



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Informe de Conclusión de Servicio Social

Alumna: Flores Rojas Karol Ivannia

Matrícula: 2192033204

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto externo:

“Seguimiento y caracterización con métodos instrumentales de una reacción para obtener análogos de ciprofloxacino, norfloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino como posibles profármacos con actividad antimicrobiana”

Ubicación: Laboratorio 3E del Edificio A de la Facultad de Química de la UNAM y Unidad Periférica de Patogénesis Bacteriana de la UNAM ubicada en el Hospital GEA González

Asesor interno:

Dr. Ernesto Sánchez Mendoza

Asesor externo:

Mtro. Juan Rolando Vázquez Miranda

Periodo: 20 de noviembre del 2023 al 24 de mayo del 2024

Capítulo 1

Introducción

En los últimos años, los casos de infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos han aumentado drásticamente, esto ha llevado a la pérdida de eficacia en los tratamientos, y a la disminución en la gama de antibióticos disponibles en contra de estos microorganismos; tal es el caso de los microorganismos resistentes a las fluoroquinolonas. Por ello, resulta de gran importancia continuar desarrollando fármacos de amplio espectro que presenten una alta eficacia y con menores efectos secundarios. Estudios recientes han demostrado que la adición de productos naturales como el ácido cinámico (metabolito obtenido de la canela) mejoran considerablemente la actividad farmacológica de las fluoroquinolonas.

Con base en lo anterior, este proyecto de servicio social tuvo como objetivo obtener 4 análogos de fluoroquinolonas que incorporan al ácido cinámico en la estructura base; el seguimiento y la caracterización, se realizó por medio de técnicas instrumentales de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) y Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H). Además, se utilizó el ensayo de dilución en caldo para evaluar la actividad antimicrobiana de los 4 análogos obtenidos.

1.1. Marco teórico

1.1.1. Resistencia antibacteriana a los antimicrobianos

La resistencia antimicrobiana (RA) sucede cuando microorganismos como bacterias y hongos han sido expuestos a antimicrobianos y por mecanismos naturales de adaptación, generan mutaciones que da como resultado que estos fármacos dejen de ser efectivos, lo cual, genera que las infecciones sean difíciles de tratar y/o que el tratamiento se prolongue [SEDESA 2023]. En un análisis sistemático realizado por Murray et al., 2022 expusieron que, en 2019 a nivel mundial, fallecieron 1.27 millones de personas a causa de infecciones causadas por bacterias resistentes, en-

tre los que destaco la *E. coli* resistente a las cefalosporinas y *E. coli* resistente a las fluoroquinolonas. Diversas agencias como la Organización Mundial de la Salud (OMS); la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) hacen un llamado para la prevención y concientización del uso de los antimicrobianos bajo la premisa “ONE HEALTH” [CSG 2018], esto debido a que la principal causa de resistencia a los antimicrobianos es el uso indiscriminado en los animales y el uso irracional en el tratamiento de diversas enfermedades en las personas [SEDESA 2023], siendo el tratamiento con antibióticos en infecciones virales el más común en el sector salud [CSG 2018]. Adicionalmente, se está investigando nuevas estrategias para el tratamiento de estas infecciones, sin embargo, la búsqueda de nuevos fármacos es demandante en recursos humanos y económicos; una alternativa es la modificación de antibióticos ya aprobados para el uso en humanos, junto con agentes que cuenten con actividad antimicrobiana, tal es el caso de la adición de productos naturales que cuenten con actividad antibacteriana a la estructura de las fluoroquinolonas, con la intención de presentar un potencial efecto sinérgico, la posibilidad de reducir efectos adversos, reducir dosis y mejorar propiedades fisicoquímicas [Shariati 2022].

1.1.2. Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son antibióticos sintéticos de amplio espectro con efecto bactericida [Carrillo-Alduenda 2018], los cuales fueron introducidos al mercado en la década de 1980, y han sido utilizados para el tratamiento de diversas infecciones. A pesar de que en la actualidad por el mal manejo de estos antibióticos existen casos de infecciones resistentes a las fluoroquinolonas, estos fármacos trataban infecciones causadas por bacterias resistentes a los derivados de la penicilina y a las cefalosporinas [Redgrave 2014], esto se debe a que su mecanismo de acción es intracelular y permite la muerte celular efectiva, ya que inhibe las enzimas bacterianas topoisomerasa II y topoisomerasa IV, las cuales son necesarias para la replicación, la transcripción, la reparación y la recombinación del ADN bacteriano [Carrillo-Alduenda 2018]. Los mecanismos bacterianos que permiten la resistencia a las fluoroquinolonas se encuentra la mutación de las enzimas dianas, la alteración en la permeación de los fármacos, la formación de biofilm y la transmisión de información de resistencia mediante plásmido [Shariati 2022].

Las fluoroquinolonas se obtienen al adicionar una molécula de flúor en la posición 6 a la molécula de la quinolona (figura 1.1) [Redgrave 2014]. La estructura base de las fluoroquinolonas es reactiva, lo que permite funcionalizar posiciones claves con la finalidad de obtener nuevas moléculas que permitan incrementar la actividad antibacteriana, reducir la tasa de aparición de resistencia, mejorar la farmacocinética

y/o la farmacodinamia [Sharma 2009]. Entre los casos más destacados, se encuentran el norfloxacin (figura 1.2d) y el ciprofloxacino (figura 1.2a) que se obtuvieron al funcionalizar la posición 7, lo que mejoro la potencia y la farmacocinética del fármaco [Lungu 2022, Sharma 2009].

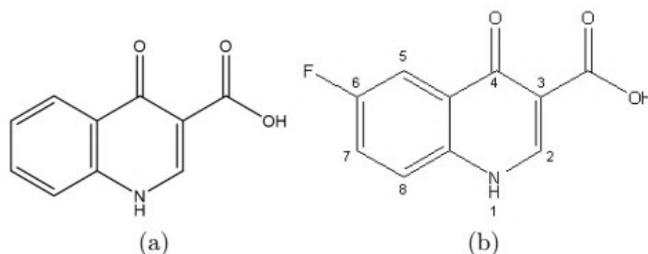


Figura 1.1: Estructura básica de a)Quinolona y b)Fluoroquinolona

El norfloxacin (figura 1.2d) fue patentado en 1978, el cual es una fluoroquinolona de primera generación, que se obtuvo adicionando una molécula de piperazina en la posición 7 de la quinolona, el cual permitió incrementar la actividad en contra de las bacterias gram-positivas [Chierentin 2016], además cuenta con una vida media extensa en el cuerpo a comparación de fluoroquinolonas de primera generación [Sharma 2009]. El norfloxacin se presenta como un polvo cristalino amarillo claro con punto de fusión de 220°C , cuenta con un peso molecular de 319.331 g/mol y se solubiliza poco en agua,[Chierentin 2016].

