



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



ESTUDIO COMPARATIVO EN LA REACCIÓN DE COREY-CHAYKOVSKY PARA LA
OBTENCIÓN DE FENIL- (1-H-IMIDAZOIL) ETANOL Y SU EVALUACIÓN
BIOLÓGICA.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SILVIA CATHERINE RUIZ PÉREZ

DIRECTOR

DRA. MARIA PAULINA AYDEE GRACIA FUENTES BENÍTES

ASESOR EXTERNO

DRA. ALEJANDRA RAMÍREZ VILLALVA

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO; SEPTIEMBRE 2018

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, Dr. Carlos González Romero y M. en Ed. Q. Macario Morales Rodríguez, apoyado con el financiamiento otorgado por la Secretaria 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 DE LA SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE COMPUESTOS N-BENCIL IMIDAZOLES."

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Paulina Aydee Gracia Fuentes Benites por todo el apoyo que me otorgo y por aceptar ser mi directora de tesis.

A la Dra. Alejandra Ramírez Villalva, por su comprensión y motivación que me brindo a lo largo de la carrera y sobre todo durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Carlos González Romero por su ayuda y los consejos invaluables brindados durante de este trabajo y en clase.

Al M. en Ed. Q. Macario Morales Rodríguez, por su apoyo y ayuda durante la realización de las pruebas biológicas.

A la Dra. Fabiola Eloisa Jiménez Montejo y la Dra. María del Carmen Cruz López por apoyo en la obtención de las pruebas TROLOX TEAC usando DPPH en el instituto CIBA-IPN de Tlaxcala.

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 Departamento de Química Orgánica de la UAEMéx por permitirme trabajar en el laboratorio durante el Servicio Social y desarrollo del trabajo de tesis.

A mis compañeros de laboratorio Ricardo, Leonardo, David, Tania, Salvador, Carlos y Javier por brindarme su amistad y por su apoyo, lo cual me permitió realizar este proyecto.

DEDICATORIAS

A DIOS por permitirme llegar a este momento tan importante. Así mismo batallas que me ayudaron valorarte cada día más.

Romanos 11:36

A mi Madre por levantarme todos los días desde pequeña, para ir a la escuela, enseñarme de forma tan dura a ser constante y responsable, ten por seguro que esto es gracias a ti. No solo en tus palabras, si no en tus acciones de todos los días, por tu infinito amor, a pesar de todo lo que has vivido, la mujer más fuerte del mundo, tú me enseñaste a no darme por vencida, tu eres la causa de que a pesar de no estar siempre cerca, todos los días me levantara una vez más sin importar que dan difícil fuera.

A mi Padre porque a pesar de todo, no me cabe duda que Dios no se equivoca, te pone en el lugar correcto y con las personas correctas. Cuando pequeña muchas veces no entendí tu forma de pensar, ahora lo entiendo, me enseñaste mucho, me preparaste para los momentos difíciles, gracias por tus palabras de aliento y tus consejos; por ser ese papa que todos los días me recogía en la escuela y estaba siempre ahí, al pendiente de mí y mis hermanos, a pesar que muchas veces me enojaba por que no podía ir con mis amigos, lo extraño, lo extraño. Gracias por estar siempre ahí.

A mis hermanos, por estar ahí siempre, aunque peleemos y discutamos, a pesar de ser la mayor creo que me dieron más consuelo ustedes a mí que yo a ustedes, gracias por todos eso momentos de juego y compañerismo, por hacerme reír en los instantes menos oportunos pero también los más difíciles. LOS AMO

A mis abuelitos, por su apoyo incondicional, su bondad, por ser el pilar de toda la familia, gracias por creer en mí, por no dejarme dar por vencida, nunca olvidare esas palabras, *“No vayas a donde te lleve la corriente, ve a donde tú quieras ir”*, hoy llegue a donde quería ir y ustedes estuvieron ahí, gracias.

A la Sra. Irma, el Sr. Jesús y Omar, por adoptarme con tanto cariño, por darme un hogar, gracias por tanta bondad, por hacerme de la familia, siempre tratarme como una hija y una hermana.

A todos aquellos que siempre estuvieron ahí, familia, amigos, compañeros, Saetas de Dios, Morada de Paz, Glitter, con una charla, una salida después de un día difícil, risas y momentos divertidos, todos formaron parte de este camino. Gracias por sus vidas.

INDICE

ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	10
I. INTRODUCCION.....	12
II. MARCO TEORICO.....	14
2.1 Micosis.....	14
2.1.1 Candidiasis.....	14
2.1.2 Mucormicosis.....	15
2.1.3 Aspergilosis.....	16
2.1.4 Dermatofitos.....	17
2.2 Importancia de las micosis en México.....	19
2.3 Imidazoles.....	20
2.3.1 Mecanismo de Acción de antimicóticos imidazólico.....	21
2.4 Mecanismos de resistencia antifúngica.....	23
2.4.1 Mutación del gen ERG3.....	24
2.4.2 Mutación en el gen ERG11.....	24
2.4.3 Sobreexpresión de los genes CDR y MDR.....	24
2.5 Síntesis de epóxidos.....	25
2.5.1 Reacción de Corey- Chaykovsky.....	25
2.5.2 Reacción de epoxidación con peroxiácidos.....	26
2.5.3 Reacción de desplazamiento de las halohidrinás.....	26
2.6 Apertura de anillos de oxirano.	27
2.6.1 Ruptura catalizada por bases.....	27
2.6.2 Ruptura catalizada por ácidos.....	27
2.7 Importancia de alcoholes.....	29
2.8 Actividad antioxidante.....	30
2.9 Pruebas biológicas.....	32
2.9.1 Pruebas de sensibilidad a antimicóticos.....	32
2.9.1.1 Método de difusión en disco.....	33
2.9.1.2 Métodos comerciales.....	33
2.9.1.3 Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a antifúngicos.....	33
2.9.2 Pruebas de evaluación para la actividad antioxidante.....	35
2.9.2.1 DPPH.....	36
2.9.2.2 ABTS.....	36
III. OBJETIVOS.....	37

IV. JUSTIFICACIÓN.....	38
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
5.1 Síntesis orgánica.....	39
5.1.1 Obtención de epóxido con yoduro de trimetilsulfonio.....	39
5.1.2 Obtención de epóxido con yoduro de trimetilsulfoxonio.....	41
5.1.3 Síntesis del grupo benciloxifenetil, compuestos fenil-(1-H-imidazoil) etanoles.....	44
5.2 Pruebas biológicas.....	47
5.2.1 Sensibilidad antifúngica.....	47
5.2.1.1 Método de microdilución para levaduras (M27-A3).....	47
5.2.1.2 Método de microdilución en caldo M38-A para hongos filamentosos....	49
5.2.2 TROLOX TEAC usando DPPH.....	51
VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	54
6.1 SINTESIS ORGANICA.....	54
6.1.1 Obtención de epóxido con yoduro de trimetilsulfonio.....	56
6.1.2 Obtención de epóxido con yoduro de trimetilsulfoxonio.....	61
6.1.3 Síntesis del grupo benciloxifenetil, compuestos fenil-(1-H-imidazoil) etanoles.....	66
6.2 PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	74
6.2.1 Sensibilidad antifúngica.....	74
6.2.1.1 Método de microdilución para levaduras (M27-A3).....	75
6.2.1.2 Método de microdilución en caldo M38-A para hongos filamentosos.....	76
6.2.2 TROLOX TEAC usando DPPH.....	77
VII. CONCLUSIONES.....	78
VIII. REFERENCIAS.....	79
IX. ANEXO.....	84
10.1 IR del 2-(2,4-diclorofenil) oxirano.....	84
10.2 RMN ¹ H del 2-(2,4-diclorofenil) oxirano.....	84
10.3 RMN ¹³ C del 2-(2,4-diclorofenil) oxirano.....	85
10.4 RMN ¹ H del (2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol.....	85
10.5 RMN ¹⁴ C del (2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol.....	86
10.6 RMN ¹ H del (1H-imidazol-1-il)(4-metoxifenil) etanol.....	86
10.7 RMN ¹³ C del (1H-imidazol-1-il)(4-metoxifenil) etanol.....	87
10.8 RMN ¹ H del (3-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol.....	87

10.9 RMN ¹³ C del (3-clorofenil) (1H-imidazol-1-il) etanol.....	88
10.10 RMN ¹ H del (1H-imidazol-1-il) (4-(trifluorometil)fenil) etanol.....	88
10.11 RMN ¹³ C del (1H-imidazol-1-il) (4-(trifluorometil)fenil) etanol.....	89
10.12 RMN ¹ H del (4-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol.....	89
10.13 RMN ¹³ C del (4-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol.....	90
10.14 RMN ¹ H del (2-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol.....	90
10.15 RMN ¹ C del (2-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol	91
10.16 RMN ¹ H del (1H-imidazol-1-il)(tiofen-2-il) etanol.....	91
10.17 RMN ¹³ C del (1H-imidazol-1-il)(tiofen-2-il) etanol.....	92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los <i>N</i> -bencil imidazoles.....	10
Figura 2. Antimicótico de referencia y estructura base.....	13
Figura 3. Levaduras y seudofilamentos de <i>Candida</i> spp.....	15
Figura 4. Esporangio de un mucoral.....	16
Figura 5. Estructuras de reproducción asexual de <i>Aspergillus</i> sp.....	17
Figura 6. Macroconidios de <i>Trichophyton</i>	17
Figura 7. Macroconidios de <i>Microsporum</i>	17
Figura 8. Macroconidios de <i>Epidermophyton</i>	18
Figura 9. Estructura general de los <i>N</i> -bencil-imidazoles.....	20
Figura 10. Mecanismo de acción de diferentes antifúngicos.....	22
Figura 11. Mecanismos de resistencia en <i>C. albicans</i>	23
Figura 12. Reacción antioxidante a nivel biológico.....	31
Figura 13. Diagrama de flujo de M27-A3 y M38-A.....	34
Figura 14. Diagrama de flujo de M27-A3 y M38-A.....	35
Figura 15. Reacción química para ABTS.....	36

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntesis lineal de fenil-(1-H-imidazoil) etanoles.....	11
Esquema 2. Mecanismo de acción de Corey Chaykovsky.....	25
Esquema 3. Mecanismo de acción con peroxiácidos.....	26
Esquema 4. Formación de epóxidos a partir de halohidrinas.....	26
Esquema 5. Apertura de oxiranos en medio básico.....	27
Esquema 6. Apertura de oxiranos en medio ácido.....	27
Esquema 7. Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante.....	31
Esquema 8. Reacción de Corey-Chaykovsky usando yoduro de trimetilsulfonio.....	39
Esquema 9. Formación de 2-(4-metoxifenil) oxirano usando yoduro de trimetilsulfonio.....	40
Esquema 10. Reacción de Corey-Chaykovsky usando yoduro de trimetilsulfoxonio....	41
Esquema 11. Formación de 2-(4-metoxifenil) oxirano usando yoduro de trimetilsulfoxonio.....	42
Esquema 12. Síntesis del grupo benciloxifenetil.....	44
Esquema 13. Apertura del epóxido.....	45
Esquema 14. Compuestos fenil (1-h-imidazoil) etanoles evaluados.....	47
Esquema 15. Compuestos fenil (1-H-imidazoil) etanoles evaluados.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacciones comunes a partir de alcoholes.....	29
Tabla 2. Desplazamiento químico del 2-(2,4-diclorofenil) oxirano (7) para RMN de ^1H y ^{13}C en ppm (multiplicidad y J en Hz).....	43
Tabla 3. Comparación de rendimientos de compuestos fenil-(1-h-imidazoil) etanoles.....	46
Tabla 4. Pruebas de sensibilidad para <i>Candida spp</i> , determinación de la CMI.....	48
Tabla 5. Pruebas de sensibilidad para hongos filamentosos, determinación de la CMI.....	49
Tabla 6. Porcentaje de reducción de los compuestos fenil (1-H-imidazoil).....	52
Tabla 7. Porcentaje de reducción del compuesto D.....	53
Tabla 8. Datos de la curva a concentración contra porcentaje de reducción.....	53

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Pruebas de sensibilidad para <i>Candida spp</i> , determinación de la CMI.....	48
Grafica 2. Pruebas de sensibilidad para hongos filamentosos, determinación de la CMI.....	50

ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
AcOEt	Acetato de etilo
MCPBA	Ácido meta-cloroperbenzoico
ABAP	Advanced Business Application Programming (Programación avanzada de aplicaciones comerciales)
ATCC	American Type Culture Collection (Colección estadounidense de cultura tipográfica)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
J	Constante de acoplamiento
CCF	Cromatografía en capa fina
δ	Desplazamiento químico
δ_c	Desplazamiento químico de Carbono
δ_H	Desplazamiento químico de hidrógeno
DMPD	Dimetil-4-fenilenediamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
EM	Espectrometría de masas
EUCAST	European Society of Clinical Microbiology and infectious Diseases (Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas)
Rf	Factor de retención
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Drogas)
g	Gramo
h	Hora
IR	Infrarrojo
μg	Microgramos
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MLC	Moléculas
ppm	Partes por millón
Pf	Punto de fusión
QSAR	Quantitative structure-activity relationship (Relación

	cuantitativa estructura-actividad)
R	Resistente
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹³ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RPMI	Medio Roswell Park Instituto Memorial
S	Sensible
SDD	Sensible dependiente la dosis
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
t.a.	Temperatura ambiente
UFC	Unidad Formadora de Colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

Evitar el aumento de enfermedades fúngicas ha sido una tarea de gran importancia en los últimos años, con lo cual continúa el desarrollo de nuevos antifúngicos con un mayor espectro de acción. Para llevar a cabo la síntesis de estos compuestos, es muy importante tener en cuenta los estudios de relación de su estructura química con su función biológica (QSAR). Los alcoholes (-OH) son grupos muy versátiles en la química orgánica, ya que pueden transformarse en muchos otros grupos funcionales.

El presente trabajo llevó a cabo la síntesis de *N*-bencil imidazoles (Figura 1), utilizando grupos halógenos que pueden presentar actividad biológica.

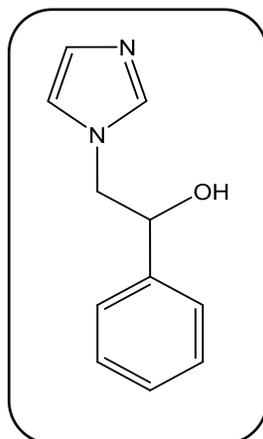
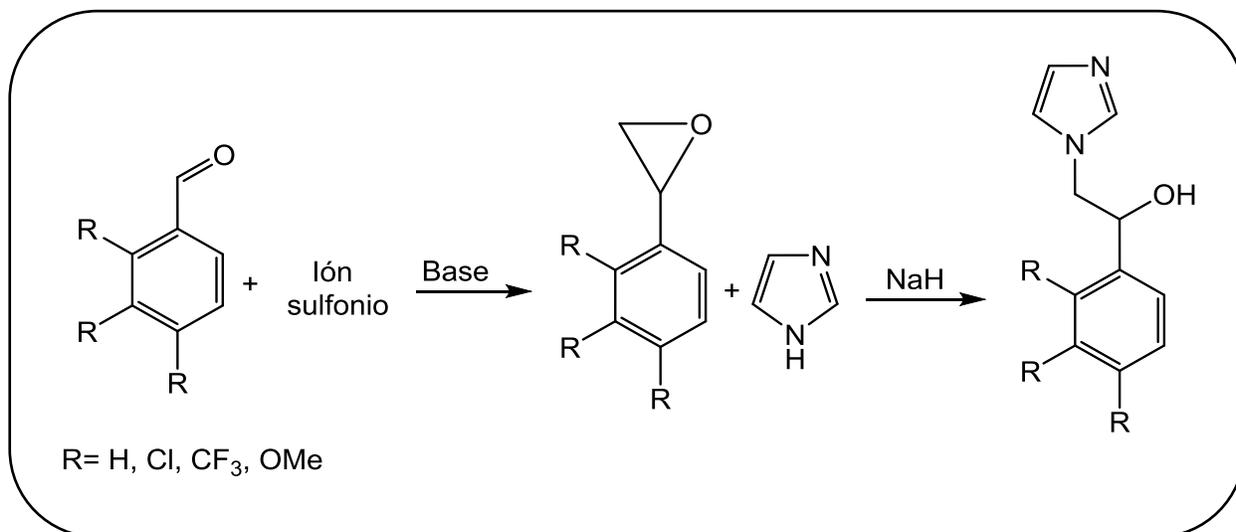


Figura 1. Estructura de los *N*-bencil imidazoles

Se utilizó como materia prima el 1*H*-imidazol, así como aldehídos aromáticos halogenados (Esquema 1) en la reacción de Corey-Chaykovsky comparando el rendimiento de la reacción con el uso de yoduro de trimetilsulfonio y/o yoduro de trimetilsulfoxonio; donde se observó mejor rendimiento con el uso de trimetilsulfonio.

Las estructuras de los compuestos obtenidos fueron identificadas con ayuda de técnicas espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C).



Esquema 1. Síntesis lineal de fenil-(1-H-imidazoil) etanoles.

Los compuestos sintetizados fueron evaluados *in vitro* contra cuatro hongos filamentosos (*Mucor hiemalis* ATCC 8690, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16907, *Trichosporon cutaneum* ATCC 28592 y *Rhizopus oryzae* ATCC 10329) y levaduras del género *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. utilis* ATCC 9226, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 14243, *C. glabrata* ATCC 34138 y *C. parapsilosis* ATCC 22019), por medio del método de microdilución en caldo descrito por el CLSI. En donde se puede notar que los compuestos clorados presentan mejor actividad tanto a cepas de hongos filamentosos, como levaduras.

Los resultados obtenidos dan pie a que los compuestos con mejores resultados puedan ser sometidos a reacciones de transformación del grupo hidroxilo para incrementar su actividad antifúngica y de esta manera obtener moléculas más específicas frente a ciertos tipos de especies.

Además, estos mismos compuestos se evaluaron por medio de pruebas TROLOX TEAC usando DPPH, ensayo del cual se puede destacar que la molécula con mayor actividad antioxidante fue la sustituida por fluor.

I. INTRODUCCION

En las últimas tres décadas las infecciones fúngicas por microorganismos no descritos, así como los ya conocidos han causado severos problemas, ya que su presencia como causantes de infección ha aumentado de manera sobresaliente, siendo los hongos de bajo potencial patógeno como *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Geotrichum* los responsables más frecuentes¹.

Los compuestos imidazólicos son un grupo de antimicóticos que han aumentado su importancia debido a que el tratamiento de las micosis se ha complicado significativamente, ya que la mayoría de los hongos levaduriformes y filamentosos han causado resistencia a los antimicóticos comerciales^{2,3}.

Muchos compuestos sintetizados que contienen el anillo imidazólico exhiben gran actividad biológica por lo que han ganado interés debido a sus propiedades inhibidoras de la *B*-lactamasa, 20 HETE, carboxipeptidasa, hemoxygenasa; antifúngicos, antibacterianos, anticoagulantes, antiinflamatorios, antivirales, antituberculosos, antidiabéticos y antimalarios; incluso otras búsquedas han demostrado que los derivados de imidazoles tienen actividad antitumoral^{4,5,6}.

En el siglo XX se comenzó la síntesis de antimicóticos; el miconazol, itraconazol y fluconazol y sus análogos poseen un grupo benciloxifenetil sobre el nitrógeno del imidazol (Figura 2). El benciloxifenetil es uno de los grupos que otorga las propiedades antifúngicas inhibiendo la síntesis de ergosterol, destruyendo la composición de la membrana lipídica^{6,7}.

El objetivo de este trabajo fue sintetizar moléculas con posible actividad biológica. Por lo cual, en este proyecto se llevó a cabo la síntesis de la estructura base de antifúngicos comerciales, como el miconazol, modificando diversos grupos con la finalidad de aumentar la actividad biológica. Esto se logró por medio de la reacción de Corey-Chaykovsky como primer paso, y posteriormente una apertura básica del epóxido.

Posteriormente se realizaron las pruebas biológicas utilizando métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a antifúngicos, siendo el método de microdilución para levaduras (M27-A3) y el método de microdilución en caldo para hongos filamentosos (M38-A). Además se utilizó la metodóloga TROLOX TEAC usando DPPH como prueba de evaluación para la actividad antioxidante.

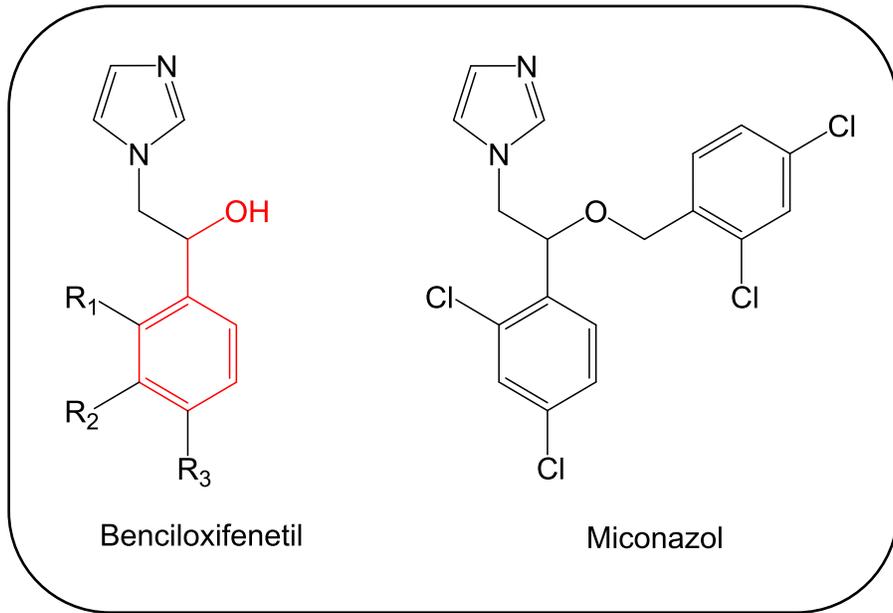


Figura 2. Antimicótico de referencia y estructura base.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Micosis

Las micosis son infecciones causadas por hongos que afectan a cualquier tejido, que presentan una sintomatología variada, cuadros clínicos leves, moderados o graves, que en ocasiones conducen a la muerte; afectan a cualquier edad, sexo, condición socioeconómica y comparten con las infecciones parasitarias, bacteriológicas y virales la misma importancia médica. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, las micosis se clasifican en superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas^{8,9}.

El diagnóstico definitivo de micosis requiere la confirmación histológica junto a la presencia de otros criterios microbiológicos o serológicos. A los pacientes que reciban tratamiento crónico con corticoides, se les debería de proporcionar información acerca de cómo prevenir el contacto con fuentes medioambientales del hongo en cuestión. En el tratamiento de las micosis, en especial las oportunistas es primordial la eliminación de los factores predisponentes.

Los hongos son células eucarióticas, por lo cual es más difícil inhibir vías metabólicas que afecten únicamente a la célula fúngica sin afectar a las células humanas; por esta razón la cantidad de drogas antifúngicas es escasa comparada con los antibióticos. Usualmente como tratamiento sistémico se puede utilizar fluconazol, itraconazol y ketoconazol; en pacientes recurrentes se recomienda el uso de anfotericina B. En manifestaciones cutáneas suele utilizarse cremas a base de imidazoles^{10, 11, 12, 13}.

2.1.1 Candidiasis

Candida sp es una levadura que forma parte de la biota de superficies mucosas dentro del cuerpo humano, todas las especies se desarrollan como células levaduriformes ovaladas que forman yemas o blastoconidios (Figura 3)¹. Aproximadamente un 15% de todas las especies del genero *Candida* que se conocen, son patógenas para el hombre^{14, 15}.

La candidiasis invasiva es una importante infección nosocomial debido al uso extensivo de agentes antifúngicos profilácticos, agentes antibacterianos de amplio espectro, dispositivos médicos así como la inmunosupresión que pueda presentar el paciente⁹. El paciente críticamente enfermo está predispuesto a una infección por *Candida* ya que padece alteraciones intrínsecas del sistema de defensa, como desnutrición, ayuno

prolongado, traslocación intestinal, depresión medular con neutropenia o traumatismo mayor¹⁷.

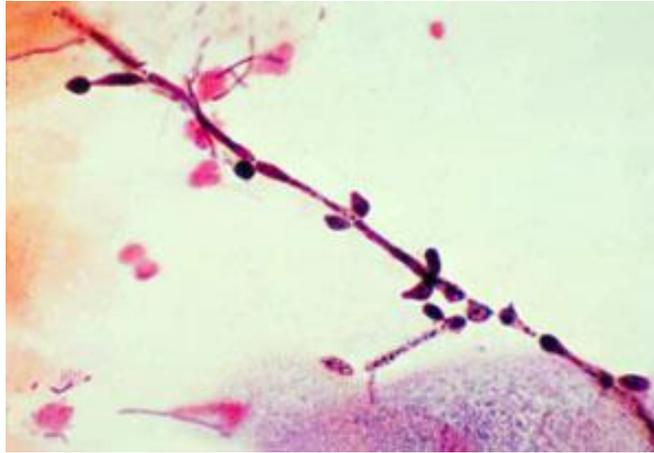


Figura 3. Levaduras y seudofilamentos de *Candida spp.*
Imagen: CDC/Dr. Stuart Brown

La candidiasis es la micosis que más se presenta en todo el mundo, representando el 25% de las micosis superficiales, aumentan el riesgo de muerte, extienden la estancia hospitalaria y elevan los costes, generando un problema importante de salud pública^{18,19}.

