

## Síntesis y actividad antibacteriana de benzazolilisotiourea carboxilatos de sodio derivados de aminoácidos

Cruz Alejandro<sup>1\*</sup>, Guerrero Muñoz Gerardo<sup>1</sup>, Ariza Ortega Teresita de Jesús<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional-UPIBI, Departamento de Ciencias Básicas,  
Av. Acueducto s/n Barrio la Laguna Ticomán, México, D.F. CP 07340.

<sup>2</sup>Universidad Politécnica de Huatusco  
Avenida 1, # 728, Huatusco Veracruz, México, CP 94100.

\*alcralmx@hotmail.com

Fecha de aceptación: 30 de Julio de 2015

Fecha de aceptación: 23 de Septiembre de 2015

### RESUMEN

En esta investigación reportamos la síntesis de una serie de benzazolilisotioureacarboxilatos de sodio derivados de aminoácidos y el estudio de su actividad como antimicrobianos. El procedimiento de síntesis es por el uso de un equivalente molar del correspondiente intermediario ditiometilcarboimidatobenzazol **2** por reacción con un equivalente molar del correspondiente aminocarboxilato de sodio derivados de aminoácidos quirales en agitación por 48 horas a temperatura ambiente. La reacción procede por ataque nucleofílico del grupo amina del aminocarboxilato sobre el grupo carboimato, provocando el desplazamiento de una molécula de HSMe. Las estructuras de las isotiureas carboxilatos **3** obtenidas se asignaron por Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. De los experimentos como antimicrobianos, se observa que las isotioureacarboxilatos de sodio en general de ambos benzazoles tienen actividad antimicrobiana contra ambas cepas fitopatógenas *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora* (Gram negativo).

**Palabras clave:** 2-aminobenzazoles; ditiometilcarboimidatobenzazoles; benzazolil-Smetil-isotiourea carboxilatos, actividad antimicrobiana.

### ABSTRACT

In this investigation, we report the synthesis of sodium salts of benzothiazolisothiurea carboxylates **3** derived from 2-aminobenzazoles **1** and its antimicrobial biological activity. The procedure we follow was by the use of one molar equivalent of the corresponding dithiomethylcarboimidatebenzazoles **2** as intermediate, which reacts with one molar equivalent of the corresponding sodium salt of the aminocarboxylate in stirring ethanol 48 hours at room temperature. The reaction proceeds by nucleophilic attack of the amines on the carboimidate group to force the leave of HSMe molecule. The structures of isothioureacarboxylates **3** were assigned by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance. The results of biological activity analysis, in general, it was observed the isothioureacarboxylates **3** derived from both benzazoles shows antimicrobial activity to both fitopatogens bacterias *Pectobacterium carotovorum* and *Erwinia amylovora* (Gram negativos).

**Key words:** 2-aminobenzazoles; dithiomethylcarboimidatebenzazoles; benzazolyl-Smethyl-isothiurea carboxylates, antimicrobial activity.

## INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 60 se sabe que compuestos derivados de benzazoles, poseen actividad farmacológica como anti-virales (Akihama *et al*, 1968), anti-bacterianos (Russo y Santagati, 1976), anti-microbianos (Hutchinson *et al*, 2001; Bhusari *et al*, 2001; Gopkumar *et al*, 2001; Ojha *et al*, 2002), fungicidas (Singh y Seghal, **1988**), anti-alérgicos (Musser, *et al*, 1984), anti-diabéticos (Pattan *et al*, 2005), anti-tumorales (Yoshida M *et al*, 2005), anti-inflamatorios (Paramashivappa *et al*, 2003) y anti-helmínticos (Ghoneim, 1988 y Nargund, 1999).

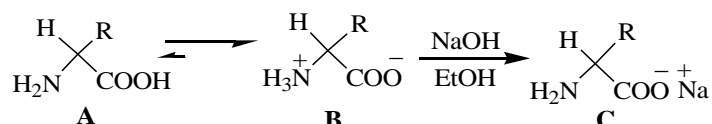
Desde esa fecha y hasta nuestros días se ha tenido un interés continuo en esta clase de compuestos y se han hecho muchos esfuerzos para sintetizar varios compuestos heterocíclicos derivados de benzazoles. Algunos compuestos de este tipo presentaron poseer actividades como anti-convulsivos (Amit, *et al*, 2000; Siddiqui y Alam *et al*, 1999) y anti-oxidantes (Valko *et al*, 2006; Venkat Ratnam *et al*, 2006; Süzen, 2007).

