



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL CACALOL Y SUS DERIVADOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTA:

AIDA SOTO HERNANDEZ



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2002





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Jurado asignado:

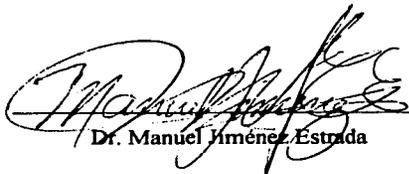
Presidente	Prof. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS
Vocal	Prof. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Secretario	Prof. ROSA MARÍA ERÉNDIRA PÁEZ AGUIRRE
1er. Suplente	Prof. MARTHA LYDIA MACIAS RUBALCAVA
2º. Suplente	Prof. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

Sitios donde se desarrolló el tema:

UNAM, Instituto de Química, Laboratorio 2-10

UNAM, FES Iztacala, UBIPRO, Laboratorio de Fitoquímica

Asesor del tema:


Dr. Manuel Jiménez Estrada

Sustentante:


Aida Soto Hernández

A mis padres José C. Soto Carrillo y Clemencia Hernández Olguín.

A mis hermanos Patricia, Citlali, Alejandra y Gabriel.

A mi sobrino José Manuel

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser mis guías en todos los aspectos... los quiero mucho.

A mis hermanos, por compartir todas las aventuras desde que "salimos de casa".

A mi abuelita Sabina por enseñarme la manera de enfrentar los obstáculos.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada por fomentar mi desarrollo como profesional de la Química y como ser humano.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña y al Biol. Daniel López González por la asesoría en la reacción de nitración.

A la M. en C. Ana María García Bores, al Dr. Guillermo Avila A. y a los integrantes de la UBIPRO de la FES Iztacala por su ayuda en la realización de las pruebas biológicas.

A la M. en C. Elisa Vega Ávila, a la Dra. Ángeles Sánchez Contreras, a la M. en C. Rosario Ruiz de Esparza y al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por su asesoría en el laboratorio y, sobre todo, por su amistad.

A mis compañeros de los laboratorios 2-5 y 2-10 del Instituto de Química por los gratos momentos dentro y fuera del Instituto.

A mis compañeros de la Facultad de Química por compartir conmigo esta importante etapa.

A mis profesores de la Facultad de Química por su dedicación en las labores docentes.

Al Proyecto de Becas para Tesis de Licenciatura (PROBETEL) por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	
1.1 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	2
1.2 <i>Psacalium decompositum</i>	4
1.3 NITROFURANOS	6
1.4 NITROBENZOFURANOS	8
1.5 MECANISMOS DE ACCIÓN PROBABLES	14
1.6 MÉTODOS GENERALES DE NITRACIÓN	21
1.7 IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS ESTUDIADOS	24
2. OBJETIVOS	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4. SECCIÓN EXPERIMENTAL	
4.1 OBTENCIÓN DE COMPUESTOS	36
4.2 PRUEBAS ANTIMICROBIANAS	40
5. CONCLUSIONES	42
6. BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXO 1 (ESPECTROS DE IR, RMN ¹ H y EM).....	47
ANEXO 2 (MÉTODO DE KIRBY - BAUER y MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN AGAR)	59

INTRODUCCIÓN

La aparición de microorganismos patógenos resistentes a los antimicrobianos, ha disminuido considerablemente el valor terapéutico de estos fármacos. Este hecho ha fomentado que varios investigadores se encuentren en una búsqueda constante de fármacos antimicrobianos más efectivos.

Las plantas ofrecen un amplio espectro de compuestos, entre los cuales es muy probable encontrar sustancias que posean actividad antimicrobiana.

La infusión acuosa de la raíz de *Psacalium decompositum* tiene, entre otras, la propiedad de ser antiséptico. En estudios previos se detectó la presencia de cacalol en dicha infusión y se propuso como el compuesto responsable de algunas de las acciones medicinales.

El cacalol posee un anillo de benzofurano. Estudios anteriores han demostrado que los benzofuranos con un grupo nitro en la posición 2, poseen propiedades bactericidas y parasiticidas.

Con base en la información anterior, en este trabajo se plantearon como objetivos llevar a cabo la nitración del cacalol usando como agente nitrante N_2O_4 (generado *in situ* por la reacción de tetrahidrofurano con ácido nítrico) y posteriormente comparar la actividad antimicrobiana del cacalol y su derivado nitrado.

El cacalol no se puede nitrar directamente ya que contiene un OH libre que provoca la oxidación de la molécula, dando como resultado una mezcla compleja de productos. Debido a esto, el cacalol se sometió a una reacción de acetilación y posteriormente a la reacción de nitración en la cual se obtuvo el 2-nitroacetato de cacalol. La hidrólisis básica del 2-nitroacetato de cacalol produjo el compuesto deseado, 2-nitrocacalol.

La actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados se evaluó por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) y el método de microdilución en agar. Los resultados de las pruebas mostraron que el grupo OH libre es esencial para que el compuesto posea actividad antibacteriana. La introducción del grupo nitro a la molécula de cacalol aumentó de manera significativa la actividad antibacteriana. En el caso de *Candida albicans*, el 2-nitrocacalol fue menos activo que el cacalol (de acuerdo al método de microdilución en agar).

El cacalol y su derivado nitrado en posición dos, poseen acción bacteriostática.

1. ANTECEDENTES

1.1 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

El desarrollo de fármacos capaces de prevenir y curar las infecciones bacterianas constituye una de las principales contribuciones del siglo veinte a la longevidad y calidad de vida humana. Los antibacterianos figuran entre los fármacos más recetados en todo el mundo (Archer y Polk 1998); sin embargo, a pesar de la disponibilidad de antibióticos clínicamente útiles, aun es indispensable una búsqueda continua de nuevos agentes antimicrobianos debido al surgimiento de cepas de microorganismos resistentes (Rios *et al.* 1988; Williams 2002). La resistencia a las terapias antimicrobianas produce varios efectos, entre ellos se encuentran la disminución de la efectividad de los fármacos y de las opciones de tratamiento, lo cual conlleva a un aumento de la morbilidad y la mortalidad (Smith y Coast 2002). Esto constituye un problema serio ya que las enfermedades infecciosas causan 45% de muertes en países en vías de desarrollo (Williams 2002).

Las poblaciones bacterianas resistentes proliferan en zonas de gran utilización de antimicrobianos, donde adquieren ventaja selectiva sobre las poblaciones sensibles (Jawetz *et al.* 1999). Los microorganismos encontrados con mayor frecuencia en el medio hospitalario son los bacilos gramnegativos multi-resistentes, *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y enterococos resistentes a vancomicina. Por otra parte, en el medio extrahospitalario, los microorganismos resistentes incluyen miembros de la familia Enterobacteriaceae (como *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*), *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophylus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* (Sefton 2002).

La resistencia de las bacterias a los agentes antimicrobianos puede ser intrínseca o adquirida. La **resistencia intrínseca** es la resistencia 'natural' poseída por una especie bacteriana y regularmente está especificada por los genes cromosómicos. Algunos ejemplos de esto lo constituyen las bacterias anaerobias obligadas las cuales poseen resistencia intrínseca a los aminoglucósidos y las bacterias gramnegativas a la vancomicina. Por otra parte, la **resistencia adquirida** ocurre en células sensibles, debido a alteraciones del genoma existente o por transferencia de información genética entre las células. La resistencia adquirida constituye una de las principales limitaciones de la eficacia de la quimioterapia antibacteriana (Towner 1995; Jawetz *et al.* 1999).

Los principales mecanismos por los cuales las bacterias resisten a la acción de los agentes antimicrobianos se subdividen en cuatro grupos (Towner 1995), los cuales son:

- a) destrucción o inactivación del antibiótico;
- b) alteración del sitio "blanco" para disminuir o eliminar la unión del antibiótico al blanco;
- c) una reducción en la permeabilidad de la superficie celular o bloqueo del mecanismo por el cual el antibiótico entra a la célula;
- d) desarrollo de una vía metabólica diferente que pasa por alto la reacción inhibida por el fármaco.

En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de antibióticos y los mecanismos de resistencia involucrados.

Tabla 1. Mecanismos de resistencia para los principales grupos de antibióticos*

Inactivación o modificación	Sitio blanco alterado	Permeabilidad reducida	Vía metabólica alterna
Antibióticos β -lactámicos Cloramfenicol Aminoglucósidos	Antibióticos β -lactámicos Estreptomicina Cloramfenicol Eritromicina Quinolonas Rifampicina Glucopéptidos	Antibióticos β -lactámicos Tetraciclinas Cloramfenicol Quinolonas	Trimetoprim Sulfonamidas

* Tabla obtenida de: Greenwood, D. Antimicrobial Chemotherapy. Third edition. Oxford University Press. New York, 1995. pp. 148.

1.2 *Psacalium decompositum*

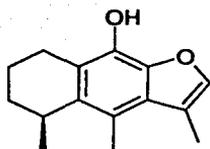
Una de las estrategias que se plantean para hallar nuevos antimicrobianos, es la búsqueda de compuestos con estructuras diferentes de las que se usan actualmente. Estos compuestos pueden ser extraídos de plantas superiores, tomando en cuenta el enorme número y la diversidad estructural de sus constituyentes. Dichas sustancias deben exhibir, de preferencia, un amplio espectro de actividad (Rios *et al.* 1988).

La planta *Psacalium decompositum* A. Gray forma parte de un complejo de plantas medicinales conocido comúnmente como 'matarique'. Esta planta pertenece a la familia Asteraceae (tribu de las senecionides) y es conocida también como *Senecio grayanus*, *Hemsley*, *Cacalia decomposita* A. Gray, *Mesadenia decomposita* A. Gray. Crece en Sonora y Chihuahua (Martínez 1959; Díaz 1976).

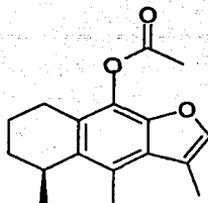
Psacalium decompositum es una planta herbácea, de aproximadamente un metro de altura. El tallo es subleñoso, anguloso y lanoso en la base. Posee una o dos hojas radicales hasta de 40 cm de largo por 25 de ancho, divididas en segmentos agudos. Tiene cabezuelas en corimbos de color blanco. Está provista de un rizoma fibroso el cual es de unos cuantos centímetros, vellosos en la base y con numerosas raíces delgadas de color amarillo claro. Tiene olor aromático y sabor picante y amargo. Florece en septiembre y octubre (Martínez 1959; Díaz 1976).

La parte de la planta que se emplea en la medicina tradicional es el rizoma con las raíces. Las aplicaciones terapéuticas de esta planta son diversas. La tintura se utiliza para calmar los dolores reumáticos, las neuralgias y para favorecer la cicatrización de las úlceras y las heridas. El cocimiento de la raíz se utiliza contra la diarrea, la gota, la congestión del hígado, contra la diabetes, como antiséptico, antineurálgico, astringente y catártico (Martínez 1959; Díaz 1976).

Romo *et al.* en 1964 aislaron y caracterizaron algunos de los componentes del extracto hexánico de la raíz, entre los cuales el cacalol es uno de los más abundantes. La estructura del cacalol (1a) fue establecida de manera definitiva por Soriano *et al.* en 1987.



1a



1b

Jiménez *et al.* en 1992 probaron la actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y hexánico de la raíz de *Psacalium decompositum* por el método de antibiograma y encontraron que los extractos causaron efectos sobre *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. En el mismo estudio, el acetato de cacalol (**1b**) mostró actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Cryptococcus neoformans*.

Los estudios de Delgado *et al.* en el 2001 demostraron que el cacalol posee actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus michrants* y *Candida albicans*.

1.3 NITROFURANOS

Los derivados del furano se usan como antibacterianos y la presencia de un grupo nitro en la posición 5 aumenta dicha actividad (Litter 1992; Dax 1997).

En la figura 1 se muestran los antimicrobianos nitrofuránicos más utilizados. Las propiedades farmacocinéticas de dichas sustancias, están dadas por el sustituyente que poseen en la posición dos del anillo de furano. La nitrofurazona o nitrofurazol (2) es un compuesto sintético que, al no ser absorbido, es utilizado como antiséptico local para la piel y mucosas. La nitrofurantoina (3) se absorbe en el tracto digestivo y presenta un proceso de eliminación rápido, concentrándose rápidamente en la orina; esto permite emplearla como antiséptico de las vías urinarias. El fármaco furazolidona (4) se absorbe poco en el intestino y se utiliza como antiséptico intestinal en la giardiasis (Litter 1992; Dax 1997).

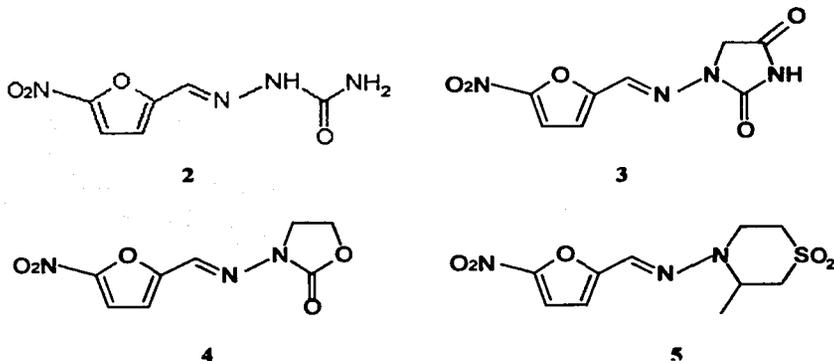


Figura 1. Nitrofuranos de mayor uso como antimicrobianos en humanos. Nitrofurazona (2), nitrofurantoina (3), furazolidona (4) y nifurtimox (5)

Los compuestos 2, 3 y 4 muestran acciones bacteriostáticas o bactericidas *in vitro*. La actividad máxima de estos compuestos se presenta a pH ácido. Los microorganismos susceptibles son: a) cocos grampositivos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus faecalis*; b) bacilos grampositivos como *Bacillus anthracis* y el género *Clostridium*; c) bacilos gramnegativos como *Escherichia coli*, *Haemophylus influenzae*, los géneros

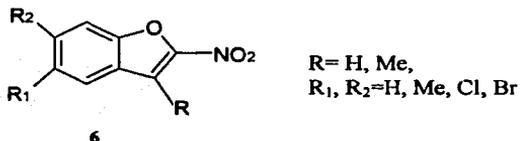
Salmonella y *Shigella*. Las cepas de *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bordetella pertussis* son menos susceptibles, mientras que *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa* son prácticamente no susceptibles. Los hongos y los virus no son sensibles a dichos fármacos (Litter 1992; Dax 1997).

El compuesto nifurtimox (5) es utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es la infección producida en el hombre y animales por *Trypanosoma cruzi* (Tay 1998; Kirchhoff 1998). En su forma crónica, esta enfermedad es una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en muchas regiones de Latinoamérica, entre ellas México. Según datos de Kirchhoff, en 1998 existían 16 a 18 millones de personas infectadas de forma crónica por *T. cruzi*.

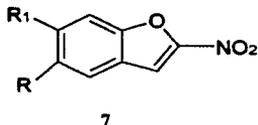
Los nitrofuranos ejercen acciones semejantes sobre las células procarióticas y eucarióticas. Esta falta de acción selectiva es responsable de las toxicidades asociadas con estos agentes. No obstante, Litter y Dax afirman que las bacterias reducen al fármaco con mayor rapidez que las células de mamíferos y ello explica su acción antimicrobiana; además no es clara la relevancia de estos ensayos con respecto al uso a corto plazo. Otro aspecto importante es que debido a estas toxicidades potenciales, los nitrofuranos y los nitroimidazoles son frecuentemente usados para infecciones del tracto urinario, más que para uso sistémico.