6.2.1 Mucormicosis

Es una micosis oportunista causada por algunos mohos clasificados en el orden de los Mucorales de la clase Zigomicetos. Estos hongos son saprofitos ubicuos termotolerantes. Las condiciones que sitúan al paciente en riesgo incluyen la acidosis, en especial la asociada a diabetes mellitus, las leucemias, linfomas, tratamientos con corticosteroides, quemaduras graves, inmunodeficiencias, así como la diálisis con el quelante de hierro deferoxamina^{20,21}.

La principal variante clínica es la mucormicosis rinocerebral, como resultado de la germinación de esporangiosporas (Figura 4) en los conductos nasales siendo angioinvasivo provocando trombosis con infarto isquémico secundario y necrosis hemorrágica debido a la invasión de venas y vasos linfáticos. La enfermedad puede progresar con rapidez para invadir los senos paranasales, ojos, huesos craneales y cerebro.

Los vasos sanguíneos y nervios sufren daño, y los pacientes desarrollan edema de la región facial afectada, exudado sanguinolento nasal y celulitis orbital. Después de inhalar

las esporangiosporas sobreviene mucormicosis torácica con invasión del parénquima y los vasos pulmonares. En ambas localizaciones la necrosis isquémica causa destrucción masiva de tejido debido a su diseminación^{20, 22, 23}.

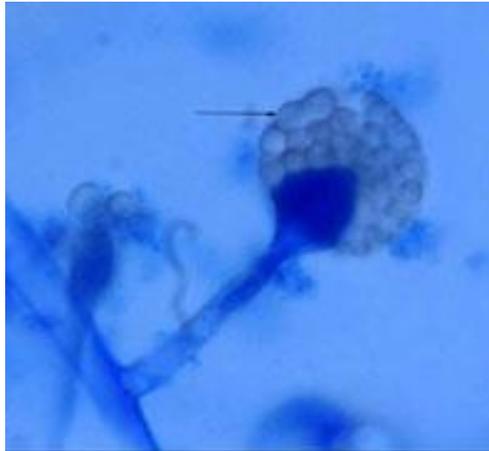


Figura 4. Esporangio de un mucoral.
Imagen: Dr. Luis Javier Méndez Tovar.

2.1.3 Aspergilosis

Las especies de *Aspergillus* son saprofitos ubicuos en la naturaleza, siendo la Aspergilosis una micosis cosmopolita. El *A. fumigatus* es el causante del 90% de infecciones de aspergilosis en humanos, pero muchos otros como *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*, pueden causar enfermedad. El pulmón es el principal órgano afectado por el *Aspergillus* debido a la alta capacidad esporulativa de este hongo, y a que sus conidias (Figura 5) son lo suficientemente pequeñas para poder alcanzar el alveolo^{20, 24}.

Normalmente después de inhalar los conidios, una vez en los pulmones, los macrófagos alveolares pueden ingerir y destruir los conidios, en el caso de personas atópicas casi siempre desarrollan reacción alérgica grave a los antígenos conidiales. En los pacientes inmunodeficientes, sobretodo con leucemia, con trasplantes de medula ósea y personas a quienes se administran corticosteroides muestran menor capacidad para detener al inoculo. En el pulmón el conidio aumenta de volumen y germina para producir hifas que tienden a invadir las cavidades preexistentes o los vasos sanguíneos^{20, 25}.

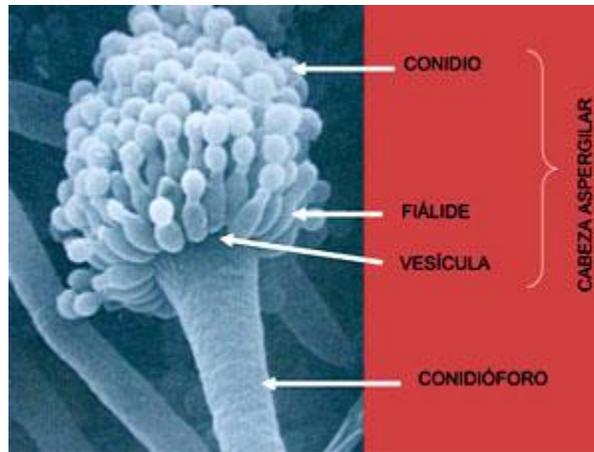


Figura 5. Estructuras de reproducción asexual de *Aspergillus sp.* Imagen: Dr. Luis Javier Méndez Tovar.

2.1.4 Dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo de casi 40 hongos pertenecientes a tres géneros, *Trichophyton* (Figura 6), *Microsporum* (Figura 7) y *Epidermophyton* (Figura 8). Estos son incapaces de crecer a 37° o en presencia de suero. La infección superficial causada por dermatofitos se denomina dermatofitosis, la cual puede ser causada por cualquier de las 40 especies de los géneros de dermatofitos. Tiña es un término utilizado como sinónimo de dermatofitosis. Su prevalencia es mayor en regiones con climas cálidos y húmedos. Las infecciones se encuentran con mayor frecuencia en los niños preadolescentes y pueden ser endémicas en los países en desarrollo²⁰.



Figura 6. Macroconidios de *Trichophyton*.
Imagen: <http://www.facmed.unam.mx>



Figura 7. Macroconidios de *Microsporum*.
Imagen: <http://www.facmed.unam.mx>



Figura 8. Macroconidios de *Epidermophyton*.

Imagen: <http://www.facmed.unam.mx>

Estos hongos solo afectan el tejido queratinizado, es decir, infectan estructuras como estrato córneo de la piel, uñas y pelo. Normalmente se inician en la piel después de un traumatismo y por contacto con suelo, humanos, animales contaminados o fomites. Dependiendo del género y especie del microorganismo en cuestión el conidio puede permanecer viable durante un tiempo prolongado^{20, 26}.

Los dermatofitos causan patología cutánea por:

- a) infección primaria de la piel y anexos, que de acuerdo a la zona comprometida se denominan tiñas de la cabeza, del cuerpo, inguinal, de las manos, de los pies y uñas.
- b) Una reacción de hipersensibilidad que se presenta por lesiones distantes del foco infeccioso llamada reacción tipo "ide" o "dermatofitides" y que ocurre por la entrada a la circulación de alérgenos en el foco primario. La más frecuente es una "ide" de las manos, en que se presenta una erupción vesicular secundaria a una tiña de los pies²⁷.

El diagnóstico clínico puede confirmarse mediante examen microscópico o cultivo. Los exámenes de luz de Wood también son un método útil, haciendo que la zona infectada aparezca en un color verdoso fluorescente, excepto en tinea favosa y tiña microsporica donde esta no se vuelve fluorescente²⁸.

A pesar de ser persistentes y problemáticas, no representan peligro para la vida, sin embargo se gastan millones en su tratamiento debido a su alta prevalencia alrededor del mundo²⁰.

2.2 Importancia de las micosis en México

Aquellas infecciones que se presentan fundamentalmente en huéspedes inmunocomprometidos con disfunción de mecanismos de defensa básicos se les denomina oportunistas, siendo infecciones causadas por microorganismos que se encuentran como biota normal del organismo y en el ambiente. La frecuencia de infecciones en esta población dependerá del tipo de inmunocompromiso, siendo los pacientes con neutropenia (Oncológicos o VIH-Positivos) los que desarrollan infecciones por bacterias extracelulares no encapsuladas y hongos levaduriformes y filamentosos; el diagnóstico precoz, aunado a tratamiento oportuno y eficaz de las mismas son considerados una emergencia por su severidad y gran mortalidad asociada. En el inicio de la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida la incidencia global de infecciones oportunistas alcanzo entre el 60% de los pacientes VIH-positivos, mientras que en México hubo una frecuencia muy similar^{29, 30, 31}.

En los últimos 25 años la morbilidad de las infecciones fúngicas ha cambiado; debido a la aparición de hongos menos frecuentes así, como de organismos emergentes, añadido al aumento de pacientes con características predisponentes³².

En junio de 1999 a mayo de 2000 se realizó un estudio de tipo observacional transversal procesando 268 especímenes, provenientes de 108 pacientes inmunosuprimidos internados en el Hospital Regional "General Ignacio Zaragoza" del ISSSTE, de los cuales se obtuvieron 249 cultivos: 183 levaduriformes y 66 filamentosos. Se diagnosticaron 45 micosis que en su mayoría correspondieron a candidosis pulmonar³³. En la actualidad, la frecuencia de las infecciones micóticas oportunistas continua aumentando de manera progresiva; favorecida por un gran número de factores ligados principalmente a procedimientos terapéuticos, como el uso indiscriminado de medicamentos y otros procedimientos clínicos.

En México histoplasmosis, coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis, son las micosis sistémicas que se presentan con mayor frecuencia, mientras que de las dermatofitosis, micosis superficiales son las frecuentes en México; actualmente constituyen del 70 al 80% de todas las micosis y tienen una frecuencia del 5% en la consulta dermatológica^{34, 35}.

2.3 Imidazoles

Los imidazoles son compuestos planos, heterocíclicos de cinco miembros, 3C y 2N. Estos compuestos han ocupado un lugar en el ámbito de la investigación debido a sus versátiles propiedades químicas y farmacológicas. Al poseer un anillo con nitrógeno le brinda propiedades farmacológicas importantes.

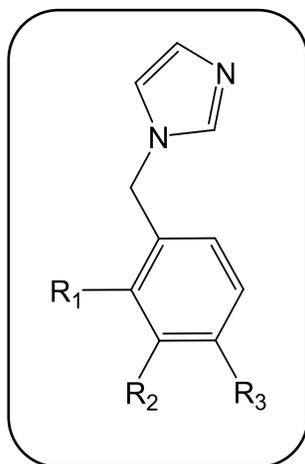


Figura 9. Estructura general de los *N*-bencil-imidazoles

Los anillos de imidazoles son núcleos base que constituyen muchos productos naturales como lo son las purinas, histamina y ácidos nucleicos. La característica de ser un compuesto aromático ionizable le brinda propiedades farmacocinéticas permitiendo que posean una buena solubilidad y biodisponibilidad³⁶.

El imidazol en conjunto con el grupo bencilo se considera un grupo farmacóforo el cual se define como *N*-bencil-imidazoles (Figura 9), grupo que tiene una serie de rasgos estructurales en la molécula que le permiten ser reconocidas en un sitio receptor, la cual es responsable de la actividad biológica de la molécula y debe reunir las siguientes características: Contener átomos de nitrógeno básicos, anillos aromáticos, ser hidrofóbico y capaz de formar puentes de hidrógeno^{37, 38}.

2.3.1 Mecanismo de Acción de antimicóticos imidazólico

Pacientes con cáncer, SIDA o hepatitis en tratamiento, son pacientes inmunodeprimidos presentando con mayor frecuencia infecciones fúngicas oportunistas, y debido a que son enfermos con factores predisponentes son difíciles de tratar independientemente de que la cepa causante sea o no, sensible a los antifúngicos. Las infecciones por hongos del género *Candida* y *Aspergillus*, son las más importantes en cuanto a frecuencia y morbilidad en la práctica hospitalaria³⁹.

En los últimos años se ha observado la aparición de nuevas especies patógenas, la prescripción insensata de antimicóticos y el aumento de las dosis terapéuticas, lo cual ha provocado un incremento en la falla de tratamientos con antimicóticos. Esta situación ha conllevado a la comercialización de varios antifúngicos o modificaciones significativas en el tratamiento de las micosis, como repetir el tratamiento o combinar medicamentos, es por eso que se siguen buscando nuevas moléculas que permitan aumentar las alternativas terapéuticas⁴⁰.

Los compuestos azólicos al ser una estructura rica en electrones, da lugar a derivados basados en azoles que se unen fácilmente con las enzimas⁴¹. Por esto actualmente el farmacóforo de azol se considera una estructura viable para la síntesis de agentes antimicrobianos más eficaces y con un amplio espectro. Se encuentran posibles actividades antibacterianas y antifúngicas con algunos tetrazoles⁴².

Los antifúngicos azólicos, caracterizados por poseer un anillo imidazólico de 2 o 3 nitrógenos, actúan inhibiendo la **enzima 14- α -desmetilasa** impidiendo la conversión de lanosterol en ergosterol al formar un complejo del azol con una parte del citocromo *P-450* del hongo. Produciendo una alteración en la membrana citoplasmática provocando la acumulación de peróxidos impidiendo el crecimiento del hongo⁴³. Un ejemplo importante de este tipo de fármacos es el miconazol, el cual tiene un amplio espectro antifúngico in vitro y es muy conocido por su uso en tratamiento para infecciones dermatofíticas⁴⁴.

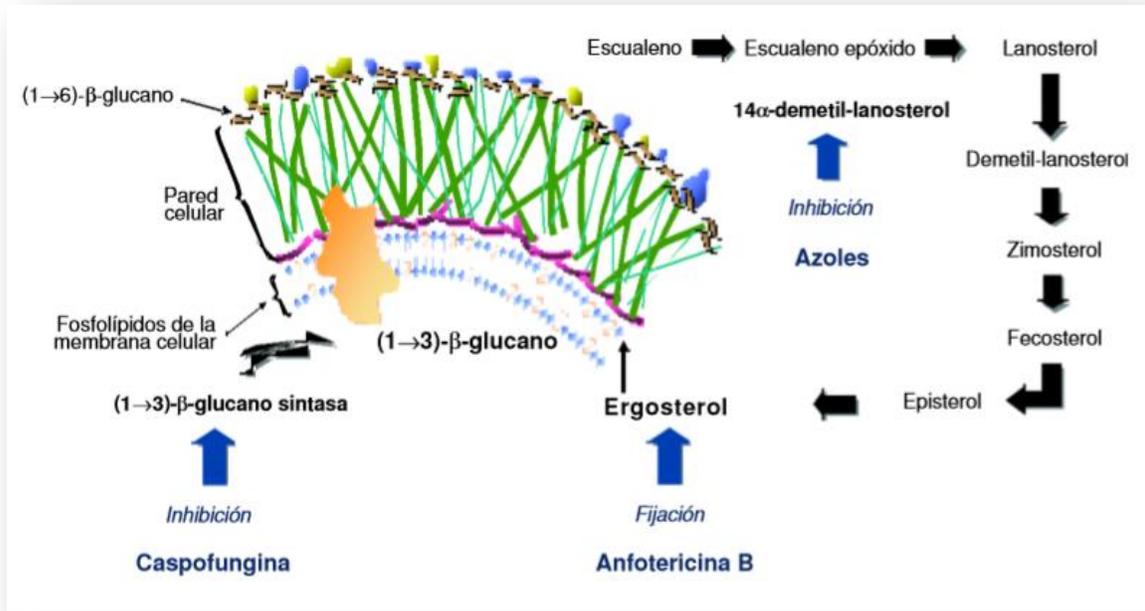


Figura 10. Mecanismo de acción de diferentes antifúngicos.
 Imagen: Graciana Escarcega

2.4 Mecanismos de resistencia antifúngica.

La resistencia microbiológica, en este caso antifúngica, es cuando el crecimiento del microorganismo patógeno es inhibido a una concentración más alta observado en cepas que conservan el patrimonio genético original propio de su especie⁴⁵.

Desde hace más de 50 años se observa la resistencia bacteriana, sin embargo en los últimos años el número de fallas terapéuticas en micosis ha incrementado. Esto es atribuible a diferentes factores, la deficiencia en la función inmunológica, baja biodisponibilidad de los antimicóticos, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos, interacciones medicamentosas o mecanismos de resistencia antifúngica^{46, 47}.

Estudios realizados en *Candida spp.* describen tres posibles mecanismos (Figura 11) para los antifúngicos azólicos como potenciales causas de resistencia^{48, 49}:

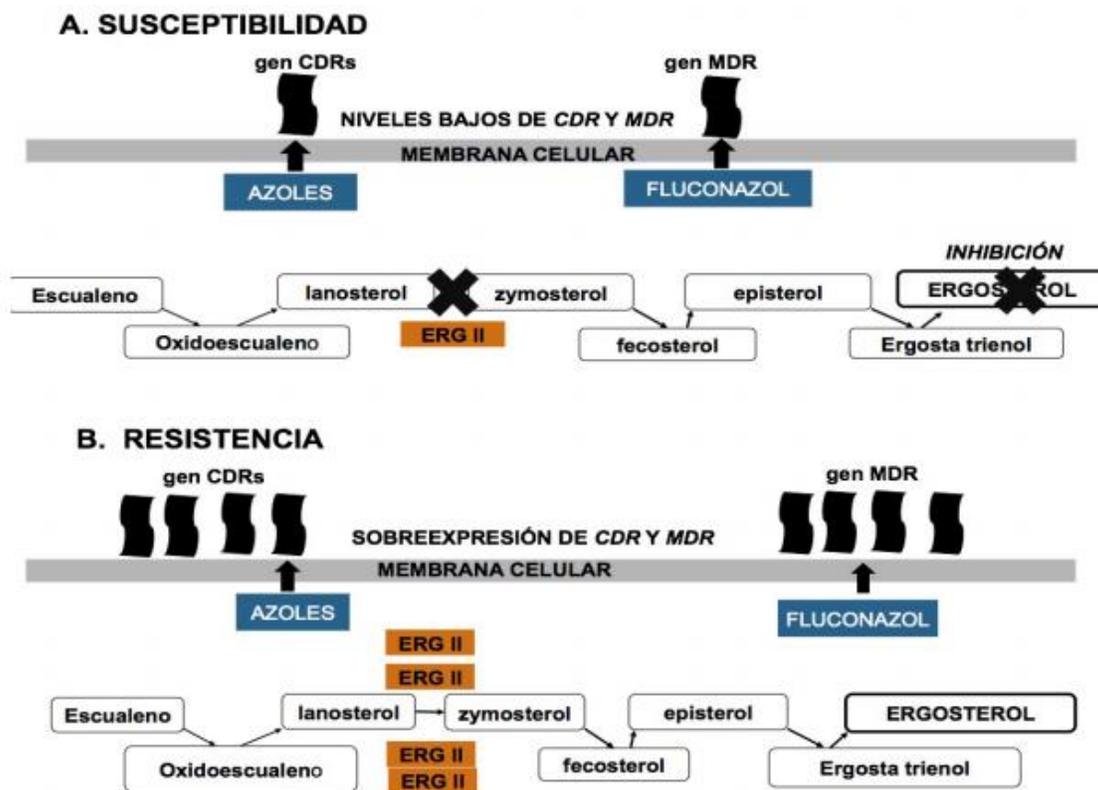


Figura 11. Mecanismos de resistencia en *C. albicans*
Imagen: López K, et al.

2.4.1 Mutación del gen ERG3

En células que son tratadas con azoles, en la vía metabólica de la síntesis del ergosterol, el lanosterol y derivados, el sustrato es la enzima 14 alfa-lanosterol desmetilasa por lo que en la enzima dará lugar a la acumulación de 14alfa-metil esteroides, especialmente 14 alfa-metil facosterol y el 14 α metil-diolergosta- 8,24(28)-dien-3b, 6alfa-diol. La acumulación de estos 14 α -metil esteroides causa la detención del crecimiento del organismo, modificando la función y fluidez de la membrana plasmática.

Se ha identificado que gracias a una mutación en el gen ERG3, que codifica para C-5 esteroil desaturasa es responsable de la resistencia a los azoles al disminuir los efectos tóxicos producidos por los metabolitos⁴⁹.

2.4.2 Mutación en el gen ERG11

El gen CYP51/ERG11 codifica la enzima 14 alfa-lanosterol desmetilasa. Han sido detectadas varias alteraciones genéticas que se asocian con el gen ERG11 de *C. albicans*, identificando una mutación puntual de ERG11, en aislamientos clínicos resistentes, presentándose una sustitución de arginina por lisina en el aminoácido 467 del gen ERG11, que contribuye a la resistencia a los azoles. Por lo cual la resistencia a los azoles es producida por la sobreexpresión de la diana de los azoles⁴⁹.

2.4.3 Sobreexpresión de los genes CDR y MDR

Los transportadores ATP-binding cassette (ABC) y Facilitadores mayores (MF) son un sistema de bombeo activo mediado por ATP, localizados en la membrana citoplasmática. Los transportadores ABC son codificados por los genes CDR (Candida Drug Resistance) y los transportadores MF son codificados por los genes MDR (Multidrug Resistance). Estos transportadores expulsan el fármaco hacia el exterior de la célula, su sobreexpresión no permite alcanzar concentraciones adecuadas del antibiótico en el sitio de acción debido la presencia de estas barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo.⁴⁹

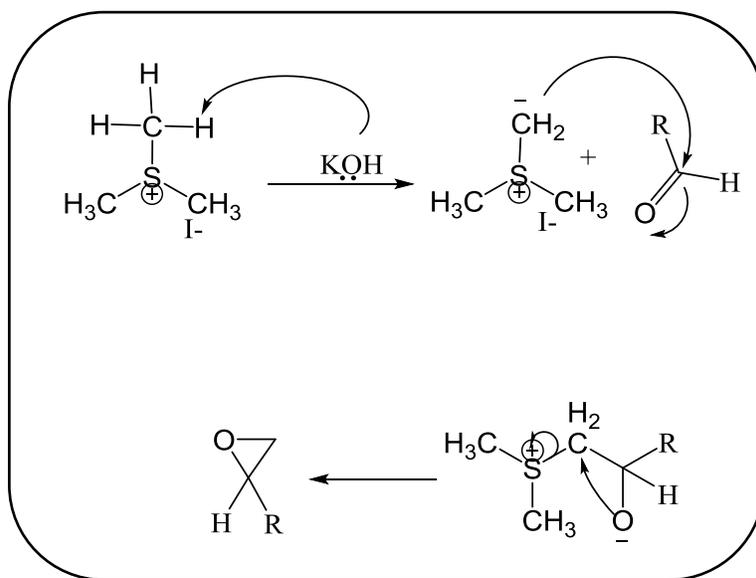
2.5 Síntesis de epóxidos

Los epóxidos son moléculas con vastas aplicaciones sintéticas, ya que son capaces de reaccionar con diversos nucleófilos abriendo el anillo, lo cual los convierte en precursores sumamente útiles para la síntesis de muchos componentes orgánicos⁵⁰.

Existen diversas rutas sintéticas para los epóxidos, de las cuales destacan:

2.5.1 Reacción de Corey- Chaykovsky

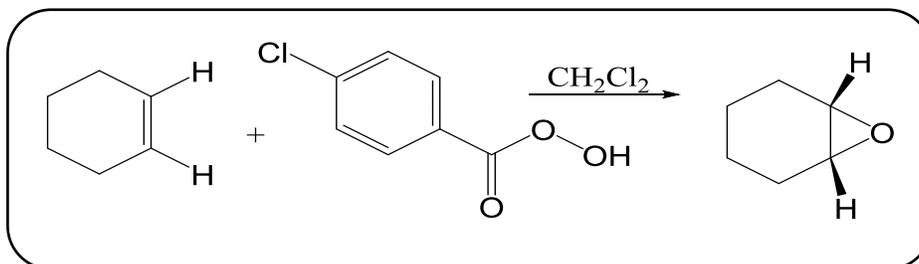
La reacción de iluros de azufre con grupos aldehído para la obtención de epóxidos es un método sintético importante. Los iluros son generados *in situ* por la desprotonación de los haluros de sulfonio con bases fuertes como hidróxido de potasio; de manera consecuente el iluro actúa como agente nucleofílico insertando el metileno al doble enlace C=O en los aldehídos de manera selectiva, obteniéndose el epóxido correspondiente fácilmente y con excelentes rendimientos (Esquema 2)^{51, 38}.



Esquema 2. Mecanismo de acción de Corey Chaykovsky

2.5.2 Reacción de epoxidación con peroxiácidos.

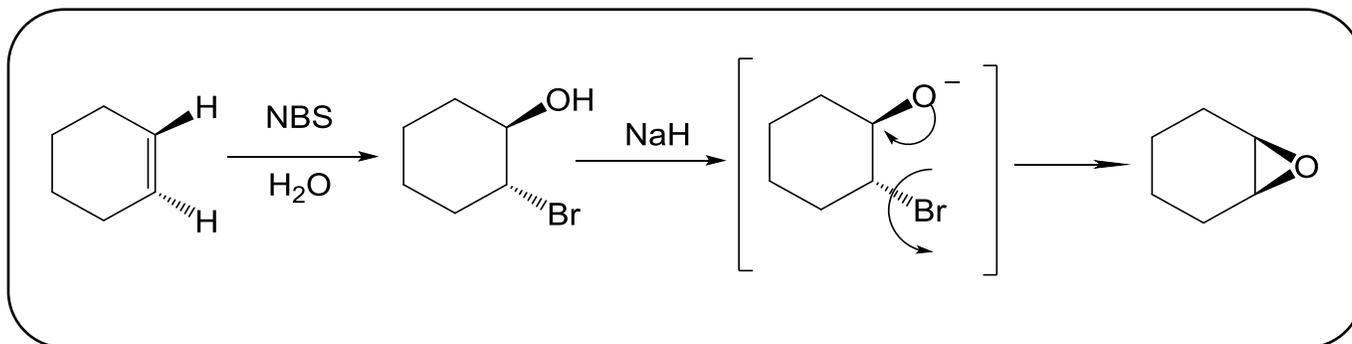
Para la obtención de epóxidos por medio de esta ruta se utiliza un peroxiácido débil, y gracias a sus propiedades de solubilidad, se utiliza muy frecuentemente en conjunto con el ácido *meta*-cloroperoxibenzoico (MCPBA). La epoxidación se lleva a cabo en una reacción concertada en un paso en donde los dobles enlaces ricos en electrones reaccionan con mayor velocidad (Esquema 3)⁵².



Esquema 3. Mecanismo de acción con peroxiácidos

2.5.3 Reacción de desplazamiento de las halohidrinas.

Al tratar los alquenos con soluciones acuosas se logra la fácil preparación de las halohidrinas en posición *trans*- como producto principal. Cuando un alcóxido y un átomo de un halógeno se ubican en la misma molécula, el alcóxido puede desplazar al ion halogenuro y formar un anillo por medio de un ataque interno S_N^2 (Esquema 4)⁵².