En vista de la importancia de los compuestos derivados de benzazoles, en este trabajo se reporta un método para sintetizar benzazolilisotiureas derivadas de aminoácidos a partir del 2-aminobenzotiazol **1a** y 2-aminobenzimidazol **1b** como materiales de partida, esquema 2.

## METODOLOGÍA y RESULTADOS de la SÍNTESIS

Se utilizan como intermediarios los ditiometilcarboimidatobenzazoles **2**, los cuales se obtienen por reacción del correspondiente 2-aminobenzazol **1** con NaOH, CS<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>I, esquema 1 (Merchant *et al*, 1982). Se sabe que la reactividad de los compuestos **2** se deben a la facilidad con que se desplazan 2 moléculas de HSMe por el uso de aminas alifáticas y aromáticas para obtener Smetilisotiureas y guanidinas (Merchant *et al*, 1982, 1985, 1987; Cruz *et al*, 2004, 2007).

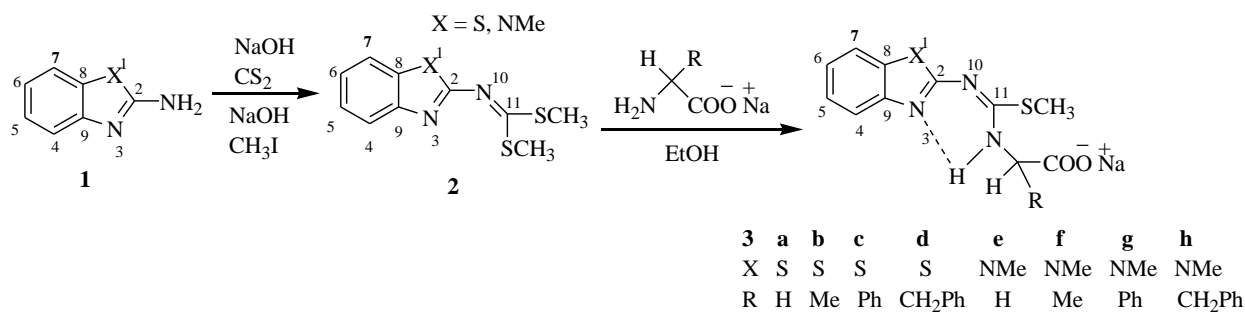
En este caso, se utilizaron cuatro aminoácidos R = H (glicina)(a), Me (alanina)(b), Ph (fenilglicina)(c), CH<sub>2</sub>Ph (fenilalanina)(d), los cuales existen en su forma natural como zwitterión **B**, esquema 1. Para que estos aminoácidos actúen como aminas, se transformaron a su forma de aminocarboxilatos de sodio **C** por reacción de **B** con un equivalente de hidróxido de sodio en agitación de etanol por 2 horas a temperatura ambiente.



Esquema 1.- Transformación de los aminoácidos a aminocarboxilatos de sodio

En el mismo sistema que contiene al aminocarboxilato **C**, se adiciona un equivalente del correspondiente ditiometilcarboimidatobenzazol **2** y se agita durante 48 horas a temperatura ambiente. En estas condiciones, la reacción procede con la precipitación de los respectivos carboxilatos de sodio de las benzotiazolilis-metilisotiureas **3**, los cuales se filtran y se lavan con acetona.

