



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
" IZTACALA "

AISLAMIENTO, PURIFICACION Y ELUCIDACION  
DE UN PRINCIPIO ANTIMICROBIANO  
EXTRAIDO DEL MOLUSCO  
Purpura pansa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

GERARDO HERNANDEZ AZUA

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1986.



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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (U.I.I.C.S.E.), de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, U.N.A.M., bajo la dirección de la Q.F.I. Rosa Martha Pérez Gutiérrez, a quien agradezco la conducción de esta Investigación. Asimismo debo agradecer muy especialmente la colaboración de René Saucedo López, en cuya ausencia esta tesis no estaría aquí.

*Esta tesis está dedicada a Tere y Héctor (mis padres), mi familia, -- María Elisa Martínez, Nefthalí Ricardo Reyes, Ivonne Márquez, Alvaro Hernández, Rosario Gutiérrez, Ignacio López Jorge Eduardo Herrera, Ena Poumián, - Ervin Silva y la banda del dos, Luis Rodríguez, Alejandro Castro, Carmen García, Pedro Mendoza, Alfonso Herrera, Moisés Cherem, Baldo, y a la memoria de Adriana García y de Faustino Hernández.*

*"Mas allá está un mundo inmenso, que existe al margen de nosotros, los seres humanos, y que se nos muestra -- como un grandioso y eterno enigma, aunque parcialmente accesible a nuestro análisis y especulación. La contemplación de este mundo nos llama como una liberación... El camino hasta este paraíso no es tan confortable ni tentador como el que conduce al edén religioso, aunque se nos ha mostrado seguro y digno de confianza. Por mi parte, no lamento en absoluto haberlo escogido".*

ALBERT EINSTEIN.

*" ...Y además una cosa: yo no tengo ningún inconveniente en meterme en camisa de once varas".*

NICANOR PARRA .

*"La muerte no importa.  
Lo que importa es la lluvia,  
afuera, la insensible tarde,  
la vida despidiéndose  
inútilmente" .*

JAIME SABINES .

A TZASNA .

## I N D I C E

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
II.1 JUSTIFICACION	2
II.2 LA FARMACOLOGIA MARINA	4
II.2.1 FUENTES BIOLÓGICAS MARINAS - DE ANTIMICROBIANOS	5
II.3 EL MOLUSCO <i>Purpura pansa</i>	10
II.4 CLASIFICACION QUIMICA DE LOS - ANTIMICROBIANOS	12
III. OBJETIVOS	27
IV. MATERIAL Y METODO	28
V. RESULTADOS	31
VI. DISCUSION	42
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. BIBLIOGRAFIA	47

## I. RESUMEN .

El presente trabajo se ha abocado a una de las propiedades terapéuticas descubiertas en el campo de la Química y la Farmacología marinas: la capacidad de ciertos organismos de producir sustancias con efectos antimicrobianos.

El molusco *Purpura pansa* fue recolectado en la Bahía de Pichilingue en La Paz, B.C.S., en octubre de 1984. De este molusco se hicieron cuatro diferentes extracciones con los siguientes disolventes: agua, etanol, cloroformo y hexano.

Como resultado de las pruebas microbiológicas de actividad antimicrobiana, se trabajó con el extracto clorofórmico, con el fin de aislar el principio activo. Para ello se emplearon técnicas de separación y purificación tales como la cromatografía en columna de vidrio vía húmeda, espectroscopía en el U.V./VIS, cromatografía en placa fina y recristalización en etanol.

La estructura que se sugiere para el compuesto antimicrobiano se determinó por medio de espectrometría de masas, espectroscopía de infrarrojo y resonancia magnética de protones, siendo dicha estructura el 2, 3, 4 trimetil, 5(4' metil-ciclohexil) 2, 4 pentadieno.

## I I . I N T R O D U C C I O N .

### II. 1. J U S T I F I C A C I O N .

Hasta las primeras décadas de este siglo, los medicamentos eran extraídos exclusivamente de la naturaleza, pero con el desarrollo de la Química Orgánica fue posible la proliferación de sustancias sintéticas, observándose así un decremento en el porcentaje de medicamentos de origen natural (Braekman, J. C. & Dalozé, D. 1983).

Con todo, la estructura de una molécula natural sirve de punto de partida para la concepción y construcción de edificios moleculares que con frecuencia pueden conducir a sustancias más activas y específicas. Estas sustancias se hacen cada vez más necesarias en el campo de los antibióticos debido a la resistencia que han desarrollado las poblaciones microbianas contra los antibióticos de carácter convencional. Esta es una de las razones que justifica la búsqueda de nuevas moléculas que conduzcan a medicamentos más específicos y mejor adaptados (op.cit., pag. 601).

Hasta hace muy poco tiempo, las fuentes de moléculas naturales activas eran únicamente los metabolitos secundarios -- aislados de microorganismos y de vegetales terrestres, pero el hallazgo de nuevas sustancias activas a partir de estas fuentes es cada día menos frecuente. De ahí la necesidad de recurrir a las nuevas fuentes naturales con miras a obtener moléculas originales que puedan ser aprovechables.

Para tal efecto, el mar es una fuente relativamente inexplorada de nuevas moléculas, siendo que su potencial es enorme ya que en el mar viven alrededor de 500,000 especies, lo que representa, exceptuando a los insectos, las tres cuartas partes de las ahora conocidas. Este potencial es tanto más importante por el hecho de que los organismos marinos han evolucionado en un medio físico y químico distinto al que se presenta en el medio terrestre.

Debido a lo anterior, el estudio de las nuevas fuentes naturales, como son los organismos marinos, es indispensable para la obtención de compuestos antimicrobianos que sean capaces de reducir la resistencia antibiótica que presentan las poblaciones microbianas; que además presenten un mayor espectro de actividad, con mayor velocidad de penetración, con menos efectos tóxicos colaterales, con una mayor afinidad por el lugar de acción y con una mejor rentabilidad.

El presente trabajo forma parte del programa de investigación de antimicrobianos de origen marino, que se realiza en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la U.I.I. C.S.E. de la E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M., patrocinado por el CONACYT, y comprendió el muestreo de la flora y fauna marinas de la Bahía de Pichilingue en La Paz, B.C.S., México.

