



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**



**" Formación de derivados de Horminona  
y su ensayo microbiológico."**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**NORMA ANGELICA VALENCIA ISLAS**

**Asesor: M. en C. René Miranda Ruvalcaba  
Q.F.B. Patricia Miranda Castro**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1995**

**FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



SECRETARÍA NACIONAL  
DE EDUCACIÓN  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo  
"Formación de derivados de Horminona y su  
ensayo microbiológico"

que presenta la pasante: Norma Angélica Valencia Islas,  
con número de cuenta: 8737766-8 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 12 de julio de 1995

PRESIDENTE M. en C. René Miranda Ruvalcaba

VOCAL M. en C. Guillermo Penieres Carrillo

SECRETARIO Q. Mario A. Morales Delgado *Mario A. Morales Delgado*

1er. SUPLENTE M. en C. Susana E. Mendoza Elvira *Susana E. Mendoza Elvira*

2do. SUPLENTE M. en C. Stella Maris Reginensi Rivera *Stella Maris Reginensi Rivera*

**DEDICO ESTE TRABAJO A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE  
ALGUNA MANERA CONTRIBUYERON A SU REALIZACION, EN ESPECIAL  
AL M. EN C. RENE MIRANDA RUVALCABA Y A LA QFB LINDA  
PATRICIA MIRANDA CASTRO POR LAS SUGERENCIAS Y APOYO QUE  
ME BRINDARON.**

**SE AGRADECE AL DR. MARIANO MARTINEZ DEL INSTITUTO DE  
QUIMICA DE LA UNAM POR EL APOYO TECNICO PROPORCIONADO.**

**SE AGRADECE A LA FUNDACION UNAM QUE POR EL PROGRAMA DE  
BECAS PARA TESIS DE LICENCIATURA ASI COMO A LA DGAPA QUE  
MEDIANTE EL PROYECTO IN-301791 PROPORCIONARON EL APOYO  
ECONOMICO PARA EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO L-122 DE LA  
SECCION DE QUIMICA ORGANICA Y EN EL EDIFICIO DE POSGRADO DE  
LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN UNAM BAJO  
LA ASESORIA DEL M.EN C. RENE MIRANDA RUVALCABA Y LA QFB.  
PATRICIA MIRANDA CASTRO.**

# INDICE GENERAL

Página

|   |    |
|---|----|
| I. RESUMEN.....   | I  |
| II. NOTACIONES.....   | II |
| 1. INTRODUCCION.....  | 1  |
| 2. GENERALIDADES.....   | 5  |
| 2.1 ANTECEDENTES DE LA HORMINONA.....   | 6  |
| 2.2. ESTUDIOS RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (REA).....                          | 9  |
| 2.2.1 HISTORIA DE LOS ESTUDIOS REA.....   | 9  |
| 2.2.2 FUNDAMENTO DE LOS ESTUDIOS REA.....                                       | 9  |
| 2.2.3 POSIBILIDADES DE LOS ESTUDIOS REA.....                                    | 10 |
| 2.2.4 RECURSOS EMPLEADOS PARA LOS ESTUDIOS REA.....                             | 12 |
| 2.2.5 LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS REA.....                                     | 13 |
| 2.2.6 CLASIFICACION GENERAL DE LOS ESTUDIOS REA.....                            | 14 |
| 2.2.7 ESTUDIOS REA Y EL FUTURO.....   | 14 |
| 2.3. BIOENSAYOS.....  | 15 |
| 2.3.1 BIOENSAYO ALEATORIO.....  | 16 |
| 2.3.2 BIOENSAYO NO ALEATORIO.....   | 16 |
| 2.3.3 CONSIDERACIONES GENERALES PARA LOS<br>BIOENSAYOS.....                     | 16 |
| 2.4. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PARA MEDIR SENSIBILIDAD<br>A LOS ANTIBIÓTICOS..... | 17 |
| 2.4.1 PRUEBA DE DIFUSION EN AGAR O SENSIDISCOS.....                             | 18 |
| 2.4.1.1 FACTORES QUE LAS AFECTAN.....   | 19 |
| 2.4.1.2 FALLAS MAS COMUNES.....   | 21 |
| 2.4.2 PRUEBAS DE DILUCION.....  | 22 |

|  |    |
|--|----|
| 2.4.3 IMPEDANCIA.....                            | 22 |
| 2.4.4 CONDUCTANCIA.....                          | 22 |
| 3. OBJETIVOS.....                                | 23 |
| 3.1 GENERAL.....                                 | 23 |
| 3.2 PARTICULARES.....                            | 23 |
| 4. METODOLOGIA Y RESULTADOS.....                 | 24 |
| 4.1 PARTE QUIMICA.....                           | 24 |
| 4.2 PARTE BIOLOGICA.....                         | 31 |
| 5. DISCUSION.....                                | 35 |
| 5.1 ASPECTO QUIMICO.....                         | 35 |
| 5.2 ASPECTO BIOLOGICO.....                       | 42 |
| 5.3 RELACIONES ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD..... | 47 |
| 6. CONCLUSIONES.....                             | 52 |
| 7. APENDICE.....                                 | 54 |
| 8. BIBLIOGRAFIA.....                             | 76 |

## INDICE DE TABLAS.

|  | página |
|--|--------|
| <b>Tabla 1.</b> Actividad biológica de algunos diterpenos de tipo quinoidal.....   | 8      |
| <b>Tabla 2.</b> Blancos para Bioensayos.....   | 17     |
| <b>Tabla 3.</b> Cepas probadas con los derivados de <b>I</b> .....   | 32     |
| <b>Tabla 4.</b> Resumen del espectro antibacteriano de los derivados de <b>I</b> .....                                   | 33     |
| <b>Tabla 5.</b> Resumen de los diámetros de los halos de inhibición .....  | 34     |
| <b>Tabla 6.</b> Comparación de los MIC's de los derivados de <b>I</b> y <b>OT</b><br>respecto a <b>I</b> .....           | 48     |
| <b>Tabla 7.</b> Comparación de los halos de inhibición de derivados de <b>I</b><br>y <b>OT</b> respecto a <b>I</b> ..... | 49     |
| <b>Tabla 8.</b> Comparación de los MIC's de los derivados de <b>I</b> respecto<br>a <b>OT</b> .....                      | 50     |
| <b>Tabla 9.</b> Comparación de los halos de inhibición de derivados de <b>I</b><br>respecto a <b>OT</b> .....            | 51     |

## INDICE DE FIGURAS

|  | <b>página</b> |
|--|---------------|
| <b>Fig. 1.</b> Acido abiético.....   | 7             |
| <b>Fig. 2.</b> Productos de Transformación de I.....   | 25            |
| <b>Fig. 3.</b> Diagrama de Flujo sobre el trabajo experimental.....                            | 26            |
| <b>Fig. 4.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ para I.....  | 54            |
| <b>Fig. 5.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ y versión APT para I.....                       | 55            |
| <b>Fig. 6.</b> Espectro de Absorción al Infrarrojo para I.....                                 | 56            |
| <b>Fig. 7.</b> Espectro de Masas por impacto electrónico para I.....                           | 57            |
| <b>Fig. 8.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ para II.....                                       | 58            |
| <b>Fig. 9.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ con adición de $\text{D}_2\text{O}$ para II.....   | 59            |
| <b>Fig. 10.</b> Espectro de RNM $^{13}\text{C}$ para II.....                                   | 60            |
| <b>Fig. 11.</b> Espectro de Absorción al Infrarrojo para II.....                               | 61            |
| <b>Fig. 12.</b> Espectro de Masas por impacto electrónico para II.....                         | 62            |
| <b>Fig. 13.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ para III.....                                     | 63            |
| <b>Fig. 14.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ con adición de $\text{D}_2\text{O}$ para III..... | 64            |
| <b>Fig. 15.</b> Espectro de RNM $^{13}\text{C}$ y versión APT para III.....                    | 65            |
| <b>Fig. 16.</b> Espectro de Absorción al Infrarrojo para III.....                              | 66            |
| <b>Fig. 17.</b> Espectro de Masas por impacto electrónico para III.....                        | 67            |
| <b>Fig. 18.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ para IV.....                                      | 68            |
| <b>Fig. 19.</b> Espectro de RNM $^{13}\text{C}$ para IV.....                                   | 69            |
| <b>Fig. 20.</b> Espectro de Absorción al Infrarrojo para IV.....                               | 70            |
| <b>Fig. 21.</b> Espectro de Masas por impacto electrónico para IV.....                         | 71            |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Fig. 22. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> para V.....</b>                  | <b>72</b> |
| <b>Fig. 23. Espectro de RNM <math>^{13}\text{C}</math> y versión APT para V.....</b> | <b>73</b> |
| <b>Fig. 24. Espectro de Absorción al Infrarrojo para V.....</b>                      | <b>74</b> |
| <b>Fig. 25. Espectro de Masas por impacto electrónico para V.....</b>                | <b>75</b> |

## I. RESUMEN

Tomando como molécula base a la **Horminona** (diterpenquinona con esqueleto de abietano aislada de la raíz de *Salvia reptans* Jacq.), se llevó a cabo un estudio de **Relación Estructura Química-Actividad** microbiológica de los derivados químicos de ésta obtenidos mediante las reacciones de deshidratación, acetilación, benzoilación y metilación. Dichos derivados se caracterizaron por correlación de sus propiedades físicas y datos espectroscópicos (RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , EMIE, IR) con los reportados en la literatura química y así mismo, se esayaron microbiológicamente (por medio de la técnica de sensibilización o Kirby-Bauer) sobre cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas de la colección ATCC sugeridas para probar antibióticos y en especial Tetraciclinas con las que presentan cierta similitud estructural y de las cuales se empleó como patrón de referencia a la **Oxitetraciclina**.

En este estudio se encontró que los derivados obtenidos presentan una marcada tendencia a actuar sólo sobre las cepas Gram positivas empleadas. Además se distingue, que al modificar químicamente las posiciones 7 y 12 de la **Horminona** cuando se sustituyen los hidrógenos de los oxhidrilos por grupos funcionales que contengan oxígeno (acetato o benzoilo), la actividad antimicrobiana se incrementa con respecto a la molécula base. Con respecto a la **Oxitetraciclina**, lo anterior sólo sucede cuando el grupo sustituido es el benzoilo. Además, si se elimina el oxhidrilo de la posición 7, el producto resultante no presenta actividad antimicrobiana.

También se encontró que dichos derivados al no ser solubles en agua presentan problemas de difusión en el agar, por lo cual, los halos de inhibición en todos los casos son menores aun a los mostrados por la molécula base que también es insoluble en agua pero, en donde los hidrógenos de los oxhidrilos no se encuentran sustituidos y por lo tanto presenta mayor hidrofiliidad.

## II. NOTACIONES.

A continuación se anexa la siguiente lista de notaciones con el objeto de hacer más sencilla la lectura del presente trabajo.

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>Ab. rel.</b>                     | <b>Abundancia Relativa</b>                              |
| <b>Ac<sub>2</sub>O</b>              | <b>Anhidrido Acético</b>                                |
| <b>AcOEt</b>                        | <b>Acetato de Etilo</b>                                 |
| <b>APT</b>                          | <b>RMN <sup>13</sup>C; versión Attached Proton Text</b> |
| <b>APTS</b>                         | <b>Acido p-toluensulfónico</b>                          |
| <b>ATCC</b>                         | <b>Colección de Cepas Tipo Americano</b>                |
| <b>BcCl</b>                         | <b>Cloruro de Benzoilo</b>                              |
| <b>CCF</b>                          | <b>Cromatografía en Capa Fina</b>                       |
| <b>CeSO<sub>4</sub></b>             | <b>Sulfato Cérico</b>                                   |
| <b>CHCl<sub>3</sub></b>             | <b>Cloroformo</b>                                       |
| <b>CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub></b>  | <b>Diazometano</b>                                      |
| <b>-C=O</b>                         | <b>Carbonilo</b>  |
| <b>CuSO<sub>4</sub></b>             | <b>Sulfato de Cobre</b>                                 |
| <b>D</b>                            | <b>Deuterio</b>   |
| <b>EMIE</b>                         | <b>Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico</b>  |
| <b>I</b>                            | <b>Horminona</b>  |
| <b>II</b>                           | <b>Producto de Deshidratación</b>                       |
| <b>III</b>                          | <b>Producto de Acetilación</b>                          |
| <b>IR</b>                           | <b>Espectrofotometría de Absorción al Infrarrojo</b>    |
| <b>IV</b>                           | <b>Producto de Benzoilación</b>                         |
| <b>KOH</b>                          | <b>Hidróxido de Potasio</b>                             |
| <b>M<sup>+</sup></b>                | <b>Ion Molecular</b>                                    |
| <b>MCB</b>                          | <b>Mínima Concentración Bactericida</b>                 |
| <b>-Me</b>                          | <b>Metilo</b>   |
| <b>Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | <b>Sulfato de dimetilo</b>                              |
| <b>Mhz</b>                          | <b>Megahertz</b>  |
| <b>MIC</b>                          | <b>Concentración Mínima Inhibitoria</b>                 |
| <b>mL</b>                           | <b>miliLitros</b>                                       |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>            | <b>Bicarbonato de Sodio</b>                             |
| <b>NaOH</b>                         | <b>Hidróxido de Sodio</b>                               |
| <b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | <b>Sulfato de Sodio</b>                                 |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>-OH</b>                | <b>Oxhidrilo</b>                                       |
| <b>OT</b>                 | <b>Oxitetraciclina</b>                                 |
| <b>pf</b>                 | <b>punto de fusión</b>                                 |
| <b>ppm</b>                | <b>partes por millón</b>                               |
| <b>Py</b>                 | <b>Piridina</b>  |
| <b>REA</b>                | <b>Relación Estructura-Actividad</b>                   |
| <b>RMN <sup>13</sup>C</b> | <b>Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13</b>      |
| <b>RMN <sup>1</sup>H</b>  | <b>Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno</b>       |
| <b>SiO<sub>2</sub></b>    | <b>Oxido de Silicio (Silice)</b>                       |
| <b>TMS</b>                | <b>Tetra Metil Silano</b>                              |
| <b>UV</b>                 | <b>Espectrofotometría de Absorción al Ultravioleta</b> |
| <b>UFC</b>                | <b>Unidades Formadoras de Colonias</b>                 |
| <b>USP</b>                | <b>United States Pharmacopeia</b>                      |
| <b>V</b>                  | <b>Producto de Metilación</b>                          |

## 1. INTRODUCCION

Por milenios las plantas medicinales se han utilizado como una fuente de alivio de las múltiples enfermedades y malestares del hombre. En los primeros registros de las civilizaciones China, Indú, Sudamericana, Centroamericana y Mediterránea, se encuentra la descripción de los efectos terapéuticos de varias plantas y mezclas de éstas, cuyos granos, raíces y cortezas<sup>1</sup> se ingerían o se empleaban en forma de infusiones, ungüentos y emplastos<sup>2</sup>. De esta manera nació la herbolaria, rama de la medicina encargada del estudio de las plantas con valor medicinal y que en nuestro país posee una enorme tradición como se observa en el *Libellus de Medicinalibus Indionum Herbis*<sup>3</sup> (Códice Badiano), el cual es un compendio de remedios tradicionales indígenas.

Al principio el empleo de preparaciones herbales presentó serios problemas, entre los que se encontraban: escasa uniformidad, la dosificación no se conocía con exactitud, existía la posibilidad de adulteración y la presencia de sustancias con actividades biológicas desconocidas, en muchos casos, fueron responsables de efectos poco deseables<sup>4</sup>. Luego de varios siglos de uso empírico, se llevó a cabo el aislamiento y purificación de los primeros principios activos (alcaloides<sup>1,4</sup>), marcándose una nueva era en el empleo de las plantas medicinales ya que, poco después, se inició la síntesis química de los primeros derivados de los productos naturales y con ello, éstos llegaron a ser el esqueleto base para la producción de fármacos<sup>1</sup>.

La mayoría de los principios activos utilizados hoy en día en la industria farmacéutica se han encontrado de manera empírica en productos

naturales (provenientes de especies que han tenido una gran y a veces bien documentada historia como plantas medicinales<sup>4</sup>) o por síntesis química, donde se evaluaron cientos de compuestos con la intención de encontrarles alguna actividad biológica que pudiese ser de interés terapéutico<sup>5,7</sup>.

Por otro lado, es conveniente resaltar que en los países industrializados, el interés por la investigación de las plantas medicinales ha tenido sus altibajos durante las últimas décadas<sup>6,7</sup>, en contraste con los países del tercer mundo donde continúan siendo fundamentales en los tratamientos médicos<sup>7</sup>. Aproximadamente el 25 % de los medicamentos prescritos en la actualidad son sustancias derivadas de las plantas<sup>6</sup>, por lo que varias compañías farmacéuticas han mostrado un renovado interés en las mismas como una fuente de nuevas estructuras para el desarrollo de fármacos. De las 250 000 a 500 000 especies de plantas existentes en el mundo, únicamente un pequeño porcentaje se ha investigado fitoquímicamente y la fracción investigada con fines biológicos o farmacológicos es aun menor<sup>6</sup>. Sin embargo, cuando a un producto natural se le determina su actividad biológica, comunmente se le modifica químicamente y se ensaya posteriormente con el objeto de obtener un compuesto más activo que produzca las acciones esperadas<sup>8</sup>, con una disminución de los efectos no desables. Uno de cada 10 000 compuestos estudiados se ha logrado convertir en un nuevo fármaco, después de un período de investigación de aproximadamente 10 años<sup>5,9</sup>.

Dentro de la herbolaria tradicional mexicana la familia *Labiatae* se utiliza extensamente<sup>10,3</sup>. A esta familia pertenece el género *Salvia*, muy abundante en México, caracterizado por ser una fuente de productos naturales con actividades importantes dentro de la medicina tradicional en el tratamiento de enfermedades estomacales<sup>11,12</sup> circulatorias<sup>13</sup> y cardíacas<sup>12-17,26</sup>,

y por presentar propiedades antitumorales<sup>11,16,26,28,30</sup>, sedantes<sup>16,18-20</sup>, antibacterianas<sup>11,14,21-23,29,32</sup>, antipiréticas<sup>12</sup>, diuréticas<sup>15,24</sup>, antivirales<sup>25</sup>, antituberculosas<sup>26</sup> y antihepatotóxicas<sup>27</sup>; además, al aceite esencial de algunas especies de *Salvia* se le ha atribuido efectos tóxicos como son crisis epiléptiformes y tetaniformes, efectos abortivos en roedores y trastornos psíquicos y sensoriales en humanos<sup>31,32</sup>.

En 1993 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM<sup>33</sup> se aisló a partir del extracto *n*-hexánico de la raíz de *Salvia reptans* Jacq, la Horminona (I) (una quinona diterpénica con esqueleto de abietano) la cual en ese estudio presentó actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En la literatura química se mencionan estudios anteriores de dicho producto natural en donde presenta actividad citotóxica sobre células cancerígenas<sup>28</sup>, así como de ser un inhibidor del crecimiento de *Trypanosoma cruzi*<sup>34</sup>.

Es por eso que, para probar si I, o algunos de sus derivados presentan una actividad biológica latente que se pudiera explotar en un futuro como un fármaco, se llevó a cabo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán/UNAM el presente trabajo de Tesis, en el cual se reportan los resultados de un estudio de Relación Estructura Química-Actividad microbiológica de varios derivados químicos de I obtenidos por Deshidratación II, Acetilación III, Benzoilación IV, Metilación V (ver Figura 2 de la sección de resultados), los que se probaron en bacterias Gram negativas y Gram positivas de la colección ATCC<sup>35</sup>, sugeridas como cepas de prueba para antibióticos y en especial de Tetraciclinas, (ver Tabla 3 de la sección de resultados). También se presenta un resumen de la actividad

antimicrobiana de cada derivado (Tablas 4 y 5 sección de resultados) y se compara la actividad de cada uno de ellos contra I y la Oxitetraciclina (OT) (Tetraciclina comercial de amplio espectro).

La validación de las pruebas se realizó utilizando normas aceptadas por la U.S.P<sup>36</sup> entre otras<sup>37-39</sup>.

