

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea del CRAI-Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la CRAI-Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación, CRAI-Biblioteca

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

**Síntesis, estudio estructural y evaluación de la actividad antifúngica de cetiminas derivadas
de la 9H-fluorenona y la anilina**

Margareth Yaniry Barón Márquez

Silvia Daniela Rodríguez Jerez

Trabajo de grado presentado para optar al título de Química Ambiental

Director del Proyecto

Hernando Camargo García, Químico, *Ph.D.*

Codirectores del Proyecto

José Antonio Henao Martínez, Químico, *Msc. Ph.D.*

Jorge Andrés Gutiérrez, Químico, *Ph.D.*

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de Ingenierías y Arquitectura

Facultad de Química Ambiental

2018

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedicamos a Dios, por ser nuestro creador y guía, y por hacer palpable su amor y propósito a través de cada persona que nos rodeó en la realización de éste proyecto de investigación.

A nuestros padres por todo lo que nos han brindado en la vida, especialmente por los sabios consejos y ayuda en momentos difíciles.

A nuestros familiares, amigos y profesores, que sin esperar nada a cambio, han sido pilares importantes en nuestro camino y así, forman parte de éste logro que hoy nos abre puertas inimaginables en nuestro desarrollo profesional.

Agradecimientos

Agradecemos a Dios por ponernos en nuestro corazón la pasión para empezar y culminar exitosamente esta investigación, iluminándonos siempre en el camino ayudándonos a superar los momentos de dificultad que surgieron.

A la Facultad de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás, por brindarnos la oportunidad de enriquecernos con conocimiento y ayudarnos a cultivar el amor por la ciencia, especialmente a nuestra Decana Sindy Lozano por su actitud siempre comprensiva.

De manera especial, queremos agradecer a nuestro director, Dr. Hernando Alberto Camargo García por ser más que nuestro guía, por luchar junto a nosotras incansablemente colocando de su amor, paciencia y experiencia para alcanzar ésta meta, por ser fuente de inspiración y conocimiento científico. Estaremos eternamente agradecidas por impulsarnos continuamente, creer en nosotras y renovar nuestras fuerzas con consejos siempre acertados.

Al codirector del proyecto, Dr. José Antonio Henao Martínez por su apoyo y ayuda para encaminarnos a comprender y amar la Difracción de Rayos X.

Al codirector Dr. Jorge Andrés Gutiérrez, por colaborar de manera especial con conocimiento en Microbiología, indispensable para ésta aspiración.

A los Auxiliares y directivas del Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomas sede Floridablanca, por brindar espacios y materiales para llevar a cabo la investigación de la mejor manera posible.

Al laboratorio de Rayos-X sede Parque Tecnológico de Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander, por su colaboración en la toma de datos de difracción de Rayos-X necesarios durante la investigación.

Al laboratorio de Microbiología de la Universidad Industrial de Santander, por llevar a cabo la evaluación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados.

Contenido

Lista de Abreviaturas y Acrónimos	13
Glosario.....	14
Resumen.....	17
Introducción	19
1. Planteamiento del Problema	21
2. Justificación	22
3. Objetivos.....	24
3.1 Objetivo General	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4 Marco Teórico.....	25
4.1 Cetiminas.	25
4.2 Técnicas de caracterización.	26
4.3 Espectroscopia infrarroja (IR).....	26
4.4 Espectrometría de masas (EM).	26
4.5 Difracción de rayos-x muestras policristalinas (DRXP).....	27
4.6 Difracción de rayos-x monocristal (DRX).....	27
4.7 Compuestos biológicamente activos.....	28
4.7.1 Mecanismo de acción compuesto de referencia	30
4.7.2 Métodos para la evaluación de la actividad biológica	31
4.8 Análisis Cienciométrico Aplicado al Estudio Estructural y Evaluación de la Actividad Antifúngica de las Bases de Schiff Frente a la <i>C. albicans</i> y <i>C. krusei</i>	32
5. Marco de Antecedentes.....	34
6. Diseño Metodológico.....	39

6.1 Síntesis general de los compuestos [3a-d]	39
6.2 Caracterización Molecular de los Compuestos [3a-d]	40
6.2.1 Espectroscopia infrarroja	40
6.2.2 Espectrometría de masas.....	40
6.3 Caracterización estructural de los compuestos obtenidos (Cetiminas).....	41
6.3.1 Difracción de rayos-X de muestras policristalinas	41
6.3.2 Difracción de Rayos-X de monocristal.....	42
6.4 Evaluación de la Actividad Antifúngica de los compuestos [3a-d].....	42
6.4.1 Determinación de la actividad antifúngica de la <i>Cándida albicans</i> y <i>Cándida krusei</i>	42
6.4.2 Concentración inhibitoria (CI ₅₀)	43
6.5 Metodología Análisis cuantitativo de la Actividad Antifúngica de las Bases de Schiff Frente a la <i>C. albicans</i> y <i>C. krusei</i>	44
7. Resultados y Discusión	46
7.1 Síntesis de las iminas [3a-d]	47
7.2 Caracterización molecular de los compuestos [3a-d]	50
7.2.1 Espectroscopía infrarroja (IR).	50
7.2.2 Espectrometría de masas.....	51
7.3 Caracterización cristalográfica y estructural de los compuestos [3a-d].....	54
7.3.1 Difracción de rayos X de muestras policristalinas (DRXP)	54
7.3.2 Difracción de rayos X de monocristal de los compuestos [3a-d]	55
7.4 Evaluación de la Actividad antifúngica de los compuestos [3a-d] a partir de la concentración inhibitoria (CI ₅₀).....	57
7.5 Resultados obtenidos en el análisis cuantitativo	66

7.5.1 Dinámica Inventiva.....	66
7.5.2 Análisis Científico.	71
8. Conclusiones.....	78
9. Recomendaciones	80
10. Divulgación de resultados.....	80
Bibliografía	82
Apéndices.....	92
Apéndice A. Espectros IR de los compuestos [3a-d].....	92
Apéndice B. Espectros de masas y tablas de iones positivos y negativos obtenidos mediante ionización electrospray	94
Apéndice C. Difractogramas de los compuestos [3a-d].....	97
Apéndice D. Longitudes de enlaces de los compuestos [3a-d].....	99
Apéndice E. Ecuación de búsqueda	100

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Condiciones de reacción para la síntesis de los compuestos N-(4-Xfenil)-9H-fluoren-9-imina; X = F, Cl, Br, I</i>	39
Tabla 2. <i>Bitácora para el estudio de cenciométrica de la actividad antifúngica de bases de Schiff</i> 44	
Tabla 3. <i>Características físicas de los Compuestos [3a-d]</i>	47
Tabla 4. <i>Bandas de absorción más representativas de los compuestos [3a], [3b], [3c] y [3d]</i>	51
Tabla 5. <i>Fragmentaciones generadas durante el proceso de ionización y presencia del ion molecular característico de los compuestos [3a], [3b], [3c], [3d] previamente sintetizados</i>	52
Tabla 6. <i>Parámetros de celda de los compuestos [3a-d]</i>	54
Tabla 7. <i>Comparación de parámetros cristalinos evaluados a partir de técnicas de DRX de monocristal y de muestras policristalinas</i>	55
Tabla 8. <i>Porcentaje de inhibición del N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina según la variación de la concentración del compuesto [3a]</i>	60
Tabla 9. <i>Porcentaje de inhibición del N-(4-clorofenil)-9H-fluoren-9-imina según la variación de la concentración del compuesto [3b].</i>	62
Tabla 10. <i>Porcentaje de inhibición del N-(4-bromofenil)-9H-fluoren-9-imina según la variación de la concentración del compuesto [3c]</i>	63
Tabla 11. <i>Porcentaje de inhibición del N-(4-yodofenil)-9H-fluoren-9-imina según la variación de la concentración del compuesto [3d]</i>	65
Tabla 12. <i>Comparación efecto fungistático de los compuestos [3a-d] respecto al Fluconazol</i> ...	65
Tabla 13. <i>Afiliaciones de América Latina</i>	77

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Estructura molecular del fluconazol	23
<i>Figura 2.</i> Cetimina secundaria	25
<i>Figura 3.</i> Morfogénesis de la <i>Cándida albicans</i>	29
<i>Figura 4.</i> Esquema del procedimiento de Macrodilución	32
<i>Figura 5.</i> Esquema del procedimiento de Microdilución	32
<i>Figura 6.</i> Estructura molecular del N-(9H-Fluoren-9-iliden)-N-(2-metoxifenil)amina.....	35
<i>Figura 7.</i> Estructura molecular de la N,N'-bis(9H-fluoren-9-iliden)benceno-1,2-diamina	35
<i>Figura 8.</i> Estructura molecular de la N-(9H-Fluoren-9-iliden)-4-metilanilina	36
<i>Figura 9.</i> Esquema de reacción propuesta por Matviiuk para la obtención de 3-(9H-fluoren-9-ilideno) pirrolidina-2,5-diona.....	37
<i>Figura 10.</i> Estructura molecular de nueva base de schiff 4-amino-5-(4-methyl-2-phenylthiazol-5-yl)-4h-1,2,4-triazole-3-thiol	38
<i>Figura 11.</i> Esquema de síntesis de los compuestos N-(4-Xfenil)-9H-fluoren-9-imina.....	40
<i>Figura 12.</i> Esquemmatización del Mecanismo de formación de las iminas (Rodríguez, 2009)	49
<i>Figura 13.</i> Representación gráfica de la celda unidad y estructura cristalina del compuesto [3a]	56
<i>Figura 14.</i> Representación gráfica de la celda unidad y estructura cristalina del compuesto [3b]	56
<i>Figura 15.</i> Representación gráfica de la celda unidad y estructura cristalina del compuesto [3c]	57
<i>Figura 16.</i> Evaluación del efecto biológico de N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina [3a] sobre el crecimiento de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231	59

<i>Figura 17.</i> Evaluación del efecto biológico de N-(4-fluorofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3a] sobre el crecimiento de <i>Cándida krusei</i> ATCC 6258.....	60
<i>Figura 18.</i> Evaluación del efecto biológico de N-(4-clorofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3b] sobre el crecimiento de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.....	61
<i>Figura 19.</i> Evaluación del efecto biológico de N-(4-clorofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3b] sobre el crecimiento de <i>Cándida krusei</i> ATCC 6258.....	61
<i>Figura 20.</i> Evaluación del efecto biológico de N-(4-bromofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3c] sobre el crecimiento de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.....	62
<i>Figura 21.</i> Evaluación del efecto biológico de N-(4-bromofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3c] sobre el crecimiento de <i>Cándida krusei</i> ATCC 6258.....	63
<i>Figura 22.</i> Evaluación del efecto biológico de N-(4-yodofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3d] sobre el crecimiento de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.....	64
<i>Figura 23.</i> Evaluación del efecto biológico de N-(4-yodofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3d] sobre el crecimiento de <i>Cándida krusei</i> ATCC 6258.....	64
<i>Figura 24.</i> Patentes relacionadas con la actividad antifúngica de compuestos orgánicos como las iminas.....	67
<i>Figura 25.</i> Dinámica inventiva por años de prioridad comprendida en un periodo de 31 años...	68
<i>Figura 26.</i> Jurisdicciones de mayor nivel de invención	69
<i>Figura 27.</i> Autores con mayor cantidad de invención científica	70
<i>Figura 28.</i> Conjunto de solicitudes de patentes.....	71
<i>Figura 29.</i> Dinámica de publicación de documentos científicos comprendida en los años 1996-2018.....	72
<i>Figura 30.</i> Jurisdicciones de mayor nivel de publicaciones	73

<i>Figura 31.</i> Principales fuentes de publicación para la evaluación de la actividad antifúngica de compuesto tipo iminas	74
<i>Figura 32.</i> Principales actores a nivel mundial, centros de investigación y desarrollo en universidades.....	75
<i>Figura 33.</i> Países con mayor número de publicaciones desde 1996-2018	76
<i>Figura 34.</i> Tipos de documentos de mayor publicación de 1996-2018	78

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Espectros IR de los compuestos [3a-d].....	92
Apéndice B. Espectros de masas y tablas de iones positivos y negativos obtenidos mediante ionización electrospray	94
Apéndice C.Difractograma de los compuestos [3a-d]	97
Apéndice D Longitudes de enlace de los compuestos [3a-d].....	99

Lista de Abreviaturas y Acrónimos

CCF	Cromatografía de capa fina
CLSI	Instituto de normas clínicas y de laboratorio
DMF	N,N-dimetilformamida
DRX	Difracción de rayos- X
EM	Espectrometría de masas
ESI-IT	Ionización por electrospray
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IR	Espectroscopía Infrarroja
JACS	<i>Journal of the American Chemical Society</i>
OMPI	Organización mundial de la propiedad intelectual
PMMA	Polimetilmetacrilato
RICYT	Indicadores de ciencia y tecnología iberoamericana e interamericana
UFC	Unidades formadoras de colonia
CI ₅₀	Concentración inhibitoria

Glosario

Antipirético: medicamento que se usa en terapéutica para combatir el síntoma febril; es decir, es una sustancia que disminuye la temperatura corporal, principalmente cuando ésta es elevada. (GER, 1971, pág. 394).

Celda unidad: es la unidad fundamental sobre la que se construye todo cristal por simples desplazamientos de translación. La celda unidad está constituida por un paralelepípedo con aristas de longitud a , b , y c , y ángulos α , β y γ . (Cortes, Martínez, & Valencia, 2009, pág. 18)

Cristal: partícula sólida con una orientación y posiciones definidas que se repiten consecutivamente con intervalos igualmente espaciados y con la misma orientación en las coordenadas x , y y z . (Sands, 1993, pág. 3).

Farmacocinética: estudio de la cinética de los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción de los medicamentos y sus metabolitos. Incluye generalmente el estudio del curso temporal de la acción de los medicamentos y su relación con la concentración del medicamento en los líquidos y tejidos corporales (Arias D. T., 1999, pág. 116).

Farmacóforo: parte activa de la molécula que interacciona con una parte del sistema biológico receptor, para producir una respuesta. (Rubira, 2008, pág. 105).

Forma canónica: estructura de la molécula donde los electrones están migrando entre las diferentes posiciones representadas por las estructuras contribuyentes al híbrido de resonancia y representa así a todas las formas canónicas. (Yúfera, 1996, pág. 68).

Indexar: procedimiento que pretende determinar la celda unidad del cristal a partir de las posiciones de los picos del difractograma con ayuda de un análisis computacional. (Jordi Rius, 1992, pág. 144).

Macla: fenómeno común en muchos cristales individuales, en los que la red cristalina presenta una orientación diferente en dos o más partes del cristal, de manera que estas zonas están relacionadas entre sí por un elemento de simetría. (OXFORD, 2000, pág. 474).

Micosis: enfermedad producida por hongos y puede infectar tanto al individuo sano, bien nutrido e inmunoactivo, como al individuo con otras patologías o inmunodeprimidos. Pueden afectarlo con una mayor severidad al poner en peligro su vida, o en llegar solo a alterar en diversos grados la estética del paciente. (Lurá, y otros, 1997, pág. 82).

Morbilidad: hace referencia a un indicador negativo de salud, es la epidemiología la ciencia encargada de su estudio y lo hace a través de estudios descriptivos, analíticos o experimentales. Se encuentran dentro de éste, todos los problemas de salud que la población siente o por lo cual acude a los centros asistenciales, registros de los servicios asistenciales, sistemas de vigilancia, y el conjunto de patologías que no se han percibido y que tampoco se han diagnosticado en las instituciones sanitarias. (Públic, 2017, pág. 42).

Neoplasias: significa “crecimiento nuevo” y se nombran comúnmente con el nombre de tumores como a la tumefacción derivada de una inflamación, y en caso de ser malignos, se llaman cáncer. (Arias J. , 2002, pág. 203).

Nosocomial: infección intrahospitalaria que se produce después de las 48 h de ingreso del paciente y hasta 72 horas después de alta. Se puede manifestar clínicamente o ser descubierta por la observación directa durante la cirugía, endoscopia y/o otros procedimientos diagnósticos. Se incluye así a las infecciones cuyo periodo de incubación se manifiesta posteriormente al alta del paciente

y se relacionan con los procedimientos de la actividad hospitalaria o de servicios ambulatorios. (Akoriyea, 2009, pág. 11).

Principio activo: es la sustancia química que se utiliza por su actividad farmacológica y es el responsable del efecto farmacológico. Para lograr su acción, es transportado con un excipiente, para favorecer su administración, liberación y absorción. (Toro, 2008, pág. 5).

Resumen

Las bases de Schiff, son compuestos orgánicos con reconocida actividad biológica antifúngica, antiviral y antipirética (Sierra, 2008, págs. 8-10). Están direccionados a la producción de nuevos principios activos, con el fin de buscar alternativas en el tratamiento de enfermedades resistentes que se han desarrollado en los últimos años; para mejorar su tolerancia, es necesario proponer alternativas ante la resistencia microbiológica, perfiles farmacocinéticos más favorables, y solucionar problemas de toxicidad de fármacos.

En el presente trabajo se planteó la necesidad de realizar estudios de actividad antifúngica, de compuestos orgánicos tipo bases de Schiff derivados de la 9*H*-fluorenona y anilina sustituida en posición *para* con halógenos, frente a cepas de hongos patógenos, como la *Cándida krusei* y la *Cándida albicans*. El proceso de síntesis de los compuestos *N*-(4-fluorofenil)-9*H*-fluoren-9-imina (**3a**), *N*-(4-clorofenil)-9*H*-fluoren-9-imina (**3b**), *N*-(4-bromofenil)-9*H*-fluoren-9-imina (**3c**) y *N*-(4-yodofenil)-9*H*-fluoren-9-imina (**3d**), se realizó mezclando cantidades estequiométricas de 9*H*-fluorenona y *p*-anilina sustituida (F, Cl, Br, I). La reacción se llevó a cabo en reflujo constante entre 48 y 72 h, utilizando etanol como solvente y ácido-*p*-toluenosulfónico como catalizador. Se observó la formación de cristales amarillos con variaciones muy tenues en la coloración.

Posteriormente se caracterizaron los compuestos obtenidos mediante las técnicas de Espectroscopia Infrarrojo (TF-IR) y Espectrometría de masas (EM). Adicionalmente, se realizó la caracterización cristalográfica y estructural por técnicas de difracción de rayos X de muestras policristalinas y de monocristal respectivamente, con el fin de determinar las constantes de celda, el sistema cristalino y grupo espacial del compuesto (cristalografía), como también las posiciones atómicas, longitudes y ángulos de enlace e interacciones intra e intermoleculares de los compuestos de interés (estructura cristalina). Finalmente se evaluó la actividad antifúngica de los

compuestos sintetizados, pudiéndose observar que el compuesto (**3a**), presentó mejor efecto biológico frente a la *Cándida Albicans* con un porcentaje de inhibición de 90 % y para *Cándida Krusei* del 87,4 %. La evaluación antifúngica frente a las cándidas determinó que los compuestos [3a-d] pueden clasificarse como fungistáticos por las concentraciones de eficiencia que presentaron para inhibir el crecimiento del hongo patógeno.

Palabras clave: Bases de Schiff, caracterización estructural; cetiminas; actividad antifúngica, *Cándida albicans*, *Cándida krusei*.

Introducción

El desarrollo de nuevos materiales bioactivos contribuye de manera significativa en el tratamiento de enfermedades generadas por diferentes tipos de microorganismos. Las bases de Schiff son una clase de compuestos orgánicos ampliamente estudiados para este fin y diversos reportes en la literatura científica lo soportan (Abdel-Rahman, 2013, págs. 266–276), (Chohan, 2010, págs. 2739 - 2747) . Por otro lado, en el diseño de fármacos, la presencia de halógenos en la estructura cristalina del compuesto de interés biológico, puede hacer que la actividad biológica se vea potencializada (Khoo, 2014, págs. 68–76).

Las bases de Schiff se caracterizan por presentar actividad antimicrobiana y antifúngica. Teniendo en cuenta las propiedades de los reactivos de partida se estudió la actividad frente hongos, con el fin de aportar información para la solución de la creciente problemática de enfermedades fúngicas a nivel mundial que ha llegado a causar muertes humanas (Suresh, 2013, págs. 239–248).

Una de las enfermedades más comunes causadas por hongos es la candidiasis, ocasionada por levaduras *Cándidas*: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* , especialmente *Cándida albicans*, infectando la cavidad oral, piel, esófago, tracto gastrointestinal, vagina y sistema vascular (Calderone, 2001, págs. 327-335). Las candidemias son infecciones nosocomiales con aumento de casos reportados en las últimas décadas, son frecuentes en poblaciones de unidades de cuidados intensivos y aunque la *Cándida krusei* representa solo entre el 1 y 5 % de causa para candidemias, su estudio es relevante por ser una cepa resistente a la terapia fúngica convencional como el Fluconazol (Schuster, 2013, págs. 278-284). Al existir pocos antifúngicos, es notable la resistencia que han desarrollado los organismos patógenos frente a éstos y, es necesario el reporte de nuevos principios activos para el tratamiento de enfermedades

comunes. La *Cándida krusei* ataca principalmente a pacientes con cáncer y/o que reciben tratamiento antifúngico profiláctico, también en pacientes inmunosuprimidos causa infección en el torrente sanguíneo (Schuster, 2013, págs. 278 - 284) e incluso se han reportado casos de ulceración crónica (Philipp, 2017, págs. 96-98) y vaginitis (Vega, 2016, págs. 565-566).

Teniendo en cuenta lo mencionado, es relevante para estudio de compuestos bioactivos, determinar la estructura cristalina de los mismos, debido a que la actividad biológica que muestran los materiales se relaciona directamente con su estructura. Por tal razón, en el presente trabajo de investigación se realizó la síntesis de cetiminas mediante un proceso de síntesis convencional, empleando un solvente amigable al medio ambiente (etanol) y asistida por un catalizador con el fin de disminuir el tiempo de reacción. Posteriormente se realizó la caracterización molecular por Espectroscopía Infrarrojo y Espectrometría de Masas y se determinó la estructura cristalina por técnicas de rayos-X de muestras policristalinas y de monocristal.

Como actividad final, se estudió la actividad antifúngica de los compuestos **[3a]**, **[3b]**, **[3c]** y **[3d]**, frente a las especies *Cándidas albicans* y *Cándida krusei*, usando como control Fluconazol, el cual es un compuesto antifúngico de amplio espectro comúnmente utilizado para controlar las cepas de *Cándidas*.

1. Planteamiento del Problema

El aumento en la población de humanos portadores de enfermedades como SIDA o cáncer, han generado alertas sanitarias, debido a la alta susceptibilidad que presentan ante la contracción de microorganismos patógenos de origen fúngico (INVIMA, 2016, págs. 2-3). Dicha problemática afecta especialmente a países de América Latina como Colombia, Ecuador, Venezuela y Brasil; entre junio de 2007 y marzo de 2010, se estudiaron 2.563 casos de infección nosocomial en el torrente sanguíneo con 2.688 microorganismos reportados, de los cuales la *Cándida* spp fue el séptimo agente más prevalente. Adicionalmente, los efectos de la micosis generaron una tasa bruta de mortalidad del 72,2 % durante el ingreso hospitalario (André Mario Doi, 2016, pág. 1). Los estudios describen la alta probabilidad de contraer infecciones intrahospitalarias tales como la candidiasis, criptococosis, trichosporonosis y aspergilosis (Nucci, 2010, pág. 561).

Es por esto que las estrategias que se formulan para combatir los efectos patógenos en los organismos vivos parten de la química orgánica, pues es esencial proponer rutas sintéticas que faciliten la obtención de compuestos de interés farmacológico con propiedades biológicamente activas. Las bases de Schiff, son compuestos prometedores para dar solución a dicha problemática, ya que son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica para el tratamiento de un gran número de enfermedades debido a su amplio rango de actividad biológica, principalmente antimicrobiana y antifúngica (Ahmed, 2016, pág. 2).

Teniendo en cuenta problemas como la resistencia que presentan los organismos patógenos, la alta toxicidad y la baja selectividad de los medicamentos útiles para tratar enfermedades de origen fúngico, en este trabajo de investigación se plantearon como interrogantes: ¿Es posible sintetizar los compuestos orgánicos tipo bases de Schiff a partir de la 9H-fluorenona, y las 4-(flúor, cloro, bromo, yodo)anilina, usando solventes amigables con el medio ambiente? ¿Los compuestos

orgánicos *N*-(4-fluorofenil)-9*H*-fluoren-9-imina (**3a**), *N*-(4-clorofenil)-9*H*-fluoren-9-imina (**3b**), *N*-(4-bromofenil)-9*H*-fluoren-9-imina (**3c**) y *N*-(4-yodofenil)-9*H*-fluoren-9-imina (**3d**) presentan propiedades antifúngicas?

2. Justificación

Las bases de Schiff son compuestos altamente estudiados en la química sintética actual, se caracterizan por presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, y anticancerígena, lo que las hace útiles para tratar enfermedades y afecciones específicas que evolucionan constantemente, generando la necesidad de nuevas investigaciones enfocadas en la obtención de productos farmacológicos eficaces (Pemán, 2013, pág. 329).

En las últimas décadas, se ha reportado un incremento global de enfermedades fúngicas invasivas, siendo las levaduras como las *Cándidas* una de las principales causantes de la morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, presentándose como agravante la limitación de agentes antifúngicos disponibles en centros clínicos. Algunos de los fármacos utilizados pertenecen principalmente a la familia de los azoles, alilaminas y polienos, entre otros. Sin embargo, el uso intensivo de moléculas tipo azoles como antifúngicos, ha generado un incremento de resistencia por parte de cepas de hongos patógenos (Anca S, 2016, pág. 12).

Para el estudio de compuesto bioactivos, la Dra. Lena Ruiz Azura de la ACS, propone a los halógenos como una buena alternativa a tener en cuenta para el diseño de fármacos. Así mismo, se reveló que la presencia de anillos aromáticos genera interacciones π - π con los residuos aromáticos de las proteínas, lo que proporciona a las moléculas un carácter hidrofóbico, siendo confirmado a partir del análisis farmacóforo. Las características aromáticas/hidrofóbicas y

aromáticas/aceptor/donante en los compuestos son esenciales para la actividad biológica (Moorthy, 2017, pág. 3240).

Para la evaluación de la actividad antifúngica, numerosos estudios proponen como compuesto de referencia el fluconazol (Figura 1), debido a que su espectro de actividad es mayor que el de otros antifúngicos y el mecanismo de acción altera la permeabilidad y rigidez de la membrana celular del hongo, mediante una serie de reacciones bioquímicas (Anca S, 2016, pág. 9).

