

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



"Síntesis, encapsulado y evaluación antimicrobiana de derivados de Trifenilimidazol"

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

Leonardo Daniel Zamarripa Córdova

Tijuana B.C.

JUNIO DEL 201

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 037

Tijuana, B. C., a 12 junio de 2019

C. Leonardo Daniel Zamarripa Córdova
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la

Opción Tesis

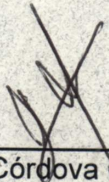
Es propuesto, por el Dr. Iván Córdova Guerrero y la Dra. Laura Janeth Díaz Rubio quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Síntesis, encapsulado y evaluación antimicrobiana de derivados de trifenilimidazol" el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII.- ANEXOS

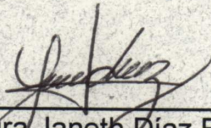
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA




FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA



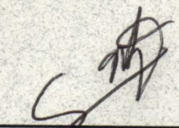
Dr. Iván Córdova Guerrero
Director de Tesis



Dra. Laura Janeth Díaz Rubio
Co-Directora de Tesis



Dr. José Luis González Vázquez
Director Provisional



Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy
Subdirectora

"El deseo de saber y de ilustrarse es innato en el corazón del hombre". Benito Juárez.

"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber". Albert Einstein.

"Los fracasos son también útiles, porque, bien analizados, pueden conducir al éxito". Alexander Fleming.

"Un hombre que limita sus intereses, limita su vida". Vincent Price.

"El que lee mucho y anda mucho, ve mucho y sabe mucho" Miguel de Cervantes Saavedra.

"La vida es maravillosa. Estar vivo, respirar y ver el sol es un don. Y de hecho no hay nada más que eso.". Michael Crichton

"Ama lo que haces y haz lo que amas. No escuches a nadie más que te diga que no lo hagas. Haz lo que quieras, lo que ames. La imaginación debe ser el centro de tu vida." Ray Bradbury.

"Tenemos que elegir entre lo que es correcto y lo que es fácil" JK Rowling

"Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes" Isaac Newton.

"En algún lugar algo increíble está esperando ser descubierto" Carl Sagan.

AGRADECIMIENTOS

- Le doy gracias a Dios, por todo lo que me ha dado a mí y a mi familia, por mi pasión a la ciencia y permitir conocer y vivir tantas experiencias, por darme salud, felicidad, familia, amigos y mentores que me han ayudado a lo largo de mi vida.
- A mi familia por apoyarme en todos los sentidos como emocional, económica, física y espiritualmente, por su tiempo, confianza, paciencia, amor, y por creer en mí, en especial a mi madre Esther Zamarripa Córdova a quien le dedico esta tesis como muestra de gratitud de todo lo que me ha dado.
- Al Dr. Iván Córdova por todo su apoyo y enseñanzas, le agradezco por haberme tenido tanta paciencia a pesar de mi larga estancia y algunas imprudencias de mi parte como casi incendiar el laboratorio una ocasión. Gracias por todo el esfuerzo que ha invertido en mi formación. Gracias por todos los conocimientos transmitidos a lo largo de estos años
- Quiero agradecer a todo el equipo del al Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales, por todo el apoyo, orientación, ayuda, paciencia y su tiempo para ayudarme. A los químicos Laura Díaz, Wagner Barajas, Arturo Estolano, Eduardo Noriega y demás miembros, gracias por su amistad y compañerismo.
- A mis maestros, que a lo largo de mi carrera me han brindado sus conocimientos y herramientas tanto dentro como fuera del salón de clases, por su apoyo, su guía y consejos. Gracias por ayudarme a formarme como profesional y seguir sus pasos en el área docente y motivarme para adentrarme al campo de la investigación
- A la Universidad Autónoma de Baja California, y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, por haberme dado las oportunidades para estudiar y desarrollarme profesionalmente.
- Al laboratorio de análisis microbiológico de la Universidad Autónoma de Baja California por su apoyo y ayudarme en la parte de evaluación biológica.
- A todos los amigos que tuve el privilegio de conocer en la carrera. que compartieron conmigo el esfuerzo, el estrés, las desveladas estudiando, los viajes, los experimentos que en más de una ocasión ponían en riesgo nuestras vidas pero nos si divertíamos, las imprudencias o payasadas que llegamos hacer y mas, muchas gracias por todo.

RESUMEN

En este proyecto se realizó la síntesis de derivados de trifenil imidazol, el encapsulamiento de algunos de los compuestos sintetizados, caracterización por diferentes métodos y la evaluación antibiótica de estos productos.

En la **Introducción** se menciona la evolución de la química medicinal a través de la historia, como se fueron dando los primeros avances a través de la curiosidad y la experimentación y como se fue recolectando esta información, el impacto que tuvo la síntesis orgánica en el desarrollo de medicamentos, las ventajas que presenta en la química medicinal en la actualidad y por último el problema de la resistencia a los antibióticos.

En las **Generalidades** se muestra una explicación sobre el grupo imidazol, sus propiedades fisicoquímicas, bioactividad y diferentes aplicaciones en biomoléculas. Además de ver los diferentes métodos para sintetizar estos compuestos de interés y su impacto para obtener las encapsulados metálicos.

En la **Metodología** se muestra la serie de pasos sintéticos para los productos generados en esta tesis, tanto de los derivados del trifenil imidazol como los encapsulados, así como el procedimiento de las evaluaciones biológicas por medio de la técnica de antibiograma

En **Discusión de Resultados** se expone la obtención de los productos, rendimientos, su caracterización por diferentes técnicas: Espectroscopia de Ultravioleta-Visible (UV-Vis), Infrarrojo (FT-IR), espectrometría de masas (MS), resonancia magnética nuclear (RMN), la obtención de NP de plata unidas a los productos y se evalúa la actividad antibacteriana y la antimicótica de los compuestos.

Finalmente en las **Conclusiones** se recapitulan los datos obtenidos y objetivos logrados en este trabajo y se hace un análisis de resultados y se formulan propuestas que expliquen cómo éstos confirman la hipótesis planteada, además de dejar una base de información para posibles trabajos a futuro.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	6
Índice de Esquemas.....	7
Índice de Tablas.....	8
Índice de Anexos.....	9
Abreviaturas y Acrónimos.....	10
1 Introducción.....	12
2 Hipótesis.....	17
3 Objetivos generales.....	18
4 Antecedentes.....	19
4.1 Imidazol: propiedades, aplicaciones.....	19
4.2 Técnicas para la síntesis del imidazol.....	21
4.3 Trifenilimidazol (Lofina).....	23
4.4 Partículas de plata.....	25
4.4.1 Aplicaciones y usos de la plata.....	25
4.4.2 Partículas.....	26
4.4.3 Métodos de síntesis de partículas de plata.....	26
4.5 Resistencia a los antibióticos.....	29
5 Metodología.....	31
5.1 Ruta sintética.....	31
5.1.1 Síntesis de los derivados.....	32
5.2 Formación de los encapsulados de plata.....	37
5.2.1 Caracterización de productos.....	38
5.3 Metodología de evaluación biológica.....	40
6 Resultados.....	42
6.1 Síntesis y caracterización de los derivados IMI.....	42
6.3 Partículas de plata.....	47
6.2 Actividad Antibiótica.....	48
7 Conclusiones.....	50
8 Bibliografía.....	51
9 Apéndice.....	54
9.1 Técnicas experimentales.....	54
9.2 Instrumentación.....	55
9.3 Anexos.....	57
9.3.1 Espectros Infrarrojos.....	57
9.3.2 Espectros de masas.....	60
9.3.3 RMN.....	62
9.3.4 Antibiogramas.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Tabla Sumeria con el Código de Hammurabi.....	12
Figura 2.	Hoja del código Badiano.....	13
Figura 3.	Paracetamol.....	14
Figura 4.	Acido acetilsalicílico.....	14
Figura 5.	Ejemplos de medicamentos con el anillo de imidazol.....	20
Figura 6.	Imagen de partículas de plata con TEM.....	27
Figura 7.	Estrategias de resistencia a los antibióticos.....	30
Figura 8.	CCF de IMI Lofina con una FM de n-Hex 70%/ AcOEt 30%.....	32
Figura 9.	CCF izquierda salicilaldehído y derecha <i>o</i> -Anisaldehído con una FM de n-Hex 70%/ AcOEt.....	33
Figura 10.	CCF de IMI <i>o</i> -Met con una FM de n-Hex 70%/ AcOEt 30%.....	34
Figura 11.	CCF de IMI <i>o</i> -NO ₂ con una FM de n-Hex 70%/ AcOEt 30%.....	35
Figura 12.	CCF de IMI FUR con una FM de n-Hex 70%/ AcOEt 30%.....	36
Figura 13.	IMI que fueron seleccionados para preparar las partículas (IMI Lofina, IMI FUR, IMI <i>o</i> -NO ₂ y IMI <i>o</i> -Met).....	37
Figura 14.	Espectrómetro FT-IR y programa OMNIC Spectra Software.....	38
Figura 15.	Pico de Absorbancia y Bandas de IR de los encapsulados Ag.....	39
Figura 16.	Medios de cultivo con diferentes cepas de microorganismos utilizadas en las pruebas de antibiograma (<i>P. aeruginosa</i> en MH y <i>C. albicans</i> en PDA).....	40
Figura 17.	Métodos de siembra: 1) por estría múltiple y 2) por vertido en placa....	41
Figura 18.	Estructuras del patrón de fragmentación del esqueleto de IMI Lofina....	43
Figura 19.	Estructuras del patrón de fragmentación del esqueleto de IMI <i>o</i> -Met....	44
Figura 20.	Estructuras del patrón de fragmentación del esqueleto de IMI <i>o</i> -NO ₂	45
Figura 21.	Estructuras del patrón de fragmentación del esqueleto de IMI FUR.....	46
Figura 22.	Nanopartículas y sus precursores.....	47
Figura 23.	Antibiogramas de las partículas de plata y precursores frente a <i>P. aeruginosa</i> multirresistente y <i>C. albicans</i>	49

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Síntesis de Urea.....	13
Esquema 2.	Ruta de la síntesis del Taxol.....	15
Esquema 3.	Síntesis de Histamina a partir de Histidina.....	19
Esquema 4.	Síntesis de Debus.....	21
Esquema 5.	Síntesis de Brederek.....	21
Esquema 6.	Síntesis de imidazoles utilizando α -hidroxicetona y amidinias.....	21
Esquema 7.	Síntesis de imidazoles utilizando amino cetona con una cianamida.....	21
Esquema 8.	Síntesis de imidazoles utilizando tosilmetilisocianida y aldimina.....	21
Esquema 9.	Síntesis de Radiszewski.....	22
Esquema 10.	Síntesis del Trifenilimidazol.....	22
Esquema 11.	Mecanismo de reacción para la Síntesis del Trifenilimidazol.....	23
Esquema 12.	Reacción para la síntesis de partículas de Plata.....	26
Esquema 13.	Síntesis de partículas de plata por microondas.....	27
Esquema 14.	Reacción para la síntesis de Trifenilimidazol a partir de: 1) Bencilo y 2) aldehído.....	31
Esquema 15.	Síntesis del IMI Lofina.....	32
Esquema 16.	Síntesis del o-anisaldehído.....	33
Esquema 17.	Síntesis del IMI o-Met.....	34
Esquema 18.	Síntesis del IMI o-NO ₂	35
Esquema 19.	Síntesis del IMI FUR.....	36
Esquema 20.	Método Radziszewski para la síntesis de Trifenilimidazoles.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Medios de cultivo utilizado para la realización de los bioensayos.....	40
Tabla 2.	Cantidades obtenidas de los IMI y sus rendimientos.....	42
Tabla 3.	Resultados de las Pruebas de Antibiograma en <i>C. albicans</i>	48
Tabla 4.	Resultados de las Pruebas de Antibiograma en <i>P. aeruginosa</i>	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Metodología de la Ruta sintética general.....	54
Anexo 2.	Espectro de infrarrojo del compuesto IMI Lofina.....	57
Anexo 3.	Espectro de infrarrojo del compuesto IMI <i>o</i> -Met.....	57
Anexo 4.	Espectro de infrarrojo del compuesto IMI <i>o</i> -NO ₂	57
Anexo 5.	Espectro de infrarrojo del compuesto IMI FUR.....	58
Anexo 6.	Espectro de infrarrojo del compuesto IMI Lofina P Ag.....	58
Anexo 7.	Espectro de infrarrojo del compuesto IMI <i>o</i> -Met P Ag.....	58
Anexo 8.	Espectro de infrarrojo del compuesto IMI <i>o</i> -NO ₂ P Ag.....	59
Anexo 9.	Espectro de infrarrojo del compuesto IMI FUR P-Ag.....	59
Anexo 10.	Espectro de masas del compuesto IMI Lofina.....	60
Anexo 11.	Espectro de masas del compuesto IMI <i>o</i> -Met.....	60
Anexo 12.	Espectro de masas del compuesto IMI <i>o</i> -NO ₂	61
Anexo 13.	Espectro de masas del compuesto IMI FUR.....	61
Anexo 14.	Espectro de RMN 1H del compuesto IMI Lofina.....	62
Anexo 15.	Espectro de RMN 1H del compuesto IMI <i>o</i> -Met.....	63
Anexo 16.	Antibiogramas.....	64

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°C	Grados centígrados
a. C.	Antes de Cristo
Ac	Acido
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
AcONH ₄	Acetato de Amonio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgNO ₃	Nitrato de plata
ARN	Acido ribonucleico
AS	Agar Sangre
B.C.	Baja California
CCF	Cromatografía de capa fina
CG/EM	Cromatografía de gases/Espectrometría de masas
CHCl ₃	Cloroformo
cm ³	Centímetros cúbicos
d. C.	Después de Cristo
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsufóxido
EI	Impacto electrónico
Ej.	Ejemplo
EM	Espectrometría de Masas
Eq	Equivalente
EtOH	Etanol
etc.	Etcétera
FCQI	Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías
Fig.	Figura
FM	Fase móvil
FT	Transformadas de Fourier
g	Gramo
H ₂ O	Agua
HCl	Acido clorhídrico
Hrs.	Horas
IR	Infrarrojo
IMI	Trifenilimidazol
IMI Lofina	2, 4, 5-trifenil-1 <i>H</i> -imidazol
IMI <i>p</i> -OH	4-(4,5-difenil-1 <i>H</i> -imidazol-2-il) fenol
IMI <i>o</i> -Met	2-(2-metoxifenil)-4,5-difenil-1 <i>H</i> -imidazol
IMI <i>o</i> -NO ₂	2-(2-nitrofenil)-4,5-difenil-1 <i>H</i> -imidazol (IMI)
IMI FUR	2-(furan-2-yl)-4,5-difenil-1 <i>H</i> -imidazol
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (por sus siglas en inglés)
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio

Kg	Kilogramo
KOH	Hidróxido de potasio
Log P	Coeficiente de partición
M	Molar
M+	Ión molecular
mg	Miligramos
MH	Mueller Hinton
min.	Minuto
mL	Mililitro
n-Hex	n-Hexano
NaBH ₄	Borohidruro de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NCCLSI	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NH ₄ OH	Hidróxido de Amonio
nm	Nanómetro
O	Orto
<i>p</i>	Para
P-Ag	Partículas de plata
Pág.	Página
Pb	Punto de Ebullición (por sus siglas en inglés)
PDA	Agar Papa Dextrosa
Pf	Punto de Fusión
pH	Potencial de Hidrógeno
pKa	Constante de disociación ácida
ppm	Partes por millón
QM	Química Medicinal
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SEM	Microscopio Electrónico de barrido (por sus siglas en inglés)
Sln.	Solución
TEM	Microscopio Electrónico de transmisión (por sus siglas en inglés)
TLC	Cromatografía de Capa Fina (por sus siglas en inglés)
UABC	Universidad Autónoma de Baja California
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro

1. INTRODUCCIÓN

La historia de la química medicinal tiene sus orígenes cuando los humanos en su necesidad por encontrar tratamientos para sus males y enfermedades, lo movieron buscar respuestas y soluciones mediante la observación, la curiosidad y la experimentación.

Tuvieron que ser cuidadosos espectadores de la naturaleza para sobrevivir. Se vieron en la necesidad de estudiar la conducta de los animales, de las plantas comestibles de las que se alimentaba o de las venenosas que rehuían, en el caso de animales de aspecto enfermizo o que sufrían al estar lastimados, consumían determinada planta y estos llegaban a sanar. Estas conductas que fueron imitadas más tarde por los humanos al sentir malestares o también de forma empírica, por medio de ensayos de prueba y error fueron aprendiendo de algunas plantas tenían la propiedad de sanar o apaciguar el dolor, pero también otras podían producir malestares, alucinaciones o incluso la muerte¹. Esta condición del descubrimiento se realizó gracias a una combinación de accidente y sagacidad.

Tiempo después, la utilización de las raíces, frutos, hojas y cortezas de plantas fueron aumentando y aparecieron otras fuentes como hongos, minerales y órganos, tejidos y desechos de animales. Tras el aumento de conocimientos curar era fuente de autoridad y prestigio reservada solo por curanderos, magos tribales o sacerdotes de una casta y se relacionó a las enfermedades como castigos divinos².

El crecimiento de civilizaciones trajo consigo nuevos conocimientos sobre las propiedades alimenticias, curativas y tóxicas de las plantas y animales que los rodeaban y nuevas prácticas como la aparición de la medicina como oficio. Existen documentos como las tablillas de arcilla en escritura cuneiforme con listas de drogas cuidadosamente redactadas en tiempos de los sumerios. Algunos de estos preparados tenían propiedades antibióticas o antisépticas o enmascaraban el mal olor de las heridas. Quizás uno de los primeros documentos detallados es el *Códice de Hammurabi*, (Fig.1) el cual contiene numerosas referencias sobre el uso de plantas curativas que hasta nuestros días siguen siendo utilizadas.



Fig. 1 Tabla
Sumeria
proveniente del
Códice de
Hammurabi

El surgimiento de culturas como la Egipcia, China e India tuvieron un gran auge en el estudio de las plantas, animales y minerales con fines terapéuticos, además de formulaciones medicinales. Esos conocimientos fueron plasmados en Papiros y representaciones artísticas en monumentos y compendios como *Pen tsao kang-mou*^{3,4}.

Aparecieron figuras como Hipócrates (entre el siglo IV y III a. C.) y Teofrasto alumno de Hipócrates quien escribió diversas obras como: Historia de las plantas (*Historia plantarum*), donde aborda el tema de las propiedades medicinales de las hierbas. Estos conocimientos trajeron la idea de crear las primeras escuelas de medicina. Otros como Discoredes médico militar romano (40-90 d.C.) y Galeno, (129 - 200 d. C.) escribieron las primeras farmacopea donde se registran las características de cientos de plantas y sus usos medicinales y hasta hoy en día sus escritos son indiscutibles⁴.



Fig. 2 Hoja ilustrada del códice Badiano

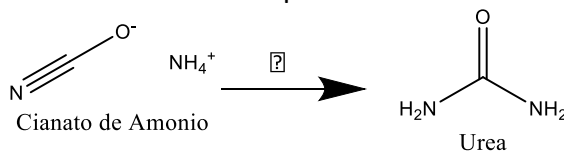
El descubrimiento del Continente Americano facilitó el enriquecimiento de los conocimientos médicos que los colonizadores poseían. De los principales legados sobre herbolaria y medicina de las culturas mesoamericanas tenemos el códice *Libellus de medicinalibus indorum herbis* escrito en 1552 por el médico náhuatl Martín de la Cruz y traducido al latín por el indio Juan Badiano⁵.(Fig. 2)

A principios del siglo XIX comenzó el nacimiento de la industria farmacéutica a partir de varias actividades relacionadas con la obtención de extractos. Los boticarios, químicos o los propietarios de herbolarios obtenían sus productos de diversas plantas, recogidas localmente o se compraban a los comerciantes que importaban especias.

Los fundamentos de la química fueron creciendo en 1700 cuando evolucionó del arte de la alquimia hasta convertirse en una ciencia moderna. Los productos químicos extraídos de plantas o animales se conocían como compuestos orgánicos, término acuñado por Jöns Jacob Berzelius y se creía que los primeros sólo podían ser producidos por los organismos vivos, de ahí su nombre, en contraposición a los compuestos inorgánicos, que eran derivados de otras fuentes. Se creía que se podían sintetizar los compuestos inorgánicos en el laboratorio, pero no los compuestos orgánicos; al menos no a partir de materiales inorgánicos, a esta doctrina se le llamaba vitalismo⁷.

