



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
FARMACOLOGÍA

**Síntesis y estudios de relación estructura-actividad
antibacteriana de imidazolinilindoles**

T E S I S

Que presenta

Maria Trinidad Serrano Alva

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
FARMACOLOGÍA**

Directora de la Tesis:

Dra. Martha Sonia Morales Ríos

Esta tesis se realizó en el Departamento de Química y en el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la Dra. Martha Sonia Morales Ríos con una beca de inversión en el conocimiento otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 289181).

INDICE

1. RESUMEN	1
1.1. Abstract	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Relación estructura-actividad	3
2.2. Las bacterias.....	3
2.2.1. El rol de las bacterias en el desarrollo de los seres vivos.....	5
2.3. Aspectos generales de los antibióticos.....	7
2.3.1. Clasificación y mecanismo de acción de los antibióticos.....	7
2.4. Resistencia a los antibióticos.....	14
2.5. El núcleo indol como agente antibacteriano	17
2.6. La imidazolina como agente antibacteriano.....	18
2.7. El motivo imidazolinilindol y su actividad antibacteriana	19
2.8. La importancia del flúor en los agentes antibacterianos	20
2.9. Microorganismos de interés para los ensayos de actividad antibacteriana	21
2.9.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.9.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	22
2.9.3. <i>Escherichia coli</i>	24
2.9.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos particulares	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1. Síntesis de imidazolinilindoles 1-6.....	29

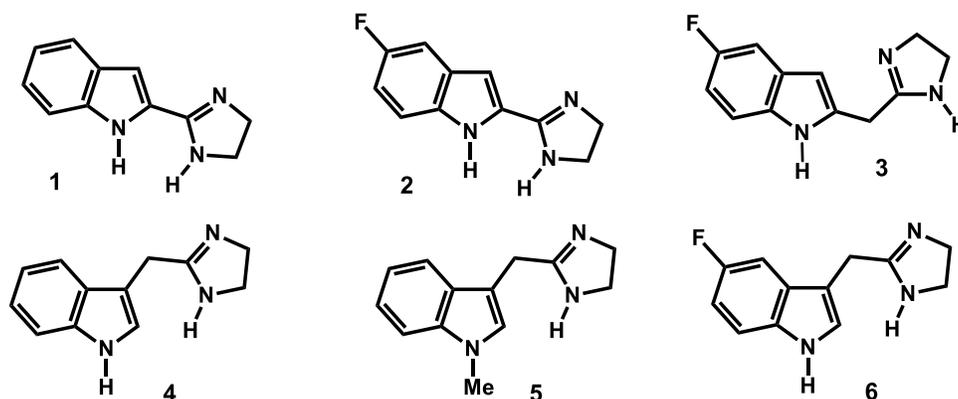
6.2. Síntesis del 2-(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-1 <i>H</i> -indol [1] y del 2-(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-5-fluoro-1 <i>H</i> -indol [2]	30
6.3. Síntesis del 2-[(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)metil]-5-fluoro-1 <i>H</i> -indol [3]	31
6.3.1. Síntesis del imidazolinilindol 3 mediante la Ruta A.....	32
6.3.2. Síntesis del imidazolinilindol 3 mediante la Ruta B.....	33
6.4. Síntesis de 3-[(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)metil]-1 <i>H</i> -indol [4] y 3-[(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)metil]-1-metil-1 <i>H</i> -indol [5]	34
6.5. Síntesis del 3-[(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)metil]-5-fluoro-1 <i>H</i> -indol [6]	35
6.5.1. Síntesis del imidazolinilindol 6 mediante la Ruta A.....	35
6.5.2. Síntesis del imidazolinilindol 6 mediante la Ruta B.....	36
6.6. Evaluación de la actividad antibacteriana de los imidazolinilindoles	38
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL	43
7.1. Procedimiento general para la síntesis	43
7.2. Síntesis de los intermediarios para la obtención de las indolimidazolininas 1 y 2 ...	44
7.2.1. (<i>E</i>)- y (<i>Z</i>)-2-(2-fenilhidrazona)propanoato de etilo [8a].....	44
7.2.2. (<i>E</i>)- y (<i>Z</i>)-2-[2-(4-fluorofenil)hidrazona]propanoato de etilo [8b].....	44
7.2.3. 1 <i>H</i> -indol-2-carboxilato de etilo [9a].....	45
7.2.4. 5-Fluoro-1 <i>H</i> -indol-2-carboxilato de etilo [9b]	45
7.3. Procedimiento general para la síntesis de los imidazolinilindoles 1 y 2	46
7.3.1. 2-(4,5-Dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-1 <i>H</i> -indol [1].....	46
7.3.2. 2-(4,5-Dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-5-fluoro-1 <i>H</i> -indol [2].....	47
7.4. Síntesis de los intermediarios para la obtención del imidazolinilindol 3	47
7.4.1. (5-Fluoro-1 <i>H</i> -indol-2-il)metanol [10]	47
7.4.2. Benzoato de (5-Fluoro-1 <i>H</i> -indol-2-il)metilo [11].....	48
7.4.3. 2-(5-Fluoro-1 <i>H</i> -indol-2-il)acetronitrilo [12].....	49
7.4.4. 2-(5-Fluoro-1 <i>H</i> -indol-2-il)acetato de etilo [13].....	49
7.5. Síntesis de 2-[(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)metil]-5-fluoro-1 <i>H</i> -indol [3].....	50
7.5.1. Síntesis del imidazolinilindol 3 vía el indolacetronitrilo [12] (Ruta A).....	50

7.5.2. Síntesis del imidazolinilindol 3 vía el éster 13 (Ruta B)	51
7.6. Procedimiento general para la síntesis de los imidazolinilindoles 4 y 5	51
7.6.1. Síntesis del 3-[(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)metil]-1 <i>H</i> -indol [4].....	51
7.6.2. Síntesis del 3-[(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)metil]-1-metil-1 <i>H</i> -indol [5].....	52
7.7. Síntesis de los intermediarios para la obtención del imidazolinilindol 6	52
7.7.1. <i>N</i> -etil- <i>N</i> -[(5-fluoro-1 <i>H</i> -indol-3-il)metil]etanamina [16].....	52
7.7.2. 2-(5-Fluoro-1 <i>H</i> -indol-3-il)acetónitrilo [17]	53
7.7.3. 2-(5-Fluoro-1 <i>H</i> -indol-3-il)acetato de etilo [18].....	53
7.8. Síntesis de 3-[(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)metil]-5fluoro-1 <i>H</i> -indol [6].....	54
7.8.1. Síntesis del imidazolinilindol 6 vía el indolacetónitrilo 17 (Ruta A).....	54
7.8.2. Síntesis del imidazolinilindol 6 vía el éster 18 (Ruta B)	55
7.9. Evaluación de la actividad antibacteriana.....	55
7.9.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	56
7.9.2. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	60
8. CONCLUSIONES	61
9. REFERENCIAS	62
10. ANEXO	66
10.1. Espectros y Tablas de RMN ¹ H y ¹³ C	66
10.2. Resultados de la evaluación antibacteriana.....	80
10.2.1. Resultados de la concentración inhibitoria mínima de los imidazolinilindoles frente a <i>Listeria monocytogenes</i> (Figura 31):.....	80
10.2.2. Resultados de la concentración inhibitoria mínima de los imidazolinilindoles frente a <i>Escherichia coli</i> (Figura 32):.....	82
10.2.3. Resultados de la concentración inhibitoria mínima de los imidazolinilindoles frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> (Figura 33):.....	84

1. RESUMEN

En el campo de la química heterocíclica, los anillos heterocíclicos que contienen nitrógeno ocupan un lugar importante debido a sus diversas propiedades biológicas. Los núcleos indol e imidazolina son considerados como estructuras privilegiadas en la química medicinal, constituyendo una clase importante de agentes terapéuticos, incluyendo anticancerígenos, antioxidantes, antihistamínicos, antifúngicos, antivirales y antimicrobianos.

La incidencia de las infecciones bacterianas ha incrementado dramáticamente en los últimos años. El uso generalizado de fármacos antibacterianos y la aparición de cepas bacterianas resistentes a estos fármacos ha conducido a graves riesgos para la salud. La resistencia bacteriana es un problema social que necesita el desarrollo de nuevos tratamientos alternativos. Teniendo en cuenta la importancia farmacológica y biológica de los núcleos indol e imidazolina, el presente estudio consistió en la síntesis de una serie de derivados imidazolinilindoles **1-6** con la finalidad de evaluar su actividad antibacteriana *in vitro* contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.



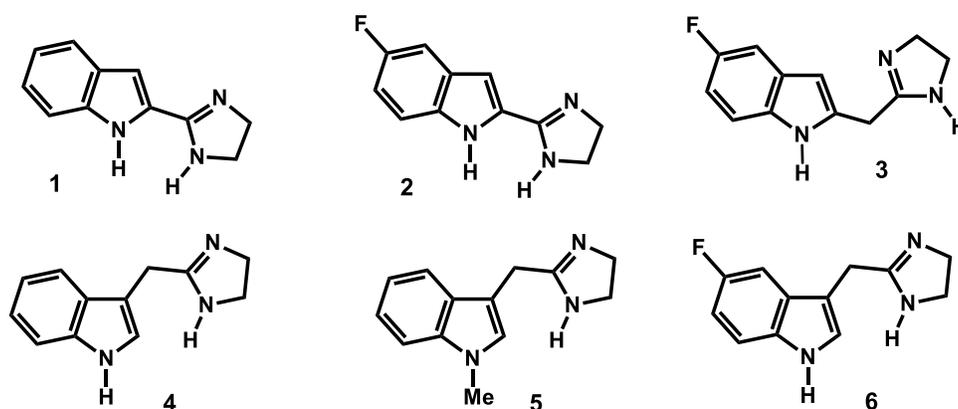
Los compuestos **1-6** fueron sintetizados a partir de derivados del ácido indol-2-carboxílico o de derivados del 3-indolilacetnitrilo por tratamiento con dietilamina. Los compuestos sintetizados fueron identificados mediante análisis físicos.

La evaluación antibacteriana *in vitro* de **1-6** mostró que el 2-imidazolinilindol, compuesto **2**, fue el más activo con una concentración inhibitoria mínima de 80 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

1.1. Abstract

In the field of heterocyclic chemistry, nitrogen-containing heterocyclic ring occupies a important place due to their various biological properties. Indole and imidazoline nucleus are considered has privileged scaffolds in medicinal chemistry, constituting an important class of therapeutic agents, including anticancer, antioxidant, antihistamine, antifungal, antiviral and antimicrobial.

The incidence of bacterial infections has increased dramatically in recent years. The widespread use of antibacterial drugs and the emergence of resistant bacterial strains to these drugs has led to serious health hazards. The bacterial resistance is a social problem that needs the development of new alternative treatments. Keeping in view the pharmacological and biological importance of the indole and imidazoline nucleus, the present study involves the synthesis of a series of imidazolylindole derivatives **1-6** with the aim to assess their *in vitro* antibacterial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria.



Compounds **1-6** were synthesized from indole-2-carboxylic acid derivatives or from 3-indolylacetonitrile derivatives by treating them with diethylamine. The synthesized compounds were identified through physical analysis.

The *in vitro* antibacterial evaluation of **1-6** showed that the 2-imidazolylindole, compound **2**, was the most active with a minimum inhibitory concentration of 80 $\mu\text{g/mL}$ against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Relación estructura-actividad

La relación estructura-actividad (SAR, del inglés Structure Activity Relationships) es la relación entre la estructura química de una molécula y su actividad biológica. Aun cuando solo una parte de la molécula puede asociarse con la actividad, pueden hacerse un gran número de modificaciones con la finalidad de modificar sus propiedades físicas, químicas, farmacológicas, entre otras. La modificación estructural de un prototipo tiene por objeto optimizar su actividad farmacológica principal, a fin de disponer de fármacos más selectivos y menos tóxicos, con mejor farmacocinética o sin problemas de formulación farmacéutica debido a su solubilidad o estabilidad inadecuadas. Una vez que se han sintetizado suficientes análogos y determinado su actividad biológica se pueden establecer conclusiones sobre las relaciones entre la estructura y su actividad biológica mediante un análisis de SAR, el cual permite la determinación de los grupos químicos responsables de producir un efecto biológico (Figura 1) (Evans, et al., 2010).

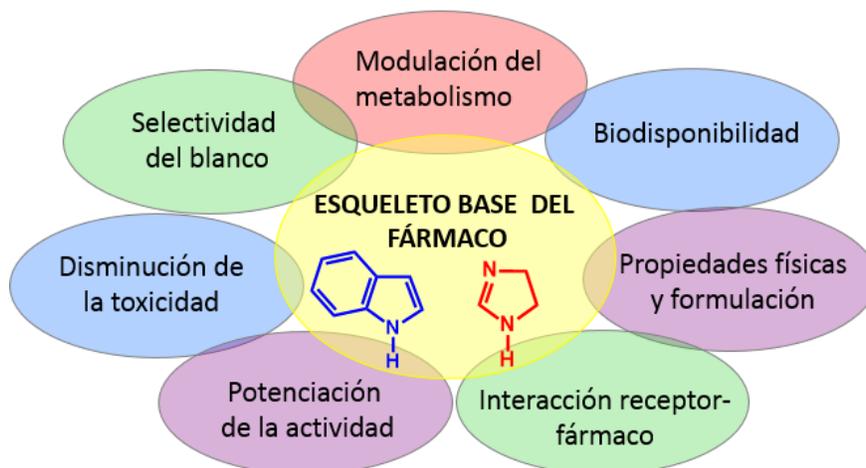


Figura 1. Relación estructura-actividad (Evans, et al., 2010)

2.2. Las bacterias

Las bacterias son los seres vivos más simples que existen en nuestro planeta se calcula que emergieron hace unos 3.6-4 billones de años, desde entonces

constituyeron la forma de vida más abundante en el planeta en términos de biomasa y número de especies. Las bacterias pueden vivir en hábitats extremos: se les encuentra en las profundidades de la Tierra, sobreviviendo gracias al lento catabolismo del carbono orgánico depositado en los sedimentos, y en las profundas fuentes hidrotermales submarinas.

Aunque existen muchos tipos de bacterias, todas comparten determinadas características básicas (Figura 2). Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas que se reproducen por fisión binaria, son extremadamente pequeñas, la mayoría tiene un diámetro que oscila entre 0.5 a 1.0 μm (Milton y Kwang-Shin, 1996). En su exterior posee una pared celular rígida compuesta por peptidoglucanos que rodea la membrana citoplasmática y cuya función es proteger a la bacteria de daño mecánico. Internamente se encuentra el citoplasma donde se encuentran todas las enzimas necesarias para división y metabolismos bacterianos, asimismo cuenta con ribosomas y un nucleoide (cuerpo nuclear). Como característica principal, las bacterias no poseen compartimientos intracelulares delimitados, por lo que carecen de membrana nuclear. Asimismo, pueden encontrarse estructuras accesorias como la cápsula, los flagelos y los pili. (García-Cortés, 2004).

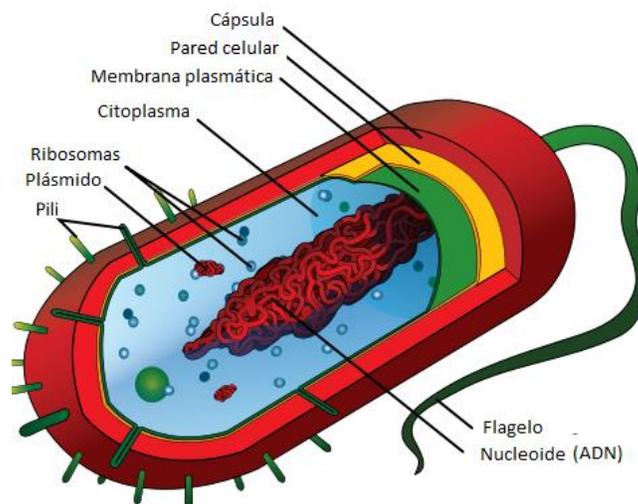


Figura 2. Estructura básica de una bacteria.

2.2.1. El rol de las bacterias en el desarrollo de los seres vivos

Las bacterias tienen un extraordinario potencial genético y metabólico; recientemente se ha reconocido la contribución decisiva que han tenido y tienen los microorganismos en la evolución y mantenimiento de todos los demás seres vivos que habitan la Tierra. La biología molecular ha demostrado que toda la vida actual, procede de antepasados comunes. Nuestro ADN proviene de las mismas moléculas que estaban presentes en las células primitivas. Cada uno de nosotros es la consecuencia de una serie de replicaciones sucesivas del ADN primigenio, que no se han interrumpido jamás (McFall-Ngai, et al., 2013).

La larga historia de la ascendencia común y alianzas entre los animales y microbios se refleja en sus genomas. El análisis del gran número de secuencias del genoma completo disponible actualmente revela que la mayoría de las formas de vida comparten aproximadamente un tercio de sus genes, incluyendo los que codifican las vías metabólicas centrales. No es de extrañar, que muchos de los genes de animales son homólogos a los genes de las bacterias, la mayoría obtenidos por descendencia, pero de vez en cuando por la transferencia de genes a partir de bacterias. Por ejemplo, el 37% de aproximadamente 23 000 genes humanos tienen homólogos en las bacterias y Archaea, y el otro 28% se originaron en eucariotas unicelulares (Figura 3) (McFall-Ngai, et al., 2013).

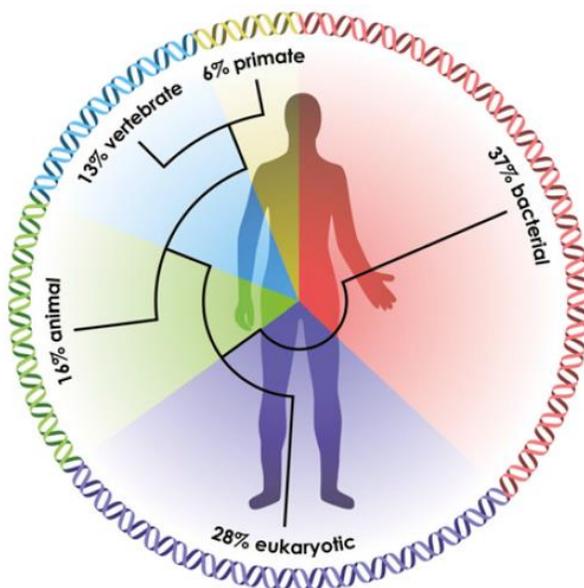


Figura 3. El ancestro del ser humano se refleja en la marca genómica. Un análisis filogenético de los genes humanos revela el porcentaje relativo del genoma que surgió en una serie de etapas en la evolución biológica (McFall-Ngai, et al., 2013).

Muchos de estos genes homólogos permiten la señalización entre los animales y las bacterias, lo que sugiere que han sido capaces de comunicarse e influenciar el desarrollo uno sobre el otro. En algunos estudios se ha encontrado que la señalización bacteriana influye en el desarrollo normal del cerebro de los mamíferos, afecta el comportamiento reproductivo en vertebrados e invertebrados, y activa el sistema inmunológico de las moscas tsetsé. Los químicos olfativos que atraen a algunos animales (incluidos los seres humanos) a sus posibles parejas también son producidos por bacterias que residen en los animales (McFall-Ngai, et al., 2013).

La señalización bacteriana no sólo es esencial para el desarrollo, sino que también ayuda a los animales a mantener la homeostasis. En algunas investigaciones se ha mostrado que las bacterias en el intestino pueden comunicarse con el cerebro a través del sistema nervioso central. Se ha visto que los ratones sin ciertas bacterias tienen defectos en las regiones del cerebro que controlan la ansiedad y el comportamiento similar a la depresión. La señalización bacteriana también juega un papel esencial en la vigilancia del sistema inmunológico de un animal. Perturbar estas vías de señalización bacteriana puede conducir a enfermedades como la diabetes, la enfermedad inflamatoria intestinal y las infecciones. Los estudios también sugieren que muchos de los patógenos que causan enfermedades en los animales han “secuestrado” estos canales de comunicación bacteriana que originalmente se desarrollaron para mantener un equilibrio entre el animal y cientos de especies de bacterias beneficiosas (McFall-Ngai, et al., 2013).

En resumen, los estudios recientes han demostrado que los animales y las bacterias dependen unos de otros para su propia salud y bienestar, así como la de su entorno. Y que esta variedad de asociaciones entre organismos (o simbiosis, en su sentido etimológico de “vida juntos”) va desde las beneficiosas, o mutualistas, hasta las perjudiciales, o parásitas, a través de un extenso abanico de relaciones posibles (Fraune, 2010; Frey-Klett, 2011).

2.3. Aspectos generales de los antibióticos

Cuando las defensas normales del cuerpo no pueden evitar o vencer una enfermedad infecciosa, esta suele tratarse con quimioterapia antimicrobiana. Los antibióticos constituyeron uno de los descubrimientos más importantes de la medicina moderna. Poco podía hacer la medicina para tratar enfermedades como la fiebre tifoidea, la tuberculosis y el denominado “envenenamiento de la sangre”, cuadro en el que las bacterias proliferaban de modo descontrolado en el torrente sanguíneo (Tortora, et al., 2007).

Así los antibióticos se desarrollan ante la necesidad de controlar las enfermedades infecciosas. Los antimicrobianos o popularmente conocidos como antibióticos son sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas, que a concentraciones bajas, inhiben el crecimiento o provocan la muerte de las bacterias.

El primer agente con actividad antimicrobiana fue descubierto por el médico y bacteriólogo alemán Paul Ehrlich, quien tras probar varios productos encontró un derivado arsenical, el producto 606 comercializado en 1910 como Salvarsán, que poseía una acción específica para poder ser utilizado en el tratamiento de la sífilis, dando lugar así, al nacimiento de la quimioterapia antimicrobiana (Aminov, 2010).

El médico microbiólogo escocés Alexander Fleming, en 1928 observó que el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* era inhibido en la zona que era rodeada con la colonia de un hongo filamentoso que había contaminado la placa Petri. El hongo se identificó como *Penicillium notatum* y su componente activo, que fue aislado poco tiempo después, se denominó penicilina dando lugar así al nacimiento de la antibioterapia (Tortora, et al., 2007; Aminov, 2010).

2.3.1. Clasificación y mecanismo de acción de los antibióticos

Las clasificaciones que más se utilizan son las que se basan en la acción del antibiótico sobre la bacteria, las que los clasifica según su mecanismo de acción y las que los agrupan según su estructura química.

Según el efecto que ejerzan sobre la bacteria pueden ser (Tabla 1):

- a) Bacteriostáticos: aquéllos que inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento.
- b) Bactericidas: poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción terapéutica es irreversible.

Estas designaciones de bacteriostático o bactericida pueden variar según el tipo de microorganismo: la penicilina G suele ser bactericida para cocos Gram positivos, pero sólo es bacteriostática contra enterococos (Cordés, et al., 1998).

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos según su efecto bacteriano

Bactericidas	Bacteriostáticos
Penicilinas	Tetraciclinas
Cefalosporinas	Eritromicina
Aminoglucósidos	Sulfonamida
Rifampicina	Novobiocina
Quinolonas	Cloranfenicol
Polimixinas	

Para conseguir destruir o inhibir a los microorganismos, los antibióticos deben atravesar la barrera superficial de la bacteria y después fijarse sobre su diana, es decir, sobre alguna de las estructuras o moléculas clave de mecanismos bioquímicos que le son necesarios para multiplicarse o para sobrevivir. Los mecanismos de acción de los antibióticos son diversos y a veces múltiples (Calvo, et al., 2009), por lo cual los antibióticos se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción de la siguiente manera (Figura 4):

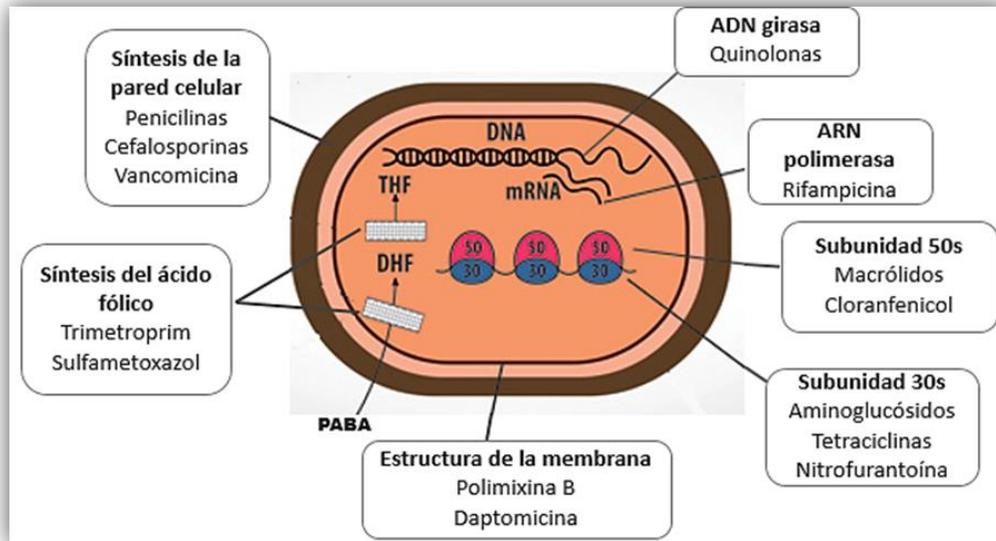


Figura 4. Mecanismo de acción de los antibióticos (Neu, et al., 1996).

1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana

La pared celular bacteriana es una estructura esencial responsable de la forma de la célula. Además, la pared celular impide la lisis celular debido a la alta presión osmótica citoplasmática y permite el anclaje de componentes de la membrana y de las proteínas extracelulares, tales como las adhesinas. En los organismos Gram positivos el componente principal de la pared celular es un polímero denominado peptidoglucano, presente en múltiples capas. Las bacterias Gram negativas, presentan una membrana externa, compuesta principalmente por lipopolisacáridos (LPS), la cual se superpone a una capa delgada de peptidoglucanos (Guilhelmelli, et al., 2013). La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano (Calvo, et al., 2009).