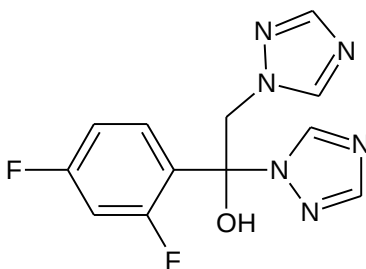


Figura 1. Estructura molecular del fluconazol

Teniendo en cuenta los reportes de las bases de Schiff, estas presentan prometedora actividad antifúngica frente a la *Cándida albicans* y *Cándida krusei* (Anca S, 2016, pág. 9).. La escogencia de los sustituyentes que componen los fármacos actuales, por los propuestos (halógenos), se realizó debido a la elevada resistencia desarrollada, baja solubilidad en solventes acuosos (afectando su biodisponibilidad), fracasos terapéuticos, efectos adversos (Rivera, 2014, pág. 10), alto riesgo de toxicidad y deficiencias farmacocinéticas en actividades antifúngicas (Moorthy, 2017, pág. 3240). Por otra parte, para el método de síntesis, además de la elección de sustituyentes, se pretende la aplicación de principios de química verde y economía atómica para garantizar la eficiencia de la reacción mediante la utilización de materiales que favorecen la selectividad y minimizan la formación de subproductos y por tanto de residuos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Estudiar la estructura cristalina mediante técnicas de difracción de rayos X y la actividad antifúngica a partir del método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria (CI₅₀) de compuestos orgánicos derivados de la 9H-fluorenona y anilinas *p*-sustituídas (F; Cl; Br y I) frente a *Cándida Albicans* y *Cándida Krusei*.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar los compuestos orgánicos N-(4-Xfenil)-9H-fluoren-9-imina; (X:F,Cl,Br;I) por métodos convencionales, como reflujo constante en un periodo de 48-72 horas.
- Caracterizar los compuestos obtenidos por medio de las técnicas instrumentales como espectroscopía infrarroja y espectrometría de masas.
- Establecer la estructura cristalina de los compuestos obtenidos mediante técnicas de difracción de rayos-X de monocristal y muestras policristalinas.
- Determinar la actividad antifúngica de los compuestos sintetizados sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 y *Cándida krusei* ATCC 6258.

4 Marco Teórico

4.1 Cetiminas.

Las iminas o bases de Schiff, deben su nombre a Hugo Schiff, quien en 1864 las creó mediante nuevos métodos de Química orgánica formándolas a partir de la condensación de una amina primaria con una cetona o un aldehído, reacción que ocurre normalmente siendo catalizada por un medio ácido, dando lugar a la formación de un doble enlace carbono-nitrógeno ($C=N$), denominado enlace azometina, siendo éste responsable de los efectos biológicos; especialmente antifúngica, antibacteriana y herbicida. Han sido moléculas ampliamente estudiadas, por su importancia biológica al ser biomoléculas que participan ampliamente como intermediarios en procesos enzimático, biosíntesis de hormonas y neurotransmisores. (Núñez, 2006, págs. 16-17).

Las cetiminas (bases de Schiff) pueden ser primarias si cumple con $-R-(C=NH)-R_1-$ o secundarias como se muestra en la Figura 2, $-R_2-(C=NR)-R_1-$, es decir, su diferencia es la presencia de hidrógeno o un grupo en el enlace con el Nitrógeno proveniente de la amina (Myron L, 1977, pág. 152).

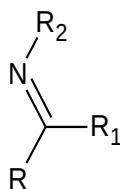


Figura 2. Cetimina secundaria

Fuente: (Myron L, 1977, pág. 152).

En particular, además de ser empleadas como colorantes, pigmentos, catalizadores, las cetiminas se destacan por ser compuestos bioactivos (Devlin, 1999, pág. 176), principalmente antifúngicos, anticancerígenos, antimálaricos, antibacterianos, antiproliferativos, antiinflamatorios, antivirales y antipiréticos (Cleiton M. , 2011, págs. 1-8).

4.2 Técnicas de caracterización.

Las técnicas de caracterización permiten determinar la identidad de compuestos desconocidos, brindando información molecular (espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas), cristalográfica y estructural (difracción de rayos-X de polvo y monocristal). El compilado de los datos proporcionados de la aplicación de las técnicas, permitirá corroborar la obtención de los compuestos de interés.

4.3 Espectroscopia infrarroja (IR).

Esta técnica analítica es una herramienta que facilita la identificación de datos estructurales de sustancias orgánicas y permite establecer indicios sobre la presencia o ausencia de grupos funcionales específicos. La radiación infrarroja que produce las vibraciones moleculares se encuentra subdividida en infrarrojo cercano (frecuencias de $12800\text{--}4000\text{cm}^{-1}$), rotación-vibración fundamental, es decir, infrarrojo medio ($4000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$) e infrarrojo lejano que comprende las vibraciones del esqueleto ($200\text{--}10\text{cm}^{-1}$), siendo el intervalo de longitud de número de onda más utilizado el comprendido entre 4000 a 670cm^{-1} (Skoog D. , 2001, págs. 410-411).

4.4 Espectrometría de masas (EM).

Es una técnica que mide la masa de las moléculas, fragmentos e/o iones y actualmente es ampliamente utilizada por su alta detección a bajas concentraciones de analito. Para realizar la medición, inicialmente se producen iones a partir de las moléculas de interés, posteriormente se separan según su relación masa-carga y finalmente se realiza la medición de las abundancias relativas de cada ion. En una de las técnicas clásicas de impacto electrónico (EI), las moléculas del analito que son ionizadas, se descomponen en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de

fragmentación así como los iones resultantes constituyen el espectro de masas, que es único y puede ser usado como “huella química” para caracterizar el analito determinado (Skoog H. , 2007, pág. 517).

4.5 Difracción de rayos-x muestras policristalinas (DRXP).

La técnica de Rayos-X analiza sólidos cristalinos para la identificación del sistema cristalino, constantes de celda unidad y grupo espacial. Éstos sólidos, se componen de múltiples cristales, los cuales están ubicados en diversas direcciones. Sobre el conjunto de pequeños cristales se incidirá radiación monocromática de Rayos-X, lo que permite la reflexión de todas las posibles orientaciones de la red (Morral F. , 2004, pág. 739).

Los índices de Miller son valores enteros que toman tres planos paralelos, identificándose como h,k,l , siendo de gran utilidad para explicar y comprender los patrones de difracción obtenidos experimentalmente. De esta manera, la toma de datos se realiza con un difractómetro, se obtiene el perfil de difracción, al cual se asignan los índices de Miller (proceso de indexado) para identificar el sistema cristalino, continuando con la estimación del grupo espacial para finalizar con el refinamiento de las constantes de celda (Ooi, 2010, págs. 23-28).

4.6 Difracción de rayos-x monocristal (DRX).

La difracción de rayos-X de monocristal es altamente precisa y proporciona la mayor cantidad de información, pues permite realizar una caracterización estructural, dando a conocer posiciones atómicas, longitudes de enlace, ángulos de enlace, torsiones, interacciones inter e intramoleculares, composición de la celda unidad, permitiendo además la verificación de las constantes de celda, sistema cristalino y su distribución, datos que se determinan mediante DRX de muestras

policristalinas. Para la aplicación de ésta técnica se necesita poseer un cristal único, de tamaño específico y sin maclas, por lo cual el proceso de recrystalización debe ser altamente controlado (Ooi, 2010, págs. 28-30).

4.7 Compuestos biológicamente activos.

Los compuestos orgánicos con actividad biológica están direccionados a la producción de nuevos fármacos, y con la elaboración de éstos, ampliar el tratamiento de enfermedades que en su gran mayoría han presentado modificaciones en los últimos siglos; para mejorar su tolerancia, proponer alternativas ante la resistencia microbiológica, perfiles farmacocinéticos más favorables, y solucionar problemas de toxicidad y seguridad de fármacos (Gennaro, 2003, pág. 234), (Carrillo, 2001, págs. 2-5).

Por ello, la importancia de sintetizar y determinar la estructura de éste tipo de compuestos, en la que a partir de variaciones en la estructura se pueda potencializar su efecto biológico.

Nuevas técnicas como el trasplante de células madre, de órganos sólidos, cirugías con extensa duración, terapia inmunosupresora, disfunción crónica de injertos, inmunosupresión pre-operativa, además de largas estancias en Unidades de Cuidados Intensivos, suman pacientes en riesgo que aumentan la cifra de infecciones fúngicas. Por otro lado, diferentes cultivos como brócoli, coliflor, mostaza, nabo, repollo, colza y rábano también son afectados por hongos patógenos; por ello, el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antifúngica es necesario, pues el incremento de enfermedades causadas por hongos aumenta cada día. La clasificación clínica de éstas enfermedades está dada por: superficiales (afectan la epidermis), cutáneas (afectan la epidermis, dermis, pelos y uñas), micosis subcutáneas (afectan la epidermis, dermis, tejido celular subcutáneo; pueden invadir el tejido muscular y óseo), micosis sistémicas o profundas (por lo

general, la lesión inicial es a nivel del pulmón, diseminándose por vía hematógica a otros sistemas u órganos de la economía) (Ponce, 2003, págs. 1-36).

Las infecciones en humanos son causadas especialmente por hongos del género *Cándidas* (levaduras) y *Aspergillus*. Las *Cándidas* producen Candidiasis, la cual es una infección común que se presenta en la piel, esófago, tracto gastrointestinal, cavidad oral, vagina, y sistema vascular; la *Cándida albicans*, suele ser la principal causante de dichas afectaciones, un importante patógeno que presenta morfogénesis, es decir, puede variar de manera reversible, de levaduras unicelulares a formas de crecimiento filamentosas, por ello puede verse como levadura, pseudohifas e hifas, siendo la única *Cándida* que forma tubos germinativos como se puede apreciar en la Figura 3 (Sudbery, 2004, págs. 317-324).

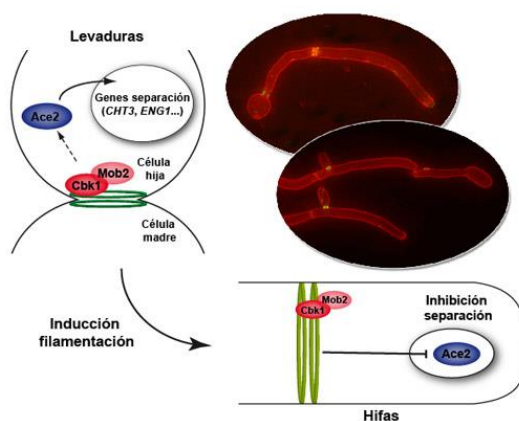


Figura 3. Morfogénesis de la *Cándida albicans*
Fuente: (Carlos, R, 2017)

La *Cándida albicans* posee una gran capacidad para sobrevivir en varios sitios del cuerpo, teniendo en cada lugar características únicas de presiones ambientales, es decir, ésta presenta una gran capacidad de adaptación a los extremos fisiológicos en el humano (A.Calderone, 2001, págs. 327-335).

Por otra parte, la *Cándida krusei* es catalogada como un patógeno nosocomial que afecta principalmente a pacientes inmunodeprimidos, ha presentado un amplio espectro de

manifestaciones clínicas tales como fungaemia, endoftalmitis, artritis y endocarditis, la mayoría de estas son adquiridas por grupos de pacientes que se encuentran en un entorno nosocomial, siendo importante mencionar que la infección se adquiere principalmente por el virus de la inmunodeficiencia humana y el uso generalizado del fluconazol para tratar las infecciones fúngicas en los pacientes, esto ha contribuido al aumento significativo de *C. krusei* por la elevada resistencia que presenta a dicho fármaco. Las investigaciones han revelado que la *C. krusei* es menos virulenta que la *C. albicans* en cuanto a la adherencia tanto a superficies epiteliales como protésicas, potencial proteolítico y producción de fosfolipasa. Es importante destacar que la *C. krusei* es más común en pacientes con neoplasias malignas hematológicas y receptores de trasplante de sangre y médula ósea. (M.A. Pfaller, 2008, págs. 515-521)

4.7.1 Mecanismo de acción compuesto de referencia. Los compuestos antifúngicos presentan diferentes tipos de mecanismos de acción frente al hongo, dividiéndose en:

- compuestos que intervienen en la función de la membrana citoplasmática
- compuestos activos frente a la pared celular
- compuestos activos frente a ácidos nucleicos
- compuestos que inhiben la síntesis proteica
- compuestos que inhiben el ensamble de los microtúbulos.

El compuesto de referencia a usar será el fluconazol, fármaco antifúngico clasificado como triazol, que presenta un excelente espectro de actividad *in vivo* e *in vitro* contra varias especies de *Cándidas*. Su lipofilicidad permite la penetración en la membrana celular del hongo, para posteriormente inhibir la síntesis de Ergosterol (principal esteroide fúngico) y con ello, aumentar la permeabilidad de la membrana finalizando el crecimiento del hongo (Ponce, 2003, págs. 1-36)

además se caracteriza por presentar menor toxicidad que la Anfotericina B (medicamento estándar).

4.7.2 Métodos para la evaluación de la actividad biológica. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana existen varios métodos.

El método dilución de Agar es útil para la determinación de susceptibilidad microbiana, en el que se obtienen varias concentraciones del agente antimicrobiano, para añadir cada una de éstas en cajas Petri, mezclado con el agar Mueller-Hinton (preferiblemente), cuidando de no ocasionar burbujas. Las placas de agar se dejan solidificar a temperatura ambiente, y antes de 30 minutos de secado se incuban a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 16 a 20 horas, para posteriormente conservarse en una bolsa durante máximo cinco días a $2-8^\circ \text{C}$.

Para la preparación del inóculo, es recomendable usar dentro de los estándares de turbidez el patrón de 0,5 McFarland como un patrón de referencia, que preferentemente posee 104 UFC por mancha de 5 a 8 mm de diámetro conocido como halo inhibitorio, para facilidad de cuantificación. La determinación final se realiza en una superficie oscura y no reflectante. (CLSI, 2006, págs. 23-26).

Por otra parte, los agentes antimicrobianos también pueden ser evaluados mediante procedimientos de dilución de caldo, dividiéndose en Macrodilución y Microdilución, siendo recomendado para ambos casos el caldo Mueller-Hinton por el instituto CLSI (CLSI, 2006, págs. 23-26).

Para el método por Macrodilución, en la figura 4 se muestra la prueba que se realiza en tubos estériles para cada combinación microorganismo/antimicrobiano, de la siguiente manera:

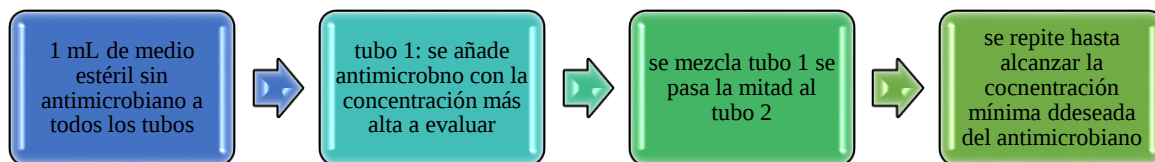


Figura 4. Esquema del procedimiento de Macrodilución

Inóculo: se hace una dilución 1:100 de forma que al añadir 1 ml a los tubos con 1 mL de medio con antimicrobiano queden 10⁶ UFC en 2 mL, es decir 5 x10⁵ UFC/mL.

El método de Microdilución, cada pocillo de la placa de microtitulación con un pocillo en forma de “U” en el fondo, representa los tubos del método de macrodilución (figura 5).

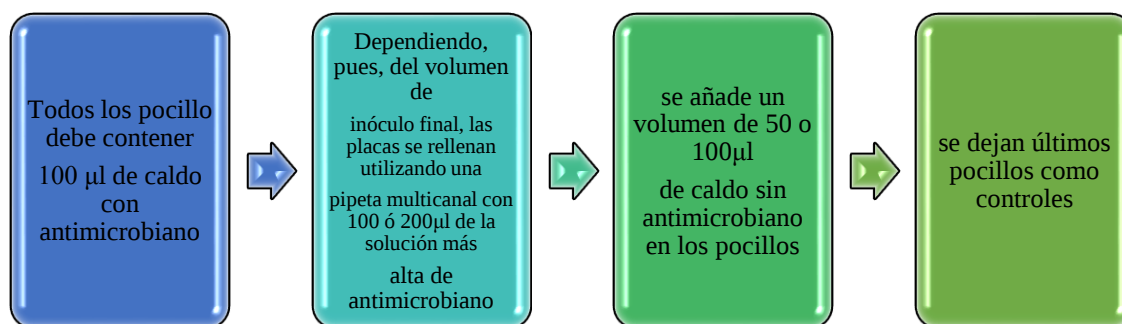


Figura 5. Esquema del procedimiento de Microdilución

Inóculo: se prepara a partir de suspensiones del 0.5 de la escala de MacFarland, empleando cualquiera de los dos métodos (crecimiento o suspensión directa) indicados anteriormente. El inóculo final será de 5 (se acepta de 3 a 7) x 10⁵ UFC/mL, ó 5 x 10⁴ UFC/pocillo.

Para ambas diluciones, los tubos o placas se incubarán a 35°C durante 16 a 20 horas, o en las condiciones necesarias que se deben tener en cuenta para la especie de microorganismo que se tenga. (CLSI, 2006, págs. 26-30).

4.8 Análisis Cienciométrico Aplicado al Estudio Estructural y Evaluación de la Actividad Antifúngica de las Bases de Schiff Frente a la *C. albicans* y *C. krusei*

La cienciometría es la ciencia que permite el estudio de la producción científica con el fin de medir y analizar la misma. Siendo los principales temas de investigación, la medición del impacto,

los conjuntos de referencia de artículos para investigar, el impacto de las revistas e institutos, mapeo de campos científicos y la producción de indicadores para su uso en contextos políticos o de gestión (Leydesdorff, 2012, pág. 75).

Es preciso conocer que, en las últimas décadas, las enfermedades de origen fúngico nosocomial han tenido un aumento a nivel mundial, que impactan principalmente a países de América Latina. Éstas, afectan a pacientes con el sistema inmunológico débil, poblaciones vulnerables como ancianos, mujeres embarazadas, recién nacidas y niñas, de tal manera que han generado gran preocupación en entidades hospitalarias y gubernamentales. Además, la elevada resistencia que han desarrollado organismos patógenos como los hongos ante los tratamientos médicos convencionales y fármacos estándar (Sierra, 2008, págs. 8-10), han generado la necesidad de continuar la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos que contribuyan de manera significativa en la solución de dicha problemática.

De acuerdo con los reportes científicos, las candidemias, conocidas como infecciones de origen nosocomial, provocadas por *Cándidas*, reportan que más del 70 % de los casos son causados por *C. albicans* y un 5% a otras especies como *C. krusei*; estos organismos provocan elevada mortalidad, dificultad de diagnóstico precoz y resistencia ante tratamientos establecidos como fármacos azólicos, y que a su vez conllevan a la alta morbilidad, prolongación en la estancia hospitalaria y elevados costos médicos (Murillo, 2017, págs. 1-7).

Por esta razón, con el fin de buscar alternativas para contribuir en temas como la inversión en Ciencia y Tecnología para el sector de la salud y siendo conscientes que la investigación es un factor decisivo en el crecimiento intelectual y científico de una nación, y que los países que han optado por el liderazgo en este tipo de inversiones, han logrado mayores niveles de crecimiento y desarrollo, es importante la realización de estudios de vigilancia tecnológica, ya que permite el

acceso a los adelantos científicos y tecnológicos mundiales a favor del desarrollo y obtención de nuevos materiales biológicamente activos como las bases de Schiff derivados de la 9*H*-fluorenona y la anilina.

5. Marco de Antecedentes

La búsqueda de nuevos compuestos biológicamente activos, ha sido una necesidad latente desde tiempos atrás y debido al aumento de enfermedades en el siglo XXI, se ha generado en investigadores y científicos interés por desarrollar nuevos compuestos que puedan proporcionar alternativas para dar tratamiento a determinadas enfermedades. De acuerdo a estudios realizados, las cetiminas presentan gran importancia en la síntesis de compuestos orgánicos, debido a su estabilidad y actividad, es y por tanto es considerada una alternativa prometedora para la solución de problemáticas relacionadas con el área de la salud.

Es por esto que, en el 2004, Neil Glagovich y colaboradores de la Universidad Estatal de Youngstown, llevaron a cabo un estudio sobre la síntesis del compuesto *N*-(9*H*-Fluoren-9-iliden)-*N*-(-2-metoxifenil)amina ($C_{20}H_{15}NO$), a partir de un reflujo constante por 20 horas, utilizándose cantidades estequiométricas de los reactivos de 9*H*-fluorenona, *o*-anisidina, ácido *p*-toluenosulfónico y tolueno como solvente. La formación de cristales naranjas y su posterior caracterización confirmó la obtención del producto de interés (Figura 6).

Como resultados relevantes se destacó los efectos que tiene la imina *orto*-sustituida, pues presentó un rendimiento de reacción menor, en comparación con la posición *meta* o *para* debido a interacciones estéricas desfavorables entre los átomos de hidrógeno de los carbonos adyacentes en el anillo bencénico. (Glagovich, 2004, pág. 60).

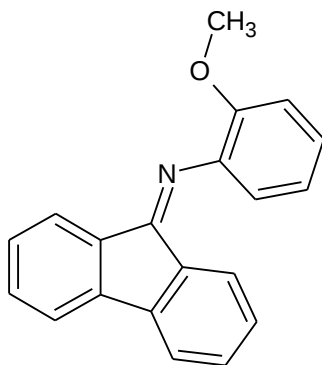


Figura 6. Estructura molecular del N-(9H-Fluoren-9-iliden)-N-(2-metoxifenil)amina
Fuente: (Glagovich, 2004)

Posteriormente, el mismo grupo de trabajo, en el 2005 logró la síntesis del compuesto *N,N'*-bis(9*H*-fluoren-9-iliden)benzene-1,2-diamina (Figura 7) bajo el mismo proceso de síntesis, variando la amina inicial por la *o*-fenilendiamina. Como resultado encontraron que el tiempo de reacción aumentó a 24 horas, obteniendo una solución color naranja, la cual al concentrarse a presión reducida cambio a una tonalidad rojiza , siendo ésta una molécula de fórmula molecular $C_{32}H_{20}N_2$ (Glagovich N. , 2005, pág. 61).

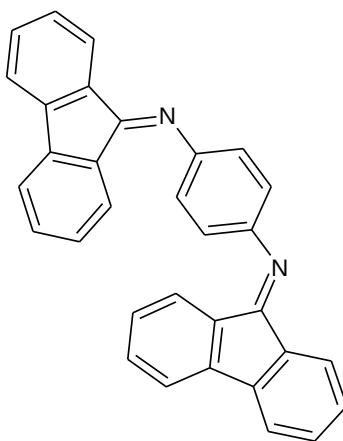


Figura 7. Estructura molecular de la *N,N'*-bis(9*H*-fluoren-9-iliden)benceno-1,2-diamina
Fuente: (Glagovich N. , 2005)

En el 2009, Su-Zhen Bai y colaboradores de la Universidad Estatal de Youngstown, utilizaron como reactivo principal 9*H*-fluorenona, cambiando con el uso de 4-metilanilina, en una reacción

de condensación, utilizando etanol como solvente y manteniendo la reacción a temperatura ambiente. La purificación se realizó mediante recristalización. Como resultado de la síntesis se obtuvo un sólido cristalino amarillo correspondiente a la formación del compuesto *N*-(9*H*-Fluoren-9-iliden)-4-metilanilina, $C_{20}H_{15}N$ (Figura 8). Éste estudio se realizó a razón de la gran atención que reciben las bases de Schiff, en especial por su reconocida actividad biológica, centrándose así en los derivados de la fluorenona (Su-Zhen, 2009, pág. 65).

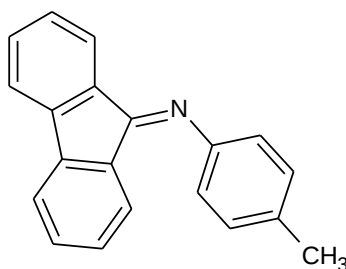


Figura 8. Estructura molecular de la *N*-(9*H*-Fluoren-9-iliden)-4-metilanilina
Fuente: (Su-Zhen, 2009).

Por otra parte, la investigación realizada por la Universidad de Pavia-Italia, en el año 2013 (Matviiuk, 2013, págs. 37-48) evidenció que compuestos como la 3-(9*H*-fluoren-9-ilideno) pirrolidina-2,5-diona, resulta ser biológicamente activo frente a la *enoyl-ACP reductasa (InhA)* y la *Micobacterium tuberculosis*. El proceso de síntesis del compuesto, se realizó mediante la condensación de fluorenona con succinonitrilo en presencia de *tert*-butóxido de potasio (*t*-BuOK) para obtener 3-(9*H*-fluoren-9-ilideno) pirrolidina-2,5-diona. Adicionalmente, se realizó la reducción del doble enlace, a partir de la hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C al 10% y $NiCl_2/NaBH_4$. La obtención del producto mencionado, facilita la preparación de otros compuestos derivados de la fluorenona con actividad de inhibición contra cepas de la *Micobacterium tuberculosis*. La reacción mencionada se evidencia en la Figura 9.

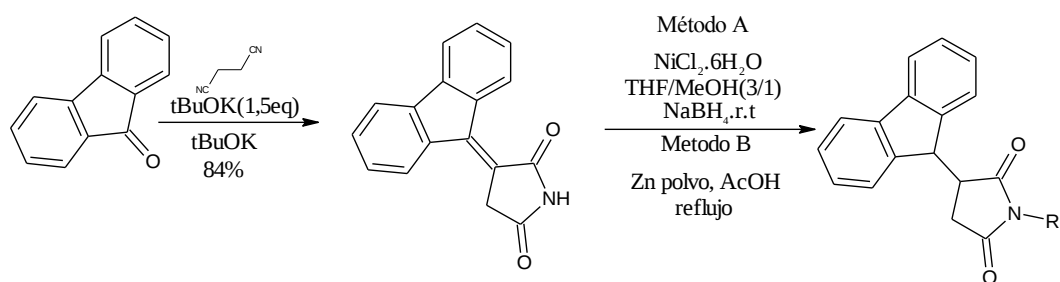


Figura 9. Esquema de reacción propuesta por Matviiuk para la obtención de 3-(9H-fluoren-9-ilideno) pirrolidina-2,5-diona.

Fuente: (Matviiuk, 2013)

Así mismo, en el año 2015 Thawra Ahmad y asociados del departamento de química de la Universidad de Damasco, se enfocaron en el estudio de procesos de síntesis, caracterización y evaluación de actividad antibacterial, en compuestos derivados de las bases de Schiff, como los heterociclos de fluoreno. Estos investigadores sintetizaron varios compuestos haciendo reaccionar aminas primarias y 2-carbaldehído de fluoreno en presencia de DMF y HCl como catalizador. Esta solución se mantuvo en reflujo constante durante 12 horas; el posterior enfriamiento evidenció la formación de un precipitado, el cual se recrystalizó en etanol para finalmente obtener los compuestos bases de Schiff derivados del fluoreno con un rendimiento del 76% ($C_{17}N_3SO_2H_{11}$; $C_{20}NOH_{15}$; $C_{20}NH_{15}$; $C_{20}N_2H_{16}$; $C_{21}N_2SH_{16}$) los cuales presentaron una amplia habilidad para inhibir cepas microbianas, siendo característico la presencia del grupo Carbono-Nitrógeno, donde los compuestos tenían actividad frente *Acinetobacter* un grupo de bacterias Gram- negativas y actividad leve o moderada contra *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*. La caracterización de los compuestos se realizó mediante la aplicación de técnicas como FT-IR, EM, 1H - NMR, ^{13}C - NMR, y análisis elementales que determinan la veracidad de los compuestos sintetizados y se comprobó la purificación por medio de HPLC (Thawra A, 2015, págs. 447 - 458).

