



Universidad de La Laguna

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética

“Evaluación de la actividad antimicrobiana de triazoles obtenidos por síntesis”

“Evaluation of the antimicrobial activity of triazole obtained by synthesis”

Sergio Bethencourt Aguilar
Grado en Biología
Julio de 2015

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014_/2015__	ENTRADA Fecha: Núm:
---	----------------------------------

Datos Personales


Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
51150297E	Sergio Bethencourt Aguilar
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
649649073	sergiokh93@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO


Evaluación de la actividad antimicrobiana de triazoles obtenidos por síntesis

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Laila Moujir Moujir	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética y D./Dña.	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: Laila Moujir Moujir	Fdo.:

La Laguna, a __6__ de Julio _____ de 2015__

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Índice

Resumen	4
1. Introducción	5
2. Objetivos	9
3. Material y métodos	
3.1 Microorganismos	10
3.2 Productos químicos	10
3.3 Medios de cultivo y soluciones de trabajo	10
3.4 Preparación de los inóculos microbianos	11
3.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) e CMI ₅₀	12
4. Resultados y discusión	
4.1 Determinación de la actividad antimicrobiana de los triazoles	14
4.2 Relación estructura-actividad	18
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía	23

Resumen

Las enfermedades infecciosas siguen siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial. El aumento en su incidencia se debe a la emergencia de enfermedades que se creían bajo control, la aparición de nuevas enfermedades infecciosas y el desarrollo de resistencia a los antibióticos.

Los azoles han sido tradicionalmente usados como antifúngicos, no obstante, los compuestos heterocíclicos que contienen 1,2,4-triazoles y 1,2,3-triazoles han despertado un gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos, por las variedad de actividades biológicas que exhiben. Por ello, en este trabajo pretendemos estudiar la actividad antimicrobiana de nuevos 1,2,3-triazoles frente a una amplia variedad de microorganismos mediante el método de microdilución en medio líquido.

Todos los microorganismos resultaron ser insensibles a la acción de los triazoles, al menos hasta una concentración de 20 µg/ml (CMI>20 µg/ml), al igual que el fluconazol, utilizado como control de referencia, a excepción de *C. albicans* (CMI 4 µg/ml). Sin embargo, los compuestos ST-3, ST-24 y ST-29 produjeron una inhibición del crecimiento de al menos el 50% en *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. smegmatis* y *B. subtilis*, con respecto al control (CMI₅₀ entre 20 y 5 µg/ml). El análisis de la relación estructura-actividad reveló que la presencia de un grupo propilo (ST-3), bifenilo (ST-29) o bromofenilo (ST-24) en posición 4 del triazol, deben de jugar algún papel en la expresión de la actividad.

Palabras clave: antimicrobiano - relación estructura-actividad - triazol

Abstract

Infectious diseases are still the second cause of death in the world. This is due to the emergence of diseases that were thought under control, the appearance of new infectious diseases and the development of antibiotics resistances.

Azoles had been traditionally used as an antifungal, however, heterocyclics compounds which contain 1,2,4-triazoles and 1,2,3-triazoles have created a big interest in the development of new drugs because the variety of biological activities that they have. Thus, in this study we aim to study the antimicrobial activity of new 1,2,3-triazoles against a wide variety of microorganisms using the “microdilution in liquid medium” method.

All the microorganisms were insensible to the action of the triazoles, at least at 20 µg/ml (CMI>20 µg/ml) were applied and same goes for fluconazole, which was used as the control of reference, with the exception of *C. albicans* (CMI 4 µg/ml). However, the compounds ST-3, ST-24 and ST-29 produced an inhibition of growth of around 50% in *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. smegmatis* and *B. subtilis* in comparison with the control (CMI₅₀ between 20 and 5 µg/ml). The analysis of the relation between structure-activity revealed the presence of a propyl (ST-3), biphenyl (ST-29) or bromophenyl group (ST-24) in the position 4 of the triazol, this must have some role in the activity expression.

Key words: antimicrobial – structure-activity relationship – triazole

1. Introducción

Las enfermedades infecciosas han sido siempre un acompañante inseparable de la humanidad, despertando curiosidad y horror a partes iguales. Son, aún en nuestros días, la segunda mayor causa de muerte en el mundo, sólo siendo superada por las enfermedades cardiovasculares. Dentro de las enfermedades infecciosas hay tres pilares que las posicionan en el lugar en el que están: las enfermedades emergentes, las enfermedades nuevas y las resistencias. En este sentido es cada vez más acuciante la realidad de que los microorganismos están adoptando resistencia a los antibióticos empleados (en ocasiones multirresistencia), haciendo necesaria la continua investigación a fin de garantizar la producción de más y mejores (Burnet, 1967; Leiall, 2000).

Los mecanismos de resistencia, ya sean adquiridos o naturales, son múltiples por lo que se agrupan a continuación según su tipología, siendo los tres primeros los de mayor relevancia (García et al., 1999; Torres, 2007):

-Modificación de la diana: mecanismo más frecuente, usualmente alteraciones en una subunidad (en caso de moléculas multiméricas) es suficiente para que el antibiótico se vuelva inefectivo, mientras que en ocasiones a pesar de tener una interacción reducida puede mantenerse la actividad del antibiótico.

-Inactivación enzimática del antibiótico: puede producirse por medio de la hidrólisis de parte de su estructura o mediante la adición de radicales (acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones), que en la mayoría de los casos inhabilita o reduce su acción.

-Bloqueo de la entrada del antibiótico: puede deberse al establecimiento de una barrera que impida en gran medida la permeabilidad a través de la pared/membrana; en otros casos se debe a la presencia de un sistema de transporte activo modificado.

-Reemplazo de la enzima sensible por otra resistente, “by pass”.

-Decrecimiento del requerimiento metabólico de la vía afectada por el antibiótico.

-Incremento del nivel de enzima inhibida, saturando el antibiótico.

-Adquisición exógena del producto cuya síntesis está inhibida por el antibiótico.

-Expulsión del antibiótico una vez que ha entrado en el citoplasma.

-Utilización de vías alternativas, normalmente menos eficientes e inhibidas de forma parcial.

