en cuenta el desvío estándar (σ). +Se resaltan con color verde las más activas y con color amarillo las de actividad moderada.

En segunda instancia para la **serie B**, se comparan las actividades de las tiosemicarbazonas entre sí, lo mismo se hace con los tiazoles, y las amidas se referencian con respecto al prototipo I (Boofilina).

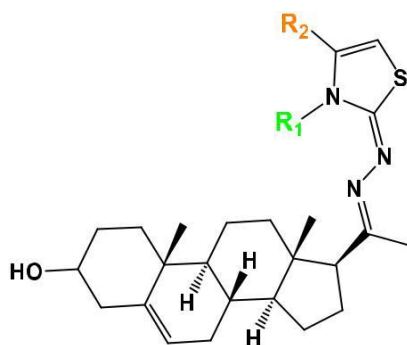
Las **tiosemicarbazonas** son consideradas potenciales agentes contra *M. tuberculosis*, siendo más activas y menos tóxicas que algunos fármacos utilizados en el tratamiento para tuberculosis. Se supone que el átomo de azufre tiene un papel clave en la actividad antimicrobiana, que puede explicarse por la supuesta interacción entre el azufre y un receptor biológico, estas conjeturas requieren mayor investigación (Pavan 2010).

Cuando el sustituyente (R1) es un hidrógeno (H), molécula **114 (R-H)** los porcentajes de formación de biofilm están por debajo de 50% en las tres cepas, siendo menor en *P. mirabilis*, luego *S. aureus* y por último *P. aeruginosa*. En contraste con los derivados chalconílicos, aquí no se ven diferencias entre gram-negativos y gram-positivos, esto mismo sucede para las dos siguientes tiosemicarbazonas.

Con el simple hecho de sustituir el H por un grupo alilo, molécula **11 (R-H₂C=CH-CH₃)**, en *S. aureus* el incremento es rotundo en comparación con la molécula **114**. El % de BF de *P. mirabilis* aumenta al doble, en divergencia con el leve decrecimiento en *P. aeruginosa*. Posiblemente se esté visualizando el efecto del doble enlace, que a grandes rasgos conduce a una ligera disminución en la actividad antibiofilm del último patógeno.

Esto no sucede cuando el sustituyente es un fenilo, molécula **122 (R-Ph)** donde se restablece la bioactividad como en la molécula **114**, incluso para el patógeno gram-positivo el % de BF es aún menor. Aquí se podría estar observando el efecto de la ciclación en el sustituyente, que favorece la actividad antibiofilm.

Ahora bien, en cuanto a los **tiazoles** hay que tener en cuenta que se manejan dos variables (**R1** y **R2**) como muestra el siguiente esquema.



R1: H (hidrógeno)	H ₂ C=CH-CH ₃ (alilo)
R2: COOH (ácido carboxílico)	R ¹ (CO)R ² (carbonilo)
4-X-Ph (<i>para</i> X-benceno, siendo X halógeno)	

Cuando el R1 es H y R2 es COOH, correspondiente a la molécula **128**, las tres cepas presentan un porcentaje de biofilm mayor al 50%, de manera leve, moderada a rotunda en *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *S. aureus*

respectivamente. Esto coincide con lo que sucede en los derivados chalconílicos, donde es clara la diferencia entre gram-negativos y gram-positivo. En base a esta molécula se compararán el resto de los tiazoles.

Al variar R1 de H por el grupo alilo molécula **21**, *P. aeruginosa* aumenta el % de BF, a diferencia del otro patógeno gram-negativo que mostró una disminución leve y *S. aureus* una contundente alcanzando un % de BF= 13.

Esto no sucede al variar R2 por un grupo carbonilo, molécula **27** ya que para *P. mirabilis* y el gram-positivo el aumento es exacerbado, mientras que para *P. aeruginosa* el descenso es medio. Aquí podría visualizarse el efecto del cambio de grupo funcional de ácido carboxílico a cetona.

El siguiente esquema muestra los sustituyentes o grupos R, tanto de los tiazoles como de las tiosemicarbazonas (Figura 22).