La síntesis de la pared celular se desarrolla en tres etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos. En la primera etapa que ocurre en el citoplasma se sintetiza el precursor del peptidoglucano, el difosfato de uridina (UDP)-acetilmuramilo-pentapéptido. En la segunda etapa, el UDP-N-

acetilmuramilo-pentapéptido y la *N*-acetilglucosamina se unen para formar un largo polímero que es transportado a través de la membrana citoplasmática y se unen al punto de crecimiento de la pared bacteriana. Esta fase es inhibida por antibióticos como la vancomicina y la bacitracina. Y finalmente la tercera etapa consiste en completar los enlaces cruzados, cosa que se obtiene por medio de las peptidoglucano glucosiltransferasas, esta etapa también es conocida como reacción de transpeptidación y es inhibida por las penicilinas y las cefalosporinas (Figura 5) (MacDougall, et al., 2012).

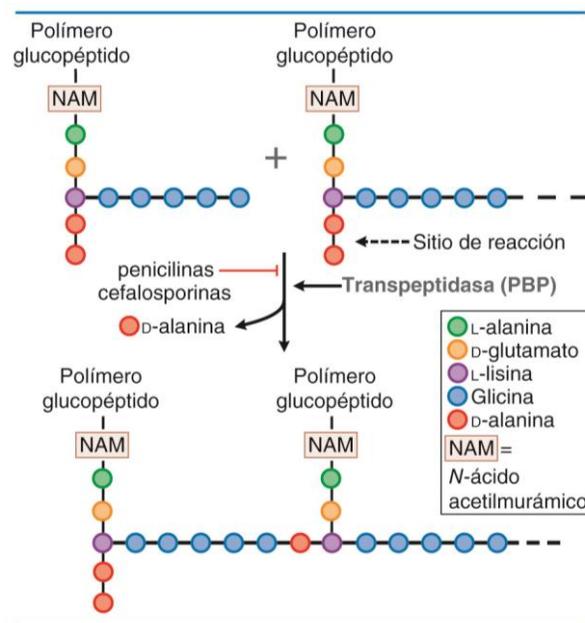


Figura 5. Acción de los antibióticos penicilina y cefalosporina (MacDougall, et al., 2012).

2. Antibióticos inhibidores de la síntesis proteica

La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos, en donde se inhibe la traducción del material genético y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S), que contienen ARN ribosómico y diversas proteínas (Calvo, et al., 2009).

Dentro de esta clasificación se encuentran los aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol. Los aminoglucósidos que actúan uniéndose específicamente y de forma irreversible a un receptor proteico de la subunidad 30S de los ribosomas interfiriendo así con el inicio de la síntesis proteica al causar una lectura errónea y una terminación prematura de la traducción del ARN mensajero (Figura 6). Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas al unirse al ribosoma bacteriano 30S bloqueando la fijación del aminoacil-tARN al sitio A parando la síntesis de proteínas. El cloranfenicol, este antibiótico se une a la subunidad ribosómica 50S en el sitio de la peptidiltransferasa enzima que une a los aminoácidos en la cadena de polipéptido en crecimiento es decir, congela el proceso de elongación de la cadena (MacDougall, et al., 2012).

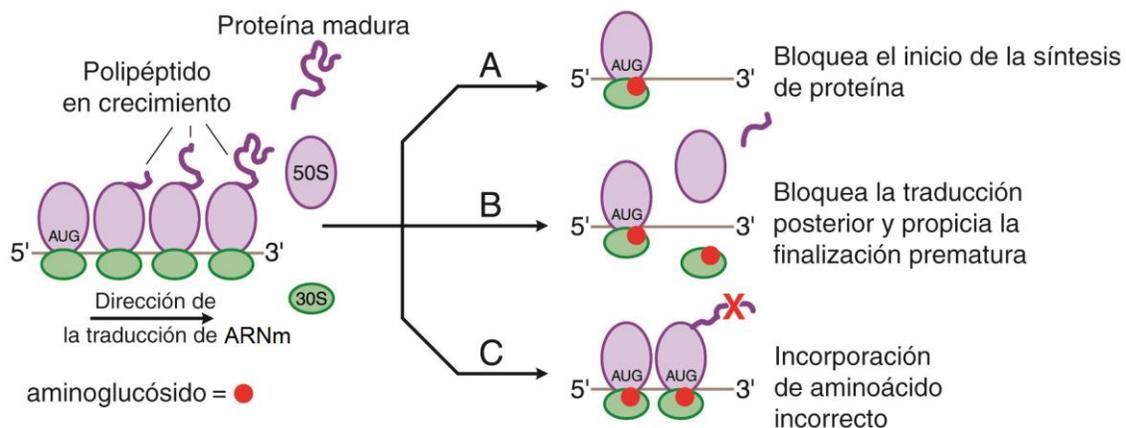


Figura 6. Efectos de los aminoglucósidos sobre la síntesis de proteínas (MacDougall, et al., 2012).

3. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

El genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir del molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formará parte de los ribosomas bacterianos. La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide, para transmitir esta información a la descendencia. La replicación y transcripción del ADN se realiza en varias fases con la

participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos.

Dentro de este grupo se incluyen las rifamicinas y las quinolonas que actúan en enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación (Figura 7), y los nitroimidazoles y nitrofuranos que actúan directamente sobre el ADN, dañándolo. Por lo general, los antibióticos de este grupo no son particularmente selectivos en su acción y poseen cierta toxicidad para las células eucarióticas. La mayoría de los antibióticos que actúan sobre el ADN son bactericidas rápidos y normalmente independientes del inóculo y de la fase de crecimiento bacteriano (Calvo, et al., 2009).

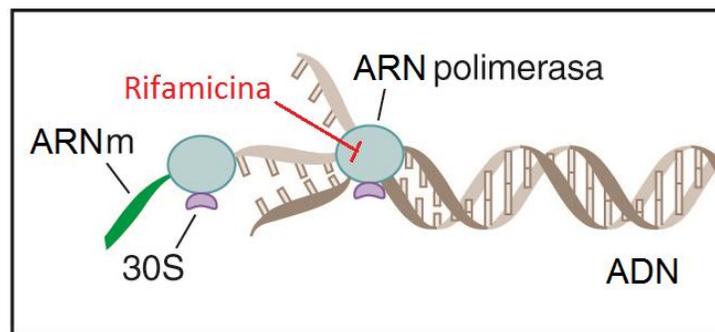


Figura 7. Inhibición de la síntesis de ARN por rifamicina al actuar en la ARN polimerasa (MacDougall, et al., 2012).

4. Agentes que alteran la estructura de la membrana

La membrana citoplásmica es vital para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo, y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal (Calvo, et al., 2009).

Los antimicrobianos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas, incluso en bacterias en reposo, y pueden tener alta toxicidad sobre las células humanas, al compartir algunos componentes de la membrana citoplásmica. A este grupo pertenecen las polimixinas las cuales interactúan en

forma potente con los fosfolípidos y rompen la estructura de las membranas celulares. Varios antibióticos, conocidos colectivamente como ionóforos, interfieren con el transporte de cationes en la membrana celular, esos incluyen al antibiótico tóxico gramicidina A. (MacDougall, et al., 2012).

5. *Bloqueadores de la síntesis de ácido fólico*

A diferencia de las células eucariotas, algunas bacterias requieren llevar a cabo la síntesis de folatos ya que son incapaces de obtenerlas del medio. La síntesis del ácido tetrahidrofólico se obtiene a partir de una molécula de pteridina y de ácido para-aminobenzoico (PABA), y mediante la acción de la enzima dihidropteroato sintetasa se forma el ácido dihidropteroico. Posteriormente, por adición de ácido glutámico y acción de la enzima dihidrofolato sintetasa se forma el ácido dihidrofólico (ácido fólico), que reducido por la hidrofolato reductasa forma el ácido tetrahidrofólico (ácido folínico), el cual participa como transportador de átomos de carbono, en concreto de los grupos formilo, los cuales son necesarios para la síntesis de las bases púricas y pirimídicas de los nucleótidos presentes en las estructuras del ADN y el ARN (MacDougall, et al., 2012).

Tanto las sulfonamidas como el trimetoprim interfieren con el metabolismo del folato (Figura 8). Las sulfonamidas son análogos del PABA y por lo tanto son inhibidores competitivos de la enzima dihidropteroato sintetasa impidiendo la formación del ácido dihidropteroico precursor inmediato del ácido fólico. El trimetoprim impide la reducción del dihidrofolato para formar tetrahidrofolato (Neu, et al., 1996).

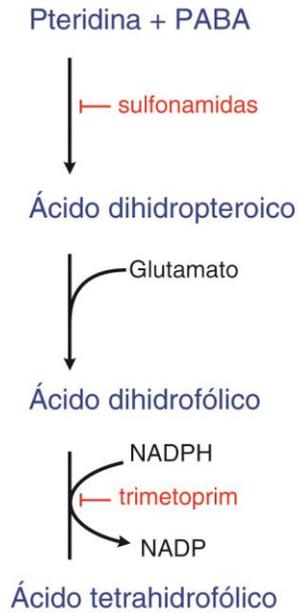


Figura 8. Pasos en el metabolismo del folato que son bloqueados por las sulfonamidas y el trimetoprim (MacDougall, et al., 2012).

2.4. Resistencia a los antibióticos

Las infecciones han sido la principal causa de enfermedad a lo largo de la historia de la población humana, con altos niveles de morbilidad y mortalidad. Con la introducción de los antibióticos, se pensó que este problema desaparecería, los antimicrobianos se consideraron curas milagrosas. Sin embargo, las bacterias han demostrado tener una gran flexibilidad y una extraordinaria capacidad de adaptación, de tal forma que poco después del descubrimiento de la penicilina apareció en forma rápida la resistencia, lo que ponía fin al milagro (Rodríguez-Rojas, et al., 2013).

Esta situación grave persiste con cada antimicrobiano y amenaza con terminar con la época de los antimicrobianos. En la actualidad cualquier clase importante de antibióticos se acompaña de una notable aparición de resistencia. Dos factores importantes se vinculan con este fenómeno: evolución y prácticas clínicas y ambientales. Una especie sometida a presiones químicas o de otro tipo que amenazan con su extinción, suele desarrollar mecanismos para sobrevivir bajo tal tensión excesiva. Los patógenos evolucionarán para presentar resistencia a la

“guerra química” a la que están sometidos. Esta evolución se facilita con prácticas terapéuticas inadecuadas realizadas por el personal de atención de la salud, así como por el uso indiscriminado que se le ha dado a los antibióticos (Furuya, et al., 2006).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia a los antibióticos se define como el fenómeno por el cual el microorganismo deja de verse afectado por el antibiótico al que anteriormente era sensible. La resistencia bacteriana impide que los antibióticos ejerzan su mecanismo de acción y esta resistencia se produce ya sea por mutaciones (mutaciones puntuales, deleciones, inversiones, inserciones, etc. dentro del genoma bacteriano) o por transferencia horizontal de genes.

Para cada clase de antibióticos por lo general hay una serie de mecanismos que pueden causar resistencia. Estos mecanismos también pueden diferir dependiendo de las especies bacterianas y su composición genética. Los principales mecanismos de resistencia incluyen (Figura 9): (i) disminución de la absorción de la droga (por ejemplo, las mutaciones en porinas), (ii) incremento de las exportaciones (por ejemplo mayor expresión de bombas reguladoras de eflujo), (iii) la inactivación o modificación del blanco del fármaco (mutaciones en las proteínas ribosomales, en las proteínas de unión a penicilina, la metilación o mutación del ARN ribosomal, etc.), (iv) la hidrólisis del antibiótico (β -lactamasas), (v) modificación del antibiótico (p. ej. enzimas que modifican a los aminoglucósidos) (Normark, et al., 2002; Rodríguez-Rojas, et al., 2013).

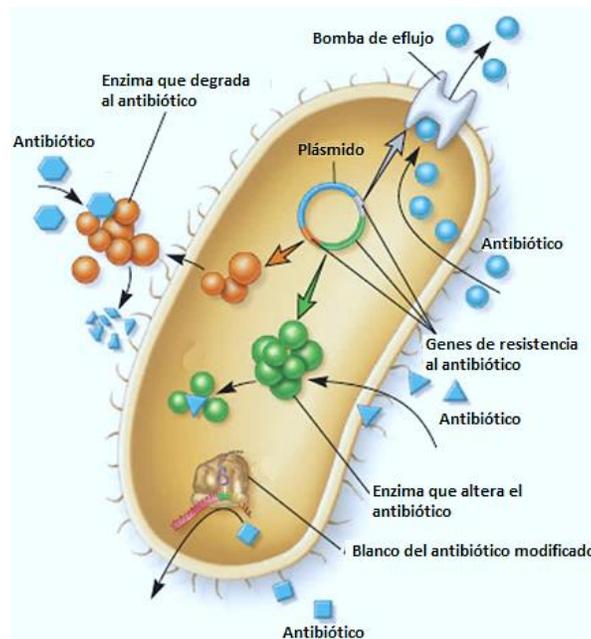


Figura 9. Mecanismos de resistencia bacteriana (Kenneth, 2011)

La mayoría de los genomas de bacterias que se han secuenciado contiene una gran proporción de ADN relativamente de reciente adquisición de otras fuentes. Este ADN adquirido horizontalmente usualmente codifica funciones que son de ventaja selectiva para el organismo tales como resistencia a los antibióticos, la virulencia y vías de biodegradación, los genes pueden contener mutaciones individuales o secuencias con cambios más severos. Los genes de resistencia a los antibióticos pueden ser transferidos por conjugación, transformación o transducción (Figura 10) (Normark, et al., 2002; Giedraitienė, 2011).

La resistencia adquirida por transferencia horizontal se disemina en forma rápida y amplia. Esta transferencia es facilitada en gran medida por elementos genéticos móviles y depende mucho de ellos, dichos elementos son, entre otros, los plásmidos y los fagos transductores. También participan en los procesos otros elementos móviles como los transposones, los integrones y los casetes génicos.

La *transducción* es la adquisición de ADN bacteriano de un fago (virus que se propaga dentro de las bacterias) que tiene ADN incorporado dentro de su cubierta proteínica externa, proveniente de una bacteria hospedera previa. Si el ADN incluye un gen de resistencia a fármacos, la célula bacteriana recién infectada

puede adquirir resistencia. La transducción es en particular importante para la transferencia de resistencia a antibióticos en varias cepas de *S. aureus*. La *transformación* es la captación e incorporación dentro del genoma de la célula receptora, por recombinación homóloga, de ADN libre liberado en el entorno por otras bacterias. La transformación es la base molecular de resistencia a penicilina en *neumococos* y *Neisseria*. La *conjugación*, como denota su nombre, es la transferencia de genes por contacto directo intercelular a través de pilosidades sexuales o puentes. Este mecanismo complejo y fascinante para la propagación de resistencia a antibióticos es de extraordinaria importancia porque en un solo episodio se pueden transferir genes de resistencia múltiple (Figura 10) (MacDougall, et al., 2012; Furuya, et al., 2006).

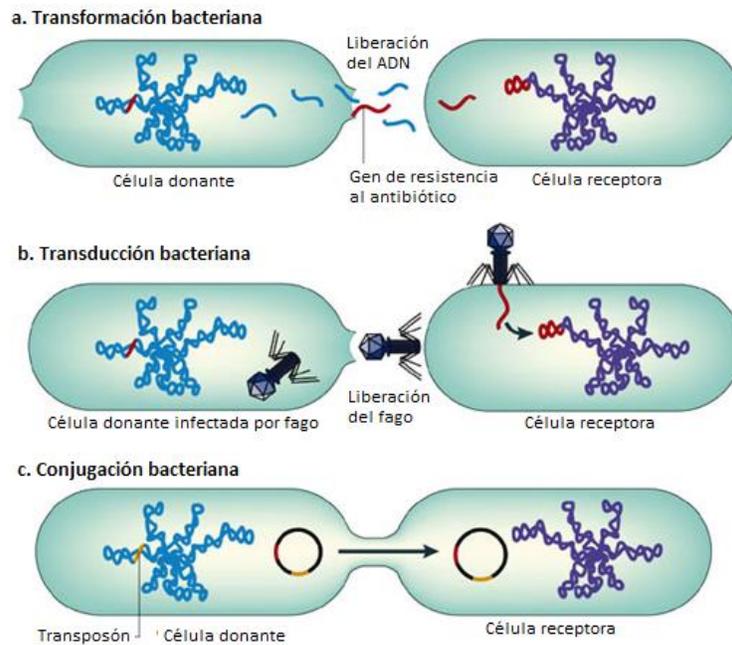


Figura 10. Transferencia horizontal de genes entre bacterias (Furuya et. al., 2006).

2.5. El núcleo indol como agente antibacteriano

El indol es un importante sistema heterocíclico que se encuentra en muchos productos naturales como el triptófano, un aminoácido esencial en la síntesis de neurotransmisores como la serotonina. El indol es además la base de fármacos como la indometacina y provee el esqueleto alcaloide indólico de compuestos

biológicamente activos en las plantas. El núcleo de indol y sus derivados tiene un amplio espectro de actividades biológicas entre ellas: antiinflamatorio, antihipertensivo, antihistamínico, antioxidante, antidiabético, anticancerígeno, anticonvulsivante, fotoquimioterapéutico, antiviral, antifúngico y antibacterial (Sharma, et al., 2010; Al-Qawasmeh, et al., 2013).

Dentro de los estudios enfocados a modificar y revertir la resistencia a antibióticos de las bacterias destacan aquellos en donde el mecanismo de resistencia es generado por bombas de eflujo que expulsan el antibiótico del citoplasma de la célula sin permitir una acción antibacteriana, ya que los niveles intracelulares del antibiótico se mantienen por debajo de una concentración letal. En este aspecto se ha encontrado que moléculas pequeñas como los indoles pueden inhibir la resistencia a los fármacos que proporciona la bomba de eflujo NorA en *S. aureus* (Bremmer, 2007). Por otro lado, se han sintetizado indoles como el 3-(4-trifluorometil-2-nitrofenil)indol (Figura 11) que exhibe una buena actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* (Sharma, et al., 2010).

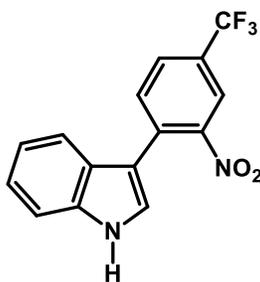


Figura 11. Estructura del 3-(4-trifluorometil-2-nitrofenil)indol

2.6. La imidazolina como agente antibacteriano

La imidazolina es un sistema heterocíclico que también ha mostrado una amplia variedad de actividades biológicas y muchas de ellas han ganado una gran aceptación en la clínica. Algunos de los agentes α -simpaticomiméticos más activos contienen el motivo imidazolina como un farmacóforo, como la nafazolina y metazolina, que son principalmente usados como preparaciones oftalmológicas y como descongestionantes nasales. Entre los bloqueadores α -adrenérgicos la

clonidina se ha utilizado como un efectivo agente antihipertensivo. Análogos de la imidazolina como la antazolina se encuentra en los antihistamínicos y la cirazolina que se utiliza para inhibir la vasoconstricción por la entrada de calcio (Shanmugasundaram, et al., 2009).

Dentro de las imidazolinas como agentes antibacterianos se encuentra el 1-(fenoximetil)-2-fenil-4,5-dihidro-1*H*-imidazol. Este compuesto posee una buena actividad antibacteriana contra las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* y sobre las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Shanmugasundaram, et al., 2009). Otro ejemplo lo constituyen los compuestos 2-amilamino-2-imidazolina (Figura 12) que exhiben una actividad contra *S. aureus*, con una CIM de 64 µg/mL (Servi, et al., 2005).

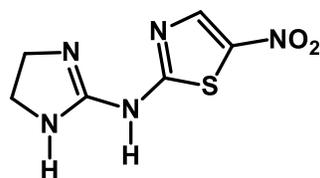


Figura 12. Estructura de una 2-amilamino-2-imidazolina.

2.7. El motivo imidazolinilindol y su actividad antibacteriana

A pesar de que se ha visto que compuestos en los cuales el indol se encuentra sustituido por otro anillo heterocíclico poseen propiedades biológicas notables, son pocos los trabajos en donde se han sintetizado compuestos que posean el motivo de imidazolina como sustituyente en el sistema indólico y que hayan sido analizados como posibles antibacterianos. Tal es el caso de indolimidazolinas que presentan actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* (Branstrom, et al., 2013) y derivados de bis-imidazolinilindoles (Figura 13) que han presentado actividad contra *S. aureus* y *Bacillus anthracis* (Panchal, et al., 2009).

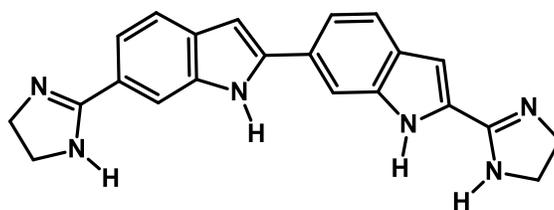


Figura 13. Estructura de bis-imidazolinilindoles.

2.8. La importancia del flúor en los agentes antibacterianos

Numerosos estudios han demostrado que la introducción selectiva de flúor en compuestos farmacológicamente activos conduce a una actividad mejorada. Ejemplo de esto son los antibióticos como el ciprofloxacino y el levofloxacino (Figura 14) que pertenecen al grupo de las fluoroquinolonas, antibióticos de amplio espectro que se caracterizan por tener un grupo flúor en el anillo central.

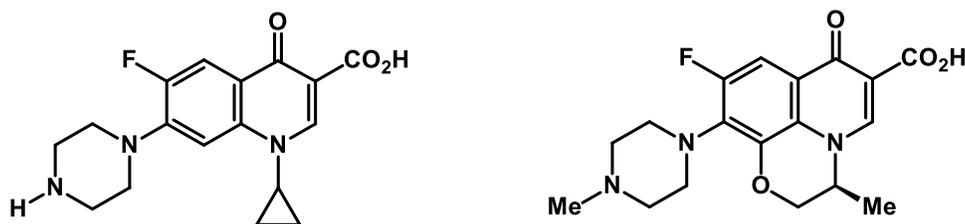


Figura 14. Estructura de ciprofloxacino (izquierda) y levofloxacino (derecha).

La sustitución isostérica de hidrógeno por flúor en compuestos organofluorados puede aumentar la lipofilia y por lo tanto mejorar la tasa de penetración celular, que es una característica muy importante en la administración de fármacos. La gran polarizabilidad debida al enlace C-F puede ofrecer nuevas posibilidades de la unión al receptor y la sustitución de flúor también puede influir en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la molécula (Limban, et al., 2011).

2.9. Microorganismos de interés para los ensayos de actividad antibacteriana

La incidencia de las infecciones bacterianas ha incrementado dramáticamente en años recientes. No todas las especies tienen el mismo grado de importancia a la hora de evaluar el peso de su resistencia, las más preocupantes son *Enterobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. y *Escherichia coli* (García-Sánchez, et al., 2012). Dentro de estas especies bacterianas, son de particular interés *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *P. aeruginosa* debido a la prevalencia de sus infecciones en México.

2.9.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, y es uno de los principales patógenos resistentes a los antibióticos (Figura 15). Es una bacteria capaz de sobrevivir en condiciones adversas, extremadamente adaptable a la presión antibiótica, coloniza fácilmente las superficies cutáneas e invade los tejidos, por lo que los cuadros clínicos que podemos encontrar más frecuentemente ocasionados por este microorganismo son infecciones de piel, abscesos cutáneos y tejidos blandos, osteomielitis, artritis, neumonía y sepsis.

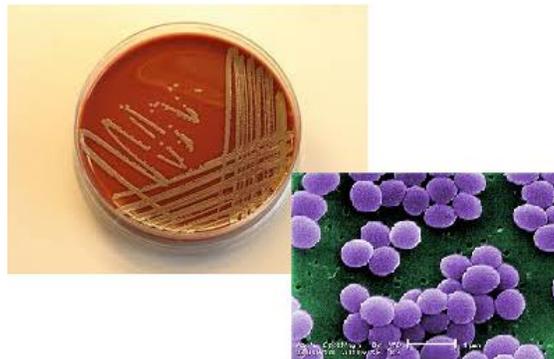


Figura 15. *Staphylococcus aureus* en agar (izquierda) y tinción de Gram (derecha).

El pronóstico de las infecciones por *S. aureus* cambió sustancialmente con la introducción de la penicilina, pero pronto se aislaron cepas productoras de penicilinasas; la transmisión de plásmidos que conferían esta resistencia favoreció la propagación, siendo actualmente más del 90% de las cepas, tanto extra como intrahospitalarias, resistentes a este antibiótico. La aparición de la meticilina y otras penicilinas y cefalosporinas resistentes a penicilinasas, pareció resolver el problema un tiempo, pero pronto empezaron a aparecer cepas meticilina-resistentes (Pahissa, et al., 2009).

La amplia distribución de *S. aureus* así como la posibilidad de desencadenar infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad y su extremada virulencia explica su relevancia como patógeno a nivel mundial. *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) es, en general elevada, aunque hay diferencias entre países, por ejemplo entre Grecia, Reino Unido, Bélgica e Irlanda (con porcentajes de resistencia próximos al 40%) con respecto a los países del norte de Europa, donde la resistencia es inferior al 3%, presentando incluso tasas del 0.6% en Suecia. En Estados Unidos, el SARM es el patógeno hospitalario resistente a los antibióticos más frecuente, y su prevalencia en algunas unidades de cuidados intensivos es superior al 60%. En México, la información sobre la magnitud del problema se ha centrado en reportes de centros hospitalarios de tercer nivel. La frecuencia de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina es elevada entre 50-85% (Miranda, 2011).

2.9.2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes (Figura 16) es una bacteria Gram-positiva anaerobia facultativa, intracelular, que puede causar infecciones invasivas muy graves en el hombre y los animales y sobrevivir sin dificultad en medios inanimados, adaptándose rápida y eficazmente a cambios extremos en las condiciones ambientales, lo que explica su gran capacidad para la transmisión (Gray, et al. 2006).

Los principales reservorios de *L. monocytogenes* son el suelo, el forraje, el agua, los silos y el tracto gastrointestinal de aves, peces y mamíferos incluyendo el

hombre. La infección se adquiere generalmente mediante la ingesta de alimentos contaminados, aunque no siempre puede identificarse la fuente. La mayoría de los casos se asocian a la ingestión de carne, pescado y vegetales crudos y lácteos no pasteurizados; también se han descrito brotes con distintas preparaciones de quesos, embutidos, patés, helados y, en general, productos refrigerados, sin requerimientos de cocción o calentamiento previo al consumo (Swaminathan, et al., 2007).



Figura 16. *Listeria monocytogenes*.

