



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUIMICA



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES
OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

T E S I S

PARA OBTENER TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

LEONARDO ROBERTO HERNANDEZ MIRELES

DIRECTORA

DRA. MARÍA PAULINA AYDEE GRACIA FUENTES BENÍTES

ASESORA EXTERNA

DRA. ALEJANDRA RAMÍREZ VILLALVA

TOLUCA, ESTADO DE MEXICO; SEPTIEMBRE 2018



1 CONTENIDO

| | | |
|--------|---|----|
| 2 | Agradecimientos | 7 |
| 3 | Dedicatoria | 8 |
| 4 | Abreviaturas y acrónimos..... | 9 |
| 5 | Lista de figuras..... | 11 |
| 6 | Lista de tablas..... | 12 |
| 7 | Lista de Esquemas | 13 |
| 8 | Resumen..... | 15 |
| 9 | Introducción | 17 |
| 10 | CAPITULO I. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES. | 18 |
| 10.1 | Antecedentes | 18 |
| 10.2 | Generalidades de micología | 20 |
| 10.2.1 | Morfología de levaduras | 21 |
| 10.2.2 | Reproducción de levaduras..... | 22 |
| 10.2.3 | Importancia de los hongos para el hombre. | 25 |
| 10.2.4 | Factores de virulencia de los hongos | 26 |
| 10.3 | Clasificación clínica de la micosis | 27 |
| 10.3.1 | Candidiasis o candidosis..... | 28 |
| 10.3.2 | Tratamiento..... | 29 |
| 10.3.3 | Mecanismo de acción de los azoles | 33 |
| 10.3.4 | Resistencia a los antifúngicos..... | 35 |
| 10.3.5 | Candidiasis en México | 36 |
| 10.4 | Pruebas estándar para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos..... | 40 |
| 10.4.1 | Clinical Laboratory Standard Institute - CLSI | 40 |
| 10.4.2 | The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST | 41 |
| 10.5 | Síntesis y propiedades..... | 42 |
| 10.5.1 | Alfa-halogenaciones..... | 42 |
| 10.5.2 | Azidas. | 43 |
| 10.5.3 | B-Cetosulfonas | 46 |
| 10.5.4 | Cicloadiciones..... | 48 |
| 10.6 | Triazoles. Más allá de la química “Click” | 51 |
| 10.6.1 | Introducción | 51 |



| | | |
|--------|--|----|
| 10.6.2 | Adiciones 1,3-Dipolar. | 51 |
| 10.6.3 | Adición [3+2] azida-enolato | 52 |
| 11 | Hipótesis..... | 54 |
| 12 | Objetivo (S)..... | 55 |
| 12.1 | Generales | 55 |
| 12.2 | Específicos | 55 |
| 13 | Justificación. | 56 |
| 14 | CAPITULO 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 57 |
| 14.1 | Resultados y discusión | 57 |
| 14.2 | Conclusiones..... | 64 |
| 15 | CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL | 65 |
| 15.1 | Obtención de 2-bromo-1-(4-metilfenil)etanona..... | 65 |
| 15.2 | Obtención de 1-(p-tolil)-2-tosiletanona | 66 |
| 15.3 | Obtención de 2-(1-azidoetil)-5-bromotieno[2,3-b]piridina. | 67 |
| 15.4 | Obtención de 5-Bromo-2-(1-(5-(4-metilfenil)-4-tosil- 1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)tieno[2,3-b]piridina. | 68 |
| 15.5 | Obtención de 5-Bromo-2-(1-(4,5-difenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)tieno[2,3-b]piridina. .. | 69 |
| 16 | CAPITULO IV. PRUEBAS ANTIFUNGICAS..... | 69 |
| 16.1 | Pruebas antifúngicas para <i>Candida spp</i> | 69 |
| 16.1.1 | Medio de cultivo..... | 69 |
| 16.1.2 | Preparación de medio de cultivo. | 70 |
| 16.1.3 | Preparación de antifúngicos insolubles en agua..... | 70 |
| 16.1.4 | Llenado de placas | 71 |
| 16.1.5 | Preparación del inóculo..... | 72 |
| 17 | Anexos | 74 |
| 17.1 | Anexo 1..... | 74 |
| 17.2 | Anexo 2..... | 74 |
| 17.3 | Anexo 3..... | 75 |
| 17.4 | Anexo 4..... | 75 |
| 17.5 | Anexo 5..... | 76 |
| 17.6 | Anexo 6..... | 76 |
| 17.7 | Anexo 7..... | 77 |
| 17.8 | Anexo 8..... | 77 |



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2]
AZIDA-ENOLATO.

| | | |
|-------|------------------|----|
| 17.9 | Anexo 9..... | 78 |
| 17.10 | Anexo 10..... | 78 |
| 18 | Referencias..... | 79 |



El presente trabajo de Tesis se llevó a cabo en los Departamentos de Química Orgánica y de Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, bajo la dirección de la Dra. María Paulina Aydee Gracia Fuentes Benites, y con la asesoría de la Dra. Alejandra Ramírez Villalva y M. en Ed. Q. Macario Morales Rodríguez, apoyado con el financiamiento otorgado por la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la UAEMéx, bajo el proyecto 4512/2018/CI



Este trabajo fue presentado en el XLII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica del 24 al 27 de Mayo de 2017 en el Centro de Convenciones William O. Jenkins, Puebla, Puebla. Con el Cartel "EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS COMPUESTOS TRIAZÓLICOS EN CEPAS DE LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS."



2 AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alejandra Ramirez Villalva por darme la oportunidad de colaborar en sus proyectos de investigación y por su disposición a enseñar, orientar e inspirar. Gracias por tener esa paciencia y dedicación con tus alumnos, sin lugar a duda creo eres una gran química.

A la Dra. Aydee Fuentes por sus observaciones y orientación que sirvieron como pilares en este trabajo de tesis.

Al Dr. Carlos Gonzáles, por su ayuda brindada durante este trabajo y sus consejos que sirvieron de guía en mi formación profesional.

A la M. en C. Ma. de las Nieves Zavala Segovia por su apoyo en la realización de la espectroscopia de RMN, en el Centro Conjunto de Investigaciones Químicas UAEM–UNAM.

Al laboratorio de química orgánica y todos aquellos que laboran en él y que tuve el placer de conocer dentro de sus instalaciones, pues siempre aprendí algo nuevo con su compañía y por supuesto los buenos momentos no faltaron.

A los maestros Sergio Pavón y Macario Morales por las facilitar el espacio, reactivos y material del laboratorio de microbiología de esta facultad al momento de realizar las pruebas antifúngicas.



3 DEDICATORIA

A mis padres, Carmen y Leonardo, quienes depositaron en mi toda su confianza, apoyo y cariño para concluir mis estudios profesionales. Los quiero mucho.

A mis amigos, no sería lo mismo asistir a esta facultad sin su poderosa compañía, invaluable consejos y momentos que pasamos juntos.

A Diana, por tu amor y cariño que hace de esta vida un lugar mucho más alegre y maravilloso. Descubrí el ángel que hay en ti. Te quiero



4 ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

µg microgramo

µL microlitro

Ar Arilo

Alk Alquilo

ADN Ácido desoxirribonucleico

CCF Cromatografía de capa fina

CMI Concentración mínima inhibitoria

CLSI Clinical Laboratory Standars Institute (Instituto de estándares de laboratorios clínicos)

Da Dalton

DO Densidad óptica

DL50 Dosis media letal

Dil. Dilución

DMF Dimetil Formamida

DMSO Sulfóxido de dimetilo

DPPA Difenil fosforil azida

DBU 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undeceno

EUCAST European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Comité Europeo de pruebas para susceptibilidad bacteriana)

LDA Litio diisopropilamida

Kg Kilogramo

mL Mililitro

Me Metilo



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2]
AZIDA-ENOLATO.

MeOH Metanol

MeONa Metóxido de sodio

MOPS Acido morfolino propanosulfónico

N Normal

NBS N-Bromosuccinimida

pH Potencial de hidrógeno

Ph Fenilo

ppb Partes por billón

ppm Partes por millón

PDA Agar glucosado de patata

RMN Resonancia Magnética Nuclear

RPMI Roswell Park Memorial Institute

Spp Especies

SIDA Síndrome de inmunodeficiencia adquirido

UFC Unidad formadora de colonias

VIH Virus de inmunodeficiencia humana

OMS Organización mundial de la salud



5 LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Porcentaje de micosis en México | 20 |
| Figura 2. Estructura de la levadura. | 21 |
| Figura 3. Colonias filamentosas y levaduriformes. | 22 |
| Figura 4. Curva de crecimiento de levaduras..... | 23 |
| Figura 5. Ciclo de reproducción de las levaduras..... | 24 |
| Figura 7. Lugar de interacción de los azoles como molécula antifúngica | 34 |
| Figura 8. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos. | 36 |
| Figura 9. Distribución de especies de Candida en micosis superficiales en México. Periodo 2005-2015 a) Oral b) Genital c) Onicomicosis d) Cutanea. | 38 |
| Figura 10. Distribución de especies de Candida en enfermedades sistémicas en México periodo 2005-2015 | 40 |
| Figura 11. Clasificación de reacciones sigmatrópicas. | 49 |
| Figura 12. Orbitales frontera de eteno y 1,3-butadieno..... | 50 |
| Figura 13. Reacción de Diels-Alder..... | 50 |
| Figura 14. Actividades antifúngicas de los compuestos sintetizados, CMI mg/mL. Abreviaturas <i>C. alb</i> ; <i>Candida albicans</i> <i>C. uti.</i> , <i>Candida utilis</i> ; <i>C. kru.</i> , <i>Candida krusei</i> ; <i>C.gla.</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>C. par.</i> , <i>Candida parapsilosis</i> | 63 |
| Figura 15. Interacción propuesta para la interacción de triazoles con enzima 14- α -desmetilasa ... | 64 |



6 LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Factores de virulencia en hongos | 27 |
| Tabla 2. Clasificación clínica de las micosis | 28 |
| Tabla 3. Especies de <i>Candidas</i> asociadas patógenas | 29 |
| Tabla 4. Propiedades farmacológicas de algunos azoles | 32 |
| Tabla 5. Número de pacientes con Candidiasis superficial en México en el periodo 2005-2015..... | 37 |
| Tabla 6. Pacientes con candidiasis sistémica en México en el periodo 2005-2015 | 39 |
| Tabla 7. Acidez de algunas Beta-cetosulfonas en etanol agua (1:1)..... | 47 |
| Tabla 8. Actividades antifúngicas de los compuestos sintetizados (CMI, mg/mL. Abreviaturas <i>C. alb</i> ; <i>Candida albicans</i> <i>C. uti.</i> , <i>Candida utilis</i> ; <i>C. kru.</i> , <i>Candida krusei</i> ; <i>C.gla.</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>C. par.</i> , <i>Candida parapsilosis</i> | 62 |
| Tabla 9. Determinación de la sensibilidad de la levadura (de acuerdo al documento M27-A3); R; Resistente, SDD; Sensible dependiente de la dosis, S; Sensible. Abreviaturas <i>C. alb</i> ; <i>Candida albicans</i> <i>C. uti.</i> , <i>Candida utilis</i> ; <i>C. kru.</i> , <i>Candida krusei</i> ; <i>C.gla.</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>C. par.</i> , <i>Candida parapsilosis</i> | 62 |
| Tabla 10. Dilución de antifúngicos insolubles en agua. | 70 |



7 LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| Esquema 1. Esquema general del trabajo realizado. | 15 |
| Esquema 2. Reacción general de alfa – halogenación. | 42 |
| Esquema 3. Fenil-1H atrazina..... | 44 |
| Esquema 4. Estructuras de resonancia del grupo azida..... | 44 |
| Esquema 5. Aplicación de la reacción de Mitsunobu para la síntesis asimétrica de derivados de 2,3-diamino-3-ácido fenilpropanoico..... | 45 |
| Esquema 6. Adición conjugada de iones azida a la ciclohexenona..... | 46 |
| Esquema 7. Rutas generales de síntesis de Beta-cetosulfonas..... | 47 |
| Esquema 8. Síntesis de β -ceto trifluorometil sulfonas por alquilación de trifluorometil sulfinitos con α -bromometil cetona. | 48 |
| Esquema 9. Síntesis de triazoles, Reacción de Dimroth..... | 48 |
| Esquema 10. Esquema general de las adiciones 1,3 – Dipolares..... | 51 |
| Esquema 11. Cicloadición 1,3-dipolar de una azida a un alquino..... | 51 |
| Esquema 12. Adición de una azida a un alqueno..... | 52 |
| Esquema 13. Formación de 1,2,3-triazol según Dimroth..... | 52 |
| Esquema 14. Síntesis de 1,2,3 triazoles 1,5-sustituidos por medio de cicloadición [3+2] azida-enolato. | 53 |
| Esquema 15. Síntesis de análogos de miconazol por cicloadición [3+2] azida-enolato. | 53 |
| Esquema 16. Mecanismo propuesto de cicloadición..... | 59 |
| Esquema 17. Reacción de obtención de 2-bromo-1-(4-metilfenil)etanona. | 65 |
| Esquema 18. Reacciones de Obtención de 1-(p-tolil)-2-tosiletanona. | 66 |
| Esquema 19. Reacción de Obtención de 2-(1-azidoetil)-5-bromotieno[2,3-b]piridina. | 67 |
| Esquema 20. Obtención de 5-Bromo-2-(1-(5-(4-metifenil)-4-tosil- 1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)tieno[2,3-b]piridina..... | 68 |
| Esquema 21. Obtención de 5-Bromo-2-(1-(4,5-difenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)tieno[2,3-b]piridina. | 69 |
| Esquema 22. Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente dimetil sulfóxido (DMSO) | 71 |
| Esquema 23. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de microdilución). Diluyente RPMI 1640. | 72 |



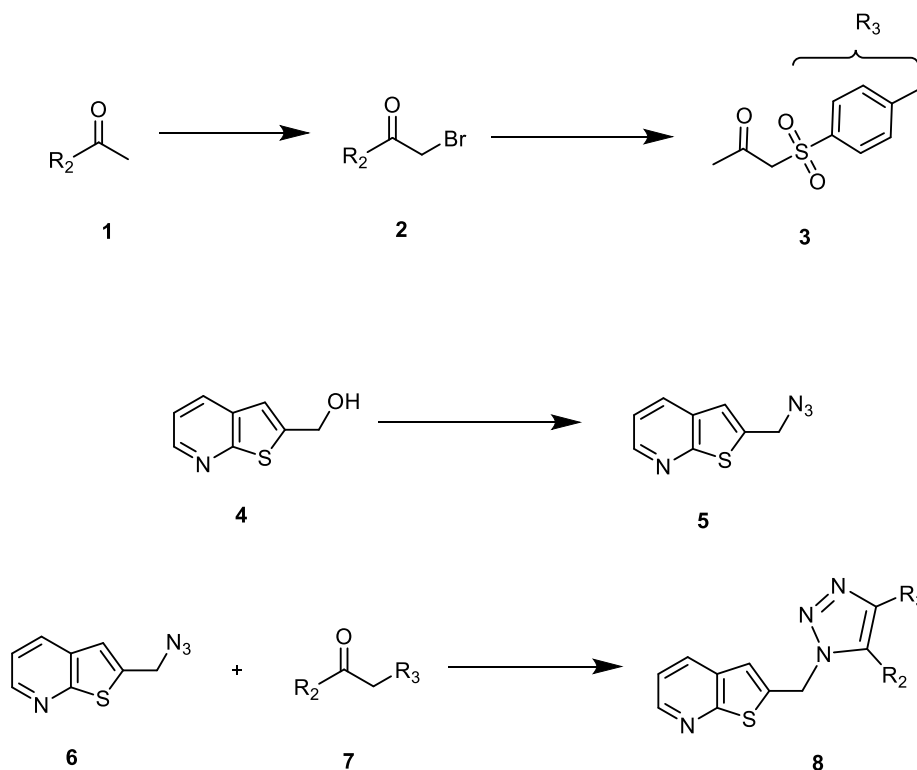
Esquema 24. Preparación de inculo de levaduras. 73



8 RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis de dos compuestos 1,2,3-triazoles derivados de una molécula de tienopiridina la cual presenta propiedades farmacóforas, estos compuestos fueron sintetizados por medio de la reacción de cicloadición [3+2] azida-enolato (Esquema 1), dichos compuestos fueron caracterizados por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C . Es conocido que los núcleos de 1,2,3-triazol, tienen propiedades antifúngicas notables por lo que en este trabajo se realizaron pruebas de microdilución en caldo para calcular la concentración mínima inhibitoria de los compuestos sintetizados.

Dichos compuestos fueron evaluados en levaduras (*C. albicans.*, *C. tropicalis.*, *C. utilis.*, *C. krusei.*, *C. glabrata.*, *C. parapsilosis*) de importancia clínica por ser considerados hongos oportunistas causantes de enfermedades nosocomiales.



Esquema 1. Esquema general del trabajo realizado.

La síntesis se dividió en dos pasos, el primer paso consistió en sintetizar la β – cetosulfona, la cual reaccionó con la azida sustituida en la molécula de tienopiridina.



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2]
AZIDA-ENOLATO.

Una vez obtenidos los compuestos fueron sometidos a prueba antifúngica para determinar la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución en caldo que proponen los documento M27-A3 para levaduras y M38 para hongos filamentosos de Clinical & Laboratory Standards Intitute (CLSI).



9 INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación aporta el diseño, la síntesis, caracterización y pruebas antifúngicas de dos nuevas moléculas basadas en núcleos de tienopiridinas con un anillo triazólico para su uso como agentes antifúngicos en hongos oportunistas de importancia nosocomial.

El primer capítulo se centra en los principios fundamentales de micología y la importancia que tienen estos hongos en los casos clínicos que se presentan principalmente dentro del país, pero que pueden afectar cualquier parte del mundo. Se dará una pequeña explicación acerca de los mecanismos de acción de los antifúngicos más comunes. Finalmente, se da una pequeña introducción a las reacciones utilizadas en este trabajo para una mayor comprensión de las reacciones empleadas en la estrategia sintética.

El segundo capítulo habla directamente de la síntesis y los pasos seguidos durante la obtención de las moléculas, así como la caracterización por medio de RMN ^1H y RMN ^{13}C de los compuestos finales.

El capítulo tercero nos detalla paso a paso el uso de las pruebas antifúngicas por medio de los documentos que proporciona el Clinical Laboratory Standards Institute para la determinación de la cantidad mínima inhibitoria de los compuestos en las levaduras y hongos filamentosos que serán sometidos a esta prueba de sensibilidad.

Para finalizar, se presentan los resultados y discusión de los mismos tanto de la síntesis como de la parte microbiológica.



10 CAPITULO I. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES.

10.1 ANTECEDENTES

Durante los últimos años, la incidencia de infecciones fúngicas oportunistas se ha incrementado significativamente y consistentemente en todo el mundo. Siendo las micosis provocadas por levaduras las que representan la mayor cantidad de casos presentes. Sin embargo, *Candida* es la principal causa de micosis en el mundo, especialmente en aquellos pacientes con enfermedades tratadas con inmunosupresores, pacientes con cirugías o trasplante de órganos, infantes prematuros y pacientes con VIH/SIDA o diabetes no controladas.

El género *Candida* incluye más de 200 especies de las cuales *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*. *Candida inconspicua*, *Candida rugosa* y *Candida norvegensis* son consideradas patogénicas para el ser humano¹. Algunas de estas especies se encuentran en el cuerpo humano, pero se pueden hacer patógenas como consecuencia de alteraciones a su medioambiente o la inmunosupresión del paciente generando a si su proliferación en el huésped.

El incremento en las especies de *Candida* que no sean *Candida albicans* es atribuido al uso indiscriminado de antifúngicos y al incremento de dispositivos médicos implantados, trasplante de órganos y terapias de ancho espectro antibacterial². Las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis* son naturalmente susceptibles al fluconazol, sin embargo, con el tiempo, la susceptibilidad de *C. albicans* a este agente antifúngico ha decrecido. Es claro que ningún agente antifúngico está exento del desarrollo de resistencia por parte de la especie fúngica.

La proliferación de estas especies, sumadas a la resistencia que han generado los microorganismos por el uso indebido de los medicamentos tradicionales, han ocasionado un problema de salud grave. El surgimiento de la química "Click"³ permitió sintetizar triazoles, pero con el paso de los años han surgido métodos de síntesis de triazoles más eficientes como la cicloadición [3+2] azida-enolato, que permite obtener compuestos con mejores rendimientos de reacción y mayor versatilidad en los sustituyentes del anillo triazólico. El uso de tienopiridinas como agentes farmacológicos no es algo nuevo y se han investigado sus propiedades debido a la semejanza con las quinolinas e isoquinolinas.⁴



Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves. La mayoría de estas infecciones se originan de un foco endógeno (tracto gastrointestinal o respiratorio) aunque no se descarta la participación de fuentes externas.

La distribución geográfica de esta micosis es universal y más de 70 % de ellas son producidas por *C. albicans* observándose un porcentaje mayor por el serotipo B. Los casos de candidiasis sistémica están relacionados a pacientes con severas deficiencias en su sistema inmune. *C. krusei* y *C. glabrata* son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos y su hallazgo como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años.

Los casos registrados de candidiasis muestran que el sexo no influye en la frecuencia, a excepción de la candidiasis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo femenino. La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la micosis, la cual realmente dependerá del factor de inmunocompromiso asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación, aunque no es un factor de importancia, se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección.