Friedrich Wilhelm Sertürner 1816 logró aislar el principio activo del opio, la morfina y en 1820 el químico francés Joseph Pelleterier extrajo el alcaloide activo de la corteza de la quina al que llamó quinina. Después de este éxito aisló diversos alcaloides más, entre ellos la atropina obtenida de la belladona o la estricnina obtenida de la nuez vómica⁶.

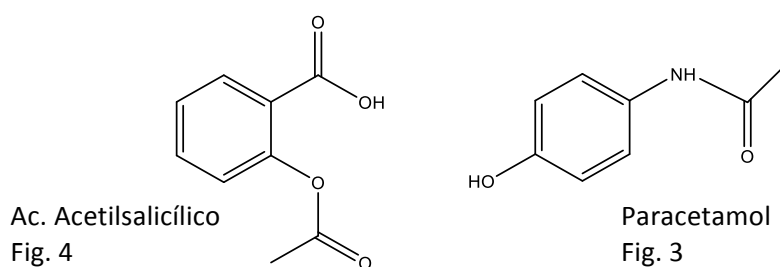
Pero en 1828, el químico alemán Friedrich Wöhler rompió con esa teoría al llevar a cabo una reacción en el laboratorio en la que calentó un compuesto inorgánico, el cianato de amonio, y consiguió producir urea, que anteriormente sólo se había conseguido aislar a partir de la orina (Esquema 1). Esta síntesis revolucionaria hizo que se intentaran sintetizar otros compuestos orgánicos.



Esquema 1 Síntesis de Urea

Uno de los primeros fármacos sintéticos fue la acetofenidina, sintetizada por Harmon Northrop Morse en 1878, comercializada en 1887 como analgésico por la empresa Bayer, de Leverkusen (Alemania) bajo la marca Phenacetin. El paracetamol -utilizado hoy como analgésico- derivó posteriormente de aquel compuesto (Fig. 3).⁸

Otro fármaco sintético importante, comercializado en 1897, fue el ácido acetilsalicílico, creado por el doctor Felix Hoffmann en los laboratorios de investigación de Bayer. Este fármaco se vendió en todo el mundo con el nombre comercial de Aspirina, propiedad de Bayer, y supuso un tratamiento nuevo y eficaz para los dolores reumáticos (Fig. 4). Aparecieron otros medicamentos sintéticos como el Arsobenzol y el Salvarsán creados por Paul Ehrlich en 1910 como tratamiento contra la sífilis⁹.



Se crearon más compañías farmacéuticas en diferentes países por empresarios o profesionales de la Medicina, algunas compañías surgieron a raíz de los comienzos de la industria química, además se fueron descubriendo nuevos principios activos y creció la demanda por medicamentos con el creciente aumento de población y los avances científicos, pero a veces esa demanda excedía la cantidad disponible de estos y ponía en riesgo especies tanto vegetales como animales de donde se extraían. Por lo que la industria de la química medicinal fue ganando terreno¹⁰.

La química medicinal es una ciencia interdisciplinaria situada entre la química orgánica, química combinatoria, bioquímica, farmacología, biología molecular, farmacognosia, inmunología, fisicoquímica, toxicología, farmacocinética, biofarmacia, farmacogenética, la espectroscopia, informática además de otras. La IUPAC establece que la química medicinal o química farmacéutica tiene como objetivo el descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del modo de acción de los compuestos biológicamente activos a nivel molecular. Otro objetivo de la química medicinal es la optimización de biomoléculas de origen natural por métodos de semisíntesis donde se busca mejorar sus efectos benéficos, o disminuir sus negativos ya sea modificar el coeficiente de partición, su afinidad por receptores, reduciendo su toxicidad o modificando sus propiedades fisicoquímicas¹¹.

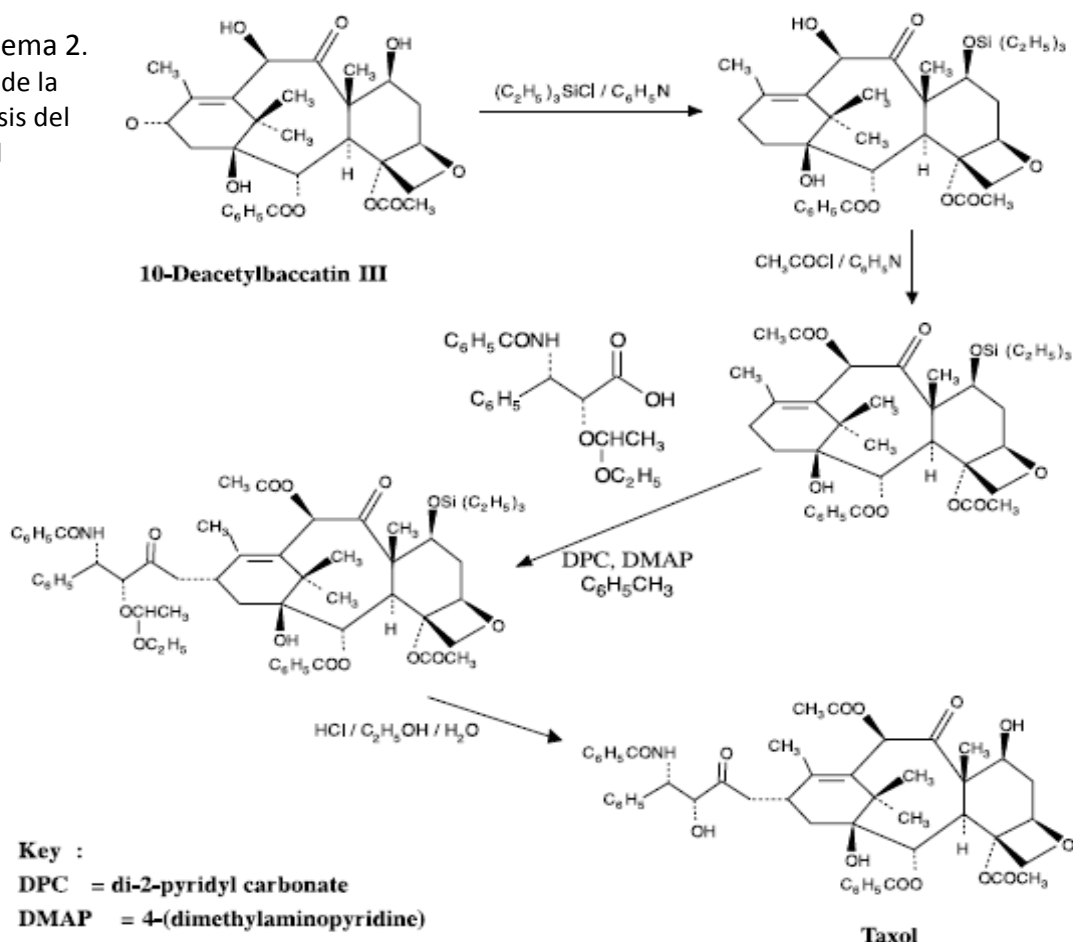
Además de entre sus otros intereses están la búsqueda de alternativas para la obtención de moléculas de especies en peligro o la optimización de mayor obtención ejemplo de ello

es el Taxol o Paclitaxel usado para el tratamiento para inhibir el crecimiento de las células cancerígenas. Se obtiene a partir de la corteza del tejo pacífico (*Taxus brevifolia*), su actividad antitumoral fue confirmada en 1977 resultando un excelente candidato como tratamiento eficaz contra tumores mamarios y el cáncer ovárico.

A pesar de su interés como agente quimioterapéutico, el uso del Paclitaxel se vio restringido como consecuencia de las limitaciones de disponibilidad derivadas de las dificultades para su obtención. Entre ellas su baja concentración en la corteza (0,007% del peso seco) y el elevado coste del proceso de extracción, así que se requería procesar unos 750 árboles para obtener 1 kg de Paclitaxel¹². A ello hay que añadir que la tala indiscriminada del tejo podría causar la rápida extinción de la especie, a la vez que comprometería la propia fuente natural del Paclitaxel. Lo que trajo de consecuencia que dicho compuesto tenga un precio muy elevado.

Tiempo después se logró optimizar un método el cual consistía en sinterizar el Paclitaxel a partir de un compuesto relacionado mucho más asequible, el 10-deacetylbaaccatin, En este tipo de síntesis enantioselectiva se han conseguido rendimientos de hasta el 75% (Esquema 2)¹³.

Esquema 2.
Ruta de la síntesis del Taxol



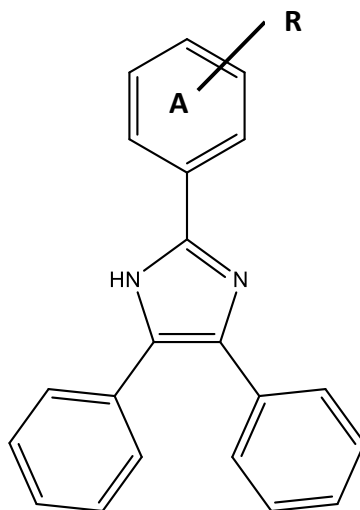
Hoy en día sabemos que los compuestos derivados de las plantas y los compuestos sintetizados son idénticos, si asumimos que son puros. Como a principios del siglo XIX se refuto el Vitalismo del que ya se mencionó, se podría pensar que en la actualidad la teoría ya no existe, pero el Vitalismo persiste hoy en día en las mentes de aquellos que creen que las vitaminas, compuestos saborizantes, etc. “naturales” (derivados de las plantas) son de cierta manera diferentes y más saludables que los compuestos idénticos “artificiales” (sintetizados)^{14,15}.

En la actualidad con ayuda de los avances tecnológicos, el desarrollo de nuevas rutas sintéticas, y mejores instrumentos, la química medicinal se apoya en el uso de la bioinformática, la química computacional y la química combinatoria para acelerar los procesos para la obtención de nuevos medicamentos con una mayor comprensión de los procesos con el fármaco y su diana. Una técnica es el cribado (screening) en donde se realiza una evaluación rápida de la actividad biológica de varias moléculas procedentes de una familia o colecciones de compuestos usando las bases de datos y simulaciones por medio de programas informáticos.

El preocupante aumento de bacterias resistentes a los antibióticos y la creciente demanda de medicamentos son razones por las que las instituciones se apoyen de la química medicinal en la búsqueda de nuevos principios activos para resolver estos problemas.

2. HIPÓTESIS

El efecto electrónico sobre el anillo A y la forma encapsulada de los derivados de Trifenilimidazol son parámetros moleculares que influyen en la actividad antimicrobiana de estos compuestos.



3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Sintetizar una familia de compuestos derivados del trifenilimidazol y evaluar los efectos electrónicos y de encapsulación en experimentos antimicrobianos.

Objetivos particulares:

- Diseñar la ruta sintética óptima y llevar a cabo la síntesis de derivados de trifenilimidazol.
- Obtener partículas de plata a partir de los derivados imidazólicos.
- Caracterizar los productos e intermedios, mediante técnicas de espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- Realizar pruebas biológicas complementarias a los compuestos evaluando la actividad antibacteriana y antimicótica de los productos sintéticos, por medio de la técnica de antibiograma.
- Determinar qué factores electrónicos y moleculares influyen en el estudio biológico de los productos evaluados.

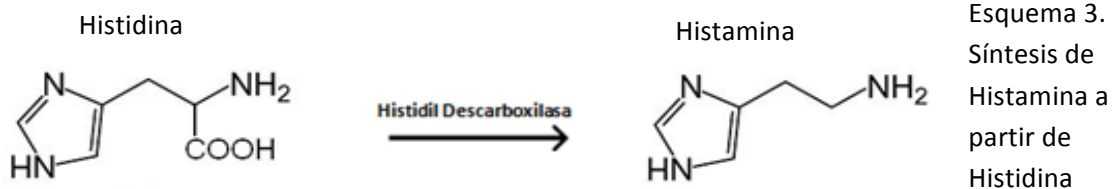
4. ANTECEDENTES

4.1 Imidazol: propiedades y aplicaciones

El anillo del imidazol (1,3-diazol o 1,3-Diaza-2,4-ciclopentadieno) es un heterociclo aromático de 5 miembros de la familia de los azoles que ha servido de base de numerosas moléculas bioactivas y diversos fármacos, su fórmula molecular es $C_3H_4N_2$ y su peso molecular es de $68.077 \text{ g/mol}^{16}$.

Es soluble en agua y otros solventes polares proteicos, tiene una densidad de 1.03 g/cm^3 . Su punto de ebullición es de 268°C y su punto de fusión es de 89°C . Tiene propiedades anfotéricas por lo que puede ser considerado una base, con un pKa de 7.0 o como ácido con un pKa de 14.52, su forma radical es conocida como imidazolil y son cristales que van del incoloro a amarillo. Presenta diferentes formas resonantes de acuerdo en el medio en el que se encuentre ácido o básico. Tiene 2 formas tautoméricas equivalentes, 1H-imidazol y 3H-imidazol^{16, 17}.

El imidazol es considerado un alcaloide y se puede encontrar presente en las semillas de varias especies de plantas leguminosas por ejemplo las lentejas (*Lens culinaris*). Además está presente en moléculas de gran importancia biológica. El derivado más importante del Imidazol es el aminoácido histidina y su producto de descarboxilación la histamina (Esquema 3). Otras moléculas donde se encuentra presente son en las Purinas como la Adenina y la Guanina que forman parte de los nucleótidos del ADN y ARN¹⁸.



Esquema 3.
Síntesis de
Histamina a
partir de
Histidina

La histidina es uno de los aminoácidos más importantes en la hemoglobina por su capacidad para ser complejos con el hierro, como neuromodulador en el sistema nervioso central, es importante en varias proteínas para el mantenimiento de las vainas de mielina que protegen a las neuronas y desintoxicación de metales pesados y como ya se había mencionado para la síntesis de histamina además de otras funciones de crecimiento y reparación de tejidos y protección contra daños de radiación²⁰.

La histamina está involucrada en numerosos procesos en nuestro cuerpo actuando en los diferentes receptores que son el H1, H2 y H3, por ejemplo en procesos del sistema inmune como un mediador de las respuestas alérgicas, Se encuentra principalmente en los mastocitos y en las células basófilas. También la encontramos en cerebro, sobre todo en el hipotálamo posterior donde la podemos considerar un neurotransmisor central, con

efecto vasodilatador y acción bronco-constrictora e interviene en la señalización para aumentar la secreción de pepsina y ácido clorhídrico en el estómago²¹.

Las aplicaciones del imidazol en la medicina son muy variadas, debido que se encuentra dentro varios grupos farmacológicos como son los Antihipertensores como el Eprosartan, Antihistamínicos como la cimetidina, Antibacterianos y antiprotozoarios como el Metronidazol, Antihelmínticos como el Albendazol y Antifúngicos como el Ketoconazol y el Intraconazol. (Figura 5) Además es usado como ligando para formar complejos metálicos o en procesos de catálisis ya se con fines académicos o industriales o para el diseño de nuevos materiales.

El mecanismo de acción por el cual los antibióticos con el anillo de imidazol como la familia de los Nitroimidazoles: Dimetridazol, Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol y Secnidazol, es por la de acción de sus formas activas que desestabilizan las cadenas de ADN, al formar aductos con las proteínas y ácidos nucleicos, impidiendo su reparación y por ende inhibiendo así la síntesis de ADN²².

El mecanismo por el que actúan los antimicóticos imidazólicos es el de inhibir la enzima lanosterol C14-alfadesmetilasa, una enzima acoplada al citocromo P-450, esencial para la síntesis de ergosterol a partir de lanosterol. La falta de ergosterol altera la fluidez de la membrana aumentando su permeabilidad, lo que produce una fuga de compuestos intracelulares y un deterioro estructural y funcional de los orgánulos intracelulares y por ende una inhibición del crecimiento celular y de la replicación²³.

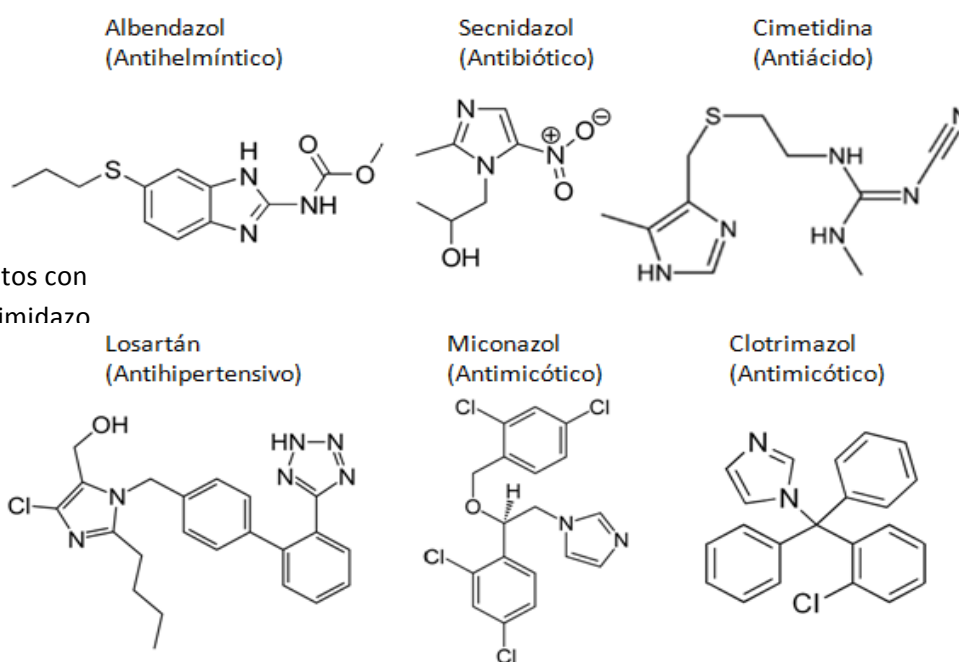
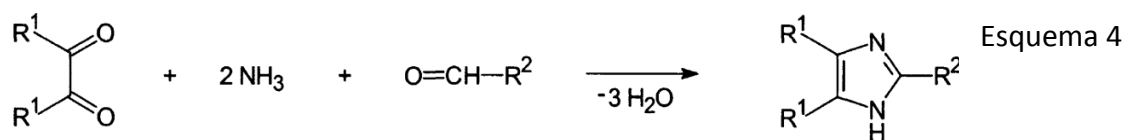


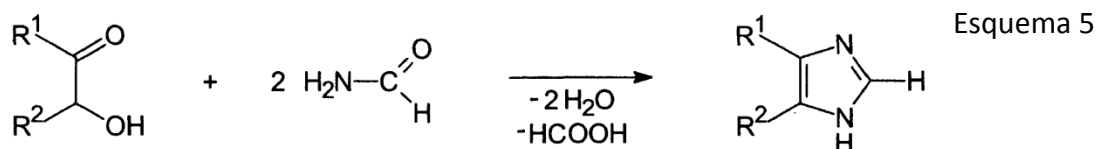
Fig. 5 Ej. de medicamentos con el anillo de imidazo

4.2 Técnicas para la síntesis del imidazol:

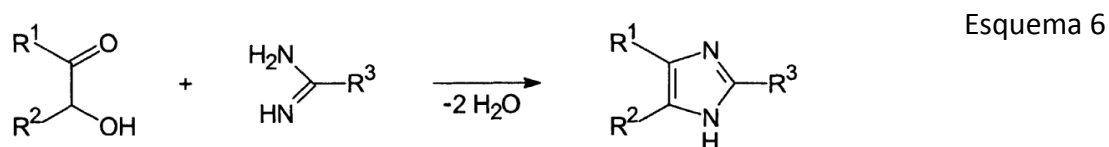
Para llevar a cabo la síntesis del imidazol se puede realizar por distintas rutas una de ellas es por medio de la ciclo-condensación con amonio y aldehído, esta reacción fue llevada a cabo en 1858 por Heinrich Debus y llamo al producto Glioxalina, por haber usado Glioxina para su síntesis. Por medio de esta reacción se obtienen rendimientos bajos (Esquema 4).