1.4 NITROBENZOFURANOS

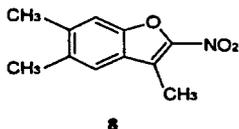
Royer *et al.* en 1971, encontraron que algunos derivados del compuesto 6 poseían actividad *in vivo* e *in vitro* contra *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba dysenteriae* y contra nemátodos en ratones.



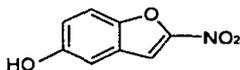
Royer *et al.* en 1972 evaluaron algunos derivados del compuesto 7 y encontraron que el compuesto con los sustituyentes R=MeO y R₁=H inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* 548, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus niger*, *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba dysenteriae*.



Cavier *et al.* en 1972 encontraron que el compuesto 3,5,6-trimetil-2-nitrobenzofurano (8) tuvo efecto amebicida contra *Entamoeba histolytica* *in vitro* e *in vivo*. Además el compuesto tuvo efecto antihelmíntico en ratones infestados con *Syphacia obvelata*. Estos resultados fueron complementados en 1976 por Cavier y Cenac, quienes estudiaron las propiedades amebicidas de algunos nitrobenzofuranos sustituidos. Los resultados mostraron que los compuestos no nitrados fueron inactivos, así como los derivados con un grupo nitro en las posiciones 3, 5 o 6. Solo los compuestos con el grupo nitro en la posición 2 tuvieron actividad amebicida. El compuesto más activo fue el 8.

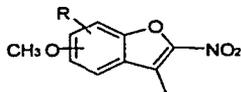


Continuando con los estudios sobre nitrobenzofuranos, *Cavier et al.* en 1973 investigaron el efecto del 5-hidroxi-2-nitrobenzofurano (**9**) y encontraron que presentaba efecto en ratones infestados con *Tricomonas vaginalis*. *Royer et al.* en 1974 investigaron sobre este mismo compuesto y encontraron que inhibió el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Sacharomyces cerevisiae*.



9

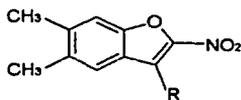
En otro estudio, *Royer et al.* en 1974, encontraron que los derivados 2-nitrobenzofuránicos del compuesto **10** tuvieron efectos amebicidas y tricomonicidas.



R = NO₂ ó CH₃CO-

10

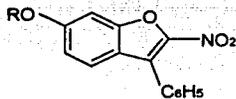
En el mismo año, *Royer et al.* encontraron que los derivados de **11** fueron tricomonicidas y amebicidas *in vitro* y antihelmínticos cuando se administraron por vía oral a ratones.



R = NO₂; R₁ = hexil, isopropil,

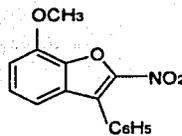
11

Scherrer en 1975 encontró que los compuestos **12**, **13** y **14** presentaban actividad bactericida contra *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.*



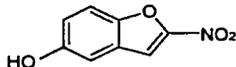
12: R = CH₃

13: R = CH₂CH₃

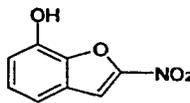


14

Buisson *et al.* en 1975 estudiaron los efectos parasiticidas y bacteriostáticos de los compuestos 15 y 16 y encontraron que estos efectos eran relativamente debilitados por eterificación o esterificación del grupo hidroxilo o por bromosustitución sobre el anillo benzénico.

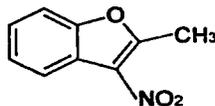


15



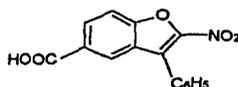
16

Powers, en 1976, probó la actividad antimicrobiana del 2-metil-3-nitrobenzofurano (17) y sus análogos que contenían los sustituyentes 7-NO₂, 5-NO₂, 7-Br, 7-CONH₂ y 7-CF₃. Los resultados indicaron que los compuestos poseían propiedades bacteriostáticas. Asimismo, encontraron que el espectro de actividad de estos compuestos es similar al de la nitrofurazona; sin embargo el 3,7-dinitro-2-metilbenzofurano fue más activo que ésta. Las bacterias contra las que se probaron los derivados fueron: *E. coli B*, *E. coli Br*, *E. coli Br 207*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.



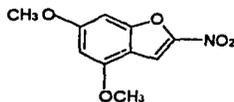
17

Scherrer en 1977 menciona que los 3-fenil-2-nitro-benzofuranos sustituidos (**18**) son útiles como bactericidas.

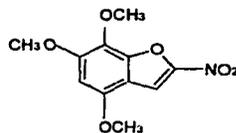


18

Royer *et al.* en 1977 prepararon metoxi- derivados de los 2-nitrobenzofuranos y encontraron que los derivados más activos contra *Entamoeba histolytica* fueron **19** y **20**. Estos hallazgos se contraponen a los resultados obtenidos por Buisson *et al.* acerca de la presencia de grupos metoxilo en la actividad antimicrobiana.



19



20

Kuriyama *et al.* en 1978 encontraron que los derivados sustituidos en la posición 7 de 2-nitrobenzofuranos poseen una alta actividad contra bacterias grampositivas y negativas y presentan baja citotoxicidad. El tamaño del sustituyente en la posición 7 determina la relación inversa entre la actividad antibacteriana y la citotoxicidad.

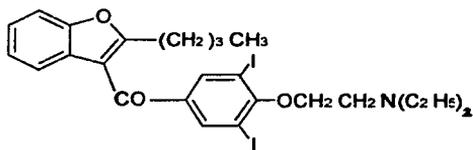
Royer *et al.* en 1978 evaluaron benzofuranos dinitrosustituidos en las posiciones 2,4-; 2,5-; 2,6- y 2,7-. Los resultados mostraron que dichos compuestos fueron menos activos que el 2-nitrobenzofurano contra bacterias gramnegativas, hongos y protozoarios, pero fueron más activos contra bacterias grampositivas.

Cavier *et al.* en 1979 encontraron que el compuesto 4,6,7-trimetoxi-2-nitrobenzofurano presentó actividad *in vivo* contra *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* en ratas.

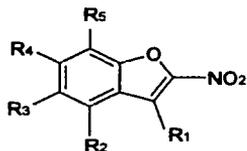
Royer *et al.* en 1983 encontraron que algunos de los 2-nitrofuranos que prepararon fueron muy efectivos contra *Syphacia obvelata*. Cuando tales compuestos presentaban un grupo amino en la posición 3, no se observaba actividad biológica, mientras que un grupo alquilo en esta posición era necesario para la actividad oxiuricida.

Einhorn *et al.* en 1984, propusieron que algunas propiedades biológicas ejercidas por los 2-nitrobenzofuranos pueden ser modificadas o realzadas por la presencia de un grupo alquilo en la posición 3. Estos efectos no han sido debidamente investigados ya que la síntesis de 3-alkil-2-nitrobenzofuranos casi siempre es difícil.

En un intento por identificar una especie química con un índice terapéutico mucho más favorable que el nifurtimox, Kinnamon *et al.* en 1998 evaluaron una nueva serie de nitrofuranos. Aunque el benzofurano amiodarona (**21**) ha sido usado por sus propiedades antiaritmicas en pacientes con enfermedad de Chagas, sus análogos nitrobenzofuránicos, no habían sido evaluados para su actividad contra *Trypanosoma cruzi*. La actividad supresora de los compuestos contra tripomastigotes de *T. cruzi* se determinó en la sangre de ratones infectados. Los compuestos poseían la estructura básica de **22**.



21



22

La actividad de cada compuesto se comparó con la actividad del nifurtimox mediante la fórmula:

$$\text{Índice de nifurtimox (IN)} = \frac{SD_{50} \text{ para nifurtimox}}{SD_{50} \text{ para el compuesto de prueba}}$$

En la fórmula, SD (supresion degree) representa la cantidad de compuesto (mg/Kg) la cual produjo la supresión de la infección en un 50%.

Un índice de nifurtimox mayor de 1 indicó que el compuesto de prueba era más activo que el compuesto de referencia.

La presencia de efectos tóxicos se observó por el nivel de actividad física, cambio en el peso corporal, apariencia del pelo y muerte. Los resultados indicaron que la toxicidad fue igual a la observada al administrar nifurtimox.

De los 60 compuestos evaluados, 23 fueron activos. El compuesto más activo (grupo fenilo en la posición R_1 y un grupo carbohidroxi en la posición R_3) fue 1.60 veces más efectivo que el nifurtimox. Por otra parte, los compuestos con grupos 4-bromofenil, 3-clorofenil y 2-fluorofenil en la posición R_1 y un grupo carbohidroxi en R_3 , fueron tan efectivos como el nifurtimox. Un compuesto con un grupo fenilo en R_1 y un carbohidroximetil en R_5 produjo un agente que fue supresor pero solo un cuarto comparado con el estándar. Varios compuestos con la estructura básica de R_1 -fenilo y con diferentes sustituyentes en R_5 produjeron agentes que no fueron efectivos.

1.5 MECANISMOS DE ACCIÓN PROBABLES

El modo de acción de los nitrobenzofuranos es desconocido. Kinnamon *et al.* en 1998 propusieron que estos compuestos pueden actuar de manera similar a los nitrofuranos.

Varios autores han tratado de explicar el mecanismo por el cual los nitrofuranos ejercen su acción antimicrobiana; sin embargo, aun no se tiene un mecanismo que explique satisfactoriamente todos los efectos de dichos compuestos.

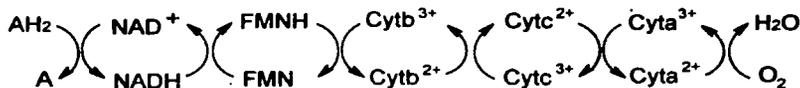
Con el fin de presentar un panorama general de la acción de estos compuestos, hemos agrupado los mecanismos propuestos por diferentes autores en tres categorías: 1) interacción del nitrofurano sin metabolizar con algún componente de la célula, 2) reducción del 2-nitrofurano y formación de metabolitos intermediarios reactivos y 3) formación directa de radicales libres generados durante el metabolismo del 2-nitrofurano. Como se verá a continuación, los mecanismos descritos no son completamente independientes.

1.5.1 Interacción del nitrofurano sin metabolizar con algún componente de la célula

En 1967 Hirano *et al.* propusieron que las moléculas de 2-nitrofurano inhiben la transferencia de electrones acoplada con el NADH de la cadena respiratoria bacteriana. En este mecanismo se asume que el NADH es el donador de electrones ya que es capaz de reducir a los nitrofuranos debido a la diferencia de los potenciales redox.

En la figura 2 se presenta un esquema de la cadena de transporte de electrones de la bacteria en ausencia y presencia del nitrofurano.

(a)



(b)

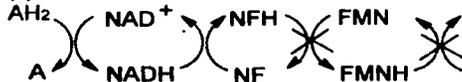


Figura 2. Efecto de los nitrofuranos en la cadena de transporte de electrones en bacterias (Hirano *et al.* 1967). (a) Transporte normal, (b) Transporte inhibido por los nitrofuranos.

Cénas *et al.* en 1991 y Kinnamon *et al.* en 1998 propusieron que el mecanismo de acción de los nitrofuranos era mediante la inhibición de la enzima glutatión reductasa. Los autores establecieron que los nitrofuranos inhiben la oxidación reversible del NADPH por glutatión (GSSG), la cual es catalizada por la enzima glutatión reductasa. Por esta razón los compuestos que actúan como inhibidores o inactivadores de la glutatión reductasa son frecuentemente utilizados como agentes antitumorales y antiparasitarios.

La enzima glutatión reductasa contiene FAD y disulfuro en el centro. Durante la reacción, el NADPH reduce el FAD el cual transfiere los electrones al disulfuro formando un complejo de transferencia de carga. El disulfuro reducido es después oxidado por el GSSG. La glutatión reductasa es responsable del mantenimiento de concentraciones lo suficientemente altas de glutatión reducido (GSH) en la célula, y se considera como una de las enzimas clave en la protección contra el estrés oxidativo (Cénas *et al.* 1991).



Los nitrofuranos también inhiben la enzima relacionada tripanotona reductasa, la cual depende de NADPH. Este mecanismo está involucrado en la actividad de los nitrofuranos contra los tripanosomas (Kinnamon *et al.* 1998).

Como se ha descrito, el glutatión en su forma reducida (GSH) protege a la célula del estrés oxidativo; esto es, el GSH sufre reacciones reversibles en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species), las cuales son los causantes del estrés oxidativo. El mecanismo de acción descrito en esta sección está relacionado con el mecanismo de formación directa de radicales libres descrito en la sección 1.5.3.

1.5.2 Reducción del 2-nitrofurano y formación de metabolitos intermediarios reactivos

Varios autores coinciden en el hecho de que las enzimas que reducen a los nitrofuranos son necesarias para su activación. Durante la reacción se forman productos intermediarios fuertemente reactivos (intermediarios nitrosamina e hidroxilamina), y son los que (supuestamente) explican la capacidad de estos compuestos para lesionar el ácido desoxirribonucleico (Litter 1992; Debnath *et al.* 1993; Dax 1997).

Las nitrorreductasas se clasifican por su sensibilidad relativa al oxígeno, las insensibles al oxígeno, o nitrorreductasas tipo I, usan un mecanismo de reducción de dos electrones, y son capaces de reducir el grupo nitro en condiciones aerobias. Las nitrorreductasas de tipo I han sido descritas en muchas bacterias, particularmente las enterobacterias, donde son llamadas nitrorreductasas clásicas (Kitts *et al.* 2000). Por su parte, las nitrorreductasas de tipo II son sensibles al oxígeno y reducen a los nitrofuranos en condiciones anaerobias. La acción de estas enzimas se describe en la sección 1.5.3.

Las enzimas nitrorreductasas son diferentes de las reductasas asimiladoras y desasimiladoras nitrato / nitrito ya que no reducen los nitratos a nitritos y no son parte de ninguna cadena respiratoria, tampoco proveen una fuente de nitrógeno reducido para el crecimiento celular. Se piensa que las nitrorreductasas se expresan solo constitutivamente y sus funciones fisiológicas no son claras (Kitts *et al.* 2000).

Los compuestos más comúnmente observados durante la nitro reducción son las hidroxilaminas aromáticas; no obstante, Kitts *et al.* también proponen la formación de un grupo funcional nitroso durante esta reducción biológica.

Varios autores han postulado que los nitrofuranos poseen la capacidad de causar mutagénesis en bacterias.

Debnath *et al.* en 1993 propusieron un mecanismo de daño al ADN (figura 3). En este mecanismo el grupo nitro es reducido por la reductasa bacteriana a la hidroxilamina, la cual ataca el ADN vía el ión nitrenio. Otros metabolitos caracterizados en la reducción de los nitrofuranos son los aminofuranos y sus nitrilos isoméricos de cadena abierta, pero estos no parecen ser mutagénicos o tóxicos.

Debnath *et al.* proponen una relación estructura-actividad cuantitativa para los nitrofuranos en relación a la actividad mutagénica y genotóxica en la bacteria *Salmonella typhimurium*. Estudiaron varios 2-nitrofuranos y encontraron que una baja densidad electrónica en el carbono 2 debilita el enlace carbono-oxígeno promoviendo la ruptura del enlace y la reacción de eliminación. Una alta densidad electrónica en el carbono 2 estabiliza el anillo de furano incrementando la probabilidad de reacción con el ADN.