Las S-metilisotiureacarboxilatos **3a-d** presentan un singulete del grupo SCH<sub>3</sub> en 2.32-2.44 ppm en una relación 3:4 con respecto de los hidrógenos aromáticos (tabla 1), además un singulete ancho en 10.65-11.44 ppm característico del átomo hidrógeno NH del aminoácido, que forma una interacción por puente de hidrógeno con el átomo de nitrógeno del benzazol, esquema 2. En los espectros de RMN de <sup>13</sup>C de los S-metilisotiureacarboxilatos **3e-h** derivados del benzimidazol se observa que los desplazamientos químicos de estos compuestos no tienen un cambio significativo con respecto de los S-metilisotiureacarboxilatos **3a-d** derivados del benzotiazol, con excepción del grupo NCH<sub>3</sub> que se encuentra en 3.75-3.83 ppm (RMN <sup>1</sup>H, tabla 3) y 45-53 ppm (RMN <sup>13</sup>C, tabla 4). La señal de los carbonos carbonílicos se presentan en aproximadamente 169-171 ppm.



Esquema 2. Síntesis de *S*-metilisotioureacarboxilatos **3a-d** derivados del benzotiazol y **3e-f** derivados del benzimidazol

Tabla 1. RMN de <sup>1</sup>H de los compuestos **3a-d**

Comp.	H4	H5	H6	H7	NH	SCH <sub>3</sub>	H14a	R14a
<b>3a</b>	7.79	7.33	7.18	7.58	10.65	2.44	3.63	3.63
<b>3b</b>	7.75	7.31	7.18	7.63	11.00	2.42	3.92	1.38
<b>3c</b>	7.80	7.32	7.18	7.64	11.44	2.32	4.80	7.2-7.3
<b>3d</b>	7.76	7.32	7.18	7.54	10.74	2.36	4.12	3.1, 7.2

Tabla 2. RMN de <sup>13</sup>C de los compuestos **3a-d**

Comp.	C2	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C11	SCH <sub>3</sub>	NC	C=O	R
<b>3a</b>	163.6	126.1	123.4	121.6	120.4	131.9	151.8	171.3	14.1	48.1	169.4	-
<b>3b</b>	163.2	126.1	123.5	121.5	120.6	131.8	151.7	174.1	13.9	54.9	171.3	20.5
<b>3c</b>	163.6	126.1	123.5	121.7	120.6	131.9	151.9	171.3	14.1	63.9	169.8	139.7
<b>3d</b>	164.4	126.1	123.5	121.6	120.4	131.6	151.6	172.5	14.0	61.2	171.3	56.5

Tabla 3. RMN de <sup>1</sup>H de los compuestos **3e-h**

Comp.	H4	H5	H6	H7	NH	SCH <sub>3</sub>	H14a	R14a	NCH <sub>3</sub>
<b>3e</b>	7.7 2	7.3 4	7.2 1	7.69		2.55	4.23	4.23	3.83
<b>3f</b>	7.7 2	7.3 7	7.2 5	7.69	11.20	2.54	4.49	1.61	3.81
<b>3g</b>	7.8 0	7.4 0	7.2 4	7.72	12.05	2.50	5.47	7.2-7.3	3.79
<b>3h</b>	7.7 0	7.3 7	7.2 0	7.66	11.22	2.36	4.70	3.3, 7.2	3.75

**Tabla 4.** RMN de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **3e-h**

Comp.	C2	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C11	SCH <sub>3</sub>	N C	C=O	R	N C H
<b>3e</b>	164.8	125.6	123.3	121.0	120.6	132.2	151.0	171.7	14.1	52.7	169.1	-	45.0
<b>3f</b>	164.0	125.6	123.3	121.0	120.7	132.1	151.0	171.7	14.0	52.8	172.3	19.3	52.3
<b>3g</b>	164.0	125.7	123.4	121.0	120.8	132.1	151.0	171.6	14.2	60.6	170.2	136.1	53.0
<b>3h</b>	164.2	125.6	123.3	121.0	120.6	132.2	151.0	171.5	14.2	58.2	171.1	39.1	52.6