En México el número de las cifras representan lo siguiente; genital(47.81%)^{5,6,7}seguido de candidiasis oral(38.26%)⁸⁻¹⁰, onicomycosis(14.65%)¹¹⁻¹³y piel(1.29%)¹⁴. (Figura 1)

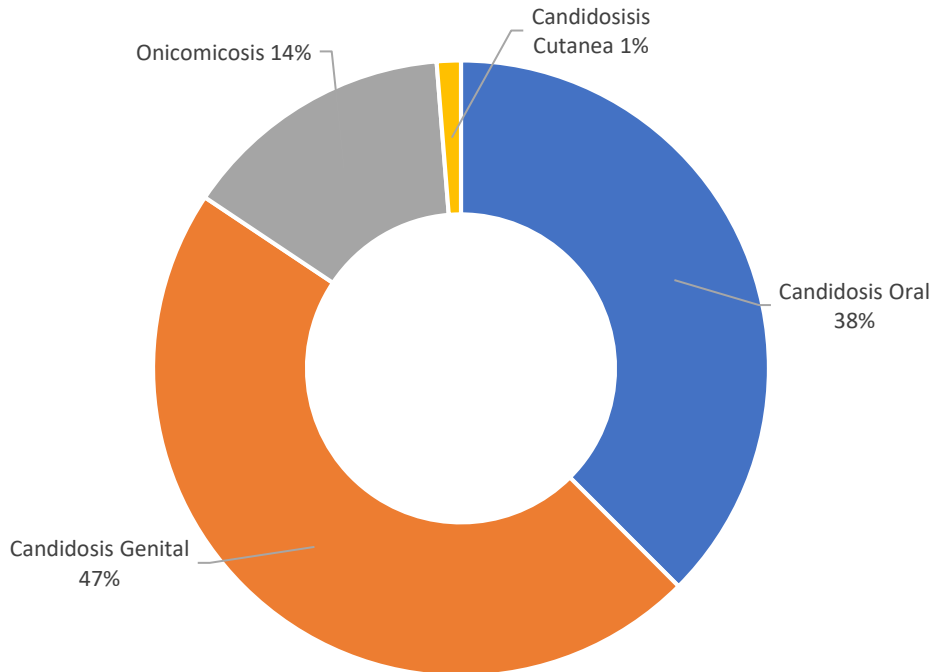


Figura 1. Porcentaje de micosis en México

10.2 GENERALIDADES DE MICOLOGÍA

Con algunas excepciones, los integrantes del reino Fungí poseen las siguientes características: Son eucariotes, aerobios, macro o microscópicos, heterótrofos, la nutrición la efectúan mediante la secreción de enzimas (exoenzimas) que digieren la materia orgánica antes de ingerirla (absorción) y es almacenada en forma de glucógeno, poseen crestas mitocondriales en placa, membrana celular constituida por ergosterol, quitina como principal componente de la pared celular.

Todas esas características contribuyen a que los hongos se encuentren o invadan hábitats muy diversos y cumplan una de las funciones más importantes en el ecosistema que es la degradación de material orgánico.

Se han descrito alrededor de 70 000 especies de hongos, pero se considera que puede haber 1.5 billones de ellas¹⁵.

La taxonomía de los hongos que producen enfermedad en el humano ha cambiado, en gran medida debido al rápido desarrollo de técnicas de secuenciación de ADN. El número de especies de hongos potencialmente patógenos ha aumentado de manera importante. Muchas de estas especies forman



parte de complejos, y muestran entre ellas diferencias en virulencia y respuesta al tratamiento, por lo que es necesaria la identificación para el manejo adecuado de los pacientes¹⁶.

10.2.1 Morfología de levaduras

La levadura, es unidad anatómica y de crecimiento en hongos unicelulares. (Figura. 2).

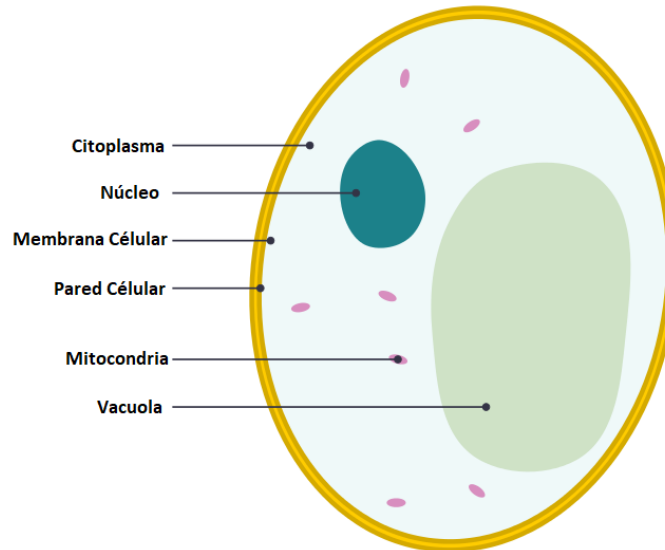


Figura 2. Estructura de la levadura.

- Las levaduras presentan formas diversas, esférica, ovoide, elipsoidal y cilíndrica; crecen de forma isodiamétrica (por todos lados). Algunas levaduras forman cadenas, estructuras a las que se denomina pseudohifas (por lo que la agregación de varias de ellas se conoce como pseudomicelio). Las colonias generalmente son poco elevadas y de consistencia suave, cremosa, y su color oscila, en general, entre el blanco - amarillo, aunque algunas contienen pigmentos carotenoides. (Figura 3)

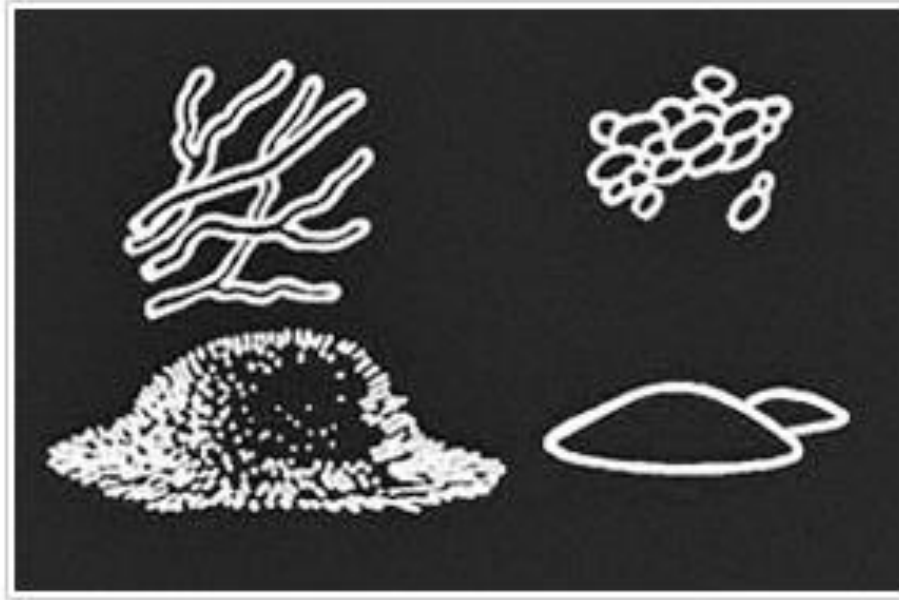


Figura 3. Colonias filamentosas y levaduriformes.

En la Micología Médica se consideran los hongos dimórficos. Habitualmente, en estos casos, se identifica una forma infectiva, y una forma parasitaria, la primera presente en la naturaleza, la segunda en el hospedero.

10.2.2 Reproducción de levaduras.

A pesar de ser células unicelulares simples, su ciclo de reproducción puede servir como modelo para eucariontes de orden superior. En el ciclo celular de las levaduras el crecimiento y la división celular están estrechamente relacionadas y son dependientes de factores tales como la concentración de nutrientes (Figura 4). Dependiendo en los factores de su ambiente las levaduras pueden reproducirse de manera asexual o sexual para producir nuevas células.

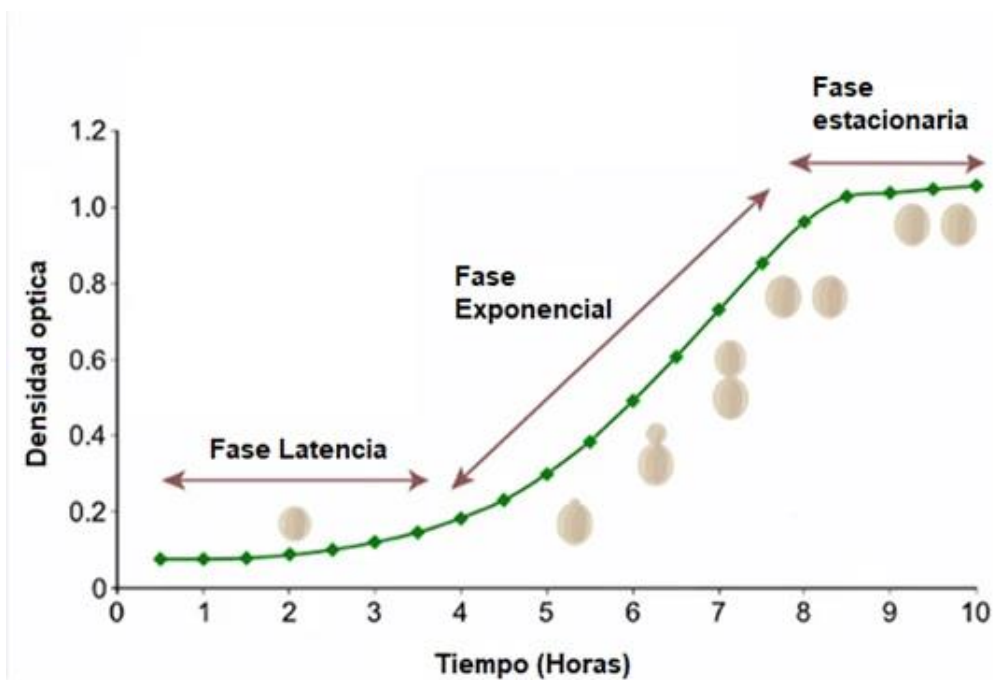


Figura 4. Curva de crecimiento de levaduras.

Retomando conocimientos del ciclo celular. Existen dos fases principales, interfase, la cual está compuesta por las subfases G1, S y G2; y la fase M o mitosis. La mitosis es un componente importante en la división celular, y las levaduras muestran la peculiaridad de dividirse asimétricamente por medio de un mecanismo de reproducción asexual llamado gemación.

En la fase G1 la célula se encuentra en el “inicio” del ciclo. La aparición de la célula “hija” aparece en la fase S y continúa creciendo en el resto del ciclo celular, incluyendo la mitosis. Cuando la citocinesis está completa, una división no equitativa del citoplasma produce una célula resultante de menor tamaño. Este proceso produce una “cicatrización” de la pared celular compuesta por quitina, dando lugar a posibles estimaciones de cuantas veces la levadura se ha dividido.

La célula recién formada, comenzará a crecer en la fase G1, en la presencia de nutrientes, hasta que ciertas condiciones son alcanzadas y de nueva cuenta se alcance el punto de “inicio” comenzando todo el proceso de división celular nuevamente. Antes de que este punto de control sea alcanzado, las levaduras pueden sufrir meiosis y una reproducción sexual subsecuente.

La reproducción sexual es una manera de introducir variación en una población de organismos, la cual a su vez promueve la supervivencia.



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

El tipo de levadura que puede reproducirse es haploide, el cual contiene una copia del genoma, como un huevo o un espermatozoide. Hay dos tipos diferentes de levaduras haploides, Mat a y Mat α , estas células pueden reproducirse asexualmente, como una levadura diploide.

Cada una de estas levaduras libera feromonas. Mat a libera la feromona a y Mat α libera la feromona α . Estas feromonas son detectadas por la levadura de diferente tipo y causa que la levadura haploide cambie de forma al alargarse.

Durante esta fase, dos haploides continúan alargándose hasta lograr contacto célula - célula. Al lograr el contacto se genera una fusión nuclear que resulta en la formación de un cigoto. El cigoto recién formado regresa al ciclo celular mitótico.

Cuando las levaduras se encuentran en condiciones estresantes una forma de meiosis toma lugar, conocida como esporulación. (Figura 5)

Durante la esporulación, se forman esporas haploides para cada tipo sexual y son contenidas en una estructura membranosa rígida llamada asco. Cuando las condiciones ambientales mejoran, las esporas son liberadas. Desde ahí pueden regenerar todo el ciclo de reproducción total.

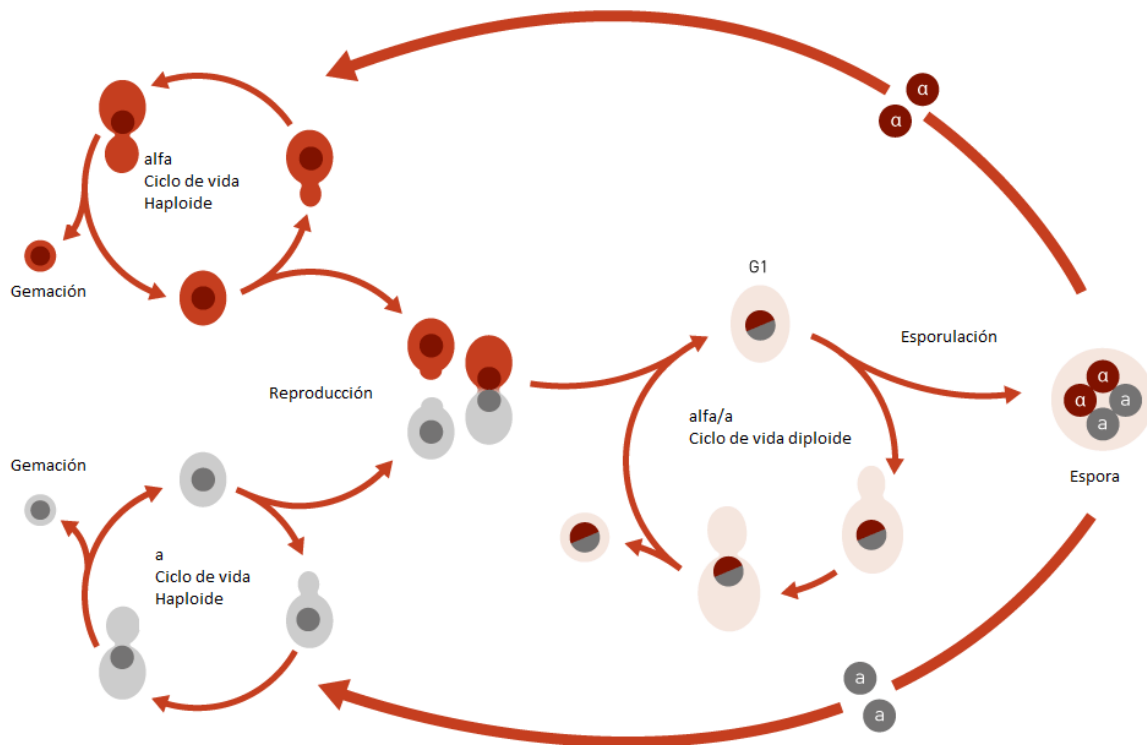


Figura 5. Ciclo de reproducción de las levaduras.



10.2.3 Importancia de los hongos para el hombre.

Los hongos producen metabolitos secundarios y el hombre los procesa para diferentes industrias como: panadería, cervecería, quesería, en la producción de antibióticos (penicilinas, cefalosporinas), inmunodepresores (ciclosporina), hormonas y esteroides, ácidos orgánicos (ácido láctico y el ácido cítrico empleado en la elaboración de un refresco de gran consumo), enzimas (celulasa, catalasa, amilasa, renina). *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura valiosa no únicamente por su valor comercial sino como sistema modelo en estudios de genética eucariota. Fue el primer eucarionte el cual su genoma ha sido secuenciado, y con sus 6000 genes, tiene el genoma más pequeño de cualquier modelo de célula eucariota. Actualmente, los biólogos moleculares están en proceso de determinar las funciones de las proteínas codificadas por sus genes. Los biólogos han usado a *S. cerevisiae* para estudiar genética molecular, incluyendo como los genes regulan la división celular¹⁷. Los investigadores continúan usando esta levadura para estudiar problemas como la recombinación genética, y la correlación entre la edad celular y el cáncer. *S. cerevisiae* también ha sido utilizada para estudiar los mecanismos de acción de los antifúngicos y la resistencia a estos.

Los hongos simbiotes tienen relaciones beneficiosas con otros organismos. Ejemplos de esto son los líquenes, asociaciones de hongos con algas o cianobacterias cuya relación íntima les permite colonizar diferentes sustratos, incluso rocas, que de manera independiente son incapaces de degradar y las micorrizas, asociaciones de hongos y raíces de plantas cuya interacción favorece el crecimiento de la planta y la obtención de nutrientes por parte del hongo en suelos que les son desfavorables. También presentan relaciones simbióticas con insectos, como las hormigas y termitas.

Los hongos tienen un papel esencial en la descomposición de la celulosa, con la producción de bióxido de carbono y agua; por otra parte, representan pérdidas económicas al degradar papel, telas, cuero, hidrocarburos y otros productos; el aspecto útil es su responsabilidad en el reciclaje de la madera en los bosques y su empleo para la biorremediación de suelos contaminados por materiales tóxicos. Degradan casi todo, con excepción de algunos plásticos y pesticidas.

Por otra parte, son causa de pérdidas económicas en la producción agrícola y ganadera debido a las enfermedades que causan a animales y plantas.



10.2.4 Factores de virulencia de los hongos

Las esporas o fragmentos de micelio de un hongo patógeno pueden permanecer latentes o germinar sobre la superficie del huésped o si son inhaladas, en los alveolos de los pulmones, las hifas resultantes pueden penetrar los tejidos, colonizarlos, reproducirse y dispersarse, alterando la fisiología del huésped y causando enfermedad.

En el humano, los sistemas de defensa generalmente son efectivos, ya que la mayoría de los hongos que están en el ambiente, no causan enfermedad. El sistema inmune de los mamíferos involucra factores tanto innatos (fagocitosis, procesos inflamatorios,) como adaptativos (células y anticuerpos específicos), cuya principal función es mantenernos limpios de agentes infecciosos; sin embargo, existen situaciones que debilitan esas defensas naturales o adquiridas, haciendo susceptible al huésped.

Los factores de virulencia serán aquellas “propiedades”, generalmente moléculas, que permiten al hongo causar daño o enfermedad en quien lo hospeda.

En la tabla 1 se muestra algunos factores de virulencia importantes que pueden ser encontrados en infecciones por levaduras.

| FACTOR | DESCRIPCIÓN |
|-------------------------|--|
| TERMO TOLERANCIA | La habilidad para sobrevivir y replicar a 37°C es una propiedad común de los hongos patógenos. La producción de proteínas resistentes al calor juega un papel muy importante en la supervivencia de la especie fúngica. |
| DIMORFISMO. | El dimorfismo es una característica de los hongos que depende del medio ambiente donde se encuentre, la transición de un hongo filamentosos a su forma de levadura es común y proporciona al hongo una forma de adaptación ante las agresiones del sistema inmunológico del huésped. |



| | |
|--|---|
| <p>COMPONENTES DE LA PARED CELULAR Y CAPSULA.</p> | <p>La pared celular es la principal defensa del hongo ante cualquier ambiente. La formación de una capsula de alfa – glucano “enmascara” los receptores de anticuerpos evitando la respuesta inmune y la activación de los macrófagos.</p> |
| <p>PRODUCCIÓN DE ENZIMAS.</p> | <p>Los hongos producen varias enzimas tales como proteinasas, lipasas y fosfolipasas. Estas enzimas juegan un papel vital en el metabolismo del hongo. En un paciente infectado, estas enzimas generan un daño a las células del huésped y proveen nutrientes al organismo patógeno en un ambiente restrictivo.</p> |

Tabla 1. Factores de virulencia en hongos.

10.3 CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA MICOSIS

La Organización mundial de la salud clasifica las micosis de la siguiente manera.

| Tipos | Enfermedad | Hongo (Género) |
|---|---|--|
| <p>Superficial: Capas externas de piel (epidermis), cabello, uñas, mucosas</p> | <p>Pitiriasis versicolor Tiña negra Dermatofitosis</p> | <p><i>Malassezia</i> <i>Hortaea</i> <i>Trichophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Epidermophyton</i></p> |
| <p>Subcutáneo: Dermis, tejido subcutáneo y músculo</p> | <p>Eumicetoma Esporotricosis Cromoblastomicosis</p> | <p><i>Madurella</i> <i>Sporothrix</i> <i>Fonsecaea</i></p> |
| <p>Sistémico o profundo: Uno o más órganos / tejidos profundos</p> | <p>Histoplasmosis Paracoccidioidomicosis Coccidioidomicosis</p> | <p><i>Histoplasma</i> <i>Paracoccidioides</i> <i>Coccidioides</i></p> |



| | | |
|--|--|--|
| Oportunista: Diversos órganos. Topográficamente pueden ser superficiales, subcutáneas o sistémicas, pero son causadas por hongos inocuos En un sujeto susceptible, <i>cualquier</i> hongo puede ser un oportunista | Candidosis Criptococosis Zigomicosis | <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Rhizopus</i> |
|--|--|--|

Tabla 2. Clasificación clínica de las micosis

10.3.1 Candidiasis o candidosis

10.3.1.1 Introducción

La candidosis o candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*. Cualquier tejido puede ser afectado por lo que se presentan diversos cuadros clínicos, cada uno de ellos asociado directamente al estado inmunológico del paciente. Las candidosis de mucosas y piel son las más frecuentes, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente severas.

10.3.1.2 Agentes etiológicos

Los agentes patógenos son levaduras del género *Candida* pertenecientes al Phylum Ascomycotina. Muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos. Este género incluye aproximadamente 150 especies identificadas.

| Especie | Frecuencia |
|------------------------|------------|
| <i>C. albicans</i> | 50% |
| <i>C. tropicalis</i> | 15-30% |
| <i>C. parapsilosis</i> | 15-30% |
| <i>C. glabrata</i> | 15-30% |

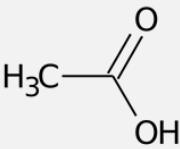
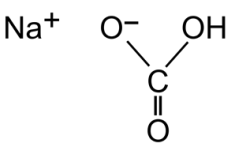
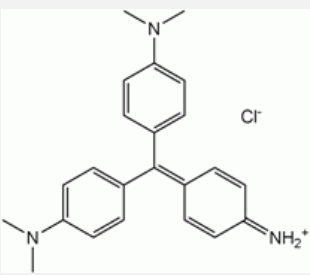


| | |
|---------------------------------|-----|
| <i>C. krusei</i> | ~1% |
| <i>C. guilliermondii</i> | ~1% |
| <i>C. lusitaniae</i> | ~1% |
| <i>C. dubliniensis</i> | ~1% |

Tabla 3. Especies de *Candidas* asociadas patógenas

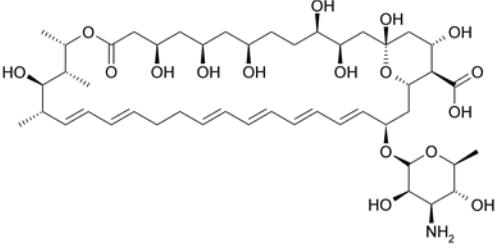
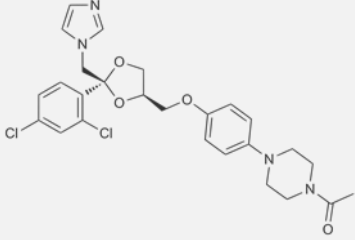
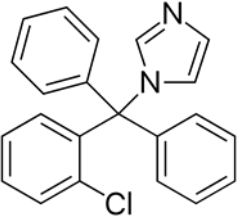
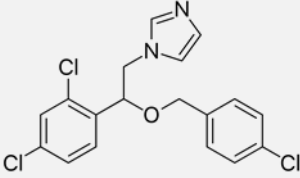
Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis*¹⁸.

