PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, NATURALES Y AMBIENTALES

CARRERA DE QUÍMICA

Actividad antimicrobiana y mecanismos de acción de derivados de fenazina bromados

Monografía previa a la obtención del título de: Química

JESSICA MIKAELA EGAS BRUSSIL

Quito, 2026

Certifico que la monografía de Química del Srta. Jessica Mikaela Egas Brussil ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Amanda Sofia Cevallos Vallejo
Time Stamping Security Data

Amanda Cevallos

Tutora de la monografía

Quito, 19 de junio de 2026

TABLA DE CONTENIDO

1 RESUMEN 1

2 ABSTRACT 3

3 INTRODUCCIÓN 5

4 OBJETIVOS 8

4.1 OBJETIVO GENERAL 8

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 8

5 FUNDAMENTO TEÓRICO 9

5.1 ANTECEDENTES 9

5.2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA (RAM) 10

5.2.1 DEFINICIÓN Y MAGNITUD GLOBAL DE LA RAM 10

5.2.2 PATÓGENOS PRIORITARIOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA 11

5.3 FUNDAMENTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LAS FENAZINAS 13

5.3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y VERSATILIDAD ELECTRÓNICA 13

5.3.2 ORIGEN Y OBTENCIÓN: FENAZINAS NATURALES, CLASIFICACIÓN Y RUTA SINTÉTICA (WOHL-AUE) 14

5.3.3 EL ROL BIOLÓGICO NATURAL: HIERRO Y SEÑALIZACIÓN 16

5.3.4 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS FENAZINAS NO HALOGENADAS 18

5.4 LA BROMACIÓN Y LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (SAR) 19

5.4.1 EL REQUISITO CRÍTICO DEL GRUPO HIDROXILO EN C-1 19

5.4.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DERIVADOS BROMADOS 21

5.4.3 EL ENLACE HALÓGENO (HALOGEN BONDING): NATURALEZA FÍSICA Y RELEVANCIA FARMACOLÓGICA 22
5.4.4 INFLUENCIA DE LA BROMACIÓN EN LA POTENCIA 23
5.4.5 CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA DE DERIVADOS HP POR TIPO, NÚMERO Y POSICIÓN DE HALÓGENO 25
5.4.6 COMPARACIÓN ENTRE HALÓGENOS EN LA SAR: BROMO, CLORO Y GRUPO TRIFLUOROMETILO 26
5.5 MECANISMOS AVANZADOS Y ERRADICACIÓN DE BIOPELÍCULA 27
5.5.1 MECANISMOS DE ACCIÓN INTEGRADO DE LAS HPs BROMADAS 27
5.5.2 ACTIVIDAD DE LAS HP BROMADAS CONTRA CÉLULAS PERSISTENTES Y BIOPELÍCULAS DE MRSA, MRSE Y VRE 29
5.5.3 ACTIVIDAD CONTRA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS REPLICANTE Y DURMIENTE 30
5.5.4 EL DERIVADO HP-8: PERFIL DE ACTIVIDAD DEL ANÁLOGO CON GRUPO TRIFLUOROMETILO 31
5.5.5 LIMITACIONES ACTUALES: AUSENCIA DE DATOS IN VIVO, FARMACOCINÉTICA Y ESTUDIOS CLÍNICOS 32

6 CONCLUSIONES 35

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 38

8 FIGURAS 40

9 TABLAS 42

10 ANEXOS 45

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 SISTEMA DE NUMERACIÓN POSICIONAL DEL NÚCLEO DE LA FENAZINA ADAPTADA DE HIUGENS ET AL., 2019. 40

FIGURA 2 PÉRDIDA DE LA ACTIVIDAD DE ERRADICACIÓN DE BIOPELÍCULAS TRAS LA SUSTITUCIÓN DE LOS ÁTOMOS DE CLORO POR BROMO EN LAS POSICIONES 7 Y 8 ADAPTADA DE DE GARRISON ET AL., 2016. 40

FIGURA 3 AUSENCIA DE ACTIVIDAD DE ERRADICACIÓN DEL DERIVADO BENCENOFENAZÍNICO DIBROMADO CON ANILLO AROMÁTICO FUSIONADO EN LAS POSICIONES 7 Y 8 ADAPTADA DE GARRISON ET AL., 2016. 40

FIGURA 4 RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LAS FENAZINAS HALOGENADAS ERRADICADORAS DE BIOPELÍCULAS Y DISEÑO RACIONAL DE ANÁLOGOS ADAPTADA DE HUIGENS ET AL. (2019). 41

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 CLASIFICACIÓN DE DERIVADOS REPRESENTATIVOS DE HPS SEGÚN NÚMERO, POSICIÓN Y TIPO DE HALÓGENO, Y SU ESPECTRO DE ACTIVIDAD..... 42

TABLA 2 MBEC* DE HP-4 VS. VANCOMICINA Y EDTA 44

1 RESUMEN

La resistencia antimicrobiana ha reducido la eficacia de los tratamientos convencionales y ha intensificado la búsqueda de agentes con mecanismos de acción novedosos, entre los que destacan las fenazinas, metabolitos heterocíclicos con marcada actividad redox. La presente monografía analizó la influencia de la bromación en derivados de la fenazina mediante una comparación bibliográfica de su actividad antimicrobiana, con el fin de evaluar su potencial farmacológico. Para ello se empleó un enfoque cuantitativo de diseño descriptivo, basado en el análisis documental de la literatura científica disponible, contrastando parámetros de actividad como la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima de erradicación de biopelícula entre derivados bromados y no bromados. Los resultados muestran que la bromación incrementa de forma sustancial la potencia antibacteriana, pero de manera dependiente del número y la posición de los sustituyentes. Mientras la 1-hidroxifenazina no halogenada resulta prácticamente inerte, la incorporación de bromo en C-2 y C-4 genera el derivado dibromado HP-1, hasta treinta y dos veces más potente que la piocianina. La actividad descansa en un mecanismo de privación de hierro que combina la penetración de membrana favorecida por la lipofilia con la quelación intracelular mediada por el hidroxilo en C-1, un motivo estructural indispensable. Este mecanismo, independiente de la replicación, permite a las fenazinas halogenadas erradicar células persistentes, biopelículas y el bacilo tuberculoso durmiente, escenarios donde los antibióticos de primera línea fracasan; el análogo HP-8 alcanza valores submicromolares y figura como el erradicador de biopelículas más potente reportado. Se concluye que la bromación confiere a esta clase un perfil terapéutico de primera clase frente a un problema clínico no resuelto, aunque su potencial sigue siendo preclínico, ya que la evidencia in vivo es tópica y limitada, y carece de caracterización farmacocinética y de estudios clínicos.

Palabras clave:

Erradicación de biopelículas, fenazinas bromadas, privación de hierro, relación estructura-actividad, resistencia antimicrobiana.

2 ABSTRACT

Antimicrobial resistance has eroded the efficacy of conventional treatments and intensified the search for agents with novel mechanisms of action, among which phenazines stand out as heterocyclic metabolites with marked redox activity. This monograph analyzed the influence of bromination on phenazine derivatives through a bibliographic comparison of their antimicrobial activity, with the aim of assessing their pharmacological potential. A quantitative approach of descriptive design was adopted, based on the documentary analysis of the available scientific literature, contrasting activity parameters such as the minimum inhibitory concentration and the minimum biofilm eradication concentration between brominated and non-brominated derivatives. The results show that bromination substantially increases antibacterial potency, although in a manner dependent on the number and position of the substituents. Whereas non-halogenated 1-hydroxyphenazine is virtually inert, the incorporation of bromine at C-2 and C-4 yields the dibrominated derivative HP-1, up to thirty-two times more potent than pyocyanin. This activity rests on an iron-deprivation mechanism that combines lipophilicity-driven membrane penetration with intracellular chelation mediated by the C-1 hydroxyl group, an indispensable structural feature. Being independent of replication, this mechanism enables halogenated phenazines to eradicate persister cells, biofilms, and the dormant tuberculosis bacillus, settings in which first-line antibiotics fail; the analogue HP-8 reaches submicromolar values and stands as the most potent biofilm-eradicating agent reported to date. It is concluded that bromination confers on this class a first-in-class therapeutic profile against an unresolved clinical problem, although its potential remains preclinical, as the available in vivo evidence is topical and limited, and it lacks pharmacokinetic characterization and clinical studies.

Keywords:

Antimicrobial resistance, biofilm eradication, brominated phenazines, iron deprivation, structure–activity relationship.

3 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la resistencia antimicrobiana (RAM) se ha posicionado como una de las crisis sanitarias más urgentes a nivel global, comprometiendo la eficacia de tratamientos convencionales y aumentando la mortalidad por infecciones comunes. A esta presión se suma un desajuste estructural en el desarrollo de fármacos, pues las bacterias adquieren nuevas resistencias con mayor rapidez de la que la industria logra introducir antibióticos con mecanismos de acción realmente novedosos. Ante este panorama, la búsqueda de nuevas moléculas con mecanismos de acción disruptivos ha llevado a la comunidad científica a reevaluar productos naturales de origen microbiano, destacando entre ellos a las fenazinas. Estos compuestos heterocíclicos nitrogenados poseen una versatilidad estructural notable y una capacidad para participar en procesos de óxido-reducción les otorga un potencial terapéutico único contra patógenos multirresistentes (Sousa et al., 2024). El presente estudio se enfoca en una modificación química específica que ha mostrado resultados prometedores y que consiste en la incorporación de átomos de bromo en el núcleo de la fenazina para potenciar su bioactividad.

El atractivo farmacológico de estas moléculas reside, en buena medida, en su arquitectura electrónica. Su núcleo tricíclico, plano y conjugado, les permite participar en transiciones redox reversibles, comportándose como mediadores de electrones en el entorno celular, propiedad de la que derivan muchas de sus actividades biológicas (Sousa et al., 2024; Yan et al., 2021). En la naturaleza, estas moléculas son producidas principalmente por bacterias de los géneros Pseudomonas y Streptomyces, para las cuales cumplen funciones ecológicas y de señalización (Huang et al., 2024). Es precisamente esa versatilidad electrónica, que gobierna su papel natural, la que, debidamente modulada por la química medicinal, abre la posibilidad de reorientar el esqueleto fenazínico hacia un uso antibacteriano dirigido contra patógenos de relevancia clínica.