### Metodología de la actividad antimicrobiana

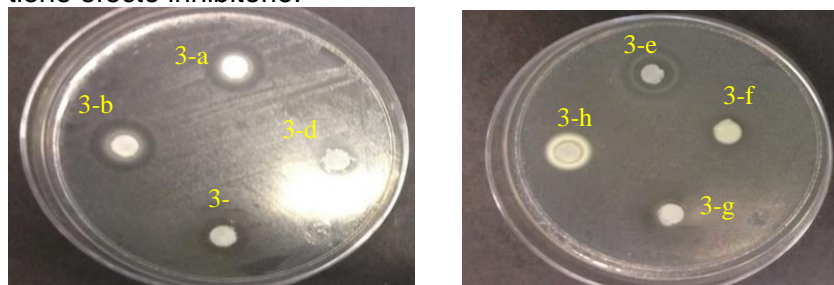
El efecto antibacterial fue determinado por la técnica de Kirby-Bauer (Koneman *et al*, 2004). Las bacterias fitopatógenas (*Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum*) se reactivaron en agar Müller Hinton (AMH) y después en solución salina (0.9%) a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC por comparación óptica con tubo a 0.5 de la escala nefelométrica de Mc Farland (Koneman *et al* 2004). Se tomó una muestra de cada bacteria con un hisopo estéril y se sembró en cajas Petri con AMH de manera uniforme. Se colocaron sensidiscos, previamente impregnados con las correspondientes isotioureacarboxilatos **3** a una concentración de 8 mg/mL. Se colocaron sensidiscos con cloranfenicol a 30  $\mu\text{g}$  como controles positivos y agua como control negativo. Después de 24h de incubación a  $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , se midieron los halos de inhibición.

### Resultados de la actividad antimicrobiana

**Tabla 5:** Halos de inhibición de isotioureacarboxilatobenzazoles (8 mg/mL) contra *Pectobacterium carotovorum* (Gram negativo (-)).

Compuesto	Halo de inhibición (mm)	Compuesto	Halo de inhibición (mm)	Cloranfenicol
<b>3-a</b>	$14.56 \pm 1.48$	<b>3-e</b>	$17.46 \pm 0.04$	$32.6 \pm 0.05$
<b>3-b</b>	$11.76 \pm 0.95$	<b>3-f</b>	$11.53 \pm 0.11$	$32.6 \pm 0.05$
<b>3-c</b>	$13.96 \pm 0.82$	<b>3-g</b>	$12.76 \pm 2.75$	$32.6 \pm 0.05$
<b>3-d</b>	NI	<b>3-h</b>	$20.43 \pm 1.24$	$32.6 \pm 0.05$

Nota: los halos de inhibición son el promedio de tres repeticiones  $\pm$  el error de la media (ESM), NI: No tiene efecto inhibitorio.

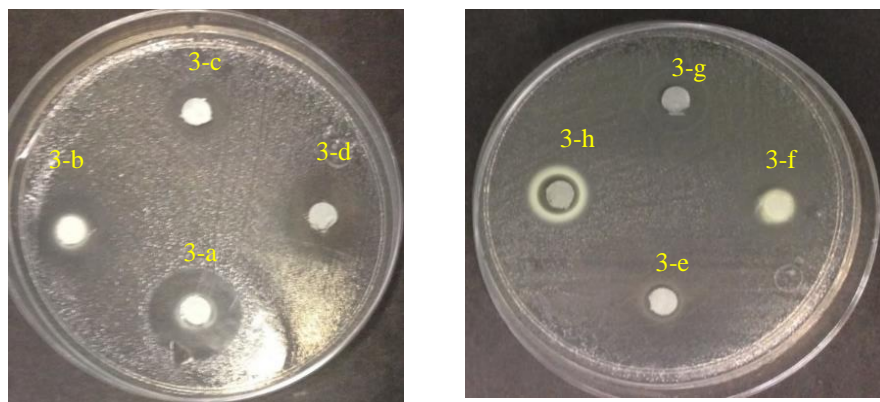


**Figura 1:** Actividad antimicrobiana de isotioureacarboxilatos de benzazoles sobre *P. carotovorum* *E. amylovora*.

**Tabla 6:** Halos de inhibición de isotioureacarboxilatobenzazoles (8 mg/mL) contra *Erwinia amylovora* (Gram negativo (-)).