Del molusco *Purpura pansa* se efectuó una revisión bibliográfica exhaustiva (Chem. Abstr. de 1940 a 1984) y no se encontraron reportes sobre estudios químicos ni microbiológicos, por lo que primeramente se realizó un estudio preliminar para determinar si este molusco poseía actividad antimicrobiana. Como resultado de este estudio preliminar se encontró actividad antimicrobiana (Com. pers. Lab. de Mic./F.E.S.-C.), y es por ello que se decidió realizar la investigación con este molusco.

## II . 2    L A   F A R M A C O L O G I A   M A R I N A .

En farmacología marina se utilizan básicamente dos métodos para abordar el medio marino. Uno de ellos ha sido el uso de la biotoxicidad como indicadora de propiedades farmacológicas generales.

Frecuentemente las sustancias tóxicas químicamente transformadas o utilizadas en dosis adecuadas, muestran actividades terapéuticas. Por tanto, el buscar moléculas activas se convierte, por este camino, en la búsqueda de toxinas; y el medio marino es rico en especies venenosas y urticantes.

El otro método consiste en someter todos los extractos de organismos marinos a pruebas farmacológicas. Esta orientación precisa de medios humanos y financieros importantes. Sin embargo ello no ha impedido que desde finales de los cincuenta y principio de los sesenta se iniciaran programas de investigación para la valorización de sustancias de origen marino en Bélgica (Braekman, J.C. & Daloz, D. op. cit.), Estados Unidos (Martínez Nadal, N.G. y col., 1964), Japón (Saito, T. & Ando, Y., 1955), y muy recientemente en México (Green, G., 1978).

No son pocas las moléculas con actividad terapéutica que han sido aisladas gracias al empleo sistemático de pruebas farmacológicas. Al efecto, el organismo estudiado es tratado con un disolvente orgánico y/o inorgánico y el extracto obtenido es sometido a pruebas que permiten poner de manifiesto una actividad determinada, por ejemplo antibiótica, citotóxica o cardiovascular. Si las pruebas son positivas, el extracto es seguidamente fraccionado y cada fracción es sometida a otro bioensayo. Este procedimiento se repite hasta el aislamiento de la sustancia activa en estado puro, cuya estructura puede entonces ser determinada.

Estos pasos, sin embargo, tropiezan con numerosos escollos siendo a menudo el principal, la pequeña concentración de la o de las sustancias activas en los extractos totales (menor al --- 0.001 %). Además, cada equipo de investigación se especializa en la detección de una actividad determinada. Ello implica que en la búsqueda de derivados antimicrobianos, por ejemplo, una sustancia de actividad cardiovascular no pueda ser detectada. Este

-método, no obstante, ha permitido poner de manifiesto numerosas moléculas activas (1,4,6,11,17,20,22,33,35 y 36).

## II. 2. 1. FUENTES BIOLÓGICAS MARINAS DE ANTIMICROBIANOS.

Las investigaciones sobre la Química y la Farmacología marinas se iniciaron a finales de los años cincuentas con el fin de obtener nuevas moléculas antimicrobianas, antivirales, antifúngicas, entre otros atributos. Así, Nigrelli y col. en 1959, fueron los primeros en reportar un agente antimicrobiano de amplio espectro a partir de una esponja marina. Esta sustancia, llamada Ectonina, fué extraída de Microciana prolifera y demostró actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas, gram-negativas y contra Candida albicans (30).

Estos mismos autores, en 1960, concluyeron que las sustancias antimicrobianas sí son producidas por las esponjas y no por bacterias asociadas a ellas. Asimismo, obtuvieron sustancias con actividad antimicrobiana a partir de las siguientes esponjas: Clona celata, Dysidea etheria, Halichondria panacea, Aliclona viridis, Oligocereas hemorragas y Tedania ignis (22).

En 1964, Martínez Nadal y col., lograron aislar y caracterizar el extracto etéreo del alga verde Cymopolia barbata, el cual inhibe el crecimiento de bacterias gram-positivas, gram-negativas, levaduras y hongos (28).

Trabajando también con algas, Irie y col., en 1966, aislaron algunos fenoles sesquiterpenicos y fenoles bromados a partir del alga Laurencia intermedia. Estos fenoles presentaron actividad sobre Staphylococcus aureus, Microsporum smegmatis y Candida albicans (20).

Burkholder, P.R. ha trabajado desde 1966 sobre el aislamiento de agentes antimicrobianos tanto en esponjas marinas como en bacterias marinas (5 y 6).

Stempien y col., en 1969, reportaron los resultados de sus investigaciones en extractos de esponjas marinas colectadas en Jamaica y las Islas Vírgenes; extractos de 23 especies presentaron actividad antibiótica (37).

En 1977, Andersen y Faulkner reportaron los resultados de su investigación sobre la actividad antibacteriana de inver-----

-tebrados del Golfo de California (1).

Kennet y col., en 1981, reportaron los resultados de sus investigaciones en diferentes extractos de especies marinas de Baja California y del Caribe, las cuales, por presentar una amplia variedad de bioactividad, se les determinaron sus constituyentes químicos por medio de cromatografía y espectrometría de masas (25).

#### A. MONERA.

Se ha calculado (26), que hay alrededor de 1,500 especies de bacterias marinas, de las cuales la mayoría (el 95 %) son Gram-negativas flageladas. Aproximadamente el 70% de estas bacterias producen pigmentos, enzimas libres y algunos presentan florecencia ( 27 ).

Rosenfeld, W.D. y Zobell, C.E., en 1947 reportaron que al menos 60 microorganismos presentaban actividad antimicrobiana y encontraron que 6 especies de Bacillus y Micrococcus presentaban actividad contra varios microorganismos no marinos (32).

En 1958, Grein, A. y Meyers, S.P., reportaron 70 compuestos activos aislados de actinomicetos de aproximadamente 166 derivados de sedimentos marinos y materiales suspendidos en el agua marina; estos compuestos presentaron actividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (18).

El primer antibiótico que se aisló de una bacteria marina Pseudomonas bromoutilis, fue reportado por Burkholder, P.R. y col., en 1966. Este compuesto fue el 2(3',5'-dibromo-2'-hidroxifenil)3,4,5-tribromo pirrol, cuya estructura fué determinada por cristalografía de rayos X. Este antimicrobiano demostró una elevada actividad contra bacterias Gram-positivas como Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae y Streptococcus pyogenes, las cuales fueron inhibidas "in vitro" con una concentración de 0.00638 mg/ml de antimicrobiano. Sin embargo, -- "in vivo" fue inactivo y las pruebas de ratón demostraron que era tóxico (25-50 mg/Kg por vía intravenosa) (5).