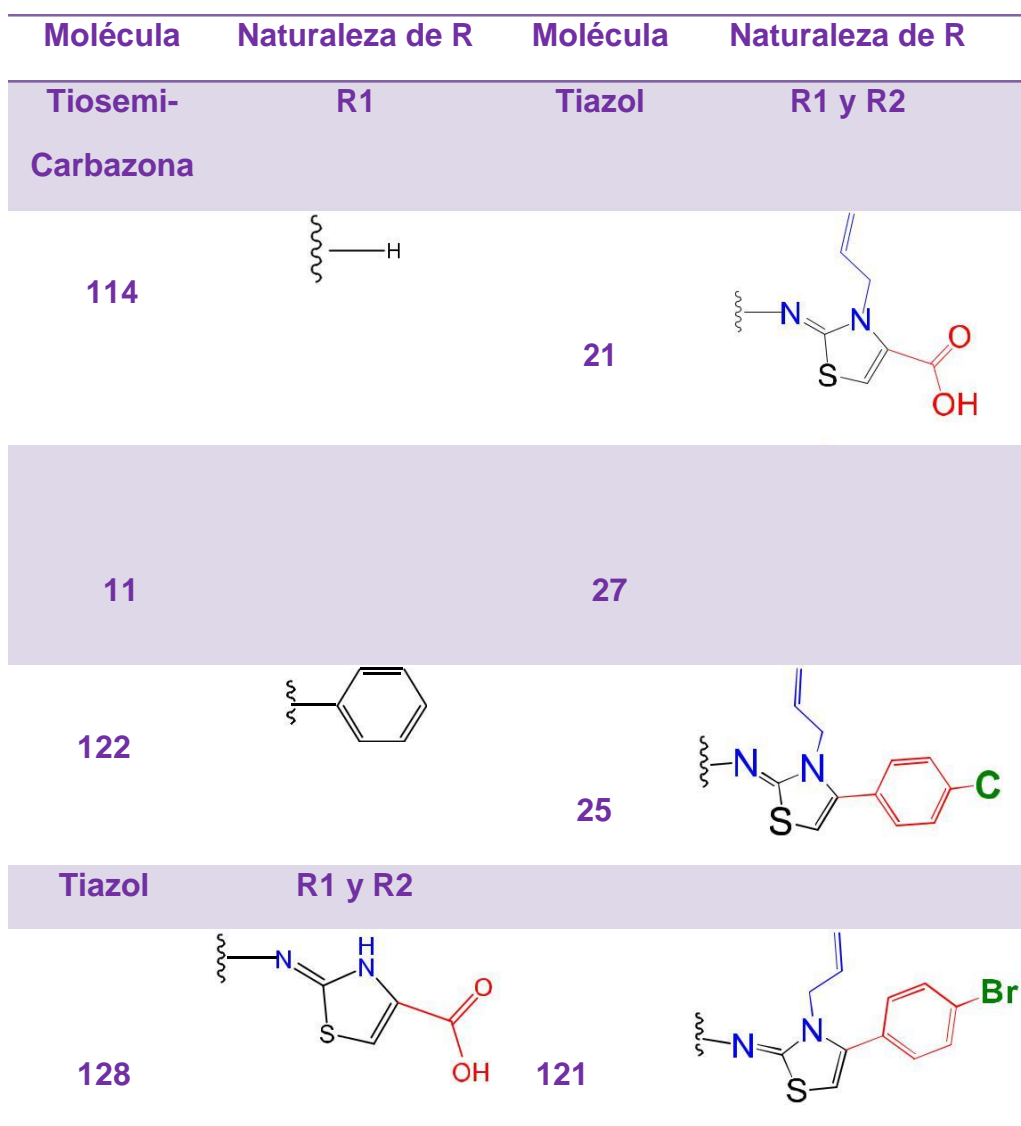


Figura 22. Naturaleza de los sustituyentes tanto de tiosemicarbazonas como de tiazoles.

Ahora bien, si se mantiene el R1, pero se varía el R2 por un benceno *para* sustituido con un halógeno (4-X-Ph), siendo este último un Cloro, molécula **25**, se observa una disminución en las tres cepas, leve en *P. mirabilis*, y en el otro gram-negativo más pronunciada, alcanzando un % de BF= 38. Mientras que *S. aureus* tiene buena capacidad de formación de biofilm.

Manteniendo el resto de la estructura en comparación con la molécula anterior, sólo con sustituir el halógeno por un Bromo molécula **121**, se mantiene el mismo % de BF para *P. aeruginosa*, decrece de manera moderada en *P. mirabilis*, mientras que en *S. aureus* es determinante el descenso, siempre en comparación con la molécula **128**. Aquí se puede observar el efecto del halógeno sobretodo en *S. aureus*, ya que cuando el sustituyente es *para*-Cl el % de BF= 86 y si es *para*-Br el % de BF= 27.