## 2. GENERALIDADES

Al reino vegetal se le considera una fuente inagotable de **metabolitos secundarios** (alcaloides, terpenoides, esteroides y flavonoides, entre otros) también conocidos como **productos naturales**<sup>40</sup>. Estos son de estructura relativamente compleja y tienen una distribución más restringida que los compuestos que les dan origen llamados **metabolitos primarios**<sup>2,3,40,41</sup>. Una característica general de los productos naturales es que parecen no tener un papel biológico activo conocido dentro de la planta<sup>2,3,41,42</sup>, porque generalmente se piensa que son materiales de desecho de la misma y algunos de ellos tienen un objetivo terapéutico o propiedades tóxicas para otras plantas, los animales o para el hombre mismo<sup>43</sup>.

Generalmente son largos y tediosos los procesos que conducen a obtener un compuesto puro y farmacológicamente activo a partir de las plantas. Requiere de la colaboración multidisciplinaria de botánicos, químicos, farmacólogos y toxicólogos ya que involucra una sofisticada serie de etapas que comprenden: a) la colección, identificación botánica y el secado del material vegetal; b) la obtención de extractos apropiados y su análisis cromatográfico preliminar por Cromatografía en Capa Fina o Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, así como c) su ensayo biológico y farmacológico a modo de observar su actividad biológica para posteriormente llevar a cabo su separación; d) la verificación de la pureza y el esclarecimiento de sus estructuras por métodos químicos y fisicoquímicos para sintetizarlos parcial o totalmente y poder preparar derivados y/o análogos con los cuales investigar la relación estructura-actividad biológica a

fin de aislarlos a gran escala y hacerles pruebas farmacológicas y toxicológicas posteriores<sup>4</sup>.

## 2.1 ANTECEDENTES DE LA HORMINONA

En general, las plantas que se utilizan en la medicina tradicional son las que más se estudian a nivel mundial con el objeto de encontrar compuestos farmacológicamente activos<sup>4</sup>, pues dentro de ellas existen una gran diversidad de metabolitos secundarios y por lo tanto una alta probabilidad de encontrar derivados en cada una de ellas. Así por ejemplo, el género *Salvia*, actualmente se investiga extensamente, ya que dentro de él existen especies que se emplean en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades<sup>2,3,10,12-15</sup>. De éstas especies se han aislado compuestos abietánicos<sup>11</sup> (productos naturales de la serie de diterpenoides cuyo esqueleto es parecido al del ácido abietico<sup>44,45</sup> (Figura 1)) que presentan actividades biológicas diferentes destacando las bactericidas<sup>22,23,28,29,33,34</sup> y antitumorales<sup>28,30</sup>, entre otras<sup>15,16,27,46</sup>, como se pueden apreciar en la Tabla 1.

Dentro de este tipo de compuestos se encuentra I, la cual es una quinona diterpénica con esqueleto de abietano y de la que Goijman y cols.<sup>34</sup> reportaron su actividad biológica como un total inhibidor del crecimiento in vitro de *Trypanosoma cruzi*, siendo 10 veces más activa que la tingenona (triterpeno) con el que se comparó.

Posteriormente, Jonathan y cols.<sup>28</sup> informaron del aislamiento de I y de la 7-O-metilhorminona a partir de *Lepechinia bullata*, espécimen vegetal perteneciente un género diferente al *Salvia* dentro de la familia *labiatae*. En

esa ocasión, probaron su actividad biológica dentro del campo anticancerígeno y observaron que presentaban una marcada acción citotóxica sobre células de leucemia. Además, estos investigadores especularon que la actividad de estas moléculas se debía a los sustituyentes asociados con los anillos de Carbono de sus esqueletos y comentaron que la modulación de la actividad se podía lograr por modificaciones en la posición 7, siendo de interés general para posteriores estudios de relación estructura-actividad biológica como el que se llevó a cabo en este trabajo de Tesis.

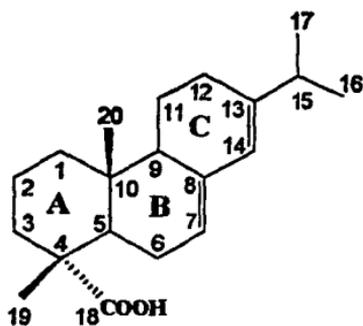


Figura 1. Esqueleto del Acido abiético

**Tabla 1** Actividad biológica de algunos diterpenos abietánicos de tipo quinoidal.

| COMPUESTO   | AISLADO DE   | ACTIVIDAD BIOLÓGICA   |
|---|--|---|
| Horminona   | <i>Lepechinia bullata</i> <sup>28,34</sup>                                       | Citotóxico en células cancerígenas. Inhibe al <i>Trypanosoma cruzi</i> (in vitro).                    |
| 7-O-Metilhorminona  | <i>Lepechinia bullata</i> <sup>28,34</sup>                                       | Citotóxico en células cancerígenas.   |
| Sugiol y el 15-hidroxi-17-oxoabieta-8,11,13-trieno              | <i>Salvia albocaerulea</i> <sup>22</sup>   | Antibiótico sobre <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> . Moderada actividad sobre <i>C. albicans</i> |
| Conacytona, Ictoxona, Romulogarzona                             | <i>Salvia balloteaefora</i> <sup>43</sup>  | Tratamiento de problemas estomacales.   |
| Rosmaquinona, Acido 11-acetoxo-carbosico.                       | <i>Salvia canariensis</i> <sup>23</sup>  | Inhibidor del crecimiento de <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i>                                    |
| Horminona   | <i>Salvia candidissima</i> <sup>16</sup>   | Sobre el receptor de unión radioligante en cerebro de rata  |
| Hypargenina A y B   | <i>Salvia hypargeia</i> <sup>29</sup>  | Antibiótico sobre <i>S. aureus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                     |
| Hypargenina C y D   | <i>Salvia hypargeia</i> <sup>29</sup>  | Antibiótico sobre <i>B. subtilis</i>  |
| Hypargenina F   | <i>Salvia hypargeia</i> <sup>29</sup>  | Antibiótico sobre <i>S. epidermidis</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> y <i>Micobacterium Tuberculosis</i> . |
| Ferruginol, Pisiferal   | <i>Salvia microstegia</i> <sup>15</sup>  | Diurético y Antiséptico   |
| Ferruginol, Pisiferal   | <i>Salvia miltiorrhiza</i> <sup>47,48</sup>                                      | En afecciones cardíacas, hemáticas y Hepatitis.   |
| 11,12-dihidroxi-20-nor-5(10),8,11,13-abietatrien-1-ona.         | <i>Salvia officinalis</i> <sup>27</sup>  | Inactiva a los Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) y al del Herpes Simple tipo 1 (HSV)            |
| 12-Hidroxi-7,20-dioxo-6,7-scco-abieta-8,11,13-trieno-6,11-ólido | <i>Salvia officinalis</i> <sup>27</sup>  | Disminuye el crecimiento del VSV  |
| Horminona   | <i>Salvia reptans</i> <sup>33</sup>  | Antibiótico sobre <i>S. aureus</i> (in vitro)   |
| Taxodiona y Taxodona  | <i>Taxodium distichum</i> <sup>30</sup> y <i>Salvia Phlomoides</i> <sup>49</sup> | Citotóxico sobre carnosarcoma 256 en ratas y humano de nasopharynx.                                   |

Como ya se mencionó, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, se aisló por primera vez I a partir de la raíz de *Salvia reptans* Jacq<sup>33</sup> y se probó su actividad biológica sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomona eruginosa* TAC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 10536. Presentando actividad bactericida únicamente sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## 2.2 ESTUDIOS DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (REA).

### 2.2.1 HISTORIA

En el año de 1868 Crum-Brown y Faser, sospecharon que el curare al comportarse como una sal cuaternaria de amonio, era responsable de sus propiedades paralizantes de los músculos, por lo que, examinaron los efectos bloqueadores neuromusculares de una gran variedad de sales cuaternarias de amonio simples y de alcaloides en animales concluyendo que la acción fisiológica de una molécula estaba en función de su constitución química. Poco después, Richardson notó que la actividad hipnótica de los alcoholes alifáticos era función de su peso molecular, constituyendo estas observaciones las bases de los posteriores estudios REA<sup>1</sup>.

### 2.2.2. FUNDAMENTO DE LOS ESTUDIOS REA.

Los estudios REA consisten simplemente en la concepción y/o síntesis a partir del compuesto base de tantos derivados/análogos como sean posibles junto con su ensayo o bioensayo posterior con la finalidad de determinar el efecto de la estructura química sobre la actividad y potencia.

Una vez que se han preparado una cantidad suficiente de los mismos, y que se han acumulado todos los resultados, las conclusiones se obtienen observando las relaciones de estructura-actividad<sup>1</sup> para generar modelos que predigan y establezcan dicha relación<sup>50</sup>.

### 2.2.3. POSIBILIDADES DE LOS ESTUDIOS REA.

Indudablemente, el principal objetivo que se pretende alcanzar al variar estructuralmente los productos de origen natural o de síntesis, es el desarrollar mejores fármacos. Al encontrarse el compuesto base desprovisto de porciones estructurales innecesarias, la nueva molécula suele poseer una mayor especificidad de acción, lo que permite conocer su mecanismo de acción más fácilmente, para buscar que las propiedades indeseables disminuyan o desaparezcan<sup>1</sup> y una vez hecho esto, sirva de inspiración a nuevas variaciones estructurales, obteniendo un compuesto más alcanzable desde el punto de vista práctico<sup>4</sup>. Son varias las posibilidades que se pueden lograr al llevar a cabo un estudio de este tipo comprendiéndose las siguientes:

1. Mantener o mejorar de la actividad del prototipo<sup>4</sup>. Supone que las propiedades químicas y físicas esenciales para la acción no se modifiquen. De aquí, que el estudio de compuestos con actividad similar y estructuralmente diferentes permita el establecimiento de relaciones y facilite el conocimiento del modo de acción. En cualquier caso, al desarrollar fármacos paralelos, se pretende descubrir el compuesto más activo, selectivo y menos tóxico.

2. Cambiar el espectro de acción del prototipo<sup>51</sup>. Dado a que cada tipo de acción biológica se debe a un conjunto específico de requisitos estructurales indispensables, los cambios en el espectro de acción del prototipo implican la eliminación o disminución de determinadas características o la exaltación de otras. Presentando diferentes posibilidades como son:

- a. Paso de una acción agonista a otra antagonista.
- b. Eliminación o exaltación de efectos secundarios.
- c. Separación de acciones en prototipos multicomponentes.
- d. Combinación, en una estructura, de las acciones de varios prototipos.

3. Modular la conducta farmacocinética del prototipo<sup>4</sup>. Este punto es importante ya que, con frecuencia se pueden conocer las estructuras, fragmentos o grupos funcionales cuyo cambio puede modificar la distribución en el organismo. Esto sólo se puede alcanzar si se varían las características estructurales que condicionan a un aspecto determinado, sin que dicho cambio influya sobre otros y, sin que por ello se modifiquen las características químicas responsables de la acción.

4. Sintetizar un compuesto similar al prototipo con ahorro de tiempo y dinero<sup>6,45,51,53,54</sup>. Es otra de las posibilidades que presenta este método, ya que por medio de síntesis química se puede obtener un derivado y/o análogo que presente la actividad biológica deseada, lo que ahorrará tiempo y dinero debido a que se podrá hacer uso de los mismos métodos de bioensayo que para el prototipo original.

## 2.2.4 RECURSOS EMPLEADOS PARA LOS ESTUDIOS REA.

Aunque sólo a una pequeña parte de la molécula se le puede asociar la actividad, existen una multitud de modificaciones que se pueden llevar a cabo<sup>1</sup>. Es muy difícil hacer el inventario de todos los recursos que se pueden utilizar para tal fin ya que muchas veces están basados en la intuición o instinto del químico, sin una base racional aparente o en el desarrollo de observaciones aisladas o casuales. Sin embargo, se cuenta con los siguientes procedimientos de manipulación molecular entre muchos otros:

1. Sustitución bioisómera<sup>4</sup>. Consiste en reemplazar ciertos grupos del prototipo por sustituyentes con igual influencia sobre la solubilidad en lípidos de la molécula que los soporta, así como similares propiedades estéricas y/o la misma distribución de cargas.

2. Series de compuestos homólogos<sup>31</sup>. Estas series se obtienen por cambios graduales en la estructura molecular, pudiendo ocurrir en las propiedades fisicoquímicas del prototipo, las cuales se pueden correlacionar con cambios graduales en la actividad biológica.

3. Aprovechamiento del principio de vinilología<sup>4</sup>. Consiste en la reducción de los dobles enlaces de los compuestos que los presenten conduciendo a productos con mayor o menor actividad.

4. Formación y fusión de anillos o cambio de estructuras cíclicas por otras abiertas manteniendo la geometría del conjunto<sup>4</sup>. Supone la formación de anillos a partir de estructuras lineales o mediante la fusión de anillos ya existentes.

5. Formación de compuestos siameses<sup>31</sup>. Implica la combinación estructural de dos fármacos -o la duplicación de uno- reuniéndolos en una misma molécula mediante un enlace covalente.

6. Variaciones en las constantes fisicoquímicas de los sustituyentes<sup>31</sup>. Implica la predicción por extrapolación o interpolación, tomando como guía la contribución de cada sustituyente al conjunto de las características fisicoquímicas necesarias para una actividad máxima. También se le llama estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR).

7. Formación de sales<sup>4</sup>. Ofrece grandes posibilidades en el sentido de modificar el transporte, la distribución y/o excreción del fármaco salinificado.

### 2.2.5 LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS REA<sup>52</sup>.

La más abrumadora de las limitaciones de estos métodos es que el número de análogos y/o derivados necesarios para llevarlos a cabo es mucho mayor a los que pueden sintetizarse ya que siempre habrá más compuestos por sintetizar. Además, los investigadores pueden definir a la estructura de diferente modo y así sintetizar diferentes análogos y/o derivados.

Otra limitación consiste en que una vez que se ha obtenido la información, no es fácil resumirla, aunque esto en la actualidad se ha visto disminuido, ya que cada compuesto provee información independiente.

Una tercera limitación se debe a que los mismos no explican la diferencias en la potencia entre los diferentes compuestos en términos de nivel

atómico. Las predicciones sólidas de un compuesto sin probarlo sólo se pueden hacer realidad cuando se le tiene bien comprendido.

## 2.2.6 CLASIFICACION GENERAL DE LOS ESTUDIOS REA<sup>54</sup>

Una revisión de la literatura publicada durante los pasados quince años revela que los métodos de REA se han dividido en dos grandes categorías. La primera comprende los métodos teóricos en los que se examinan y cuantifican la estructura real o las características estructurales que conducirían a una verdadera relación estructura-actividad al acoplarse con la evidencia biológica. Un método de esta clase se basa en la descripción fundamental de la materia por medio de mecánica cuántica. Otros métodos de REA que constituyen intentos de cuantificación estructural, comprenden un método topológico conocido por conectividad molecular y varios métodos de cuantificación de fragmentos moleculares.

Una segunda categoría de métodos de REA se basa en los intentos de hallar paralelismo entre la actividad biológica y las propiedades fisicoquímicas de las series de moléculas en estudio. Aunque esto puede no corresponder a un método cuantitativo REA, este tipo de método puede llevar a explicaciones (en términos de un modelo físico) de la acción del fármaco y permitir predicciones en su síntesis.

## 2.2.7 ESTUDIOS REA Y EL FUTURO<sup>54</sup>.

Por la disponibilidad de los sistemas computacionales para el almacenamiento, análisis rápido de los datos y comparación de los mismos,

actualmente ha extendido el empleo de los métodos REA como una herramienta indispensable en el diseño de fármacos. Estos métodos ayudan enormemente a los investigadores a desarrollar su sensibilidad en lo referente a la predicción de relaciones que se puedan presentar durante el estudio de un compuesto en particular. Se puede anticipar un empleo todavía mayor de los métodos teóricos en las décadas venideras con la finalidad de que los investigadores dirijan sus recursos en el diseño de nuevos, más seguros y eficaces fármacos.

## 2.3 BIOENSAYOS

Una de las necesidades primordiales para llevar a cabo un estudio de Relación Estructura-Actividad biológica, es la de contar con los medios para ensayar a los compuestos en estudio, sabiendo cuando el compuesto presenta actividad o no. Un bioensayo<sup>1</sup> es el medio por el cual un sistema biológico se define con respecto a un compuesto control, si este último ha tenido la actividad deseada y si resulta así, se determina cual es la potencia relativa del mismo. Algunos bioensayos comienzan como pruebas *in vitro* por ejemplo, la inhibición de una enzima, y otros como pruebas *in vivo*, ej. la habilidad del compuesto para prevenir en el ratón la parálisis inducida, siendo los bioensayos *in vitro* más rápidos y menos costosos.

2.3.1 Bioensayo aleatorio.- No involucra un análisis previo, todos los compuestos se prueban sin considerar a sus estructuras. Antes de 1935 (descubrimiento de las sulfas), éste era el único camino que existía para probar la actividad biológica de los

compuestos; ahora se emplea en menor grado; sin embargo, aun es muy importante por tener como finalidad el descubrir fármacos o compuestos base con estructuras inesperadas o inusuales<sup>1</sup>, sucediendo esto con mayor probabilidad cuando se estudian especies o géneros de plantas de familias raras<sup>7</sup>.

Las clases de materiales que más se someten a un bioensayo comprenden a los productos naturales (microbianos, plantas y marinos). Un ejemplo de un bioensayo aleatorio es el que se llevó a cabo durante los años 40's y 50's por varias empresas farmacéuticas con muestras de suelos para investigar nuevos antibióticos. En esta vez, no sólo se descubrieron una gran cantidad de compuestos base, sino que también se encontraron dos nuevos antibióticos: la Estreptomicina y la Tetraciclina<sup>1</sup>.

**2.3.2 Bioensayo no aleatorio.** Es una aproximación ligeramente más estrecha que un bioensayo al azar. En este caso se pueden probar selectivamente compuestos que tienen un vago parecido a cierta actividad descubierta por medio de un bioensayo aleatorio o que contienen diferentes grupos funcionales a los de compuestos base<sup>1</sup>.

**2.3.3 Consideraciones generales para los bioensayos<sup>6</sup>.** Deben de ser simples, rápidos, reproducibles y baratos. Considerando que en el extracto crudo los principios activos generalmente están presentes a bajas concentraciones, el sistema de prueba debe ser por lo tanto, sensible para poder detectarlos confiablemente. Existe un rango de posibles blancos para bioensayos incluyendo los ensayos de

extractos crudos sobre animales completos (Tabla 2). Actualmente se considera como regla en programas de barrido los bioensayos sobre sistemas subcelulares o cultivos celulares, ya que combinan reproducibilidad, manejo rápido de la muestra con una alta sensibilidad y selectividad. Aunque no lo hacen respecto a las interacciones que comúnmente ocurren en los constituyentes de las plantas como con los taninos que conducen a un gran número de resultados falsos positivos. En tales casos, se deben de remover los compuestos que interfieren y posteriormente hacer una repetición del bioensayo.

**Tabla 2. Blancos para Bioensayos.**

| <b>BLANCOS PARA BIOENSAYOS</b>   |
|--|
| Organismos inferiores (microorganismos, insectos, crustáceos y moluscos) |
| Sistemas subcelulares aislados (enzimas, receptores)                     |
| Cultivos celulares de origen animal o humano.                            |
| Organos aislados de vertebrados.   |
| Animales completos.  |

#### **2.4 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PARA MEDIR SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS.**

El uso *in vitro* de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos son un intento para predecir como será la respuesta *in vivo* de un microorganismo infeccioso ante un agente antimicrobiano seleccionado<sup>55</sup> proporcionando una ayuda indispensable en la selección del quimioterapéutico correcto, al brindar

una estimación eficiente del mismo y la concentración en la que se debe dosificar para inhibir al agente infeccioso<sup>36</sup>. Se cuentan con diversas pruebas microbiológicas para medir sensibilidad entre la cuales se mencionarán las siguientes:

2.4.1 Prueba de difusión en agar.

2.4.2 Prueba de dilución en caldo.

2.4.3 Impedancia.

2.4.4 Conductancia.

2.4.1 **Pruebas de difusión en Agar.** También conocida como de difusión en disco, antibiograma o “Kirby-Bauer”<sup>37</sup> es la más utilizada en los laboratorios de microbiología clínica. El método es técnicamente simple, barato, y si se desarrolla correctamente, es razonablemente confiable<sup>38</sup>.

Esta técnica es el resultado de la interacción del antibiótico que se encuentra depositado en un reservorio, generalmente un disco de papel filtro, del microorganismo que será inhibido o no por el antibiótico y del medio sólido (agar) que servirá de apoyo al crecimiento de la bacteria y a la difusión del antibiótico.