Un azol es un compuesto heterocíclico aromático en el que al menos uno de los carbonos es sustituido por un nitrógeno, azufre u oxígeno (Eicher y Hauptmann, 2003). Los primeros hallazgos de azoles con actividad antifúngica (el clotrimazol y el miconazol) se produjeron en 1967, descubriéndose desde entonces otros azoles naturales así como derivados sintéticos, compartiendo la misma estructura básica (Figura 1; Berg et al., 1986).

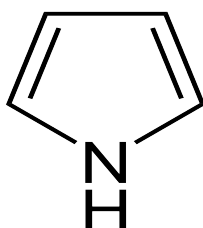
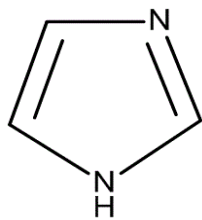
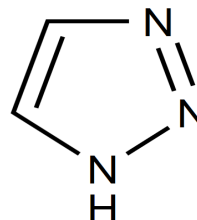


Figura 1. Anillo de pirrol (azol básico).

El grupo de los azoles, está compuesto por dos familias (Tabla 1), imidazoles y triazoles, las cuales comparten mecanismos de acción y resistencia. Se dice que los triazoles son isómeros de los imidazoles en los que un átomo de carbono del imidazol (Figura 2) es isoméricamente remplazado por nitrógeno. Los triazoles tienen anillos de cinco miembros, que contienen dos átomos de carbono y tres de nitrógeno (Figura 3). De acuerdo a la posición de los átomos de nitrógeno existen formas isoméricas, siendo las más conocidas los 1,2,3-triazoles y los 1,2,4-triazoles (Martin y Martin, 2014).

Tabla 1. Clasificación de los distintos imidazoles y triazoles.

Imidazoles	Triazoles	
Ketoconazol	1° generación	2° generación
Econazol	Fluconazol	Voriconazol
Butoconazol	Itraconazol	Posaconazol
Isoconazol		Ravuconazol
Bifonazol		
Miconazol		
Clotrimazol		

**Figura 2.** Anillo de imidazol.**Figura 3.** Anillo de triazol.

Los imidazoles son más tóxicos debido a su menor selectividad por lo que su uso ha sido relegado a unos pocos miembros y en ocasiones puntuales. Entre los triazoles destacan el fluconazol e itraconazol, y más recientemente el voriconazol, ravuconazol y posaconazol, cuyo espectro de acción ha mejorado respecto a sus antecesores. En cuanto a este último grupo el más estudiado es el voriconazol, con muy buenos resultados en cuanto a muerte celular. (Gregorí, 2005; Pérez et al., 2003).

Todos los azoles llevan a cabo su actividad antifúngica por medio de la interrupción de alguno de los pasos que conducen a la síntesis del ergosterol y otros esteroides, lo que provoca el aumento de la permeabilidad de la membrana, la interrupción del crecimiento y en última instancia, la muerte. Los triazoles poseen la capacidad de interactuar en varios niveles de la síntesis del ergosterol, siendo el más importante y mejor estudiado el bloqueo de la enzima 14-lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P450, la cual escinde un grupo metilo del lanosterol, produciendo un intermediario que es sustrato del siguiente paso. Los triazoles de 2^o generación tienen además la capacidad de intervenir en pasos posteriores de esta vía sintética, actuando por ejemplo sobre la 24-metileno dihidrolanosterol demetilasa (Palle, 2011; Pérez et al., 2003).

Las razones de su toxicidad en el hospedador se deben a que la vía sintética del ergosterol también se encuentra en él, así como la presencia de isoenzimas asociadas al citocromo P450. En los nuevos compuestos esta toxicidad ha sido en parte subsanada por medio de la mejora de la afinidad con la molécula diana hasta 250 veces (Pérez et al., 2003).

De acuerdo con los antecedentes descritos, existe una estricta necesidad en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. En este sentido, los heterocíclicos que contienen nitrógeno están siendo considerados de importancia en el diseño de nuevos fármacos. Así, el éxito de los imidazoles propició el estudio de los triazoles, dadas sus numerosas propiedades biológicas:

Antifúngica (Zoumpoulakis et al., 2012), anticonvulsivo (Deng et al., 2014), analgésico (Cansiz et al., 2001), antiinflamatorio (Al-Aabdullah et al., 2014), antidepresivo (Kane et al., 1990), antibacteriano (Fu et al., 2013; Jacob et al., 2013; Ledeti et al., 2015), anti-VIH (Li et al., 2013), antiparásito (Bakunov et al., 2010), anticancerígeno (Srivastava et al., 2014), antimalaria (Patil et al., 2010), antiproliferativo (Nagesh et al., 2015), antioxidante (Al-Soud et al., 2010) y antiviral (Diana y Nitz, 1993).

Son múltiples los trabajos que han puesto de manifiesto la utilidad de los triazoles como antibacterianos, ya sea por la acción única del triazol o por medio de compuestos híbridos, así por ejemplo la fusión de dihidropirimidinonas y triazoles mejora la actividad de la molécula resultante en comparación con sus precursores por separado (Agarwal et al., 2014). Si bien no se conoce exactamente el mecanismo de actuación en bacterias, se piensa que se debe a su capacidad para anclarse al ADN y a su participación en la activación de los canales de potasio (Tejera, 2011).

2. Objetivos

De acuerdo con estos antecedentes, en este trabajo pretendemos evaluar la actividad antimicrobiana de veinticinco mono- y di- 1,2,3-triazoles, 1,4-disustituidos obtenidos por síntesis en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” (ULL), según los siguientes objetivos:

-Determinar la actividad antimicrobiana de nuevos triazoles frente a una amplia variedad de microorganismos.

-Llevar a cabo una relación estructura-actividad de las moléculas con el fin de determinar el grupo o los grupos funcionales responsables de la acción antimicrobiana.

3. Material y métodos

3.1 Microorganismos

Para llevar a cabo este trabajo se han empleado, las siguientes estirpes bacterianas: *Bacillus cereus* CECT496, *B. subtilis* CECT39, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *S. epidermidis* CECT232, *S. saprophyticus* CECT235, *Enterococcus faecalis* CECT795, *Mycobacterium smegmatis* CECT3020, *M. phlei* CECT3009, *Escherichia coli* CECT99, *Klebsiella pneumoniae* CECT140, *Proteus mirabilis* CECT170, *Pseudomonas aeruginosa* AK958, *Salmonella* spp. CECT456; y la levadura *Candida albicans* CECT1039.