La investigación sobre derivados sintéticos de fenazina ha evolucionado significativamente en la última década. Inicialmente, el interés se centró en las propiedades de fenazinas naturales como la piocianina, sin embargo, diversos estudios han demostrado que la halogenación estratégica puede alterar drásticamente el potencial farmacológico de la molécula. Específicamente, se ha identificado que la introducción de sustituyentes bromo en posiciones clave del anillo tricíclico puede incrementar la potencia antibacteriana hasta 32 veces en comparación con los compuestos base (Borrero et al., 2014). Asimismo, el bromo no contribuye únicamente por su volumen molecular, sino que su incorporación modifica de manera cuantificable propiedades fisicoquímicas determinantes para la actividad, lo que lo convierte en una herramienta deliberada del diseño de fármacos (Potapskyi et al., 2024). A pesar de estos hallazgos aislados, la literatura científica presenta una dispersión de datos sobre cómo la variación en el número y la ubicación de estos átomos de bromo modifica los mecanismos de acción subyacentes.

Esta observación conduce al planteamiento del problema central de esta investigación. Si bien existe evidencia de que los derivados bromados son altamente efectivos contra bacterias en estado planctónico y en biopelículas, no se dispone de una síntesis bibliográfica que compare de manera sistemática la influencia de la bromación en la eficacia antimicrobiana global. Por lo tanto, surge la siguiente interrogante: ¿De qué manera influye la bromación en los mecanismos de acción y la actividad antimicrobiana de los derivados de fenazina?, y ¿cuál es su verdadero potencial para el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos?

Para responder a esta pregunta, el objetivo general de esta monografía es analizar la influencia de la bromación en derivados de la fenazina, mediante una comparación bibliográfica de su actividad antimicrobiana, con el fin de evaluar su potencial farmacológico. Este propósito general se concreta en cuatro objetivos específicos, orientados a analizar la relación entre la estructura química de los derivados bromados y su mecanismo de acción,

clasificar la información bibliográfica de acuerdo con las propiedades químicas y farmacológicas de los compuestos, comparar los valores de actividad antimicrobiana reportados para derivados bromados y no bromados, y evaluar de manera crítica el vínculo entre la bromación y el potencial farmacológico de la clase. La importancia de este estudio radica en la necesidad de hallar alternativas terapéuticas que puedan erradicar biopelículas bacterianas, las cuales son responsables de la persistencia de infecciones crónicas. Como señalan Yang et al. (2017), las fenazinas halogenadas representan una de las pocas clases de antibióticos capaces de atacar células metabólicamente inactivas dentro de la matriz del biofilm, lo que justifica una evaluación profunda de sus relaciones estructura-actividad para guiar el diseño de futuros fármacos.

La metodología empleada para este análisis tiene un enfoque cuantitativo y un diseño descriptivo, fundamentado en la técnica de análisis documental. A través de una revisión sistemática de artículos científicos y reportes de laboratorio, se recopilarán datos estadísticos como la Concentración Mínima Inhibitoria para realizar comparaciones objetivas entre derivados bromados y no bromados. Este procedimiento garantiza que la evaluación del potencial farmacológico se base en evidencia empírica sólida y resultados validados por la comunidad científica internacional.

Finalmente, la monografía se organiza en cuatro capítulos principales. El primer capítulo comprende esta introducción, donde se presenta el problema y la ruta de investigación. El segundo capítulo desarrolla el marco teórico, profundizando en la química de las fenazinas. El tercer capítulo detalla el marco metodológico y los criterios de selección de la información. Por último, el cuarto capítulo presenta la comparación bibliográfica de los resultados, las conclusiones sobre la influencia de la bromación y las recomendaciones para futuras investigaciones en el área de la química medicinal.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la influencia de la bromación en derivados de la fenazina, mediante una comparación bibliográfica de su actividad antimicrobiana, con el fin de evaluar su potencial farmacológico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Analizar la relación entre la estructura química de los derivados de fenazina bromados y su mecanismo de acción antimicrobiano.

4.2.2 Clasificar la información bibliográfica sobre los derivados de fenazina bromados, de acuerdo con sus propiedades químicas y farmacológicas.

4.2.3 Comparar los valores de actividad antimicrobiana reportados para distintos derivados bromados y no bromados.

4.2.4 Evaluar la relación entre la bromación y el potencial farmacológico de los derivados de fenazina, a partir del análisis crítico de los resultados descritos previamente.

5 FUNDAMENTO TEÓRICO

5.1 ANTECEDENTES

La investigación farmacéutica se ha enfocado de manera creciente en la síntesis de análogos estructurales para optimizar la potencia y selectividad de las fenazinas. Una estrategia que ha demostrado ser particularmente exitosa es la halogenación. Se ha identificado que diversos derivados de fenazina bromados, como 2,4-dibromo-1-hidroxifenazina, poseen una potencia antibacteriana significativamente mayor que fenazinas no halogenadas como la piocianina, especialmente contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Borrero et al., 2014). Esta línea de investigación fue expandida por Yang et al., 2017, quienes desarrollaron una síntesis modular para crear una biblioteca de 20 fenazinas halogenadas, confirmando su potente actividad no solo contra bacterias planctónicas como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* resistentes a la meticilina, y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, sino también su notable capacidad para la erradicación de biopelículas.

Investigaciones más recientes, citadas por (Huang et al., 2024), han continuado validando esta estrategia, reportando derivados de fenazina bromados con potente bioactividad y capacidad para erradicar biopelículas de patógenos de alta relevancia clínica como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecium*. Adicionalmente, se han intensificado los estudios sobre sus mecanismos de acción. Sousa et al. (2024), han aportado a la determinación de cómo estos antibióticos inspirados en fenazinas bromadas interfieren con procesos celulares vitales. Esto demuestra su eficacia para erradicar infecciones tanto en estado planctónico como en biopelículas multirresistentes. A pesar de estos avances puntuales que demuestran la superioridad de los análogos bromados, aún es necesario un análisis bibliográfico comparativo y sistemático que, como persigue esta monografía, analice la influencia específica de la posición y número de

sustituyentes bromo en la actividad antimicrobiana y los mecanismos de acción, con el fin de evaluar su potencial farmacológico.

5.2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA (RAM)

5.2.1 DEFINICIÓN Y MAGNITUD GLOBAL DE LA RAM

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) corresponde a un fenómeno biológico en el cual las bacterias patógenas logran evadir de manera eficaz la acción de las terapias antibióticas convencionales durante el transcurso de una infección. Este comportamiento se asocia a la capacidad de las bacterias de desarrollar múltiples mecanismos de resistencia bien definidos para eludir los efectos farmacológicos (Xiao et al., 2020). Dichos mecanismos incluyen alteraciones en la química de la membrana celular que disminuyen la penetración del fármaco, la expulsión de los antibióticos mediante bombas de eflujo, la mutación de los sitios objetivo y la inactivación enzimática de las moléculas terapéuticas (Xiao et al., 2020).

Clínicamente, las bacterias patógenas plantean dos desafíos biomédicos bien diferenciados frente al tratamiento convencional, a saber, la resistencia a los antibióticos y la tolerancia a los mismos (Yang et al., 2017). Mientras que, las bacterias planctónicas, de división rápida y flotación libre, desarrollan resistencia a través de mutaciones genéticas específicas o la adquisición de determinantes de resistencia bajo presión selectiva (Huigens et al., 2019), las bacterias que entran en un estado metabólicamente durmiente o de no replicación exhiben una tolerancia innata que no está ligada a dichos mecanismos de resistencia (Huigens et al., 2019; Yang et al., 2017). Este último fenómeno es el fundamento de la formación de biofilms, los cuales son comunidades bacterianas adheridas a superficies y rodeadas por una matriz polimérica extracelular protectora (Yang et al., 2017). Los biofilms

albergan altas poblaciones de células persistentes inactivas que toleran concentraciones elevadas de agentes antimicrobianos, lo que anula la efectividad del arsenal antibiótico actual para atacar dianas de replicación rápida (Garrison et al., 2016).

A nivel global, la magnitud de la RAM representa una crisis de salud pública de proporciones críticas debido al incremento sostenido en la morbilidad y mortalidad humana (Liu et al., 2023; Xiao et al., 2020). Únicamente en los Estados Unidos, se registran anualmente cerca de 2.8 millones de casos de infecciones provocadas por bacterias resistentes, las cuales derivan de forma directa en más de 35,000 muertes por año (Yang et al., 2021). Asimismo, se estima que las infecciones crónicas y recurrentes causadas específicamente por la tolerancia de los biofilms bacterianos afectan a 17 millones de individuos y provocan más de 500,000 decesos cada año en territorio estadounidense (Garrison et al., 2016). De igual modo, patógenos persistentes y de lento crecimiento como *Mycobacterium tuberculosis* (MtB) agravan significativamente esta problemática, siendo responsables de la muerte de aproximadamente 1.5 millones de personas anualmente a escala mundial (Garrison et al., 2016). Las proyecciones epidemiológicas indican que, si no se desarrollan nuevas estrategias terapéuticas con urgencia, las infecciones por patógenos resistentes se convertirán en la principal causa de muerte para el año 2050, alcanzando una cifra estimada de 10 millones de fallecimientos anuales en todo el mundo (Liu et al., 2023).

5.2.2 PATÓGENOS PRIORITARIOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

Dentro de la categoría de patógenos prioritarios de espectro gram positivo de alto impacto clínico se encuentran *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina (MRSE), *Enterococcus faecium*

resistente a la vancomicina (VRE) y *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (MDR-TB) (Yang et al., 2017). Su selección como dianas prioritarias no es arbitraria, pues todos comparten la capacidad de adoptar fenotipos de baja o nula replicación que los vuelven intrínsecamente tolerantes al arsenal antibiótico convencional, independientemente de los mecanismos de resistencia adquirida que también puedan poseer.

A diferencia de la resistencia adquirida, la tolerancia innata no resulta de mutaciones ni de presión selectiva, sino del estado metabólicamente inactivo de las células en biopelícula. Tanto MRSA como VRE basan su tolerancia biológica en la formación de biopelículas, frente a las cuales los antibióticos de primera línea, vancomicina, daptomicina y linezolid, son incapaces de lograr la erradicación bacteriana, reportando concentraciones mínimas de erradicación de biopelícula (MBEC) superiores a los 2.000 µM (Garrison et al., 2016). El fracaso de estos agentes tiene una base mecanística precisa, puesto que todos fueron diseñados para inhibir procesos dependientes del crecimiento activo, síntesis de pared celular, síntesis proteica, replicación del ADN, dianas que están ausentes o inactivas en células metabólicamente dormidas (Huigens et al., 2019).