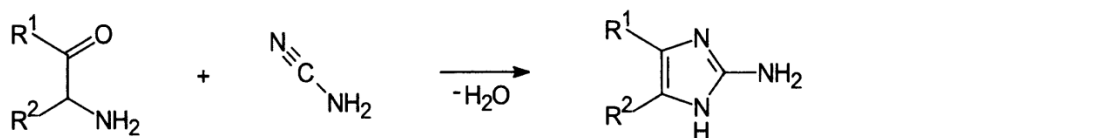
Otra técnica es la síntesis de Brederick a partir de la guanidina y una α-hidroxicetona para dar imidazoles con sustituciones en los carbonos 1 y 5 (Esquema 5).



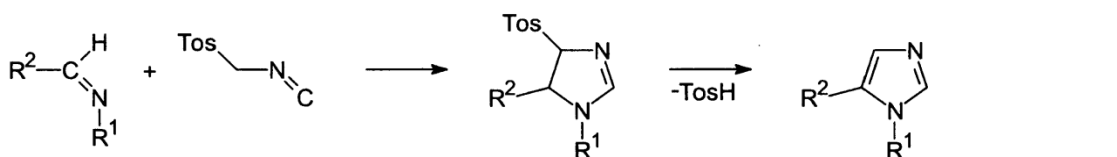
Una tercera técnica para la síntesis de imidazoles con sustituciones en los carbonos 1 y 5 es utilizando una α-hidroxicetona y amidinas (Esquema 6).



Por medio de una condensación de un amino cetona con una cianamida se puede llevar a cabo la síntesis del imidazol (Esquema 7).

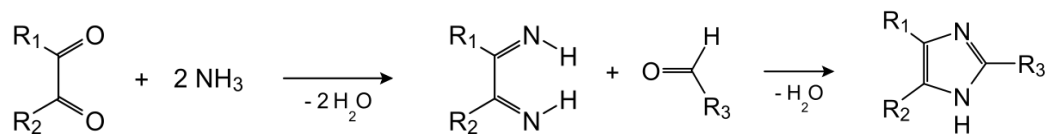


Otra síntesis para imidazoles es utilizando tosilmetilisocianida con una aldimina en presencia de K₂CO₃ (Esquema 8) ²⁴.

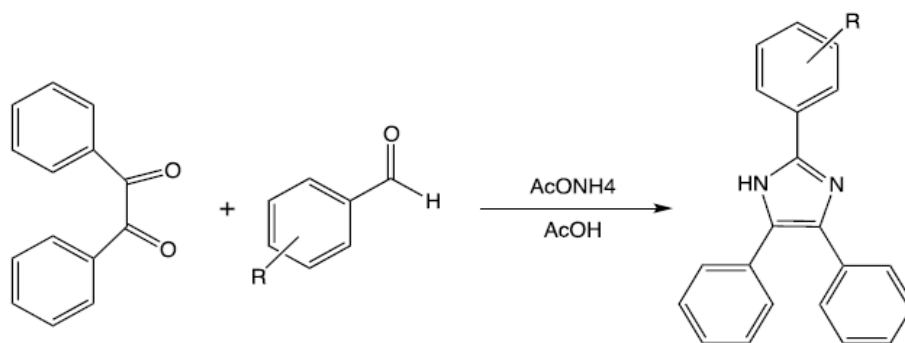


La reacción de Síntesis de Debus-Radiszewski (Reacción con la que se trabajo para esta tesis) la cual es una modificación de la reacción de Debus donde se sintetiza la Lofina cuyo núcleo es un imidazol (Esquema 9)²⁵.

Esquema 9.



La propuesta para esta tesis es partir de la síntesis de Radiszewski para la síntesis de Trifenil imidazol y sus derivados.

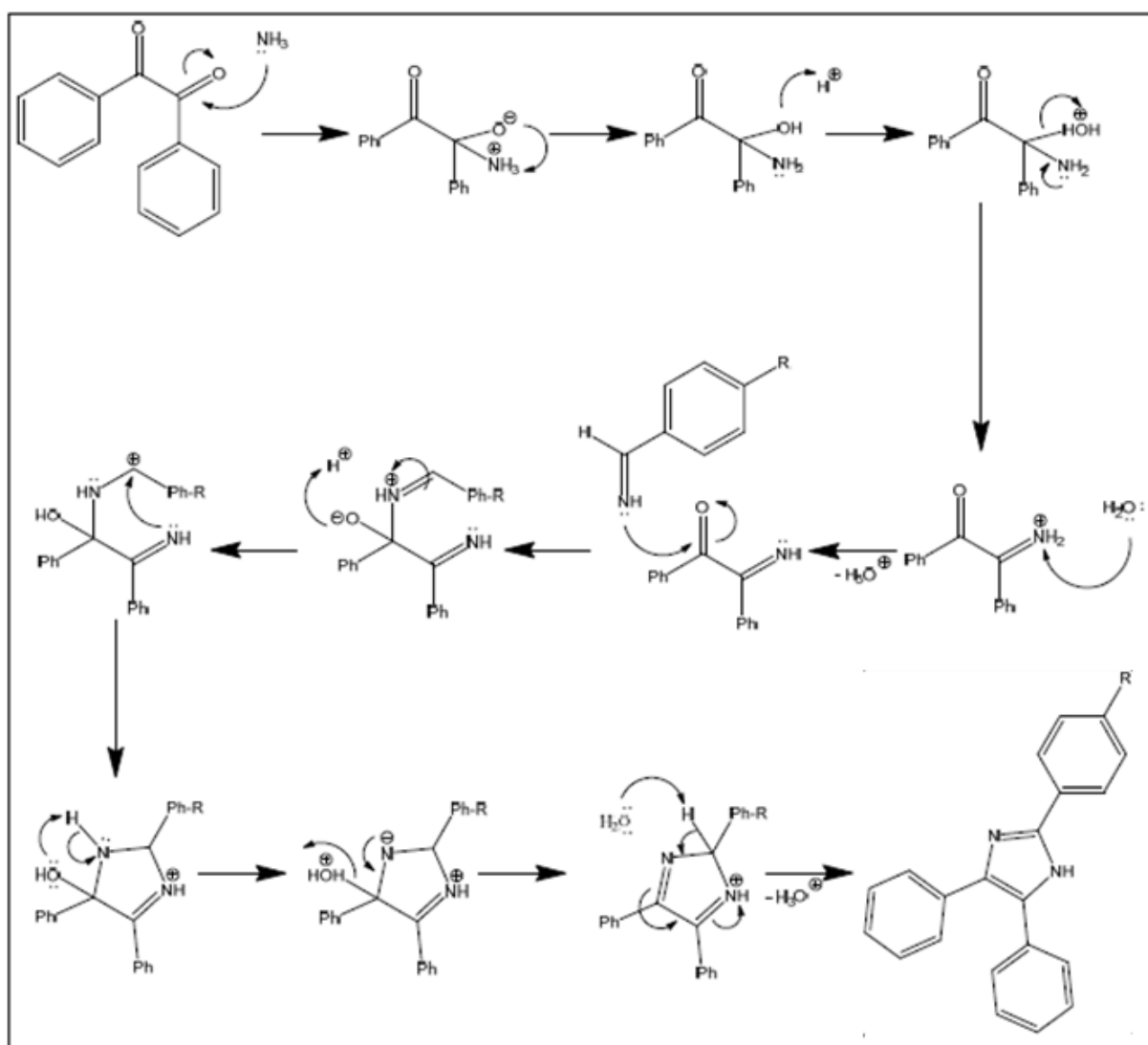


Esquema 10.

4.3 Trifenilimidazol (Lofina)

Esta molécula con núcleo de imidazol fue propuesta por Bronisław Leonard Radziszewski en 1877 tras una modificación a la síntesis de imidazoles propuesta por Heinrich Debus, y fue publicado en 1882, la reacción era a través de una condensación de una 1,2-diacetona con un aldehído aromático y amonio²⁶.

La reacción ocurre en 2 etapas, en la primer etapa el 1,2- diacetona (Bencilo) y el amonio (Acetato de amonio) se condensan para formar una 1,2-diamina y en el segundo paso la 1,2-diamina se condensa con el grupo aldehído (Benzaldehído) en reflujo con Acido acético (Esquema 11)²⁷.



Esquema 11. Mecanismo de reacción para la síntesis del Trifenilimidazol²⁸

El nombre común del 2,4,5-Trifenilimidazol es Lofina, su fórmula molecular es $C_{21}H_{16}N_2$ y su peso molecular es de 296.365 g/mol. Su punto de fusión está entre los 274-278 °C y punto de ebullición es de 508.6 ± 19.0 °C, su densidad es de 1.2 ± 0.1 g/mL y un LogP de 5.39, es soluble en solventes de polaridad media como Cloroformo y Acetato de Etilo³. Los tres anillos de fenilo unidos al núcleo de imidazol no son coplanares con este último, con ángulos de 21,4, 24,7 y 39,0 grados, el anillo de imidazol es portador de un Nitrógeno H-donante y otro H-aceptor.

Este compuesto tiene propiedades de fluorescencia y quimioluminiscencia ya que emite una luz amarilla cuando reacciona con el oxígeno en presencia de una base fuerte, además es una de las pocas moléculas luminiscente de larga duración y se ha propuesto como un reactivo analítico para el rastreo detección de iones metálicos²⁹. Continúan en investigación sus aplicaciones ya que se siguen descubriendo nuevas propiedades y de sus respectivos derivados.

4.4 Partículas de plata

4.4.1 Aplicaciones y usos de la plata

Durante siglos, la plata ha sido empleada como metal precioso por el ser humano en diversas aplicaciones pero también ha sido utilizada como un agente antimicrobiano y desinfectante. Civilizaciones antiguas como los egipcios o los fenicios ya construían las cisternas de almacenamiento de agua con plata para reducir las enfermedades causadas por el consumo de aguas contaminada. En los siglos XVII y XVIII se empleó nitrato de plata AgNO_3 para el tratamiento de úlceras y su actividad antimicrobiana se estableció en el siglo XIX pero fue hasta 1893 cuando Karl Wilhelm von Nageli, botánico suizo, hizo pública la primera investigación demostrando las características antimicrobianas de la plata³⁰.

Sin embargo después de la introducción de los antibióticos en 1940 su uso fue disminuido, pero la resistencia causada por el abuso antibióticos a ha motivado el uso de derivados de la plata para tratamientos y empleo en el control de infecciones.

Los iones de plata actúan interfiriendo en la permeabilidad gaseosa de la membrana (respiración celular) y una vez en el interior de la célula, alteran su sistema enzimático, inhibiendo su metabolismo y producción de energía y modificando su material genético. El resultado es que el microorganismo pierde rápidamente toda capacidad de crecer y reproducirse, de esta manera se evita el desarrollo de microorganismos patógenos³¹.

Imágenes de microscopía electrónica de transmisión muestran daños a la membrana celular y algunos elementos del citoplasma además recientes estudios han demostrado que la plata interrumpe múltiples procesos celulares bacterianos, incluida la formación de enlaces disulfuro, el metabolismo y la homeostasis del hierro en los microorganismos. Estos cambios conducen a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una mayor permeabilidad de la membrana de las bacterias haciéndolas más vulnerables a los antibióticos, ya que mayor cantidad de fármaco pueda penetrar fácilmente en su interior demostrándose un efecto sinérgico entre antibióticos y partículas^{32, 33}.

Hoy en día son pocos los medicamentos con base de plata, entre los existentes en el mercado están el Argenpal que pertenece al grupo de medicamentos denominados antisépticos y desinfectantes, cuyo principio activo es nitrato de plata, la sulfadiazina de plata, utilizada para prevenir y tratar las infecciones de las quemaduras de segundo y tercer grado que mata una gran variedad de bacterias y los tratamientos de Soluciones coloidales de plata para pacientes de pie diabético³⁴.

4.4.2 Partículas

Durante los últimos años, la nanotecnología ha atraído investigaciones extensas debido a su gran potencial en el área de Biomedicina, ya que poseen dos características relevantes que los distingue: gracias a su tamaño (escalas en nanómetros de 1×10^{-9} m a 1×10^{-8} m) pueden llegar con mayor rapidez y efectividad a un blanco elegido luego de ser administrados y que la relación área-volumen es mayor que en un material macroscópico, lo cual permite modificar su superficie con una mayor cantidad de moléculas activas y ofrece una mayor exposición del nanomaterial ante el blanco elegido, además poseen una mayor relación de superficie-volumen y por lo tanto una mayor superficie de contacto con el entorno³⁵.

Cuando estos nanomateriales se combinan con ciertas moléculas de interés como antibióticos, factores de crecimiento, proteínas o enzimas interactuando mediante enlaces covalentes, fuerzas electrostáticas o de afinidad, se obtienen materiales con una capacidad de reconocimiento excepcional que pueden ser empleados en el desarrollo de nuevos biosensores, marcadores, sistemas de diagnóstico y liberación de fármacos. Algunas ventajas de utilizar NP son su baja citotoxicidad, menores costos de producción y la posibilidad de sobrepasar los mecanismos de resistencia. Estas características ubican a las NP dentro del área con mayores posibles aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico.

Las partículas para propósitos farmacéuticos se definen como partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 1 a 1,000 nm. Consisten de materiales macromoleculares y se pueden usar terapéuticamente también como transportadores de fármacos en los cuales el principio activo (fármaco o material activo biológicamente) está disuelto, entrampado o encapsulado, o en el cual el principio activo está adsorbido o enlazado covalentemente. Debido a su amplio rango de aplicaciones se han desarrollado diversos métodos de fabricación de partículas de plata (P-Ag), así como diversos compuestos que contienen iones de plata o plata metálica³⁶.

4.4.3 Métodos de síntesis de partículas de plata

Desde un punto de vista químico, la síntesis de partículas en disolución coloidal requiere de un medio que permita obtener un control preciso sobre el tamaño y la forma de las partículas para así obtener un conjunto de partículas monodispersas que presenten una morfología determinada. En general, la síntesis de partículas metálicas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes: un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante. Ejemplo de ello es el uso del Borohidruro de sodio y el Nitrato de plata³⁷. (Esquema 12 y Figura 6).



Esquema 12. Reacción para la síntesis de partículas de plata

El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de plata metálica (Ag^0) consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento³⁵. El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación mientras que el proceso de crecimiento requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las partículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción que pueden ser concentración, temperatura, pH, poder reductor, entre otros³⁸.

Existen diferentes agentes reductores para la formación de NP Ag como lo son la DMF (N,N-dimetilformamida) siendo usado como disolvente y agente reductor a la vez en presencia de polivinilpirrolidona, el uso de ácido ascórbico, polioles, monosacáridos como la β -D-glucosa en presencia de almidón como agente estabilizante^{35, 39}. Existen varios métodos para la síntesis de NP de plata, ya sea empleando altas temperaturas (termólisis) o por medio del uso de reducción fotoquímica (fotólisis), radioquímica (radiólisis) o el uso de microondas.

La técnica de irradiación con microondas produce con una muy baja dispersión de tamaño, aunque no siempre se logre un control preciso en la morfología, como pasa en la mayoría de las técnicas pero tiene tiempos de reacción más cortos, menor consumo de energía y mejores rendimientos del producto que impiden la aglomeración de las partículas formadas. Otras ventajas la ausencia de impurezas formadas cuando se usan reductores químicos, estos métodos producen partículas de alta pureza⁴⁰.

Las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, capaces de calentar cualquier material conteniendo cargas eléctricas como las moléculas polares en un disolvente o iones conductores en un sólido. Esto lleva a la descomposición térmica de los cationes de plata, que se reduce a partículas de plata metálica, produciendo gas NO_2 como principal producto (Esquema 13).



Esquema 13.
Síntesis de NP de plata por microondas

También se informan buenos resultados presencia de etilenglicol que sirve como disolvente y agente reductor, para mejorar la producción de P Ag.

Algunas técnicas utilizadas para caracterizar e identificar partículas son el uso de Espectroscopia ultravioleta-visible (UV) debido al efecto físico de

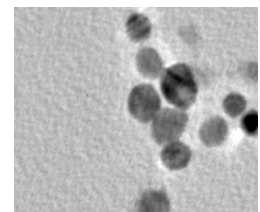


Fig. 6 Imagen de NP-Ag con TEM

la absorción de la luz en partículas metálicas es conocido como resonancia de plasmones de superficie (RPS). Esta característica óptica, es de hecho un efecto de tamaño, porque está ausente tanto en los átomos individuales como en los materiales en bulto³⁷. Otros métodos son la microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y Cristalografía o Difracción de rayos X (XRD)^{40, 41}.

La cristalografía de rayos X es una técnica que utiliza los rayos X para atravesar cristales (forma más pura del compuesto). Al entrar en contacto con el cristal, el haz se divide en varias direcciones debido a la simetría y agrupación de los átomos y, por difracción, da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos de los cristales⁴¹.

4.4 Resistencia a los Antibióticos

La resistencia a los antibióticos es una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial ya que pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones por virus, bacterias, hongos o parásitos y se requieren medidas por parte de todos los sectores del gobierno y la sociedad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) revela una grave falta de nuevos medicamentos en fase de desarrollo, para combatir la creciente amenaza de resistencia a los antibióticos. La mayoría de los fármacos que se están desarrollando son modificaciones de clases de antibióticos ya existentes que ofrecen soluciones solamente a corto plazo ⁴².

En años más recientes, las cepas de microorganismos multirresistentes a antibióticos se han cuadruplicado en el mundo entero. Bacterias tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM o MRSA en inglés), *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV) y miembros de la familia de las enterobacterias, como por ejemplo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia spp*, y *Proteus spp*, que rápidamente han desarrollado resistencia y se han diseminado en las áreas de las instituciones hospitalarias, residencias de ancianos y entre pacientes inmunodeficientes ⁴³.

El problema es tan grave que el Centro Europeo de Control de Enfermedades y el Centro para Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta han tenido que emitir nuevas definiciones que permitan estandarizar términos a nivel internacional: (MDR) bacterias multi drogo resistentes aquellas con resistencia adquirida para al menos un agente en tres o más clases distintas de antibióticos, (XDR) bacterias extensamente drogo resistentes aquellas que son resistentes al menos a un agente en todas las categorías distintas de antibióticos con la excepción de dos o menos y (PDR) bacterias pan drogo resistentes aquellas que son resistentes a todos los agentes de todas las categorías de antibióticos ⁴⁴.

La resistencia a los antibióticos se produce cuando los microorganismos sufren cambios al verse expuestos a los diferente antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antipalúdicos o antihelmínticos). Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas.

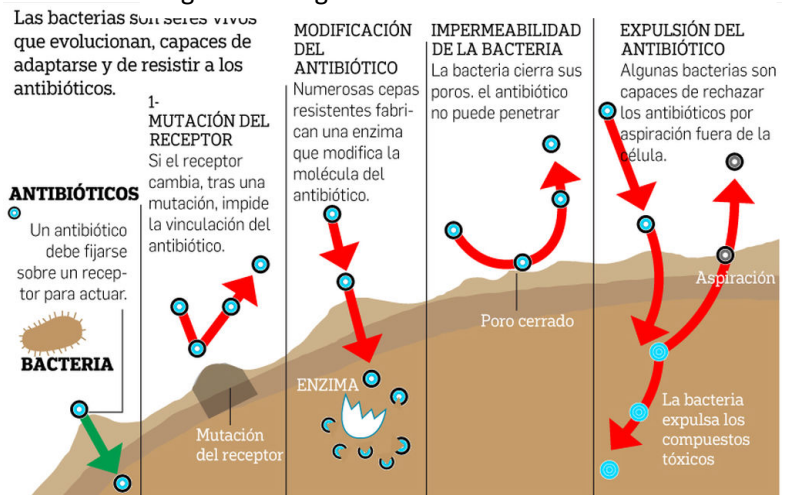
Esta resistencia a los antibióticos puede darse por diversas circunstancias, puede ser una resistencia natural debido a que cada antibiótico ejerce un efecto inhibitorio sobre ciertos grupos de microorganismos susceptibles, a estas especies se les dice naturalmente sensibles pero las especies bacterianas que no se encuentran incluidas dentro de dicho espectro se denominan naturalmente resistentes.