3.2 Productos químicos

Los triazoles objeto de estudio en este trabajo fueron sintetizados, por la Licenciada en Ciencias Químicas, D^a. Sara Tejera Díaz, bajo la dirección de los Dres. Jesús Trujillo y Rosa Lelia Dorta en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” (ULL).

Los 25 productos son nombrados por las letras ST seguido de un número. Los triazoles, dado su insolubilidad en medio acuoso, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Merck). A partir de estas soluciones se prepararon los productos en el medio de experimentación a la concentración requerida, justo antes de cada ensayo.

3.3 Medios de cultivo y soluciones de trabajo

Las bacterias fueron mantenidas en agar nutritivo (Oxoid), a excepción *M. phlei* y *M. smegmatis*, que por sus exigencias metabólicas lo fueron en agar cerebro corazón (BHIA, Scharlau) y la levadura *C. albicans* que fue mantenida en agar Sabouraud (Scharlau). Las placas fueron conservadas a 4 °C, llevándose a cabo resiembras periódicas.

La conservación de las cepas durante largos periodos de tiempo se realizó por congelación (-80 °C), resuspendiendo una suspensión celular en glicerol al 15% (v/v).

Como medios líquidos, para la realización de los experimentos, se emplearon los siguientes:

-Nutrient broth (Oxoid), que será denominado como caldo nutritivo (CN). Este medio fue esterilizado a 121°C durante 20 min.

-Infusión cerebro corazón (Scharlau), que será denominado como BHI. Este medio fue esterilizado a 121°C durante 20 min.

-Medio YP (extracto de levadura-peptona), cuya composición por litro es la siguiente:

Extracto de peptona (Scharlau) 10 g

Extracto de levadura (Scharlau) 10 g

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

-Medio YPD, cuya composición por litro es la siguiente:

Extracto de peptona (Scharlau) 10 g

Extracto de levadura (Scharlau) 10 g

Glucosa 10 g

El extracto de levadura y la peptona fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos, y la glucosa por filtración a través de filtros Millipore de 0,45 µm de diámetro de poro.

3.4 Preparación de los inóculos microbianos

A partir de cultivos en medio sólido, se prepararon pre-inóculos en 20 ml de medio YP (a excepción de las micobacterias) o YPD (para la levadura), que fueron incubados a 37 °C durante 18 horas en agitación orbital. En el caso de las micobacterias se empleó el medio BHI con Tween 80 al 0,06%, concentración que no afecta al crecimiento (Mizuguchi et al., 1985), para evitar la formación de agregados, incubándose en las mismas condiciones experimentales durante 48h. Estos cultivos fueron diluidos en suero fisiológico o en medio de cultivo, siendo utilizados como inóculos para llevar a cabo los ensayos a la densidad celular deseada.

3.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y CMI₅₀

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron determinadas por el método de microdilución en medio líquido utilizando placas de 96 pocillos (Iwaki), ensayando los triazoles a una concentración máxima de 20 µg/ml.

Se depositaron 200 µl de cada producto en el medio de experimentación (CN o BHI en el caso de las bacterias y Sabouraud para la levadura), a doble concentración de la requerida para el ensayo, en los pocillos de la columna 2 y 100 µl de medio en los restantes, para a continuación llevar a cabo diluciones seriadas a mitades. Estas placas fueron inoculadas con 100 µl de una suspensión del microorganismo a ensayar, realizada a partir de pre-inóculos preparados como se indicó en el apartado 2.4, de modo que quedara una densidad celular en los pocillos de $1-5 \times 10^5$ u.f.c./ml. Cada ensayo fue realizado por duplicado, y como control positivo se inocularon pocillos (columna 12) en las mismas condiciones, pero carentes de producto y con DMSO a una concentración equivalente a la máxima utilizada en los cultivos problemas, en ningún caso la concentración de DMSO superó la máxima tolerable por cada bacteria (Moujir, 1988). El control negativo (blanco control), se preparó añadiendo 200 µl de medio a una columna de pocillos (columna 1).

Como control de referencia se empleó fluconazol, que fue disuelto en agua destilada a una concentración diez veces superior a la máxima ensayada (400 µg/ml) y conservado a -80°C hasta su utilización.

Tras 24 horas de incubación (48 horas en el caso de *M. smegmatis*) a 37 °C en agitación orbital, se determinó la turbidez de los cultivos en un lector ELISA (Infinite M200, Tecan) a 550 nm, con el fin de establecer la CMI, que se define como la mínima concentración de producto a la cual no hubo crecimiento visible (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000). Así mismo, se efectuó un recuento de unidades viables, para lo cual se tomaron alícuotas (100 µl) que fueron transferidas a placas de agar que fueron incubadas en las mismas condiciones.

Por otra parte, se determinó el tanto por ciento de inhibición del crecimiento con respecto al control a partir de los valores de densidad óptica (DO), mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [1 - (\text{DO muestra} - \text{DO blanco muestra} / \text{DO control} - \text{DO blanco control})] \times 100$$