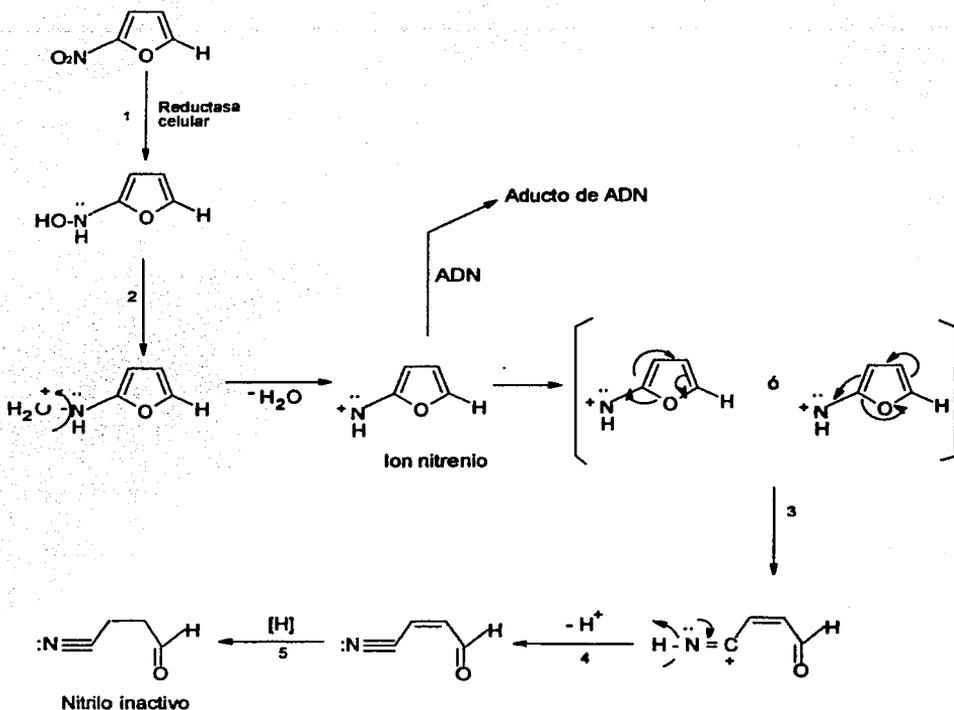


Figura 3. Mecanismo posible de mutagénesis y apertura del anillo de nitrofurano. (Basado en el artículo de Debnath *et al.* 1993).

En el estudio se plantea que los nitrofuranos causan mutagenicidad vía un ión nitrenio el cual podría formarse a partir de la hidroxilamina o uno de sus ésteres como se muestra en los pasos 1 y 2. También se plantea una eliminación como reacción alternativa (paso 3). Los autores no han aislado el nitrilo insaturado propuesto como intermediario; al parecer, este compuesto es reducido enzimáticamente al nitrilo saturado el cual ya ha sido aislado.

La figura 4 es un mecanismo alternativo que Debnath *et al.* proponen para la formación del nitrilo. Una baja densidad electrónica sobre C2 ayudaría a la enolización del paso 2. Los autores plantean que el punto débil en este esquema es cómo ocurre la ruptura con deshidratación de la oxima al nitrilo.

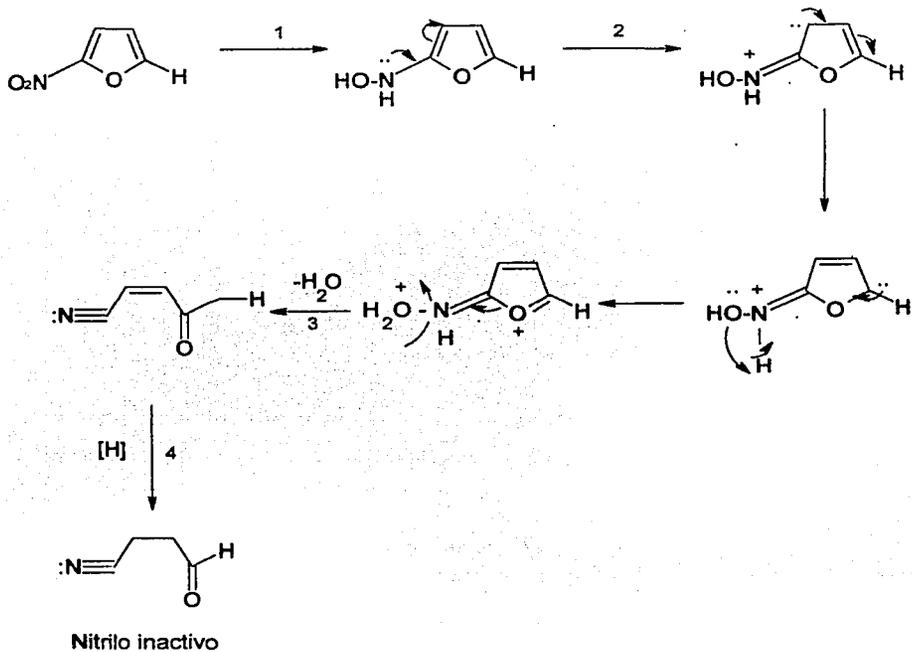


Figura 4. Mecanismo alternativo de formación del nitrilo inactivo (Debnath *et al.* 1993).

Los autores concluyen que una alta densidad electrónica sobre el átomo de carbono 2 promueve la mutagenicidad. Una baja densidad electrónica en este punto promovería la pérdida del potencial ión nitrenio. Aun no se conoce si este mecanismo es o no correcto, se requiere más trabajo experimental.

1.5.3 Formación directa de radicales libres generados durante el metabolismo del 2-nitrofurano

De acuerdo a estudios de Kinnamon *et al.* en 1998, la acción de los nitrofuranos está determinada por su habilidad para ser reducidos por la vía de un electrón a los correspondientes aniones radicales fácilmente reoxidables por el oxígeno, lo cual conduce a la formación de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

Las nitrorreductasas sensibles al oxígeno, o nitrorreductasas tipo II, reducen los grupos nitro en un proceso de un electrón, formando un anión radical nitro. En presencia de oxígeno, el anión radical nitro puede ser reoxidado a un grupo nitro, y se produce un anión superóxido. Mientras el oxígeno esté presente, se lleva a cabo un ciclo, el cual consume equivalentes reductores a través de la nitro reductasa sin la reducción neta del grupo nitro. De esta manera, las nitrorreductasas tipo II solo son capaces de reducir el grupo nitro en condiciones anaerobias (Kitts *et al.* 2000).

Gajewska *et al.* en 1990 estudiaron el efecto del ácido ascórbico y el selenito de sodio sobre las actividades mutagénica y carcinogénica de la nitrofurantoína y la nitrofurazona. Los autores proponían, al inicio del experimento, que los radicales libres formados durante el metabolismo de los nitrofuranos, eran responsables de la actividad mutagénica y carcinogénica asociada con estos compuestos. Debido a que el ácido ascórbico y el selenito de sodio son agentes antioxidantes que reaccionan con los radicales libres, al administrar los agentes antioxidantes se esperaba que no se presentaran los efectos mutagénico y carcinogénico de los nitrofuranos. Sin embargo, los resultados mostraron que ambos antioxidantes no tuvieron un efecto antimutagénico significativo lo cual podría deberse a la baja participación de los radicales libres de oxígeno en la actividad genotóxica de los nitrofuranos. Los autores concluyeron que era posible que los efectos genotóxicos de los nitrofuranos se debieran a sus derivados nitroso e hidroxilamino que surgen en los últimos pasos de su reducción, independientemente del contenido de oxígeno y presencia o ausencia de antioxidantes. Además, los autores proponen que la relación entre la mutagenicidad bacteriana y la genotoxicidad en animales de la nitrofurazona y furazolidona puede ser fortuita, debido a que las respuestas mutagénicas producidas por los nitrofuranos en las bacterias pueden no ser relevantes para el potencial carcinogénico de estos compuestos en otros sistemas biológicos.

Como se ha revisado, los nitrofuranos tienen acción en varios blancos bacterianos y quizás debido a esto, la resistencia no es un problema con el uso de estos agentes (Dax 1997).

1.6 MÉTODOS GENERALES DE NITRACIÓN

La reacción de nitración es una de las reacciones más estudiadas en la química orgánica debido a que permite la formación de enlaces carbono-nitrógeno, los cuales solo pueden ser formados en las plantas mediante la reducción de los nitratos.

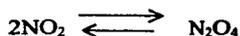
Para realizar la nitración directa de productos naturales o metabolitos secundarios se requieren condiciones suaves de reacción debido a la polifuncionalidad que presentan estos compuestos (Jiménez *et al.* 1999).

Ayala, en 1991 hizo una extensa revisión de los diferentes métodos de nitración existentes para furanos y benzofuranos. Entre los ejemplos de nitración de benzofuranos, se encuentran los siguientes:

- Reacción con ácido nítrico
- Reacción con una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico
- Reacción con ácido nítrico y ácido o anhídrido acético
- Reacción con trióxido de dinitrógeno
- Reacción con ácido nitroso
- Reacción con tetranitrometano
- Reacción con tetróxido de dinitrógeno

Dióxido de nitrógeno / Tetróxido de dinitrógeno

Características. En condiciones ordinarias de presión y temperatura, el dióxido de nitrógeno y el tetróxido de dinitrógeno se encuentran presentes en un estado de equilibrio:



El dióxido de nitrógeno presenta una intensa coloración café – rojiza, mientras que el dímero tetróxido de dinitrógeno es un gas incoloro, cuando se encuentra puro. En estado líquido (debajo de 21.15 ° C) las moléculas de dióxido de nitrógeno están dimerizadas como tetróxido de dinitrógeno. A 135 ° C el gas tiene 99 % de las moléculas disociadas como dióxido de nitrógeno. El tetróxido de nitrógeno congelado, cuando está puro, es un sólido incoloro, mientras que si está contaminado presenta una coloración verdosa.

Toxicidad. El dióxido de nitrógeno / tetróxido de dinitrógeno es excesivamente tóxico y es al menos tan peligroso como el monóxido de carbono o el cianuro de hidrógeno. Colorea la piel de amarillo y es un gas venenoso que pronto produce dolor de cabeza y malestar si se encuentra en pequeñas cantidades en la atmósfera. No se considera seguro trabajar por periodos prolongados en una atmósfera conteniendo más de 5 ppm. La inhalación continua de concentraciones superiores a 100 ppm ha llevado a la muerte. Toda operación que involucra dióxido de nitrógeno / tetróxido de dinitrógeno debe ser hecha en una campana muy eficiente (The Merck Index, 1996).

En la literatura se encuentran reportados varios métodos para obtener tetróxido de dinitrógeno. Entre ellos se encuentran:

1. La descomposición térmica de un nitrato anhidro de un metal pesado (generalmente plomo), utilizando una ligera corriente de oxígeno.



2. La reacción entre el ácido nítrico y el pentóxido de fósforo



3. La oxidación de óxido nítrico



4. La reacción entre el trióxido de dinitrógeno y el pentóxido de dinitrógeno



5. La reacción entre el ácido nítrico y el dióxido de azufre



6. La reacción de ácido nítrico con cobre



7. La reacción de cloruro de nitrosilo con nitrato de plata



8. La reacción entre el sulfonato de nitrosilo y el nitrato de potasio



9. La reacción entre el trióxido de arsénico y el ácido nítrico



10. La reacción de oxidación del tetrahidrofurano a ácido succínico con ácido nítrico concentrado



Jiménez, Navarro, Ayala y López han utilizado el método de nitración mediante vapores de óxidos de nitrógeno obteniendo buenos resultados. De acuerdo a estos autores, el método de preparación del dióxido de nitrógeno / tetróxido de dinitrógeno presenta las siguientes ventajas: es fácil de preparar, se obtiene lo suficientemente puro para llevar a cabo la nitración en el mismo instante que se produce sin necesidad de purificarlo, aparentemente no se forma trióxido de dinitrógeno que es una especie fuertemente oxidante, no es un agente nitrante muy agresivo.

1.7 CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS ESTUDIADOS

Como se mencionó anteriormente, en el estudio de Jiménez *et al.* en 1992 se encontró que el cacalol presentó actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Cryptococcus neoformans*. Por otra parte, en el estudio de Delgado *et al.* en el 2001, el cacalol fue probado contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Candida albicans*, encontrándose resultados alentadores.

Los microorganismos que se evaluaron en el presente trabajo se basaron en los datos obtenidos en los estudios previos para el cacalol y en los datos reportados para los nitrofuranos. Además se tomaron en cuenta los microorganismos disponibles en el Laboratorio de Fitoquímica de la FES Iztacala.

A continuación se presentan las principales características de los microorganismos en estudio (Archer y Polk 1998).

Staphylococcus aureus. Los estafilococos pertenecen a la familia Micrococcaceae. Son bacterias esféricas, grampositivas, cuyo diámetro fluctúa entre 0.8 y 1.0 μm . No poseen flagelos ni esporas y solo algunas cepas son capsuladas. Se agrupan en acúmulos parecidos a racimos de uvas. Su pared celular consta de una capa externa rica en proteínas y de una capa interna de mucopéptido. Son microorganismos facultativamente anaerobios, catalasa +, citocromo +.

S. aureus causa dos tipos de síndromes: las intoxicaciones y las infecciones. Las manifestaciones clínicas de las intoxicaciones son atribuibles en exclusiva a la acción de uno o unos pocos productos segregados por el microorganismo (toxinas). Por otra parte, las infecciones implican la proliferación bacteriana, la invasión o la destrucción de los tejidos del huésped y, en la mayoría de los casos, respuestas sistémicas y locales del huésped a estos sucesos. La capacidad del microorganismo de causar infección radica en su capacidad de producir ciertos productos que le permiten sobrevivir y prosperar en el interior del huésped.

Los estafilococos figuran entre las bacterias no esporuladas más resistentes, ya que pueden sobrevivir a muchas condiciones ambientales desfavorables tales como temperaturas extremas y desecación. También resisten la acción de los fenoles y la de muchos otros desinfectantes empleados en los laboratorios (cloruro de magnesio, cloruro de benzalconio, etc). La resistencia de estos microorganismos a la penicilina, suele depender de su capacidad para producir β

lactamasas. Un tratamiento alternativo es la metilina, fármaco al cual algunas bacterias han presentado resistencia.

Sarcina lutea. *Sarcina lutea* es un microorganismo Gram positivo que pertenece a la familia *Micrococcaceae*, se presenta en forma de esferas de 1.0 a 1.5 micras de diámetro, forma paquetes en todos los medios, produce indol de manera ligera, también produce sulfuro de hidrógeno, generalmente produce nitritos a partir de nitratos. Es un microorganismo aerobio, su hábitat es el aire, suelo y agua; también se encuentra en la superficie de la piel. Es un microorganismo muy sensible ya que es inhibido por concentraciones muy pequeñas de sustancias antimicrobianas.

Se evaluaron algunas bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* las cuales presentan las siguientes características comunes: son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, sin agrupación, que miden 0.6 a 0.8 μm de ancho por 2 a 4 de largo; son móviles (excepto *Shigella*), no esporulados y algunas pocas cepas de *E. coli* presentan cápsula.

Escherichia coli. *E. coli* es la causa más común de infección del aparato urinario y es responsable casi del 90 % de las infecciones urinarias primarias en mujeres jóvenes. *E. coli* causante de diarrea es muy común en todo el mundo. Cuando las defensas normales del huésped son inadecuadas, *E. coli* puede alcanzar el torrente sanguíneo y causar septicemia. *E. coli* y los estreptococos del grupo B son las principales causas de meningitis en los lactantes.

Grupo Salmonella – Arizona. Las especies de este grupo se han identificado mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Entre las especies se encuentran: *S. paratyphi* A (serogrupo A), *S. paratyphi* B (serogrupo B), *S. choleraesius* (serotipo C1) y *S. typhi* (serogrupo D). Los microorganismos casi siempre ingresan por vía oral. La dosis infectante promedio capaz de producir infección clínica o subclínica en humanos es de 10^5 a 10^8 salmonelas (pero quizás hasta menos de 10^3 microorganismos de *S. typhi*). Las salmonelas producen tres tipos principales de enfermedad en los humanos:

- Fiebres entéricas (fiebre tifoidea). Sólo unos cuantos tipos de salmonela producen este síndrome, entre ellos *S. typhi* (fiebre tifoidea) es el más importante.
- Bacteremia con lesiones focales. Se vincula comúnmente con la *S. choleraesuis*, pero también puede ser causada por cualquier serotipo de salmonelas. Después de la ingestión por vía oral hay invasión inicial del torrente sanguíneo (con posibles lesiones focales en pulmones, huesos, meninges, etc), pero con frecuencia no hay manifestaciones intestinales.
- Enterocolitis (antes llamada gastroenteritis). Es la manifestación más común de la infección por salmonelas. En EUA, destaca la *S. typhimurium* pero cualquiera de los 1500 a 2000 tipos de salmonelas pueden causar enterocolitis.