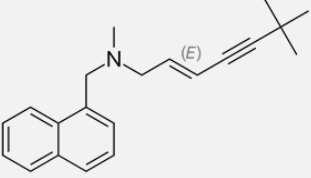
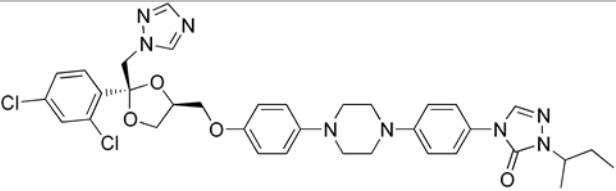
10.3.2 Tratamiento

| Infección tópica | |
|---|--|
| Vinagre Blanco (ácido acético) |  |
| Solución Saturada de bicarbonato de sodio |  |
| Violeta de genciana |  |
| Nistatina | |



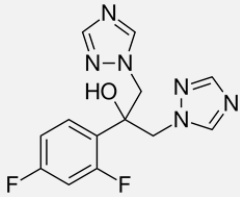
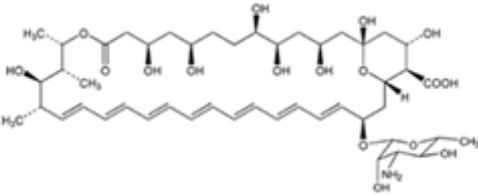
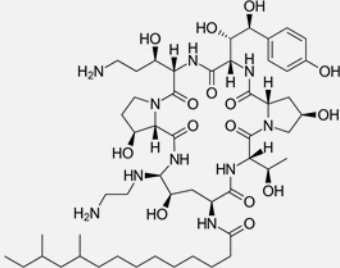
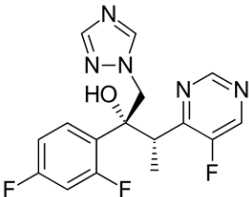
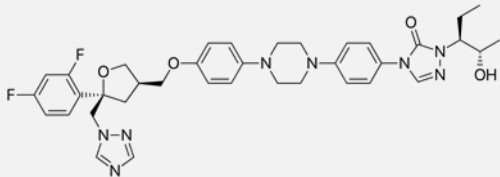
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

| | |
|--------------------|---|
| |  |
| Ketoconazol |  |
| Clotrimazol |  |
| Econazol |  |

| Infección sistémica | |
|----------------------------|--|
| Terbinafina |  |
| Itraconazol |  |



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

| | |
|-----------------------|--|
| Fluconazol |  |
| Anfotericina B |  |
| Caspofungina |  |
| Voriconazol |  |
| Posaconazol |  |

El empleo frecuente de compuestos azólicos ha dado origen a superinfecciones por especies resistentes como *C. krusei* y *C. glabrata*, así como cepas resistentes de otras especies de *Candida*, incluyendo *C. albicans*.



| | SOLUBILIDAD EN AGUA | ABSORCIÓN | VIDA MEDIA (H) | ELIMINACIÓN | FORMULACIÓN |
|--------------------|--------------------------------|------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| KETOCONAZOL | Baja | Variable | 7-10 | Hepático | Oral |
| ITRACONAZOL | Baja | Variable | 24-42 | Hepático | Oral, IV |
| FLUCONAZOL | Alta | Alta | 22-31 | Renal | Oral, IV |
| VORICONAZOL | Alta | Alta | 6 | Hepático | Oral, IV |
| POSACONAZOL | Baja | Alta | 25 | Hepático | Oral, IV |

Tabla 4. Propiedades farmacológicas de algunos azoles

10.3.2.1 Ketoconazol

Fue el primer azol oral introducido a la práctica clínica. Se distingue por inhibir enzimas de mamíferos y es menos selectivo para enzimas fúngicas en comparación con los azoles actuales. Como resultado el ketoconazol ha caído del uso clínico.

10.3.2.2 Itraconazol

Disponible en vía oral o intravenosa en dosis de 100-400 mg/d. La absorción por capsula se da por medio de alimentos o bajo pH estomacal, Como otros azoles liposolubles, puede interactuar con enzimas hepáticas, pero a un menor nivel que el ketoconazol. No interrumpe la síntesis de esteroides en mamífero. A su vez posee una potencia antifúngica muy significativa, su efectividad es limitada debido a su biodisponibilidad reducida.

10.3.2.3 Fluconazol

Fluconazol muestra gran solubilidad en agua mejorando la biodisponibilidad. Las interacciones con otras enzimas son mínimas, debido a estas condiciones el fluconazol tiene el índice de mayor amplitud en uso clínico permitiendo dosis más agresivas ante muchas infecciones fúngicas. Sin embargo, debido a estas dosis han surgido hongos resistentes a este fármaco, lo cual ha generado una preocupación.

10.3.2.4 Voriconazol

EL fármaco es bien absorbido de manera oral con una biodisponibilidad del 90% y exhibe una toxicidad al inhibir enzimas de mamíferos. El voriconazol es similar al itraconazol en el espectro de acción ante *Candidas* y hongos dimórficos. El voriconazol es el medicamento de elección ante hongos filamentosos al ser menos toxico que la anfotericina B.



10.3.2.5 *Posaconazol*

Destinado principalmente a pacientes con infecciones severas, es el azol con mayor espectro de acción ya que actúa tanto en *Candidas* como en hongos filamentosos. Su uso se da para terapias de salvamento de pacientes críticos, pacientes con quimioterapias o trasplantes.

Las guías actualizadas de la Infectious Diseases Society of America (IDSA) en el manejo de enfermedad severa recomiendan como tratamiento de primera línea para la candidemia una echinocandina, como la caspofungina, ya que estas destruyen, no inhiben a los patógenos. Desde luego, las variaciones entre individuos y el juicio del clínico determinan el tratamiento.²⁰

10.3.3 Mecanismo de acción de los azoles

Los azoles son compuestos sintéticos que pueden ser clasificados como: Imidazoles o triazoles de acuerdo con el número de átomos de nitrógeno que contenga el anillo de 5 miembros. La farmacología de cada azol es única y cuenta para algunas variaciones en el uso clínico.

La actividad antifúngica presentada por los azoles se debe por la reducción en la síntesis de ergosterol por la inhibición de citocromo P450. (Figura 8)

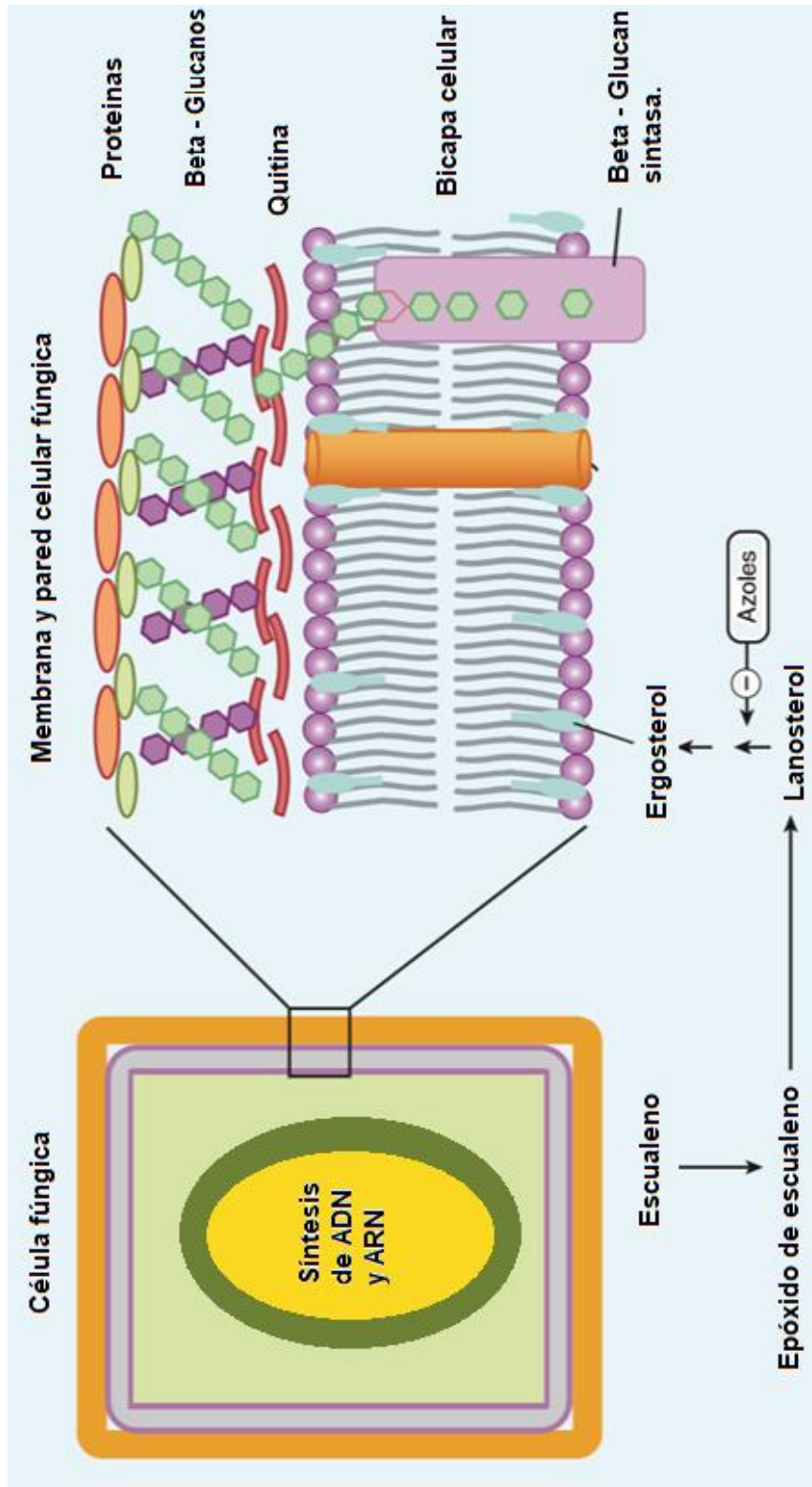


Figura 6. Lugar de interacción de los azoles como molécula antifúngica



El espectro de acción de los medicamentos azólicos es amplio, incluyendo muchas especies de *Candida* y en el caso de Itraconazol, posaconazol y voriconazol las enfermedades por Aspergilosis pueden ser tratadas al igual que especies resistentes a la anfotericina. Como grupo los azoles son relativamente no tóxicos. La mayor reacción adversa que presentan estos compuestos es irritación gastrointestinal menor.

10.3.4 Resistencia a los antifúngicos

Durante muchos años, la anfotericina B era el único antifúngico eficaz para uso sistémico. Su eficacia se ve contrastada por su toxicidad. En los últimos años la introducción de fármacos de tipo azólicos (administración oral y parenteral) y las equinocandinas (administración parenteral) ha generado cambios drásticos en el tratamiento de infecciones fúngicas. Estos nuevos agentes ofrecen mayor selectividad y menor toxicidad. Desafortunadamente, la aparición de organismos resistentes a estos nuevos fármacos y el incremento de los pacientes ha generado nuevos retos.

Se conocen cuatro mecanismos principales de resistencia a los azoles en especies de *Candida*. Más de un mecanismo puede existir en una cepa fúngica. (Figura 9)

1. Reducción de concentración del fármaco.

El desarrollo de bombas activas de expulsión resulta en un decaimiento en la concentración del fármaco en el sitio activo. Un incremento en los genes de transporte en las especies *Candida* demuestra una resistencia a los fármacos azólicos.

2. Alteración del sitio objetivo

Se ha demostrado que las mutaciones en el gen ERG11, el gen codificante para la enzima objetivo, lanosterol C14a-desmetilasa, evita la interacción del azol al sitio activo enzimático.

3. Aumento de la enzima objetivo

Algunas cepas que tienen resistencia a los azoles, contienen concentraciones mayores de ERG11 a comparación de las cepas susceptibles a los azoles. El agente antifúngico es entonces sobrepasado y las concentraciones clínicas ya no generan la inhibición de ergosterol. El incremento puede lograrse por medio de transcripción acelerada, amplificación de genes o decaimiento de la degradación del producto.

4. Desarrollo de caminos de síntesis alternativos.

La exposición a compuestos azólicos resulta en el agotamiento de ergosterol de la membrana celular y la acumulación del producto tóxico 14a-metil-3,6-diol, conduciendo a una inhibición de crecimiento. La mutación del gen ERG3 previene la formación de 14a-metil-



3,6-diol desde 14a-metilfecosterol. El reemplazo del ergosterol con el producto anterior lleva a membranas funcionales y niega la acción de los azoles al saltar el paso donde interactúan los fármacos.

5. Secuestro del fármaco en compartimientos celulares extra o intracelulares

Los hongos tienen la habilidad de secuestrar a los fármacos en biopelículas bajo condiciones de crecimiento específicos. Las biopelículas están elaboradas de polímeros generadas desde la pared celular de la célula.

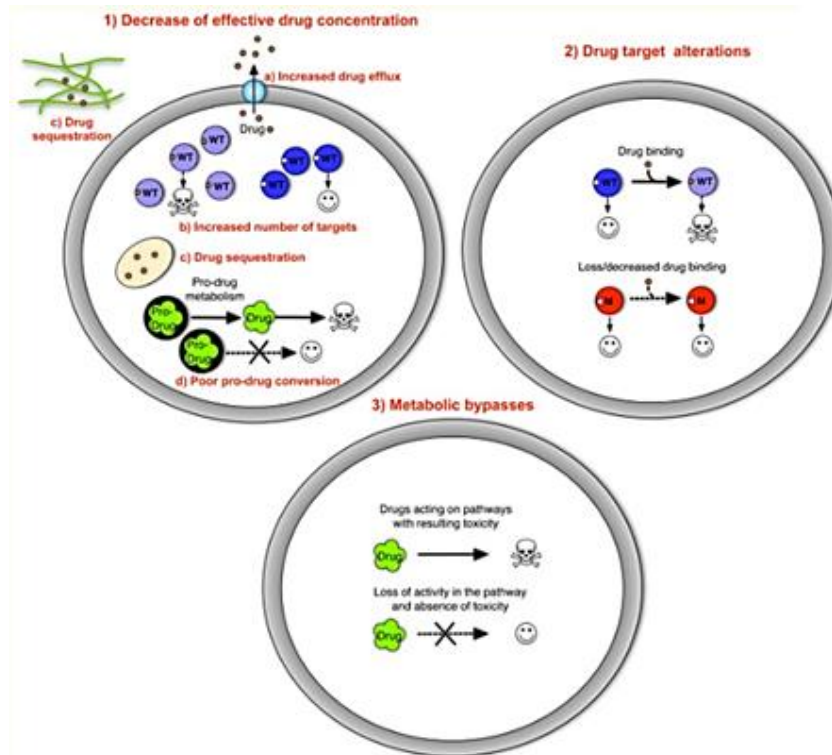


Figura 7. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos.

La extensión del problema es variable y depende del tipo de hongo y las ubicaciones geográficas de los hospitales. La resistencia multifármaco ha generado preocupaciones en el tratamiento de las infecciones fúngicas, resultando en infecciones con bajas posibilidades de recuperación y la expansión de la enfermedad misma.

10.3.5 Candidiasis en México

En México, Reyes y colaboradores²¹, han realizado una vigilancia de los casos reportados en México. Dividiendo los casos en micosis superficiales (tabla 6 y figura 10) y sistémicas (tabla 7 y figura 11).



| TIPO | NÚMERO DE PACIENTES CON <i>CANDIDA</i> Y CARACTERÍSTICAS |
|----------------------------|---|
| CANDIDIASIS ORAL | 72 Con VIH/SIDA 112 Sin SIDA 21 Niños mal cuidados 33 Sin síntomas de <i>candida</i> 21 Oncológicos 36 Niños con VIH/SIDA 26 Niños desnutridos 10 Tarahumaras 37 Diabéticos 34 Con diálisis y sin diabetes 56 Diabéticos (tipo 2) |
| CANDIDIASIS GENITAL | 986 Ginecológicos 20 Balanitis |
| ONICOMICOSIS | 305 Signos de onimcomicosis 1 Onicomicosis de mano |
| CANDIDIASIS CUTÁNEA | 27 Dermatitis por pañal |

Tabla 5. Número de pacientes con Candidiasis superficial en México en el periodo 2005-2015.

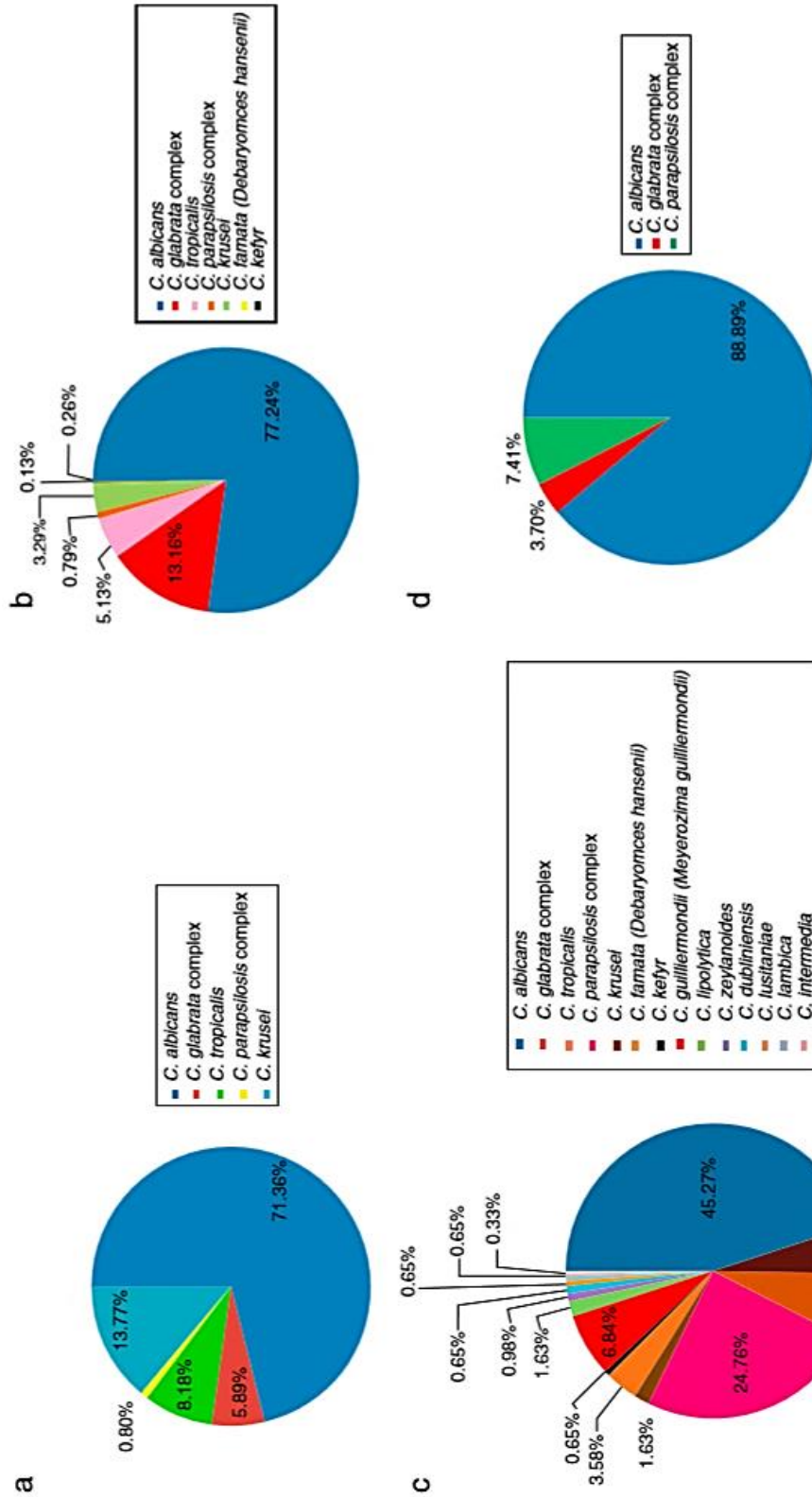


Figura 8. Distribución de especies de *Candida* en micosis superficiales en México. Periodo 2005-2015 a) Oral b) Genital c) Onychomycosis d) Cutanea.



| Número de pacientes estudiados y características | Número de pacientes con <i>Candida</i> |
|---|---|
| 1221 neonatos con candidiasis | 25 |
| 567 pacientes hospitalizados | 18 |
| 107 pacientes pediátricos con fiebre y neutropenia | 31 |
| 398 pacientes con infección nosocomial de sangre | 398 |
| 3 neonatos con candidiasis nosocomial | 3 |
| 104 pacientes con fiebre desconocida e inmunosupresión | 7 |
| 52 pacientes con trasplante de órgano | 52 |
| 1225 pacientes con candidiasis | 1171 |
| 24 pacientes con infección en la sangre | 24 |
| 1 paciente con neumonía | 1 |

Tabla 6. Pacientes con candidiasis sistémica en México en el periodo 2005-2015

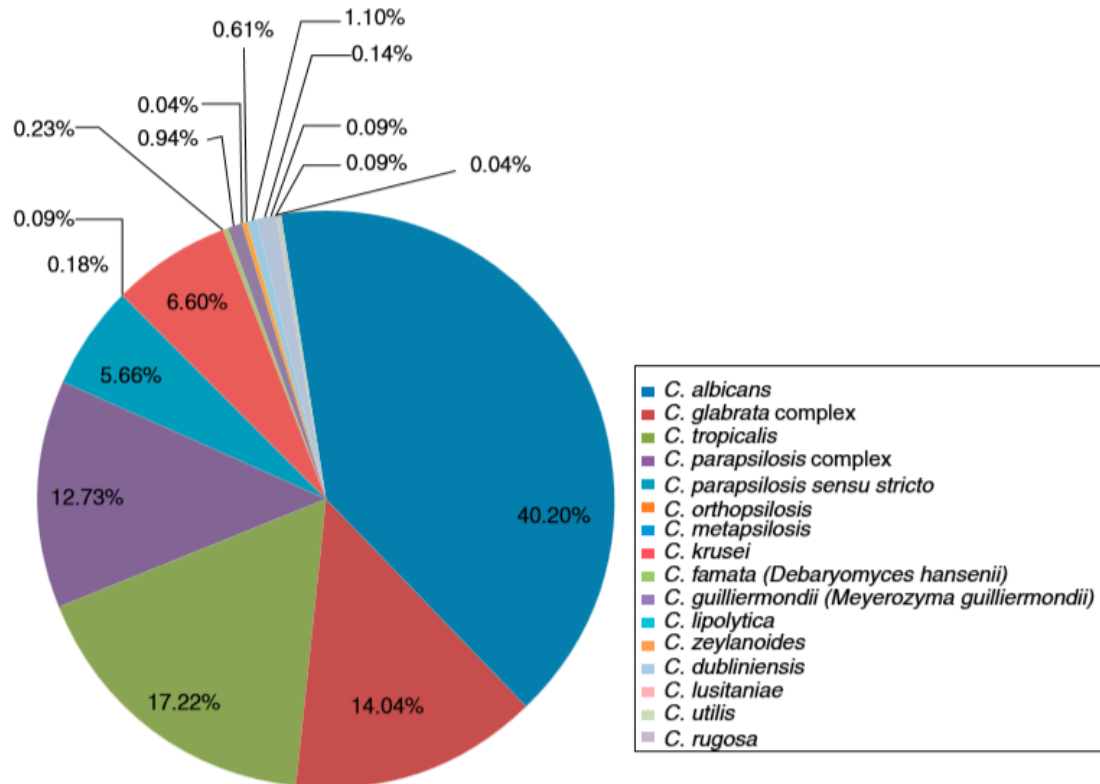


Figura 9. Distribución de especies de *Candida* en enfermedades sistémicas en México periodo 2005-2015

10.4 PRUEBAS ESTÁNDAR PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS.

10.4.1 Clinical Laboratory Standard Institute - CLSI

Cuando la anfotericina B y la 5-fluorocitosina eran las únicas opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones fúngicas profundas, la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica no estaba justificada. Cuando la industria farmacéutica fue produciendo nuevos y mejores antimicóticos, se encontraron con la necesidad de realizar pruebas de sensibilidad a los nuevos fármacos y detectar posibles resistencias dentro de las cepas micóticas.