Existen siete especies de *Listeria*, pero sólo *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* se consideran patógenas, siendo esta última la de mayor importancia en salud pública. La prevalencia en la población general, en materia fecal, es de 5-14%. *L. monocytogenes* se ha asociado a infecciones perinatales con una tasa de 9 por cada 100 000 nacimientos y una mortalidad de 20-40%, en adultos representa una condición rara pero generalmente severa, que suele presentarse en personas inmunocomprometidas, con presentación inicial a nivel gastrointestinal y con posterior diseminación a sistema nervioso central, bacteriemia, endocarditis o sepsis de origen desconocido. Se ha reportado una incidencia anual de 0.2 y 0.8 casos por 100 000 en Europa y en población general de Estados Unidos, respectivamente; en México son escasos los datos epidemiológicos (Espinoza-Gómez, et al., 2006).

2.9.3. *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo anaerobio facultativo fermentador de lactosa y glucosa, reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram negativo) y ha sido estudiado porque es la bacteria más común que infecta el tracto urinario. El tratamiento es usualmente empírico, los mecanismos de resistencia son variados, y la resistencia a múltiples antibióticos es un problema (Figura 17).



Figura 17. *E. coli*

En América Latina, *E. coli* es responsable por una alta prevalencia de infecciones del torrente sanguíneo y neumonía, es la causa de la enfermedad diarreica aguda, además de las infecciones del tracto urinario. En las regiones de Asia y el Pacífico, las infecciones del tracto urinario por *E. coli* presentan una alta resistencia a los antimicrobianos (Murillo-Llanes, et al., 2012).

A nivel mundial se ha indicado una resistencia a los antibióticos para *E. coli* desde 6.8 a 91%, con un promedio general de 52.9%. En América Latina, la resistencia a la trimetoprima-sulfametoxazol (TMS) es de un poco más del 40%. En México algunos informes marcan una resistencia a TMS menor del 60%, aunque en un estudio realizado por Murillo-Llanes y colaboradores (Murillo-Llanes, et al., 2012) marcan valores de resistencia del 70%, además de que *E. coli* presenta una gran resistencia para las fluoroquinolonas, con valores del 85%.

2.9.4. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo aerobio, considerado un patógeno oportunista. Es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno. Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en el intervalo de temperatura de 4 a 42°C (Figura 18). Estas características le permiten sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias. Lo anterior favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. *P. aeruginosa* puede causar neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, debido a las infecciones crónicas que eventualmente conducen a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria. Las infecciones por *P. aeruginosa* son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca (por la expresión constitutiva de β -lactamasas y bombas de eflujo, combinado con una baja permeabilidad de la membrana), además de su capacidad para adquirir genes de resistencia a los antibióticos (ejemplo, genes para enzimas que inactivan aminoglucósidos o modifican su diana) (Mesaros, et al., 2007; Ochoa, et al., 2013).

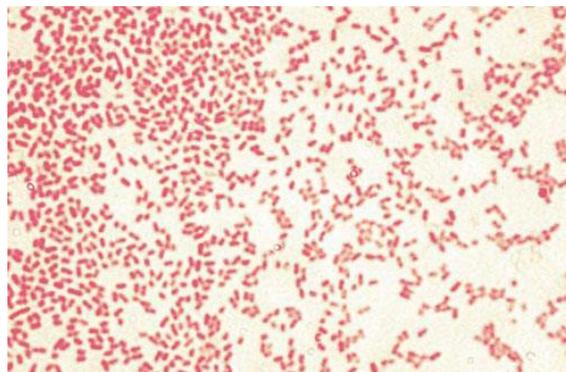


Figura 18. *P. aeruginosa* tinción de Gram.

P. aeruginosa es la causante del 10% al 20% de bacteriemias por Gram negativos en pacientes con tratamiento antimicrobiano inadecuado o bien con infecciones de origen respiratorio, se ha visto que produce una mortalidad del 30% al 40%, sobre todo en las primeras 24-48 horas de su inicio (Casal, et al., 2012).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia de las infecciones bacterianas ha incrementado dramáticamente en los últimos años. El aumento de la resistencia a múltiples fármacos ha llevado a un renovado interés en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. No es de extrañar que las especies patógenas hayan adoptado mecanismos de supervivencia a los medicamentos antimicrobianos existentes. El aumento en la incidencia de la resistencia bacteriana a gran número de agentes antibacterianos tales como glicopéptidos, sulfonamidas, β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos se está convirtiendo en una preocupación importante.

El indol y la imidazolina son sistemas heterocíclicos de gran importancia debido a que poseen un amplio espectro de actividades biológicas. Sin embargo, son pocos los trabajos en donde se han sintetizados compuestos que contengan los motivos de imidazolina e indol y que hayan sido analizados como posibles antibacterianos.

Por lo anterior, el diseño y la síntesis de compuestos nuevos tipo imidazolinilindol que ayuden a combatir infecciones bacterianas tendría un gran impacto sobre la salud. Este tipo de compuestos son particularmente interesantes, ya que a pesar de su actividad antibacteriana demostrada contra *E. coli* y *S. aureus*, son pocos los estudios que se han realizado a la fecha enfocados a su evaluación como antibacterianos.

4. HIPÓTESIS

Las modificaciones estructurales sistemáticas realizadas en el esqueleto base imidazolinilindol proporcionarán información relevante sobre los requerimientos estructurales necesarios para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos con actividad antibacteriana.

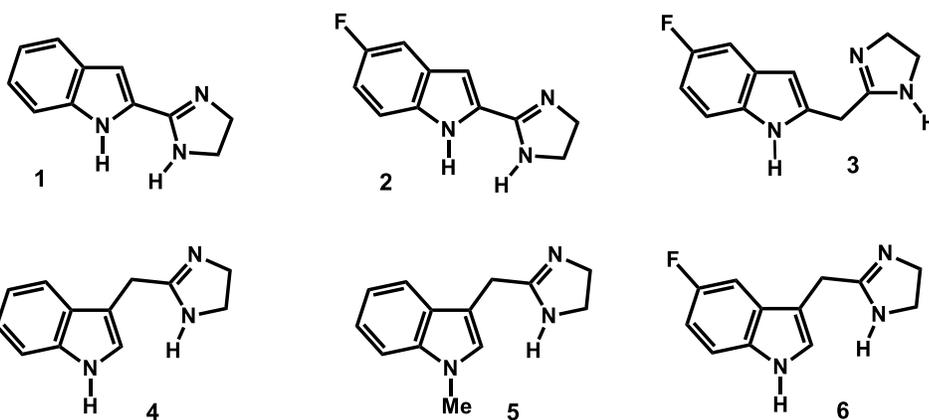
5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Sintetizar una serie de derivados de imidazolinilindoles cuyas modificaciones estructurales consistan en la variación de la posición del anillo de imidazolina con respecto al indol, la inserción de un metileno entre ambos heterociclos, así como la sustitución por un átomo de flúor o un grupo metilo en el indol, con el fin de relacionar el efecto que ejercen dichas modificaciones estructurales sobre la actividad antibacteriana.

5.2. Objetivos particulares

1. Sintetizar los imidazolinilindoles **1-6**.



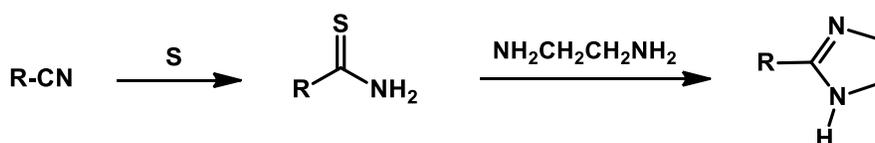
2. Llevar a cabo la caracterización de los compuestos sintetizados por medio de RMN ^1H , RMN ^{13}C , IR, y espectrometría de masa.
3. Determinar *in vitro* la capacidad inhibitoria de los imidazolinilindoles sintetizados en el crecimiento de las siguientes especies bacterianas:
 - a) *Staphylococcus aureus*
 - b) *Listeria monocytogenes*
 - c) *Escherichia coli*
 - d) *Pseudomonas aeruginosa*

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Síntesis de imidazolinilindoles 1-6

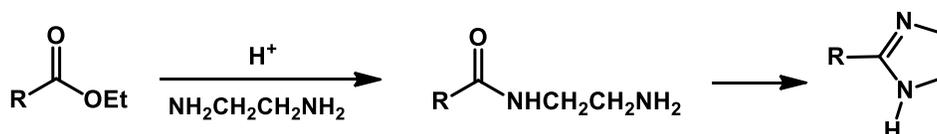
De manera general los imidazolinilindoles considerados en el presente trabajo, fueron preparados usando como sustrato precursor un indol sustituido por un grupo nitrilo (Esquema 1, Ruta A) o alternativamente un indol sustituido por un grupo éster (Esquema 2, Ruta B).

En la ruta A, la transformación del grupo nitrilo en el anillo imidazoliníco se lleva a cabo por tratamiento con azufre, lo que genera un intermediario electrófilo tioamida que es susceptible de ser atacado *in situ* por etilendiamina para formar una imina. La ciclización intramolecular del intermediario imina conduce al anillo heterocíclico (Domínguez-Mendoza, 2012).



Esquema 1. Formación del anillo de imidazolina catalizada por azufre a partir de nitrilos.

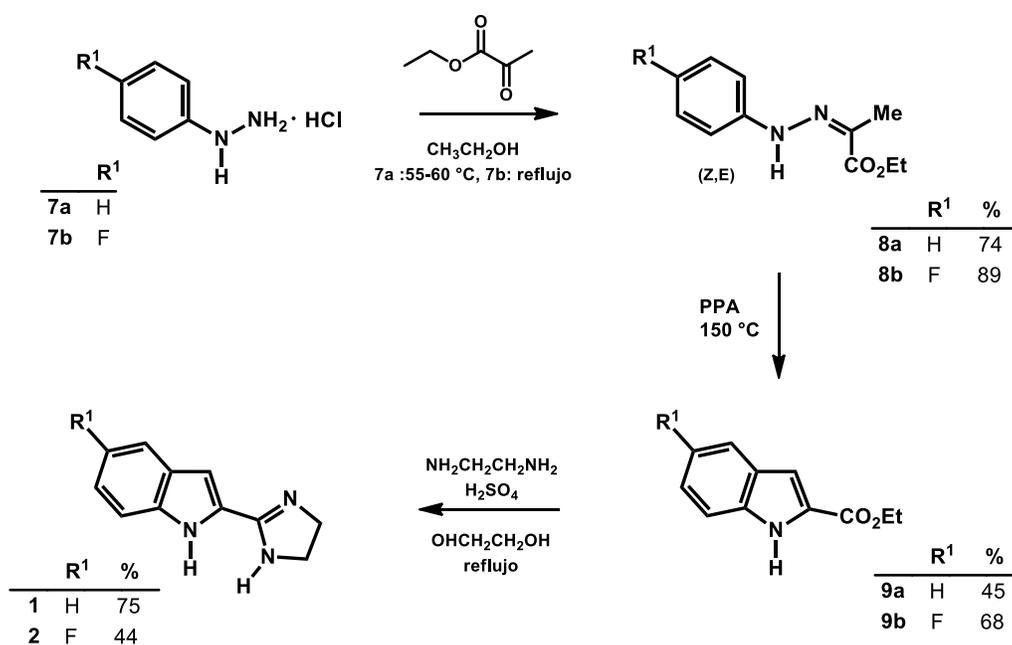
En la ruta B, la formación de la imidazolina a partir de un éster (Esquema 2) se lleva a cabo por sustitución nucleofílica en el grupo acilo inducida por reacción con etilendiamina en medio ácido para dar una amida. La ciclización intramolecular del intermediario amida genera el anillo heterocíclico (Dubey, et al., 2007)



Esquema 2. Formación del anillo de imidazolina a partir de ésteres.

6.2. Síntesis del 2-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-indol [1] y del 2-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)-5-fluoro-1*H*-indol [2]

La síntesis de los imidazolinilindoles **1** y **2**, se llevó a cabo en una secuencia de tres reacciones a partir de los clorhidratos de fenilhidrazina **7a** y 4-fluorofenilhidrazina **7b** respectivamente. El primer paso involucró la formación de las fenilhidrazonas **8a** u **8b**, mediante un proceso de adición-eliminación entre la fenilhidrazina correspondiente con piruvato de etilo en metanol, obteniéndose **8a** u **8b** como una mezcla de sus isómeros geométricos *cis*, *trans*. El siguiente paso fue la formación de los ésteres indólicos **9a** y **9b**, mediante la síntesis de indoles de Fischer. Así, el calentamiento de la fenilhidrazona **8a** u **8b** a temperaturas elevadas (150 °C) en presencia de ácido polifosfórico (PPA) como catalizador dio lugar a los compuestos **9a** o **9b** como sólidos con puntos de fusión de 117-118 °C y 148-150 °C respectivamente, los cuales concuerdan con los descritos en la literatura (118-119 °C y 147-148 °C respectivamente, Koenig, et al., 2010). Finalmente, la formación del anillo de imidazolina se llevó a cabo siguiendo la Ruta B por tratamiento de los ésteres indólicos **9a** y **9b** con etilendiamina, catálisis ácida y calentamiento a temperatura de reflujo durante 3 h. Los imidazolinilindoles **1** y **2** se obtuvieron en rendimientos de 75% y 44%, respectivamente (Esquema 3).

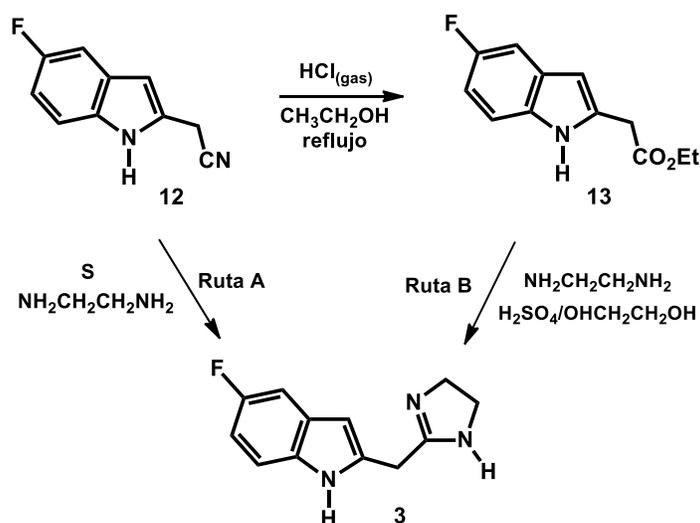


Esquema 3. Síntesis de los imidazolinilindoles **1** y **2**.

Los imidazolinilindoles **1** y **2** se caracterizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos. Así, en el espectro de RMN de ^1H del compuesto **1** (Figura 24, Anexo) se observa entre 7.6 y 7.0 ppm un patrón de señales que corresponde a un benceno orto disustituído, en 6.94 aparece una señal simple que se asignó a H-3 y la señal simple en 3.75 ppm que integra para cuatro hidrógenos se asignó a los metilenos del anillo de imidazolina. Para el caso del nuevo imidazolinilindol **2**, en su espectro de RMN ^1H (Figura 25, Anexo) se observa en la zona aromática un patrón de señales característico de un benceno 1,2,4-trisustituído, con un acoplamiento adicional originado por el átomo de flúor de spin nuclear $\frac{1}{2}$. En 7.4 ppm aparece una señal simple que se atribuye al hidrógeno H-3 del indol. En aproximadamente 4.0 ppm se observa una señal simple ancha que integra para los cuatro hidrógenos de los grupos metileno del anillo imidazolinico. En el espectro desacoplado de RMN de ^{13}C de **2** (Tabla 5, Anexo) se observa que las señales de los carbonos localizados hasta cuatro enlaces del átomo de flúor pueden presentarse como señales dobles debido al acoplamiento con el flúor.

6.3. Síntesis del 2-[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil]-5-fluoro-1H-indol [**3**]

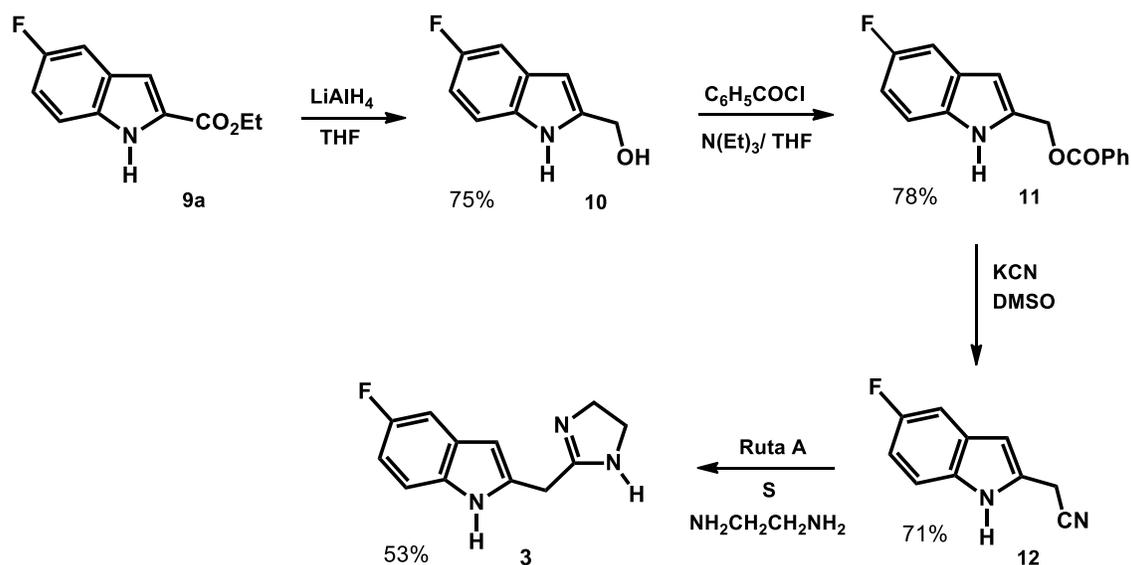
La síntesis del compuesto **3** se llevó a cabo vía el indolacetonitrilo (**12**) (Ruta A, Esquema 4) y vía del éster del ácido indolilacético (**13**) (Ruta B, Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis del 2-[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil]-5-fluoro-1H-indol [**3**]

6.3.1. Síntesis del imidazolinilindol 3 mediante la Ruta A

El primer paso fue la elongación de la cadena en C-2 mediante la reducción del éster **9b** usando como agente reductor el hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4), para obtener el alcohol **10** como un sólido incoloro de pf 91-92 °C, (91-92 °C, Jin et al., 2011). La transformación del alcohol **10** al benzoato **11** se realizó por tratamiento con cloruro de benzoilo en THF anhidro a temperatura ambiente, para obtener el compuesto **11** como un sólido con pf 143-145 °C. El indolacetonitrilo **12** se obtuvo como un sólido café de pf 116-118 °C al tratar el compuesto **11** con cianuro de potasio en DMSO a temperatura de reflujo. Los datos espectrales del compuesto **12** concuerdan con los de la literatura (Spadoni, et al., 2006) (Esquema 5).



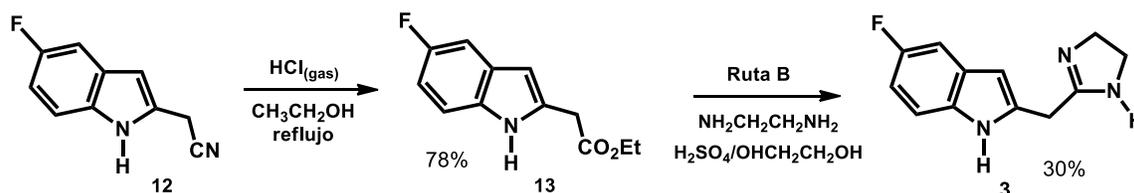
Esquema 5. Síntesis del imidazolinilindol **3** vía el 2-indolilacetonitrilo **12**.

Una vez obtenido el indolacetonitrilo **12** se trató con azufre y etilendiamina para así generar el imidazolinilindol **3** (Esquema 5) con un rendimiento del 53%. En la Figura 26 (Anexo) se muestra el espectro de RMN ^1H del imidazolinilindol **3** y en la Tabla 3 (Anexo), se compilan los datos espectroscópicos de los imidazolinilindoles **1**, **2** y **3**. En la zona aromática, entre 7.4 y 6.7 ppm se reconoce un patrón de señales característico de un benceno 1,2,4-trisustituído, en donde además se observa un acoplamiento adicional con el átomo de flúor. En aproximadamente

6.2, 3.6 y 3.4 ppm aparecen señales simples que integran para uno, dos y cuatro hidrógenos que se atribuyen al hidrógeno H-3 del indol, al metileno que une a ambos anillos heterocíclicos y a los hidrógenos del anillo de imidazolina, respectivamente.

6.3.2. Síntesis del imidazolinilindol **3** mediante la Ruta B

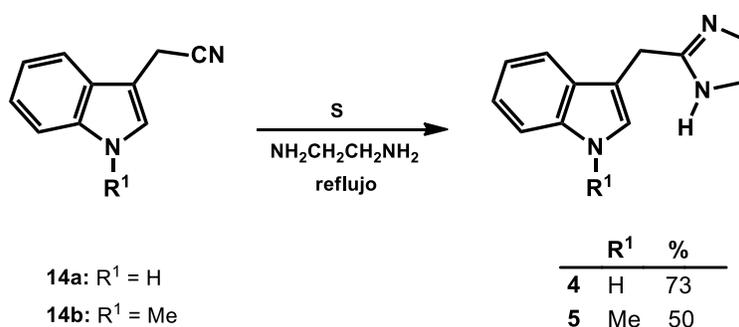
La obtención del éster del ácido indolilacético **13** (Esquema 6) se llevó a cabo por la solvólisis del nitrilo presente en compuesto **12**. El proceso ocurrió por burbujeo de cloruro de hidrógeno ($\text{HCl}_{(g)}$) a una solución del compuesto **12** en etanol a temperatura ambiente. El éster del ácido indolilacético **13** se obtuvo como un sólido ligeramente amarillo de $\text{pf } 94\text{-}96\text{ }^\circ\text{C}$. El espectro de RMN ^1H de **13** (Figura 30 del Anexo) presenta una señal ancha en aproximadamente 8.6 ppm que se asigna al hidrógeno unido al nitrógeno del indol, entre 7.3 y 6.8 ppm se observa un patrón de señales característico de un benceno 1,2,4-trisustituído, en donde se observa además un acoplamiento adicional con el átomo de flúor. En aproximadamente 6.3, y 3.8 ppm aparecen señales simples que integran para uno y dos hidrógenos que se asignan al H-3 y al metileno de la cadena en C-2. En 4.2 y 1.3 ppm se presentan una señal cuádruple y una triple características del grupo etoxilo. El imidazolinilindol **3** se obtuvo al tratar el éster del ácido indolilacético **13** con etilendiamina en medio ácido con un rendimiento del 30% (Esquema 6). El bajo rendimiento de **3** se debe a la generación de subproductos. Por lo anterior, el mejor resultado en la preparación de **3** se obtiene siguiendo la Ruta A que usa como sustrato al 2-indolilacetónitrilo **12** (Esquema 5).



Esquema 6. Síntesis del imidazolinilindol **3** vía el éster del ácido indolilacético **13** (Ruta B).

6.4. Síntesis de 3-[(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)metil]-1*H*-indol [4] y 3-[(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)metil]-1-metil-1*H*-indol [5]

La síntesis de los imidazolinilindoles **4** y **5** se llevó a cabo siguiendo la Ruta A a partir del indolacetonitrilo correspondiente **14a** o **14b**, los que se sintetizaron utilizando una metodología desarrollada en el grupo de trabajo (Acevedo-Quiroz, 2008). Los compuestos **14a** o **14b** se trataron a temperatura de reflujo de la etilendiamina usando azufre como catalizador, obteniéndose los imidazolinilindoles **4** y **5** en rendimientos del 73 y 50% respectivamente (Esquema 7).

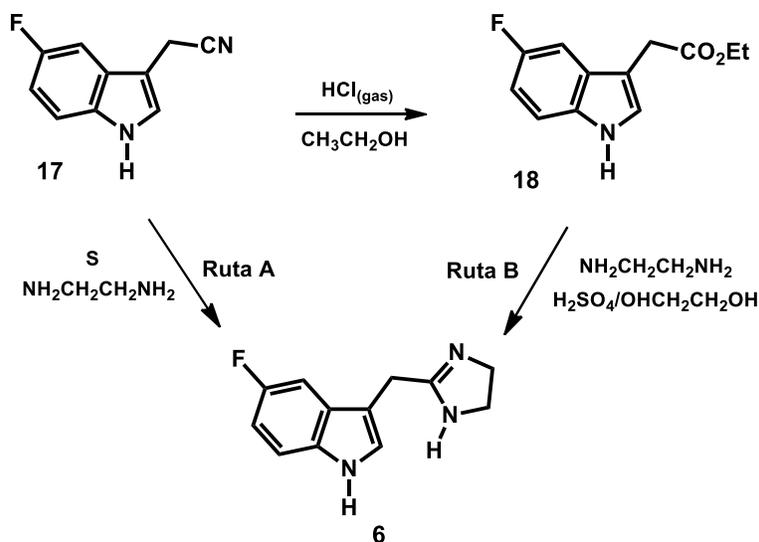


Esquema 7. Síntesis de los imidazolinilindoles **4** y **5**.

El espectro de RMN ¹H (Figura 27, Anexo) de la imidazolinilindol **4** muestra en aproximadamente 9.1 ppm una señal ancha que se intercambia con agua deuterada y se asignó al hidrógeno unido al nitrógeno del indol. En la zona aromática, entre 7.6 y 7.1 ppm se reconoce un patrón de señales característico de un benceno orto disustituido. En aproximadamente 7.1, 3.8 y 3.6 ppm aparecen señales simples que integran para uno, dos y cuatro hidrógenos que se atribuyen al hidrógeno H-2 del indol, al metileno que une a ambos anillos heterocíclicos y a los hidrógenos del anillo de imidazolina, respectivamente. El espectro de RMN ¹H (Figura 28, Anexo) del imidazolinilindol **5** es semejante al ya descrito para **4**, excepto por la señal simple en aproximadamente 3.8 ppm del *N*-metilo que se encuentra sobrepuesta con aquella del metileno de la cadena en C-3. Los datos espectroscópicos de **4** y **5** son consistentes con los descritos en la literatura (Domínguez-Mendoza, 2012).

