



UNIVERSIDAD MICHUACANA
DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO



FACULTAD DE QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA

**“SÍNTESIS DE PIRROLIL-QUINOLIL-
FLUOROQUINOLONA DERIVADO DE CIPROFLOXACINO.
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y
RECONOCIMIENTO FRENTE A ADN.”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

**PRESENTA:
KARINA MORFIN ZAMORA**

ASESOR DE TESIS: D.C. LUIS CHACÓN GARCÍA

MORELIA, MICHUACAN; MAYO 2018



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Diseño Molecular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. Luis Chacón García.

Dedicatoria

A mis padres:

Agradezco a Dios por haberme otorgado una familia maravillosa, quienes han depositado en mí su confianza para la realización de este trabajo. En el cual se ve plasmado su esfuerzo y dedicación al estar siempre para mí apoyándome e impulsándome. Son el mejor ejemplo de que con esfuerzo, dedicación y amor a lo que haces, todo se puede. Culmino una etapa importante en mi vida y es gracias a ustedes, los amo.

A mi hermana:

La mujer que más quiero en este mundo, mi primer amiga y confidente. Fue maravilloso crecer a tu lado y ver cómo te esforzabas en ser un gran ejemplo para mí, siempre has estado cuando lo necesito. La culminación de esta etapa también va para ti, te amo.

Agradecimientos

A mi asesor de tesis:

Al Dr. Luis Chacón García, por estar siempre en la disposición de ofrecernos su ayuda, los conocimientos que nos comparte y sobre todo por la amistad que me brindó.

A mi comité tutorial:

MC. Abel Suarez, MC. Melissa Tapia, MC. Yolanda Valencia, MC. Rosa Maria Trujillo y MC. Sandra Barboza; por el tiempo empleado para mejorar este trabajo de investigación.

Al MC. Abel Suarez quiero darle un agradecimiento especial por brindarme su valioso tiempo y su gran conocimiento para la realización de las pruebas de actividad biológica.

A los servicios técnicos:

Al QFB José Manuel Zaragoza, por su valiosa ayuda para obtener los datos espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear.

A mis amigos:

Gris, Israel y Josué las excelentes amistades que me dejó la universidad, siempre los llevaré en mi corazón. Compartimos tantos momentos juntos, gracias por el apoyo, consejo y gracias por brindarme su valiosa amistad.

A mis mejores amigas Jessica, Ninfa, Lulú y Evelyn, que a pesar de la distancia que nos separa siempre están para mí cuando lo necesito y sé que siempre podré contar con ustedes. Soñamos con el día en convertirnos en profesionistas y poco a poco lo hemos logrado.

Del laboratorio de Diseño Molecular, a la MC Meli Tapia principalmente por su amabilidad, por la paciencia y el apoyo que siempre nos brinda, gracias por el gran aporte en el trabajo experimental como en el escrito, tu conocimiento quedó plasmado en este trabajo.

Al MC. Salvador Gallardo gracias por brindarme tu apoyo y paciencia al enseñarme a trabajar en el laboratorio, nunca nos has negado el conocimiento que has adquirido con los años y eso se agradece.

A Gaby por regalarnos sus conocimientos y el apoyo que necesitamos, a Cesia, y Jairo gracias por los momentos divertidos y por la amistad que me brindaron siempre. También a Gerardo y Alex que a pesar de no convivir mucho con ellos siempre brindan su apoyo y conocimiento.

A Liza por los momentos divertidos y sobre todo por su amistad, por celebrar mis triunfos y darme aliento en momentos difíciles, te quiero mucho.

Índice general

Índice general.....	I
Índice de figuras.....	III
Índice de tablas.....	V
Índice de esquemas.....	VI
Lista de abreviaturas.....	VII
Lista de compuestos.....	VIII
Resumen.....	IX
Abstract.....	X
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Historia de las quinolonas.....	4
2.2 Relación estructura química-actividad de las quinolonas.....	10
2.3 Mecanismo de acción.....	13
2.4 Benzoquinonas.....	18
2.5 Pirrolilquinonas.....	21
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo General.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4.JUSTIFICACION.....	27
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	28
5.1 Materiales y métodos.....	28

5.2 Obtención de 2-pirrolil-2,5-dimetil-p-benzoquinona 3	28
5.3 Obtención del híbrido ciprofloxacino-pirrolilquinona 5	29
5.4 Prueba de difusión en disco.....	30
5.5 Reconocimiento del compuesto 5 con ADN en UV-Visible.....	30
5.6 Titulación en Ultravioleta.....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSION	32
6.1 Síntesis del híbrido ciprofloxacino-pirrolilquinona 5	32
6.2 Actividad antimicrobiana.....	35
6.2.1 Actividad antimicrobiana del compuesto 5	35
6.3 Estudio de reconocimiento del ADN en UV-visible.....	40
6.4 Evaluación del compuesto 5 como sensor aniónico.....	43
6.4.1 Titulación del compuesto 5 con TBA-F en CH ₃ CN.....	44
7. CONCLUSIONES	46
8. ANEXOS	47

Índice de figuras

- Figura 1.** Estructura base de las quinolonas
- Figura 2.** Estructura química del Ciprofloxacino
- Figura 3.** Estructura del ácido nalidíxico y sus predecesores
- Figura 4.** Estructuras de la primera generación de quinolonas
- Figura 5.** Estructura de la segunda generación de quinolonas
- Figura 6.** Estructura de la tercera generación de quinolonas
- Figura 7.** Estructura de la cuarta generación de quinolonas
- Figura 8.** Etapas de desarrollo de las quinolonas
- Figura 9.** Relación estructura actividad de las quinolonas
- Figura 10.** Modelo propuesto de la interacción de las quinolonas consigo misma y con el sitio de unión (ADN)
- Figura 11.** Unión de quinolona-topoisomerasa facilitada a través de un puente de iones metal-agua
- Figura 12.** Estructura base 1,4-benzoquinona
- Figura 13.** Equilibrio quinona-hidroquinona
- Figura 14.** Estructura química de fármacos que poseen en su estructura hidroxiquinona
- Figura 15.** Estructura química de 2-pirrolil- 2,5-dimetil-p-benzoquinona (**3**)
- Figura 16.** Pirrolilquinonas reportadas por Chacón, G.L y colaboradores. 2014
- Figura 17.** Interacción de la pirrolilquinona-anion fluoruro
- Figura 18.** Esquema de región de reconocimiento de 2- (1,5-dimetil-4-oxo-hexil)-3-hidroxi-5-metil-6-pirrolil-1,4-benzoquinona.
- Figura 19.** Estudio de reconocimiento de ADN en UV-Visible de una pirrolilquinona funcionalizada
- Figura 20.** Espectro de RMN DE ^1H (400 MHz), asignación de los ^1H CFX-PQ **5**
- Figura 21.** Actividad antimicrobiana del Ciprofloxacino (disco central) y el compuesto **5** a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* ATCC 28922 en prueba de difusión en agar.
- Figura 22.** Actividad antimicrobiana del Ciprofloxacino (disco central) y el compuesto **5** a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en prueba de difusión en agar.
- Figura 23.** Actividad antimicrobiana observada mediante el halo de inhibición del

compuesto **5** frente *Escherichia coli*

Figura 24. Actividad antimicrobiana observada mediante el halo de inhibición del compuesto **5** frente *Staphylococcus aureus*

Figura 25. Estructura de quinolonas modificadas; CP-67,015 y Voreloxin

Figura 26. Espectro de absorción UV-Visible del DNA (negro), PQ-CFX (rojo), intercalación del compuesto PQ-CFX con el DNA a diferentes tiempos (azul, rosa, verde y morado).

Figura 27. Titulación en UV-Vis de compuesto **5** (5×10^{-4} Molar) en CH_3CN con la adición de cantidades crecientes de F (0-53eq).

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de condiciones de reacción

Índice de esquemas

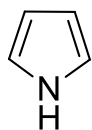
Esquema 1. Obtención de 2-pirrolil-2,5-dimetil-p-benzoquinona

Esquema 2. Obtención del compuesto **5**

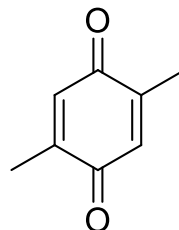
Lista de abreviaturas

RMN¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
UV-Vis	Ultravioleta-visible
MHz	Mega Hertz
TMS	Trimetilsilano
mL	Mililitro
mg	Miligramo
M	Solución molar
T.A	Temperatura ambiente
MCR	Reacción de multicomponetes
μL	Microlitros
μg	Microgramos
mmol	Milimol
AcoEt	Acetato de etilo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
°C	Grados centígrados
Mm	Milímetros
Eq	Equivalentes
CFX	Ciprofloxacino
PQ	Pirrolilquinona

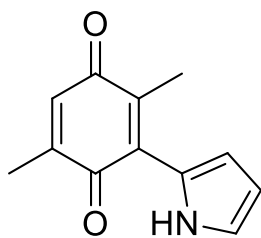
Lista de compuestos



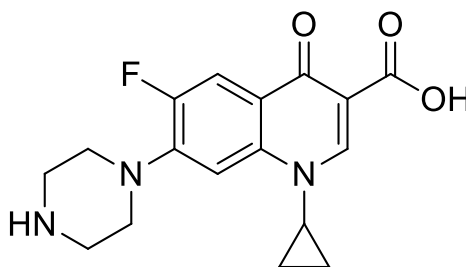
1



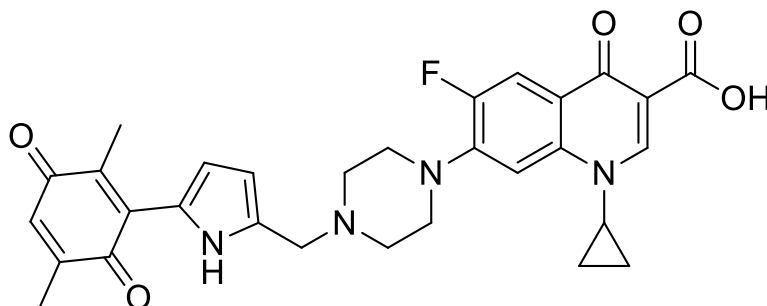
2



3



4



5

Resumen

Las quinolonas son agentes antimicrobianos con amplio espectro contra microorganismos grampositivos y gramnegativos. La posibilidad de transformación de su estructura química ha permitido obtener nuevas variantes estructurales con mayor espectro antibacteriano, penetración tisular y seguridad. Las variaciones estructurales han resultado en cuatro generaciones de fármacos; aun así, es importante continuar modificando las estructuras existentes para generar compuestos activos contra cepas resistentes, así como fármacos novedosos con propiedades biológicas diferentes para lo que fueron diseñadas. En lo que refiere a las fluoroquinolonas, la posición 7 se encuentra entre los objetivos principales de variación química. La naturaleza del sustituyente en esta posición es la responsable del espectro antibacteriano, potencia, biodisponibilidad y efectos secundarios de la quinolona.

En el presente trabajo se modificó una fluoroquinolona de segunda generación: el ciprofloxacino, al cual se le ha incorporado en el nitrógeno N' de la piperazina ubicada en la posición 7, un compuesto de interés previamente sintetizado por nuestro grupo de trabajo: 2-pirrolil-2,5-dimetil-p-benzoquinona **3**. La actividad antimicrobiana del compuesto sintetizado se evaluó frente a cepas *Escherichia coli* ATCC 28922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mediante el método de Kirby-Bauer. Se observó mayor actividad en bacterias gramnegativas, aunque en bacterias grampositivas el compuesto muestra actividad comparable con el Ciprofloxacino de referencia.

El derivado obtenido presenta las características básicas para interactuar con el ADN por medio de intercalación en la región de la pirrolilquinona, lo cual podría potenciar el efecto de la fluoroquinolona. El reconocimiento frente al ADN se evaluó por medio de espectroscopia UV-Visible, obteniendo resultados prometedores.

Palabras claves: Quinolona, fluoroquinolona, ciprofloxacino, pirrolilquinona, actividad antimicrobiana, intercalación.

Abstract

Quinolones are a type of broad spectrum antimicrobial agents against both gram positive and gram negative microorganisms. The possibility of changing part of its chemical structure has allowed the synthesis of structurally different quinolones which have resulted in a broader antibacterial activity, tissue penetration and security. The structural variations have resulted in four generations of drugs. even so, it is still important to continue modifying the existing structures in order to obtain active molecules against resistant strains, as well as new drugs with different biological properties from what they were originally used. In regard to fluoroquinolones, the 7 position is a main target in chemical variation. The nature of the substituent in this position is responsible for its antibacterial activity, potency, bioavailability and secondary effects of quinolones.

In the present work, a modification in a second generation of fluoroquinolone, ciprofloxacin, was made, a previously synthesized compound in our work group (2-pirrolil-2,5-dimetil-p-benzoquinona **3** was incorporated to the nitrogen n of piperazine located at the 7 position. The antimicrobial activity of this newly synthesized compound was evaluated in *Escherichia coli* ATCC 28922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strains using the Kirby-Bauer method. a greater activity against gram negative bacteria was observed. Still, a comparable activity to the reference compound ciprofloxacin was observed in gram positive bacteria.

The compound synthesized presents the basic characteristics in order toto interact with DNA through an intercalation in the pyrroloquinoline region, this could potentially improve the effect of the fluoroquinolone. The interaction with DNA was evaluated using UV-vis obtaining promising results.

Keywords: Quinolone, fluoroquinolone, ciprofloxacin, antimicrobial activity, pyrroloquinoline, intercalation.

1. Introducción

Las quinolonas constituyen uno de los grupos de antimicrobianos con mayor importancia. Son estructuras bicíclicas heteroaromáticas, constituidas por un núcleo piridona- β -ácido carboxílico y un anillo aromático (**Figura 1**).¹

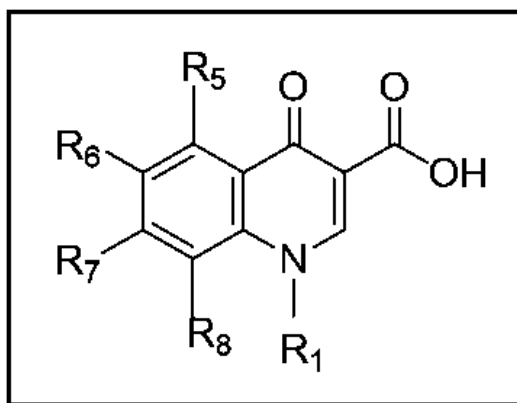


Figura 1. Estructura base de las quinolonas.

Las Quinolonas se emplean en el tratamiento de enfermedades infecciosas como las relacionadas con las vías urinarias y respiratorias.² Constituyen una familia de antibióticos contra microorganismos grampositivos y gramnegativos. Inhiben la ADN-girasa y topoisomerasa IV indispensables para la duplicación del ADN bacteriano.³

En la actualidad, existe una preocupación por la disminución de la eficacia de los agentes antimicrobianos y el aumento de resistencia a los antibióticos. Debido a esto se ha tomado como alternativa la modificación química de los ya existentes agentes antibacterianos con el fin de obtener nuevos análogos con mejores propiedades farmacocinéticas y mayor espectro antibacteriano.⁴

¹ Sergio Mella M., Guillermo Acuña L., Maritza Muñoz Q., Carlos Pérez C., Jaime Labarca L., Gerardo González R., Helia Bello T., Mariana Domínguez Y., Raúl Zemelman Z., Rev Chil Infect (2000); 17 (1): 53-66.

² Mehlhorn Allana., Brown Dana. Safety Concerns with Fluoroquinolones. Ann Pharmacother 2007; 41:1859-66.

³ Alós JL. (2003). Quinolonas. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003;21(5):261-8.