Motivado por este cambio de eventos, el "Clinical Laboratory Standard Institute" (CLSI, antes NCCLS) realizó, en 1985, una encuesta en diferentes laboratorios para conocer qué pruebas de sensibilidad antifúngica realizaban habitualmente y cómo las realizaban. Además, se les solicitó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a una serie de cepas utilizando su propia metodología. Los resultados mostraron que pocos laboratorios realizaban pruebas de sensibilidad anti- fúngica y que la metodología empleada (medio de cultivo, inóculo, etc.) era muy variada.



Aun a pesar del reciente incremento de enfermedades relacionadas a un cepa micótica, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no se encuentran tan desarrolladas como las pruebas de resistencia de los antibióticos. Los puntos de corte y criterios de sensibilidad y resistencia sólo han sido determinados en pacientes con sida y candidemias. Por lo que se debe estar pendiente de las actualizaciones de los ensayos in vitro. Tanto de la dependencia europea (EUCAST) como la dependencia de los estados unidos (CLSI)²².

El medio de cultivo, pH, tampón, inóculo, tiempo y temperatura de incubación deben ajustarse estrictamente a lo recomendado en dichos documentos puesto que cualquier variación de estos parámetros puede afectar los resultados.²³

10.4.2 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST

El EUCAST es un organismo europeo, creado por la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID), cuya función primordial es el desarrollo de estándares para realizar pruebas de sensibilidad in vitro a los antimicrobianos. Este comité debe tomar en consideración las metodologías preexistentes en países europeos, lograr el mayor consenso posible entre expertos y las sociedades nacionales, así como intentar que los estándares sean compatibles con los procedimientos de organismos homólogos no europeos, como el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).

La finalidad de los estándares es establecer puntos de corte que permitan realizar estudios epidemiológicos, con el propósito de vigilar y controlar el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos.

Entre 1999 y 2002, el AFST-EUCAST realizó varios estudios experimentales para desarrollar un método de microdilución, que sirviera para determinar la sensibilidad a los antifúngicos de las levaduras fermentadoras de la glucosa. Este método se basa en la metodología recogida en el documento M27 del CLSI, pero incluyendo modificaciones con la intención de automatizar la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), al sustituir la lectura visual por la espectrofotométrica, y al reducir el tiempo necesario para la obtención de resultados de 48 a 24 h.

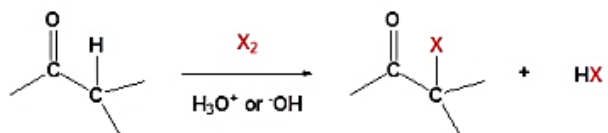
El estándar del EUCAST fue publicado en 2003²⁴, y ha mostrado una reproducibilidad elevada (>85%), tanto intra como interlaboratorio, así como una buena correlación con el procedimiento M27-A2 del CLSI.



10.5 SÍNTESIS Y PROPIEDADES.

10.5.1 Alfa-halogenaciones.

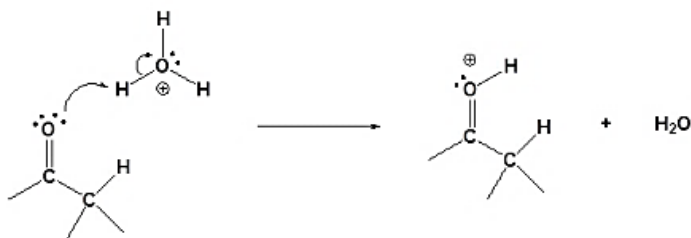
Un compuesto carbonílico que contenga hidrógenos en posición α puede llevar a cabo una reacción de sustitución con halógenos. Esta reacción es posible debido a la tendencia de los compuestos carbonílicos a formar enolatos en condiciones básicas y enoles en condiciones ácidas. En estos casos, incluso las bases débiles, tales como el anión hidroxilo, son suficientemente fuertes para causar una reacción debido a que no es necesaria una conversión total al enolato. Para estas reacciones Cl_2 , Br_2 , I_2 . Pueden ser utilizados como fuentes de halógeno. Sin embargo, estos no representan las únicas fuentes de halógenos posibles.



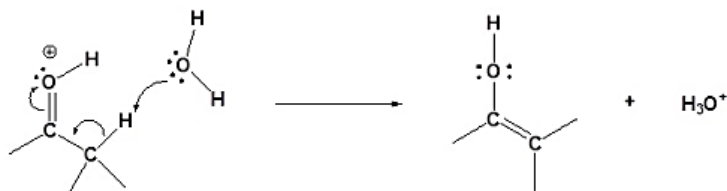
Esquema 2. Reacción general de alfa – halogenación.

Bajo condiciones ácidas la reacción ocurre a través de la formación de un enol el cual reacciona con el halógeno.

1. Protonación del carbonilo.



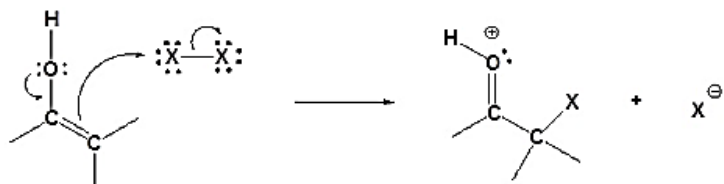
2. Formación del enol.



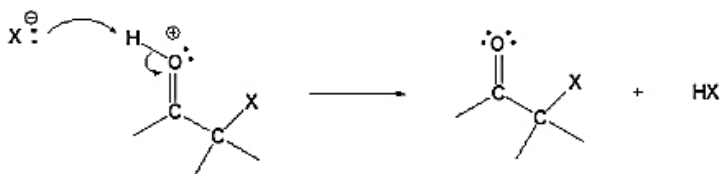
3. Ataque $\text{S}_{\text{N}}2$



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

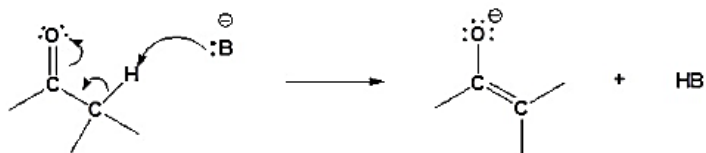


4. Deprotonación.

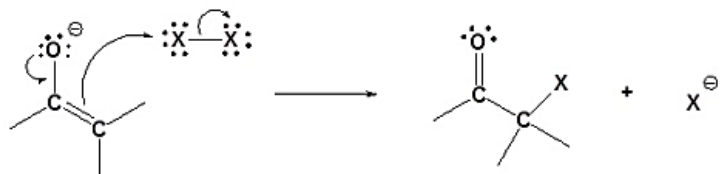


Bajo condiciones básicas se forma el enolato, el cual reacciona con el halógeno.

1. Formación del enolato.



2. Ataque S_N2



Es conocido que el uso de N-Bromosuccinimida como molécula proveedora de Bromo ha sido estudiada extensamente y genera alfa-bromaciones con rendimientos bastante aceptables (50-80%) en cadenas alquílicas, alicíclicas, arílicas y heterociclos que contienen hidrógenos ácidos en sus estructuras. Este procedimiento ha significado grandes ventajas, es mucho más rápido que cualquier otro método conocido y además se evita por completo el uso de bromo, una sustancia peligrosa de manejar, simplificando considerablemente el trabajo realizado en el laboratorio^{25,26}.

10.5.2 Azidas.

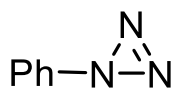
Desde la preparación de la primer azida orgánica por Peter Griess en 1864 estos compuestos versátiles y llenos de energía han disfrutado de considerable interés. En años más recientes, nuevas perspectivas han surgido, notablemente el uso de azidas orgánicas para la síntesis de péptidos, síntesis combinatoria, síntesis de heterociclos y la ligación o modificación de biopolímeros. Sin



embargo, el campo de aplicación predilecto hoy en día se trata de las cicloadiciones 1,3 dipolares de Huisgen y diferentes tipos de variantes de la ligación de Staudinger.

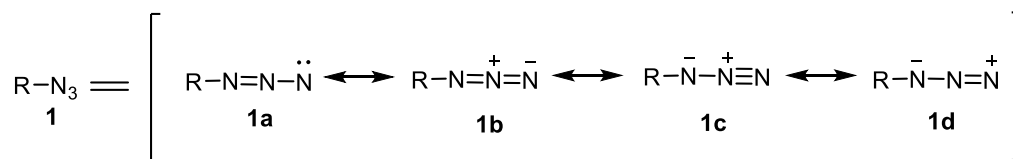
Como la azida de hidrógeno la mayoría de las azidas también son sustancias explosivas que se descomponen con la liberación de nitrógeno a la menor entrada de energía externa, por ejemplo por presión, impacto o calor. Sin embargo, a pesar de sus propiedades explosivas las azidas orgánicas son intermediarios valiosos en síntesis orgánica.^{27,28}

La determinación estructural de las azidas se origina de los postulados iniciales de Curtius y Hantzsch, quienes habían sugerido una estructura cíclica (esquema 3). Sin embargo, esto fue rápidamente rechazado en favor de una estructura lineal.



Esquema 3. Fenil-1H atrazina

La base para la diversidad química de las azidas proviene de las propiedades fisicoquímicas de las azidas. Algunas propiedades fisicoquímicas pueden ser explicadas por la presencia de estructuras resonantes. Las Azidas aromáticas son estabilizadas por conjugación con sistemas aromáticos. Las estructuras dipolares del tipo **1c, d** (Esquema 4) explican la facilidad de descomposición al correspondiente nitreno o nitrógeno así como la reactividad como 1,3-dipolar.



Esquema 4. Estructuras de resonancia del grupo azida.

En principio, las azidas orgánicas pueden ser preparadas por cinco métodos diferentes²⁹: a) Inserción del grupo N₃ (sustitución o adición), b) inserción de un grupo N₂ (dialo), c) inserción de un átomo de Nitrógeno (diazotización), d) ruptura de triazirinas y compuestos análogos. Y e) ordenamiento de azidas. Cómo las propiedades y la síntesis de los compuestos aromáticos y alifáticos varían considerablemente, para efectos de esta tesis se discutirá exclusivamente la formación de azidas alifáticas por sustitución nucleofílica.

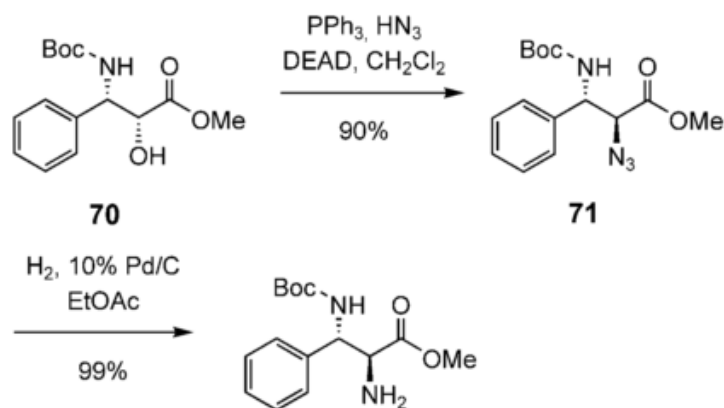


Las azidas de alquilo fueron descubiertas por primera vez por Curtius y, después de las azidas de arilo representan el segundo grupo más importante de los compuestos de azida. En la mayoría de los casos, la sustitución nucleofílica clásica es el método de elección.

10.5.2.1 Obtención de azidas

Las azidas alifáticas son compuestos fácilmente accesibles por sustitución nucleofílica (tipo S_N2) con el altamente nucleofílico ion azido. La azida de sodio es el agente más común como fuente de azida, sin embargo, otros agentes pueden ser utilizados tales como, azidas de tetraalquil amonio, azidas ligadas a un polímero o la altamente explosiva azida de plata. En la mayoría de los casos halógenos, carboxilatos, sulfonatos, mesilatos, nosilatos y triflatos son escogidos como grupos salientes.^{30,31}

Una reacción muy conocida para la obtención de azidas desde alcoholes primarios o secundarios es la reacción de Mitsunobo desarrollada en 1967³² (Esquema 5). Los alcoholes mencionados reaccionan con azida de hidrógeno, trifenilfosfina y dietil azodicarboxilato (DEAD). Los alcoholes secundarios son de especial interés pues reaccionan con inversión de la estereoquímica, esta reacción es el paso principal para la preparación de compuestos biológicamente activos tales como antibióticos.

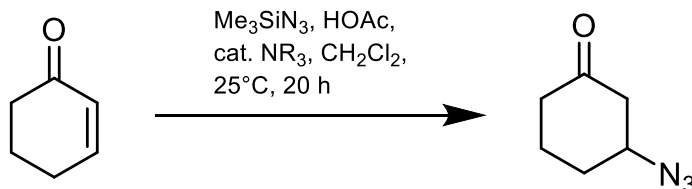


Esquema 5. Aplicación de la reacción de Mitsunobu para la síntesis asimétrica de derivados de 2,3-diamino-3-ácido fenilpropanoico.

Compuestos carbonílicos α - β insaturados pueden reaccionar con el ion azida en adiciones 1,4, a diferencia de las azidas orgánicas que conllevan la formación de un triazol. Un ejemplo de este método fue descrito por Miller y colaboradores en 1999 para la adición en 2-ciclohexenona. La



fuentes de azida en esta reacción es una mezcla equimolar de azida de trimetilsilano y ácido acético, mientras que una amina terciaria cataliza la reacción como base de Lewis. (Esquema 6)

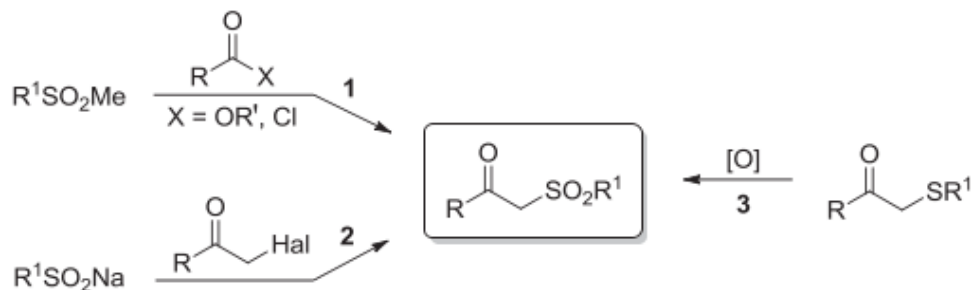


Esquema 6. Adición conjugada de iones azida a la ciclohexenona.

10.5.3 B-Cetosulfonas

Las sulfonas pertenecen a una clase conocida de compuestos organosulfurados, que tienen una gran cantidad de aplicaciones en la síntesis orgánica. Para los químicos orgánicos se encuentran entre los derivados de las sulfonas, aquellos grupos especiales que contienen un grupo funcional. En particular las 2-oxo-sulfonas (β -cetosulfonas) que contienen el grupo carbonilo en la posición β al grupo sulfonilo, estos grupos son muy versátiles como intermediarios en la preparación de diversos compuestos orgánicos. *Vía* intermediario y conversión del fragmento de β -cetosulfona, como una característica estructural de la molécula, la síntesis de productos naturales es común por este medio. En adición, ciertos derivados de β -cetosulfonas se sabe poseen ciertas actividades biológicas. Es por ello que la química de las β -cetosulfonas, ha alcanzado un gran interés significativo durante la última década y hoy en día constituye gran parte de la rama química organosulfurada.³³

La síntesis de las β -cetosulfonas puede ser llevada a cabo de muchas maneras. El método más ampliamente conocido y utilizado incluye la acilación de metil sulfonas^{34,35} (Método 1), alquilación de arenos metálicos sulfonados con α -haloacetos^{36,37} (Método 2), y la oxidación de β -cetosulfuros.³⁸ (método 3) (Esquema 7).



Esquema 7. Rutas generales de síntesis de Beta-cetosulfonas.

La acilación de metil sulfonas con cantidades en exceso de ésteres o cloruros de acilo con la presencia de una base como n-butilitio, LDA o Hidruro de sodio es el método más explorado y demandado para proveer de β -cetosulfonas hasta la fecha.

La utilidad sintética de las β -cetosulfonas es determinada por la presencia de dos centros reactivos, el grupo carbonilo y el grupo metileno presente. Con esta información presente, las β -cetosulfonas pueden ser consideradas como análogos de compuestos β -dicarbonílicos. Por otro lado, el grupo sulfonilo mejora sus propiedades de versatilidad sintética al implicar la posibilidad de su futura eliminación por cualquier medio de desulfonación.

Las β -cetosulfonas contienen un grupo metileno que está unido a dos grupos fuertemente electroattractores, los grupos carbonilo y sulfonilo. Debido a estos dos aceptores, podemos apreciar que la acidez de los hidrógenos de estos metilenos son levemente ácidos (tabla 8)³⁹, la acidez puede ser comparada con los β -cetoésteres. Como puede ser deducido de los valores de pK_a , el remplazar un grupo metilo con un grupo fenilo la acidez de las β -cetosulfonas se aumenta.

| B - Cetosulfona | pK_a |
|--|--------|
| PhCOCH ₂ SO ₂ Ph | 9.83 |
| MeCOCH ₂ SO ₂ Ph | 10.01 |
| PhCOCH ₂ SO ₂ Me | 10.09 |
| MeCOCH ₂ SO ₂ Me | 10.48 |

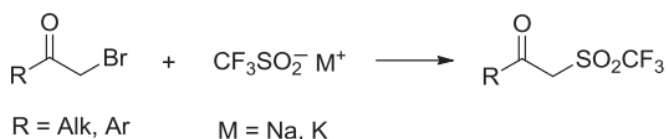
Tabla 7. Acidez de algunas Beta-cetosulfonas en etanol agua (1:1).



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

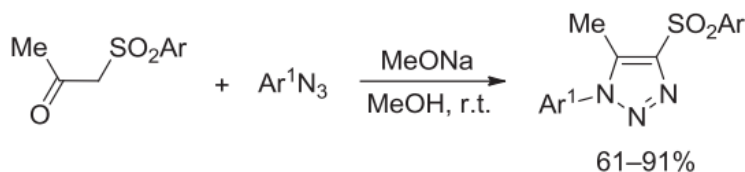
Suferencias sintéticas para la obtención de β -cetosulfonas basadas en la alquilación de arenos sulfinitos metálicos con α -halocetonas (Método 2) (Esquema 7) son constantemente actualizados para mejorar la efectividad y numerosas modificaciones de este método se encuentran actualmente en la literatura. Fue reportado que reacciones de este tipo fueron promovidas con PEG-400 y líquidos iónicos como medio de reacción.

La alquilación de trifluorometilsulfonatos con α -bromo metil cetonas fue utilizado como un método de preparación de β -ceto trifluorometil sulfonas. (Esquema 8)



Esquema 8. Síntesis de β -ceto trifluorometil sulfonas por alquilación de trifluorometil sulfinitos con α -bromometil cetona.

Un lugar mayoritario en la química de las β -cetosulfonas está ocupado por reacciones de ciclación. Al incorporar dos grupos funcionales, las β -cetosulfonas son consideradas nucleófilos que son capaces de reaccionar con muchos reactivos multifuncionales, formando productos cíclicos. La reacción de Dimroth⁴⁰ catalizada por base de β -cetosulfonas con aril azidas produjo un 1,2,3-triazol *N*-sustituido en rendimientos de moderados a excelentes. (Esquema 9)



Esquema 9. Síntesis de triazoles, Reacción de Dimroth.

10.5.4 Cicloadiciones

Las reacciones de cicloadición son hoy en día una poderosa herramienta en la química orgánica para poder generar moléculas cíclicas con gran cantidad de aplicaciones. Entre la clasificación que encontramos de las reacciones pericíclicas encontramos las siguientes (Figura 12).

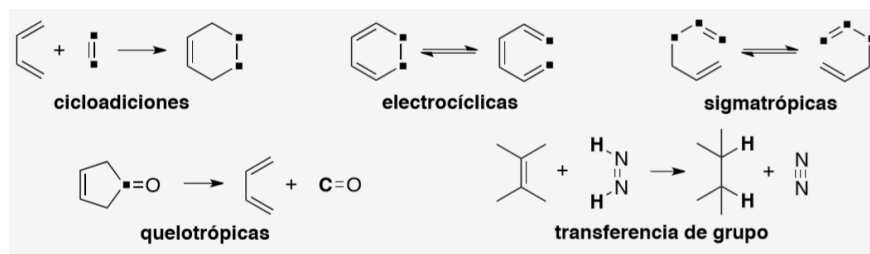


Figura 10. Clasificación de reacciones sigmatrópicas.

- I. Cicloadiciones: dos o más moléculas se unen para formar un ciclo
- II. Electrocíclica: ocurre un cierre o apertura de anillo de modo que los electrones π se convierten en σ y viceversa
- III. Transposición sigmatrópica: un grupo con su enlace sigma, migra a otra posición a través de un sistema conjugado.
- IV. Transposición quelotrópica: todo un grupo participa como si fuera un único átomo para abrir o cerrar un ciclo.
- V. Transferencia de grupo: un átomo o grupo de átomos se transfiere de una molécula a otra.

En los años iniciales de estas reacciones no se conocía con precisión como es que estas reacciones se llevaban a cabo, pues no se conseguía aislar ningún intermediario y no mostraban gran influencia por el disolvente o el pH de la reacción.