Debido al constante aumento de infecciones fúngicas invasivas causadas por las *Cándidas* y la resistencia que muestran frente a fármacos pertenecientes a la familia de los azoles, alilaminas,

polienos entre otros; en Rumania en el año 2016, en la Universidad de medicina y farmacia, se sintetizaron nuevas bases de Schiff, los *Tiazolil-triazol* (Figura 10), para evaluar el potencial antifúngico frente a las *Cándidas*. Para el análisis de la actividad biológica, se tomó como compuestos de referencia el fluconazol y ketoconazol. Los datos obtenidos del acoplamiento mostraron que todas las bases de Schiff tienen en el sitio de unión interacción más alta respecto al fluconazol, al interaccionar covalentemente con el sitio activo de la 14 α -desmetilasa de Itraconazol-lanosterol aislada de la *Saccharomyces cerevisiae*; en un rango de -10,45 y -12,92 kcal/mol. Así mismo, se realizó la determinación de los diámetros de las zonas de inhibición mediante un ensayo *in vitro* utilizando el método de difusión en disco, en los cuales se midieron los respectivos diámetros y los resultados obtenidos con respecto a la relación entre la estructura y actividad anti-cándida de los compuestos, mostraron que aquellos sustituidos en el fenilo unido al grupo azometínico con *para*-Br, *meta*-nitro, *para*-nitro y 2,4-dicloro, mostraron mayores diámetros en la zona de inhibición, y la relación de CI₅₀ y CMF para los compuestos (figura 21), mostró que las bases de Schiff sintetizadas podrían actuar como agentes fungicidas (Anca S, 2016, pág. 19).

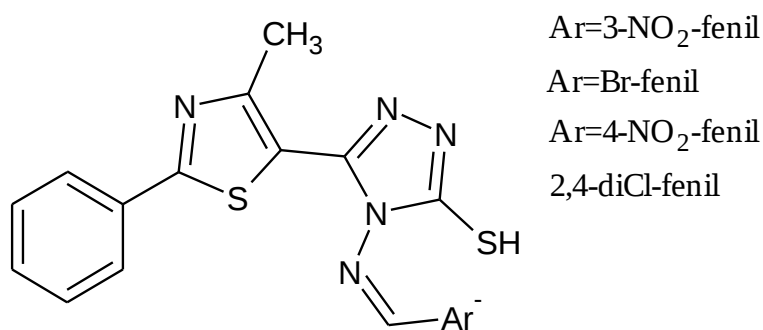


Figura 10. Estructura molecular de nueva base de schiff 4-amino-5-(4-methyl-2-phenylthiazol-5-yl)-4h-1,2,4-triazole-3-thiol
 Fuente: (Anca S, 2016)

6. Diseño Metodológico

6.1 Síntesis general de los compuestos [3a-d]

La síntesis de los compuestos *N*-(4-*X*fenil)-9*H*-fluoren-9-imina; *X*=F, Cl, Br, I [3a-d] se llevó a cabo en etanol, debido a que es un solvente amigable con el medio ambiente en comparación con el tolueno, el cual es el solvente empleado en los reportes de la literatura para estructuras similares (Glagovich, 2004, pág. 60).

Inicialmente se hicieron reaccionar cantidades estequiométricas (según se describe en la Tabla 1) de los reactivos 9*H*-fluorenona [1] y anilina *p*-sustituida (*X*: F, Cl, Br, I), manteniendo el reflujo constante a 70°C en un intervalo de 48-72 horas, usando etanol como solvente y ácido *p*-toluenosulfónico como catalizador (0,0021g, 10μmol). Posteriormente, cuando la reacción se completó, se eliminó el solvente mediante filtración al vacío. Finalmente se calculó el rendimiento de reacción y se determinó el punto de fusión de cada uno de los compuestos de interés. El transcurso de la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (CCF).

Tabla 1. Condiciones de reacción para la síntesis de los compuestos *N*-(4-*X*fenil)-9*H*-fluoren-9-imina; *X* = F, Cl, Br, I

COMPUESTO	CANTIDADES DE REACTIVOS [g]		REFLUJO (Horas)	SOLVENTE DE CRISTALIZACIÓN
	9 <i>H</i> -Fluorenona (1.72 mmol)	<i>X</i> -Anilina (1.72 mmol)		
<u>3a</u>	0.3300	0.2034	72	acetonitrilo
<u>3b</u>	0.3642	0.2714	72	metanol
<u>3c</u>	0.3628	0.2972	72	metanol
<u>3d</u>	0.2365	0.2873	48	acetonitrilo

El producto de esta síntesis se purificó por medio de recristalización usando diferentes solventes orgánicos como etanol, metanol y acetonitrilo para finalmente obtener los compuestos de interés 3a, 3b, 3c y 3d. En la Figura 11 se aprecia el esquema de reacción para esta metodología.

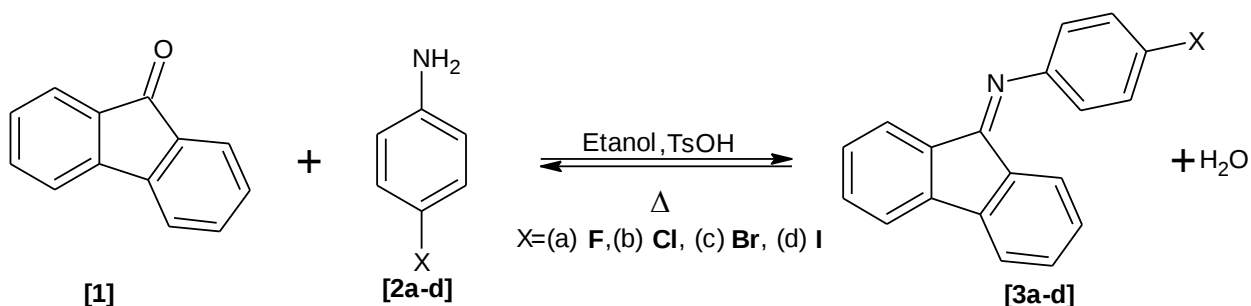


Figura 11. Esquema de síntesis de los compuestos N-(4-Xfenil)-9H-fluoren-9-imina

6.2 Caracterización Molecular de los Compuestos [3a-d]

6.2.1 Espectroscopia infrarroja. Se realizó la identificación de los principales grupos funcionales de las muestras solidas obtenidas durante el proceso de síntesis, mediante espectroscopía infrarroja (IR) con el espectrómetro FT-IR Bruker Tensor 27 ubicado en el laboratorio 304 del edificio de investigaciones de la Universidad Industrial de Santander en la sede Guatiguará.

6.2.2 Espectrometría de masas. La elucidación estructural de las moléculas se realizó a partir de la determinación de las masas moleculares de las cetiminas obtenidas mediante ionización por electrospray (ESI-IT) de iones positivos. Se llevó cabo en el espectrómetro de masas Bruker, ubicado en el laboratorio de espectrometría de masas, en las instalaciones del Parque Tecnológico Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander, para el análisis los compuestos [3a], [3b], [3c] y [3d] se disolvieron en una mínima cantidad de etanol y la toma de datos se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: flujo 5.0L/min, presión de 8psi, temperatura de 220°C y diferencial entre dos potenciales $V_1=4500\text{v}$ y $V_2=500\text{v}$.

6.3 Caracterización estructural de los compuestos obtenidos (Cetimininas)

La caracterización estructural se realizó por técnicas de Difracción de rayos-X de muestras policristalinas y monocristal.

6.3.1 Difracción de rayos-X de muestras policristalinas. La metodología seguida se describe a continuación:

El ítem de ensayo (aprox. 100 mg), se pulverizó en un mortero de ágata posteriormente, el espécimen seleccionado fue montado en un portamuestra de polimetilmetacrilato (PMMA) con centro de silicio “low background” y 0,5 mm de cavidad mediante la técnica de llenado frontal. El proceso de toma de datos se realizó utilizando un difractómetro de polvo BRUKER D8 Advance equipado con un detector lineal LynexEye, filtro de níquel (Ni) en un rango de medición de 2 a 70° en ángulos de 2 theta (2θ) y con una razón de muestreo de 1 s/paso. El difractómetro utilizado para la toma de datos se encuentra ubicado en el laboratorio de rayos-X de la Universidad Industrial de Santander (UIS) – sede Guatigará.

Posterior a la toma de datos, se realizó la caracterización cristalográfica de cada uno de los compuestos obtenidos siguiendo los pasos descritos a continuación:

- Tratamiento de datos: el perfil de difracción experimental fue sometido a una serie de corrección de datos que involucran el alisamiento del perfil utilizando el método de Savitzky-Golay; eliminación del ruido de fondo (background) mediante el método de Sonneveld y Visser; eliminación de la radiación $K\alpha_2$ del material del que está hecho el ánodo del equipo utilizando el método de Ranchinger y localización de los picos calculando el ancho máximo de la altura media (FWHM) para cada uno (Amutha, 2014, págs. 6, 432–435). Este proceso se realizó utilizando el programa especializado de dominio público POWDERX (Dong, 1998, pág. 32).

- **Determinación de las características cristalinas:** Posteriormente se determinó el sistema cristalino y las constantes de la celda unidad. Este proceso se realizó mediante la asignación de índices de Miller a las reflexiones observadas (indexado) utilizando el método de dicotomía de volumen, DICVOL14 (Louer, 2004, págs. 24, 987 – 993.). El grupo espacial se determinó mediante el programa especializado CHEKCELL (Jean, 2004, pág. 46). Finalmente se realizó el cálculo de los mejores valores de las constantes de la celda unidad mediante un refinamiento por medio del programa especializado NBS*AIDS83 (Hubbard, 1991, pág. 141) utilizando la totalidad de las reflexiones observadas.

6.3.2 Difracción de Rayos-X de monocristal. La obtención de cristales aptos para el estudio por DRX de monocristal (tamaño y morfología) se logró mediante un proceso de recristalización en metanol o acetonitrilo, empleando la técnica de evaporación lenta de solvente. La toma de datos se realizó en un difractómetro RIGAKU modelo XtaLab P200K equipado con un detector Pilatus y dos fuentes de radiación (Cobre y Molibdeno) soportado por el software CrystalClear para la toma de datos y OLEX2.0 para la solución y refinamiento de la estructura. El estudio de las características estructurales (posiciones atómicas, longitudes de enlace, ángulos de enlace e interacciones inter e intramoleculares) se realizó con el programa Mercury.

6.4 Evaluación de la Actividad Antifúngica de los compuestos [3a-d]

6.4.1 Determinación de la actividad antifúngica de la *Cándida albicans* y *Cándida krusei*. Se llevó a cabo mediante pruebas de inhibición de crecimiento fúngico, determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CI₅₀), utilizando como modelos de estudio dos tipos de

hongos patógenos: *Cándida krusei* y *Cándida albicans*, teniendo en cuenta el método de microdilución.

Respecto al cultivo microbiano, se utilizaron los procedimientos descritos por Shahverdi et al. (Shahverdi, 2007, págs. 158-171). Los microorganismos fueron cultivados en los medios sólidos correspondientes. Antes de los ensayos de CI_{50} se realizó un preinóculo en medios de cultivo líquidos, garantizando así que los ensayos se llevaron a cabo en la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos.

6.4.2 Concentración inhibitoria (CI_{50}). Los cultivos microbianos se llevaron de acuerdo con lo descrito previamente, suplementando los medios de cultivo con los compuestos **[3a]**, **[3b]**, **[3c]** y **[3d]** a diferentes concentraciones. La mezcla se incubó a 37 °C por 2h, y se monitoreó la turbidez del cultivo mediante mediciones de densidad óptica a 595 nm. Como control positivo se utilizó fluconazol y como control negativo agua destilada. Los compuestos a evaluar fueron diluidos en medio de cultivo y adicionados directamente en placas de ELISA de 96 pozos. Posteriormente a la microplaca se le adicionaron 100 μ L/pozo de agar conteniendo una concentración fúngica de 105-106 unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL).

La adición inicial del caldo cultivado a los pozos de la microplaca, fue tomada como el tiempo cero. Los microorganismos se incubaron a 37°C durante periodos de 3 a 24 horas. La concentración mínima inhibitoria (CI_{50}) se determinó mediante turbidimetría usando lector de microplaca marca Biorad a 595 nm. La CI_{50} se tomó como la concentración más baja (μ g/mL) en la cual no hay crecimiento de microorganismos.

6.5 Metodología Análisis cuantitativo de la Actividad Antifúngica de las Bases de Schiff Frente a la *C. albicans* y *C. krusei*

La búsqueda de la información bibliométrica se realizó en la base de datos de Scopus para la revisión de artículos relacionados con temas sobre la actividad antifúngica que ejercen las bases de Schiff en cepas de hongos patógenos como la *Cándida albicans* y *Cándida krusei*. Para esto se utilizaron diferentes estrategias de búsqueda, como la elección de palabras claves relacionadas con el tema, la limitación del rango de años, y las secciones de búsqueda (títulos, palabras clave, resumen) con el fin de obtener datos pertinentes y selectivos de acuerdo al tema en cuestión.

Para mayor selectividad, se efectuaron cambios en la ecuación de búsqueda, en la que se agruparon las palabras claves que presentaban mayor similitud, pues al aplicar un operador lógico diferente a OR, y se aplica AND, el algoritmo de búsqueda cambia, lo que genera resultados errados, a su vez se llevó a cabo la delimitación por años, teniendo en cuenta solo los documentos existentes de los últimos 22 años además se incluyeron todas las palabras clave posibles relacionadas con el tema de investigación que la base de datos estableció. En la tabla 2 se aprecia la bitácora tenida en cuenta para el estudio de cuantimetría bibliométrica.

Tabla 2. Bitácora para el estudio de cuantimetría de la actividad antifúngica de bases de Schiff

Ecuación de búsqueda	Resultados	Rango de años	Base de datos
("imine" OR "schiff base") AND ("antifungal")	1392 documentos	1957 - 2018	SCOPUS
(TITLE-ABS-KEY ("imine" OR "schiff base") AND TITLE-ABS-KEY ("antifungal")) APENDICE E	1158 documentos	1980 - 2018	SCOPUS
(imine* OR "Schiff Bases" OR ketimine*) AND (antifungal) APENDICE E	1160 documentos	1996 – 2018	SCOPUS

Seguidamente para el proceso de refinamiento de *dinámica científica*, se procedió la búsqueda en *DERWENT* una base de datos de carácter mundial que contiene solicitudes de patentes y subvenciones, más de diez millones de invenciones básicas (18 millones de patentes en total) de más de 40 autoridades emisoras de patentes. Con una cobertura que se remonta a 1980, la utilización de este recurso proporciona una visión extensa e internacional de invenciones e investigaciones publicadas tipo artículo de acceso libre o pago según el tipo de revista. Esta es especializada en áreas como química, ingeniería electrónica y eléctrica e ingeniería mecánica, que teniendo en cuenta el propósito de la investigación la búsqueda se desarrolló en el área de química.

Teniendo en cuenta registros asociados a la plataforma *Derwent Innovation* se procedió a la utilización de *VantagePoint* para la consolidación de los indicadores bibliométricos. *VantagePoint* es un software utilizado para la minería de datos, que facilita acceder a diferentes publicaciones a través de cada uno de sus términos, los cuales se tratan como datos que permiten aportar a los investigadores información relevante, conocer rápidamente aspectos como quién, qué, cuándo y dónde, facilita la utilización de tres herramientas analíticas como listas, matrices y mapas de relaciones.

VantagePoint trabaja con los resultados de bases de datos de texto. Para esto fue necesario la utilización de un motor de búsqueda como *SCOPUS*, tan pronto se llevó a cabo el proceso de búsqueda se descargaron los datos en formato Excel, luego se eliminaron gráficos y enlaces que generarían inconsistencia en la aplicación del filtro para la importación, posteriormente se llevó a cabo el proceso de extracción e indexado de datos teniendo en cuenta campos como: las publicaciones por años de prioridad, las universidades asociadas, países con mayor rango de publicación incluidos algunos de américa latina, las publicaciones realizadas según las palabras

clave, revistas donde se efectúan mayor cantidad de publicaciones con el tema relacionado y las empresas que financian la producción de nuevo conocimiento.

Finalmente se procedió al estudio de *dinámica inventiva*, para esto se estableció la ecuación de búsqueda en la base de datos “*The Lens*”, la cual arrojó 396 resultados, de los cuales fueron analizados los años de prioridad, los tipos de patentes, las afiliaciones y los propietarios de las patentes, las universidades asociadas, países con mayor índice donde se protege las patentes, empresas financiadoras de nuevo conocimiento y aspirantes en proceso de solicitud de patentes. Seguidamente, se muestra los resultados obtenidos de acuerdo a la ecuación de búsqueda utilizada y el rango de años establecidos.

- Cantidad de resultados: 396 documentos
- Familias de patentes: 328
- Rango en años del análisis: 1981 – 2016
- Ecuación de búsqueda: imine* OR "Schiff Bases" OR ketimine* AND antifungal OR antifungic

7. Resultados y Discusión

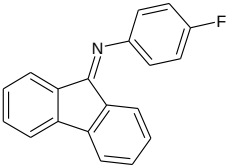
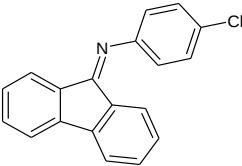
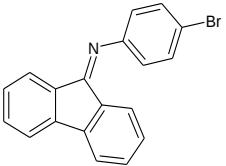
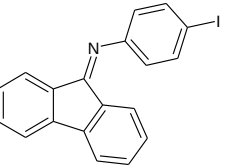
La preparación y caracterización de los derivados de las moléculas orgánicas 9H-fluorenona y la anilina *p*-sustituida con los halógenos flúor, cloro, bromo y yodo se desarrolló en dos etapas: la primera de ellas se basó en la preparación, cristalización y caracterización molecular y estructural de los compuestos orgánicos tipo iminas y en la segunda etapa se evaluó la actividad antifúngica CI50₅₀ frente a cepas de hongos patógenos con cada uno de los compuestos orgánicos previamente sintetizados.

7.1 Síntesis de las iminas [3a-d]

En el proceso de síntesis de los compuestos *N*-(4-Xfenil)-9*H*-fluoren-9-imina X=F, Cl, Br, I; [3a], [3b], [3c] y [3d] se realizó satisfactoriamente, obteniendo las características físicas y químicas mencionadas en la Tabla 3.

Como se puede evidenciar en la Tabla 3, los valores (o rangos) obtenidos en el punto de fusión sirven como índice de pureza, ya que la variación de los intervalos de temperatura entre estos es de máximo un grado, lo que adicionalmente facilita la identificación de la sustancia. Así mismo, se infiere que existe simetría molecular en los compuestos sintetizados debido a los elevados puntos de fusión (Geissman, 1973, pág. 12) (Brown, 2004, pág. 442).

Tabla 3. *Características físicas de los Compuestos [3a-d]*

Nombre del compuesto	<i>N</i> -(4-fluorofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3a]	<i>N</i> -(4-clorofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3b]	<i>N</i> -(4-bromofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3c]	<i>N</i> -(4-yodofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3d]
Esquema				
Aspecto físico	Sólido amarillo	Sólido amarillo	Sólido amarillo	Sólido amarillo
Masa obtenida (g)	0,4352	0,4721	0,4828	0,3127
Rendimiento de reacción	87%	94%	96%	62%
Punto de fusión (°C)	141-142	154-155	142-143	144

En la Figura 12 se presenta un esquema del mecanismo de reacción propuesto para estos compuestos.

A. **ATAQUE NUCLEOFÍLICO:** el carbono del grupo carbonilo de la *9H*-Fluorenona está polarizado positivamente debido a que la densidad de carga está desplazada hacia el átomo más electronegativo (Oxígeno), y las nubes electrónicas provenientes de los aromáticos; por ello este átomo está favorecido para que ocurra un ataque nucleofílico. La amina primaria, cumple como agente nucleofílico por el par de electrones libres del átomo de Nitrógeno para atacar el grupo carbonilo, permitiendo así la formación de un enlace covalente en una nueva estructura.

B. **TRANSFERENCIA DE PROTÓN:** el átomo de oxígeno se encuentra cargado negativamente, y ataca al protón cercano para aumentar la estabilidad de la estructura, dando la formación del grupo hidroxilo (-OH), supliendo la deficiencia electrónica en la que se encontraba el nitrógeno.

C. **PROTONACIÓN POR UN ÁCIDO:** la reacción ocurre en un medio ácido, por lo cual se encuentran protones libres en el medio, de los cuales uno es atacado por un par de electrones libre del átomo de oxígeno, para dar así la formación de un enlace covalente que genera en el oxígeno una deficiencia electrónica.

D. **REMOCIÓN DE UNA MOLÉCULA DE AGUA:** el oxígeno al presentar una deficiencia electrónica, es altamente reactivo y busca estabilizarse, para ello, toma el par de electrones provenientes del enlace covalente con el átomo de carbono, liberándose en el medio en forma de una molécula de agua. Inmediatamente, se da la formación de un carbocation, intermediario orgánico, el cual carece de un par de electrones para cumplir con la regla del octeto, lo cual lo hace altamente reactivo, haciendo necesario que el átomo de nitrógeno done un par de electrones para la formación de un nuevo enlace covalente.

E. DESPROTONACIÓN Y FORMACIÓN DEL GRUPO AZOMETINO: El catalizador ionizado presente en el medio, ataca el protón presente en la estructura de formación, procediendo a su restablecimiento. Finalizado esto, el par electrónico del enlace covalente, es utilizado para suplir la deficiencia electrónica que sufría el átomo de nitrógeno por la donación realizada anteriormente, obteniendo finalmente, la estructura de interés y el catalizador.

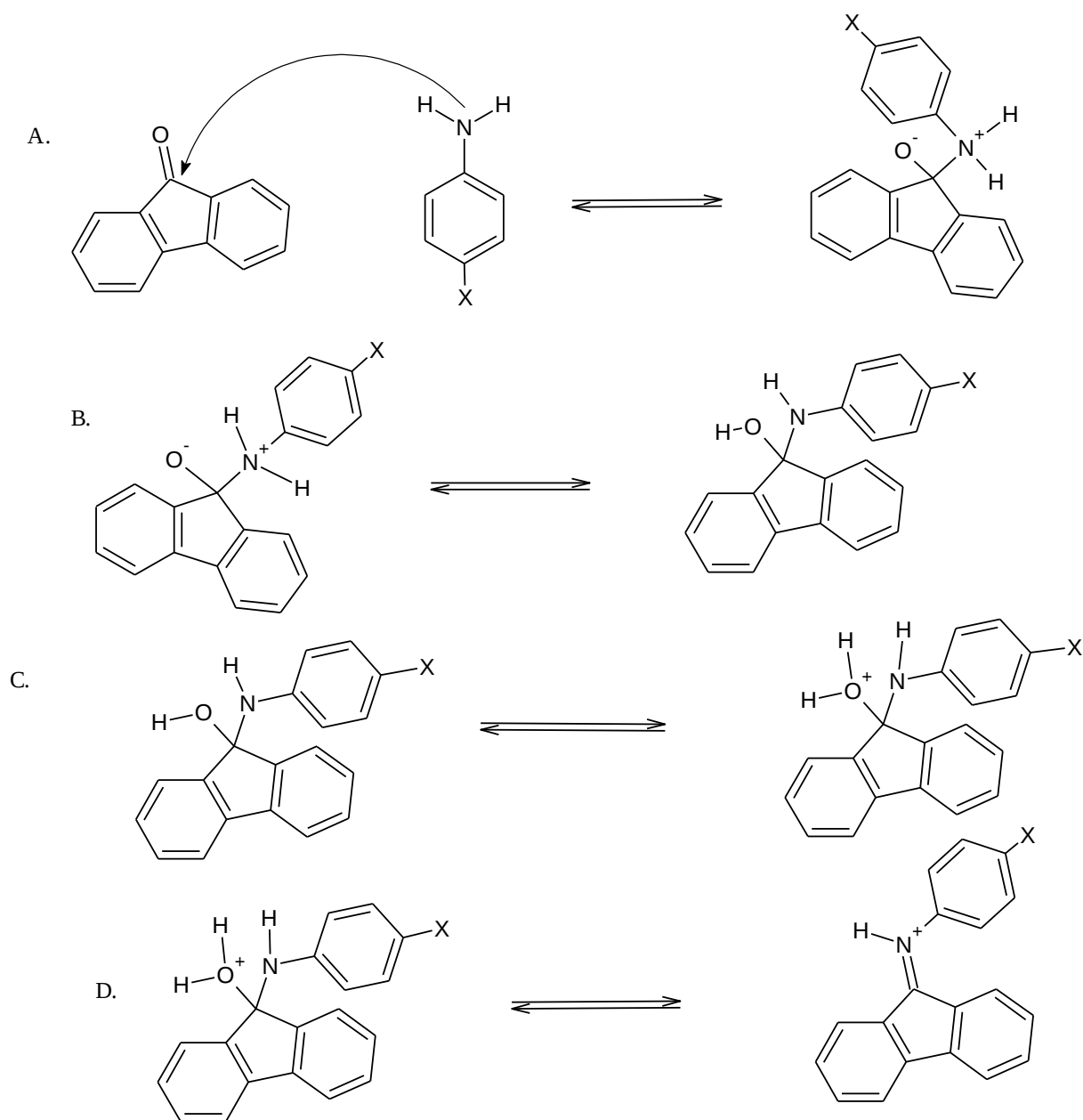


Figura 12. Esquematización del Mecanismo de formación de las iminas (Rodríguez, 2009)

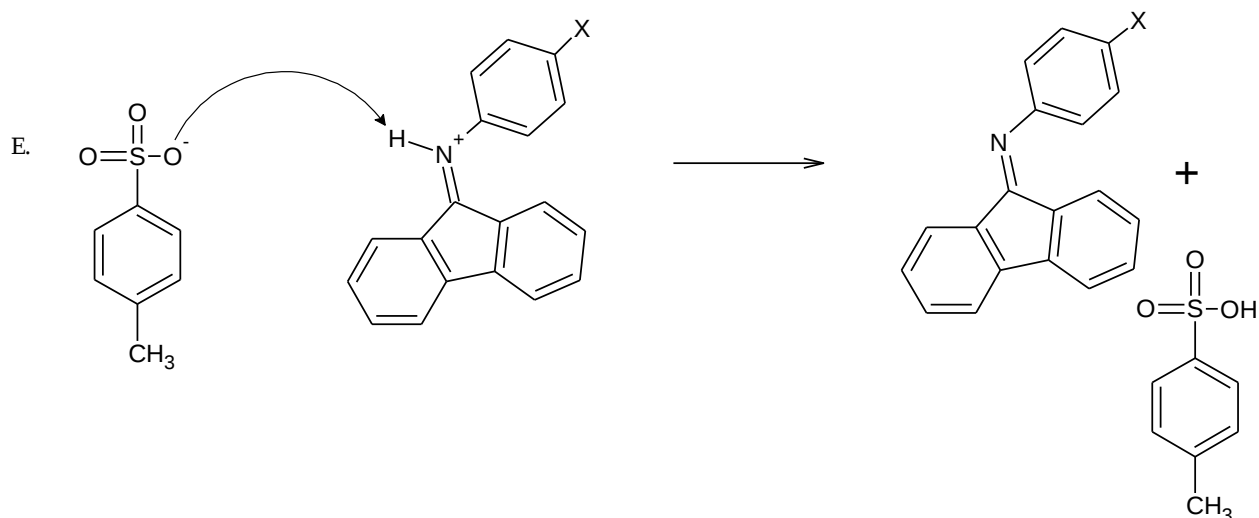


Figura 12. (Continuación).

7.2 Caracterización molecular de los compuestos [3a-d]

Los compuestos obtenidos durante el proceso de síntesis se caracterizaron molecularmente mediante Espectroscopia Infrarroja (IR), y Espectrometría de masas (EM), los resultados son analizados en los siguientes apartados.