En este caso el antibiótico no crea resistencia, pero si selecciona las bacterias resistentes eliminando las sensibles. Es lo que se conoce con el nombre de presión de selección. Otra forma es la resistencia adquirida, que surge dentro de una especie bacteriana que anteriormente era sensible y cuyo patrimonio genético ha sido modificado por mutaciones del ADN o por la adquisición de genes de resistencia transferidos a partir de otra cepa perteneciente a una especie idéntica o diferente

Existen también mecanismos bioquímicos por los que el microorganismo producción de enzimas que inactivan el antibiótico ejemplo de ello son las β -lactamasas, por una modificación del blanco del antibiótico como la Modificación de las Proteínas de Enlace en la pared celular, una impermeabilidad de la pared bacteriana por modificación o por disminución cuantitativa de las porinas o por un mecanismo de efusión: expulsión de la molécula por un transporte activo (Fig. 7) ⁴⁵.

Una resistencia cruzada es cuando se debe a un mismo mecanismo de resistencia. En general, afecta a varios antibióticos dentro de una misma familia ejemplo de ello es la resistencia de los β -lactámicos. En ciertos casos, puede afectar a antibióticos de familias diferentes por ejemplo la resistencia por impermeabilidad a las tetraciclinas se cruza con la resistencia al coloranfencol y al trimetoprim). Y una resistencia asociada es cuando afecta a varios antibióticos de familias diferentes. En general, se debe a la asociación de varios mecanismos de resistencia ⁴⁶.

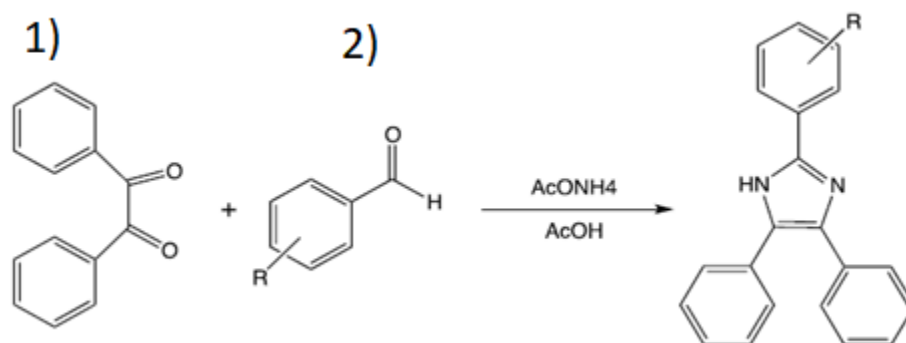
Fig. 7 Estrategias de resistencia a los antibióticos



5. METODOLOGÍA

5.1 Ruta Sintética

La síntesis de los derivados de trifenil imidazol propuesta en este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas en Ingeniería UABC. Para la reacción general se utilizó bencilo (1,2-difeniletano-1,2-diona) como material de partida, acetato de amonio, como fuente de nitrógeno y el aldehído aromático correspondiente, todo disuelto previamente en ácido acético, dentro de un matraz bola de tres bocas y a reflujo. En el siguiente esquema se muestra la reacción general (Esquema 14).



Esquema 14. Reacción para la síntesis de Trifenilimidazol a partir de: 1) Bencilo y 2) aldehído.

Después de la síntesis de los compuestos imidazol estos fueron purificados por técnicas de recristalización con etanol y cromatografía por columna utilizando silica gel (SiO₂) como fase estacionaria y solventes de diferentes polaridad (n-Hexano y Acetato de Etilo) como fase móvil, más adelante se monitoreo por TLC a luz UV con una fase móvil de n-Hex/ AcOEt (la mayoría de los IMI presenta una coloración azulada al verse en luz UV).

Tras la purificación de cada uno, estos, se caracterizaron por medio de las técnicas de Espectrometría de Absorción, Espectrometría Infrarroja (FT-IR), Espectrometría de Masas y Resonancia magnética Nuclear. Además se uso el programa: Molinspiration Cheminformatics Software (Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score) para calcular el LogP (coeficiente de partición) de cada compuesto sintetizado. Se reviso la literatura y buscaron fuentes de información para interpretar los espectros.

5.1.1 Síntesis de los derivados

2, 4, 5-trifenil-1*H*-imidazol (IMI Lofina)



Esquema 15.
Síntesis del
IMI Lofina

Una mezcla de 0.52g (5.95 mmol) de acetato de amonio y 10 mL de ácido acético se puso en reflujo y agitación. Después de 5 minutos del inicio de la reacción se adicionó por goteo constante 0.126 g (1.19 mmol) de benzaldehído y después de otros 5 minutos se agregan 25g (1.19 mmol) de bencilo. Se continuó con el reflujo por 4 horas más y se deja en reposo a temperatura ambiente durante la noche. Se adiciono hidróxido de amonio hasta pH 9. El precipitado formado se filtró y se lavó repetidas veces con agua destilada y salmuera, se realizaron extracciones con disolventes de polaridad media y se eliminó el disolvente a presión reducida en un rotaevaporador. El producto se purificó mediante recristalizaciones con etanol y el monitoreo de la pureza se realizó por CCF (Fig. 8).

Nombre: 2, 4, 5-trifenil-1*H*-imidazol

Formula: C₂₁H₁₆N₂

Peso molecular: 296 g/mol

Aspecto Físico: Sólido amorfo color blanco

LogP: 5.39

λ Pico de Absorbancia: 334 nm

IR (cm⁻¹): 3037, 2963, 2855, 1602, 1586, 1502, 1487, 1323, 1260, 734

EM m/z (%): 296 [M⁺] (77), 207 (50), 193 (10), 165 (80), 89 (32), 73 (36), 63 (19), 44 (100).

RMN 1H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.6 (s, 1H, NH), 8.0 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.2-7.9 (m, 13H, Ar-H).



Fig. 8 IMI Lofina CCF de IMI Lofina con una FM de n-Hex 70%/ AcOEt

2-metoxibenzaldehído (*o*-anisaldehído)



Esquema 16.
Síntesis del *o*-
anisaldehído

A una disolución de 1g (8.19mmol) de salicilaldehído destilado y 4g (40.94 mmol) de carbonato de potasio en 30 mL de acetonitrilo, se adicionaron lentamente 2.32g (16.38mmol) de ioduro de metilo. Esta mezcla se colocó a reflujo por 30 minutos, se enfrió y se filtró para remover los sólidos precipitados. Al filtrado o sobrenadante se lavó con una disolución saturada de cloruro de sodio. Se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida en un rotaevaporador. La conversión del material de partida se monitoreó por CCF (Fig. 9).

Nombre: 2-metoxibenzaldehído

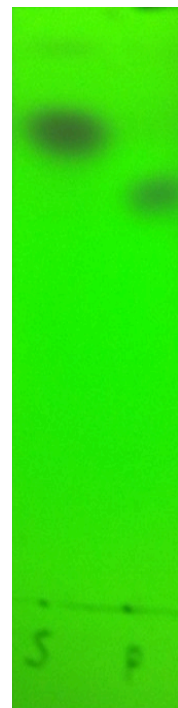
Formula: C₈H₈O₂

Peso molecular: 136 g/mol

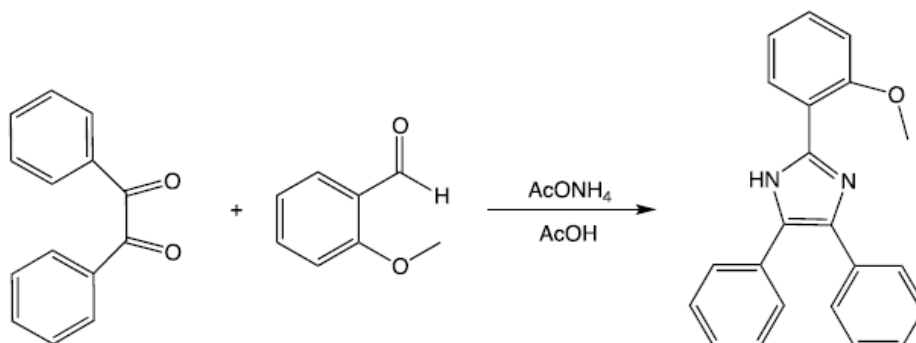
Aspecto Físico: Líquido oleoso color ámbar

Aroma: Sutilmente Dulce (Anis)

Fig. 9 CCF izquierda
salicilaldehído y derecha
producto de reacción *o*-
Anisaldehído con una FM
de n-Hex 70%/ AcOEt 30%



2-(2-metoxifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol (IMI o-Met)



Esquema 17.
Síntesis del
IMI o-Met

Se puso en refluxo una mezcla de 0.52 g (5.95 mmol) de acetato de amonio en 10 mL de ácido acético. Después de 5 minutos por goteo constante se adicionaron 0.162 g (1.19 mmol) de 2-metoxibenzaldehído, y pasados 5 minutos se agregaron 0.25 g (1.19 mmol) de bencilo. Se continuó con el refluxo por 4 horas y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó hidróxido de amonio hasta pH 9. Se filtró el sólido precipitado y se lavó con agua destilada y una disolución saturada salina, se extrajo con disolventes de polaridad media y se eliminaron a presión reducida en un rotaevaporador. El producto se purificó por medio de recristalización con etanol, monitoreando la pureza por CCF (Fig. 10).

Nombre: 2-(2-metoxifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol

Formula: C₂₂H₁₈N₂O

Peso molecular: 326 g/mol

Aspecto Físico: Sólido amorfo color crema claro.

LogP: 5.4

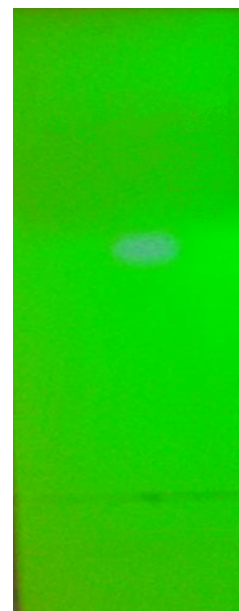
λ Pico de Absorbancia: 343 nm

IR (cm⁻¹): 3063, 3030, 2973, 2840, 1651, 1600, 1584, 1525, 1505, 1251, 1017, 764.

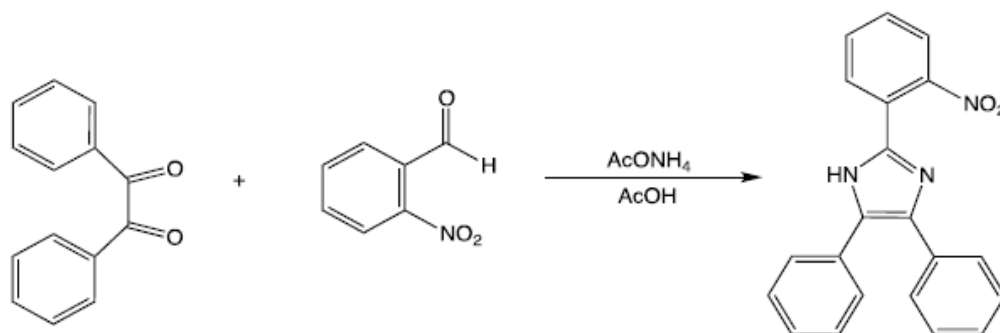
EM m/z (%): 326 [M⁺], (100), 308 (80), 295 (40), 221 (40), 165 (58), 77 (17).

RMN 1H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.48 (s, 1H, NH), 8.47 (dd, J₁ = 8 Hz, J₂ = 1.2 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.30 (m, 7H, Ar-H), 7.10 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H, -O-CH₃)

Fig. 10 CCF de IMI o-Met con una FM de n-Hex 70%/ AcOEt 30%



2-(2-nitrofenil)-4,5-difenil-1H-imidazol (IMI o-NO₂)



Esquema 18.
Síntesis del
IMI o-NO₂

Se puso en reflujo una mezcla de 0.4 g (1.5 mmol) de acetato de amonio disuelto en 10ml de ácido acético. Después de 5 minutos a goteo constante se adicionaron 0.227 g (1.5 mmol) de 2-nitrobenzaldehido. Pasados 5 minutos se agregaron 0.316 g (1.5 mmol) de bencilo. Se continúa con el reflujo por 4horas más y se deja en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó hidróxido de amonio hasta llevar a pH 9. Se filtró el sólido precipitado y se lavó con agua destilada y una disolución saturada salina, se extrajo con solventes de polaridad media y se eliminó a presión reducida en un rotaevaporador. El producto se purificó con columna cromatográfica con silica gel y con una fase eluyente de *n*-hexano/acetato de etilo al 50%, con monitoreo por CCF (Fig. 11).

Nombre: 2-(2-nitrofenil)-4,5-difenil-1H-imidazol

Formula: C₂₁H₁₅N₃O₂

Peso molecular: 341 g/mol

Aspecto Físico: Sólido amorfo color amarillo huevo

LogP: 5.3

λ Pico de Absorbancia: 303 nm

IR (cm⁻¹): 3066, 2924, 2852, 1698, 1652, 1601, 1584, 1524, 1503, 1352, 764, 722

EM m/z (%): 341 [M⁺] (1), 178(100), 165(24), 150(17), 132(25), 103(18), 89(20), 77(4), 59 (60), 45 (40)

RMN 1H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 11.90 (s, 1H, NH), 8.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.50 (m, 4H), 7.31 (m, 6H)

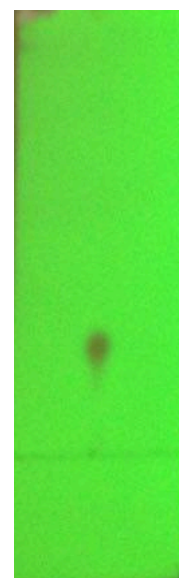
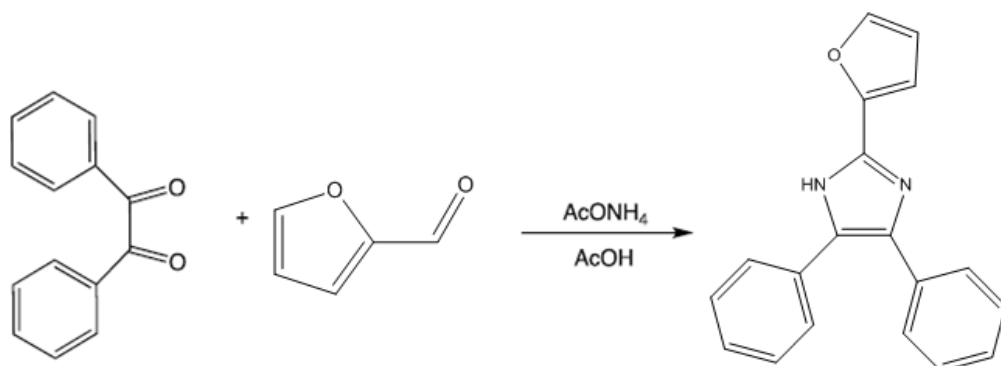


Fig. 11 CCF de IMI o-NO₂
con una FM de *n*-Hex
70%/ AcOEt 30%

2-(furan-2-yl)-4,5-difenil-1H-imidazol (IMI FUR)



Esquema 19.
Síntesis del
IMI FUR

Previamente el aldehído Furfural se destilo para purificarlo (Punto de ebullición 161,7 °C). Se puso en reflujo una mezcla de 1.46 g (19 mmol) de acetato de amonio en 10ml de ácido acético. Después de 5 minutos a goteo constante se adicionaron 0.473 mL (7.1 mmol) de Furfural. Pasados 5 minutos se agregaron 0.8 g (3.8 mmol) de bencilo. Se continuó con el reflujo por 5 horas más y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó hidróxido de amonio hasta pH 9. Se filtró el sólido precipitado y se realizaron lavados con agua destilada y una disolución saturada salina, extrayendo con disolventes de polaridad media y se eliminó el disolvente a presión reducida en un rotaevaporador. El producto se purificó por columna cromatográfica de silica gel utilizando como mezcla eluyente Hexano/AcOEt al 10 %, con monitoreo por CCF (Fig. 12).

Nombre: 2-(furan-2-yl)-4,5-difenil-1H-imidazol

Formula: C₁₉H₁₄N₂O

Peso molecular: 286 g/mol

Aspecto Físico: Sólido amorfo color crema

LogP: 4.53

λ Pico de Absorbancia: 333 nm

IR (cm⁻¹): 3147, 3057, 2921, 2850, 1683, 1626, 1601, 1525, 1501, 1485, 1387, 1250, 1227, 1126, 738.

EM m/z (%): 286 [M⁺] (30), 165 (17), 104 (33), 94 (34) 77 (100), 66 (27), 51 (96)

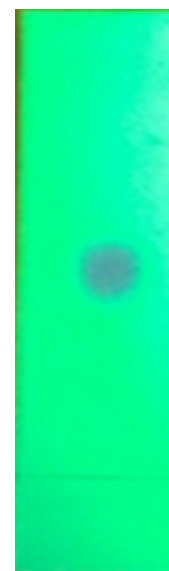


Fig. 12 CCF de IMI FUR con una FM de n-Hex 70%/ AcOEt 30%

5.2 Formación de las partículas de plata

Para la formación de las partículas de plata se decidió trabajar con cuatro de las moléculas sintetizadas IMI FUR, IMI O-NO₂, IMI Lofina, IMI o- Met. Esta elección se hizo en base a los grupos funcionales tanto electrodonador como electroattractor del anillo A del trifenilimidazol, con la intención de evaluar sus propiedades.

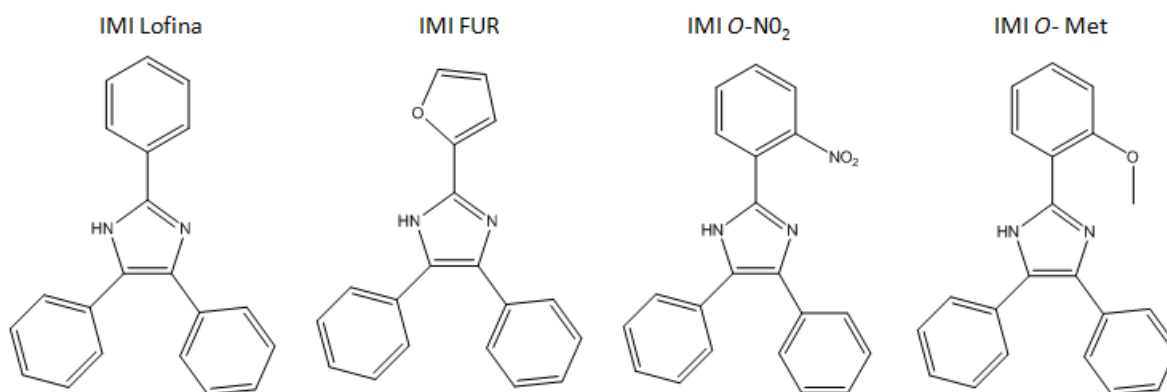


Fig. 13 IMI que fueron seleccionados para preparar las P Ag

Previamente se analizaron por CCF los compuestos IMI para comprobar que no hubiera impurezas o degradación de estos.

Para la generación de las partículas de plata con los imidazoles, se preparó una disolución 0.02 M de AgNO₃ (84 mg /25 mL) bajo oscuridad. Por otra parte se tomaron 50 mg de los derivados del imidazol y se mezclaron en agua destilada fría, tratada previamente con burbujeo de Nitrógeno para retirar la mayor cantidad posible de oxígeno y se enfrió (para ayudar a la solubilidad se usó una cantidad mínima de etanol). Una vez disueltos los derivados del imidazol se le agregan 5 mL de la disolución de AgNO₃ protegiendo de la luz en todo momento y se dejó en agitación por una hora con un agitador magnético^{47, 48}.

10 minutos antes de terminada la hora, se preparó una disolución del agente reductor NaBH₄ al 0.05 M disolviendo 19 mg en 10 mL del agua tratada, y una vez terminado el tiempo de agitación de la mezcla IMI/AgNO₃, se agregó por goteo el NaBH₄ hasta observar un cambio de color oscuro y continuar en agitación por 5 min. Finalmente se guardó la solución protegiendo de la luz y en refrigeración hasta su análisis y caracterización⁴⁷. Esta técnica se realizó para cada uno de los IMI sintetizados, (el material con el que se trabajó era limpiado con HCl diluido y solventes para evitar interferencias de contaminación)⁴⁹.