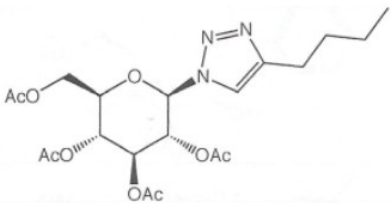
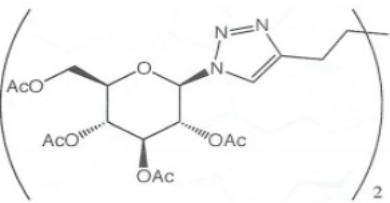
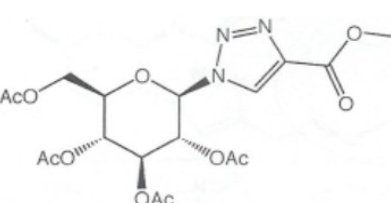
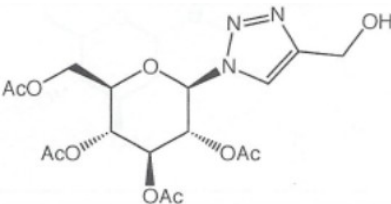
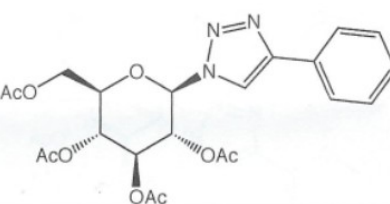
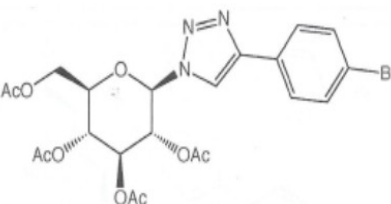
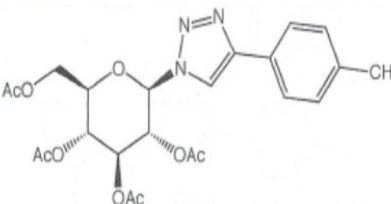
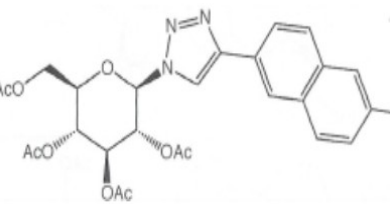
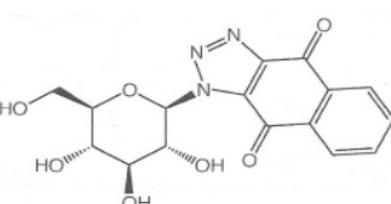
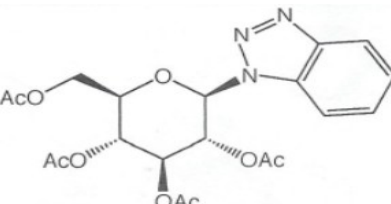
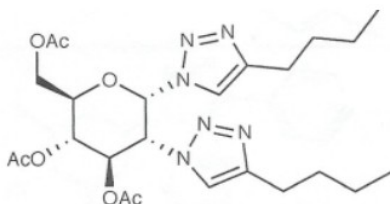
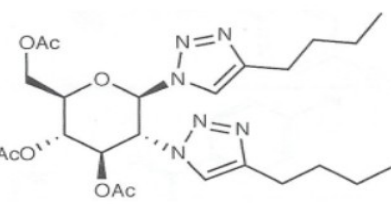
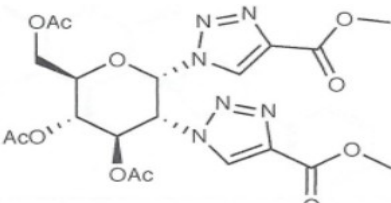
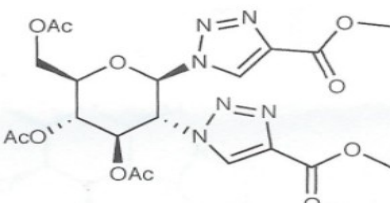
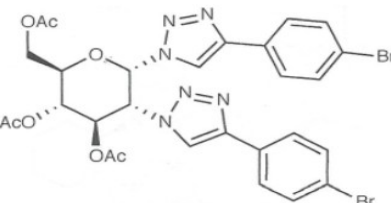
A partir de estos datos establecer la concentración mínima inhibitoria cincuenta (CMI₅₀), que es definida como la mínima concentración de producto que inhibe el crecimiento al 50% de la población.