Lewin y Jakson (3), reportaron sustancias antimicrobianas, entre otras propiedades, que eran producidas por cianobacterias marinas.

Se han reportado diferentes sustancias antibióticas pro-

-ducidas por la cianobacteria de agua dulce Oscillatoria splendida (3); y se ha reportado que los extractos de Oscillatoria-princeps presentan actividad contra Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, B. thyphosa, E. coli y Brucella branchisep-tica (19).

#### B. PROTISTAS.

Aquí se incluyen a las algas rojas, verdes y cafés, a las diatomeas y a los dinoflagelados, los cuales han demostrado poseer una gran cantidad de sustancias antibióticas, reportadas por Welch, A.M. en 1962 (40).

Las algas marinas son probablemente los organismos que se han estudiado con mayor amplitud en relación con las propiedades antimicrobianas de sus componentes. En 1966, Irie, T. y col. demostraron que algunas algas rojas del género Laurencia, contienen fenoles sesquiterpénicos y fenoles bromados entre los que figuran el laurenterol y el dibromo-laurenterol, que son capaces de inhibir el crecimiento de Staphylococcus aureus, Microsporium smegmatis y Candida albicans (20).

El extracto etéreo de Cymopolia barbata (un alga verde), inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como de levaduras y hongos, según demostraron Martínez Nadal, N.G. y col. en 1964 (28).

Burkholder y col., en 1969, reportaron que los extractos acuosos del dinoflagelado Gonyaulax tamerensis, inhiben el crecimiento de Staphylococcus aureus, E. coli, C. albicans y Mycobacterium sp. (6).

La mayoría de los análisis extensivos de sustancias antibióticas extraídas a partir de las algas se han realizado en miembros de los phylums Clorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta (Baslow, D. 1969) (3).

En cuanto a las diatomeas, se ha reportado que el crecimiento de cultivos de estos organismos en sus géneros Skeletonema y Nitzschia (3).

#### C. PORÍFERA.

Entre los organismos marinos que representan una fuente importante de antimicrobianos, están las esponjas. En 1959, Nigrelli y col. obtuvieron el primer agente antimicrobiano, llama-

-mado Ectyonina, extraído de la esponja Microciona prolifera y demostró propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y contra el hongo Candida albicans.

Jakowska y Nigrelli, en 1960, obtuvieron sustancias antimicrobianas con un grado variable de actividad en las esponjas Cliona celata, Dysidea etheria, Halichondria panicea, Oligoceras hemorrhages y Tedania ignis.

En 1967 y 1970, Sharma, G.M. y Burkholder, P.R. reportaron las propiedades químicas de algunas sustancias antibióticas extraídas de las esponjas Dysidea herbacea, Homaxinella sp., Plakortis sp., Verognia fistularis y Verognia cauliformis.

Stempien, M.F. y col., (1969), aislaron de Verognia archeri, el 3,5-dibromo-4- hidroxifenilacetamida, compuesto que inhibe el crecimiento de Bacillus subtibilis, E. coli y Pseudomonas atrovenetum.

En 1970, Minale y col., aislaron el 4,5-dibromo-2-cianopirrol a partir de Angelatus spp., y fue activo sobre Streptococcus sp., Candida albicans y Trichophytum sp.

Finalmente, Green, G., en 1977, reportó los resultados de sus investigaciones sobre la actividad antibiótica de extractos de esponjas marinas tóxicas colectadas en el Golfo de México y en la costa del Pacífico de Norteamérica. De las 24 especies de esponjas estudiadas, extractos de 15 especies mostraron tener actividad contra Bacillus subtibilis y extractos de 12 especies mostraron tener actividad contra Escherichia coli. (17).

#### D. CNIDARIOS (CELETERADOS).

En los celenterados también se han encontrado compuestos antimicrobianos. De los corales Plexaura crassa y Eunica mammosa se han aislado dos compuestos con actividad antibiótica y son tóxicos para Entamoeba hystolitica e inhiben el crecimiento de Clostridium feseri y Sthaphylococcus aureus (8).

En los gorgónidos del Caribe y en los corales blandos del Indopacífico, Di Salvo, L.H., en 1971, encontró también varios compuestos con actividad antimicrobiana (9).

## E. MOLUSCOS.

Aquí se incluyen organismos tales como pulpos, almejas, - caracoles, liebres de mar, ostras, etc. Sin embargo, el estudio\_ de los antimicrobianos en moluscos se ha centrado hacia los --- opistobranquios y los nudibranquios. En un buen número de casos estudiados se ha encontrado que el principio activo no es produ\_ cido por el molusco , sino que éste se forma en los organismos\_ de que se alimenta. Por ejemplo, en Aplysia californica, de ex- tracto de la glándula digestiva se aisló laurenterol y otros fe\_ noles sesquiterpénicos que provienen de las algas rojas Plocami\_ um spp. y Laurencia spp. (3).

El molusco Onchidilla binneyi, cuando es irritado, excre- ta una mucosidad que contiene un compuesto con propiedades anti\_ microbianas sobre Staphylococcus aureus y al cual se le dió el\_ nombre de Ancuidal (21).

Además de la actividad antimicrobiana de ciertos moluscos también se ha demostrado actividad antitumoral, la cual fue des\_ cubierta con experimentos sobre extractos de la almeja Mercena- ria mercenaria (Baslow, D., 1969).

I I . 3 . EL MOLUSCO Purpura pansa .

A. DESCRIPCION TAXONOMICA.

El molusco Purpura pansa Gould 1957, pertenece a la Clase Gasterópoda, que es la más importante, pues estos organismos es-  
tán presentes en el planeta desde el período Cámbrico. Se cono-  
cen (de esta clase) cerca de 35,000 especies actuales y cerca -  
de 15,000 especies fósiles. Los miembros de esta clase poseen -  
una concha que a menudo es espiral. Presentan una cabeza bien -  
diferenciada y una rádula; un ancho pie y una masa visceral tor-  
cionada 180°.

Hay tres Sub-clases: Prosobranchia, Opisthobranchia y Pul-  
monata. Purpura pansa pertenece a la Sub-clase Prosobranchia y  
como todos los miembros de esta Subclase ha sufrido la torsión  
y el traslado de las branquias, ano y cavidad paleal hacia ade-  
lante. Esta Sub-clase se divide en 3 Ordenes : Archeogasterópoda  
Mesogasterópoda y Neogasterópoda.