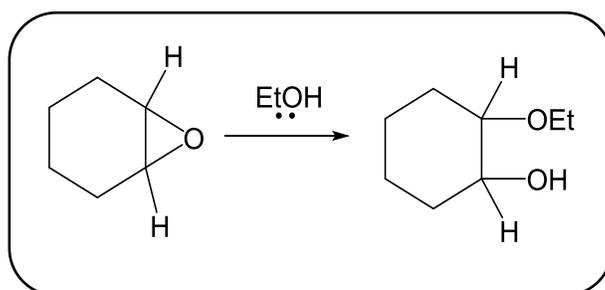
Esquema 4. Formación de epóxidos a partir de halohidrinas

2.6 Apertura de anillos de oxirano.

Debido a la gran energía de tensión de los anillos de oxirano, estas moléculas son estructuras muy reactivas; siendo capaces de reaccionar en condiciones ácidas y básicas³¹.

2.6.1 Ruptura catalizada por bases

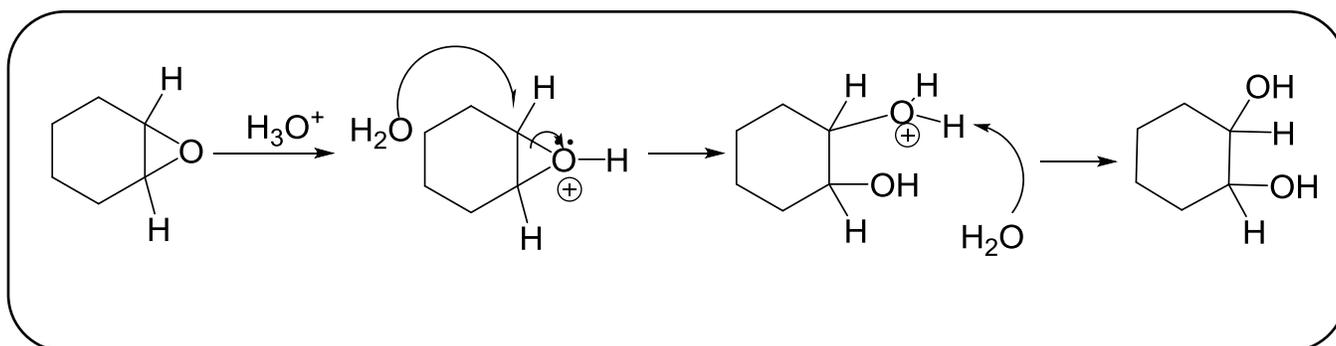
Los epóxidos sufren un ataque S_N^2 donde nucleófilos como los iones hidróxido o alcóxido atacan al carbono menos impedido (Esquema 5)⁵³.



Esquema 5. Apertura de oxiranos en medio básico

2.6.2 Ruptura catalizada por ácidos.

El oxígeno del epóxido se protona en disolución ácida, una vez protonado, puede ser atacado por nucleófilos débiles, tales como agua, alcoholes o iones halogenuro. Los productos de apertura catalizados por un ácido dependen principalmente del disolvente que se utilice (Esquema 6)⁴⁴.

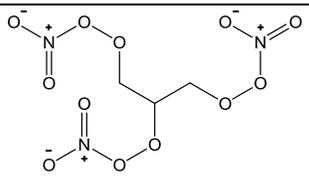
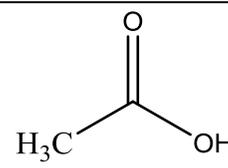
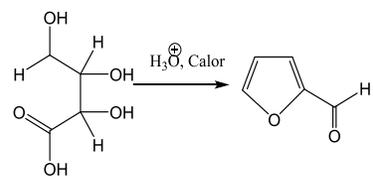
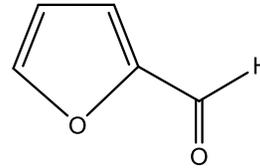
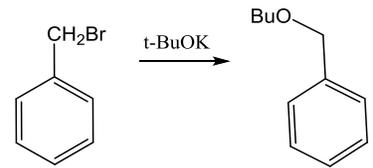
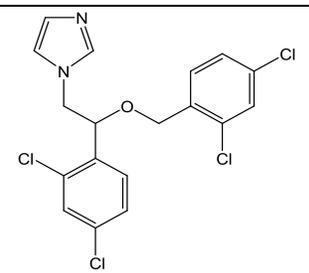


Esquema 6. Apertura de oxiranos en medio ácido.

Los factores que deben considerarse para apertura nucleofílica de los anillos de oxirano son: El acercamiento del grupo nucleofílico, el rompimiento iónico del enlace C-O, el disolvente o catalizador, la resonancia del sustituyente del oxirano y la presencia de grupos electrodonadores o electroatrayentes⁵⁴.

2.7 Importancia de alcoholes.

Los alcoholes pueden sintetizarse a partir de una amplia gama de métodos. Debido a que el grupo –OH puede transformarse en diversos grupos funcionales, constituye una de las clases más útiles de compuestos orgánicos además de su importante actividad biológica⁵².

Tabla 1. Reacciones comunes a partir de alcoholes ^{32, 55, 56} .			
Tipo de reacción	Reacción general	Ejemplo farmacológico	Uso
Acido-base de Lewis	$\text{HOCH}_3 + \text{NO}_3 + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{NO}_3\text{OCH}_3$	 <p>Nitroglicerina</p>	Vasodilatador ¹⁹ .
Carbonilación	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{CO} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$	 <p>Ácido acético</p>	Solución fijadora, tintes para colposcopias y antiséptico ¹⁹ .
Deshidratación		 <p>Furfural</p>	Fungicida, insecticidas ³⁵ .
Síntesis éteres de Williamson		 <p>Miconazol</p>	Antifungico ¹⁹ .

2.8 Actividad antioxidante.

Los radicales libres se producen normal y continuamente durante el metabolismo celular, por las diversas reacciones redox, como las oxidaciones microsomales, los fagosomas, la autooxidación de sustratos y los neutrófilos. Los radicales libres endógenos juegan un papel importante de defensa del organismo, maduración de reticulocitos o degradación de proteínas. Por lo cual estos radicales libres endógenos pueden ser controlados por los sistemas antioxidantes endógenos, sin embargo se presentan problemas cuando los radicales libres provienen de fuentes exógenas^{57, 58}.

Los radicales libres oxidan a los aminoácidos constituyentes de las proteínas produciendo modificaciones como: formación de grupos carbonilo, asociación de fragmentos proteicos por entrecruzamientos de enlaces disulfuro, rompimiento de enlaces peptídicos, pérdida de la afinidad por los metales e incremento en la hidrofobicidad. Esto provoca que las proteínas sufran cambios en su estructura, actividad y funcionalidad lo cual conlleva a que las proteínas que sufren un daño oxidativo presenten un deterioro en la actividad hormonal y enzimática, así como el transporte de iones⁵⁹.

Cuando existe un desequilibrio en la generación de radicales libres el daño oxidativo al extenderse sobre los componentes celulares provoca una serie de enfermedades como lo son cáncer, enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, diabetes, deterioro del sistema inmune, entre otras⁶⁰.

Un alcohol puede perder el hidrógeno de su oxhidrilo cediéndolo a una base, debido a esto es posible que actúe como antioxidante de diferentes maneras. El hidrógeno donado de los antioxidantes reacciona con especies de oxígeno o nitrógeno reactivo (Figura 12)⁶¹.

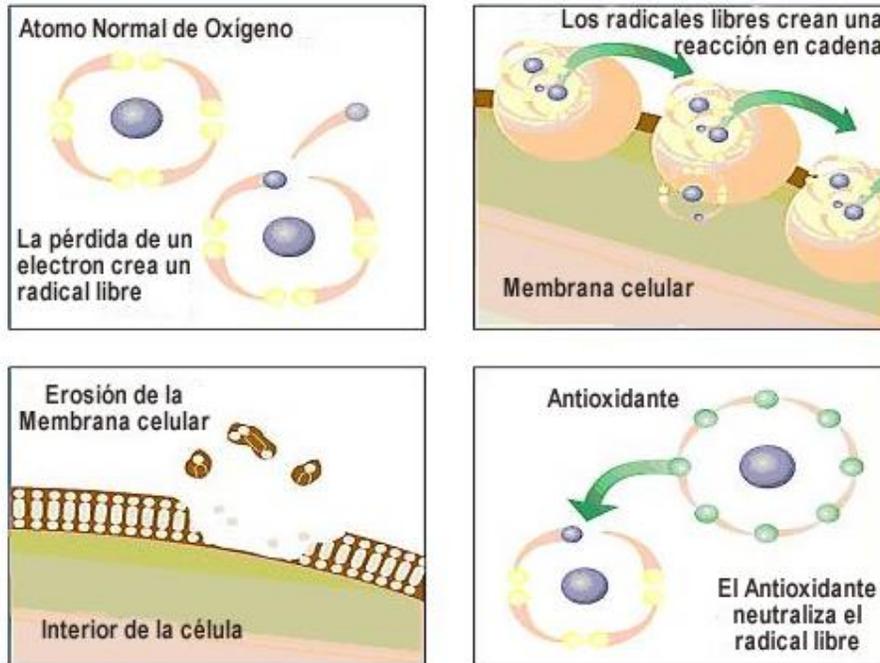
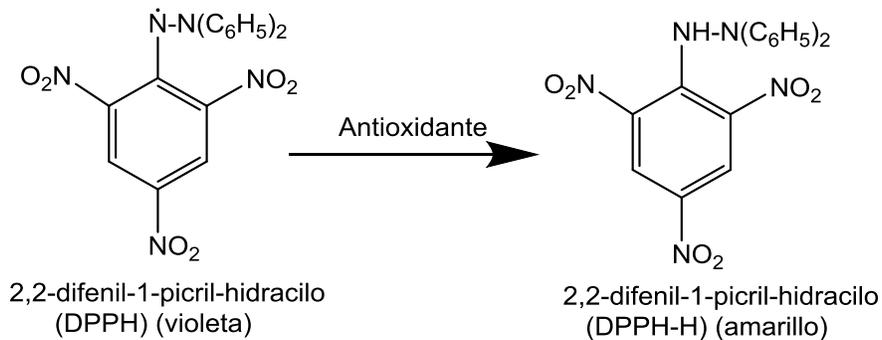


Figura 12. Reacción antioxidante a nivel biológico.

Imagen: Anónimo

Su actividad depende de la estructura, y su investigación es de sumo interés debido a los beneficios potenciales a la salud otorgado por las propiedades antioxidantes de estos compuestos (Figura 13)⁶².



Esquema 7. Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante

2.9 Pruebas biológicas.

Las investigaciones sobre la relación estructura química-actividad (Structure Activity Relationships) han sido largas y poco definidas, debido a que no hay una clara correspondencia entre las propiedades físico-químicas de ciertas moléculas y su comportamiento en el medio biológico. A veces la actividad biológica no se debe al producto original sino a un metabolito del mismo, y la producción de aquél depende de numerosas variables (especie animal, inducción enzimática, etc.). La paradoja estructural, que indica que sustancias con estructura química parecida presentan actividad y toxicidad diferentes.

Por lo cual, a pesar de que las moléculas puedan tener el mismo núcleo farmacóforo, es necesario realizar pruebas para confirmar la actividad biológica⁶³.

2.9.1 Pruebas de sensibilidad a antimicóticos.

El aumento de infecciones fúngicas en conjunto con el aumento de hongos resistentes a los antifúngicos, ha hecho necesario desarrollar métodos estandarizados de susceptibilidad antifúngica.

El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) y el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) han elaborado guías para susceptibilidad de levaduras por microdilución en caldo (documentos M27-A2 y E. Dis. 7.1, respectivamente). Aunque presentan diferencias metodológicas ambos son equivalentes. El CLSI ha desarrollado los documentos M38-A (hongos filamentosos) y M44-A (difusión en disco), mientras que EUCAST trabaja en un documento para *Aspergillus* sp⁶⁴.

Hay cuatro principios básicos a tomar en cuenta en la interpretación de los resultados en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana:

- Una CMI no es una medición física o química.
- Con frecuencia ciertos factores del paciente son más importantes que los resultados de las pruebas de susceptibilidad en la determinación de la evolución clínica.
- La susceptibilidad in vitro no siempre predice el éxito de una terapia específica.
- La resistencia in vitro con frecuencia se correlaciona con el fracaso en el tratamiento⁶⁵.

2.9.1.1 Método de difusión en disco

Es un método simple, desarrollado para levaduras y disponible para fármacos solubles en agua, tales como fluocitosina, fluconazol y voriconazol, estandarizado por el CLSI en el documento M44-P para especies de *Candida*. Se obtiene un halo de inhibición cuya medición correlaciona muy bien con el método de referencia⁶⁶.

2.9.1.2 Métodos comerciales

Etest[®] (AB BioDisk, Solna, Sweden), aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para susceptibilidad in vitro de *Candida* sp contra fluconazol e itraconazol.

Sensitre[®] YeastOne (TREK Diagnostic Systems), método comercial cuyo formato se asemeja más a la metodología del CLSI aprobado por la FDA basado en microdilución en caldo.

Vitek 2[®] (Biomérieux), que utiliza una lectura espectrofotométrica, lo cual facilita la lectura de la CIM. Tiene la ventaja de encontrarse acoplado a la identificación de levaduras⁶⁷.

2.9.1.3 Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a antifúngicos.

Cuando la industria farmacéutica fue introduciendo en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones de los ya conocidos, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de los mismos y detectar las posibles resistencias, con lo cual el CLSI creó un subcomité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.

A pesar de todo, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas como los de los antibacterianos, como complemento del método de sensibilidad para levaduras, en 1998 el CLSI publicó su propuesta metodológica para el estudio de sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos (documento M38-P) y en 2002 aprobó el método definitivo (documento M38-A). En el 2004 fue estandarizado el método M44-A para levaduras (Figura 14y 15)⁶⁸.

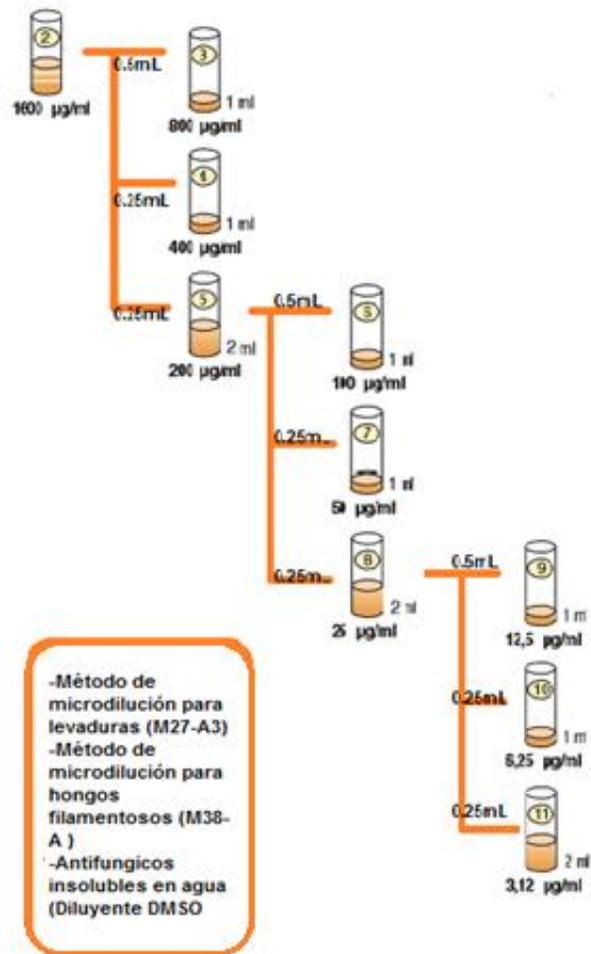


Figura 13. Diagrama de flujo de M27-A3 y M38-A

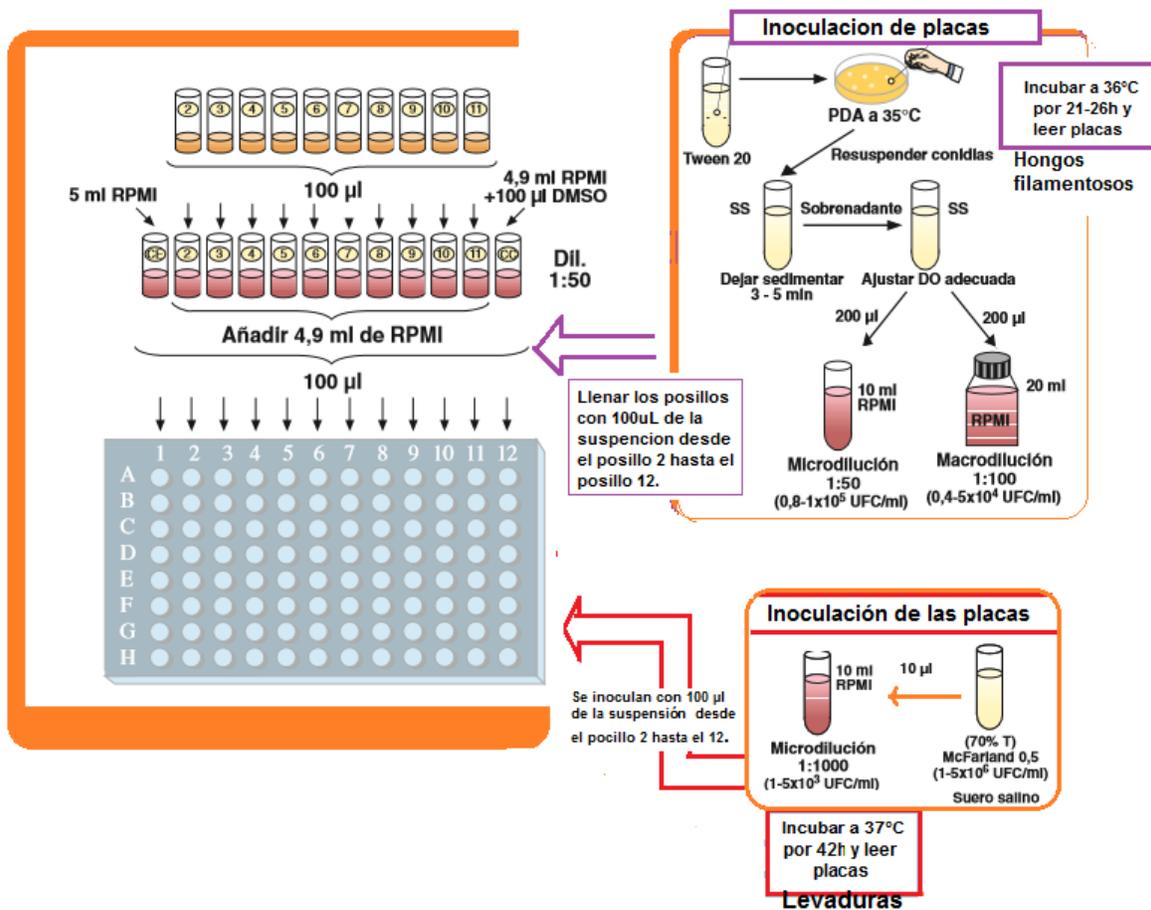


Figura 14. Diagrama de flujo de M27-A3 y M38-A

2.9.2 Pruebas de evaluación para la actividad antioxidante.

Para evaluar la actividad antioxidante de algún compuesto se utilizan estudios *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración^{68, 69}.

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH, los cuales presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones.

2.9.2.1 DPPH

La molécula 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa y solo puede disolverse en medio orgánico, con el DMPD solo se puede medir la actividad de compuestos en medio acuoso; además de que presenta un pico de absorbancia 505 nm^{69, 70}.

El DPPH conocido como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno desvaneciendo el color violeta (Figura 13). El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.

Los resultados del ensayo DPPH+ se expresan como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC50), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC50 cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH+ usado (Deng et al., 2011)⁷⁰.

2.9.2.2 ABTS

El ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también electroquímica (Figura 16). Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, y presenta un pico de absorbancia a 515 nm^{69, 70}

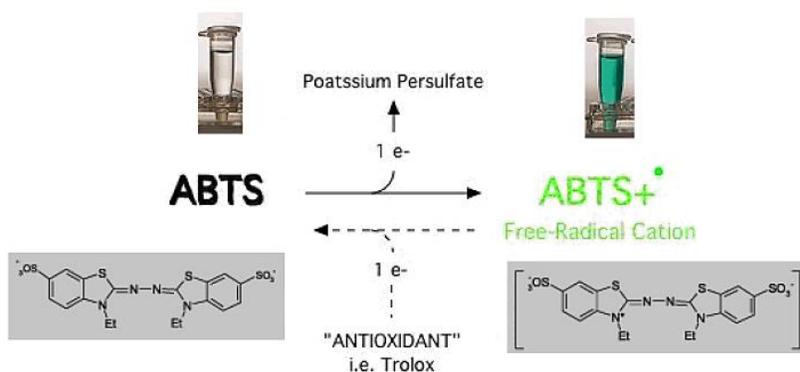


Figura 15. Reacción química para ABTS

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un estudio comparativo en la reacción de Corey-Chaykovsky con Yoduro de trimetil sulfonio y sulfoxonio para la obtención de fenil-(1-H-imidazoil) etanoles y llevar a cabo la evaluación de la actividad biológica de los productos sintetizados.

Objetivos particulares

- Evaluar los resultados de la epoxidación de Corey-Chaykovsky, con la finalidad de optimizar las condiciones de reacción.
- Determinar la actividad antifúngica de estas estructuras realizando pruebas *in vitro* mediante la evaluación contra cuatro hongos filamentosos (*Mucor hiemalis* ATCC 8690, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16907, *Trichosporon cutaneum* ATCC 28592 y *Rhizopus oryzae* ATCC 10329) y seis levaduras del género *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. utilis* ATCC 9226, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 14243, *C. glabrata* ATCC 34138 y *C. parapsilosis* ATCC 22019), por medio del método de microdilución en caldo descrito por CLSI.
- Determinar la actividad antioxidante por el método Trolox utilizando el radical ABTS

IV. JUSTIFICACIÓN

El área de síntesis orgánica se encarga del estudio, aislamiento y caracterización de compuestos de origen natural o sintético con posible actividad biológica para que puedan ser utilizados como terapia para numerosas enfermedades. La optimización de la síntesis de moléculas con grupo OH es relevante, ya que es de gran utilidad en la Química Orgánica debido a que permite síntesis de muchos otros derivados.

En los últimos años los casos fallidos de terapia para micosis ha aumentado, atribuido a pacientes inmunodeprimidos, baja biodisponibilidad de antimicóticos, interacciones medicamentosas además de la resistencia antifúngica que los hongos han creado a numerosos fármacos.

Estas situaciones generan la necesidad de búsqueda de nuevos productos con actividad farmacológica, así como rutas de síntesis más eficaces y económicas.

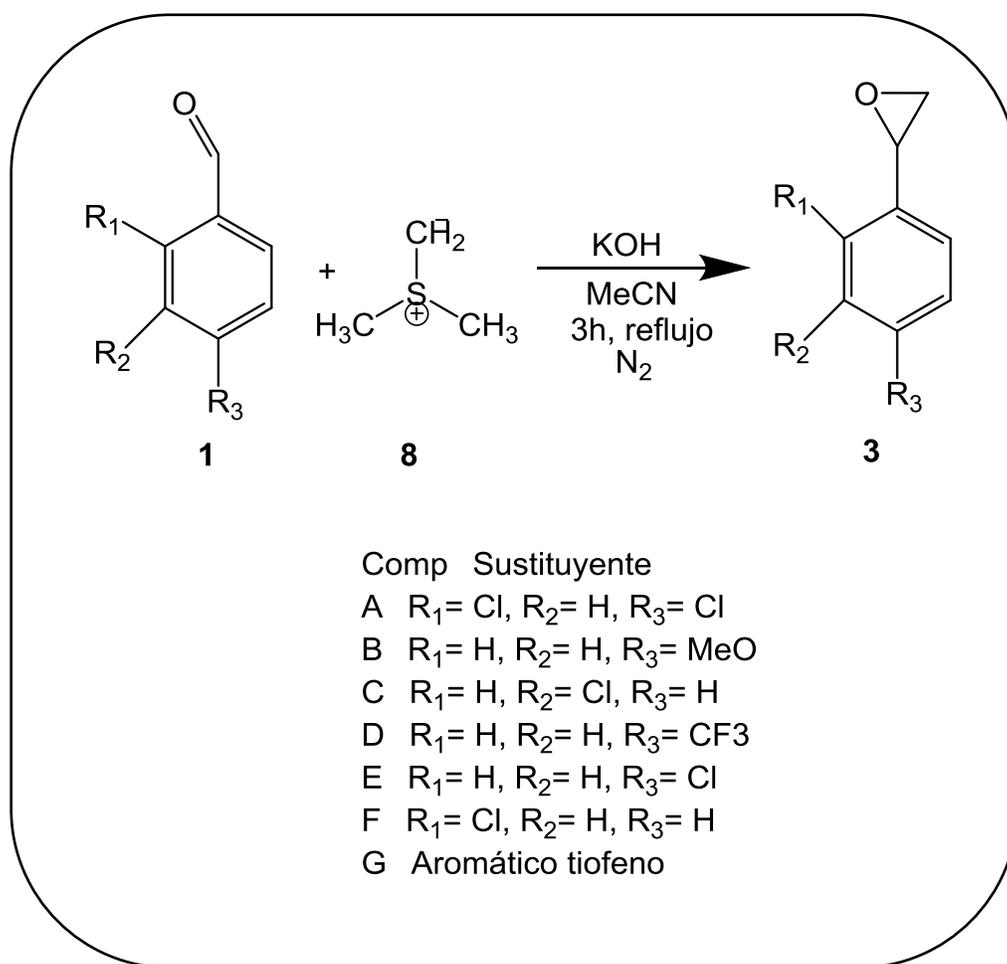
Es por esto que la comparación en la eficacia de la síntesis con el uso de diferentes iones sulfonio y la evaluación biología de moléculas con el grupo funcional oxhidrilo y anillo imidazólico nos permitirá encontrar una nueva alternativa para el tratamiento de diversas patologías.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Síntesis orgánica

5.1.1 Obtención de epóxido con yoduro de trimetilsulfonio

Se realizó la reacción de Corey-Chaykovsky usando yoduro de trimetilsulfonio (Método reportado en la literatura⁵¹) a partir de siete diferentes benzaldehídos para la síntesis de oxiranos como se muestra en el esquema 9.