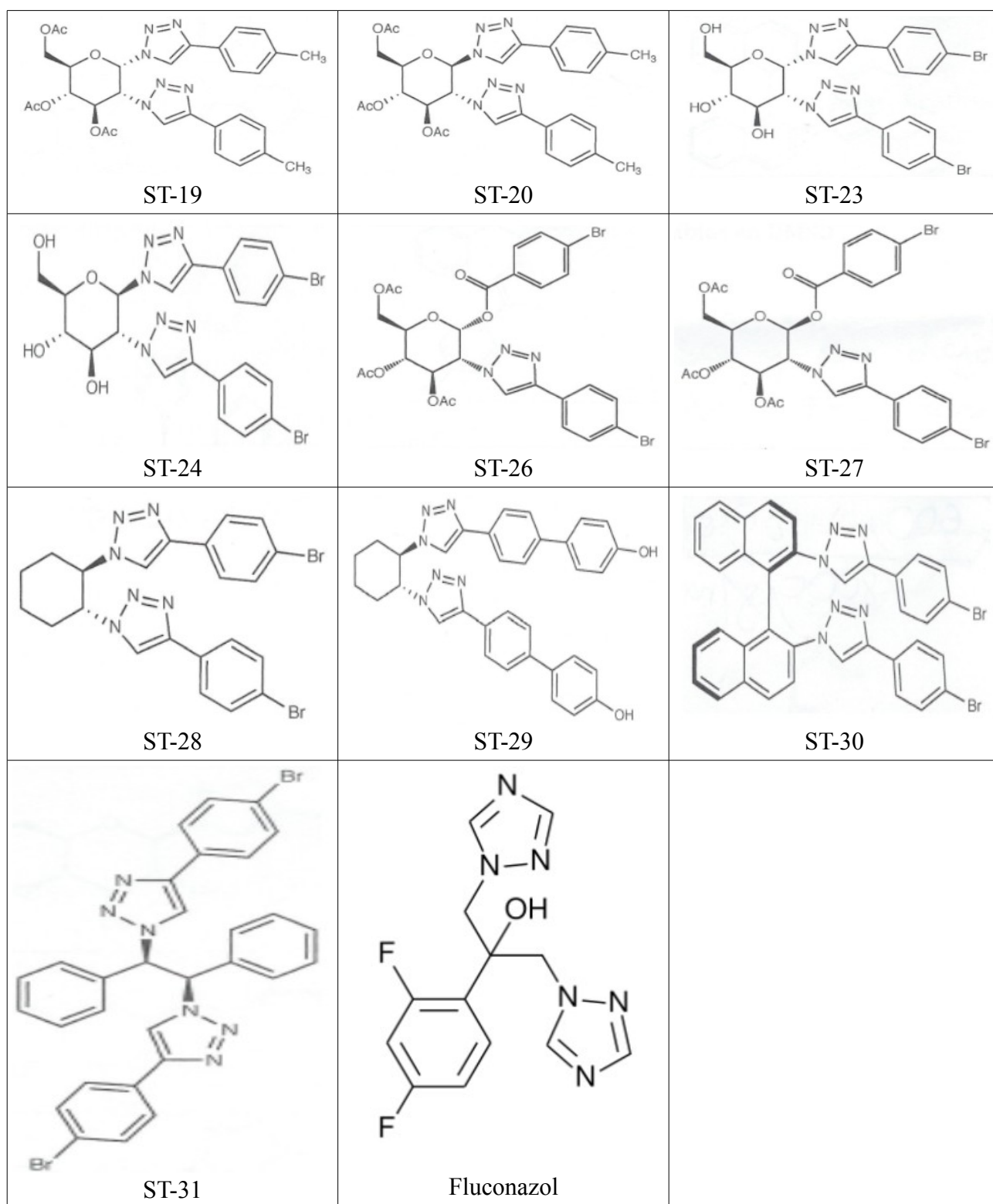
4. Resultados y discusión

4.1 Determinación de la actividad antimicrobiana de los triazoles

Se determinó la actividad antimicrobiana de 25 derivados 1,2,3-triazoles, cuyas estructuras químicas se muestran en la Tabla 2, por el procedimiento descrito en el punto 3.5.

Tabla 2. Estructuras químicas de los triazoles ensayados y fluconazol.

 ST-1	 ST-3	 ST-4
 ST-5	 ST-6	 ST-7
 ST-8	 ST-9	 ST-11
 ST-12	 ST-13	 ST-14
 ST-15	 ST-16	 ST-17



Los microorganismos ensayados resultaron ser insensibles a la acción de los triazoles, al menos hasta una concentración de 20 µg/ml (CMI>20 µg/ml), así como al fluconazol, utilizado como control de referencia (CMI>40 µg/ml), a excepción de la levadura *C. albicans* (CMI 4 µg/ml) que de acuerdo con el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y del European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST), la CMI de compuestos triazólicos, en el caso de las levaduras, como el valor de CMI₅₀, es decir, la concentración más baja de producto en la que se observa una disminución de la densidad óptica igual o superior al 50%, con respecto al control (Cuenca et al., 2006).

Como se muestra en la Tabla 3, sólo los triazoles ST-3, ST-24 y ST-29, resultaron ser activos frente a 4 de las bacterias empleadas en este estudio. Los cocos, *S. aureus* y *S. epidermidis*, resultaron ser sensibles al triazol ST-3, que presentó valores de CMI₅₀ de 20 y 5 µg/ml, respectivamente. Una sensibilidad similar presentó *B. subtilis*, al triazol ST-29, con una CMI₅₀ de 5 µg/ml y *M. smegmatis* al ST-24 (CMI₅₀ 10 µg/ml).

Tabla 3. Actividad inhibitoria de los triazoles ST-3, ST-24 y ST-29, expresada como CMI₅₀ (µg/mL), frente a diversas bacterias utilizadas en este estudio.

Producto	CMI ₅₀			
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>M. smegmatis</i>
ST-3	>20	20	5	>20
ST-24	>20	>20	>20	10
ST-29	5	>20	>20	>20

Los demás triazoles objeto de estudio presentaron una CMI₅₀>20 µg/ml, frente a todos los microorganismos ensayados.

Por otra parte, quisiéramos indicar que el efecto de estos 1,2,3-triazoles sobre los microorganismos indicados en la Tabla 3, fue dependiente de la concentración ensayada. Como se observa en la Figura 4, el compuesto ST-29 frente a *B. subtilis*, dio lugar una inhibición del crecimiento de hasta el 76% a 10 µg/ml y algo más del 50% los triazoles ST-3 y ST-24 frente a *S. epidermidis* (Figura 5) y *M. smegmatis* (Figura 6).

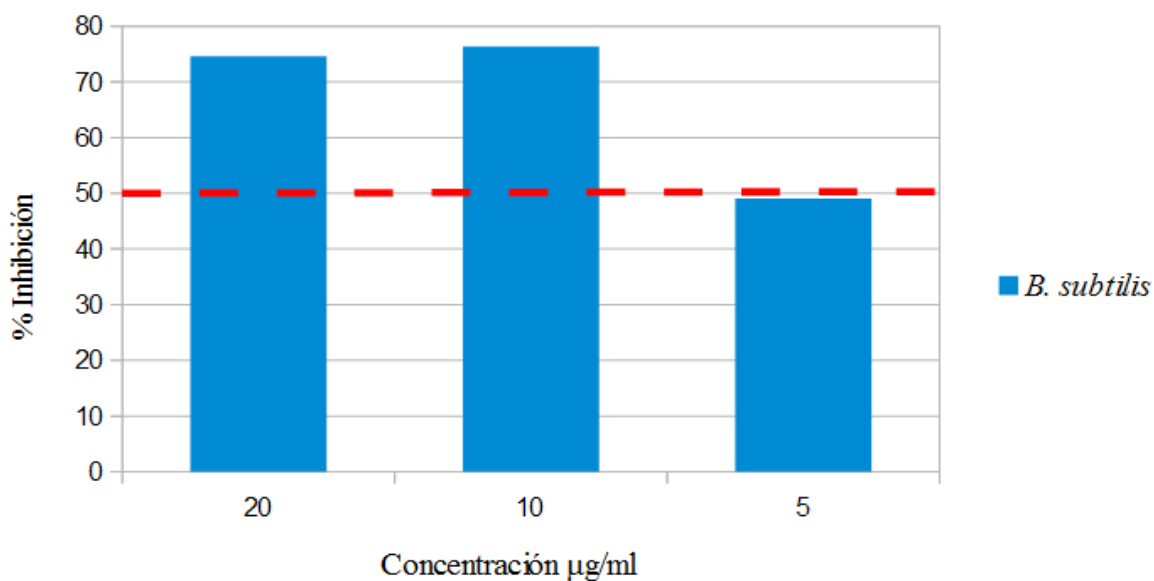


Figura 4. Tanto por ciento de inhibición del crecimiento de *B. subtilis* por el producto ST-29 a concentraciones de 20, 10 y 5 µg/ml.