Como todos los miembros de el Orden Neogasterópoda, la ca-  
vidad del manto y los órganos que contiene se encuentran en la  
parte anterior del animal. Posee una sola branquia unipectinada  
y un osfradio bipectinado; un sistema nervioso central y una --  
concha con una muesca o canal sifonal. Su longitud varía entre  
dos y tres pulgadas, no presenta umbilico y su columnella es de  
color blanquecina-cremosa.

Purpura pansa pertenece a la familia Muricidae (Drupinae)  
y se encuentra en las costas del Pacífico, desde México hasta -  
Colombia(38).

B. ECOLOGIA Y UTILIZACION.

El molusco Purpura pansa vive adherido a las rocas, en la  
zona de las rompientes de las olas, con un ciclo de vida de ---  
aproximadamente siete años. El molusco se puede coleccionar fácil-  
mente durante la marea baja.

De este molusco se obtiene un tinte de color purpura, que  
es usado para la tinción de hilos y tejidos telares. La secre-  
ción cumple una doble función para el organismo : como narcoti-  
zante sobre sus víctimas y como cápsula de protección a los hue-  
vecillos, del ataque de algunos peces depredadores (34).

Cabe hacer mención que este molusco está en grave peligro de extinción, debido a que una compañía japonesa ha sobre-explotado el recurso con el fin de extraer el tinte. De hecho, en las costas de Centroamérica ya se ha extinguido y este fenómeno bien podría generalizarse ya que no se ha sabido extraer el tinte: lo explotan durante todo el año sin respetar sus ciclos reproductivos y de maduración, períodos en los cuales el fluido protege a las crías.

Desde antes de la conquista , diversos grupos indígenas han extraído el tinte sin ocasionar su extinción y es por ello que actualmente se reclaman medidas para que recursos naturales como este molusco, sean debidamente aprovechados (2).

## II . 4 CLASIFICACION QUIMICA DE LOS ANTIMICROBIANOS .

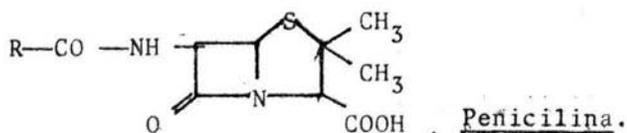
Entre todas las sustancias antimicrobianas aisladas y estudiadas, solo pocas son utilizadas clínicamente. Hay muchos productos que poseen identidades de estructura química, por lo que también presentan un mecanismo de acción y un espectro comparable.

Se ha efectuado una clasificación de antibióticos basada en dichos criterios y se han definido 11 "familias" de antibióticos, mismas que a continuación se presentan ( 10 ) :

### A. BETALACTAMINAS.

Las beta-lactaminas se denominan así porque su molécula posee un anillo  $\beta$  -lactámico. Aquí se incluyen las penicilinas, las cefamicinas y las cefalosporinas.

#### a) Penicilinas.



Poseen en común un núcleo (el ac. 6-aminopenicilánico), formado por la unión de dos anillos : un anillo  $\beta$  -lactámico y un anillo tiazolidina. Las distintas penicilinas difieren entre sí por el radical R.

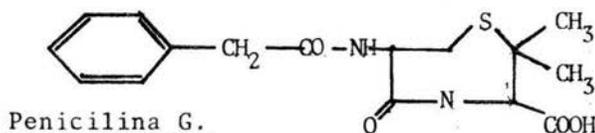
La primera que se usó fue la penicilina G o bencilpenicilina, producida por la fermentación de Penicillium notatum. Su espectro antibacteriano es reducido : no actúa sobre la mayoría de los bacilos Gram-negativos, es inactiva por vía oral y ciertas enzimas (penicilinasas), producidas por estafilococos y por bacilos Gram-negativos, la destruyen por lo que su uso es limitado a organismos susceptibles Gram-positivos y por vía parenteral. Las enzimas son  $\beta$  -lactamasas que abren el anillo  $\beta$  -lactámico y la transforman en ácido peniciloico inactivo.

Otras enzimas llamadas amidasas, que son producidas por diversos microorganismos, rompen el enlace amido, desenganchan la cadena lateral y liberan el núcleo, el ac. aminopenicilánico (6-APA), muy poco activo.

Se ha intentado obtener compuestos cercanos a la penicilina G, pero sin sus efectos indeseables, llegándose a ello por medio de la modificación de la cadena lateral y con estos procedimientos se han preparado penicilinas activas por vía oral, penicilinas resistentes a la penicilinasasa y otras de espectro ampliado hasta los bacilos gram-negativos. Actualmente, estos productos se clasifican en tres grupos:

- i.- grupo de la penicilina G.
- ii.- grupo de la metecilina.
- iii.- grupo de las penicilinas de amplio espectro.

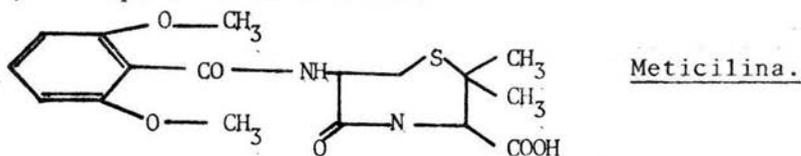
i).- Grupo de la penicilina G.: Su estructura química es la bencilpenicilina usada en forma de sal sódica o potásica:



Es activa sobre cocos gram-positivos, bacilos gram-positivos; es moderadamente activa sobre hemófilos, moraxellas y algunas pastorellas; es inactiva a dosis terapéuticas sobre la mayoría de los bacilos gram-negativos.

La toxicidad de la penicilina G. es prácticamente nula. - La única toxicidad real afecta al sistema nervioso central (en concentraciones muy altas) y son frecuentes las reacciones alérgicas.

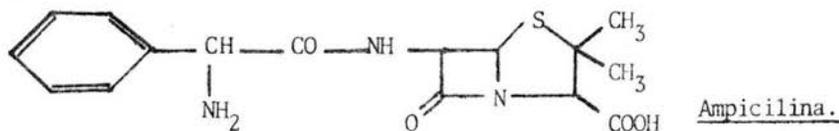
ii).- Grupo de la metecilina:



Aún cuando es menos activo que la penicilina G, no es inactivado por la penicilinasasa del estafilococo, de lo que deriva su única indicación, las infecciones por estafilococos productores de penicilinasasa y puede ser administrado por vía oral o parenteral.

Además de los riesgos de la penicilina G, debe agregarse la posibilidad de nefropatías con hematuria e insuficiencia renal.