6.5. Síntesis del 3-[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil]-5-fluoro-1H-indol [6]

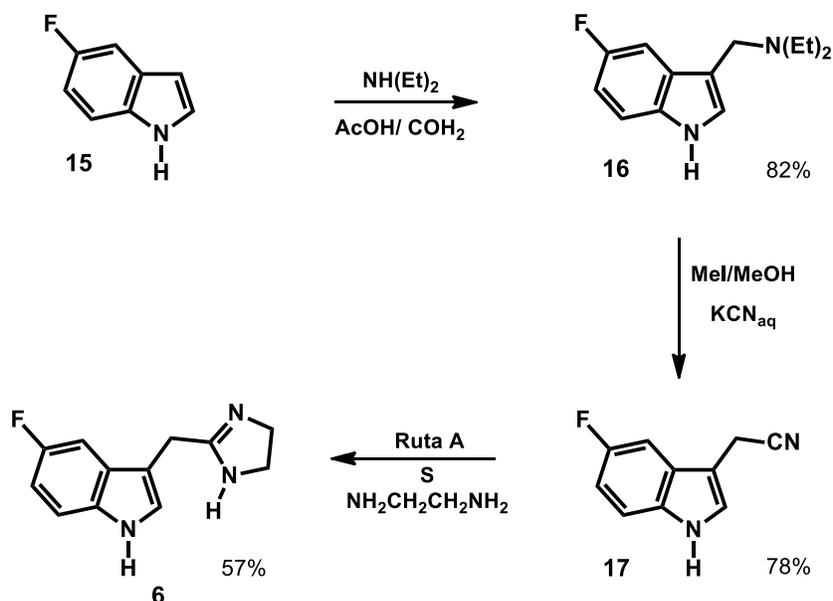
La formación del anillo de imidazolina del imidazolinilindol **6** se llevó a cabo vía el 2-(5-fluoro-1H-indol-3-il)acetonitrilo (**17**) siguiendo la metodología de la Ruta A y vía el 2-(5-fluoro-1H-indol-3-il)acetato de etilo (**18**) de acuerdo a la Ruta B (Esquema 8).



Esquema 8. Síntesis del 3-[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil]-5-fluoro-1H-indol [6].

6.5.1. Síntesis del imidazolinilindol **6** mediante la Ruta A

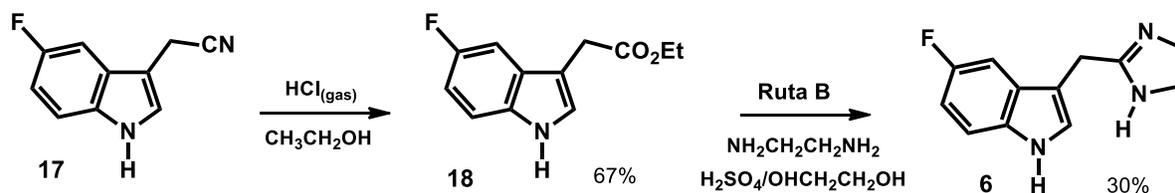
La síntesis del indolacetonitrilo **17** se llevó a cabo usando una metodología desarrollada en el grupo de trabajo (Acevedo-Quiroz, 2008). Así, el tratamiento del 5-fluoroindol (**15**) con formaldehído y dietilamina en condiciones de Mannich dio lugar a la formación del aminometilindol (**16**). La reacción del compuesto **16** con yoduro de metilo y posterior tratamiento con KCN generó al indolacetonitrilo **17** como un sólido café de $\text{pf } 49\text{-}51\text{ }^\circ\text{C}$. La transformación del nitrilo en el anillo de imidazolina ocurrió por reacción de **17** con azufre y etilendiamina para así generar el imidazolinilindol **6** con un rendimiento del 57% (Esquema 9). El imidazolinilindol **6** se obtuvo como un sólido ligeramente amarillo de $\text{pf } 118\text{-}120\text{ }^\circ\text{C}$, que es consistente con el descrito en la literatura ($119\text{-}121\text{ }^\circ\text{C}$; Wysong, et al., 1968).



Esquema 9. Síntesis del imidazolinilindol **6** vía el indolacetonitrilo **17** (Ruta A).

6.5.2. Síntesis del imidazolinilindol **6** mediante la Ruta B

El éster del ácido indolilacético **18**, precursor del imidazolinilindol **6**, se obtuvo por solvólisis del grupo nitrilo de **17** y su subsecuente esterificación en el medio de reacción. El éster **18** se aisló como un sólido ligeramente anaranjado de p_f 74-75 °C. El tratamiento del éster **18** con etilendiamina en medio ácido condujo al imidazolinilindol **6** con un rendimiento del 30% (Esquema 10).



Esquema 10. Síntesis del imidazolinilindol **6** vía el éster del ácido indolilacético **18**.

El imidazolinilindol **6** mostró en el espectro de masa (EM/IE) un ion molecular $217 + \text{H}^+$ m/z correspondiente al peso molecular del compuesto. En el espectro de RMN de ^1H de **6** (Figura 28, Anexo) se observa en aproximadamente 11.1 ppm

una señal muy ancha que se intercambia con agua deuterada y se asignó al hidrógeno unido al nitrógeno del indol. Entre 7.2 y 7.4 ppm aparece una señal múltiple que integra para tres hidrógenos que corresponde a H-7, H-4 y H-2 del núcleo indólico y en aproximadamente 6.9 ppm se observa una señal triple de dobles que se le atribuye al hidrógeno H-6. En aproximadamente 3.5 y 3.4 ppm aparecen señales simples que integran para dos y cuatro hidrógenos debidas a los hidrógenos del metileno que une a ambos anillos heterocíclicos y a los hidrógenos del anillo de la imidazolina, respectivamente.

6.6. Evaluación de la actividad antibacteriana de los imidazolinilindoles

El efecto de los imidazolinilindoles **1** a **6** sobre la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas se determinó por el método de microdilución en caldo siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013) con algunas modificaciones. Se utilizó el MTT como indicador de actividad biológica, este compuesto puede ser reducido por las bacterias desencadenando un color violeta (metabolismo activo) y quedando amarillo en caso contrario.

El método de microdilución en caldo se basa en la preparación de concentraciones crecientes de los compuestos que se encuentran diluidos en el medio de cultivo (caldo). A continuación se inocula cada una de las concentraciones preparadas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. La prueba se examina después de incubar entre 18 a 24 horas a 37 °C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del compuesto frente al microorganismo ensayado. La CIM corresponde al pozo donde no se observa crecimiento de la bacteria (botón) tras la incubación.

Los imidazolinilindoles **1-6** se evaluaron en un intervalo de concentración de 2.5 a 640 µg/mL frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli* y en un intervalo de 2.5 a 320 µg/mL para *P. aeruginosa*. Se utilizó como control positivo gentamicina (0.25 a 250 µg/mL).

Los resultados muestran que los imidazolinilindoles **1-3** y **6** presentaron actividad antibacteriana. Se observó que esta actividad dependió de los siguientes factores:

- a) Los imidazolinilindoles sustituidos por un átomo de flúor en C-5 del núcleo indólico **2**, **3** y **6** mostraron una mejor actividad frente a los microorganismos. Ejemplo de esto se observó al comparar los imidazolinilindoles **1** y **2** teniendo como única diferencia en su estructura la presencia de flúor en el indol en el caso de **2**. Los resultados frente a *S. aureus* demostraron que el imidazolinilindol **2** es 2 veces mas activo que **1**. La CIM que se determinó para estos compuestos fue de 160 para **1** y de 80 $\mu\text{g/mL}$ para **2** (Figura 19).

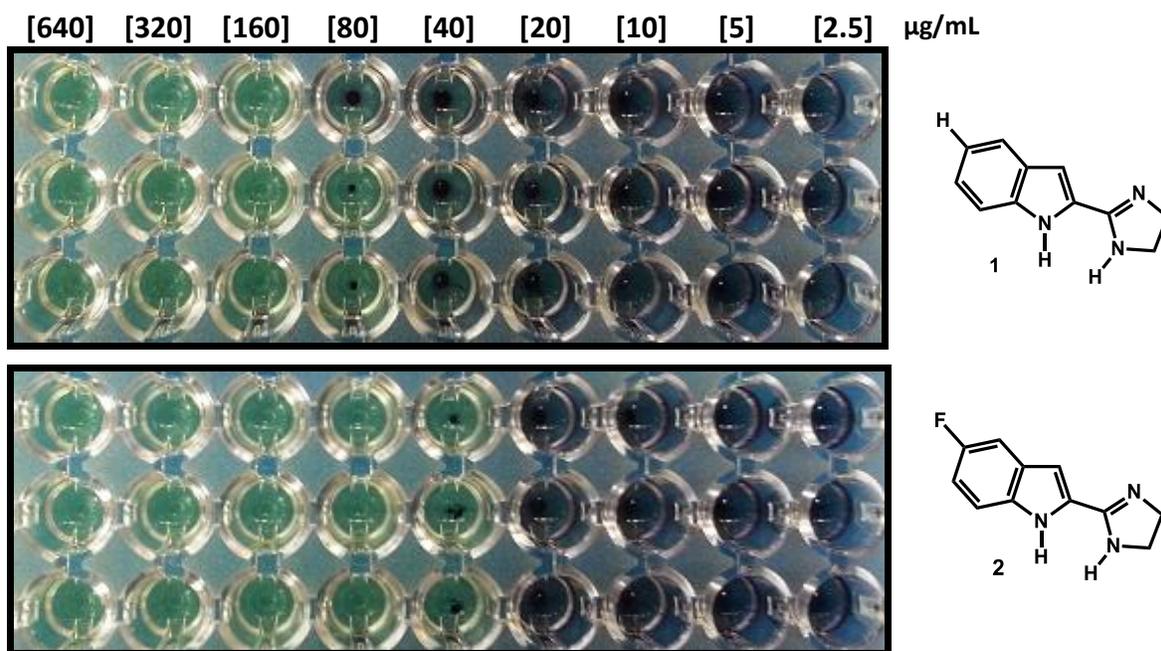


Figura 19. Comparación de las CIM's de los imidazolinilindoles **1** (superior) y **2** (inferior) frente a *S. aureus*.

b) La ausencia del metileno que une a ambos anillos mejora la actividad antibacteriana. Ejemplo de esto se observó al comparar los imidazolinilindoles **2** y **3** cuya única diferencia es la presencia de un metileno en el caso de **3**. Los resultados frente a *S. aureus* demostraron que el imidazolinilindol **2** es 2 veces mas activo que **3**. La CIM que se determinó para estos compuestos fue de 160 para **3** y de 80 µg/mL para **2** (Figura 20).

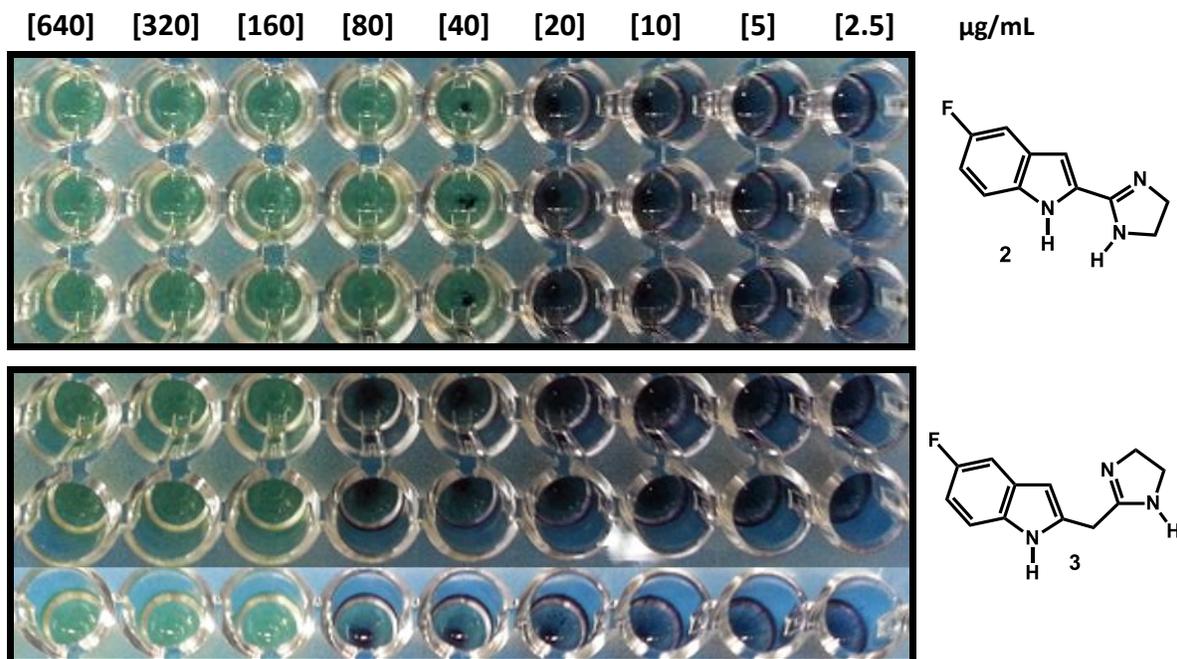


Figura 20. Comparación de las CIM's de los imidazolinilindoles **2** (superior) y **3** (inferior) frente a *S. aureus*.

c) Finalmente, se observó que la actividad antibacteriana aumenta cuando el metilimidazol se encuentra unido en la posición 2 del sistema indólico. Ejemplo de esto se observó al comparar los imidazolinilindoles **3** y **6** cuya única diferencia es la posición del sustituyente metilimidazol, que en el caso de **3** se encuentra en la posición 2 del indol y en **6** este sustituyente se encuentra en la posición 3 del indol. Los resultados frente a *S. aureus* demostraron que el imidazolinilindol **3** es 4 veces mas activo que **6**. La CIM que se determinó para estos compuestos fue de 160 para **3** y de 640 µg/mL para **6** (Figura 21).

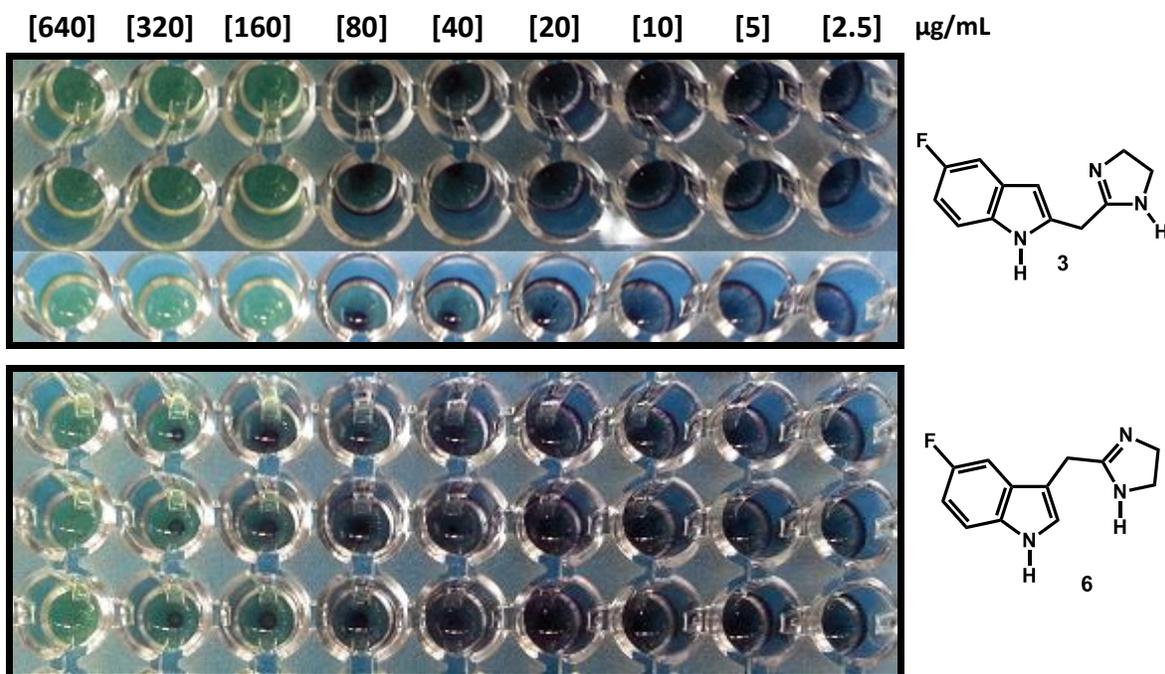
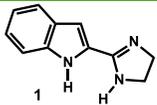
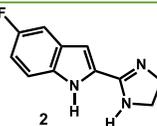
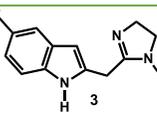
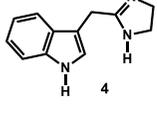
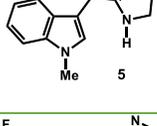
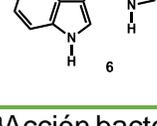


Figura 21. Comparación de las CIM's de los imidazolinilindoles **3** (superior) y **6** (inferior) frente a *S. aureus*.

Por lo antes mencionado el imidazolinilindol **2** fue el que presentó una mejor actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa* (Ver Tabla 2).

Adicionalmente se observó que los compuestos **1-3** tienen una mayor actividad antibacteriana en comparación al compuesto **6**, siendo las bacterias Gram positivas más susceptibles que las bacterias Gram negativas. Con respecto a la concentración mínima bactericida (CMB) se observó que los compuestos **1-3** poseen acción bactericida frente a *S. aureus* y *E. coli* y presentan acción bacteriostática frente a *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa*. En el caso del imidazolinilindol **6** presente acción bacteriostática frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* y frente a *E. coli* posee acción bactericida (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Actividad antibacteriana de seis imidazolinilindoles contra bacterias Gram negativas y Gram positivas

CIM (µg/mL)				
Compuesto	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Gentamicina	<0.25 ^a	<0.25 ^b	0.98 ^a	<0.25 ^b
	160 ^a	160 ^b	320 ^a	320 ^b
	80 ^a	80 ^b	160 ^a	320 ^b
	160 ^a	160 ^b	320 ^a	320 ^b
	>640	>640	>640	>320
	>640	>640	>640	>320
	640 ^b	640 ^b	640 ^a	>320

^aAcción bactericida. ^bAcción bacteriostática

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1. Procedimiento general para la síntesis

Las materias primas fueron adquiridas en Sigma-Aldrich Chemical. Co. y utilizadas sin purificación adicional. Los disolventes usados fueron grado reactivo y en el caso del tetrahidrofurano (THF), fue secado con sodio y benzofenona como indicador. Los disolventes empleados para realizar la purificación por columna fueron destilados antes de ser utilizados.

El curso de las reacciones fue seguido por cromatografía de capa fina (CCF), usando placas comerciales de sílica gel 60 F₂₅₄ de Merck. Se emplearon como reveladores: radiaciones UV (254 nm), vapores de yodo y sulfato cérico (Ce(SO₄)₂). Los compuestos se purificaron en columna por cromatografía flash utilizando sílica gel 60 (230-400 mallas, Merck Chem Co.).

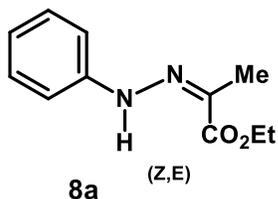
Todo material de vidrio utilizado en las reacciones se secó en la estufa por lo menos 24 horas a 110 °C antes de ser utilizados cuando se requerían condiciones controladas de humedad.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato *Fisher-Johns* y no fueron corregidos. Los espectros de Infrarojo se registraron en un espectrofotómetro Buck scientific modelo 500 en solución de CHCl₃. Los espectros de masas se efectuaron en un cromatógrafo de gases Varian CP3800 acoplado a un detector de masas selectivo Varian Saturn 200 a 70 eV.

Determinación de los espectros de RMN. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear, RMN ¹H (300 MHz) y de RMN ¹³C (74.5 MHz) se obtuvieron en un espectrofotómetro Varian Mercury 300 en el disolvente apropiado (CDCl₃, DMSO, CD₃OOD ó COOD) y se utilizó SiMe₄ como referencia interna. La multiplicidad de señales se indica por medio de una o más de las siguientes abreviaciones: *a* (ancha), *s* (simple), *d* (doble), *t* (triple), *m* (múltiple).

7.2. Síntesis de los intermediarios para la obtención de las indolilimidazolininas 1 y 2

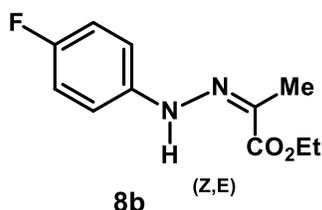
7.2.1. (*E*)- y (*Z*)-2-(2-fenilhidrazona)propanoato de etilo [8a]



En un matraz se colocaron 2 g (13.8 mmol) del clorhidrato de fenilhidrazina (**7a**), 16 mL de etanol y 1.6 mL (14.7 mmol) de piruvato de etilo. El matraz de reacción se colocó en un baño de agua a una temperatura entre 55-60 °C, durante 1 hora en agitación constante.

A la mezcla de reacción enfriada en un baño de hielo se le añadió lentamente agua hasta observar turbidez. La mezcla se dejó en refrigeración por 5 horas, posteriormente fue filtrada con vacío, obteniéndose 2.1 g (10.2 mmol, 74% de rendimiento) de la mezcla *cis*, *trans*-**8a** como cristales de color amarillo claro. Los isómeros no fueron separados y la mezcla como tal fue utilizada en la siguiente reacción (Ishibashi, et al., 1986).

7.2.2. (*E*)- y (*Z*)-2-[2-(4-fluorofenil)hidrazona]propanoato de etilo [8b]



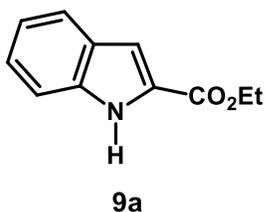
En un matraz se preparó una suspensión con 4 g (24.6 mmol) del clorhidrato de (4-fluorofenil)hidrazina (**7b**) en 40 mL de etanol, posteriormente se adicionaron 2.8 mL (25.8 mmol) de piruvato de etilo. La suspensión resultante se calentó a temperatura de reflujo por 1 hora, el curso de la

reacción fue seguido por cromatografía en capa delgada, empleando una fase móvil de hexano-acetato de etilo (hexano-AcOEt, 8:2). El etanol fue evaporado hasta sequedad obteniéndose un crudo de color rojizo.

La mezcla *cis*, *trans* se purificó por cromatografía en columna eluida por gradiente, utilizando inicialmente una fase móvil de hexano-AcOEt (95:5) y posteriormente hexano-AcOEt (90:10). De donde se obtuvieron 1.3 g (5.8 mmol, 24%) del isómero *Z* de la fenilhidrazina **8b** como un sólido amarillo de pf 87-89 °C y 3.6 g (16 mmol, 65%) del isómero *E* como un sólido amarillo pálido de pf 89-91 °C (83-87 °C,

Zhang, et al., 2011). Recuperándose un total de 4.9 g, 89% de rendimiento de la fenilhidrazona **8b**.

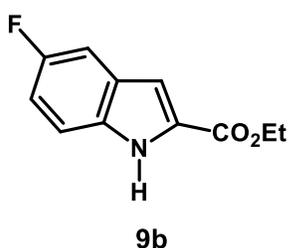
7.2.3. 1*H*-indol-2-carboxilato de etilo [**9a**]



En un matraz se colocaron 0.75 g (3.6 mmol) de la mezcla *cis, trans* de **8a** y 1.4 g (4.2 mmol) de ácido polifosfórico (PPA). El matraz de reacción se sumergió en un baño de aceite a una temperatura de 150 °C y se dejó en agitación mecánica por 1 hora.

El crudo de reacción se trató con 10 mL de solución salina y 20 mL de AcOEt; la fase acuosa fue tratada nuevamente con AcOEt (2 x 10 mL), las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con 15 mL de solución salina, se secaron con sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro, se filtró y por último se concentró en el rotavapor. El producto se purificó por cromatografía utilizando como medio de elución hexano-AcOEt (90:10), de donde se obtuvieron 0.31 g (1.6 mmol, 45%) del compuesto **9a** como un sólido de color amarillo claro de pf 117-118 °C (118-119 °C, Koenig, et al., 2010).

7.2.4. 5-Fluoro-1*H*-indol-2-carboxilato de etilo [**9b**]



Para la obtención de **9b** se colocaron en un matraz 4.0 g (17.9 mmol) de la mezcla de isómeros de **8b** y 8.0 g (23.7 mmol) de PPA, la mezcla de reacción se dejó en agitación por 1 hora bajo las condiciones descritas para **9a**. La reacción se monitoreó por cromatografía en capa delgada (hexano-AcOEt, 8:2).

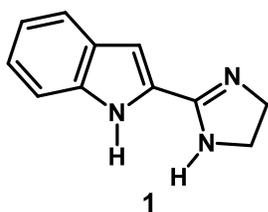
El crudo de reacción se trató con 50 mL de AcOEt y 30 mL de solución salina; la fase acuosa fue tratada nuevamente con AcOEt (2 x 25 mL), las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con 25 mL de solución salina, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y por último se concentró en el rotavapor. El producto se purificó por cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano-AcOEt, (95:5).

Se obtuvieron 2.5 g (12.1 mmol, 67% de rendimiento) del compuesto **9b** como un sólido amorfo de color café claro de pf 148-150 °C (147-148 °C, Koenig, et al., 2010).

7.3. Procedimiento general para la síntesis de los imidazolinilindoles **1** y **2**

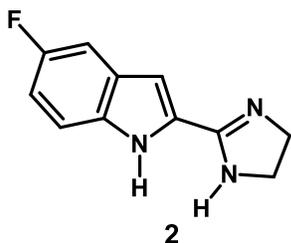
En un matraz redondo provisto de agitación mecánica y de un refrigerante se preparó la suspensión de **9** en etilenglicol, posteriormente se adicionó etilendiamina (10 eq) y finalmente gota a gota se adicionó H₂SO₄ concentrado. La solución resultante se calentó a temperatura de reflujo por 3 horas, el curso de la reacción fue seguido por cromatografía en capa delgada, empleando una fase móvil de metanol-trietilamina (MeOH-NEt₃, 95:5).