Mycobacterium tuberculosis comparte con las biopelículas esta característica fenotípica de persistencia y resistencia, al presentarse como un patógeno de crecimiento lento o no replicante que demanda terapias combinadas sumamente prolongadas (Garrison et al., 2016). Esta tolerancia se incrementa de forma drástica en el estado latente o durmiente del bacilo, donde las bacterias en latencia se vuelven más de 1000 veces más tolerantes a fármacos esenciales como la isoniazida y la rifampicina (Gao et al., 2025). Este patrón, compartido con las células persistentes de los patógenos estafilocócicos, establece un hilo

conductor entre los cuatro patógenos prioritarios y fundamenta la búsqueda de agentes con mecanismos de acción independientes del estado de replicación bacteriana.

5.3 FUNDAMENTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LAS FENAZINAS

5.3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y VERSATILIDAD ELECTRÓNICA

Las fenazinas constituyen una clase fundamental de compuestos heterocíclicos nitrogenados (Huang et al., 2024). Desde el punto de vista estructural, el núcleo básico corresponde a un sistema tricíclico formado por dos anillos bencénicos simétricos en torno a un anillo central de pirazina, denominado en conjunto pirazinodibenceno, 9,10-diazaantraceno o dibenzopyrazina (Sousa et al., 2024). La fórmula molecular del núcleo fenazínico sin sustituir es $C_{12}H_8N_2$, con un peso molecular de 180,21 g/mol, punto de fusión entre 171 y 176,5 °C, y un coeficiente de partición octanol-agua ($log\ K_{ow}$) de 2,84 (Sousa et al., 2024). Esta última característica refleja una lipofilicidad moderada que, como se verá, puede ser modulada de manera precisa mediante sustituciones estratégicas sobre el esqueleto. Su arquitectura molecular planar le confiere a las fenazinas propiedades fisicoquímicas singulares que definen sus múltiples actividades farmacológicas (Sousa et al., 2024).

La nomenclatura posicional del núcleo fenazínico sigue un sistema de numeración que asigna los carbonos e hidrógenos de los anillos bencénicos laterales a las posiciones C-1 a C-4 y C-6 a C-9, mientras que los dos átomos de nitrógeno del anillo de pirazina central ocupan las posiciones N-5 y N-10 (Yan et al., 2021). La Figura 1 ilustra esta distribución: las posiciones C-1 y C-6 son adyacentes a los nitrógenos del anillo pirazínico y resultan, por tanto, electrónicamente distintas de las posiciones C-2, C-3, C-4, C-7, C-8 y C-9, que se ubican en los extremos más alejados del sistema conjugado. Esta asimetría electrónica tiene

consecuencias directas sobre la reactividad química: la posición C-1 es particularmente susceptible a la sustitución nucleofílica y a la instalación de grupos donantes de densidad electrónica, como el hidroxilo fenólico, cuyo rol en la actividad biológica de los análogos halogenados se examinará en el capítulo 3.4 (Huigens et al., 2019). Las posiciones C-2 y C-4, por su parte, han sido identificadas como los sitios de halogenación más determinantes para la potencia antibacteriana (Borrero et al., 2014).

Más allá de la geometría del esqueleto, la relevancia biológica de las fenazinas descansa sobre sus propiedades electrónicas intrínsecas. El extenso sistema π conjugado del triciclo permite a estos compuestos participar en transiciones redox reversibles, comportándose funcionalmente como transportadores de electrones (Sousa et al., 2024). En condiciones celulares, esta capacidad se traduce en la capacidad de mediar la oxidación del NADH a NAD^+, desviando electrones hacia el oxígeno molecular y generando así especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas especies, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), inducen estrés oxidativo severo en el microorganismo (Sousa et al., 2024). La funcionalización del núcleo mediante la incorporación de sustituyentes en posiciones específicas modula de manera pronunciada tanto la lipofilicidad del compuesto como su potencial redox, alterando con ello la eficiencia con que la molécula penetra la membrana bacteriana y ejecuta el daño oxidativo intracelular (Sousa et al., 2024; Yan et al., 2021).

5.3.2 ORIGEN Y OBTENCIÓN: FENAZINAS NATURALES, CLASIFICACIÓN Y RUTA SINTÉTICA (WOHL-AUE)

Las fenazinas son metabolitos secundarios producidos de manera natural por una amplia variedad de microorganismos. Las bacterias de los géneros Pseudomonas y Streptomyces representan las fuentes más productivas y mejor caracterizadas, aunque la producción de fenazinas ha sido documentada también en géneros como *Brevibacterium*,

Burkholderia, *Nocardia* y en algunas arqueas (Huang et al., 2024; Yan et al., 2021). Entre las especies productoras dentro del género *Pseudomonas*, el perfil fenazínico varía según la cepa: *P. aeruginosa* sintetiza piocianina (PYO), ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), fenazina-1-carboxamida (PCN), 1-hidroxifenazina (1-OH-PHZ) y aeruginosinas A y B, mientras que *P. chlororaphis* produce preferentemente PCA, 2-hidroxifenazina (2-OH-PHZ), 2-OH-PCA y PCN en proporciones variables según las condiciones de cultivo y los genes de derivatización activos (Serafim et al., 2023).

Desde un punto de vista quimiotaxonómico, el conjunto de fenazinas naturales identificadas supera el centenar de estructuras distintas, diferenciadas entre sí por los patrones de sustitución sobre el núcleo tricíclico común, esto es, por la presencia de grupos carboxilo, hidroxilo, amino, metoxilo o combinaciones de estos en posiciones variables de los anillos bencénicos laterales (Huang et al., 2024). El precursor biosintético universal de esta familia es el corismato, metabolito clave de la ruta del ácido shikímico. A partir de él, dos moléculas de ácido 2-amino-2-desoxicorísmico (ADIC) son condensadas y cicladas en una secuencia enzimática codificada por el operón phz, presente en los organismos productores, hasta generar el PCA como andamiaje central (Sousa et al., 2024). El PCA actúa entonces como precursor común a partir del cual enzimas modificadoras específicas de cada organismo introducen los sustituyentes que definen la identidad de cada fenazina natural. La biosíntesis, controlada por el sistema de detección de quórum (QS), opera únicamente a densidades celulares suficientes, lo que refleja la función ecológica y de señalización comunitaria de estos compuestos (Sousa et al., 2024).

Sin embargo, los derivados halogenados de mayor interés terapéutico, los cuales presentan átomos de bromo en posiciones C-2 y C-4 junto con sustituyentes en C-6 a C-9, no son accesibles mediante la ruta biosintética natural y requieren síntesis química. En este contexto, la reacción de Wohl-Aue ha emergido como la plataforma sintética más versátil para el acceso modular a estas estructuras. Esta reacción consiste en una condensación

promovida por una base entre una anilina y un nitroareno apropiadamente sustituido para construir el núcleo fenazínico con control regioquímico (Huigens et al., 2019). En la implementación desarrollada por Yang et al. (2017), los compuestos 2-nitroanisol y 2-nitro-4-metilanisol fueron condensados con diversas anilinas empleando hidróxido de potasio en tolueno a reflujo, seguidos de una secuencia de dos pasos, desmetilación con tribromuro de boro (BBr_3) y dibromación con N-bromosuccinimida (NBS), para generar las fenazinas halogenadas finales con rendimientos promedio de 64 % en los últimos dos pasos (Yang et al., 2017). Esta estrategia permitió la síntesis sistemática de una biblioteca de 20 análogos con sustituciones en las posiciones C-6, C-7 y C-8 del andamiaje de fenazinas halogenadas (Halogenated Phenazines HPs), demostrando la potencia del enfoque modular para explorar la relación estructura-actividad (Structure-Activity Relationship SAR) de manera eficiente (Yang et al., 2017).

No obstante, la ruta Wohl-Aue original presenta limitaciones reconocidas: los rendimientos del paso de condensación son muy bajos, promedio < 10 %, las condiciones son drásticas y generan subproductos (Huigens et al., 2019). Estas restricciones motivaron el desarrollo de rutas alternativas basadas en acoplamiento cruzado y ciclización reductiva, con altos rendimientos, condiciones suaves e incorporación de anilinas disponibles comercialmente, que representan las plataformas sintéticas de tercera generación actualmente en uso (Huigens et al., 2019). La elección de la estrategia sintética óptima para cada biblioteca de derivados es una variable que condiciona la eficiencia y el alcance estructural de los programas de diseño de fenazinas bromadas.

5.3.3 EL ROL BIOLÓGICO NATURAL: HIERRO Y SEÑALIZACIÓN

Las fenazinas no solo constituyen compuestos con actividad antimicrobiana frente a otros microorganismos, sino que cumplen funciones biológicas esenciales para la supervivencia y el metabolismo del organismo productor. Entre estos roles destaca su

participación en la adquisición de hierro y en los procesos de señalización intercelular mediados por el sistema de QS. Como señalan Sousa et al. (2024), estas moléculas contribuyen a la aptitud ecológica y a la patogenicidad de las bacterias productoras mediante la alteración del estado redox celular, y ejercen una función de señalización involucrada en la regulación de la expresión génica que favorece la formación de biopelículas y la supervivencia bacteriana.

En lo que respecta a la adquisición de hierro, la captación de este micronutriente es mediada habitualmente por sideróforos, y resulta fundamental para el desarrollo de biopelículas (Sousa et al., 2024). Sin embargo, en ausencia de sideróforos, las bacterias pueden recurrir a las fenazinas como transportadoras de electrones para la reducción del hierro. Específicamente, Sousa et al. (2024) documentan que, en condiciones aeróbicas, la piocianina (5-metilfenazin-1-ona) y otras fenazinas pueden reducir el hierro férrico (Fe^{3+}), insoluble y de difícil captación, a hierro ferroso (Fe^{2+}), soluble y biodisponible, acoplando esta reacción a la oxidación del NADH a NAD^+. Este mecanismo fue corroborado al observarse que mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* incapaces de producir sideróforos utilizaron el PCA para reducir el Fe^{3+} y sostener el desarrollo de biopelículas, con la captación del Fe^{2+} resultante mediada por la proteína transportadora FeoB (Sousa et al., 2024).

En cuanto a la señalización, la biosíntesis de fenazinas se encuentra bajo control transcripcional dependiente de la densidad celular a través del QS, ya que estas moléculas solo se sintetizan una vez alcanzado un umbral mínimo de densidad poblacional (Sousa et al., 2024, p. 103). En *Pseudomonas spp*., la expresión génica de fenazinas y su producción consecuente están controladas por un sistema de dos componentes que integra el mecanismo de QS y un sistema de ARN pequeños (sRNAs) (Serafim et al., 2023, p. 6). De este modo, las fenazinas actúan como compuestos de señalización capaces de modular la expresión de subconjuntos de genes y operones, influyendo en la formación y morfogénesis

de biopelículas (Sousa et al., 2024). Comprender este nexo resulta esencial para interpretar por qué los derivados halogenados son capaces de atacar las biopelículas desde adentro, pues, al mimetizar la capacidad natural de quelación de hierro de sus precursores no halogenados, pero con una afinidad y lipofilia marcadamente superiores, logran acceder y desestabilizar precisamente las condiciones que el biofilm utiliza para su propia supervivencia.