5.2.1 Caracterización de productos

Para caracterización parcial de las partículas por espectrofotometría UV y espectroscopía infrarrojo se tuvo que secar el producto. Por medio de vacío se hizo pasar la disolución de P-Ag con el IMI, realizando lavados con agua destilada y etanol para arrastrar por completo cualquier rastro de producto y las partículas quedaron atrapadas en el filtro con sus respectivos imidazoles, se dejaron secar por un día, y se guardaron en tubos eppendorf manteniéndolos en oscuridad^{50, 51}.

Para el análisis UV-VIS se ajustó la lectura entre 300 nm y 800 nm. Se tomó una pequeña muestra y se disolvió en etanol para poder realizar las lecturas en las respectivas celdas.

Después se procedió con el análisis por espectroscopía IR con un espectrómetro FT-IR (Infrarrojo de Transformadas de Fourier). Se colocó una pequeña muestra sobre el equipo y los espectros se analizaron por el programa OMNIC Specta Software (Fig. 14). Se revisó la literatura para apoyar la interpretación de los espectros⁵².

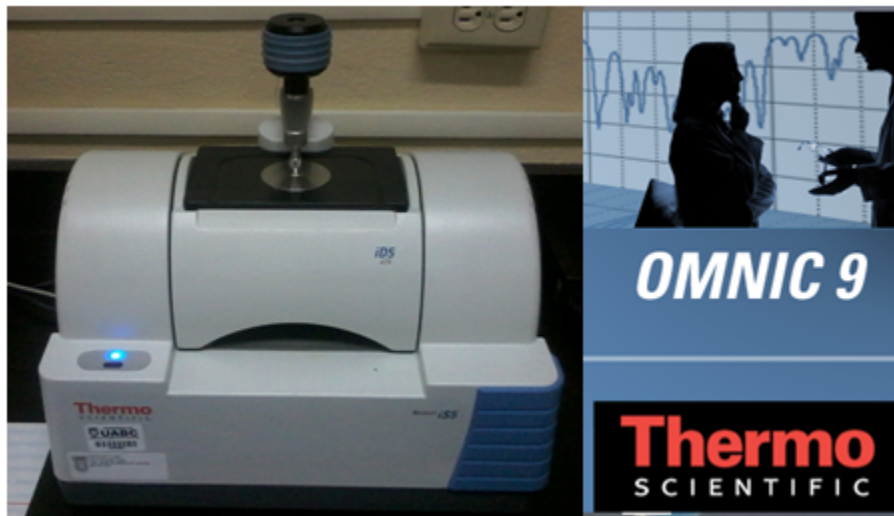
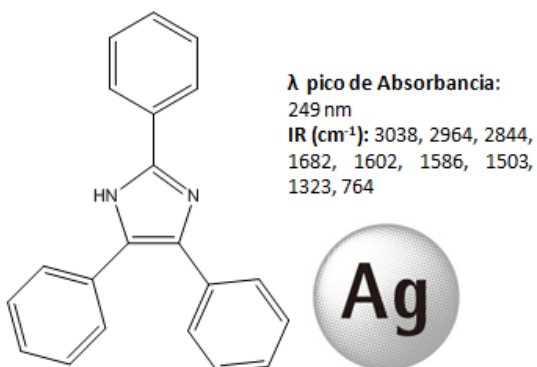
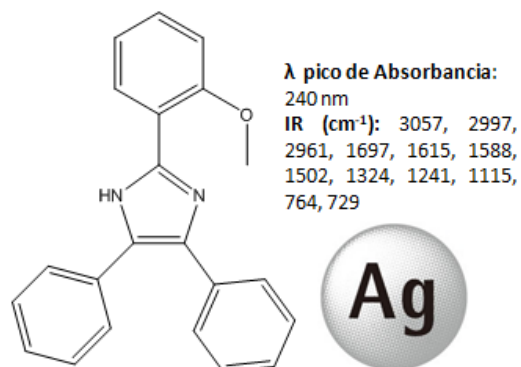


Fig. 14 Espectrómetro FT-IR y programa OMNIC Specta Software

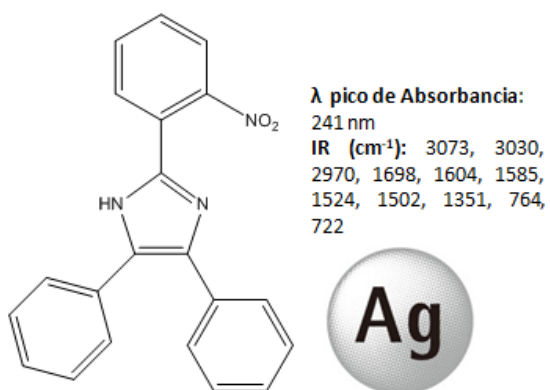
IMI Lofina



IMI o-Met



IMI o-NO₂



IMI FUR

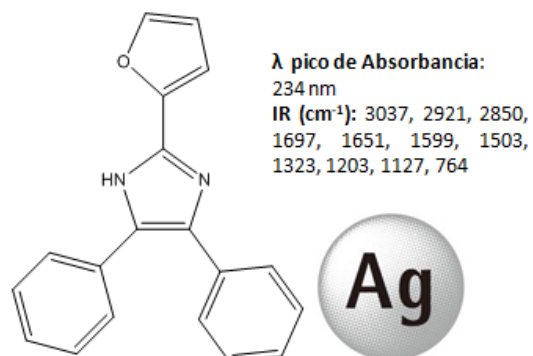
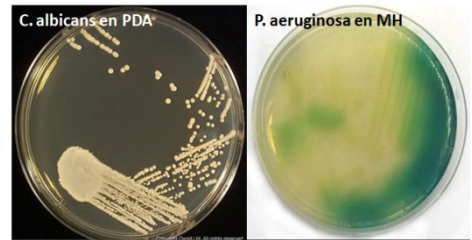


Fig. 15 Pico de Absorbancia y Bandas del IR de las P Ag

5.3 Metodología evaluación biológica

La evaluación antimicrobiana se llevo a cabo por el método Kirby-Bauer (difusión en agar). Fueron utilizadas dos cepas de microorganismos:

1. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: bacteria aerobia gram negativa.
2. *Candida albicans*: hongo diploide.



Las cepas fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Análisis Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC, donde fueron llevados a cabo los experimentos (Fig.16).

Fig. 16 Medios de cultivo con diferentes cepas de microorganismos utilizadas en las pruebas de antibiograma.

Previamente se esterilizó todo el material usado para los experimentos por medio del en autoclave a 121°C durante 15 min. Acto seguido se preparo una solución al 1 % de IMI Lofina, IMI Lofina –P Ag, IMI FUR –P Ag, IMI O-NO₂– P Ag, IMI o- Met– P Ag y P Ag (1% = 1.000 ppm = 1 mg/ mL) en DMSO. Por medio de una micropipeta se impregnaron con 100 µL del IMI Lofina y un control negativo con DMSO en discos estériles de papel de filtro Whatman de 40 mm de diámetro previamente esterilizados^{53, 54}.

Un día antes a la realización de los ensayos, fueron resembradas las cepas en medios de cultivo nuevos, para la obtención de cultivos jóvenes no mayores a 24 horas.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizado para la realización de los bioensayos.

Microorganismo	Medio de cultivo
Bacteria	Hongo
Mueller Hinton	Agar papa dextrosa (PDA)

Para las dos cepas se preparó una suspensión microbiana en solución salina estéril al 0.9%, ajustando al 0.5 del nefelómetro de McFarland, correspondiente a 1.5×10^8 células bacterianas y fúngicas respectivamente por mL de la suspensión anterior se tomó 1 mL y se llevó a un aforo de 10 mL con medio de cultivo, se homogenizó y se realizó el sembrado por los métodos de vertido en placa y siembra en doble capa sobre cajas petri cuádruples, esto para obtener cultivos más homogéneos. (Fig. 17: 1).

Cada vez que un matraz o un tubo de ensayo se abre para añadir o sacar material, se pasa la boca del mismo a través de la llama de un mechero, a fin de destruir cualquier microorganismo que pueda haberse depositado allí^{55, 56, 57}.

Después de esperar unos 5 minutos se colocaron todos los discos cargados con las diferentes concentraciones del IMI Lofina por medio de pinzas estériles sobre la superficie del agar, presionando los discos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto uniforme, por último incubar las cajas a 35°C y leer después de 24 horas de incubación.

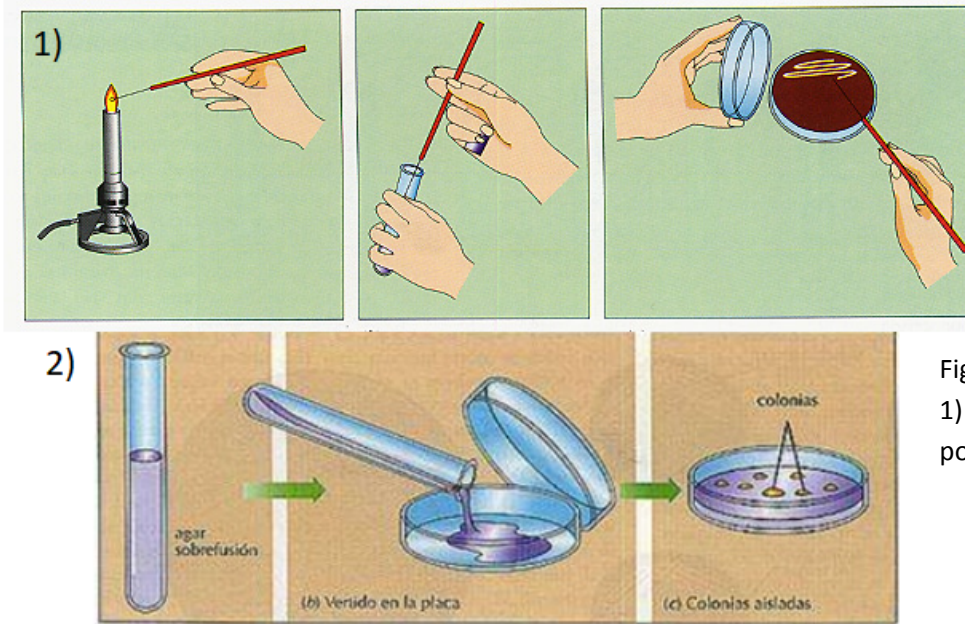


Fig. 17 Métodos de siembra:
1) por estría múltiple y 2)
por vertido en placa

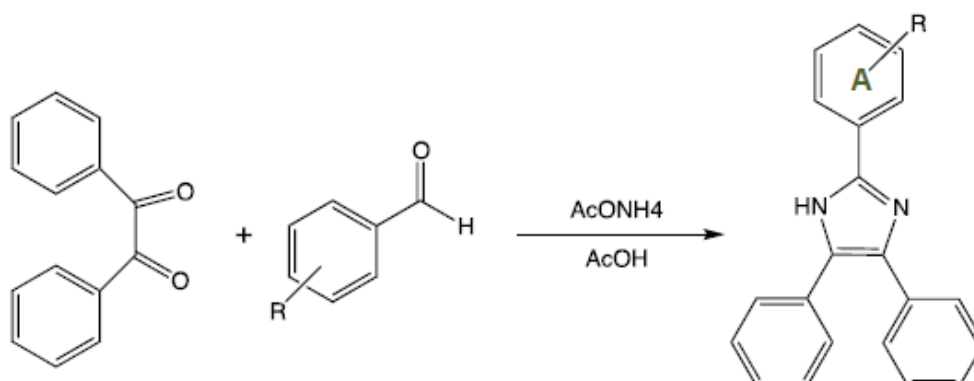
Fueron utilizados sensidiscos de Ciprofloxacina, Vancomicina, Penicilina G y Oxacilina como controles positivos. Para el análisis de los resultados se midió el diámetro de la zona de inhibición y se comparó con las referencias publicadas por el National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS), en el documento M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2016) y el M27-A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts (2008), reportando si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente (S, I, R) a cada uno de los antibióticos ensayados^{58, 59}.

6. RESULTADOS

6.1 Síntesis y caracterización de los derivados IMI

Como se puede observar para la generación de los diferentes IMI se siguió la metodología de Radziszewski utilizando bencilo, aldehídos, acetato de amonio y ácido acético como disolvente.

Los aldehídos utilizados para la generación de estas moléculas fueron seleccionados por la naturaleza química de sus sustituyentes, todos presentaron una estructura aromática con grupos funcionales de carácter electrodonador o electrotractor.



Esquema 20. Método de Radziszewski para la síntesis de Trifenilimidazoles.

Todos los compuestos sintetizados se purificaron y se obtuvieron con buenos rendimientos de reacción. Enseguida se muestran las cantidades obtenidas y sus respectivos rendimientos (Tabla 2).

Compuesto	Nombre	Sustituyente	Pesos (Gramos)	% Rendimiento
1	IMI Lofina	-H	0.2072	95%
4	IMI o-Met	o-OCH ₃	0.2555g	93%
5	IMI NO ₂	o-NO ₂	0.3661g	77%
6	IMI FUR	Furano	0.716g	94%

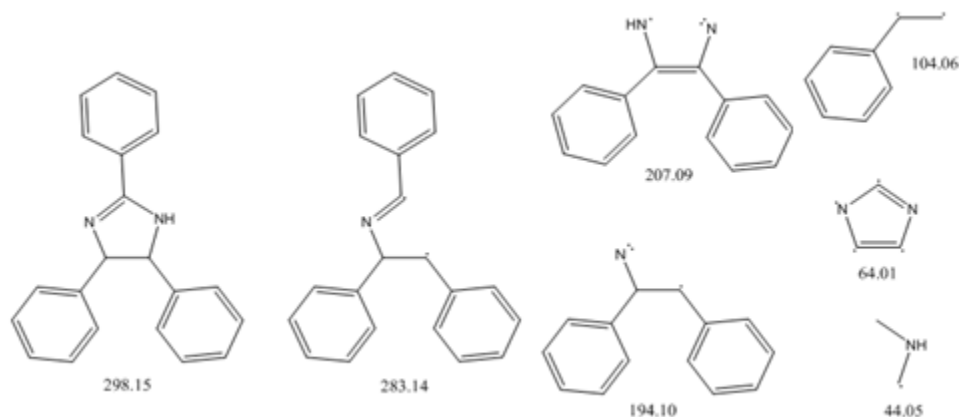
Tabla 2. Cantidades obtenidas de los IMI y sus rendimientos.

Todos los compuestos se caracterizaron por espectrofotometría UV, espectroscopía Infrarroja (FT-IR), espectrometría de Masas y resonancia magnética Nuclear.

El producto IMI Lofina se observó como un sólido amorfo color blanco, y soluble en disolventes de polaridad media. En espectrofotometría UV-Vis se observó una señal a 334 nm. En infrarrojo el compuesto mostró bandas correspondientes a tensión de enlaces C=C-H (3037cm^{-1}), N-H (2963cm^{-1}), C-H (2855cm^{-1}), C=N (1724cm^{-1}), C=C conjugado a Benceno (1586cm^{-1}), N-H (1586cm^{-1}), C=C aromático (1502cm^{-1}), C-N aril (1323cm^{-1}) y C-H de benceno mono sustituido (734cm^{-1}) estas señales confirman la formación del anillo heterocíclico del imidazol (Anexo 2).

Por espectrometría de masas se pudo ver el ión molecular a una m/z de 296, correspondiente al peso molecular del derivado con fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2$ con un 77% y a su vez se observan los fragmentos característicos a la degradación del esqueleto del IMI en los picos de m/z 281, 207, 193, 165, 147, 133, 104, 89, 73, 63 y 44 de los cuales la mayoría se logro determinar su estructura, siendo el pico base a una m/z de 44, posiblemente el ion para metila

Fig. 18 Estructuras del patrón de fragmentación del esqueleto de IMI Lofina



En la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de este derivado, por la simetría que presenta la molécula, en el espectro de protón se observó a un desplazamiento químico de 12.6δ un singulete con integración para un protón, correspondiente al hidrógeno unido a nitrógeno del anillo de imidazol; a un desplazamiento de 8.0δ se identificó un doblete que integra para 2 protones con una constante de acoplamiento característica de hidrógenos vecinales a 7.7 Hz . El resto de los hidrógenos al encontrarse en un ambiente químico y magnético similar, se desdoblaron en forma de un multiplete con integración para 13 protones aromáticos a un desplazamiento de $7.2\text{-}7.9 \delta$ (Anexo 16).

Finalmente por medio del programa Molinspiration Cheminformatics Software se calculó un LogP de 5.39

El producto puro IMI o-Met se observó como un sólido amorfo color beige, con solubilidad en disolventes de polaridad media. En el análisis UV se observó una señal a 343 nm, y en espectroscopía infrarroja este compuesto mostró bandas correspondientes a tensión de enlaces C=C-H (3063 cm^{-1}), N-H (3030 cm^{-1}), C-H (2973 cm^{-1}), C=N (1651 cm^{-1}), C=C conjugado a benceno (1600 cm^{-1}), N-H (1584 cm^{-1}), C=C aromático (1505 cm^{-1}), C-N aril (1303 cm^{-1}), C-O (1251 cm^{-1}), C-O-C (1099 cm^{-1}), estas señales confirman la formación del anillo heterocíclico del imidazol. (Anexo 4).

En espectrometría de masas se observó en ión molecular de m/z de 326 correspondiente al peso molecular del derivado con formula $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{ON}_2$ con un 100% siendo el pico base. Además se logró identificar los picos de m/z a 308, 295, 281, 255, 221, 208, 194, 178, 165, 141, 127, 104, 91, 77, 64, 51 (Anexo 13).

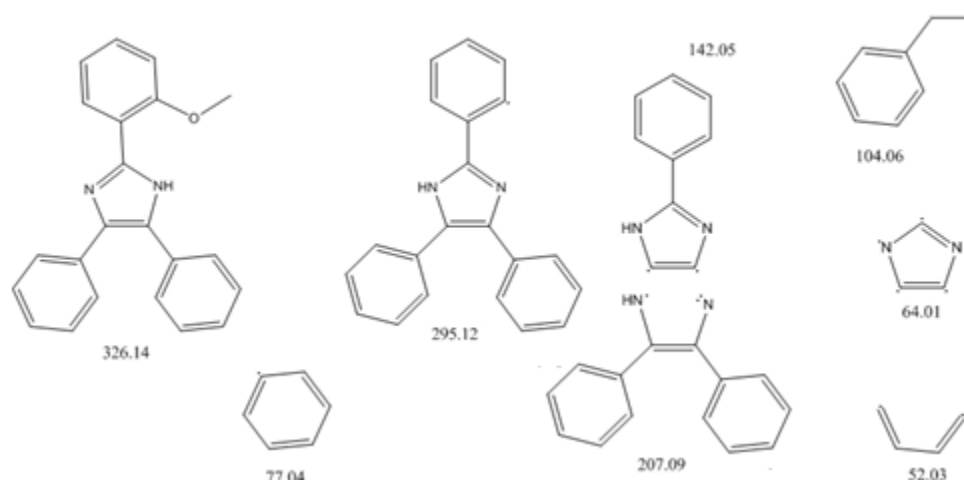


Fig. 19 Estructuras del patrón de fragmentación del esqueleto de IMI o-Met

En la resonancia magnética nuclear de este derivado IMI o-Met se observó: 10.48 (s, 1H, NH), 8.47 (dd, $J_1 = 8\text{ Hz}$, $J_2 = 1.2\text{ Hz}$, 1H), 7.65 (d, $J = 7.6\text{ Hz}$, 2H), 7.50 (d, $J = 7.2\text{ Hz}$, 2H), 7.30 (m, 7H, Ar-H), 7.10 (d, $J = 7.6\text{ Hz}$, 1H), 6.99 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 1H), 3.99 (s, 3H, -O-CH₃) (Anexo 18).