Al depositarse el disco impregnado con el antibiótico sobre el agar inoculado con el microorganismo, se establece una competencia entre el primero, que difunde a través del medio y el microorganismo que comienza a crecer. Si el microorganismo es susceptible al antibiótico de prueba, el resultado es una zona de inhibición del desarrollo del microorganismo de borde delineado que se extenderá hasta un límite donde la concentración alcanzada por el antibiótico en ese punto (“concentración crítica”) no sea la suficiente para inhibir el crecimiento exponencial del organismo que en la

periferia ha alcanzado la "masa crítica" necesaria para superar la concentración inhibitoria del antibiótico. Este fenómeno sucede dentro de un "tiempo crítico", por lo que el diámetro de la zona de inhibición indicará el grado de susceptibilidad del organismo al antibiótico cuando éste queda como única variable del sistema. A mayor zona de inhibición, mayor será la susceptibilidad del organismo y, en consecuencia, la concentración necesaria del antibiótico para inhibir su crecimiento será menor<sup>57,58</sup>.

#### 2.4.1.1 Factores que afectan las pruebas de difusión.

a. Elección del medio de cultivo<sup>55</sup>. Debe promover el crecimiento de los microorganismos probados sin llevar a cabo una reacción antagonica de la actividad o de la difusión de los agentes. Se toma como medio de cultivo estándar al agar Müller-Hinton debido a que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos<sup>59</sup>.

b. Espesor del medio<sup>35,55</sup>. Es importante que este espesor sea uniforme de 3-4 mm porque si es más fino, los antibióticos tenderán a difundir más en dirección lateral y por lo tanto las zonas de inhibición se incrementarán a medida que el espesor del agar disminuye observándose este efecto más marcado en placas de agar muy delgadas.

c. Densidad del inóculo. La USP<sup>36</sup> establece que el inóculo debe ser ajustado a un valor de 25% de transmitancia (a una longitud de onda de 580 nm), o a una turbidez de 0.5 del estándar de Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC)<sup>35</sup>. Incrementando la densidad del inóculo se

reducen los tamaños de la zona de inhibición. Este factor es una de las principales fuentes de error en las pruebas de susceptibilidad<sup>55</sup>.

d. Pre-incubación y predifusión. Una vez inoculado el microorganismo sobre el agar, se debe dejar un lapso entre 3 y 15 min. para colocar los discos antimicrobiales<sup>55</sup>. Una preincubación de las cajas antes de que se coloquen los discos hacen que el tamaño de las zonas de inhibición disminuyan; la predifusión del agente antimicrobiano antes de la incubación tiene el efecto opuesto<sup>55</sup>.

e. Discos antimicrobiales<sup>35,59</sup>. En el método de Kirby-Bauer se utilizan los llamados discos de "alto poder" los cuales son discos comerciales de papel filtro donde la concentración de antibiótico debe ser lo suficientemente grande como para producir una difusión homogénea y fácilmente reproducible. Estos se deben colocar usando pinzas estériles presionándolos ligeramente sobre el agar a fin de asegurar el contacto con el agar. No se deben recolocar discos una vez que han hecho contacto con el agar pues la difusión del antibiótico comienza instantáneamente.

f. Incubación. Las placas invertidas se deben incubar después de 15 min. de haberse colocado los discos<sup>35</sup> a una temperatura de 35-37 °C en aire a menos que otra atmósfera sea esencial<sup>56</sup>. La USP recomienda que el tiempo de incubación de las placas sea de 16 a 24 horas<sup>36</sup> aunque el método estándar recomendado requiere que todas las determinaciones finales se lleven a cabo exactamente a las 18 horas<sup>59</sup>.

g. Medición de diámetros. Los diámetros de estas zonas se deben medir cuidadosamente por la parte posterior de la placa, ante

una fuente de luz brillante transmitida a un ángulo de 45°, se debe quitar la tapa de la caja de petri<sup>35</sup> y emplear calibres móviles y graduados, reglas graduadas en milímetros o plantillas especialmente preparadas<sup>60</sup> para poder lograr la reproducibilidad de la lecturas<sup>55</sup>.

2.4.1.2 Las fallas más comunes que se cometen con esta técnica son las siguientes:

1. Utilizar un medio diferente al de Müller-Hinton, mal preparado, o sin controlar su pH.
2. No ajustar el inóculo.
3. Utilizar un tubo de Mc Farland inexacto como referencia de turbiedad.
4. Tiempo excesivo entre la preparación del inóculo y su sembrado.
5. Tiempo prolongado entre el sembrado del medio y la aplicación de los discos.
6. Retardo de la incubación después de la inoculación
7. Emplear inóculos mixtos.

La USP<sup>36</sup> recomienda llevar a cabo la valoración de antibióticos mediante el método de **penicilindros**, el cual es una variación al descrito anteriormente pues en lugar de emplear los discos antimicrobiales de papel filtro, utiliza cilindros de acero inoxidable con longitud de 10 mm  $\pm$  0.1 mm, y diámetros exterior de 8 mm e interior de 6mm, que una vez colocados sobre el agar inoculado, se llenan cuidadosamente con la disolución del antibiótico a probar, el cual debe ser forzosamente soluble en agua.

**2.4.2 Pruebas de dilución<sup>56</sup>.** Consiste en preparar un medio de cultivo líquido, donde se adiciona al microorganismo y al antimicrobiano a diversas diluciones. Se incuba por lo menos de 18 hr, al término de lo cual se mide la turbidez que presentan los tubos problema en comparación con los patrones preparados y un blanco para calibrar el espectrofotómetro. Este método da densidades ópticas que indican claramente si hay o no resistencia al antibiótico en la medida en la que hay inhibición del microorganismo.

**2.4.3 Impedancia.** Mediante esta técnica se puede realizar un seguimiento continuo automatizado de los efectos que tiene el antibiótico sobre el crecimiento del microorganismo. Este último se puede medir indirectamente por medio de un conteo bacteriano apoyándose en los cambios de impedancia eléctrica (medida de la resistencia al flujo de la corriente eléctrica) que se presentan en el medio de crecimiento<sup>60-61</sup>. Estos se presentan de forma paralela al crecimiento de la bacteria, tomando en cuenta que se coloca una concentración bacteriana de  $10^6$  UFC, empleándose para medios de cultivo líquidos mediante el método de dilución en caldo.

**2.4.4 Conductancia<sup>62</sup>.** Esta técnica proporciona una reducción importante en el tiempo de incubación para establecer la sensibilidad al antibiótico. Se creó para determinar el MIC y la MCB y consiste en comparar los patrones de conductibilidad eléctrica de un cultivo en el que no se ha colocado a la bacteria en contacto con el antibiótico con otro al que contiene el microorganismo y que se le adiciona el quimioterapéutico. Las dos curvas obtenidas se analizan para establecer la susceptibilidad del microorganismo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GENERAL:

Tomando como esqueleto base a la molécula de la Horminona, producto natural extraído de la raíz de la *Salvia reptans* Jacq. que presentó actividad bactericida sobre *S. aureus* (*vide supra*), se propone la obtención de diferentes derivados de la misma, sin la alteración del esqueleto original, para posteriormente probar su actividad antimicrobiana.

#### 3.2 PARTICULARES:

1.- Preparación de diferentes derivados químicos, a partir de **I** como son los productos de: a) Deshidratación (**II**), b) Acetilación (**III**), c) Benzoilación (**IV**), d) Metilación (**V**).

2.- Identificar a los derivados químicos por medio de sus propiedades físicas (Color, olor, apariencia, pf, solubilidad) y datos espectroscópicos (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, EMIE, IR)

3.- Probar la actividad antimicrobiana de los derivados químicos obtenidos sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas de la colección de cepas ATCC sugeridas para probar antibióticos y en especial Tetraciclinas, empleando para tal efecto la técnica de Kirby-Bauer o sensidiscos. Estableciendo el MIC para cada uno de los derivados y cepas que resulten sensibles a los mismos.

4. Comparar los resultados obtenidos de los derivados contra **I** y contra **OT**.

## 4. METODOLOGIA Y RESULTADOS

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en dos fases, en la primera o parte química se realizó la síntesis química y la caracterización física y espectroscópica de los derivados de I (Figura 2) y en la segunda o parte biológica se hizo el estudio antimicrobiano de los mismos; al respecto en la Figura 3 se describe el diagrama de flujo general del trabajo experimental.

### 4.1 PARTE QUIMICA.

Los puntos de fusión de los derivados de I se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. La pureza de los productos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina en cromatofolios Macherey-Nagel Düren, usando como revelador una disolución de  $\text{CeSO}_4$  al 1% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y/o lámpara UV a  $\lambda = 365 \text{ nm}$ .

Los productos finales se purificaron por medio de cromatoplasmas preparativas de gel de sílice Macherey-Nagel SIL G 200 UV<sub>254</sub>.

Los equipos empleados para los diversos estudios fueron: para Espectrofotometría de Absorción de Infrarrojo (IR) un equipo Nicolet FT-IR 55X; utilizando la técnica de película y de pastilla según el caso. Para la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ ) y Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) equipos Varian, Gemini 200 y VRX-300S, usando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente; los desplazamientos químicos están dados en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Para indicar los patrones de acoplamiento se

utilizan las siguientes abreviaturas: s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, q = señal cuádruple, sa = señal simple ancha, dd = señal doble de doble, smc = señal múltiple compleja, s/sp = señal sobrepuesta.

Para la Espectrometría de Masas (EM) se empleó un espectrómetro de masas HP 5985-B CG/MS mediante la técnica de impacto electrónico.

Figura 2. Esquema de los Productos de Transformación de I.

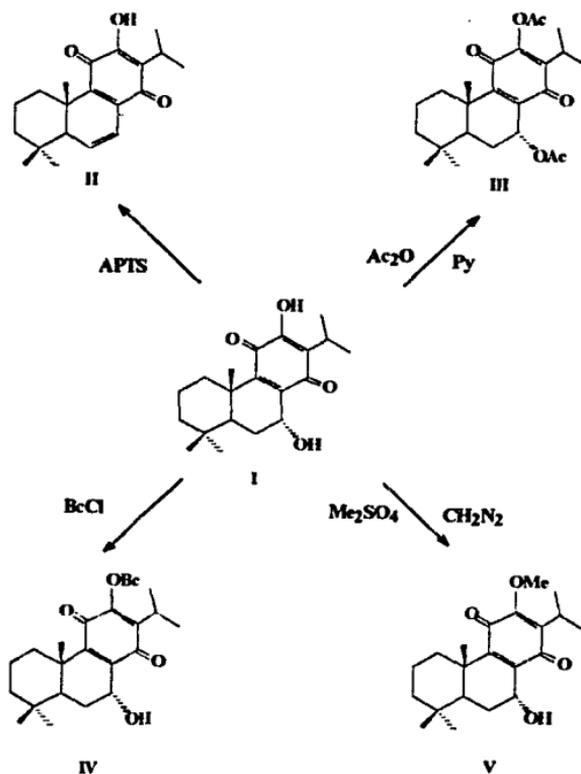
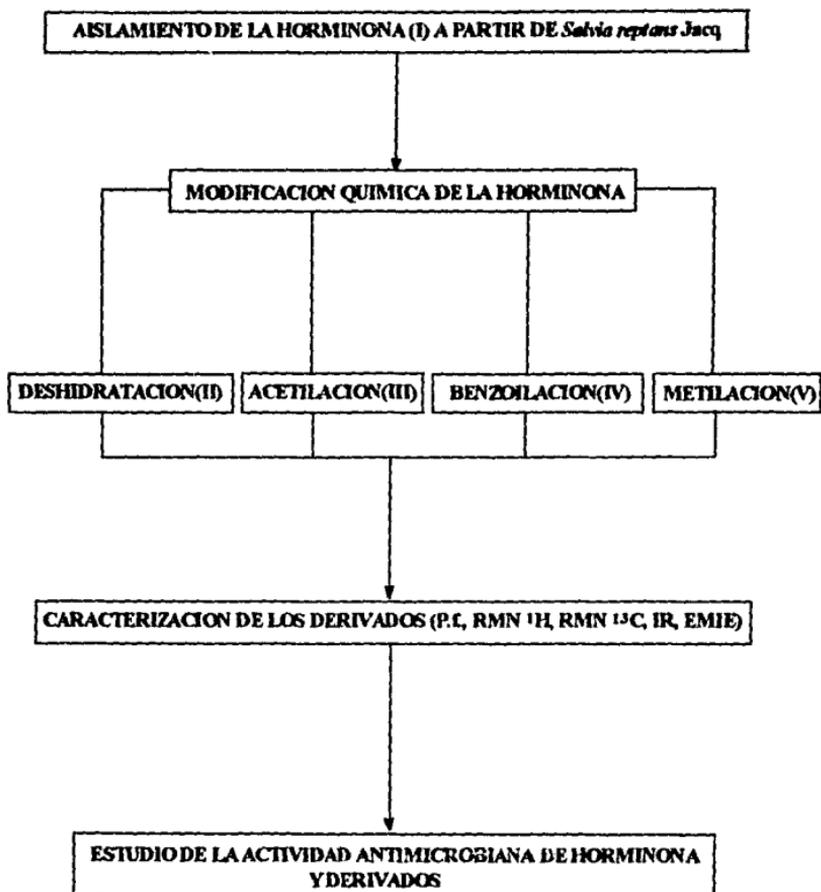


Figura 3. Diagrama de flujo sobre el trabajo experimental.



**DESHIDRATACION DE I (II).**- 300 mg de I se disolvieron en 5 mL de tolueno, acto seguido se le agregaron unos gránulos de ácido *p*-toluensulfónico y se sometió a refluxo durante 6 horas. El desarrollo de la reacción se siguió por CCF (SiO<sub>2</sub>; *n*-hexano/AcOEt 8:2); concluido el tiempo de reacción el residuo se disolvió en 30 mL de AcOEt y se realizaron lavados con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> al 1% (5mL x 3). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó el disolvente en el rotavapor. Posteriormente el producto se separó por medio de una columna cromatográfica (SiO<sub>2</sub> Kieselgel 60G; *n*-hexano/AcOEt 8:2). Finalmente las fracciones de interés se purificaron por medio de cromatoplasas o placas preparativas (SiO<sub>2</sub>, *n*-hexano/AcOEt 9.5:0.5) obteniéndose II. Cristales color anaranjado, p.f. 167-169 °C; IR(CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3359.21(OH), 3079.00(C-H sp<sub>2</sub>), 2926.79(C-H sp<sub>3</sub>), 2870.83(C-H), 1641.13(CO), 1633.13(CO), 1551.35(CC); RMN <sup>1</sup>H (300 Mhz, CDCl<sub>3</sub>/TMS)  $\delta$ ppm: 7.70 sa(1H, OH), 7.20-6.80 dddd(ABX, 2H, H-6 y H-7), 3.52 m(1H, H-15), 3.25 dddd(2H, H-1), 2.50 m(1H, H-5), 1.68 s(3H, H-20), 1.63 d(Me-16\*), 1.58 d(Me-17\*), 1.39 s(3H, Me-18), 1.35 s(3H, Me-19); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 186.00 s(C-14, C=O\*), 183.50 s(C-11, C=O\*), 151.17 s(C-12), 140.90 s(C-9), 139.67 d(C-7), 136.00 s(C-8), 122.59 s(C-13), 121.08 d(C-6), 52.08 d(C-5), 40.49 t(C-3), 39.22 s(C-10), 35.14 t(C-1), 33.24 s(C-4), 32.59 s(C-18), 24.06 d(C-15), 22.80 q(C-19), 20.00 q(C-16\*), 19.80 q(C-17\*), 18.65 t(C-2), 15.16 q(C-20); EMIE (70 ev) m/z (%Ab. rel.): 314(70) M<sup>+</sup>, 299(30) [M-15]<sup>+</sup>, 271(15) [M-43]<sup>+</sup>, 245(70) [271-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>], 232(100) [M-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>]<sup>+</sup>.

\* pueden intercambiarse.

**ACETILACION DE I (III).**- 300 mg de I se disolvieron en 10 mL de Ac<sub>2</sub>O y 5 mL de Py, esta disolución se sometió a baño de vapor por aproximadamente 1 hr 15 min. El desarrollo de la reacción se siguió por CCF (SiO<sub>2</sub>; *n*-hexano/AcOEt 8:2); concluido el tiempo de reacción el residuo se disolvió en 30 mL de AcOEt y se le realizaron lavados con disolución de CuSO<sub>4</sub> al 1 % (10 mL x 3), a continuación se lavó la fase orgánica con agua (20 mL x 3) y finalmente con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> al 5 % (10 mL x 3). El extracto orgánico se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh) y se le evaporó el disolvente a presión reducida obteniéndose un producto oleoso que se separó por medio de una columna cromatográfica técnica "flash" (SiO<sub>2</sub> Kieselgel 60 G; *n*-hexano/AcOEt 8:2). Por último el producto se purificó por medio de una cromatoplaça preparativa (SiO<sub>2</sub>; *n*-hexano/AcOEt 8:2). Agujas finas de color amarillo; pf 99-103 °C; IR(CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 2905(CH), 1765(MeCO), 1730(MeCO), 1650(CO), 1640(CO); RMN <sup>1</sup>H(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS)  $\delta$ ppm: 5.93 dd (1H, H-7), 3.09 m(1H, H-15), 2.59 dddd(2H, H-1), 2.35 s(3H, C(12)-OAc), 2.05 s(3H, C(7)-OAc), 1.26 s(3H, H-20), 1.16 d(Me-16\*), 1.15 d(Me-17\*), 0.87 s(6H, gem C(4), C(3)); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 198.00 s (C-14, C=O\*), 193.50 s(C-11 C=O\*), 169.52 s(C-21, MeCO\*), 168.22 s(C-23, MeCO\*), 153.03 s(C-12), 139.16 s(C-9), 137.90 s(C-8), 112.30 s(C-13), 64.37 d(C-7), 46.02 d(C-5), 40.06 t(C-3), 39.24 s(C-10), 35.64 t(C-1), 32.96 s(C-4), 32.90 q(c-18), 25.16 t(C-6), 24.70 d(C-15), 21.57 q(C-19), 21.01 q(C-16\*), 20.37 q(C-17\*), 20.22 q(C-20); EMIE (70 ev) m/z (%Ab. rel.): 374(12) M<sup>+</sup>, 332(65) [M-42]<sup>+</sup>, 314(100) [M-17-60]<sup>+</sup>, 299(60) [314-15]<sup>+</sup>, 271(20) [299-28]<sup>+</sup>, 43(80) C<sub>3</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup>.

---

\* pueden intercambiarse.

**BENZOILACION DE I (IV).**- 300 mg de I se disolvieron en 5 mL de BcCl y 3 gotas de Py. La mezcla se sometió a agitación durante 24 hr a temperatura ambiente. El desarrollo de la reacción se siguió por CCF (SiO<sub>2</sub>; *n*-hexano/AcOEt 8:2); concluido el tiempo de reacción el residuo se disolvió en 30 mL de AcOEt y se le realizó un lavado con 10 mL de solución de CuSO<sub>4</sub> al 1%, a continuación la fase orgánica se lavó con H<sub>2</sub>O (20 mL x 3) y con disolución de NaOH al 5 % (20 mL x 10). El extracto orgánico se seco (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh) y se le evaporó el disolvente a presión reducida obteniéndose un producto oleoso que se separó por medio de una columna cromatográfica técnica "flash" (SiO<sub>2</sub> Kieselgel 60 G; *n*-hexano/AcOEt 9:1). Por último el producto se purificó por medio de una cromatoplaca preparativa (SiO<sub>2</sub>; *n*-hexano/AcOEt 9:1, UV  $\lambda$ =365 nm). Cristales color amarillo, p.f: 188-191 °C; IR(CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3470.80(OH), 2926.25(CArH), 2856.48(CH), 1742.80(BCO), 1664.40(CO), 1603.30(CO); RMN <sup>1</sup>H (300 Mhz, CDCl<sub>3</sub>/TMS)  $\delta$ ppm: 8.12-7.58 m (5H, Ar), 4.79 dd(1H, H-7), 2.85 sa(1H, OH), 2.69 dddd(2H, H-1), 2.01 d(1H, H-6), 1.26 d(6H, Me-16-17), 1.24 s/sp(3H, Me-20), 0.98 s(3H, Me-18), 0.90 s(3H, Me-19); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 188.85 s(C-14, C=O\*), 180.55 s(C-11, C=O\*), 164.05 s(C-12,BC=O), 151.50 s(C-12), 149.93 s(C-9), 141.27 s(C-8), 139.00 s(C-13), 134.80-128.00 (C-Ar), 62.95 d(C-7), 45.77 d(C-5), 41.11 t(C-3), 39.54 s(C-10), 35.74 t(C-1), 33.17 s(C-4), 33.10 q(C-18), 26.05 t(C-6), 25.026 d(C-15), 21.71 q(C-19), 20.44 q(C-16\*), 20.28 q(C-17\*), 18.76 t(C-2), 18.59 q(C-

---

\* pueden intercambiarse.