⁴ Chauhan Kuldeep, Singh Patiksha, Kumar Vikash, Shukla Praveen K, Siddiqi Mohammad, Chauhan Prem., K. Chauhan et al. / European Journal of Medicinal Chemistry 78 (2014) 442-454.

El núcleo de las quinolonas contiene diferentes sitios que permiten su modificación permitiendo obtener variaciones estructurales. La manipulación de las posiciones 1, 5, 6, 7 y 8 (**Figura 1**) han sido los objetivos principales de las variaciones químicas y éstas han conducido a una amplitud y potencia mejoradas en la farmacodinamia y la farmacocinética.⁵ En los primeros intentos de modificar la estructura base de esta molécula se llegó a la síntesis de derivados que presentan sustituyentes 6-fluoro, 7 piperazinil (norfloxacino, ciprofloxacino y perfloxacina) los cuales dieron origen al grupo denominado fluoroquinolonas, comúnmente identificadas simplemente por quinolonas.¹ Las quinolonas fluoradas, como la ya mencionada ciprofloxacina (**Figura 2**), han recibido mucha atención por la industria farmacéutica debido a su importante actividad frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos.⁶

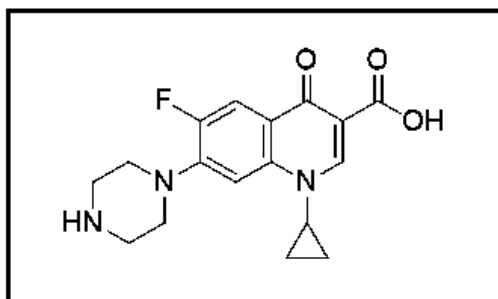


Figura 2. Estructura química del ciprofloxacino

Las modificaciones químicas a las fluoroquinolonas más frecuentes han sido en el C-7 por ser la posición que permite controlar las propiedades farmacocinéticas provocando, entre otras cosas, cambios en la permeabilidad celular.⁴ Los sustituyentes lineales o pequeños (H, Cl, CH₃, NH₂CH₂CH₂NH₂, NHCH₃ y NHH₂) en dicha posición confieren menor potencia antibacteriana, a diferencia de los anillos heterocíclicos de cinco a seis miembros que presentan buena actividad biológica.¹

⁵ Emami Saeed, Shafiee Abbas, Foroumadi Alireza. Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. Emami S, Shafiee A and Foroumadi A / IJPR **2005**, 3: 123-136.

⁶ Leyva Elisa., Monreal Elena., Hernández Alma., Leyva Socorro. Las Fluoroquinolonas. Síntesis y actividad antimicrobiana. Elisa Leyva et al. Rev. Soc. Quím. Méx. Vol. 43, Núm. 2 (**1999**)

El presente trabajo se centra en la síntesis de un nuevo derivado de fluoroquinolona a partir de su condensación con formaldehído y pirrolilquinona **3**, con el fin explorar si hay efecto en la actividad del nuevo derivado de ciprofloxacino.

Cabe mencionar que las pirrolilquinonas son compuestos sintetizados por nuestro grupo de trabajo las cuales han sido diseñados como sensores ópticos^{7,8}. Por tal motivo se consideró también importante estudiar la capacidad de reconocimiento aniónico en el nuevo derivado, dadas las propiedades ópticas de las pirrolilquinonas, así como las de fluorescencia de las fluoroquinolonas.

⁷ Tapia-Juárez M., González-Campos J., Contreras-Celedón C., Corona D., Cuevas-Yañez E., Chacón-García L., RSC Adv., **2014**, 4, 5660-5665.

⁸ Chacón-García L., Valle-Sánchez M., Contreras-Celedón C., Lett. Org. Chem. **2013**, 10, 632–636.

2. Antecedentes

2.1 Historia de las quinolonas

En la búsqueda de nuevos fármacos antimaláricos, en 1962 el proceso de síntesis y purificación de la cloroquina, condujo al descubrimiento de la 7-cloroquinolina, el cual presentó actividad antimicrobiana. Fue a partir de este evento que se obtuvo la primera quinolona sintética, el ácido nalidíxico (**Figura 3**), descrita por Lescher y col, el cual fue bastante empleado para el tratamiento de infecciones en vías urinarias no complicadas.^{9,10,11}

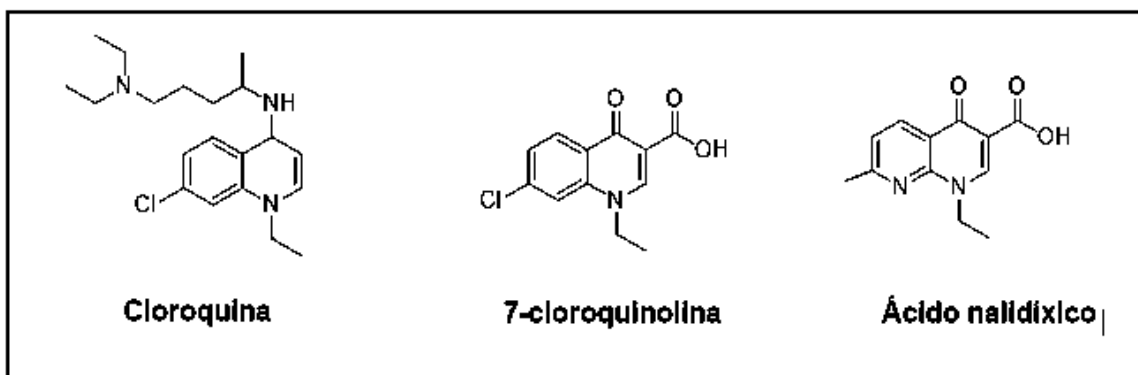


Figura 3. Estructuras del ácido nalidíxico y sus predecesores

El descubrimiento del ácido nalidíxico fue un gran paso en la generación de nuevos antibióticos sin embargo la rápida resistencia bacteriana al compuesto, así como su restringido espectro de acción, limitado a gram negativos, llevó al desarrollo de otros antimicrobianos como el ácido pipemídico, obtenido en 1973, y los ácidos oxolínico, cinoxacina, acroxacino, y rusoxacino, obtenidos pocos años después, conformando todos ellos la primera generación de quinolonas (**Figura 4**), los cuales se caracterizan por tener actividad frente a bacilos gramnegativos. Desde el punto de vista terapéutico, la actividad de estos compuestos no fue destacada en comparación con el ácido nalidíxico así que se establecieron como antisépticos urinarios.¹²

⁹ Álvarez Hernández D., Garza Mayén G., Vázquez López R. Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev Chilena Infectol* **2015**; 32 (5): 499-504.

¹⁰ Rothlin P. Rodolfo. (1999). Quinolonas. *MEDICINA (Buenos Aires)* **1999**:59 (Supl. I): 3-7.

¹¹ Mitscher Lester A. *Chem. Rev.*, **2005**; 105(2): 559-92.

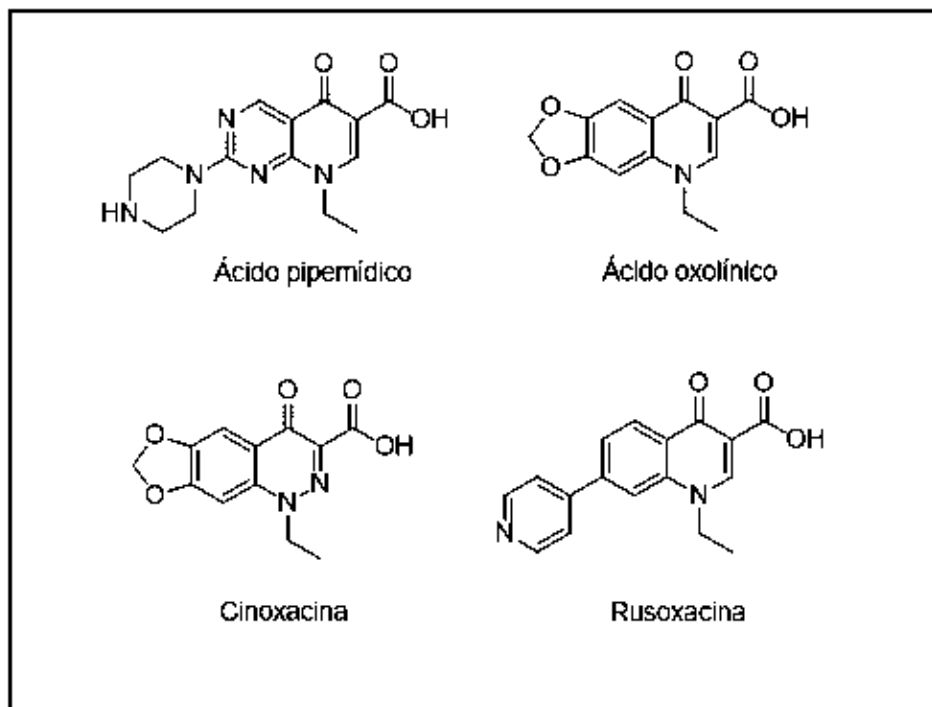


Figura 4. Estructuras de la primera generación de quinolonas

Las primeras modificaciones a la estructura base y que llevaron a la segunda generación de quinolonas fue la incorporación de un grupo piperacínico en la posición 7 y de un átomo de flúor en la posición 6 (**Figura 5**). El cambio de hidrógeno por flúor incrementó 10 veces su potencia; estabilizando las cargas cuando se lleva a cabo la unión del antibiótico con el blanco (Topoisomerasa bacteriana) y le confiere actividad contra especies grampositivas como estafilococos. El anillo piperacínico amplía el espectro contra especies gramnegativas aerobias y *Pseudomonas aeruginosa*.^{12,13} Con este antecedente, en 1978 dio inicio la era de las quinolonas fluoradas con la aparición de compuestos de gran interés farmacéutico como el norfloxacino entre otros (**Figura 5**).¹⁴

¹² Bruguera Cué M., Morejón Moisés., Díaz Rosa. Actualidad de las quinolonas. Rev Cubana Farm **2005**;39 (1)

¹³ Chávez-Jacobo VM., Ramírez-Díaz MI., Silva- Sánchez J., Cervantes C. (2015). Resistencia Bacteriana a Quinolonas: Determinantes codificados en Plásmidos. REB 34(1): 4-9, **2015**.

¹⁴ Flórez J. (1997). Farmacología humana. Barcelona (España): Masson, S.A

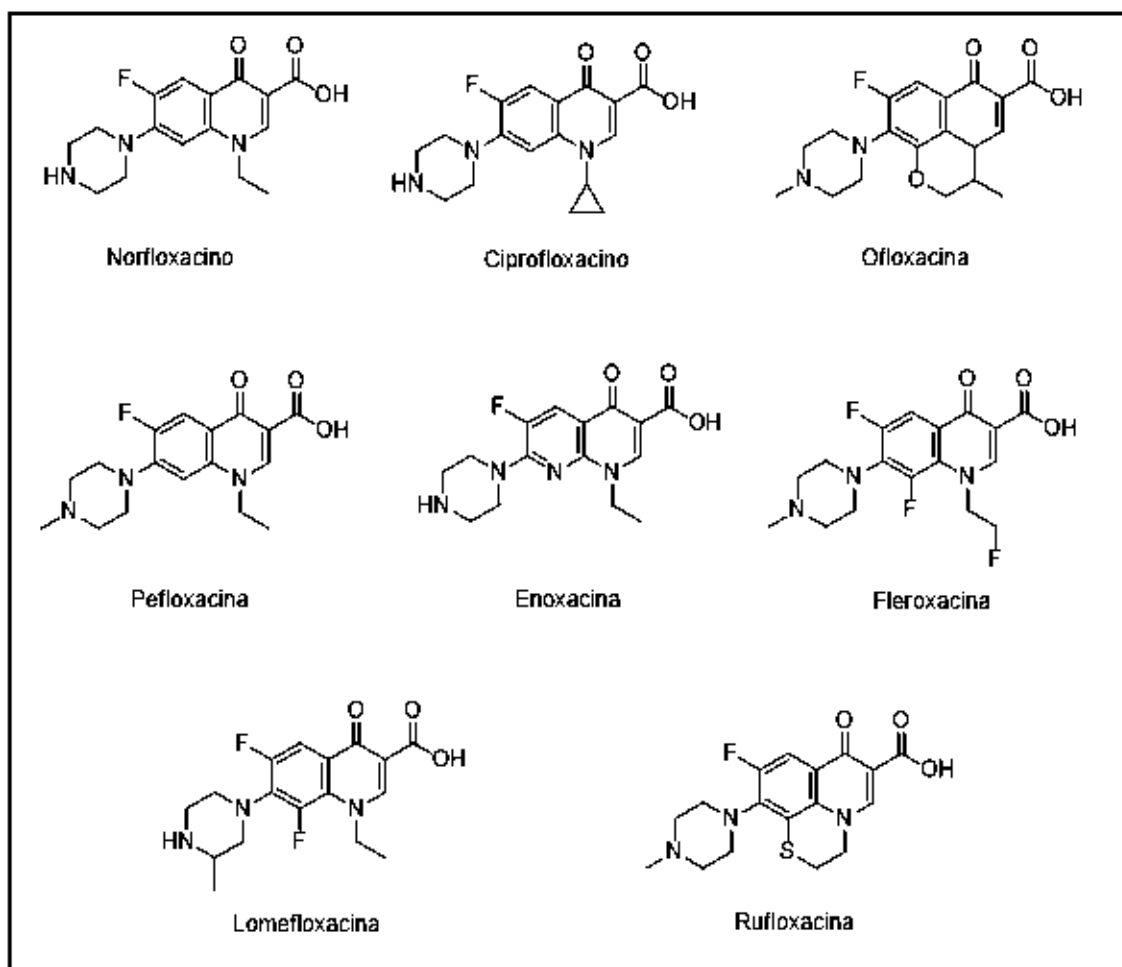


Figura 5. Estructura de la segunda generación de quinolonas

Las modificaciones posteriores dieron lugar a la tercera generación de quinolonas, mejorando la actividad contra bacterias grampositivas y anaerobias. Presentan una piperazina sustituida con un alquilo o pirrolidina en la posición 7 y un sustituyente metoxilo en la posición 8 (**Figura 6**).^{5,9}