Compuesto	Halo de inhibición (mm)	Compuesto	Halo de inhibición (mm)	Cloranfenicol
<b>3-a</b>	17.6 ± 3.26	<b>3-e</b>	11.2 ± 3.33	35 ± 0.0
<b>3-b</b>	10 ± 0.66	<b>3-f</b>	NI	35 ± 0.0
<b>3-c</b>	14.53 ± 1.28	<b>3-g</b>	8.03 ± 0.37	35 ± 0.0
<b>3-d</b>	NI	<b>3-h</b>	16.46 ± 0.64	35 ± 0.0

Nota: los halos de inhibición son el promedio de tres repeticiones ± el error de la media (ESM), NI: No tiene efecto inhibitorio.



**Figura 2:** Actividad antimicrobiana de isotioureacarboxilatos de benzazoles contra *E. amylovora*.

De las tablas 5 y 6 se observó que en general las isotioureacarboxilatos de sodio de ambos benzazoles tienen actividad antimicrobiana contra ambas cepas fitopatógenas, el compuesto **3-d** derivado de fenilalanina del benzotiazol no presentó actividad contra ambas cepas, de igual forma el compuesto **3-f** derivado de alanina del bencimidazol no presentó actividad frente a la bacteria *Erwinia amylovora*. Todos los halos expresados en el ensayo con ambas bacterias fitopatógenas presentaron resistencia por tener una zona de inhibición con diámetro menor de 25 mm.

Para que los compuestos evaluados como antimicrobianos alcancen su diana deben atravesar la cubierta bacteriana, salvo cuando la diana es la propia envoltura externa de los gramnegativos. Las bacterias gramnegativos ofrecen mayor resistencia que las Gram positivas a la entrada de antimicrobianos, pues poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de peptidoglucano. Esa membrana es una bicapa lipídica que, a diferencia de las membranas eucariotas, contiene lipolisacárido, y desempeña un importante papel de barrera frente a determinados antimicrobianos (Koneman *et al.*, 2004). En la misma existen un gran número de proteínas, que representan en torno al 40% de su peso total, entre las cuales se encuentran las porinas, proteínas triméricas o monoméricas que forman conductos o poros hidrófilos que permiten el acceso al peptidoglucano. A través de estos poros difunden de forma pasiva pequeñas moléculas hidrofílicas (menores de 600 Da), pero se impide el paso de otras mayores, por ejemplo los glucopéptidos (peso molecular >1.000 Da). Por el contrario, los antibióticos más lipofílicos difunden a través de la bicapa lipídica, y algunos utilizan un mecanismo de transporte con gasto de energía.

Entre las posibles sitios de acción que puedan participar los compuestos evaluados para ejercer una acción antimicrobiana se tiene categorizado que un antimicrobiano puede actuar inhibiendo la síntesis

de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos. Además el efecto del antimicrobiano se clasifica tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano). En este caso, todos los compuestos son bactericidas ya que los ensayos se mantuvieron durante dos meses sin ningún cambio de diámetro en la zona de inhibición, por lo tanto la bacteria no ha sido capaz de invadir dicha zona tratada por difusión del compuesto en el medio sólido; en este sentido los bactericidas por lo general actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos (Nikaido, 2003).

## CONCLUSIONES

Los aminoácidos neutros se hicieron reaccionar con hidróxido de sodio para ser transformados a los correspondientes carboxilatos de sodio para tener el grupo amina libre. Para obtener las benzazolil-isotiourea carboxilatos de sodio, la reacción se realizó en agitación de etanol por 24 horas a temperatura ambiente, con una lenta eliminación de una molécula de tiometanol. Los carboxilatos son insolubles en acetona, por lo que esta se usa para su purificación.

Con base en el análisis de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de estos compuestos, se demuestra la presencia de una interacción intramolecular por puente de hidrógeno con el átomo de nitrógeno del anillo del benzazol.

El estudio de la actividad biológica de estos carboxilatos, mostró tener actividad antimicrobiana frente a las dos bacterias fitopatógenas (*Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum*).