Enterobacter. El género *Enterobacter* está constituido por *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* (antiguamente denominado *Erwinia*) y algunas otras especies. *E. cloacae* es la causa de la mayor parte de las infecciones hospitalarias producidas por este género. Estos microorganismos pertenecen a la familia Klebsiellae y, a semejanza de *E. coli*, colonizan el aparato gastrointestinal humano y solo rara vez producen enfermedad en el huésped normal. Por otra parte, representan una causa importante de infección nosocomial y de infección oportunista.

Shigellas. La relación del género *Shigella* con *Escherichia coli* es tan íntimo que los dos géneros no pueden distinguirse mediante técnicas de hibridación de ADN. De hecho, puede considerarse como una *E. coli* patógena diferenciada. Las cuatro especies del género *Shigella* son *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*. El género se caracteriza por su poder de invasión de las células epiteliales intestinales y por provocar infección y enfermedad en el ser humano, incluso cuando el inóculo es pequeño (algunos cientos o miles de microorganismos). La shigelosis es una colitis inflamatoria infecciosa aguda debida a uno de los microorganismos integrantes del género *Shigella*. Las formas menos intensas de la enfermedad predominan en los países industrializados, mientras que la disentería más grave y a menudo mortal, afecta a enfermos de países en vías de desarrollo.

Vibrio cholerae. En los aislamientos iniciales, el *V. cholerae* es un bacilo curvo en forma de coma, de 2 a 4 μm de longitud. En cultivo prolongado, los vibriones pueden convertirse en bacilos rectos parecidos a bacterias entéricas gramnegativas. En condiciones naturales, el *V. cholerae* solo es patógeno para humanos. Una persona debe ingerir 10^8 a 10^{10} microorganismos para infectarse y desarrollar la enfermedad. El cólera no es una infección invasora. Los microorganismos no alcanzan el torrente sanguíneo, sino que permanecen en el intestino. Los microorganismos del *V. cholerae* virulentos se unen a las microvellosidades del borde en cepillo de las células epiteliales. Allí se multiplican y liberan toxinas coléricas y quizá mucinasas y endotoxinas. Muchos agentes antimicrobianos son eficaces contra el *V. cholerae*. La tetraciclina por vía oral tiende a reducir la cantidad de materia fecal expulsada y acorta el periodo de excreción de vibriones. En algunas regiones endémicas han surgido *V. cholerae* resistentes a la tetraciclina, resistencia que es transportada por plásmidos. Si hay producción de toxina y no hay multiplicación microbiana, no se recomienda tratamiento antimicrobiano (Williams 2002).

Candida albicans. El género *Candida* incluye un variado número de especies, pero solamente algunas de ellas pueden ser oportunistas, entre ellas sobresale *C. albicans*. El género *Candida* pertenece a la familia *Criptococaceae*. Se reproducen por blastosporas, formando gemas de la mitad de su tamaño. Aunque no se rigen por el Gram, generalmente son positivas. El hábitat de las diversas especies de *Candida* es el humano y algunos animales homeotérmicos. Diversas especies de *Candida* son componentes de la flora habitual del cuerpo, se presentan desde los primeros días del nacimiento y tienen una fuerte predilección hacia las mucosas. Se pueden encontrar en el tracto gastrointestinal, habitando boca, laringe y faringe; el estómago generalmente no es saprofitado porque presenta un pH demasiado ácido (entre 1 y 3), en cambio coloniza intestino delgado y grueso. La enfermedad producida por este microorganismo se conoce como candidosis, la cual es una micosis cosmopolita que afecta primordialmente mucosas (boca, vagina, etc.), piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones, intestinos, etc. El fármaco utilizado para el tratamiento de la candidosis es la nistatina (Bonifaz 1998).

En la tabla 2 se presenta un resumen de las enfermedades producidas por algunas de las bacterias en estudio, así como el tratamiento de primera elección.

Tabla 2. Enfermedades producidas por algunas bacterias grampositivas y gramnegativas y el tratamiento de primera elección*

Microorganismo	Enfermedades		Antimicrobiano de primera elección
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abscesos Bacteremia Endocarditis Neumonía Osteomielitis Celulitis Otras	Sensibles a meticilina	Nafcilina u oxacilina
		Resistentes a meticilina	Vancomicina
<i>Escherichia coli</i>	Infección de vías urinarias		Trimetoprim-sulfametoxazol Ciprofloxacina u ofloxacina Una cefalosporina (G1) Ampicilina + un aminoglucósido
	Otras infecciones Bacteriemia		Ampicilina + un aminoglucósido Una cefalosporina (G1)
Especies de <i>Enterobacter</i>	Infecciones de vías urinarias y de otros órganos		Ampicilina + un aminoglucósido Una cefalosporina (G1)
<i>Salmonella</i>	Fiebre tifoidea Fiebre paratifoidea Bacteremia		Ciprofloxacina u ofloxacina Ceftriaxona Trimetoprim – sulfametoxazol
	Gastroenteritis aguda		Ningún tratamiento Norfloxacina o ciprofloxacina
<i>Shigella</i>	Gastroenteritis aguda		Ciprofloxacina o norfloxacina
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera		Doxiciclina Ciprofloxacina o norfloxacina

* Información extraída del cuadro "Uso actual de los fármacos antimicrobianos en la terapéutica de infecciones". En Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol. II. Novena edición. Mc-Graw-Hill Interamericana. México, 1996. pp. 1009-1018

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- a) Llevar a cabo la nitración indirecta del cacalol.
- b) Comparar la actividad antimicrobiana del cacalol y su derivado nitrado en posición 2.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Obtener el cacalol a partir de su fuente natural (raíz de la planta *Psacalium decompositum*).
- b) Llevar a cabo la acetilación del cacalol.
- c) Realizar la reacción de nitración del acetato de cacalol usando como agente nitrante dióxido de nitrógeno/tetróxido de dinitrógeno generado *in situ*, mejorando las condiciones establecidas en trabajos previos.
- d) Obtener el 2-nitrocacalol mediante la hidrólisis básica del 2-nitroacetato de cacalol.
- e) Determinar si se incrementa la actividad antimicrobiana después de introducir un grupo nitro en la posición 2 de la molécula del cacalol.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 6 se presenta un esquema de las reacciones efectuadas para obtener el 2-nitrocacalol.

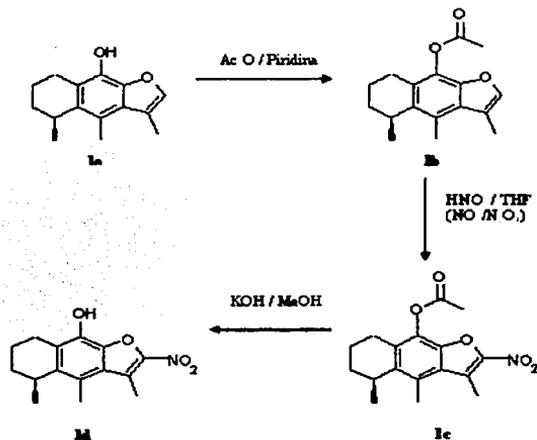


Figura 6. Esquema general de las reacciones efectuadas. Cacalol (1a), acetato de cacalol (1b), 2-nitroacetato de cacalol (1c), 2-nitrocacalol (1d)

El método de **difusión en agar** o de **Kirby-Bauer** se utilizó para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de los compuestos. Los resultados de esta prueba se presentan en la tabla 3. Como se observa en la tabla, el cacalol mostró actividad contra las siguientes cepas de bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Sarcina lutea* cepa de campo, *Shigella boydii* ATCC 8700, *Vibrio cholerae* NO-01 y *Candida albicans* aislada de caso clínico.

Tabla 3. Efecto del cacalol y sus derivados sobre algunos microorganismos, determinado por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer)

MICROORGANISMO	COMPUESTOS (500 μ g/disco. Halos de inhibición en mm)			
	Cacalol	Acetato de cacalol	2-nitroacetato de cacalol	2-nitrocacalol
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.2 \pm 0.8	-	9.0 \pm 0.9	17.5 \pm 1.0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-
<i>Sarcina lutea</i>	13.7 \pm 0.5	-	-	16.2 \pm 1.0
<i>Shigella boydii</i>	10.3 \pm 0.5	-	8.3 \pm 0.5	16.8 \pm 1.3
<i>Vibrio cholerae NO-01</i>	8.7 \pm 0.5	-	8.7 \pm 0.5	16.8 \pm 0.8
<i>Candida albicans</i>	10.5 \pm 0.8	-	-	9.2 \pm 0.4

* Las cifras indican el promedio de los halos de inhibición en mm y la desviación estándar. Los datos están reportados como el promedio de 6 resultados. El signo (-) indica no inhibición del crecimiento.

Los resultados mostraron que al estar protegido el -OH fenólico por un grupo acetilo (acetato de cacalol), la actividad antimicrobiana se pierde, lo cual puede deberse a que el grupo acetilo disminuye la solubilidad del compuesto en agua; además se puede relacionar el mecanismo de acetilación realizado por las bacterias para inhibir la acción antimicrobiana del cloramfenicol con la presencia de un grupo acetilo en el cacalol.

Comparando los resultados del acetato de cacalol y el 2-nitroacetato de cacalol, se observa que la introducción de un grupo nitro aumenta ligeramente la actividad del compuesto. Lo anterior puede deberse a que el grupo nitro hace que la molécula se vuelva ligeramente más polar, además de que ejerce acción antibacteriana. Sin embargo, la presencia del grupo nitro no logra contrarrestar el efecto producido por el grupo acetilo. En el caso de *Sarcina lutea* no hubo actividad con el 2-nitroacetato de cacalol. En el caso de *Candida albicans*, se observó que el compuesto no presenta actividad.

Al eliminar el grupo acetilo de la molécula se observa un aumento significativo en el halo de inhibición, lo cual indica que el grupo OH, al estar libre, aumenta la solubilidad y, como ya se mencionó, es probable que tenga efecto en algún componente bacteriano. El hecho de remover el grupo acetilo de la molécula no parece haber tenido un efecto significativo en la actividad contra *Candida albicans*.

Para explicar los resultados obtenidos para *Candida albicans*, se plantearon los siguientes supuestos: el grupo nitro no ejerce actividad sobre *C. albicans*. La falta de actividad puede deberse a la ausencia de transportadores del compuesto en la célula o al hecho de que la composición de la pared celular de la levadura es diferente a la pared celular bacteriana.

Los resultados obtenidos por el método de difusión en agar, nos indican la susceptibilidad de los microorganismos a un determinado agente antimicrobiano. Sin embargo, solo nos dan información cualitativa ya que están influidos por el grado de difusión de los compuestos en el agar. Es por ello que se realizó el método de microdilución en agar. Por otra parte, el método de microdilución en agar proporciona información cuantitativa de la actividad antimicrobiana del compuesto ya que permite conocer la concentración mínima a la cual se presenta inhibición del crecimiento y se basa en la dispersión homogénea de la muestra en el medio de cultivo.

De acuerdo a Vanden Berghe y Vlietnick, las ventajas del método de microdilución en agar son su simplicidad, la velocidad y la posibilidad de usarlo en el estudio antimicrobiano de muestras solubles e insolubles en agua. En esta técnica, no es necesario que las muestras estén estériles debido a que los organismos aerobios no desarrollan bien bajo el agar solidificado. La cantidad máxima de muestra a evaluar no debe ser mayor de 1mg/mL.

El empleo de métodos de microdilución es una buena opción para probar compuestos extraídos de plantas ya que se pueden evaluar pequeñas cantidades de compuestos.

El diseño del método, se realizó en base a los resultados obtenidos en la prueba de difusión en agar. Los resultados de concentración mínima inhibitoria se reportaron de acuerdo a lo que se obtuvo a las 24 horas y se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) del cacalol y sus derivados, determinada por el método de microdilución en agar*

MICROORGANISMO	COMPUESTOS		
	Cacalol	2-nitroacetato de cacalol	2-nitrocacalol
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	250	7.81
<i>Sarcina lutea</i>	250	250	7.81
<i>Shigella boydii</i>	250	250	7.81
<i>Vibrio cholerae NO-01</i>	250	250	7.81
<i>Candida albicans</i>	31.62	NE	> 500

* Los datos están reportados de acuerdo a las observaciones realizadas después de 24 horas de incubación.

NE = no evaluado

Un hecho importante es que los resultados observados aproximadamente a las 96 horas de incubación, en el caso del 2-nitrocacalol, mostraron crecimiento bacteriano desde la concentración de $7.8 \mu\text{g/mL}$ hasta $500 \mu\text{g/mL}$. Este hallazgo indica que el compuesto en cuestión retarda el crecimiento bacteriano, es decir, es un agente bacteriostático.

Los alcances del experimento realizado para determinar la concentración mínima inhibitoria no permitieron determinar el tiempo exacto en el cual comienza el crecimiento bacteriano en presencia de los compuestos. No se conoce si el compuesto se degrada al permanecer cierto tiempo en contacto con el agar o si el inicio del crecimiento de los microorganismos ocurre por otro mecanismo. Se recomienda realizar una cinética de crecimiento de los microorganismos en presencia y ausencia de compuestos, así como pruebas de estabilidad.

Por otra parte, en el proceso de obtención de compuestos, el extracto hexánico se evaporó a baja temperatura debido a que el cacalol es un compuesto termolábil.

La reacción de acetilación del cacalol se llevó a cabo con la finalidad de obtener un compuesto más estable que permitiera realizar posteriormente la reacción de nitración. La acetilación del cacalol, es evidente en el espectro de infrarrojo por la aparición de una banda a 1761 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo del éster y la desaparición de la señal a 3580 cm^{-1}

debida al -OH fenólico. El espectro de masas presenta el pico correspondiente al ión molecular a 230 y la fragmentación por pérdida de un grupo metilo a 215. En el espectro de RMN ^1H , se observa la señal del hidrógeno furánico a 7.34 ppm, la cual se desdobra debido a la interacción con los hidrógenos del metilo unido al carbono 3.

La presencia del grupo nitro después de realizar la reacción de nitración del acetato de cacalol, se observa por la aparición, en el espectro de infrarrojo, de las señales a 1515 y 1344 cm^{-1} . La entrada del grupo nitro en la posición 2 del anillo de furano, se comprobó mediante la ausencia de la señal debida al hidrógeno que se encontraba en esta posición. Además, la señal debida a los hidrógenos del metilo unido al carbono 3, se observan como un singulete. En el espectro de masas se observa el pico correspondiente al ión molecular a 317.

En el presente trabajo se introdujeron varios cambios en la reacción de nitración y en el procedimiento de purificación del compuesto obtenido en mayor cantidad después de la reacción. Estos cambios están referidos al trabajo de Ayala en 1991 y se presentan a continuación: disminución de la temperatura de reacción, refrigerante en posición de reflujo para evitar la fuga de los vapores de óxidos de nitrógeno, utilización de yodo como catalizador en lugar de la solución de bromo. El yodo se une transitoriamente a la posición 2 de la molécula de acetato de cacalol para ser desplazado posteriormente por el grupo nitro. Cuando se utiliza bromo, se obtiene el producto nitrado en posición 2 y con un bromo unido al metilo del carbono 3. El ácido producido durante la reacción se eliminó al realizar los lavados con agua en lugar de utilizar una solución saturada de bicarbonato de sodio.