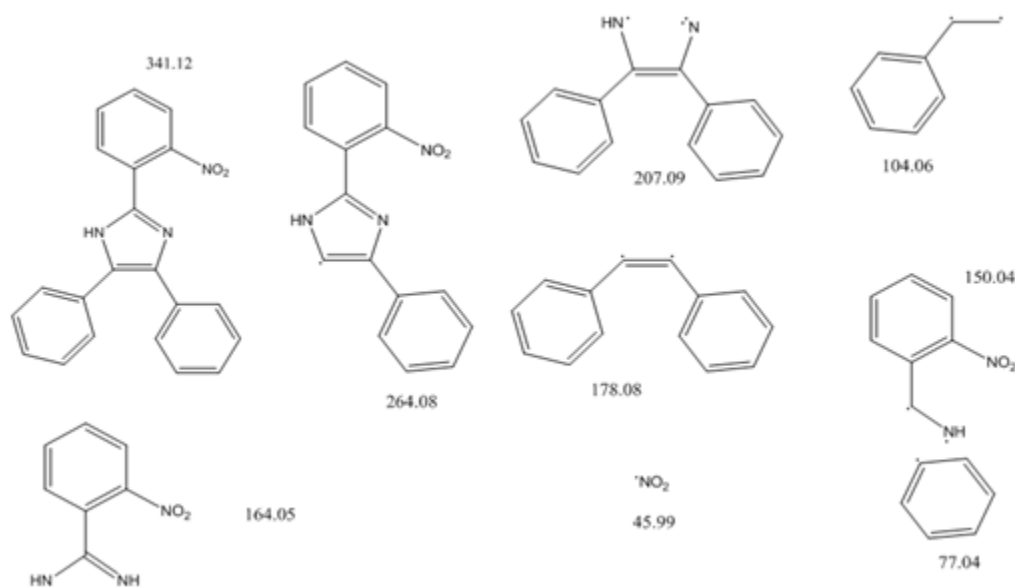
Finalmente por medio del programa Molinspiration Cheminformatics Software se calculó un LogP: 5.4

El producto puro IMI *o*-NO₂ mostró un aspecto físico sólido amorfo color amarillo soluble en disolventes de polaridad media. En el análisis de UV se observó una señal a 303 nm.

El análisis espectroscópico por infrarrojo del compuesto IMI *o*-NO₂ mostró bandas correspondientes a tensión de enlaces C=C-H (3066 cm⁻¹), N-H (2924 cm⁻¹), C-H (2852 cm⁻¹), C=N (1698 cm⁻¹), C=C conjugado a benceno (1601 cm⁻¹), N-H (1584 cm⁻¹), NO₂ (1524 cm⁻¹), C=C aromático (1503 cm⁻¹) C-N aril (1352 cm⁻¹), *o*-Sustitución (764 cm⁻¹) y C-H de Benceno monosustituido (722 cm⁻¹), estas señales confirman la formación del anillo heterocíclico del imidazol (Anexo 5).

En la espectrometría de masas del producto IMI *o*-NO₂ se observó en ión molecular de m/z de 341 correspondiente al peso molecular del derivado con fórmula C₂₂H₁₅O₂N₃, y el patrón de fragmentación característico a la degradación del esqueleto del IMI con los picos de m/z 330, 263, 237, 220, 207, 193, 178, 165, 150, 132, 103, 89, 77, 59 y 45 de los cuales se logró identificar el pico base a un a una m/z de 178 posiblemente el ion para bencilo (Anexo 14).

Fig. 20 Estructuras del patrón de fragmentación del esqueleto de IMI *o*-NO₂



En la resonancia magnética nuclear de este derivado IMI *o*-NO₂ se observó: 11.90 (s, 1H, NH), 8.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.50 (m, 4H), 7.31 (m, 6H).

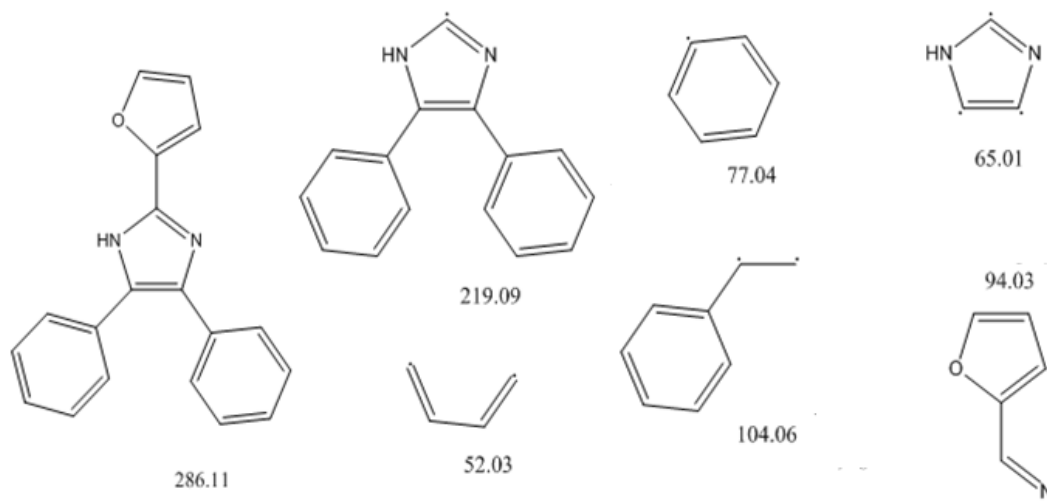
Finalmente por medio del programa Molinspiration Cheminformatics Software se calculó un LogP: 5.3

El producto puro IMI FUR mostró un aspecto físico de un sólido amorfo color beige, con una señal de 333 nm en el análisis de UV.

En el análisis espectroscópico por infrarrojo del compuesto IMI FUR se observaron bandas correspondientes a tensión de enlaces C=C-H (3147 cm^{-1}), C-H (3057 o 2850 cm^{-1}), N-H (2921 cm^{-1}), C=N (1683 cm^{-1}), C=C conjugado a benceno (1626 cm^{-1}), N-H (1601 cm^{-1}), C=C aromático (1501 cm^{-1}), C-N aril (1250 cm^{-1}), C-O-C (1227 cm^{-1}), C-O (1126 cm^{-1}) y C-H de Benceno mono sustituido (738 cm^{-1}), estas señales confirman la formación del anillo heterocíclico del imidazol (Anexo 6).

En la espectrometría de masas del producto IMI FUR se observó en ión molecular de m/z 286 que correspondió al peso molecular del derivado con fórmula $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{ON}_2$, además se identificó el patrón de fragmentación característico a la degradación del esqueleto del IMI con los picos de m/z de 285, 257, 218, 165, 128, 104, 94, 77, 65 y 51, de los cuales se logró determinar su estructura con un pico base de m/z de 77 (Anexo 15).

Fig. 21 Estructuras del patrón de fragmentación del esqueleto de IMI FUR

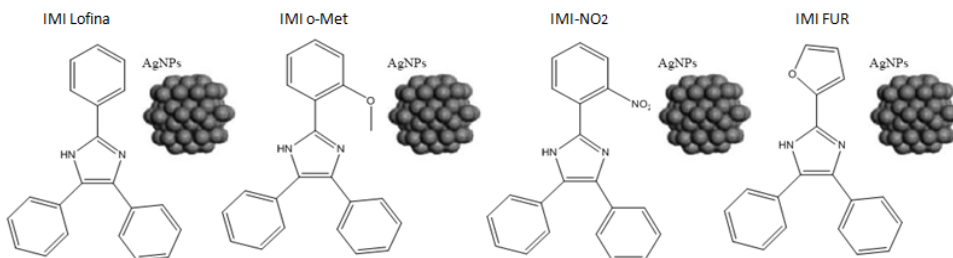


Mediante del programa Molinspiration Cheminformatics Software se calculó el LogP: 4.53

6.3 Partículas de plata

Después de la síntesis de los derivados IMI Lofina, IMI *o*-Met, IMI *O*-NO₂ y IMI FUR, se prepararon de estas partículas de plata. Estos se mantuvieron en una solución de agua destilada y una cantidad mínima de etanol para mejorar la solubilidad de los productos, en

Fig. 22 Partículas y sus precursores



Las partículas de plata se caracterizaron parcialmente por espectroscopía IR y espectrofotometría UV-Vis. Para el análisis FT-IR del compuesto IMI Lofina P Ag mostró bandas correspondientes a tensión de enlaces para C=C-H (3038 cm⁻¹), N-H (2964 cm⁻¹), C-H (2844 cm⁻¹), C=N (1682 cm⁻¹), C=C conjugado a benceno (1602 cm⁻¹), N-H (1586 cm⁻¹), C=C aromático (1503 cm⁻¹), C-N aril (1323 cm⁻¹) y C-H del benceno monosustituido (764 cm⁻¹) (Anexo 7). Para su UV-Vis el pico de absorbancia máxima fue de 249 nm.

Respecto el análisis FT-IR del compuesto IMI *o*-Met P Ag mostró bandas correspondientes a tensión de enlaces para C=C-H (3057 cm⁻¹), N-H (2997 cm⁻¹), C-H (2961 cm⁻¹), C=N (1697 cm⁻¹), C=C conjugado a benceno (1615 cm⁻¹), N-H (1588 cm⁻¹), C=C aromático (1502 cm⁻¹), C-N aril (1324), C-O (1241 cm⁻¹), C-O-C (1115 cm⁻¹), *o*-Sustitución (764 cm⁻¹) y C-H del benceno monosustituido (729 cm⁻¹) (Anexo 8). Para su UV-Vis el pico de absorbancia máxima fue de 240 nm.

Para el análisis FT-IR del compuesto IMI *o*-NO₂ P Ag mostró bandas correspondientes a tensión de enlaces para C=C-H (3073 cm⁻¹), C-H (3030 cm⁻¹), N-H (2970 cm⁻¹), C=N (1698 cm⁻¹), C=C conjugado a benceno (1604 cm⁻¹) N-H (1585 cm⁻¹), NO₂ (1524 cm⁻¹), C=C aromático (1502 cm⁻¹) C-N aril (1351 cm⁻¹), *o*-Sustitución (764 cm⁻¹) y C-H del benceno monosustituido (722 cm⁻¹) (Anexo 9). Para su UV-Vis el pico de absorbancia máxima fue de 241 nm.

Para el análisis FT-IR del compuesto IMI FUR P Ag mostró bandas correspondientes a tensión de enlaces C=C-H (3037 cm⁻¹), N-H (2921 cm⁻¹), C-H (2850 cm⁻¹), C=N (1697 cm⁻¹), C=C conjugado a benceno (1651 cm⁻¹), N-H (1599 cm⁻¹), C=C aromático (1503 cm⁻¹), C-N Aril (1323 cm⁻¹), C-O-C (1203 cm⁻¹), C-O (1127 cm⁻¹) y C-H del benceno monosustituido (764 cm⁻¹) (Anexo 10). Para su UV-Vis el pico de absorbancia máxima fue de 234 nm.

6.2 Actividad Antibiótica

Los antibiogramas se llevaron por el método de Kirby-Bauer con algunas modificaciones utilizando una cepa bacteriana Gram negativo multirresistente (*P. aeruginosa*) y una cepa fúngica (*C. albicans*).

A. Resultados actividad antibacteriana.

Para esta actividad fueron evaluadas todas las partículas de plata sintetizadas, los resultados se muestran concentrados en la Tabla 3.

Compuesto	contenido	Diámetro mm	S	I	R
IMI Lofina –P Ag	100 µg	1.1 cm		x	
IMI FUR –P Ag	100 µg	1.5 cm	x		
IMI O-NO ₂ – P Ag	100 µg	1.1 cm		x	
IMI o- Met– P Ag	100 µg	1.2 cm		x	
Ciprofloxacina		-			x
Vancomicina		-			x
Penicilina G		-			x
Oxacilina		-			x

Tabla 3. Resultados de las Pruebas de Antibiograma en *P. aeruginosa*

Se puede observar en la tabla anterior que los antibióticos utilizados como control no presentaron ningún efecto inhibitorio contra *P. aeruginosa*, lo cual era esperado al ser una cepa multirresistente, sin embargo, es de destacar el hecho de que todas las partículas de plata evaluadas si mostraron efecto contra este microorganismo, con diámetros de inhibición de 1.1 cm para las partículas derivadas de los compuestos IMI Lofina (-H) e IMI O-NO₂ (o-NO₂), y de 1.2 cm de diámetro para la partícula derivada de IMI O-Met (o-OCH₃), mostrando esta cepa sensibilidad intermedia frente a estos compuestos. De entre las partículas ensayadas, resalto la actividad mostrada por IMI FUR –P Ag, superando al resto con un diámetro de inhibición de 1.5 cm.

B. Resultados actividad antifúngica.

Para esta actividad fueron evaluadas todas las partículas de plata sintetizadas, así como los precursores IMI-Lofina e IMI-FUR, los resultados se muestran concentrados en la Tabla 4.

Candida albicans

Compuesto	contenido	Diámetro mm	S	I	R
IMI Lofina	100 µg	-			x
IMI FUR	100 µg	-			x
IMI Lofina -P Ag	100 µg	1.3 cm	x		
IMI FUR -P Ag	100 µg	1.3 cm	x		
IMI O-NO ₂ - P Ag	100 µg	1.4 cm	x		
IMI o- Met- P Ag	100 µg	1.4 cm	x		
Partículas Ag	100 µg	0.9 cm	x		

Tabla 3. Resultados de las Pruebas de Antibiograma en *C. albicans*

En la evaluación antifúngica, observando primeramente a los compuestos precursores, estos no mostraron ningún efecto sobre el crecimiento del hongo, sin embargo, nuevamente todas las partículas de plata presentaron actividad inhibitoria frente a *C. albicans*, clasificando a este hongo como sensible frente a estos compuestos evaluados, con diámetros de inhibición de 1.3 y 1.4 cm. Se analizó como control una muestra de partículas de plata sin precursor de tipo imidazol (P Ag), observando un decremento en la actividad, con halo de inhibición menor a 1 cm (0.9 cm), esto nos indica que la adición de un compuesto de tipo trifenilimidazol a estas partículas es un factor importante para potencializar la actividad, trabajando de manera sinérgica.

Es conocido que las partículas de plata ejercen un efecto de sinergismo con antibióticos, ya que ayudan a aumentar la permeabilidad de la membrana de las bacterias; por otro lado, los compuestos de tipo imidazol tienen un efecto intercalante en las cadenas de ADN de microorganismos, causando su muerte, un claro ejemplo de esto es el caso del fármaco Metronidazol.

Por otro lado, el mecanismo de acción antifúngica de las partículas de plata se debe a que estas pueden unirse a la membrana del hongo, modificando su permeabilidad y con ello alterar la viabilidad celular⁶⁰.

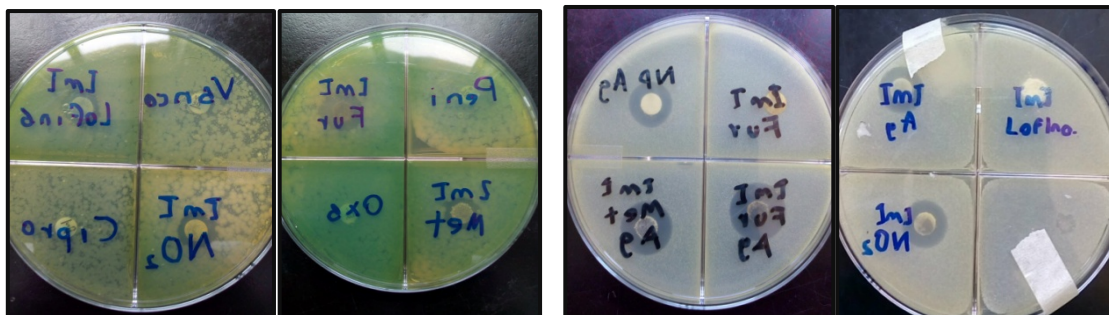


Figura 23 Antibiogramas de las partículas de plata y precursores frente a *P. aeruginosa* multirresistente y *C. albicans*

7. CONCLUSIONES

1. A partir de la ruta sintética de Debus-Radiszewski se lograron sintetizar 4 derivados del esqueleto base 2,4,5-trifenilimidazol con diferentes sustituciones del anillo A.
2. Las estructuras moleculares de los productos sintéticos fueron confirmadas por técnicas de caracterización de espectrofotometría UV, espectroscopía Infrarroja, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.
3. Se llevo a cavo la síntesis de partículas de plata por medio de una sal de plata y un agente reductor, utilizando como precursores los 4 derivados del 2,4,5-trifenilimidazol.
4. De los resultados de la actividad antimicrobiana frente a una cepa bacteriana y un hongo de los productos sintéticos IMI y sus respectivas partículas de plata, los productos IMI fueron inactivos pero las partículas metálicas mostraron inhibición frente a la bacteria y el hongo utilizado en estos bioensayos.
5. De los resultados obtenidos en la evaluación biológica, se sugiere un sinergismo antimicrobiano entre los productos de trifenilimidazol y las partículas de plata.

De acuerdo con la literatura las nanopartículas de plata ejercen un efecto de sinergismo con los antibióticos aumentando la permeabilidad de la membrana de las bacterias y los compuestos de anillos de imidazol tienden a tener un efecto intercalante en el ADN del microorganismo como el caso del Metronidazol. En el caso de los hongos actúa de manera no específica en el exterior e interior de las células, así como en la pared celular en ambos proceso se piensa que esto es por su alta reactividad con compuestos de azufre la hace reaccionar con enzimas y aminoácidos estructurales de la pared celular. Bajo estos criterios se piensa que posiblemente este es el mecanismo por el cual se llevo a cavo este efecto antibacterial.

Trabajo futuro.

Sintetizar una mayor cantidad de derivados de trifenil imidazol y evaluarlos como nanopartículas para realizar un estudio de relación estructura-actividad biológica. Determinar la morfología y el tamaño de las partículas metálicas obtenidas.