Las reacciones pericíclicas pueden ser tratadas de un modo cuantitativo desde tres puntos de vista:

- I. Conservación de la simetría orbital (Diagramas de correlación de Woodward y Hoffmann⁴¹)
- II. Método de orbitales frontera (teoría de perturbación de orbitales moleculares de Fukui⁴²)
- III. Método de la aromaticidad de los estados de transición (Evans, Deward, Zimmermann)

Según las reglas de Woodward y Hoffmann, una reacción pericíclica sólo será posible si la simetría de todos los orbitales moleculares que reaccionan es la misma que la simetría de los orbitales moleculares del producto. Fukui simplifica este método y lo aplica a los orbitales frontera (Figura 13).

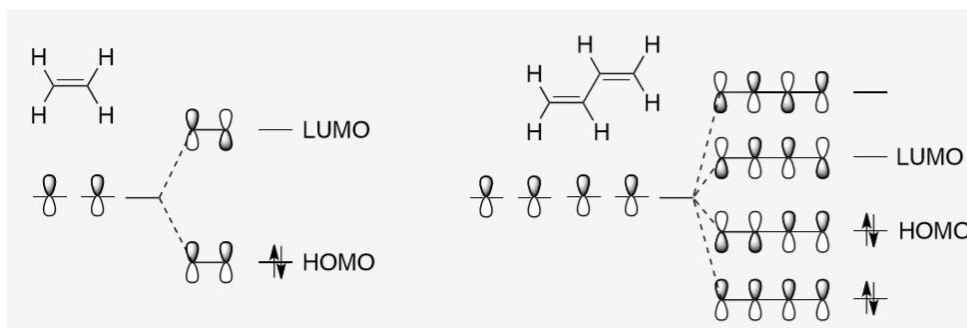


Figura 11. Orbitales frontera de eteno y 1,3-butadieno.

La reacción de cicloadición de eteno y butadieno [4+2] se conoce como reacción de Diels-Alder (figura 14). Se debe considerar que el dieno actúa con su HOMO y el dienófilo a través de su LUMO. De ese modo, ambos orbitales se aproximan en energía. Al hacerlo podemos observar que los lóbulos orbitales tienen igual simetría. En estas condiciones la reacción se lleva a cabo. El estado de transición se conforma con 6 electrones π , es decir es un sistema aromático ($4n+2$) según Huckel.

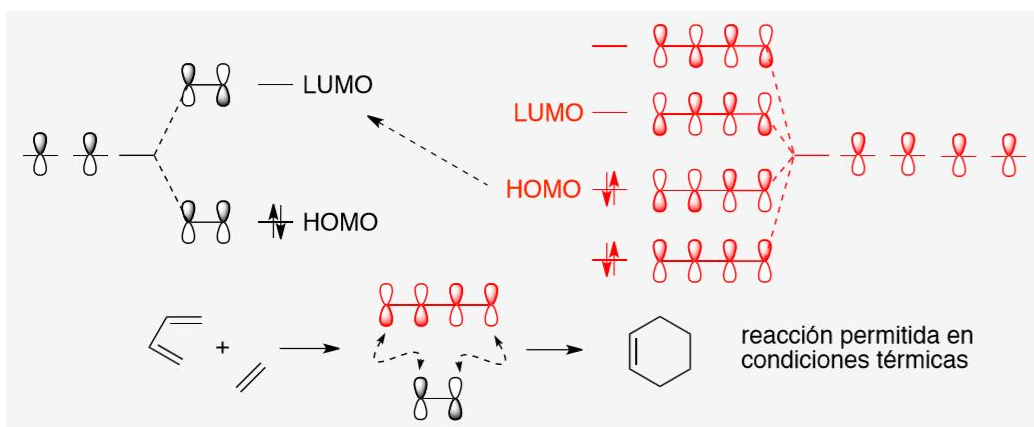
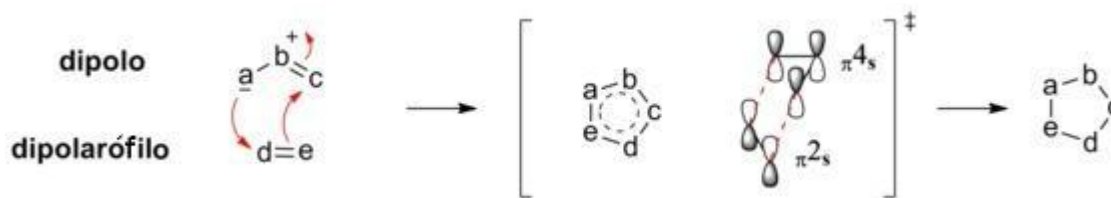


Figura 12. Reacción de Diels-Alder.

Woodward y Hoffmann clasificaron a las adiciones 1,3-dipolares como un ejemplo de reacción pericíclica aplicando los mismos principios de que en las reacciones elementales de Diels – Alder, el cual es utilizado en muchos libros. Es importante mencionar que el modelo es muy simplificado y sirve para explicar la formación del anillo para cursos introductorios a los triazoles. Las interacciones actuales requieren complejos cálculos computacionales que para efectos de esta tesis no serán abordados y se apegará al modelo simplificado. (esquema



Esquema 10. Esquema general de las adiciones 1,3 – Dipolares.

10.6 TRIAZOLES. MÁS ALLÁ DE LA QUÍMICA “CLICK”

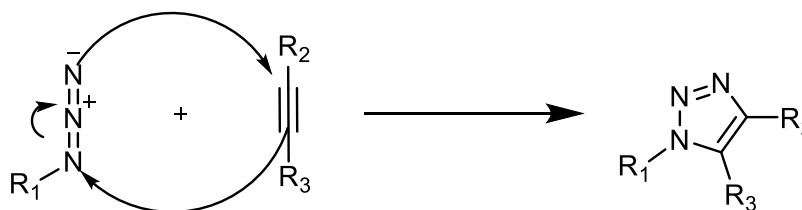
10.6.1 Introducción

Sharpless³ introdujo el concepto de química Click, la cual genera reacciones que son estereoespecíficas y quimioselectivas, ofreciendo métodos de purificación simple y condiciones de reacciones accesibles, por lo cual es particularmente útil para elaborar bloques de trabajo como su nombre lo indica. Mientras este concepto es de interés general para un químico, uno puede notar fácilmente que la cicloadición azida-alquino catalizada por Cu(I) (CuAAC)^{43,44} se ha convertido en el ejemplo primario de reacciones click. Con un alcance muy vasto, este tipo de química no sólo se dedica a unir dos moléculas si no a sintetizar la molécula entera de triazol. De hecho, los 1,2,3-triazoles son moléculas intrigantes que ofrecen propiedades muy interesantes

10.6.2 Adiciones 1,3-Dipolar.

EN 1893, Michael descubrió una síntesis para los 1,2,3-triazoles al reaccionar fenil azida con dimetil acetiléndicarboxilato. Este tipo de reacción fue luego clasificado como una adición (3+2) cicloadición 1,3-Dipolar^{28,29,45-49}. El 1,3-dipolo se caracteriza por la presencia de un átomo electrofílico, teniendo un sexteto de electrones y una carga positiva, así como también de un átomo nucleofílico, teniendo un octeto de electrones y una carga negativa, los cuales se encuentran en la posición 1 y 3. La azida es el ejemplo más común de este tipo de 1,3-dipolos siendo este casi lineal.

La ruta predominante para preparar 1,2,3-Triazoles es la cicloadición 1,3-Dipolar de una azida a un alquino. (Esquema 10).

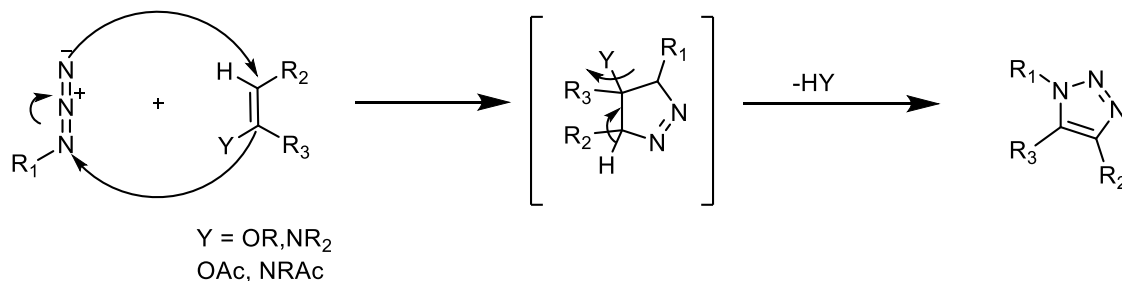


Esquema 11. Cicloadición 1,3-dipolar de una azida a un alquino



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

Esta ruta bien explorada recibe interés continuo debido a su facilidad y altos rendimientos. Una ruta de síntesis menos explorada es la cicloadición de azidas a alquenos que porten un grupo saliente. (Esquema 11).

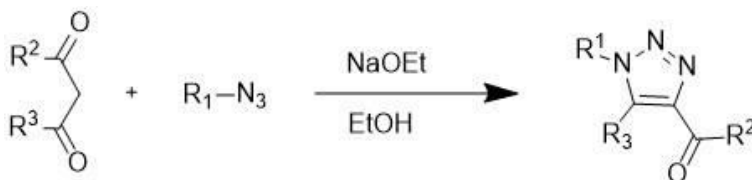


Esquema 12. Adición de una azida a un alqueno.

Este tipo de reacciones sirven como sintones de alquinos⁵⁰. Mientras que las reacciones de cicloadición en alquenos típicamente requieren más temperatura que en los alquinos, sin embargo, estos también poseen ventajas. Primero, los alquenos son generalmente obtenidos a partir de compuestos carbonílicos y pueden ser preparados de una extensa variedad de compuestos a diferencia de los alquinos que requieren moléculas más específicas para su obtención. Segundo, la electronegatividad del grupo saliente en la reacción puede ser utilizado como un controlador para la regioselectividad de la reacción de cicloadición.

10.6.3 Adición [3+2] azida-enolato

En el año 1902 Dimroth⁴⁰ sintetizó por primera vez un grupo 1,2,3 triazólico con la formación de un enolato y la posterior cicloadición del grupo azida orgánica presente en una cadena alifática. (Esquema 12)

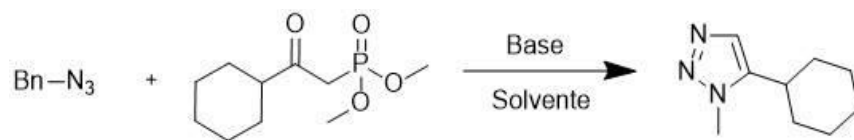


Esquema 13. Formación de 1,2,3-triazol según Dimroth.

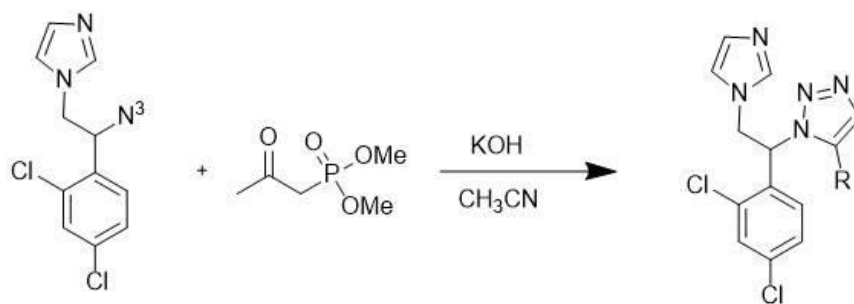
Esta adición/condensación ocurre con completa regioselectividad y es fácilmente alcanzada al utilizar alcóxidos como bases y alcoholes como disolventes. En años recientes se han propuesto diferentes variaciones que demuestran la efectividad de este tipo de síntesis.^{40,50-55} Pudiendo proponer moléculas con actividades biológicas como se muestra en los Esquemas 13 y 14.



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.



Esquema 14. Síntesis de 1,2,3 triazoles 1,5-sustituidos por medio de cicloadición [3+2] azida-enolato.



Esquema 15. Síntesis de análogos de miconazol por cicloadición [3+2] azida-enolato.



11 HIPÓTESIS

Mediante la reacción de cicloadición [3+2] azida-enolato, entre una azida orgánica y una β -cetosulfona, se generarán de forma eficiente derivados de 1,2,3-triazólicos de tienopiridinas que pueden ser utilizados como agentes antifúngicos.



12 OBJETIVO (S)

12.1 GENERALES

Sintetizar dos nuevos derivados triazólicos de tienopiridinas a través de una reacción de cicloadición (3+2) y determinar su concentración mínima inhibitoria (CMI) en levaduras del género *Candida* mediante el método M27-A3 (estandarizado por el CLSI).

12.2 ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones de reacción como temperatura, tiempo, disolvente, etc., para cada metodología de reacción.
- Caracterizar los productos sintetizados por medio de RMN (^1H y ^{13}C)
- Determinar la CMI por el método de microdilución en caldo M27-A3 en *C. albicans* ATCC 10321, *C. krusei* ATCC-14243, *C. utilis* ATCC-9226, *C. tropicalis* ATCC-13803, *C. parapsilopsis* ATCC-22019, *C. glabrata* ATCC-34138.
- Obtener el título de Químico



13 JUSTIFICACIÓN.

En el presente trabajo se busca establecer las bases para un futuro desarrollo de moléculas orgánicas con actividad antifúngica de una manera sencilla y fácilmente aplicable en cualquier laboratorio de investigación en química orgánica o de bioquímica. Significando un avance en la búsqueda y síntesis de nuevos compuestos triazólicos con actividades antifúngicas, y la posibilidad de desarrollo de nuevos fármacos contra las enfermedades resistentes que se encuentran actualmente, por el uso incorrecto de medicamentos o la evolución natural de las especies. Así mismo, el trabajo presentado representa investigación básica dentro de la universidad y el desarrollo científico dentro de la sociedad mexicana.

Es importante mencionar que las moléculas sintetizadas no se encuentran en bases de datos, por lo que su síntesis es novedosa.



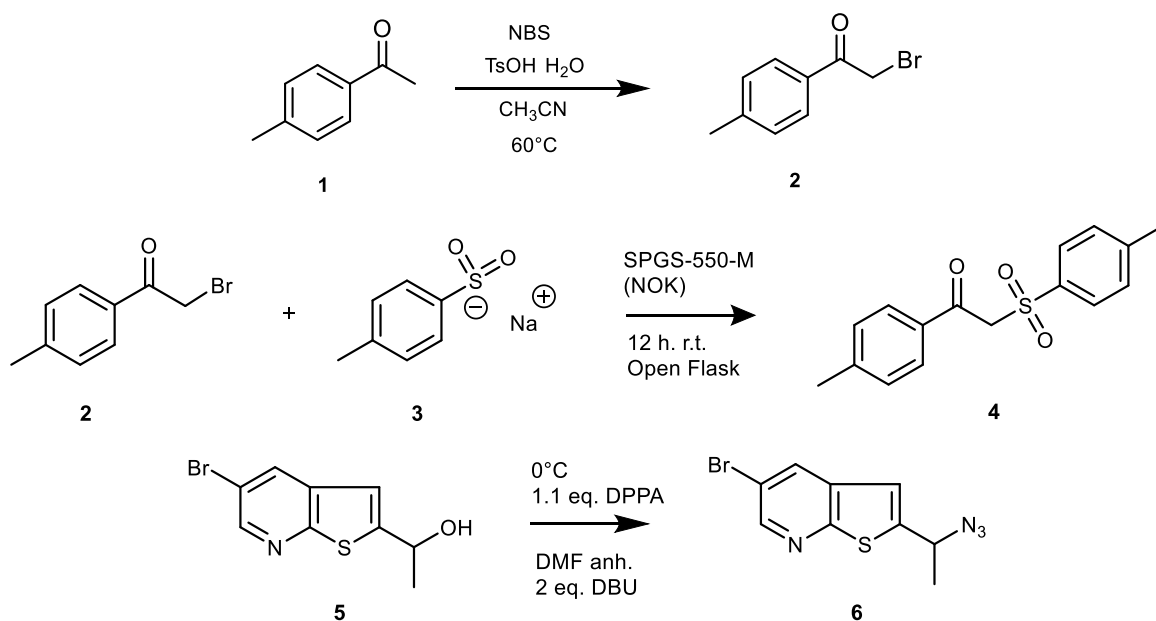
14 CAPITULO 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

14.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo se dividió en dos partes:

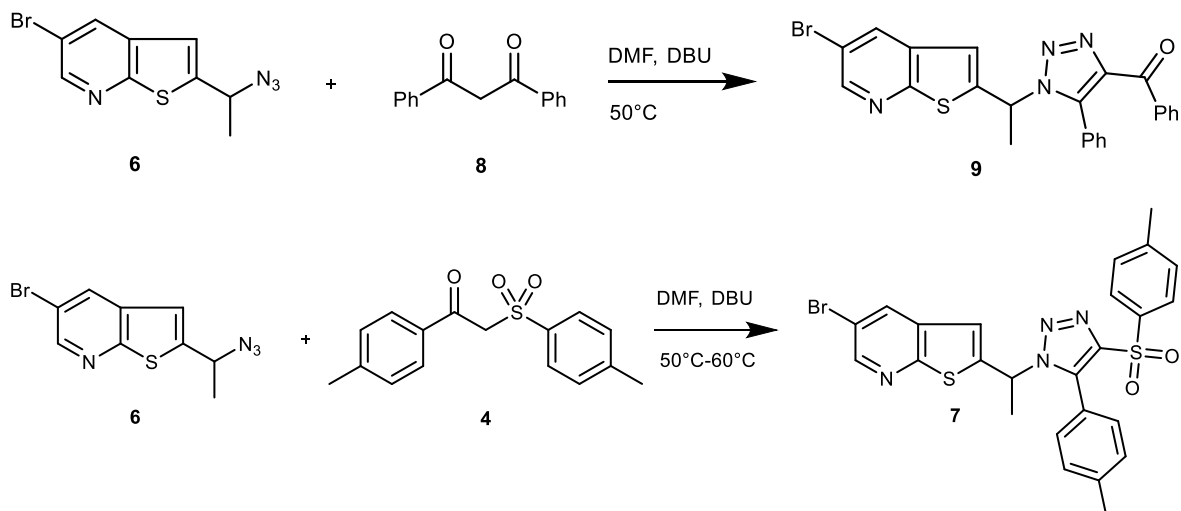
A) Estrategia Sintética:

Con base en los antecedentes mencionados y empleando la metodología desarrollada por el grupo de investigación de González-Romero y Fuentes-Benítez⁵⁵, se llevó a cabo la síntesis (Esquema 15) y el ensayo de actividad biológica de los triazoles basados en el anillo de tienopiridina. Para lo cual se sintetizó el 2-bromo-1-(4-metilfenil)-etanon (2), haciendo reaccionar la 4-metilfenil etanon (1) con NBS en presencia de un ácido sulfónico en condiciones catalíticas.





SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.



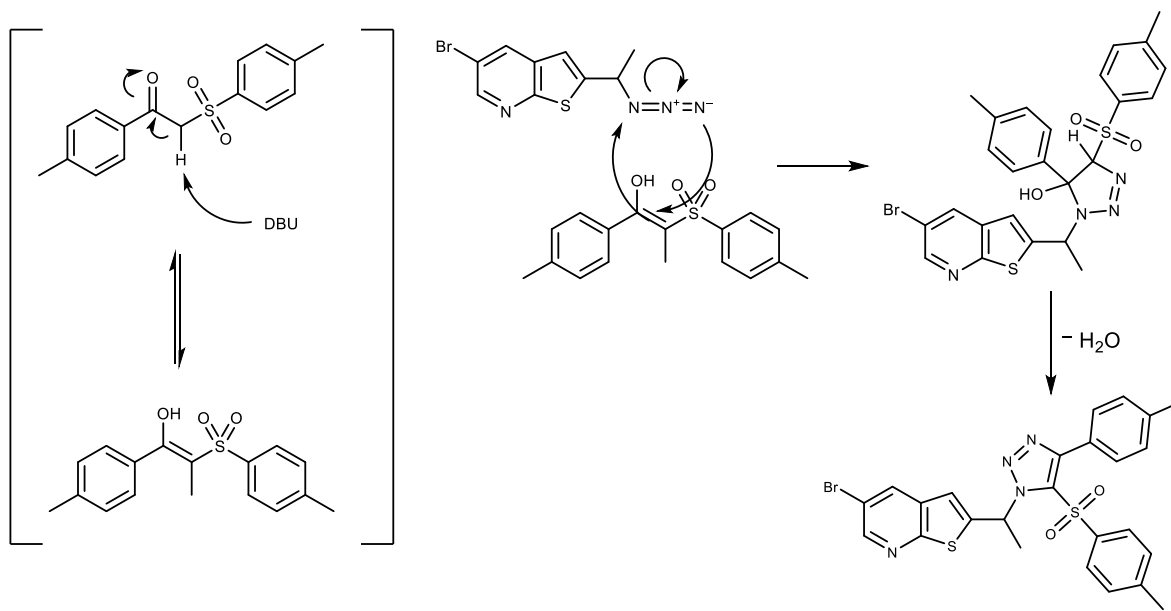
Esquema 15. Estrategia sintética.

La reacción de condensación entre el compuesto bromado **2** y el compuesto sulfonado **3** se lleva a cabo por medio de una reacción S_N2 utilizando como nucleófilo la carga negativa que se encuentra en el p-toluensulfinito de sodio, el cual al momento de la reacción desplaza al átomo de bromo, permitiendo un rendimiento bastante alto y sin la necesidad de utilizar condiciones de reacción drásticas.

Durante la reacción de cicloadición entre el compuesto tienopiridinico **6** y el compuesto 1,3 dicarbonílico **8** se considera se forma el enolato debido al uso de la base DBU, el cual actúa como dipolarófilo ante la presencia de la azida, que actúa como dipolo. Un intermediario propuesto para esta reacción es la formación del anillo de cinco miembros que aún no es aromático, y al sufrir la aromatización pierde una molécula de agua para alcanzar su estructura final. (esquema)



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.



Esquema 16. Mecanismo propuesto de cicloadición

La regioselectividad de la reacción se debe a la presencia de un grupo (de los dos originales) electro atractor, por lo que al formarse el enolato, aún queda un grupo electro atractor que produce una carga parcial positiva en el metileno, el cual por cuestiones electrostáticas reacciona con la azida y su carga negativa. También considerando que el impedimento estérico juega un papel muy importante en la posición de los sustituyentes, ya que al contar con dos grupos voluminosos (tienopiridina y sulfona) la repulsión entre estos evita la formación del anillo sulfonado en la posición 5. Al finalizar la reacción, el grupo electroatractor queda en la posición más alejada del nitrógeno sustituido dentro del anillo. Por lo que esto aplica exactamente a ambos productos,

De acuerdo con los espectros de RMN ^1H (**Anexo 1**), el compuesto bromado **2** muestra una señal desplazada a 2.4 ppm que integra para 3 hidrógenos el cual representa al metilo unido al fenilo, la sustitución del anillo bencénico se observa en los dobletes de 7.88 y 7.28 ppm que integran para 4 hidrógenos (dos por doblete), representando una sustitución simétrica, el pico restante corresponde a 4.4 ppm que integra para dos hidrógenos correspondiente al metileno bromado α al carbonilo.