El producto obtenido en mayor cantidad en la reacción es el 2-nitroacetato de cacalol; anteriormente se separaba el producto de la mezcla de reacción mediante cromatografía preparativa en capa fina, eluyendo dos veces con una mezcla de Hex-AcOEt. En el presente trabajo se realizó la separación mediante cromatografía flash utilizando como adsorbente sílica gel de capa fina y mezclas de polaridad creciente de Hex-AcOEt como fase móvil (se empleó el vacío para aumentar la velocidad de elución de la fase móvil). Este método permitió la obtención del 2-nitroacetato de cacalol con un alto grado de pureza al que no fue necesario recrystalizarlo.

En la reacción de hidrólisis del 2-nitroacetato de cacalol se observó que al agregar la solución metanólica de hidróxido de potasio, la mezcla de reacción cambió de color amarillo a café-rojizo, lo cual se debe a la presencia del grupo nitro. Al finalizar la reacción se agregó ácido

clorhídrico. Lo cual produjo que la solución retomara la coloración amarilla. La reacción se verificó por la aparición, en el espectro de infrarrojo, de la señal correspondiente al OH fenólico a 3570 cm^{-1} y la ausencia de la señal debida al grupo carbonilo. Se comprobó que el grupo nitro aún sigue en la molécula por la aparición de las señales a 1515 y 1357 cm^{-1} . La existencia de un pico a 275 en el espectro de masas corrobora la obtención del 2-nitrocacalol.

El grupo nitro atrae los electrones del doble enlace del anillo de furano; debido a esto, los hidrógenos del CH_3 unido al carbono 3 presentan un fenómeno de desprotección, lo cual provoca que su señal se observe a campo ligeramente más bajo en comparación a las moléculas que no presentan el grupo nitro.

4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

El aislamiento y la síntesis de compuestos se realizaron en el laboratorio 2-10 del Instituto de Química de la UNAM.

Las pruebas antimicrobianas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) perteneciente a la FES Iztacala de la UNAM.

4.1 OBTENCIÓN DE COMPUESTOS

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos.

El curso de las reacciones y las fracciones eluidas de las columnas cromatográficas, se siguieron por cromatografía en capa fina (CCF). El adsorbente y la fase móvil utilizados en las columnas cromatográficas, se especifican en los experimentos. En la CCF se utilizaron placas de sílica gel ALUGRAM/SIL G/uv₂₅₄. Las placas cromatograficas eluidas se visualizaron con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm y posteriormente se revelaron con una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N.

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en los instrumentos Nicolet Magna IR TM 750 y Perkin-Elmer 283B.

Los espectros de RMN ¹H se registraron en un equipo Varian a 300 MHz y los desplazamientos químicos están expresados en partes por millón (δ) en relación al tetrametilsilano. Las abreviaturas utilizadas son: s = singulete, d = doblete, m = multiplete.

Los datos de espectrometría de masas (EM) fueron registraos con un espectrómetro de masas JEOL JMS-AX 505 HA y fueron obtenidos a 70 eV de energía de ionización.

Los espectros de RMN ¹H, IR y Masas de los compuestos estudiados se presentan en el Anexo 1.

Obtención y fraccionamiento del extracto hexánico. La raíz de la planta *Psacalium decompositum* A. Gray se compró en el mercado de Sonora de la Ciudad de México. La raíz (1 Kg) fue secada al aire, fragmentada y puesta en contacto con hexano a temperatura ambiente durante 1 semana. Terminado el proceso de maceración, se filtró la solución y se destiló el hexano a presión reducida. El residuo obtenido (17.23 g) fue un aceite café - rojizo con un olor característico; dicho residuo se fraccionó por cromatografía en columna utilizando alúmina como adsorbente y un gradiente de polaridad creciente de Hex-AcOEt, como fase móvil. De la elución de la columna se eligieron 2 fracciones (4.0 g) que contenían el cacalol puro. Una porción de dichas fracciones se recristalizó de pentano, obteniéndose un sólido ligeramente amarillo (**1a**) con punto de fusión de 92-94 °C, $R_f = 0.63$ en Hex-AcOEt (8:2, v/v). **IR (v) cm^{-1} :** 3580 (-OH de fenol), 2966, 2934, 2870, 1450 (C-H alifático). **RMN ^1H (CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$:** 1.18 (d,3H,CH₃,C-5); 1.80 (m,7H,C-5,C-6,C-7,C-8); 2.37 (d,3H,CH₃,C-3); 2.52 (s,3H,CH₃,C-4); 7.24 (m,1H,C-2). **EM m/z (%):** 230 (M⁺)(71); 215 (M⁺-15)(100). *Ver espectros 1, 2 y 3.*

Reacción de acetilación del cacalol. La reacción de acetilación se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Romo *et al.* en 1966, con anhídrido acético / piridina. La reacción transcurrió en 18 horas obteniéndose 4.02 g de un aceite café - rojizo, los cuales se separaron mediante cromatografía en columna empleando sílica gel 60 (70-230 mesh) de Merck. El producto crudo obtenido se recristalizó de diclorometano - hexano. El acetato de cacalol se obtuvo como un sólido amorfo de color blanco (**1b**), con punto de fusión 104-106 °C, $R_f = 0.70$ en Hex-AcOEt (8:2, v/v). **IR (v) cm^{-1} :** 2966, 2934, 2871, 1453 (C-H alifático); 1761 (C=O de acetilo); 1193 (C-O-C éster). **RMN ^1H (CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$:** 1.19 (d,3H,CH₃,C-5); 1.80 (m, 7H,C-5,C-6,C-7,C-8); 2.38 (d,3H,CH₃,C-3); 2.57 (s,3H,CH₃ de acetilo) 7.23 (m,1H,C-2). **EM m/z (%):**272(M⁺)(35); 230(M⁺+42)(100); 215(M⁺+42-15)(86). *Ver espectros 4, 5 y 6.*

Reacción de nitración del acetato de cacalol. En el presente trabajo se llevó a cabo la nitración con dióxido de nitrógeno / tetróxido de dinitrógeno. El método utilizado para la preparación de los gases mencionados fue por la reacción de oxidación del tetrahidrofurano (THF) a ácido succínico mediante el ácido nítrico concentrado. En la figura 6 se muestra el aparato utilizado en esta reacción. En el matraz 1 se colocaron 250 mg (0.919 mmol) de acetato de cacalol disueltos en 50 mL de diclorometano anhidro (Merck). A la solución anterior se añadieron 2.5 mg de yodo metálico. El matraz se conectó a un refrigerante en posición de reflujo y se colocó en baño de hielo-acetona-sal. Para generar los óxidos de nitrógeno, se colocaron 1.5 mL de tetrahidrofurano en el matraz 2 y se adicionaron 4.5 mL de ácido nítrico concentrado (la adición se hizo en tres porciones de 1.5 mL debido a que *la reacción es exotérmica*). Los gases generados se burbujearon al matraz de reacción durante 10 minutos, después de lo cual se desconectó el sistema y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética hasta la transformación completa de los reactivos (100 minutos). Posteriormente se lavó la mezcla de reacción se lavó con 2 porciones de 50 mL de una solución acuosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 0.2 % para eliminar el yodo. La fase orgánica se lavó con agua destilada hasta obtener pH neutro y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se destiló a presión reducida sin usar calentamiento. Se obtuvieron 345.5 mg de un aceite viscoso café. La mezcla de productos se separó mediante cromatografía en columna (utilizando sílica gel para cromatografía en capa fina y un gradiente de Hex-AcOEt como eluyente) obteniéndose 81.2 mg (32.48%) de un sólido cristalino de color amarillo (**1c**), en forma de agujas, con punto de fusión 152-154 °C, $R_f = 0.58$ en Hex-AcOEt (8:2, v/v). **IR (v) cm^{-1} :** 2934, 2873, 1456 (C - H alifático); 1767 (C = O de acetilo); 1630, 1589, 1474 (C = C aromático); 1515, 1344 (NO_2); 1195 (C - O - C - éster). **RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm):** 1.19 (d, 3H, CH_3 , C-5); 1.82 (m, 7H, C-5, C-6, C-7, C-8); 2.43 (s, 3H, CH_3 , C-3); 2.63 (s, 3H, CH_3 , C-4); 2.90 (s, 3H, CH_3 de acetilo). **EM m/z (%):** 317 (M^+) (9); 276 ($\text{M}^+ - 41$) (21); 275 ($\text{M}^+ - 42$) (100); 261 ($\text{M}^+ - 41 - 15$) (14); 260 ($\text{M}^+ - 42 - 15$) (82); 214 ($\text{M}^+ - 42 - 15 - 46$) (12); 43 ($\text{M}^+ - 274$) (6). *Ver espectros 7, 8 y 9.*

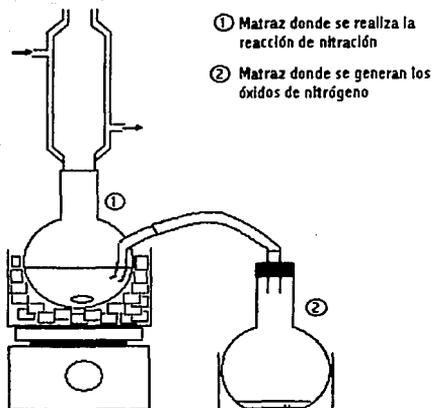


Figura 6. Esquema del aparato utilizado en la reacción de nitración

Reacción de hidrólisis del 2-nitroacetato de cacalol. En un matraz Erlenmeyer de 25 mL se colocaron 67 mg (0.2114 mmol) de 2-nitroacetato de cacalol y se agregaron 22.9 mg (0.4089 mmol) de hidróxido de potasio (Merck) en gránulos disueltos en 2 mL de metanol. Al término de la reacción, se agregaron unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla de reacción se vació en un matraz que contenía aproximadamente 50 mL de agua fría, obteniéndose un sólido de color amarillo – naranja, el cual se filtró al vacío. Debido a que se presentaron dificultades para obtener el sólido, este se disolvió con un poco de cloruro de metileno. Al evaporar el disolvente se obtuvieron 38.9 mg (67%) de un aceite café-rojizo al cual no se le pudo determinar el punto de fusión. El compuesto (**1d**) presenta un R_f de 0.67 en Hex-AcOEt (8:2, v/v). **IR** (ν) cm^{-1} : 3570 (OH de fenol); 2928, 2856, 1453 (C-H alifático); 1629, 1578 (C=C aromático); 1515, 1357 (NO_2). **RMN** ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 1.17 (d, 3H, CH_3 , C-5); 1.81 (m, 7H, C-5, C-6, C-7, C-8); 2.57 (s, 3H, CH_3 , C-3); 2.90 (s, 3H, CH_3 , C-4). **EM** m/z (%): 275 (M^+)(100), 260 ($\text{M}^+ - 15$)(82). Ver espectros 10, 11 y 12.

4.2 PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

Los métodos descritos para bacterias también son adecuados para la levadura *Candida albicans* debido a que ambos son microorganismos de crecimiento rápido.

Considerando que el calentamiento excesivo puede destruir los compuestos termolábiles, se debe evitar su esterilización por autoclave. La esterilización por filtración en membrana tiene la desventaja de que muchos agentes antimicrobianos pueden ser adsorbidos en el filtro (Vanden Berghe y Vlietnick, 1991). En el presente estudio los experimentos se realizaron de manera aséptica utilizando material y medios de cultivo estériles y trabajando en campana de flujo laminar.

Los microorganismos evaluados, en los dos métodos descritos, fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 (grampositivo), *Sarcina lutea* cepa de campo (grampositivo), *Shigella boydii* ATCC 8700 (gramnegativo), *Vibrio cholerae* NO-O1 (gramnegativo) y *Candida albicans* aislada de caso clínico (hongo levaduriforme). Las bacterias *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155 (gramnegativo), *Escherichia coli* ATCC 25922 (gramnegativo) y *Salmonella typhi* ATCC 19430 (gramnegativo) únicamente se evaluaron en el método de difusión en agar.

Los medios de cultivo empleados en la preparación del inóculo microbiano fueron: caldo Mueller-Hinton BBL (Becton-Dickinson) para bacterias y caldo Dextrosa Sabouraud (BD Bioxon) para la levadura. Los medios de cultivo sólidos fueron: agar Mueller-Hinton (Merck) para bacterias y agar Sabouraud con glucosa al 4% (DIBICO) para *Candida albicans*.

Método de difusión en agar o de Kirby-Bauer. La metodología consistió en evaluar la inhibición del crecimiento (presencia de halos) después de poner en contacto los discos impregnados con los compuestos sobre la superficie del agar solidificado y sembrado con los microorganismos en estudio (estandarizados a una concentración de 10^8 microorganismos/mL). Los compuestos evaluados fueron cacalol, acetato de cacalol, 2-nitroacetato de cacalol y 2-nitrocacalol. Los discos de papel filtro se impregnaron con 500 µg de cada compuesto. Como control negativo se utilizaron discos de papel filtro impregnados con acetona. En el caso de los controles positivos se empleó cloramfenicol (30 µg/disco) para las bacterias y nistatina (4400 U/disco) para la levadura. El cacalol y sus derivados se evaluaron por sextuplicado con cada

microorganismo; los controles se evaluaron por triplicado. Las cajas Petri se incubaron a 37 °C durante 24 horas, después de este periodo se midió el halo de inhibición.

Método de microdilución en agar. Los compuestos evaluados fueron cacalol, 2-nitroacetato de cacalol (excepto para *C. albicans*) y 2-nitrocacalol. Se evaluaron concentraciones desde 1000 hasta 7.8 µg/mL en diluciones seriadas. Los microorganismos utilizados en este ensayo fueron *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae NO-01* y *Candida albicans*. Como control negativo se utilizó acetona. El control positivo para bacterias fue el cloramfenicol. Para el caso de *C. albicans* se utilizó nistatina. Se empleó también un control de crecimiento el cual no contenía ningún compuesto. También se utilizó un control de contaminación microbiana el cual no contenía inóculo bacteriano ni compuestos. En la realización del experimento se utilizaron placas de ELISA estériles con 96 pozos, a los cuales se les adicionaron 100 µL del control o de una solución del compuesto a evaluar a las diferentes concentraciones (los controles y las concentraciones se evaluaron por triplicado para cada microorganismo). Después que hubo solidificado el agar, se agregaron 20 µL del inóculo microbiano (estandarizado a 10^5 microorganismos/mL). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, después de lo cual el crecimiento bacteriano se hizo evidente mediante una solución de violeta de tetrazolio; en el caso de *C. albicans* no se agregó dicho reactivo, el crecimiento se observó mediante el aspecto macroscópico de las colonias. La concentración mínima inhibitoria es la concentración más pequeña donde no existe crecimiento aparente.

Los detalles de ambos métodos se describen en el Anexo 2.

5. CONCLUSIONES

El 2-nitrocacalol se obtuvo mediante una serie de reacciones las cuales involucraron la protección del grupo OH del anillo de benzofurano, la nitración del compuesto acetilado y la eliminación posterior del grupo acetilo. Lo anterior evitó la autooxidación de la molécula por medio del OH libre.

La adición de un grupo acetilo a la molécula de cacalol anuló la actividad antimicrobiana lo cual indica que el grupo OH debe estar libre para que la molécula posea acción antimicrobiana.

Los resultados mostraron que el 2-nitrocacalol posee mayor actividad antibacteriana con respecto al cacalol, lo cual confirma la hipótesis planteada de que el grupo nitro aumentaría la actividad antibacteriana. Sin embargo, lo anterior no se cumplió para el caso de *C. albicans* ya que la adición de un grupo nitro a la molécula del cacalol no mostró un aumento en la actividad contra este microorganismo.