20); EMIE (70 ev) m/z (%Ab. rel.): 436(5) M<sup>+</sup>, 418(12.5) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 403(5) [M-18-15]<sup>+</sup>, 331(12) [M-øCO]<sup>+</sup>, 105(100) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO<sup>+</sup>.

**METILACION DE I (V).**- Preparación de Diazometano: En un matraz se colocó una mezcla de 2.5 mL de éter etílico y 0.8 mL de KOH al 50%. Dicha mezcla se enfrió a 5 °C y se le adicionó con agitación 44.31 mg (0.43 mmoles) de nitrosometil urea. El matraz se unió a un condensador colocado para destilación. La parte baja del condensador llevaba un adaptador que se estaba sumergido en 10 mL de éter contenidos en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y que estaban enfriados en una mezcla de hielo-sal. Los gases formados pasaron a través de una segunda porción de 10 mL de éter enfriados por debajo de 0 °C. La reacción del matraz se colocó a baño de agua a 50 °C y se llevó al punto de ebullición del éter con agitación ocasional. El éter se destiló hasta que comenzó a disminuir el color, lo cual sucedió después de que dos o tres partes del éter se destilaron (bajo ninguna circunstancia se debe destilar todo el éter). La disolución de éter combinada en el matraz de recepción contuvo 12.68 mg (0.301 mmoles) de diazometano (63-70 % de la cantidad teórica), el cual se secó para su uso poniéndola sobre pellets de KOH puro durante tres horas.

Al matraz que contenía al diazometano (preparado *in situ*) se le agregaron 100 mg (0.301 mmoles) de I disueltos en éter etílico, la mezcla resultante se sometió a agitación durante 24 hr siguiendo el desarrollo de la reacción por medio de CCF (SiO<sub>2</sub>; *n*-hexano/AcOEt 9:1 y *n*-hexano/Me<sub>2</sub>CO 9:1). Transcurrido este tiempo, el residuo de la mezcla de reacción se disolvió en una mínima cantidad de Me<sub>2</sub>CO, se soportó en celita y se purificó el producto esperado por medio de una columna cromatográfica (SiO<sub>2</sub> Kieselgel

60 G; *n*-hexano/AcOEt 9.7:0.3). Agujas finas de color amarillo; pf: 130-132 °C; IR(CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3574.86(OH), 2962.75(CH), 2931.57(CH), 1640.52(CO), 1661.93(CO), 1139.97(COC); RMN <sup>1</sup>H (300 Mhz, CDCl<sub>3</sub>/TMS)  $\delta$ ppm: 4.73 dd(1H, H-7), 3.85 s(3H, OMe), 3.16 m(1H, H-15), 2.85 sa(1H, OH), 2.57 dddd(2H, H-1), 1.93 d(1H, H-6), 1.24 s/sp(3H, Me-20), 1.17 d(6H, Me-16-17), 0.95 s(3H, Me-18), 0.88 s(3H, Me-19); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 189.72 s(C-14, C=O\*), 184.23 s(C-11, C=O\*), 157.17 s(C-12), 150.78 s(C-9), 140.40 s(C-8), 135.69 s(C-13), 62.76 d(C-7), 60.72 q(C-12, Me), 45.89 d(C-5), 41.15 t(C-3), 39.27 s(C-10), 35.81 t(C-1), 33.19 s(C-4), 33.09 q(C-18), 25.97 t(C-6), 24.29 d(C-15), 21.70 q(C-19), 20.50 q(C-16\*), 20.30 q(C-17\*), 18.84 t(C-2), 18.61 q(C-20); EMIE (70 ev) m/z (%Ab. rel.): 346(48) M<sup>+</sup>, 328(100) [M-18]<sup>+</sup>, 313(58) [328-Me]<sup>+</sup>, 209(48) [313-104]<sup>+</sup>.

#### 4.2 PARTE BIOLÓGICA.

Consistió en determinar la susceptibilidad de las cepas bacterianas enumeradas en la **Tabla 3** a los derivados de **I** (**Esquema 1**) obteniendo los MIC's y empleando para tal efecto al agar de Müller-Hinton como medio de difusión de los sensibilizados impregnados con los derivados previamente disueltos en CHCl<sub>3</sub> (Baker, grado reactivo), colocando como blanco al disolvente.

---

\* pueden intercambiarse.

**Tabla 3. Cepas probadas con los derivados de I.**

| MICROORGANISMO                 | ATCC No. |
|--------------------------------|----------|
| GRAM (+)                       |          |
| <i>Bacillus cereus</i>         | 11778    |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 8014     |
| <i>Micrococcus luteus</i>      | 9341     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | 6538p    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | 25923    |
| <i>Streptococcus faecalis</i>  | 8043     |
| <i>Streptococcus faecalis</i>  | 10741    |
| GRAM (-)                       |          |
| <i>Escherichia coli</i>        | 10536    |
| <i>Escherichia coli</i>        | 25922    |
| <i>Proteus rettgeri</i>        | 9918     |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i>   | 9027     |

**Prueba preliminar:** Se llevó a cabo pesando 8.7 mg de cada derivado puro y disolviéndolo en 1mL de  $\text{CHCl}_3$  grado espectroscópico, para posteriormente impregnar los discos de papel filtro (Watman Cat. 1002 125) de 0.5 mm de diámetro con 10  $\mu\text{L}$  de estas disoluciones en condiciones asépticas. Una vez secos los discos, se colocaron en placa de agar Muller-Hinton (BIOXON) en donde se encontraban inoculadas por estría con hisopo las cepas a probar (Tabla 3). Se incubaron durante 24 hr a 37 °C y se leyó la inhibición en la periferia de los discos con ayuda de un vernier graduado en milímetros.

**Cálculo de los MIC's.** Realizadas las pruebas preliminares, las cepas que resultaron sensibles a los derivados se probaron a diferentes diluciones

decimales o decuples (8.7 mg/mL), siendo éstas: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 (colocando 10 µL de cada dilución por disco). Al encontrar la dilución decimal mínima capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias se hicieron diluciones dobles o intermedias para establecer con mayor margen de exactitud la concentración del derivado que puede impedir el desarrollo del microorganismo, impregnando los discos con 10 µL de cada dilución. Los resultados obtenidos del espectro antibacteriano de los derivados de I en términos de diámetro promedio de los halos de inhibición y de MIC se resumen en las Tablas 4 y 5.

**Tabla 4. Resumen del espectro antimicrobiano de los derivados de I.**

| <b>ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE DERIVADOS DE HORMINONA</b> |          |           |            |           |          |           |
|--|----------|-----------|------------|-----------|----------|-----------|
| <b>MIC (µg/mL)</b>                                       |          |           |            |           |          |           |
| <b>MICROORGANISMO DE PRUEBA</b>                          | <b>I</b> | <b>II</b> | <b>III</b> | <b>IV</b> | <b>V</b> | <b>OT</b> |
| <b>GRAM (+)</b>  |          |           |            |           |          |           |
| <i>Bacillus cereus</i> 11778                             | 0.870    | -         | 0.093      | 0.043     | -        | 0.093     |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014                      | -        | -         | 0.217      | 0.043     | -        | 0.187     |
| <i>Micrococcus luteus</i> 9341                           | 0.870    | -         | 0.093      | 0.087     | -        | 0.021     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 6538p                       | 0.435    | -         | 0.187      | 0.043     | 0.435    | 0.087     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 25923                       | 0.435    | -         | 0.187      | 0.043     | 0.435    | 0.087     |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 8043                       | 8.700    | -         | 0.217      | 0.435     | -        | -         |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 10741                      | 0.870    | -         | 0.217      | 0.043     | -        | -         |
| <b>GRAM (-)</b>  |          |           |            |           |          |           |
| <i>Escherichia coli</i> 10536                            | -        | -         | -          | -         | -        | 0.435     |
| <i>Escherichia coli</i> 25922                            | 0.435    | -         | -          | -         | -        | -         |
| <i>Proteus rettgeri</i> 9918                             | -        | -         | -          | -         | -        | 0.870     |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> 9027                        | -        | -         | -          | -         | 87       | 0.087     |

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se llevó a cabo sobre bacterias de la colección ATCC, recomendadas algunas de ellas para las pruebas de antibióticos y en especial de Tetraciclinas. Los resultados mostrados son promedio de tres repeticiones del evento.

**Tabla 5. Resumen de los diámetros de halo de inhibición del espectro antimicrobiano de los derivados de I.**

| <b>ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE DERIVADOS DE HORMINONA<br/>DIAMETROS DE INHIBICION PROMEDIO (mm)</b> |          |           |            |           |          |            |
|--|----------|-----------|------------|-----------|----------|------------|
| <b>MICROORGANISMO DE PRUEBA</b>  | <b>I</b> | <b>II</b> | <b>III</b> | <b>IV</b> | <b>V</b> | <b>O T</b> |
| <b>GRAM (+)</b>  |          |           |            |           |          |            |
| <i>Bacillus cereus</i> 11778   | 9.05     | -         | 6.50       | 7.00      | -        | 7.00       |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014  | -        | -         | 5.80       | 6.95      | -        | 7.60       |
| <i>Micrococcus luteus</i> 9341   | 7.75     | -         | 6.15       | 6.85      | -        | 8.05       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 6538p   | 11.9     | -         | 6.00       | 6.25      | 7.30     | 12.40      |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 25923   | 10.45    | -         | 7.30       | 6.95      | 9.20     | 11.55      |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 8043   | 10.37    | -         | 6.80       | 6.80      | -        | -          |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 10741  | 7.05     | -         | 6.50       | 6.15      | -        | -          |
| <b>GRAM (-)</b>  |          |           |            |           |          |            |
| <i>Escherichia coli</i> 10536  | -        | -         | -          | -         | -        | 8.00       |
| <i>Escherichia coli</i> 25922  | 8.05     | -         | -          | -         | -        | -          |
| <i>Proteus rettgeri</i> 9918   | -        | -         | -          | -         | -        | 9.70       |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> 9027  | -        | -         | -          | -         | 7.75     | 9.25       |

Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones del evento.

## 5. DISCUSION

El producto natural Horminona (I), es muy abundante en la raíz de la *Salvia reptans* Jacq. y tiene una gran actividad bactericida sobre *S. aureus* ATCC 25923. Teniendo como base lo anterior se realizó un estudio de REA para determinar la forma en qué se afecta su actividad biológica cuando se modifica químicamente su estructura, para ésto, se sintetizaron los compuestos II, III, IV, y V, los que se purificaron al máximo para asegurar que los resultados de actividad se debieran solamente a la molécula en estudio, se identificaron comparando sus propiedades físicas y espectroscópicas con las reportadas en la literatura las cuales se discutirán posteriormente con mayor detalle.

El presente trabajo involucra aspectos químicos y biológicos, a continuación se hace una discusión por separado de cada uno de ellos, para después tratar de establecer su Relación entre Estructura-Actividad respectiva.

### 5.1 ASPECTO QUIMICO.

Se anexa la espectroscopia de I con la finalidad de hacer clara la interpretación de los espectros de los productos sintetizados (Figuras 4-7).

Producto II.- Cuando se sometió I a reacción con ácido *p*-toluensulfónico empleando tolueno como disolvente se obtuvo al producto de deshidratación correspondiente, éste resultó ser cristalino de color anaranjado el cual se identificó como 6,7-deshidroyleanona mediante la correlación de

los datos físicos y espectroscópicos con los reportados en la literatura química<sup>45,53,63-67</sup>. Su punto de fusión resultó ser 167-169 °C (166-167, 166-168.5, 167 °C Lit.). Por otro lado, el citado producto en su espectro de RMN <sup>1</sup>H a 300 Mhz (Figuras 8-9) presenta una señal simple ancha en 7.70 ppm que integra para un protón y que desaparece con D<sub>2</sub>O e inequívocamente corresponde al protón del oxhidrilo en C-12, así mismo en el desplazamiento químico de 4.7 ppm ya no se observa la señal múltiple que integra para un protón base de oxígeno asignada al H-7 en el producto I, apareciendo una señal dddd en el intervalo de 7.20-6.80 ppm debida a la parte AB del sistema ABX que integra para 2H de la doble ligadura correspondientes al H-6 y H-7. Las señales restantes concuerdan con las indicadas en los espectros de I y los de la literatura química. En lo concerniente a la RMN <sup>13</sup>C normal y APT (Figura 10) la señal en 63.1 ppm correspondiente al Carbono metínico (non) designada para C-7 base de oxhidrilo desaparece y en su lugar se observa en 139.67 ppm una señal doble típica de Csp<sub>2</sub> (non) que corresponde a uno de los carbonos que ha sufrido la deshidratación.

En cuanto al IR (Figura 11) se puede contemplar en 3359.2 cm<sup>-1</sup> la banda indicativa de la existencia de un oxhidrilo en la molécula, a la par se presenta una banda en 1079.00 cm<sup>-1</sup> característica de interacciones C-H de tipo sp<sub>2</sub> así como en 2926.79 cm<sup>-1</sup> las bandas que establecen interacciones C-H de tipo sp<sub>3</sub>. Así mismo en 1641.13 y 1633.13 se manifiestan las bandas de los carbonilos del sistema quinoidal y en 1551.13 cm<sup>-1</sup> se revelan las interacciones para C-C de tipo sp<sub>2</sub>.

Respecto a la EMIE (Figura 12) se nota la desaparición del ion molecular en 332 referente al peso molecular de I, y se observa un ion molecular de 314 que corresponde al peso molecular de la 6,7-deshidroroyleanona, lo que nos explica que se han perdido 18 unidades. El patrón de fragmentación para ésta molécula es consistente con el reportado en la literatura química (*vide supra*).

Producto III.- Para sintetizar este producto, se hizo reaccionar a I con  $\text{Ac}_2\text{O}$  y Py, obteniéndose un polvo cristalino de color amarillo que se identificó como Di-O-acetilhorminona por la analogía presentada con respecto a sus datos físicos y espectroscópicos con los reportados en la literatura química<sup>63,68</sup>. Su punto de fusión es de 99-103 °C (122-123 °C Lit). Por medio de la RMN  $\text{H}^1$  a 300 Mhz (Figuras 13-14) para este derivado se hace evidente que la señal del desplazamiento químico en 3.05 ppm de I correspondiente al protón del oxhidrilo en C-7 ya no se presenta, apreciándose en su lugar dos señales simples que integran para 3 protones cada una a un desplazamiento químico de 2.35 y 2.05 ppm asignadas a los hidrógenos de los grupos acetilo en posición 12 y 7 respectivamente. Las señales restantes se ajustan a las indicadas en los espectros de I y III (*vide supra*). En lo referente a la RMN  $^{13}\text{C}$  normal y su versión APT (Figura 15) se exhiben dos señales simples en la región de los carbonilos una en 169.52 ppm y otra en 168.22 ppm correspondientes a los C-21 (par) y C-23 (par) de los carbonilos de los acetatos, notando que las señales restantes se corroboran con base a las reportadas en los espectros de I y del derivado diacetilado.

En el espectro de IR (Figura 16) para este producto se percibe que las bandas en  $3600$  y  $3350\text{ cm}^{-1}$  debidas a la presencia de oxhidrilos en I, ya no son visibles, resaltándose la aparición de dos bandas en  $1765$  y  $1730\text{ cm}^{-1}$  que sugieren sin duda alguna interacciones C-O de tipo carbonílico para los grupos acetilo.

En la EMIE (Figura 17) el ion molecular de I en 332 ya no es evidente, apreciándose un pico en 374 que pertenece sin duda alguna al fragmento masa/carga del derivado monoacetilado (debido a que la forma diacetilada es tan lábil que pierde rápidamente un grupo acetato) y por lo tanto no se pudo apreciar el ion molecular para la forma diacetilada. El pico base representante del fragmento  $m/z$  314 se asigna a la pérdida de  $M^+ - 17 - 60$  encontrando que el patrón de fragmentación concuerda con el reportado en la literatura.

Producto IV.- Este producto a su vez se obtuvo cuando I se hizo reaccionar con BcCl y Py, el compuesto resultante fue cristalino de color amarillo y su punto de fusión de  $93-103\text{ }^\circ\text{C}$ , este derivado en su espectro de RMN  $^1\text{H}$  a  $300\text{ Mhz}$  (Figura 18) presenta: En un intervalo de  $8.12-7.58\text{ ppm}$  una señal múltiple que integra para 5 protones de tipo aromático correspondientes al fenilo del benzoilo, la señal doble de doble en  $4.79\text{ ppm}$  que integra para 1 protón sugiere que sea un protón base de oxígeno, el cual se asigna al H-7; la señal que se encuentra en  $3.20\text{ ppm}$  es debida al H-15, y en  $2.85\text{ ppm}$  se contempla una señal simple ancha que integra para un protón, la cual intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$  e indudablemente corresponde al protón del oxidrilo en C-7 por lo se dice que la benzoilación no se llevó a cabo en esta

posición. También aparece una señal dddd centrada en 2.69 la cual integra para los dos protones asignados a H-1, así como en la región de 2.01-1.4 ppm destacan un conjunto de señales que se atribuyen a los protones H-2, H-3, H-4 y H-6, para finalmente distinguir en la región de los metilos una señal doble que integra para 6 protones y está centrada en 1.26 ppm, además de dos señales simples en 0.98 y 0.90 ppm que integran para 3 protones cada una, dichas señales se asignan a los metilos en 16,17,18 y 19 respectivamente. La señal simple/sobrepuesta en 1.24 ppm que integra para 3 protones se vincula al Me-20. En lo relacionado a la RMN  $^{13}\text{C}$  normal y su versión APT (Figura 19) en la región de los carbonilos se contemplan dos señales simples, una en 188.85 ppm y otra en 180.55 que hacen alusión a los carbonos de carbonilo en C-14 y en C-11 respectivamente, a continuación se encuentra en 164.05 ppm una señal simple que representa al carbono del carbonilo del benzoilo en posición 12 y en 151.50 ppm una señal de  $\text{Csp}_2$  (par) correspondiente a C-12. En los desplazamientos químicos de 149.93, 141.27 y 139.00 ppm hay tres señales simples que también describen  $\text{Csp}_2$  (par) asignadas a C-9, C-8 y C-13 respectivamente y en el intervalo de 134.8-128.00 ppm se manifiesta una serie de señales relacionadas a los carbonos del sistema aromático del benzoilo. Más adelante en 62.95 ppm se encuentra una señal doble debida a un carbono metínico (non) designada al C-7 base de oxhidrilo, de igual modo la observada en 45.77 ppm (non) se asigna al C-5; los desplazamientos químicos de 41.11 y 39.54 ppm, corresponden a los C-3 y C-10. Por lo que respecta al C-15 se obtiene una señal en 25.026 ppm relativa a un carbono metínico, para por último encontrar en la región de los metilos un conjunto de señales cuádruples que detallan comparativamente a C-16, C-17, C-18, C-19 y C-20 (nones) de los metilos.

En lo relativo al espectro de IR (Figura 20) la banda en  $3470.80\text{ cm}^{-1}$  es característica para avisar de la presencia de OH en la molécula; la de  $2926.25\text{ cm}^{-1}$  muestra las interacciones C-H de tipo aromático y en  $2856.48\text{ cm}^{-1}$  las de tipo C-H  $sp_3$ , además, la banda que se presenta en  $1752.80$  aconseja la presencia del éster del benzoilo y por último las que se encuentran en  $1664.40$  y  $1603.30\text{ cm}^{-1}$  que se deben a los carbonilos del sistema quinoidal.

Por último, en la EMIE a 70 e.v. (Figura 21) al ion molecular se le encuentra en una relación de masa/carga de 346 la cual concuerda con el peso molecular esperado para este derivado, posteriormente se hacen patentes picos de valor 418, 403 y 331 asignadas a pérdidas de  $M^+-H_2O$ ,  $M^+-18-15$  y  $M^+-\text{CO}$  respectivamente. El pico base corresponde al fragmento típico de  $C_6H_5CO^+$ .