El ciprofloxacino (figura 1.2a) fue de las primera fluoroquinolonas aprobada para su uso clínico, teniendo 36 años de registro y uso en México, es considerada una fluoroquinolona de segunda generación y la cual cuenta con gran actividad en contra de bacterias gram-negativo y bacterias gram-positivo, sin embargo, no cuenta con actividad en presencia de microorganismos anaerobios [Carrillo-Alduenda 2018]. Su peso molecular es de 331.34 g/mol , en su estructura química que se aprecia el grupo funcional ciclopropil, ácido carboxílico, flúor y piperazina, en las posiciones 1,2, 6 y 7 respectivamente, siendo las dos últimas posiciones las responsables de la actividad antimicrobiana [Shariati 2022]

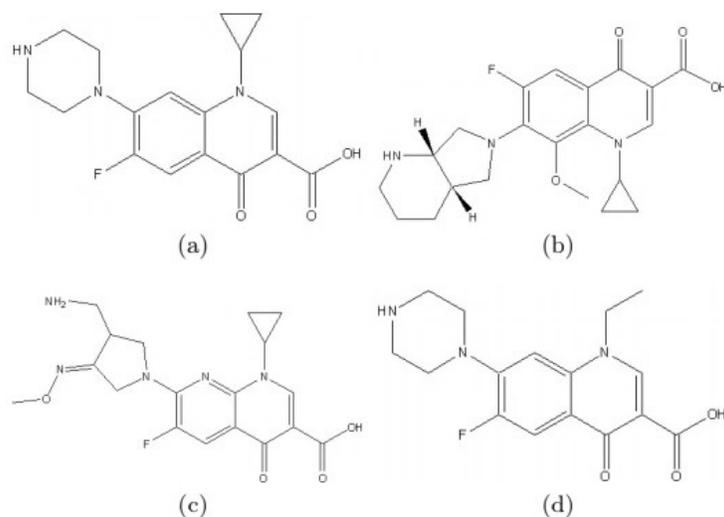


Figura 1.2: Estructura de a)Ciprofloxacino, b)Moxifloxacino, c)Gemifloxacino y d)Norfloxacino

El moxifloxacino (figura 1.2b) cuenta con 22 años de autorización en México y se categoriza como fluoroquinolona de cuarta generación, teniendo mejor actividad en contra de bacterias gram-positivas, en comparación de las fluoroquinolonas de primera y segunda generación[Carrillo-Alduenda 2018]. Su peso moléculas es de 401.4 g/mol. Su estructura se diferencia de otras fluoroquinolonas por tener en la posición 8 un grupo metoxido y en la posición 7 cuenta con un anillo octahidro-6H-pirrolo[3,4-b]piridin-6-ilo [Al Omari 2014].

El gemifloxacino (figura 1.2c) es la fluoroquinolona que se ha aprobado recientemente para su uso en humanos, la cual se categorizo como una fluoroquinolona de cuarta generación, se ha utilizado en tratamientos en contra de bronquitis infecciosa crónica y neumonía leve a moderada. Cuenta con un peso molecular de 389.4 g/mol, a diferencia de otras fluoroquinolonas cuenta con un anillo heteroaromático, y un grupo 3-aminometil-4-metoxiimino-pirrolidina-1-ilo en la posición 7 [NCBI 2024]

1.1.3. Ácido cinámico

El ácido cinámico es un ácido orgánico que se encuentra naturalmente en plantas, principalmente en la corteza de aquellos pertenecientes al género *Cinnamomum*, el cual ha demostrado tener baja toxicidad, ser un potente antioxidante y tener actividad antimicrobiana. En la publicación de Sova 2012 expone que el ácido cinámico tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de *B. subtilis*, *E. coli* y *P. syringae*, además se encontró que derivados sintéticos que combinan el ácido cinámico junto con otras moléculas presentan actividad antimicrobiana de interés.

La molécula de ácido cinámico se disuelve mejor en disolventes orgánicos y tiene muy baja solubilidad en agua. La estructura del ácido cinámico (figura 1.3) consta

de un anillo aromático y un ácido acrílico [Ruwizhi 2020], lo cual permite realizar reacciones de sustitución que permitan generar moléculas de interés [Guzman 2014]. Debido a los crecientes casos de RA de las fluoroquinolonas, se consideran estos antibióticos como candidatos a ser modificados y adicionar una molécula de ácido cinámico, con la finalidad de mejorar la actividad antibacteriana y mejorar la permeación, debido a que las dianas farmacológicas de las fluoroquinolonas son intracelulares y entre los mecanismos de resistencia se encuentra la formación de biofilm y formación de porinas para la excreción [Piplani 2017, Shariati 2022, Mingoia 2022].

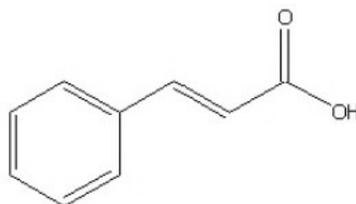


Figura 1.3: Ácido cinámico

1.1.4. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia es una de las técnicas instrumentales más utilizada en la investigación, desarrollo y producción de nuevos fármacos, la razón que lo vuelve una técnica clave es que permite la separación de compuestos químicos o analitos que se encuentran en una mezcla. El fundamento de esta técnica consiste en la separación de los compuestos, dependiendo de su interacción con la fase estacionaria y la fase móvil. En los principios de esta técnica, la fase móvil era exclusivamente un líquido de carácter no polar, mientras que la fase estacionaria contaba con una superficie altamente polar, conocido actualmente como HPLC-fase normal, sin embargo, en 1964 el Ingeniero Químico Csaba Horváth propuso cubrir la fase estacionaria con negro de humo y posterior, la adición de cadenas alquílicas unidas químicamente, en consecuencia, se cambió la polaridad de la fase móvil, utilizando soluciones base agua, creando la técnica de HPLC-fase inversa, en el cual, se utilizan las fuerzas de dispersión como las interacciones de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas para llevar a cabo la separación de los analitos, gracias a ello permite distinguir pequeñas diferencias en las interacciones moleculares de analitos semejantes [Kazakevich 2007].

1.1.5. Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier

La espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier es una técnica de análisis instrumental que permite obtener información sobre los grupos funcionales presen-

tes en una estructura química. El espectro de infrarrojo se obtiene cuando se hace incidir a la muestra radiación infrarroja que coincida exactamente con la frecuencia de la vibración molecular, lo cual permite el proceso de absorción de la radiación, en consecuencia, genera un cambio en la amplitud de la vibración molecular. Las moléculas que se pueden analizar por medio de esta técnica deben de sufrir un cambio neto en el momento dipolar cuando vibran o rotan sin ayuda de algún agente externo, lo cual se determina por la magnitud de la diferencia de carga y la distancia entre centros de carga de los átomos que conforman la molécula. Las especies homonucleares como N_2 o Cl_2 que no sufren un cambio neto durante la vibración o la rotación, no cuentan con momento dipolar, por lo tanto, no absorben radiación infrarroja [Skoog 2008].

Los espectros de infrarrojo tienen en el eje de las abscisas el número de onda ($\bar{\nu}$), el cual es el recíproco de la longitud de onda y es proporcional a la frecuencia, el $\bar{\nu}$ se maneja en unidades de cm^{-1} [Skoog 2008].

En la espectroscopia de infrarrojo, se pueden utilizar sensores para analitos específicos, como el caso del optodo, que es un sensor químico basado en los principios de la fibra óptica. Para los analitos que son sólidos difíciles de manipular, se utiliza el optodo basado en la reflectancia total atenuada (ATR), en el cual el haz de radiación disminuye debido a la presencia del analito, ya que durante el proceso de reflexión, el haz penetra una cierta distancia en el analito, la radiación que penetra se denomina *onda evanescente*, la profundidad dependerá de la longitud de onda, el índice de refracción del analito, el índice de refracción del sensor, y el ángulo incidente que forma el haz incidente con la interfase. Los espectros de ATR son similares a los espectros de absorción ordinarios, la única diferencia se encuentra en las intensidades relativas que son proporcionales a la concentración. Las ventajas de esta técnica es la mínima preparación y la facilidad de obtener los espectros de absorción de gran variedad de muestras complejas como telas y fibras [Harris 2016, Skoog 2008].