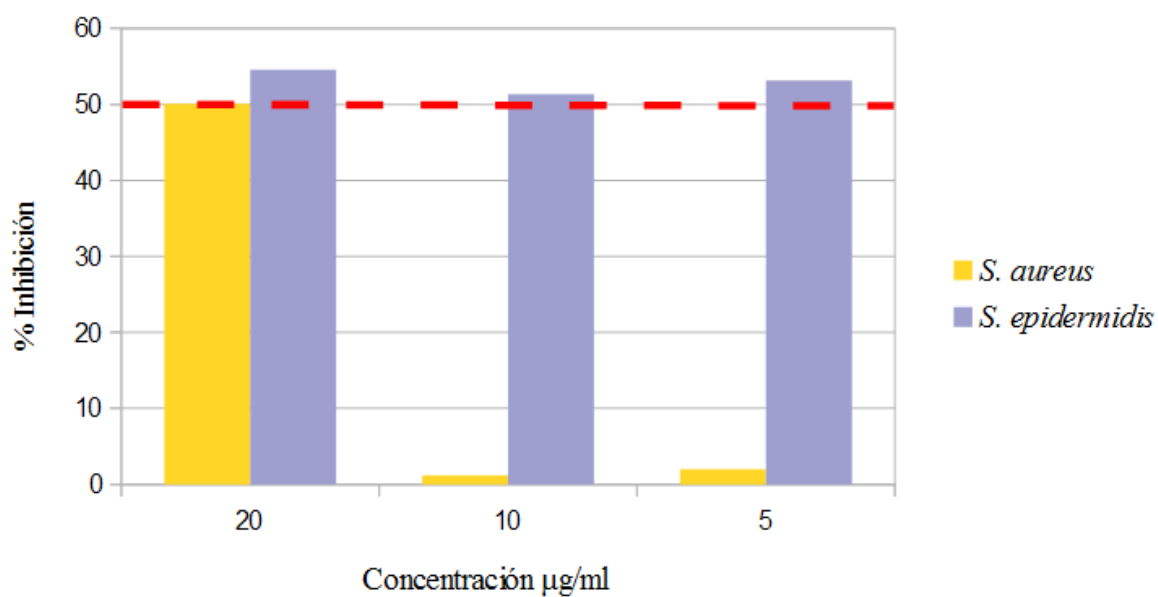


Figura 5. Tanto por ciento de inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *S. epidermidis* por el producto ST-3 a concentraciones de 20, 10 y 5 µg/ml.

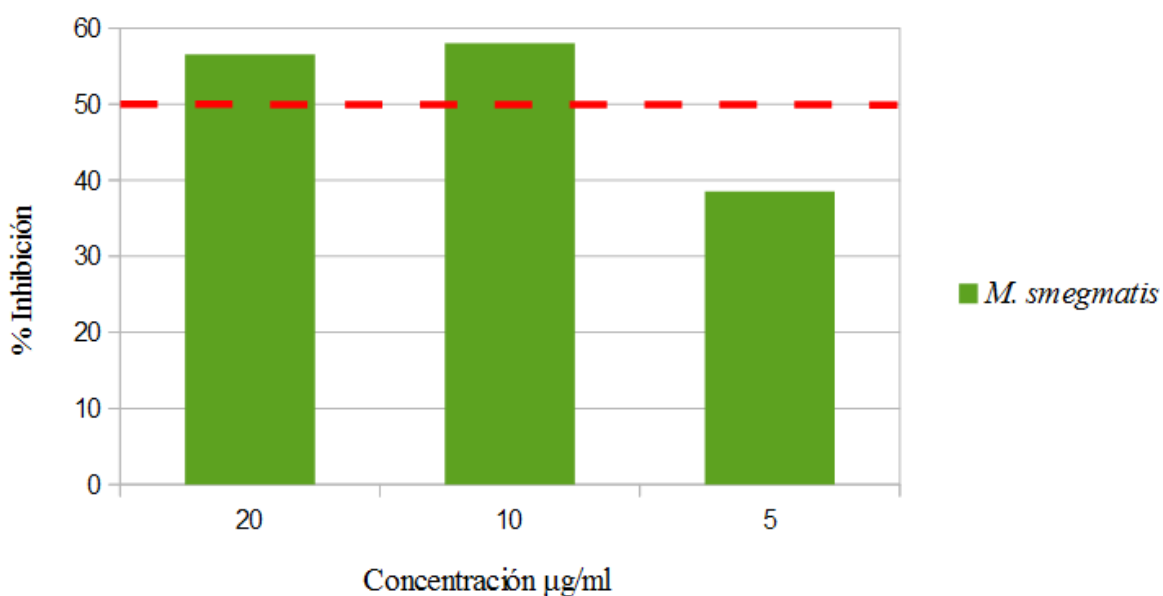


Figura 6. Tanto por ciento de inhibición del crecimiento de *M. smegmatis* por el producto ST-24 a concentraciones de 20, 10 y 5 µg/ml.

Si comparamos los resultados obtenidos en este trabajo, con los publicados por otros autores para compuestos triazólicos, con actividad antibacteriana (Jacob et al., 2013; Srivastava et al., 2014) cabe indicar que los valores de CMI descritos frente a bacterias Gram positivas y negativas son entre 1-2 mg/ml, concentraciones muy superiores a las utilizadas en este trabajo. En este sentido comentar, que en nuestro caso no pudimos ensayar a concentraciones superiores, debido a su escasa solubilidad en agua, lo que hacía que a concentraciones superiores de 20 µg/ml, los productos comenzaran a precipitar en el medio de experimentación.

4.2 Relación estructura-actividad

Una vez determinada la actividad biológica de nuevos productos naturales o sintéticos, es fundamental llevar a cabo un estudio SAR, con el fin de determinar el grupo o grupos responsables de su actividad, y en base a las conclusiones que se deriven del estudio seguir haciendo modificaciones, con el propósito de obtener moléculas más activas.

Los derivados triazólicos resultaron ser inactivos frente a todos los microorganismos utilizados en este estudio, al menos hasta una concentración de 20 µg/ml, aunque algunos de

ellos produjeron una inhibición del crecimiento de las bacterias: *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *M. smegmatis*. Así pues, basándonos en la reducción del crecimiento detectado frente a estos microorganismos por los triazoles, llevamos a cabo un estudio preliminar de la relación estructura-actividad.

Los triazoles objeto de estudio, pueden ser divididos en dos grupos: mono- y di-1,2,3-triazoles:

A) Mono-1,2,3-triazoles con un residuo glucosilo en posición 1 y diferentes sustituyentes en posición 4 (ST-1, ST-3...ST-9, ST-11 y ST-12).