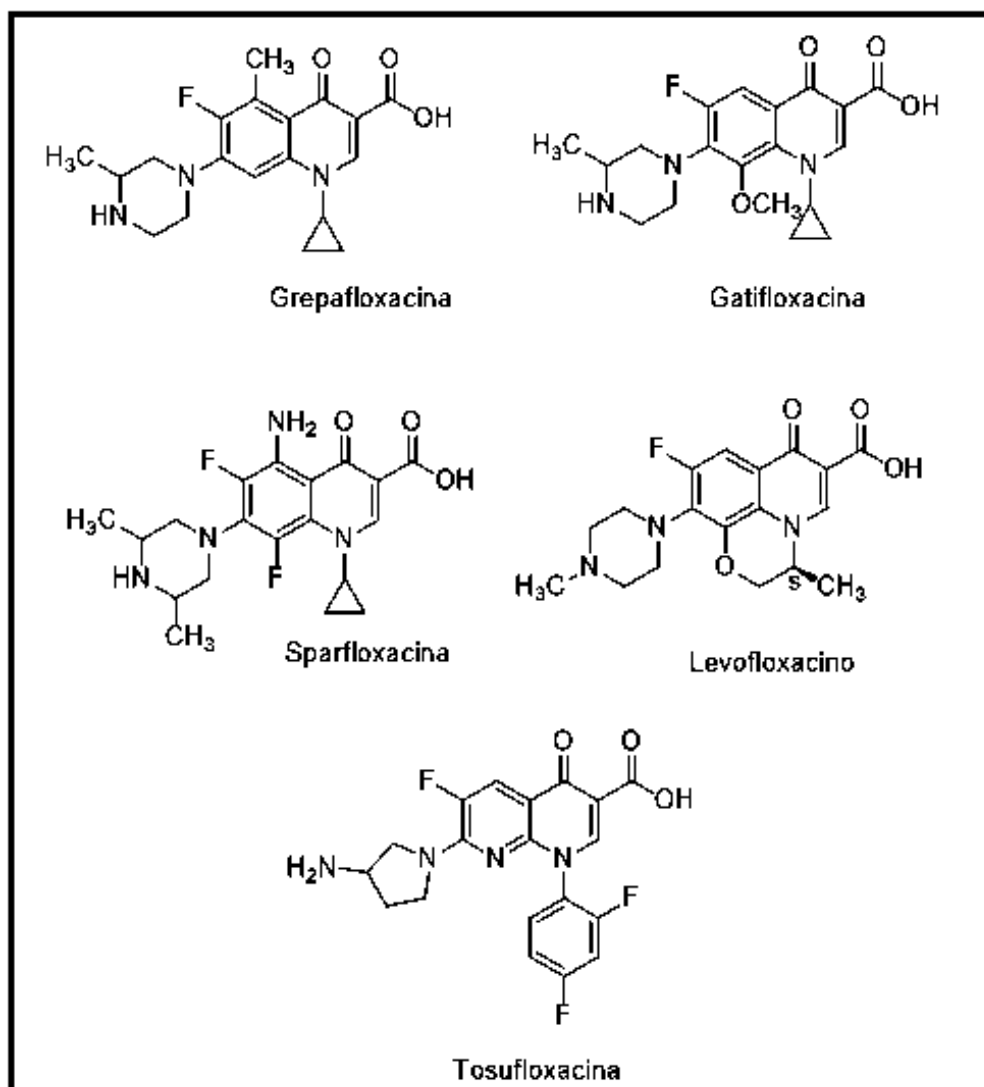


Figura 6. Estructura de la tercera generación de quinolonas

La cuarta generación de quinolonas promete un mayor espectro de actividad y una disminución en el desarrollo de resistencia microbiana (**Figura 7**) .¹⁵

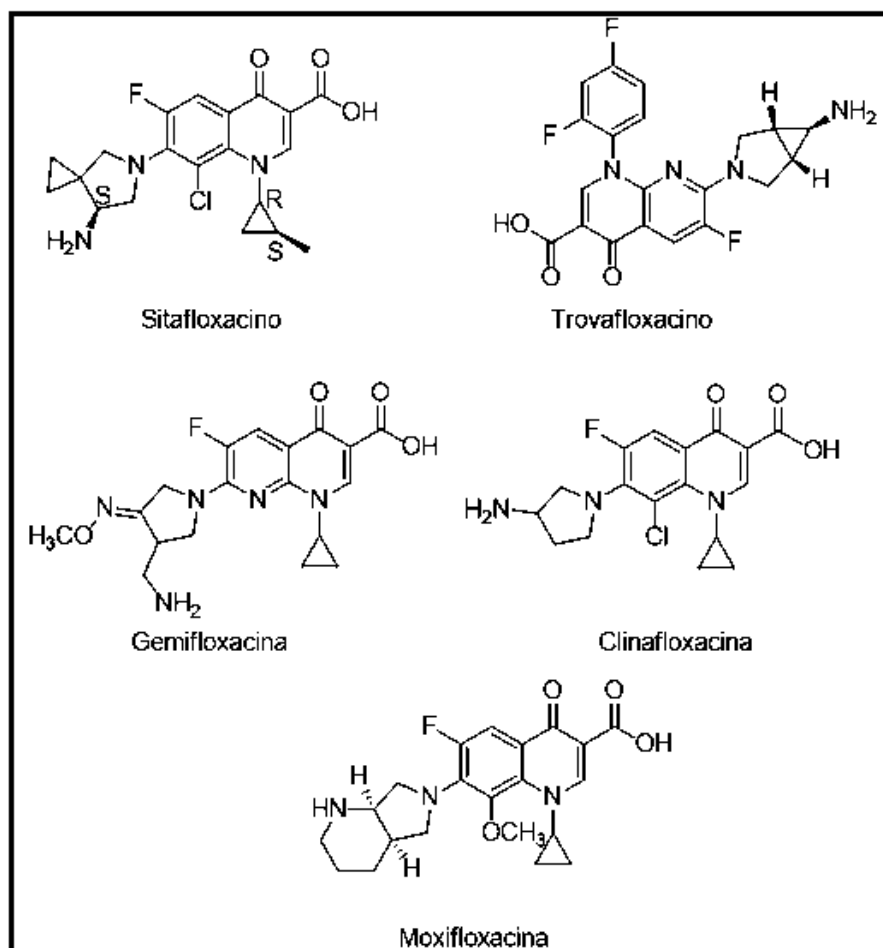


Figura 7. Estructura de la cuarta generación de quinolonas

¹⁵ Blondeau JM. (2004). Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance. *Surv Ophthalmol* 49 (Suppl 2) March **2004**

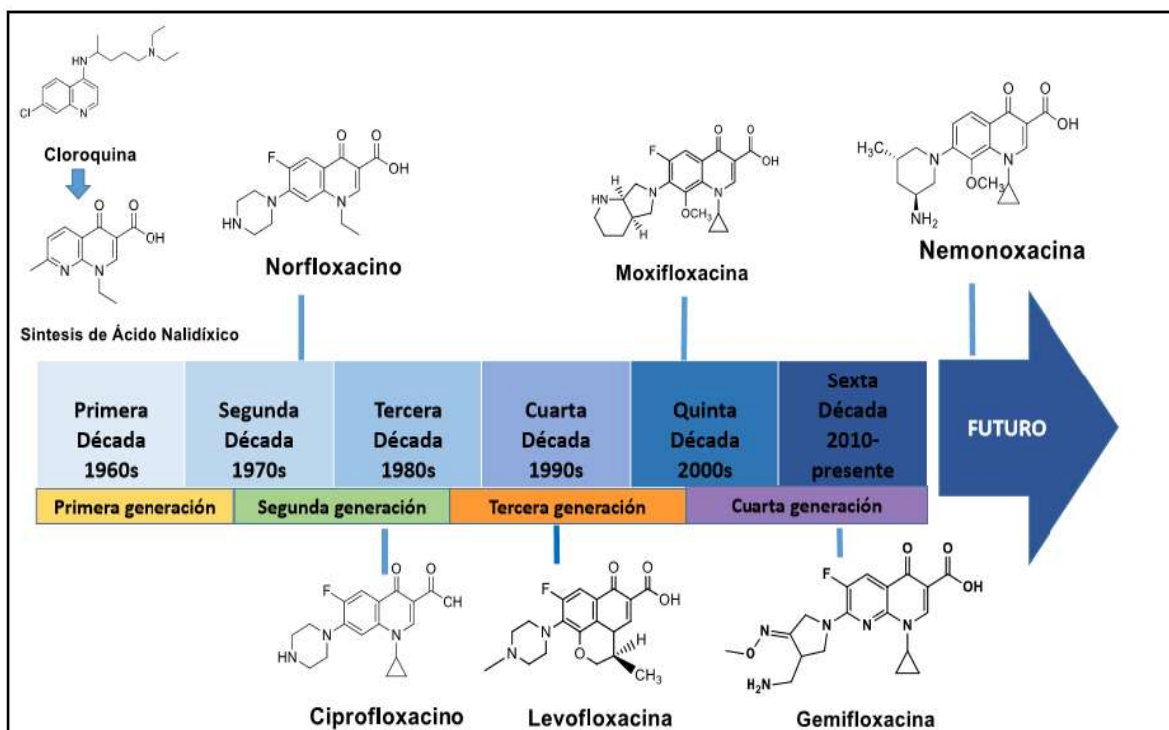


Figura 8 Etapas de desarrollo de las quinolonas

La diversidad estructural de estas moléculas se debe a que el farmacóforo, núcleo de la quinolona, contiene diferentes sitios para su funcionalización (**Figura 1**), permitiendo obtener variaciones estructurales que potencian su actividad, logrando con el tiempo conocer con detalle las alteraciones farmacocinéticas y farmacodinámicas con respecto a la posición y funcionalidad de la molécula. Todo ello ha desatado el interés por desarrollar nuevos derivados con mayor actividad biológica, amplio espectro, mejores propiedades farmacológicas y sobre todo actividad contra cepas que presentan resistencia a fármacos (**figura 8**).¹⁶

¹⁶ Leyva-Ramos S., Hernández-López H. (2017). Fluoroquinolonas: perspectivas no antibacterianas. Rev Esp Quimioter **2017**;30(1): 01-08

2.2 Relación estructura química-actividad de las quinolonas

Como se mencionó en el apartado anterior, la relación entre la estructura química y la actividad biológica de estas moléculas despertó el interés de sintetizar compuestos con diferentes sustituyentes en la estructura química base para aumentar su eficacia, espectro, potencia y disminuir sus efectos secundarios (**Figura 9**).¹⁷

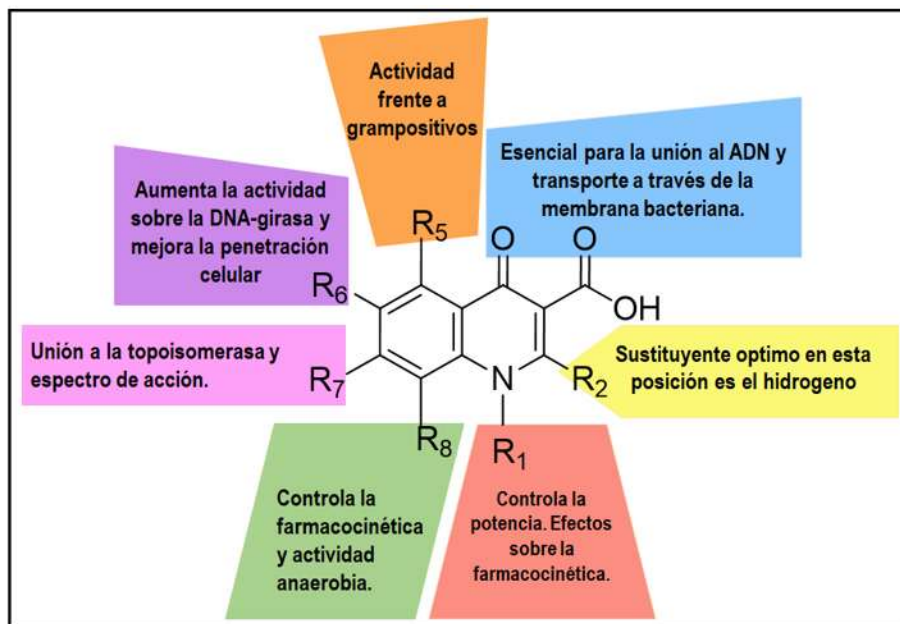


Figura 9. Relación estructura actividad de las quinolonas

Las quinolonas presentan una estructura bicíclica heteroaromáticas, constituidas por un núcleo piridona-β ácido carboxílico y un anillo aromático.¹⁷ La presencia de algunos sustituyentes es esencial para la acción del fármaco por lo tanto no deben ser modificados con el fin de mantener la actividad de la quinolona.¹⁸ A diferencia de algunos sustituyentes que en sitios específicos alrededor del núcleo se les han asociado ciertos efectos secundarios.¹⁹

¹⁷ Campos-Sepúlveda A., Martínez-Enríquez M., Mendoza Patiño N. (2008). Quinolonas. Rev Fac Med UNAM Vol. 51 No. 4

¹⁸ Juste Díez de Pinos J.L., Adover Rigó M., Ribos Sala J. (2000). Levofloxacino, Fluoroquinolona de Tercera Generación. Farm Hosp 2000;24(5):288-2959

¹⁹ Rubinstein Ethan. History of Quinolones and Their Side Effects. Chemotherapy 2001;47(Suppl 3):3-8

Posición 1: La adición de un sustituyente en la posición N-1 mejora la actividad antibacteriana, el volumen de los sustituyentes, así como la donación electrónica, son factores que influyen en la actividad biológica. El grupo ciclopropilo presenta condiciones favorables de interacción estérica. Los sustituyentes en posición 1 tienen efecto en la actividad frente a bacilos gramnegativos.²⁰

Posición 2: La modificación en esta posición ha sido poco explorada debido a que la adición de grupos voluminosos puede crear impedimento estérico en las posiciones adyacentes 3 y 4 donde ocurre la unión a las bases de ADN, por lo que el sustituyente óptimo en esta posición es el hidrógeno.²¹

Posición 3: El grupo ácido carboxílico en el C-3 en conjunto con el grupo ceto en C-4 se consideran esenciales para la actividad de la quinolona debido que en estas posiciones se lleva a cabo la unión de la quinolona con la ADN-girasa. Las modificaciones a este nivel no han producido quinolonas activas con cambios significativos, solo se ha demostrado la importancia de este grupo al sintetizar compuestos que presentando otro sustituyente en C-3, in vivo, sufrieron la transformación a ácido carboxílico y por lo tanto adquiriendo nuevamente la actividad.^{1,20}

Posición 4: La sustitución de este grupo hasta la fecha ha dado compuestos inactivos, por lo tanto, el grupo cetónico es indispensable para la actividad de las quinolonas y en conjunto con el grupo ácido carboxílico son responsables de la quelación con metales.²

²⁰ Chu Daniel T.W., Fernandes Prabhavathi B. Structure-Activity Relationships of the Fluoroquinolones. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 1989, p. 131-135

²¹ Tillotson G.S. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. J. Med. Microbiol. - Vol. 44 (1996), 320-324.

Posición 5: Las propiedades farmacocinéticas se ven favorecidas por la presencia de sustituyente amino o metilo.¹⁷ El grupo amino incrementa la absorción, distribución y actividad sobre microorganismos grampositivos (Esparflaxacino). El grupo metilo favorece las propiedades farmacocinéticas (Grepafloxacino).¹ La exploración de sustituyentes ha sido limitada en esta posición. Los grupos estudiados han sido N, COH, CNH₂, CNHMe, CNMe₂, CNHAc, CCH₃, CEt, CCl, CF. La sustitución en esta posición no ha tenido un buen progreso.¹¹

Posición 6: El flúor no ha sido el único sustituyente adicionado en esta posición, se han sintetizado diversas moléculas con sustituyentes como (H, F, Cl, Br, CH₃, SCH₃, COCH₃, CN, y NO₂) pero de entre todos ellos, fue flúor que dio como resultado un aumento en la potencia antibacteriana.²⁰ La actividad superior de las 6-Fluoroquinolonas en comparación con las quinolonas se explica en un aumento en la afinidad en la unión al complejo topoisomerasa-ADN, así como incremento en la penetración intracelular.^{5,11} Actualmente se han desarrollado quinolonas sin la presencia átomo de flúor las cuales muestran una mayor potencia (Garenoxacina). Esto pone en duda la necesidad como requisito indispensable o fundamental el átomo flúor en esta posición. Entre otros, se ha reemplazado el átomo flúor por un grupo NO₂ obteniendo nitroquinolonas con mayor potencia.⁵ Sin embargo es sabido, dentro de la Química Medicinal, que los nitrocompuestos presentan toxicidad por lo que el cambio no ha sido fructífero.