1.1.6. Espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear provee información acerca de la estructura, la reactividad y la dinámica de las moléculas. La base teórica de la RMN considera que los núcleos cuentan con propiedades de espín. Los núcleos que cuentan con un número impar de protones y/o neutrones tienen valores de espín diferente de cero, por lo que un núcleo que gira y tienen carga presenta un momento magnético a lo largo del eje del espín. Cuando los núcleos de este tipo son sometidos a un campo magnético externo tienden a orientarse en ciertas direcciones, cuando cuentan con número cuántico de espín de $1/2$, solo existen dos orientaciones de los núcleos los cuales pueden ser antiparalelo o paralelo al campo magnético externo,

este fenómeno genera distintos estados cuánticos magnético de energía, siendo la orientación paralela al campo magnético la predominante entre los núcleos, debido a que es el estado de menor energía y más estable, este excedente permite que cuando se incide la radiación en el rango de las radiofrecuencias (40-1000 MHz) al analito, permite la absorción de energía y con ello la transición de los núcleos al estado cuántico magnético de mayor energía, una vez se deja incidir la radiación, los núcleos se relajan y es el fenómeno de relajación lo que proporciona una señal medible [Mlynárik 2017, Rhodes 2017, Skoog 2008], la frecuencia que absorbe un núcleo se ve afectado por el entorno químico, además los núcleos de 1H son los utilizados con mayor frecuencia para elucidar estructuras, sin embargo, también se utilizan los núcleos de ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P los cuales tienen un valor de espín igual a $\pm 1/2$. El espectro de RMN proporciona la siguiente información:

1. El número de señales permite categorizar los protones en distintos «tipos» de acuerdo a su equivalencia entre sí, para que protones cumplan esta característica, debe ser equivalentes estereoquímicamente.
2. El desplazamiento químico representado en unidades de ppm expresa la posición de la señal, el cual depende del entorno electrónico de cada tipo de protón.
3. La intensidad de las señales permite determinar de manera relativa la cantidad de protones de cada tipo existente en la estructura química.
4. El desdoblamiento de una señal permite obtener información del entorno de un protón con respecto a otros protones vecinos, este fenómeno se genera cuando existe el acoplamiento de espines y la señal resultante se presenta como un conjunto de señales [Morrison 1998].

1.1.7. Ensayo de dilución en caldo

El ensayo de dilución en caldo es un método de laboratorio, que permite la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de fármacos experimentales. La concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) se define como la concentración en la cual el agente antimicrobiano inhibe el crecimiento visible del microorganismo evaluado, el cual es expresado en unidades de $\mu g/mL$ o mg/L [Balouiri 2016]. El medio de cultivo utilizado como estándar es el medio Mueller-Hinton (MH). Los fármacos experimentales se deben encontrar en dilución, por lo que se recomienda utilizar agua, que actúa como solvente y diluyente, sin embargo, hay moléculas poco solubles que requieren solventes adicionales como alcoholes, buffer de fosfato y DMSO [Kowalska-Krochmal 2021]. El microorganismo que se haya seleccionado debe cumplir con ciertas condiciones como pertenecer a una misma

colonia, se debe incubar durante la noche y se debe encontrar en una suspensión estandarizada, esta suspensión se mide por medio de un densitómetro y se ajusta a una densidad de 0.5 McFarland, este valor es equivalente a una concentración de 1×10^8 CFU/mL bacterias en la suspensión [Kowalska-Krochmal 2021]. El ensayo consiste en la preparación de diluciones de distintas concentraciones del fármaco experimental preparados en tubos de un volumen mínimo de 2 mL, en los cuales se adiciona medio de crecimiento. A cada tubo se inocula con la suspensión estandarizada de bacterias, el cual debe contar con una concentración final de 5×10^5 CFU/mL. Las pruebas se dejan incubar de 16-18 h para estar dentro del rango en el que se encuentren mayor cantidad de bacterias vivas que muertas [Balouiri 2016].

Capítulo 2

Objetivos

2.1. General

Sintetizar posibles profármacos con actividad antimicrobiana derivados de ciprofloxacino, norfloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino, y realizar el seguimiento y caracterización por medio de métodos instrumentales.

2.2. Específicos

1. Realizar una síntesis de profármacos de ciprofloxacino, norfloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino.
2. Realizar el seguimiento de la síntesis y separar a los componentes de la mezcla de reacción por medio de HPLC.
3. Caracterizar los productos obtenidos por medio de las espectroscopias FTIR y RMN ^1H .
4. Evaluar la actividad antimicrobiana de los productos obtenidos.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron ciprofloxacino (Pharmalife), gemifloxacino (Factive-V), moxifloxacino (Crescrin), trietilamina (TEA) (Sigma Aldrich), cloruro de cinamoilo (Sigma Aldrich) de grado R.A., bicarbonato de potasio (J.T. Baker), acetonitrilo anhidro (Sigma Aldrich), metanol (MeOH) (Sigma Aldrich), diclorometano (DCM) (Sigma Aldrich), acetato de etilo (Sigma Aldrich), ácido fosfórico, para la caracterización por medio de RMN se utilizó DMSO deuterado (Sigma Aldrich). Para el ensayo de dilución en caldo, se utilizó medio Mueller-Hinton (BD Bioxon). El análogo de Norfloxacino fue sintetizado y caracterizado previamente en el Laboratorio 3E del Edificio A de la Facultad de Química de la UNAM, el cual se identificó como AN-4 y solo se realizó la evaluación antimicrobiana.

3.2. Equipos

Para el seguimiento de la reacción y la determinación de la pureza de los productos obtenidos se utilizó el equipo de HPLC marca Agilent, modelo 1220 Infinity II LC, equipado con una columna C18 de 15 cm, 5 μ m y detector UV de onda variable.

Para la elucidación estructural se utilizó el espectrofotómetro FTIR marca Agilent, modelo Cary 630 equipado con ATR; y un espectrofotómetro de resonancia magnética nuclear marca Magritek, modelo Spinsolve de 80 MHz.

3.3. Obtención de análogos de las fluoroquinolonas propuestas

3.3.1. Obtención de la base libre para ciprofloxacino y gemifloxacino

Para obtener los antibióticos aislados se pulverizaron 2 tabletas en un mortero hasta obtener un polvo fino, al cual se suspendió en 50 mL de agua destilada, y posterior se filtró para retirar los excipientes no solubles. Al líquido filtrado se le adicionó una solución de bicarbonato de potasio para precipitar los fármacos de interés, una vez la suspensión tuviera un pH neutro, se filtró la suspensión y se dejó secar por 24 h.

3.3.2. Análogo de Ciprofloxacino (AC-1)

La síntesis para la obtención del análogo de ciprofloxacino se muestra en la figura 3.1. Para la síntesis se utilizó 67.6 mg de ciprofloxacino aislado. Se utilizó un matraz bola de 10 mL al cual se le adicionó 5 mL de DCM y se disolvieron en el 1.1 eq de cloruro de cinamoilo y 1.2 eq de TEA, una vez se observó una solución homogénea se adicionó poco a poco el ciprofloxacino aislado y se dejó reaccionar por 24 h, a temperatura de 0°C, en atmósfera de nitrógeno y en constante agitación. Para detener la reacción se adicionó una gota de agua destilada.