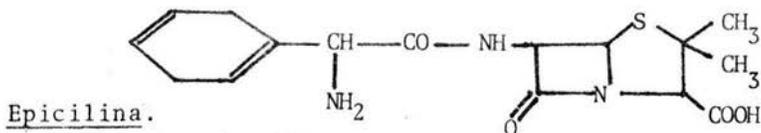
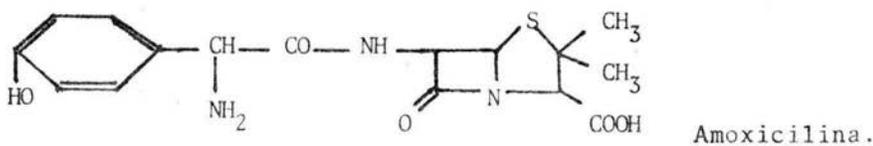
iii.- Penicilinas de amplio espectro : De forma principal aquí se incluye a la Ampicilina, cuya estructura química es la aminobencil penicilina:



En relación a la penicilina G, la amp<sub>ic</sub>ilina presenta un espectro ampliado que abarca los bacilos Gram-negativos, pero como ella, es destruída por las penicilinasas. Es de 2 a 4 veces más activa que la penicilina G sobre los hemófilos, pero algunas cepas producen una  $\beta$ -lactamasa. Su actividad sobre los estafilococos no productores de penicilinasas, estreptococos, neumococos y neisseria es parecida a la de la penicilina G.

Su toxicidad es idéntica a la penicilina G, aunque la amp<sub>ic</sub>ilina es especialmente alergizante.

Análogos a la amp<sub>ic</sub>ilina son la amoxicilina y la epicilina, que no son transformados en amp<sub>ic</sub>ilina en el organismo.



#### b) Cefalosporinas .

Los productos de este grupo utilizados en terapéutica son derivados semisintéticos (por sustitución de las cadenas laterales), de la cefalosporina C, antibiótico natural producido por el Cephalosporium acremonium.

La estructura química es próxima a las penicilinas; posee un núcleo común (el ac. 7- aminocefalosporónico), constituido por un anillo  $\beta$ -lactámico asociado a un anillo dihidrotiazina, sobre el que se fijan dos cadenas laterales que varían según --

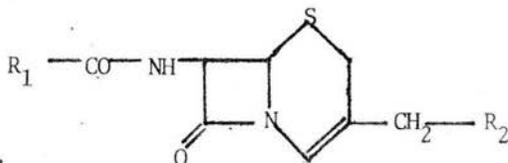
-los productos.

Hay dos categorías : cefalosporinas de la primera generación y las de la segunda generación.

Las cefalosporinas de la primera generación conjuntan -- las ventajas de las penicilinas del grupo de la meticilina y -- las de las **penicilinas** de amplio espectro. Son resistentes a -- la penicilinas del estafilococo, son activas sobre bacilos -- Gram-negativos como las enterobacterias, pero pueden ser des-- truidas por  $\beta$ -lactamasas (cefalosporinasas), producidas por -- estas bacterias, sustancias que al abrir el anillo  $\beta$ -lactámico transforman las cefalosporinas en ácido cefalosporoico inactivo.

Su toxicidad incluye accidentes alérgicos en alrededor de un 5% de los casos, y accidentes renales que conciernen principalmente a la cefaloridina.

La estructura general de las cefalosporinas es la siguiente:

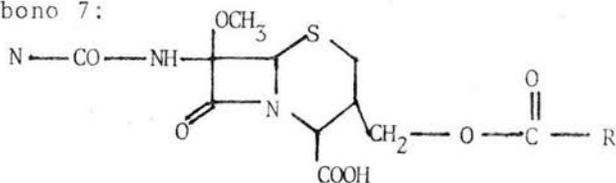


Cefalosporina.

c) Cefámicas :

Las cefamicinas constituyen un nuevo grupo de betalactaminas próximas a las cefalosporinas: el único producto utilizado actualmente en terapéutica, es la cefoxitina, derivado semi sintético de la cefamicina C, producida por el Streptomyces -- lactam durans.

Las cefamicinas poseen la estructura básica de las cefalosporinas, diferenciándose de ellas por la presencia de un -- grupo metoxi en el carbono 7:



Cefamicina.

El mecanismo de acción de las betalactaminas es la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana sin destruir la --

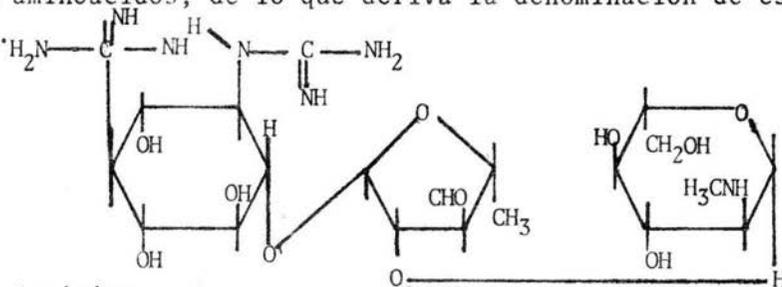
- pared ya formada; estos antibióticos bloquean enzimas involucradas en la síntesis de la mureína, la cual es el constituyente químico que garantiza la rigidez de la pared.

La cefoxitina posee un amplio espectro de actividad antibacteriana y es resistente a las betalactamasas de algunos bacilos Gram-negativos, especialmente Serratia y Proteus indol positivos. Es inactiva sobre Pseudomonas aeruginosa y sobre la mayoría de Enterobacter.

#### B. OLIGOSACÁRIDOS O AMINOSIDOS O AMINOGLUCOSIDOS.

El primer antibiótico de este grupo que se aisló fue la estreptomina, a partir del Streptomyces griseus.

La estructura química se basa en azúcares y especialmente en aminoácidos, de lo que deriva la denominación de este grupo.



Estreptomina.

En cuanto al mecanismo de acción, la mayoría de los estudios al respecto se han realizado con la estreptomina. El antibiótico se fija sobre las bacterias a nivel de los ribosomas y luego de una alteración en la lectura del código genético a nivel de la fracción 30 S del ribosoma. Todo ello conduce a la incorporación en la cadena peptídica en formación de distintos aminoácidos que los previstos. Las proteínas formadas no son por tanto funcionales, derivándose importantes alteraciones del metabolismo de la bacteria que implican su muerte.