5.3.4 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS FENAZINAS NO HALOGENADAS

Las fenazinas constituyen una clase de metabolitos secundarios con notable actividad antibacteriana frente a una amplia variedad de microorganismos, tanto gram negativos como gram positivos. Los mecanismos por los cuales estos compuestos ejercen su acción antimicrobiana incluyen la intercalación en el ADN, la producción de ROS, la inhibición de topoisomerasas y la quelación de metales, siendo estos los modos de acción propuestos para compuestos de referencia como la iodinina y la myxina (Huang et al., 2024). Sin embargo, la magnitud de esa actividad en los representantes no halogenados resulta baja, y los datos cuantitativos disponibles lo confirman.

Entre los compuestos con actividad antibacteriana documentada destaca el ácido fenazin-1,6-dicarboxílico (PDC), el cual exhibe actividad letal frente a bacterias gramnegativas como *Escherichia coli* y grampositivas como *Bacillus subtilis* a una concentración de 37 mM (Huang et al., 2024). De igual manera, la PYO, producida por el 90-95 % de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, ha demostrado actividad antibacteriana de amplio espectro frente a especies de *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, con concentraciones mínimas inhibitorias que oscilan entre 31, 25 y 125 µg/mL (Huang et al., 2024). Adicionalmente, la myxina, aislada de *Lysobacter antibioticus*, presenta una actividad antimicrobiana significativamente superior a la de la iodinina, su análogo sin o-metilación lo que confirma que ciertas modificaciones no halogenadas ya modulan la potencia (Huang et

al., 2024). Aun así, ninguno de estos compuestos supera el umbral de relevancia clínica frente a los patógenos de mayor interés.

No obstante, la limitación más determinante de esta clase de compuestos reside en su incapacidad para actuar sobre biopelículas ya establecidas. La 1-hidroxifenazina (1-OHP), precursor estructural no halogenado de los derivados bromados, carece por completo de actividad antibacteriana frente a Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis, con valores de concentración mínima inhibitoria (Minimum Inhibitory Concentration MIC) superiores a 100 µM (Huigens et al., 2019), lo que revela que el esqueleto fenazínico sin modificar resulta prácticamente inerte incluso frente a células planctónicas. La dificultad, sin embargo, no se limita a las fenazinas naturales, en la medida en que los antibióticos de primera línea empleados contra infecciones por MRSA vancomicina, daptomicina y linezolid, conservan una actividad planctónica eficaz, con concentraciones mínimas bactericidas de 3,0 a 125 µM, pero fracasan por completo en la erradicación de biopelículas de MRSA, con una concentración mínima de erradicación de biopelícula (Minimum Biofilm Eradication Concentration, MBEC) superior a 2000 µM (Garrison et al., 2016). El déficit que comparten las fenazinas no halogenadas y los antibióticos clásicos frente a las células organizadas en biopelícula constituye, precisamente, el vacío terapéutico que la bromación de la fenazina pretende resolver.

5.4 LA BROMACIÓN Y LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (SAR)

5.4.1 EL REQUISITO CRÍTICO DEL GRUPO HIDROXILO EN C-1

Entre los elementos estructurales más determinantes identificados en el estudio de las HPs, el grupo hidroxilo ubicado en la posición C-1 del heterociclo de fenazina ocupa un lugar central e indispensable para la actividad antibacteriana de esta clase de compuestos. Los trabajos publicados por el grupo de Huigens et al. (2019) han demostrado de manera

sistemática y reproducible que la presencia de este grupo funcional no es simplemente favorable, sino estrictamente necesaria para que los análogos halogenados ejerzan su efecto sobre patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

En los estudios iniciales de SAR, se sintetizaron análogos del compuesto 2,4-dibromo-1-hidroxifenazina (HP-1) en los que el grupo hidroxilo fenólico fue reemplazado por grupos metoxilo y amino. Estas sustituciones condujeron a análogos completamente inactivos, con valores de MIC superiores a 100 μM, que corresponde a la concentración más alta ensayada (Huigens et al., 2019). Esto evidencia que la modificación del grupo hidroxilo en C-1 anula completamente la actividad antibacteriana frente a organismos del género *Staphylococcus* (Huigens et al., 2019). Este hallazgo fue corroborado posteriormente al observarse que la metilación del grupo hidroxilo fenólico en el compuesto HP-1 también suprime totalmente la actividad antibacteriana de la estructura de la HP (Garrison et al., 2016, p. 3818).

La razón estructural de este requisito radica en la capacidad del grupo hidroxilo en C-1 de actuar en conjunto con el átomo de nitrógeno adyacente del heterociclo de fenazina para formar un quelato estable de cinco miembros al coordinar cationes metálicos divalentes como hierro(II) y cobre(II) (Huigens et al., 2019; Yang et al., 2021). Esta interacción de coordinación, análoga a la que presentan las 8-hidroxiquinolinas, es considerada un elemento clave en el mecanismo de acción de las fenazinas halogenadas, ya que permite la quelación intracelular del hierro y la consecuente inducción de un estado de inanición de hierro en las bacterias (Garrison et al., 2016). En coherencia con lo anterior, la funcionalización del grupo hidroxilo fenólico elimina la capacidad de los compuestos para unirse a cationes metálicos divalentes, lo que simultáneamente suprime la actividad de erradicación de biopelículas (Huigens et al., 2019).

Sin embargo, los estudios también revelaron que ciertos análogos éster del grupo hidroxilo fenólico de HP-1 mostraron actividad antibacteriana, lo cual fue atribuido a la

activación como profármaco mediante la hidrólisis enzimática del éster, que libera el agente activo con el grupo hidroxilo libre (Huigens et al., 2019). Este comportamiento fue observado tanto para análogos tipo carbonato como para otras versiones modificadas en la posición fenólica, confirmando que la actividad biológica se recupera únicamente tras la liberación del grupo hidroxilo libre (Xiao et al., 2020).

5.4.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DERIVADOS BROMADOS

La incorporación de átomos de bromo no solo redefine la geometría del núcleo fenazínico, sino que altera de manera cuantificable su comportamiento fisicoquímico, en particular su lipofilia. Como describen Potapskyi et al. (2024), la sustitución de un hidrógeno por un halógeno voluminoso y polarizable como el bromo incrementa el coeficiente de reparto octanol-agua de la molécula y, con ello, su afinidad por los entornos lipídicos. Este aumento de lipofilia resulta determinante para la penetración a través de la bicapa fosfolipídica de la membrana bacteriana, por lo que la bromación se traduce, en principio, en un mayor acceso del compuesto a sus blancos intracelulares.

Los valores de coeficiente de partición (LogP) reportados para las HPs confirman su naturaleza marcadamente lipofílica. El compuesto HP-1 presenta un LogP calculado (CLogP) de 4,68; propio de una molécula de elevada hidrofobicidad (Xiao et al., 2023; Yang et al., 2017). Sin embargo, las mediciones experimentales obtenidas mediante el método de agitación con detección UV-visible arrojaron valores sensiblemente inferiores a los predichos por cálculo. Así, análogos como la 7-cloro-HP-1, la 6,8-dimetil-HP-1 y la 3-cloro-6-metil-HP-1 registraron logP experimentales de 0,68; 1,20 y 0,81; respectivamente (Xiao et al., 2023). Esta discrepancia entre lo calculado y lo medido advierte sobre la necesidad de validar empíricamente la lipofilia antes de inferir el comportamiento biológico del derivado.

En cuanto a la ionización, el grupo hidroxilo fenólico confiere a estos compuestos un carácter débilmente ácido. La HP-1, derivado bromado predominante, presenta un pKa de 6,74; valor que cae dentro de un intervalo de aproximadamente 6,7 a 8,4; observado para distintos análogos halogenados (Garrison et al., 2016) y coherente con el valor representativo cercano a 7 establecido por Yang et al. (2021). Ello implica que, en condiciones fisiológicas, una fracción considerable de la molécula coexiste en su forma aniónica, lo que condiciona su difusión y su interacción con los blancos intrabacterianos. Finalmente, la elevada lipofilia que favorece la penetración celular conlleva una contrapartida, concretamente, una solubilidad acuosa restringida, situada en torno a 250 µM para la propia HP-1 (Garrison et al., 2016), limitación fisicoquímica central para el desarrollo farmacéutico de esta clase.

5.4.3 EL ENLACE HALÓGENO (HALOGEN BONDING): NATURALEZA FÍSICA Y RELEVANCIA FARMACOLÓGICA

Para comprender por qué la incorporación de bromo modifica el comportamiento farmacológico de una molécula conviene detenerse en un fenómeno fisicoquímico específico específico, el enlace halógeno. Durante mucho tiempo se asumió que los sustituyentes halogenados (–F, –Cl, –Br, –I) actuaban únicamente como grupos nucleófilos, dotados de una densidad electrónica elevada y, por tanto, de una carga parcial negativa que les permitía comportarse como aceptores de enlaces de hidrógeno. No obstante, los estudios de mapeo del potencial electrostático molecular y de cristalografía de rayos X revelaron que estos átomos también pueden establecer interacciones no covalentes propias, conocidas como enlaces halógeno o enlaces X (Potapskyi et al., 2024, p. 240).

El origen de esta interacción reside en la distribución anisótropa de la carga sobre el átomo de halógeno unido al carbono. A lo largo del eje del enlace C–X, en posición opuesta a este, surge una región de potencial electrostático positivo denominada σ-hole (agujero sigma), rodeada por un cinturón ecuatorial de carga negativa. Esa zona positiva habilita al

halógeno para actuar como aceptor frente a centros ricos en electrones, e incluso frente al orbital π de anillos aromáticos, lo que genera nuevos sitios potenciales de unión con el blanco terapéutico (Potapskyi et al., 2024).

La magnitud del σ-hole no es uniforme entre los halógenos, sino que aumenta de forma proporcional a su tamaño y polarizabilidad. El flúor, pequeño y muy electronegativo, prácticamente no presenta σ-hole; el cloro lo desarrolla de manera moderada; y el bromo, más voluminoso y polarizable, exhibe un agujero sigma considerablemente más pronunciado, capaz de formar enlaces halógeno de mayor intensidad (Potapskyi et al., 2024). Esta diferencia es la que otorga al bromo una relevancia particular en el diseño de fármacos.