Para el aislamiento de AC-1, se evaporó el DCM con nitrógeno, una vez evaporado en su totalidad, se disolvió el sólido obtenido en MeOH, posterior se adicionó agua destilada para formar una suspensión, el cual se filtró y el residuo obtenido se enjuagó con agua destilada. Se dejó secar por 24 h.

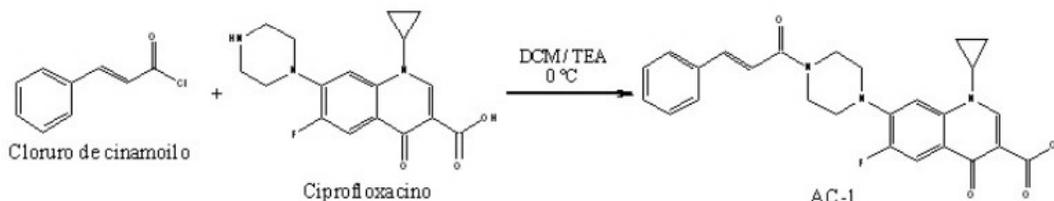


Figura 3.1: Reacción 1

3.3.3. Análogo de Moxifloxacino (AM-2)

La síntesis para la obtención del análogo de moxifloxacino se muestra en la figura 3.2. Para la síntesis se utilizó tableta pulverizada de moxifloxacino que contenía 109 mg de moxifloxacino. Se utilizó un matraz bola de 10 mL al cual se le adicionó 5 mL de AcN y se disolvieron en el 1.1 eq de cloruro de cinamoilo y 2 eq de TEA, una vez

se observó una solución homogénea, se adicionó poco a poco la tableta pulverizada y se dejó reaccionar por 24 h, a temperatura de 0°C, en atmósfera de nitrógeno y en constante agitación. Para detener la reacción se adicionó una gota de agua destilada.

Para el aislamiento de AM-2, se filtró el contenido del matraz bola y se enjuagó el matraz con AcN, posterior el líquido filtrado se expuso a nitrógeno gaseoso para evaporar el disolvente, una vez evaporado en su totalidad, se suspendió el sólido obtenido en agua destilada. Posterior se filtró y el residuo obtenido se enjuagó con agua destilada. Se dejó secar por 24 h. El polvo seco se disolvió en 20 mL de acetato de etilo y se realizó dos extracciones con 30 mL de agua destilada. Para evitar la formación de emulsión se le adicionó al agua 1g de Na_2SO_4 . La fase orgánica se secó con 1 g de Na_2SO_4 y se procedió a evaporar el disolvente.

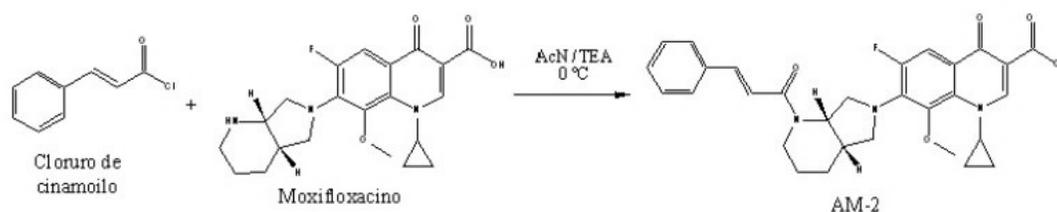


Figura 3.2: Reacción 2

3.3.4. Análogo de Gemifloxacino (AG-3)

La síntesis para la obtención del análogo de gemifloxacino se muestra en la figura 3.3. Para la síntesis se utilizó 100 mg de gemifloxacino aislado. Se utilizó un matraz bola de 10 mL, al cual se le adicionó 5 mL de DCM y se disolvieron en el 1.1 eq de cloruro de cinamoilo y 2 eq de TEA, posterior se adicionó poco a poco tableta pulverizada y se dejó reaccionar por 24 h, a temperatura de 0°C, en atmósfera de nitrógeno y en constante agitación. Para detener la reacción se adicionó una gota de agua destilada.

Para el aislamiento del AG-3, se filtró el contenido del matraz bola y se enjuagó el matraz con DCM, al líquido filtrado se adicionó agua destilada acidificada con una gota de ácido acético glacial, al líquido filtrado, se formó una suspensión la cual se filtró y se enjuagó con agua acidificada para mantener el ambiente a un pH ácido. Se dejó secar por 24 h.

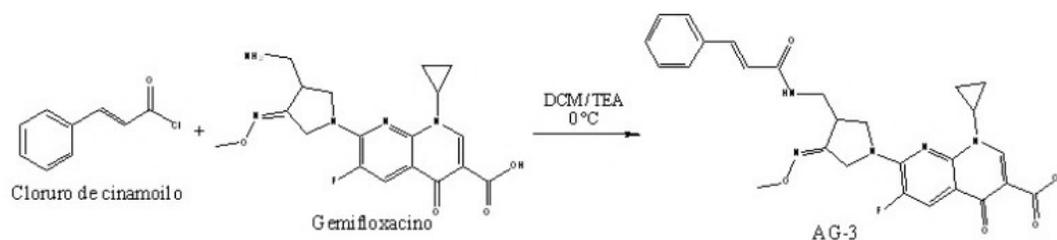


Figura 3.3: Reacción 3

3.4. Seguimiento y caracterización

3.4.1. HPLC

Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las siguientes:

1. Flujo a 1 mL/min, longitud de onda a 283 nm y presión a 400 bar
2. La fase móvil fue constituida por dos fase:
 - a) La fase A (FA) se conformó por 0.1 % de ácido fosfórico, 0.05 % de TEA y agua destilada
 - b) La fase B (FB) se conformó por metanol

La corrida cromatográfica se llevó a cabo como se muestra en la tabla 3.1

Tabla 3.1: Corrida cromatográfica en gradiente

Tiempo (min)	FA	FB
0	90	10
3	90	10
10	20	80
15	20	80
16	90	10
25	90	10

3.4.2. RMN

Los productos se disolvieron en DMSO deuterado para realizar la prueba en el equipo de RMN.

3.4.3. IR

Una vez que se verificó que el equipo se encontraba limpio, las muestras se colocaron en el porta muestras, el cual se limpió entre cada muestra con algodón.

3.4.4. Punto de fusión

Se colocó el producto a determinar su punto de fusión entre dos cubreobjetos circulares, los cuales se colocaron sobre la platina del equipo, se anotó la temperatura cuando el cambio de estado de agregación cambió.

3.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antibacteriana de los cuatro derivados obtenidos se utilizó la técnica por dilución en caldo. Debido a la poca solubilidad de los derivados obtenidos, se utilizó DMSO como disolvente para la preparación de las disoluciones stock de los derivados. La concentración de los stocks de los productos obtenidos fue de 1 mg/mL . A cada tubo de prueba se adicionó $50\ \mu\text{L}$ de DMSO como tensoactivo. Las concentraciones que se evaluaron de los compuestos van de $10\text{-}30\ \mu\text{g/mL}$, a excepción del análogo de ciprofloxacino que fue el que presentó mayor inhibición a concentraciones bajas (tabla 4.3). Se utilizó ciprofloxacino aislado como control positivo. La cepa bacteriana que se utilizó en el experimento fue la *E. coli* K12, proporcionada por la Unidad Periférica de Patogénesis Bacteriana de la Facultad de Medicina, el cual se estandarizó a 0.5 McFarland. El medio de cultivo utilizado fue Mueller-Hinton en caldo y el volumen final de las pruebas fue de 1 mL .