7.2.1 Espectroscopía infrarroja (IR). La identificación de los grupos funcionales de los compuestos [3a-d] se realizó empleando la espectroscopía infrarroja. En el Apéndice A se muestran los espectros obtenidos para cada compuesto, en los cuales se aprecian las intensidades de las bandas de absorción características de cada grupo funcional. En la Tabla 4 se describen las bandas de absorción más representativas de los grupos funcionales presentes en los compuestos sintetizados. La banda de absorción ubicada entre $1690\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ (presente en los 4 espectros IR), corresponde a la vibración de tensión del grupo $\text{C}=\text{N}$ de las iminas. A su vez se observan las vibraciones características de los anillos aromáticos policíclicos con señales entre $2000\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ y p-sustituidos en $1900\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ siendo característico en algunos aromáticos la banda principal que está debajo de 3000 cm^{-1} .

Así mismo, teniendo en cuenta la región ubicada entre los 1300-400 cm^{-1} , conocida como la huella dactilar de cada compuesto, se aprecian notables diferencias que son características de los halógenos. La presencia de un solo átomo de flúor da lugar a la aparición de una intensa banda de absorción en la región de 1250-960 cm^{-1} , las vibraciones carbono-cloro la frecuencia de la absorción de tensión se observa en la zona de 830-500 cm^{-1} o 760-540 cm^{-1} y para las vibraciones carbono-bromo y carbono-yodo las bandas de tensión aparecen en la región de 667-290 cm^{-1} y 500-200 cm^{-1} respectivamente, lo cual es concordante con los valores reportados en la Tabla 4.

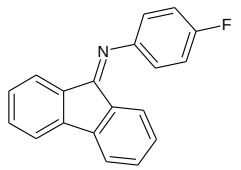
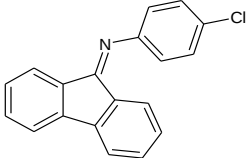
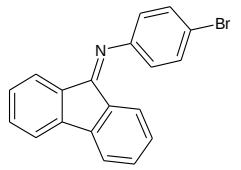
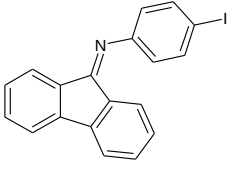
Tabla 4. *Bandas de absorción más representativas de los compuestos [3a], [3b], [3c] y [3d]*

FT-IR				
<i>V[cm^{-1}]</i>				ASIGNACIÓN
<u>[3a]</u>	<u>[3b]</u>	<u>[3c]</u>	<u>[3d]</u>	
1638	1640	1637	1651	Vibración de tensión C=N
3043	3051	3046	3043	Vibración de tensión C-H (aromático)
2943-2853	3080-3073	2927	3072-2927	Vibración de tensión =C-H (aromático)
2400	2300	2400	2500	Sobretonos aromáticos policíclicos
	1967-1836	1971-1928	1962-1821	Bandas de combinación C=C <i>p</i> -sustituido
1227-961				Vibración de tensión C-F
	650-515			Vibración de tensión C-Cl
		656		Vibración de tensión C-Br
			651	Vibración de tensión C-I

7.2.2 Espectrometría de masas. Los espectros de masas se obtuvieron tras la conversión de los componentes de la muestra en iones gaseosos, que se mueven rápidamente en presencia de un campo magnético y se separan en función de su relación masa/carga. En el Apéndice B, se muestra los espectros obtenidos para los compuestos [3a-d]. Estos resultados suministraron información sobre la estructura molecular, las relaciones isotópicas de los átomos, su respectiva composición y la abundancia relativa de los distintos iones en función de su relación masa/carga (m/z) (Skoog H. D., 2007, pág. 517).

Además, se resalta que las fragmentaciones generadas durante el proceso de ionización de las muestras, evidencian señales químicamente lógicas, ya que las fragmentaciones se dan específicamente en el enlace C-Halógeno y algunos dobles enlaces de los anillos aromáticos, siendo importante destacar que en el espectro del compuesto **[3a]** ocurre una asociación de iones positivos causados durante el proceso de análisis. En la Tabla 5 se muestran los iones más representativos por su intensidad.

Tabla 5. *Fragmentaciones generadas durante el proceso de ionización y presencia del ion molecular característico de los compuestos **[3a]**, **[3b]**, **[3c]**, **[3d]** previamente sintetizados*

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Ión molecular relación (m/z)	Tipo de fragmentación	Fragmentación según relación m/z	Relación isotópica
 [3a]	273.3036	274.2 $M^+ + H$	Asociación de iones positivos	$M^+ + Na$ m/z=296 $2M^+ + Na$ m/z=569	$M^+ + F$ ^{19}F Una sola especie isotópica (más estable)
 [3b]	289.7582	290.0 $M^+ + H$	Fragmentación del cloro y anilina	Cl^- m/z=255.1 Anilina m/z= 166 C_5H_4Cl m/z=193 C_6H_4Cl m/z=180	$M^+ + Cl$ ^{35}Cl ^{37}Cl
 [3c]	334.2092	334.0	Fragmentación del bromo	Br^- m/z= 255.1	$M^+ + Br$ ^{79}Br ^{81}Br
 [3d]	381.2097	381.2	Fragmentación de C_2H_2	C_2H_2 m/z=355	$M^+ + I$ ^{127}I

* *Masa de la molécula analizada.*

En el proceso de análisis se pudo evidenciar pocas fragmentaciones que suelen generarse durante la ionización, esto se debe a que dependiendo de la naturaleza de la molécula, algunos

iones serán más estables que otros, lo que da la posibilidad de que existan casos en el que el ion molecular no manifieste gran descomposición (McLAFFERTY, 1969, pág. 39), como ocurre con la molécula **[3d]**, esto permite inferir la estabilidad de las moléculas sustituidas con los respectivos halógenos, además de que el proceso se llevó a cabo mediante ionización por electrospray (ESI-IT) y este se caracteriza por ser un método de ionización suave y que por ende no detecta mayor cantidad de fragmentación en las moléculas de estudio (Mann, 1995, págs. 219-224).

En los espectros de masas, es común observar que en compañía del pico del ion molecular de mayor intensidad, se hallan picos correspondientes a isótopos que pueden ser determinados con precisión, conociéndose este fenómeno como patrones de distribución isotópica (Pasto, 1981, pág. 286), (Durst, 1985, pág. 159). Es por esta razón, que en los espectros experimentales no aparece un solo pico del ion molecular sino un conjunto de picos con intensidades fijas que son características de la presencia de ciertos elementos.

Según la literatura se establece que compuestos con un solo átomo de flúor (compuesto **3a**) tiende a evidenciarse el isótopo más estable ^{19}F , presentando una abundancia del 100%, en el caso de compuestos con un átomo de Cl (**3b**), aparecen dos picos correspondientes a los isótopos ^{35}Cl y ^{37}Cl . El pico de relación $m/z=35$ tiene tres veces la altura de $m/z=37$, pues el ^{35}Cl tiene una abundancia del 75% y el ^{37}Cl de 24% (Daub, 2005, pág. 98). Para compuestos con presencia de un átomo de bromo (**3c**) se observan los picos característicos a los isótopos ^{79}Br y ^{81}Br de abundancia muy similar del 51% y 49% respectivamente, y finalmente la presencia del yodo (**3d**), se destaca un pico de relación $m/z=127$, al ion I^+ para el análisis de la distribución isotópica se debe relacionar la masa del ión con la relación (m/z) del compuesto correspondiente (Reboiras, 2006, pág. 73).

7.3 Caracterización cristalográfica y estructural de los compuestos [3a-d]

La caracterización cristalográfica y estructural de las bases de Schiff tipo iminas sintetizadas, se llevó a cabo mediante la aplicación de dos técnicas de difracción de rayos X (DRX), muestras policristalinas, y monocristal.

7.3.1 Difracción de rayos X de muestras policristalinas (DRXP). Los perfiles de difracción obtenidos mediante la técnica de difracción de rayos X de muestras policristalinas se adjuntan en el Apéndice C. Tras determinar las posiciones e intensidades de los máximos de difracción (mediante el software POWDERX), se realizó el proceso de indexado, que permitió la asignación de los índices de Miller, realizado con el programa Dicvol14 (tratamiento de datos descrito en la sección 6.3.1) y la estimación del grupo espacial (Chekcell). En la Tabla 6 se aprecia los resultados de la caracterización cristalográfica para cada compuesto.

Teniendo en cuenta que para que el indexado se considere físicamente confiable se toma como parámetro que la figura de Mérito $M_{(20)}$ sea superior a 10, lo cual se cumple en la caracterización cristalográfica de los cuatro compuestos.

Tabla 6. *Parámetros de celda de los compuestos [3a-d]*

Parámetros de celda unidad	<i>N</i> -(4-fluorofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3a]	<i>N</i> -(4-clorofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3b]	<i>N</i> -(4-bromofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3c]	<i>N</i> -(4-yodofenil)-9 <i>H</i> -fluoren-9-imina [3d]
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
<i>a</i> (Å)	13.7183	14.261	10.9448	24.3861
<i>b</i> (Å)	5.3702	5.205	23.3190	4.9580
<i>c</i> (Å)	18.9936	19.428	11.5691	10.4783
β (°)	102.138	99.147	98.364	95.357
Volumen (Å ³)	1367.87	1426.4	2921.30	1261.37
$M_{(20)}$	10.4	19.3	16.5	20.1
$F_{(20)}$	25.2 (0.0167, 45)	13.9(0.0048, 287)	32.9(0.0051, 119)	42.4 (0.0066, 71)
Grupo espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c	P2 ₁ /m

7.3.2 Difracción de rayos X de monocristal de los compuestos [3a-d]. Con el proceso de recristalización mediante evaporación de solvente se obtuvieron cristales de tamaño y forma adecuados de los compuestos [3a], [3b], [3c] y [3d] aptos para el estudio de difracción de rayos X de monocristal. En la Tabla 7, se observan los datos de los parámetros de celda unidad obtenidos durante el proceso de refinamiento con el programa SHELX incluido en el software OLEX 2.0 y la comparación con los resultados obtenidos por DRX de muestras policristalinas. Su similitud confirma la veracidad de la caracterización cristalográfica.

Tabla 7. Comparación de parámetros cristalinos evaluados a partir de técnicas de DRX de monocristal y de muestras policristalinas

Constantes de celda unidad	DRX muestras policristalinas				DRX monocristal		
	[3a]	[3b]	[3c]	[3d]	[3a]	[3b]	[3c]
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico	monoclínico	monoclínico	monoclínico	monoclínico	monoclínico
<i>a</i> (Å)	13.7147	14.261	10.9448	24.3861	13.6542 (10)	14.2471 (12)	10.8956 (7)
<i>b</i> (Å)	5.3626	5.205	23.3190	4.9580	5.3326 (4)	5.2035 (4)	23.2222 (16)
<i>c</i> (Å)	18.9953	19.428	11.5691	10.4783	18.9200 (14)	19.4321 (18)	11.5144 (8)
β (°)	102.138	99.147°	98.364	95.357	102.176 (7)°	99.152 (15)	98.375 (5)°
Grupo espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c	P2 ₁ /m	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c
Z	4	4	8		4	4	8
Volumen (Å ³)	1365.81	1426.4	2921.30	1261.37	1346.62 (18)	1423.3 (2)	2882.3 (3)

Del estudio de difracción de rayos X de los cristales se deduce que estos se encuentran formados por celdas unidad monoclinicas con un numero de moléculas por celda unidad (Z) de 4 para los compuestos [3a], [3b] y [3d] y 8 para el compuesto [3c]. En la Figura 13 se presenta la representación de la celda unidad para el compuesto [3a]. Los planos demuestran la planaridad de la molécula consecuencia de los anillos aromáticos, con un ángulo de torsión entre ellos de 120,33°. En el Apéndice D se aprecia las longitudes de enlace de los estudios de monocristal.

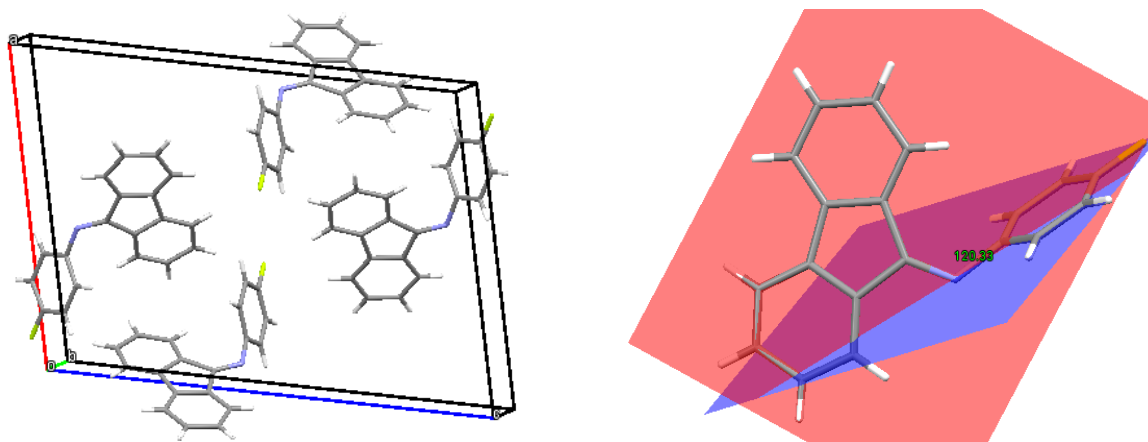


Figura 13. Representación gráfica de la celda unidad y estructura cristalina del compuesto **[3a]**

En la Figura 14 se muestran las cuatro moléculas que componen la celda unidad del compuesto **[3b]**, de igual manera se aprecia que el ángulo de torsión entre los dos principales planos de la molécula tiene un valor de $120,94^\circ$.

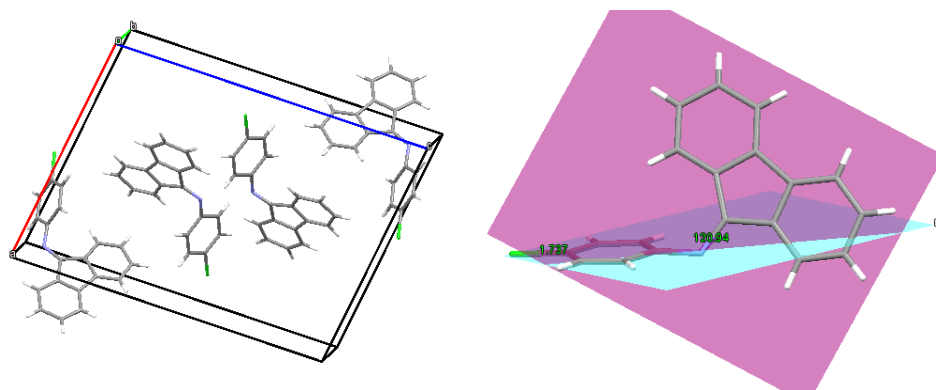


Figura 14. Representación gráfica de la celda unidad y estructura cristalina del compuesto **[3b]**

El compuesto **[3c]**, cristaliza de una forma particular a los demás compuestos estudiados (Figura 15), debido a que, al tener una unidad asimétrica de dos moléculas, su celda unidad está integrada por 8 moléculas. Sin embargo, los planos característicos presentan una torsión de $121,39^\circ$, lo cual es concordante con los compuestos **[3a]** y **[3b]**.

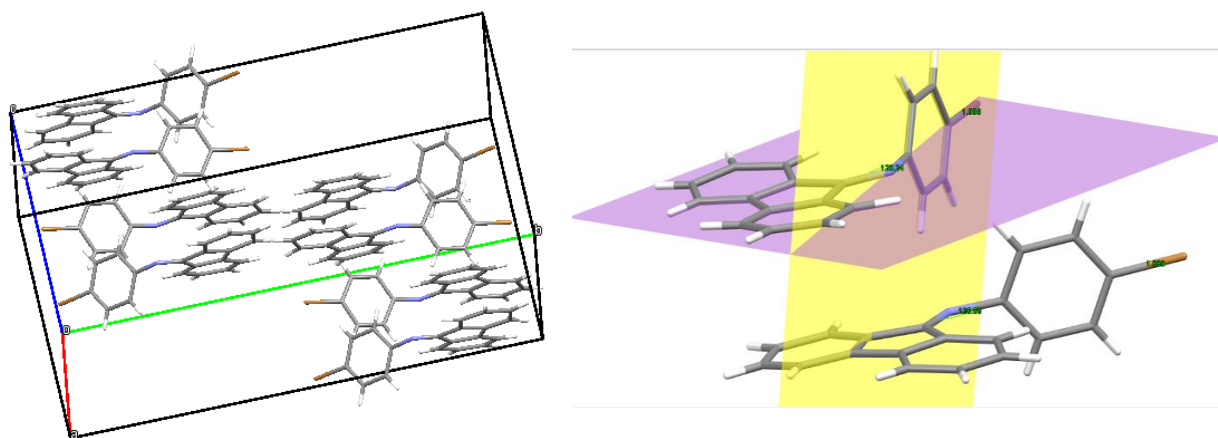


Figura 15. Representación gráfica de la celda unidad y estructura cristalina del compuesto **[3c]**

En las moléculas sintetizadas se propone las interacciones descritas, teniendo en cuenta que todas las moléculas de interés se componen de una celda primitiva con un eje de tornillo 2_1 , lo cual describe una rotación de 180° , seguida de una translación de la mitad de la celda unidad (Figura 14), por lo cual en el fragmento estructural proveniente de la 9H-Fluorenona, queda desplazada permitiendo la interacción de la nube electrónica. Se llevó a consideración, además, que las interacciones π - π se ven favorecidas por la presencia del átomo de nitrógeno, pues colabora con la deslocalización de la carga electrónica. Los datos analizados de la estructura molecular de los compuestos sintetizados permitieron establecer la relación entre la composición de la estructura con sus propiedades, presentándose éstas como análogas. Así mismo, por su similitud en la celda unidad, las variaciones en los ángulos para el enlace C-N-C son pequeñas: **[3a]** 120.33° (4), **[3b]** 120.94° (3), **[3c]** 121.39° (2) y **[3d]**.

7.4 Evaluación de la Actividad antifúngica de los compuestos [3a-d] a partir de la concentración inhibitoria (CI_{50})

La evaluación de la actividad antifúngica a partir de la determinación de la CI_{50} , se llevó a cabo teniendo en cuenta el método de microdilución. Para esto se preparó un inóculo a partir de un

repique en placa fresco (<24h) con cuatro colonias, se resuspendió en un tubo de solución salina ajuntando a 0,5 en la escala de McFarland. Posteriormente, se realizó una dilución 1:1000 con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640). Esta última dilución, se encuentra estandarizada por la densidad del inóculo bajo un estándar de turbidez BaSO₄ (0.5 McFarland Standard) como lo describe CLSI M38-A para los ensayos de susceptibilidad antifúngica, fue la utilizada para inocular las microplacas, finalmente se sellaron herméticamente los tubos y se incubó a 37°C en oscuridad.

El compuesto de referencia, Fluconazol, se disolvió en agua para obtener una dilución de concentración final media, por otra parte, los compuestos a evaluar (3a-3d) son insolubles en agua, por lo cual se utilizó DMSO, obteniendo igualmente una concentración final media. Las diluciones de los compuestos de estudio, se realizó teniendo en cuenta el esquema para preparar series de diluciones de agentes antifúngicos insolubles en agua que se utilizarán en las pruebas de sensibilidad a la dilución en caldo: se inicia con 25 µg/mL de cada agente antifúngico, al cual se le añade 0.5mL de caldo, y 0.5, 1.5, 3.5mL de DMSO para cada dilución específica respectivamente, obteniendo una concentración media de 12.5, 6.5, 3.13 µg/mL, para luego hacer una dilución de 1:50 obteniendo valores de concentración finales de 0.25, 0.125, 0.0625 µg/mL.

Adicionalmente se llevó a cabo la determinación de CI₅₀ a través de turbidimetría, ya que permite la cuantificación de los microorganismos totales en las muestras al medir la reducción de la transmisión de luz debido a partículas en suspensión, lo que permite cuantificar la luz residual transmitida. Teniendo en cuenta esto, las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo siendo posible su determinación por espectrofotometría. Para verificación del estándar de turbidez BaSO₄ se determina la absorbancia a 625nm obteniendo valores entre 0.08-0.1 para el estándar de 0,5 McFarland. Posteriormente, la respuesta de las cepas se observa en las siguientes

gráficas donde se muestra el efecto biológico de los compuestos sintetizados sobre el crecimiento de *Cándida albicans* y *Cándida krusei* en un tiempo de 24 horas.

En la Figura 16 se aprecia la evaluación del efecto biológico del compuesto **[3a]** frente a la *C. albicans*. Se destaca una relación inversamente proporcional entre la concentración y la absorbancia, lo que evidencia que a medida que aumentó la concentración del compuesto **[3a]**, se incrementó el porcentaje de inhibición de la cepa *C. albicans* principalmente en las primeras 20 horas. De igual forma, todas las concentraciones usadas para el estudio mostraron una efectividad moderada en el cultivo evaluado.

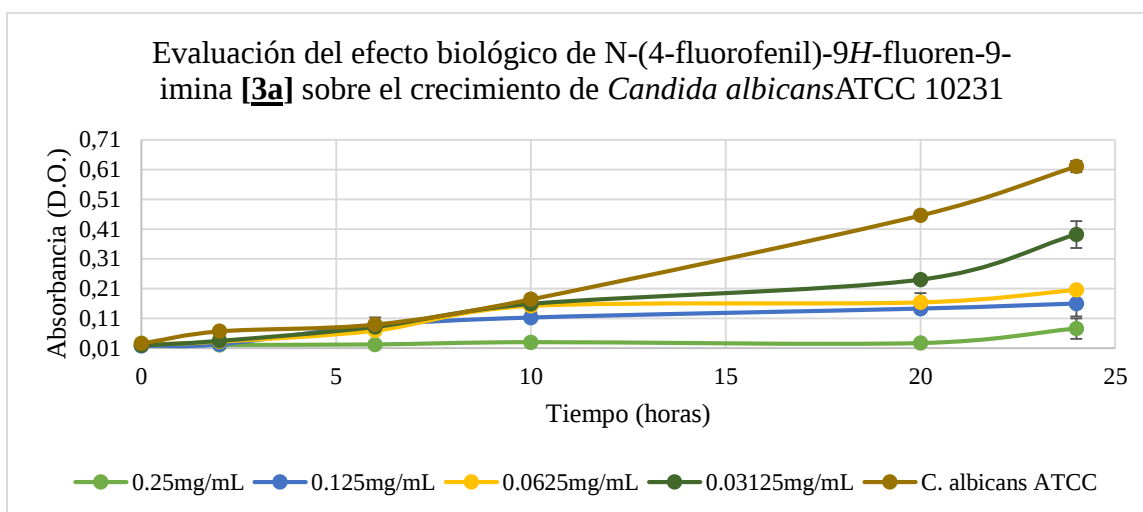


Figura 16. Evaluación del efecto biológico de N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3a]** sobre el crecimiento de *Cándida albicans* ATCC 10231

De igual manera, en el estudio de evaluación biológica del compuesto **[3a]** frente a la *C. krusei*, se aprecia un comportamiento similar al de la cepa *C. albicans*. En la Figura 17 se muestra la relación entre el tiempo de inhibición y la absorbancia, resaltando que después de las 10 horas de evaluación de crecimiento, la efectividad del compuesto **[3a]** a una concentración de 0.25mg/mL es ampliamente superior a las demás concentraciones evaluadas.

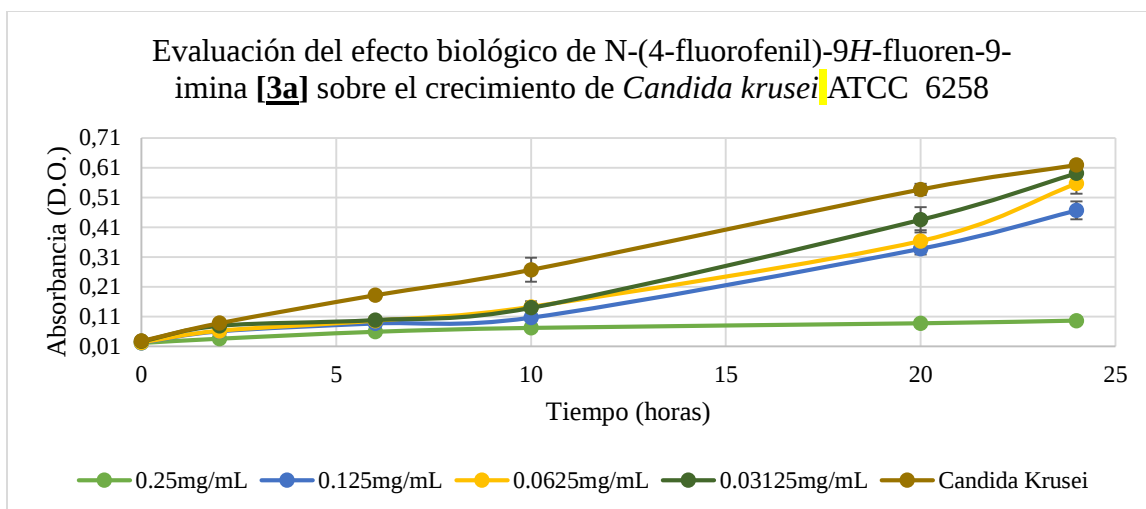


Figura 17. Evaluación del efecto biológico de N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3a]** sobre el crecimiento de *Cándida krusei* ATCC 6258

En la Tabla 8, se evidencia que la concentración de 0.25mg/mL del compuesto **[3a]** fue más efectiva para la inhibición de las dos cepas estudiadas, con un porcentaje de inhibición del 90.4% para la *C. albicans* y del 87.4% para la *C. krusei*. Según los porcentajes de inhibición, se aprecia que el compuesto **[3a]** resulta ser más efectivo aún a bajas concentraciones en cepas de *C. albicans* que en cepas de *C. krusei*.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina según la variación de la concentración del compuesto **[3a]**

Concentración (mg/mL) compuesto [3a]	% de Inhibición <i>C. albicans</i>	% de Inhibición <i>C. krusei</i>
0.2500	90.4	87.4
0.1250	76.1	24.9
0.0625	69.1	9.7
0.0312	37.4	4.5

En la Figura 18, se aprecia que el efecto biológico del compuesto **[3b]** frente a la *C. albicans*, fue menor que el presentado por el compuesto **[3a]**. Se muestra un comportamiento de inhibición similar entre todas las concentraciones, sin embargo, a partir de las 6 horas la efectividad de la inhibición decrece.