Posición 7: La posición más investigada para la sustitución de quinolonas ha sido C-7, de la cual se han sintetizado diversos compuestos con diferentes sustituyentes y de acuerdo con los resultados se llegó a la conclusión que la adición de un heterociclo de nitrógeno de cinco a seis miembros aporta mayores beneficios a la molécula tales como mayor actividad y farmacocinética favorable. Los sustituyentes con mejores resultados son aminopirrolidinas y piperazina. Las primeras confieren mayor actividad contra bacterias grampositivas, a diferencia de la piperazina la cual mejora la actividad contra bacterias gramnegativas.^{11,21}

Posición 8: Los sustituyentes C-8 tienen un papel importante en la molécula pues de ellos depende la afinidad de las quinolonas para la ADN-girasa o topoisomerasa IV. Este efecto es modulado por el sustituyente C-5, especialmente si es un átomo de flúor. Entre las diferentes modificaciones en dicha posición se destacan F, Cl, CH₃, OCH₃ los cuales demostraron aumentar la actividad bacteriana en especial contra bacterias grampositivas.

Se ha asociado a fenómenos de fototoxicidad a los halógenos (F y Cl) por lo que se ha limitado el uso clínico de estos (Esparflaxacino). Grupos metoxi o metilos aumentan la potencia de la molécula contra anaerobios. Se ha desarrollado la síntesis de quinolonas reemplazando el C-8 de dicha molécula por un átomo de nitrógeno, mejorando la actividad (tosufloxacina).^{1,5,11,21}

2.3 Mecanismo de acción

Las quinolonas ejercen un efecto bactericida en un primer paso penetrando la célula bacteriana a través de porinas, sin afectar la pared celular. Una vez dentro de la célula, actúan en el DNA cromosómico bacteriano interaccionando con algunas topoisomerasas e inhibiendo su actividad.³ Las topoisomerasas participan en el proceso de síntesis del DNA, mediante desenrollamiento y enrollamiento del DNA cromosómico.²²

En bacterias gramnegativas las quinolonas inhiben principalmente la DNA-girasa, una proteína tetramérica constituida por dos pares de subunidades A y B (codificadas por los genes GyrA y GyrB). Es una topoisomerasa dependiente de ATP. La girasa es la única topoisomerasa II que introduce superenrollamiento negativos, además de eliminar el estrés torsional que se acumula frente a las horquillas de replicación y complejos de transcripción.^{9,22,23}

²² Alós J. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2009**; 27 (5):290-297

²³ Aldred J.K., Kerns R.J., Osheroft N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* **2014**, 53, 1565–157

En cambio, en grampositivas el blanco es la topoisomerasa IV, una proteína tetramérica constituida por dos pares de subunidades, A y B, codificadas por los genes ParC y ParE. Su función se basa en la eliminación de los nudos que se acumulan en el cromosoma bacteriano como resultado de procesos celulares fundamentales, separan las hebras de DNA tras cada replicación y tienen una actividad relajante sobre la cadena de DNA.^{9,22,23}

Estas enzimas modulan el estado topológico del DNA al pasar una doble hélice intacta a través de una rotura de doble hélice transitoria que generan un segmento separado de DNA.²³ Las quinolonas actúan uniéndose al complejo DNA-topoisomerasa dando lugar a un complejo ternario quinolona-DNA-Topoisomerasa con un tiempo de vida lo suficientemente largo para impedir la replicación celular.²⁴

Shen y colaboradores proponen un modelo cooperativo de unión entre la quinolona-ADN para la inhibición de ADN-girasa. Este modelo plantea que la girasa induce un sitio de unión para el fármaco en el sustrato de ADN relajado; esto se lleva a cabo por la acción de la girasa la cual corta ambas cadenas en cuatro posiciones escalonadas. Las hebras de ADN escindidas con los segmentos monocatenarios de cuatro bases se separan; este paso intermedio sirve como sitio ideal de unión al fármaco, en el cual cuatro moléculas de quinolona se unen a cuatro bases desapareadas de ADN (**Figura 10**).

²⁴ Hawkey P.M. Mechanisms of quinolone Action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 51, Suppl. S1, 29–35.

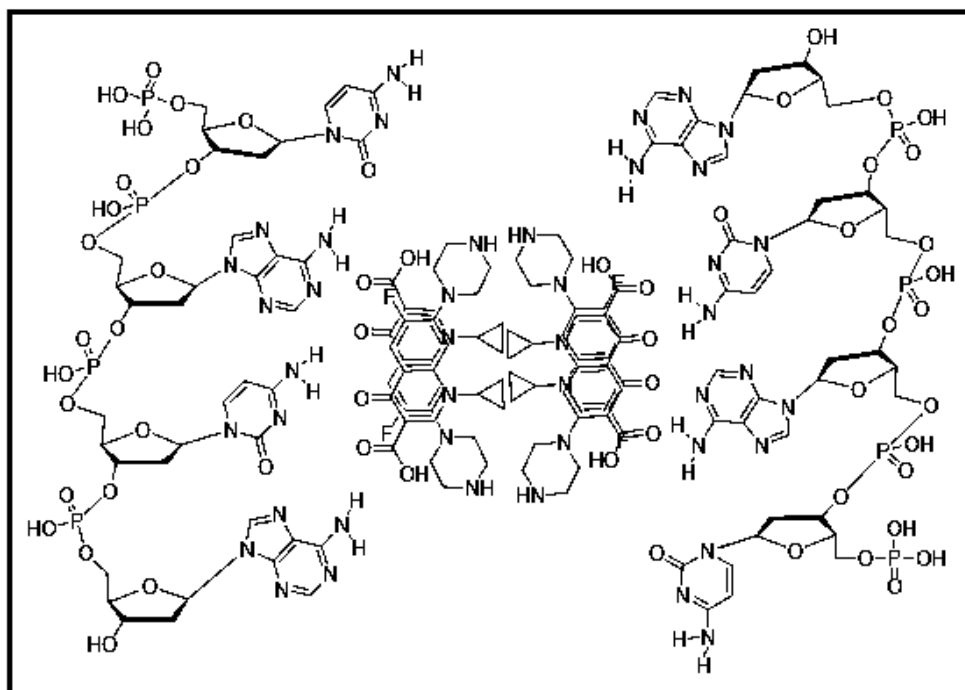


Figura 10. Modelo propuesto de la interacción de las quinolonas consigo misma y con el sitio de unión (ADN).

La cooperatividad y alta afinidad del fármaco se debe a las fuertes interacciones intermoleculares entre fármaco-fármaco. Una de estas interacciones es el apilamiento de dos anillos de quinolona adyacentes unidos por puentes de hidrogeno a la misma hebra de ADN y los grupos carbonilo del C4 y el ácido carboxílico de C3. Las interacciones hidrofóbicas de cola a cola entre los grupos N1 de las quinolonas unidas a hebras opuestas permiten que la unión fármaco-fármaco sea más fuerte.²⁵ La interacción supramolecular entre quinolonas se ha demostrado en solución por técnica de RMN ¹H.²⁶

²⁵ Shen, L. L., Mitscher, L. A., Sharma, P. N., O'Donnel, T. J., Chu, D. W. T., Cooper, C. S., Rosen, T. & Pernet, A. G. (1989) *Biochemistry* 28, 3886-3894.

²⁶ Leyva-Ramos S, Hernández-López H, Jiménez-Cataño R, Chacón-García L, Vega-Rodríguez S. "An efficient reduction of azide to amine: A new methodology to synthesize ethyl 7-amino-1-ethyl-6,8-difluoroquinolone-3-carboxylate and its spectroscopy characterization". *Chemical Papers* 71 (5) 939–947 (2017).

Estudios posteriores realizados por Tornaletti y Pedrini mostraron que la norfloxacina es capaz de desenrollar la doble hélice del ADN en presencia de Mg^{2+} .²⁷ El modelo de Shen no toma en cuenta el hecho de que se requiere el Mg^{2+} para la interacción quinolona-ADN.²⁸ Mediante resonancia magnética nuclear se comprobó que el magnesio se sitúa entre los grupos carbonilo y carboxilato C3 y C4 respectivamente.²⁹

Estudios cristalográficos con girasa y topoisomerasa IV arrojaron resultados importantes sobre las interacciones quinolona-enzima. Se sugiere que dos residuos de aminoácidos juegan un papel importante en la mediación de interacciones quinolona-enzima.³⁰⁻³¹ Las estructuras iniciales ubicaron al fármaco cerca de la serina y los residuos ácidos, pero los aminoácidos no estaban suficientemente cerca en el espacio para mediar la unión del fármaco. Una vista posterior capturó un complejo de quinolona que contenía un ion Mg^{2+} no catalítico que estaba quelatado por el cetoácido C3/C4 del fármaco (**Figura 11**).²³

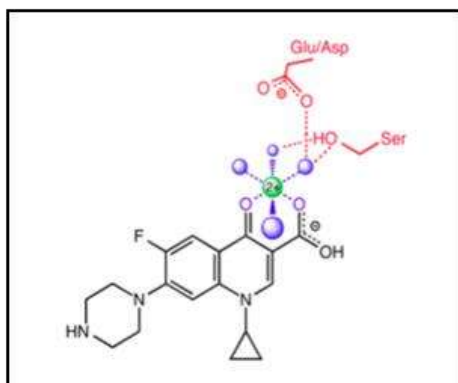


Figura 11. Unión de quinolona-topoisomerasa facilitada a través de un puente de iones metal-agua.

El ion metálico se coordina a cuatro moléculas de agua dos de las cuales se sitúan lo suficientemente cerca de la serina y los residuos ácidos (ácido aspártico) para formar puentes de hidrogeno.³² Estos resultados confirman y proporcionan evidencia de que la serina y los residuos ácidos funcionan como puntos de anclaje que coordinan el puente con la enzima, lo que demuestra que el puente de iones metal-agua es la principal interacción entre las quinolonas y las enzimas bacterianas tipo II (**Figura 11**).²³

²⁷ Tornaletti, S.; Pedrini, A. M. *Biochem. Biophys. Acta* **1988**, 949, 279-287.

²⁸ Noble, C.G.; Barnard, F.M.; Maxwell, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 854.

²⁹ Lecomte, S., M.H. Baron, M.T. Chenon, C. Coupry, and N.J. Moreau. **1994**, S. Effects of magnesium complexation by Fluoroquinolones and Their antibacterial properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2810-

³⁰ Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X. S., Sawhney, R., Thompson, A. W., McAuley, K. E., Fisher, L. M., and Sanderson, M. R. (**2009**) Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 667– 669.

³¹ Bax, B. D., Chan, P. F., Eggleston, D. S., Fosberry, A., Gentry, D. R., Gorrec, F., Giordano, I., Hann, M. M., Hennessy, A., Hibbs, M., Huang, J., Jones, E., Jones, J., Brown, K. K., Lewis, C. J., May, E. W., Saunders, M. R., Singh, O., Spitzfaden, C. E., Shen, C., Shillings, A., Theobald, A. J., Wohlkonig, A., Pearson, N. D., and Gwynn, M. N. (**2010**) Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature* 466, 935–940.

³² Wohlkonig, A., Chan, P. F., Fosberry, A. P., Homes, P., Huang, J., Kranz, M., Leydon, V. R., Miles, T. J., Pearson, N. D., Perera, R. L., Shillings, A. J., Gwynn, M. N., and Bax, B. D. (**2010**) Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1152–1153.

2.4 Benzoquinonas

Las quinonas son compuestos que presentan como característica estructural dos grupos carbonilo conjugados a dobles enlaces en un ciclo de seis miembros, estos grupos le otorgan reactividad química particular a la molécula. La 1,4-benzoquinona o *p*-benzoquinona es la estructura básica de los compuestos quinoides (**Figura 12**).³³

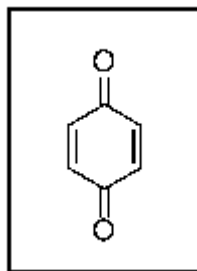


Figura 12. Estructura base 1,4-benzoquinona

Las quinonas son compuestos distribuidos en la naturaleza, se encuentran en plantas con flores, hongos y en pequeñas cantidades se encuentran dispersas en la mayoría de las formas de vida.³³ Desempeñan un papel importante en funciones biológicas, como la fosforilación oxidativa y transferencia de electrones. Compuestos a base de quinona participan en una serie en cascada de oxidorreductasa biológica.^{33,35} Se han empleado como agentes antimicrobianos y anticancerígenos, funcionando bien como inhibidores de vías redox o como profármacos.³⁶ La presencia del grupo quinona ha sido asociada a la actividad antitumoral que presentan diversos agentes antitumorales, incluyendo adriamicina, daunorubicina, mitomicina C, trenimon.³⁷

³³ Abraham I., Joshi R., Pardasani P., Pardasani R.T. Recent Advances in 1,4-Benzoquinone Chemistry. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 22, No. 3, 385-421, **2011**.

³⁴ Thomson RH. (1991). Distribution of naturally occurring quinones. Pharm Weekbl **1991**;13(2):70-3.

³⁵ Hall B., Meredith E., Wilkinson S. (2012). Targeting the Substrate Preference of a Type I Nitroreductase To Develop Antitrypanosomal Quinone-Based Prodrugs. Antimicrob. Agents Chemother. **2012**, 56, 5821–5830

³⁶ Silva, A. J. M.; Netto, C. D.; Pacienza-Lima, W.; Torres-Santos, E. C.; Rossi-Bergmann, B., Maurel, S.; Valentin, A.; Costa, P. R. R.; J. Braz. Chem. Soc. **2009**, 20, 176

³⁷ Begleiter A., Blair G. (1984). Quinone-induced DNA Damage and Its Relationship to Antitumor Activity in L5178Y Lymphoblasts. CANCER RESEARCH 44, 78-82, January **1984**.

Una de las características más importantes de estos compuestos es su fácil conversión de quinona a hidroquinona, lo cual proporciona un sistema redox muy importante el cual ha sido ampliamente estudiado.³⁸ Las hidroquinonas presentan actividad biológica relacionada a la capacidad de perder un electrón seguido por desprotonación lo que genera un radical semiquinona (**Figura 13**). A estos intermediarios se les han asociado propiedades biológicas tales como pro-oxidantes, los cuales aceleran el daño oxidativo al ADN, proteínas y carbohidratos.³⁹

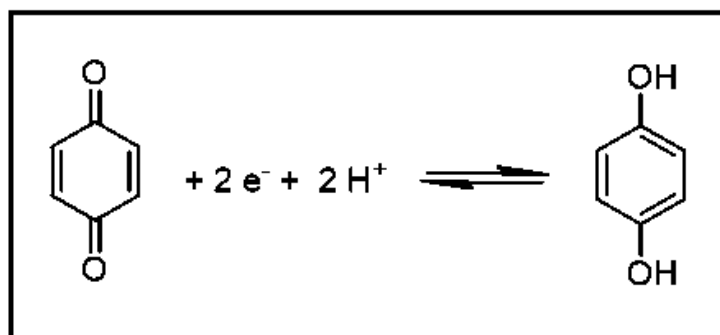


Figura 13. Equilibrio quinona-hidroquinona.

La actividad biológica está relacionada con su potencial redox, por lo que juegan un papel importante en nuestro ciclo de vida. Las hidroquinonas y sus derivados sustituidos, por ejemplo, la antraciclina y tetraciclina poseen en su estructura hidroquinona, a la cual se le atribuye su actividad biológica (**Figura 14**).⁴⁰

³⁸ Martínez M., Weiss B., Santos L., Araya R., Intramolecular Hydrogen Bond in Biologically Active o-Carbonyl Hydroquinones. *Molecules* **2014**, 19, 9354-9368

³⁹ Soto J., Bahamonde V., Araya R., Weiss B. (2013). On the Mechanism of biological activity of hydroquinone derivatives that inhibit tumor cell respiration. A theoretical study. *Computational and Theoretical Chemistry* 1013 (**2013**) 97–101.

⁴⁰ Christianopoulou M. Silylation-desilylation of quinones and Their derivatives. *Appl. Organometal. Chem.* **2001**; 15: 889–900.