B) Di-1,2,3-triazoles, entre los que se incluyen:

- ✓ Di-1,2,3-triazoles con un residuo glucosilo en posición 1,2 y diferentes sustituyentes en posición 4 (ST-13...ST-17, ST-19, ST-20, ST-23 y ST-24).
- ✓ Di-1,2,3-triazoles en posición 1,2 de un ciclohexano y con diferentes sustituyentes en posición 4 (ST-28 y ST-29).
- ✓ Di-1,2,3-triazoles sobre un anillo binaftilo en posición 1,2 y con bromofenol en posición 4 (ST-30)
- ✓ Di-1,2,3-triazol sustituido con p-bromofenol (4) del difeniletano (ST-31)

El dímero ST-3 (Figura 7), resultó ser activo frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, que se caracteriza por presentar en posición 4 un radical propilo. Frente a *M. smegmatis* y *B. subtilis* presentaron actividad los di-1,2,3-triazoles ST-24 y ST-29, respectivamente. Para que la molécula tenga actividad frente a la bacteria esporulada, es importante que en posición 4 del triazol exista un radical bifenilo, aunque en este caso el triazol, está unido a un ciclo hexano y no a un azúcar, mientras que para la expresión de la actividad frente a la micobacteria se requiere un bromofenil, en dicha posición, pero bajo la forma de di-triazol (ST-24 vs ST-7).

Evidentemente, dada la escasa actividad mostrada por los triazoles frente a los microorganismos objeto de estudio, somos conscientes de que es difícil el poder establecer con rigor los requerimientos estructurales para la expresión de la actividad.

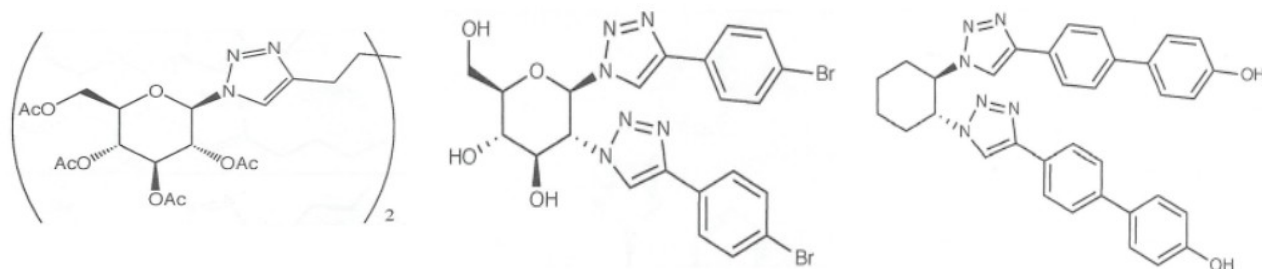


Figura 7. Estructura química de los mono-1,2,3-triazoles ST-3, ST-24 y ST-29gmail

5. Conclusiones

En el presente trabajo se analizan las actividades antimicrobianas de 25 mono- y di-1,2,3 triazoles, obtenidos por síntesis en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica (ULL) y como resultado del mismo se han elaborado las siguientes conclusiones:

1. Todos los triazoles presentaron una CMI > 20 µg/ml frente a los microorganismos utilizados en este trabajo, al igual que el fluconazol, utilizado como control de referencia, a excepción de *C. albicans* (CMI 4 µg/ml).

2. Los triazoles ST-3 y ST-24 produjeron una inhibición del crecimiento del 50% con respecto al control (CMI₅₀) comprendida entre 20 y 5 µg/ml frente a *S. aureus*, *S. epidermidis* y *M. smegmatis*. Así mismo, el compuesto ST-29 dio lugar a una inhibición del crecimiento de hasta el 76% a 10 µg/ml, frente a *B. subtilis*.

3. El análisis de la relación estructura-actividad de estos compuestos, nos permiten establecer que la presencia de un grupo propilo en posición 4 sobre el dimero del mono-1,2,3-triazol y un radical bifenilo o bromofenil en 4 del di-triazol, deben de jugar algún papel en la expresión de la actividad antimicrobiana de estos compuestos.

Conclusions

In this present study we analyze the antimicrobial activity of 25 mono- and di-1,2,3-triazoles that were obtained through the synthesis in the Instituto Universitario de Bio-Orgánica (ULL) and conclusions of these results of the following:

1. All triazoles present a CMI > 20 µg/ml against the microorganism used in this study, and same goes for fluconazole, which was used as the control of reference, with the exception of *C. albicans* (CMI 4 µg/ml).

2. The triazoles ST-3 and ST-4 produced an inhibition of growth of 50% in comparison with the control (CMI_{50}) which was between 20 and 5 $\mu\text{g/ml}$ against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *M. smegmatis*. Furthermore, the compound ST-29 gave rise to an inhibition of growth until 76% at 10 $\mu\text{g/ml}$, against *B. subtilis*.

3. The analysis of the relation between structure-activity of these compounds allow us to establish the presence of a propyl group in position 4 in the dimer of the mono-1,2,3-triazol and a biphenyl or bromophenyl radical group in the position 4 of the di-triazol, this must have some role in the antimicrobial activity expression of these compounds.