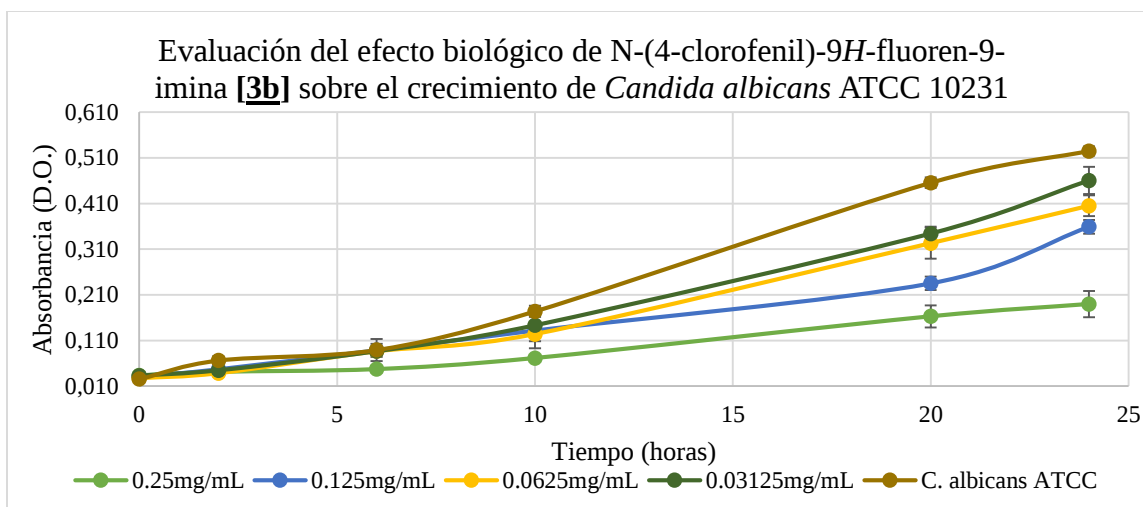


Figura 18. Evaluación del efecto biológico de N-(4-clorofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3b]** sobre el crecimiento de *Cándida albicans* ATCC 10231

En el estudio realizado para el compuesto **[3b]** respecto a la cepa de *C. krusei*, se aprecia que la concentración de 0,0625mg/mL es más efectiva respecto a la concentración de 0,25mg/mL debido a que a las 24 horas de exposición el porcentaje de inhibición es similar, como se aprecia en la Figura 19.

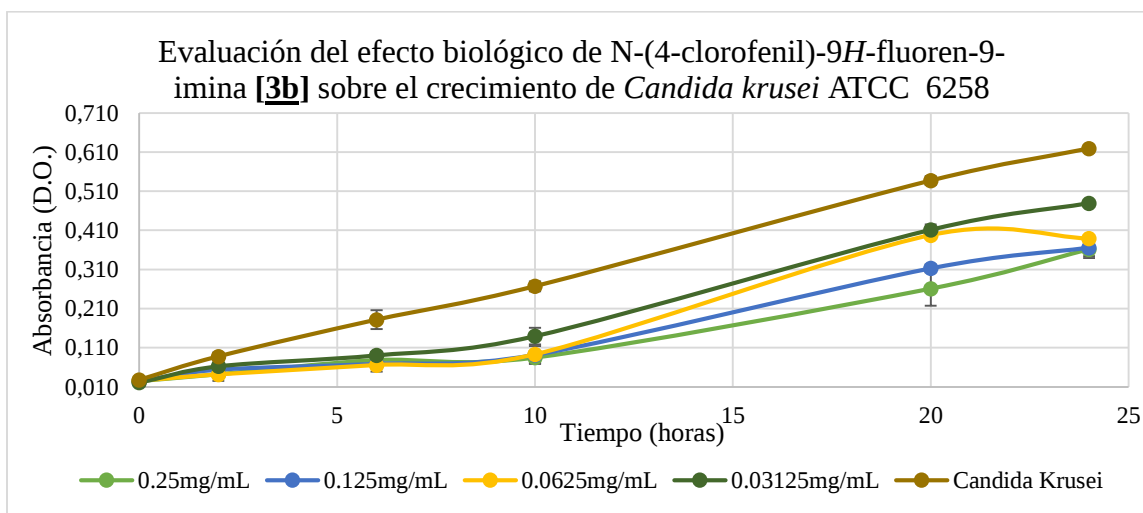


Figura 19. Evaluación del efecto biológico de N-(4-clorofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3b]** sobre el crecimiento de *Cándida krusei* ATCC 6258

En la Tabla 9 se muestra los porcentajes de inhibición del compuesto **[3b]** a diferentes concentraciones, frente a las cepas *C. albicans* y *C. krusei*.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición del N-(4-clorofenil)-9H-fluoren-9-imina según la variación de la concentración del compuesto [3b].

Concentración (mg/mL) compuesto [3b]	% de Inhibición <i>C. albicans</i>	% de Inhibición <i>C.</i> <i>krusei</i>
0.2500	68.7	43.0
0.1250	34.1	42.3
0.0625	24.4	38.5
0.0312	14.4	22.4

En la Figura 20 se muestra la evaluación del efecto biológico del compuesto [3c] frente a la *C. albicans*. Hasta las 20 horas de inhibición, se aprecia que el crecimiento del hongo tiende a ser similar en todas las concentraciones en estudio. Después de este tiempo, se observa un aumento en los valores de absorbancia para las concentraciones de 0,0625 y 0,0325mg/mL, es decir, disminuye su acción inhibitoria.

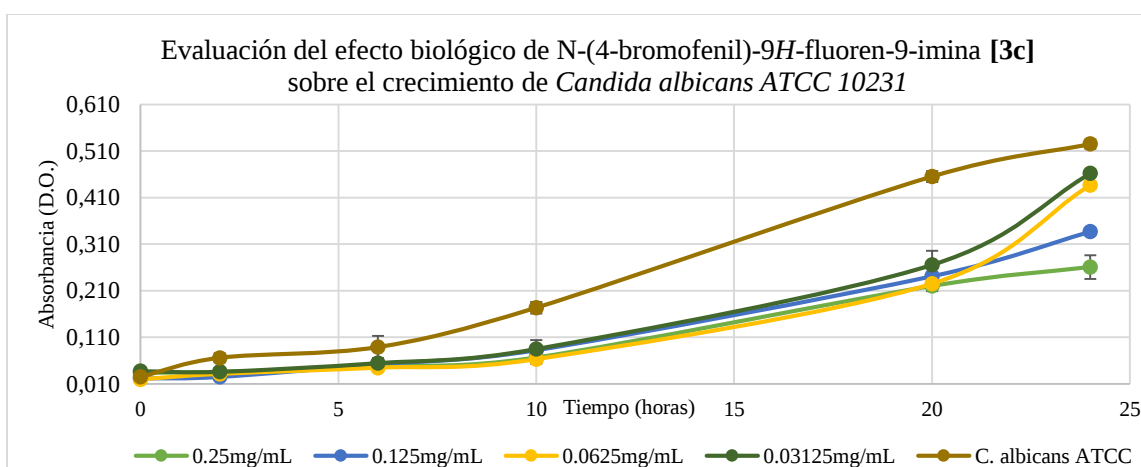


Figura 20. Evaluación del efecto biológico de N-(4-bromofenil)-9H-fluoren-9-imina [3c] sobre el crecimiento de *Cándida albicans* ATCC 10231

La respuesta de la *C. krusei* (mostrada en la Figura 21), difiere notablemente a la *C. albicans*, mostrando un porcentaje de inhibición bajo para todas las concentraciones en estudio.

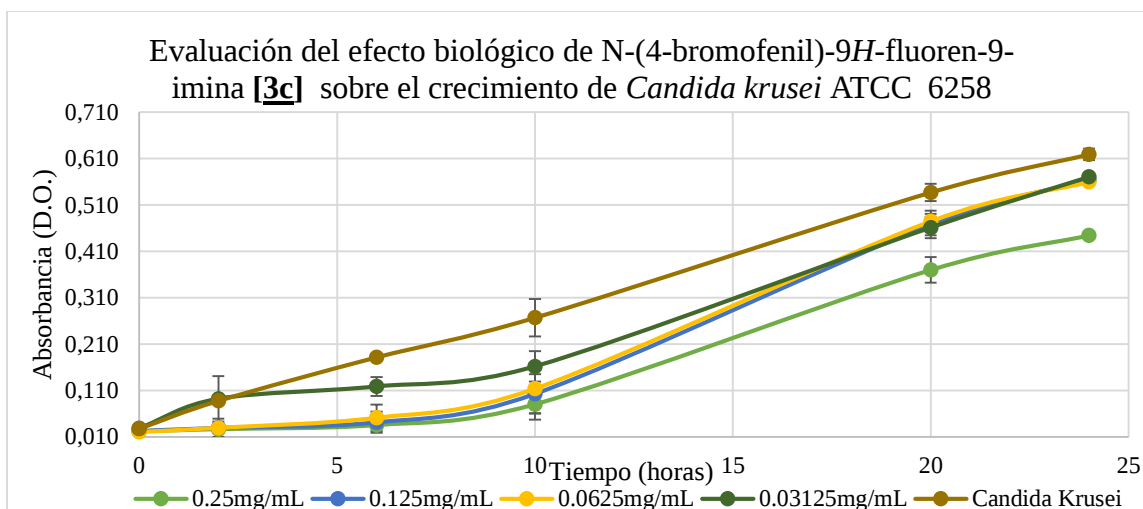


Figura 21. Evaluación del efecto biológico de N-(4-bromofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3c]** sobre el crecimiento de *Cándida krusei* ATCC 6258

En la Tabla 10 se muestra el porcentaje de inhibición del compuesto **[3c]** frente a las cepas *C. albicans* y *C. krusei*. Se muestra el bajo porcentaje de inhibición del compuesto **[3c]** a todas las concentraciones en estudio frente a la *Cándida krusei*

Tabla 10. Porcentaje de inhibición del N-(4-bromofenil)-9H-fluoren-9-imina según la variación de la concentración del compuesto **[3c]**

Concentración (mg/mL) compuesto [3c]	% de Inhibición <i>C. albicans</i>	% de Inhibición <i>C. krusei</i>
0.2500	54.5	28.5
0.1250	36.9	8.5
0.0625	16.4	8.8
0.0312	15.0	8.3

La Figura 22 muestra que las concentraciones estudiadas del compuesto **[3d]** no influyen en la efectividad de inhibición de la *C. albicans*, debido a que no es directamente proporcional la concentración y el porcentaje de inhibición. Por tanto, el compuesto **[3d]** permite un alto grado de crecimiento de la cepa.

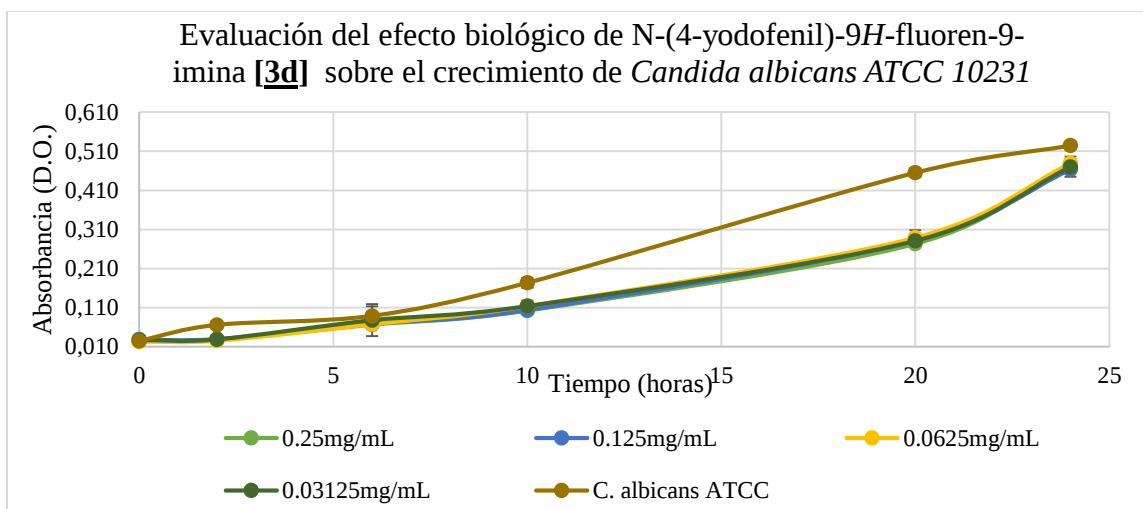


Figura 22. Evaluación del efecto biológico de N-(4-yodofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3d]** sobre el crecimiento de *Cándida albicans* ATCC 10231.

El análisis del compuesto **[3d]** contra la cepa *C. krusei* (Figura 23), muestra un alto grado de efectividad con todas las concentraciones evaluadas, manteniendo un comportamiento constante en las tres concentraciones más bajas y una ligera mejoría en la acción inhibitoria de la muestra con concentración de 0,25mg/mL.

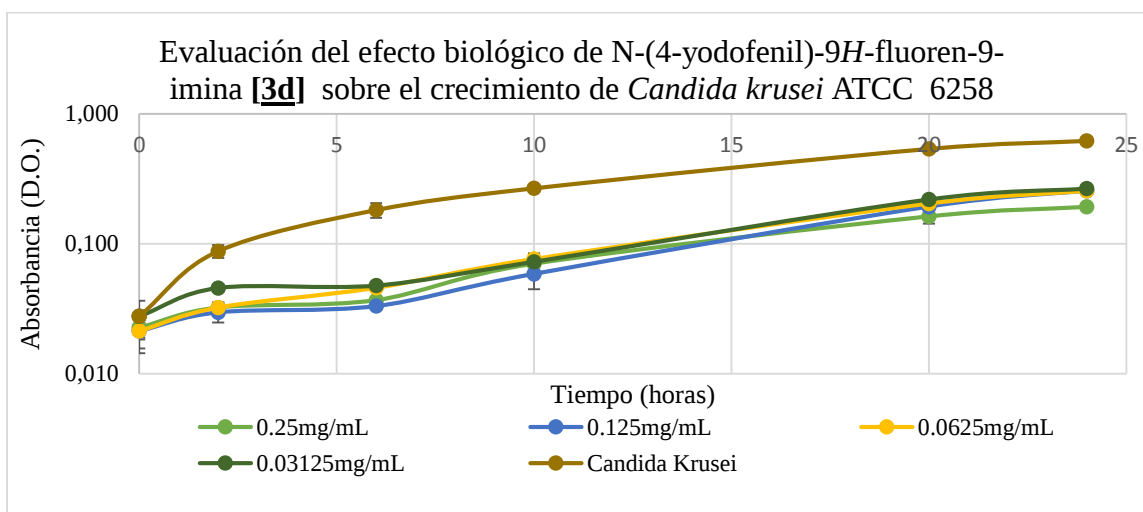


Figura 23. Evaluación del efecto biológico de N-(4-yodofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3d]** sobre el crecimiento de *Cándida krusei* ATCC 6258

En la Tabla 11 se aprecia la baja efectividad del compuesto **[3d]** frente a la *C. albicans* a todas las concentraciones evaluadas. Por otro lado, sobresale la elevada efectividad del compuesto frente

a la *C. krusei* a todas las concentraciones en estudio, principalmente a 0,25mg/mL que presentó una inhibición del 71%.

Tabla 11. Porcentaje de inhibición del N-(4-yodofenil)-9H-fluoren-9-imina según la variación de la concentración del compuesto [3d]

Concentración (mg/mL) compuesto [3d]	% de Inhibición <i>C. albicans</i>	% de Inhibición <i>C.</i> <i>krusei</i>
0.2500	10	71
0.1250	13	60
0.0625	8	60
0.0312	11	60

Los resultados de bioactividad obtenidos para los compuestos [3a], [3b], [3c], y [3d] se compararon con el fluconazol, el cual fue utilizado como material de referencia, ya que es un medicamento antifúngico fungistático estándar para el tratamiento de la candidiasis. En la Tabla 12 se presentan los resultados comparativos de cada uno de los compuestos con los resultados de inhibición del fluconazol obtenidos experimentalmente.

Tabla 12. Comparación efecto fungistático de los compuestos [3a-d] respecto al Fluconazol

Compuestos	<i>Cándida albicans</i> ATCC 10231		<i>Cándida krusei</i> ATCC 6258	
	CI ₅₀ (mg/mL)	% de Inhibición	CI ₅₀ (mg/mL)	% de Inhibición
3a	0,25	90	0,25	87
3b	0,25	68	0,12	42
3c	0.25	54	0,25	28
3d	0.12	13	0,25	71
Fluconazol	0,008	control	0,016	control

Los resultados expuestos en la Tabla anterior, muestran que el compuesto [3a], presentó un elevado porcentaje de inhibición frente a las dos candidas estudiadas, aunque la concentración es mayor en comparación con el material de referencia. En general, los compuestos [3a], [3b] y [3c] presentaron una CI₅₀ superior al 50% para la cepa de *Cándida albicans*, lo cual indica que pueden ser prometedores materiales fungistáticos. De igual manera, los compuestos [3a] y [3d] también presentaron una CI₅₀ superior al 50% para la cepa *Cándida krusei*.

7.5 Resultados obtenidos en el análisis cuantitativo

7.5.1 Dinámica Inventiva. Las patentes son conocidas como importantes apoyos de transferencia de tecnología y nuevos conocimientos para la promoción del potencial de innovación, estimulando en ámbitos universitarios la investigación en la búsqueda de nuevas alternativas de solución. Este título jurídico que es conferido al poseedor (persona, empresa, institución) solo se concede para invenciones que son nuevas, y que se basan en una actividad inventiva con utilidad en los diferentes tipos de industria nacional e internacional.

7.5.1.1 Tipo de patentes: Los análisis realizados sobre patentes en el tema de investigación evidencian que se encuentran clasificadas según la CIP de Wipo en las categorías C07D compuestos heterocíclicos, A61K preparativos para propósitos médicos, dentales o de inodoro, C07C compuestos carbocíclicos, A61P actividad terapéutica específica de compuestos químicos o preparaciones medicinales, con un total de 396 resultados, de los cuales las patentes concedidas suman un total de 280 lo que corresponde al 71% de la totalidad de patentes, sin embargo, se presentan 105 documentos en proceso de solicitud que corresponden al 26%. Este tipo de patentes se encuentran en evaluación y revisión por personas capacitadas que indican que la información es correcta, concreta, verídica y garantizan que la familia de patentes encaminadas a la protección en el extranjero, no aparezcan dos veces en las estadísticas de datos sobre las solicitudes que se presentan en varias oficinas (OMPI, 2009). El 3 % restante corresponde a los diferentes informes de búsqueda, con 11 documentos cuyo objetivo es identificar los artículos o textos existentes, que temporalmente se encuentran de acceso disponible para el público, lo mencionado se puede apreciar en la Figura 24.

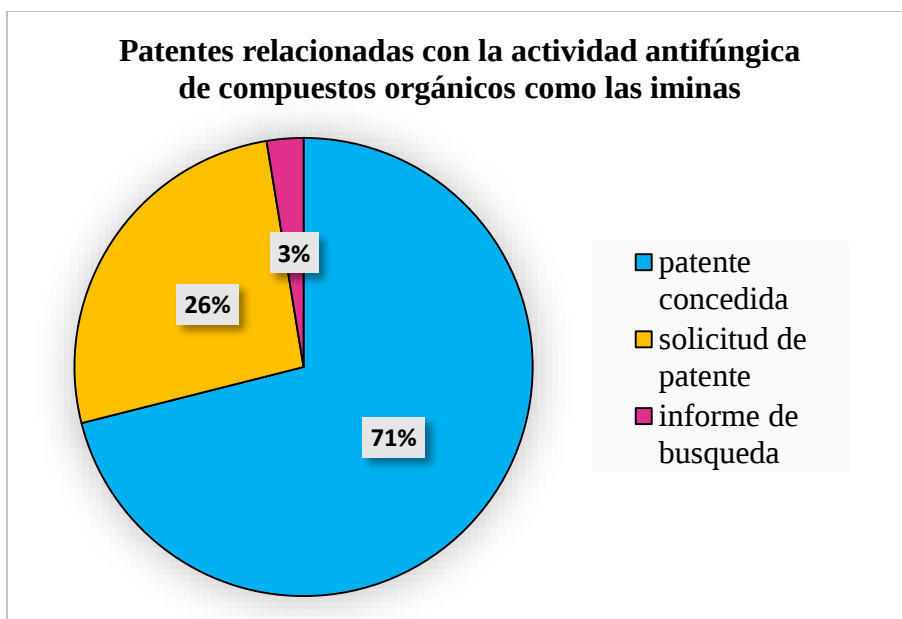


Figura 24. Patentes relacionadas con la actividad antifúngica de compuestos orgánicos como las iminas

Fuente: Recuperado el 6 de noviembre de 2017 en línea www.lens.org

7.5.1.2 Dinámica inventiva por años de prioridad. En la Figura 25 se puede evidenciar una dinámica fluctuante en cada uno de los 31 años analizados. Ya que desde 1986 hasta el año 2000, fue un rango que se caracterizó por ser una temporada en la que el promedio de patentes concedidas fue superior a 10, así mismo, se destaca que a partir del 2008 se presenta un decrecimiento siendo 6 el promedio de documentos patentados. Es importante mencionar que de los 3 años tomados como rango de análisis, en el 2015 se observa un pico prominente en comparación con los años anteriores, en dicho año se concedieron un total de 27 patentes y en el 2016 un total de 26, lo que evidencia el creciente interés científico por la búsqueda de nuevas alternativas de solución, para temas relacionados con la salud pública y el constante incremento de enfermedades de origen fúngico, además los datos estadísticos obtenidos proporcionan valiosa información acerca de la actividad inventiva (WIPO, 2017, párr 10).

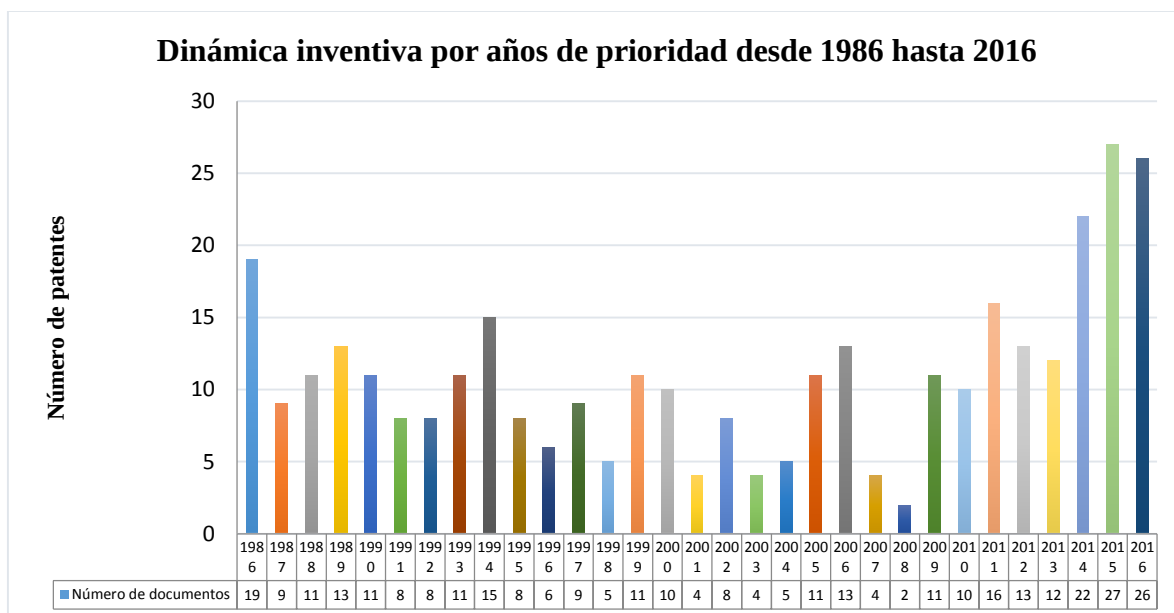


Figura 25. Dinámica inventiva por años de prioridad comprendida en un periodo de 31 años
Fuente: Recuperado el 6 de noviembre de 2017 en línea www.lens.org

7.5.1.3 Principales países donde se desarrolla o protege la generación de nuevo conocimiento. La búsqueda realizada en *Lens*, proporcionó 328 familias de patentes, para la ecuación de búsqueda “imine* OR "Schiff Bases" OR ketimine* AND antifungal OR antifungic” evidenciando que de las 10 jurisdicciones encargadas de conferir protección a las invenciones de nuevos compuestos con propiedades antifúngicas, entre otras aplicaciones, es la oficina de patentes europeas quien lidera, por poseer el mayor nivel de protección hasta la fecha con 150 patentes las cuales representan el 37,8 % del total de los resultados, siendo seguida por los Estados Unidos de América, con 147 resultados, en el tercer lugar se encuentra la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), quienes promueven la innovación y la creatividad al servicio del desarrollo económico social y cultural de todos los países, a través de un sistema internacional de propiedad intelectual equilibrado y eficaz con un total de 39 patentes bajo su jurisdicción, lo mencionado puede apreciarse en la Figura 26.

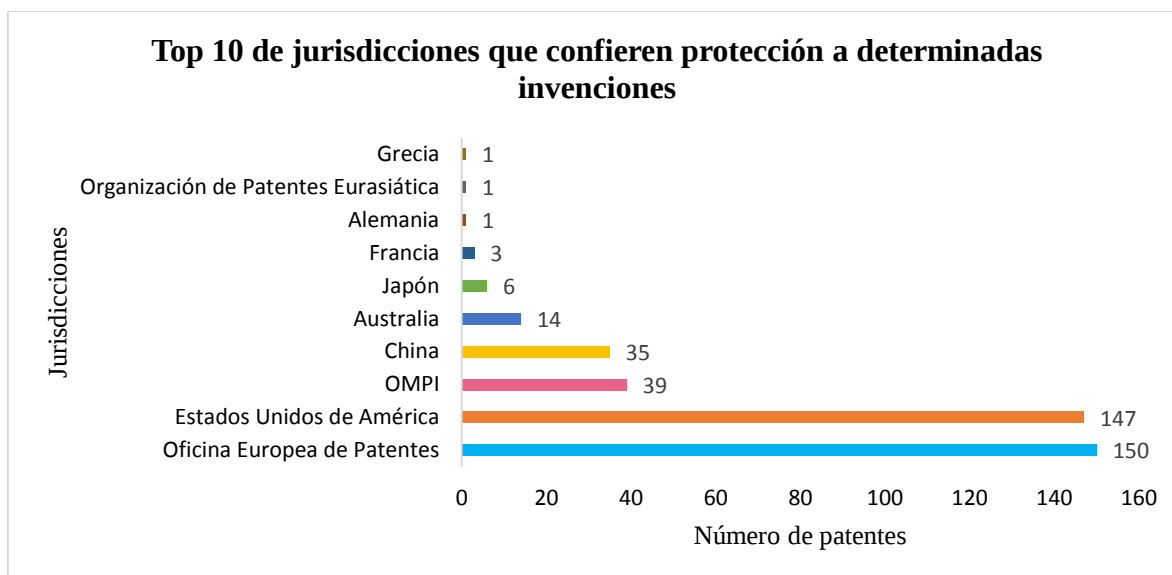


Figura 26. Jurisdicciones de mayor nivel de invención

Fuente: Recuperado el 6 de noviembre de 2017 en línea www.lens.org

Así mismo, se destaca que existen diferentes causantes de las fluctuaciones estadísticas pues la presentación de solicitudes internacionales de patentes depende de las corrientes comerciales, la inversión extranjera directa, el tamaño del mercado del país, como también el hecho de que debido a la creciente internacionalización de las actividades de inversión y desarrollo (I+D), además de que puede que dichas actividades se lleven a cabo en un lugar pero la protección de la invención se solicite en otro destino (WIPO, 2017, párr 10).