8. BIBLIOGRAFIA

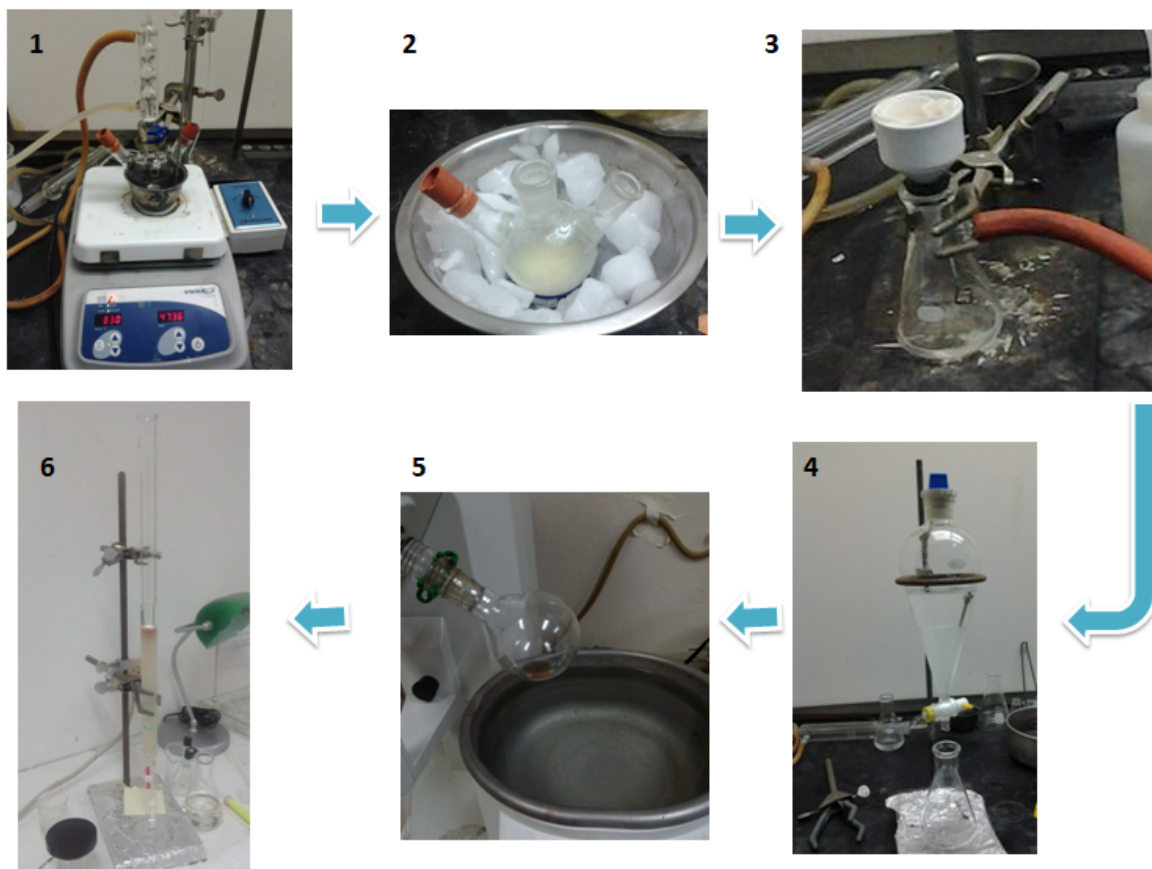
1. Vieyle Cortez-Gallardo y col. Historia de la Medicina (*Revista Biomed*). 2004
2. Alfredo Jácome Roca. Historia de los Medicamentos. 2008
3. Mayra Levy Rodríguez. Farmacología. Su historia y desarrollo. 2005
4. Pilar Martín Escudero. Evolución de la Farmacología. 2013
5. Guillermo Turner. *El Códice de la Cruz-Badiano* y su extensa familia herbaria. 2012
6. John McMurry Química Orgánica, 7 Ed. 2008
7. L.G. Wade Jr. Química Orgánica 2011
8. Alfio Bertolini y col. Paracetamol: Nuevas vistas de una vieja droga. 2006
9. Miguel f. Braña y col. La verdadera historia de la Aspirina R. Acad. Nac. Farm. 2005
10. Àngel Messeguer. Los químicos y los descubrimientos de fármacos. 2010
11. Antonio Delgado y col. Introducción Síntesis Fármacos (2002)
12. Tomislav Meštrović, Historia del Paclitaxel
13. Josep j. Centelles, Santiago Imperial. Paclitaxel Descubrimiento, propiedades y uso clínico. 2007
14. Gareth Thomas. Medicinal Chemistry 2.Ed. 2012
15. Química Orgánica L.G. Wade Jr. 2011
16. Norman L. Allinger. Química orgánica, Volumen 1, 2 Ed.1998
17. Theophil Eicher, Siegfried Hauptmann. The Chemistry of Heterocycles. 2003
18. Gada Yassin y James S. Dawson. Lo Esencial en Farmacología. 2011
19. Judith Ramos-Jiménez y col. Rev Biomed: Histamina y comunicación intercelular. 2009
20. José Montes Montes. Art. Rev. Histamina, receptores y antagonistas. 2005
21. Edison Galárraga. Química Farmacéutica. 2011
22. Samanta Waxman . Nitroimidazoles en medicina veterinaria. 2004
23. Fortún Abete, J. Antifúngicos: azoles, imidazoles, triazoles Medicina. 1998
24. Theophil Eicher, Siegfried Hauptmann. The Chemistry of heterocycles. 2003
25. Debus, Heinrich "Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Glyoxal". 1858
26. Radzisewski, Br. "Ueber Glyoxalin und seine Homologe" (1882).
27. Diana Yanover. Lophine (2,4,5-triphenyl-1H-imidazole) 2009
28. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9815.html>
29. Kenichiro Nakashima. Lophine derivatives as versatile analytical tools (2002)
30. Zheng Zhang, Victoria E. Wagner. Antimicrobial Coatings and Modifications on Medical Devices. 2017
31. Constanza Y. Flores. Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida" Trabajo de Tesis Doctoral. 2014
32. José Rubén Morones-Ramírez. Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria. 2013
33. José Rubén Morones-Ramírez. Synergistic Antimicrobial Effects of Silver/Transition-metal Combinatorial Treatments. 2017

34. Elda Maria del Rocío Coutiño Rodríguez, Rocío Anaís Pérez Gutiérrez Los compuestos de plata y la salud. 2008
35. Miguel Monge. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas 2009
36. Ávalos, A, Haza y col. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente
37. Sally D. Solomon y col. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. 2007
38. Rodolfo Zanella. Metodologías para la síntesis de nanopartículas controlando forma y tamaño. 2012
39. Gerardo Leyva Gómez. Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. 2013
40. Fernando M. Martinez y col. Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología 2013
41. S. Belmares-Perales y col. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, plata y fierro por el método de fisicoquímica verde 2013
42. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/es/>
43. Guadalupe Aguirre-Ávalos y col. Bacteremia por *Acinetobacter baumannii* en pacientes en estado crítico, Universidad de Guadalajara. 2008
44. Matthew E. Falagas Drosos E. Karageorgopoulos. Pandrug Resistance (PDR), Extensive Drug Resistance (XDR), and Multidrug Resistance (MDR) among Gram-Negative Bacilli: Need for International Harmonization in Terminology. 2008
45. Francisco Valery y col. Evaluación de la resistencia bacteriana en el Hospital Pediátrico "Dr. Elías Toro". Años 2012 al 2016 Recomendaciones prácticas. 2016
46. Trieu-cuot, P., M. Arthur, P. Courvalin. Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes. (1987)
47. Sally D. Solomon y col. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. 2007
48. Yong Sheng Zhao y col. Fabrication and Size-Dependent Optical Properties of Copper/Lophine Core/Shell Nanocomposites, Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2007
49. Gi Xue. Chemical Reactions of Imidazole with Metallic Silver Studied by the Use of SERS and XPS Techniques. 1987
50. Gerardo Leyva Gómez. Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. 2013
51. Rodolfo Zanella. Metodologías para la síntesis de nanopartículas controlando forma y tamaño. 2012
52. Daimay Lin-Vien y col. The Handbook of Infrared and Raman Frequencies of Organic Molecules. 1991
53. Mercedes Acosta. Actividad biológica de extractos en acetato de etilo de los hongos *fusarium camptoceras wollenw* y *reinking* y *aspergillus flocculosus frisvad* y *samson*, aislados de ambientes marinos Colombia. 2011

54. Anastasia Cruz-Carrillo y col. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*, 2010
55. Maria Aquiahuatl, Tecnicas y metodos de aislamiento y selección de microorganismos manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. Y col, UAM, 2012
56. Catedra de biotecnologia: Siembra y recuento de microorganismos, Ing. Eduardo Santambrosio y Ing. Marta Ortega, UTN, 2009
57. Maye Bernal r. y Miguel Guzman U. Biomedica vol 4.el antibiograma de discos: Normalizacion de La Tecnica de Kirby-Bauer, *. 1984
58. Taylor & Francis Biotechnology of Antibiotics, Second Edition William Strohl /1997
59. Humberto H. Lara, Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study 2015
60. Roberto Vazquez-Muñoz, Alejandro Huerta Saquero. Nanomateriales con actividad microbicida: una alternativa al uso de antibióticos Mundo Nano UNAM. 2014

9.1 Técnicas experimentales

Metodología de la Ruta sintética general:



1. Los reactivos Acetato de amonio, bencilo y aldehído disueltos en ac. acético se ponen a reflujo
2. La reacción se neutraliza con NH_4OH hasta alcanzar $\text{pH}=9$
3. El producto se filtra a vacío y se deja secar
4. Se hacen lavados con agua destilada y sln. Salina saturada y se extrae el producto con solventes de polaridad media
5. Rotoevaporar los solventes
6. Purificación por columna cromatográfica con silica gel y usando disolventes para la fase móvil eran mezclas de n- Hex/ AcOEt en distintas proporciones

Condiciones de reacción: Los reactivos utilizados fueron comprados de distintos proveedores como Sigma-Aldrich, J.T. Baker y Fermont. Los rendimientos de los productos generados se calcularon una vez purificados.

9.2 Instrumentación

Resonancia Magnética Nuclear: Para la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear se utilizó un espectrómetro RMN-H Spinsolve Benchtop Magritek. Se utilizó cloroformo deuterado como disolvente. Las siguientes abreviaciones se utilizaron para explicar las multiplicidades: s= singulete; d= doblete; t= triplete; dd= doble de doblete; m= multiplete



Espectroscopía de UV-Visible: Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro en un rango de 200 - 800 nm con una celda de cuarzo de 10 mm. Como disolvente se empleó MeOH y agua destilada. Los valores de absorbancia (λ) se expresan en nm.



Espectroscopía de Infrarrojo: Los espectros de IR fueron realizados en un espectrofotómetro Thermo Scientific iS5 FT-IR. Los valores de transmitancia (ν) están expresados en cm^{-1} .

Espectrometría de Masas: Para la obtención de los espectros de masas, se emplearon las técnicas de ionización por impacto electrónico (EI), utilizando el equipo de un Cromatografo de gases Thermo Scientific modelo TRACE 1310 acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo sencillo Thermo Scientific modelo ISQ LT. La temperatura del horno fue de 120°C y la de la fuente de iones 240°C. La rampa de calentamiento de la columna comenzó a 120°C manteniendo esta temperatura 1 minuto, para subir a una velocidad de 40°C/min hasta 280°C, y manteniendo esta temperatura 10 minutos.



Cromatografía de Capa Fina o TLC: Se emplearon placas FLUKA Analytical de 0.2 mm, usando como agente visualizador luz ultravioleta a 254 nm.

Cromatografía de columna: Se empleó sílica gel con un tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm y de 0.063-0.200 mm de marca MERCK. La preparación de las columnas consistió en el empaquetado con una mezcla de sílica gel y n-Hex, a la que posteriormente se le adicionaba en la parte superior el crudo de reacción por purificar. Los disolventes para la fase móvil eran mezclas de n-Hex/AcOEt en distintas proporciones.

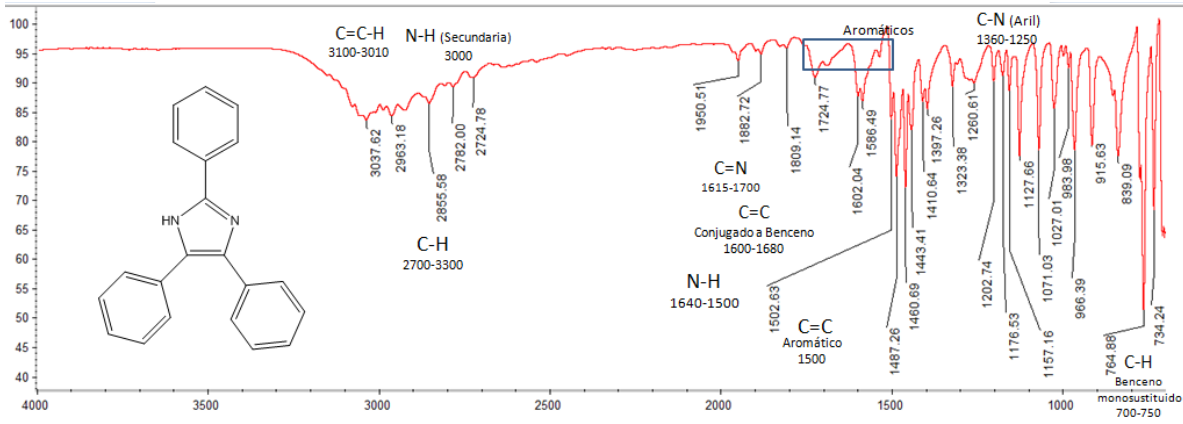
Programas informáticos: Se utilizó el Software ChemDraw Ultra versión 2001 para dibujar las estructuras moleculares y para otorgarle los nombres sistemáticos a los productos sintetizados. El programa Molinspiration Cheminformatics Software (Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score) para calcular el LogP (coeficiente de partición) y el programa OMNIC Spectra Software para el análisis de los Espectros IR y el programa MestreNova Software para el análisis de los Espectros de RMN H¹.

Medios de Cultivos: Las cepas se sembraron para su análisis en Agar Müller-Hinton Marca BDBioxon fabricado en México y se prepararon 3.8 gramos por Litro de agua en un autoclave de calor húmedo son 121°C por 15 minutos y se vertió en cajas petri cuádruples. Las cepas *P. aeruginosa*, y *C. albicans* con no más de 24 horas, provenientes del cepario en el laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e ingenierías UABC. Los sensidiscos utilizados para las pruebas de antibiograma de Ciprofloxacina, Vancomicina, Penicilina G y Oxacilina de la compañía HARDY Diagnostic.

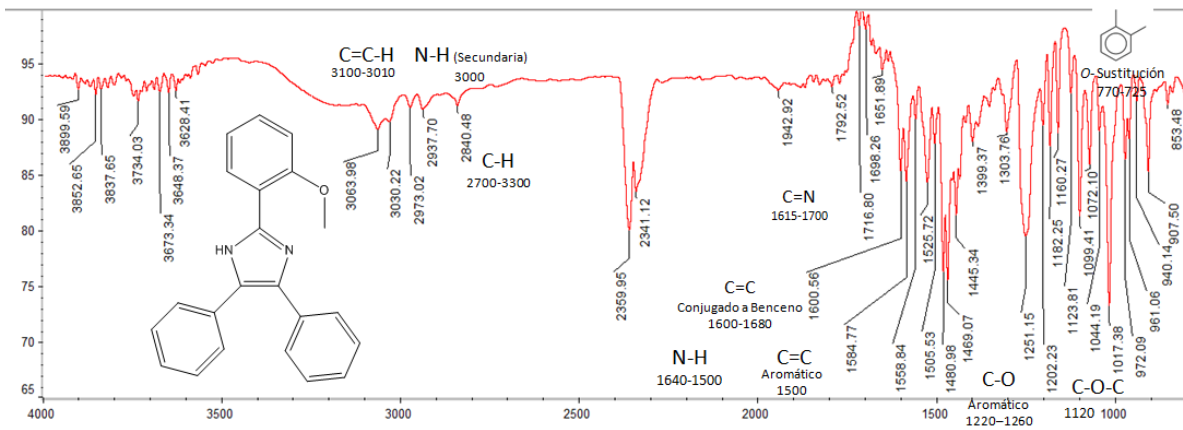
9.3 Anexos

9.3.1 Espectros Infrarrojos

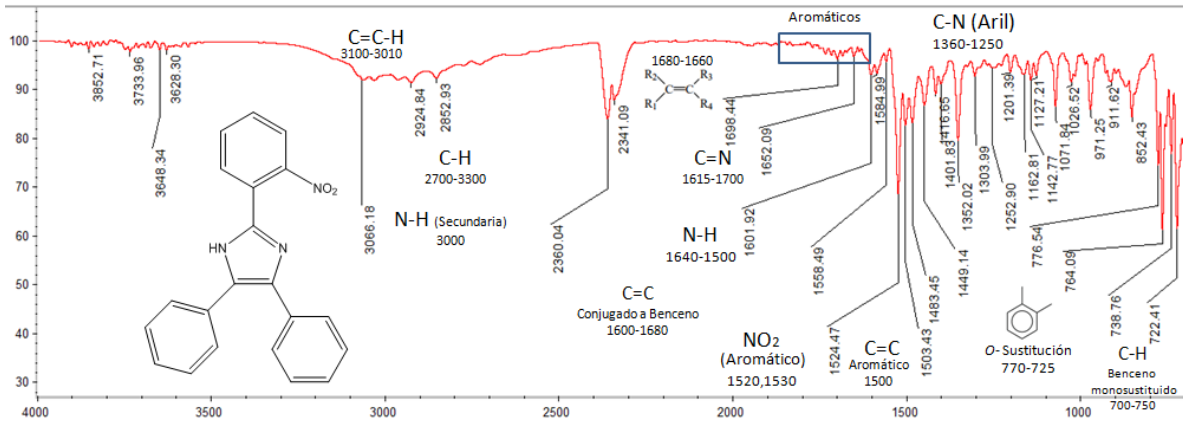
Espectro de infrarrojo del compuesto IMI Lofina



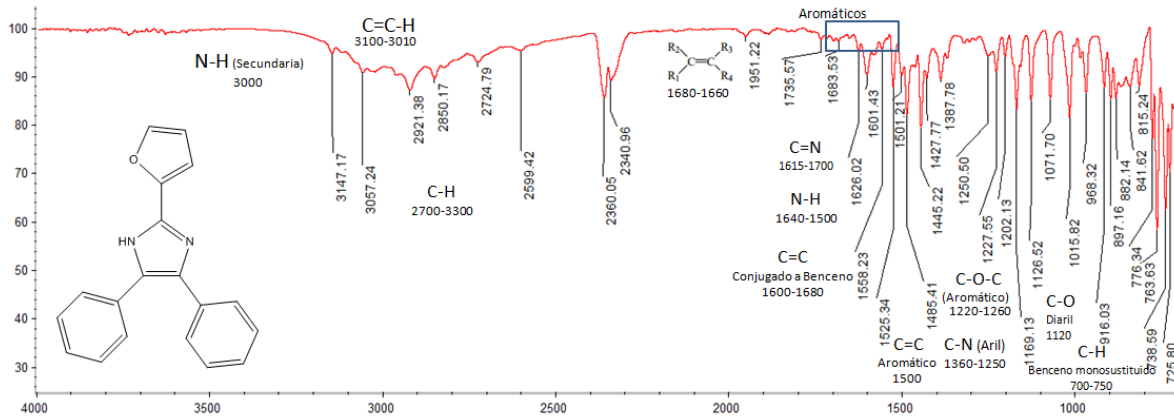
Espectro de infrarrojo del compuesto IMI *o*-Met



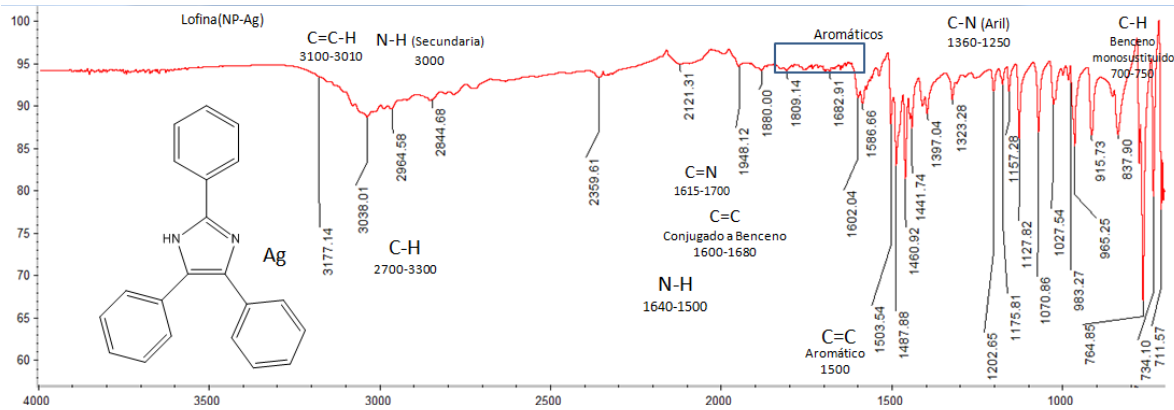
Espectro de infrarrojo del compuesto IMI *o*-NO₂



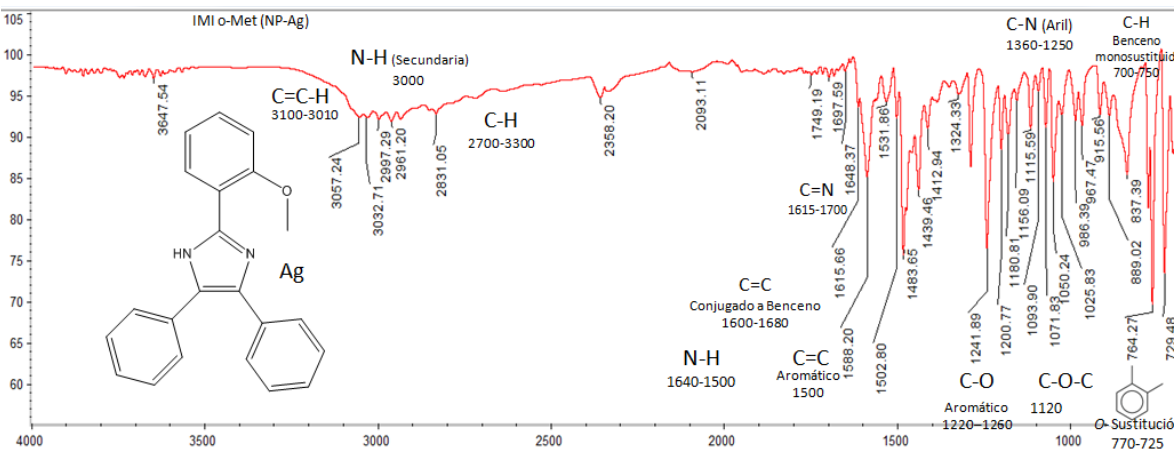
Espectro de infrarrojo del compuesto IMI FUR