Por último, resta comparar las dos amidas sintetizadas (molécula 136 y 138) con Boofilina, como muestra el siguiente esquema (Figura 23).

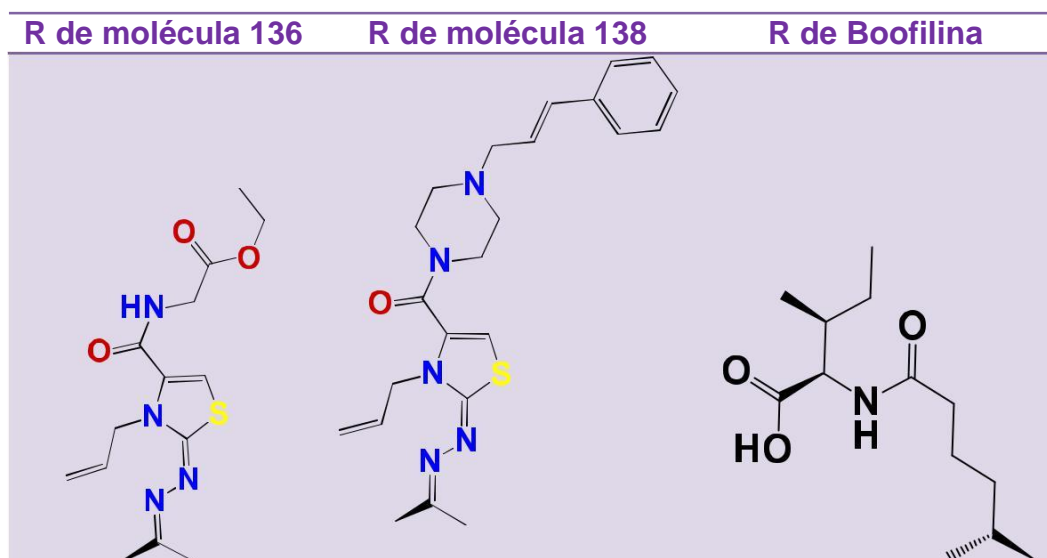


Figura 23. Naturaleza de los sustituyentes de las dos amidas sintetizadas y Boofilina.

Solo hay referencia de Boofilina para *P. aeruginosa* con un 43% de inhibición. La molécula **136**, presenta para los otros dos patógenos un aumento en la formación del biofilm, mientras que *S. aureus* muestra un % de BF= 56.

Finalmente en la molécula **138**, se visualiza el mismo efecto que la molécula anterior pero de manera exacerbada, *S. aureus* muestra un % de BF= 43, el mismo resultado de referencia que Boofilina. Contrariamente las otras dos bacterias muestran ser muy buenas formadoras de biofilm, como se resume en el siguiente gráfico de barras (Figura 24).

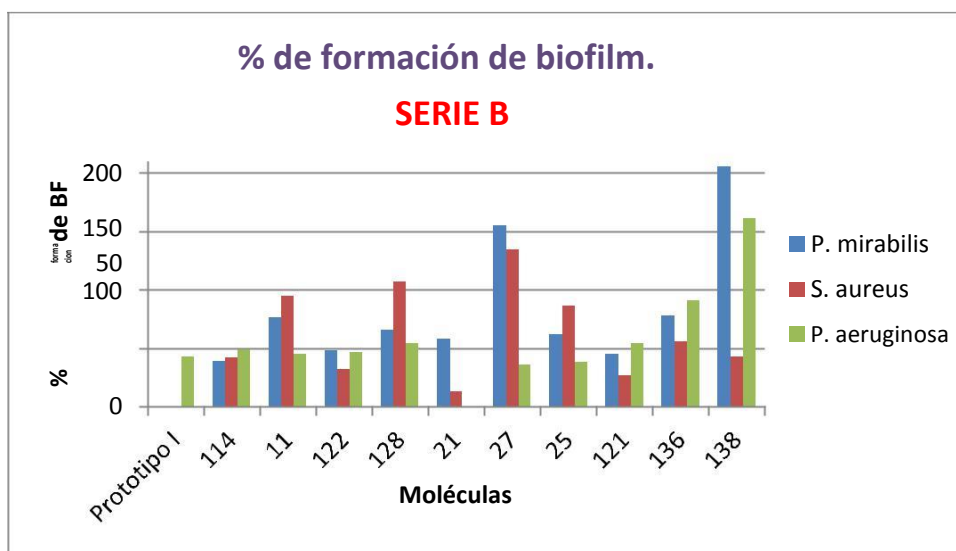


Figura 24. Porcentaje de formación de biofilm de prototipo I, tiosemicarbazonas, tiazoles y amidas para las tres cepas bacterianas.