El cacalol y su derivado nitrado en posición 2, son compuestos bacteriostáticos en el rango de concentraciones de 7.8 a 500 µg/mL.

En estudios futuros se pretende probar el 2-nitrocacalol contra protozoarios como *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Trypanosoma cruzi*

6. BIBLIOGRAFÍA

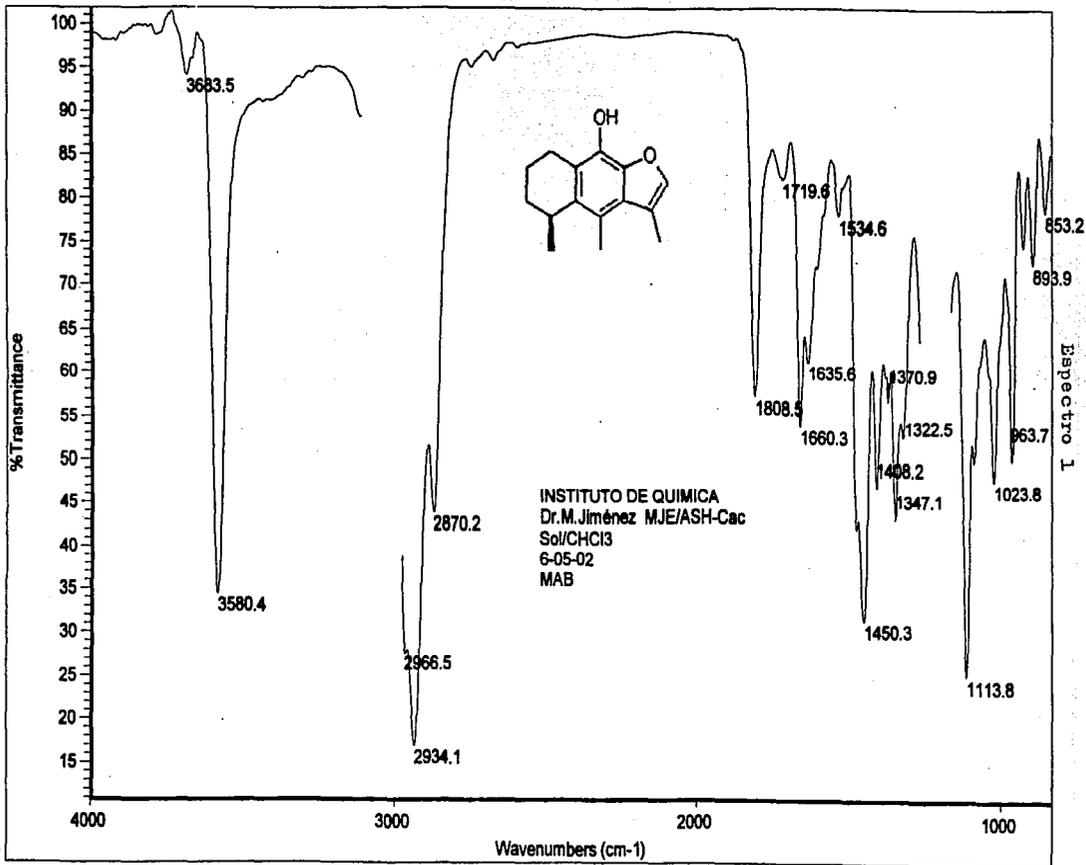
- Archer, G.L., y Polk, R.E. Tratamiento y profilaxis de las infecciones bacterianas. En: Harrison, Principios de medicina interna. Editores: Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martín, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., and Longo, D.L. Vol. I. Catorceava edición. Mc Graw-Hill. México, 1998. pp. 978-993.
- Ayala – Ramos, J., TESIS: Nitración de furanos y benzofuranos, Instituto de Química, UNAM (1991).
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, 1966, 36 (3): 493-496.
- Bonifaz, A. Micología médica básica. Capítulo 19. Candidosis. Méndez Editores. México, 1998. pp. 277-301
- Buisson, J.P., et al., *Eur J Med Chem-Chim Ther.*, 10,43-6 (1975). C.A., 83: 158452 (1975).
- Cavier, R. and Cenac, J. *J Ann Pharm Fr.*, 34, 139-42 (1976). C.A., 85: 153747 (1976).
- Cavier, R., et al., *Chim. Ther.*, 7, 361-4 (1972). C.A., 78: 38152 (1973).
- Cavier, R., et al., *Chim. Ther.*, 8, 319-23 (1973). C.A., 79: 132824 (1973).
- Cavier, R., et al., *J Ann Pharm Fr.*, 37, 309-12 (1979). C.A., 93 : 19097 (1980).
- Cénas, N.K., Bironaité, D.A., Kulys, J.J., and Sukhova, N.M. Interaction of nitrofurans with glutation reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1073: 195-199.
- Dax, S.L. Antibacterial Chemotherapeutic Agents. Blackie Academia and Professional, USA, 1997, pp. 376 – 378.
- Debnath, A.K., and Hansch, C. Mechanistic interpretation of the genotoxicity of nitrofurans (antibacterial agents) using Quantitative Structure-Activity Relationships and Comparative Molecular Field Analysis. *J Med Chem*, 1993, 36: 1007-1016.
- Delgado, G., Garduño-Ramirez, M.L., Trejo, A., Navarro, V., Bye, R., and Linares, E. New modified Eremophilanes from the Roots of *Psacalium radulifolium*. *J Nat Prod*, 2001, 64: 432-435.
- Díaz, J.L. Usos de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas II. Editor; Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAM); México, 1976.
- Einnhorn, J., et al., *Synthesis*, 1984, 978-80.
- Gajewska, J., Szczypka M., Tudek B., and Szymczyk, T. Studies on the effect of ascorbic

- acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidona. *Mutation Res*, **1990**, 232: 191-197.
- Goodman y Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Vol. II. Novena edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México, **1996**, pp. 1136-37.
 - Greenwood, D. *Antimicrobial Chemotherapy*. Edited by Greenwood, D. Third edition. Oxford University Press, New York, **1995**, pp 51,57,58
 - Hirano, K., et al. *Bull Chem Soc Japan*, **1967**, 40: 2229-33.
 - Jawetz, Melnick y Adelberg. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Capítulo 10, Quimioterapia antimicrobiana. Editado por Brooks, G.F., Batel, J.S., y Morse, S.A. Editorial el Manual Moderno. Dieciseisava edición en español. México, 1999. pp. 179-216.
 - Jiménez Estrada, M., Lozano R., C., Valdés M. J., León C.J.R., Alarcón, G. y Sveshtarova, P.B. Actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados. *Revista Latinoamericana de Química*, **1992**, 23/1 y 22/4, 14.
 - Jiménez-Estrada, M., Ayala-Ramos, J., Saad, I., Reyes-Chilpa, R., Navarro-Ocaña, A. Nitración de productos naturales con anillos furánicos y benzofuránicos. *Rev Latinoamer Quim*, **1999**, 27/3: 81-88.
 - Kinnamon, K.E., Poon, B.T., Hanson, W. L., and Waits, V. B. *Trypanosoma cruzi*: A novel chemical class (nitrobenzofurans) active against infections of mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, **1998**, 89: 251-256.
 - Kirchhoff, L.V. Tripanosomiasis. En: Harrison, Principios de medicina interna. Editores: Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., and Longo, D.L. Vol. I. Catorceava edición. Mc Graw-Hill. México, **1998**. pp. 978-993.
 - Kitts, C.L., Green, C.E., Otley, R.A., Álvarez, M.A., and Unkefer, P.J. Type I nitroreductases in soil enterobacteria reduce TNT (2,4,6-trinitrotoluene) and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). *Can J Microbiol*, **2000**, 46: 278-282.
 - Kuriyama, K., et al., *Yakugaku Zasshi*, 96, 257-63 (1978). C.A., 89: 36459 (1978).
 - Lennette, E.H., *Microbiología clínica*. Editorial Médica Panamericana. Tercera edición. México, **1982**; pp. 541-548.
 - Litter, M. Compendio de Farmacología; Cuarta Edición; Editorial El Ateneo; México, **1992**; pp. 669-670.

- López-González, D. TESIS: Biotransformación de nitroalquenos con *Saccharomyces cerevisiae* en medios acuoso y orgánico. Facultad de Ciencias, UNAM (1999).
- Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México. Cuarta edición. Ediciones Botas. México, 1959. pp. 217 - 220.
- Navarro-Ocaña, A., TESIS: Preparación de 2-fenil-3-(p-R-fenil)-3-nitropropenonitrilos. Instituto de Química, UNAM (1986).
- Powers, L.J. Chemistry and antibacterial activity of nitrobenzofurans. *J Med Chem*, 1976, 19: 57-62.
- Powers, L.J., and Mertes, M.P. antibacterial activity of nitrobenzofurans. *J Med Chem*, 1970, 18: 1102-1105.
- Rios, J.L., Recio, M.C., and Villar, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 1988, 23: 127-149.
- Romo, J., and Joseph-Nathan, P. The constituents of *Cacalea decomposita* A. Gray, structures of cacalol and cacalone. *Tetrahedron*, 1964, 20: 2331
- Royer, R.; et al., *Ger Offen.* 2, 113, 489, 14 Oct 1971, 25 pp. *C.A.*, 75 : 45069 (1972).
- Royer, R., et al., *Ger Offen.* 2,131, 927, 3 Feb 1972, 17 pp. *C.A.*, 77: 19520 (1972).
- Royer, R., et al., *Fr. Demonde.* 2,181,581, 11 Jan 1974, 7 pp. *C.A.*, 81 : 21796 (1974).
- Royer, R., et al., *Eur J Med Chem-Chim Ther.*, 9, 136-45 (1974). *C.A.*, 81: 105139 (1974).
- Royer, R., et al., *Eur J Med Chem-Chim Ther.*, 12, 455-8 (1977). *C.A.*, 88: 45572 (1978).
- Royer, R., et al., *J Med Chem-Chim Ther.*, 13, 411-14 (1978). *C.A.*, 90: 97995 (1979).
- Scherrer, R.A., U.S. 3,927,037, Dec. 16, 1975, 7 pp. *C.A.*, 84:105382 (1976).
- Scherrer, R.A., *Ger Offen.* 2,642,877, Apr 14, 1977, 38 pp. *C.A.*, 87:53062 (1977).
- Seflon, A.M. Mechanism of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs*, 2002, 62:557-66.
- Smith, R.D., and Coast, J. Antimicrobial resistance: a global response. *Bull World Health Organ*, 2002, 80: 1226-133.
- Soriano-García, M., Walls, F., Barrios, H., Ortiz, B., Sánchez-Obregón, R., Toscano, R.A. y Yuste, F. *Acta cryst*, 1987, 43:1805

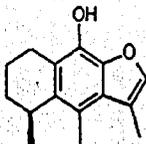
- Tay-Zavala, J., Lara-Aguilera, R., Velasco-Castrejón, O. y Gutiérrez-Quiroz, M. Parasitología médica. Editado por Méndez-Cervantes, F. y Méndez-Oteo, F. Sexta edición. Méndez Editores, México, 1998, pp. 107-127.
- The Merck Index. Twelfth edition. USA, 1996, pp 6704.
- Tortora, G.F., Funke B.R., and Case C.L. Microbiology, an introduction; Fifth edition. The Benjamin / Cummings Publishing Company. USA, 1995, pp. 508-510.
- Towner, K.J. The genetics of resistance. In: Antimicrobial chemotherapy. Edited by Greenwood, D. Third edition. Oxford University Press, New York, 1995, pp 159-167.
- Vanden Berghe, D.A., and Vlietnick, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Methods in plant biochemistry, Vol. 6 "Assays for bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editors Dey, P.M., and Harborne, J.B. Academic Press, New York, 1991, pp. 47-71.
- Williams, R. Resistance as a Worldwide Problem. In: Bacterial Resistance to Antimicrobials. Edited by Lewis, K., Salyers, A.A., Taber, H.W., and Wax, R.G. Marcel Dekker, Inc. New York, 2002, pp. 223-238.
- Wistreich G.A., and Lechtman, M.D., Microbiology. Third edition. USA, 1980; pp. 399-402.

ANEXO 1
(ESPECTROS DE IR, RMN ¹H y EM)



Dr. Manuel Jimenez
 Aida Soto MJE/ASH-Cac
 800 MHz/ CDCl₃
 (eclipse 300 jeol)

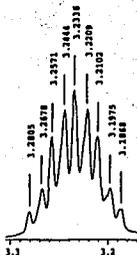
mpg



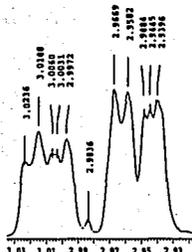
X : parts



X : parts pe



X : parts per Million :



X : parts per Million : 1H

1.30614

1.60459

0.13054

0.13244

2.62163

2.62975

8.74696

8.74697

0.63239

11.7508

7.58706cm

0.69797

0.65582

2.5215

2.3779

2.3758

1.1997

1.1762

8.0

7.0

6.0

5.0

4.0

3.0

2.0

1.0

0

X : parts per Million : 1H

[Mass Spectrum]

Date : 04-Feb-1982 13:18

Date : 04-Feb-1982 13:18

Sample: MJE-RS+Csl

Note : -

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.36 min

Scan# : (8,18)