Producto V.- Al reaccionar el diazometano (preparado *in situ*) con I, se logró obtener el correspondiente producto de metilación, el cual resultó ser cristalino de color amarillo, su punto de fusión es de  $130-132\text{ }^\circ\text{C}$  ( $135-137$ ,  $142-144$  y  $138\text{ }^\circ\text{C}$  Lit.) y se identificó como 12-metilhorminona por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los reportados en la literatura<sup>63,68-70</sup>. Del espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 300 Mhz (Figura 22) para este derivado se nota una señal doble de doble en 4.73 ppm que integra para 1 protón, que sugiere sea base de oxígeno y se asigna al H-7, así como en 2.85 ppm se contempla una señal simple ancha que integra para un protón, la cual intercambia con  $D_2O$  e indudablemente corresponde al protón del oxhidrilo en C-7 por lo cual se establece que la benzoilación no se llevó a cabo en esta

posición, aparte de que la señal correspondiente al H base de oxígeno en posición 12 desaparece haciendo evidente en 3.85 ppm una nueva señal simple que integra para tres protones en la región de los hidrógenos de los carbonos base de oxígeno correspondiente sin duda alguna al grupo metoxilo en dicha posición. Si se continua comparando las siguientes señales con lo reportado se observa que concuerdan entre si. De la RMN  $^{13}\text{C}$  normal y su versión APT (Figura 23) para el presente derivado la señal correspondiente al C-12 se ve un poco desplazada; en 60.72 ppm se hace evidente una señal cuádruple debida al grupo metoxilo en posición 12 además de que las señales restantes se avalan con las reportadas en la literatura para este producto.

En el espectro de IR (Figura 24) para el mismo producto las bandas más significativas están en:  $3574.86\text{ cm}^{-1}$  que hace notable la presencia de oxhidrilo en V,  $2962.75\text{ cm}^{-1}$  se refiere a las interacciones C-H de tipo  $\text{sp}_2$  y en  $2931.57$  de tipo  $\text{sp}_3$ ; en  $1640.52\text{ cm}^{-1}$  y en  $1661.93\text{ cm}^{-1}$  las señales son debidas a los carbonilos del sistema quinoidal y por último en  $1139.97\text{ cm}^{-1}$  las bandas son indicativas de la presencia del grupo éter en la molécula.

Para finalizar, en la EMIE (Figura 25) para este producto se aprecia su ion molecular en una relación masa/carga de 346 y es concordante con el peso molecular esperado para el mismo. Posteriormente se hacen visibles picos de valor 328 y 313 asignados a pérdidas de  $\text{M}^+-18$  y  $328-15$ . El pico base corresponde al valor de 328 y está representado por  $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$ . Las señales restantes son análogas a las reportadas para este derivado en la literatura.

## 5.2 ASPECTO BIOLÓGICO.

Este estudio se llevó a cabo con la finalidad de observar si con las modificaciones químicas hechas a **I** se incrementaba, disminuía o mantenía su actividad antimicrobiana, es decir, si la cantidad requerida del derivado para establecer el **MIC** era menor o mayor a la de **I**. También, se decidió probar su actividad sobre bacterias Gram positivas y negativas para demostrar si el espectro antimicrobiano de los derivados de la Horminona y de **I** eran diferentes entre sí.

En vista de que **I** presenta cierta similitud estructural con las Tetraciclinas, para el estudio REA se empleó como patrón de comparación a la **OT**, la cual, es una Tetraciclina comercial de amplio uso farmacéutico.

Por ser **I** y sus derivados insolubles en agua y aun en disoluciones amortiguadoras de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  a  $\text{pH}=9.3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a  $\text{pH}=4.0$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a  $\text{pH}=8.0$ , el ensayo microbiológico se llevó a cabo mediante el método de difusión en agar, técnica que a diferencia de otras, como la de dilución en caldo, no requiere forzosamente de un patrón de referencia soluble en agua.

La prueba preliminar se realizó con la finalidad de determinar cuál de las cepas en cuestión eran sensibles a **I** y sus derivados, para posteriormente obtener el espectro antimicrobiano en términos de **MIC** (Concentración Mínima Inhibitoria), valor en el que los compuestos todavía inhiben el crecimiento del microorganismo de prueba, por lo que se prepararon

diluciones decimales de los derivados en  $\text{CHCl}_3$  (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). Una vez encontrada la dilución decimal mínima capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias se prepararon diluciones dobles o intermedias para establecer con mayor exactitud la concentración del derivado que pudiera impedir el desarrollo del microorganismo.

El cálculo de los MIC's se efectuó de la siguiente manera: Una vez encontrada la última dilución (doble o decimal) donde el derivado todavía impidió el crecimiento del microorganismo se obtuvo por retroceso la cantidad colocada en los sensibilizadores y se expresó en unidades de concentración de  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados del ensayo antimicrobiano de los derivados de **I** en términos de diámetro promedio del halo de inhibición y de MIC están resumidos en las Tablas 4 y 5.

Por medio de comparaciones del número de veces que es mayor o menor la concentración de cada derivado con respecto a **I** y a **OT** para obtener el MIC y los halos de inhibición (Tablas 6-9), se observó que el producto **II** no presentó actividad antimicrobiana contra alguna de las cepas probadas.

Comparado con **I**, el producto **III** presentó un espectro de acción más reducido, porque fue activo solamente sobre bacterias Gram positivas. Además, la concentración necesaria de **III** para establecer los MIC's en todos los casos fue menor que la requerida para probar **I**. En relación a la **OT** es importante destacar que **III** actúa sobre bacterias donde la primera no lo

hace, como son *S. faecalis* ATCC 8043 y *S. faecalis* 10741 y a su vez, la **OT** actúa sobre cepas donde **III** no.

En relación a los diámetros de los halos de inhibición, se hace evidente que los obtenidos con **III** son menores a los de **I** en todos los casos; esto se puede deber a que esta última al poseer en su molécula dos grupos oxhidrilo sea más hidrofílica que **III**, en donde los hidrógenos de los oxhidrilos se sustituyeron por grupos acetato provocando una difícil difusión. Respecto a la **OT** se nota fácilmente que sus halos de inhibición son mayores a los presentados por **III**, y esto es lógico porque **OT** es soluble en agua.

Por otra parte, al analizar los resultados obtenidos con **IV**, se observa que sus **MIC**'s son aproximadamente la mitad de los obtenidos con **OT**, aunque los halos de inhibición sean más pequeños para el primero. Esto es importante porque si se tiene en cuenta que los halos de inhibición indican la sensibilidad de la cepa a un compuesto determinado y además de que el inverso de los diámetros de los halos de inhibición representa el **MIC**<sup>35</sup>, los resultados referentes al derivado **IV** para *Staphylococcus aureus* ATCC 6338p y 25923 no cumplen lo anterior debido a que los halos de inhibición aparecen reducidos casi a la mitad al igual que la concentración. Esto podría pasar porque **IV**, al igual que los otros derivados no son solubles en agua y por lo tanto presentan problemas de difusión en el agar. De cualquier modo, el hecho de que este derivado presente una marcada actividad antimicrobiana, aun bajo estas condiciones drásticas de trabajo, promete, que si se mejora su solubilidad (por ejemplo formando sales solubles en agua), podría en un futuro ser un antibiótico alternativo para combatir a este tipo de

microorganismos y además, porque *Staphylococcus aureus* ha presentado problemas de resistencia a los antibióticos comerciales, por lo que **IV** podría ser un antibiótico alternativo para dar solución a este problema.

También es importante destacar que **IV** al igual que **III**, presentó actividad antimicrobiana únicamente sobre los microorganismos Gram positivos probados. Así mismo, la **OT** actuó sobre cepas donde **IV** no lo consiguió como son *E. coli* 10536, *Proteus rettgeri* 9918 y *Pseudomona aeruginosa* 9027.

Comparando **IV** contra **I** se advierte que los MIC's de esta última son mayores aproximadamente quince veces (tomando la máxima y mínima diferencia); por lo que se estima que **IV** es más activo que **I** en términos de MIC, sin embargo los halos de inhibición para este derivado son menores que los de **I**, puede ser que al sustituir uno de los oxhidrilos de **I** por un grupo benzoilo se le reste hidrofilia y por lo tanto tenga una menor difusión a través del agar.

En relación al producto **V** se observó que la actividad antimicrobiana es aun más reducida que para **III** y **IV**, ya que de todas las cepas probadas sólo actúa contra *Staphylococcus aureus* 6538p y 25923 y contra *Pseudomona aeruginosa* 9027. Analizando los resultados mostrados en la **Tabla 5** para este derivado, se encuentra que los MIC's de **V** y de **I** son iguales entre sí, cosa que no sucede con los halos de inhibición donde son mayores los de **I**., esto se debe a la pobre difusión del derivado en el agar el cual es menos hidrofílico que **I**. En comparación con la **OT** tanto las

concentraciones como los halos de inhibición de **V** son mucho mayores que los de la primera.

Resulta difícil establecer que exista un uso determinado para los derivados sintetizados, sin embargo, se puede especular que al ser activos microbiológicamente **III**, y **IV** contra *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 y 10741 donde **OT** no lo es, podrían ser una alternativa quimioterapéutica para combatir las enfermedades producidas por esos microorganismos. Así mismo, al ser mucho más activo el derivado **IV** que **OT** sobre *Staphylococcus aureus*, podría ser una solución para el problema de resistencia que presenta a los antibióticos comerciales, aunque para todo ello se requiera de diferentes evidencias (farmacológicas, toxicológicas, farmacéuticas, etc.) que demuestren su inocuidad como un nuevo fármaco.

Mediante este estudio se demostró que los compuestos **III** y **IV** son más activos que **I** en términos de **MIC**. En donde el derivado **IV** presentó una mayor actividad antimicrobiana inclusive que **OT** para *Staphylococcus aureus*, por lo que se cree que se debería hacer un estudio más a fondo de las diferentes partes de esta molécula con el fin de identificar la fracción activa más sencilla de sintetizar y/o que pudiera unirse a antibióticos comerciales con el objeto de potencializar su acción. Por lo anterior se deduce que de los derivados sintetizados el **IV** es el más activo y presenta una actividad antimicrobiana potencial que debería probarse sobre otro tipo de microorganismos (hongos, protozoarios, helmintos, entre otros) con la finalidad de poder determinar si es útil desde el punto de vista farmacológico.

### 5.3 RELACIONES ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD.

Al sustituir los oxhidrilos de la molécula original o esqueleto base **I** por diferentes grupos funcionales se observó que la actividad biológica se afectó, al aumentar o disminuir la cantidad necesaria del derivado para establecer el **MIC**; siendo menores los diámetros de inhibición en todos los casos debido a los problemas de difusión en el agar que se presentan por decrecer su solubilidad en agua.

Cuando se elimina en **I** el oxhidrilo de la posición 7 (lo que se consiguió al sintetizar **II**) el derivado obtenido no presenta actividad antimicrobiana contra las cepas probadas, tal vez porque se pierde la semejanza en funcionalidad con respecto a **OT**. Sin embargo, cuando en esa posición se sustituye un carbonilo (en el caso de **III** donde se sustituyó un acetato) o un grupo funcional con oxígeno (como es el oxhidrilo en **I**), la actividad aumenta ya que su estructura se asemeja más a la funcionalidad de las Tetraciclinas.

De entre los grupos funcionales sustituidos, los que poseen oxígeno en su estructura como son acetato o benzoilo incrementan la actividad antimicrobiana de **I** cuando se colocan en la posición 12. Particularmente si este grupo es un benzoilo la actividad es mayor si se compara contra **OT**, pues además de afectar a microorganismos que esta última no ataca, la concentración para establecer el **MIC** es menor que la requerida por **I** y **OT**.

Se advierte que todos los derivados obtenidos excepto **II** y **V** tienen tendencia a actuar solamente sobre las bacterias Gram positivas ensayadas, es

decir que con las modificaciones químicas hechas a I el espectro antimicrobiano disminuyó porque este último también actúa sobre *E. coli* 25922 la cual es una bacteria Gram negativa.

Aun cuando I presenta mayor difusión que III, IV y V, la cantidad requerida de éste para establecer el MIC es mayor, por lo que se cree que sus derivados son más activos aunque presenten problemas de difusión, de los cuales IV es al que se le considera el más activo.

**Tabla 6. Comparación de los MIC's de derivados de I y OT respecto a I.**

| <b>COMPARACION DE LOS MIC'S DE DERIVADOS DE I Y OT RESPECTO A I.</b> |          |           |            |           |          |           |
|--|----------|-----------|------------|-----------|----------|-----------|
| <b>MICROORGANISMO DE PRUEBA</b>                                      | <b>I</b> | <b>II</b> | <b>III</b> | <b>IV</b> | <b>V</b> | <b>OT</b> |
| <b>GRAM (+)</b>  |          |           |            |           |          |           |
| <i>Bacillus cereus</i> 11778   | 1        | -         | 9.35<      | 20.23<    | -        | 9.35<     |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014                                  | -        | -         |            |           | -        |           |
| <i>Micrococcus luteus</i> 9341                                       | 1        | -         | 9.35<      | 10.00<    | -        | 41.42<    |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 6538p                                   | 1        | -         | 2.32<      | 10.11<    | igual    | 5.00<     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 25923                                   | 1        | -         | 2.32<      | 10.11<    | igual    | 5.00<     |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 8043                                   |          | -         | 40.00<     | 20.00<    | -        | -         |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 10741                                  |          | -         | 4.00<      | 20.23<    | -        | -         |
| <b>GRAM (-)</b>  |          |           |            |           |          |           |
| <i>Escherichia coli</i> 10536  | -        | -         | -          | -         | -        | -         |
| <i>Escherichia coli</i> 25922  |          | -         | -          | -         | -        | -         |
| <i>Proteus rettgeri</i> 9918   | -        | -         | -          | -         | -        | -         |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> 9027                                    | -        | -         | -          | -         | -        | -         |

Datos adimensionales obtenidos al dividir el mayor valor entre el menor tomando como referencia a los valores de I para cada derivado y tipo específico de microorganismo.

**Tabla 7. Comparación del diámetro de halo de inhibición de los derivados de I y OT respecto a I.**

| COMPARACION DE HALOS DE INHIBICION DE DERIVADOS DE I Y OT RESPECTO A I |   |    |       |       |       |       |
|--|---|----|-------|-------|-------|-------|
| MICROORGANISMO DE PRUEBA   | I | II | III   | IV    | V     | OT    |
| <b>GRAM (+)</b>  |   |    |       |       |       |       |
| <i>Bacillus cereus</i> 11778   | 1 | -  | 1.39< | 1.29< | -     | 1.29< |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014                                    | - | -  |       |       | -     | -     |
| <i>Micrococcus luteus</i> 9341   | 1 | -  | 1.26< | 1.13< | -     | 0.96> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 6538p                                     | 1 | -  | 1.98< | 1.90< | 1.63< | 1.04> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 25923                                     | 1 | -  | 1.43< | 1.50< | 1.13< | 1.10> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 8043                                     | 1 | -  | 1.52  | 1.52< | -     | -     |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 10741                                    | 1 | -  | 1.08< | 1.14< | -     | -     |
| <b>GRAM (-)</b>  |   |    |       |       |       |       |
| <i>Escherichia coli</i> 10536  | - | -  | -     | -     | -     | -     |
| <i>Escherichia coli</i> 25922  | - | -  | -     | -     | -     | -     |
| <i>Proteus rettgeri</i> 9918   | - | -  | -     | -     | -     | -     |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> 9027                                      | - | -  | -     | -     | -     | -     |

Datos adimensionales obtenidos al dividir el mayor valor entre el menor tomando como referencia a los valores de I para cada derivado y tipo específico de microorganismo.

**Tabla 8. Comparación de los MIC's de I y sus derivados con respecto a OT.**

| COMPARACION DE MIC's DE I Y SUS DERIVADOS CON RESPECTO A OT. |    |        |    |       |       |      |
|--|----|--------|----|-------|-------|------|
| MICROORGANISMO DE PRUEBA                                     | OT | I      | II | III   | IV    | V    |
| <b>GRAM (+)</b>  |    |        |    |       |       |      |
| <i>Bacillus cereus</i> 11778                                 | 1  | 9.35>  | -  | igual | 2.16< | -    |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014                          | 1  | -      | -  | 1.16> | 4.34< | -    |
| <i>Micrococcus luteus</i> 9341                               | 1  | 41.42> | -  | 4.42> | 4.14> | -    |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 6538p                           | 1  | 5.0>   | -  | 2.15> | 2.02< | 5.0> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 25923                           | 1  | 5.0>   | -  | 2.15> | 2.02< | 5.0> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 8043                           | -  |        | -  |       |       | -    |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 10741                          | -  |        | -  |       |       | -    |
| <b>GRAM (-)</b>  |    |        |    |       |       |      |
| <i>Escherichia coli</i> 10536                                | 1  | -      | -  | -     | -     | -    |
| <i>Escherichia coli</i> 25922                                | -  |        | -  | -     | -     | -    |
| <i>Proteus rettgeri</i> 9918                                 | 1  | -      | -  | -     | -     | -    |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> 9627                            | 1  | -      | -  | -     | -     | 100> |

Datos adimensionales obtenidos al dividir el mayor valor entre el menor tomando como referencia a los valores de OT para cada derivado y tipo específico de microorganismo.

**Tabla 9. Comparación de los diámetros promedio de halo de inhibición de I y sus derivados con respecto a OT.**

| <b>COMPARACION DE LOS DIAMETROS PROMEDIO DE HALO DE INHIBICION DE I Y SUS DERIVADOS RESPECTO A OT</b> |           |          |           |            |           |          |
|---|-----------|----------|-----------|------------|-----------|----------|
| <b>MICROORGANISMO DE PRUEBA</b>   | <b>OT</b> | <b>I</b> | <b>II</b> | <b>III</b> | <b>IV</b> | <b>V</b> |
| <b>GRAM (+)</b>   | 1         |          |           |            |           |          |
| <i>Bacillus cereus</i> 11778  | 1         | 1.35>    | -         | 1.07<      | igual     | -        |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014   | 1         | -        | -         | 1.31<      | 1.0<      | -        |
| <i>Micrococcus luteus</i> 9341  | 1         | 0.96>    | -         | 1.30<      | 0.85<     | -        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 6538p  | 1         | 1.04<    | -         | 2.06<      | 1.98<     | 1.69<    |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 25923  | 1         | 1.10<    | -         | 1.58<      | 1.66<     | 1.25<    |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 8043  | -         |          | -         |            |           | -        |
| <i>Streptococcus faecalis</i> 10741   | -         |          | -         |            |           | -        |
| <b>GRAM (-)</b>   |           |          |           |            |           |          |
| <i>Escherichia coli</i> 10536   | 1         | -        | -         | -          | -         | -        |
| <i>Escherichia coli</i> 25922   | -         |          | -         | -          | -         | -        |
| <i>Proteus rettgeri</i> 9918  | 1         | -        | -         | -          | -         | -        |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> 9027   | 1         | -        | -         | -          | -         | 1.19<    |

Datos adimensionales obtenidos al dividir el mayor valor entre el menor tomando como referencia a los valores de OT para cada derivado y tipo específico de microorganismo.