La conexión con la SAR resulta directa. Potapskyi et al. (2024) señalan que la sustitución por halógenos de mayor tamaño contribuye a un incremento de la actividad inhibitoria, fenómeno que atribuyen a la capacidad del halógeno de establecer enlaces halógeno con sitios moleculares de la diana, además de los efectos sobre la lipofilia ya analizados. Bajo esta lógica, la bromación no se limita a añadir masa a la estructura, sino que introduce un elemento capaz de modular activamente las interacciones fármaco-diana.

5.4.4 INFLUENCIA DE LA BROMACIÓN EN LA POTENCIA

La incorporación de átomos de bromo en el núcleo fenazínico incrementa de manera significativa la potencia antibacteriana, tal como lo evidencian los valores de MIC reportados en la literatura. Esta relación, sin embargo, no es uniforme ya que depende tanto del número de átomos de bromo como de la posición que ocupan en el heterociclo, y puede incluso revertirse en determinados contextos estructurales.

El punto de partida lo establece Borrero et al. (2014) con la forma monobromada, 2-bromo-1-hidroxifenazina, producto natural de origen marino, que presentó una MIC de 6,25

μM frente a Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis. Esta es una potencia ocho veces superior a la del antibiótico fenazínico piocianina (MIC = 50 μM) evaluado en condiciones equivalentes. La actividad, no obstante, depende de manera crítica de la posición, la ausencia del bromo en C-2 anula por completo la actividad frente a S. aureus, lo que identifica a esa posición como imprescindible (Borrero et al., 2014).

El paso a la forma dibromada reveló el efecto más marcado sobre la potencia. La introducción de un segundo átomo de bromo en C-4 genera la HP-1, que alcanzó una MIC de 1,56 μM frente a *S. aureus* y de 0,78 a 1,56 μM frente a *S. epidermidis*, resultando 32 veces más potente que la piocianina (Borrero et al., 2014). La contribución de este segundo bromo se cuantifica al retirarlo, ya que su eliminación reduce la potencia cuatro veces, devolviendo el compuesto al nivel de la 2-bromo-1-hidroxifenazina (Borrero et al., 2014). Ambas posiciones resultan, por tanto, necesarias, aunque con jerarquías distintas, pues C-2 es indispensable y C-4 actúa como potenciadora.

Investigaciones posteriores extendieron el análisis a las posiciones 6 a 9. Yang et al. (2017) demostraron que la serie 2,4-dibromo superó de forma consistente a sus homólogos 4-metilo frente a MRSA, con MIC de 0,05 a 3,13 μM frente a 1,17 - 18,8 μM, respectivamente; en comparación directa, el análogo 4-bromo-6,7-dimetilo resultó doce veces más potente que su contraparte 4-metilo (Yang et al., 2017, p. 10). Sobre el esqueleto dibromado, la adición de un único sustituyente en C-6 o C-7 amplificó todavía más la actividad. Huigens et al. (2019) sistematizaron que los análogos monosustituidos en esas posiciones alcanzaron incrementos de 32 a 64 veces en la erradicación de biopelículas de MRSA respecto del esqueleto HP-1 sin sustituyentes adicionales con un MBEC de 150 μM frente a 2,35-4,69 μM.

Esta progresión, sin embargo, no debe leerse como una regla lineal en la que cada bromo adicional aumenta la potencia. Diversos casos muestran lo contrario. En el estudio de Garrison et al. (2016), el reemplazo de los dos átomos de cloro en las posiciones 7 y 8 de

análogos activos por dos átomos de bromo, originando el análogo HP-7, produjo una pérdida sustancial de actividad, sin erradicación detectable frente a biopelículas de MRSA, MRSE ni VRE como se muestra en la Figura 2. De forma análoga, el derivado bencenofenazínico dibromado, que incorpora un anillo aromático fusionado en las posiciones 7 y 8, careció por completo de actividad de erradicación, con una pérdida de entre más de dos y más de veinte veces respecto de los análogos activos (Garrison et al., 2016) como se observa en la Figura 3. Incluso la acumulación de bromo puede ser contraproducente, ya que la introducción de un cuarto átomo de bromo en C-7 sobre un análogo ya potente ocasionó una reducción de dos veces en la actividad frente a MRSA-2 (Garrison et al., 2016). En conjunto, estos resultados consolidan la idea de que la potencia de las fenazinas bromadas obedece a un equilibrio fino entre número, tipo y posición del halógeno, y no a una simple maximización del contenido de bromo.

5.4.5 CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA DE DERIVADOS HP POR TIPO, NÚMERO Y POSICIÓN DE HALÓGENO

El conjunto de SAR revisadas en los apartados anteriores puede ordenarse de manera sistemática atendiendo a cuatro criterios complementarios: el número de átomos de halógeno presentes en la molécula, las posiciones del núcleo fenazínico que ocupan, la identidad del halógeno o grupo halogenado incorporado y el espectro de actividad resultante. Esta organización no es meramente descriptiva, pues constituye el recurso central para dimensionar el alcance de la bromación frente a las demás estrategias de halogenación y, por tanto, sostiene el segundo objetivo específico de clasificación.

La síntesis visual más completa de estas relaciones es la propuesta por Huigens et al. (2019), quienes condensaron en un único esquema el efecto de cada posición sobre la actividad y el diseño racional que de él se deriva. En dicho esquema, el grupo hidroxilo de C-1, junto con el nitrógeno contiguo, se señala como el motivo de unión a metales imprescindible

y, simultáneamente, como punto de anclaje para estrategias de profármaco; las posiciones C-2 y C-4 figuran como los sitios cuya halogenación determina la actividad basal; y las posiciones C-6 a C-9 se presentan como moduladores cuyo efecto oscila entre la mejora y la pérdida de actividad según el sustituyente que las ocupe. La lectura integrada del esquema evidencia que la potencia no obedece a una variable aislada, sino a la combinación ordenada de las cuatro dimensiones mencionadas. A partir de este marco, la Tabla 1 organiza los derivados representativos.

5.4.6 COMPARACIÓN ENTRE HALÓGENOS EN LA SAR: BROMO, CLORO Y GRUPO TRIFLUOROMETILO

Aunque el bromo ocupa un lugar central en la actividad de las HPs, no es el único sustituyente halogenado empleado ni resulta óptimo en todas las posiciones del núcleo. Compararlo con el cloro y con el grupo trifluorometilo desde una perspectiva estructural permite entender por qué estos sustituyentes no son intercambiables y por qué su elección depende del contexto.

La primera diferencia es electrónica. El cloro es más electronegativo que el bromo, mientras que el bromo, de mayor tamaño y polarizabilidad, distribuye su densidad electrónica de manera más anisótropa. Esa mayor polarizabilidad es precisamente la que confiere al bromo un σ-hole más pronunciado y, por tanto, una capacidad de enlace halógeno superior a la del cloro (Potapskyi et al., 2024). El grupo trifluorometilo introduce una lógica distinta, al estar constituido por tres enlaces C–F, en los que el flúor, pequeño y muy electronegativo, prácticamente no desarrolla σ-hole, el $–CF_3$ no participa de forma apreciable en enlaces halógeno, sino que opera como un potente grupo atractor de electrones por efecto inductivo.

En cuanto a la lipofilia, tanto el bromo como el grupo trifluorometilo elevan el coeficiente de reparto en mayor medida que el cloro, lo que favorece la permeabilidad de

membrana ya analizada (Potapskyi et al., 2024). El $–CF_3$ conjuga así una elevada lipofilia con una marcada estabilidad metabólica, atributos que motivaron su incorporación al esqueleto fenazínico (Gao et al., 2025).

Estas diferencias se traducen en una preferencia de halógeno dependiente de la posición. El esquema de Huigens et al. (2019) ordena la contribución de cada uno, de manera que en C-2 y C-4, determinantes de la actividad, la jerarquía es –Br > –I > –Cl >> –H, de modo que el bromo es el sustituyente óptimo; en C-6, en cambio, se invierte parcialmente a –I > –Br > –Cl >> –H como se muestra en la Figura 4. En ambos casos el cloro queda por debajo del bromo y del yodo, aunque muy por encima del hidrógeno, lo que confirma que cualquier halogenación supera a su ausencia.

Existe, sin embargo, un contexto en el que el cloro aventaja al bromo. En los derivados 7,8-dihalogenados de Garrison et al. (2016), los análogos 7,8-dicloro (HP-5 y HP-6) fueron los compuestos más potentes frente a MtB de toda la serie (MIC 3,13 μM), y el reemplazo de esos cloros por bromo, que origina el 7,8-dibromo (HP-7), produjo una pérdida sustancial de actividad. De forma convergente, Yang et al. (2017) identificaron al análogo 8-cloro como el más potente frente a MtB de su serie 2,4-dibromo (MIC 6,25 μM). Ambos casos evidencian que la mayor capacidad de enlace halógeno y la mayor lipofilia del bromo no son ventajas universales, en las posiciones periféricas, el menor tamaño y la mayor electronegatividad del cloro resultan estructuralmente más favorables.

5.5 MECANISMOS AVANZADOS Y ERRADICACIÓN DE BIOPELÍCULA

5.5.1 MECANISMOS DE ACCIÓN INTEGRADO DE LAS HPs BROMADAS

La potencia antibacteriana de las hidroxifenazinas bromadas no obedece a un evento aislado, sino a una secuencia mecanística encadenada cuyo punto de partida es la elevada

lipofilia conferida por la sustitución con bromo. Esta característica resulta determinante en el plano funcional, pues permite que la molécula atraviese de forma pasiva la membrana bacteriana sin requerir transportadores específicos. En el caso de HP-4 (2-bromo-4-yodo-7,8-dicloro-1-hidroxifenazina), su carácter marcadamente lipofílico (CLogP = 6,25) sustenta una difusión rápida hacia el interior celular (Huigens et al., 2019). Una vez en el citoplasma, el compuesto ejerce su acción sobre la homeostasis del hierro, el eslabón central de toda la cadena.

El hierro férrico (Fe^{3+}) no difunde de manera pasiva a través de la membrana, por lo que la bacteria lo capta mediante sideróforos y, tras internalizarlo, lo reduce a hierro ferroso (Fe^{2+}) en su citoplasma reductor para destinarlo a la respiración, la biosíntesis de ADN y la función de metaloproteínas (Huigens et al., 2019). Es precisamente este Fe^{2+} biodisponible el que las HPs interceptan, dado que la quelación se produce mediante la formación de un complejo soluble entre el grupo hidroxilo en posición 1 y el nitrógeno adyacente en posición 10 del núcleo fenazínico, con una estequiometría de dos moléculas de HPs por cada ion ferroso (Xiao et al., 2023). El carácter crítico de este motivo quelante quedó demostrada según la evidencia de SAR ya expuesta.