7.3.1. 2-(4,5-Dihidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-indol [**1**]



Se preparó a partir de **9a** (100 mg, 0.53 mmol), etilendiamina (0.35 mL, 5.25 mmol), H₂SO₄ (0.1 mL) y etilenglicol (1.5 mL). Terminada la reacción la mezcla fue enfriada en un baño de hielo, a la cual se añadieron 8 mL de agua de donde el producto fue recuperado por extracción con cloroformo (CHCl₃, 2 x 15 mL), se juntaron las fases orgánicas, se lavaron con agua y se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 74 mg (0.4 mmol, 75% de rendimiento) del compuesto **1** como un sólido amarillo: pf 130-132 °C; R_f = 0.32 (MeOH-NEt₃); EMIE (*m/z*): 185 (100); IR (CHCl₃) ν_{\max} 3445 (N-H), 1634 (C=N) cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C ver Tablas 3 y 5 respectivamente (Anexo); el espectro de RMN ¹H se muestra en la Figura 24 del Anexo. Los datos espectrales concuerdan con los de la literatura. (Giuseppe, et al. 2013).

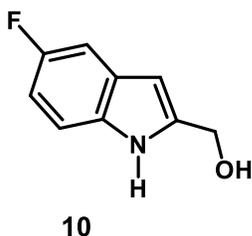
7.3.2. 2-(4,5-Dihidro-1H-imidazol-2-il)-5-fluoro-1H-indol [2]



Se preparó a partir de **9b** (200 mg, 0.97 mmol), etilendiamina (0.7 mL, 10.5 mmol), H₂SO₄ (0.2 mL) y etilenglicol (2.4 mL). Transcurrido el tiempo de reacción, el matraz fue sumergido en un baño de hielo y se llevó a cabo la adición de agua fría hasta observar la formación de un precipitado. El producto fue filtrado con vacío y el sólido café obtenido (138 mg, 69%) fue recrystalizado en metanol-agua. Se obtuvieron 87 mg (0.43 mmol, 44% de rendimiento) del compuesto **2**, como un sólido amorfo de color beige: pf 254-256 °C; R_f = 0.39 (MeOH-NEt₃); EMIE (*m/z*): 174 (31) 203 (100); IR (CHCl₃) ν_{max} 3702 (N-H), 1717 (C=N) cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C ver Tablas 3 y 5 respectivamente (Anexo); el espectro de RMN ¹H se muestra en la Figura 25 del Anexo.

7.4. Síntesis de los intermediarios para la obtención del imidazolinilindol **3**

7.4.1. (5-Fluoro-1H-indol-2-il)metanol [10]

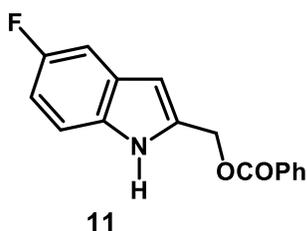


En un matraz bajo atmósfera de argón, se suspendieron 410 mg (10.8 mmol) de hidruro de litio y aluminio (LiAlH₄) en 20 mL de THF seco, la suspensión se colocó en un baño de hielo con agitación mecánica por 15 minutos, en otro matraz se colocaron 500 mg (2.4 mmol) del compuesto **9b** que se disolvieron con 20 mL de THF seco, la solución del compuesto **9b** fue trasvasada con ayuda de una cánula al matraz que contenía la suspensión del LiAlH₄ en un intervalo de 15 minutos, una vez terminada la adición se dejó 5 min más en hielo y posteriormente se dejó en agitación por 1 hora a temperatura ambiente siguiendo el curso de la reacción por cromatografía en capa delgada, empleando una mezcla de hexano-AcOEt (8:2) como fase móvil.

A la suspensión gris enfriada en un baño de hielo, se le añadieron lentamente 30 mL de AcOEt, posteriormente se realizó la adición lenta de 25 mL de agua fría y el producto fue recuperado de la fase acuosa por extracción con de AcOEt (2 x 20

mL), las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con 20 mL de solución salina, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y por último se concentró en el rotavapor. El sólido obtenido fue recrystalizado en CH₂Cl₂/hexano. Se obtuvieron 313 mg (1.9 mmol, 79% de rendimiento) del compuesto **10** como un sólido amorfo incoloro de pf 91-92 °C (91-92°C, Jin, et al., 2011).

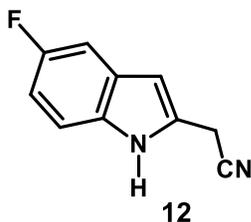
7.4.2. Benzoato de (5-Fluoro-1*H*-indol-2-il)metilo [11]



En un matraz protegido de la humedad atmosférica empleando una trampa con cloruro de calcio anhidro (CaCl₂), se disolvieron 1 g (6.1 mmol) de **10** con 50 mL de THF, se adicionaron 2.5 mL (18 mmol) de trietilamina. El matraz de reacción fue sumergido en un baño de hielo y a la misma temperatura se llevó a cabo la adición de 1.1 mL (9.5 mmol) de cloruro de benzoilo en un intervalo de 20 minutos, formándose un precipitado blanco. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 3 horas a temperatura ambiente y se monitoreó la reacción por cromatografía en capa delgada (hexano-AcOEt, 8:2).

El sólido blanco formado se eliminó por filtración. El filtrado se trató con 5 mL de una solución acuosa de NaOH al 10%, posteriormente a la mezcla se le adicionó 15 mL de solución salina, y el producto fue recuperado por extracción con AcOEt (2 x 25 mL), se juntaron las fases orgánicas, se lavaron con 20 mL de agua y secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor. Se obtuvo un sólido amarillo que se purificó por recrystalización con CH₂Cl₂/hexano. Se obtuvieron 1.27 g (78% de rendimiento) del compuesto **11** como un sólido color crema, con pf 143-145 °C.

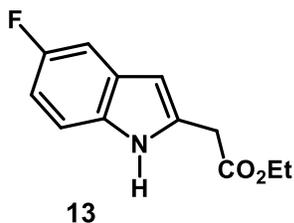
7.4.3. 2-(5-Fluoro-1*H*-indol-2-il)acetonitrilo [12]



A una solución de 1 g (3.7 mmol) de **11** en 23 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) se le adicionaron 0.95 g (14.6 mmol) de cianuro de potasio (KCN). La solución resultante se dejó en agitación por 4 horas dentro de un baño de aceite que se encontraba a una temperatura entre 65-70 °C, el curso de la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada empleando una mezcla de hexano-AcOEt (8:2) como fase móvil.

La mezcla de reacción se trató con 10 mL de una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 5%, posteriormente se le adicionó 15 mL de solución salina y el producto fue recuperado por extracción con tres volúmenes de 30 mL de AcOEt, se juntaron las fases orgánicas, se lavaron con 20 mL de agua y se sacaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor. El compuesto fue recuperado por cromatografía en columna, utilizando como mezcla de elución hexano-AcOEt (85:15). Se obtuvieron 0.46 g (2.6 mmol, 71%) de **12** como un sólido amorfo café; pf 116-118 °C. Los datos espectrales concuerdan con los de la literatura (Spadoni, et al., 2006).

7.4.4. 2-(5-Fluoro-1*H*-indol-2-il)acetato de etilo [13]



A una solución de 350 mg (2.0 mmol) de **9** en 15 mL de etanol, se le burbujeo en un intervalo de 30 minutos cloruro de hidrógeno (HCl_g) que se generó por la adición lenta de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 50 mL) sobre cloruro de sodio (NaCl, 24.5 g), la agitación se continuó por 3 horas a temperatura ambiente y la reacción se monitoreo por cromatografía en capa delgada (hexano-AcOEt, 7:3).

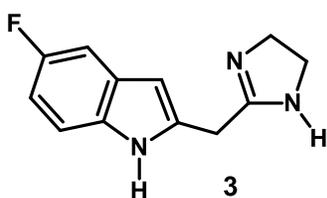
A la reacción enfriada en un baño de hielo, se le adicionó lentamente 15 mL de solución salina y el producto fue recuperado de la fase acuosa por extracción con CH₂Cl₂ (2 x 20 mL) y después con AcOEt (2 x 15 mL), las fases orgánicas se

lavarón con 15 mL de solución salina cada una, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron en el rotavapor. El compuesto se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 85:15). De donde se obtuvieron 350 mg (1.6 mmol, 78% de rendimiento) del compuesto **13** como un sólido amorfo de color crema; pf 94-96 °C R_f = 0.32 (Hexano-AcOEt, 7:3); EMIE (*m/z*): 221 (68), 148 (100); IR (CHCl₃) ν_{max} 3436 (N-H), 1707 (C=N) cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C ver Tablas 7 y 8 respectivamente (Anexo); el espectro de RMN ¹H se muestra en la Figura 30 del Anexo.

7.5. Síntesis de 2-[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil]-5-fluoro-1H-indol [3]

7.5.1. Síntesis del imidazolinilindol **3** vía el indolacetonitrilo [12] (Ruta

A)



A una solución de 150 mg (0.86 mmol) de **12** en 1.4 mL de etilendiamina, se adicionaron 7.5 mg (0.23 mmol) de azufre. La solución resultante se calentó a temperatura de reflujo por 2.5 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionaron 10 mL de agua y el producto fue recobrado de la fase acuosa por extracción con CHCl₃ (20 mL) primero y luego tres veces mas con volúmenes de 15 mL, se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con 15 mL de solución salina, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y concentraron a vacío en el rotavapor.

El compuesto se purificó por cromatografía en columna por gradiente, usando inicialmente una fase móvil de hexano-AcOEt (7:3) y posteriormente una fase móvil de MeOH-AcOEt (6:4), de donde se obtuvieron 99 mg (0.46 mmol, 53% de rendimiento) de **3** como un sólido color crema; pf 133-135 °C; R_f = 0.15 (MeOH-NEt₃, 95:5); EMIE (*m/z*): 217 (100); IR (CHCl₃) ν_{max} 3426 (N-H), 1628 (C=N) cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C ver Tablas 3 y 5 respectivamente (Anexo); el espectro de RMN ¹H se muestra en la Figura 26 del Anexo.

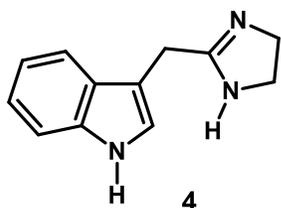
7.5.2. Síntesis del imidazolinilindol **3** vía el éster **13** (Ruta B)

En un matraz se colocaron 150 mg (0.68 mmol) de **13** y se suspendieron en 1.8 mL de etilenglicol, a la mezcla resultante se adicionaron 0.53 mL (7.93 mmol) de etilendiamina y gota a gota 0.15 mL de H₂SO₄. La mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo por 3 horas. La solución obtenida se lavó con 10 mL de solución salina y se extrajo con CHCl₃ (3 x 25 mL), se juntaron las fases orgánicas y se lavó con 15 mL de agua, se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró a vacío en el rotavapor. El compuesto se purificó por cromatografía en columna por gradiente, usando inicialmente una fase móvil de hexano-AcOEt (7:3) y posteriormente una fase móvil de MeOH-AcOEt (6:4). Se obtuvieron 56 mg (0.26 mmol, 30%) de **3**.

7.6. Procedimiento general para la síntesis de los imidazolinilindoles **4** y **5**

En un matraz provisto de refrigerante se colocaron el indolacetonitrilo **14** y azufre (0.25 eq), y a la mezcla resultante se adicionó etilendiamina (2.5 mL). La mezcla se calentó a temperatura de reflujo durante 3 h. Transcurrido el tiempo de reacción, el producto fue tratado con 15 mL de CHCl₃ y agua (5 mL), para la recuperación completa del producto, la fase acuosa fue tratada con tres volúmenes de 10 mL de CHCl₃, se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con 15 mL de agua, se secó con Na₂SO₄ se filtró y concentró a vacío en el rotavapor.

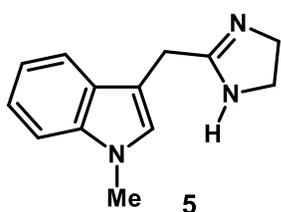
7.6.1. Síntesis del 3-[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil]-1H-indol [**4**]



El compuesto fue preparado siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (Domínguez-Mendoza, 2012), a partir de **14a** (250 mg, 1.6 mmol) en presencia de 12.8 mg (0.4 mmol) de azufre en 2.5 mL de etilendiamina. El sólido obtenido fue recristalizado en acetona-hexano. Se obtuvieron 234 mg (1.18 mmol, 73%) de un sólido color ligeramente amarillo; *mp* 131-133 °C; los datos de RMN ¹H y ¹³C se encuentran en las Tablas 4 y 6 respectivamente (Anexo); el espectro de RMN ¹H se muestra en la Figura 27 del

Anexo. Los datos espectrales concuerda con los de la literatura (Domínguez-Mendoza, 2012).

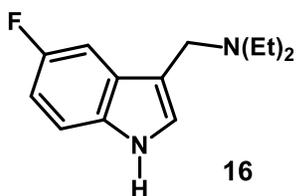
7.6.2. Síntesis del 3-[(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)metil]-1-metil-1*H*-indol [5]



Se preparó a partir de **14b** (250 mg, 1.47 mmol) por reacción con 11.8 mg (0.37 mmol) en 2.3 mL de etilendiamina. La miel parcialmente solidificada se cristalizó en acetona-hexano. Se obtuvieron 158 mg (0.74 mmol, 50%) de cristales amarillo pálido: pf 118-120 °C; los datos de RMN ^1H y ^{13}C se encuentran en las Tablas 4 y 6 respectivamente (Anexo); el espectro de RMN ^1H se muestra en la Figura 28 del Anexo. Los datos espectrales concuerdan con los de la literatura (Domínguez-Mendoza, 2012).

7.7. Síntesis de los intermediarios para la obtención del imidazolinilindol 6

7.7.1. *N*-etil-*N*-[(5-fluoro-1*H*-indol-3-il)metil]etanamina [16]

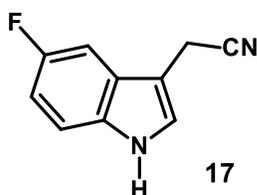


El producto fue preparado siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (Acevedo-Quiroz, 2008). En una matraz sumergido en un baño de hielo que contenía 0.68 mL de formaldehído al 37% se le adicionó lentamente 1.75 mL de ácido acético, 0.92 mL de dietilamina, y 1 g (7.4 mmol) de 5-fluoro-1*H*-indol **15**. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 16.5 horas a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción fue vertida sobre 20 mL de una solución de NaOH al 10% previamente enfriada en un baño de hielo, se dejó en agitación hasta la formación de un precipitado, posteriormente se adicionó AcOEt hasta la disolución del precipitado. El producto fue completamente recuperado de la fase acuosa por extracción con dos volúmenes de 20 mL de AcOEt, se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con solución salina (2 x 20 mL). Se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se

filtró y concentró casi a sequedad dejando 15 mL de AcOEt, se dejó en refrigeración para su cristalización. Se obtuvieron 1.34 g (6.1 mmol, 82% de rendimiento) del compuesto **16** como cristales de color amarillo claro de pf 111-113 °C.

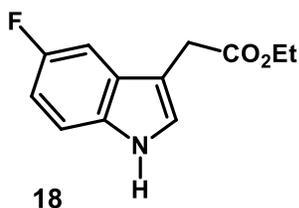
7.7.2. 2-(5-Fluoro-1*H*-indol-3-il)acetonitrilo [17]



El producto fue preparado siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (Acevedo-Quiroz, 2008), a partir de una solución de 1 g (4.5 mmol) de **16** en 5 mL de MeOH enfriada en un baño de hielo bajo atmósfera de argón y en agitación se adicionaron 0.7 mL (11.2 mmol) de yoduro de metilo (MeI). La mezcla de reacción se dejó en agitación por 2 horas a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se adicionaron 3 mL de una solución acuosa de cianuro de potasio al 20% (9.68 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo por 2 horas.

La mezcla de reacción se trató con 25 mL de AcOEt y 15 mL de agua. El producto fue completamente recuperado de la fase acuosa por extracción con dos volúmenes de 20 mL de AcOEt, las fases orgánicas se juntaron y se lavaron sucesivamente con agua (2x20 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentró en el rotavapor. La miel parcialmente solidificada se purificó empleando una columna cromatográfica y utilizando una mezcla de hexano-AcOEt (8:2) como fase móvil. De donde se obtuvieron 0.62 g del compuesto **17** (3.6 mmol, 78% de rendimiento), como un sólido de color café oscuro de pf 49-51 °C. El pf y los datos espectrales concuerdan con los de la literatura (Acevedo-Quiroz, 2008).

7.7.3. 2-(5-Fluoro-1*H*-indol-3-il)acetato de etilo [18]

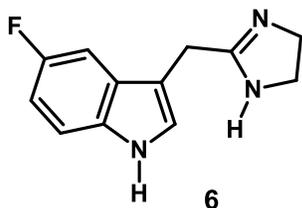


A una solución de 200 mg (1.15 mmol) de **17** en 10 mL de etanol, se le burbujeo en un intervalo de 25 minutos cloruro de hidrógeno que se generó por la adición lenta de H₂SO₄, (30 mL) sobre NaCl (14 g), la agitación se continuó por 3 horas a temperatura ambiente.

A la reacción enfriada en un baño de hielo, se le añadieron lentamente 10 mL de solución salina y el producto fue recuperado de la fase acuosa por extracción con dos volúmenes de 20 mL de CH₂Cl₂ y después con dos volúmenes de 15 mL de AcOEt, las fases orgánicas por separado se lavaron con 15 mL de solución salina, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron en el rotavapor. El compuesto se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 85:15). De donde se obtuvieron 173 mg (0.78 mmol, 66% de rendimiento) del compuesto **18** como un sólido ligeramente anaranjado de pf 74-75 °C. Los datos espectrales concuerdan con los de la literatura (Boularot, et. al., 2007).

7.8. Síntesis de 3-[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil]-5-fluoro-1H-indol [6]

7.8.1. Síntesis del imidazolinilindol **6** vía el indolacetonitrilo **17** (Ruta A)



En un matraz se colocaron 200 mg (1.15 mmol) de **17**, con 1.8 mL de etilendiamina y 10 mg (0.31 mmol) de azufre. La solución resultante se calentó a temperatura de reflujo por 2 horas. Terminada la reacción se adicionaron 20 mL de CHCl₃ y 10 mL de solución salina, el producto fue

recobrado de la fase acuosa por extracción con CHCl₃ (3 x 15 mL), se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con 15 mL de solución salina, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentró a vacío en el rotavapor.

El compuesto se purificó por cromatografía en columna, por gradiente, usando inicialmente una fase móvil de hexano-AcOEt (7:3) y posteriormente una fase móvil de MeOH-AcOEt (6:4), de donde se obtuvieron 143 mg (0.66 mmol, 57% de rendimiento) de **6** como un sólido ligeramente amarillo: pf 118-120 °C (119-121 °C; Wysong, et al., 1968); R_f = 0.32 (Hexano-AcOEt, 7:3); EMIE (*m/z*): 217 + H⁺ (100); IR (CHCl₃) ν_{max} 3487 (N-H), 1637 (C=N) cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C ver Tablas 4 y 6 respectivamente (Anexo); el espectro de RMN ¹H se muestra en la Figura 29 del Anexo.

7.8.2. Síntesis del imidazolinilindol 6 vía el éster 18 (Ruta B)

En un matraz se colocaron 150 mg (0.68 mmol) de **18** y 1.8 mL de etilenglicol, se calienta un poco para disolver y a la solución resultante se adicionaron 0.53 mL (7.93 mmol) de etilendiamina y finalmente gota a gota se añadió 0.1 mL de H₂SO₄. La mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo por 3 horas. Terminada la reacción, la mezcla fue tratada con 10 mL de solución salina y el producto fue recuperado de la fase acuosa por extracción con CHCl₃ (3 x 25 mL), se juntaron las fases orgánicas y se lavó con 15 mL de agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío en el rotavapor. El compuesto se purificó por cromatografía en columna como se describió anteriormente y se obtuvieron 56 mg (0.26 mmol, 30% de rendimiento) de **6** con las mismas características anteriormente descritas.

7.9. Evaluación de la actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana fue realizada en el laboratorio de Bacteriología Médica del departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría del Dr. Gerardo Aparicio Ozores.

Los estudios experimentales *in vitro* se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013) con algunas modificaciones. Para este trabajo en particular se empleó el método de microdilución en pozos.

Para el ensayo de la actividad antibacteriana se emplearon caldo Mueller Hinton (Bioxon) y agar soya tripticaseína (Dibico) los cuales fueron preparados según las especificaciones de la empresa y esterilizados en autoclave a una presión de 15 psi durante 15 min.

7.9.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

a) Preparación del inóculo

Se ensayaron cuatro cepas bacterianas procedentes de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115).

Las cepas se cultivaron en cajas Petri en medio agar soya tripticaseína a 37 °C durante 18-24 h; se tomaron de 2 a 5 colonias (de similar morfología) y se suspendieron en 2 mL de caldo Mueller Hinton (MH) para obtener una suspensión equivalente al estándar de turbidez 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Posteriormente se transfirieron 20 μ L de la suspensión estandarizada a 2 mL de caldo MH (1×10^6 UFC/mL), se mezclaron por 15 a 20 segundos, de esta suspensión se tomaron 1.6 mL y se adicionaron a 14.4 mL de caldo MH para obtener una densidad final de 1×10^5 UFC/mL. El inóculo se usó dentro de los 20 minutos siguientes de la preparación.

b) Preparación de las microdiluciones seriadas

Se prepararon soluciones stock de los compuestos a una concentración 10240 μ g/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) de grado analítico, las cuales fueron conservadas en congelación a -20 °C.

Como se había mencionado anteriormente la CIM de los compuestos se evaluó mediante el ensayo de microdilución en caldo, el cual se realizó en placas de 96 pozos, de acuerdo al procedimiento siguiente: a los pozos de la primera columna se les adicionaron 50 μ L de caldo MH a doble concentración y a los pozos de la columna 2 a la 11 se les adicionó 50 μ L de caldo MH a concentración simple. Se depositaron 50 μ L de la solución stock (10240 μ g/mL) del compuesto a evaluar, el medio de cultivo y el compuesto se mezclaron muy bien, reduciendo la concentración del compuesto a 5120 μ g/mL. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas 1:2; se tomó la mitad del volumen (50 μ L) y se transfirió al siguiente pozo, se mezcló el contenido y se volvió a tomar 50 μ L que se

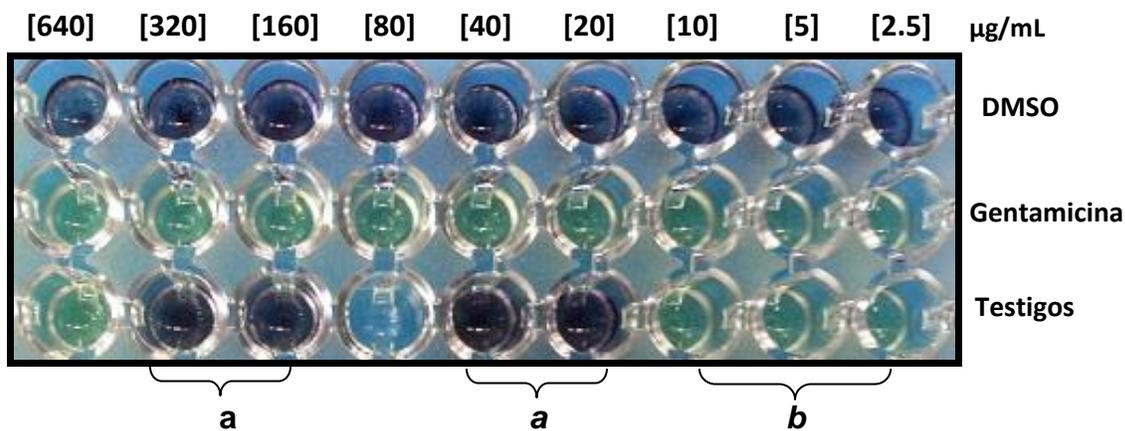
transfirieron al siguiente pozo, y así sucesivamente hasta terminar. Y a continuación se adicionaron 50 µL de la suspensión bacteriana (1×10^5 UFC/mL), reduciendo la primera dilución de los compuestos a 2560 µg/mL, y también se redujo el inóculo del microorganismo a una densidad final de 5×10^4 UFC/mL. El volumen final que cada pocito fue de 100 µL con las siguientes concentraciones 2560, 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 y 2.5 µg/mL.

Las tres primeras filas de la placa se utilizaron para los controles y se prepararon de manera similar a los compuestos; la primera fila fue destinada al control de toxicidad del disolvente (diluciones de DMSO + inóculo), la segunda fila se destinó al control positivo (gentamicina 0.25-250 µg/mL + inóculo), y la tercer fila al control negativo (medio de cultivo + inóculo) y al control de contaminación (medio de cultivo sin inocular).

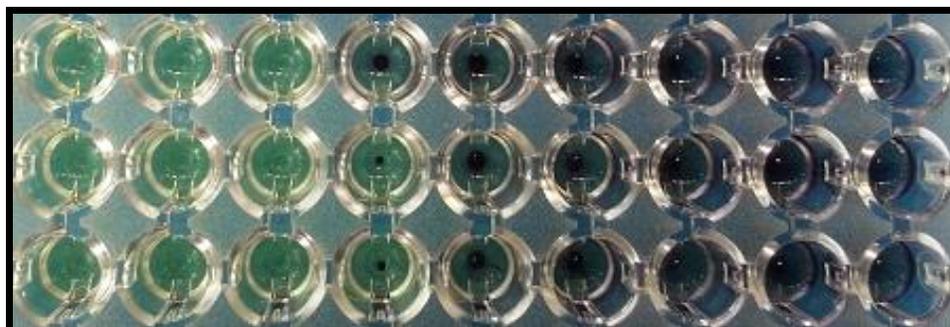
Las microplacas se incubaron a 37 °C en aerobiosis, por espacio de 18-24 horas. Después del tiempo de incubación, se realizó la observación visual de cada una de las concentraciones evaluadas y se procedió a la adición de 10 µL/pozo (5mg/mL) de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma®); las placas se incubaron por 30 minutos a 37 °C. El MTT es un indicador de actividad biológica debido a que actúa como aceptor de electrones y es reducido, desencadenando un color violeta cuando hay actividad de las bacterias (metabolismo activo) y quedando amarillo en caso contrario. Por consiguiente, consideramos la CIM, como la menor concentración del imidazolinilindol capaz de inhibir el desarrollo bacteriano (Ver Tabla 2).

Las pruebas se realizaron por triplicado en dos ensayos por separado para cada bacteria. Durante los ensayos se observó que el DMSO tiene un efecto inhibitorio sobre las bacterias en las dos primeras diluciones para *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli*, en el caso de *P. aeruginosa* se observó un efecto hasta la tercera dilución. Por lo cual los resultados se consideraron confiables en el rango de concentración de 640 a 2.5 µg/mL y 320 a 2.5 µg/mL respectivamente.