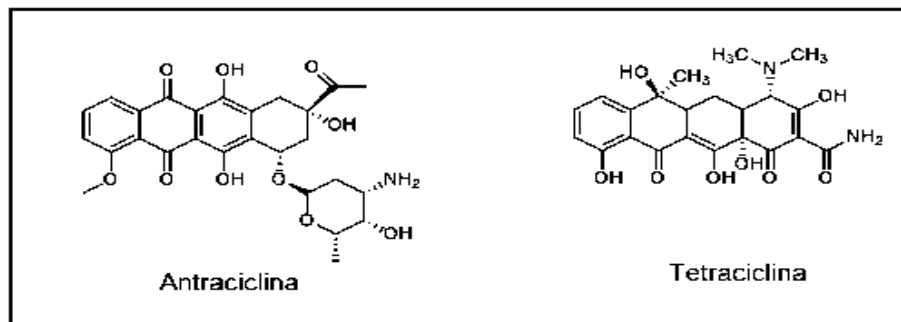


Figura 14. Estructura química de fármacos que poseen en su estructura hidroxiquinona

El desarrollo de agentes que posean 1,4 benzoquinona en su estructura ha ido en aumento, no solo como antioxidantes sino además como antiinflamatorios y agentes citotóxicos.⁴¹ En este contexto, se ha demostrado que la presencia quinonas en diversos compuestos, reconocedores del material genético, aumentan la capacidad de unión con el ADN mejoran la actividad citotóxica lo cual es, en cierta medida, de esperar pues los mecanismo de muerte celular implican producción de radicales libres y especies de oxígeno activo.³⁷

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se han sintetizado compuestos derivados de pirrolilquinonas con potencial de intercalación del DNA. Entre las características estructurales para ser agente intercalador se encuentran la presencia de grupos aromáticos o enlaces π , las cuales son capaces de interactuar y estabilizar a los pares de bases de ADN por medio de interacciones π - π .⁴²

Así mismo, dado que las quinonas tales como antraquinonas, naftoquinonas y benzoquinonas son compuestos altamente coloreadas y buenos fluoróforos en nuestro grupo de trabajo se han funcionalizado quinonas las cuales han resultado ser excelentes sensores aniónicos; un ejemplo de estas es la pirrolilquinona, compuesto **3**, se le atribuye una excelente capacidad reconocedora de aniones específicamente el anión fluoruro.⁴³

⁴¹ Filosa R., Peduto A., Aparoy P., Schaible A., Luderer S., Krauth V., Petronzi C., Massa A., Rosa M., Reddanna P., Werz O. *European Journal of Medicinal Chemistry* 67 (2013) 269-279270

⁴² Gallardo Alfonso S. Síntesis de nuevas pirrolilquinonas y estudio de su interacción frente a fluoruro y ADN. Tesis maestría. UMSH. 2015.

⁴³ Saini, R.; Kaur, N.; Kumar, S.; Quinones based molecular receptors for recognition of anions and metal ions. *Tetrahedron* (2014) 1-23.

2.5 Pirrolilquinonas

Las síntesis de las pirrolilquinonas han sido descritas por Chacón y sus colaboradores en **2014**, pioneros en reportar dichas moléculas.

La síntesis de estos compuestos se lleva a cabo mediante la adición de pirrol a la correspondiente quinona (*p*-benzoquinona o el producto natural perezona) utilizando SiO₂ como soporte.⁴² Las pirrolilquinonas son compuestos sintetizados por nuestro equipo de trabajo, los cuales tienen la capacidad de reconocer selectivamente iones, específicamente el anión fluoruro (**Figura 15**).

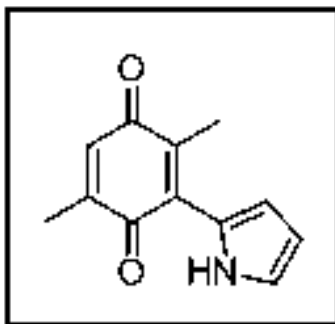


Figura 15. Estructura química de 2-pirrolil-2,5-dimetil-*p*-benzoquinona (**3**)

El desarrollo de nuevos compuestos sintéticos capaces de reconocer selectivamente aniones o cationes ha atraído la atención de diferentes áreas como: químicas, ciencias biológicas y de materiales.⁷

Recientemente nuestro grupo de trabajo ha descrito la síntesis de dos receptores diseñados para funcionar como receptores ditopicos (**Figura 16**).^{7,8}

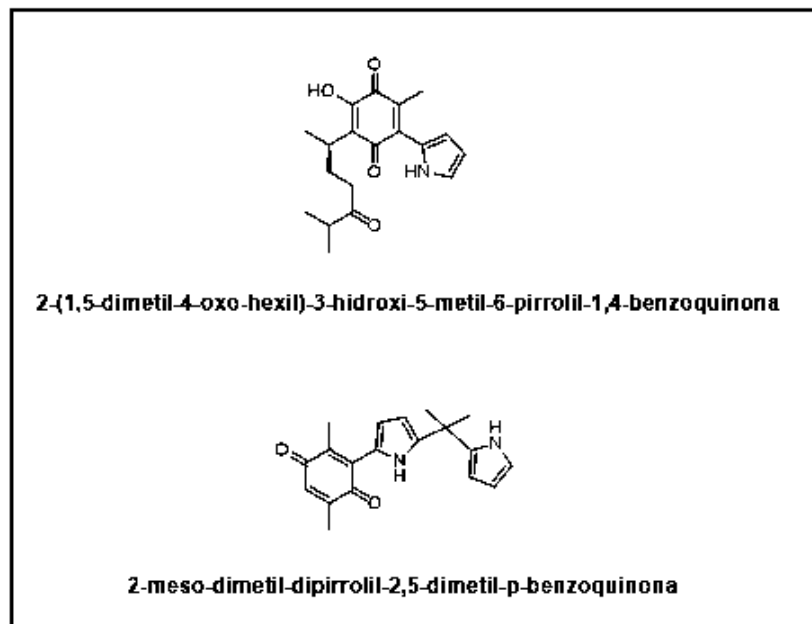


Figura 16. Pirrolilquinonas reportadas por Chacón, G.L y colaboradores. 2014

La pirrolilquinona 2-meso-dimetil-dipirrolil-2,5-dimetil-p-benzoquinona presenta una selectividad por el anión fluoruro (**Figura 17**) por medio de interacciones π -anión, así como puentes de hidrógeno.⁷

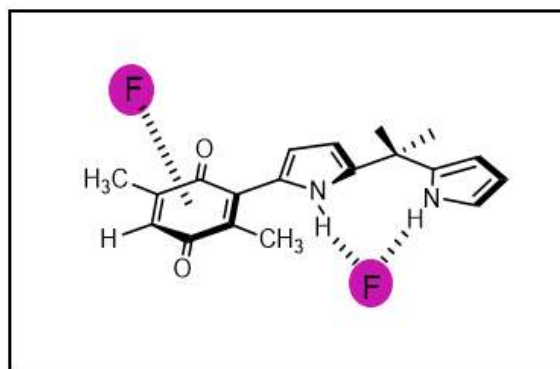


Figura 17. Interacción pirrolilquinona-anión Fluoruro

El receptor ditópico (**Figura 18**) presenta una región de reconocimiento de aniones (el pirrol como donante de enlace de hidrógeno), y una región de reconocimiento de cationes que participan en las interacciones de ácido de Lewis a través de la cadena lateral de carbonilo.⁸

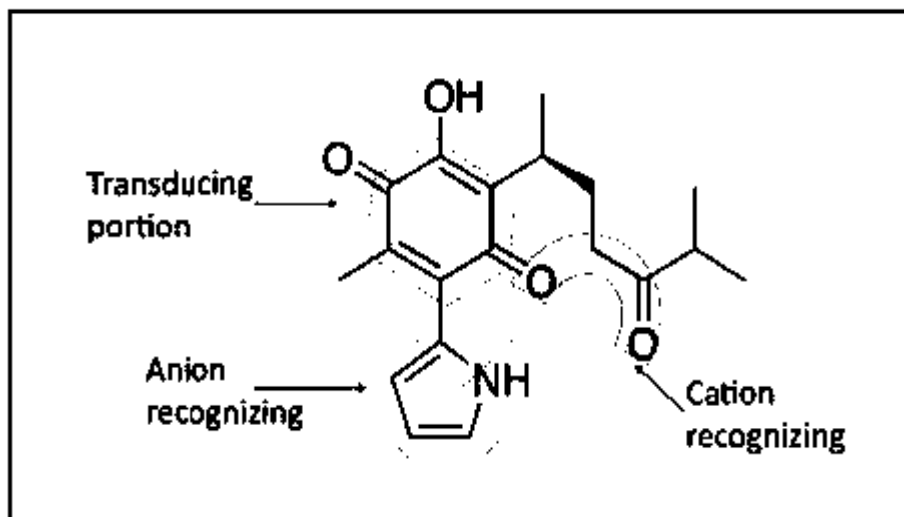


Figura 18. Esquema de región de reconocimiento de 2- (1,5 - dimetil - 4 - oxo - hexil) - 3 - hidroxil - 5 - metil - 6 -Pirrolil-1,4-benzoquinona

La capacidad de reconocimiento de estos compuestos está dada por las interacciones π -anión, las cuales han tomado gran importancia y un avance en el campo de la química supramolecular. Se establecen cuando una especie con carga negativa es atraída con fuerza al centro del sistema π de un anillo aromático deficiente en electrones y además por una polarización inducida por el anión. Estas interacciones tienen mucho potencial siendo empleadas para el desarrollo de nuevos sensores, huéspedes, catalizadores y materiales.⁴⁴ También pueden estar implicadas en funciones biológicas, particularmente en funciones que implican interacciones entre proteínas y aniones.⁷

⁴⁴ Frontera, A.; Gamez, P.; Mascar, M.; Moorbroek, T.J.; Reedijk, J.; Angew.Chem. Int. Ed. **2011**,50,9564-9583

El núcleo de la pirrolilquinona 2-pirrolil-2,5-dimetil-p-benzoquinona **3** presenta actividad frente al ADN posiblemente por medio de intercalación. Recientemente en nuestro grupo de trabajo se estudió la interacción que dicha molécula presenta frente al ADN, al incorporarla a otras moléculas que ya presentaban un reconocimiento de ADN (**Figura 19**). La incorporación de la pirrolilquinona favorece el reconocimiento y la intercalación con el ADN. ⁴² Para evaluar la interacción frente al ADN se realizó una titulación del derivado con una solución de ADN, en los espectros (**Figura 19**) se puede observar un desplazamiento tanto hiper Cromico como batocromico muy marcado en la región de 260 a 350 nm, estos desplazamientos sugieren la existencia de una interacción con el ADN.

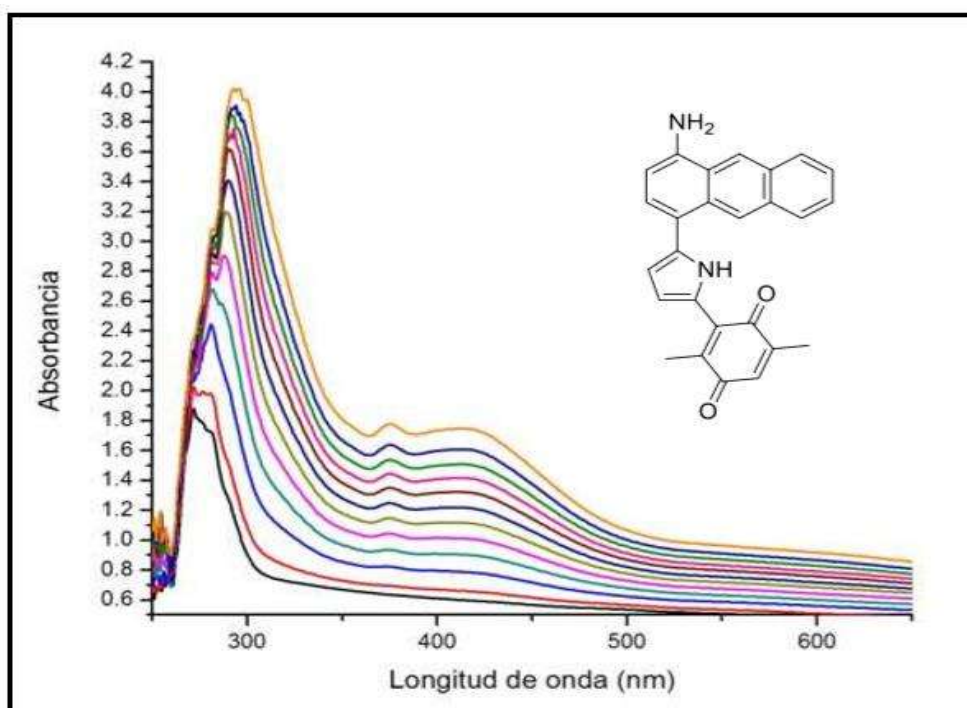


Figura 19. Estudio de reconocimiento de ADN en UV-Visible de una pirrolilquinona funcionalizada

Considerando el alto potencial que presentan las fluoroquinolonas como agentes antibacterianos y las propiedades de las pirrolilquinonas resulta interesante explorar compuestos que contengan ambas porciones no solo por lo que a actividad biológica respecta, sino además en lo que a propiedades de absorción y fluorescencia demostrada en ambos compuestos lo que los hace atractivos para ser utilizados, unidos

“Síntesis de Pirrolil-quinolil-fluoroquinolona derivado de ciprofloxacino. Evaluación de su actividad antibacteriana y reconocimiento frente a ADN.”

covalentemente, como sensores químicos ditópicos, reconocedores de aniones por parte de la pirrolilquinona y de metales por parte del carboxilato de la quinolona.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Sintetizar un nuevo derivado de fluoroquinolona funcionalizado mediante la adición de pirrolilquinona, capaz de reconocer aniones y mantener, o incrementar, la actividad biológica de la fluoroquinolona como agente antibiótico.

3.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar un compuesto híbrido ciprofloxacino-pirrolilquinona mediante funcionalización de la piperazina de la fluoroquinolona
2. Evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana del compuesto obtenido.
3. Evaluar la capacidad del compuesto obtenido como reconocedor iónico y de ADN.

4. Justificación

La resistencia bacteriana constituye un problema mundial de salud pública pues, entre otros factores, las observaciones epidemiológicas demuestran la rápida adaptación de las bacterias a los nuevos antibióticos debido no únicamente al uso indiscriminado de fármacos como se pensaba sino además por mecanismos de defensa natural. Una de las posibles soluciones ante este problema es la modificación de los antibacterianos existentes para proporcionar nuevos análogos prometedores.

Las quinolonas son un buen ejemplo de antibióticos que se encuentran actualmente en el mercado las cuales presentan un núcleo con diferentes sitios susceptibles a modificaciones, lo que nos permite tener nuevas variantes estructurales con actividad biológica. Una modificación inteligente puede dar resultados que abran una línea de investigación y soluciones potenciales a mediano y largo plazo.

5. Parte experimental

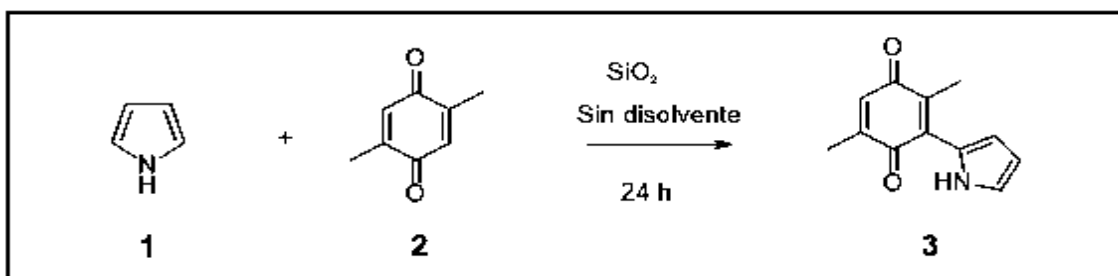
5.1 Materiales y Métodos

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H) se obtuvo con un equipo Varion Mercury Plus de 400 MHz empleando como referencia TMS y como disolventes CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$, para la titulación con fluoruro se realizaron en CD_3CN y para las titulaciones en UV-visible se emplearon disolventes grado HPLC. Todos los reactivos utilizados fueron de origen comercial de la empresa Sigma- Aldrich. La purificación de compuestos se realizó por cromatografía en columna con sílica gel 70-230 mesh marca Aldrich.