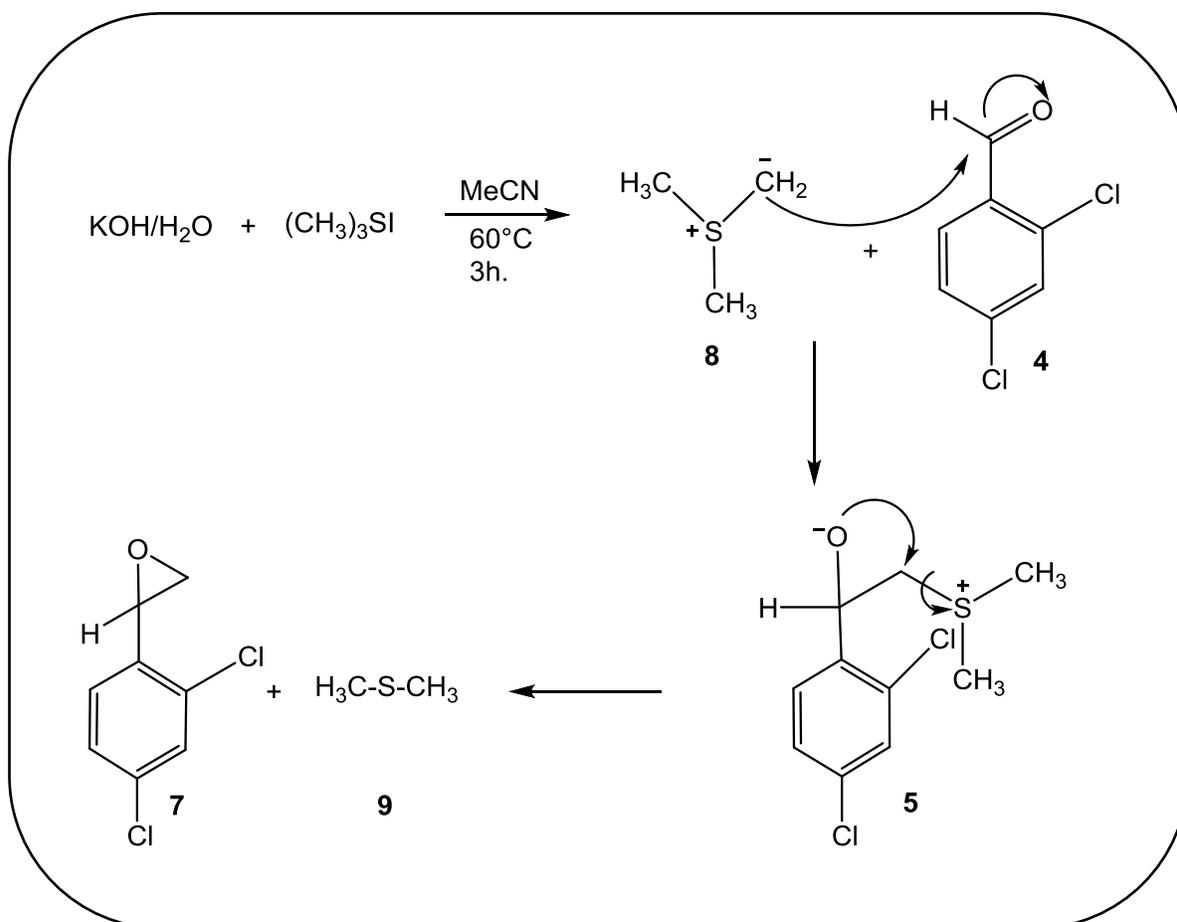


Esquema 8. Reacción de Corey-Chaykovsky usando yoduro de trimetilsulfonio.

Se sintetizó 2-(2,4-diclorofenil)oxirano (**7**), materia prima para la obtención del (2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il)metanol (**13**); por lo cual se hizo reaccionar 2,4-

diclorobenzaldehído (**4**) y el yoduro de trimetilsulfonio (**8**), usando como base hidróxido de potasio y agua en forma catalítica.

La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera inerte de nitrógeno, a 60° C durante 3 h con reflujo. El Esquema 10 muestra el mecanismo de reacción para el proceso de formación del oxirano (**5**), resaltando la adición nucleofílica del intermediario iluro (formado *in situ*) al grupo carbonilo y la subsecuente formación de dimetilsulfuro (**9**)

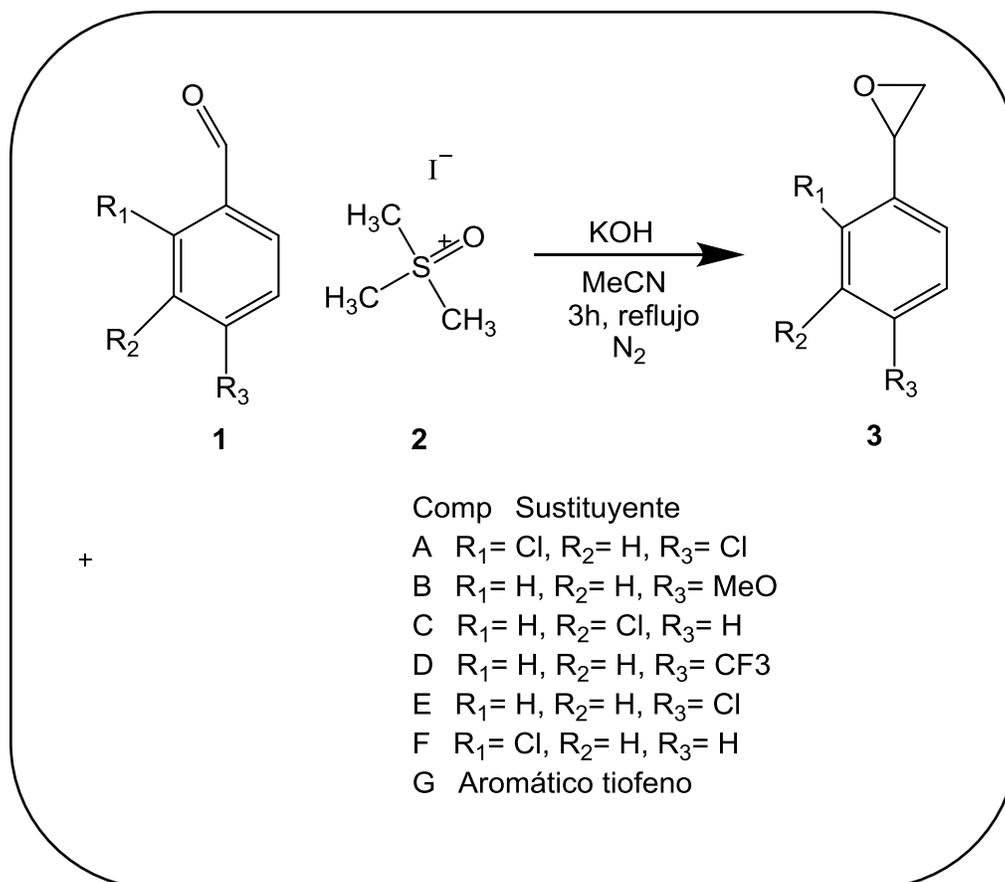


Esquema 9. Formación de 2-(4-metoxifenil) oxirano usando yoduro de trimetilsulfonio

Se realizó una CCF usando como eluyente un sistema de hexano/ AcOEt (8:2), tratado con trietilamina para evitar la descomposición del producto. Debido a la reactividad del epóxido sintetizado, el compuesto no fue purificado, sólo se filtró y concentró. El resultado de esta reacción es la obtención de un líquido aceitoso amarillo con un rendimiento de 73%

5.1.2 Obtención de epóxido con yoduro de trimetilsulfoxonio

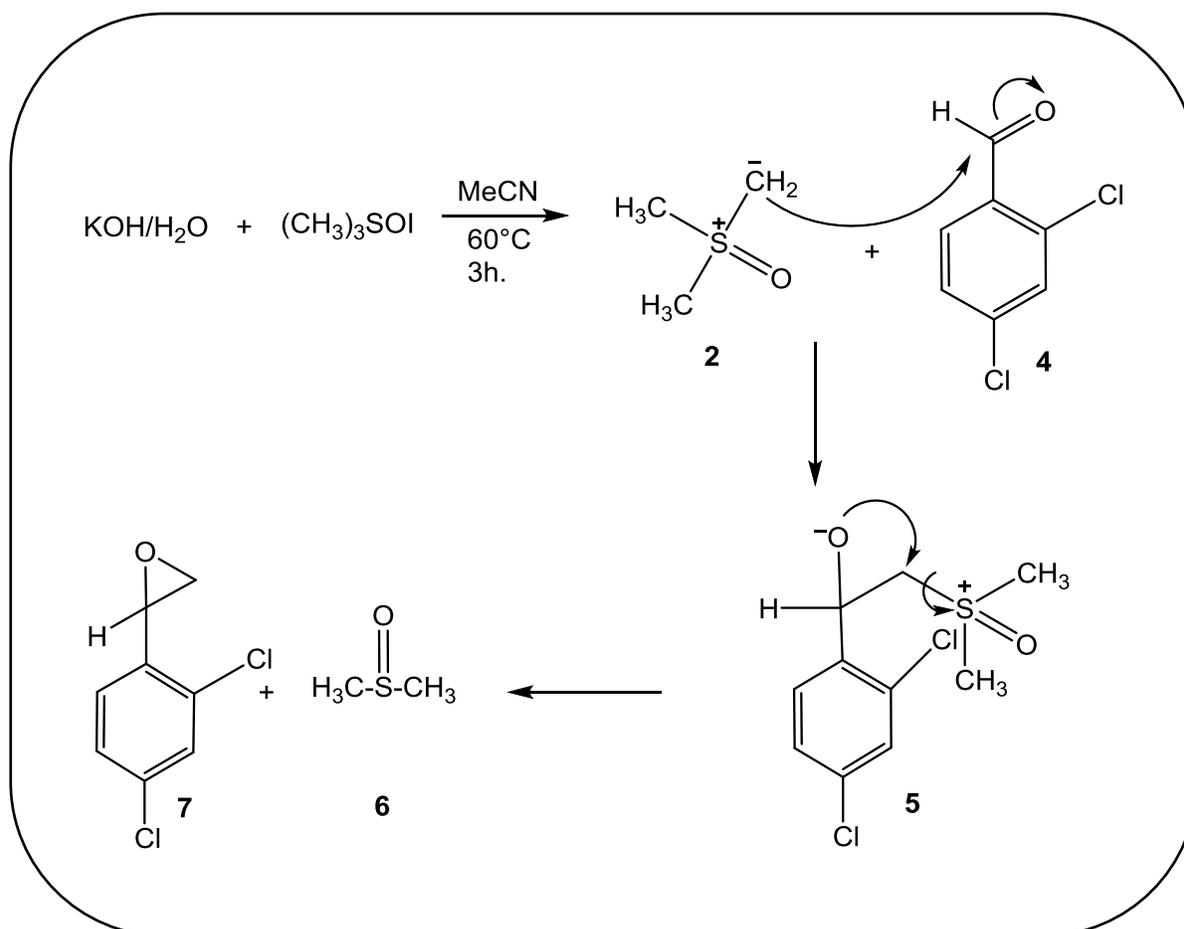
Por otra parte la reacción de Corey-Chaykovsky se realizó con yoduro de trimetilsulfoxonio a partir de siete diferentes benzaldehídos para la síntesis de oxiranos, como se muestra en el esquema 7.



Esquema 10. Reacción de Corey-Chaykovsky usando yoduro de trimetilsulfoxonio.

Se desarrolló la síntesis de 2-(2,4-diclorofenil)oxirano (**7**), materia prima para la obtención del (2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il)metanol (**13**); por lo cual se hizo reaccionar 2,4-diclorobenzaldehído (**4**) y el yoduro de trimetilsulfoxonio (**2**), usando como base hidróxido de potasio y agua en forma catalítica.

Se mantuvo la reacción bajo atmósfera inerte de nitrógeno, a 60° C durante 3 h con reflujo. El Esquema 8 muestra el mecanismo de reacción para el proceso de formación del oxirano (**7**), resaltando la adición nucleofílica del intermediario iluro (formado *in situ*) al grupo carbonilo y la subsecuente formación de dimetilsulfoxido (**6**)



Esquema 11. Formación de 2-(4-diclorofenil) oxirano usando yoduro de trimetilsulfoxonio

Se realizó una CCF usando como eluyente un sistema de hexano/AcOEt (8:2), tratado con trietilamina para evitar la descomposición del producto. Debido a la reactividad del epóxido sintetizado, el compuesto no fue purificado por cromatografía en columna, sólo se filtró y concentró. Cabe destacar que la filtración con trimetilsulfoxonio fue más difícil debido a que el precipitado formado era más fino y se retenía con dificultad; en comparación con trimetilsulfonio. El resultado de esta reacción es la obtención de un líquido aceitoso amarillo, con un rendimiento de 56.5%

Con ayuda de infrarrojo se analizó la desaparición del grupo carbonilo del 2,4-diclorobenzaldehído (4). Como se muestra en el espectro de IR del compuesto 7 (Anexo 10.1) donde no se observa la banda del grupo carbonilo del 2,4-diclorobenzaldehído (4) que aparece en 1680 cm^{-1}

La estructura del compuesto 2-(2,4-diclorofenil)oxirano (7) fue ratificada mediante el análisis de **RMN-¹H** (Anexo 10.2), donde se muestran los hidrógenos 3-Ha y 3-Hb del anillo del oxirano, la señal correspondiente del H-3a tiene un desplazamiento de 3.18 ppm con $J = 4.1$ y 5.6 Hz, en tanto que la señal correspondiente a H-3b se encuentra en 2.63 ppm y tiene $J = 4.1$ y 5.6 Hz, en ambos casos las señales son doble de doble e integran para un hidrógeno. El hidrógeno H-2 del oxirano se observa como una señal múltiple, mostrando un desplazamiento en la región comprendida de 4.14 a 4.16 ppm, integrando para un hidrógeno. En la zona de los hidrógenos aromáticos se observa una señal múltiple entre 7.21 y 7.36 ppm que integra para tres hidrógenos.

En el espectro de **RMN-¹³C** (Anexo 10.3) se observa una señal en 49.5 ppm correspondiente al C-2, una señal en 50.6 ppm para el C-3, además de una serie de señales que se ubican entre 133.6 y 134.1 ppm que representa a los carbonos aromáticos, destacando las señales de los carbonos orto (C-9) y del carbono de la posición para (C-7). Los desplazamientos químicos del 2-(2,4-diclorofenil) oxirano se muestran en la Tabla 2.

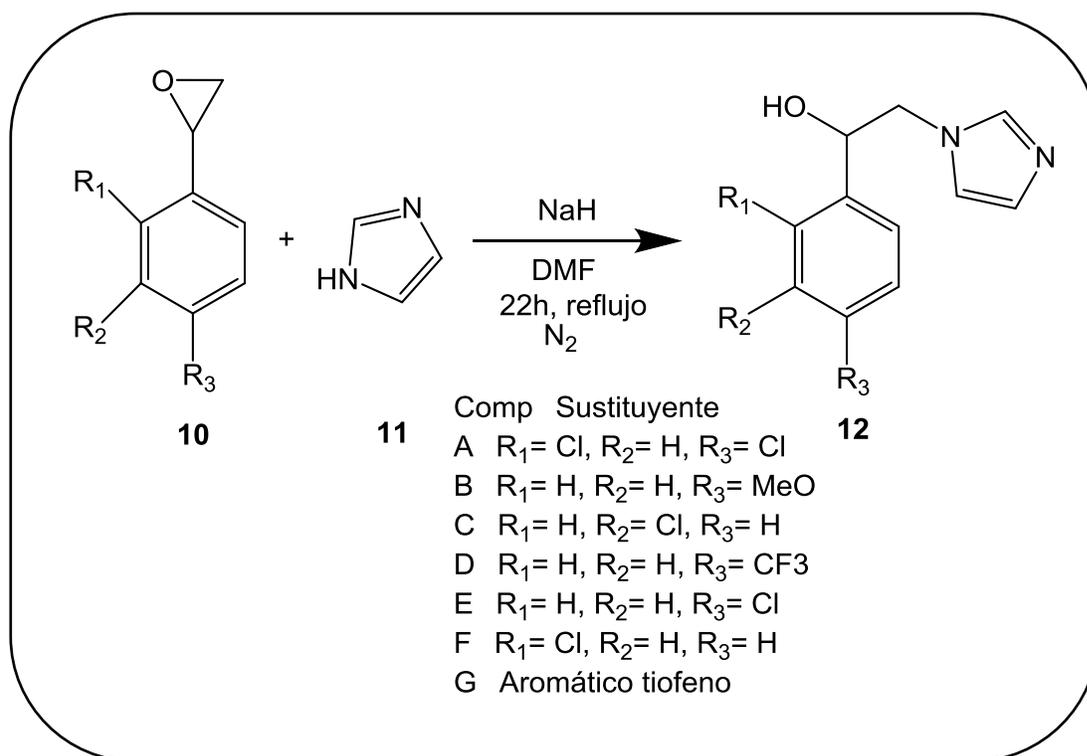
Tabla 2. Desplazamiento químico del 2-(2,4-diclorofenil) oxirano (7) para RMN de ¹H y ¹³C en ppm (multiplicidad y J en Hz).

2-(2,4-diclorofenil) oxirano	δ (ppm)
H-3a	3.18 (dd, $J = 4.1$ y 5.6 Hz)
H-2b	2.63 (dd, $J = 4.1$ y 5.6 Hz)
H-2	4.14-4.16 (m)
Har	7.21-7.36 (m)
C-2	49.5
C-3	50.6
C-4	133.9
C-5	127.3
C-6	126.5
C-7	134.1
C-8	128.8
C-9	133.6

Debido a la inestabilidad de los oxiranos y a que todas las moléculas sintetizadas siguen un mismo patrón, únicamente se realizaron pruebas confirmatorias para el 2-(2,4-diclorofenil) oxirano (**7**), el cual fue preparado al momento de realizar los experimentos de RMN; por lo que los compuestos se utilizaron en crudo para la siguiente reacción de apertura de anillo.

5.1.3 Síntesis del grupo benciloxifenetil, compuestos fenil-(1-h-imidazolil) etanoles

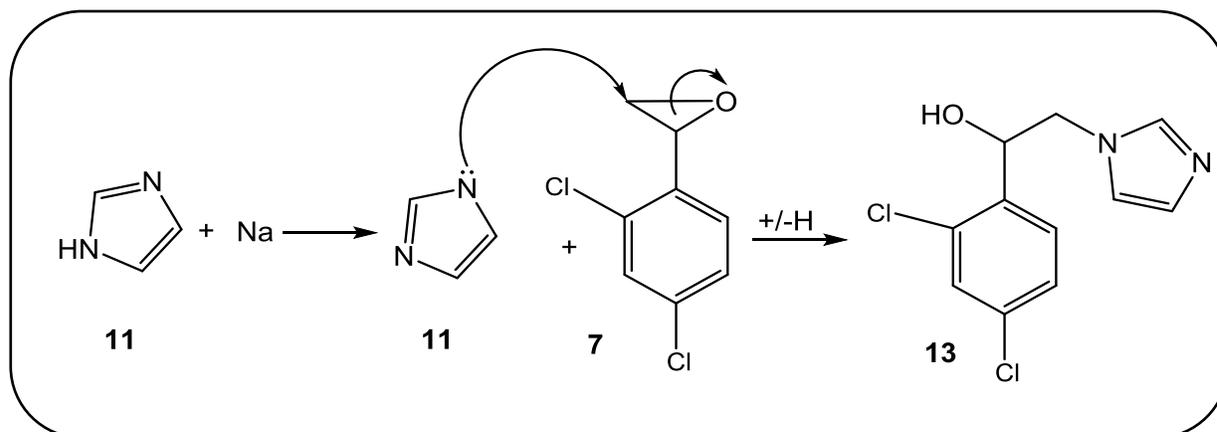
Una vez sintetizados los siete epóxidos diferentes se llevó a cabo la apertura de los mismos con imidazol (**11**), por medio de una reacción básica con NaH como se muestra en el esquema 11.



Esquema 12. Síntesis del grupo benciloxifenetil

Se sintetizó (2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il)etanol (**13**) a partir de 2-(2,4-diclorofenil)oxirano (**7**), realizando la apertura con imidazol (**11**) y como base hidruro de sodio.

Donde, como primer paso, el NaH desprotonó el imidazol, que es un ácido de Bronsted, como se muestra en el esquema 12; este paso de la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó lentamente 2-(2,4-diclorofenil)oxirano (**7**), la reacción se mantuvo en agitación por 24 horas a reflujo; la cual se monitoreo mediante CCF empleando como eluyente un sistema de Hexano/AcOEt (6:4).



Esquema 13. Apertura del epóxido

El compuesto obtenido fue tratado por medio de extracciones donde la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad obteniéndose un líquido viscoso ámbar. Para obtener el compuesto deseado se realizó una recristalización usando AcOEt. Se obtuvo el alcohol **13** como un sólido amarillo con punto de fusión de 128-133°C y un rendimiento del 35%

Mediante el análisis de **RMN-¹H** (Anexo 10.4), se confirmó la estructura del compuesto (2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il)etanol (**13**); donde se observa una señal doble de doble en 4.04 ppm correspondiente al hidrógeno H-2a, que tiene constantes de acoplamiento de J = 14.1 y 7.1 Hz, la cual integra para un hidrógeno. Así mismo se puede ver una señal doble de doble en 4.18 ppm que integra para un hidrógeno y corresponde a H-2b, esto significa que ambos hidrógenos de la posición 2 son químicamente iguales pero magnéticamente diferentes debido a la interacción con el grupo hidroxilo y el nitrógeno 3 del imidazol, viéndose H-2b más afectado. Además se observa una señal múltiple en 5.08 ppm que corresponde al hidrógeno H-1, e integrando para un hidrógeno. También se observa una señal múltiple en 6.84 ppm correspondiente al hidrógeno H-6; y una señal doble en 6.07 ppm que corresponde al hidrógeno del hidroxilo, mostrando una J = 4.4 Hz que integra para 1 hidrógeno, mientras que una señal simple en 6.84 ppm corresponde a H-6 e integrando para 1 hidrógeno. Las señales de H-6 y H-7 no se ven tan afectadas por los

átomos de nitrógeno vecinos del imidazol, comparadas con la señal de H-4 que se ve más afectada debido a su posición entre dos átomos de nitrógeno, lo cual hace que la señal se desplace a campos más bajos apareciendo en 7.59 ppm. Finalmente, las señales de los hidrógenos aromáticos (H-Ar) aparecen como señales múltiples y se pueden observar entre 7.41-7.50 ppm, integrando para 3 hidrógenos.

En el espectro de **RMN-¹³C** (Anexo 10.5) se puede ver una señal en 51.5 ppm y una en 68.6ppm que corresponde a C-2 y a C-1 respectivamente. Además se observa una serie de señales que se ubican entre 119.9 y 138.6 ppm que corresponden a los carbonos aromáticos.

Como se observa en la tabla 3 los rendimientos obtenidos del fenil-(1-h-imidazoil) etanoles sintetizados con Yoduro de trimetilsulfoxonio fueron bajos, al menos 50%, en comparación con los sintetizados con Yoduro de trimetilsulfonio, excepto por el compuesto 13 y 25 con un rendimiento de 36.49% y 52.1565% respectivamente. Los cuales estuvieron abajo por aproximadamente 10% únicamente.

Los compuestos obtenidos a partir de utilizar Yoduro de trimetilsulfoxonio presentaron más problemas al momento de tratarlos; desde el momento de la filtración del epóxido y la apertura del mismo, hasta la recristalización para la obtención del alcohol, razón por la cual es muy probable que los rendimientos bajos usando Yoduro de trimetilsulfoxonio se deban a la pérdida de producto durante su purificación.

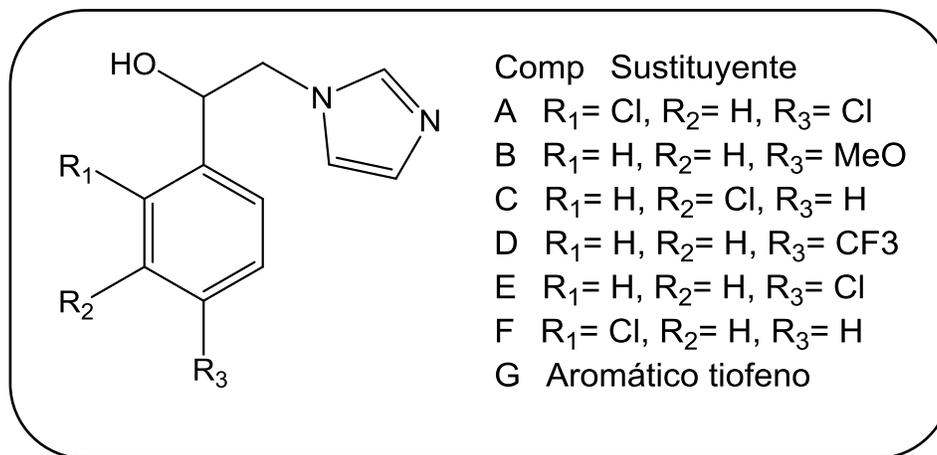
Tabla 3. Comparación de rendimientos de compuestos fenil-(1-h-imidazoil) etanoles.