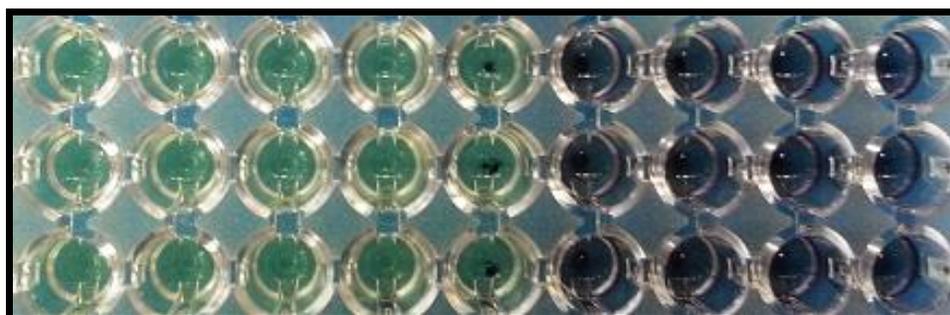
A continuación en la Figura 22 se muestran los resultados de un ensayo de la CIM de los imidazolinilindoles frente a *Staphylococcus aureus* (Los resultados frente a las otras bacterias se encuentran en el apartado 10.2 del Anexo):



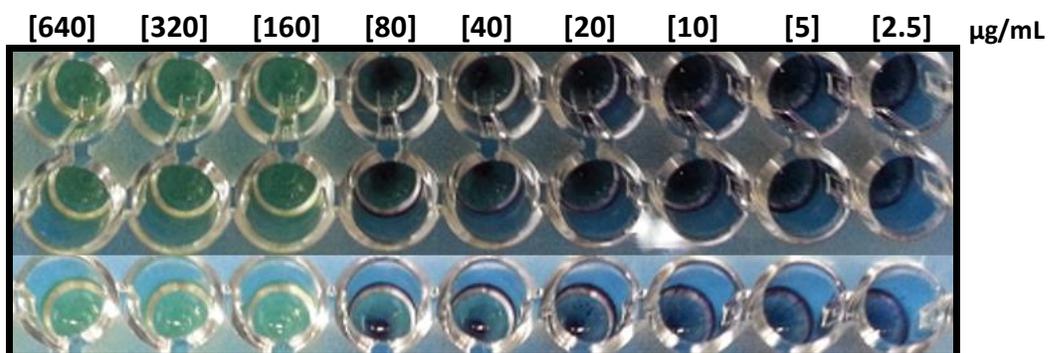
a) Controles: (a) controles negativos y (b) controles de contaminación



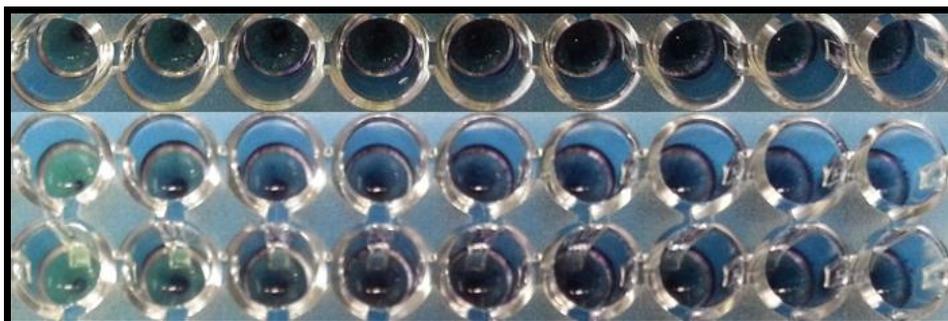
b) Imidazolinilindol 1 (CIM= 160 µg/mL)



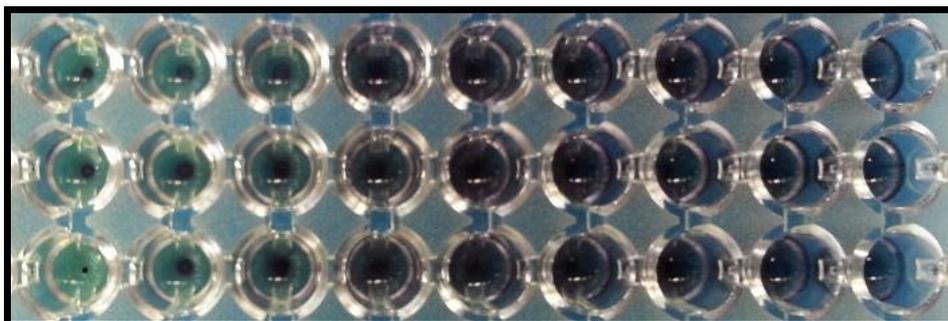
c) Imidazolinilindol 2 (CIM= 80 µg/mL)



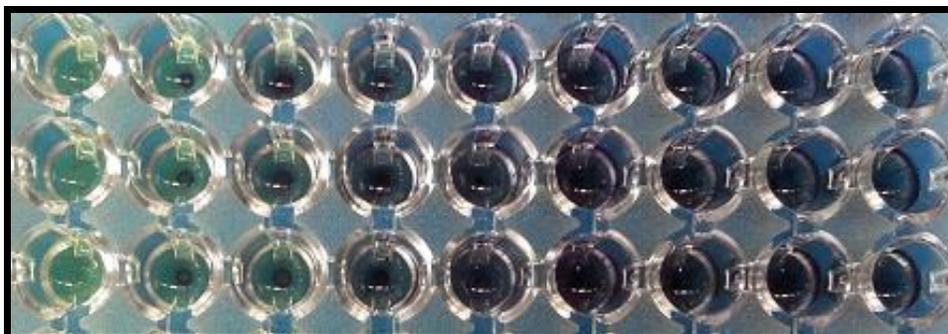
d) Imidazolinilindol 3 (CIM= 160 $\mu\text{g/mL}$)



e) Imidazolinilindol 4 (CIM> 640 $\mu\text{g/mL}$)



f) Imidazolinilindol 5 (CIM> 640 $\mu\text{g/mL}$)



g) Imidazolinilindol 6 (CIM= 640 $\mu\text{g/mL}$)

Figura 22. Resultados de la determinación de la CIM de los imidazolinilindoles frente a *S. aureus*. Los controles (inciso a), y los imidazolinilindoles 1-6 (incisos b-g).

7.9.2. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

A partir de las diluciones en las cuales no se observó crecimiento en el ensayo de CIM, de estas se tomaron inóculos con un asa calibrada y se colocaron en placas de agar soya tripticaseína, las cuales se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. La CMB se definió como la concentración más baja que demostró la destrucción de la población en un 99% (Figura 23), en algunos casos el pozo de la menor concentración del imidazolinilindol en el que no se observó crecimiento correspondió a la CMB. (Ver tabla 2).

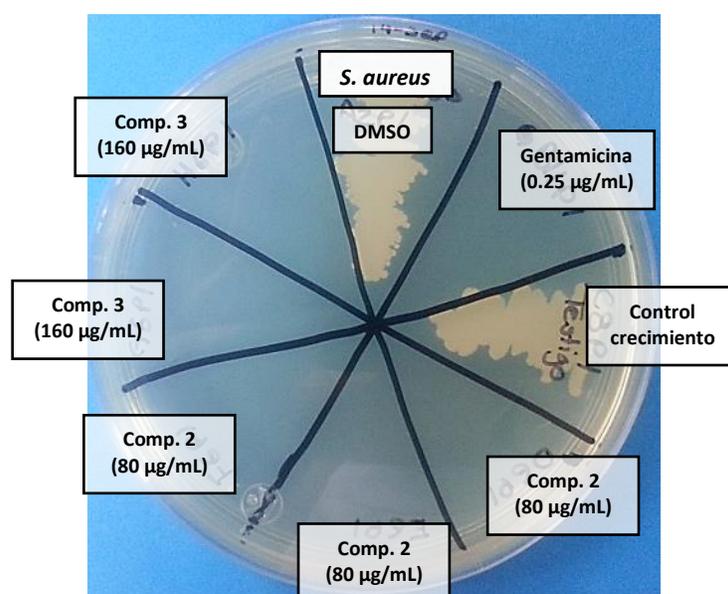


Figura 23. Determinación de la CMB de los imidazolinilindoles 2 y 3 frente a *S. aureus*.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Se realizó la síntesis de seis imidazolinilindoles en rendimientos del 30 al 75%.
- ❖ Se encontró que la ruta de síntesis de los imidazolimetil indoles vía el acetonitrilindol, es más eficiente que aquella que usa como sustrato el éster del ácido indolilacético correspondiente.
- ❖ Los compuestos obtenidos fueron caracterizados por medio de RMN ^1H , RMN ^{13}C , IR y espectrometría de masas.
- ❖ Se observó que la actividad antibacteriana de los imidazolinilindoles se favorece con la presencia del flúor en el anillo del indol, con la sustitución en posición 2 del indol por el anillo de imidazolina y por la ausencia del metileno que une a ambos heterociclos.
- ❖ Se encontró que las bacterias Gram positivas resultaron más susceptibles a los imidazolinilindoles que las bacterias Gram negativas.

9. REFERENCIAS

Acevedo-Qurioz M. E. Diseño y síntesis de pirrolidinoindolonas fluoradas como inhibidores selectivos de la butirilcolinesterasa. Tesis de Maestría. Departamento de Farmacología, Cinvestav, México, D.F. 2008.

Al-Qawasmeh A., Khanfar M., Semreen M., Odeh R., y Al-Tel T. Design and synthesis of new hybrid triazine-indole derivatives as potential antimicrobial agents against hospital resistant strains. *Heterocycles*. 2013; 87(11): 2385-2394.

Aminov R. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* 2010; 1: 134.

Boularot A., Giglione C., Petit S., Duroc Y., Larue V., Cresteil T., Dardel F., Artaud I. y Meinel T. Discovery and Refinement of a new structural class of potent peptide deformylase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2007; 50:10-20.

Branstrom A., Andrew A. M., Aleksey G., Gary K. y Jiashi W. Patente Antibacterial compounds and methods for use. WO 2013033258 A1. 2013; Disponible en: <http://www.google.com/patents/WO2013033258A1?cl=en> Consultada el día 4 de octubre de 2013.

Bremmer J. Some approaches to new antibacterial agents. *Pure Appl. Chem.* 2007; 79(12): 2143-2153.

Calvo J. y Martínez-Martínez L., Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfer. Infec. Clin.* 2009; 27(1): 44-52.

Casal M., Causse M. y Rodríguez-López F. Resistencia antimicrobiana en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Esp Quimioter* 2012; 25(1): 37-41.

Cordés-Jackson L., Machado-Reyes A. y Hamilton-Cordés M. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica*. 1998; 8(1): 13-27

Domínguez-Mendoza E. A. Síntesis de indolimidazolinas y espirooxindoles como posibles antidepresivos. Tesis de Maestría. Cinvestav México, D.F. 2012.

Dubey P. K., Babu B. y Narayana M. V. Synthesis of 2-indolylbenzimidazoles using Fischer's indole method. *Indian J. Chem.* 2007; 46B: 823-828.

Espinoza-Gómez F., Newton-Sánchez O., Melnikov V. y Pinzón L. Peritonitis bacteriana espontánea por *Listeria monocytogenes*, en un paciente con cirrosis hepática. Caso clínico. *Rev. Med. Chile*. 2006; 134: 1171-1174.

Evans J. y Hutchinson J. Seeing the future of bioactive lipid drug targets. *Nat. Chem. Biol.* 2010; 6: 476-479.

Fraune S. y Bosch T. Why bacteria matter in animal development and evolution. *Bioessays journal.* 2010; 32: 571-580.

Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau A., Barret M., Tarkka M., y Sarniguet A. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultura, Clinical, Environmental and Food Microbiologists. *Microbio. Mol. Biol. Rev.* 2011; 75(4): 583-608.

Furuya E. y Lowy F. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006; 4: 36-45.

García-Cortés V. Introducción a la microbiología. 2ª. Ed. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica, 2004; pp. 41-50.

García-Sánchez J. E., García-Merino E., Martín-del-Rey A. y García-Sánchez E. Antibioterapia para el siglo XXI, antibacterianos para la segunda decada. ¿Posibilidades o realidades en un futuro? *Rev. Esp. Quimioter.*, 2012; 25(2): 100-121.

Giedraitienė A., Vitkuskienė A., Naginienė R. y Pavilionis A. Antibiotic Resistance Mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas).* 2011; 47(3): 137-146.

Gray M. J., Freitag N. E. y Boor K. J. How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infect. Immun.* 2006; 74: 2505-2512.

Guilhelmello F., Vilela N., Albuquerque P., Derengowski L., Silva-Pereira I. y Kyaw C. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 353.

Ishibashi F., Nashima T., Nishino J., Kobayashi I., Ichihara Y., Kitagawa Y., Sasaki S., Yoshikawa M., Matsuoka A. y Yamamoto K. Geometrical Isomerism of Phenylhydrazones of α -ceto esters. II. *p*-Substituted phenylhydrazones of ethyl pyruvate and 2,4-dinitrophenylhydrazones of some α -ceto esters. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1986; 59: 73-76.

Jin A., Ning-Jie C., Li-Dong S., Yu-Qin J., Ying M., Jia-Rong C. y Wen-Jing X. Efficient and general synthesis of oxazino[4,3- α]indoles by cascade addition-cyclization reactions of (1*H*-indol-2-yl)methanols and viny sulfonium salts. *Chem. Commun.* 2011; 47: 1869-1871.

Kenneth T. Bacterial Resistance to Antibiotics. Online Textbook of Bacteriology. 2011. Disponible en http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html.

Koenig S., Dankwardt J. W., Liu Y., Zhao H., Singh S. P. A ligand-free, copper-catalyzed cascade sequence to indole-2-carboxylic ester. *Tetrahedron Lett.* 2010; 51: 6549-6551.

Limban C. y Chifiriuc M. Antibacterial activity of new Dibenzoxepinone oximes with fluorine and trifluoromethyl group substituents. *Int. J. of Mol. Sci.* 2011; 12: 6432-6444.

MacDougall C. y Gumbo T. En: Qumioterapia de enfermedades microbianas. Goodman y Gilman. Las bases de la Terapéutica. 12ª. Edición. Mc Graw-Hill interamericana editores. México. 2012; pp. 1505-1570.

McFall-Ngai M., Hadfield M., Bosch T., Carey H., Domazet-Loso T., Douglas A., Dubilier N., Eberl G., Fukami T., Gilbert S., Hentschel U., King N., Kjellerberg S., Knoll A., Kremer N., Mazmanian S., Metcalf J., Nealon K. y Pierce N.. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013; 9: 3229-3236.

Mendoza-Medellín A. El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Rev. Fsc. Med. UNAM.* 2011; 54(1): 18-27.

Mesaros N., Nordmann P., Plésiat M., Rousel-Delvallez M., Eldere J., Glupczynski Y., Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P y Bambeke F. *Pseudomonas aureginosas*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millenium. *Clin. Microbial Infect.* 2007; 13: 560-578.

Miranda G. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Bol. Med. Infant. Mex.* 2011; 68(4): 262-270.

Murillo-Llanes J., Varon J., Velarde-Félix J. S. y González-Ibarra F. P. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in Mexico: How serious is the problem? *J. Infect. Citries.* 2012; 6(2): 126-131.

Neu H. y Gootz T. Antimicrobial Chemotherapy. In: Medical Microbiology. 4th edition. Baron S, editor. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7986/>

Normark H. y Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 2002; 252(2): 91-106.

Ochoa S. A., López-Montiel F., Escalona G., Cruz-Córdoba A., Dávila L., López-Martínez B., Jiménez-Tapia Y., Giono S., Eslava C., Hernández-Castro. y Xicohtencatl-Cortes J. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aureginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol. Med. Hosp. Mex.* 2013; 70(2): 138-150.

Pahissa A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Ed. Marge Medica Books. Barcelona, España. 1ra. Ed. 2009; pp. 15-42.

Panchal R. G., Ulrich R. L., Lane D., Butler M. M., Houseweart C., Opperman T., Williams J.D., Peer N.P., Moir D.T., Nguyen T., Gussio R., Bowlin T. y Bavari S. Novel broad-spectrum Bis-(imidazolinyndole) derivates with potent antibacterial activities against antibiotic-resistant strains. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 2009; 53: 4283-4291.

Rodríguez-Rojas A., Rodríguez-Beltrán J., Couce A. y Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013; 303: 293-297.

Salton M., Kim K. Structure. In: Chapter 2. Medical Microbiology. Baron S, editor. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8477/>

Servi S., Genc M., Gür S. y Koca M. The synthesis and antimicrobial activity of some new methyl *N* arylthiocarbamates, dimethyl *N*-aryldithiocarbonimidates and 2-arylamino-2-imidazolines. *European J. Med. Chem.* 2005; 40: 687-693.

Shanmugasundaram P. Vijayakumar B., Devadass G., Reddy A. y Aanandhi M.V. Synthesis and biological activity of novel imidazoline derivates. *Rasayan J. Chem.* 2009; 2: 890-894.

Sharma V., Kumar P. y Pathak D. Biological Importance of the indole Nucleus in Recent years: A Comprehensive Review. *J. Heterocyclic Chem.* 2010; 47: 491-502.

Spadoni G., Diamantini G., Bedini A., Tarzia G., Vacondio F., Silva C., Rivara M., Mor M., Plazzi P., Zusso M. y Franceschini D. Synthesis, antioxidant activity and structure-activity relationships for a new series of 2-(*N*-acylaminoethyl)indoles with melatonin-like cytoprotective activity. *J. Pinela. Res.* 2006; 40: 259-269.

Swaminathan B. y Gerner-Smidt P., The epidemiology of human listeriosis. *Microb. Infect.* 2007; 9: 1236-1243.

Tortora G. J., Funke, B. R. y Case C. L. Introducción a la microbiología. 9° Ed. Editorial Médica Panamericana. México, 2007; pp. 582-590.

Wysong V. y Whithe H. C. Substituted imidazolinyndoles. United States Patent Office 3,586,695. 1968.

Zhang F., Zhao Y., Sun L., Ding L., Gu Y. y Gong P. Synthesis and anti-tumor activity of 2-amino-3-cyano-6-(1*H*-indol-3-yl)-4-phenylpyridine derivates *in vitro*. *Eur. J. Med. Chem.* 2011; 46: 3149-3157.

10. ANEXO

10.1. Espectros y Tablas de RMN ^1H y ^{13}C

10.2. Resultados de la evaluación biológica

10.2.1. Resultados de la concentración inhibitoria mínima de los imidazolinilindoles frente a *Listeria monocytogenes*

10.2.2. Resultados de la concentración inhibitoria mínima de los imidazolinilindoles frente a *Escherichea coli*

10.2.3. Resultados de la concentración inhibitoria mínima de los imidazolinilindoles frente a *Pseudomona aeruginosa*

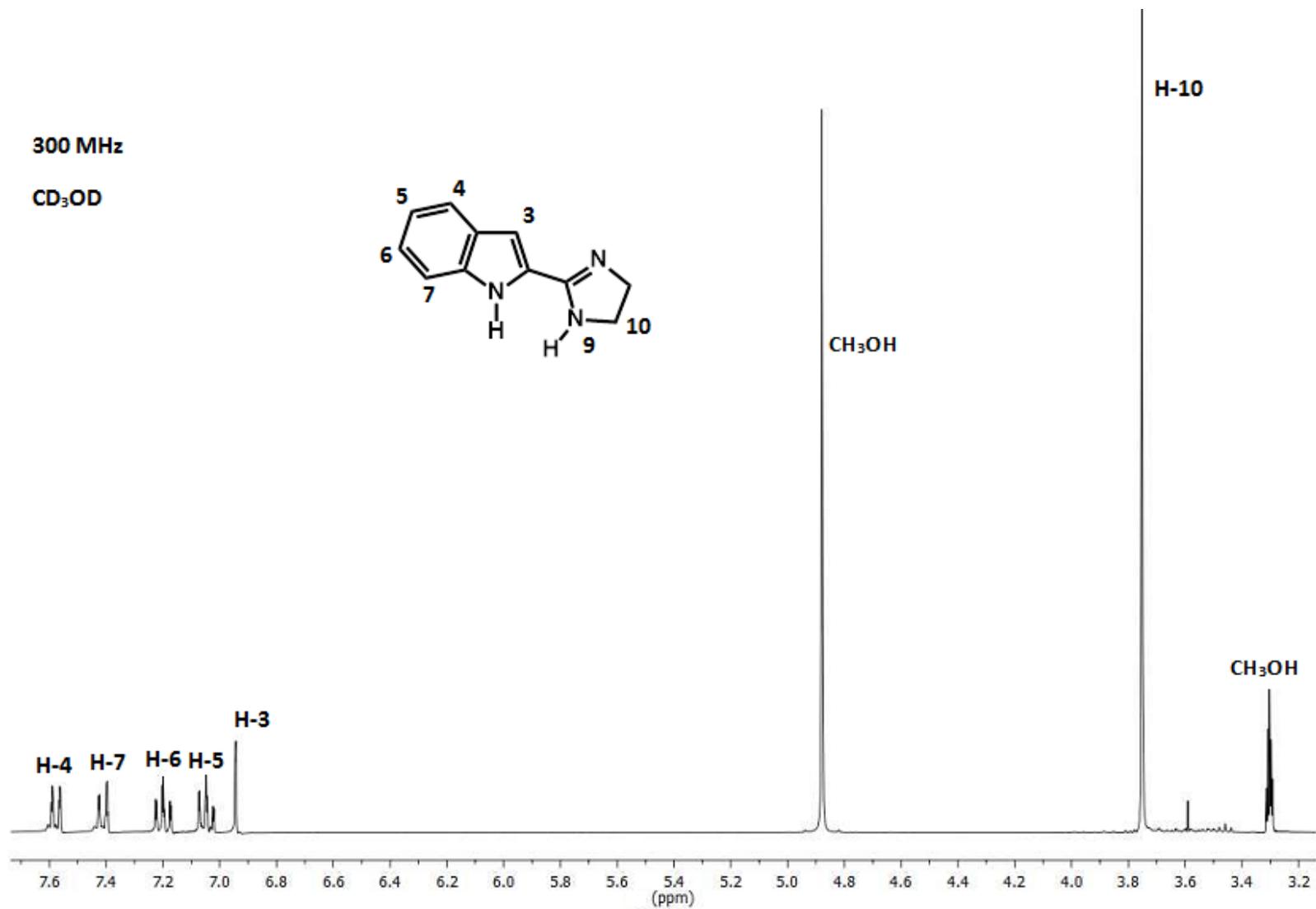


Figura 24. Espectro de RMN ¹H del imidazolinilindol 1.

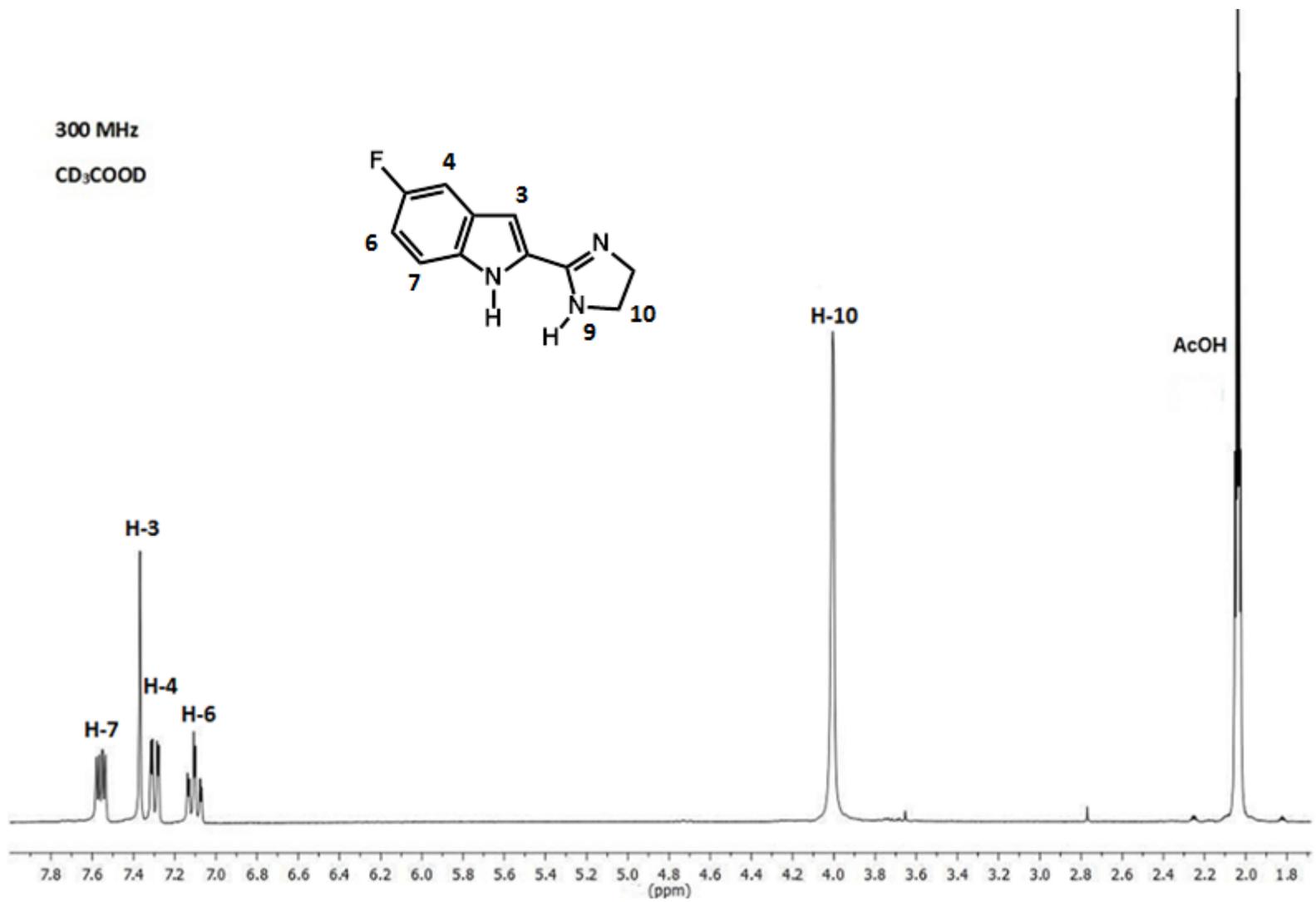


Figura 25. Espectro de RMN ¹H del imidazolinilindol 2.