El secuestro intracelular de Fe^{2+} genera un estado de privación de hierro que la célula percibe como una amenaza inmediata, lo que desencadena la activación de sus sistemas de adquisición y conduce finalmente a la muerte celular. La distinción operativa entre fenotipos resulta aquí esencial. En las bacterias planctónicas, en activa replicación, la interrupción del suministro de hierro compromete procesos metabólicos en curso. En las células persistentes, metabólicamente latentes, el mecanismo conserva su letalidad porque la supervivencia en estado durmiente sigue dependiendo de la homeostasis del hierro. Cabe recalcar que las poblaciones de biopelícula responden con una rápida activación de los clústeres de captación, evidencia de que detectan la carencia pese a su inactividad (Huigens et al., 2019).

Que agentes quelantes como el EDTA y el TPEN, incapaces de penetrar la biopelícula, no reproduzcan esta actividad confirma que la penetración mediada por lipofilia y la quelación intracelular constituyen una unidad mecanística indisociable, distinta del mero secuestro extracelular de metales (Huigens et al., 2019).

5.5.2 ACTIVIDAD DE LAS HP BROMADAS CONTRA CÉLULAS PERSISTENTES Y BIOPELÍCULAS DE MRSA, MRSE Y VRE

La eficacia de las hidroxifenazinas bromadas frente a las subpoblaciones persistentes y a las comunidades de biopelícula constituye la primera comprobación experimental del mecanismo de privación de hierro expuesto anteriormente. Esta evidencia se sustenta en dos modelos in vitro, los cultivos estacionarios, enriquecidos en células no replicantes, y los ensayos de erradicación en dispositivo de biopelícula de Calgary.

En cultivos estacionarios de MRSA-2, el análogo HP-4 eliminó más del 99,9 % de las células persistentes, con una reducción superior a tres logaritmos, a una concentración de 12,5 µM, y con una cinética de muerte lenta que progresó a lo largo de 24 horas (Huigens et al., 2019). Por otro lado, la vancomicina permaneció inactiva frente a estos mismos cultivos a 100 µM, es decir, cien veces su concentración inhibitoria mínima (Huigens et al., 2019). Esta limitación se extiende a otros antibióticos de primera línea, pues un análisis comparativo posterior confirmó que ni la vancomicina ni la daptomicina redujeron las poblaciones persistentes a 100 µM, mientras que el linezolid, pese a inducir una reducción de dos logaritmos a las tres horas, vio su efecto neutralizado por la recuperación bacteriana hasta un único logaritmo neto a las 24 horas (Sousa et al., 2024).

La superioridad de las HP frente a los tres patógenos grampositivos de interés se cuantifica en la erradicación de biopelícula establecida. La Tabla 2 confronta los valores de

concentración mínima de erradicación de biopelícula (MBEC) de HP-4 con los de la vancomicina y el quelante EDTA.

5.5.3 ACTIVIDAD CONTRA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS REPLICANTE Y DURMIENTE

Entre los patógenos evaluados, MtB constituye el escenario más ilustrativo de la actividad diferencial de las hidroxifenazinas según el estado metabólico bacteriano. La capacidad del bacilo para adoptar un estado durmiente, no replicante y tolerante a los fármacos subyace a la infección latente y explica la prolongada duración de los esquemas antituberculosos convencionales. Es precisamente sobre esta forma latente donde la terapéutica de primera línea revela su mayor limitación.

Frente a *M. tuberculosis* replicante, los fármacos de referencia exhiben una potencia notable, debido a que la isoniazida y la rifampicina presentan valores de concentración inhibitoria mínima de 0,1 μM y 0,001 μM, respectivamente (Gao et al., 2025). Sin embargo, su eficacia se cae bruscamente contra el bacilo durmiente, donde la concentración inhibitoria de la isoniazida asciende a 114,7 μM, más de mil veces superior, y la de la rifampicina a 1,43 μM (Gao et al., 2025). Este colapso de potencia frente a la forma no replicante constituye el núcleo del problema clínico que las HPs buscan resolver.

El comportamiento de los derivados bromados ante este patrón no es uniforme, sino que depende de la optimización estructural. El compuesto parental HP-1 reproduce la vulnerabilidad de los fármacos clásicos, conservando una actividad moderada contra el bacilo replicante (MIC = 15,8 μM), pero la pierde de manera drástica contra la forma durmiente (MIC = 200 μM) (Gao et al., 2025). El andamiaje bromado básico, por tanto, no basta por sí solo para superar la tolerancia asociada a la latencia.

La incorporación de los grupos trifluorometilo invierte por completo esta tendencia. El derivado HP-8 (2,4-dibromo-6,8-bis(trifluorometil)-1-hidroxifenazina) resulta más potente contra *M. tuberculosi*s durmiente (MIC = 1,35 μM) que contra su contraparte replicante (MIC = 3,69 μM), y es el único compuesto del conjunto que incrementa su actividad al enfrentar el estado no replicante (Gao et al., 2025). Esta inversión, opuesta al perfil de la isoniazida y la rifampicina, resulta coherente con un mecanismo de privación de hierro independiente del crecimiento activo, pues una célula durmiente, que conserva su dependencia de la homeostasis del hierro, pero ha desactivado las dianas asociadas a la división, queda expuesta a un agente que no precisa replicación para ejercer su letalidad.

5.5.4 EL DERIVADO HP-8: PERFIL DE ACTIVIDAD DEL ANÁLOGO CON GRUPO TRIFLUOROMETILO

El derivado HP-8 representa el punto culminante de la optimización dentro de esta familia, al constituir el agente erradicador de biopelículas más potente reportado hasta la fecha (Gao et al., 2025). Evaluado en el dispositivo de biopelícula de Calgary frente al panel de patógenos grampositivos de interés, alcanzó concentraciones mínimas de erradicación de biopelícula notablemente bajas, de 1,17 μM contra MRSA 1707, 0,39 μM contra MRSE 35984 y 0,15 μM tanto contra *Staphylococcus epidermidis* 12228 como contra VRE 700221 (Gao et al., 2025). Estos valores, situados en el rango submicromolar para buena parte del panel, superan a los de cualquier análogo previo de la serie.

La solidez de este perfil se confirmó al ensayar el compuesto contra una colección de seis aislamientos clínicos de MRSA, frente a los cuales HP-8 mantuvo una erradicación uniforme con valores comprendidos entre 0,59 y 1,17 μM (Gao et al., 2025). El contraste con la vancomicina resultó especialmente revelador en este escenario clínico, donde el antibiótico de última línea fue incapaz de erradicar las biopelículas de ninguno de los seis aislamientos

a concentraciones superiores a 2000 μM, pese a su potente actividad sobre las células planctónicas correspondientes.

La microscopía confocal de barrido aportó una confirmación visual directa de esta capacidad erradicadora. El tratamiento de biopelículas preformadas de MRSA con HP-8 a 25 μM redujo su altura desde aproximadamente 30 μm hasta cerca de 10 μm y eliminó en gran medida la matriz de polisacáridos que recubre la comunidad bacteriana, un efecto marcadamente superior al de la fenazina parental HP-1, que apenas la disminuyó hasta unos 20 μm (Gao et al., 2025).

Este perfil de potencia se acompaña de una ventana terapéutica notablemente amplia. HP-8 no produjo citotoxicidad medible frente a células HeLa hasta el límite del ensayo. Presentando una concentración citotóxica media (IC_{50} > 100 μM), de modo que su índice de selectividad frente a MRSA, cociente entre dicha IC_{50} y la concentración inhibitoria mínima de 0,05 μM, supera el valor de 2000, situándolo en el extremo más favorable de una serie cuyos miembros, según Gao et al. (2025), exceden mayoritariamente un índice de selectividad de 300. Esta amplia separación entre la dosis activa sobre la bacteria y la concentración tóxica para la célula del hospedador respalda en principio la viabilidad farmacológica del compuesto, cuyo alcance traslacional real se matiza en el apartado siguiente. Adicionalmente, el perfil antibiopelícula se complementa con la actividad diferencial frente a *Mycobacterium tuberculosis* durmiente examinada en el apartado anterior, donde HP-8 fue el único derivado capaz de incrementar su potencia contra el bacilo no replicante. En conjunto, estos resultados sitúan a HP-8 como el análogo de referencia de la serie.

5.5.5 LIMITACIONES ACTUALES: AUSENCIA DE DATOS IN VIVO, FARMACOCINÉTICA Y ESTUDIOS CLÍNICOS

El recorrido trazado en los apartados anteriores configura un perfil in vitro notablemente favorable, sustentado en un mecanismo de privación de hierro de primera clase, eficacia frente a las poblaciones persistentes, las biopelículas y el bacilo tuberculoso durmiente. Sin embargo, la traducción de estas propiedades a una terapia clínica exige demostrar que la promesa observada en cultivo sobrevive a la complejidad de un organismo vivo, evidencia que en el caso de los derivados bromados permanece, en gran medida, ausente.

La información in vivo disponible es escasa y se limita a contextos tópicos. El único derivado evaluado en un modelo animal es 3-cloro-6-metil-HP-1 (HP-29), que en modelos de infección de herida dorsal en ratones produjo reducciones de 0,82 log frente a *S. aureus* y de 1,73 log frente a *E. faecium* tras tres días de tratamiento, formulado como ungüento de polietilenglicol y aplicado de forma tópica (Xiao et al., 2023). Conviene subrayar dos matices críticos, dado que estas reducciones son modestas y de carácter localizado, y los análogos con mejor perfil in vitro a lo largo de este capítulo, HP-4 y HP-8, carecen por completo de datos de eficacia en animales.

A esta limitación se suma un vacío más fundamental, donde ninguno de los estudios evaluados reporta parámetros farmacocinéticos. No se dispone de información sobre absorción, distribución, metabolismo, excreción, semivida plasmática ni biodistribución, datos imprescindibles para evaluar cualquier candidato de administración sistémica. Las propias limitaciones fisicoquímicas y metabólicas del andamiaje agravan esta incertidumbre. La elevada lipofilia que habilita la penetración de membrana compromete simultáneamente la solubilidad acuosa. El grupo hidroxilo fenólico, esencial para la quelación del hierro, resulta vulnerable a la glucuronidación y la quelación de metales fuera de la diana bacteriana plantea preocupaciones de toxicidad (Liu et al., 2023).