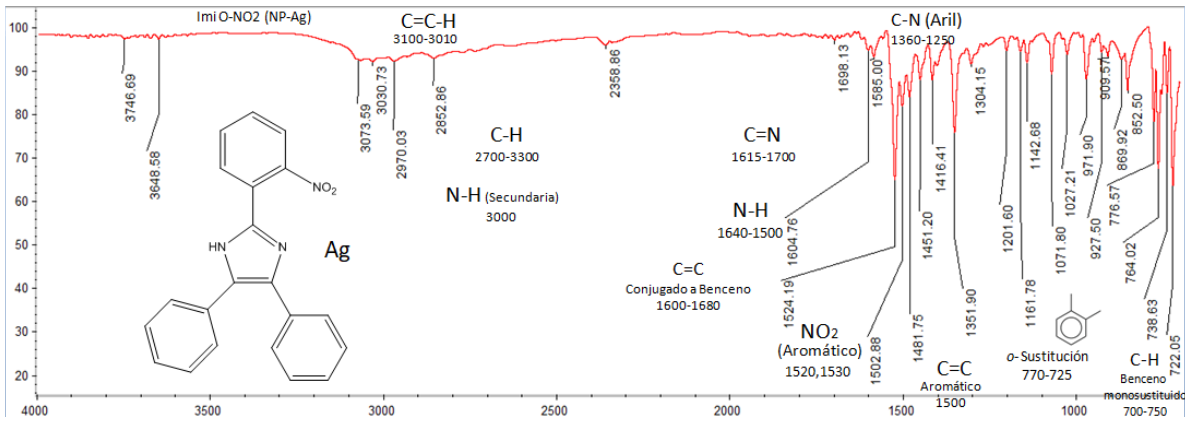
Espectro de infrarrojo del compuesto IMI Lofina P Ag



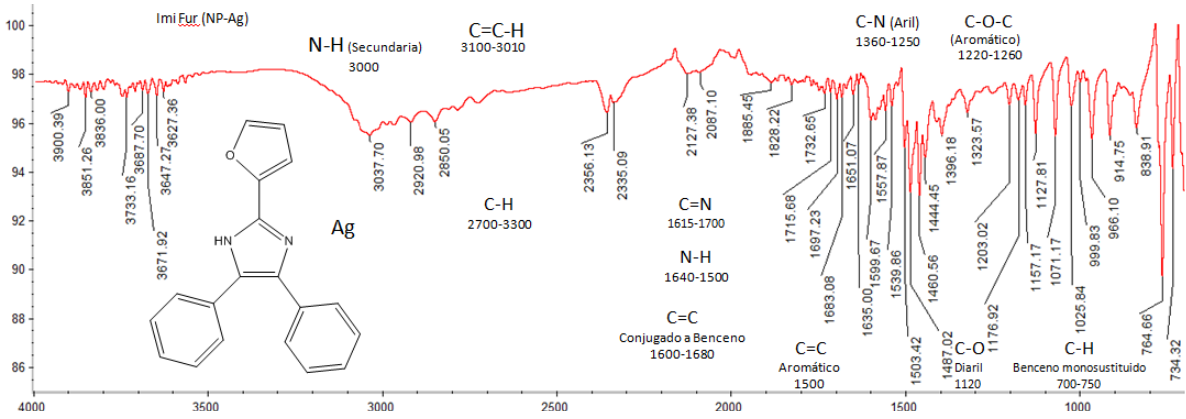
Espectro de infrarrojo del compuesto IMI o-Met P Ag



Espectro de infrarrojo del compuesto IMI *o*-NO₂ P Ag

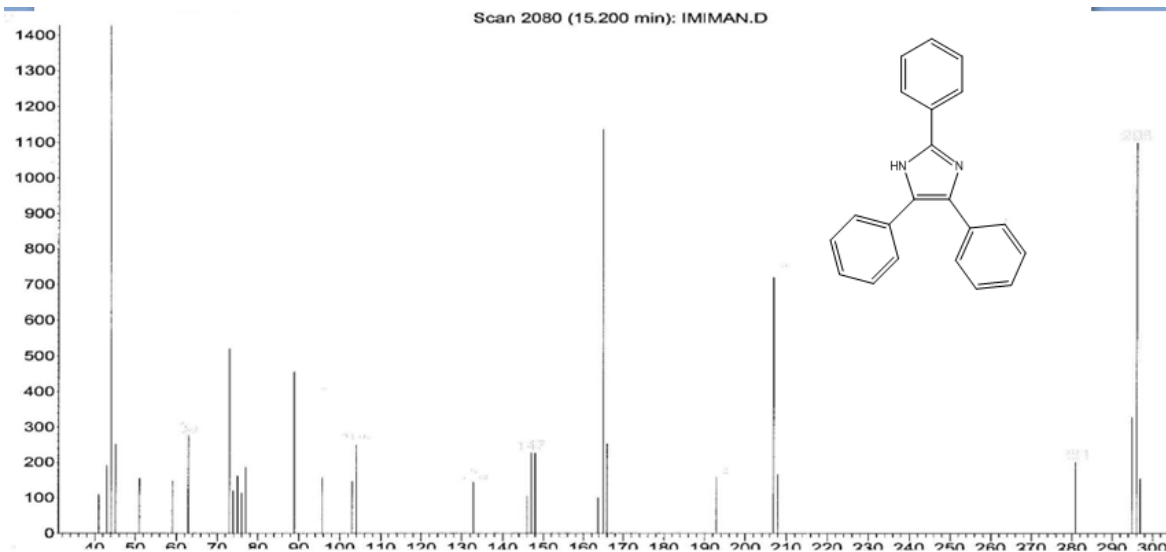


Espectro de infrarrojo del compuesto IMI FUR P-Ag

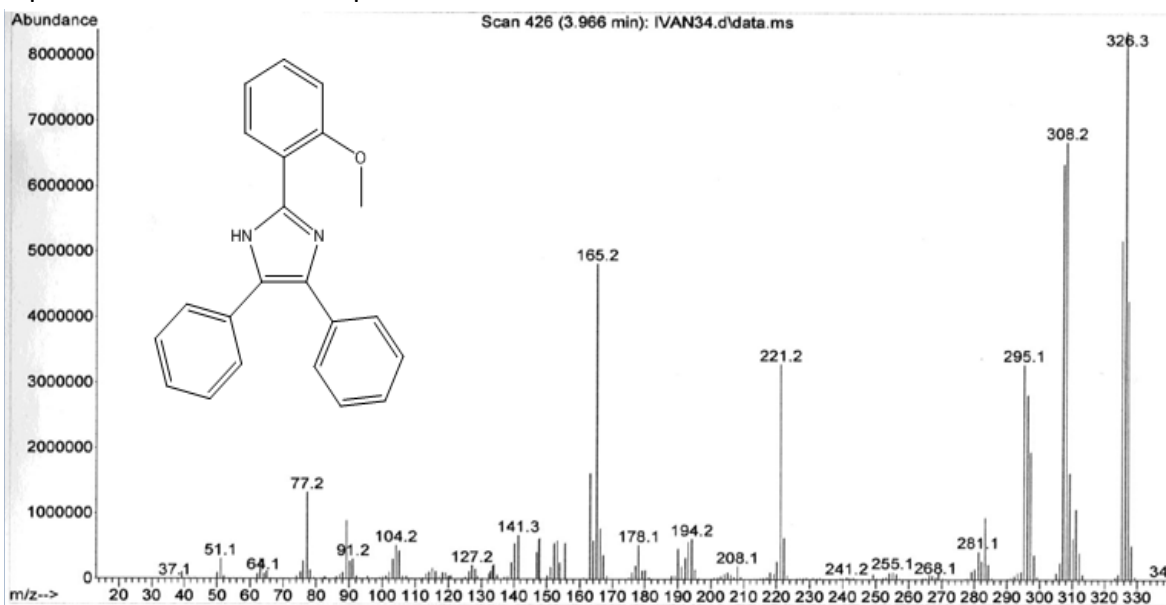


9.3.2 Espectros de Masas

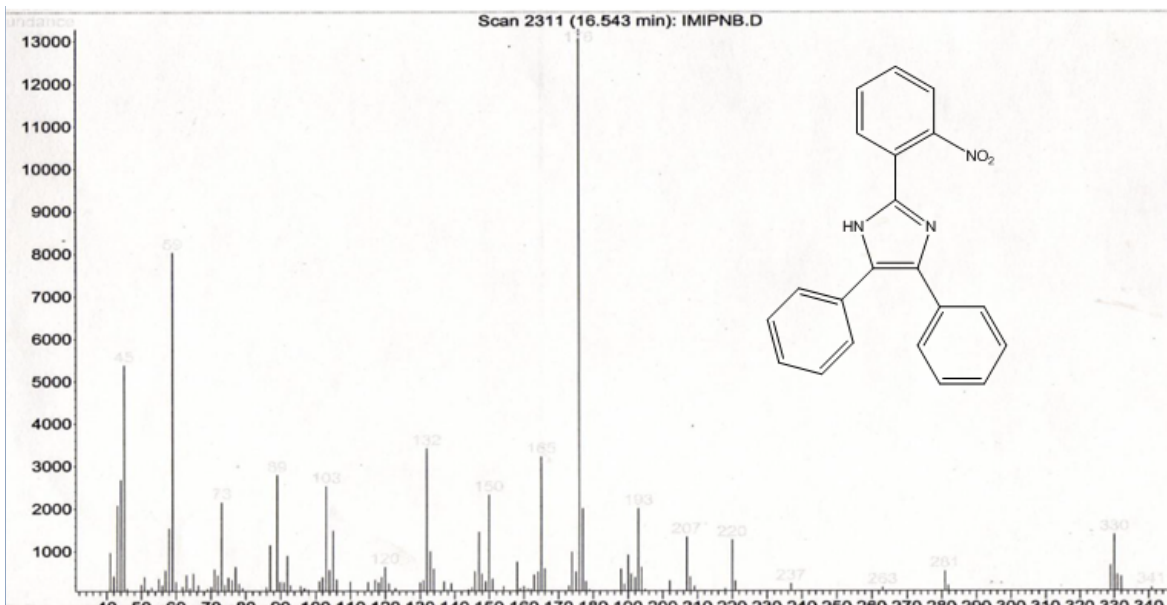
Espectro de masas del compuesto IMI Lofina



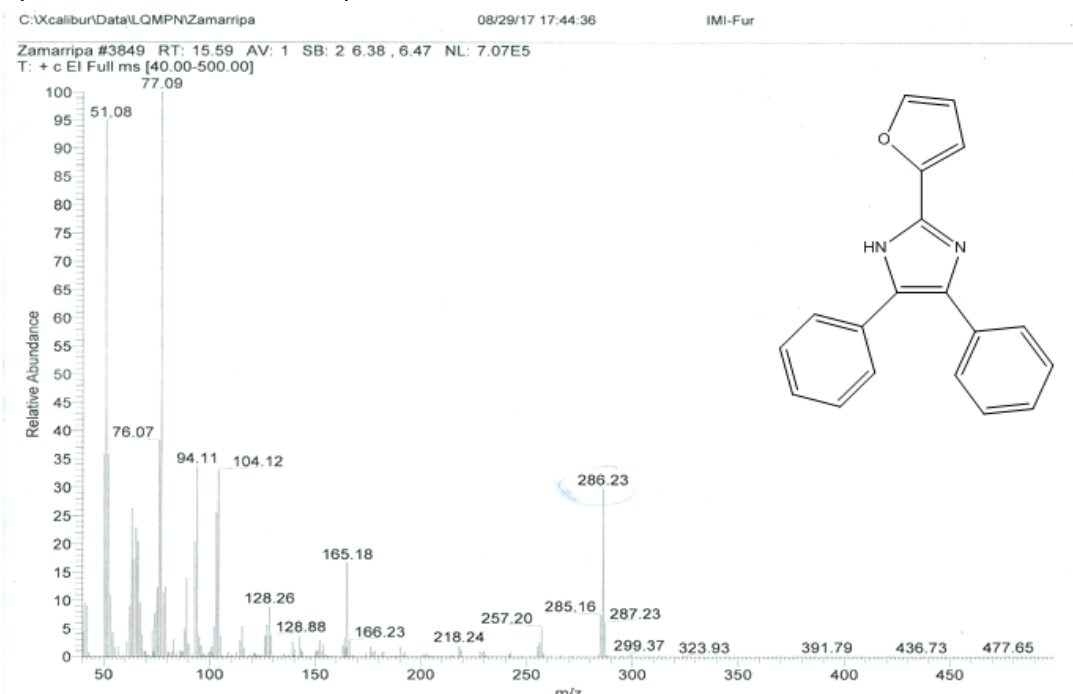
Espectro de masas del compuesto IMI o-Met



Espectro de masas del compuesto IMI *o*-NO₂

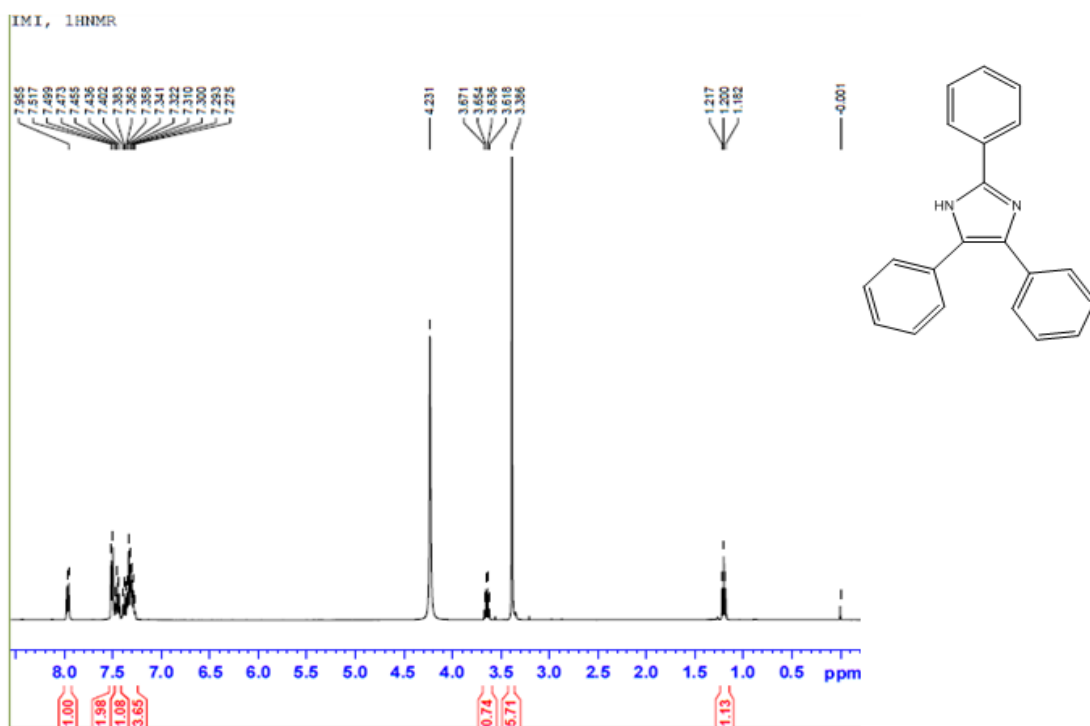


Espectro de masas del compuesto IMI FUR

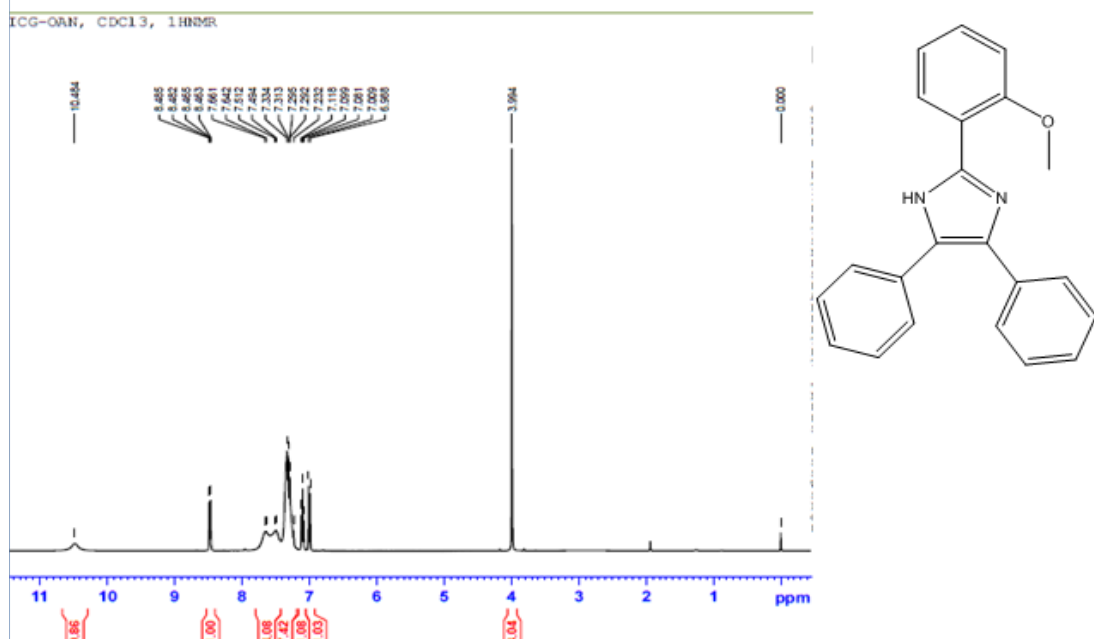


9.3.3 RMN

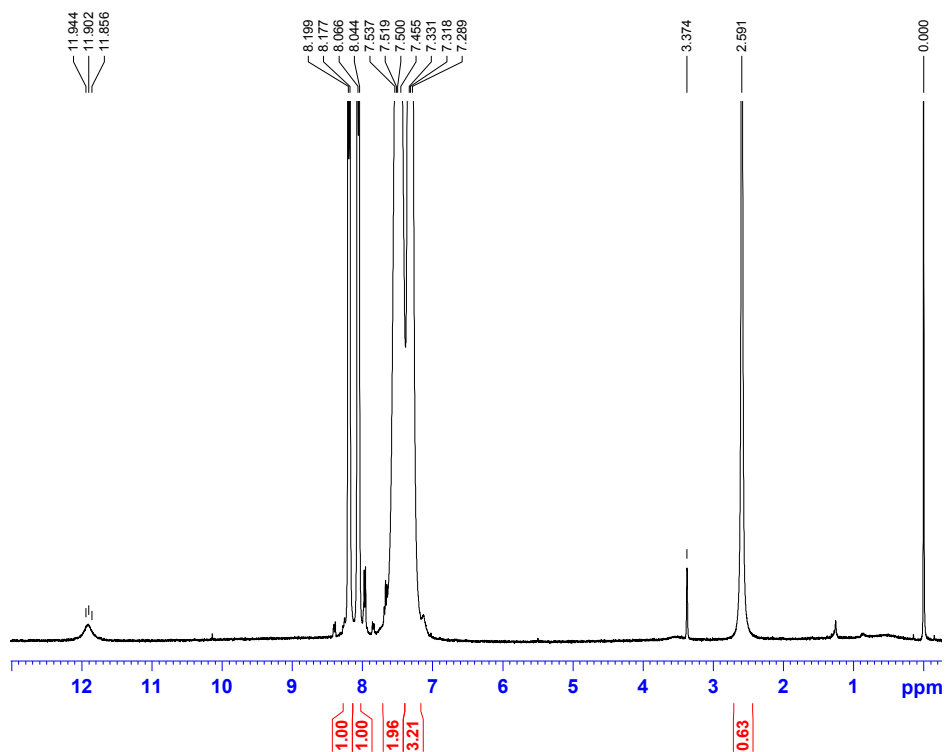
Espectro de RMN 1H del compuesto IMI Lofina



Espectro de RMN 1H del compuesto IMI o-Met



Espectro de RMN 1H del compuesto IMI o-NO₂



9.3.4 Antibiogramas

Candida albicans



Pseudomonas aeruginosa