7.5.1.4 Principales inventores a nivel mundial, empresas, centros de investigación y desarrollo y universidades. En la Figura 27, se muestra al Dr. Rasshofer, Werner como el autor con mayor número de publicaciones, liderando la lista con 22 patentes, quien trabaja en investigación química para BAYER, seguido del Dr. Grogler, Gerhard (también ha trabajado para BAYER), a quien se le han atribuido 13 patentes. Igualmente, a su compañero, Dr. Kopp, Richard, quien ha logrado obtener 11 patentes, siendo su más actual colaboración en el año 2013. Se destaca que, no todas las invenciones se patentan, pues los inventores pueden optar por otros métodos de

protección, tales como el secreto comercial y las técnicas de comercialización (WIPO, 2017, párr 10).

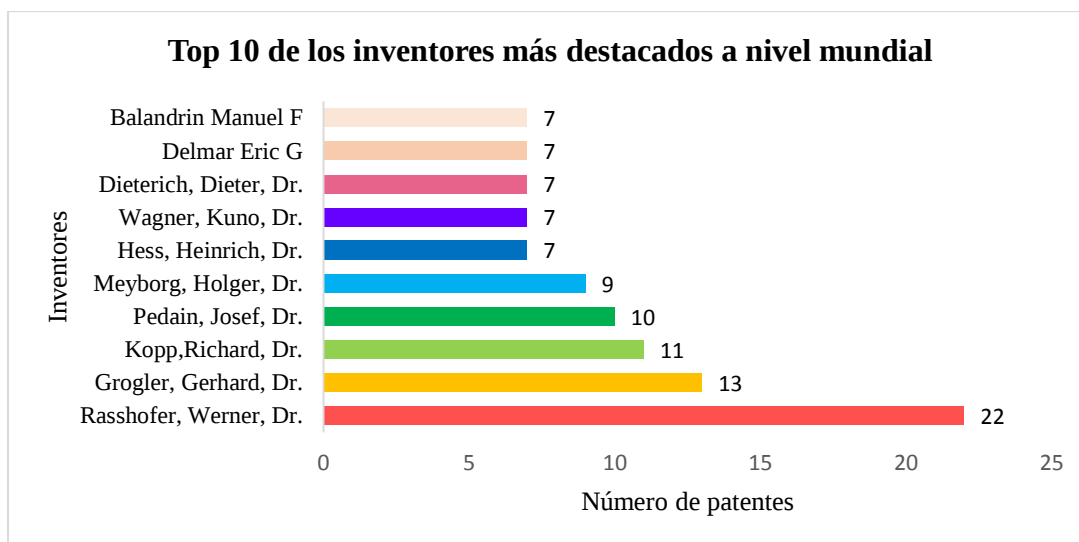


Figura 27. Autores can mayor cantidad de invención científica

Fuente: Recuperado el 6 de noviembre de 2017 en línea www.lens.org

7.5.1.5 Solicitantes de patentes. En la Figura 28 se destaca que la empresa Químico-farmacéutico lidera la lista de participante para solicitudes de patentes con un total de 76 documentos, seguida se encuentra la compañía Biofarmacéutica, que proporciona productos terapéuticos para el tratamiento de trastornos gastrointestinales y endocrinos con 7 documentos. Es de importancia indicar que las invenciones suelen presentarse a menudo en varias oficinas, y generalmente los solicitantes europeos poseen un porcentaje mayor de familias de patentes ya que las presentan en más de tres oficinas (OMPI, 2009, pág. 21).

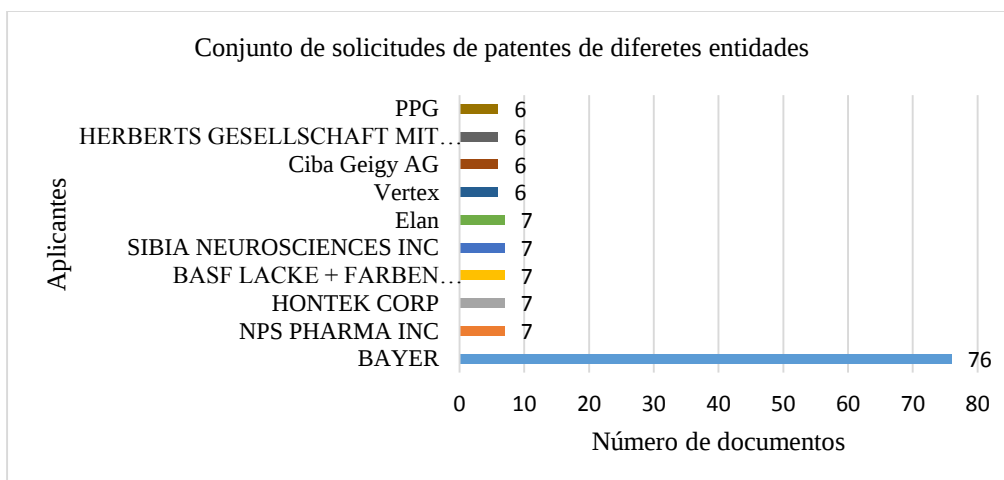


Figura 28. Conjunto de solicitudes de patentes

Fuente: Recuperado el 6 de noviembre de 2017 en línea www.lens.org

7.5.2 Análisis Científico.

7.5.2.1 Dinámica científica en los últimos 22 años. Las investigaciones realizadas entre 1996 y 2018, con ayuda de *Vantage-Point* y *Derwent* para la consolidación de los indicadores bibliométricos, evidencia una dinámica de publicación de nuevos hallazgos muy variada. En la Figura 29 se puede apreciar que entre 1996 y 2000, se publicaron 23 documentos tipo artículo, lo que se traduce como una cantidad de documentos muy limitada después de 4 años de investigación a nivel mundial.

En el 2008 se puede apreciar que la investigación sobre la síntesis, caracterización y evaluación antifúngica de compuestos bioactivos adquiere mayor interés evidenciando un constante aumento entre 2008 y 2013 siendo este último año el índice de mayor número de resultados con una totalidad de 136 publicaciones. Así mismo se puede apreciar que transcurridos 13 años, se la cantidad de publicaciones aumentó a 766 documentos, lo que se puede considerar como un momento en el que el tema de investigación cobra mayor interés e importancia, existiendo coincidencia con los reportes establecidos acerca del incremento de enfermedades por la resistencia desarrollada por cepas de hongos patógenos.

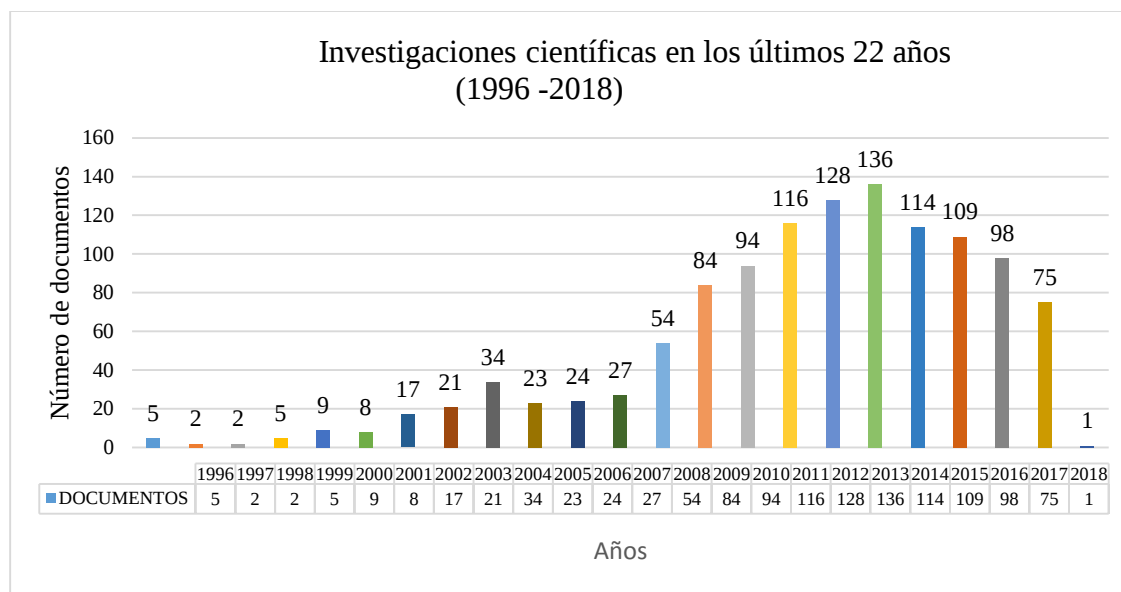


Figura 29. Dinámica de publicación de documentos científicos comprendida en los años 1996-2018

Fuente: Unidad bibliométrica. Crai biblioteca USTABUCA. Base de datos SCOPUS(Elsevier Vantage Point (2017) versión 10)

7.5.2.2 Principales países donde se desarrolla nuevos conocimientos relacionados con salud pública. Los resultados obtenidos del proceso de indexado de *VantagePoint*, evidencian que las jurisdicciones con mayor tendencia de crecimiento han sido países como India quien presenta el mayor número de patentes adjudicadas, seguido a este Egipto y Turquía. Así mismo, en la Figura 30 se observan las 10 jurisdicciones de mayor incidencia en la tendencia mundial de investigación en el tema de interés, siendo los países de la región situada al sudoeste de Asia, oriente medio, quienes han realizado mayor cantidad de aportes de nuevos conocimientos del tema planteado, seguido a estos se encuentra Estados Unidos, Italia, y Malasia con el mayor índice de patentes, en comparación con los países de américa latina. Sin embargo, al comparar entre Colombia, Chile, Brasil y México, Colombia ha realizado un mayor número de publicaciones, lo que implica que efectuar nuevas investigaciones en temas relacionados con salud pública resulta una excelente temática, debido a la falta de nuevos conocimientos en países tropicales.

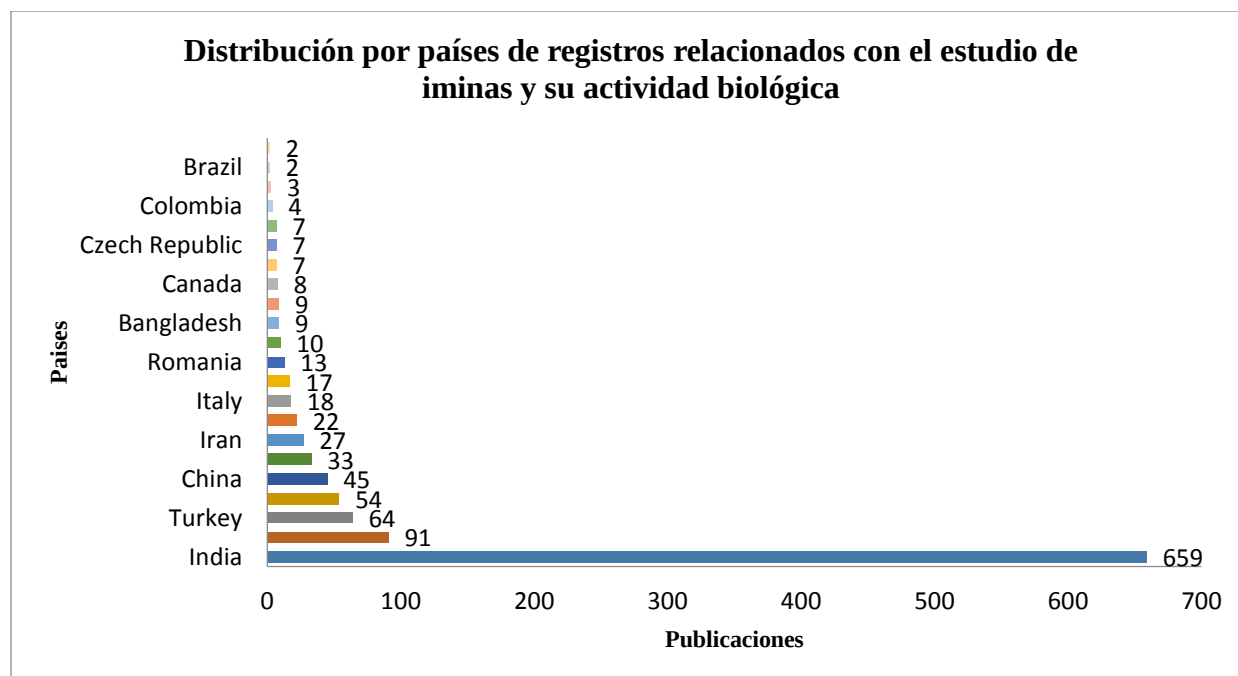


Figura 30. Jurisdicciones de mayor nivel de publicaciones

Fuente: Unidad bibliométrica. Crai biblioteca USTABUCA. Base de datos SCOPUS(Elsevier Vantage Point (2017) versión 10)

7.5.2.3 Principales fuentes de información científica. Conocer las principales fuentes de información científica, destacando la que mayor índice de publicaciones presenta es de vital importancia, ya que permite establecer opciones de publicación para futuros aspirantes escritores de artículos científicos. En la Figura 31 se puede apreciar que *The Journal of Organic Chemistry (JOC)*, es una de las fuentes de información con mayor número de artículos, se caracteriza por ser una revista indexada de rigor científico. Aunque la *Journal of the American Chemical Society (JACS)*, presenta un menor número de publicaciones científicas, es reconocida como una de las revistas más importantes del mundo en todas las áreas de química e interacción con la ciencia.

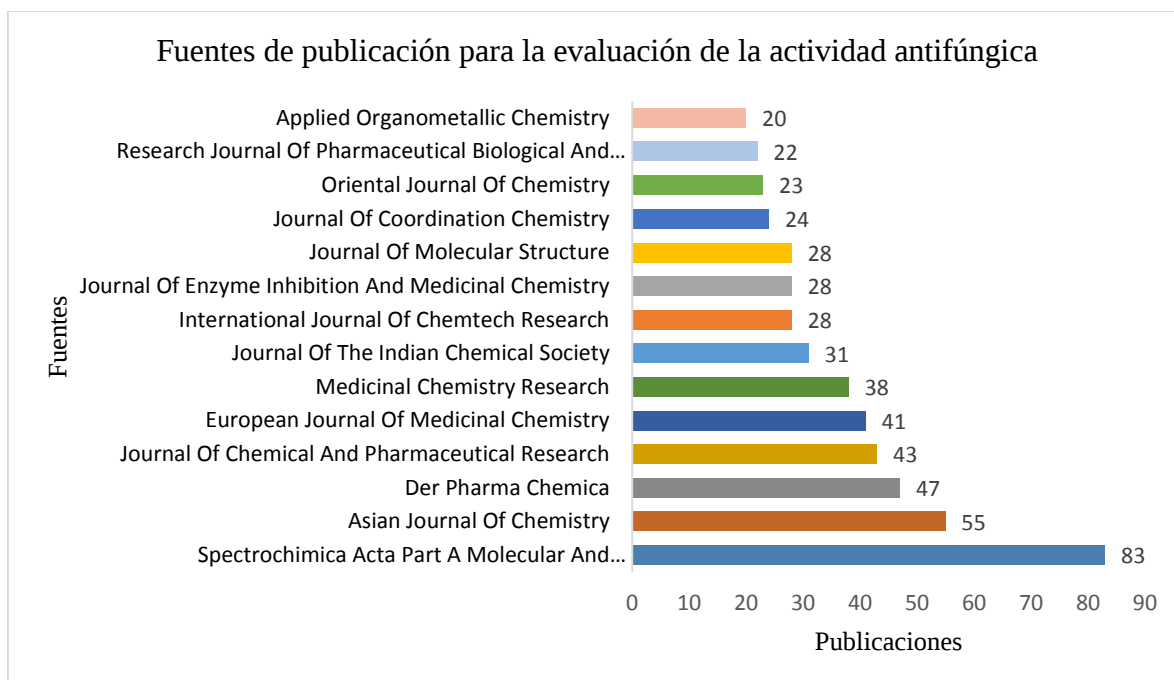


Figura 31. Principales fuentes de publicación para la evaluación de la actividad antifúngica de compuesto tipo iminas

Fuente: Unidad bibliométrica. Crai biblioteca USTABUCA. Base de datos SCOPUS(Elsevier Vantage Point (2017) versión 10).

7.5.2.4 Principales actores a nivel mundial, centros de investigación y desarrollo en universidades. Para el tema de interés, en el rango de tiempo planteado, se evidencia que el mayor número de Centros de Investigación y desarrollo, dentro de los 10 primeros lugares más importantes a nivel mundial, el 41.4% se encuentran en China, siguiéndolo Roma con 14.6% e India 16.3 % (Figura 32). De esta manera, es posible afirmar que China está en continua investigación sobre actividad antifúngica de compuestos tipo bases de Schiff, pues posee varias líneas de investigación en sus centros que les permiten a los investigadores seguir ampliando el conocimiento en el área.

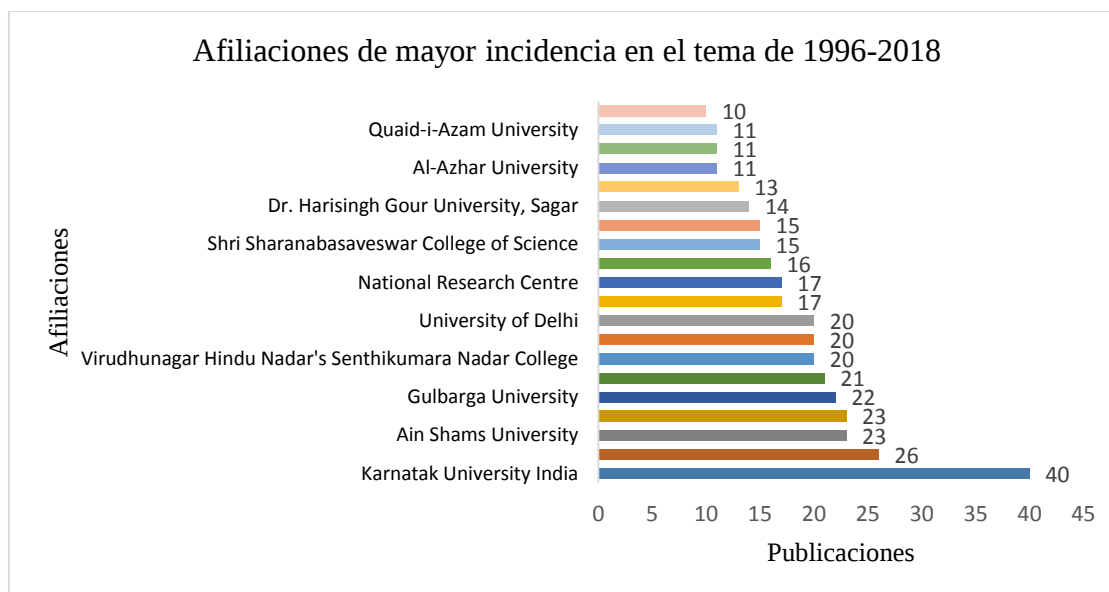


Figura 32. Principales actores a nivel mundial, centros de investigación y desarrollo en universidades

Fuente: Unidad bibliométrica. Crai biblioteca USTABUCA. Base de datos SCOPUS(Elsevier Vantage Point (2017) versión 10)

7.5.2.5 Principales países donde se investiga. Los países más influyentes en el estudio de iminas con actividad antifúngica, India encabeza el listado, liderando con un 31.2% las publicaciones de los 10 primeros puestos, seguido por potencias mundiales como lo son Estados Unidos, China, Japón y Alemania. Dentro de los resultados encontrados, hasta el puesto 37 aparecen los países latinoamericanos, liderando Colombia, seguida de Brasil, continuando hasta el puesto 49 y 50 con Chile y México. Los datos graficados evidencian que India, posee una fuerte investigación en ésta disciplina, que da como resultado altos índices de publicación científica logrando obtener un gran impacto en el mundo (Figura 33).

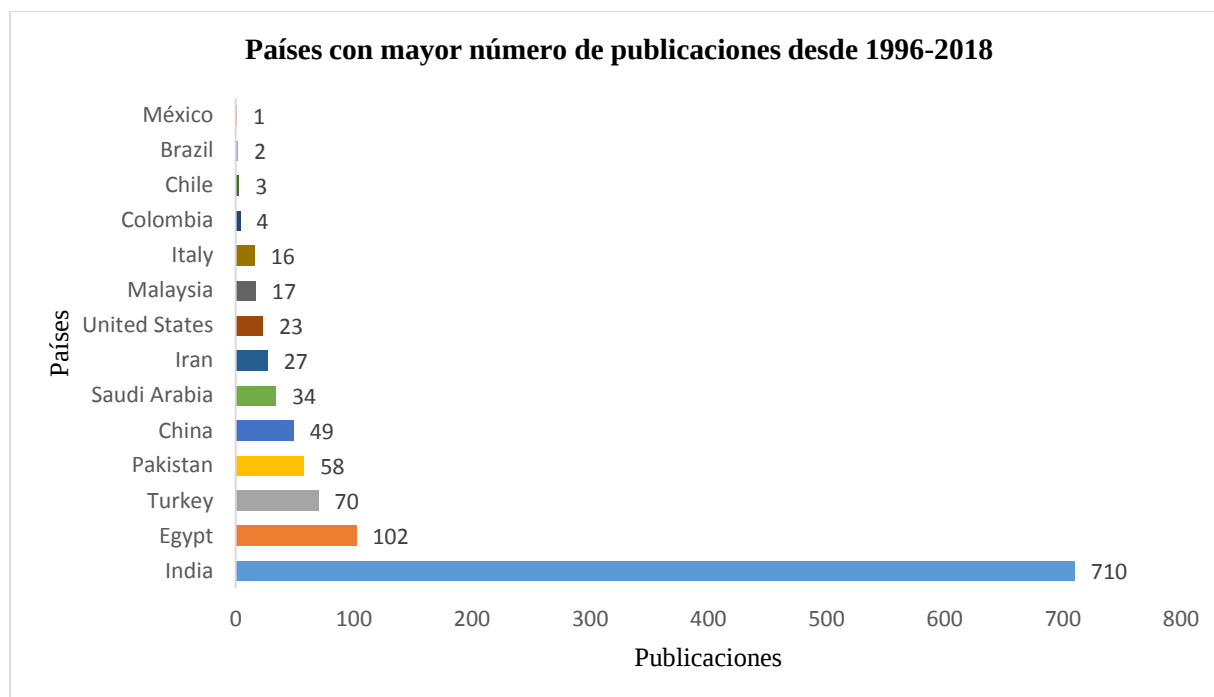


Figura 33. Países con mayor número de publicaciones desde 1996-2018

Fuente: Unidad bibliométrica. Crai biblioteca USTABUCA. Base de datos SCOPUS(Elsevier Vantage Point (2017) versión 10)

En la Tabla 13 se aprecia los países de América Latina que evidencian registros estadísticos de publicaciones relacionadas con la fabricación nuevos materiales orgánicos con prometedora actividad antifúngica, siendo Colombia el país con un mayor número de registros, cuyos trabajos son liderados por la Universidad Industrial de Santander, seguido se encuentra Chile, Brasil y finalmente México, sin embargo, en estos países en comparación con los países descritos en la Figura 33, se evidencia la falta de investigación, lo que es debido a que según “el estudio de Indicadores de Ciencia y Tecnología Iberoamericana e Interamericana (RICYT), indican que los países latinoamericanos representan aproximadamente el 2% de la inversión mundial en investigación y desarrollo (I+D), muy lejos de Norteamérica (39%), Europa (31%) y Asia (26%).

Por otro lado, ningún país de América Latina destina más del 1% de su Producto Interno Bruto a I+D, a diferencia de países de otras regiones donde la inversión supera el 2%. Brasil es el país que más invierte en I+D (54% de la inversión latinoamericana), seguido de México con 26%”

(Tecnológica, 2011, pág. 22). Sin embargo, a pesar de la falta de conciencia de los gobiernos, la calidad de la ciencia desarrollada en las principales instituciones latinoamericanas ha mejorado, pues al menos existen registros a nivel mundial en los indicadores que evalúan la generación de nuevos conocimientos.

Tabla 13. *Afiliaciones de América Latina*

AFILIACIONES (PAISES)	PUBLICACIONES	AFILIACIONES (UNIVERSIDADES)	AUTORES
Colombia	4	Universidad Industrial de Santander, Colombia	Kouznetsov, V.V; y colaboradores
		Universidad de Antioquia, Colombia	Escobar, G; y colaboradores
		Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín, Colombia	Barrio, A.G; Stashenko, E; Vargas Méndez, L.Y; Rodríguez, W
Chile	3	Universidad Católica del Norte, Chile	Fuentes, J.A; y colaboradores
		Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile	Christen, P; y colaboradores
		Universidad Andres Bello, Santiago, Chile	Gacitúa, M; y colaboradores
		Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile	Alves, R.B; y colaboradores
Brasil	2	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, Brazil	De Lima, G.M; y colaboradores
México	1	Instituto de Química, UNAM, D.F., Mexico	Chan-Navarro, R; y colaboradores
		Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico	Jiménez-Pérez, V.M; y colaboradores

7.5.2.6 Tipos de documentos. Como resultado de las investigaciones científicas realizadas, se obtienen artículos científicos con alto contenido de revisión, por ello, éste índice es el más alto en cuanto al tipo de documentos de publicación, pues contiene un sustento bibliográfico extenso que ha permitido la realización de la investigación, dándole estructura de partida para la construcción de nuevo conocimiento, que admite a los autores lleven la información obtenida a discusión para finalizar con la obtención de unas conclusiones propias de manera crítica (figura 34).

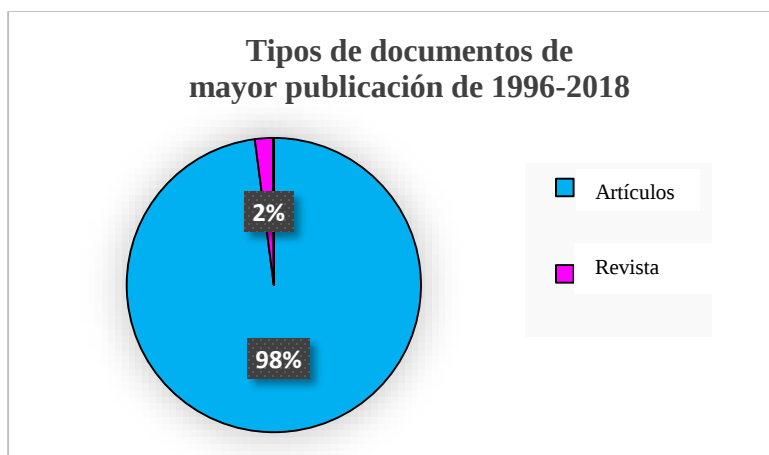


Figura 34. Tipos de documentos de mayor publicación de 1996-2018

Fuente: Unidad bibliométrica. Crai biblioteca USTABUCA. Base de datos SCOPUS (Elsevier Vantage Point (2017) versión 10).

8. Conclusiones

- Se realizó la síntesis de las bases de Schiff de los compuestos [3a-d], mediante una técnica convencional logrando rendimientos de reacción entre 62 y 96 %, obteniendo en todos los casos, cristales amarillos.
- Se evidencian los principios de química verde en la síntesis planteada debido a que no hay formación de subproductos, por ende, hay prevención de generación de residuos y economía atómica. Por otro lado, el cambio de tolueno (reportado en la literatura) por etanol como solvente de síntesis, contribuye significativamente en la disminución de la carga tóxica.
- Los estudios de vigilancia tecnológica permitieron tener acceso y seleccionar de manera organizada los adelantos científicos y tecnológicos mundiales, a favor del desarrollo y obtención de nuevos materiales biológicamente activos. Adicionalmente, permitió conocer el desarrollo de este tema de investigación a nivel mundial, en América Latina y en el país.