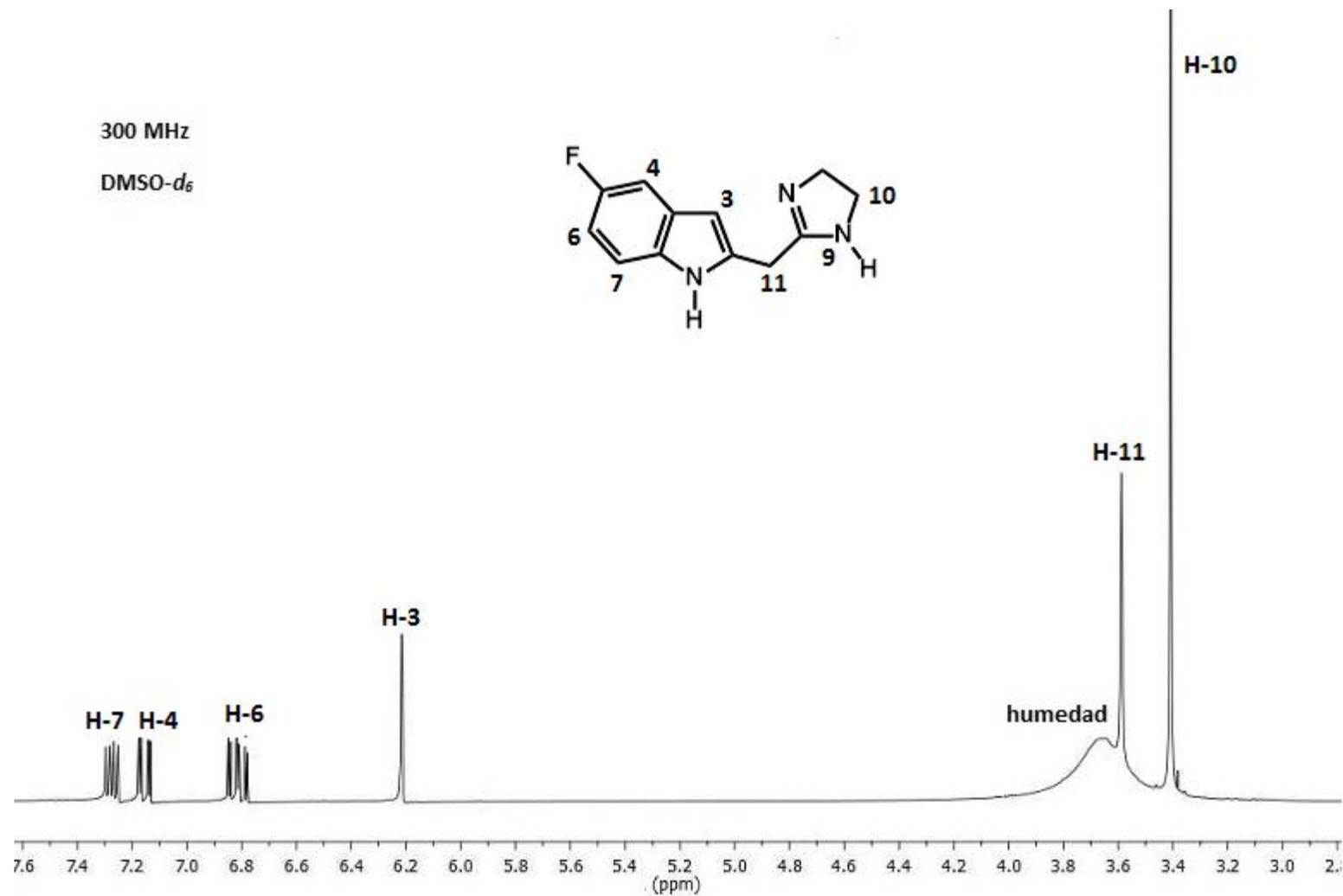


Figura 26. Espectro de RMN ¹H del imidazolinilindol 3.

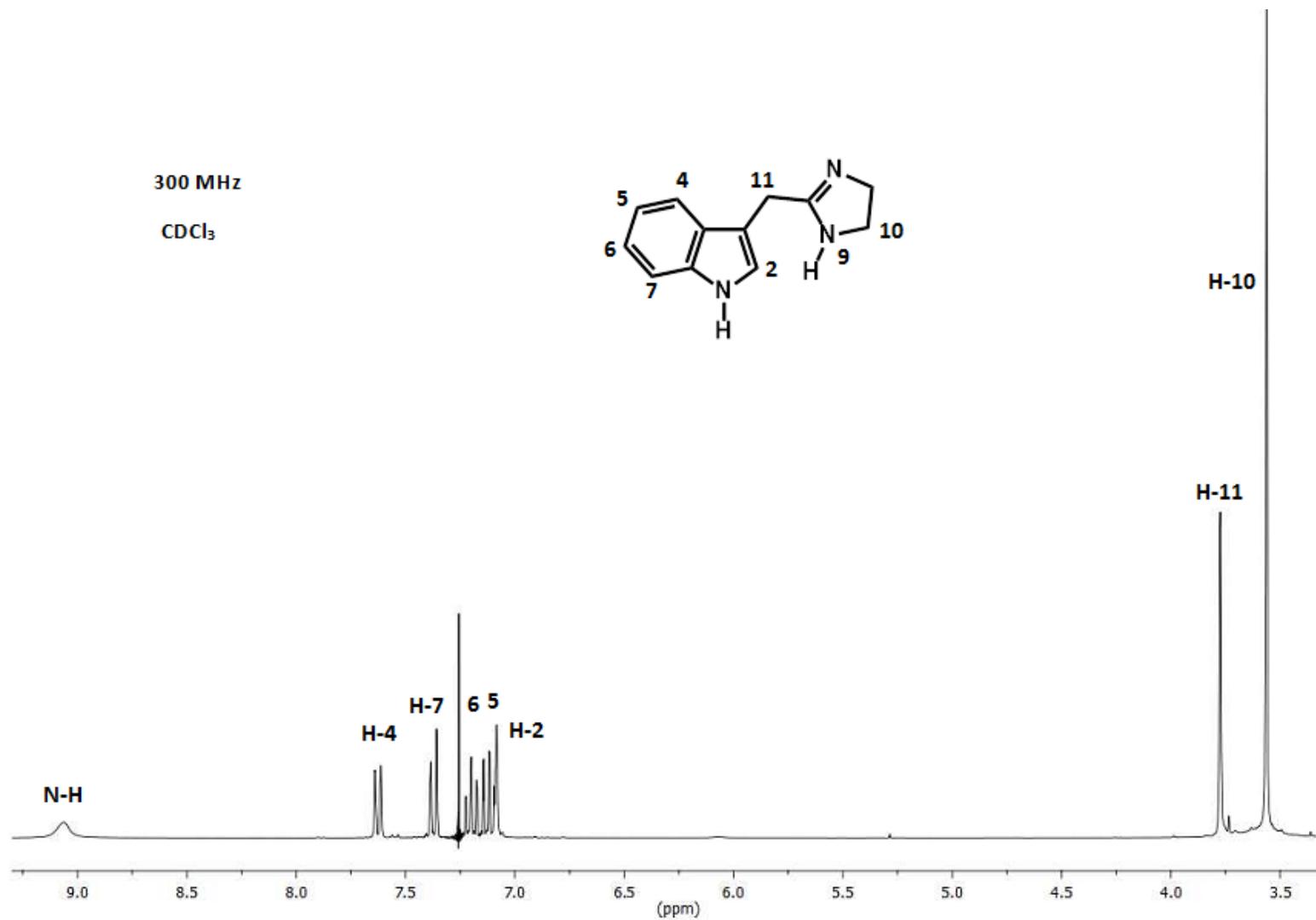


Figura 27. Espectro de RMN ¹H del imidazolinilindol 4.

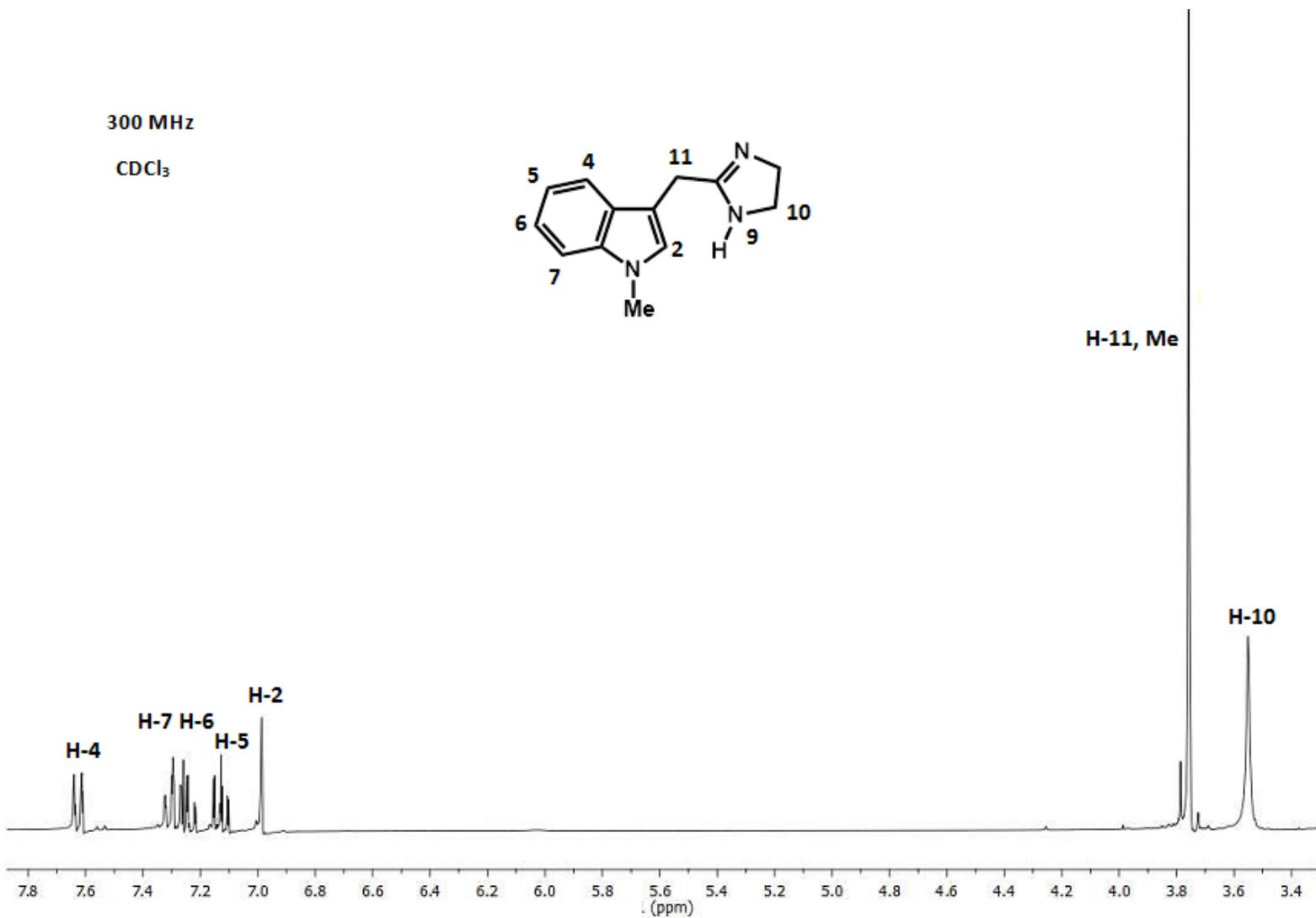


Figura 28. Espectro de RMN ¹H del imidazolinilindol **5**.

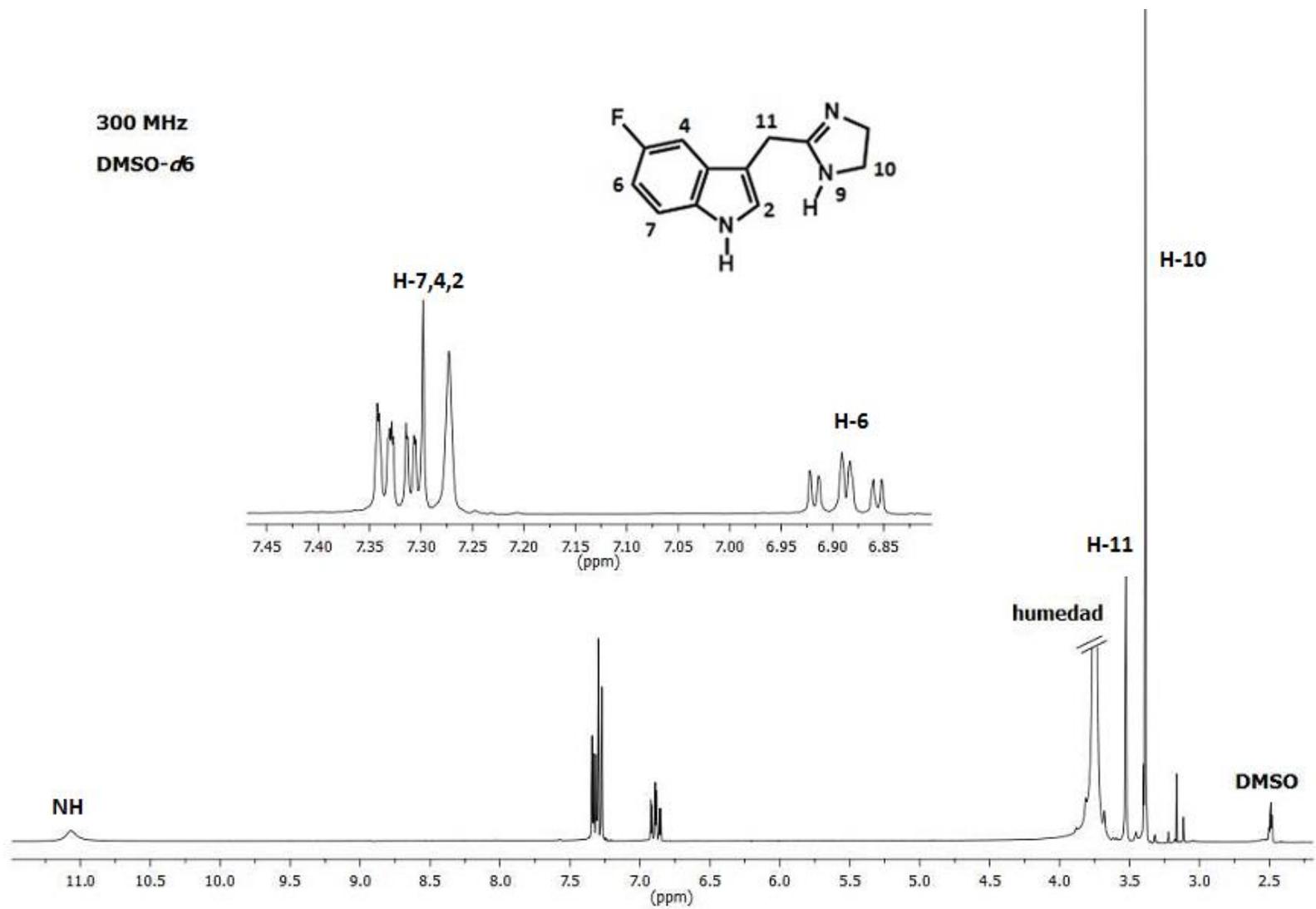


Figura 29. Espectro de RMN ¹H del imidazolinilindol 6.

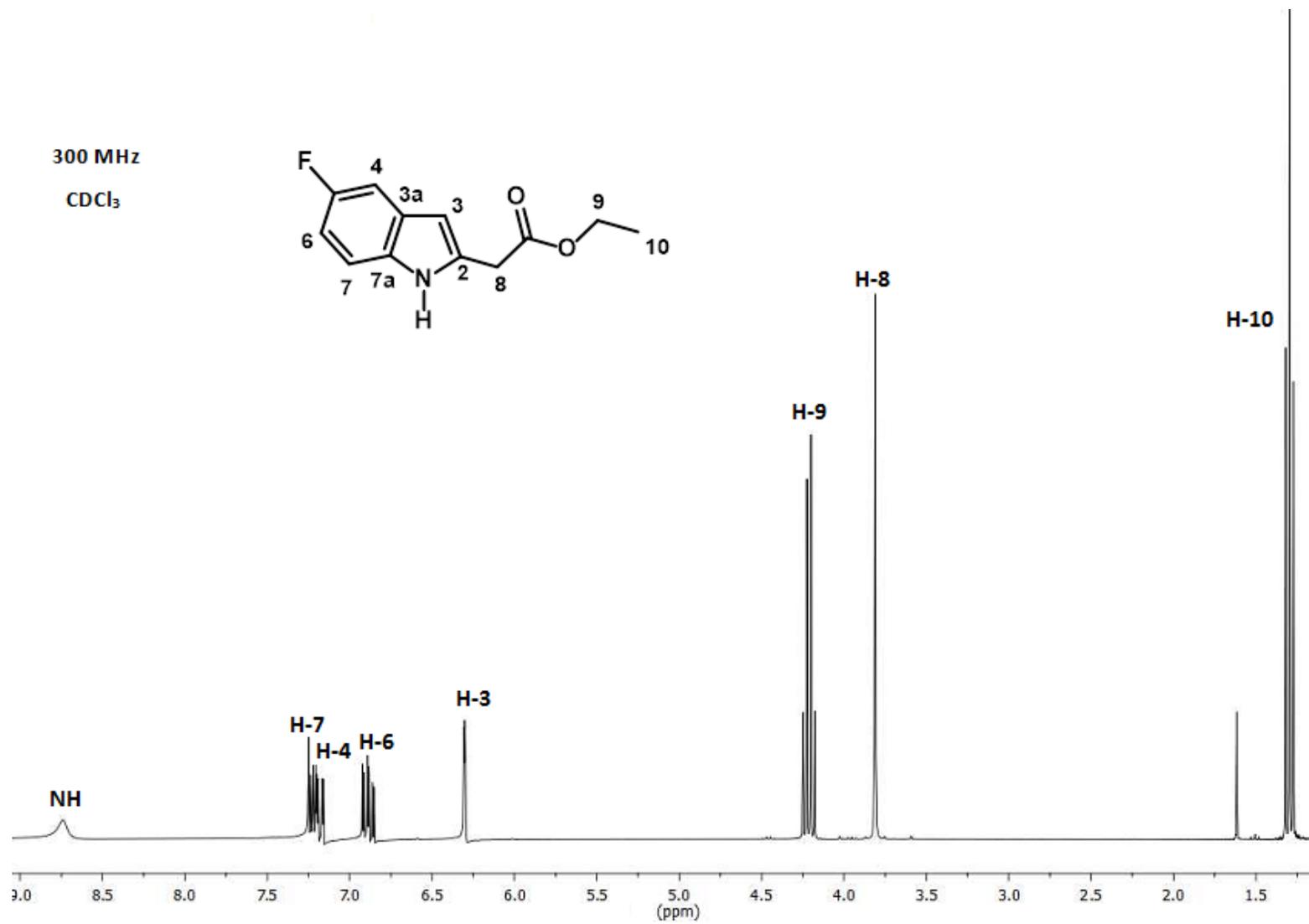
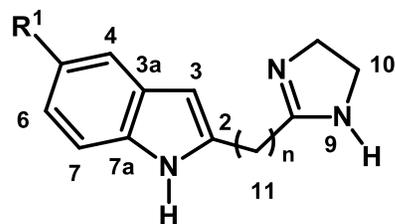


Figura 30. Espectro de RMN ¹H del 2-(5-Fluoro-1*H*-indol-2-il)acetato de etilo 13.

Tabla 3. Datos de RMN ^1H de los imidazolinilindoles **1**, (CD_3OD), **2** (CD_3COOD) y **3** ($\text{DMSO}-d_6$) con TMS como referencia interna. Desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (ppm) y constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).



1: $\text{R}^1 = \text{H}$, $n = 0$

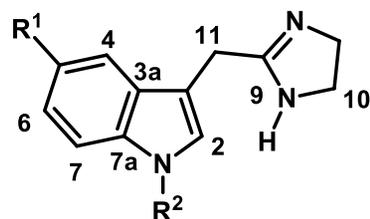
2: $\text{R}^1 = \text{F}$, $n = 0$

3: $\text{R}^1 = \text{F}$, $n = 1$

		H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-10	H-11
1^a	δ	6.94 s	7.58 <i>dm</i>	7.05 <i>td</i>	7.20 <i>td</i>	7.41 <i>dm</i>	3.75 s	-
	J	-	8.2	8.2, 1.2	8.2, 1.2	8.2	-	-
2^a	δ	7.36 s	7.29 <i>dd</i>	-	7.11 <i>td</i>	7.55 <i>dd</i>	4.01 s	-
	J	-	9.4, 2.4	-	9.4, 2.4	9.1, 4.4	-	-
3	δ	6.22 <i>dm</i>	7.16 <i>dd</i>	-	6.82 <i>ddd</i>	7.29 <i>dd</i>	3.41 <i>sa</i>	3.59 s
	J	0.7	10.1, 2.5	-	9.7, 8.8, 2.6	8.8, 4.7	-	-

^aLos hidrógenos lábiles unidos a nitrógeno (N-H) intercambian con el deuterio del disolvente.

Tabla 4. Datos de RMN ^1H de los imidazolinilindoles **4**, **5** (CDCl_3) y **6** ($\text{DMSO}-d_6$) con TMS como referencia interna. Desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (ppm) y constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).



4: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$
 5: $\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{Me}$
 6: $\text{R}^1 = \text{F}, \text{R}^2 = \text{H}$

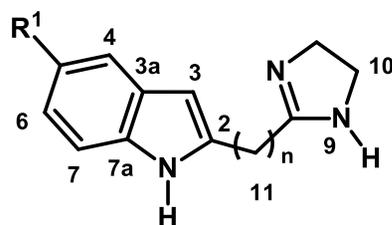
		H-2	H-4	H-5	H-6	H-7	H-9	H-10	H-11
4	δ	6.96 <i>sa</i>	7.53 <i>dm</i>	7.04 <i>td</i>	7.12 <i>td</i>	7.33 <i>dm</i>	4.30 <i>sa</i>	3.45 <i>s</i>	3.67 <i>s</i>
	J	-	7.9	7.5, 1.2	7.5, 1.2	7.9	-	-	-
5	δ	7.00 <i>sa</i>	7.63 <i>dm</i>	7.13 <i>td</i>	7.25 <i>td</i>	7.31 <i>dm</i>	4.15 <i>sa</i>	3.55 <i>s</i>	3.76 <i>s</i>
	J	-	8.1	7.4, 1.2	7.4, 1.2	8.1	-	-	-
6	δ	7.27 <i>sa</i>	7.29-7.35 <i>m</i>	-	6.88 <i>td</i>	7.29-7.35 <i>m</i>	11.10 <i>sa</i>	3.38 <i>s</i>	3.23 <i>s</i>
	J	-	-	-	9.3, 2.4	-	-	-	-

4: 10.13 (1H, N-H, *sa*);

5: 3.76 (3H, N-Me, *s*);

6: 11.07 (1H, N-H, *sa*).

Tabla 5. Datos de RMN ^{13}C de los imidazolinilindoles **1**, (CD_3OD), **2** (CD_3COOD) y **3** ($\text{DMSO-}d_6$) con TMS como referencia interna. Desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (ppm).



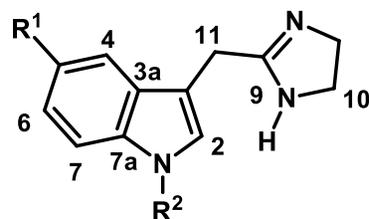
1: $\text{R}^1 = \text{H}$, $n = 0$

2: $\text{R}^1 = \text{F}$, $n = 0$

3: $\text{R}^1 = \text{F}$, $n = 1$

	C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-10	C-11
1	127.9	104.1	127.1	119.7	120.9	123.5	111.3	137.1	160.1	49.0	-
2	121.7	111.4	128.0	107.0	160.0	116.7	115.5	136.5	159.5	45.7	-
3	136.8	100.2	128.4	103.9	156.9	108.2	111.7	132.9	164.4	49.3	28.2

Tabla 6. Datos de RMN ^{13}C de los imidazolinilindoles **4**, **5** (CDCl_3) y **6** ($\text{DMSO}-d_6$) con TMS como referencia interna. Desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (ppm).

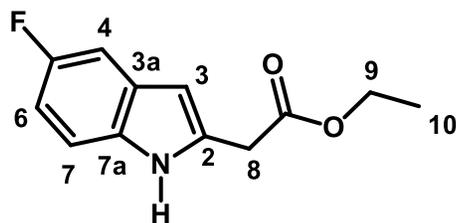


4: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$
 5: $\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{Me}$
 6: $\text{R}^1 = \text{F}, \text{R}^2 = \text{H}$

	C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-10	C-11
4	123.5	108.7	126.9	118.2	119.2	121.7	111.5	136.4	167.9	49.2	25.5
5	127.6	108.5	127.6	118.8	119.3	121.9	109.3	137	167.3	49.9	25.8
6	126.1	109.7	127.6	103.6	156.9	109.3	112.5	133	167.2	49.1	25.3

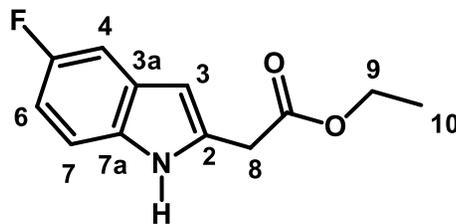
4: 32.6 (N-Me).

Tabla 7. Datos de RMN ^1H de 2-(5-Fluoro-1*H*-indol-2-il)acetato de etilo **13** en CDCl_3 con TMS como referencia interna. Desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (ppm) y constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).