Por último, toda la investigación es de naturaleza preclínica, debido a que no existe ningún estudio clínico que haya evaluado estos compuestos en seres humanos. En conjunto, una valoración equilibrada del potencial traslacional de los derivados bromados debe reconocer dos realidades simultáneas. Por una parte, constituyen un andamiaje genuinamente prometedor, capaz de abordar mediante un mecanismo inédito un problema clínico que la terapéutica convencional no resuelve. Por otra, su madurez traslacional es todavía incipiente, ya que la eficacia está demostrada en cultivo y en pruebas tópicas de concepto, pero no en administración sistémica, sin caracterización farmacocinética y sin evaluación clínica. Su aplicación más realista a corto plazo se sitúa, por tanto, en el ámbito tópico y localizado, heridas, dispositivos, mientras que el uso sistémico permanece como una perspectiva sujeta a la optimización mediante profármacos y a una caracterización farmacocinética y toxicológica completa. El potencial es real, pero, en el estado actual del conocimiento, aún no está probado más allá de las primeras etapas preclínicas, consideración que enmarca las recomendaciones del capítulo final.

6 CONCLUSIONES

1. La bromación constituye una modificación estructural decisiva para el perfil antimicrobiano de las fenazinas, a pesar de que su influencia no es lineal ni acumulativa. Más que añadir masa a la molécula, redefine su lipofilia y habilita interacciones que pueden elevar la potencia hasta treinta y dos veces respecto de los compuestos no halogenados. Su mayor aporte consiste en dotar a la clase de un mecanismo de privación de hierro independiente del estado replicativo bacteriano, eficaz frente a células persistentes, biopelículas establecidas y el bacilo tuberculoso durmiente, escenarios donde la terapéutica convencional fracasa. No obstante, la evidencia favorable es esencialmente preclínica e in vitro, de modo que su potencial farmacológico, aunque genuino, permanece sin validar más allá de las primeras etapas del desarrollo.

2. La actividad de los derivados bromados obedece a una cadena que parte de su estructura. El grupo hidroxilo en C-1, junto con el nitrógeno adyacente, forma un quelato de cinco miembros indispensable, pues su funcionalización por metilación o eterificación suprime por completo la actividad antibacteriana. Sobre esa base, la bromación incrementa la lipofilia y favorece la penetración pasiva de la membrana, mientras que el σ-hole del bromo posibilita enlaces halógeno con la diana. La penetración mediada por lipofilia y la quelación intracelular del hierro operan, así como una unidad indisociable que induce un estado de inanición metálica letal con independencia del crecimiento celular. La estructura modula la potencia y define la naturaleza del mecanismo.

3. Los derivados de fenazina halogenada pueden ordenarse según cuatro criterios convergentes, que son el número de halógenos, su posición en el núcleo, su identidad

química y el espectro de actividad resultante. Las posiciones cumplen funciones jerarquizada el hidroxilo de C-1 ancla la unión a metales y las estrategias de profármaco; C-2 y C-4 determinan la actividad basal, con el bromo como sustituyente óptimo; y las posiciones C-6 a C-9 actúan como moduladores cuyo efecto oscila entre la mejora y la pérdida de actividad. En el plano fisicoquímico, la clase se distingue por una elevada lipofilia, la acidez débil del hidroxilo fenólico y una solubilidad acuosa restringida, lo cual condiciona su comportamiento biológico y su viabilidad farmacéutica.

4. El contraste cuantitativo entre ambos grupos resulta indiscutible. Las fenazinas no halogenadas exhiben una actividad marginal, pues la 1-hidroxifenazina carece de efecto frente a estafilococos, con concentraciones inhibitorias superiores a 100 μM. La halogenación con bromo revierte esto ya que la forma monobromada posee ocho veces más la potencia de la piocianina y la dibromada HP-1 la multiplica por treinta y dos. La ventaja se acentúa frente a biopelículas, donde los antibióticos de primera línea fracasan, con concentraciones de erradicación superiores a 2000 μM, mientras que los análogos optimizados alcanzan valores micromolares e incluso submicromolares. Sin embargo, que la superioridad del bromo es posicional, porque en las posiciones 7 y 8 el cloro resulta más favorable, y la acumulación de bromo puede revertir la potencia.

5. La valoración crítica del potencial farmacológico exige sostener dos lecturas simultáneas. Por una parte, la bromación ha producido un andamiaje de primera clase frente a un problema clínico no resuelto, cuyo ejemplo más destacado se sitúa como el agente erradicador de biopelículas más potente reportado hasta la fecha. Por otra, su madurez traslacional es todavía incipiente, dado que la única evidencia *in vivo* disponible procede de aplicaciones tópicas con reducciones modestas, no existe caracterización farmacocinética y ningún compuesto ha sido evaluado en humanos. A

ello se suman limitaciones intrínsecas del esqueleto, como la tensión entre lipofilia y solubilidad, la vulnerabilidad del hidroxilo fenólico a la glucuronidación y el riesgo de quelación fuera de la diana. Su aplicación realista a corto plazo se limita al ámbito tópico, mientras que el uso sistémico queda sujeto a la optimización mediante profármacos y a una caracterización farmacocinética y toxicológica completa.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Borrero, N. V., Bai, F., Perez, C., Duong, B. Q., Rocca, J. R., Jin, S., & Huigens, R. W. (2014). Phenazine antibiotic inspired discovery of potent bromophenazine antibacterial agents against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. *Organic and Biomolecular Chemistry*, *12*(6), 881–886. https://doi.org/10.1039/C3OB42416B

Gao, Q., Yang, H., Sheiber, J., Halicki, P. C. B., Liu, K., Blanco, D., Milhous, S., Jin, S., Rohde, K. H., Fleeman, R. M., & Huigens, R. W., III. (2025). Identification of 6,8-ditrifluoromethyl halogenated phenazine as a potent bacterial biofilm-eradicating agent. Organic & Biomolecular Chemistry, 23(14), 3342-3357. https://doi.org/10.1039/d4ob02011a

Garrison, A. T., Abouelhassan, Y., Norwood, V. M., Kallifidas, D., Bai, F., Nguyen, M. T., Rolfe, M., Burch, G. M., Jin, S., Luesch, H., & Huigens, R. W. (2016). Structure–Activity Relationships of a Diverse Class of Halogenated Phenazines That Targets Persistent, Antibiotic-Tolerant Bacterial Biofilms and Mycobacterium tuberculosis. Journal Of Medicinal Chemistry, 59(8), 3808-3825. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b02004

Huigens, R. W., Abouelhassan, Y., & Yang, H. (2019). Phenazine Antibiotic-Inspired Discovery of Bacterial Biofilm-Eradicating Agents. ChemBioChem, 20(23), 2885-2902. https://doi.org/10.1002/cbic.201900116

Huang, W., Wan, Y., Zhang, S., Wang, C., Zhang, Z., Su, H., Xiong, P., & Hou, F. (2024). *molecules Review Recent Advances in Phenazine Natural Products: Chemical Structures and Biological Activities*. https://doi.org/10.3390/molecules29194771

Liu, K., Xiao, T., Yang, H., Chen, M., Gao, Q., Brummel, B. R., Ding, Y., & Huigens, R. W. (2023). Design, synthesis and evaluation of halogenated phenazine antibacterial prodrugs targeting nitroreductase enzymes for activation. *RSC Medicinal Chemistry*, *14*(8), 1472–1481. https://doi.org/10.1039/D3MD00204G

Potapskyi, E., Kustrzyńska, K., Łażewski, D., Skupin-Mrugalska, P., Lesyk, R., & Wierzchowski, M. (2024). Introducing bromine to the molecular structure as a strategy for

drug design. Journal Of Medical Science, 93(3), e1128. https://doi.org/10.20883/medical.e1128

Serafim, B., Bernardino, A. R., Freitas, F., & Torres, C. A. V. (2023). Recent Developments in the Biological Activities, Bioproduction, and Applications of Pseudomonas spp. Phenazines. Molecules, 28(3), 1368. https://doi.org/10.3390/molecules28031368

Sousa, C. A., Ribeiro, M., Vale, F., & Simões, M. (2024). Phenazines: Natural products for microbial growth control. *HLife*, *2*(3), 100–112. https://doi.org/10.1016/J.HLIFE.2023.11.005

Xiao, T., Liu, K., Gao, Q., Chen, M., Kim, Y. S., Jin, S., Ding, Y., & Huigens, R. W. (2023). Design, Synthesis, and Evaluation of Carbonate-Linked Halogenated Phenazine-Quinone Prodrugs with Improved Water-Solubility and Potent Antibacterial Profiles. ACS Infectious Diseases, 9(4), 899-915. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00558

Xiao, T., Liu, K., & Huigens, R. W. (2020). Progress towards a stable cephalosporin-halogenated phenazine conjugate for antibacterial prodrug applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *30*(22), 127515. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127515

Yan, J., Liu, W., Cai, J., Wang, Y., Li, D., Hua, H., & Cao, H. (2021). Advances in Phenazines over the Past Decade: Review of Their Pharmacological Activities, Mechanisms of Action, Biosynthetic Pathways and Synthetic Strategies. *Marine Drugs*, *19*(11), 610. https://doi.org/10.3390/MD19110610

Yang, H., Abouelhassan, Y., Burch, G. M., Kallifidas, D., Huang, G., Yousaf, H., Jin, S., Luesch, H., & Huigens, R. W. (2017). A Highly Potent Class of Halogenated Phenazine Antibacterial and Biofilm-Eradicating Agents Accessed Through a Modular Wohl-Aue Synthesis. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 2003-. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01045-3

Yang, H., Liu, K., Jin, S., & Huigens, R. W. (2021). Design, synthesis and biological evaluation of a halogenated phenazine-erythromycin conjugate prodrug for antibacterial applications. *Organic and Biomolecular Chemistry*, *19*(7), 1483–1487. https://doi.org/10.1039/D0OB02428G

8 FIGURAS

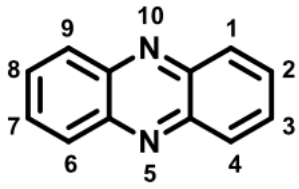


Figura 1 Sistema de numeración posicional del núcleo de la fenazina Adaptada de Hiugens et al., 2019.