- La caracterización molecular realizada por medio de Espectroscopía Infrarroja y Espectrometría de Masas a los compuestos [3a-d] sirvió para garantizar su formación mediante la identificación de los grupos funcionales (IR) y la presencia del ion molecular (EM).
- Las técnicas de difracción de Rayos X de muestras policristalinas y monocristal fueron herramientas adecuadas para determinar que los compuestos [3a-d] cristalizan en el sistema monoclinico. Los valores de sus constantes y volumen de celda unidad tienen poca variación debido a que están conformadas por una estructura base idéntica, con equivalente número de moléculas por celda unidad, excepto para N-(4-bromofenil)-9H-fluoren-9-imina [3c] cuya unidad asimétrica está constituida por ocho moléculas.
- La evaluación de la actividad antifúngica frente a las cepas *Cándida albicans* ATCC 10231 y *Cándida krusei* ATCC 6258 determinó que los compuestos [3a-d] pueden clasificarse como fungistáticos por las concentraciones de eficiencia que presentaron para inhibir el crecimiento del hongo patógeno. Esto abre una oportunidad de encontrar nuevos compuestos bioactivos que sean altamente efectivos y con menos resistencia.
- El estudio de bioactividad mostró que el compuesto N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina [3a], es el más activo frente a las cepas de *C. albicans*, al tener un porcentaje de inhibición superior al 90 %, con una concentración de 0.25mg/mL. Adicionalmente se encontró que el porcentaje de inhibición frente a la *C. krusei*, es de 87.4 % para la misma concentración.
- El compuesto N-(4-yodofenil)-9H-fluoren-9-imina [3d], posee un porcentaje de inhibición del 71 % para la cepa *C. krusei*. Este valor es considerado relevante debido a que el sustituyente yodo actualmente no es muy utilizado por la industria para la producción de fármacos contra ésta cepa, lo cual provee una nueva ventana de investigación.

- El estudio de la variación de los sustituyentes halógenos en posición para respecto al anillo, en las estructuras tradicionales para el tratamiento de enfermedades, es importante debido a que nuevas modificaciones pueden descubrir potenciales grupos que favorezcan y potencialicen la actividad biológica.

9. Recomendaciones

- Sintetizar compuestos de coordinación con los compuestos sintetizados para evaluar si la actividad biológica antifúngica de los compuestos [3a], [3b], [3c] y [3d] se ve potencializada.
- Realizar estudios de cambios morfológicos o en la estructura celular de los hongos mediante la aplicación de la técnica de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para conocer el mecanismo de acción de los nuevos antifúngicos.
- Realizar estudio de toxicidad en cada uno de los compuestos [3a], [3b], [3c] y [3d] y elaborar una evaluación del impacto ambiental de los compuestos sintetizados (Environmental Risk Assessment, ERA) siguiendo la guía para la evaluación del impacto medioambiental de los medicamentos de uso humano de la EMA (Agencia Europea de Medicamentos).

10. Divulgación de resultados

Los medios de divulgación utilizados para esta investigación fueron:

- Trabajo de investigación escrito para la Universidad Santo Tomás.
- Reconocimiento interno (USTA) del Semillero de investigación en nuevos materiales (SENUMA)

- Doble Presentación en Congreso Nacional titulado “XVII Congreso Colombiano de Química”, 2017 en modalidad poster.
- Presentación en Congreso Internacional celebrado en Brasil titulado : XV Seminario Latinoamericano de Análisis por técnicas de Rayos X, 2016, modalidad poster y presentación oral.
- Aceptación de presentación en modalidad poster en congreso Internacional celebrado en Cancún titulado: “Congreso Internacional de investigación de materiales” 2017 y solicitud de publicación del trabajo en MRS (Materials Research Society).

Bibliografía

•

A.Calderone, E. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends and Microbiology*, Vol. 9 327-335.

Abdel-Rahman, e. a. (04 de julio de 2013). Design, Characterization, Teratogenicity Testing, Antibacterial, Antifungal and DNA Interaction of Few High Spin Fe(II) Schiff Base Amino Acid Complexes. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc*, 266–276.

Ahmed, M. (3 de December de 2016). Synthesis, characterization, biological activities and molecular modeling of Schiff bases of benzene sulfonamides bearing curcumin scaffold. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-13.

Akoriyea, S. K. (2009). *Epidemiología de la infección nosocomial en neurocirugía*. España: Universidad de Santiago de Compostela.

Amutha, e. a. (2014). *The New Cu (II) and Ni (II) Complexes of Schiff Bases : Synthesis , Characterization and Antibacterial Studies*. P. Der Pharma Chem: 6, 432–435.

Anca S, E. a. (2016). New Thiazolyl-triazole Schiff Bases: Synthesis and Evaluation of the Anti-*Candida* Potential. *Molecules*, 19.

André Mario Doi, e. a. (25 de enero de 2016). Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. (A. Chowdhary, Ed.) *PLoS ONE*, e0146909, 11(1).

Arias, D. T. (1999). *Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso*. Estados Unidos: Organización panamericana de la salud.

Arias, J. (2002). *Generalidades médico quirúrgicas*. Madrid: Editorial Tebar.

Brown, e. a. (2004). *Química, La ciencia moderna* (novena edición ed.). México: Pearson Educación.

Calderone, e. a. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 9(7), 327-335.

Carrillo, A. J. (2001). Una nueva generación de fármacos. *Iberoam Micol*, 2-5.

Cervera, C. (2012). Candidemia and Invasive Candidiasis in the Adult: Clinical Forms and Treatment. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 30, 483–491.

Chohan, Z. H. (2010). Metal Based Biologically Active Compounds: Design, Synthesis, and Antibacterial/antifungal/cytotoxic Properties of Triazole-Derived Schiff Bases and Their oxovanadium(IV) Complexes. *Eur. J. Med.Chem.*, 45, 2739 - 2747.

Cleiton. (2011). Schiff bases A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 1-8.

Cleiton, M. (2011). Schiff bases, A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 1-8.

Cleiton, M. S. (2011). Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 1-8.

Clinical and Laboratory Standards Institute, C. (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, Vol. 6 No. 2 p 23-30.

CLSI. (2006). Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard.

Company, W. H. (1987). *Química. Ciencia experimental*. Reverte, pp 257.

Cortes, H. H., Martínez, Y. P., & Valencia, H. A. (2009). *Fundamentos de cristalografía*. Colombia: Elizcom.

Daniel J. Pasto, C. R. (1981). *Determinación de estructuras orgánicas*. Barcelona: Reverté.

Daub, G. W. (2005). *Química*. Pearson Educación, pp 98.

Devlin, T. M. (1999). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Pennsylvania: Reverté.

Dong, e. a. (1998). *PowderX: Windows-95-based program for powder X-ray diffraction data processing*. C. J. Appl. Crystallogr: 32.

Durst, H. D. (1985). *Química orgánica experimental*. Reverte, pp159.

Fraternale, D. G. (2003). *J. Essent. Oil Res.* . 15: 278-281.

Geissman, T. A. (1973). *Principios de química orgánica* (segunda edición ed.). Los Ángeles: reverte.

Gennaro, A. R. (2003). Remington: Farmacia, Buenos Aires: Médica Panamericana, pp234.

Gennaro, A. R. (2003). *Remington: Farmacia* (Vol. 1). Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.

GER. (1971). *Gran enciclopedia Rialp: GER*. Rialp.

Glagovich. (2004). N-(9H-Fluoren-9-ylidene)-N-(-2-methoxyphenyl)amine. Acta Crystallographica Section E. *International Union of Crystallography*, 60.

Glagovich, N. (2005). N,N-Bis(9H-fluoren-9-ylidene)benzene-1,2-diamine. *International Union of Crystallography. Acta Crystallographica Section E*, 61.

Harold Frederic Walton, J. R. (1983). *Análisis químico e instrumental moderno*. Barcelona: Reverte.

Harris, D. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. España: Reverté, p 517.

Harris, D. C. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. España: Editorial Reverté.

Hubbard, e. a. (1991). *A Fortran Program for Crystallographic Data Evaluation* Tech. Note 1141. USA: National Bureau of Standards: NBS*AIDS83.

invima. (2016). COMISIÓN REVISORA, SALA ESPECIALIZADA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS. *ACTA No. 06 PRIMERA PARTE*, (págs. 2-3). Bogotá.

INVIMA. (2016). COMISIÓN REVISORA, SALA ESPECIALIZADA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS. En C. REVISORA (Ed.), *COMISIÓN REVISORA, SALA ESPECIALIZADA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS*, (págs. pp. 2-3). Bogotá.

Jean, L. e. (2004). *LMGP-Suite Suite of Programs for the interpretation of X-ray. Experiments*, ENSP/Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique. BP 46. 38042 Saint Martin d'Hères.

Jordi Rius, J. F. (1992). *Caracterización de materiales: avances teóricos y experimentales de la metodología de la difracción*. Madrid: CSIC.

Khoo, e. a. (2014). Synthesis, Characterization and Biological Activity of Two Schiff Base Ligands and Their nickel(II), copper(II), zinc(II) and cadmium(II) Complexes Derived

- from S-4-Picolylidithiocarbazate and X-Ray Crystal Structure of cadmium(II) Complex Derived. *Inorganica Chim* (págs. 413, 68–76). *Inorganica Chim*.
- Louer, B. (2004). *Indexing of powder diffraction patterns of low symmetry lattices by successive dichotomy method*. *J. Appl. Crystallogr.*: 24, 987 – 993.
- Lurá, M. C., González, A. M., Basílico, J. C., Sarsotti, P. V., Gómez, R., & Freyne, L. (1997). *Introducción al estudio de la micología*. Universidad Nacional del Litoral.
- M.A. Pfaller, E. A. (2008). *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 515-521.
- Mann, M. a. (1995). “*Electrospray mass spectrometry for protein characterization*”. pp 219-224.
- Marcelino de Fuentes Navarta, C. B. (2008). Aplicación de la Espectroscopia del Infrarrojo Medio. *Sociedad Química de México*, 93-103.
- Marcio Nucci, e. a. (1 de September de 2010). Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clin Infect Dis, OXFORD*, 51, 5.
- Matviiuk, T. e. (2013). Design, chemical synthesis of 3-(9H-fluoren-9-yl)pyrrolidine-2,5-dione derivatives and biological activity against enoyl-ACP reductase (InhA) and *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37-48.
- McLAFFERTY, F. (1969). *Interpretación de los espectros de masas*. Buenos Aires: Reverte, pp 39.
- Mohamed Y. B, E. A. (2017). IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SOME SCHIFF BASES DERIVED FROM ORTHO-HYDROXYBENZALDEHYDE AGAINST FUSARIUM. *Journal of Engineering Science and technology*, 1-14.

- Moorthy, N. H. (2017). Synthesis, antifungal evaluation and in silico study of novel Schiff bases derived from 4-amino-5(3,5-dimethoxy-phenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiol. *Arabian Journal of Chemistry*, S3239-S3244.
- Morral, F. (2004). *Metalurgia general*. Reverte, España.: pp739.
- Morral, F. e. (2004). *Metalurgia general*. España: Reverte, 739.
- Morral, F. R. (2004). *Metalurgia general*. España: Reverte.
- Murillo, J. P. (2017). Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Revista médica Risaralda*, 23(1), 1-7.
- Myron L, e. a. (1977). Catálisis y acción enzimática, Barcelona: Reverté, p 152-153.
- Myron L, e. a. (1977). *Catálisis y acción enzimática*. Barcelona: Reverte.
- Myron, e. a. (1977). *Catálisis y acción enzimática*. Barcelona: Reverté, p 152-153.
- Nucci, M. (1 de September de 2010). Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *National Center for. Biotechnology Information.*, 51, 561-570.
- Núñez, L. N. (2006). Compuestos de coordinación de rutenio con ligandos base de Schiff. Universidade da Coruña.
- OMPI. (2009). *Indicadores mundiales de propiedad intelectual, Organización Mundial de la Propiedad Intelectual*. Obtenido de http://www.wipo.int/edocs/pubdocs/es/intproperty/941/wipo_pub_941.pdf
- Ooi, L.-L. (2010). Principles of x-ray crystallography, L.E.G.O. S.p.A, Oxford.: pp23-30.
- Ooi, L.-L. (2010). *Principies of x-ray crystallography*. Oxford: L.E.G.O. S.p.A.
- Ooi, L.-L. (2010). *Principies of x-ray crystallography*. Oxford: L.E.G.O. S.p.A, p 23-30.

OXFORD. (2000). *Diccionario de ciencias de la tierra* . Madrid: Complutense.

Pasto, D. J. (1981). Determinación de estructuras orgánicas. Reverte, pp 286.

Pasto, D. J. (1981). Determinación de estructuras orgánicas, Reverte, pp 286.

Pemán, J. e. (2013). Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 328-341.

Philipp, e. a. (2017). Invasive *Candida krusei* infection and *Candida* vasculitis of a leg ulcer in an immunocompetent patient: A case report. *International Journal of Infectious Diseases*, Vol. 55 pp 96-98.

Ponce. (2003). ASPECTOS ACTUALES Y REVISIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS, Santa Clara, Cuba: Unidad de Descubrimiento Molecular Biosilico Asistido por Ordenadores e Investigaciones Bio-informáticas (CAMD-BIR Unit).

Ponce. (2003). ASPECTOS ACTUALES Y REVISIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS. Santa Clara, Cuba: Unidad de Descubrimiento Molecular Biosilico Asistido por Ordenadores e Investigaciones Bio-informáticas (CAMD-BIR Unit).

Ponce. (2003). ASPECTOS ACTUALES Y REVISIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS. Santa Clara, Cuba: Unidad de Descubrimiento Molecular Biosilico Asistido por Ordenadores e Investigaciones Bio-informáticas (CAMD-BIR Unit).

Ponce, E. A. (s.f.). ASPECTOS ACTUALES Y REVISIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS. Santa Clara, Cuba: Unidad de Descubrimiento

Molecular Biosilico Asistido por Ordenadores e Investigaciones Bio-informáticas (CAMD-BIR Unit).

Públic, C. d. (2017). *Auxiliar de Enfermería. Temario Vol. I. Parte Específica*. Madrid: CEP.

Reboiras, M. D. (2006). *Química: la ciencia básica*. Editorial Paraninfo, pp 73.

Rivera, A. E. (2014). Actividad antimicótica de nanopartículas. *Mundo Nano*, Vol. 7, No. 12,, 6-18.

Rubira, E. R. (2008). *Medicamentos: Un Viaje a Lo Largo de la Evolucion Del Descubrimiento de Farmacos, Volume 1*. España: Univ Santiago de Compostela.

Sands, D. E. (1993). *Introducción a la Cristalografía*. España: Reverté.

Schuster, M. G. (2013). Risk factors and outcomes of *Candida krusei* bloodstream infection: A matched, case-control study. *Journal of Infection*, 66(3), 278-284.

Shahverdi, R. e. (2007). "Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*," *Nanomedicine Nanotechnology*". *Biol. Med.*, 3(2), 158-171.

Shriner, R. L. (2001). *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*. Limusa, Noriega Editores, pp 479.

Sierra, C. E. (2008). CANDIDEMIAS NOSOCOMIALES: Patrones de cambio clínico-epidemiológico, factores pronóstico e influencia de tratamiento antifúngico. 1-135. Tesis doctoral, Universidad de Murcia, Facultad de medicina.

Skoog, D. (2001). *Principios de análisis intrumental*. Aravaca, Madrid: McGraw Hill, p 481-483.

- Skoog, D. a. (2001). *Principios de análisis intrumental*. Aravaca, Madrid: McGraw Hill, p 481-483.
- Skoog, D. e. (2001). *Principios de análisis intrumental*. Aravaca, Madrid: McGraw Hill.
- Skoog, H. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. Reverté, España.: pp 517.
- Skoog, H. D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. reverte, pp 517.
- Stephen J. Weininger, F. R. (1988). *Química orgánica*. Reverte.
- Sudbery, P., Berman, J., & Gow, N. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, Vol 7. 317-324.
- Suresh, R. e. (2013). Solvent-Free Synthesis, Spectral Correlations and Antimicrobial Activities of Some Aryl Imines. 101 (págs. 239–248). *Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*
- Su-Zhen, B. e. (2009). N-(9H-Fluoren-9-ylidene)-4-methylaniline. *International Union of Crystallography. Acta Crystallographica Section E*, 65.
- Tecnológica, I. (2011). Investigación en América Latina. *Información tecnológica*, 22(3), 1.
- Thawra A, e. a. (2015). Synthesis, Characterization, Biological Evaluation and Antibacterial Activity of some Heterocyclic Fluorene Compounds Derived from Schiff Base. *International Journal of ChemTech Research*, 447 - 458.
- Toro, M. B. (2008). *Farmacología para fisioterapeutas*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Vega, E. E. (2016). Treatment of refractory *Candida krusei* vaginitis with topical amphotericin B. *Medicina Clínica*, 147(12), 565-566.

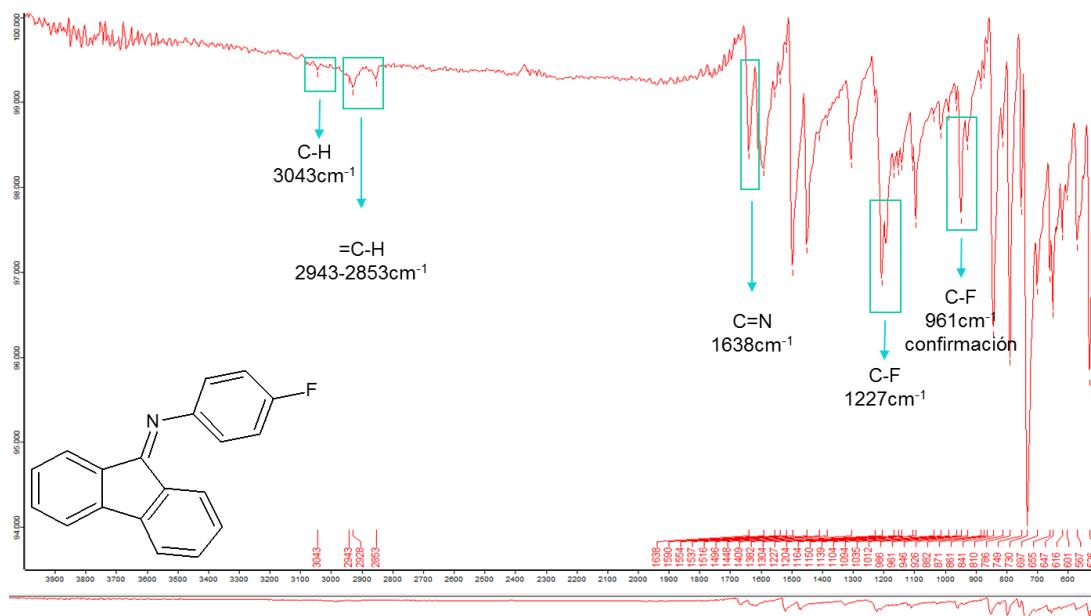
WIPO. (27 de 11 de 2017, párr 10). *World Intellectually Property Organization*. Obtenido de http://www.wipo.int/export/sites/www/ipstats/es/statistics/patents/pdf/patent_stats_methodology.pdf

Yúfera, E. P. (1996). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Barcelona: Reverté.

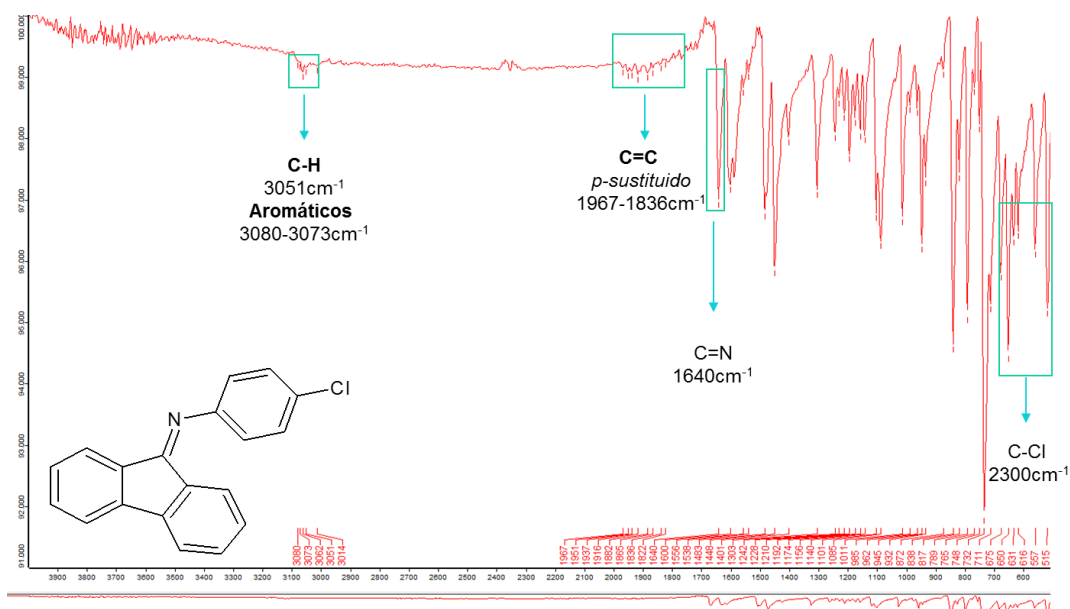
Apéndices

Apéndice A. Espectros IR de los compuestos [3a-d]

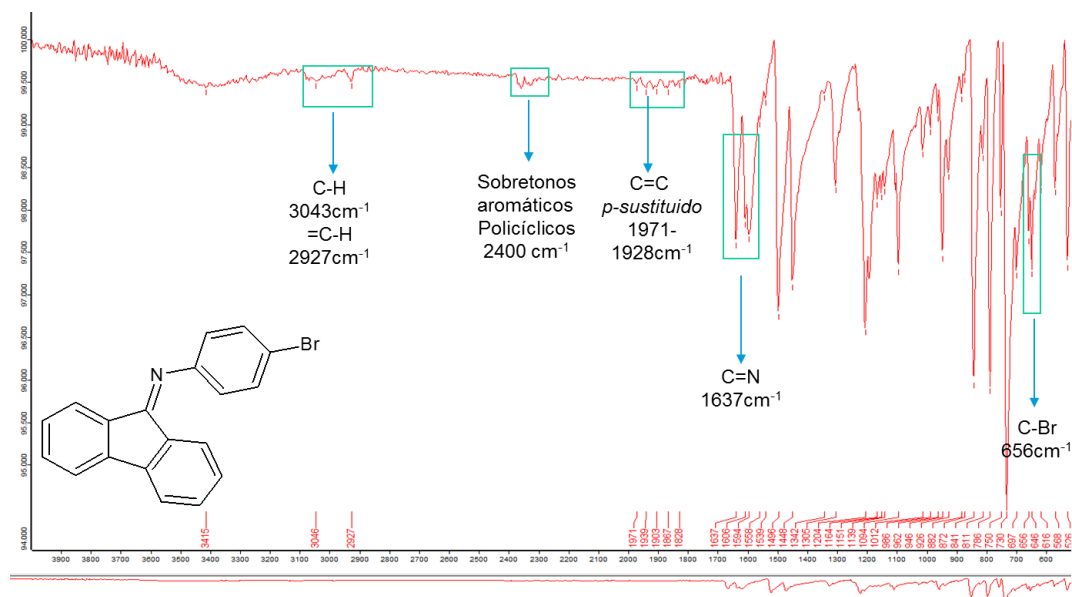
a) Espectro IR del compuesto N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina [3a]



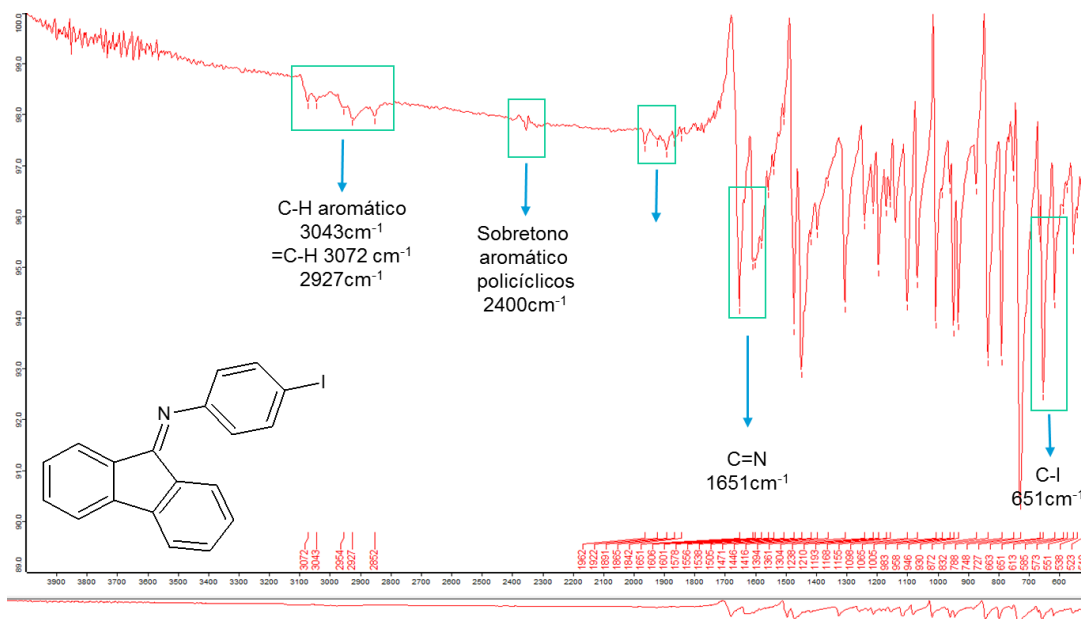
b) Espectro IR del compuesto N-(4-clorofenil)-9H-fluoren-9-imina [3b]



c) Espectro IR del compuesto N-(4-bromofenil)-9H-fluoren-9-imina [3c]



d) Espectro IR del compuesto N-(4-yodofenil)-9H-fluoren-9-imina [3d]