MLC	Yoduro de trimetilsulfonio	Yoduro de trimetilsulfoxonio
	Rendimiento	Rendimiento
13	45%	36.5%
20	53%	27.5%
21	60.4%	11.8%
22	65.1%	22.9%
23	64.5%	15%
24	60.3%	10%
25	68.3%	52.2%

5.2 Pruebas biológicas

5.2.1 Sensibilidad antifúngica.

En el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química de la UAEMex se realizaron las pruebas de sensibilidad por medio de los métodos de microdilución en caldo descritos por el CLSI, documento M27-A3 para levaduras, y M38-A para hongos filamentosos con la finalidad de obtener la CMI de los compuestos sintetizados, esquema 12.



Esquema 14. Compuestos fenil (1-h-imidazoil) etanoles evaluados

5.2.1.1 Método de microdilución para levaduras (M27-A3)

Se emplearon seis diferentes especies de *Candida*, como antimicótico de referencia se empleó al itraconazol, el cual presenta solubilidad en el disolvente utilizado (DMSO) y los resultados son comparables al tratarse de un azol.

De acuerdo con los puntos de corte según el CLSI (intervalos de las CMI: sensible, intermedio, resistente y una nueva categoría aplicable a los azoles: sensible dependiendo de la dosis), la Tabla 3 y la gráfica 1 muestra los resultados obtenidos de las CMI's en *Candida spp* a las 24 h de crecimiento de las cepas.

Solo cuatro compuestos (A, B, E y F) de los siete sintetizados presentan resultados dentro de los intervalos de sensibilidad y sensibilidad dependiente de dosis establecidos por el CLSI.

Donde el compuesto que mostró mayor actividad fue el A ((2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il)etanol) ya que tiene las CMI's más bajas, por lo tanto tiene una mayor inhibición de crecimiento de las cepas evaluadas; principalmente para *C. albicans* y *C. parapsilosis* siendo SDD, mientras que para *C. tropicalis* y *C. krusei* presenta una inhibición intermedia.

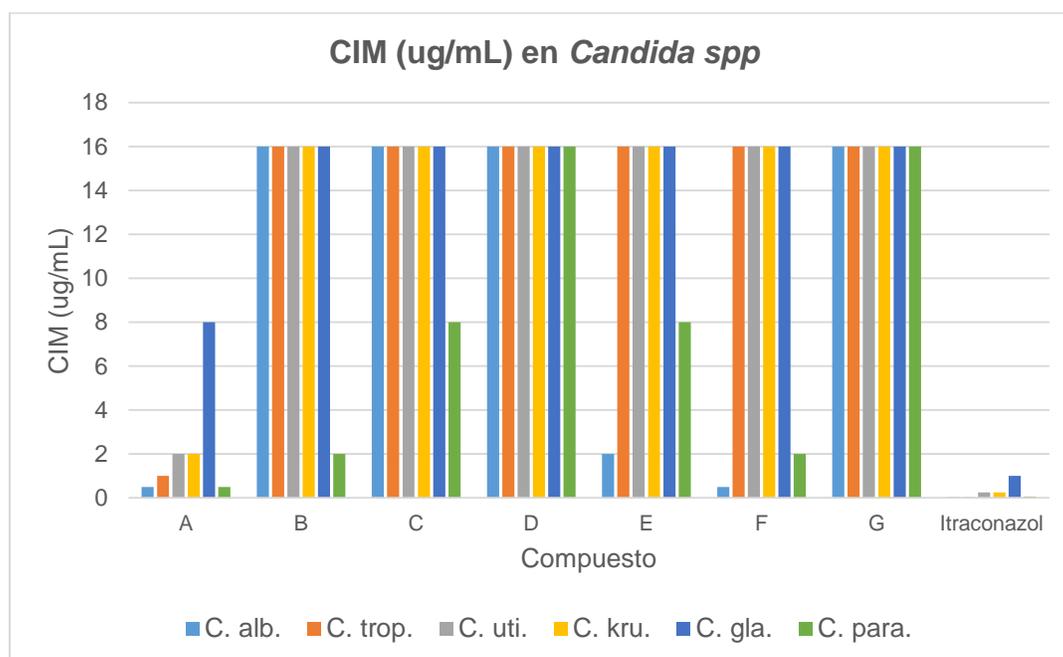
Por otro lado el compuesto F ((2-clorofenil)(1H-imidazol-1-il)etanol) presenta Inhibición SDD para *C. albicans* e intermedio para *C. parapsilosis*.

Así mismo el compuesto E ((4-clorofenil)(1H-imidazol-1-il)etanol) y B ((1H-imidazol-1-il)(4-metoxifenil)etanol) presentan inhibición intermedia para *C. albicans* y *C. parapsilosis* respectivamente.

Tabla 4. Pruebas de sensibilidad para *Candida spp*, determinación de la CMI.

CIM (ug/mL) en <i>Candida spp</i> .						
Compuesto	<i>C. alb.</i>	<i>C. trop.</i>	<i>C. uti.</i>	<i>C. kru.</i>	<i>C. gla.</i>	<i>C. para.</i>
A	0.5	1	2	2	8	0.5
B	16	16	16	16	16	2
C	16	16	16	16	16	8
D	16	16	16	16	16	16
E	2	16	16	16	16	8
F	0.5	16	16	16	16	2
G	16	16	16	16	16	16
Itraconazol	0.03	0.03	0.25	0.25	1	0.06

SDD=Sensible Dependiente de Dosis; S= Sensible; R= Resistente; I=Intermedio



Grafica 1. Pruebas de sensibilidad para *Candida spp*, determinación de la CMI.

Como se muestra en el esquema 12 los compuestos A, F y E son moléculas cloradas, que difieren en la posición del halógeno con lo que podemos observar que tanto los halógenos presentes en las moléculas, como la posición de los mismos influyen mejorando o disminuyendo su actividad frente a los microorganismos. Con lo cual se ve favorecida la molécula con dos cloros en posición *orto* y *para*, así como, la posición *orto* por si misma.

Del mismo modo se observa que tanto grupos electroattractores (-Cl) como electrodonadores (-OMe) presentan actividad con lo cual no se puede diferenciar si uno tiene mayor o menor actividad, sin embargo su afinidad es diferente, como es el caso del compuesto E (-Cl) y B (-OMe); los cuales tienen sustitución en *para*, presentando una inhibición intermedia (2ug/mL); es decir, ambos presentan actividad frente a *Candida spp*, sin embargo tienen selectividad por diferentes géneros de *Candida spp*. Debido a que el compuesto E presenta una CMI de 2ug/mL frente a *C. albicans* mientras que el compuesto B presenta actividad frente a *C.parapsilosis* a la misma concentración; el acomplejar la molécula podría ayudar a crear un compuesto mucho más específico para una especie y no solo un género.

5.2.1.2 Método de microdilución en caldo M38-A para hongos filamentosos

Se emplearon cuatro hongos filamentosos, como antimicótico de referencia se empleó al itraconazol, el cual presenta solubilidad en el disolvente utilizado (DMSO) y los resultados son comparables al tratarse de un azol.

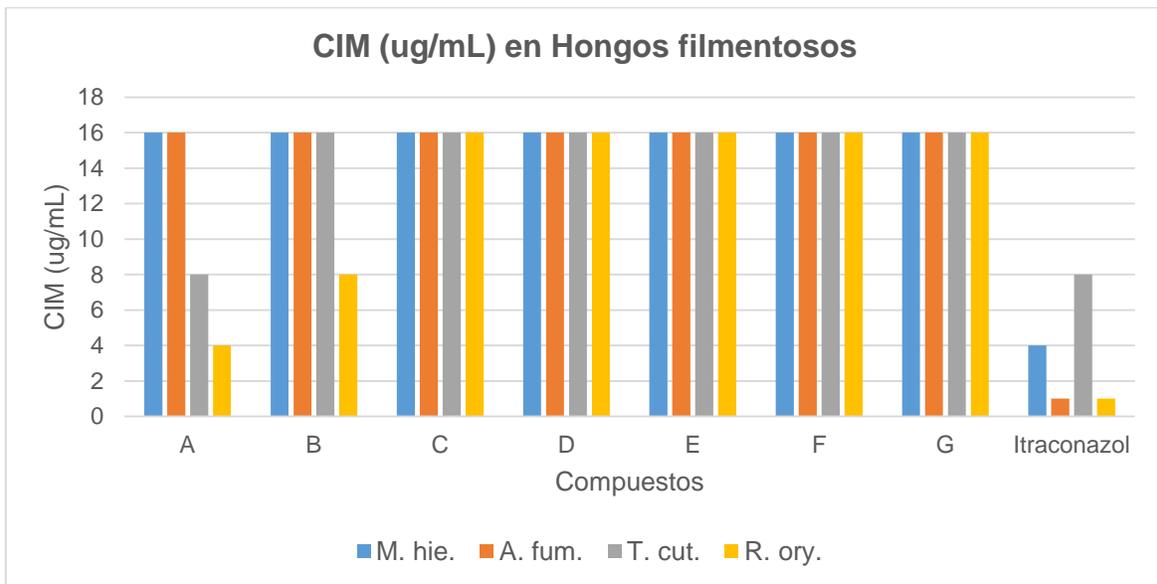
De acuerdo con los puntos de corte según el CLSI, la Tabla 7 y la gráfica 2 muestra los resultados obtenidos de las CMI's en hongos filamentosos a las 48 h de crecimiento de las cepas.

Tabla 5. Pruebas de sensibilidad para hongos filamentosos, determinación de la CMI.

CIM (ug/mL) en Hongos filamentosos				
Compuesto	<i>M. hie.</i>	<i>A. fum.</i>	<i>T. cut.</i>	<i>R. ory.</i>
A	16	16	8	4
B	16	16	16	8
C	16	16	16	16
D	16	16	16	16
E	16	16	16	16
F	16	16	16	16
G	16	16	16	16
Itraconazol	4	1	8	1

Como se muestra en la tabla 7, solo los compuestos A y B presentaron actividad antifúngica, siendo el compuesto A el que presentó actividad frente a *Trichosporon cutaneum* y *Rhizopus oryzae*, teniendo mayor afinidad por este último al presentar una CMI menor con un valor de 4ug/mL. Se puede destacar que este compuesto presenta una CMI equivalente con Itraconazol, de 8ug/mL, frente a *T. cutaneum*, como se muestra en la gráfica 2.

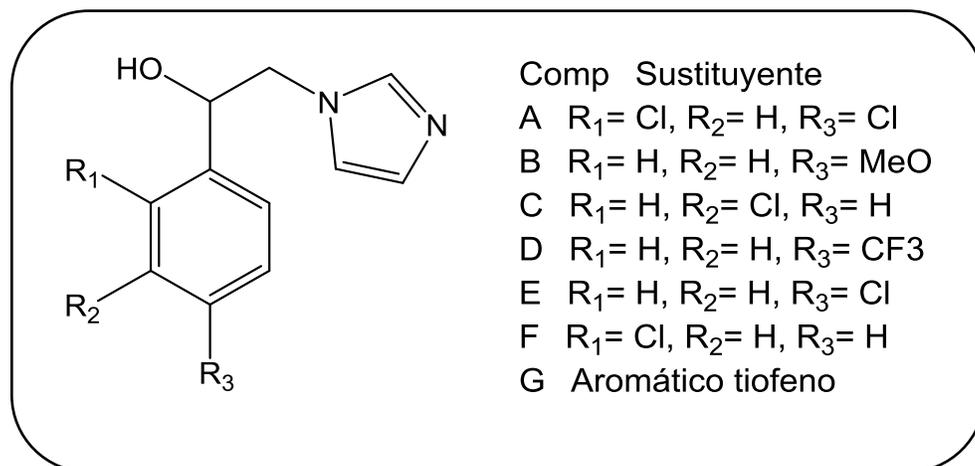
Por otra parte el compuesto B únicamente tiene actividad frente a *Rhizopus oryzae* a una CMI de 8 ug/mL



Grafica 2. Pruebas de sensibilidad para hongos filamentosos, determinación de la CMI.

5.2.2 TROLOX TEAC usando DPPH

En el instituto de CIBA-IPN de Tlaxcala se realizaron las pruebas de evaluación antioxidante por medio del método TROLOX TEAC usando DPPH, con la finalidad de obtener la actividad antioxidante equivalente al DPPH de los compuestos sintetizados, esquema 12.



Esquema 15. Compuestos fenil (1-H-imidazoil) etanoles evaluados

Para la determinación de la actividad antioxidante de los compuestos, se realizaron soluciones a concentración 20mM de cada compuesto, se tomaron 0.1µL de cada muestra se le adicionó a cada uno 2.9 µL de la disolución de DPPH, en etanol. Manteniéndola en oscuridad durante 30 minutos. La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración. Se utiliza antioxidante TROLOX como referencia.

Durante la preparación de las diluciones el compuesto A no presento cambio de color, por lo cual, no se midieron absorbancias del mismo. De los 6 compuestos restantes se realizó la lectura de absorbancias por cuadruplicado, de las cuales se calcularon desviaciones estándar, consiguiendo valores menores de 0.02, lo cual indica que los resultados obtenidos son confiables.

A partir de las absorbancias se calculó el % de reducción por medio de la fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs compuesto}}{\text{Abs control}} \times 100$$

Como se observa en la tabla 8, el orden creciente de la capacidad antioxidante obtenida, determinada por el método DPPH, es de G<F<C<B<E<D. Donde G presenta un valor negativo mientras que los compuestos de B, C, E, F, tienen porcentajes de reducción que van de 1 a 5%. Valores muy bajos en comparación con el porcentaje de reducción de la referencia que tiene un valor de 95.0219619%. Sin embargo el compuesto D con un valor de 42.0204978% fue el más alto en comparación del resto. Esto se puede explicar debido a que oxidantes son compuestos electrofílicos, es decir, especies que tienen avidez por los electrones. Considerando que la electronegatividad de los elementos sustituyentes en orden creciente son S< Cl< O<F, se puede observar que los resultados obtenidos cumplen con este fenómeno.

Sin embargo el grupo $-OCH_2$ es un grupo electrodonador, por el contrario de los otros grupos, por lo que no podemos perder de vista la posición en donde se encuentra sustituido cada grupo, ya que los sustituyentes activantes (libera electrones) orientan a orto y para mientras que casi todos los sustituyentes desactivantes (atrae electrones) orientan a meta. Con lo cual se explicaría por qué la capacidad antioxidante obtenida en los compuestos clorados va en orden creciente F (-orto), C (-meta), E (-para) dependiendo de la posición sustituida, y que el compuesto B a pesar de ser un grupo electrodonador tenga actividad antioxidante superior a los compuestos G, F y C.

Tabla 6. Porcentaje de reducción de los compuestos fenil (1-H-imidazoil).

Compuesto	Promedio de Abs	Desviación estándar	Coefficiente de variación (CV%)	% de reducción
Blanco	0	0.001	2.9205E+16	
Control	0.683	0.008	1.171	
B	0.655	0.013	1.926	4.09956076
C	0.668	0.006	0.869	2.19619327
D	0.474	0.013	2.671	42.0204978
E	0.649	0.004	0.585	4.97803807
F	0.674	0.004	0.608	1.31771596
G	0.684	0.008	1.168	-0.14641288
Referencia	0.034	0	1.048	95.0219619

Ya que el compuesto D tiene el porcentaje de reducción más alto, debido a la alta electronegatividad del Fluor como se mencionó anteriormente, fue el que se evaluó a diferentes concentraciones. Obteniendo los resultados descritos en la tabla 9 y 10. Donde se observa que la actividad antioxidante es dependiente de la concentración del compuesto analizado.

Tabla 7. Porcentaje de reducción del compuesto D

Concentración (mM)	Promedio de Abs	Desviación estándar	Coficiente de variación (CV%)	% de reducción
Blanco	0	0.001	-7.5082E+16	
Control	0.683	0.007	1.063	
15	0.244	0.025	6.838	62.86149163
14	0.283	0.006	1.455	56.92541857
13	0.305	0.004	1.028	53.57686454
12	0.337	0.014	3.097	48.70624049
11	0.359	0.004	1.001	45.35768645

Tabla 8. Datos de la curva a concentración contra porcentaje de reducción.

X	Y
[mM]	% Reducción
15	62.86149163
14	56.92541857
13	53.57686454
12	48.70624049
11	45.35768645

A partir de los resultados obtenidos se calculó la IC_{50} a partir de la siguiente ecuación:

$$IC_{50} = \left[\frac{(x_1 - x_2)}{(y_1 - y_2)} (50 - y_2) \right] + x_2$$

El compuesto D presentó una actividad antirradical dependiente de la concentración inhibiendo el radical DPPH con un valor IC_{50} de 12.2656 mM una vez sustituidos los valores en la formula.

$$IC_{50} = \left[\frac{(13 - 12)}{(53.57686454 - 48.70624049)} (50 - 48.70624049) \right] + 12 = 12.2656 \text{ m}$$

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 SINTESIS ORGANICA.

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 atmosfera de nitrógeno.

Los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. La *N,N*-Dimetilformamida (DMF) fue secada con hidruro de calcio (CaH₂) y luego destilada.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet Avatar 360 FT-IR-ESP, utilizando la técnica de pastilla de bromuro de potasio (KBr).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (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 (δ) está dado en partes por millón (ppm). Los disolventes utilizados en estos estudios fueron: cloroformo deuterado (CDCl₃) y sulfóxido de dimetilo deuterado (DMSO-D₆)

Las abreviaturas para la interpretación de los espectros de RMN-¹H es la siguiente:

s= Señal simple

d= Señal doble

t= Señal triple

q= Señal cuádruple

qt= Señal quintuple

dd= Señal doble de doble

ddd= Señal doble de doble de doble

m=Señal múltiple

Los espectros de masas (EM) se obtuvieron en un equipo JOEL JMS-SX-102-A por impacto electrónico a 70 e.V.

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

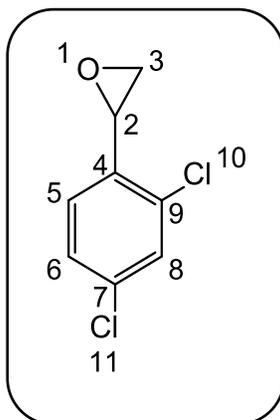
6.1.1 Obtención de epóxido con yoduro de trimetilsulfonio

6.1.1.1 Reacción de Corey- Chaykovsky

Método general B

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de tres bocas, provisto con agitación magnética, refrigerante, termómetro y bajo atmosfera inerte de nitrógeno, se colocaron 3mmol de hidróxido de potasio. Posteriormente se adicionaron 2 mmol de yoduro de trimetilsulfonio. Enseguida se agregó con una jeringa 2 mmol de benzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se monitoreo mediante CCF empleando como eluyente un sistema de Hexano/AcOEt (8:2) tratado con una gota de trimetilamina. La reacción se calentó durante 3 horas, pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido blanco la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporo a sequedad, obteniéndose un líquido amarillo de olor característico. El producto se utilizó en crudo para la siguiente reacción.

2-(2,4-diclorofenil) oxirano (7)



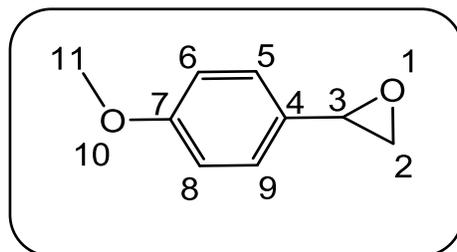
Siguiendo el método general B se colocaron 0.350 g de 2,4-diclorobenzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.408g de trimetilsulfonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido blanco, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f= 0.62 (Hexano/AcOEt: 8.2)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ= 2.63 (dd, *J*= 2.4 Hz, 1H, H-1b), 3.18 (dd, *J*= 4.2 Hz, 1H, H-1a), 4.15 (m, *J*= 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.21 (dd, *J*= 0.6 Hz, 1H, H-8), 7.21 (dd, *J*= 0.6 Hz, 1H, H-7), 7.36 (d, *J*= 1.8 Hz, 1H, H-5) ppm.

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃) δ= 49.5 (C-2), 50.6 (C-1), 126.5 (C-7), 127.3 (C-8), 128.8 (C-5), 133.6 (C-5), 133.9 (C-3), 134.1 (C-6) ppm.

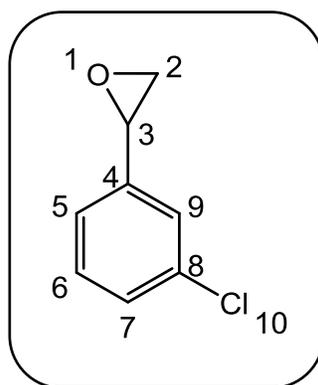
2-(4-metoxifenil) oxirano (14)



Siguiendo el método general B se colocaron 0.272g de 4-metoxibenzaldehido disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.408g de trimetilsulfonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido blanco, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporo a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

Rf= 0.60 (Hexano/AcOEt: 8.2)

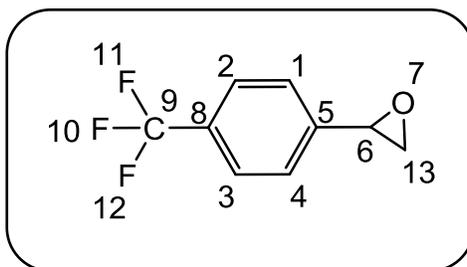
2-(3-clorofenil) oxirano (15)



Siguiendo el método general B se colocaron 0.2811 g de 3-clorobenzaldehido disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.408g de trimetilsulfonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido blanco, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporo a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

Rf= 0.59 (Hexano/AcOEt: 8.2)

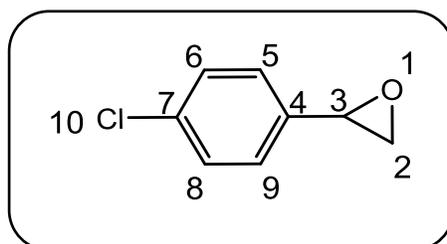
2-(4-(trifluorometil) fenil) oxirano (16)



Siguiendo el método general B se colocaron 0.348 g de 4-(trifluorometil)benzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.408g de trimetilsulfonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido blanco, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f= 0.51 (Hexano/AcOEt: 8.2)

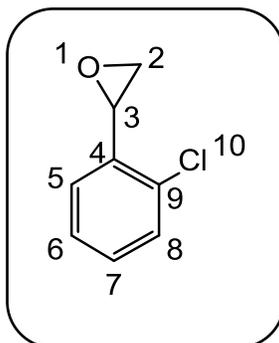
2-(4-clorofenil) oxirano (17)



Siguiendo el método general B se colocaron 0.2811 g de 4-clorobenzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.408g de trimetilsulfonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido blanco, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f= 0.56 (Hexano/AcOEt: 8.2)

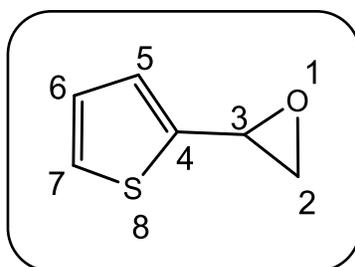
2-(2-clorofenil) oxirano (18)



Siguiendo el método general B se colocaron 0.2811 g de 4-clorobenzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.408g de trimetilsulfonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido blanco, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f = 0.87 (Hexano/AcOEt: 8.2)

2-(tiofen-2-il) oxirano (19)



Siguiendo el método general B se colocaron 0.22 g de tiofen-2-carbaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.408g de trimetilsulfonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido blanco, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f = 0.53 (Hexano/AcOEt: 9:1)

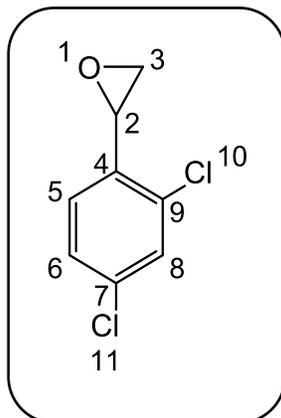
6.1.2 Obtención de epóxido con yoduro de trimetilsulfoxonio

Reacción de Corey- Chaykovsky

Método general A

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de tres bocas, provisto con agitación magnética, refrigerante, termómetro y bajo atmosfera inerte de nitrógeno, se colocaron 3mmol de hidróxido de potasio. Posteriormente se adicionaron 2mmol de yoduro de trimetilsulfoxonio. En seguida se agregó con una jeringa 2mmol de benzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se monitoreo mediante CCF empleando como eluyente un sistema de Hexano/AcOEt (8:2) tratado con una gota de trimetilamina. La reacción se calentó durante 3 horas, pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido amarillo claro, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporo a sequedad, obteniéndose un líquido amarillo de olor característico. El producto se utilizó en crudo para la siguiente reacción.

2-(2,4-diclorofenil) oxirano (7)



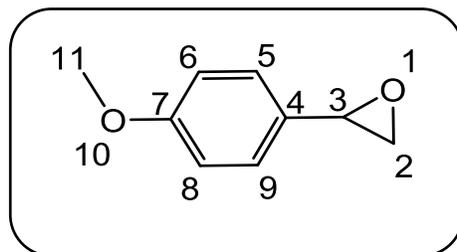
Siguiendo el método general A se colocaron 0.350 g de 2,4-diclorobenzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.44g de trimetilsulfoxonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido amarillo claro, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f = 0.64 (Hexano/AcOEt: 8.2)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ = 2.63 (dd, J = 2.4 Hz, 1H, H-1b), 3.18 (dd, J = 4.2 Hz, 1H, H-1a), 4.15 (m, J = 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.21 (dd, J = 0.6 Hz, 1H, H-8), 7.21 (dd, J = 0.6 Hz, 1H, H-7), 7.36 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-5) ppm.