6. Bibliografía

- Agarwal, A., Goyal, A. y Sharma, C.S. 2014. Synthesis and antimicrobial evaluation of some triazole incorporated pyrimidine derivatives. *Journal of Applicable Chemistry*. 3: 1510-1516.
- Al-Aabdullah, E.S., Asiri, H.H., Lahsani, S., Habib, E.E., Ibrahim, T.M. y El-Emam, A.A. 2014. Synthesis, antimicrobial, and anti-inflammatory activity, of novel s-substituted and n- substituted 5-(1-adamantyl)-1,2,4-triazole-3-thiols. *Drug Design, Development and Therapy*. 8: 505-517.
- Al-Soud, Y.A., Mohammed H.A. y Abo-Amer, A. 2010. Microwave-assisted synthesis and antioxidant properties of some new 1,2,4-triazole derivatives. *Jordan Journal of Chemistry*. 5: 119-129.
- Bakunov, S.A., Bakunova, S.M., Wenzler, T., Ghebru, M., Werbovets, K.A., Brun, R. y Tidwell, R.R. 2010. Synthesis and antiprotozoal activity of cationic 1,4-diphenyl-1H-1,2,3-triazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*. 53: 254-272.
- Berg, D., Büchel, K.-H., Plempel, M. y Regel, E. 1986. Antimycotic Sterol Biosynthesis Inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 7: 233-238.
- Burnet, Sir M. 1967. Historia de las enfermedades infecciosas. Capítulo I: El punto de vista ecológico. Alianza Editorial S.A. 11-35. Madrid-España.
- Cansiz, A., Servi, S., Koparir, M., Altintas, M. y Digrak, M. 2001. Synthesis and biological activity of Mannich bases of 5-(2-furyl)-1,2,4-triazole-3-thiones. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*. 23: 237-240.
- Cuenca, M., Gadea, I., Martín, E., Pemán, J., Pontón, J. y Rodríguez, J.L. 2006. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos.
- Deng, X.-Q., Song, M.-X., Zheng, Y. y Quan, Z.-S. 2014. Design, synthesis and evaluation of the antidepressant and anticonvulsant activities of triazole-containing quinolinones. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 73: 217-224.
- Diana, G.D. y Nitz, T.J. 1993. 1,2,4-Oxadiazolyl-phenoxyalkylisoxazoles and their use as antiviral agents. European Patent EP 566199.
- Eicher, T. y Hauptmann, S. 2003. The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Synthesis, and Applications (2nd ed.). John Wiley & Sons. United States.
- Fu, T.-h., Li Y., Thaker, H.D., Scott, R.W. y Tew, G.N. 2013. Expedient synthesis of SMAMPs via click chemistry. *ACS Medicinal Chemical Letters*. 4: 841-845.
- García, J.E., López, R. y Prieto, J. 1999. Antimicrobianos en medicina. Edita Sociedad Española de Quimioterapia. Barcelona-España.
- Gregori, B.S. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*. 39. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012
- Jacob, J.H., Irshaid, F.I. y Al-Soud, Y.A. 2013. Antibacterial activity of some selected 1,2,4-triazole derivatives against standard, environmental, and medical bacterial strains. *Advanced Studies in Biology*. 5: 291-301.
- Kane, J.M., Baron, B.M., Dudley, M.W., Sorensen, S.M., Staeger, M.A. y Miller, F.P. 1990. The synthesis of 2,4-dihydro-3H-1, 2,4-triazol-3-ones as potent anticonvulsant agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 33: 2772-2777.

- Ledeti, I., Bercean, V., Alexa, A., Soica, C., Suta, L.-M., Dehelean, C., Trandafirescu, C., Muntean, D., Licker, M. y Fuias, A. 2015. Preparation and antibacterial properties of substituted 1,2,4-triazoles. *Journal of Chemistry*. 2015: ID 879343, doi:10.1155/2015/879343.
- Leiall, P. 2000. Contengamos la resistencia microbiana. Informe de la Organización Mundial de la Salud sobre enfermedades infecciosas 2000. Edita Ministerio de Sanidad y Consumo, Gobierno de España. 5-34. Madrid-España.
- Li, Z., Cao, Y., Zhan, P., Pannecouque, C., Balzarini, J., Clercq, E.D., Shen, Y. y Liu, X. 2013. Arylazolythioacetanilide. Part 11. Design, synthesis and biological evaluation of 1,2,4-triazole thioacetanilide derivatives as novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Medicinal Chemistry*. 9: 968-973.
- Martin, A. y Martin, R. 2014. A review on the antimicrobial activity of 1,2,4-triazole derivatives. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 3: 323-329.
- Mizuguchi, Y., Ogawa, M. y Udou, T. 1985. Morphological changes induced by β -lactam antibiotics in *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 27: 541-547.
- Moujir, L. 1988. Acción antibiótica de la netzahualcoyona, una triterpenoquinona aislada de *Shaefferia cuneifolia*. Edita Universidad de La Laguna. La Laguna-España.
- Nagesh, H.N., Suresh, N., Prakash, G.V.S.B., Gupta, S., Rao, J.V. y Sekhar, K.V.G.C. 2015. Synthesis and biological evaluation of novel phenanthridinyl piperazine triazoles via click chemistry as anti-proliferative agents. *Medicinal Chemistry Research*. 24: 523-532.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 5th ed., NCCLS document M7-A4, (17):1-36. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa.
- Palle, S. 2011. Studies directed towards the synthesis of azoles and its derivatives. Doctor of Philosophy. Jawaharlal Nehru Technological University Hyderabad. Hyderabad, India.
- Patil, V., Guerrant, W., Chen, P.C., Gryder, B., Benicewicz, D.B., Khan, S.I., Tekwani, B.L. y Oyelere, A.K. 2010. Antimalarial and antileishmanial activities of histone deacetylase inhibitors with triazole-linked cap group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 415-425.
- Pérez, J.L., Guna, R., Orta, N. y Gimeno, C. 2003. Nuevos azoles: Voriconazol. *Control calidad, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Srivastava, A., Aggarwal, L. y Jain, N. 2014. One-pot sequential alkynylation and cycloaddition: regioselective construction and biological evaluation of novel benzoxazole-triazole derivatives. *ACS Combinatorial Science*. 17: 39-48.
- Tejera, S. 2011. Estudio estereoquímico de carbohidratos. Máster en Química-Química Orgánica. Universidad de La Laguna. La Laguna-España.
- Torres, C. 2007. La resistencia bacteriana a los antibióticos: ¿Cuestión de inteligencia o de azar?. Edita Universidad de La Rioja. 19-42. La Rioja-España.
- Zoumpoulakis, P., Camoutsis, C., Pairs G., Sokovic, M., Glamoclija, J., Potamitis, C. y Pitsas, A. 2012. Synthesis of novel sulfonamide-1,2,4- triazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,3,4- oxadiazoles, as potential antibacterial and antifungal agents. Biological evaluation and conformational analysis studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 20: 1569-1583.

-Páginas Web consultadas:

Transcripción del Curso de Actualización en Micología Médica, Infecciones Fúngicas Invasoras y Nosocomiales, organizado por el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile en 2004. Consultado el 19/06/15. <http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3548>

Documento con información respecto a los azoles y sus tipos. Consultado el 19/06/15. <http://www.reboundhealth.com/cms/images/pdf/azole%20id%2014682.pdf>

Diapositivas de Biasoli, M., Estructura y actividad de los antifúngicos. Consultado el 19/06/15. <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/4130/course/section/1519/Estructura%20y%20actividad%20de%20los%20antifungicos.pdf>