El patógeno más sensible en la actividad antibiofilm es *P. aeruginosa* (como se observa en las barras verdes del gráfico). Se destaca que las moléculas con mayor actividad antibiofilm en dicha cepa son: **27**, **25** y **11** alcanzando los menores % de formación de BF respectivamente.

A modo de resumen, las moléculas con inhibición de la formación de biofilm mayor al 50% se consideran activas.

Las moléculas que resultaron activas en las tres especies de bacterias son: 120, 114, 122 y 121, particularmente:

- En *P. mirabilis*: **120**, **142**, **31**, **126**, **114**, **122**, **121**, se destaca el compuesto **114** con un 61% de inhibición del biofilms a 50µM.
- En *S. aureus*: toda la serie A resulta activa y los compuestos **114**, **122**, **21**, **121** y **138** de la serie B. Se destacan los compuestos **142**, **110** y **124** con una inhibición de biofilms mayor al 90%.
- En *P. aeruginosa*: **120**, **31**, **124**, **114**, **11**, **122**, **128**, **27**, **25** y **121**, se destacan los compuestos **25** y **27** con una inhibición de biofilms mayor al 60%.

Todos los compuestos que resultaron activos, se ensayaron a 200 µM en el modelo de *C. elegans* para caracterizar la selectividad. Los mismos no mostraron actividad tóxica a dicha dosis, es decir que el porcentaje de inhibición del movimiento con respecto al control sin tratamiento fue de 0%. Este resultado manifiesta que estas moléculas no son tóxicas inespecíficas, sino que solo afectan la actividad de producción de biofilm y el crecimiento bacteriano.

Los antibióticos de referencia son Ampicilina (300 μ M), Gentamicina (100 μ M) y Kanamicina (20 μ M). Los mismos no muestran inhibición en la formación de biofilm, a diferencia de algunas moléculas sintetizadas (**120**, **114**, **122** y **121**) que sí lo inhiben, esto convierte a las moléculas descritas anteriormente en potenciales antibióticos mejorados (Figura 25).

Se destaca el compuesto **114** que es seis veces más activo que la ampicilina, antibiótico específico de *P. mirabilis*. Se resalta también las moléculas **142**, **110** y **124**, que son dos veces más activas que la Gentamicina, específico de *S. aureus*. Mientras que todos los compuestos que dan actividad en *P. aeruginosa*, fueron activos a la misma dosis que la Kanamicina, donde esta es un inductor de la formación del biofilm.

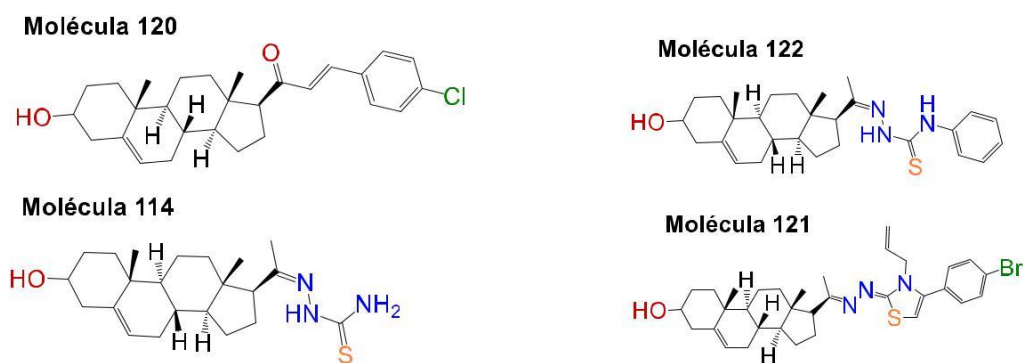


Figura 25. Moléculas que tienen actividad antibiofilm de amplio espectro en los tres patógenos.

La actividad antimicrobiana de estas moléculas no fue ensayada directamente en esta instancia, pero como se evidencia en las imágenes de microscopía electrónica para el biofilm de *P. aeruginosa* tratado con el compuesto **11** (Figura 19), donde se observa una reducción en el número de bacterias, y una inhibición en la formación del biofilm. Indirectamente se puede decir entonces que estas moléculas poseen actividad antibacteriana. Además las mismas son selectivamente tóxicas para las bacterias, como se demostró en el ensayo toxicológico con *C. elegans*.