Los oligosacáridos son antibióticos de amplio espectro, habitualmente bactericidas sobre cocos Gram-negativos y positivos, bacilos Gram-positivos como Corynebacterium y bacilos Gram-negativos como enterobacterias, brucellas y hæmophilus.

La estreptomycin y la kanamicina se utilizan en el tratamiento de la tuberculosis. Las bacterias anaerobias y las rickettsias son resistentes.

En cuanto a su toxicidad, en la estreptomycin se han observado accidentes alérgicos, entre los más frecuentes los cutáneos, y accidentes tóxicos verdaderos entre los que están las lesiones laberínticas y las lesiones nerviosas como en la aplicación sobre la corteza cerebral que puede producir convulsiones.

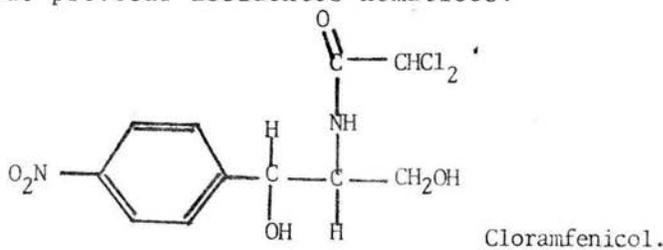
### C. GRUPO DEL CLORAMFENICOL.

Aislado de los productos de fermentación de *Streptomyces venezuelae*, el cloramfenicol es el primer antibiótico de origen biológico, cuya síntesis química se ha logrado.

Su estructura química es relativamente sencilla. La fórmula la presenta dos átomos de carbono asimétricos, por lo que hay 4 estereoisómeros. Sólo el isómero D (-) *threo*, que corresponde al antibiótico natural, posee actividad antibacteriana.

El cloramfenicol actúa por inhibición de la síntesis protéicas a nivel del ribosoma. El cloramfenicol se fija en la fracción 50 S de los ribosomas bacterianos, de lo que se ha deducido que el lugar sobre el que actúa se halla en el ribosoma.

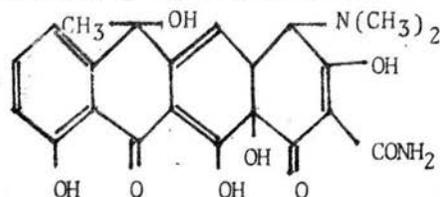
Los dos accidentes importantes que provoca el cloramfenicol son: la aplasia medular y el "Grey syndrome", observado en los recién nacidos tras la administración de elevadas dosis por vía parenteral. El tiamfenicol se considera menos tóxico, pero sin embargo puede provocar accidentes hemáticos.



### D. TETRACICLINAS .

Aquí se incluyen muchos antibióticos de fórmulas químicas muy parecidas. El núcleo de la molécula está constituido por la

- unión de 4 anillos hexagonales. Cada uno de ellos se caracteriza por la naturaleza de los radicales unidos a este núcleo. La clortetraciclina fue el primer antibiótico de este grupo, - aislado del *Streptomyces aureofaciens*. Posteriormente se han - introducido en la terapéutica : la oxitetraciclina, la tetraciclina, la demetil clortetraciclina, la rolitetraciclina, la metaciclina, la doxiciclina y la minociclina.



Tetracyclina.

Una importante propiedad de las tetraciclinas es la de - formar complejos con diversos iones metálicos, pero esta actividad quelante y la actividad antibacteriana dista mucho de correlacionarse completamente. El mecanismo de acción de las tetraciclinas reside en la inhibición de la síntesis protéicas, de lo que se han obtenido numerosas pruebas experimentales en sistemas acelulares. El mecanismo íntimo de esta acción parece ser la inhibición de la fijación del complejo aminoácido-RNAt sobre el complejo ribosoma-mensajero.

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro. - Teóricamente son activos sobre un gran número de especies bacterianas, gram positivas y negativas, incluyendo rickettsias, clamidias y micoplasmas. Las tetraciclinas sólo son bacterios-táticas *in vivo*.

Los principales riesgos tóxicos son los trastornos gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarreas, como consecuencia de un efecto irritativo de la droga y por la modificación de las flores intestinales. Puede presentarse además, una coloración amarillenta en los dientes de niños durante los primeros estadios de calcificación. Lesiones hepáticas pueden producirse en mujeres embarazadas si se les administra tetraciclina por vía venosa en más de 1 gr.

Se aconseja evitar el uso de tetraciclinas en pacientes con insuficiencia renal pues se puede producir el síndrome de Fanconi, tras la absorción de tetraciclinas periclitadas.

## E. MACROLIDOS Y SIMILARES .

Tres grupos de antibióticos (macrólidos, lincomicinas y estreptograminas o sinnergistinas) presentan numerosos puntos comunes en sus propiedades, su espectro antibacteriano y sus formas de acción, lo que justifica su relación aún cuando sea diferente su estructura química.

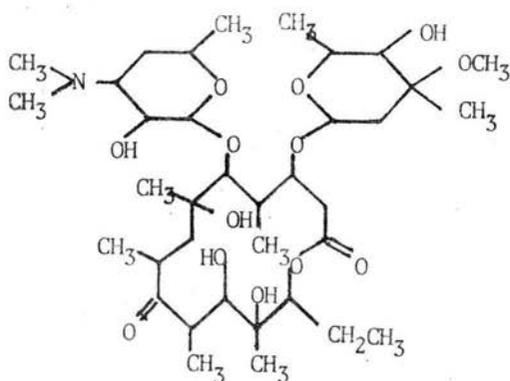
Los macrólidos constan de 40 antibióticos producidos por diversos *Streptomyces*; entre los principales están:

- La eritromicina (aislada de *Streptomyces erythaeus*).
- La eleandomicina (de *Streptomyces antibioticus*).
- La espiramicina (de *Streptomyces ambofaciens*).
- La midecamicina (de *Streptomyces mycarofaciens*).

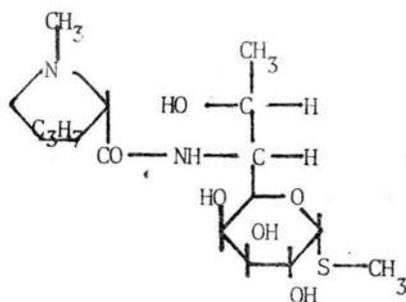
La fórmula de todas estas sustancias comprende un gran anillo lactona u ólido. A este anillo se unen uno o varios azúcares aminados o no. El anillo y los azúcares varían de uno a otro macrólido.