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Rendimiento de la síntesis y pureza de los productos

En la tabla 4.1 se presenta el rendimiento, el tiempo de retención y la pureza de los productos aislados. Como se puede observar los rendimientos de la síntesis propuesta para obtener AC-1 y AM-2 son bajos, por otro lado, la metodología que se utilizó para realizar la purificación de los productos presenta purezas altas lo cual, se consideró que existió pérdida de producto durante el proceso de purificación. En el caso del AG-3 el rendimiento de la síntesis presenta un valor del 63.71 %, siendo mayor en comparación de AC-1 y AM-2, sin embargo, la purificación del AG-3 presentó un valor de pureza menor del 90 %, lo cual no es recomendable para los estudios de elucidación estructural que demandan mayor pureza. En el Apéndice A se encuentran los cromatogramas de los productos aislados de los cuales se extrajo la pureza cromatográfica por medio de la estandarización de las áreas.

Tabla 4.1: Rendimientos, tiempos de retención (t_r) y pureza cromatográfica de los productos obtenidos

Producto	Rendimiento (%)	t_r (min)	Pureza Cromatográfica (%)
1	21.67	11.64	96.33
2	26.74	12.93	94.36
3	63.71	11.54	81.21

4.2. Caracterización de los productos

En la tabla 4.2 se muestran los puntos de fusión obtenidos, el AC-1 fue el que presento mayor punto de fusión, mientras que el AM-2 presentó menor punto de

fusión. Cabe destacar que los puntos de fusión de los compuestos son altos, lo cual permite manipular las moléculas a temperatura ambiente, sin que se vean afectadas.

Tabla 4.2: Características fisicoquímicas de los productos sintetizados

Clave	Formula	Peso molecular (g/mol)	Aspecto físico	Punto de fusión (°C)
AC-1	$C_{26}H_{24}FN_3O_4$	461.17	Polvo blanco	268
AM-2	$C_{30}H_{30}FN_3O_5$	531.58	Polvo amarillo claro	135
AG-3	$C_{27}H_{26}FN_5O_5$	519.53	Polvo beige claro	160
AN-4	$C_{25}H_{24}FN_3O_4$	449.17	Polvo blanco	257

En la figura B.1 del apéndice B se encuentra el espectro de FTIR del AC-1, en el cual se observa las señales de 3060cm^{-1} que corresponde a señales de H enlazado a C sp^2 , presentes tanto en los anillos aromáticos como en los alquenos presentes en la estructura, a 2000cm^{-1} se observan sobretonos de estructuras aromáticas. Las señales de 2920cm^{-1} y 2863cm^{-1} representan H enlazado a C sp^3 presentes en el grupo piperazina. Entre $3000\text{-}2250\text{cm}^{-1}$ se observa una señal ancha y poco intensa, causada por puentes de hidrógeno del ácido carboxílico presente en la estructura, esta señal se encuentra presente en el resto de los productos. En 1625cm^{-1} se identifica para el grupo carbonilo. Cabe destacar que no hay presencia de la señal que corresponde a H enlazado a N de aminas, lo que permite interpretar que la síntesis se realizó en esta zona.

En la figura C.1 del apéndice C, se encuentra el espectro de RMN H^1 , la señal de mayor interés en la que se encuentra a 15 ppm, debido a que representa el H-18 del ácido carboxílico de la estructura de ciprofloxacino, lo cual permite determinar que la sustitución nucleofílica no se realizó en esta posición. Adicionalmente, las señales entre 7-8 ppm presentes en el espectro, integran para nueve protones que corresponden a 2 protones aromáticos de la molécula del ciprofloxacino, además de los 5 protones del anillo aromático y 2 protones del alqueno, que están en la estructura del grupo cinamoilo,

En la figura B.2 del apéndice B se encuentra el espectro de FTIR del AM-2, en el cual cuenta con las señales claves similar con el espectro de AC-1. En 1310cm^{-1} se encuentra la señal de C-O perteneciente al metóxido de la estructura del moxifloxacino. La señal que corresponde a C-N se ubica a 1354cm^{-1} para la amina enlazada al anillo aromático y a 1310cm^{-1} para la amina enlazada a la cetona del grupo cinamoilo. Al igual que AC-1, no presenta señal de enlace H-N de aminas.

En la figura C.2 del apéndice C, se encuentra el espectro de RMN H^1 , en el cual presenta la señal clave a 15ppm del protón del ácido carboxílico. Las señales

presentes entre 7-8 ppm integran para nueve protones, por lo que representan las señales aromáticas del grupo cinamoilo y del anillo aromático del moxifloxacino.

En la figura B.3 del apéndice B se encuentra el espectro de FTIR del AG-3. A diferencia de los productos anteriores, el enlace entre gemifloxacino y el grupo cinamoilo forma una amida secundaria, la cual se observa en la banda a 3283 cm^{-1} . A 1718 cm^{-1} se correspondería a los grupos carbonilos presentes, mientras que a 1627 cm^{-1} corresponderían al enlace C=N. En 1045 cm^{-1} se encontraría el estiramiento de C-O del metóxido.

En la figura C.3 del apéndice C, se encuentra el espectro de RMN H^1 de AG-3, el cual también presenta la señal clave a 15 ppm. El protón de la amida se encuentra a 8.1 ppm. Entre 7.2 a 8 ppm se encuentra los protones aromáticos y H-6 pertenecientes al grupo cinamoilo, además se ubica H-13 a 7.3ppm que corresponde a el único protón de la piridina de la estructura del gemifloxacino. A diferencia de las moléculas anteriores, se encuentra una señal a 6.5 ppm que corresponde a H-7, el cual sufre un efecto de apantallamiento no solo por el anillo aromático cercano, sino también por el nitrógeno del grupo oxima.

4.3. Actividad antimicrobiana

Se consideró como referencia del 100% de crecimiento la absorbancia del control negativo, una vez calculado el porcentaje de crecimiento por diferencia de 100 se obtuvo el porcentaje de inhibición. En la tabla 4.3 se observa que el AC-1 presenta mayor actividad antimicrobiana a concentraciones más baja, en comparación de los demás productos obtenidos, esto se demuestra con la concentración de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, que presenta 60.3% de inhibición, mientras que el AM-2, AG-3 y AN-4 presentan un porcentaje de inhibición de 26.4%, 4% y 20.3% respectivamente. Por otro lado, el AG-3 es el segundo en tener mayor actividad, esto debido a que a $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ cuenta con una inhibición del 57.2%, en comparación con el AM-2 y AN-4, que a la misma concentración presentan inhibición del 44.3% y 41% respectivamente.

En el caso del AM-2 y AN-4, se observó que cuando se trataba de disolver en el medio MH, estos presentaban turbidez, lo que significó que los productos se precipitaron debido a que son muy poco solubles en medio acuoso. Para mejorar la solubilidad de estos dos compuestos, se optó por aumentar la cantidad de DMSO a la prueba, lo cual mejoró la actividad, sin embargo, se observó que una gran cantidad de DMSO, arrojó falsos positivos. En consecuencia, se mantuvo la cantidad de DMSO equivalente a AC-1 y AG-3. La actividad que presentaron fue semejante, puesto que el rango de inhibición de ambos se encontró entre 20-44%, por lo que se consideró como área de oportunidad proponer un método para la formación de la sal de los productos y/o el uso de un tensoactivo que permita una suspensión estable, en

el cual el compuesto de prueba pueda interactuar adecuadamente con la bacteria experimental.