De acuerdo con los espectros de ^{13}C (**Anexo 2**), se muestra una señal en 190.9 ppm que nos indica la presencia del carbonilo en forma de cetona, la señal mostrada en 30.9 ppm representa al carbono sustituido por el Br, la señal de 21.7 ppm representa el metilo unido al anillo aromático, las señales restantes cerca de 130 ppm representan los carbonos del sistema aromático del benceno.



Una vez obtenido el compuesto bromado, se procedió a sintetizar la sulfona **4** que después sería acoplada al anillo triazólico en la parte final de la síntesis. En esta ocasión se hizo reaccionar la molécula bromada **2** con p-toluensulfonato de sodio **3** generando la especie sulfonada **4**, esta reacción ocurre por una reacción S_N2 .

De acuerdo con los espectros de RMN^1H (**Anexo 3**) es posible observar varios multipletes en 7.88-7.80, 7.80-7.72, 7.36-7.29, 7.29-7.23 ppm que corresponden a los hidrógenos de los sistemas aromáticos. Se observa el aumento de hidrógenos aromáticos, entre 7.88 – 7.23 ppm, los cuales integran para 8 hidrógenos en tanto, el metileno se ve desplazado a campos bajos debido a la interacción del efecto electroatractor de la sulfona.

Al observar los espectros de ^{13}C (**Anexo 4**) observamos un pico en 187.64 ppm que corresponde al sistema carbonílico, las señales que corresponden a 145.56, 145.29, 135.81 y 133.39 ppm indican la presencia de los carbonos cuaternarios de las moléculas aromáticas. La señal en 63.61 ppm indica la presencia del metileno que une la cetona y la sulfona y que se ve desplazado a campos más bajos debido a que ahora interacciona entre dos grupos electroattractores confirmando la condensación de las moléculas.

Finalizada esta síntesis se realizó la formación de la azida que generaría la reacción de cicloadición, La formación del compuesto **6** se llevó a cabo por medio de una sustitución nucleofílica en el lugar del alcohol.

En el espectro de RMN^1H (**Anexo 5**) podemos observar las señales más representativas, el metilo, al no recibir interacción por parte del alcohol aparece en campos altos con un desplazamiento entre 1.68 - 1.70 ppm que integra para 3 hidrógenos, correspondientes al metilo de la molécula. La señal de 4.87 - 4.91 ppm corresponde al hidrógeno del metino desplazado a campos altos, el cual se encuentra unido al grupo azida. El resto de las señales corresponde al anillo aromático. Estas señales corresponden a la región de 7.1 – 8.58 ppm.

En los espectros de $RMN^{13}C$ (**Anexo 6**) se encuentran las señales importantes como la del carbono terciario en 57.30 ppm que corresponde al carbono unido a la azida, esta señal se vería desplazada a campos bajos por la presencia del alcohol, el cual no se ve reflejado en el espectro obtenido.

La obtención del triazol **7** se llevó a cabo al hacer reaccionar los sustratos **6** y **4** por medio de una reacción de cicloadición. El espectro de RMN^1H muestra la aparición de 3 grupos metilos en un rango de 2.64 – 2.93 ppm lo que indica la presencia de los metilos presentes en las moléculas



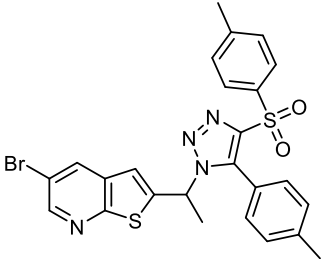
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

individuales antes de la cicloadición, una señal en 4.74 ppm que indica la presencia del hidrógeno del carbono vecino al anillo triazólico. El resto de señales que se encuentra entre 7 – 9 ppm corresponde a los hidrógenos de los anillos aromáticos de tienopiridinas y fenilos. La presencia de los metilos y el carbono alifático unido al triazol se puede confirmar nuevamente en el espectro de ^{13}C (**Anexo 8**) y a su vez la aparición de carbonos aromáticos entre 75 – 80 ppm que corresponde al anillo recién formado del triazol.

Finalmente, el último triazol sintetizado corresponde a aquel que reaccionó con los compuesto **6** y **8** generando el correspondiente triazol **9**. El espectro de RMN ^1H muestra el metilo de la molécula y el hidrógeno de la cadena alifática unida entre el anillo triazólico y la tienopiridina. Las señales observadas entre 7 – 9 corresponden a los hidrógenos de los anillos aromáticos presentes (**Anexo 9**). En el espectro de ^{13}C (**Anexo 10**) encontramos la formación del anillo triazólico en la región de 76 ppm, a su vez observamos los carbonos alifáticos en 21 y 63 ppm. La molécula contiene un grupo carbonilo que puede ser observado claramente con un desplazamiento químico de 191 ppm. Las señales que corresponden a 110 – 150 ppm nos indican la presencia de los anillos aromáticos, tanto de la tienopiridina como de los fenilos unidos al anillo triazólico.

B) Pruebas antifúngicas

Una vez obtenidos los compuestos 1,2,3-triazólicos derivados de tienopiridinas, en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química de la UAEMéx, se llevaron a cabo pruebas de sensibilidad antifúngica para determinar la CMI. Como antimicótico de referencia se empleó al itraconazol, debido a que los compuestos sintetizados fueron solubles en DMSO. Se utilizaron 5 cepas de levaduras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Para la determinación de la CMI de levaduras se utilizó el método M-27-A3 del CLSI. La actividad antifúngica se resume en la tabla 9, mostrando los valores en $\mu\text{g/mL}$.

| Compuesto | <i>C. alb</i> | <i>C. uti</i> | <i>C. kru</i> | <i>C. gla</i> | <i>C. par</i> |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 7  | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

| | | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|------|
| 9 | 16 | 16 | 16 | 0.12 | 8 |
| | | | | | |
| Itraconazol | 0.03 | 0.25 | 0.25 | 1 | 0.06 |

Tabla 8. Actividades antifúngicas de los compuestos sintetizados (CMI, mg/mL. Abreviaturas *C. alb*; *Candida albicans* *C. uti.*, *Candida utilis*; *C. kru.*, *Candida krusei*; *C. gla.*, *Candida glabrata*, *C. par.*, *Candida parapsilosis*.

Estos resultados indican que el compuesto **9** muestra una actividad importante en *C. glabrata*, resultando en una CMI menor que el itraconazol (0.12 µg/mL y 1 µg/mL respectivamente), es decir, tienen una mayor inhibición de crecimiento de las cepas evaluadas. De acuerdo con los puntos de corte establecidos por el CLSI (intervalos de las CMI: sensible, intermedio, resistente y una nueva categoría aplicable a los azoles: sensible dependiendo de la dosis), la CMI del compuesto **9** corresponde a un intervalo "SENSIBLE", mientras que el Itraconazol tiene un intervalo "RESISTENTE" (ver tabla 10). Estos valores nos indican que el compuesto **9** puede ser una buena alternativa para el tratamiento de la candidiasis causada por *C. glabrata*, que además es la cepa más agresiva.

| Compuesto | <i>C. alb</i> | <i>C. uti</i> | <i>C. kru</i> | <i>C. gla</i> | <i>C. par</i> |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 7 | R | R | R | R | R |
| 9 | R | R | R | S | R |
| <i>Itraconazol</i> | S | SDD | SDD | R | S |

Tabla 9. Determinación de la sensibilidad de la levadura (de acuerdo al documento M27-A3); R; Resistente, SDD; Sensible dependiente de la dosis, S; Sensible. Abreviaturas *C. alb*; *Candida albicans* *C. uti.*, *Candida utilis*; *C. kru.*, *Candida krusei*; *C. gla.*, *Candida glabrata*, *C. par.*, *Candida parapsilosis*.

En la figura 12 se pueden observar los diferentes valores de CMI obtenidos para cada cepa, resaltando la importancia del compuesto **9**. Es claro que la actividad antifúngica en el resto de las cepas y del compuesto **7** muestra intervalos de "RESISTENTE", por lo cual no es conveniente considerar el compuesto **7** como posible tratamiento antifúngico debido a la baja sensibilidad de las cepas a los compuestos evaluados..

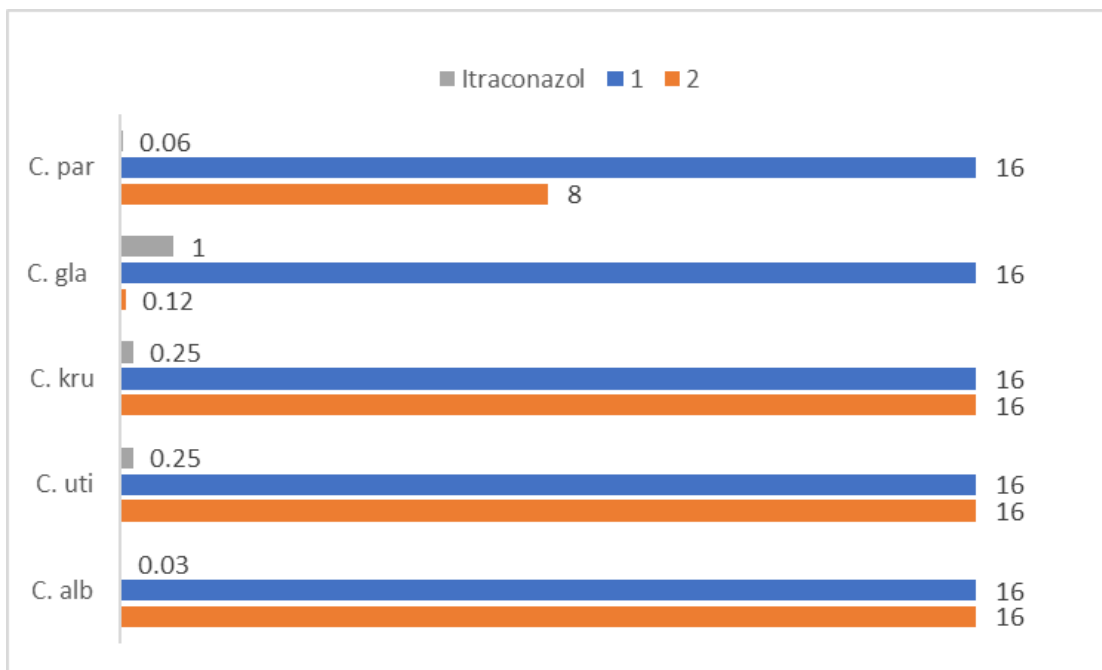


Figura 13. Actividades antifúngicas de los compuestos sintetizados, CMI mg/mL. Abreviaturas C. alb; Candida albicans C. uti., Candida utilis; C. kru., Candida krusei; C.gla., Candida glabrata, C. par., Candida parapsilosis.

De acuerdo a las estructuras de los triazoles **7** y **9**, se puede observar la importancia de los grupos sustituyentes en el anillo del triazol. El compuesto **2** muestra una mejor actividad antifúngica y esta característica la podemos relacionar con los sustituyentes de las posiciones 4 y 5 del anillo del triazol. Aunque el tamaño de los sustituyentes es similar (-Ph con respecto a *p*-Me-Ph; y -COPh con respecto a *p*-Tol-SO₂), podemos relacionar la actividad antifúngica con la presencia del grupo carbonilo de la cetona en el compuesto **2**, dicho grupo probablemente tiene una mejor interacción con el grupo *hemo* de la enzima 14- α -desmetilasa (figura 13).

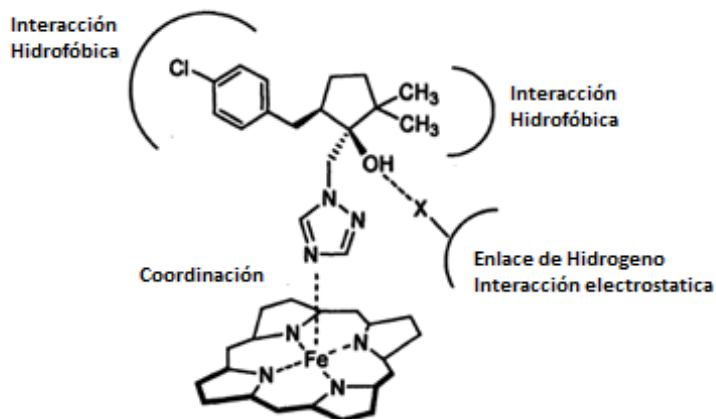


Figura 14. Interacción propuesta para la interacción de triazoles con enzima 14- α -desmetilasa

En base a la figura 13, podemos observar la importancia de tener grupos sustituyentes que permitan tener interacciones hidrofóbicas con la enzima, tal interacción se produce fácilmente mediante la presencia de halógenos (el anillo de tienopiridina cuenta con un átomo de bromo); estas interacciones también se encuentran cuando existen grupos alifáticos (-CH₃ presente en la molécula). Las interacciones electrostáticas, como puentes de hidrógeno, son favorecidas por el grupo carbonilo de la cetona, así como del grupo sulfona. Finalmente, la interacción con el átomo de hierro del grupo hemo de la enzima se da mediante la coordinación del par electrónico del átomo de nitrógeno 2 o 3 del anillo de triazol.

Estos resultados preliminares nos indican que es necesario llevar a cabo síntesis de triazoles con sustituyentes alquilo y heterociclos en la posición 5 del triazol, y grupos cetona e incluso esteres pequeños en la posición 4, con la finalidad de conocer de mejor manera el comportamiento del sitio activo de la enzima, así como las interacciones que tendrían con los sustituyentes del triazol.

14.2 CONCLUSIONES

La reacción por medio de la cicloadición [3+2] azida-enolato generó la síntesis de dos compuestos nuevos 1,2,3-triazólicos de tienporidinas en rendimientos moderados y sin la necesidad de utilizar catalizadores metálicos. Estos compuestos fueron probados exitosamente en levaduras de importancia clínica de los cuales el compuesto 2 presentó una actividad antifúngica aun mayor que el itraconazol en la especie *C. glabrata*. El resto de los compuestos no mostró una actividad antifúngica notable, pues las levaduras analizadas mostraron resistencia ante estos compuestos. Es importante mencionar que la facilidad de la síntesis y los buenos rendimientos de estos genera una



alternativa para la síntesis de triazoles que pueden presentar actividades antifúngicas muy interesantes y puedan resolver el problema de resistencia a los antifúngicos actuales.

15 CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL

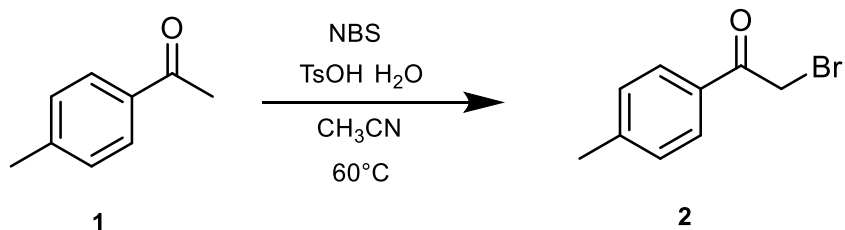
Para llevar a cabo las reacciones sensibles a la humedad, el material utilizado fue secado previamente en la estufa a 120 °C y las reacciones se trabajaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno.

Los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. La dimetil formamida (DMF) fue secada sobre hidruro de calcio seguido por decantación del agente secante y destilada a vacío. El cloruro de metileno fue secado mediante reflujo con CaH₂ y posterior destilación. El tetrahidrofurano (THF) anhidro se obtuvo después de 4 horas de reflujo con sodio, usando benzofenona como indicador. La determinación de puntos de fusión se realizó en un aparato Melt-Temp de capilar y se informaron sin corrección.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMN-¹H) así como de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN-¹³C), se determinaron en los espectrómetros: VARIAN-INOVA 500 MHz, AGILENT TECHNOLOGIES 500 MHz, ECLIPSE 300 MHz, usando como referencia interna el tetrametilsilano (0.0 ppm). El desplazamiento químico descrito esta dado en partes por millón. Los disolventes utilizados en estos estudios fueron: cloroformo deuterado (CDCl₃) y sulfóxido de dimetilo deuterado DMSO-D₆).

El monitoreo de las reacciones se llevó a cabo con cromatofolios de silica gel ALUGRAM/UV 254, y empleando como revelador luz ultravioleta proveniente de una lámpara de UV minerallight. La purificación de los compuestos se realizó por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice malla 230-400.

15.1 OBTENCIÓN DE 2-BROMO-1-(4-METILFENIL)ETANONA



Esquema 17. Reacción de obtención de 2-bromo-1-(4-metilfenil)etanona.



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

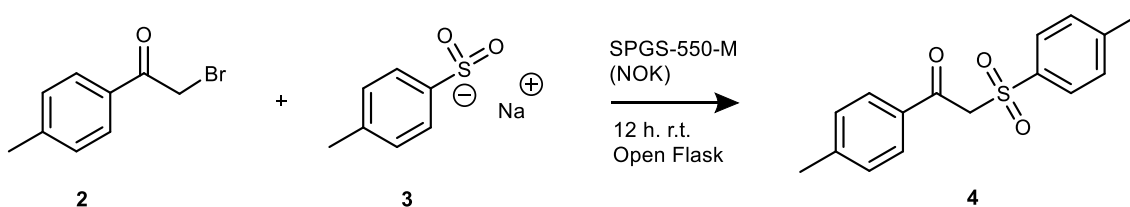
En un matraz de fondo redondo de 2 bocas de 50 mL provisto con agitación magnética, refrigerante, termómetro y atmósfera inerte, se agregó con una jeringa de vidrio (2 mmol) de 4-metil acetofenona, posteriormente se agregó 0.384 g (2 mmol) de ácido p-toluensulfónico y 0.394 g (2.2 mmol) de N-bromosuccinimida y 10 mL de acetonitrilo como disolvente. El sistema se llevó a reflujo a una temperatura de 60°C. Para determinar el avance de reacción se utilizó cromatografía de capa fina utilizando como eluyente un sistema hexano - acetato de etilo (8:2) dejando la reacción durante 6 horas. Pasado el tiempo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, obteniendo un líquido de color marrón.

El tratamiento de la reacción se realizó con una disolución saturada de NaHCO₃ y salmuera (1x10 mL). El producto se extrajo con Acetato de etilo (2x30 mL) y se llevó a concentrar al vacío. Obteniendo un sólido de color ligeramente amarillento. Con un punto de fusión de 44°C. El peso del producto obtenido fue de 0.2540 g. (52%)

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.94–7.85 (m, 2 Ar-H), 7.29 (d, J = 8.0 Hz, 2 Ar-H), 4.43 (s, 2 H), 2.43 (s, 3 H) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 190.9 (C=O), 145.0 (C), 131.4 (C), 129.5 (2 CH), 129.0 (2 CH), 30.9 (CH₂), 21.7 (CH₃) ppm.

15.2 OBTENCIÓN DE 1-(P-TOLIL)-2-TOSILETANONA



Esquema 18. Reacciones de Obtención de 1-(p-tolil)-2-tosiletanona.

En un vial de 10 mL provisto de tapón de hule se agregaron 0.2540 g (1.2 mmol) de 2-bromo-1-(4-metilfenil)etanona (2) . Al vial se le agregó por medio de jeringa 4 mL de SPGS-550-M y se dejó con agitación magnética hasta disolución de los reactivos. Después de la disolución de los reactivos se agregó 0.521 g (3 mmol) de p-toluensulfonato de sodio. El avance de la reacción se monitoreo por CCF con un eluyente hexano - acetato de etilo (8:2). El vial se dejó durante 8 horas con agitación magnética. El producto se extrajo directamente con acetato de etilo y se dejó concentrar al vacío. Obteniéndose 23 mg de un producto cristalino blanco (87%), con p.f.= 104 °C

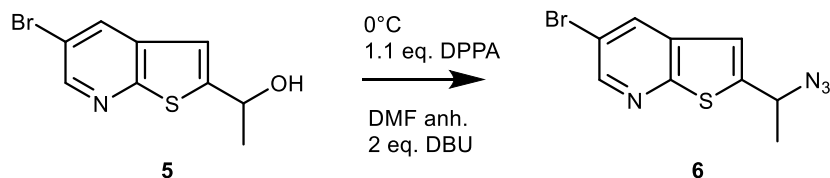


SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.88–7.80 (m, 2 Ar-H), 7.80–7.72 (m, 2 Ar-H), 7.36–7.29 (m, 2 Ar-H), 7.29–7.23 (m, 2 Ar-H), 4.69 (s, 2 H), 2.42 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H) ppm

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ = 187.6 (C=O), 145.5 (C), 145.2 (C), 135.8 (C), 133.3 (C), 129.8 (CH), 129.55 (CH), 129.52 (CH), 128.6 (CH), 63.6 (CH₂), 21.79 (CH₃), 21.71 (CH₃) ppm

15.3 OBTENCIÓN DE 2-(1-AZIDOETIL)-5-BROMOTIENO[2,3-B]PIRIDINA.



Esquema 19. Reacción de Obtención de 2-(1-azidoetil)-5-bromotieno[2,3-b]piridina.

En un matraz de dos bocas de 50 mL provisto con agitación magnética, refrigerante, termómetro y atmósfera de nitrógeno se agregaron 100 mg (0.387 mmol) de 2-(1-hidroxietil)-5-bromotieno[2,3-b]piridina. El sistema fue enfriado a 0°C con ayuda de un baño de hielo, una vez enfriado, se agregó con jeringa en cada caso 1 mL de DMF anhidra como disolvente, 0.1 mL de DBU (2 mmol) y 0.1 mL de DPPA (1.1 mmol). La reacción se dejó durante 24 horas hasta agotar la materia prima.

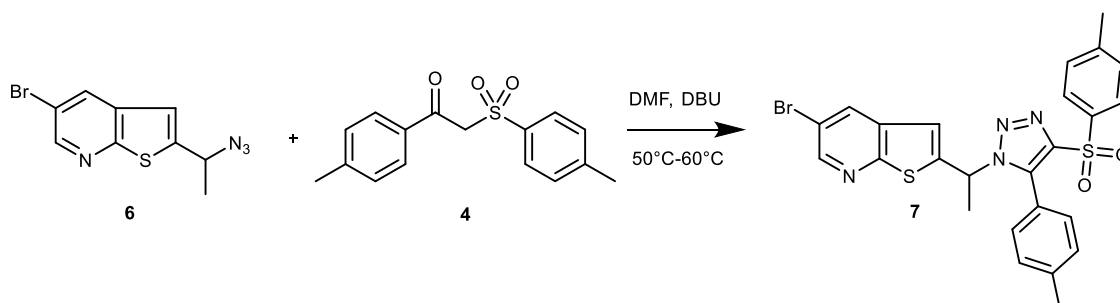
Pasando el tiempo establecido la reacción fue tratada con salmuera para la remoción de DMF (1x 20 mL) trasvasando a un embudo de separación se realizó una extracción con acetato de etilo (2x15 mL) obteniendo en la fase orgánica la azida correspondiente, posteriormente la fase orgánica fue concentrada al vacío. El crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna de gel de sílice con un eluyente hexano – acetato (7:3), obteniéndose 53% de un sólido cristalino blanco, p.f.= 86. °C

¹H NMR (300 MHz,) δ = 8.57 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 4.94 – 4.84 (m, 1H), 1.69 (d, J = 6.8 Hz, 3H) ppm

¹³C NMR (126 MHz, cdcl₃) δ = 159.6, 147.9, 147.7, 134.2, 133.2, 117.8, 116.9, 57.3, 21.6 ppm.