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃) δ = 49.5 (C-2), 50.6 (C-1), 126.5 (C-7), 127.3 (C-8), 128.8 (C-5), 133.6 (C-5), 133.9 (C-3), 134.1 (C-6) ppm.

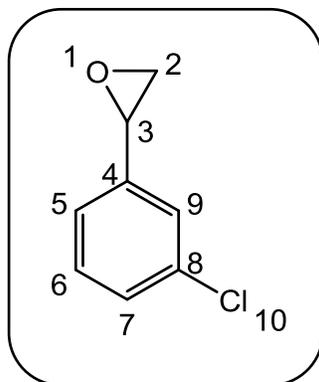
2-(4-metoxifenil) oxirano (14)



Siguiendo el método general A se colocaron 0.272g de 4-metoxibenzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.44g de trimetilsulfoxonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido amarillo claro, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f= 0.62 (Hexano/AcOEt: 8.2)

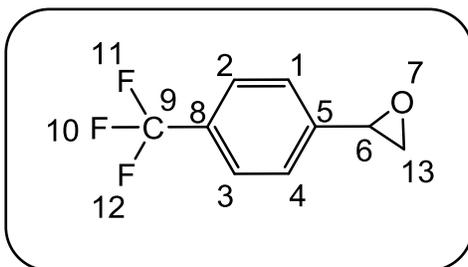
2-(3-clorofenil) oxirano (15)



Siguiendo el método general A se colocaron 0.2811 g de 3-clorobenzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.44g de trimetilsulfoxonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido amarillo claro, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f= 0.58 (Hexano/AcOEt: 8.2)

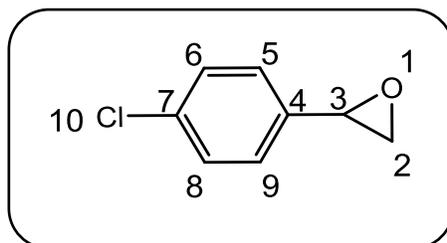
2-(4-(trifluorometil) fenil) oxirano (16)



Siguiendo el método general A se colocaron 0.348 g de 4-(trifluorometil) benzaldehido disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.44g de trimetilsulfoxonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido amarillo claro, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f = 0.53 (Hexano/AcOEt: 8.2)

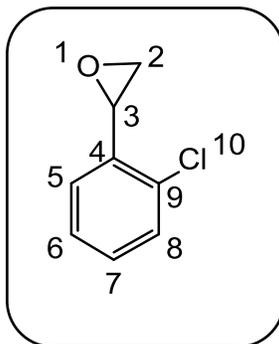
2-(4-clorofenil) oxirano (17)



Siguiendo el método general A se colocaron 0.2811 g de 4-clorobenzaldehido disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.44g de trimetilsulfoxonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido amarillo claro, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f = 0.54 (Hexano/AcOEt: 8.2)

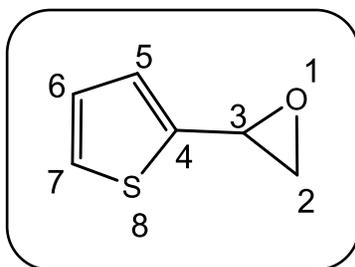
2-(2-clorofenil) oxirano (18)



Siguiendo el método general A se colocaron 0.2811 g de 4-clorobenzaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.44g de trimetilsulfoxonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido amarillo claro, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f= 0.85 (Hexano/AcOEt: 8.2)

2-(tiofen-2-il) oxirano (19)



Siguiendo el método general A se colocaron 0.22 g de tiofeno-2-carbaldehído disuelto en 3mL de acetonitrilo con 0.154g de KOH y 0.44g de trimetilsulfoxonio. El crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observando la precipitación de un sólido amarillo claro, la mezcla se filtró al vacío. El disolvente se evaporó a sequedad. El producto se utilizó en forma cruda para la siguiente reacción.

R_f= 0.57 (Hexano/AcOEt: 9:1)

6.1.3 Síntesis del grupo benciloxifenetil, compuestos fenil-(1-h-imidazoil) etanoles

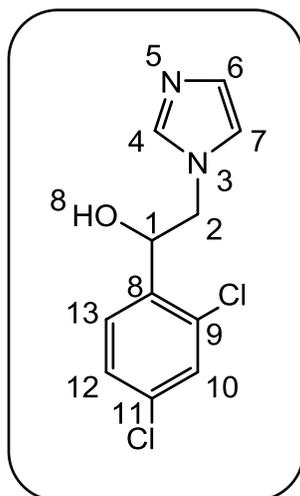
Apertura básica de epóxido.

Método general C.

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de tres bocas, provisto con agitación magnética, refrigerante y bajo atmosfera inerte de nitrógeno, se inyectaron 3 mL de dimetilformamida (DMF) anhidra. Posteriormente se agregaron 3 mmol de hidruro de sodio, se dejó en agitación por 10 minutos, en seguida se adicionaron 1.8 mmol de imidazol disuelto en 5 mL de DMF dejando caer gota a gota. Se mantuvo en agitación por 15 minutos. Pasado este tiempo, se adicionaron lentamente 1.8 mmol de oxirano disueltos en 2 mL de DMF. La reacción se mantuvo en agitación constante, bajo atmosfera inerte de nitrógeno y a reflujo durante 22 horas hasta agotar la materia prima, la reacción se monitoreo mediante CCF empleando como eluyente un sistema de Hexano/AcOEt (6:4). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporo hasta sequedad obteniéndose un líquido viscoso ámbar.

El crudo de reacción se cristalizó, para posteriormente lavarlo repetidas veces con Hexano/ AcOEt (9:1) hasta obtener un sólido de color característico.

(2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol (13)



Siguiendo el método general se colocaron 0.3384 g de 2-(2,4-diclorofenil) oxirano (**7**) disueltos en 2mL de DMF anh, 0.122g de imidazol y 0.071g de NaH. El crudo de reacción fue tratado por medio de extracciones donde la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad obteniéndose un líquido viscoso ámbar. Para obtener el compuesto deseado se realizó una recrystalización usando AcOEt. Obteniéndose un sólido color amarillo mostaza, con un rendimiento de 45% con yoduro de trimetilsulfonio y 36.5% con yoduro de trimetilsulfoxonio.

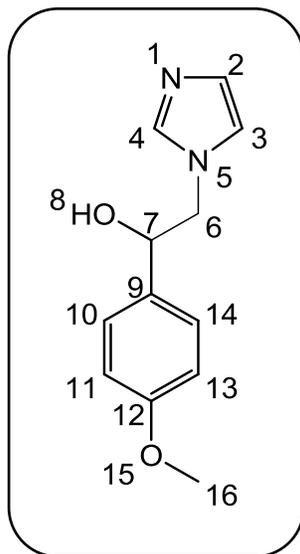
PF= 128-133°C

Rf= 0.32 (Hexano/AcOEt: 8:2)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ= 7.59 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.51 – 7.37 (m, 3H), 7.04 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.08 (dt, *J* = 7.5, 3.8 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 14.1, 3.5 Hz, 1H), 4.04 (dd, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 1H) ppm.

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃) δ= 139.11, 133.20, 132.25, 131.82, 129.82, 128.86, 127.92, 127.27, 117.36, 69.15 (C-1), 52.05 (C-2) ppm.

(1H-imidazol-1-il)(4-metoxifenil) etanol (20)



Siguiendo el método general C se colocaron 0.27 g de 2-(4-metoxifenil) oxirano (**14**) disueltos en 2mL de DMF anh., 0.122g de imidazol y 0.071g de NaH. El crudo de reacción fue tratado por medio de extracciones donde la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad obteniéndose un líquido viscoso ámbar. Para obtener el compuesto deseado se realizó una recrystalización usando AcOEt. Obteniéndose un sólido color beige oscuro, con un rendimiento de 53% con yoduro de trimetilsulfonio y 27.5% con yoduro de trimetilsulfoxonio.

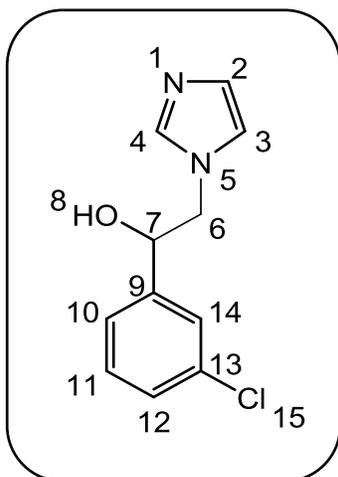
PF= 159-162°C

Rf= 0.19 (Hexano/AcOEt: 6:4)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ= 7.47 (s, 1H), 7.29 – 7.19 (m, 2H), 7.10 (s, 1H), 6.94 – 6.84 (m, 2H), 6.82 (s, 1H), 5.61 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.76 (dt, *J* = 8.4, 4.4 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 13.8, 4.4 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 13.8, 7.6 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.35 (s, 1H) ppm.

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃) δ= 158.51, 137.64, 134.60, 127.67, 127.15, 119.96, 113.42, 71.63, 55.00 (-7), 53.57 (C-6) ppm.

(3-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol (21)



Siguiendo el método general se colocaron 0.2811 g de 2-(3-clorofenil) oxirano **(15)** disueltos en 2mL de DMF anh, 0.122g de imidazol y 0.071g de NaH. El crudo de reacción fue tratado por medio de extracciones donde la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad obteniéndose un líquido viscoso ámbar. Para obtener el compuesto deseado se realizó una recrystalización usando AcOEt. Obteniéndose un sólido color amarillo mostaza, con un rendimiento de 60.4% con yoduro de trimetilsulfonio y 11.8% con yoduro de trimetilsulfoxonio.

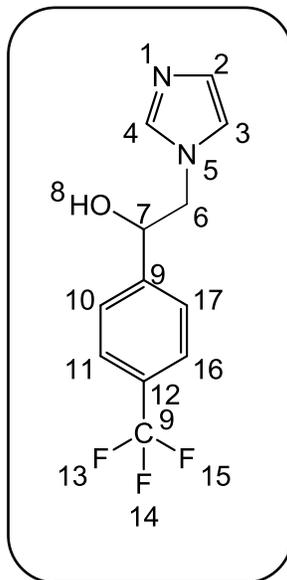
PF= 177-180°C

Rf= 0.14 (Hexano/AcOEt: 6:4)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ= 7.52 – 7.06 (m, 4H), 6.90 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 4.84 (dd, J = 6.6, 4.8 Hz, 1H), 4.06 (dt, J = 6.5, 2.4 Hz, 2H) ppm.

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃) δ= 137.63, 128.78, 127.02, 125.25, 124.22, 119.69, 77.45, 77.02, 76.60, 69.67 (C-7), 54.75 (C-6) ppm

(1H-imidazol-1-il)(4-(trifluorometil)fenil) etanol (22)



Siguiendo el método general se colocaron 0.3132 g de 2-(4-(trifluorometil)fenil)oxirano (**16**) disueltos en 2mL de DMF anh, 0.122g de imidazol y 0.071g de NaH El crudo de reacción fue tratado por medio de extracciones donde la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad obteniéndose un líquido viscoso ámbar. Para obtener el compuesto deseado se realizó una recristalización usando AcOEt. Obteniéndose un sólido color beige oscuro, con un rendimiento de 65.1% con yoduro de trimetilsulfonio y 22.9% con yoduro de trimetilsulfoxonio.

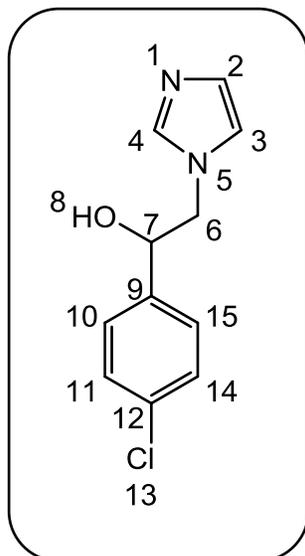
PF= 127-130°C

Rf= 0.35 (Hexano/AcOEt: 6:4)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ= 7.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.62 – 7.44 (m, 3H), 7.12 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.95 (dd, *J* = 7.6, 4.0 Hz, 1H), 4.20 (dd, *J* = 13.9, 4.1 Hz, 1H), 4.08 (dd, *J* = 13.9, 7.5 Hz, 1H) ppm.

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃) δ= 147.78, 128.77, 128.52, 128.27, 128.02, 127.28 (C-2), 125.86, 125.43 (C-3), 125.40, 125.37, 125.34, 123.69, 120.54, 71.90 (C-7), 53.62 (C-6) ppm.

(4-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol (23)



Siguiendo el método general se colocaron 0.279 g de 2-(4-clorofenil) oxirano (**17**) disueltos en 2mL de DMF anh, 0.122g de imidazol y 0.071g de NaH. El crudo de reacción fue tratado por medio de extracciones donde la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporo hasta sequedad obteniéndose un líquido viscoso ámbar. Para obtener el compuesto deseado se realizó una recrystalización usando AcOEt. Obteniéndose un sólido color beige oscuro, con un rendimiento de 64.5% con yoduro de trimetilsulfonio y 15% con yoduro de trimetilsulfoxonio.

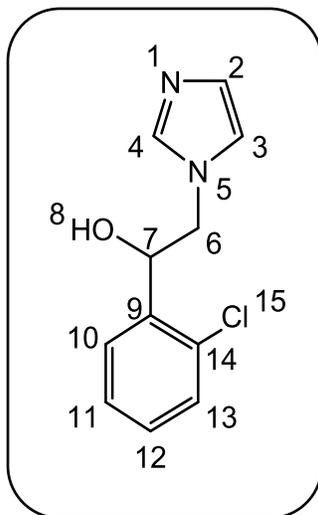
PF= 132-135°C

Rf= 0.11 (Hexano/AcOEt: 7:3)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ= 7.55 – 7.35 (m, 5H), 7.09 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.84 (dd, *J* = 7.5, 4.2 Hz, 1H), 4.14 (dd, *J* = 13.9, 4.3 Hz, 1) ppm.

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃) δ= 141.54, 137.66, 131.74, 128.20, 127.96, 127.85, 127.71, 119.99, 71.26 (C-7), 53.23 (C-6) ppm.

(2-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol (24)



Siguiendo el método general se colocaron 0.2811 g de 2-(2-clorofenil) oxirano (**18**) disueltos en 2mL de DMF anh, 0.122g de imidazol y 0.071g de NaH. El crudo de reacción fue tratado por medio de extracciones donde la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad obteniéndose un líquido viscoso ámbar. Para obtener el compuesto deseado se realizó una recristalización usando AcOEt. Obteniéndose un sólido color beige oscuro, con un rendimiento de 60.3% con yoduro de trimetilsulfonio y 10% con yoduro de trimetilsulfoxonio.

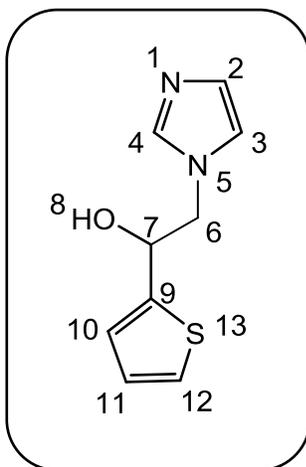
PF= 91-97°C

Rf= 0.07 (Hexano/AcOEt: 6:4)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ= 7.69 – 7.24 (m, 5H), 7.06 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 5.97 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 5.10 (dt, J = 7.0, 3.4 Hz, 1H), 4.18 (dt, J = 13.9, 2.5 Hz, 1H), 4.03 (ddd, J = 14.1, 7.6, 1.9 Hz, 1H) ppm.

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃) δ= 139.47, 137.64, 130.84, 129.10, 128.95, 127.87 (C-2), 127.22, 119.91 (C-3), 69.07 (C-7), 51.88 (C-6) ppm.

(1H-imidazol-1-il)(tiofen-2-il) etanol (25)



Siguiendo el método general se colocaron 0.2227 g de 2-(tiofen-2-il) oxirano (**19**) disueltos en 2mL de DMF anh, 0.122g de imidazol y 0.071g de NaH. El crudo de reacción fue tratado por medio de extracciones donde la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad obteniéndose un líquido viscoso ámbar. Para obtener el compuesto deseado se realizó una recrystalización usando AcOEt. Obteniéndose un sólido color beige oscuro, con un rendimiento de 68.3% con yoduro de trimetilsulfonio y 52.2% con yoduro de trimetilsulfoxonio.

PF= 113-116°C

R_f= 0.27 (Hexano/AcOEt: 8:2)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ= 7.45, 7.40, 7.37, 7.26, 7.06, 6.94, 4.98, 4.17, 4.15, 4.13, 0.04 ppm

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃) δ= 143.76, 136.85, 127.99, 126.24, 124.46, 123.44, 118.91, 76.45, 68.89 (C-7), 53.98 (C-6) ppm

6.2 PRUEBAS BIOLÓGICAS

6.2.1 Pruebas de sensibilidad antifúngica

En el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química de la UAEMéx se realizaron las pruebas de sensibilidad por medio de los métodos de microdilución en caldo descritos por el CLSI, documento M27-A3 para levaduras y M38 para hongos filamentosos, fueron adoptados como protocolos a seguir.

Se usó el medio de cultivo sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M, ajustado a pH $7\pm 0,1$ y con 0,2% de glucosa adquirido en Sigma-Aldrich. El fármaco de referencia empleado fue el Itraconazol. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Se utilizaron cepas de hongos filamentosos (*Mucor hiemalis* ATCC 8690, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16907, *Trichosporon cutaneum* ATCC 28592 y *Rhizopus oryzae* ATCC 10329) y levaduras del género *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. utilis* ATCC 9226, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 14243, *C. glabrata* ATCC 34138 y *C. parapsilosis* ATCC 22019), las cuales fueron expuestas a concentraciones de 16-0.03 $\mu\text{g/mL}$ frente a 7 compuestos sintetizados en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Química de la UAEMex descritos anteriormente.

6.2.1.1 Método de microdilución para levaduras (M27-A3)

Se siguió la metodología para antifúngicos insolubles en agua, se prepararon soluciones de las moléculas sintetizadas previamente (Antifúngico), pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración de 1.600 µg/mL de cada compuesto para disolverla en dimetil sulfóxido (DMSO).

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 (32 µg/mL - 0,06 µg/mL).

Las placas de microtiter se rellenan con 100 µL de solución de antifúngico el contenido de cada tubo se vierte en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se toman 100 µL y se llenan los pocillos de la columna nº 2 (2A - 2H) a la nº 11 (11A - 11H).

Los pocillos de la columna nº 12 se llenan con 100 µL de RPMI (control de crecimiento). Los pocillos de la columna nº 1 se llenan con 200 µL de RPMI (control de esterilidad).

Una vez llenas las placas se cierran y envuelven convenientemente con una bolsa de plástico o con papel de estaño, para evitar la evaporación, y se congelan a -70 °C, o bien a -40 °C.

El inóculo para *Candida spp.* se preparó tocando con el asa de cultivo colonias con 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina (NaCl 0,85%). Se agita bien, se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de 1×10^6 - 5×10^6 UFC/mL. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de 1×10^3 - 5×10^3). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$.

El día del ensayo se sacaron las placas del congelador y se dejaron a temperatura ambiente hasta su completa descongelación. Se inocularon con 100 µL de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12. La columna nº 1 (1A - 1H) que contiene 200 µL de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio. La columna nº 12 (12A - 12H) no contiene antifúngico pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico, siendo el control de crecimiento.

Las placas se incuban a 35 °C por 48 horas. Se realizó la lectura visual con ayuda de un espejo invertido.

6.2.1.2 Método de microdilución en caldo M38-A para hongos filamentosos

Las características del medio de cultivo, pH, preparación de la solución madre de antifúngico y diluciones son iguales a las del método M27-A3 para antifúngicos insolubles en agua, descrito previamente.

El inóculo se prepara a partir de un cultivo de 7 días de crecimiento a 35 °C en agar glucosado de patata (PDA), medio que induce la formación de conidias o esporangiosporas.

Para facilitar la recogida de conidias se introdujo el asa de cultivo en Tween 20 para posteriormente pasarla por encima de las conidias; después resuspender en solución salina. Se dejó sedimentar las partículas durante 3-5 min, transferir el sobrenadante a otro tubo y agitar vigorosamente durante 15 segundos. Debido a que el tamaño de las conidias es distinto para cada especie, la densidad óptica (DO) para obtener una concentración de $1-5 \times 10^6$ variará con la especie; por lo cual se siguió la tabla de intervalos de DO y de UFC/mL para los hongos filamentosos descrita por el CLSI.

Cada pocillo se inocula con 100 μ L de la suspensión de conidias o esporangiosporas desde el pocillo 2 hasta el 12. La columna nº 1 (1A - 1H) que contiene 200 μ L de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio. La columna nº 12 (12A - 12H) no contiene antifúngico pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico, siendo el control de crecimiento.

Las placas se incuban a 35 °C sin agitación hasta que se observa crecimiento en el pocillo control. Dependiendo de la especie se incubo de 24 a 48 horas.

6.2.2 Pruebas TROLOX TEAC usando DPPH

Se empleó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%) como antioxidante de referencia. El DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132) procede de Sigma-Aldrich.

Se preparó una solución de DPPH+ pesando 3.9 mg del radical en un matraz aforado, previamente tratado y protegido contra la luz. Se disolvió en 100 mL de metanol al 80%. Una vez preparada la solución se añadió 0.1 uL de la muestra y 2.9 uL de la solución. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente, en microplacas de 96 pozos protegidas de la luz, después de lo cual, se mide la absorbancia a 520 nm en un espectrómetro Elisa Versa Max Tunable Microplate Reader (Molecular Devices Co.). La concentración de DPPH+ en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox ($\mu\text{M/g}$ de muestra peso fresco).

Construcción de la curva estándar de **trolox**.

1. Se prepara una solución stock de trolox a una concentración de 0.0025 M en etanol.
2. Se preparan por duplicado las diluciones indicadas en la siguiente tabla.

Concentración (M)	Alícuota de sol. Stock (mL)	Etanol (mL)	Concentración Final (μM)
0.001616	3.232	1.768	2
0.001414	2.828	2.172	4
0.001212	2.424	2.576	6
0.00101	2.02	2.98	8
0.000808	1.616	3.384	10
0.000606	1.212	3.788	12
0.000404	0.808	4.192	14
0.000202	0.404	4.596	16

3. Posteriormente, a 1mL de la solución DPPH ajustada a 0.700 de absorbancia, se le adiciona 10 μL de la solución de trolox 0.001616 M (Concentración final $2\mu\text{M}$). Agitar bien y leer a 436 nm en el espectrofotómetro.
4. Monitorear el efecto secuestrante cada minuto durante 6 min.
5. Se calcula el porcentaje de reducción con la siguiente fórmula % Reducción = $((C - E/C) * 100)$, donde C= Absorbancia inicial del DPPH⁺, E= promedio de absorbancia del trolox.
6. Se grafica porcentaje de reducción contra concentración.

VII. CONCLUSIONES

Se obtuvieron los epoxidos a partir del uso de yoduro de trimetilsulfoxonio, sin embargo debido a la dificultad de su purificación y por consiguiente a los bajos rendimientos obtenidos, su uso no es rentable.

Con ayuda del uso de técnicas espectroscópicas unidimensionales como RMN-¹H, RMN-¹³C, se permitió llevar a cabo la elucidación de los compuestos sintetizados.

Los cuatro compuestos que presentaron CMI's de 8 a 0.5 ug/mL (A, B, E y F) pueden ser sometidos a reacciones de transformación del grupo hidroxilo para incrementar su actividad antifúngica y de esta manera obtener moléculas más específicas frente a ciertos tipos de especies, debido a que se observa mejor actividad frente a las levaduras *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*, así como a *Trichosporon cutaneum* y *Rhizopus oryzae* en caso de los hongos filamentosos.

En las pruebas antioxidantes destaca el compuesto D, que obtuvo el porcentaje de reducción más alto con un valor de 42.020% y se calculó una IC50 de 12.2656 mM.