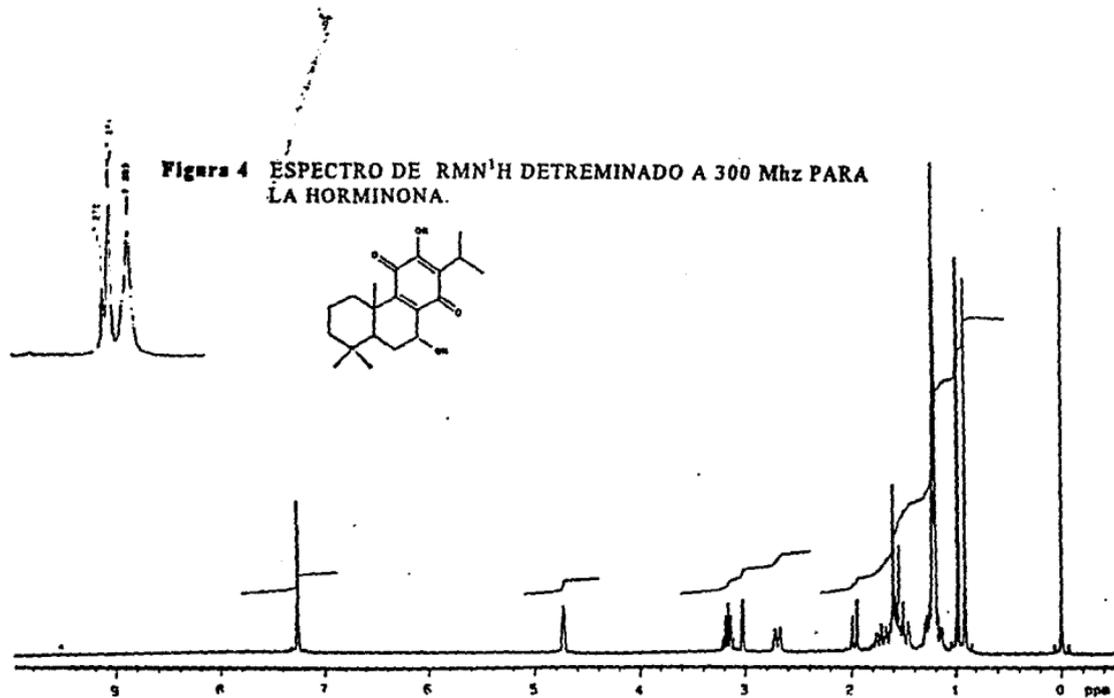
## 6. CONCLUSIONES

1. En el estudio de **Relación Estructura-Actividad** con los derivados de **I** se observó que la **REA** se ve reflejada claramente en la sustitución de los oxhidrilos en la posición 7 y/o 12 de la molécula base.
2. De los derivados sintetizados el **IV** es el más activo porque en todos los casos los **MIC's** obtenidos son menores a los de los demás derivados e inclusive a los de los patrones de referencia.
3. Los derivados obtenidos presentaron una marcada tendencia a actuar sólo sobre las cepas Gram positivas empleadas. Además, al modificar químicamente las posiciones 7 y 12 de la Horminona sustituyendo los hidrógenos de los oxhidrilos por grupos funcionales que en su constitución contenían oxígeno, como es el caso del acetato o el benzoilo, la actividad antimicrobiana se vió incrementada respecto a la molécula base, y en relación a la Oxitetraciclina, lo anterior sólo sucedió cuando el grupo sustituido era el benzoilo. Así mismo si se eliminaba el oxhidrilo de la posición 7, el producto resultante no presentó actividad antimicrobiana.
4. Se encontró que los derivados al no ser solubles en agua presentaron problemas de difusión en el agar, por lo cual, los halos de inhibición en todos los casos fueron menores a los mostrados por la molécula base que también es insoluble en agua pero, en donde los hidrógenos de los oxhidrilos no se han sustituido y por lo tanto presentaron mayor hidrofiliidad.

5. Como las bacterias sobre las que se probaron los derivados de la Horminona causan enfermedades en el hombre, alguno de los derivados que se estudiaron podrían ser en el futuro una alternativa quimioterapéutica a las enfermedades provocadas por dichas bacterias, aunque para ello se requiere de una serie de trabajos posteriores (farmacológicos, toxicológicos, farmacéuticos, de química cuántica, etc.) que conduzcan a demostrar su inocuidad como fármaco.

Se sugiere que se lleve a cabo la continuación de este trabajo sintetizando otros derivados de I (preferiblemente en forma de sales solubles en agua). También se deben probar los ya ensayados sobre otro tipo de microorganismos (hongos, protozoarios, helmintos, entre otros) para poder encontrar un uso determinado a este tipo de compuestos.

## **7. APENDICE**



**Figura 5** ESPECTRO DE RMN  $C^{13}$  DETERMINADO A 75.5 Mhz PARA LA HORMINONA

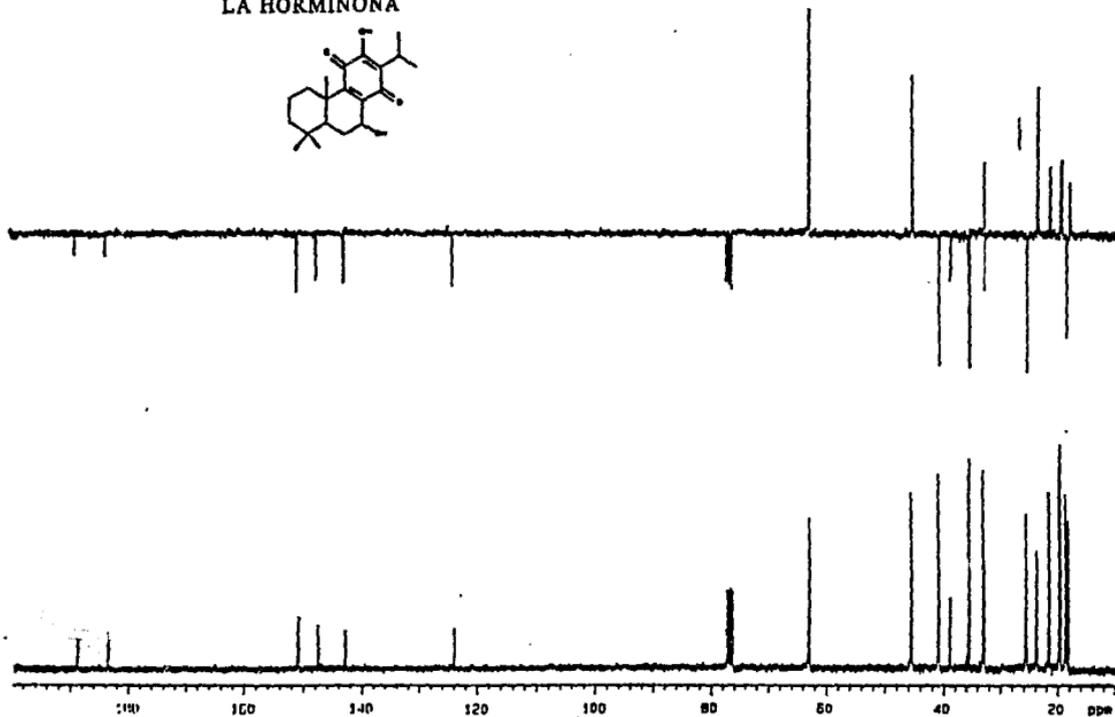
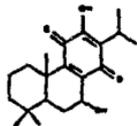


Figura 6 ESPECTRO DE ABSORCION DE INFRARROJO PARA LA HORMINONA.

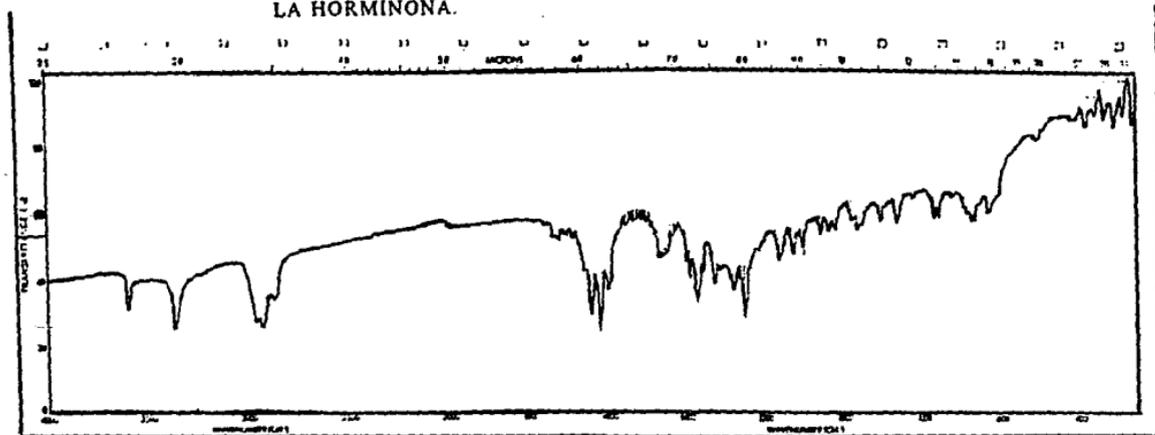
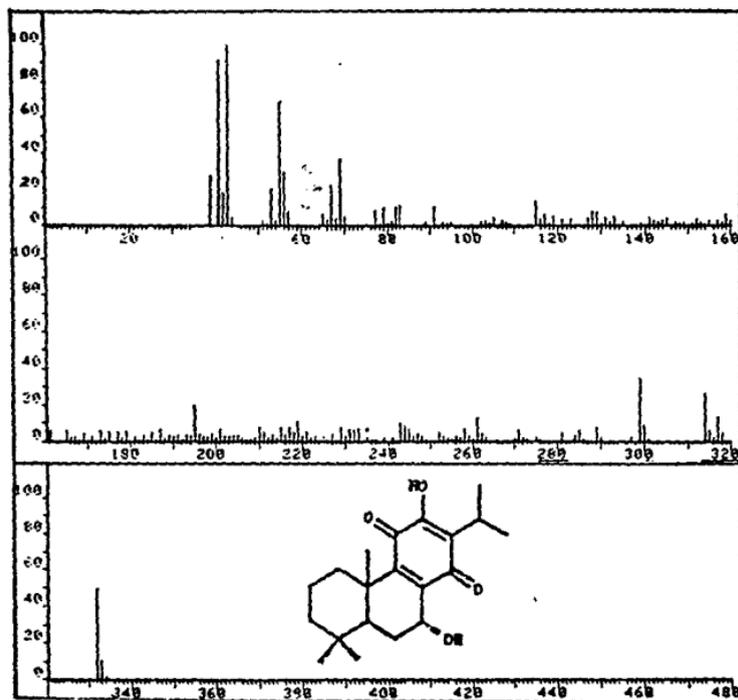


Figura 7 ESPECTRO DE MASAS DETERMINADO A 70 eV (250 °C) PARA LA HORMINONA.





$+D_2O$ 

Figura 9 ESPECTRO DE RMN  $^1H$  DETERMINADO A 300 MHz PARA LA HORMINONA DESHIDRATADA, CON ADICION DE  $D_2O$ .

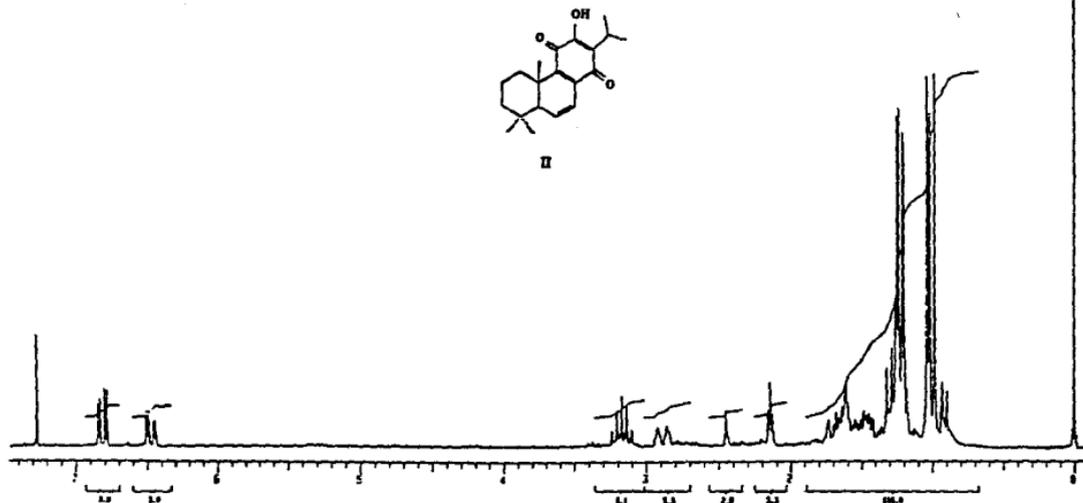


Figura 10 ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DETERMINADA A 75.5 Mhz PARA LA HORMINONA DESHIDRATADA.

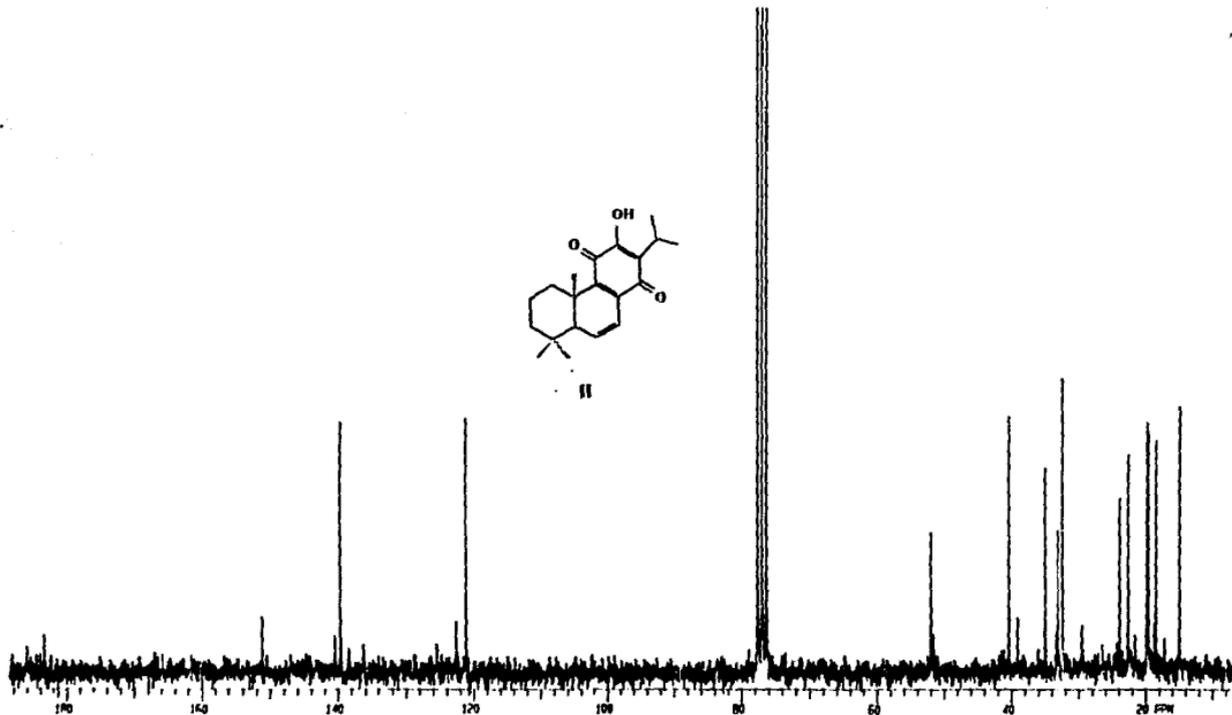


Figura 11 ESPECTRO DE ABSORCION DE INFRARROJO PARA LA HORMINONA DESHIDRATADA.

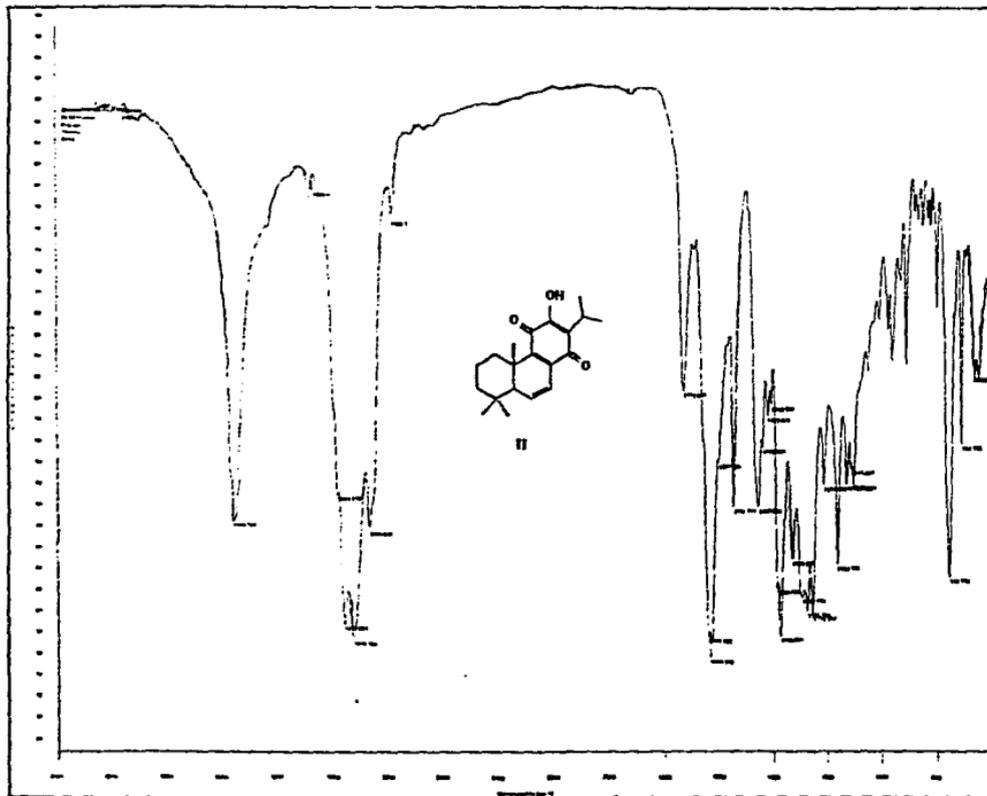


Figura 12 ESPECTRO DE MASAS POR IMPACTO ELECTRONICO A 70 eV (250 °C) PARA LA HORMINONA DESHIDRATADA.

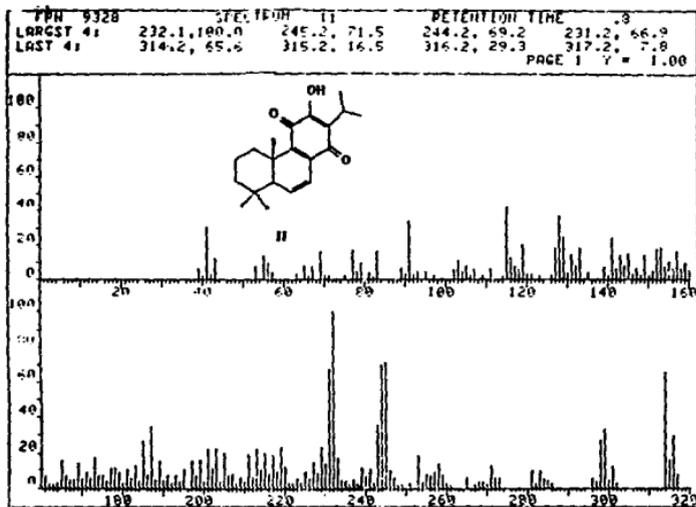


Figura 13 ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DETERMINADO A 300 Mhz PARA LA HORMIONA DIACETILADA.

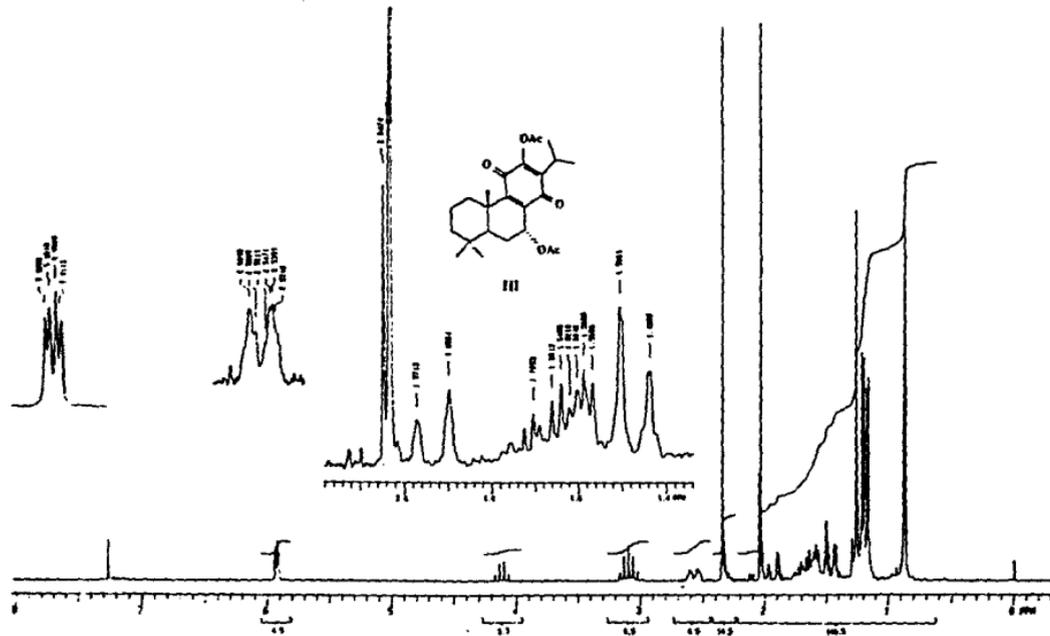


Figura 14 ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DETERMINADO A 300 Mhz PARA LA HORMINONA DIACETILADA, CON ADICION DE  $\text{D}_2\text{O}$ .