Tabla 4.3: Actividad antimicrobiana de los productos obtenidos

Componente	Concentración de antibiótico ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Porcentaje de inhibición
Ciprofloxacino (control +)	20	100 %
Sin antibiótico (control -)	—	0 %
AC-1	2	33.2 %
	4	30.1 %
	6	57.2 %
	8	56.9 %
	10	60.3 %
AM-2	10	26.4 %
	15	38.0 %
	20	39.5 %
	25	40.7 %
	30	44.3 %
AG-3	10	4.0 %
	15	5.8 %
	20	7.6 %
	25	32.5 %
	30	57.2 %
AN-4	10	20.3 %
	15	27.5 %
	20	26.9 %
	25	33.8 %
	30	41 %

Capítulo 5

Metas alcanzadas y recomendaciones

Se lograron obtener los análogos propuestos a purezas favorables, sin embargo, los métodos de purificación involucraron pérdidas considerables, por lo que se recomienda buscar alternativas que permitan un proceso de purificación con las menores pérdidas posibles.

La metodología utilizada en el HPLC fue el adecuado, debido a que permitió evaluar la pureza de los análogos aislados.

Se logró obtener los espectros de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear de ^1H , lo cual permitió elucidar las estructuras, sin embargo, no se pudo obtener los espectros de ^{13}C , lo cual sería una prueba que se recomendaría realizar a futuro, así como incluir espectrometría de masas.

Por parte de la evaluación de la actividad antimicrobiana, los cuatro productos obtenidos cuentan con actividad antibacteriana la cual se ve afectada por la solubilidad de las moléculas, por lo que se recomienda formar la sal de los productos y/o el uso de un tensoactivo que permita mejorar la solubilidad de los productos.

5.1. Conclusión

Este proyecto de servicio social, presento cuatro moléculas que combinan el ácido cinámico y 4 fluoroquinolonas distintas, con la finalidad de incrementar la actividad farmacológica. Las moléculas AM-2 y AN-4 son moléculas poco solubles en medios acuosos, lo que dificultó la evaluación de la actividad antimicrobiana, además el uso de gran cantidad de DMSO dio falsos positivos durante las pruebas. Por otro lado, las moléculas AC-1 y AG-3, al ser moléculas que se solubilizaron con la cantidad suficiente de DMSO en el medio acuoso, permitió observar la actividad antimicrobiana de estas dos moléculas, sin embargo, la actividad no supera al antibiótico de control, por lo que sería necesario estudios futuros que logren aumentar la solubilidad de estos compuestos, con la finalidad de determinar si la actividad es dependiente de la

solubilidad, además pruebas que determinen sí el mecanismo de acción es similar al de las fluoroquinolonas.