VIII. REFERENCIAS

1. Méndez Tovar L, López Martínez R, Macotella Ruiz E, Manzano-Gayosso P, Serrano-Jaen L, Carmona-Castañón A et al. Variación en la frecuencia de micosis en México. *Rev Argen Microbiol*; **1999**; 31,107-113.
2. Bergoglio. Antibióticos. Ed Panamericana. Madrid, España; **1993**, 357-376.
3. Linares M, Charriel G, Solis F, Casal M. CHROMAgar *Candida* más fluconazol: comparación con técnicas de microdilución. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; **2003**, 21 (9), 493-497.
4. Sukanta K, Mendoza K, Biehl E. R. Microwave-assisted Hantzsch thiazole synthesis of N-phenyl-4-(6-phenylimidazo[2,1-b]thiazol-5-yl)thiazol-2-amines from the reaction of 2-chloro-1-(6-phenylimidazo[2,1-b]thiazol-5-yl)ethanones and thioureas. *Tetrahedron Lett*; **2012**, 53(37), 4921–4924.
5. Andreani A, et al. New antitumor imidazo[2,1-b]thiazole guanylhydrazones and analogues. *J Med Chem*; **2008**, 51(4), 809–816.
6. Kumari S, et al. Imidazole and its biological activities: A review. Department of Pharmaceutical Technology, Meerut Institute of Engineering & Technology, Meerut (UP), India. *Pelagia Research Library Der Chemica Sinica*; **2010**, 1 (3), 36-47
7. Allevalo M, Negroni R. Antifungicos; ayer, hoy y mañana. *Act Terap Dermatol*; **2007**, 30 (8), 8-19.
8. Sepkowitz, KA. Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*; **2002**, 34, 1098-1107.
9. López-Martínez R. Las micosis en la época del sida. *Rev Med IMSS*; **2000**, 38, 421-423.
10. Verma S, Heffernan MP. Superficial fungal infection: dermatophytosis, tinea nigra, piedra. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, editors. *Dermatology in general medicine*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; **2008**, 1807–1821.
11. Hay RJ, Ashbee HR. Superficial mycoses. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. 8 th. Singapore: Wiley Blackwell; **2010**, 35-68.
12. Azulay RD, Azulay DR, Abulafia LA, Azulay DR. *Dermatologia*. 5. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; *Micoses superficiais*; **2011**, 419–439.
13. Sobera JO, Elewski BE. Fungal diseases. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. New York: Mosby Elsevier; **2008**, 2, 1135–1149.
14. Patrick R, Murray. *Microbiología médica*. Elsevier Saunders; **2013**, 7, 643-651; 677-683
15. De la Torre-Saldaña VA, Martínez-Velázquez M, Reséndiz-Sánchez J. Factores de riesgo y epidemiología de la candidemia en el Hospital Juárez de México. *Med Int Méx*; **2014**, 30, 121-132

-
16. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*; **2006**, 20,485-506.
 17. Jorge G. Prevention of severe Candida Infections in non-neutropenic, high-risk, critically ill patients. *Intensive Care Med*; **2002**, 28, 1708-17.
 18. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, VandeBerg J, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*; **2003**, 37, 1172–7.
 19. Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken I, Messer SA, Tendokar S, Hollis RJ, et al. Effectiveness of anidulafungin in eradicating Candida species in invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*; **2012**, 56, 2518-2523
 20. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual moderno*; **2007**, 19, 658-662, 674-680
 21. Blitzer A, Lawson W. Mucositis de nariz y senos paranasales, Parte 1. In: Blitzer A, Lawson W, editors *Mucositis de cabeza y cuello. Clínicas Otorrinolaringológicas Norteam* McGraw-Hill; **1993**, 1011-1041.
 22. deShazo RD, O'Brien M, Chapin K, Soto-Aguilar M, Gardner L, Swain R. A new classification and diagnostic criteria for invasive fungal sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; **1997**, 123 (11), 1181-1188.
 23. Blitzer A, Lawson W, Meyers BR, et al. Patient survival factors in paranasal sinus mucormycosis. *Laryngoscope*; **1980**, 90, 635-648.
 24. Latgé JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*; **2001**, 9, 382-9.
 25. Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Epidemiology of and risk factors for invasive aspergillosis in nonneutropenic patients. *Rev Mal Respir*; **2008**, 25, 139-53.
 26. Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 regions. *J Clin Microbiol*; **1999**, 37, 920–4.
 27. Kaaman T, Torssander J. Dermatophytid: a misdiagnosed entity. *Acta Derm Venereol (Stockh)*; **1983**, 63, 404–8.
 28. Azulay RD, Azulay DR, Abulafia LA, Azulay DR. *Dermatologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; Micosis superficiais*; **2011**, 5, 419–439.
 29. Vázquez del Mercado E, Arenas R. V. Mucositis oportunistas en pacientes inmunocomprometidos. *Gac Méd Méx*; **2008**, 144 (2), 609-614
 30. Cuéllar Ponce de León E. Infecciones en huéspedes inmunocomprometidos. *Rev Med Hered*; **2013**, 24, 156-161
 31. Álvarez F, Figueras C, Roselio E, y en representación del Grupo de Trabajo de Infecciones Fúngicas de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Infecciones fúngicas invasivas emergentes. *An Pediatr (Barc)*; **2010**, 73 (1), 52.e1-52.e6
 32. Martín del Campo Rodríguez L, Sifuentes Osornio J. Infecciones oportunistas en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida: La historia en México a 20 años del inicio de la epidemia. *Rev Invest Clín*; **2004**, 56(2), 169-180

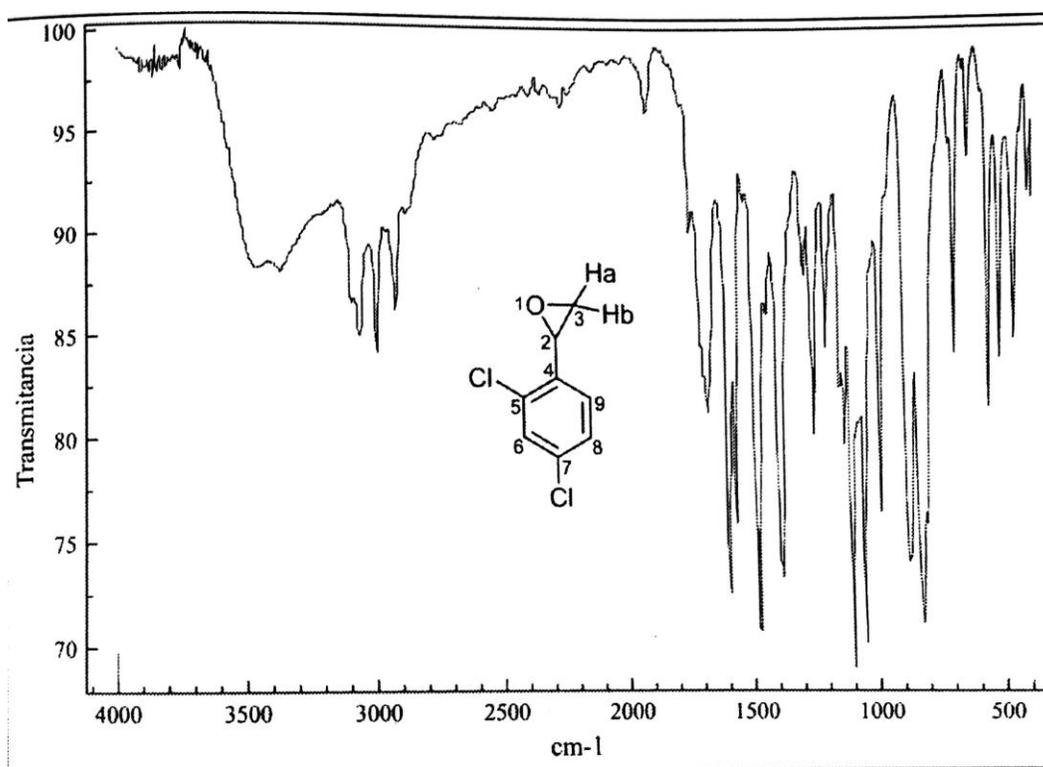
-
33. Hernández Hernández F, Córdova Martínez E, Manzano Gayosso P, López Álvarez R, Bazan Mora E, López Martínez R. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. *Salud pública Méx*; **2003**, 45(6)
 34. Arenas R. Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol*; **2002**, 19, 63-67.
 35. Méndez Tovar L. IV. Las micosis sistémicas en México. *Gac Méd Méx*; **2008**, 144 (2).
 36. Gupta V, et al. A Review on Biological Activity of Imidazole and Thiazole Moieties and their Derivatives. *Science International*; **2013**, 1 (7), 253-260.
 37. Bogdal D, Pielichowski J, Jaskot K. Remarkable Fast N-Alkylation of Azaheterocycles under Microwave Irradiation in Dry Media. *Heterocycles*; **1997**, 45, 715.
 38. Ramírez A. Síntesis de análogos de Miconazol. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Química. Departamento de Química Orgánica; **2012**, pág 10
 39. Cuenca Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. *Rev Esp Quimioter*; **2010**, 23(4), 169-176.
 40. Fernández Velázquez P. *Farmacología Básica y Clínica*, Ed. Médica; **2008**, 18, 957-972
 41. Peng XM, et al. Recent developments in azole compounds as antibacterial and antifungal agents. *Curr Top Med Chem*; **2013**, 13(16), 1963-2010.
 42. Rostom Sherif A. F, et al. Azole antimicrobial pharmacophore-based tetrazoles: Synthesis and biological evaluation as potential antimicrobial and anticonvulsant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **2009**, 17 (6), 2410–2422 .
 43. Shashank Kumar and Abhay K. Pandey. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*; **2013**, 2013, 16
 44. Isham N, Ghannoum M. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains; **2010**, 53, 434-437.
 45. Pfaller M. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Med*; **2012**, 125, 3-13.
 46. Pontón J, Quindós G. Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Med Clin (Barc)* **2006**, 126, 56-60.
 47. Gomez Q. Resistencia de levaduras del genero *Candida* al fluconazol. *Infectio*. **2010**, 14, 172-180.
 48. Manzano P, Mendez L, Hernandez F. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac. Méd Méx*; **2008**, 144 (1), 357-362.
 49. López K, Dzul K, Lugo C, Arias J, Zavala J. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomed*; **2016**, 27,127-136.

-
50. Tajbakhsh M, Hosseinzadeh R, Rezaee P, Alinezhad H. Regioselective Ring Opening of Epoxides with Amines Using Silica-bonded S-sulfonic Acid under Solvent-free Conditions. *J. Mex Chem. Soc*; **2012**, 56 (4), 402-407.
 51. Corey, E. J.; Chaykovsky, M. *J. Am. Chem. Soc*; **1962**, 84, 867–868.
 52. Wade L. G. *Química Orgánica*. Pearson Prentice Hall. Madrid; **2004**, 338-378, 601-625
 53. Fressenden R, Fressenden J. *Química Orgánica*. Grupo Editorial Iberoamérica. California; **1983**, 303-307.
 54. Yurkanis Bruce P. *Química Organica*. 5° Ed. Pearson Prentice Hall. Mexico; **2008**, 454-455.
 55. Acosta H, Barraza C, Gonzalez M, Martinez B, Viola D. H Proceso de Produccion Industrial de Sulfato Ferroso Heptahidratado En La Empresa Productos Químicos Panamericana P. Q. P Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia. Diseño de reactores; **2013**, 1-9
 56. Amaya F, Flores O. ESTUDIO DE INGENIERIA SOSTENIBLE PARA LA OBTENCIÓN DE FURFURAL COMO SUBPRODUCTO DE LA AGROINDUSTRIA DEL MAÍZ. Universidad de el Salvador facultad de Ingeniería y Arquitectura escuela de Ingeniería Química. Ciudad universitaria; **2011**.
 57. Nour-Eddine Es-Safi, Souhila Ghidouche, Paul Henri Ducrot. Flavonoids: Hemisynthesis, Reactivity, Characterization and Free Radical Scavenging Activity. *Molecules* **2007**, 12, 2228-2258.
 58. Pereira D, Valentão P, Pereira J, Andrade P. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* **2009**, 14, 2202-2211.
 59. Nour-Eddine Es-Safi, Souhila Ghidouche, Paul Henri Ducrot. Flavonoids: Hemisynthesis, Reactivity, Characterization and Free Radical Scavenging Activity. *Molecules* **2007**, 12, 2228-2258.
 60. Kumari S, et al. Imidazole and its biological activities: A review. Department of Pharmaceutical Technology, Meerut Institute of Engineering & Technology, Meerut (UP), India. *Pelagia Research Library Der Chemica Sinica*, **2010**, 1 (3),36-47.
 61. Delgado Olivares L, Betanzos Cabrera, Sumaya Martínez M. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*; **2010**, 50, 10-15.
 62. Dragan Amic, Dusanka Davidovic-Amic, Drago Beslo, Nenad Trinajstic. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA*, **2003**, 76 (1), 55-61.
 63. Reguero M, et al. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **1989** 1 (17), 81-84
 64. Cecilia V, Tapia P. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infect*; **2009**, 26 (2) ,144-150.

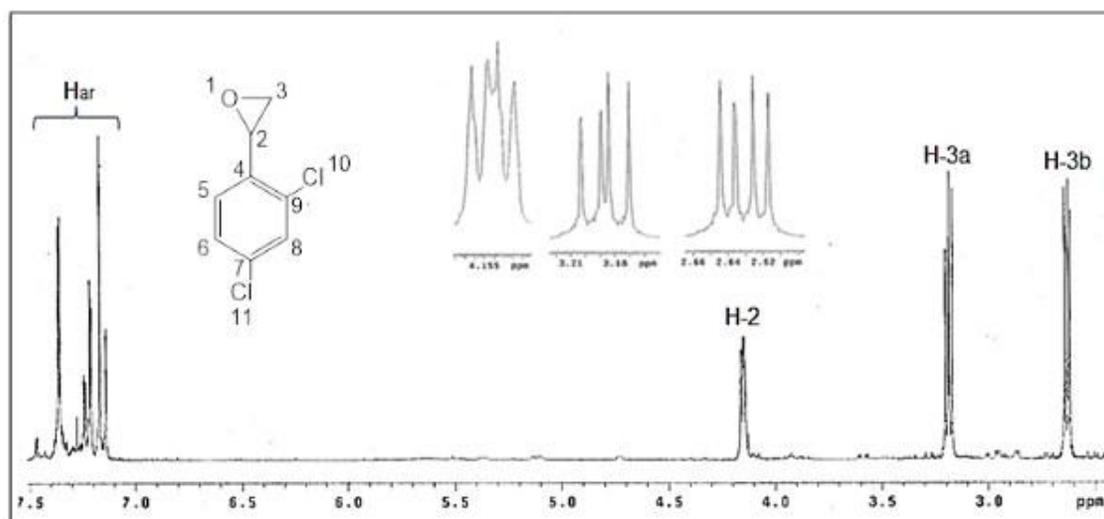
-
65. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol*; **2007**, 45, 569-87.
 66. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved standard M44-A. NCCLS, Wayne, PA, USA, **2004**, 29 (17), 610-688
 67. Canton E, Martin E, Espinel A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A) *Revista iberoamericana de Micología*; **2007**, 15^a-1-15b-6
 68. Arena E, Fallico B, Maccarone E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem*; **2001**, 74, 423-427.
 69. Kuskoski E, Asuero A, Troncoso. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*; **2005**, 25, 726-732.
 70. Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice E. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med*; **1999**, 26, 1231-1237.

IX. ANEXOS

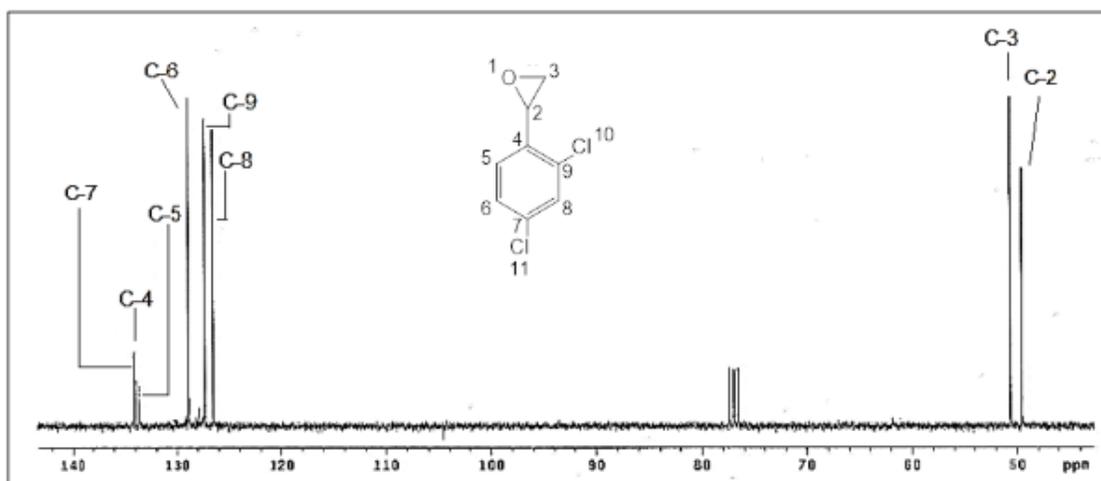
10.1 IR del 2-(2,4-diclorofenil) oxirano



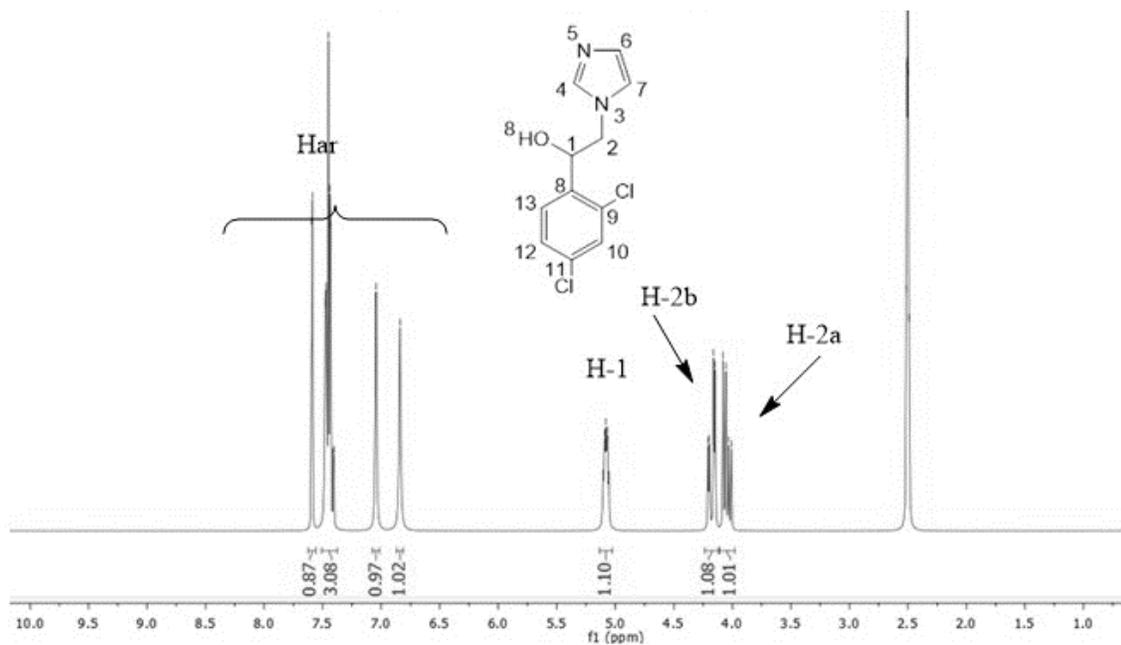
10.2 RMN ¹H del 2-(2,4-diclorofenil) oxirano



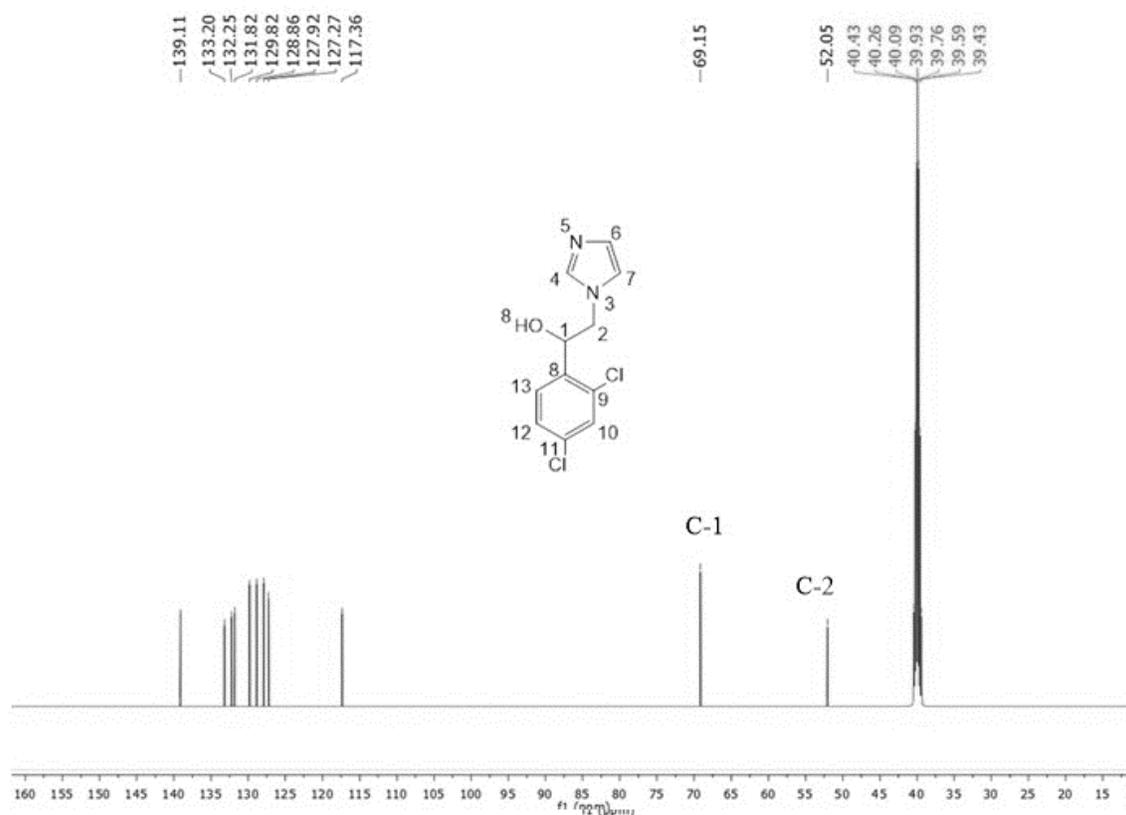
10.3 RMN ^{13}C del 2-(2,4-diclorofenil) oxirano



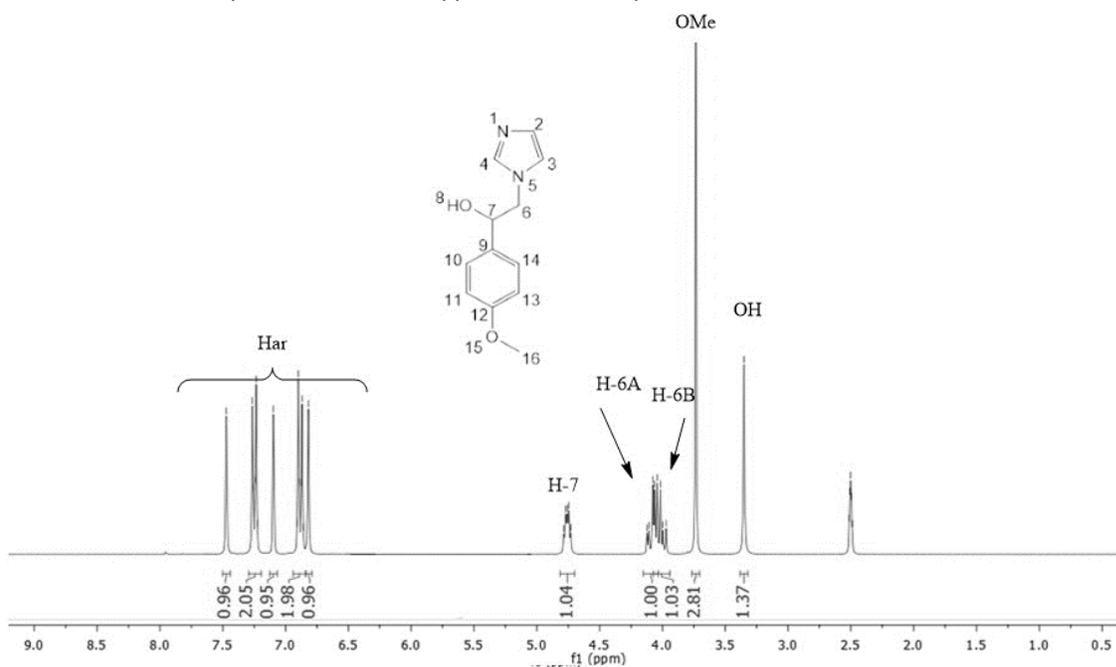
10.4 RMN ^1H del (2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol



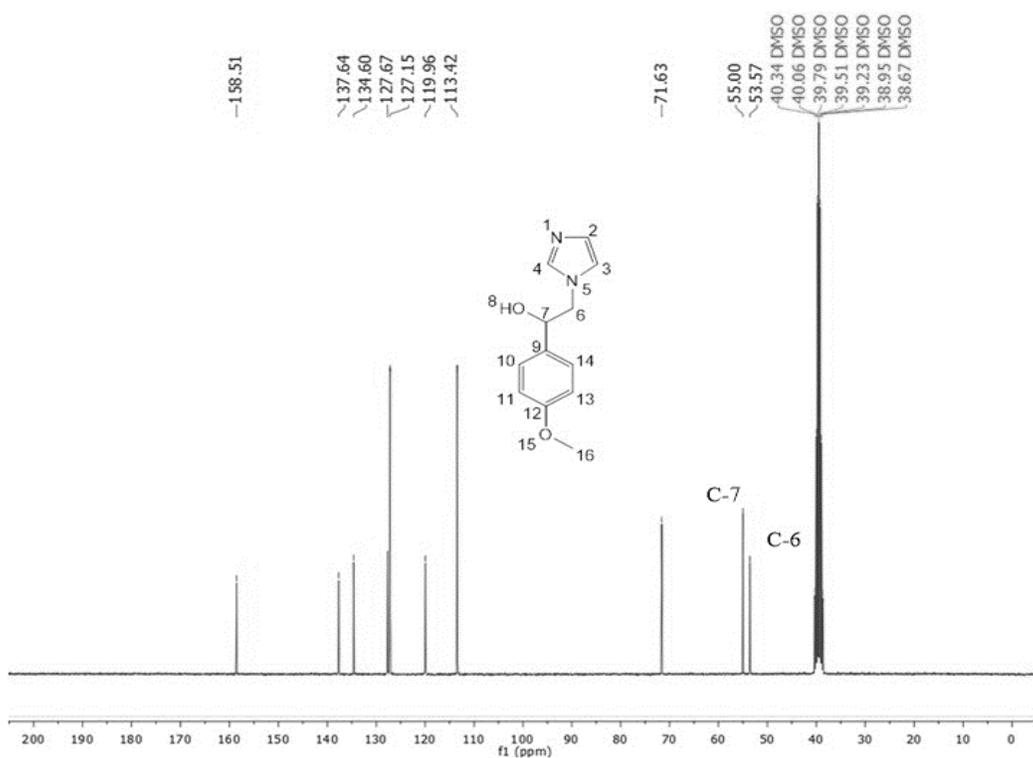
10.5 RMN ^{14}C del (2,4-diclorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol



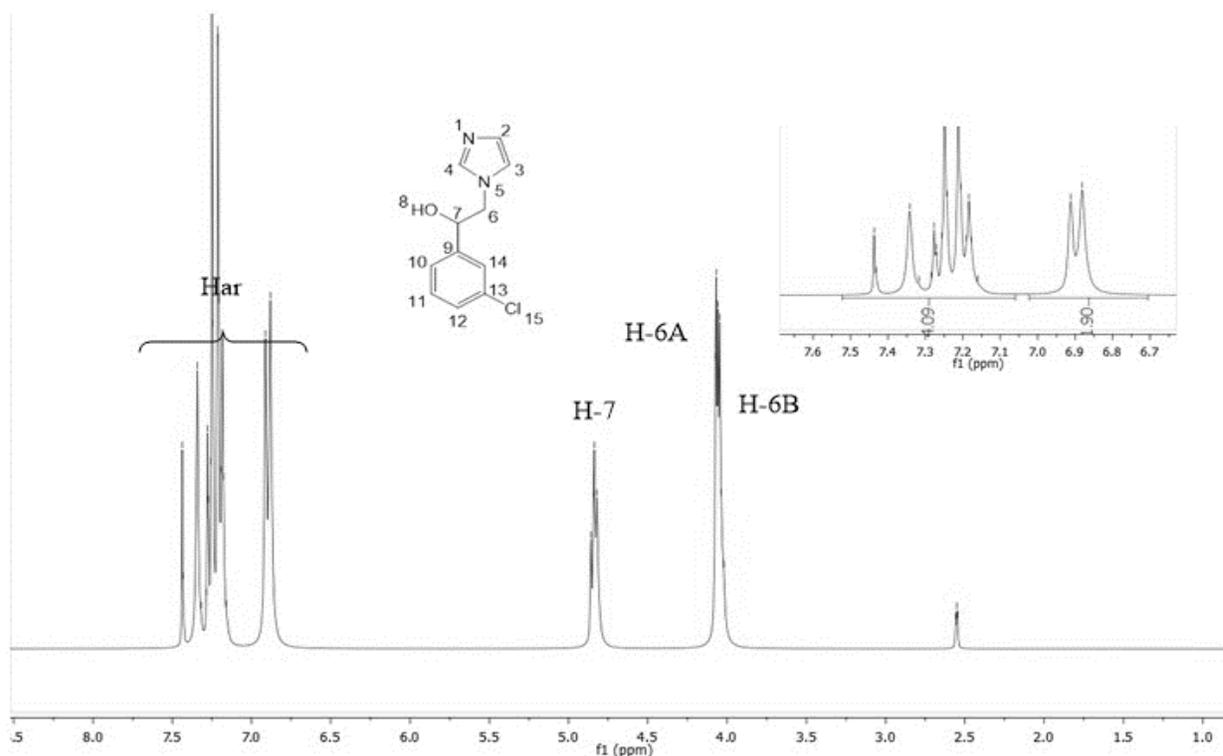
10.6 RMN ^1H del (1H-imidazol-1-il)(4-metoxifenil) etanol



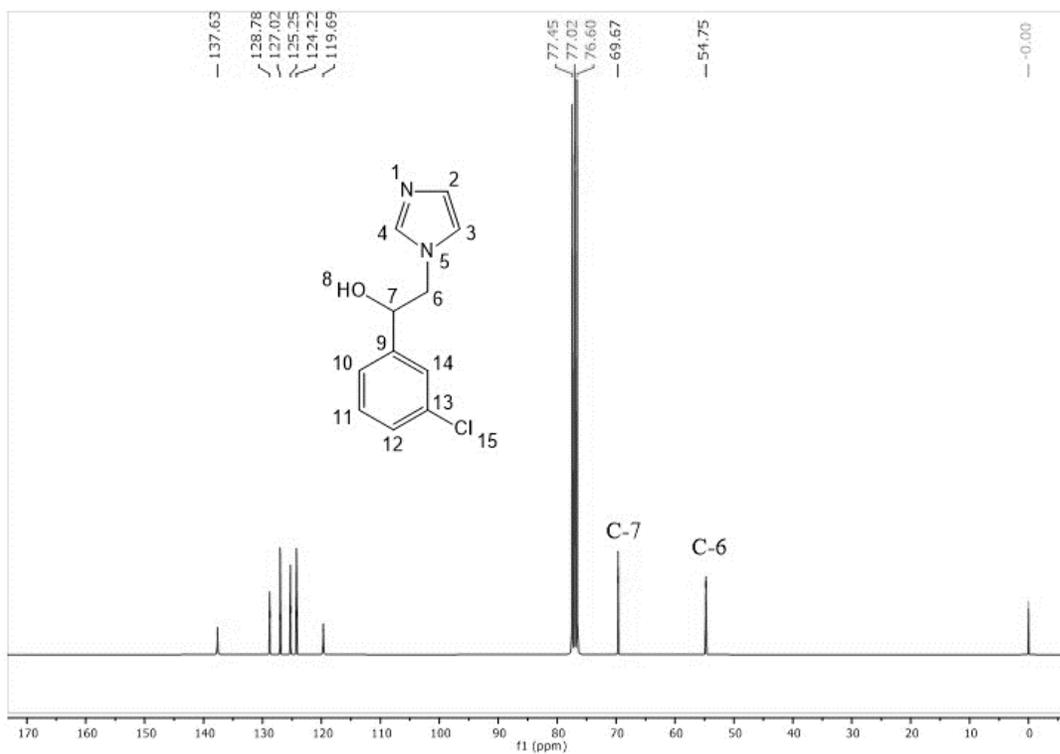
10.7 RMN ^{13}C del (1H-imidazol-1-il)(4-metoxifenil) etanol



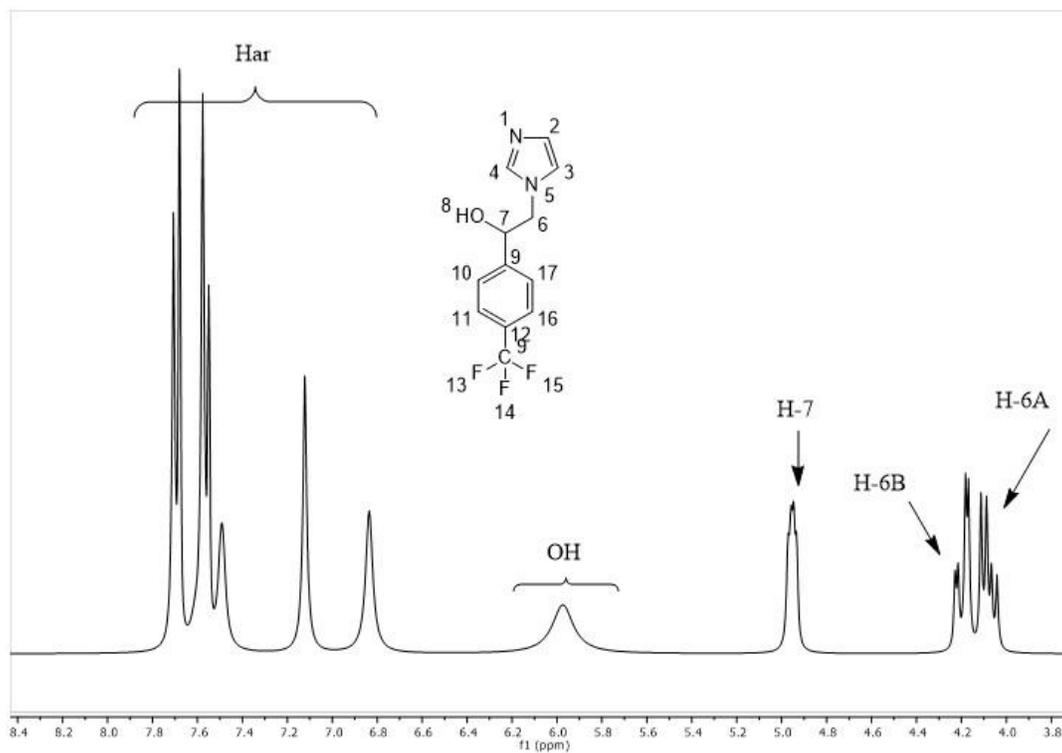
10.8 RMN ^1H del (3-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol



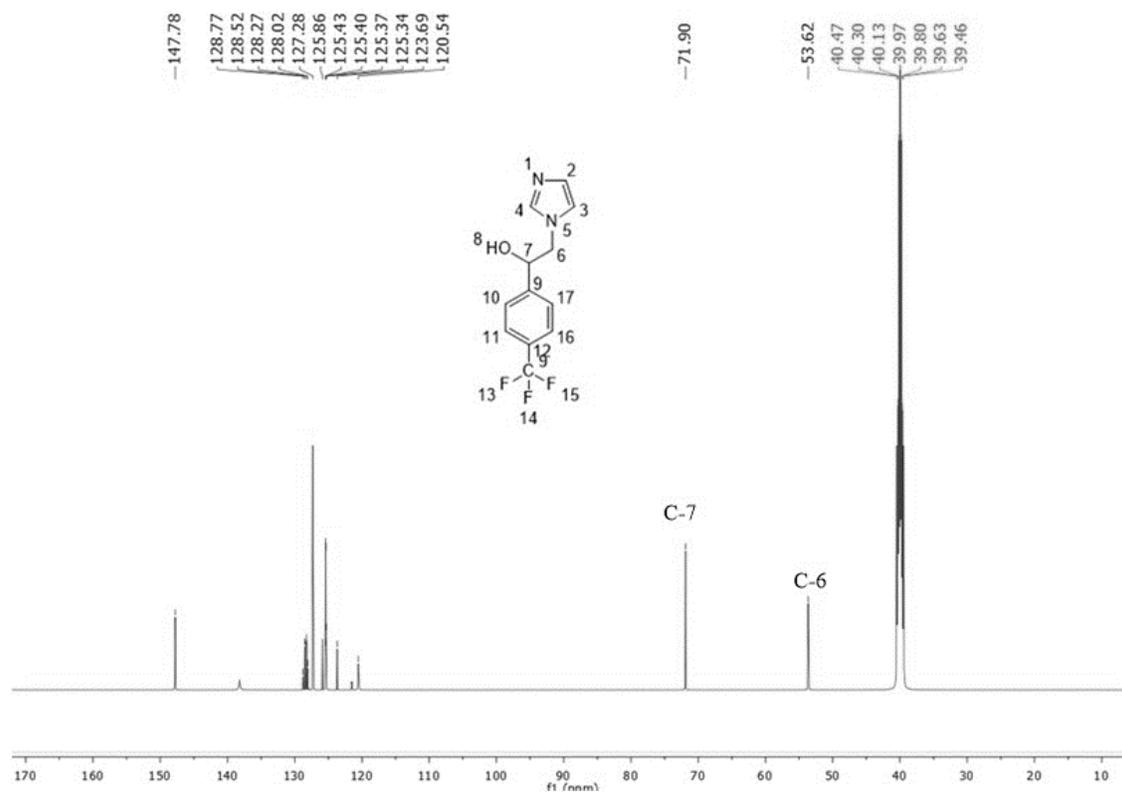
10.9 RMN ^{13}C del (3-clorofenil) (1H-imidazol-1-il) etanol



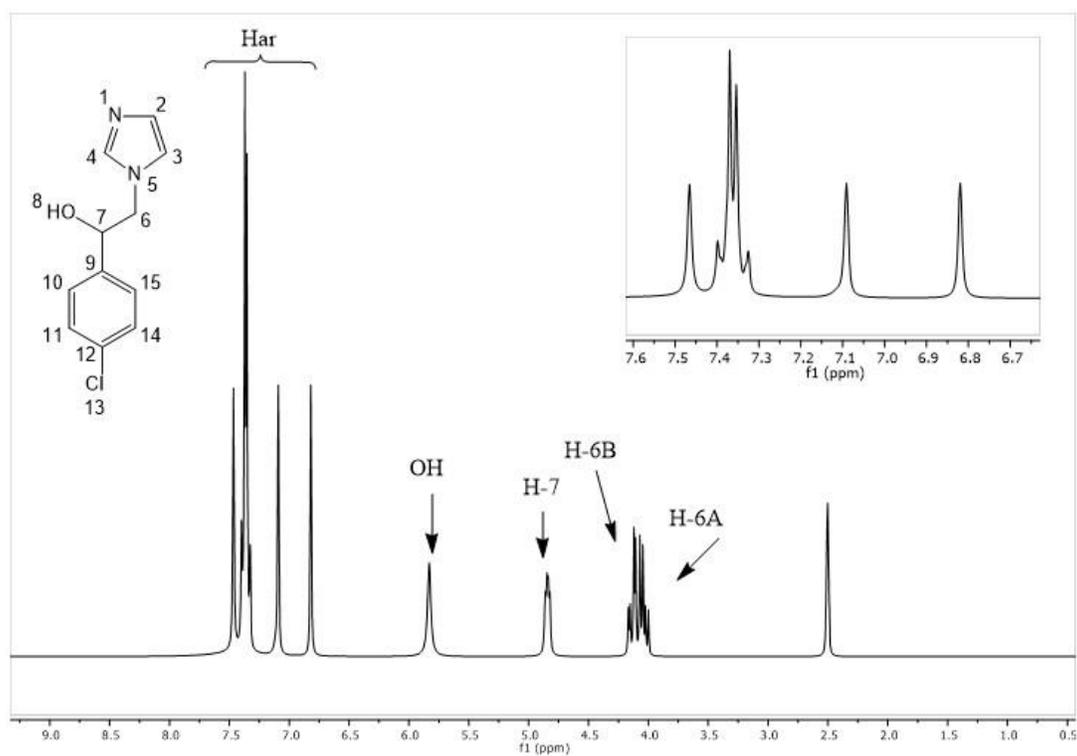
10.10 RMN ^1H del (1H-imidazol-1-il) (4-(trifluorometil)fenil) etanol



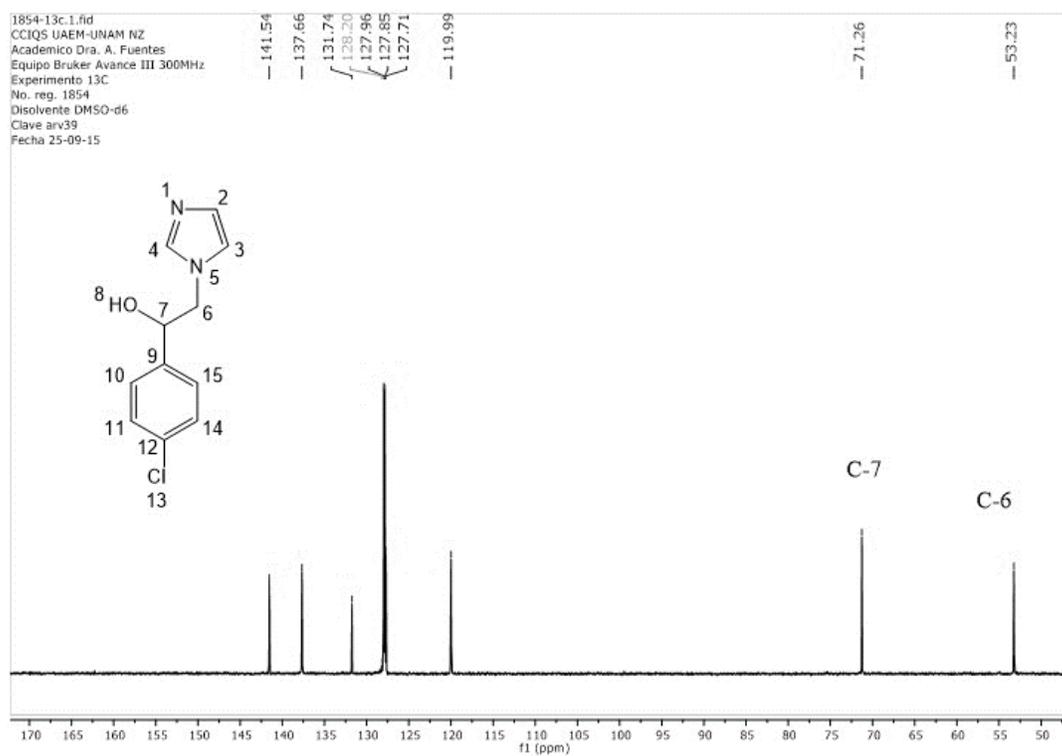
10.11 RMN ^{13}C del (1H-imidazol-1-il) (4-(trifluorometil)fenil) etanol



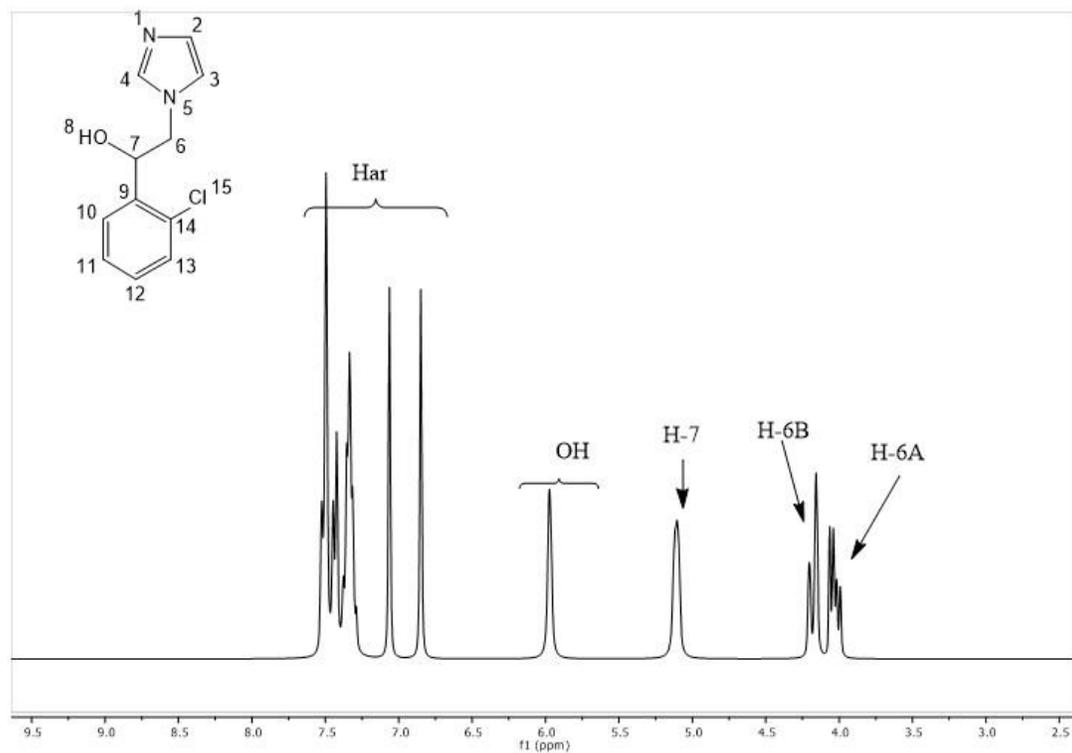
10.12 RMN ^1H del (4-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol



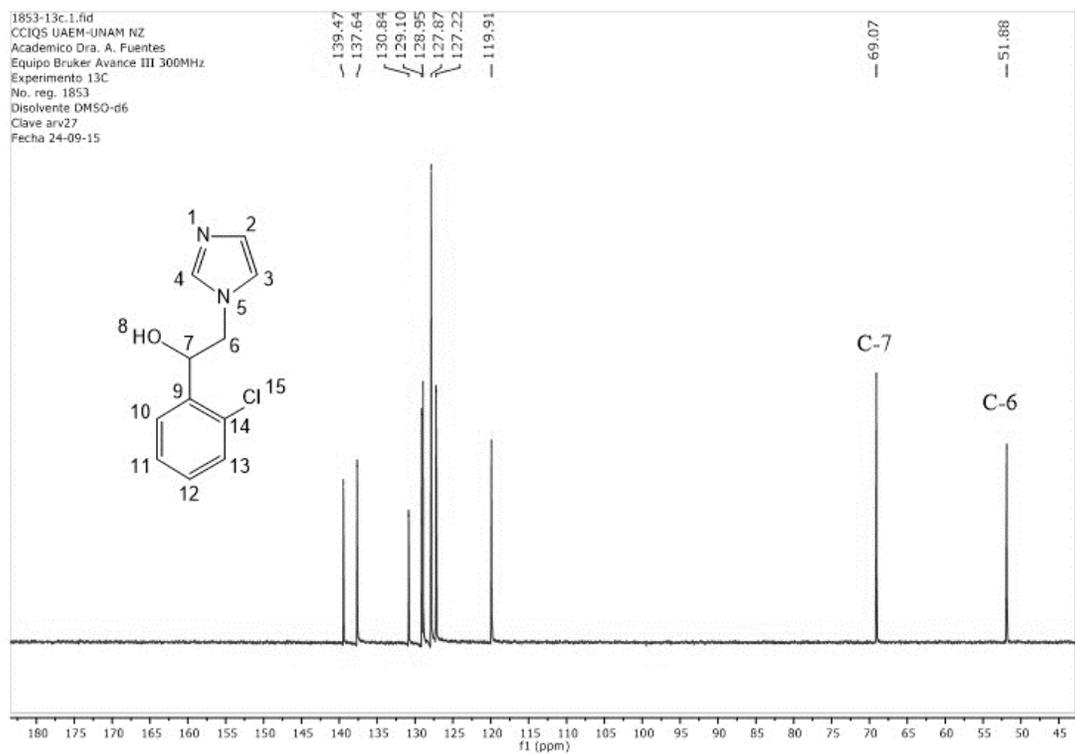
10.13 RMN ^{13}C del (4-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol



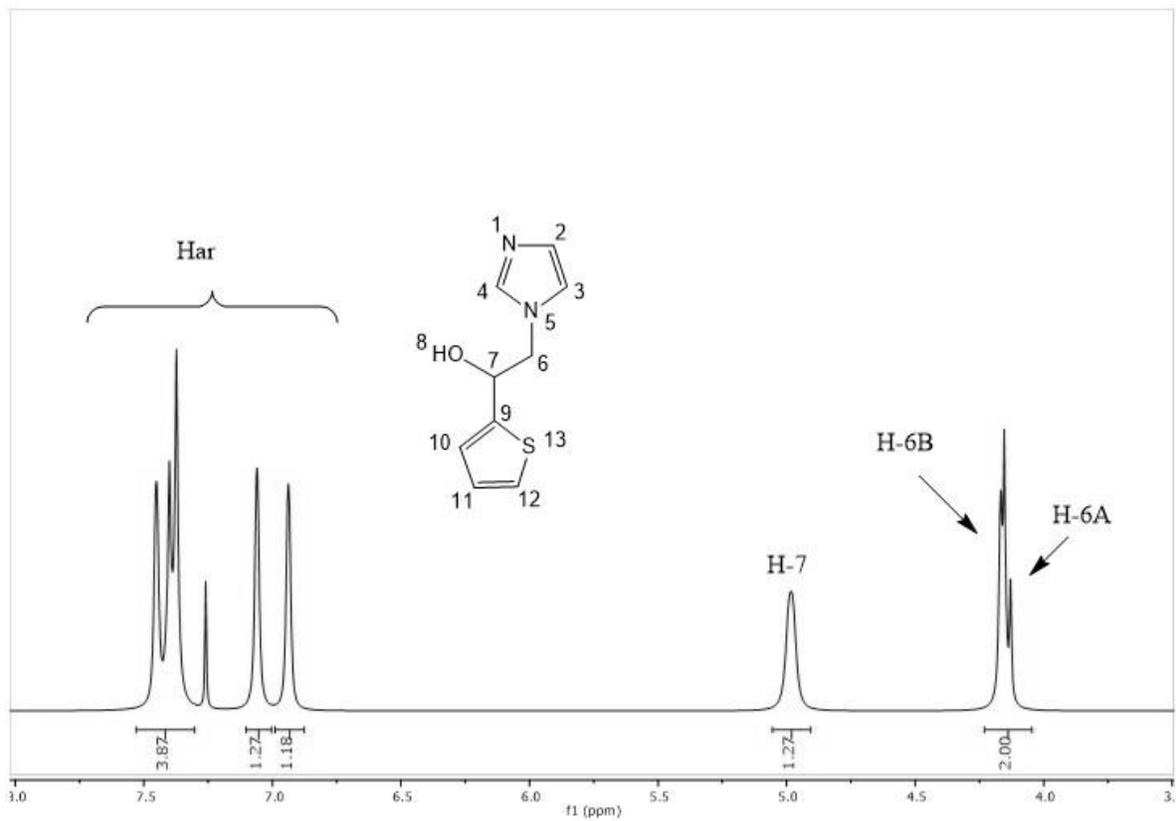
10.14 RMN ^1H del (2-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol



10.15 RMN ^{13}C del (2-clorofenil)(1H-imidazol-1-il) etanol



10.16 RMN ^1H del (1H-imidazol-1-il)(tiofen-2-il) etanol



10.17 RMN ^{13}C del (1H-imidazol-1-il)(tiofen-2-il) etanol