El ciprofloxacino se obtuvo de su forma farmacéutica, para esto se trituro una tableta de 500 mg de clorhidrato de Ciprofloxacino monohidratado hasta obtener un polvo fino, se colocó en un matraz balón y se adiciono 10 mL de agua destilada. Se colocó en agitación por treinta minutos para disolver la sal y se dejó en reposo hasta la precipitación de los excipientes. El sobrenadante se filtró y se obtuvo una solución clara, se adiciono una solución de $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}$ hasta la formación de un precipitado color blanco. Se filtró el precipitado y se dejó secar a temperatura ambiente el resultado fue la obtención de un sólido blanco que mostro las señales de RMN ^1H y ^{13}C de Ciprofloxacino.

5.2 Obtención de 2-pirrolil-2.5-dimetil-p-benzoquinona 3

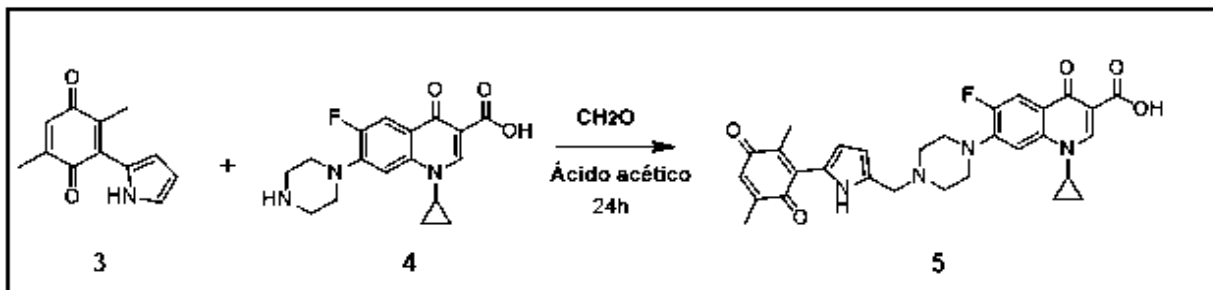
La síntesis de este compuesto ha sido descrita por Chacón y colaboradores y se realiza mediante la reacción de la 2,5-dimetil-1,4-benzoquinona y pirrol en ausencia de disolvente empleando sílica gel como soporte. ⁷



Esquema 1. Síntesis de 2-pirrolil-2.5-dimetil-p-benzoquinona

En un matraz de bola de 10 mL se pusieron a reaccionar 2.205 mmol de la dimetil benzoquinona **2** con 5 eq de pirrol **1**, primeramente, se disolvió la benzoquinona en CH₂Cl₂ y se agregó el pirrol, se homogenizó la solución y se agregó 1.5 g de SiO₂ a la mezcla, se evaporó el disolvente y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 72 horas, al pasar el tiempo de reacción se aprecia un color oscuro intenso en la sílice. La purificación se realizó por cromatografía en columna con sílica gel 70-230 mesh y empleando como eluyente un sistema Hex: AcOEt 98:2 el compuesto obtenido fueron cristales en forma de aguja de color rojo muy intenso, el rendimiento calculado fue de 17%.

5.3 Obtención de híbrido Ciprofloxacino-pirrolilquinona **5**



Esquema 2. Síntesis del compuesto **5**

En un vial limpio se pesaron 50mg de 2-pirrolil-2,5-dimetil-p-benzoquinona **3** (0.2mmol,1.0eq) posteriormente se agregó 22mg de poliformaldehído (0.7mmol,3.0eq), seguido de 246mg de ciprofloxacino **4** y finalmente se adicióno 2mL de ácido acético glacial. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 24 horas a 25° C. El avance de la reacción se monitoreo mediante TLC y una vez concluida la desaparición de materias primas se retiró de agitación, posteriormente se añadió 5 mL de agua y se neutralizó con una solución de NaHCO₃ al 10%, la fase orgánica es separada con CH₂Cl₂, se secó con Na₂SO₄ y finalmente el compuesto se lavó tres veces con heptano. El producto fue un sólido color morado, el rendimiento de la reacción es de un 40%.

5.4 Prueba de difusión en disco

Se determinó la actividad antibacteriana del compuesto **5** frente a microorganismos gramnegativos y grampositivos; *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mediante el método de Kirby-Bauer.

Se realizaron diluciones en serie del compuesto **5**. Se trabajó con una batería de tres tubos. La concentración del compuesto **5** del primero tubo fue de 20mg/mL, el segundo tubo de 2 mg/mL y el tercer tubo de 0.2 mg/mL. Se impregnaron discos de papel filtro con 10 μ L de cada solución, se dejaron secar durante 24 horas.

Posteriormente, se sembraron las cepas *E. Coli* y *S. aureus* en placas Mueller-Hinton, se dejaron incubar a una temperatura 37° C durante 24 horas. Se seleccionó una colonia perfectamente aislada y se transfirió a un tubo que contenía 3 mL de solución salina y se agito para homogenizar. Se introdujo un hisopo de algodón dentro de la suspensión de bacterias, rotándolo varias veces presionando las paredes del tubo para evitar un exceso de inculo. Se inoculo la placa Mueller-Hinton por estría cerrada, rotando la placa 90°C, para la distribución homogénea del inculo.

Los discos se colocaron en la placa a una distancia no menor de 24 mm entre cada uno de ellos, colocando cuatro discos por placa. Las placas se incubaron a 37° C durante 24 horas; la interpretación de los resultados se realizó midiendo los diámetros de inhibición en milímetros con una regla convencional. El diámetro del halo formado está en relación con el grado de sensibilidad del microorganismo. El ciprofloxacino se empleó como control positivo, lo que permitió comparar la sensibilidad del compuesto **5**.

5.5 Reconocimiento del compuesto 5 con ADN en UV-Visible

Se prepararon 15 mL de una mezcla DMSO: Buffer de fosfatos pH 7 2:1 y se dejó estabilizar por 24 horas. Se preparó una solución de ADN (3mg/mL), disolviendo el ADN en el sistema y se dejó reposar por 24 h a 4 °C. La solución del compuesto (**5**) se preparó a una concentración 2.30×10^{-4} M disolviendo completamente en el sistema. Los espectros se obtuvieron por barrido desde 200 nm a 700 nm. Se adiciono 1 mL de la solución del compuesto (**5**) a la solución preparada de ADN y se midió a Tiempo 0,4,24 y 48 horas.

5.6 Titulaciones en Ultravioleta

Para la realización de las titulaciones en UV-Vis se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis, Thermo Scientific, empleando una celda de cuarzo. Utilizando una longitud de onda que va desde los 250 nm a 700 nm. El compuesto a titular se preparó a una concentración de 5×10^{-4} M, utilizando acetonitrilo HPLC.

La solución del TBA-F se preparó a una concentración 0.1 M se midió como línea base el CH_3CN y el blanco fue el compuesto a titular, posteriormente se hicieron adiciones de la solución de F-TBA, iniciando con $10 \mu\text{L}$ y se fue aumentando de acuerdo a la observación del comportamiento del compuesto; dejando de realizar adiciones cuando ya no había modificaciones en la absorbancia del compuesto.

6. Resultados y discusión

6.1 Síntesis del híbrido Ciprofloxacino-pirrolilquinona 5

El objetivo principal de este trabajo es la síntesis de un compuesto con mayor complejidad estructural pero que pueda obtenerse de manera sencilla, preferentemente en un solo paso, para lo cual se seleccionó una reacción multicomponente (MCR). La industria farmacéutica emplea e impulsa tales reacciones ya que ofrecen mayor eficiencia y reducción de costos además de hacer posible la síntesis de ensamble de sustancias estructuralmente complejas que podrían mostrar actividad biológica.⁴⁵

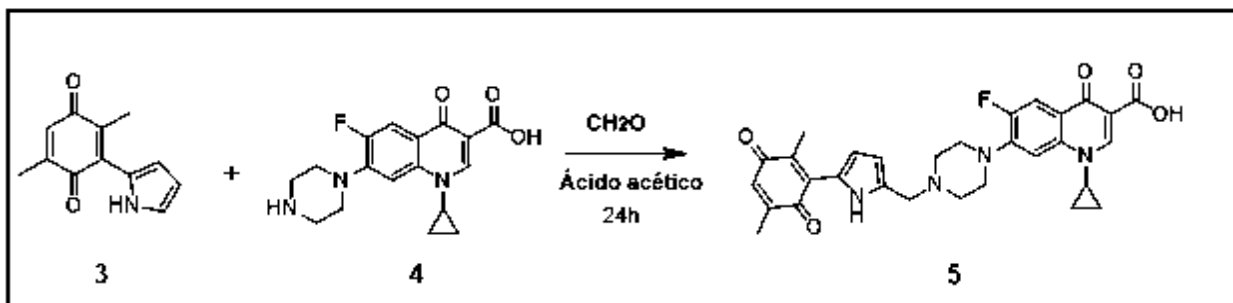
La reactividad de los diferentes sustituyentes de la quinolona ha permitido obtener variantes estructurales y derivados con mejores características químicas y biológicas.⁵ En estudios en los que se ha modificado la posición 7 de las fluoroquinolonas se demostró que el grupo aminoacilo afecta la actividad antibacteriana frente a las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, en algunos casos mejorándola.⁴⁶ Derivados de tetrazol en dicha posición muestran una actividad antibacteriana in vitro significativa contra las bacterias grampositivas.⁴⁷

El derivado obtenido, compuesto **5**, se obtuvo mediante la incorporación del de la pirrolilquinona **3** a la posición 7 de la fluoroquinolona (**Esquema 2**). A diferencia de otros derivados recientes como los ya mencionados, este derivado es de obtención relativamente fácil ya que se lleva a cabo en un solo paso, no requiere de la protección del grupo carbonilo mediante una esterificación, y la reacción, al ser de multicomponentes, es rápida, eficiente y con un buen rendimiento experimental. Es importante también considerar si el proceso cumple las pautas principales de la química verde en las cuales se trata de diseñar compuestos y procesos químicos que reduzcan o eliminen el uso y la generación de sustancias peligrosas, ahorrando el uso de sustancias químicas y así reduciendo el impacto ambiental que conlleva su uso.

⁴⁵ Ganem B. Acc Chem Res. **2009**;42(3):463-472.

⁴⁶ Valencia Barajas Y. Síntesis y actividad antimicrobiana de nuevo derivados de fluoroquinolona sustituidos en la posición 7. Tesis maestría. UMSNH.**2010**.

⁴⁷ Chauhan K.; Singh P.; Kumar V.; Shukla P.; Siddiqi M.; Chauhan P.; Investigation of Ugi-4CC derived 1H-tetrazol-5-yl-(aryl) methyl piperazinyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid: Synthesis, Biology and 3D-QSAR analysis. European Journal of Medicinal Chemistry 78 (**2014**) 442-454.



Esquema 2. Síntesis del compuesto (5)

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, no fue necesario el empleo de solvente alguno (**Tabla 1**). Se llevó a cabo usando condiciones acidas de catálisis (ácido acético).

	Experimento 1	Experimento 2
2-pirrolil-2,5-dimetil-p-benzoquinona	1 Eq	1 Eq
Ciprofloxacino	3 Eq	1 Eq
Paraformaldehído	3 Eq	1 Eq
Medio de reacción	Ácido acético	Ácido acético
Temperatura	T.A	T.A
Tiempo	24horas	24horas

Tabla 1. Comparación de condiciones de reacción

Explorando la metodología de reacción decidimos disminuir los equivalentes (experimento 2) obteniendo un subproducto, el cual no fue posible purificar por medio de cromatografía en columna, ya que el compuesto **5** es muy polar y por ende es retenido por más tiempo por el gel de sílice siendo demasiado complicada su purificación por este método.

Las condiciones óptimas de la reacción fueron las del primer experimento, ya que una de las principales ventajas es la ausencia de subproductos en la reacción, por lo que no se requiere purificación, solo se lavó con *n*-hexano para eliminar algunas impurezas como grasas las cuales eran bastante destacables en los espectros RMN ¹H. El rendimiento de la reacción es del 42%.

La estructura del compuesto obtenido fue confirmada por el espectro de RMN (**Figura 20**) en el cual se aprecia que están presentes las señales, tanto para la pirrolilquinona como para las de la fluorquinolona, en la proporción 1:1, pero sobre todo destaca la señal correspondiente al metileno proveniente del formaldehído que se expresa como un singlete cerca de 3.5 ppm.

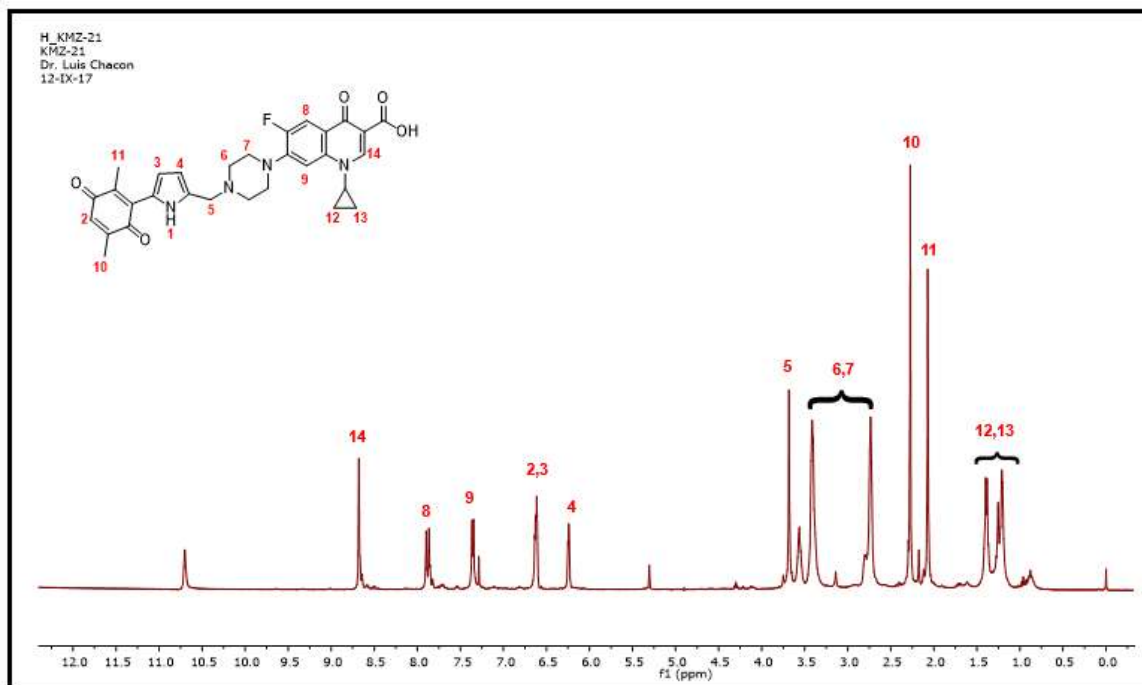


Figura 20. Espectro de RMN DE ^1H (400 MHz), asignación de los ^1H CFX-PQ 5 en CDCl_3

6.2 Actividad Antimicrobiana

Al compuesto obtenido se evaluó su actividad antibacteriana frente a dos cepas de referencia; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 28922. Se seleccionaron dichas cepas para observar la actividad que presenta la fluoroquinolona modificada frente microorganismos grampositivos como gramnegativos.