15.4 OBTENCIÓN DE 5-BROMO-2-(1-(5-(4-METILFENIL)-4-TOSIL-1H-1,2,3-TRIAZOL-1-IL)ETIL)TIENO[2,3-B]PIRIDINA.



Esquema 20. Obtención de 5-Bromo-2-(1-(5-(4-metilfenil)-4-tosil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)tieno[2,3-b]piridina.

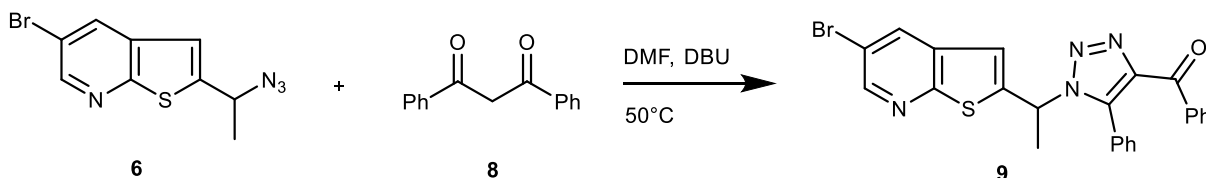
En un matraz limpio y seco de dos bocas de 25 mL provisto con agitación magnética, termómetro, y refrigerante se agregaron 30 mg de 2-(1-azidoetil)-5-bromotieno[2,3-b]piridina y 46 mg de 1-(p-tolil)-2-tosiletanona, se cerró el sistema y fue purgado con N₂, posteriormente con jeringa se agregó 2 mL de DMF anhidra y 0.3 mL de DBU. El sistema se dejó durante 24 horas. Posteriormente se verificó el avance de la reacción por medio de CCF en un eluyente Hexano – Acetato de etilo (6:4), el crudo de reacción se trató con salmuera para remover la DMF (2x10 mL) y el producto fue extraído con acetato de etilo (2x10 mL), posteriormente la fase de extracción fue secada con sulfato de sodio anhidro filtrado y evaporado al vacío. La purificación se llevó a cabo en cromatografía de columna con sílica. El producto sólido de color amarillo se dejó secando con ayuda de vacío durante 4 horas. El rendimiento de la reacción fue de 52%. P.f.= 152 °C

¹H NMR (300 MHz,) δ = 8.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.34 – 8.24 (m, 3H), 8.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.81 – 7.68 (m, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.75 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 2.93 (s, 3H), 2.86 (s, 3H), 2.68 – 2.61 (m, 3H) ppm.

¹³C NMR (75 MHz,) δ = 162.6, 161.4, 150.5, 145.5, 135.3, 134.1, 130.5, 130.1, 128.5, 125.7, 124.0, 117.2, 64.2, 26.7, 21.8 ppm.



15.5 OBTENCIÓN DE 5-BROMO-2-(1-(4,5-DIFENIL-1H-1,2,3-TRIAZOL-1-IL)ETIL)TIENO[2,3-B]PIRIDINA.



Esquema 21. Obtención de 5-Bromo-2-(1-(4,5-difenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)tieno[2,3-b]piridina.

En un matraz de dos bocas de 25 mL, limpio y seco provisto con agitación magnética, refrigerante y termómetro, se pesaron 30 mg 2-(1-azidoetil)-5-bromotieno[2,3-b]piridina y 25 mg de propanodiona, el sistema a reflujo fue purgado con N₂, ya con estas condiciones se agregó 2 mL de DMF anhidra y 0.1 de DBU, el sistema fue dejado a una temperatura de 50°C durante 48 horas. Vigilado por CCF en un eluyente hexano – acetato de etilo (6:4) Posteriormente el crudo de reacción fue tratado con (2x10 mL) de salmuera y el producto fue extraído con acetato de etilo (2x10mL). EL acetato de etilo fue secado con sulfato de sodio anhidro y después evaporado al vacío obteniendo un producto sólido marrón con p.f.= 138 °C Y con un rendimiento de 47%.

¹H NMR (300 MHz,) δ = 8.58 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.88 (s, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.51 – 7.40 (m, 2H), 7.39 – 7.25 (m, 6H), 5.53 (s, 1H), 2.27 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (75 MHz,) δ = 191.4, 147.8, 145.5, 145.1, 139.7, 134.9, 133.7, 133.1, 130.1, 129.6, 129.3, 128.1, 125.8, 125.3, 123.6, 119.1, 116.8, 63.7, 21.3 ppm.

Una vez obtenidos los compuestos triazólicos, se comenzaron las pruebas antifúngicas descritas por el CLSI de microdilución en caldo.

16 CAPITULO IV. PRUEBAS ANTIFUNGICAS

16.1 PRUEBAS ANTIFÚNGICAS PARA *CANDIDA SPP*

16.1.1 Medio de cultivo.

Se utilizó el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato de sodio, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) ajustado a pH 7±0.1 y con 0.2% de glucosa.



16.1.2 Preparación de medio de cultivo.

Se disolvió en 900 mL de agua destilada la cantidad de 10.40 g de RPMI 1640 y 34.53 g de MOPS agitando hasta su completa disolución. Ajustando el pH a 6.9-7.1 utilizando NaOH 1N o 10N. Posteriormente se añadió agua destilada hasta completar 1 litro de disolución. Se filtró estérilmente.

16.1.3 Preparación de antifúngicos insolubles en agua.

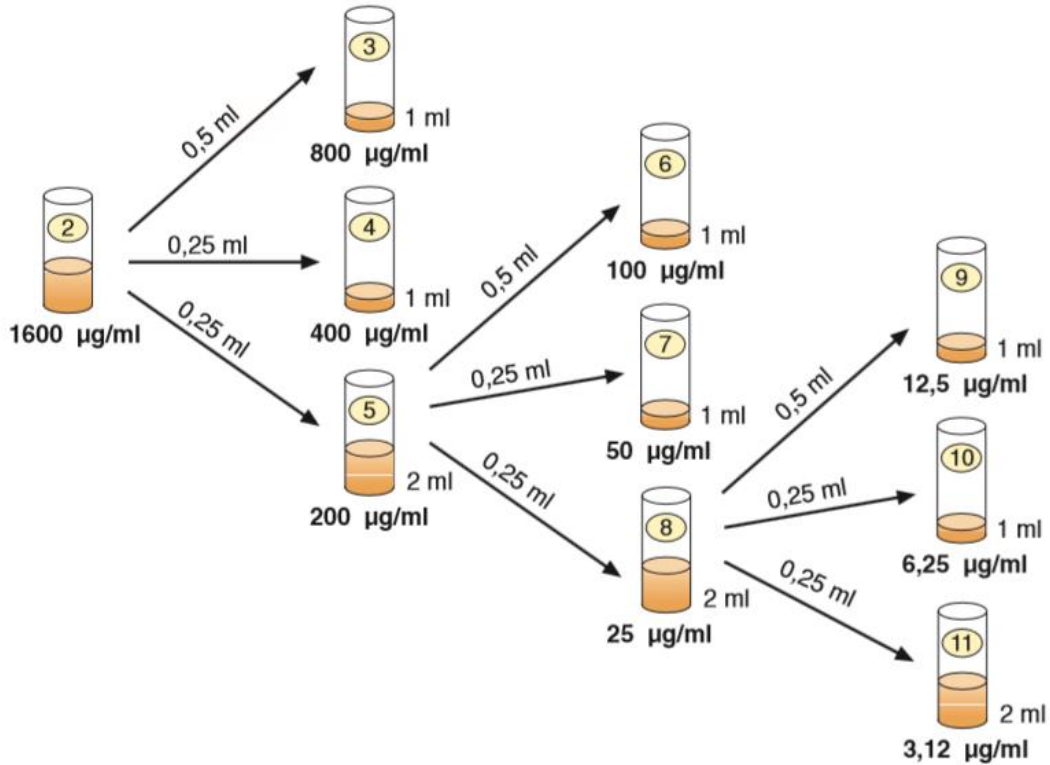
Los pasos seguidos se detallan en la tabla 6. Y las figuras 23 y 24. Las concentraciones por ensayar son las comprendidas entre 16 y 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

| Tubo | Concentración | Transferir | A un tubo con | Concentración resultante | Tubo |
|------|------------------------------|------------|-----------------|------------------------------|-------|
| n° 2 | 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 0,5 ml | 0,5 ml de DMSO | 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | n° 3 |
| n° 2 | 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 0,25 ml | 0,75 ml de DMSO | 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | n° 4 |
| n° 2 | 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 0,25 ml | 1,75 ml de DMSO | 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | n° 5 |
| n° 5 | 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 0,5 ml | 0,5 ml de DMSO | 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | n° 6 |
| n° 5 | 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 0,25 ml | 0,75 ml de DMSO | 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | n° 7 |
| n° 5 | 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 0,25 ml | 1,75 ml de DMSO | 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | n° 8 |
| n° 8 | 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 0,5 ml | 0,5 ml de DMSO | 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | n° 9 |
| n° 8 | 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 0,25 ml | 0,75 ml de DMSO | 6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | n° 10 |
| n° 8 | 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 0,25 ml | 1,75 ml de DMSO | 3,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | n° 11 |

Tabla 10. Dilución de antifúngicos insolubles en agua.

A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO.

En seguida se realiza una dilución 1/50 tomando 100 μL de cada tubo y se transfieren a otro tubo que contiene 4.9 mL de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico es dos veces mayor que la concentración final deseada y la de DMSO 2%.



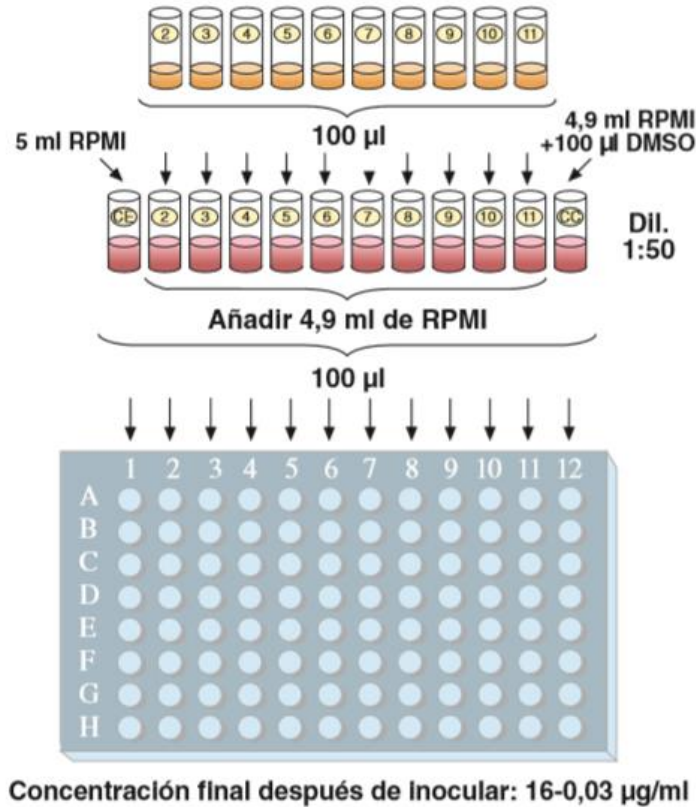
Esquema 22. Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente dimetil sulfóxido (DMSO)

Para fines prácticos, se pesaron de 3.6 mg de ambos antifúngicos y se llevaron a dos mililitros para la concentración deseada de 1600 µg/mL

16.1.4 Llenado de placas

Se utilizaron placas de microtiter, siguiendo los siguientes pasos.

EL contenido del tubo n° 2 se vierte en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal se toman 100 µL y se llenan los pocillos de la columna n° 2 (2A – 2H), con el contenido del tubo n° 3 se llenan los pocillos de la columna n° 3 (3A - 3H). Con el contenido del tubo n° 4 se llenan los pocillos de la columna n° 4 (4A - 4H). Etc.... y así hasta la columna n° 11. Los pocillos de la columna n° 12 se llenan con 100 µl de RPMI (control de crecimiento). Los pocillos de la columna n° 1 se llenan con 200 µl de RPMI (control de esterilidad).

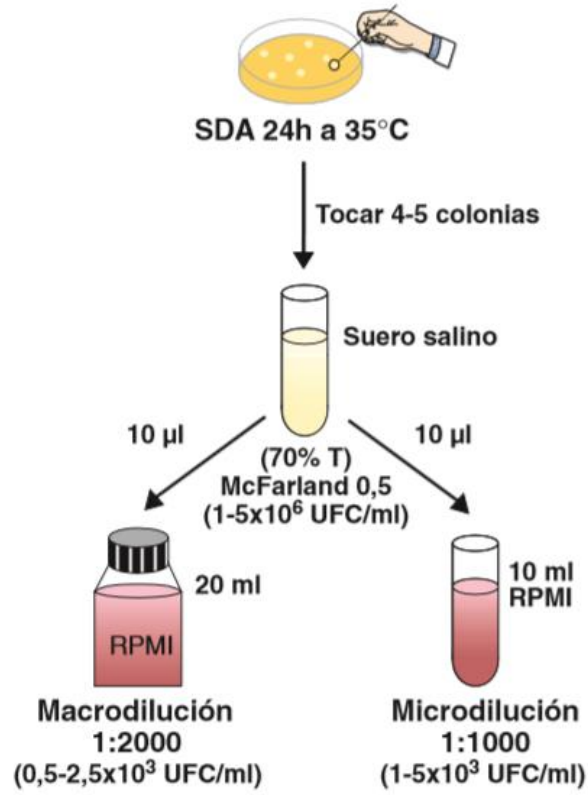


Esquema 23. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de microdilución). Diluyente RPMI 1640.

16.1.5 Preparación del inóculo

16.1.5.1 Inóculo para *Candida spp.*

1. Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias y de 24 horas de crecimiento en placa que se resuspenden en un tubo de solución salina (NaCl 0.85%).
2. Se agita bien y se compara contra una solución 0.5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina.
3. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI. Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico. En el esquema 22 se representan esquemáticamente todos estos pasos.

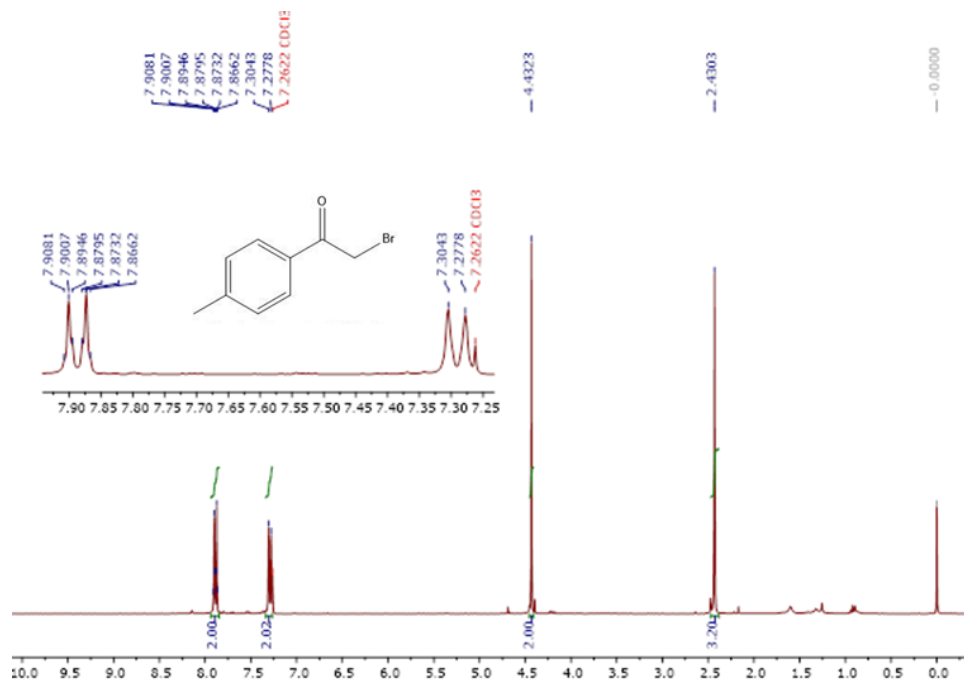


Esquema 24. Preparación de inóculo de levaduras.