Apéndice A

Cromatogramas de los productos

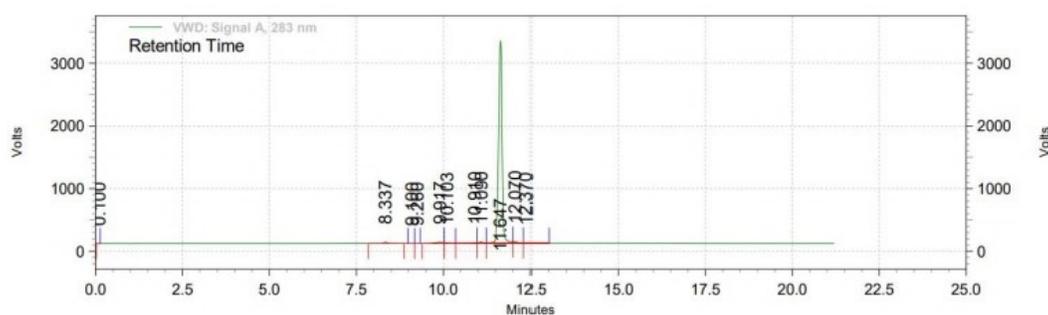


Figura A.1: Cromatograma de AC-1

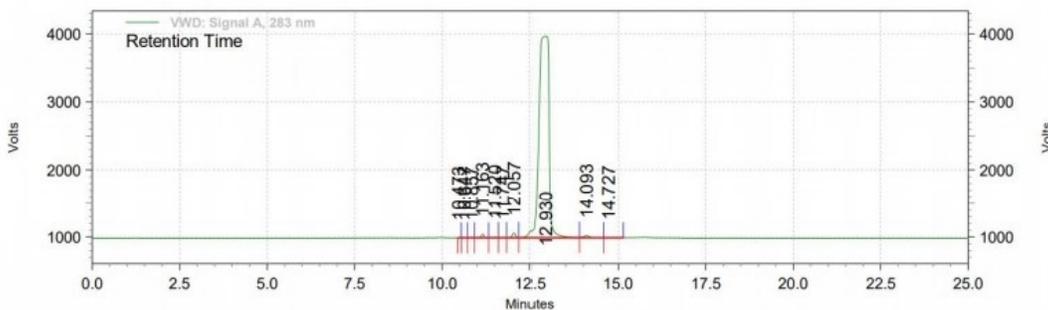


Figura A.2: Cromatograma de AM-2

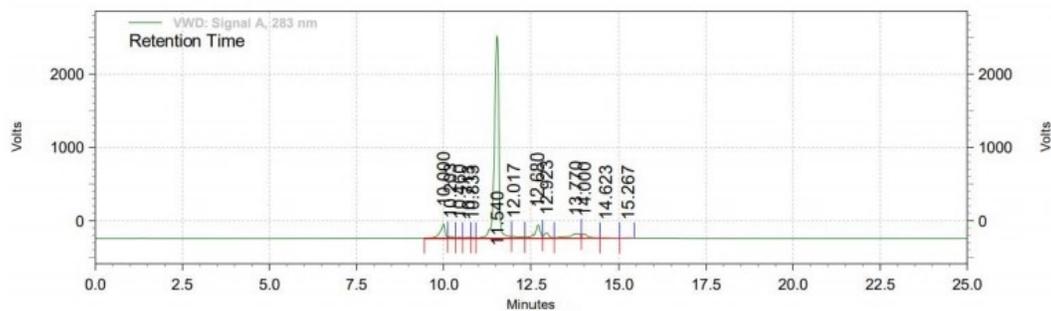


Figura A.3: Cromatograma de AG-3

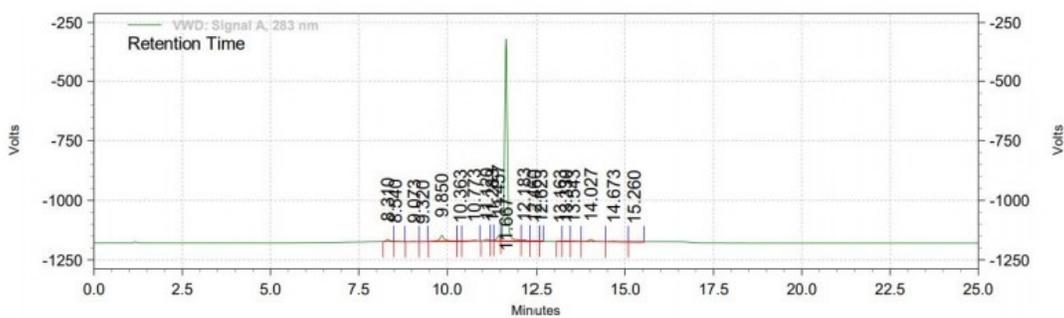


Figura A.4: Cromatograma de AN-4

Apéndice B

Espectros de FTIR de los productos

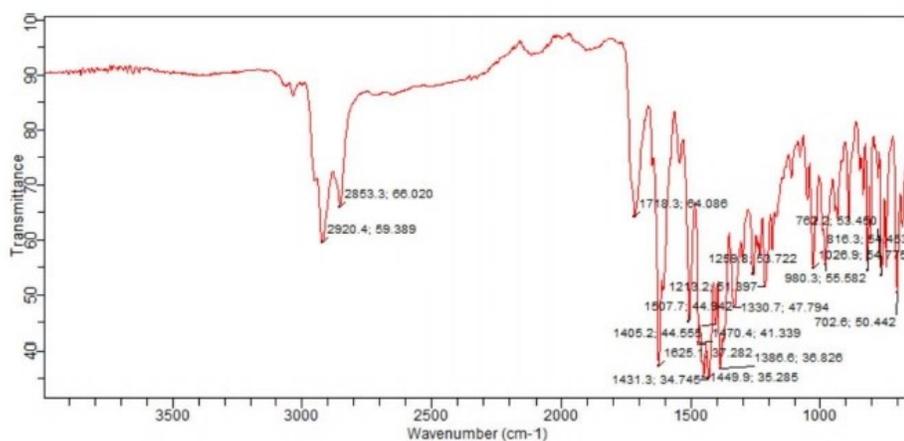


Figura B.1: FTIR del AC-1

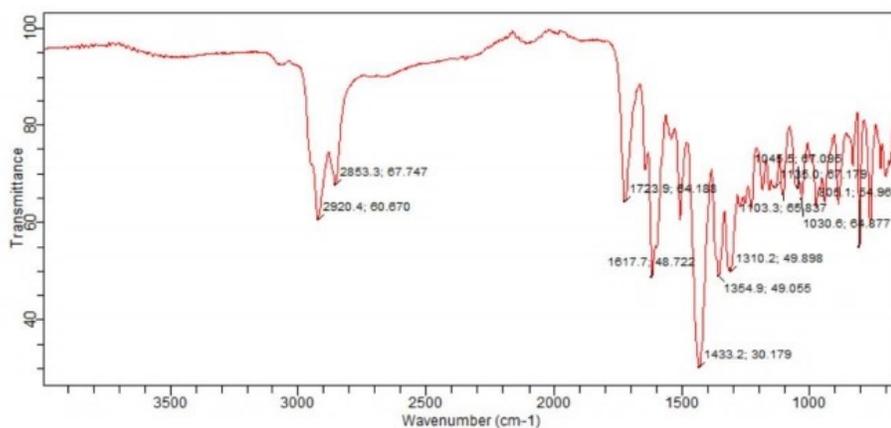


Figura B.2: IR AM-2

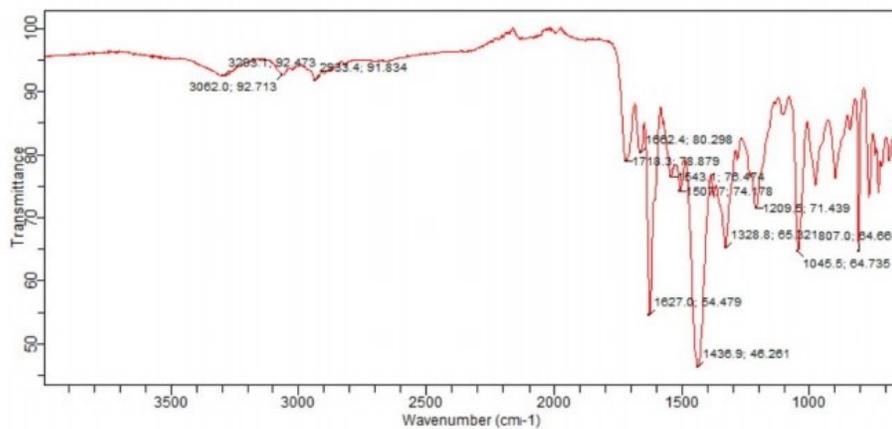


Figura B.3: IR AG-3

Apéndice C

Espectros de RMN de protón de los productos

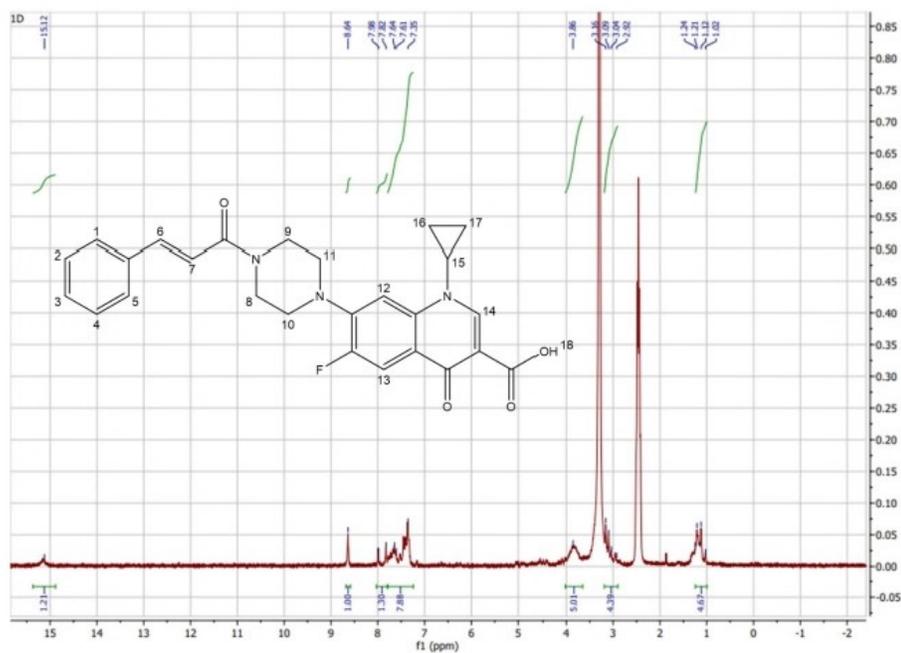


Figura C.1: RMN del AC-1

APÉNDICE C. ESPECTROS DE RMN DE PROTÓN DE LOS PRODUCTOS26

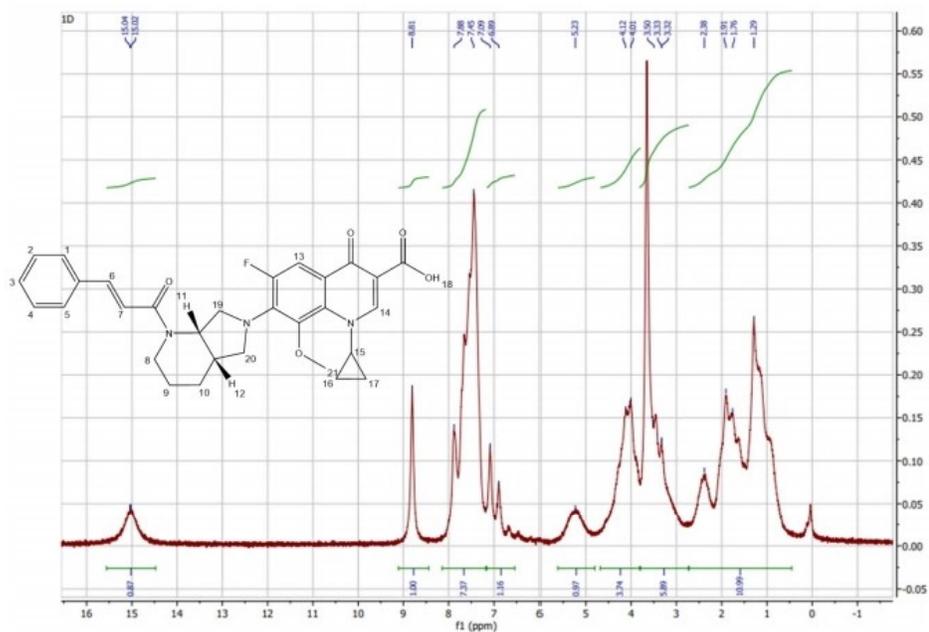


Figura C.2: RMN del AM-2

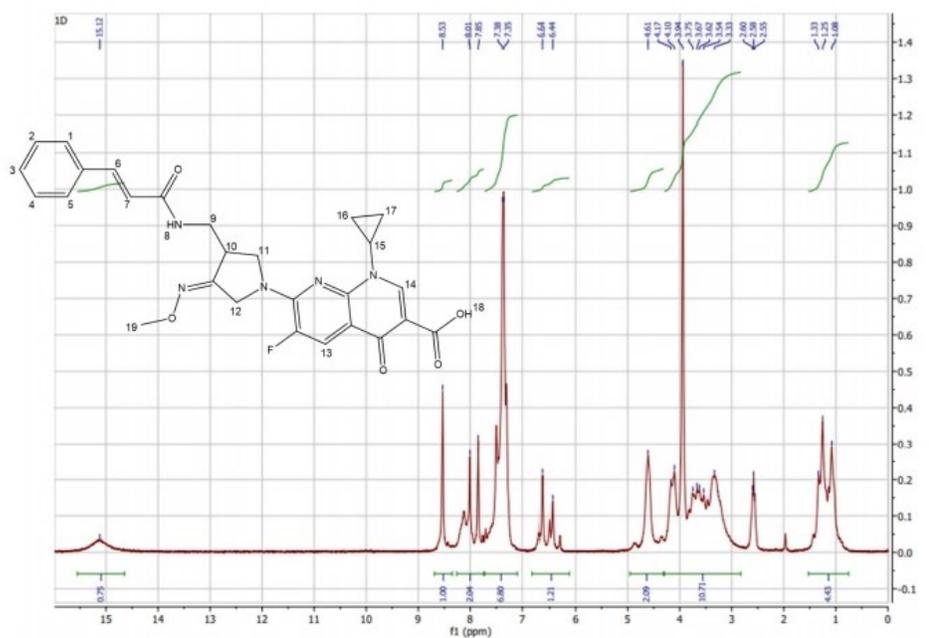


Figura C.3: RMN del AG-3

Bibliografía

- [Al Omari 2014] Al Omari, M. M. H., Jaafari, D. S., Al-Sou'od, K. A., & Badwan, A. A. (2014). Moxifloxacin Hydrochloride. In Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology (Vol. 39, pp. 299–431). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00007-6>
- [Balouiri 2016] Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. In Journal of Pharmaceutical Analysis (Vol. 6, Issue 2, pp. 71–79). Xi'an Jiaotong University. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- [Carrillo-Alduenda 2018] Carrillo-Alduenda JL., Flores-Murrieta FJ., Rodríguez-Alcocer AN., (2018) Actualización en la prescripción de fluoroquinolonas. Med Int Méx., 34(1):89-105. DOI: <https://doi.org/10.24245/mim.v34i1.1429>
- [Chierentin 2016] Chierentin, L., & Salgado, H. R. N. (2016). Review of Properties and Analytical Methods for the Determination of Norfloxacin. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 46(1), 22–39. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.941456>
- [CSG 2018] Consejo de Salubridad General (2018, 5 de junio) Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018
- [Dhaneshwar 2011] Dhaneshwar, S., Tewari, K., Joshi, S., Godbole, D., & Ghosh, P. (2011). Diglyceride prodrug strategy for enhancing the bioavailability of norfloxacin. Chemistry and Physics of Lipids, 164(4), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.03.006>

- [Guzman 2014] Guzman, J. (2014). Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules*, 19(12), 19292–19349. <https://doi.org/10.3390/molecules191219292>
- [Harris 2016] Harris, D. (2016) Análisis químico cuantitativo (3ra ed., V. Berenguer, trad.; A. Berenguer, trad.). Reverté
- [Kazakevich 2007] Kazakevich, Y., & LoBrutto, R. (2007). PART 1: HPLC THEORY AND PRACTICE. In *HPLC for pharmaceutical scientists* (pp. 1–22). John Wiley & Sons, Inc.