Temp : 52.6 deg.C

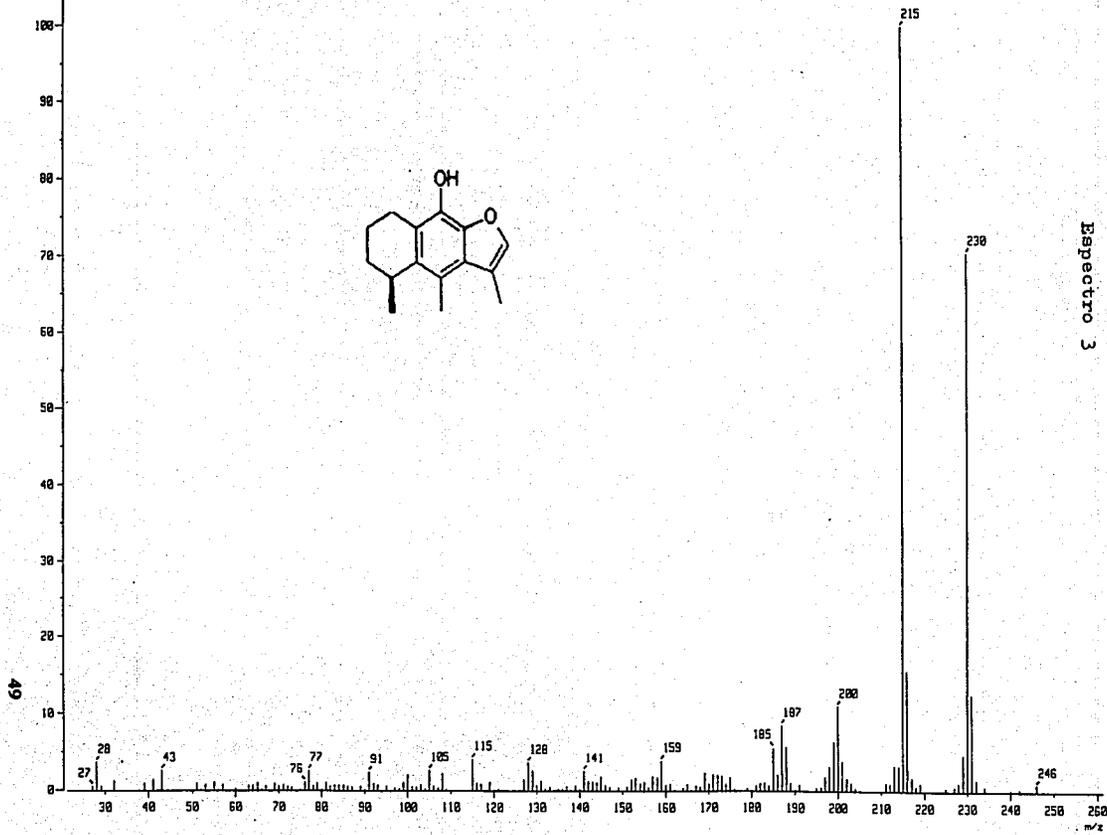
BP : m/z 215.0000

Int. : 592.44

Output m/z range : 21.3650 to 251.1275

Cut Level : 0.00 %

6445561

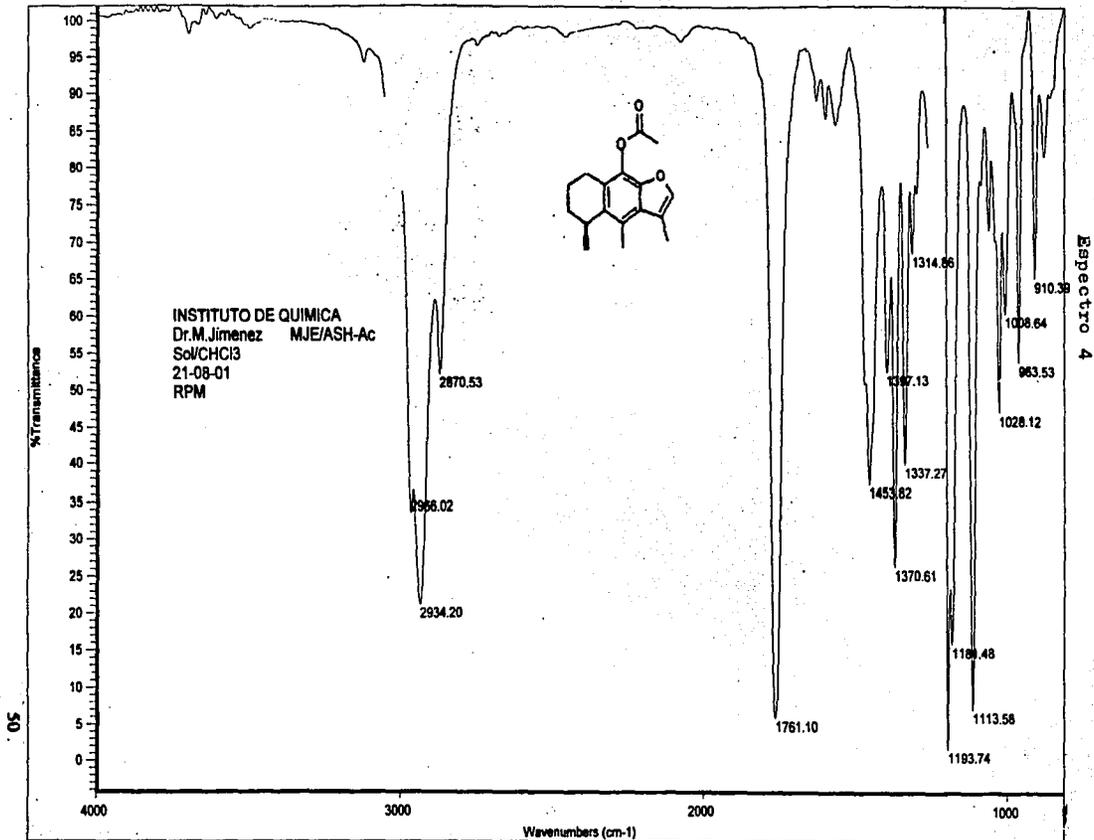


Espectro 3

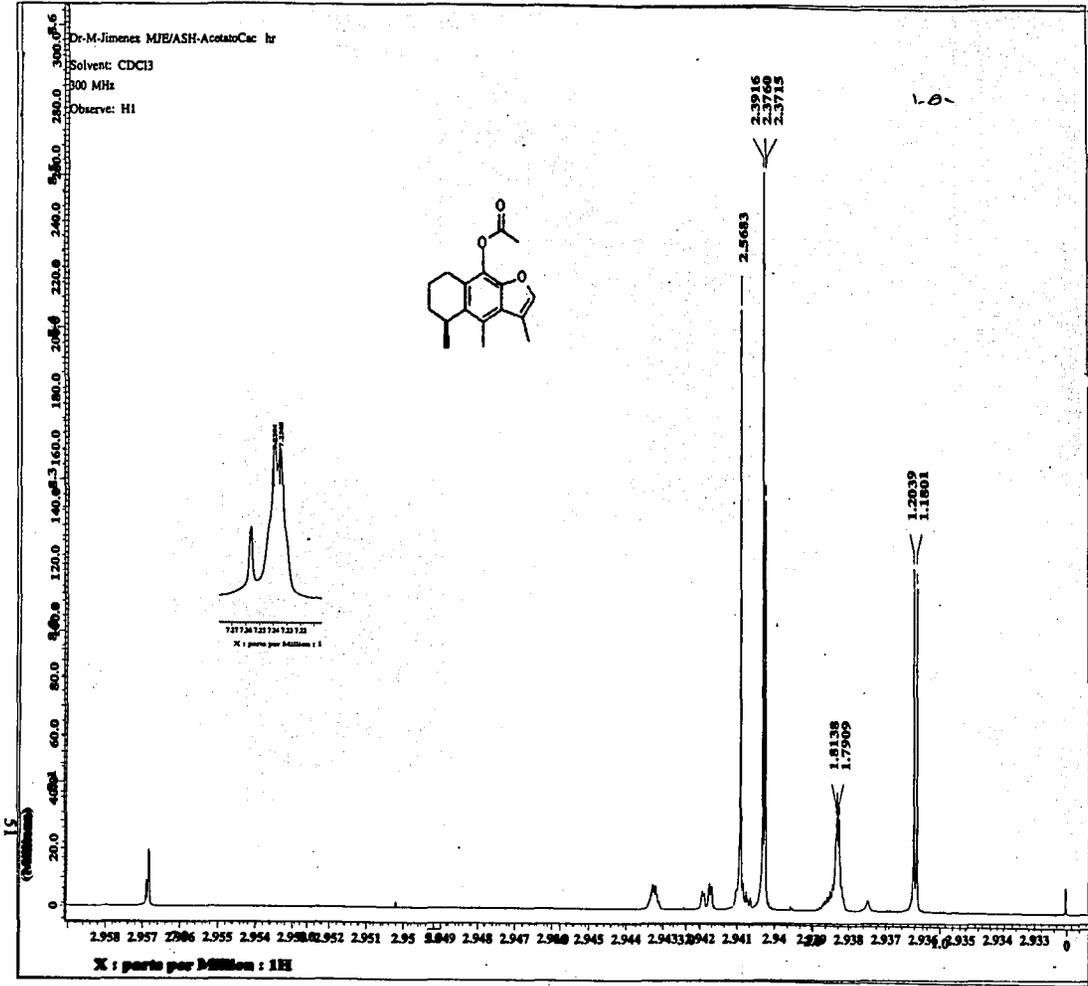
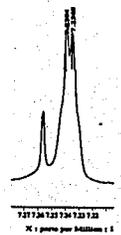
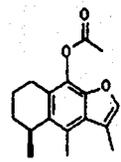


Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Infrarrojo



Dr-M-Jimenes MJB/ASH-AcetoatoCac hr
Solvent: CDCl3
300 MHz
Observe: H1



[Mass Spectrum]

Data : Dr-Jimenez-Manuel-022

Date : 30-May-100 07:19

Sample: MJC-RSH-Pc

Note : -

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion (M-Linear)

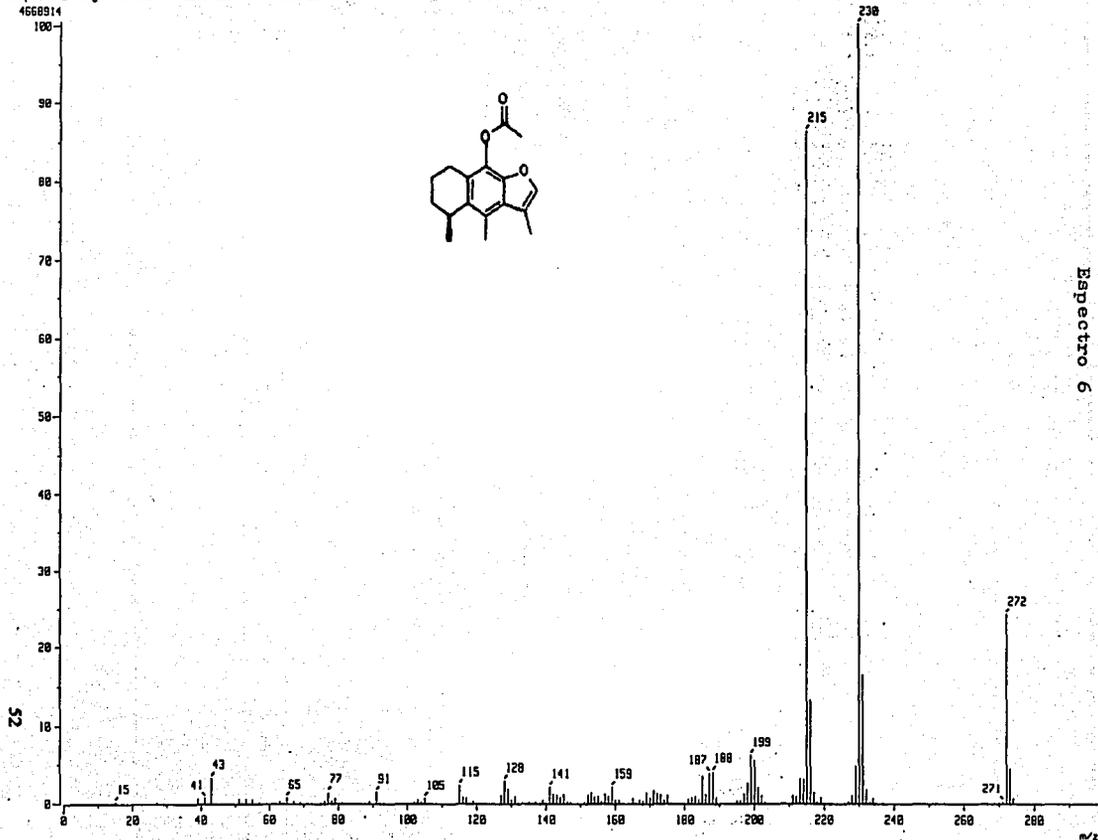
RT : 0.49 min Scan# : 16,291-(4,9)

Temp : 39.0 deg.C

BP : m/z 230.0000 Int. : 442.70

Output m/z range : 0.0000 to 297.5028

Cut Level : 0.00 %



Espectro 6

52

m/z

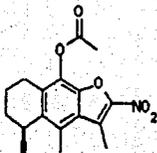
Dr. Ricardo Reyes

Aida Soto RRCH/ASH-Nitrado

300 MHz/ CDCl₃

(eclipse 300 jeol)

98



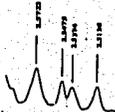
7.2606

X 1 parts per Million



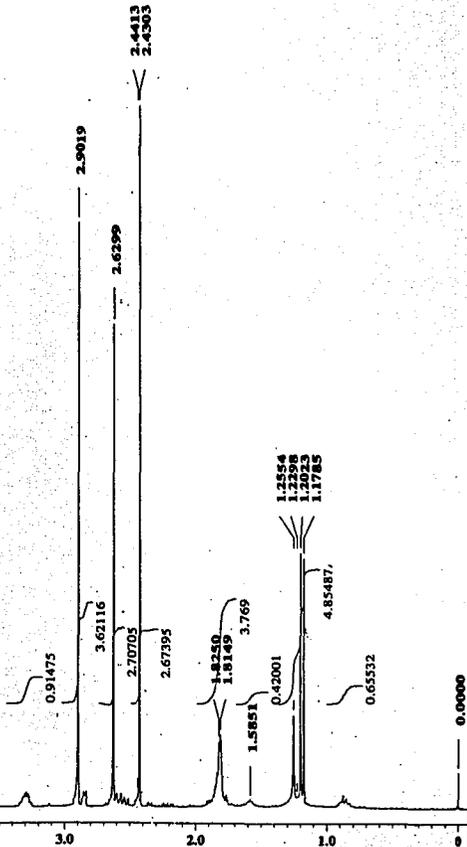
6.2116

X 1 parts per Million



3.769

X 1 parts per Million



Espectro 8

[Mass Spectrum]

Data : Alvarez-Ricardo-015

Date : 16-Apr-100 01:34

Sample : KRCH-HH-nitrado

Note : -

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.27 min

Scan : (4,16)-(4,8)