Se determinó la sensibilidad del nuevo agente microbiano mediante el método de difusión en disco. Para fines de una adecuada evaluación, se seleccionó como compuesto de referencia el ciprofloxacino. El estudio realizado proporciono resultados cualitativos.

6.2.1 Actividad antimicrobiana del compuesto 5

Como se mencionó en la sección de antecedentes, la relación estructura-actividad en las quinolonas está ampliamente descrita y queda claro que hay posiciones que al hacer cambios en grupos funcionales se pierde o disminuye la actividad biológica. Así, por ejemplo, un cambio del carboxilato por amida resulta en pérdida total de la actividad debido a que el ácido carboxílico juega un papel primordial en el reconocimiento hacia el magnesio. Sin embargo, si los cambios son en la posición 7, se puede esperar modificación de la potencia del fármaco, pero no pérdida de la actividad por no ser parte del farmacóforo.

Así, el compuesto **5**, mantiene prácticamente la estructura completa del ciprofloxacino, una de las fluoroquinolonas más importantes por su éxito en uso clínico, pero con la adición de una pirrolilquinona que biológicamente es un fragmento con potencial biológico dadas las características de óxido-reducción que presenta. Es de esperar, por sus características estructurales, que el compuesto **5** inhiba el crecimiento bacteriano tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas ya que, cabe recordar, que la piperazina de la posición 7 interactúa directamente con la DNA-girasa o topoisomerasa IV y que el sustituyente en esta posición permite una interacción adicional con la subunidad ya que interacciona con está reforzando la actividad inhibitoria al impedir la separación.⁴⁸ Se ha demostrado que los radicales voluminosos y la hidrofobicidad de la molécula en esta posición contribuyen a la reducción del eflujo activo, lo que disminuye la probabilidad de resistencia bacteriana.^{49,50} Las sustituciones en el C-7 son una pieza clave en la actividad inhibitoria de las quinolonas, teniendo gran impacto en potencia, solubilidad y espectro antibacteriano.⁵¹ Por lo anterior, es clara la importancia de llevar a cabo pruebas de actividad antibacteriana que permitan dar pauta a continuar buscando derivados de este compuesto.

Se determinó la actividad antimicrobiana del compuesto objetivo mediante el método de Kirby-Bauer. Los sensidiscos se impregnaron con soluciones preparadas a diferentes concentraciones.

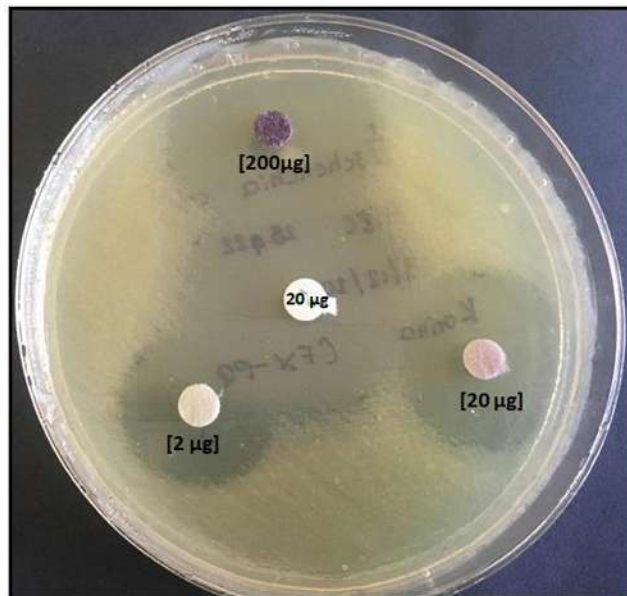


Figura 21. Actividad antimicrobiana del Ciprofloxacino (disco central) y el compuesto **5** a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* ATCC 28922 en prueba de difusión en agar.

De acuerdo con los resultados que se aprecian en la (**Figura 21**), frente a *Escherichia coli*, es notorio que el compuesto **5** tiene una actividad comparable con el ciprofloxacino a concentraciones elevadas (200µg/mL), pero se sigue observando actividad inhibitoria por medio del halo de inhibición a concentraciones pequeñas como el caso del disco con concentración de 2 µg/ml.

⁴⁸ Peterson, L.R. Quinolone molecular structure-activity relationships: ¿What we have learned about improving antimicrobial activity? Clin Infect Dis **2001**; 33 (Supl. 3): S180-S186.

⁴⁹ Pestova E, Millichap JJ, Noskin GA, Peterson LR. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. J Antimicrob Chemother **2000**; 45:583–90. 49.

⁵⁰ Beyer R, Pestova E, Millichap JJ, Noskin GA, Peterson, LR. A convenient assay for estimating the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus: evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin efflux. Antimicrob Agents Chemother **2000**; 44:798–801.

⁵¹ Lee KW, Kwon SY, Hwang S, Lee J-U, Kim H. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) study on C-7 substituted quinolone. Bull Korean Chem Soc **1996**; 17:147-52.

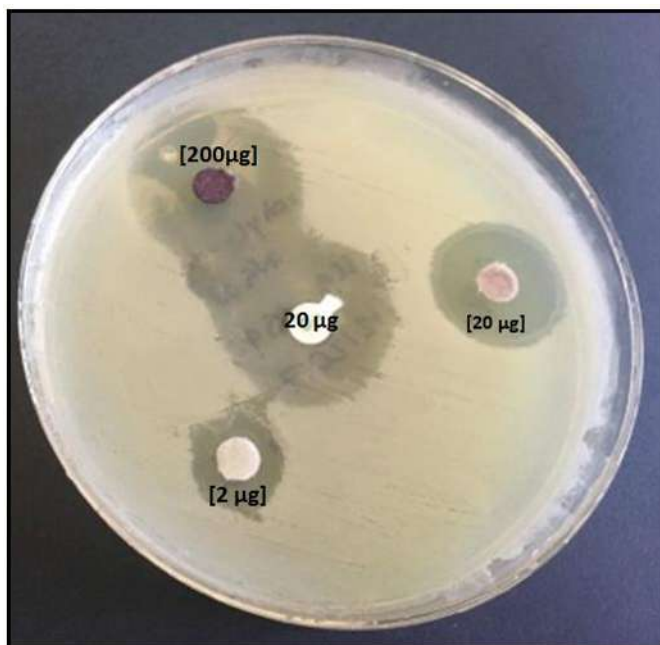


Figura 22. Actividad antimicrobiana del Ciprofloxacino (disco central) y el compuesto **5** a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en prueba de difusión en agar.

Por su parte, cuando el compuesto se evaluó frente a *Staphylococcus aureus* (**figura 22**), el compuesto **5** mostró actividad comparable con el ciprofloxacino a concentraciones elevadas.

Una comparación más clara se puede hacer si se compara cuantitativamente el halo de inhibición con respecto a las diferentes concentraciones usadas en el estudio. (**Figuras 23 y 24**).

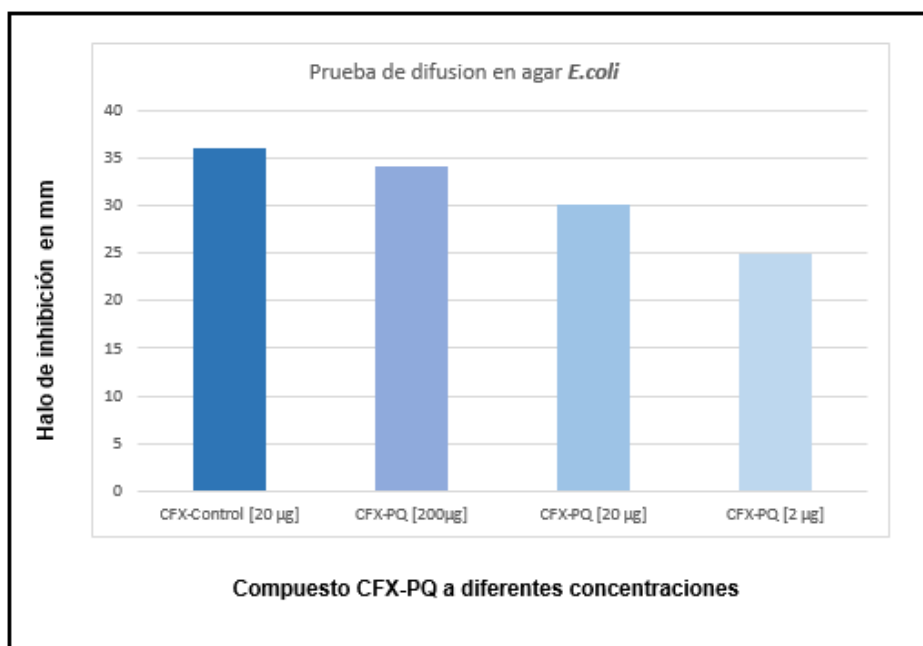


Figura 23. Actividad antimicrobiana observada mediante el halo de inhibición del compuesto (5) frente *E. Coli*

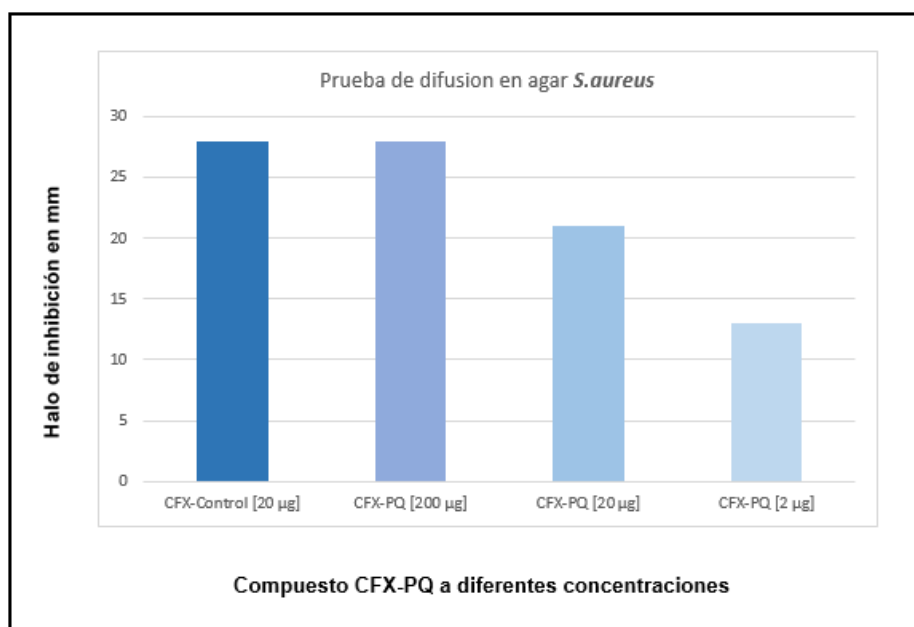


Figura 24. Actividad antimicrobiana observada mediante el halo de inhibición del compuesto (5) frente *S. aureus*

Se observó mayor actividad en bacterias Gramnegativas de acuerdo con la mayor sensibilidad observada mediante el halo de inhibición (**Figura 21**), La cual es comparable con el Ciprofloxacino de referencia.

De acuerdo con el tamaño de los halos de inhibición observados en los antibiogramas (**Figura 23 y Figura 24**), se puede establecer una correlación, bastante burda pero muy sugerente, con los valores de CMI: halos pequeños se relacionan con valores altos de CMI (resistentes) y halos grandes con CMI bajas (sensibles). Lo que permite especular que la CMI del compuesto **5** sea igual e incluso menor que el ciprofloxacino, ya que los halos de inhibición son comparables con el ciprofloxacino en ambas bacterias.

Es evidente la necesidad de ensayos adicionales en diferentes microorganismos, así como determinar la CMI para poder conocer la selectividad y potencia del nuevo antimicrobiano, pero en este punto es claro que, si resulta conveniente hacer dichos experimentos, lo cual abre las puertas para una nueva investigación.

6.3 Estudio de reconocimiento del ADN en UV-Visible

Al ser una estructura con diversos grupos funcionales, el compuesto 5 y bajo la premisa, de acuerdo con el mecanismo de acción de las fluoroquinolonas, de que la inhibición del crecimiento bacteriano es debida a una interacción con el ADN, se abre la posibilidad de dirigir este compuesto hacia otros ámbitos terapéuticos, particularmente sobre aquellos en los que el material genético juega un papel fundamental.¹⁶

Ya hay descritos algunos antecedentes al respecto. Por ejemplo, se han reportado quinolonas modificadas, CP-67,015 y voreloxin, las cuales han mostrado efectos atípicos contra la topoisomerasa II eucariota, en particular voreloxin actúa intercalándose entre las hebras del ADN e inhibiendo la topoisomerasa II (**Figura 25**), lo que hasta ahora no se pensaba que fuera un objetivo para las quinolonas, por lo que las modificaciones estructurales en fluoroquinolonas son responsables de la transformación de un antibacteriano en un agente anticancerígeno.^{52,53,54}

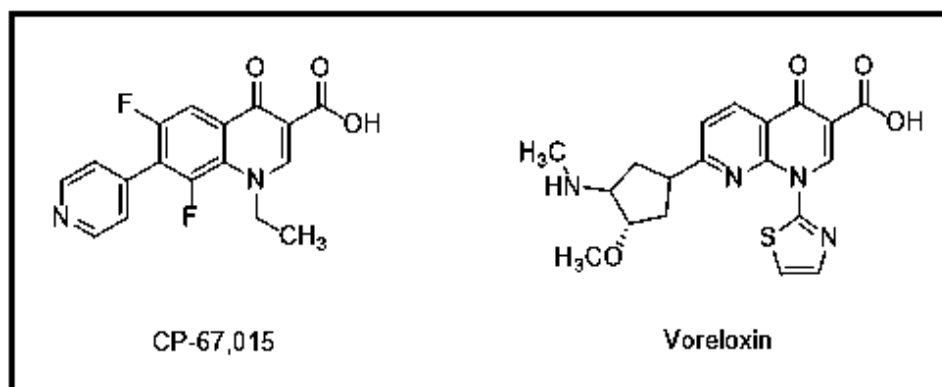


Figura 25. Estructura de quinolonas modificadas; CP-67,015 y Voreloxin.

El compuesto **3** ha demostrado tener la capacidad de interactuar con el ADN.⁴¹ Entre las principales características de los intercaladores se destaca la presencia de grupos aromáticos o enlaces π que actúan interaccionando con las pares de bases de ADN mediante interacciones π - π .⁵⁵

La incorporación del compuesto **3** a la posición C-7 de la fluoroquinolona puede favorecer la interacción con el ADN, funcionalizando la fluoroquinolona y transformándola de un antibacteriano a un agente anticancerígeno.

El ADN es el objetivo celular de muchos agentes citotóxicos contra el cáncer. Se han empleado varias técnicas instrumentales para estudiar las interacciones fármaco-ADN tales como la espectroscopia UV-Visible, emisión de fluorescencia y voltamperometría cíclica. La técnica instrumental comúnmente empleada es la espectroscopia de absorción UV-Visible. Las interacciones de ADN se pueden estudiar por comparación de los espectros de absorción de los complejos de fármaco libre y fármaco-ADN que usualmente son diferentes. Debido a esto, se decidió emplear esta técnica instrumental por su simplicidad y comúnmente es la más usada para estudiar las interacciones entre fármaco-ADN.⁵⁶ Los espectros de este compuesto frente a ADN a diferentes tiempos se ilustran en la **Figura 26**.