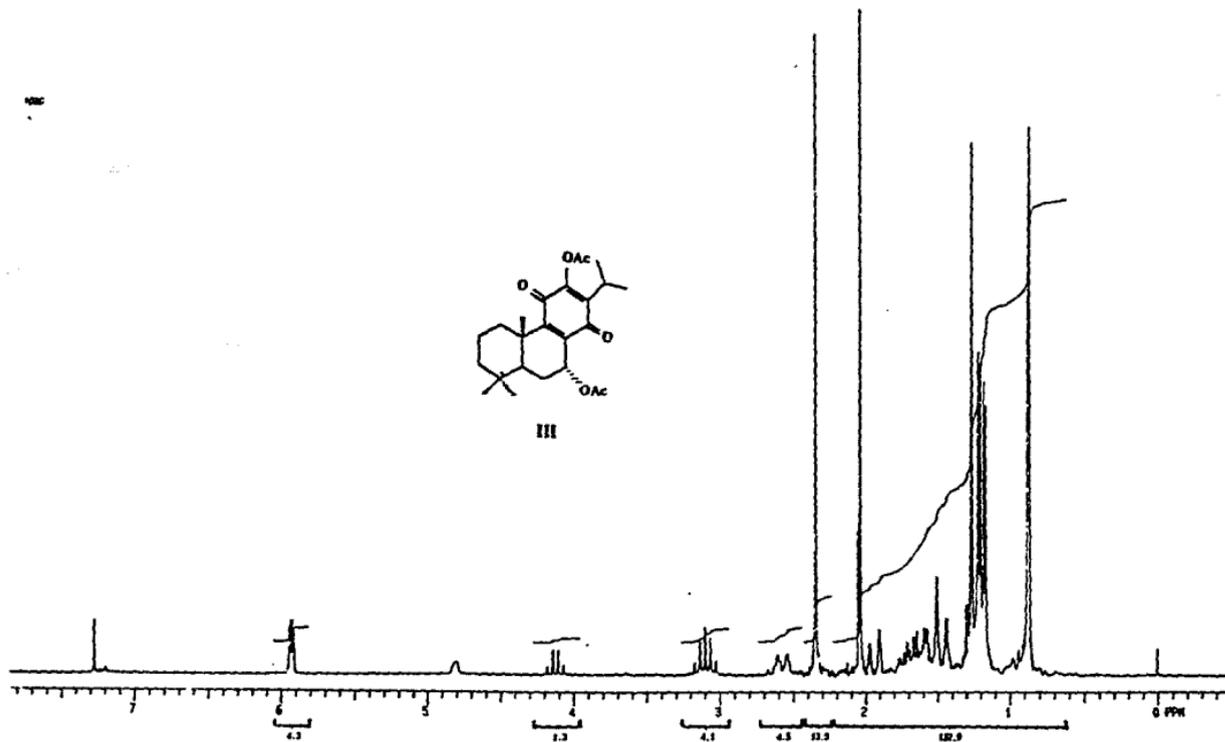


Figura 15 ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DETERMINADO A 75.5 Mhz PARA LA HORMINONA DIACETILADA.

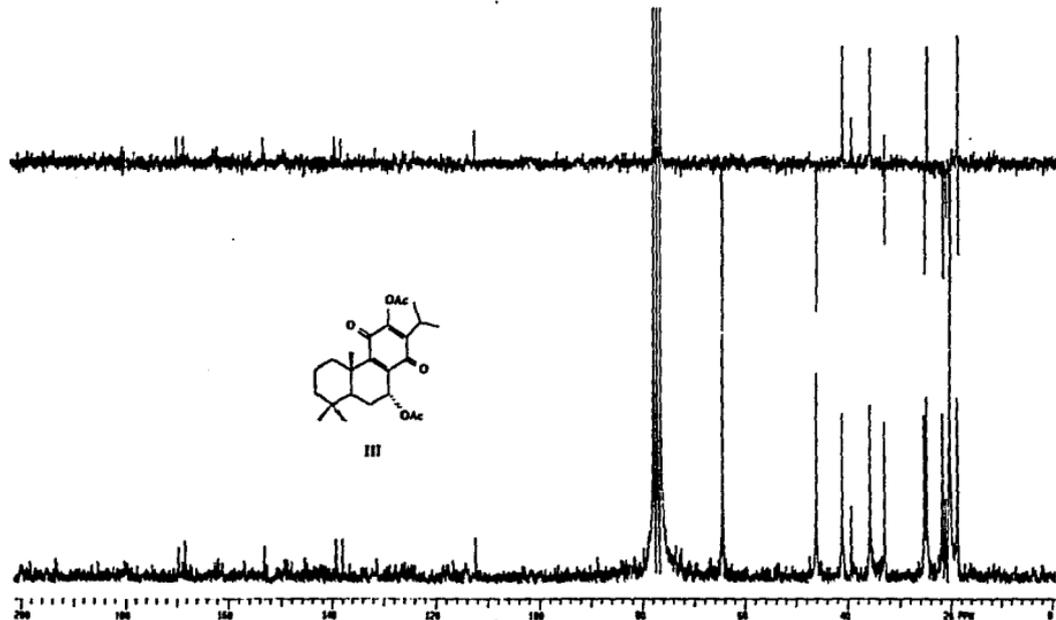
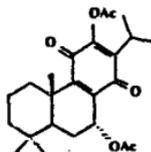
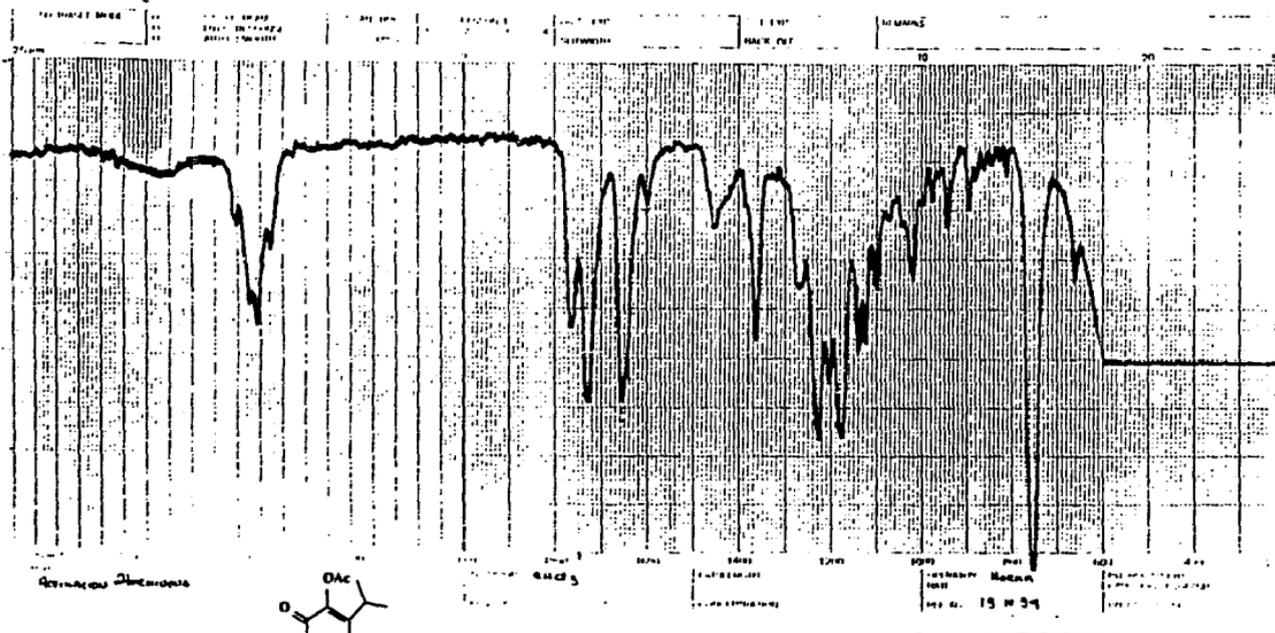


Figura 16 ESPECTRO DE ABSORCION DE INFRARROJO PARA LA HORMINONA DIACETILADA.



III

Figura 17 ESPECTRO DE MASAS POR IMPACTO ELECTRONICO A 70 eV (250 °C) PARA LA HORMINONA DIACETILADA.

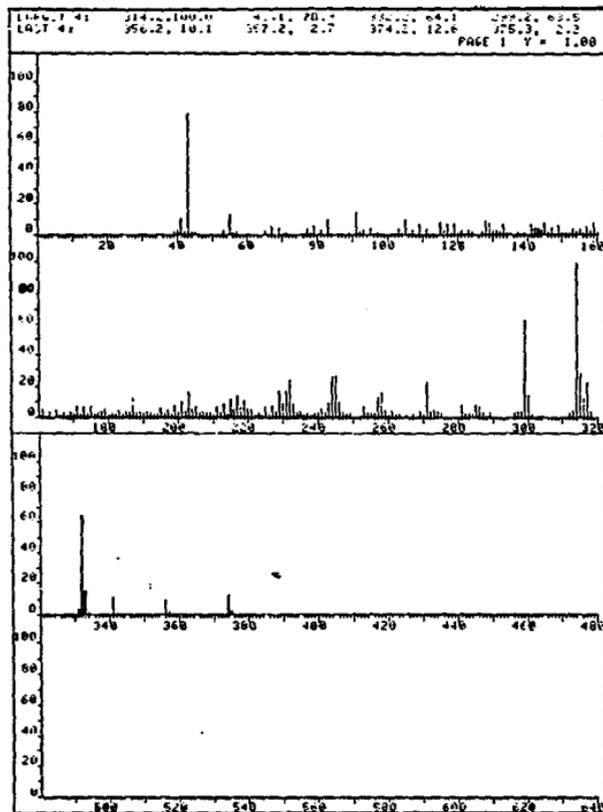
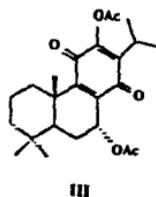


Figura 15 ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DETERMINADO A 300 Mhz PARA LA HORMINONA BENZOILADA.

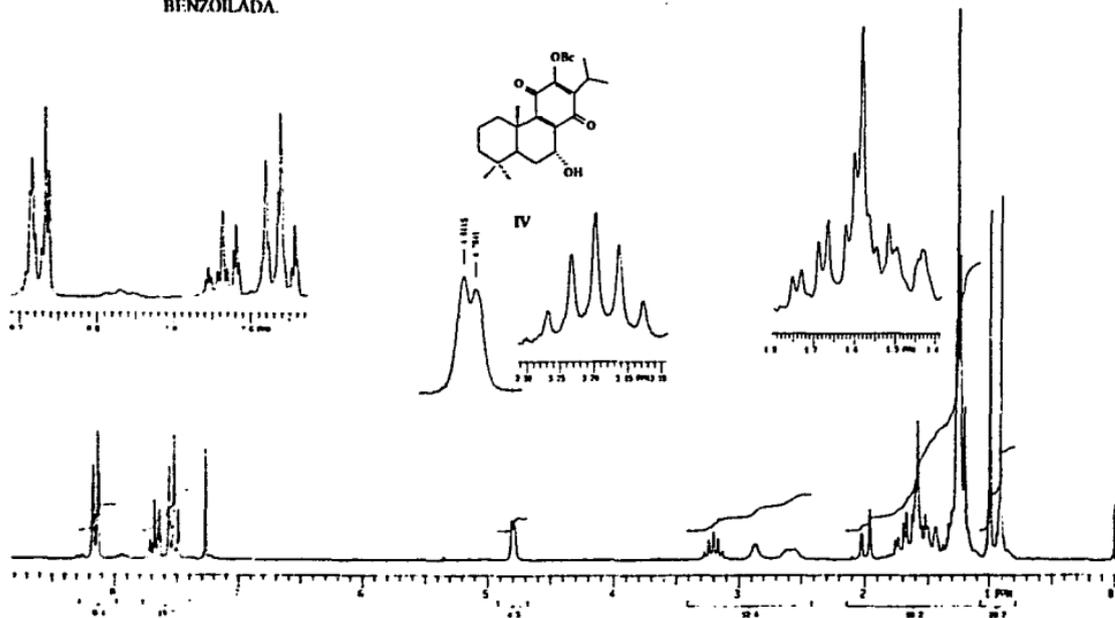


Figura 19 ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DETERMINADO A 75.5 Mhz PARA LA HORMINONA BENZILADA.

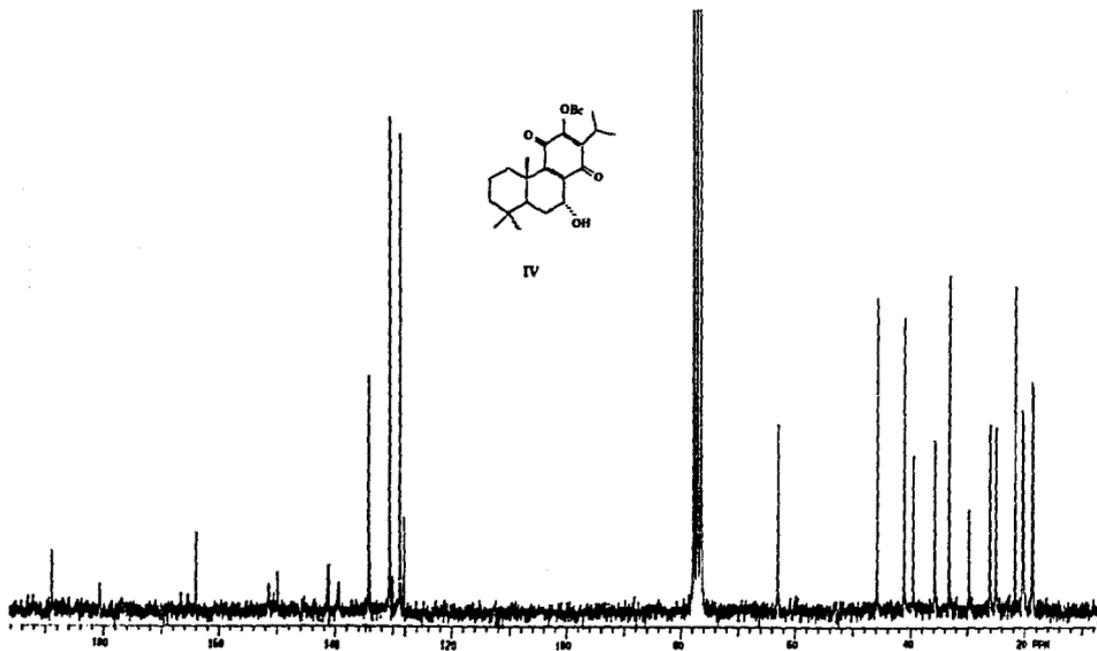


Figura 20 ESPECTRO DE ABSORCION DE INFRARROJO PARA LA HORMINONA BENZOILADA.

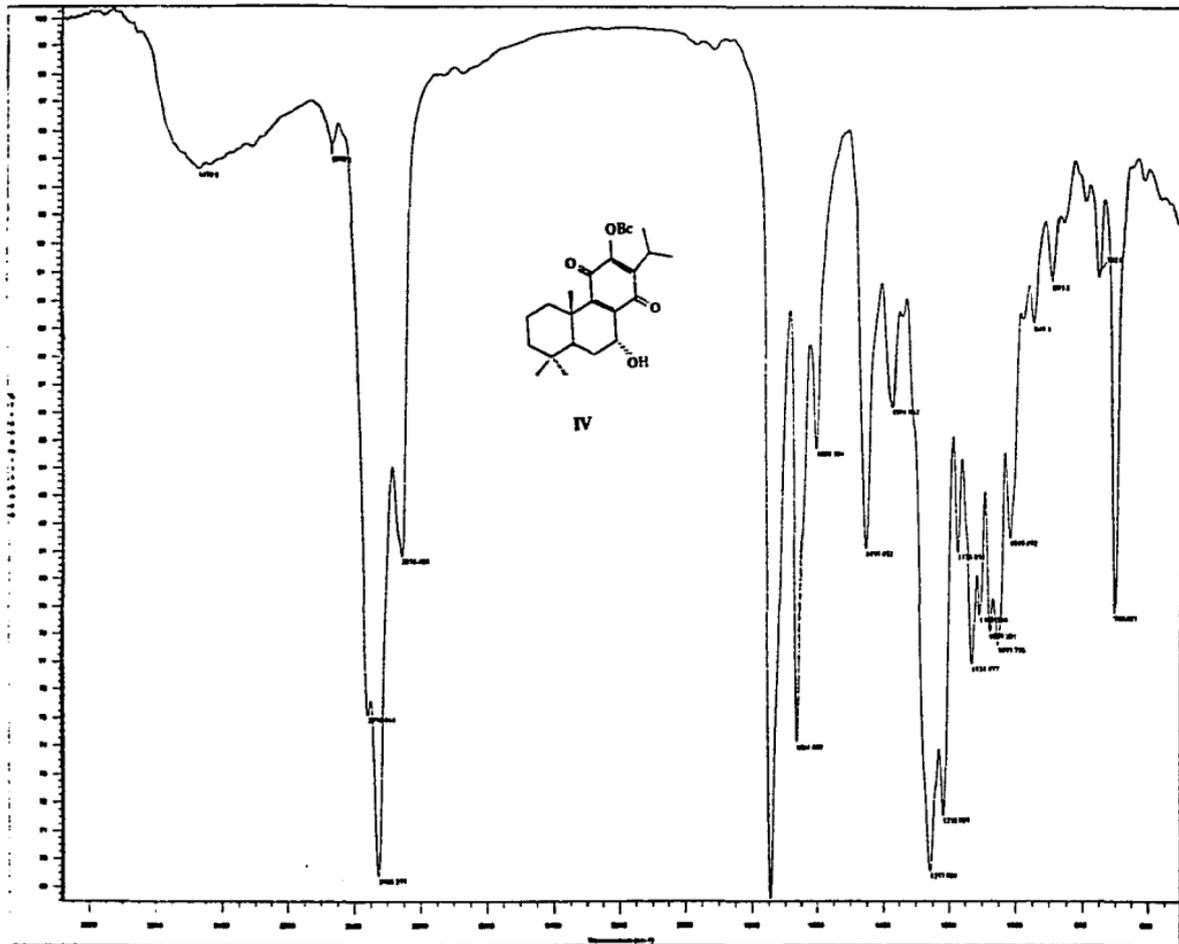
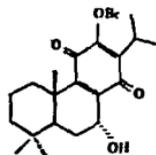
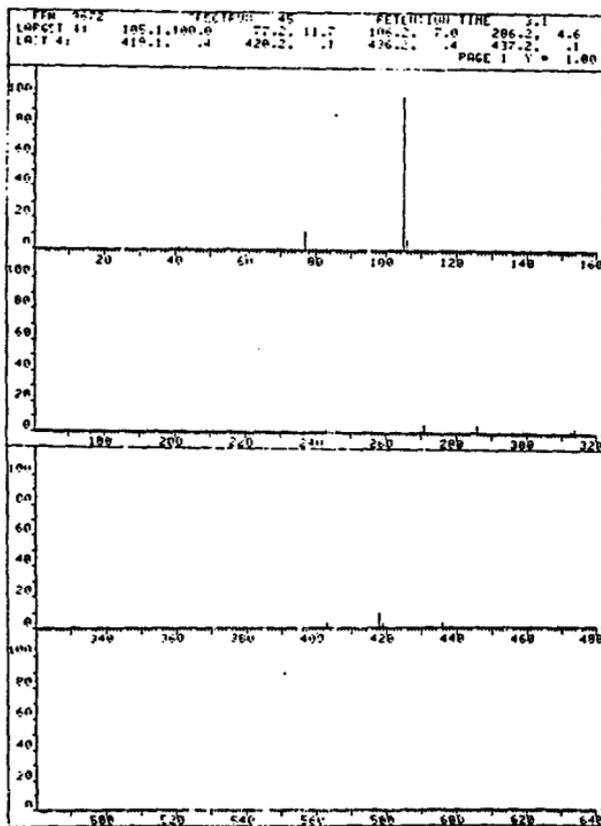


Figura 21 ESPECTRO DE MASAS POR IMPACTO ELECTRONICO A 70 eV (250 °C) PARA LA HORMINONA BENZOILADA.