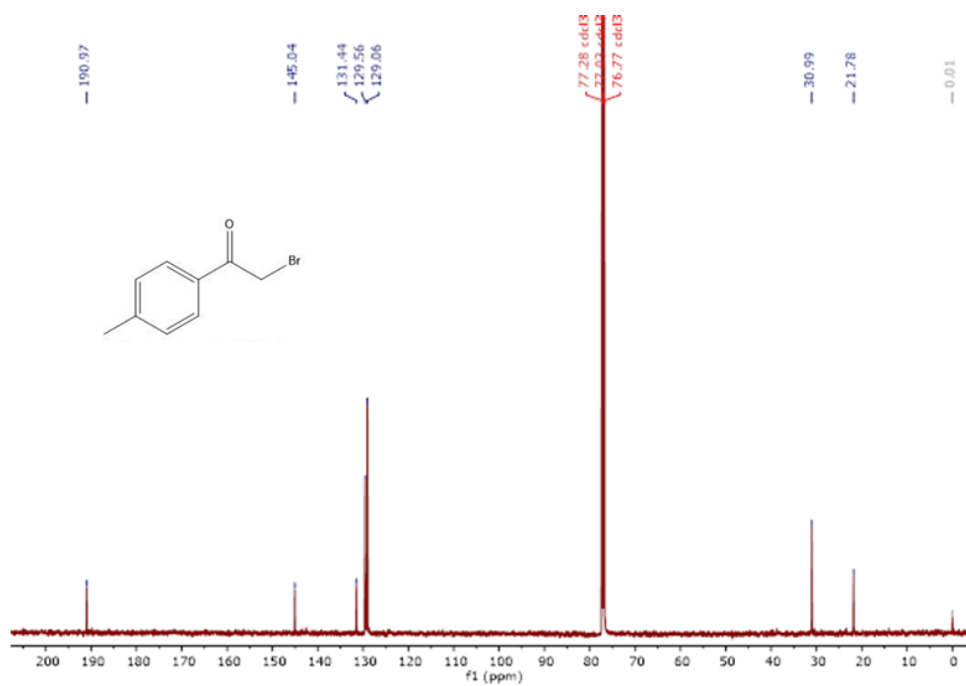


17 ANEXOS

17.1 ANEXO 1

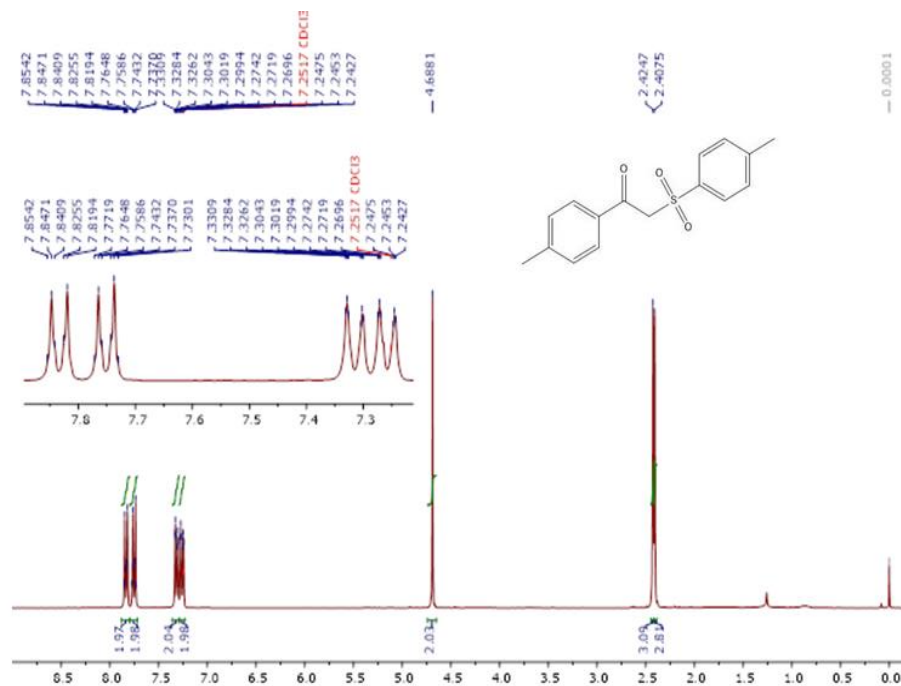


17.2 ANEXO 2

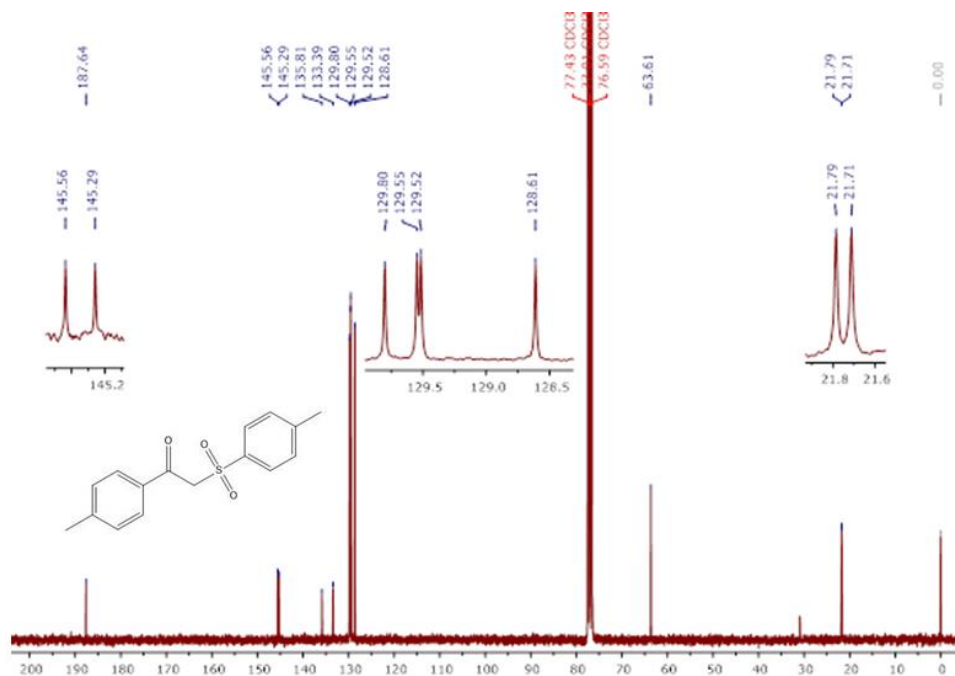




17.3 ANEXO 3



17.4 ANEXO 4



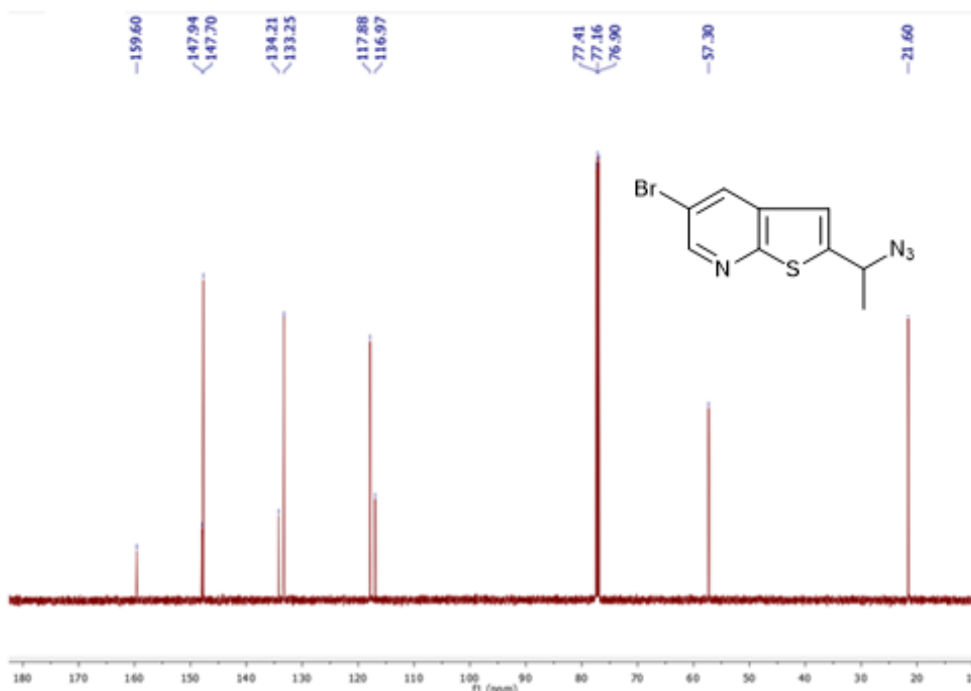


SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

17.5 ANEXO 5



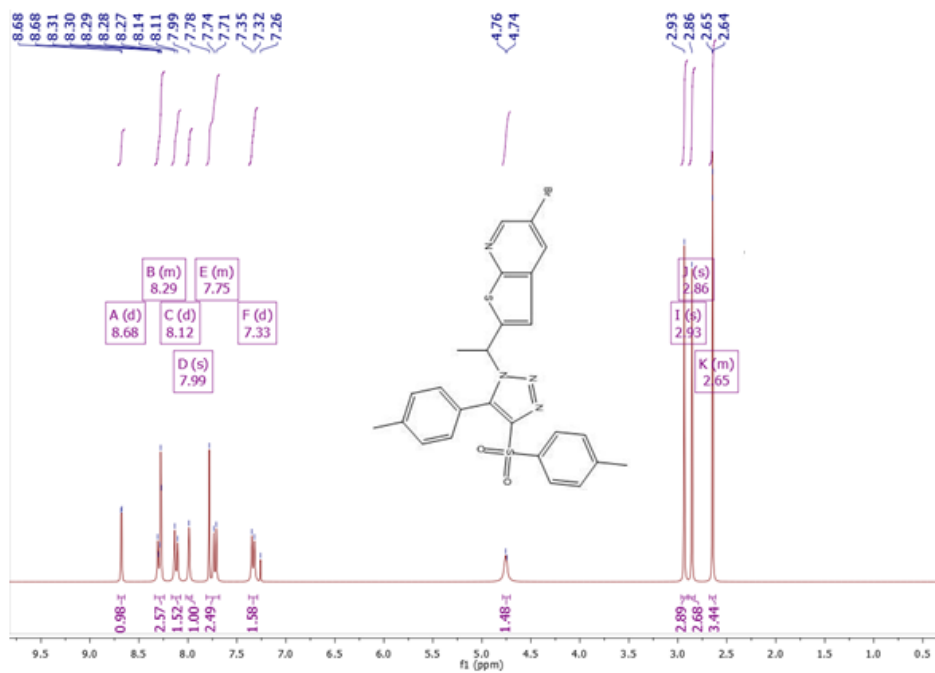
17.6 ANEXO 6



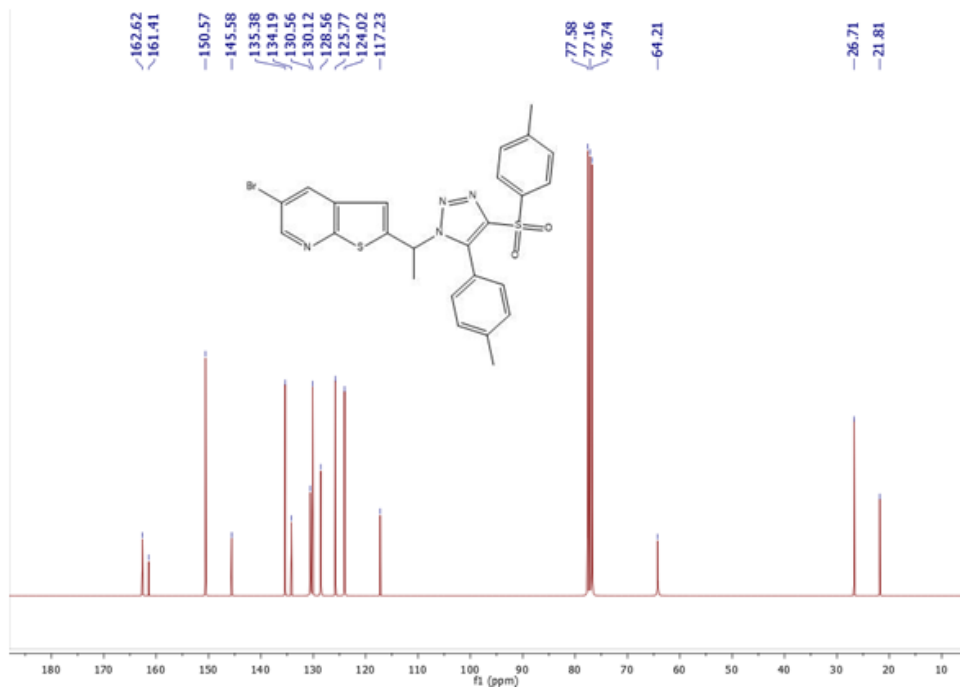


SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

17.7 ANEXO 7



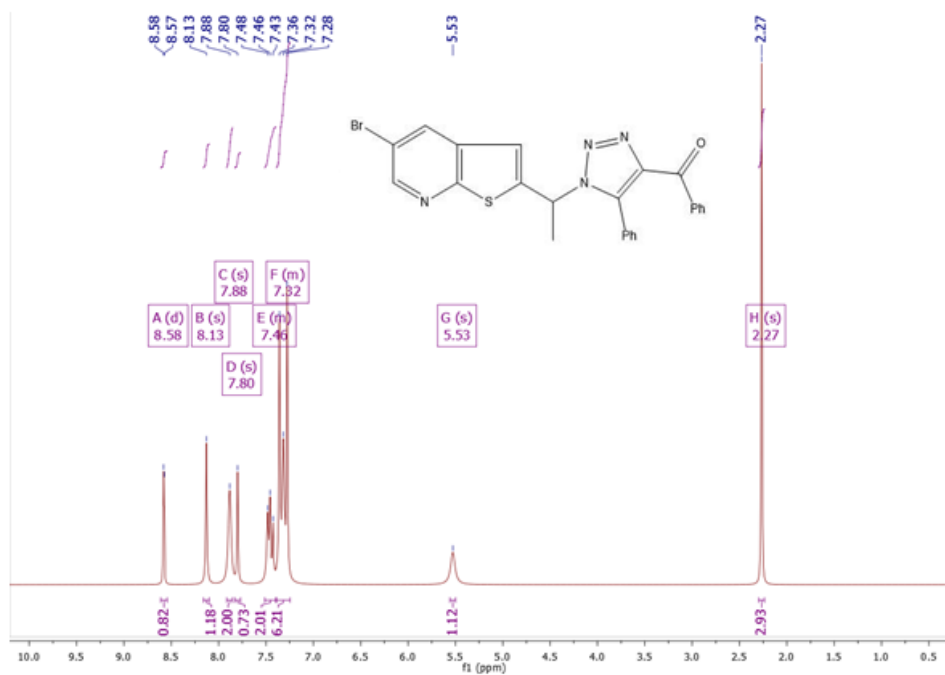
17.8 ANEXO 8



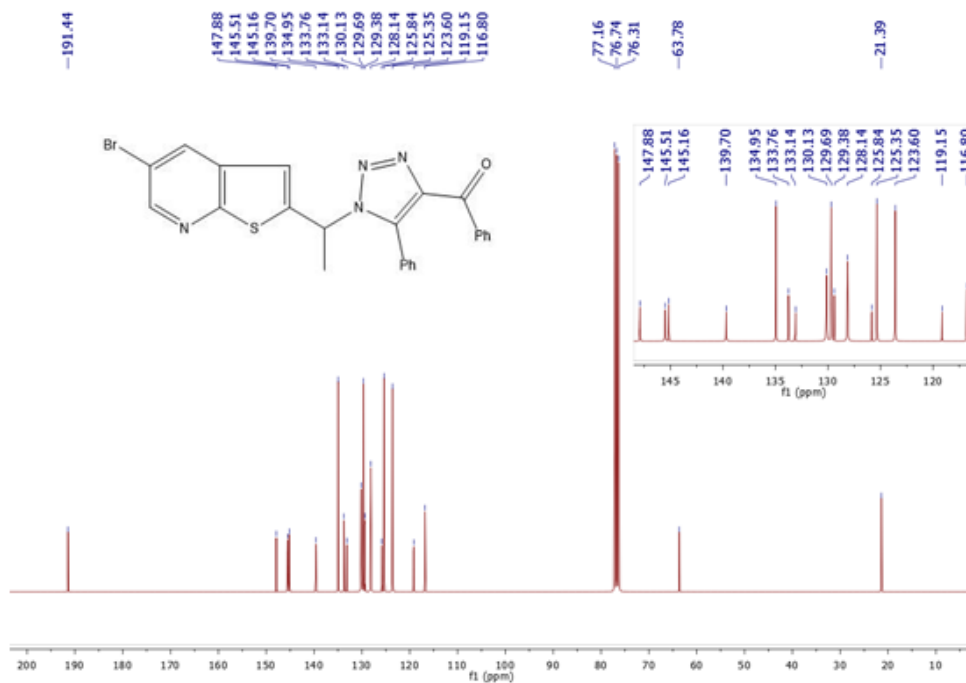


SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE NUEVOS 1,2,3-TRIAZOLES OBTENIDOS MEDIANTE LA CICLOADICIÓN [3+2] AZIDA-ENOLATO.

17.9 ANEXO 9



17.10 ANEXO 10





18 REFERENCIAS

1. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. Candida species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(PART1):10-24. doi:10.1099/jmm.0.045054-0
2. Bassetti M, Merelli M, Ansaldi F, et al. Clinical and therapeutic aspects of candidemia: A five year single centre study. *PLoS One*. 2015;10(5):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0127534
3. Schulze B, Schubert US. Beyond click chemistry – supramolecular interactions of 1,2,3-triazoles. *Chem Soc Rev*. 2014;43(8):2522. doi:10.1039/c3cs60386e
4. Klopfenstein CE. Chemistry of Thienopyridines. 111, Syntheses of the Thieno[2,3-b] and Thieno [3,2-b]pyridine Systems. *J Org Chemistry*. 1969;34(2):347-353.
5. López-García a, Ruiz-Tagle A. Prevalencia de diversas especies de Candida en mujeres con displasia cervical en un Hospital de la Ciudad de Puebla, México. *Rev Latinoam Patol Clínica*. 2012;59:101-106.
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Prevalencia+de+diversas+especies+de+Candida+en+mujeres+con+displasia+cervical+en+un+Hospital+de+la+Ciudad+de+Puebla+,+M?xico#0%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:P>.
6. Buitrón García-Figueroa R, Araiza-Santibáñez J, Basurto-Kuba E, Bonifaz-Trujillo A. Candida glabrata: an emergent opportunist in vulvovaginitis. *Cir Cir*. 2009;77(6):423-427.
7. García Heredia M, García SD, Copolillo EF, et al. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Argent Microbiol*. 2006;38(1):9-12.
8. Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Stevens DA, Clemons K V., Pais C. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among Candida parapsilosis sensu stricto isolates. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1677-1682. doi:10.1128/JCM.02151-09
9. Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Pereira-Góngora JR VJ. Frecuencia de portadores de C. albicans en un grupo de niños de una comunidd rural del estado de Yucatan. *Rev Odontol*



- Latinoam.* 2008;0(1):1-4.
10. Gaitán-Cepeda LA, Sánchez-Vargas LO, Pavia-Ruz N, Muñoz-Hernández R, Villegas-Ham J, Caballos-Salobreña A. Candida bucal en niños mexicanos con VIH/sida, desnutrición o marginación social. *Rev Panam Salud Pública.* 2012;31(1):48-53. doi:10.1590/S1020-49892012000100007
 11. Molina VD, Espíndola YS, De La Paz AS, et al. Onicomicosis de mano causada por tres especies de candida. In: *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica.* Vol 11. ; 2013:23-25.
 12. Abad-González J, Bonifaz A, Ponce RM. Onicomicosis por Candida asociada con diabetes mellitus. *Dermatología Rev Mex.* 2007;51(4):135-141.
 13. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Arenas R, et al. Levaduras causantes de onicomicosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. *Rev Iberoam Micol.* 2011;28(1):32-35. doi:10.1016/j.riam.2010.11.002
 14. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Graniel MJ, Mena C, Valencia A, Ponce-Olivera RM. The Efficacy and Safety of Sertaconazole Cream (2 %) in Diaper Dermatitis Candidiasis. *Mycopathologia.* 2013;175(3):249-254. doi:10.1007/s11046-013-9642-3
 15. Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res.* 2001;105(12):1422-1432. doi:10.1017/S0953756201004725
 16. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2012;30(1):33-39. doi:10.1016/j.eimc.2011.09.006
 17. Parker R. RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2012;191(3):671-702. doi:10.1534/genetics.111.137265
 18. Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. In: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE, eds. *Essentials of Clinical Mycology.* New York, NY: Springer New York; 2011:167-206. doi:10.1007/978-1-4419-6640-7_11
 19. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(1):42-48. doi:10.1016/j.riam.2013.10.001



20. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2015;62(4):e1-e50. doi:10.1093/cid/civ933
21. Reyes-Montes M del R, Duarte-Escalante E, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Frías-De León MG. Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(4):203-210. doi:10.1016/j.riam.2017.05.001
22. Cantón E, Msrtin E, Espinel-ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Rev Iberoam Micol*. 2007;15:1. <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>.
23. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard - Third Edition. CLSI Document M27-A3*. Vol 28.; 2008. doi:10.1007/SpringerReference_5244
24. Rodríguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, et al. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(8):i-viii. doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00789.x
25. Harpp DN, Bao LQ, Black CJ, Gleason JG, Smith RA. Efficient .alpha.-halogenation of acyl chlorides by N-bromosuccinimide, N-chlorosuccinimide, and molecular iodine. *J Org Chem*. 1975;40(23):3420-3427. doi:10.1021/jo00911a026
26. Harpp DN, Bao LQ, Black CJ, Smith RA, Gleason JG. α - Chlorination and iodination of acid chlorides. *Tetrahedron Lett*. 1974;15(36):3235-3238. doi:https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91871-4
27. Jung N, Bräse S. Vinyl and alkynyl azides: Well-known intermediates in the focus of modern synthetic methods. *Angew Chemie - Int Ed*. 2012;51(49):12169-12171. doi:10.1002/anie.201206409
28. Treinin A. The chemistry of the azido group. In: *The Chemistry of the Azido Group*. ; 1971:2-57. doi:10.1002/9780470771266.ch1
29. Bräse S, Gil C, Knepper K, Zimmermann V. Organic azides: An exploding diversity of a unique class of compounds. *Angew Chemie - Int Ed*. 2005;44(33):5188-5240. doi:10.1002/anie.200400657



30. Mazzini C, Sambri L, Regeling H, Zwanenburg B, J. F. Chittenden G. Enantiospecific syntheses of (R)- and (S)-proline and some derivatives from D-glucono-1{,}5-lactone. *J Chem Soc{,} Perkin Trans 1*. 1997;(22):3351-3356. doi:10.1039/A704915C
31. Yudina ON, Sherman AA, Nifantiev NE. Synthesis of propyl and 2-aminoethyl glycosides of α -d-galactosyl-(1 \rightarrow 3')- β -lactoside. *Carbohydr Res*. 2001;332(4):363-371. doi:https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00097-0
32. Fletcher S. The Mitsunobu reaction in the 21st century. *Org Chem Front*. 2015;2(6):739-752. doi:10.1039/C5QO00016E
33. Markitanov YM, Timoshenko VM, Shermolovich YG. β -Keto sulfones: Preparation and application in organic synthesis. *J Sulfur Chem*. 2014;35(2):188-236. doi:10.1080/17415993.2013.815749
34. Thomsen MW, Handwerker BM, Katz SA, Belser RB. Preparation of .beta.-keto sulfones from [(phenylsulfonyl)methylene]dilithium and acid chlorides. *J Org Chem*. 1988;53(4):906-907. doi:10.1021/jo00239a051
35. House HO, Larson JK. The Use of β -Keto Sulfones as Synthetic Intermediates. *J Org Chem*. 1968;33(1):61-65. doi:10.1021/jo01265a012
36. Wildeman J, Van Leusen AM. Convenient Alternative Synthesis of Sulfones in Aprotic Medium using Phase-Transfer Catalysis. *Synthesis (Stuttg)*. 1979;1979(09):733-734. doi:10.1055/s-1979-28819
37. VENNSTRA GE, ZWANEURG B. An Improved Synthesis of Sulfones using Tetrabutyl-ammonium Sulfinates. *Synthesis (Stuttg)*. 1975;1975(08):519-520. doi:10.1055/s-1975-23829
38. Fan AL, Cao S, Zhang Z. A New Approach for the Synthesis of some 1,4-Benzoxathiin 4,4-Dioxide Derivatives. *J Heterocycl Chem*. 1997;34(6):1657-1660. doi:10.1002/jhet.5570340603
39. Truce WE, Bannister WW, Knospe RH. The Preparation of β -Keto Sulfones by the Thorpe Reaction. The Acidity of β -Keto Sulfones^{1,2}. *J Org Chem*. 1962;27(8):2821-2828. doi:10.1021/jo01055a025



40. Pokhodylo NT, Matiychuk VS, Obushak MD. (Arylsulfonyl)acetones and -acetonitriles: New activated methylenic building blocks for synthesis of 1,2,3-triazoles. *Synthesis (Stuttg)*. 2009;(14):2321-2323. doi:10.1055/s-0029-1216850
41. Hoffmann R, Woodward RB. The Conservation of Orbital Symmetry. *Acc Chem Res*. 1968. doi:10.1021/ar50001a003
42. Fukui K. The Path of Chemical Reactions - The IRC Approach. *Acc Chem Res*. 1981. doi:10.1021/ar00072a001
43. Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J Org Chem*. 2002;67(9):3057-3064. doi:10.1021/jo011148j
44. Rostovtsev V V, Green LG, Fokin V V, Sharpless KB. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew Chemie Int Ed*. 2002;41(14):2596-2599. doi:10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4
45. Huisgen R, Szeimies G, Möbius L. 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. *Chem Ber*. 1967;100(8):2494-2507. doi:10.1002/cber.19671000806
46. Huisgen R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew Chemie Int Ed English*. 1963;2(10):565-598. doi:10.1002/anie.196305651
47. Huisgen R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew Chemie Int Ed English*. 1963;2(11):633-645. doi:10.1002/anie.196306331
48. Huisgen R. 1,3-Dipolar cycloadditions. 76. Concerted nature of 1,3-dipolar cycloadditions and the question of diradical intermediates. *J Org Chem*. 1976;41(3):403-419. doi:10.1021/jo00865a001
49. Huisgen R, Knorr R, M.Bius L, Szeimies G. 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXIII. Einige Beobachtungen zur Addition organischer Azide an Dreifachbindungen. *Chem Ber*. 1965;98(12):4014-4021. doi:10.1002/cber.19650981228
50. Roque DR, Neill JL, Antoon JW, Stevens EP. Synthesis of 1,2,3-triazoles by cycloadditions of



- azides with enol ethers. *Synthesis (Stuttg)*. 2005;(15):2497-2502. doi:10.1055/s-2005-872116
51. Yao L, Smith BT, Aubé J. Base-Promoted Reactions of Bridged Ketones and 1,3- and 1,4-Haloalkyl Azides: Competitive Alkylation vs Azidation Reactions of Ketone Enolates. *J Org Chem*. 2004;69(5):1720-1722. doi:10.1021/jo0356098
52. González-Calderón D, Fuentes-Benítez A, Díaz-Torres E, González-González CA, González-Romero C. Azide–Enolate 1,3-Dipolar Cycloaddition as an Efficient Approach for the Synthesis of 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from Alkyl/Aryl Azides and β -Ketophosphonates. *European J Org Chem*. 2016;2016(4):668-672. doi:10.1002/ejoc.201501465
53. González-Calderón D, Mejía-Dionicio MG, Morales-Reza MA, et al. Antifungal activity of 1'-homo-N-1,2,3-triazol-bicyclic carbonucleosides: A novel type of compound afforded by azide-enolate (3+2) cycloaddition. *Bioorg Chem*. 2016;69:1-6. doi:10.1016/j.bioorg.2016.09.003
54. González-Calderón D, Mejía-Dionicio MG, Morales-Reza MA, et al. Azide-enolate 1,3-dipolar cycloaddition in the synthesis of novel triazole-based miconazole analogues as promising antifungal agents. *Eur J Med Chem*. 2016;112:60-65. doi:10.1016/j.ejmech.2016.02.013
55. Ramírez-Villalva A, González-Calderón D, González-Romero C, et al. A facile synthesis of novel miconazole analogues and the evaluation of their antifungal activity. *Eur J Med Chem*. 2015;97:275-279. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.047