## REFERENCIAS

- Amit, B.N., Kamath, R.V. and Khadse, G.B. (2000). *Indian J. Heterocycl. Chem.*, 9, 309.
- Akihama S, Okhude M, Mizno A, Meiji Yakka, Diagakn Kenkyu Kiyu. (1968). *Chem Abstr*, 68: 10369v.
- Bhusari, S.R., Pawar, R.P., and Vibute Y.B., (2001). *Indian J. Heterocycl. Chem.*, 11, 79.
- Cruz, A.; Gayosso, M.; Contreras, R. Syntheses of optically active 2-(2-benzothiazoly-limino)-heterazolidines. *Heteroat. Chem.* 2001, 12, 586–593.
- Cruz, A.; Padilla-Martínez, I.I.; García-Báez, E.V. (2012) a synthetic method to access symmetric and non-symmetric 2-(N,N'-disubstituted)guanidinebenzothiazoles. *Molecules*, 17, 10178–10191.
- Cruz, A.; Padilla-Martínez, I.I.; García-Báez, E.V.; Juárez-Juárez, M. (2008). S-Methyl(-N-aryl and -N-alkyl)isothioureas derived from 2-aminobenzothiazole. *ARKIVOC*, v, 200–209.
- Garín, J.; Meléndez, E.; Merchan, F.L.; Ortíz, D.; Tejero, T. (1985). Facile synthesis of 8-aryl-aminoand 8-hetarylamino purines and their 1- and 3-deaza analogs. *Synthesis*, doi:10.1055/s-1985-35505.
- Ghoneim, K.M., Essawi, M.YH., Mohamed, M.S., and Kamal, A. M. (1998). *Indian J. Chem.*, 37B, 904.
- Gopkumar. P., Shivakumar, B., Jayachandran, E., Nagappa, A.N., Nargund, L.V.G., and Gurupadaiah, B.M. (2001). *Indian J. Heterocycl. Chem.*, 11, 39.

- Hutchinson I, Chua MS, Browne HL, Trapani V, Bradshaw TD, Westwell AD et al. (2001). *J Med Chem*; 44: 1446.
- Komeman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G. y Screckenberger, P. (2004). Diagnóstico microbiológico. Editorial Medica-Panamericana. 5a. Edición. Argentina. pp. 565-620.
- Martínez-Martínez, L. (2008). Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos. *Enf. Infecc. Microbiol. Clin.*, 26, 481-484.
- Merchán, F.; Garín, J.; Meléndez, E.; Tejero, T. (1982). 2-(2-Benzimidazolylamino)-benzothiazoles and 2-(2-Imidazolidinylidenamino)-benzothiazoles. *Synthesis*, doi:10.1055/s-1982-30068.
- Musser JH, Brown RE, Love B, Baily K, Jones H, Kahen R, et al. (1984). *J. Med Chem*; 27: 121.
- Merchan, F.L.; Garín, J.; Meléndez, E.; Tejero, T. (1987). a facile synthesis of 2-(2-benzothiazolyl-amino)-1,3-heterazoles. *Synthesis*, doi:10.1055/s-1987-27946.
- Nargund, L.V.G. (1999). *Indian Drugs*, 36, 137.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 593-656.
- Ojha, K.G., Jaisinghani, N. and Tahiliani, H., (2002). *J. Indian Chem. Soc.*, 79, 191.
- Singh SP, Seghal S. (1988). *Indian J Chem.* 27 B: 941.
- Pattan SR., Suresh C, Pujar VD, Reddy VVK, Rasal VP, Kotti BC. (2005). *Indian J Chem*; 4B: 2404.
- Paramashivappa, R., Kumar, P.P., Rao, S.P.V. and Rao, S., (2003). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 657.
- Russo F, Santagati M. (1976). *Farmaco Ed Sci*; 31: 41.
- Siddiqui N, Alam M. (2004). *Ind J Het Chem*; 13: 361.
- Süzen S., (2007). *Top. Heterocycl. Chem.*, 11, 145–178.
- Valko C. J., Rhodes J., Moncol M., Izakovic M. and Mazur M., (2006). *Chemico Biol. Int.*, 160, 1–40.
- Venkat Ratnam D., Ankola D.D., Bhardwaj V., Sahana D.K. and Ravi Kumar M.N.V., (2006). *J. Control. Release*, 113, 189–207.
- Yoshida M, Hayakawa I, Hyashi N, Agatsuma T, Oda Y, Tanzawa F et al. (2005). *Bioorg Med Chem Letters*; 15: 3328.