71



IV



FALLA DE ORIGEN

Figura 22 ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DETERMINADO A 300 Mhz PARA LA HORMINONA METILADA.

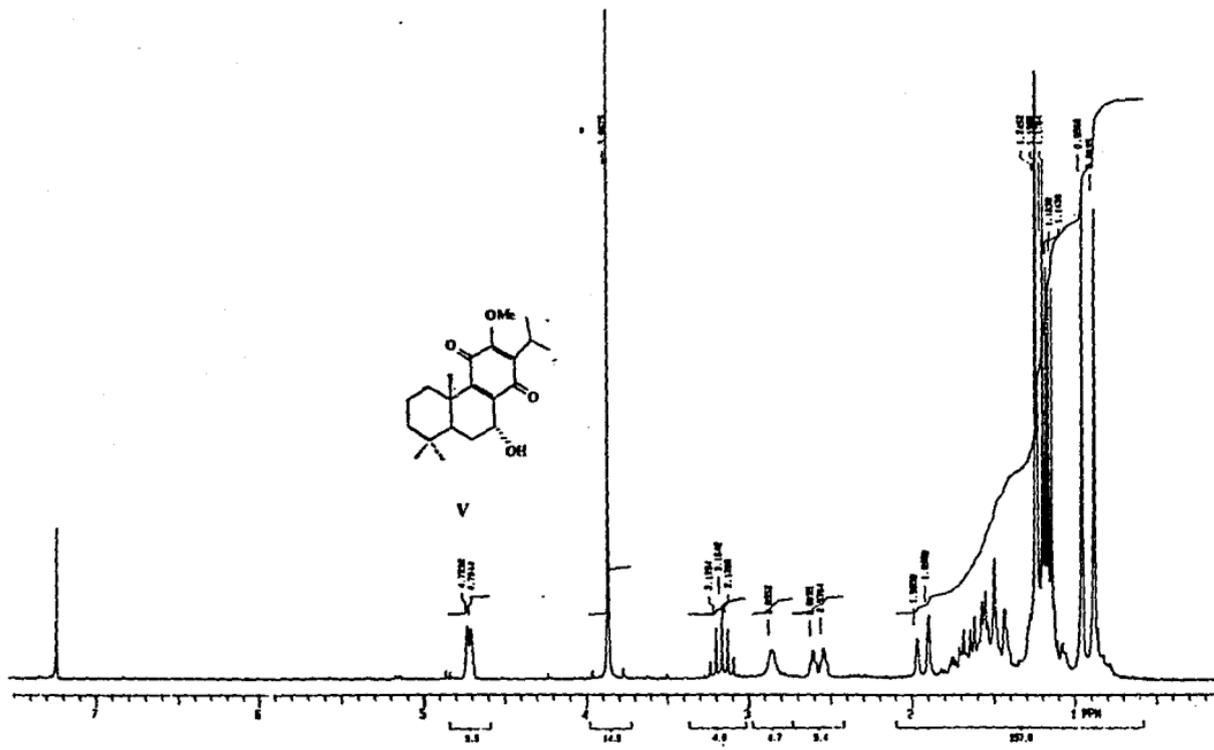
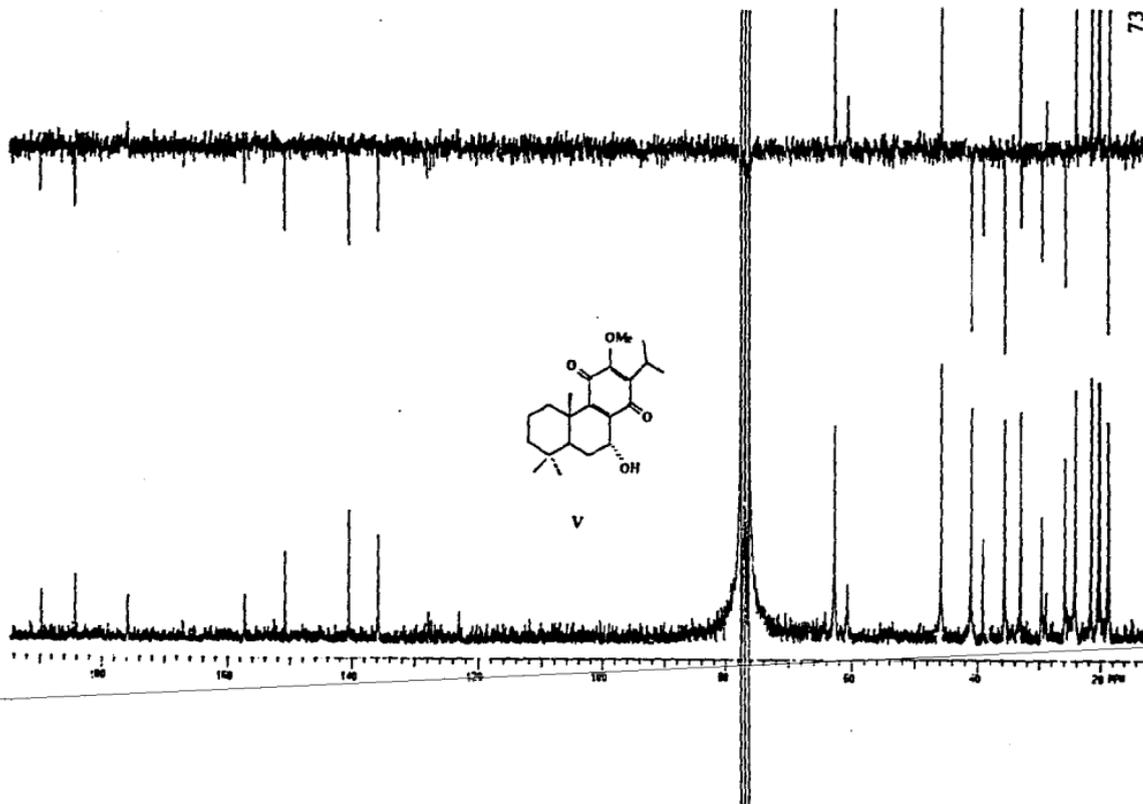


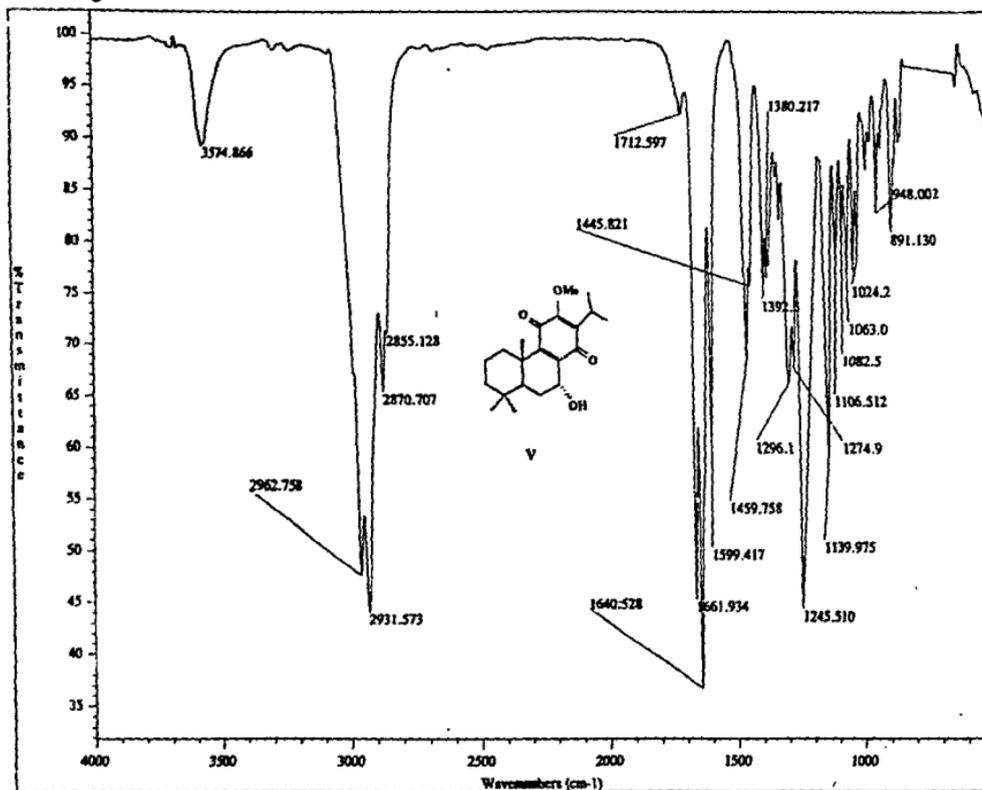
Figura 23 ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DETERMINADA A 75.5 Mhz PARA LA HORMINONA METILADA.

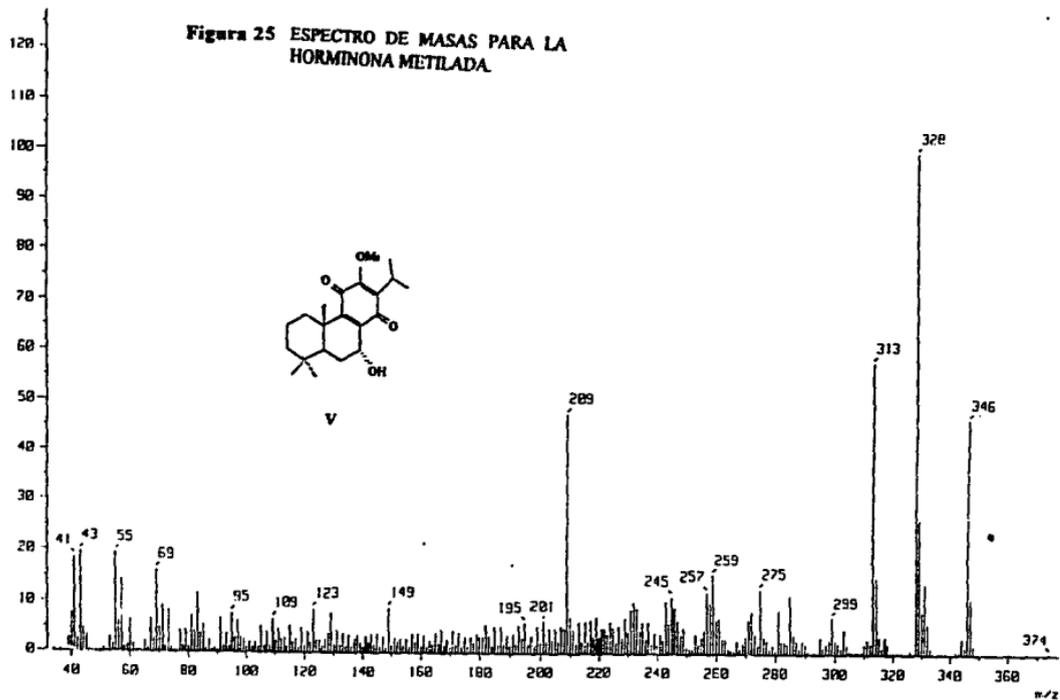


73

FALLA DE ORIGEN

Figura 24 ESPECTRO DE ABSORCION DE INFRARROJO PARA LA HORMITONA METILADA.





## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Silverman, R., *The Organic Chemistry of Drug Design and Action*, Academic Press, USA, 1992, p. 1-20.
2. De la Rosa, F., *Plantas y Yervas Medicinales de México*, 3a. ed. Editores Mexicanos Unidos, México, 1976.
3. De la Cruz, M., *Libellus de Medicinabus Indionum Herbis (Códice Badiano)*, FCE, México, 1991.
4. Madroñero, P. R., *Química Médica*, Alhambra, España 1980, p. 179-91
5. Neiss, E. S., Boy, T. A., *Pharmacogenology: The Industrial New Drug Development Process. The Clinical Research Process in the Pharmaceutical Industry*. Gary M. Mitoren. Marcel Dekker, USA, 1984, p. 1-31.
6. Testa, B., Kyburz, E., Fuhner, W., and Giger, R., *Perspectives in Medicinal Chemistry*, Hostettman, K., Hamburger, M., "Search for new lead compounds of natural origin", Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, Suiza, 1993, p. 477-88
7. Korolkovas, A., *Medicinal Chemistry*, 2nd. ed., Wiley Interscience, USA, 1988, p.67.
8. Litter, M., *Farmacología Experimental y Clínica*, El Manual Moderno, Argentina, 1989. p. 34
9. Hernández, F., Castillo, R., *Rev. Mex. Cien. Farm.*, 24, 25, (1993).
10. Martínez, M., *Las Plantas Medicinales de México*, 5a. ed. Batas, México, 1969.
11. Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, O., Cárdenas, J., *Rev. Latinoamer. Quim.*, 20, 105, (1989).
12. Romo de Vivar, A., González, J. Pérez, L., *Rev. Latinoamer. Quim.* 16, 51, (1985).
13. *Pharmaceutical Anal.*, 110, 199249s, (1985).

14. Ikeshiro, Y., Hashimoto, I., Iwamoto, Y., Mase, I., Tomita, Y., *Phytochemistry* **30**, 2791, (1991).
15. Ulubelen, A., Topcu, G., *Phytochemistry*, **30**, 2085, (1991).
16. Ulubelen, A., Topcu, G., Tan, N., *Phytochemistry*, **31**, 3637, (1992).
17. Ikeshiro, Y., Mase, I., Tomita, Y., *Phytochemistry*, **28**, 3139, (1989).
18. Collera, O., Gomora, E., García Jiménez, F., *Rev. Latinoamer. Quim.*, **11**, 60, (1980).
19. *Chem. Abs.*, **86**, 117603r, (1977).
20. *Chem. Abs.*, **43**, 5907d, (1950).
21. *Chem. Abs.*, **112**, 4342s, (1950).
22. Pereda, M., Hernández, L., López, R., *Planta Med.*, **58**, 223, (1992).
23. González, A., Andrés, L., Herrera, J., Luis, J., Ravello, A., *Can J. Chem.*, **67**, 208, (1989).
24. Ulubelen, A., Tuzlaci, E., *Fitoterapia* **61**, 185, (1990).
25. *Chem. Abs.*, **102**, 56094a, (1985).
26. Topcu, G., Ulubelen, A., Terem, B., *Fitoterapia*, **4**, 281-282, (1987).
27. Tada, M., Okuno, K., Chiba, K., Ohnishi, E., Yoshii, T., *Phytochemistry*, **35**, 2, 539-541, (1994).
28. Jonathan, L., Che, Ch., Pezzuto, J., Fong, H., Farnsworth, N., *J. Nat. Prod.*, **52**, 571, (1989).
29. Ulubelen, A., Evren, N., Tuzlaci, E., Johansson, C., *J. Nat. Prod.*, **51**, 1178-1183, (1988).
30. Kupchan, M., Karim, S., Marcks, C., *J. Org. Chem.*, **34**, 3912, (1969).
31. Funier, G., Pages, N., Cosperec, I., *Planta Med.*, **59**, 96, (1993).
32. Bruneton, J., *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Acricbia, España, 1991, p. 226-29, 243.

33. Ramírez, R., *Estudio Fitoquímico de Salvia reptans Jaqc. y un Ensayo Electroquímico Microbiológico de Horminona aislada de*, Tesis de licenciatura de la FESC-UNAM, México, 1993.
34. Gojiman, S., Turrens, J., Marini-Bettolo, Stoppani, M., *Experientia*, **41**, 647-648, (1985).
35. Isenberg, H., *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol. I, American Society for Microbiology, USA, 1992.
36. U. S. Pharmacopeia National Formulary, *The United States Pharmacopeia*, 60a. ed., 1201 Twinbrook Parway, 1985.
37. Bryan, L. E., *Antimicrobial Drug Resistance*, 1a. ed., Academic Press, U.S.A., 1984, p.194.
38. Giono, C. S., Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a antimicrobianos, *Infectología*, **7**,325, (1983).
39. Pichardo, R. E., Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos, *Infectología*, **3**, 215, (1982).
40. Williams, P. H., Stone, M. J, Hauk, P. R. and Rahman, S. K., *J. Nat. Prod.*, **52**, 3, 1189, (1989).
41. Garzón, L., Alvarez, A., García, R., *Rev. Mex. Cien. Farm.*, **22**, (1991).
42. Dominguez, X., *Rev. Soc. Quím. Mex.*, **13**, 85, (1969).
43. Vanhaelen, M., *J. Pharm. Belg.*, **44**, 242-47, (1989).
44. Nakanishi, Koji, Goto, Toshio, *Natural Products Chemistry*, Vol. I., Academic Press, USA, 1974, p. 218.
45. Matsumoto, T., Ohsuga, Y. Harada, Sh., Fukui, K., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **50**, 266-72, (1977).
- 46.- Domingez, X., González, F., Aragón, R., Gutiérrez, M., Marroquiun, J., Waston., W., *Planta Medica*, **30**, 237, (1976).
47. An Kong-Lee, Wu, W., Chang, W., Lin, H., Chin, King, M., *J. Nat. Prod.*, **50**,157, (1987).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

48. Nakanishi, T., Miyasaka, H., Nasu, M., Hashimoto, H., Yoneda, K., *Phytochemistry*, **22**, 721-722, (1983).
49. Hueso-Rodriguez, J., Jimeno, M., Rodriguez, B., Savona, G., Bruno, M., *Phytochemistry*, **22**, 2005-9, (1993).
50. M. Pastor and J. Alvarez-Builla, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **10**, 350-58, (1991).
51. Ariëns, E. J., *Medicinal Chemistry*, Vol. II, Academic Press, England, 1971, p. 70-72, 76, 81.
52. Yvonne, C., Eberhard, K., Austel, V., *Modern Drug Reseach*, Vol. 12, Marcel Dekker, USA, 1989, p.
53. King, J., Quayle, P., Malone, J., *Tetrahedron Letters*, **31**, 5221-24, (1990).
54. Foye, W. O., *Principios de Química Farmacéutica*, Tomo I, Reverté, España, 1984, p. 52-53.
55. Hawkey P., Lewis D., *Medical Bacteriology*, IRL Press, England 1989, p. 167-71.
56. Lennette, E. H., Spaulding, E. H., Truant, J. P., *Manual of Clinical Microbiology*, 2nd.ed. American Society for Microbiology, USA, 1974, p. 407.
57. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., *Amer. J. Clin. Path.*, **45**, 493-496, (1966).
58. Ericson, H. M., Sherris, J.C., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **217**, 1-90, (1971).
59. "National Committee for Clinical Laboratory Standars Performance Standars for Antimicrobial Disc Suceptibility Test, Aproved Standars ASM-2, Villanova, 1975.
60. Koneman, E., Allen, S., Dowell, V., Summers, H., *Diagnóstico Microbiológico*, Panamericana, México, 1991, p.380-401.
61. Stewart, G. N., *J. Exp. Med.*, **4**, 235-243, (1989).
62. Ur. A., Brown, D., *J. Med. Microbiol.*, **8**, 19-28, (1975).
63. Hogg, G.M., Patterson, M.F., Barr. J.G., *J. Appl. Microbiol.*, **5**, 393-96, (1977).
64. Hensch, M., Ruedi, P., Hans, C., *Helv. Chim. Acta*, **58**, 1921, (1975).

65. Mukherjee, K., *Phytochemistry*, **22**, 1296, (1983).
66. Ulubelen, A., *Phytochemistry*, **26**, 1534, (1987).
67. Edwards, O., Feniak, G., Los, M., *Can. Journal of Chem.*, **40**, 1540, (1962).
68. Ruedi, P., *Helv. Chim. Acta*, **67**, 116-1120, (1984).
69. Janot, P., Potier, P., *Ann. Pharm. Françaises*, **22**, 387-395, (1964).
70. Bhat, S., Salyanaraman, H., Kohl, S., *Tetrahedron*, **31**, 1001-1004, (1975).
71. De la Torre, M., Bruno, M., Rodriguez, B., Savona, G., *Phytochemistry*, **31**, 3953-3955, (1992).