		H-3	H-4	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	NH
13	δ	6.30 <i>dm</i>	7.18 <i>dd</i>	6.89 <i>ddd</i>	7.24 <i>dd</i>	3.81 <i>s</i>	4.21 <i>q</i>	1.30 <i>t</i>	8.73 <i>sa</i>
	J	1.2	9.6, 2.5	9.2, 8.8, 2.4	8.5, 4.1	-	7.1	7.1	-

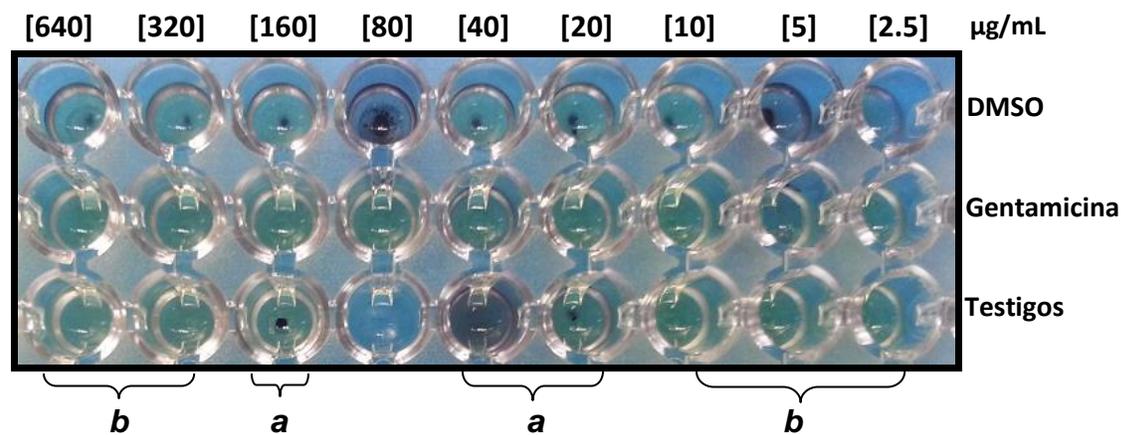
Tabla 8. Datos de RMN ^{13}C de 2-(5-Fluoro-1*H*-indol-2-il)acetato de etilo **13** en CDCl_3 con TMS como referencia interna. Desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (ppm).



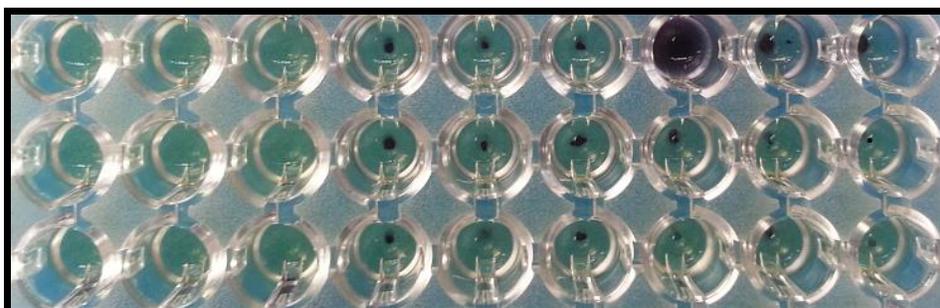
	C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9	C-10	C=O
13	132.4	101.9	128.5	104.9	157.7	109.9	111.3	132.7	33.8	61.4	14.1	170.5

10.2. Resultados de la evaluación antibacteriana

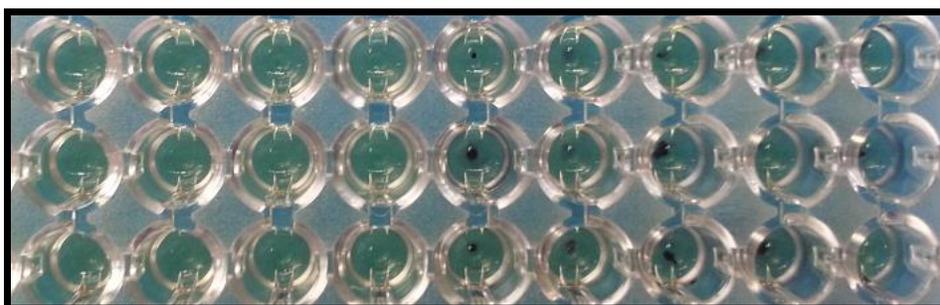
10.2.1. Resultados de la concentración inhibitoria mínima de los imidazolinilindoles frente a *Listeria monocytogenes* (Figura 31):



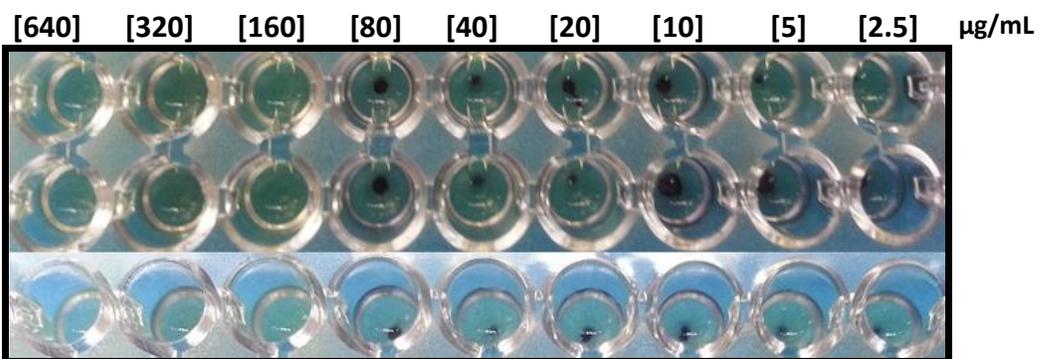
a) Controles: (a) controles negativos y (b) controles de crecimiento.



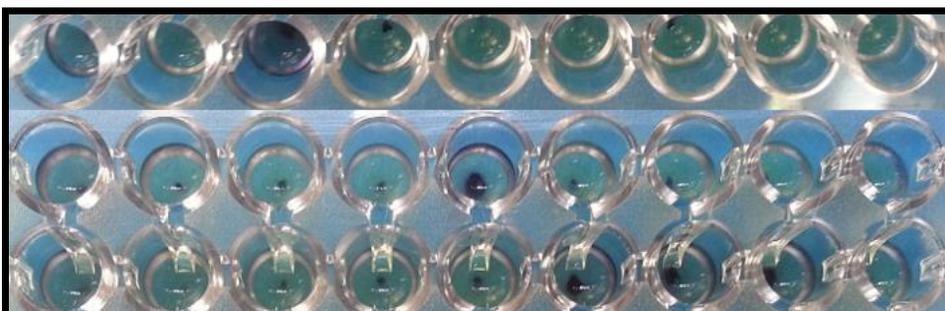
b) Imidazolinilindol 1 (CIM= 160 $\mu\text{g/mL}$)



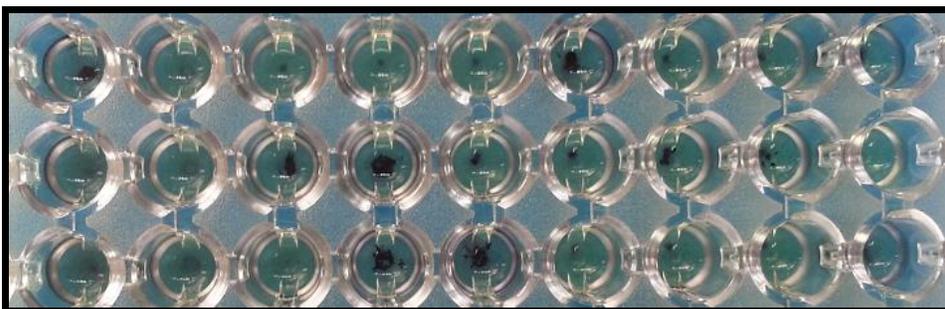
c) Imidazolinilindol 2 (CIM= 80 $\mu\text{g/mL}$)



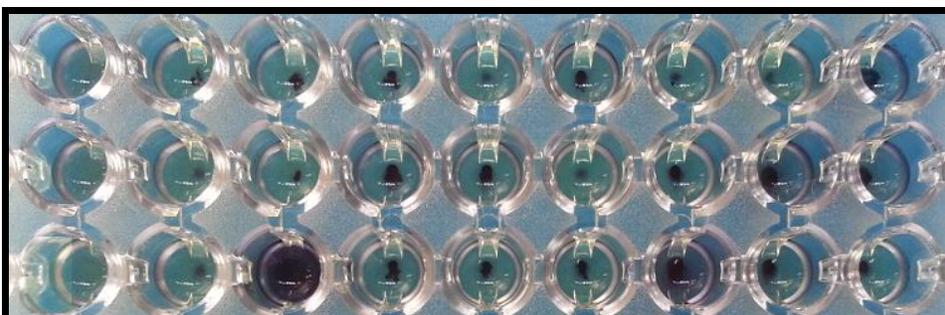
d) Imidazolinilindol **3** (CIM= 160 $\mu\text{g/mL}$)



e) Imidazolinilindol **4** (CIM> 640 $\mu\text{g/mL}$)



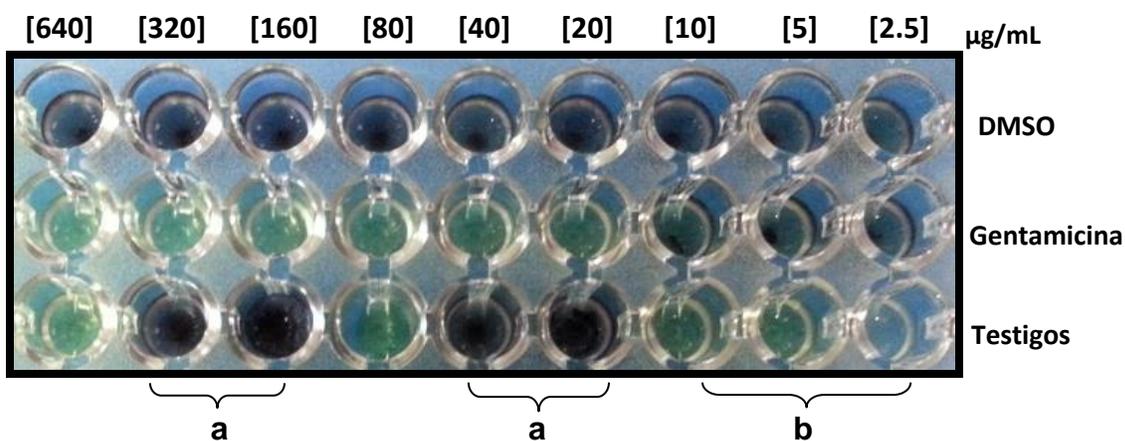
f) Imidazolinilindol **5** (CIM> 640 $\mu\text{g/mL}$)



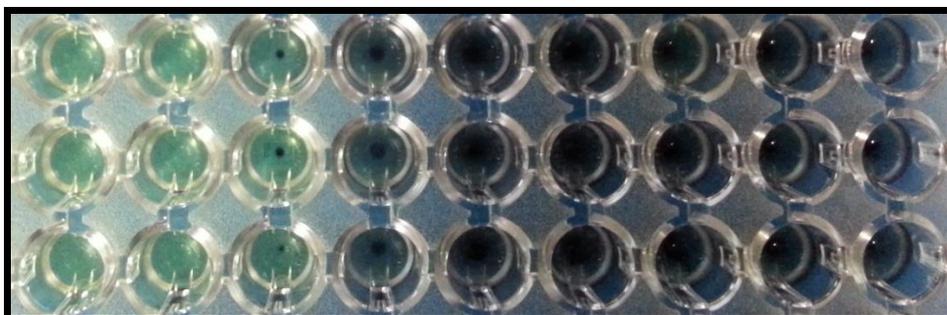
g) Imidazolinilindol **6** (CIM= 640 $\mu\text{g/mL}$)

Figura 31. Resultados de la determinación de la CIM de los imidazolinilindoles frente a *L. monocytogenes*. Los controles (inciso **a**), y los imidazolinilindoles **1-6** (incisos **b-g**)

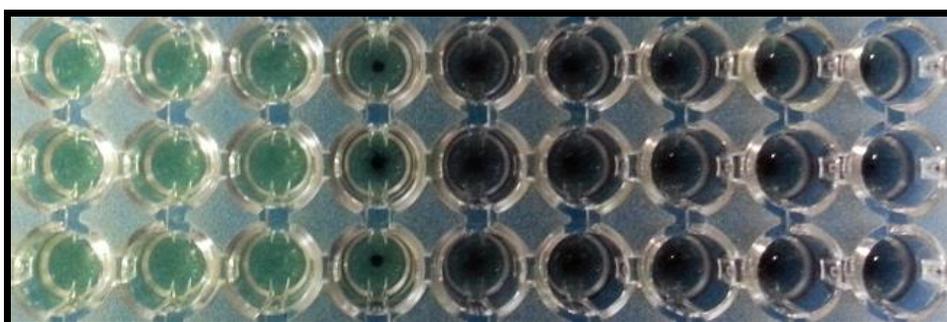
10.2.2. Resultados de la concentración inhibitoria mínima de los imidazolinilindoles frente a *Escherichia coli* (Figura 32):



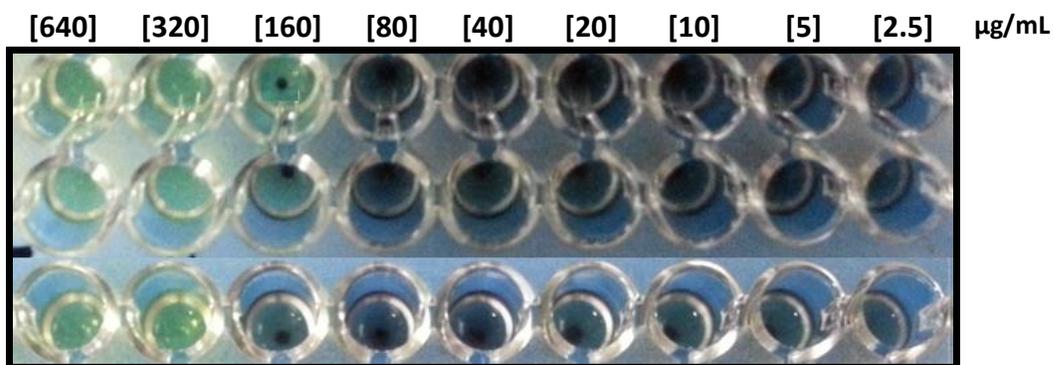
a) Controles: (a) controles negativos y (b) controles de crecimiento.



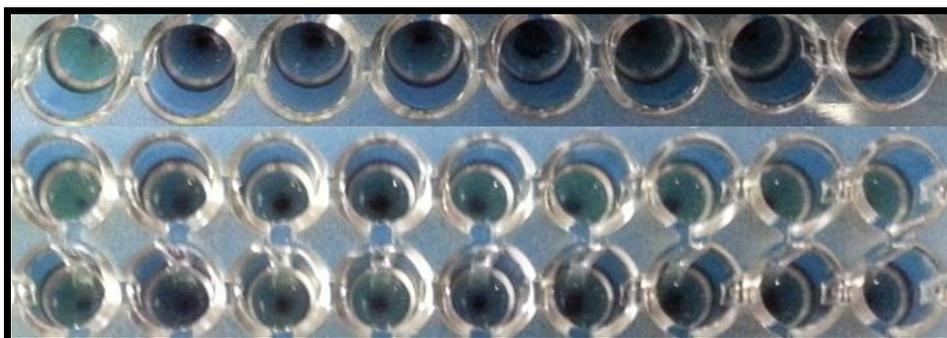
b) Imidazolinilindol 1 (CIM= 320 $\mu\text{g/mL}$)



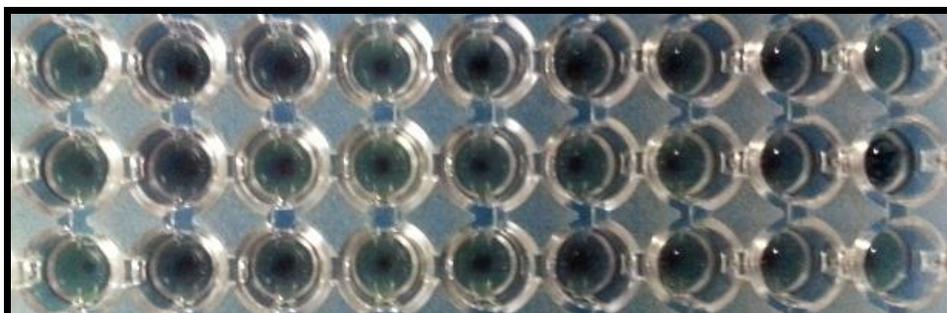
c) Imidazolinilindol 2 (CIM= 160 $\mu\text{g/mL}$)



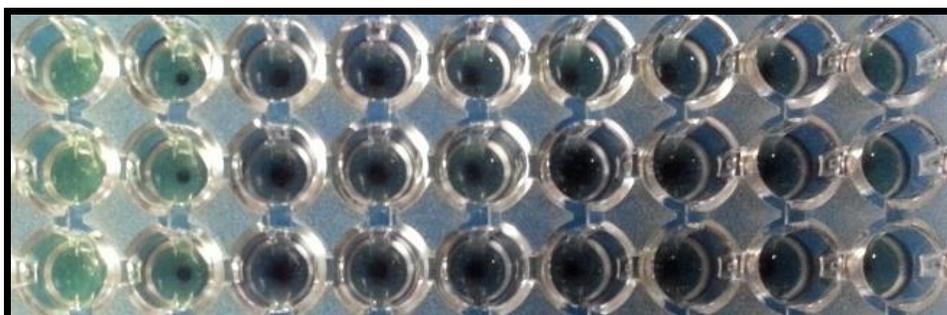
d) Imidazolinilindol 3 (CIM= 320 $\mu\text{g/mL}$)



e) Imidazolinilindol 4 (CIM> 640 $\mu\text{g/mL}$)



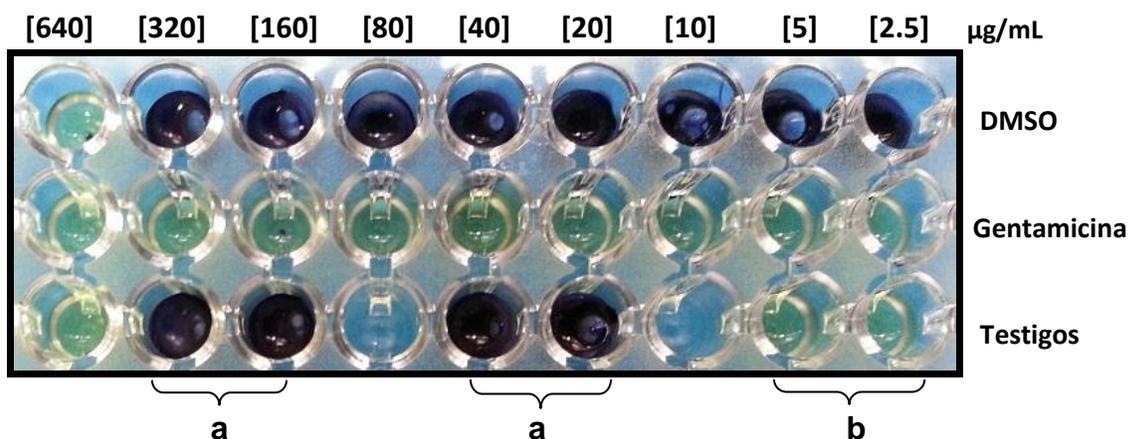
f) Imidazolinilindol 5 (CIM> 640 $\mu\text{g/mL}$)



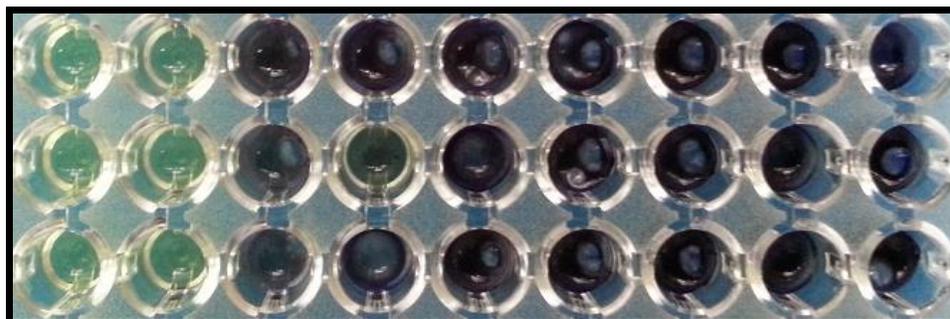
g) Imidazolinilindol 6 (CIM= 640 $\mu\text{g/mL}$)

Figura 32. Resultados de la determinación de la CIM de los imidazolinilindoles frente a *E. coli*. Los controles (inciso a) y los imidazolinilindoles 1-6 (incisos b-g).

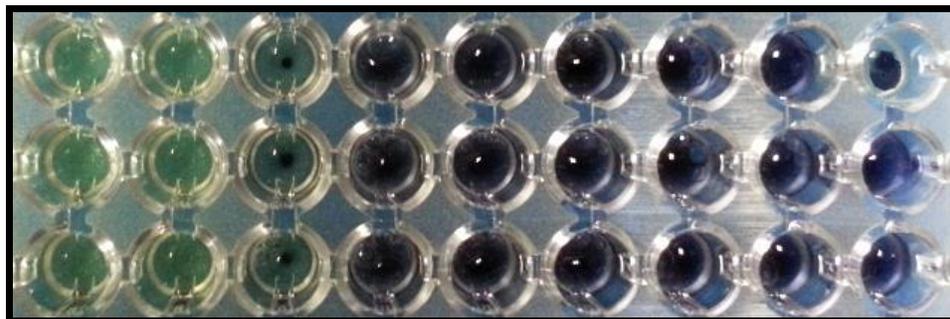
10.2.3. Resultados de la concentración inhibitoria mínima de los imidazolinilindoles frente a *Pseudomona aeruginosa* (Figura 33):



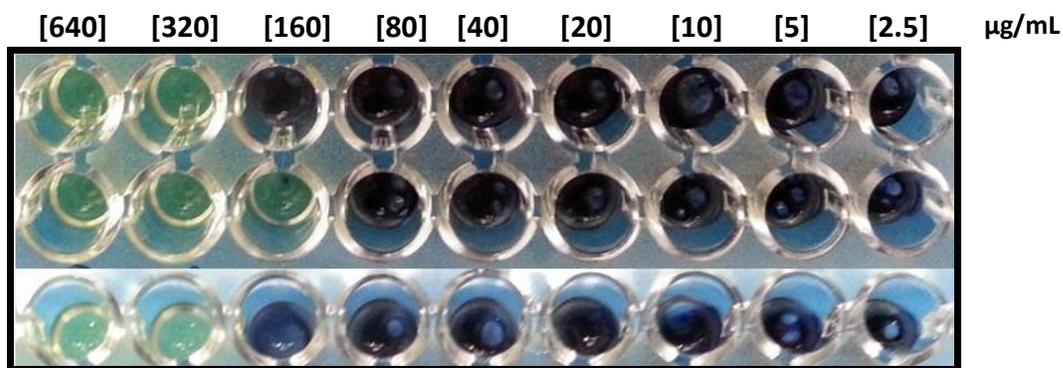
a) Controles: (a) controles negativos y (b) controles de crecimiento.



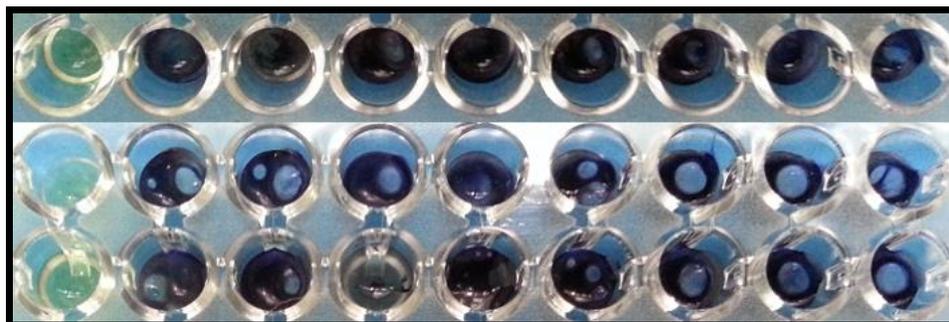
b) Imidazolinilindol 1 (CIM= 320 µg/mL)



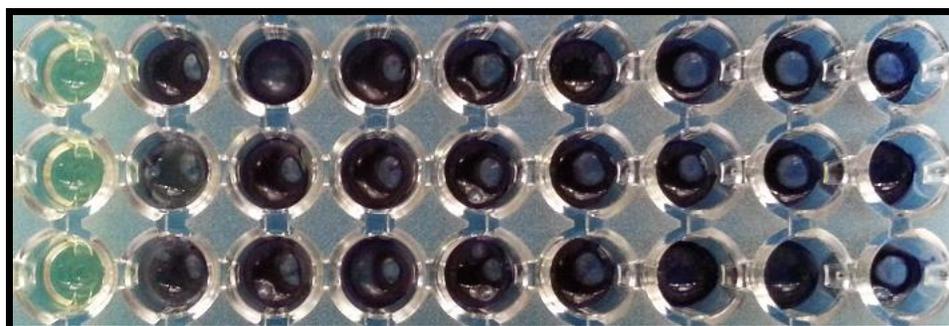
c) Imidazolinilindol 2 (CIM= 320 µg/mL)



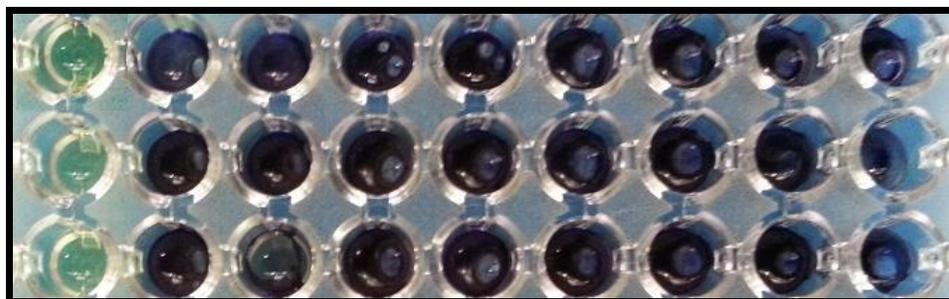
d) Imidazolinilindol 3 (CIM= 320 $\mu\text{g/mL}$)



e) Imidazolinilindol 4 (CIM> 320 $\mu\text{g/mL}$)



f) Imidazolinilindol 5 (CIM> 320 $\mu\text{g/mL}$)



g) Imidazolinilindol 6 (CIM> 320 $\mu\text{g/mL}$)

Figura 33. Resultados de la determinación de la CIM de los imidazolinindoles frente a *P. aeruginosa*. Los controles (inciso a) y los imidazolinilindoles 1-6 (incisos b-g).