6. Conclusión

Se sintetizaron y caracterizaron químicamente 20 moléculas nuevas. De éstas, cuatro de ellas (120, 114, 122 y 121) poseen actividad antibiofilm de amplio espectro en las tres especies bacterianas. Además se describe una variada gama de actividades antibiofilm en las diferentes bacterias, algunas de estas moléculas poseen actividad antibiofilm mejor que los antibióticos de referencia. Por otro lado, se ensayó la toxicidad inespecífica de las moléculas activas, las que resultaron selectivamente tóxicas para la formación de biofilm. Finalmente se puede decir que estas moléculas son prototipos novedosos para el desarrollo de nuevos antibióticos de amplio espectro con inhibición en la formación de biofilms.

7. Bibliografía

- Anderson, G. G., & O'Toole, G. a. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 85–105.
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445–459.
- Banday, A. H., Zargar, M. I., & Ganaie, B. A. (2011). Synthesis and antimicrobial studies of chalconyl pregnenolones. *Steroids*, 76(12), 1358–1362.
- Banday, Abid H et al. 2010. "Studies on Novel D-Ring Substituted Steroidal Pyrazolines as Potential Anticancer Agents." *Steroids*: 3–7.
- Banu, A., Mohammad, M., Hassan, N., Rajkumar, J., & Srinivasa, S. (2015). Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation : A prospective study What this study adds :, 8(9), 280–285.
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426.
- Catheters, O. F., Williams, G. J., & Stickler, D. J. (2013). Some Observations on the Migration of *Proteus mirabilis* and Other Urinary Tract Pathogens Some Observations on the Migration of *Proteus mirabilis* and Other Urinary Tract Pathogens Over Foley Catheters, 29(5), 443–445.
- Choudhary, M. et al. 2011. "Pregnenolone Derivatives as Potential Anticancer Agents." *Steroids* 76(14): 1554–59.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2(2), 114–22.
- Deligianni, E., Pattison, S., Berrar, D., Ternan, N. G., Haylock, R. W., Moore, J. E., ... Dooley, J. S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. *BMC Microbiology*, 10, 38.
- Donlan, R. M., Costerton, J. W., Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology*, 15(2), 167–193.
- Eyal, Z., Matzov, D., Krupkin, M., Wekselman, I., Paukner, S., Zimmerman, E., ... Yonath, A. (2015). Structural insights into species-specific features of the ribosome from the pathogen *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), E5805-14.

- Fernández, L., Hancock, R. E. W., Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance : Role of Porins and Efflux Pumps, *25*(4), 2013.
- Fernebro, J. (2011). Fighting bacterial infections - Future treatment options. *Drug Resistance Updates*, *14*(2), 125–139.
- Figuroa-valverde, L., Díaz-cedillo, F., López-ramos, M., Garcia-cervera, E., Torres-cruz, R., & Reyna-moo, J. (2010). Antimicrobial activity of pregnenolone-carbamazepine complex on *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *E. coli* ., *4*(1), 2–7.
- Gómez, J., Alcántara, M., Simarro, E., Martínez, B., Ruiz, J., Guerra, B., ... Valdés, M. (2002). Original Bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa* :, *15*(Nº 4), 360.
- Gopal, R., Lee, J. H., Kim, Y. G., Kim, M. S., Seo, C. H., & Park, Y. (2013). Anti-microbial, anti-biofilm activities and cell selectivity of the NRC-16 peptide derived from witch flounder, *Glyptocephalus cynoglossus*. *Marine Drugs*, *11*(6), 1836–1852.
- Hoffman, L. R., Deziel, E., D'Argenio, D. A., Lepine, F., Emerson, J., McNamara, S., ... Miller, S. I. (2006). Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *103*(0027–8424 (Print)), 19890–19895.
- Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, *387*(10014), 176–187.
- Jacobsen, S. M., & Shirtliff, M. E. (2011). *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *2*(5), 460–465.
- Kakati, Dwipen et al. 2013. "Rapid Microwave Assisted Synthesis and Antimicrobial Bioevaluation of Novel Steroidal Chalcones." *Steroids* *78*(3): 321–26.
- Lehar, S. M., Pillow, T., Xu, M., Staben, L., Kajihara, K. K., Vandlen, R., ... Mariathasan, S. (2015). Novel antibody–antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*, *527*(7578), 323–8.
- Lewis, K. I. M., Lewis, K. I. M., Suspects (2001). Riddle of Bio Im Resistance. *Society*, *45*(4), 999–1007.
- Li, K., Diao, Y., Zhang, H., Wang, S., Zhang, Z., Yu, B., ... Yang, H. (2011). Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *11*(1), 86.
- Lone, I. H., Khan, K. Z., Fozdar, B. I., & Hussain, F. (2013). Synthesis antimicrobial and antioxidant studies of new oximes of steroidal chalcones.