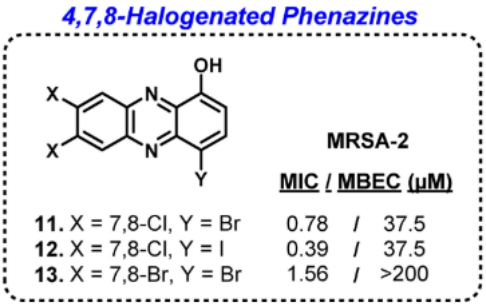


Figura 2 Pérdida de la actividad de erradicación de biopelículas tras la sustitución de los átomos de cloro por bromo en las posiciones 7 y 8 Adaptada de Garrison et al., 2016.

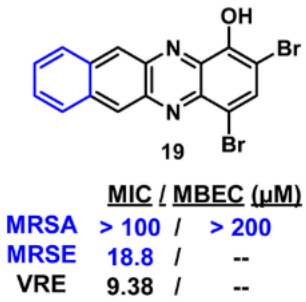


Figura 3 Ausencia de actividad de erradicación del derivado bencenofenazínico dibromado con anillo aromático fusionado en las posiciones 7 y 8 Adaptada de Garrison et al., 2016.

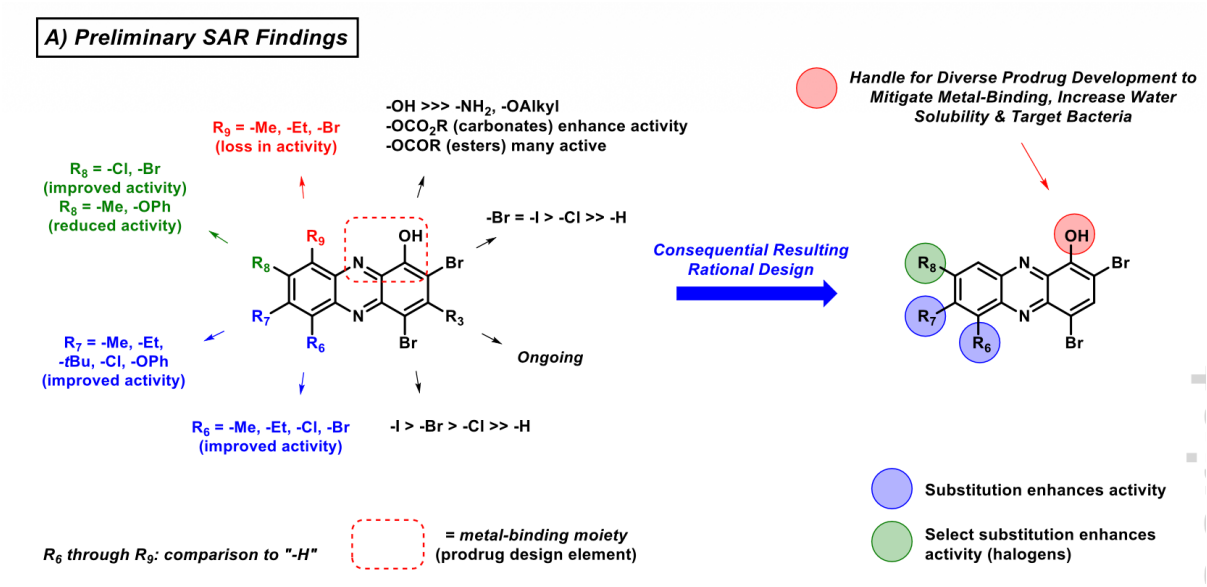


Figura 4 Relaciones estructura-actividad de las fenazinas halogenadas erradicadoras de biopelículas y diseño racional de análogos Adaptada de Huigens et al. (2019).

9 TABLAS

Tabla 1 Clasificación de derivados representativos de HPs según número, posición y tipo de halógeno, y su espectro de actividad.

Compuesto	**N. halógenos**	**Posiciones**	**Tipo**	**Espectro de actividad**	**Fuente**
1-hidroxifenazina	0	—	—	Inactivo (MIC > 100 µM) *S. aureus* y *S. epidermidis*	Huigens et al., 2019
2-bromo-1-hidroxifenazina	1	C-2	Br	Activo (MIC 6,25 µM); erradicación moderada S.*aureus* y *S. epidermidis*	Borrero et al., 2014
4-bromo-1-hidroxifenazina	1	C-4	Br	Inactivo (MIC > 100 µM); revela la necesidad del bromo en C-2 S.*aureus* y *S. epidermidis*	Huigens et al., 2019
2,4-dibromo-1-hidroxifenazina (HP-1)	2	C-2, C-4	Br	Activo (MIC 1,56 µM); MBEC 150 µM	Huigens et al., 2019
2-bromo-4-yodo-1-hidroxifenazina (HP-2)	2	C-2, C-4	Br, I	Ligero aumento de erradicación frente a HP-1 (MIC 0,78 MBEC 62,5 µM)	Garrison et al., 2016

2,4,6-tribromo-1-hidroxifenazina (HP-3)	3	C-2, C-4, C-6	Br	Muy potente (MIC 0,05 MBEC 9,38 µM)	Yang et al., 2017
2-bromo-4-yodo-7,8-dicloro-1-hidroxifenazina (HP-4)	4	C-2, C-4, C-7, C-8	Br, I, Cl	Máxima erradicación de biopelícula (MBEC 6,25–9,38 µM, MRSA) (MBEC 2,35 µM, MRSE)	Huigens et al., 2019
4-bromo-7,8-dicloro (HP-5)	3	C-4, C-7, C-8	Br, Cl	Los más potentes frente a *M. tuberculosis* (MIC 3,13 µM); erradicación moderada	Garrison et al., 2016
4-yodo-7,8-dicloro (HP-6)	3	C-4, C-7, C-8	I, Cl	Los más potentes frente a *M. tuberculosis* (MIC 3,13 µM); erradicación moderada	Garrison et al., 2016
4,7,8-tetrabromo-1-hidroxifenazina (HP-7)	3	C-4, C-7, C-8	Br	Inactivo en erradicación (MRSA/MRSE/VRE)	Garrison et al., 2016
2,4-dibromo-6,8-bis(trifluorometil)-1-hidroxifenazina (HP-8)	2 Br + 2 –CF_3	C-2, C-4 (Br); C-6, C-8 (–CF_3)	Br, –CF_3	Erradicación máxima (MBEC 0,15 µM); activo frente a MtB durmiente	Gao et al., 2025; Liu et al., 2023

Tabla 2 MBEC* de HP-4 vs. Vancomicina y EDTA

Compuesto	**MRSA-2**	**MRSE 35984**	**VRE 700221**
HP-4	9,38	2,35	0,20
Vancomicina	>2000	>2000	150
EDTA	>2000	>2000	—

*Valores de MBEC expresados en μM (Garrison et al., 2016).

10 ANEXOS

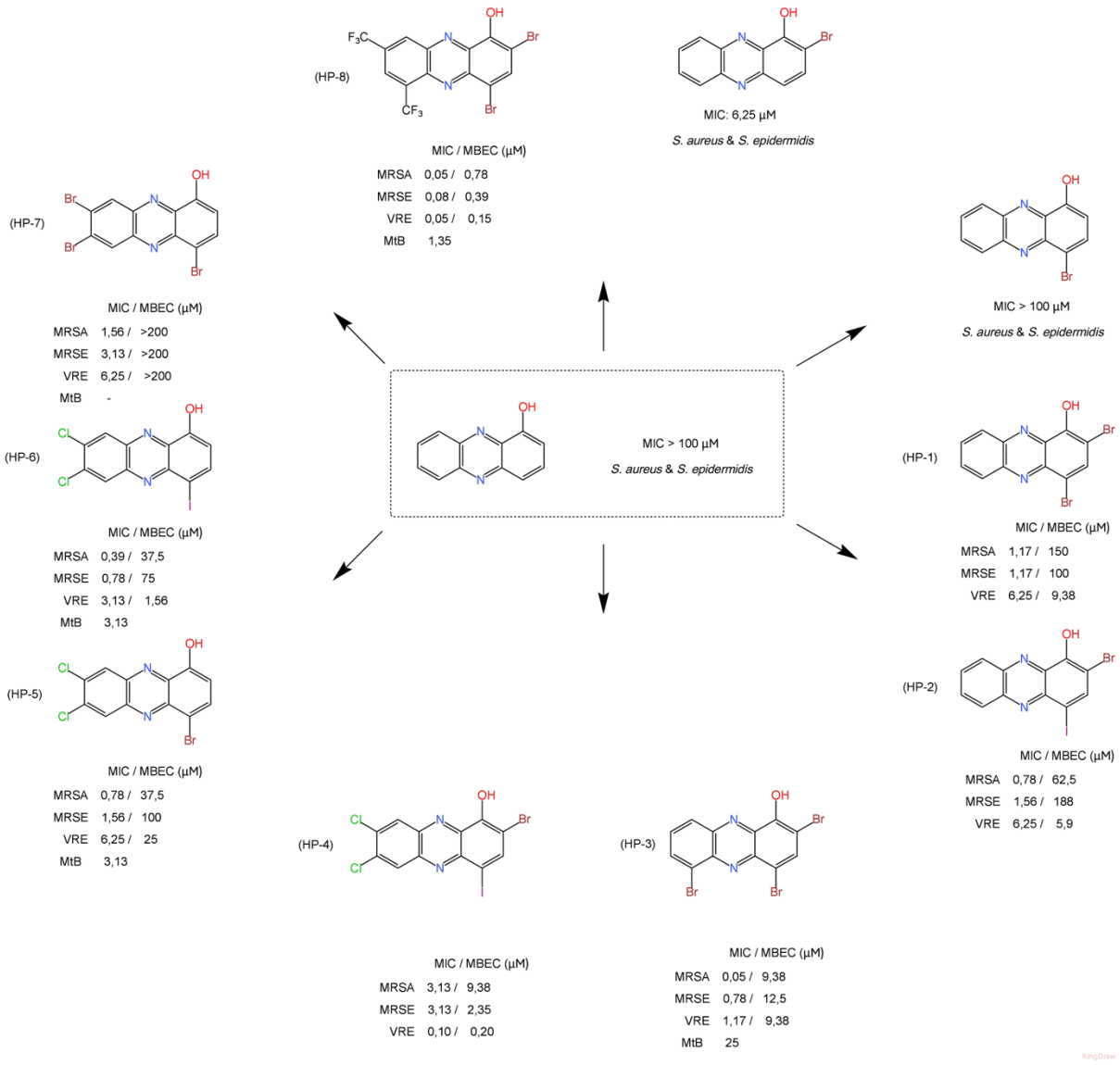


Figura A1 Derivados representativos de HPs y sus valores de MIC y MBEC frente a MRSA, MRSE, VRE y MtB.