Temp : 75.2 deg.C

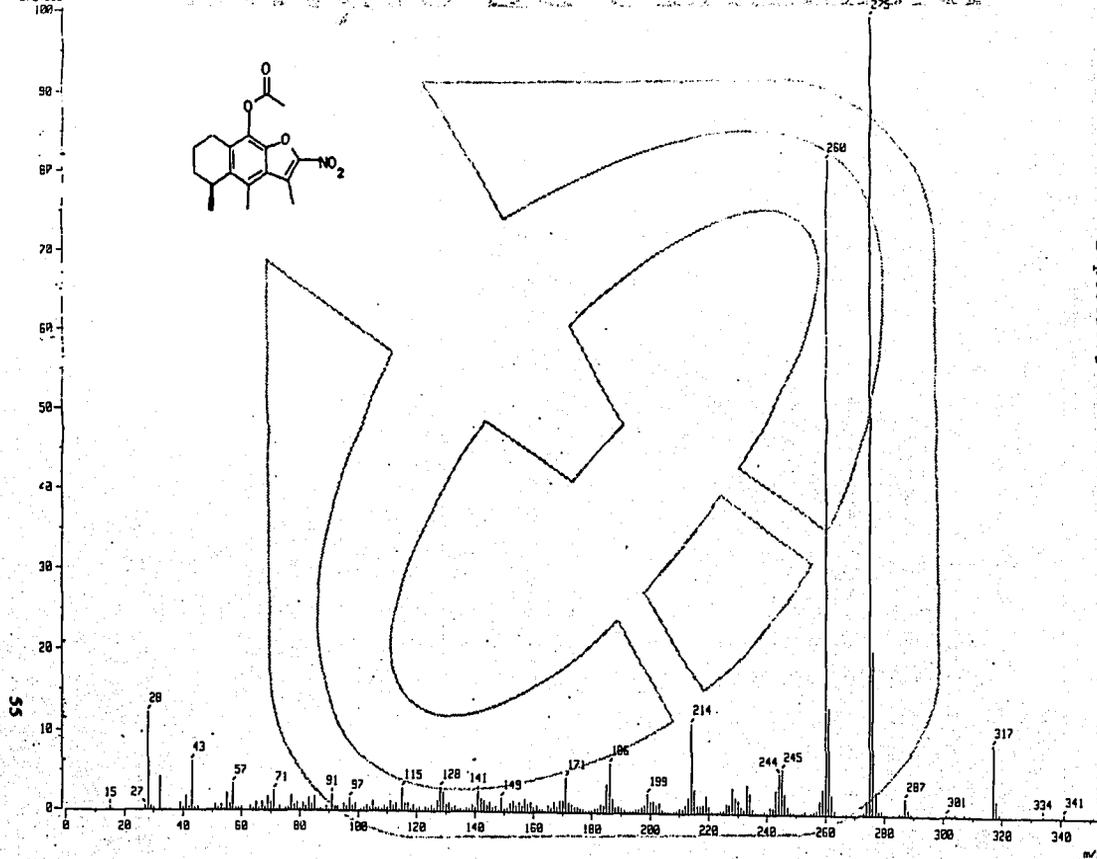
BP : m/z 275.0000

Int. : 637.56

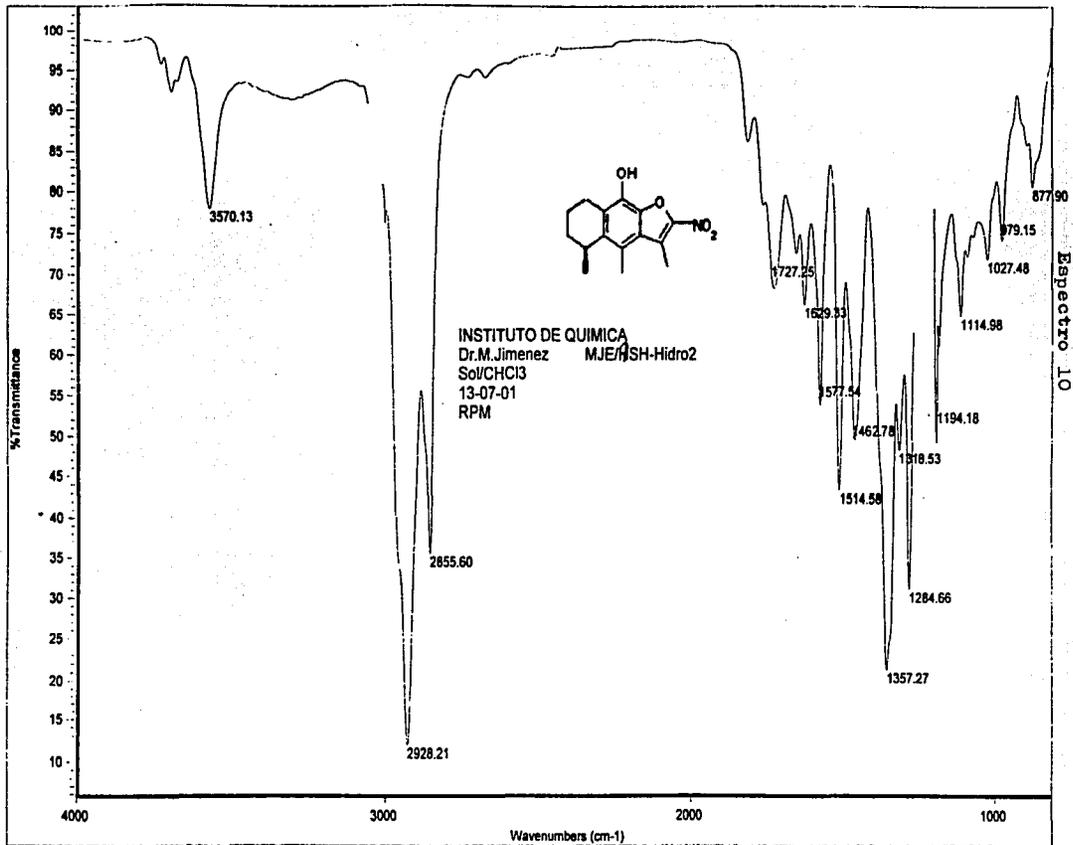
Output m/z range : 0.0000 to 353.7852

Cut Level : 0.00 %

6704582



Espectro 9



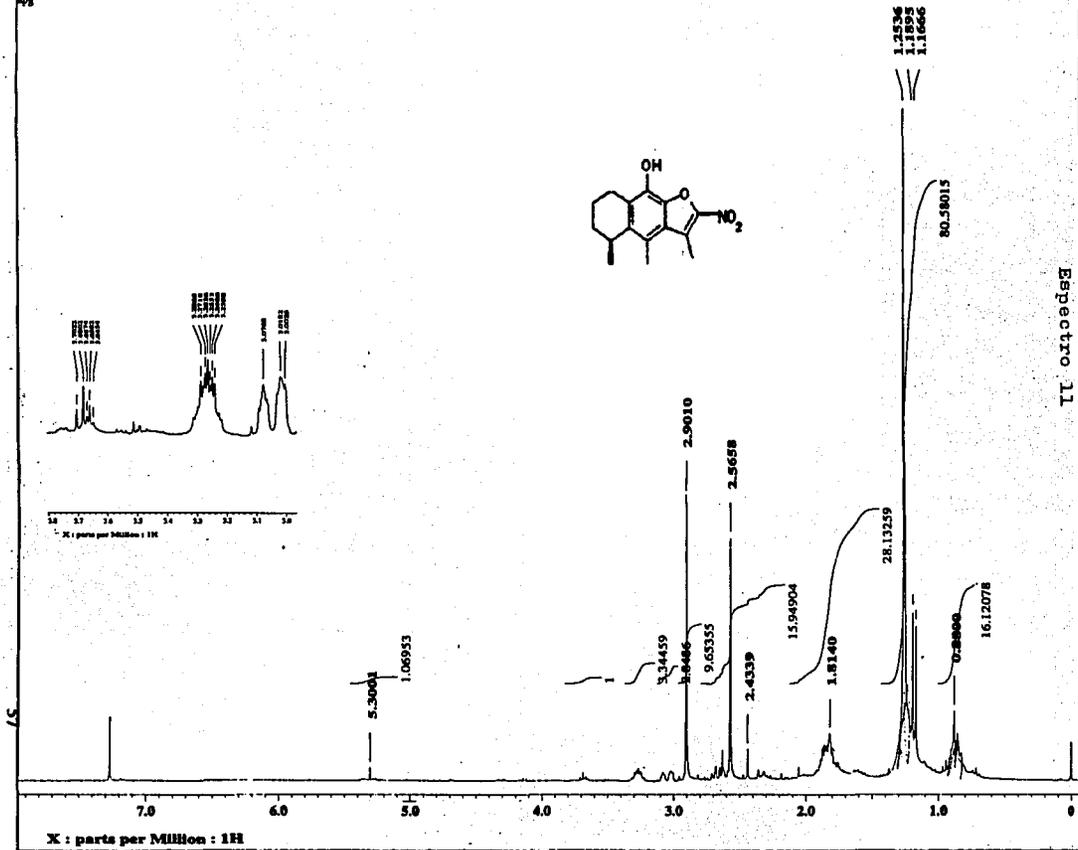
Dr. Manuel Jimenez

MIE/ASH-Hidro?

300 mhz/ CDCl₃

(eclipse 300 jeol)

ppm



[Mass Spectrum]

Data : Dr-Jimenez-Manuel-004

Date : 24-May-100 20:07

Sample: HJC-AS3+hidro-2

Note : -

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)

RT : 1.10 min Scan# : (11,70)

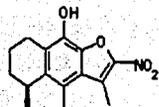
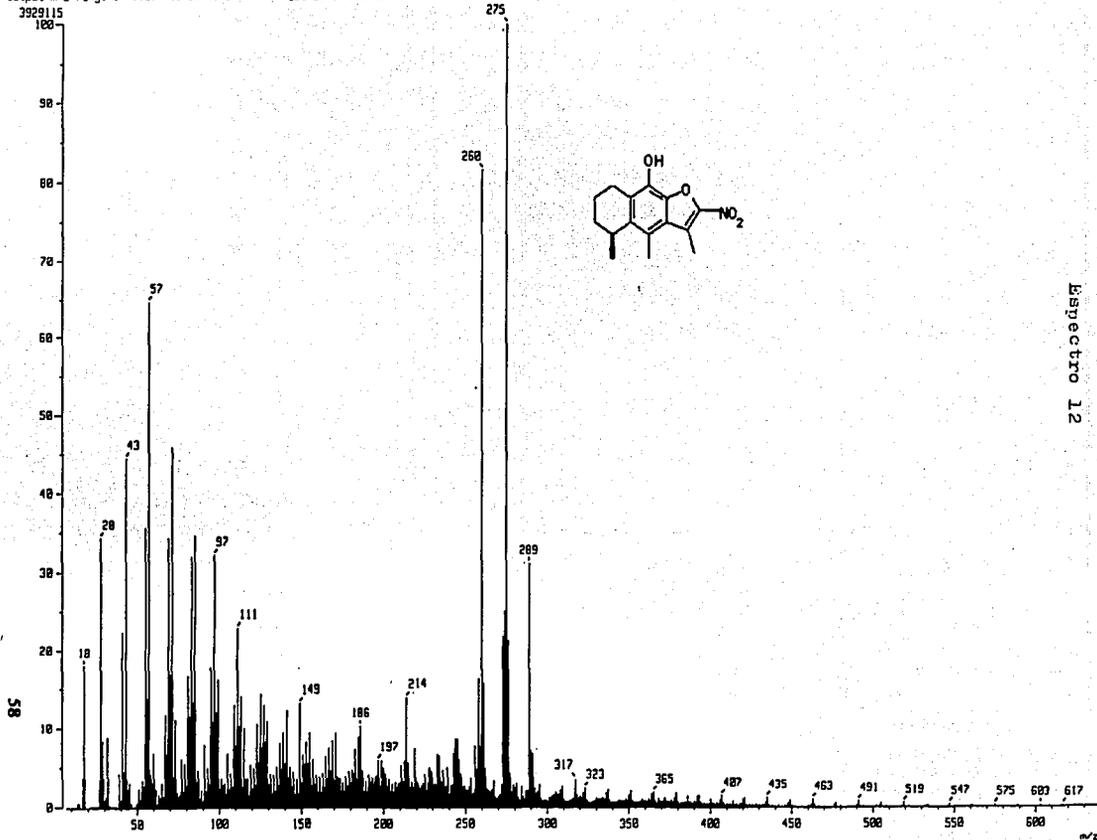
Temp : 62.0 deg.C

BP : m/z 275.0000

Int. : 374.71

Output m/z range : 7.1217 to 638.5757

Cut Level : 0.00 %



Espectro 12

ANEXO 2

PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

Medios de cultivo líquidos. El cultivo y estandarización de los microorganismos se realizó en Caldo Mueller-Hinton BBL (Becton-Dickinson) en el caso de las bacterias y en Caldo Dextrosa Sabouraud (BD Bioxon) para *Candida albicans*.

Medios de cultivo sólidos. El agar utilizado para la prueba de difusión en agar y el método de microdilución fue Agar Mueller-Hinton (Merck) para las bacterias y Agar Dextrosa Sabouraud al 4% (DIBICO) para *C. albicans*.

Controles. En el caso de las bacterias se utilizó como control positivo una preparación comercial de cloramfenicol (CLORAMFENI OFTENEO) la cual contiene 0.5 g de cloramfenicol por cada 100 mL de solución. El control positivo para *C. albicans* fue nistatina de 50 000 U (Sigma). En todos los experimentos se utilizó acetona como control negativo.

Método de difusión en agar (Kirby-Bauer)

Preparación de sensidiscos. Se utilizaron discos de papel filtro Whatman No. 5 de 6 mm de diámetro. El cacalol y sus derivados (50 mg de cada compuesto) se disolvieron en 1 mL de acetona y se impregnaron los discos con 10 µL de la solución correspondiente a cada compuesto, dejando evaporar posteriormente el disolvente. Para el control positivo en bacterias, se agregaron 6 µL de CLORAMFENI OFTENEO a los discos correspondientes. Para *C. albicans* se prepararon discos que contenían 4400 U de nistatina por disco. El control negativo se preparó impregnando discos con 10 µL de acetona.

Cepas de microorganismos. Estos microorganismos fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 (grampositivo), *Sarcina lutea* cepa de campo (grampositivo), *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155 (gramnegativo), *Escherichia coli* ATCC 25922 (gramnegativo), *Salmonella typhi* ATCC 19430 (gramnegativo), *Shigella boydii* ATCC 8700 (gramnegativo), *Vibrio cholerae* NO-01 (gramnegativo) y *Candida albicans* aislada de caso clínico (hongo levaduriforme).

Inóculo microbiano. La preparación y estandarización del inóculo microbiano se realizó de la siguiente manera: con un asa bacteriológica, se tocaron las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar y se sumergieron en 3 mL de caldo. La suspensión microbiana se incubó a 37 °C durante 24 horas o hasta que la turbidez presentara una absorbancia de 0.3 a 660 nm en el espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy), lo cual equivale a una concentración de 10^8 microorganismos/mL.

Siembra de los microorganismos. Un hisopo de poliéster, estéril y seco se sumergió en la suspensión bacteriana que contenía 10^8 microorganismos/mL, con este hisopo se inoculó la superficie sólida de la placa de agar y se sembró mediante estría en tres direcciones.

Evaluación de la actividad antimicrobiana. Una vez seco el inóculo, se aplicaron los discos sobre la superficie del agar. Se utilizaron 3 cajas Petri por microorganismo. En cada caja Petri se colocaron: 2 discos de cacalol, 2 discos de los derivados del cacalol, 1 disco de control positivo y 1 disco de control negativo. Una vez preparadas las cajas, se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Al término de este periodo se buscó la presencia de halos de inhibición.

Método de microdilución en agar

Compuestos. Los compuestos evaluados fueron cacalol, 2-nitroacetato de cacalol (excepto para *C. albicans*) y 2-nitrocacalol.

Diluciones. En la preparación de las diluciones se utilizaron frascos viales los cuales contenían agar fundido. Se disolvieron 4 mg del compuesto a evaluar en 150 μ L de acetona y se agregaron a un vial que contenía 4 mL de agar fundido (concentración de 1000 μ g/mL). Se transfirió una alícuota de 2 mL de la solución anterior a un vial que contenía 2 mL de agar fundido (concentración de 500 μ g/mL). De esta manera se prepararon las concentraciones mediante diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 7.8 μ g/mL.

Controles. Para el control de crecimiento, en ausencia de compuesto, se colocaron 100 μ L de agar y el microorganismo a evaluar. El control positivo para bacterias se preparó de la siguiente manera: se colocaron 100 μ L de agar en los pozos correspondientes y se agregaron 10 μ L de CLORAMFENI OFTENOL. Para el control positivo de *C. albicans* se agregaron 10 μ L de una solución que contenía 5000 U de nistatina disueltas en acetona. Para el control negativo se

colocaron 100 μL de agar en los pozos correspondientes y se agregaron 10 μL de acetona. La presencia o ausencia de contaminación microbiana se evaluó mediante pozos que contenían únicamente 100 μL de agar.

Inóculo microbiano. A diferencia del método de difusión en agar, el presente método requiere que la concentración de microorganismos sea de 10^5 microorganismos/mL. Para obtener esta concentración, primero se estandarizó el inóculo a 10^8 microorganismos/mL de la manera descrita en el método de difusión en agar y enseguida se transfirió una alícuota de 10 μL de la suspensión microbiana a un tubo que contenía 9.99 mL de caldo.

Ensayo de actividad antimicrobiana. Como contenedor de las concentraciones y los controles, se utilizaron placas de ELISA (Evergreen scientific) estériles de 96 pozos con fondo de U. Los controles y las concentraciones se evaluaron por triplicado en cada microorganismo. Cada réplica contenía 100 μL de la concentración o los controles. Después de que el agar hubo solidificado, se agregaron 20 μL de la suspensión de 10^5 microorganismos/mL a cada pozo (excepto a los correspondientes al control de contaminación microbiana). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después de este periodo, el crecimiento bacteriano se hizo evidente mediante la reducción del reactivo violeta de tetrazolio (Sigma)*: se agregaron, a cada pozo, 50 μL de una solución acuosa del reactivo al 0.08%, después de lo cual se incubó la placa a 37 °C durante 30 minutos.

* En el caso de *C. albicans* no se agregó el reactivo de tetrazolio ya que este microorganismo es la única especie del género *Candida* que no reduce dicho reactivo; la presencia de crecimiento en este caso, se observó directamente en los pozos ya que este es evidente por la aparición de colonias ligeramente amarillas, de apariencia butírea, convexas y bordes redondeados.

Interpretación de la prueba. La concentración más pequeña donde no se observó crecimiento (ausencia de coloración violeta o ausencia de colonias), se reportó como la concentración mínima inhibitoria.