Steroids, 78(9), 945–50.

- Mohareb, R. M., & Al-Omran, F. (2012). Reaction of pregnenolone with cyanoacetylhydrazine: novel synthesis of hydrazide-hydrazone, pyrazole, pyridine, thiazole, thiophene derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids*, 77(14), 1551–9.
- Mohareb, R. M., Wardakhan, W. W., Elmegeed, G. A., & Ashour, R. M. S. (2012). Heterocyclizations of pregnenolone: Novel synthesis of thiosemicarbazone, thiophene, thiazole, thieno[2,3-b]pyridine derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids*, 77(14), 1560–1569.
- Park, S. C., Park, Y., & Hahm, K. S. (2011). The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5971–5992.
- Pavan, Fernando R. et al. 2010. “Thiosemicarbazones, Semicarbazones, Dithiocarbazates and Hydrazide/hydrazones: Anti - Mycobacterium Tuberculosis Activity and Cytotoxicity.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 45(5): 1898–1905.
- Piersigilli, A. L., Enrico, M. C., Bongiovanni, M. E., Bilbao, L. E., Martínez, G., & Ledesma, E. M. (2009). Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de β -lactamasa de espectro extendido en un centro privado de Córdoba. *Revista Chilena de Infectología*, 26(4), 331–335.
- Potterat, O., & Hostettmann, K. (2007). 143 . Boophiline , an Antimicrobial Sterol Amide from the Cattle Tick *Boophilus microplus*, 80(1997), 2066–2072.
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30(2), 285–293.
- Simonetta SH, Golombek DA (2007) An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J Neurosci Methods*, 161(2), 273-280.
- Jones C, Allsopp L, Horlick J, Kulasekara H, Filloux A. (2013) Subinhibitory concentration of kanamycin induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system. *PLoSOne*. 8(11), e81132.
- Rogers, G. B., Carroll, M. P., & Bruce, K. D. (2012). Enhancing the utility of existing antibiotics by targeting bacterial behaviour? *British Journal of Pharmacology*, 165(4), 845–857.
- Samira, H., & Fereshteh, E. (2015). Biofilm formation and β -lactamase production in burn isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(3).
- Scavone, P., Iribarnegaray, V., Caetano, A. L., Schlapp, G., Härtel, S., &

- Zunino, P. (2016). Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *Pathogens and Disease*, 74(5), ftw033.
- Schlapp, G., Scavone, P., Zunino, P., & Härtel, S. (2011). Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach. *Journal of Microbiological Methods*, 87(2), 234–240.
- Seo, Y. S., Lee, D. Y., Rayamahji, N., Kang, M. L., & Yoo, H. S. (2008). Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Research in Veterinary Science*, 85(3), 433–438.
- Strateva, T., & Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of Microbiology*, 61(4), 717–732.
- Trautner, B. W., & Darouiche, R. O. (2004). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American Journal of Infection Control*, 32(3), 177–183.
- Yu, W., He, Z., & Huang, F. (2015). Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Isolated From Newly Weaned Infant Rhesus Monkeys and Ferrets, 8(6), 8–10.
- Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Giordani, R. B., Conceição, J. M., Nicastro, G. G., Boechat, A. L., ... Termignoni, C. (2013). A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. *Environmental Microbiology*, 15(7), 2008–18.
- Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Nicastro, G. G., Baldini, R. L., & Termignoni, C. (2013). Egg wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(5), 366–376.
- Zimmer, K. R., Seixas, A., Conceição, J. M., Zvoboda, D. A., Barros, M. P., Tasca, T., ... Termignoni, C. (2013). Cattle tick-associated bacteria exert anti-biofilm and anti-*Trichomonas foetus* activities. *Veterinary Microbiology*, 164(1–2), 171–6.
- Zimmer, K. R. (2012). Atividade antibiofilme e antibiótica da cera dos ovos e de metabólitos produzidos por bactérias associadas ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Atividade antibiofilme e antibiótica da cera dos ovos e de metabólitos produzidos por bactérias.