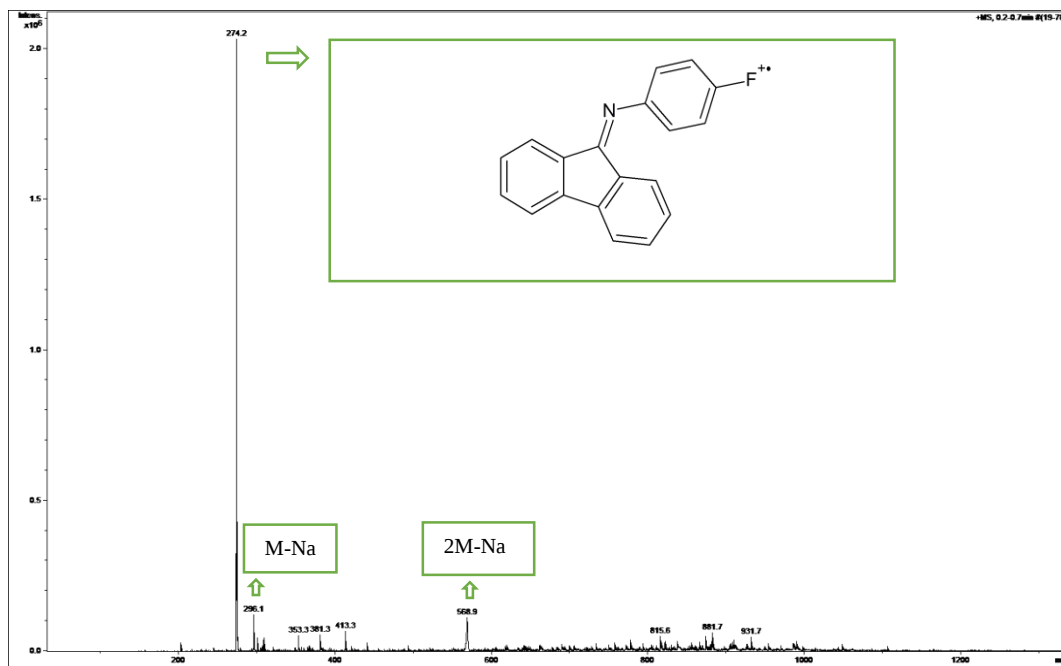


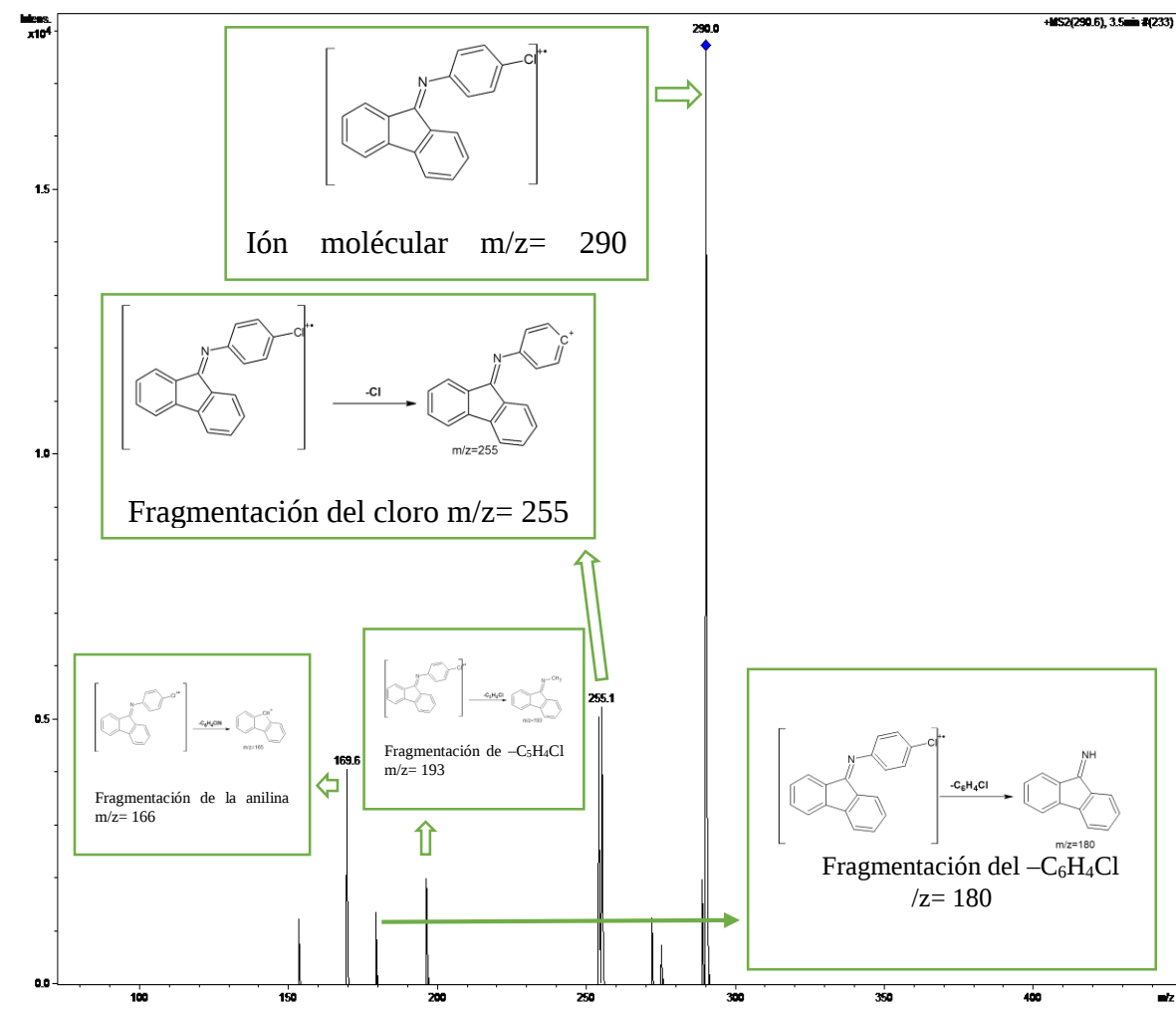
Apéndice B. Espectros de masas y tablas de iones positivos y negativos obtenidos mediante ionización electrospray

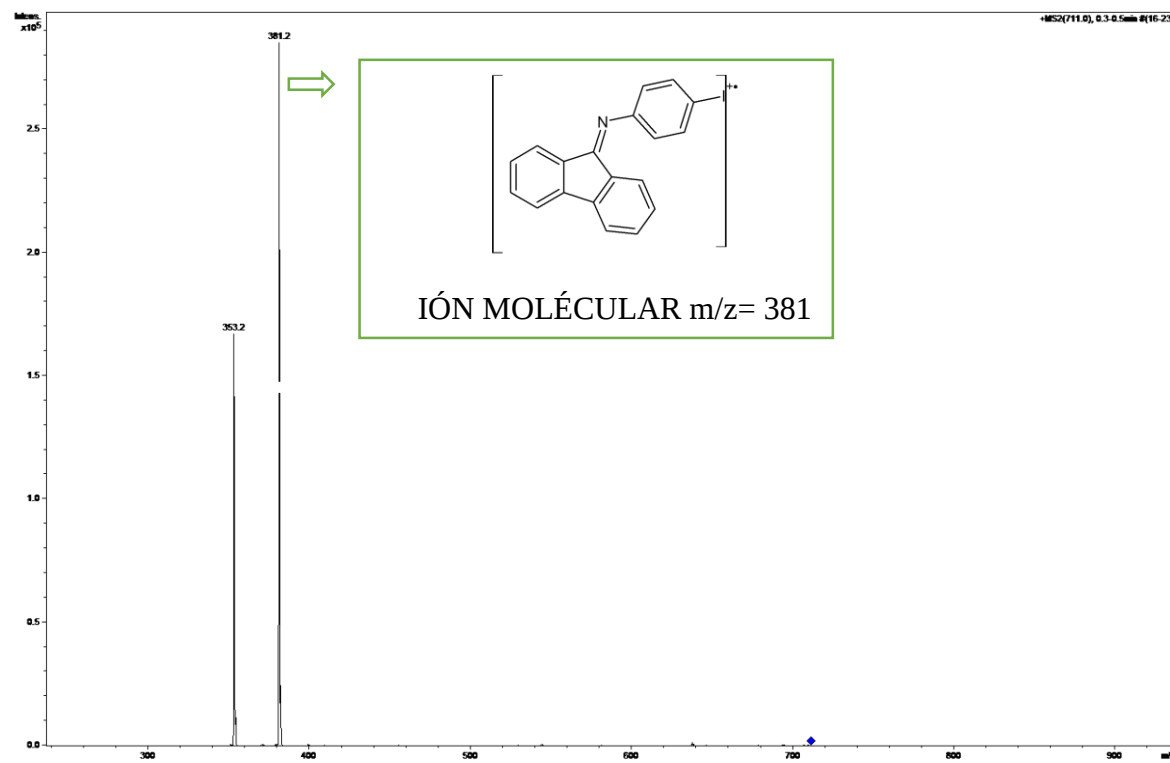
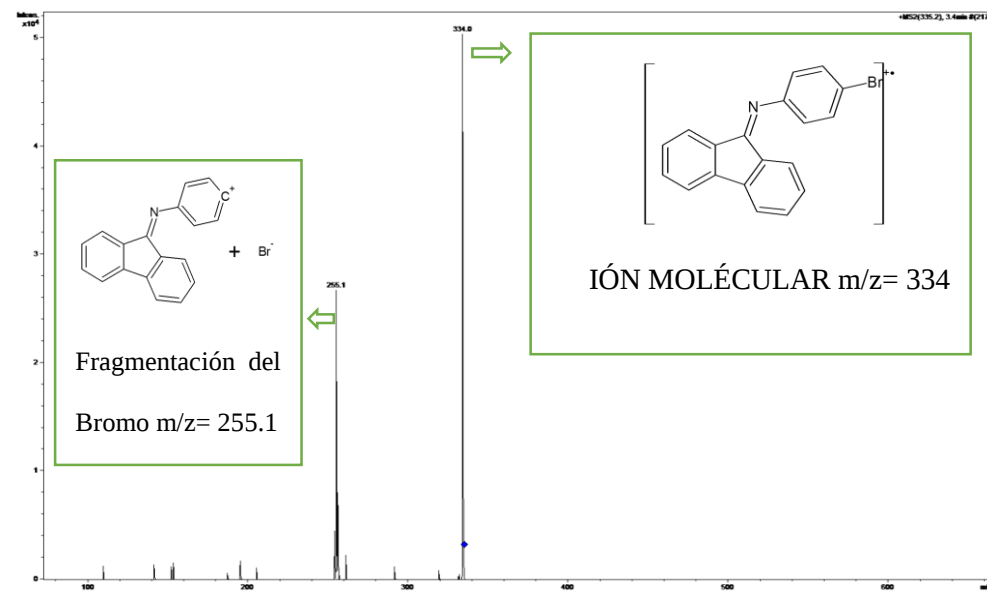
IONES POSITIVOS	IONES NEGATIVOS
M ⁺ +H	M-H
M+NH ₄	M-H ₂ O-H
M+Na	M+Na-H ₂
M+CH ₃ OH+H	M+K-H ₂
M+K	M-Cl
M+CH ₃ CN+H	M+HCOOH-H
M+Na ₂ -H	M+CH ₃ COOH-H
M+C ₂ H ₈ CO+H	M+Br
M+C ₂ H ₃ N+Na	M+CF ₃ COOH-H
2M+H	2M-H
2M+NH ₄	2M-HCOOH-H
2M+Na	2M+CH ₃ COOH-H
2M+K	3M-H
2M+C ₂ H ₃ N+H	
2M+C ₂ H ₃ N+Na	

* Masa de la molécula analizada.

a) Análisis EM del compuesto N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3a]**

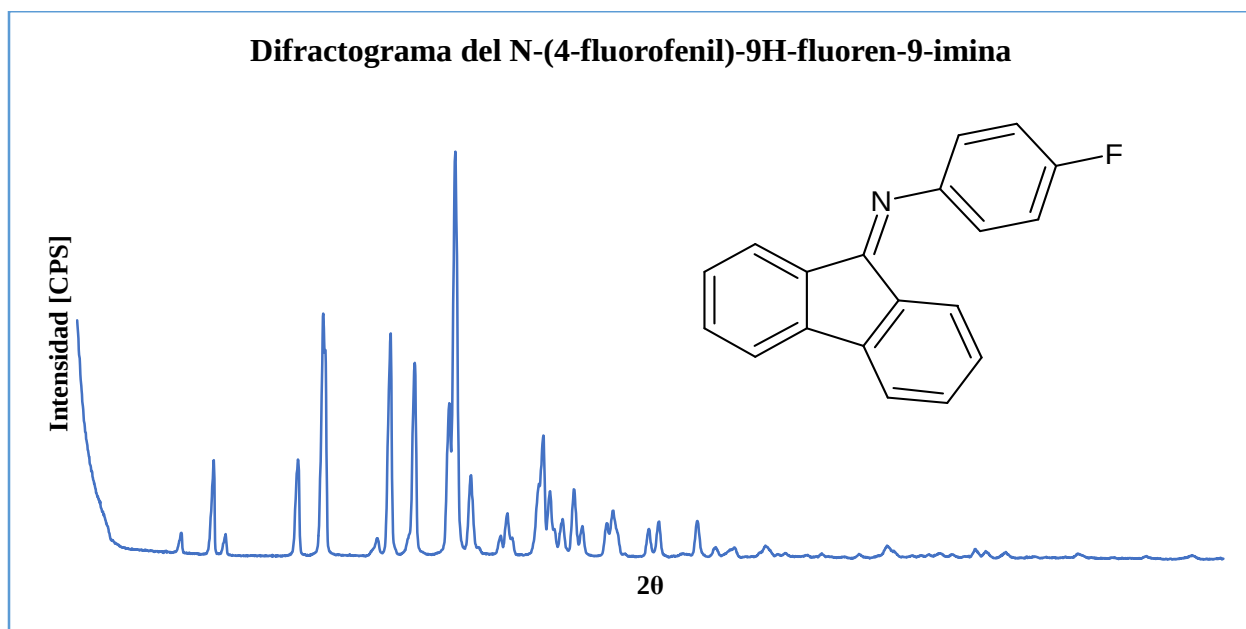


b) Análisis EM del compuesto N-(4-clorofenil)-9H-fluoren-9-imina [**3b**]

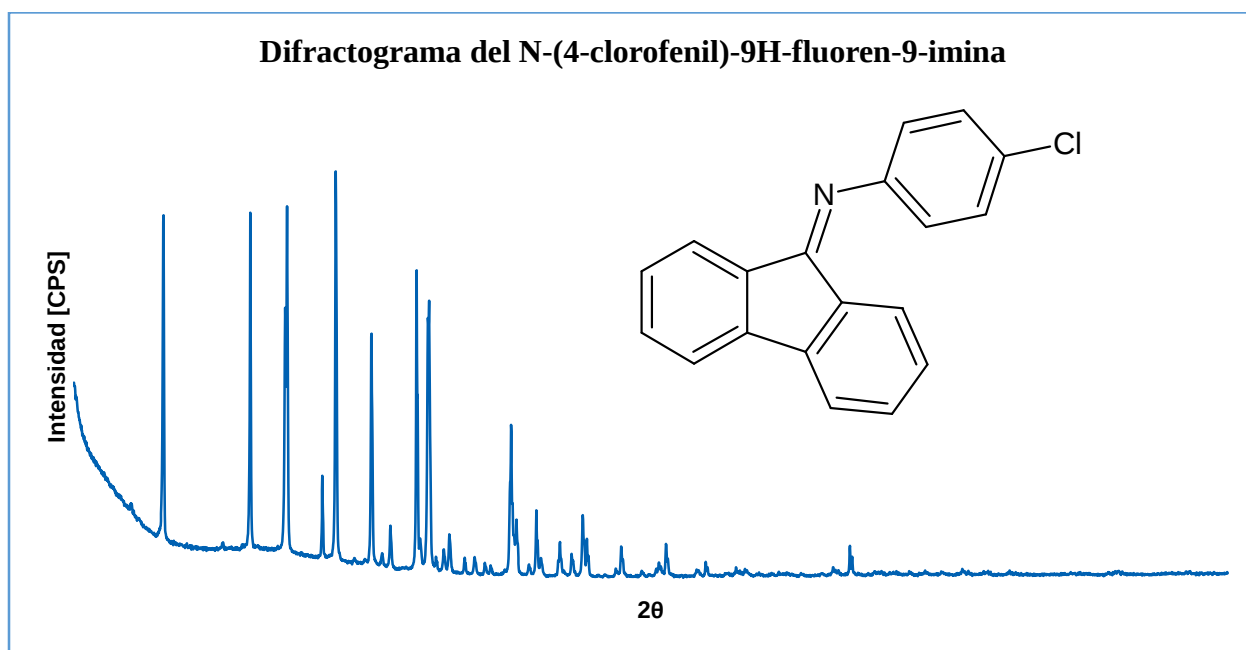
c) Análisis EM del compuesto N-(4-bromofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3c]**d) Análisis EM del compuesto N-(4-yodofenil)-9H-fluoren-9-imina **[3d]**

Apéndice C. Difractogramas de los compuestos [3a-d]

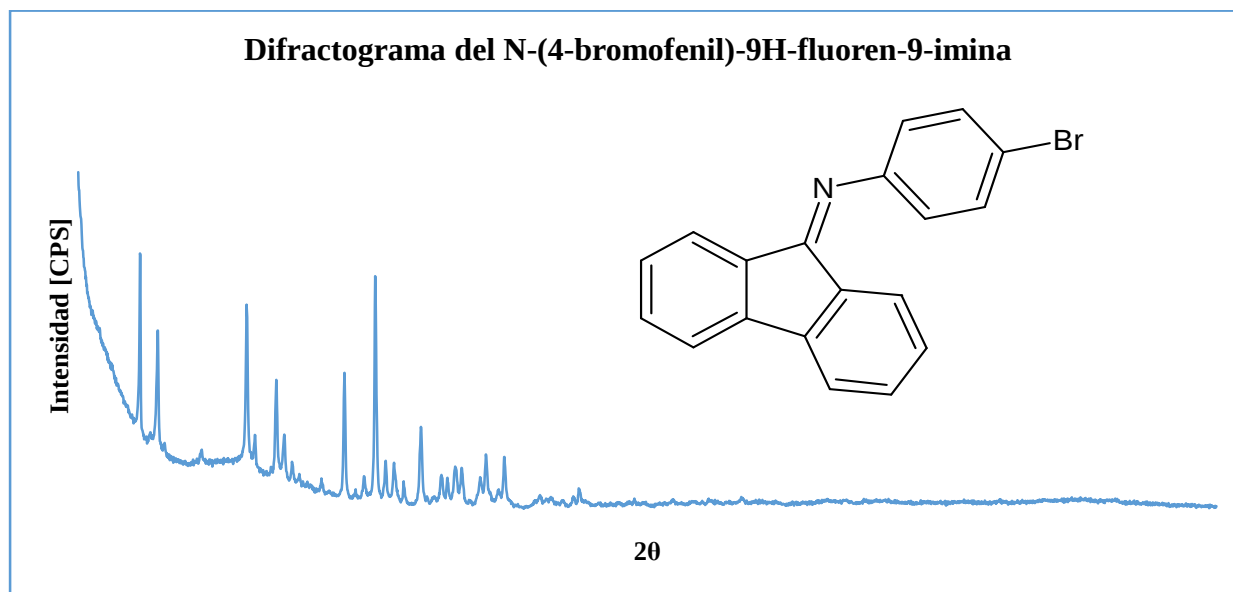
a) Difractograma del N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina [3a]



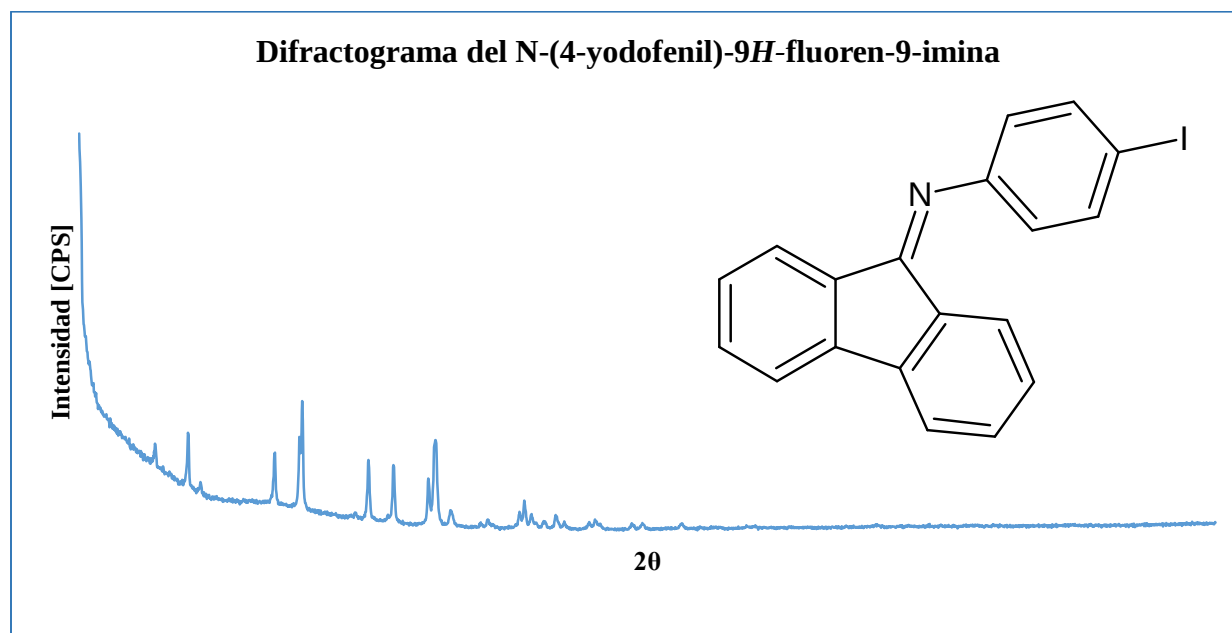
b) Difractograma del N-(4-clorofenil)-9H-fluoren-9-imina [3b]



c) Difractograma del N-(4-bromofenil)-9H-fluoren-9-imina [3c]



d) Difractograma del N-(4-yodofenil)-9H-fluoren-9-imina [3d]



Apéndice D. Longitudes de enlaces de los compuestos [3a-d]*(a) Longitudes de enlace del compuesto N-(4-fluorofenil)-9H-fluoren-9-imina*

Átomo	Átomo	Longitud/Å	Átomo	Átomo	Longitud/Å
F1aa	C6aa	1.379(5)	C1ba	C9ba	1.373(6)
N1aa	C3aa	1.411(5)	C2aa	C3aa	1.375(6)
N1aa	C4aa	1.273(5)	C2ba	C6ba	1.359(7)
C0aa	C4aa	1.498(6)	C2ba	C7ba	1.391(6)
C0aa	C7ba	1.382(6)	C3aa	C5ba	1.379(6)
C0aa	C8aa	1.392(6)	C3ba	C5ba	1.365(6)
C0ba	C5aa	1.376(6)	C3ba	C6aa	1.338(6)
C0ba	C9aa	1.373(7)	C4ba	C5aa	1.376(6)
C1aa	C2aa	1.380(6)	C4ba	C8aa	1.456(6)
C1aa	C6aa	1.350(7)	C6ba	C7aa	1.372(7)
C1ba	C4aa	1.475(6)	C7aa	C8aa	1.383(6)
C1ba	C4ba	1.386(6)	C9aa	C9ba	1.385(6)

(b) Longitud de enlace del compuesto N-(4-clorofenil)-9H-fluoren-9-imina

Átomo	Átomo	Longitud/Å	Átomo	Átomo	Longitud/Å
Cl01	C007	1.737(4)	C007	C017	1.365(6)
C002	C003	1.490(5)	C007	C019	1.361(6)
C002	N1	1.267(5)	C008	C013	1.379(5)
C002	C008	1.476(5)	C009	C016	1.371(6)
C003	C009	1.389(5)	C010	C012	1.371(6)
C003	C015	1.393(5)	C011	C014	1.385(6)
C004	C008	1.388(5)	C012	C020	1.374(6)
C004	C010	1.373(6)	C013	C020	1.382(6)
C004	C015	1.474(6)	C014	C019	1.380(6)
N1	C011	1.416(5)	C015	C021	1.370(6)
C006	C011	1.381(6)	C016	C018	1.371(6)
C006	C017	1.370(6)	C018	C021	1.381(6)

(c) Longitudes de enlace del compuesto *N*-(4-bromofenil)-9*H*-fluoren-9-imina

Átomo	Átomo	Longitud/Å	Átomo	Átomo	Longitud/Å
Br01	C011	1.895(4)	C014	C039	1.398(6)
Br02	C005	1.894(4)	C016	C039	1.467(6)
N004	C013	1.407(5)	C017	C042	1.382(6)
N004	C015	1.275(5)	C018	C026	1.386(6)
C005	C010	1.362(6)	C018	C041	1.369(6)
C005	C034	1.345(6)	C019	C024	1.374(6)
N006	C009	1.268(5)	C019	C031	1.376(7)
N006	C019	1.419(5)	C020	C029	1.380(6)
C007	C009	1.499(6)	C021	C026	1.477(6)
C007	C017	1.384(6)	C021	C032	1.368(6)
C007	C021	1.402(6)	C022	C027	1.373(6)
C008	C015	1.496(6)	C023	C030	1.360(7)
C008	C016	1.405(6)	C025	C026	1.370(6)
C008	C028	1.381(6)	C025	C037	1.386(7)
C009	C018	1.483(6)	C028	C030	1.383(6)
C010	C024	1.381(6)	C031	C034	1.384(6)
C011	C020	1.370(6)	C032	C036	1.383(7)
C011	C027	1.372(7)	C033	C043	1.373(6)
C012	C016	1.376(6)	C035	C038	1.344(6)
C012	C023	1.378(6)	C035	C039	1.382(6)
C013	C022	1.376(6)	C036	C042	1.378(7)
C013	C029	1.368(7)	C037	C040	1.363(7)
C014	C015	1.469(6)	C038	C043	1.410(7)
C014	C033	1.369(6)	C040	C041	1.385(6)

Apéndice E. Ecuación de búsqueda

- Cantidad de resultados: 1158 documentos
- Rango en años del análisis: 1980 - 2018
- Ecuación de búsqueda:

(TITLE-ABS-KEY ("imine" OR "schiff base") AND TITLE-ABS-KEY ("antifungal"))
AND DOCTYPE (ar OR re) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Schiff Base") OR
LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Antifungal Activity") OR LIMIT-TO (

EXACTKEYWORD , "Schiff Bases") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Antifungal Agent") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Cándida Albicans") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Antifungal Agents") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Antifungal") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Structure Activity Relation") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Schiff-base") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Fluconazole") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Imine") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Anti-fungal Activity") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Structure-Activity Relationship") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Antibacterial And Antifungal Activity") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Schiff Basis") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Candida") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Chlorine Compounds") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Imines") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Amphotericin B") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Triazoles") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Bioactivity") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Schiff's Base")).

- Cantidad de resultados: 1160 documentos
- Rango en años del análisis: 1996 – 2018
- Ecuación de búsqueda sencilla: (imine* OR "Schiff Bases" OR ketimine*) AND (antifungal)

- Ecuación de búsqueda con aplicación de filtros:
(TITLE-ABS-KEY ((imine* OR "Schiff Bases" OR ketimine*)) AND TITLE-ABS-KEY ((antifungal))) AND (LIMIT-TO (PUBYEAR , 2018) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2017) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2016) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2015) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2014) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2013) OR LIMIT-TO (

PUBYEAR, 2012) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2011) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2010) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2009) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2008) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2007) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2006) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2005) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2004) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2003) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2002) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2001) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2000) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 1999) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 1998) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 1997) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 1996)) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE, "ar") OR LIMIT-TO (DOCTYPE, "re") OR LIMIT-TO (DOCTYPE, "ch")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Schiff Base") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Antifungal Activity") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Schiff Bases") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Antifungal Agent") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Cándida Albicans") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Cándida Krusei") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Fungi") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Antifungal Agents") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Antifungal") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Biological Activity") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Fluconazole") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Schiff-base") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Imine") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "X Ray Diffraction") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Anti-fungal Activity") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Antibacterial And Antifungal Activity") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Structure-Activity Relationship") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Schiff Basis") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Chlorine Compounds") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Anti-fungal") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Cándida") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Imines")) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA,

"BIOC") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "CHEM") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "ENVI"
) OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "PHAR") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "MATE") OR
LIMIT-TO (SUBJAREA , "MEDI")).