- [Kowalska-Krochmal 2021] Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- [Lungu 2022] Lungu, I. A., Moldovan, O. L., Biriş, V., & Rusu, A. (2022). Fluoroquinolones Hybrid Molecules as Promising Antibacterial Agents in the Fight against Antibacterial Resistance. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081749>
- [Mingoia 2022] Mingoia, M., Conte, C., di Rienzo, A., Dimmito, M. P., Marinucci, L., Magi, G., Turkez, H., Cufaro, M. C., del Boccio, P., di Stefano, A., & Cacciatore, I. (2022). Synthesis and Biological Evaluation of Novel Cinnamic Acid-Based Antimicrobials. *Pharmaceutics*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/ph15020228>
- [Mlynárik 2017] Mlynárik, V. (2017). Introduction to nuclear magnetic resonance. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 529, pp. 4–9). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.006>
- [Morrison 1998] Morrison, R. T., & Boyd, R. N. (1998). *Química orgánica*. Pearson Educación.
- [Murray 2022] Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeita, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G.,

- Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- [NCBI 2024] National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 9571107, Gemifloxacin. Retrieved May 20, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9571107>.
- [Piplani 2017] Piplani, M., Rajak, H., & Sharma, P. C. (2017). Synthesis and characterization of N-Mannich based prodrugs of ciprofloxacin and norfloxacin: In vitro anthelmintic and cytotoxic evaluation. *Journal of Advanced Research*, 8(4), 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.003>
- [Redgrave 2014] Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. In *Trends in Microbiology* (Vol. 22, Issue 8, pp. 438–445). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- [Rhodes 2017] Rhodes, C. J. (2017). Magnetic resonance spectroscopy. In *Science Progress* (Vol. 100, Issue 3, pp. 241–292). Science Reviews 2000 Ltd. <https://doi.org/10.3184/003685017x14993478654307>
- [Ru wizhi 2020] Ru wizhi, N., & Aderibigbe, B. A. (2020). Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 16, pp. 1–36). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21165712>
- [SEDESA 2023] Secretaría de Salud (2023) Resistencia a los Antimicrobianos. <https://www.salud.cdmx.gob.mx/conocemas/resistencia-los-antimicrobianos>
- [Shariati 2022] Shariati, A., Arshadi, M., Ali, M., Abedinzadeh, M., Ganjalishahi, M., Maleki, A., Heidary, M., & Khoshnood, S. (2022). The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1025633>

- [Sharma 2009] Sharma, P. C., Jain, A., & Jain, S. (2009). Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 66(6), 587–604.
- [Skoog 2008] Skoog, D., Holler, F., y Crouch, S., (2008) Principios de análisis instrumental (6ta ed. S. Cervantes, ed.; M. Bruna, trad.). Cengage
- [Sova 2012] Sova, M. (2012). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. In *Reviews in Medicinal Chemistry* (Vol. 12).