La fórmula química de las lincomicinas es muy diferente y sencilla. Se utiliza la lincomicina y un derivado, la 7-cloro-7-deoxilincomicina ó clindamicina.

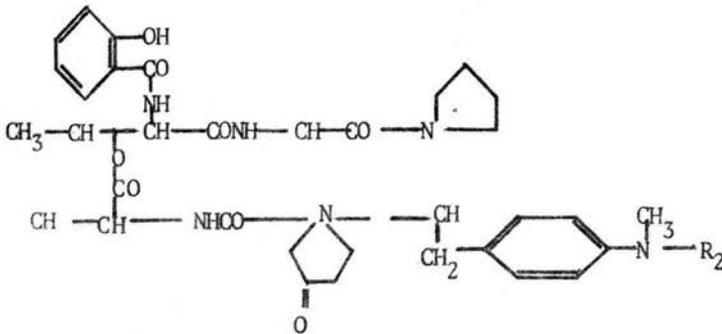
La estreptogramina se aisló en 1953 del *Streptomyces graminofaciens*. Posteriormente se han aislado otros antibióticos muy próximos como la ostreogricina, la sinergistina, la virgimicina y la pristinamicina.



Eritromicina.



Lincomicina.



Pristinamicina.

Todos estos antibióticos son inhibidores de las síntesis proteicas a nivel de la fracción 50 S del ribosoma, pero el mecanismo exacto de esta acción aún es controvertido.

Los macrólidos se fijan a nivel de la fracción 50 S del ribosoma, y esta fijación impide la del cloramfenicol. Es probable que su acción consista en impedir la traslocación del --RNA-t desde el lugar aceptor al donador.

En cuanto a las lincomicinas, es posible que su acción sea idéntica a la de los macrólidos.

Asimismo, la acción de las sinergistinas es parecida a la de los macrólidos, en cuanto a su posible fijación en la --fracción 50 S del ribosoma.

El espectro de actividad de las sinergistinas, lincomicinas y macrólidos es reducido, comparable al de la penicilina G es decir, sobre cocos gram positivos y negativos, bacilos gram positivos y hemófilos. Son totalmente inactivos sobre las enterobacterias y pseudomonas.

La mayoría de estos antibióticos se toleran bien por lo común, siendo responsables únicamente de pequeñas alteraciones digestivas (náuseas, vómitos, diarreas) y, a veces, de alergia cutánea.

F. RIFAMICINAS.

La Rifamicina B fue aislada del *Streptomyces mediterranei*. En solución acuosa aireada, la rifamicina B se transforma en un compuesto más activo, la rifamicina S que, por reducción proporciona la rifamicina SV, utilizada en terapéutica, sobre todo su derivado, la rifampicina.

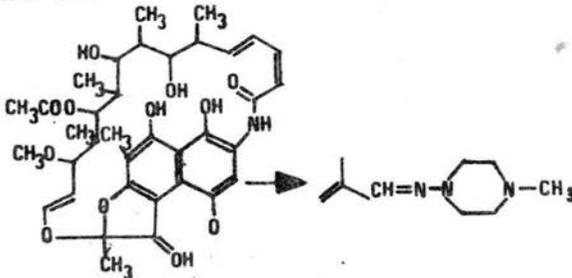
Al principio se pensó que estos antibióticos actuaban inhibiendo las síntesis protéicas, pero ahora se sabe que esta -

-acción no constituía el efecto primario de estas drogas que, en realidad, inhiben la síntesis del RNA por bloqueo de la RNA-polimerasa.

Su espectro es peculiar ya que abarca a las micobacterias (tuberculosis, lepra); actualmente la rifampicina es un antituberculostático de primer orden. La rifampicina es activa además sobre diversos bacilos gram-negativos como las enterobacterias y las brucellas.

En cuanto a su toxicidad, la rifampicina causa insuficiencia renal aguda y severa de mecanismo alérgico. También se han dado casos de púrpura trombopénica y anemia hemolítica.

Rifamicina SV.



Rifampicina.

#### G. ANTIBIOTICOS POLIPEPTIDICOS.

Han sido aisladas gran cantidad de sustancias antibióticas de estructura polipeptídica dotadas de un potente efecto bactericida, pero su toxicidad, especialmente renal, prohíbe la utilización clínica de la mayoría. Los pocos que son usados son producidos por bacterias del género *Bacillus*.

El primero que se descubrió fue la tirotricina (1939), mezcla de dos antibióticos, la gramcidina y la tiricidina. Posteriormente fueron aisladas la bacitricina y las polimixinas.

Las polimixinas son las más importantes del grupo. Constituyen este grupo cinco productos principales: las polimixinas A, B, C, D y E. Todos son tóxicos para el riñón en diferentes grados, por ello sólo se utilizan las menos tóxicas: la polimixina B y sobre todo la polimixina E o colistina.

Las polimixinas son polipeptidos básicos, de P.M. aprox. = 1200 y todas contienen L-treonina y Ac. L- $\alpha$ - $\gamma$ -diaminobutírico.

Las moléculas de las polimixinas son electropositivas, - por lo que su acción ha sido comparada con la de los detergentes catiónicos. Se fijan sobre la membrana citoplásmica de las bacterias, alterándolas y provocando trastornos de la permeabilidad. Las polimixinas se combinan con los fosfolípidos de la membrana. Esta combinación desorienta las capas de la membrana cuya función se ve alterada, especialmente la de la barrera osmótica. El equilibrio osmótico de la célula se rompe y se liberan constituyentes del contenido celular, acarreando la muerte de la bacteria. Estos antibióticos son activos sobre los bacilos gram negativos, a excepción de los proteus, providencia, serratia, bacterioides y de un gran número de aphaerophorus.

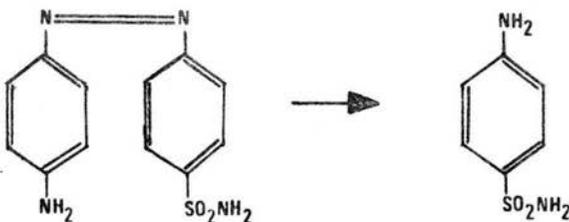
Los riesgos tóxicos de las polimixinas son ante todo nefrotóxicos: insuficiencia renal con diuresis conservada. Además, pueden producirse alteraciones neurológicas y depresiones respiratorias.

La Bacitracina y la Tirotricina son polipéptidos cíclicos activos solo sobre bacterias gram-positivas. Son muy tóxicos por vía general y son usados únicamente en tratamientos locales. Se sabe que alteran, como las polimixinas, la membrana citoplásmica de las bacterias.