⁵² Barrett JF, Gootz TD, McGuirk PR, Farrell CA, Sokolowski SA. Use of in vitro topoisomerase II assays for studying quinolone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **1989**;33:1697-03.

⁵³ Wentland MP, Leshner GY, Reuman M, Pilling GM, Saindane MT, Perni RB, et al. Relationship of structure of bridged (2,6-dimethyl-4-pyridinyl) quinolones to mammalian topoisomerase II inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* **1993**; 3:1711-16

⁵⁴ Advani RH, Hurwitz HI, Gordon MS, Ebbinghaus SW, Mendelson DS, Wakelee HA, et al. Voreloxin, a first-in-class anticancer quinolone derivative, in relapsed/refractory solid tumors: A report on two dosing schedules. *Clin Cancer Res* **2010**;16:2167-75.

⁵⁵ Snyder R., *Mut Res.* **2007**, 623, 72-82.

⁵⁶ Sirajuddin M., Ali S., Badshah A., *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**. 124, 1-19

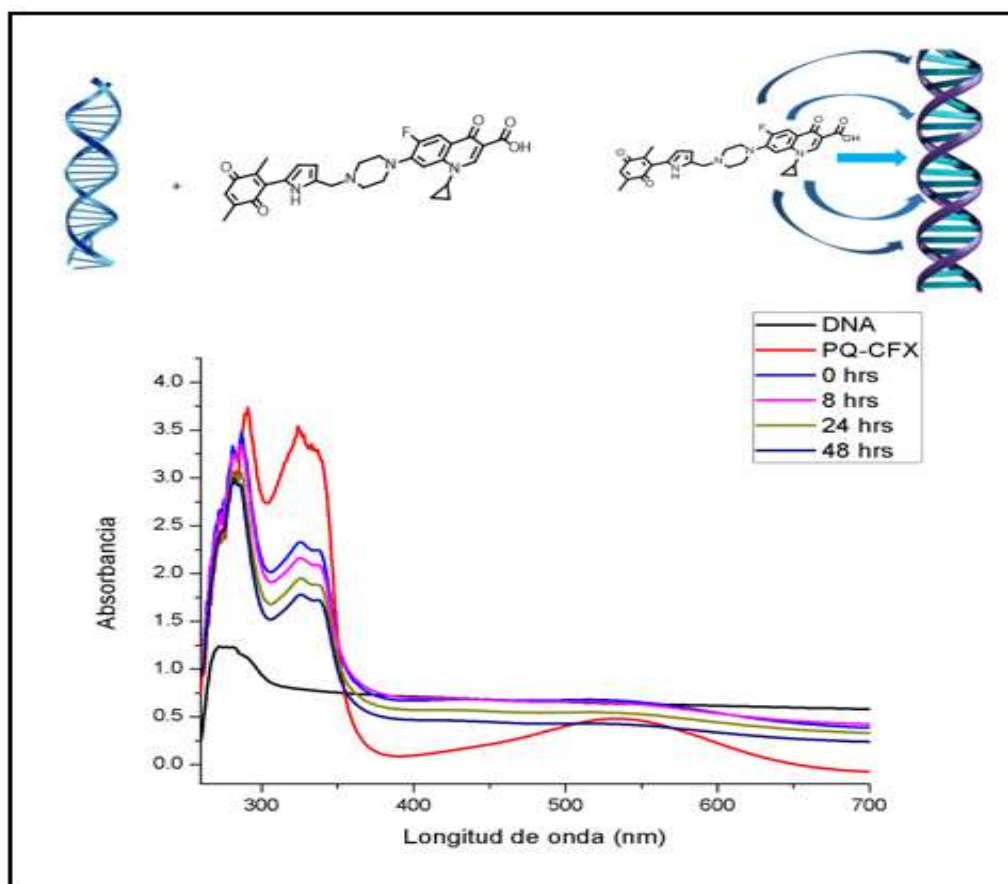


Figura 26. Espectro de absorción UV-Visible del DNA (negro), PQ-CFX (rojo), intercalación del compuesto PQ-CFX con el DNA a diferentes tiempos (azul, rosa, verde y morado).

El compuesto PQ-CFX (**5**) presenta una λ_{\max} de 280 nm, bastante cercana a la del DNA. Las mediciones fueron tomadas a diferentes tiempos por lo que se puede apreciar un efecto hipocrómico, lo que sugiere la existencia de una interacción entre el DNA y el compuesto PQ-CFX **5**.

Los compuestos que se unen con el DNA mediante intercalación generalmente resulta en un desplazamiento batocrómico e hipocrómico, debido a la fuerte interacción entre un cromóforo aromático y el par de bases del DNA.⁵⁷

El efecto hipocrómico es el resultado de la contracción de la hélice del DNA, mientras que el efecto hipercrómico refleja modificaciones a la estructura de la doble hélice.^{58,59} El efecto hipocrómico se emplea para verificar la existencia de interacciones fármaco-DNA.

⁵⁷ Liu J., Zhang T., Lu T., Qu L., Zhou H., Zhang Q., Ji L., J. Inorg. Biochem. **2002**, 91, 269–276

⁵⁸ Sirajuddin M., Ali S., Haider A., Shah N., Shah A., Khan M., Polyhedron., **2012**, 40, 19–31

⁵⁹ V. Gonzalez-Ruiz, A.I. Olives, M.A. Martin, P. Ribelles, M.T. Ramos, J.C. Menendez, Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies, InTech, India, **2011**. p. 65 (ISBN 978-953-307-514-3).

6.4 Evaluación del compuesto 5 como sensor aniónico

El diseño de sensores aniónicos ha recibido un mayor interés en las últimas décadas debido a la importancia que tienen en los sistemas biológicos pues son esenciales para la vida, ya que muchos procesos bioquímicos dependen de la presencia o el transporte de aniones.^{60,61,62}

El anión fluoruro (F⁻) presenta una toxicidad latente, ya que se encuentra en el agua potable, en la pasta dental y en fármacos utilizados para el tratamiento de la osteoporosis.⁶³ La presencia de este anión es crucial para la formación y conservación del esmalte de los dientes, pero niveles elevados causan caries dental. Fluorosis, es el término que se le ha dado a la sobreexposición del flúor; esta puede causar insuficiencia renal y defectos esqueléticos graves.⁶¹

Nuestro grupo de trabajo describió la síntesis del compuesto **3** el cual interacciona con el anión fluoruro mediante interacciones anión- π . Debido a la coloración intensa que presentan las quinonas y al ser funcionalizadas con compuestos que presentan reconocimiento de aniones, se obtienen sensores colorimétricos que tienen ventajas sobre otros sensores moleculares.

⁶⁰ Beer, P.D.; Gale, P.A.; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **2001**, 40, 486-516

⁶¹ Galbraith E.; James T.D.; Boron based anion receptors as sensors. Chem. Soc. Rev.,**2010**,39,3831-3842.

⁶² T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G.M. Tocci, P.E. Kruger, F.M. Pfeffer, Coord. Chem. Rev. 250 (**2006**) 3094–3117.

⁶³ Hudnall, T.W.; Chiu, C.W.; Gabbai, F.P. Fluoride ion Recognition by chelating and Cationic Boranes. Accounts of Chemical Research.388-397. February **2009**. Vol. 42, No. 2.

La espectroscopia (UV-vis) es de las técnicas analíticas más empleadas en la química supramolecular ya que permite cuantificar el reconocimiento con intermolecular entre diferentes especies químicas como los aniones. De acuerdo con las características que presenta el compuesto **5**, como el color violeta intenso, el cual es atribuido por la quinona, y el reconocimiento del anión fluoruro frente a sales como TBA-F en donde se observó un cambio de coloración notable debido a las interacciones que presenta con el flúor, se procedió a realizar una titulación del anión fluoruro por medio de ultravioleta-visible (UV-vis) en CH₃CN. Si bien es cierto que se espera un comportamiento similar frente a aniones como lo hiciese la pirrolilquinona por sí misma, también es claro que la aplicación como quimiosensor se puede ver expandida pues la porción de la fluoroquinolona presenta fluorescencia por sí misma y además reconoce cationes, es decir un efecto doble o mejor dicho ditópico, pero visible frente a UV en un caso y fluorescencia en el otro.

6.4.1 Titulación del compuesto 5 con TBA-F en CH₃CN

La titulación del compuesto **5**, se llevó a cabo agregando pequeñas alícuotas de una solución 0.1 M de TBA-F a una solución 5×10^{-4} M del compuesto en ambas soluciones empleando CH₃CN como solvente.

La solución inicial presento una coloración morada intensa, mostrando una banda centrada en 530 nm pero que tras la adición de cantidades crecientes de la solución de TBA-F, se produjo un intenso cambio de coloración acompañado de una disminución de esta banda, conocido como efecto hipocrómico. Al seguir adicionando una mayor cantidad del anión fluoruro se hizo más evidente la formación de una nueva banda de absorción a 410 nm, la cual corresponde al nuevo complejo formado, el cual provoca un efecto hiperocrómico. Los espectros obtenidos se ilustran en la **Figura 27**.

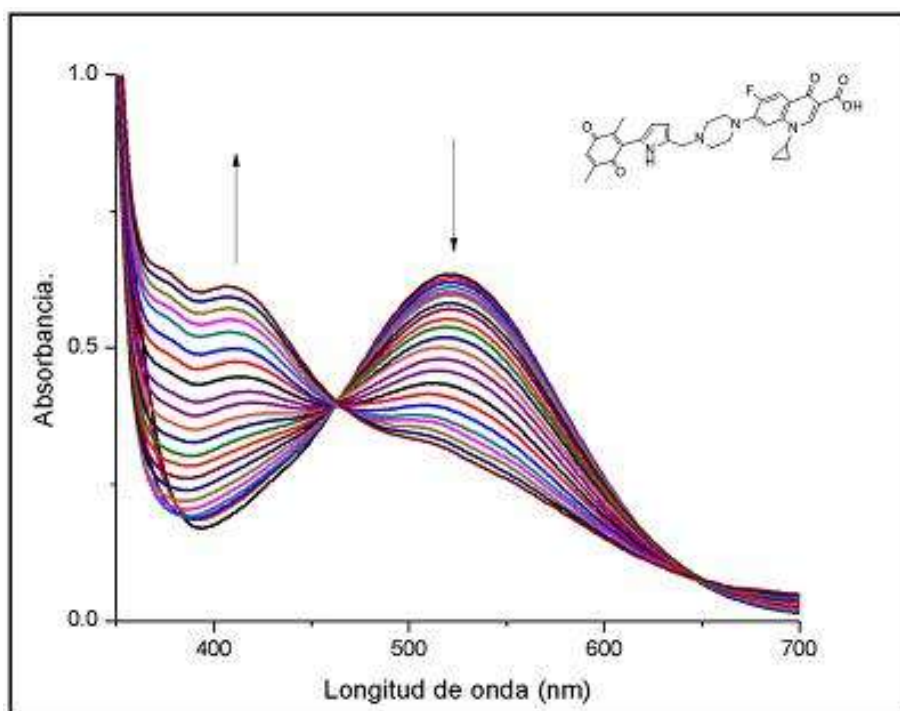


Figura 27. Titulación en UV-Vis de compuesto **5** (5×10^{-4} Molar) en CH_3CN con la adición de cantidades crecientes de F^- (0-53eq).

Esto se debe a que el compuesto **5** reconoce por el lado de la benzoquinona en una unión π -anión con él, lo que provoca un cambio de conjugación el cual se ve reflejado en un cambio de coloración, el efecto hipercrómico indica la presencia de una nueva especie distinta a la del compuesto inicial. Este resultado deja claro que la interacción con el anión fluoruro mantiene el mismo comportamiento que cuando se encuentra la pirrolilquinona.

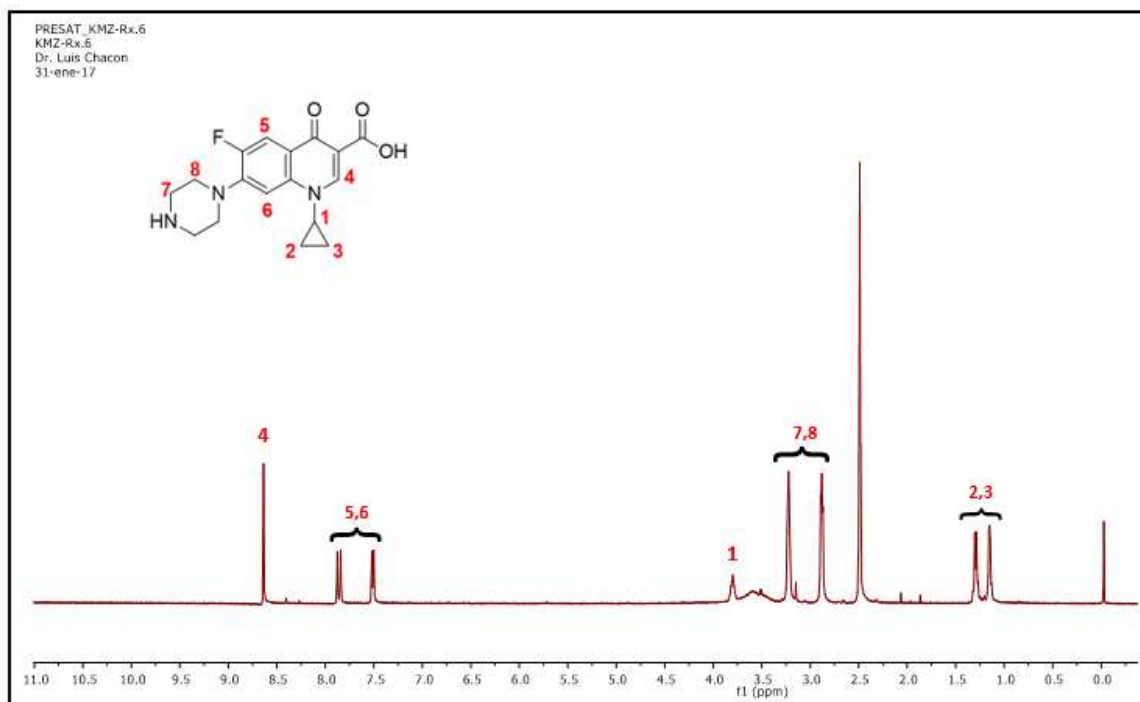
Aunque con este estudio se cumplen los objetivos de la tesis, se abre la posibilidad de explorar la interacción con cationes y conocer su comportamiento fluorescente, así como investigar el comportamiento frente a ambos, aniones y cationes, con la posibilidad de buscar una aplicación biológica como marcador.

7. Conclusiones

- El compuesto obtenido híbrido de pirrolilquinona y ciprofloxacino es activo inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, microorganismos grampositivos y gramnegativos respectivamente. Se corrobora que el grupo de la quinona incorporado en la posición 7 incrementa la potencia y se espera que también lo haga en el espectro de acción y farmacocinética por lo que resultará importante llevar a cabo las pruebas correspondientes.
- El reconocimiento del anión fluoruro es mediado por la interacción π -anión.
- El compuesto obtenido tiene capacidad de interaccionar con el ADN.
- Tanto por los resultados obtenidos como por las características estructurales del nuevo compuesto, es evidente el potencial biológico que puede presentar, por lo que será importante llevar a cabo ensayos frente a un grupo más amplio de microorganismos grampositivos y gramnegativos que permitan conocer la selectividad del compuesto, así como hacer pruebas adicionales para evaluar su selectividad sobre las topoisomerasas y explorar otros ámbitos terapéuticos.

1. Anexos

Anexo 1. Espectro de RMN¹H del ciprofloxacino **4** en DMSO-*d*₆



Anexo 2. Espectro de RMN¹H del compuesto **5** en CDCl₃