#### H. SULFAMIDAS.

La sulfamidocrisoidina es un colorante de la industria del tinte que en 1935 se encontró que atacaba eficientemente a un estreptococo.

La sulfamidocrisoidina (SC), es inactiva *in vitro*, su actividad terapéutica es debida a que *in vivo* se escinde la molécula con liberación de paraaminobencenosulfamida (sulfanilamida), que ya es activa tanto *in vivo* como *in vitro*.



Sulfamidocrisoidina.

Sulfamilamida.

Posteriormente se han preparado centenares de compuestos relacionados, con la finalidad de mejorar la actividad, de reducir la toxicidad y de modificar las propiedades fisicoquímicas de manera que fuera mejor sobre todo la solubilidad en la orina.

Las modificaciones de la forma se han efectuado mediante sustitución a nivel del grupo aminado  $-NH_2$  o del grupo  $-SO_2NH_2$

El mecanismo de acción de las sulfamidas fue elucidado en 1940 por Woods y Fildes. Debido a la similitud de su estructura, con la del ácido paraaminobenzoico, las sulfamidas se conducen como inhibidores competitivos del mismo en la síntesis de los folatos, bloqueando la dihidrofolatosintetasa.

El espectro antibacteriano teóricamente es amplio: la mayoría de las bacterias gram-positivas y gram-negativas, pero actualmente son muy numerosas las cepas resistentes.

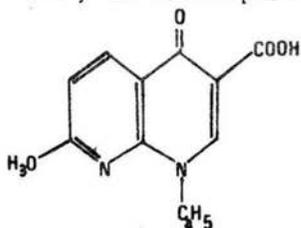
En cuanto a su toxicidad, se ha observado bloqueo renal por precipitación de cristales en los túbulos, debido a la baja solubilidad de las sulfamidas y de sus derivados acetilados.

Los accidentes alérgicos pueden ser cutaneomucosos: rash de diferentes tipos, dermatitis de contacto, eritema nodoso, etc.

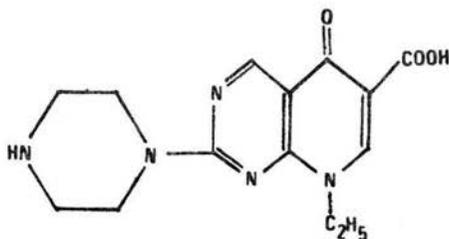
Se pueden presentar también accidentes hemáticos (leucopenia, agranulocitosis, anemia hemolítica), y alteraciones hepáticas (por competir con la unión de la bilirrubina).

### I. QUINOLONAS .

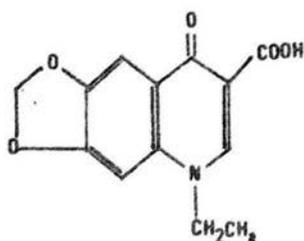
Las Quinolonas son agentes antibacterianos sintéticos que se utilizan sobre todo para el tratamiento de las infecciones urinarias; hoy día hay 5 productos comercializados: el ac. nalidíxico, el ac. oxolínico, el ac. pipemídico, el ac. piromídico y la flumequina.



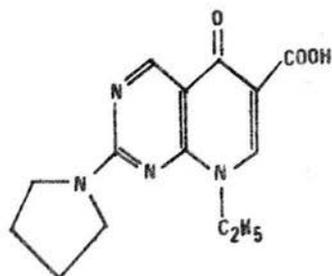
Ac. nalidíxico



Ac. pipemídico



Ac. oxolínico.



Ac. piromídico.

El mecanismo de acción ha sido estudiado sobre todo para el ácido nalidíxico. Este producto inhibe al mismo tiempo la síntesis de ADN y la de ARN, siendo las dos acciones independientes: al parecer, el efecto sobre el ARN concierne únicamente a los ARN mensajeros y produce una inhibición de las síntesis protéicas rigurosamente paralela a la del ARN.

Su espectro es limitado a bacterias gram-negativas, a excepción del bacilo piociánico.

Los accidentes observados, en cuanto toxicidad, conciernen sobre todo al ácido nalidíxico, al ser más resistentes los otros productos. Se trata de náuseas, vómito, diarrea, fotosensibilización, alergias cutáneas, trastornos visuales, hipertensión intracraneal benigna reversible y acidosis metabólica en el lactante, recién nacido y prematuro.

#### J. DERIVADOS DE LA OXIQUINOLEINA.

Son antibacterianos sintéticos de amplio espectro y están indicados en procesos urinarios o digestivos.

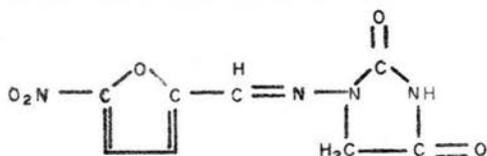
Los accidentes tóxicos observados en estos productos son fundamentalmente neuropatías sensitivas con neuritis óptica retroncular.

#### K. DERIVADOS DE LOS NITROFURANOS.

También son derivados sintéticos de amplio espectro a los que, sin embargo, han adquirido resistencia el bacilo piociánico, los proteus, los serratia y los acinetobacter.

La nitrofurantoína se utiliza en infecciones urinarias.- Otros dos productos se utilizan *per os* en las infecciones digestivas: la furazolidona y la nifuroxacida.

Los nitrofuranos pueden provocar reacciones alérgicas (- fiebre, rash cutáneos, trastornos respiratorios) y alteraciones digestivas (náuseas, diarrea). Además se han observado polineuritis en sujetos con insuficiencia renal tratados con nitrofurantoína en dosis excesivas.

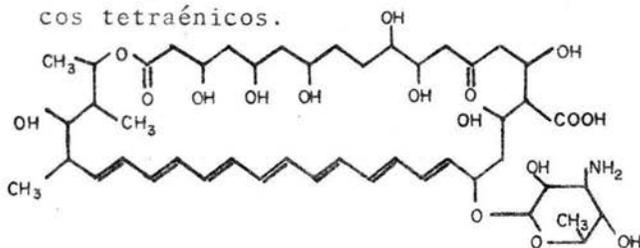


Nitrofurantoína.

#### L. DROGAS ANTIFUNGICAS DE ORIGEN BIOLÓGICO.

La terapéutica de las micosis sistémicas y superficiales, recurre a algunos antibióticos muy específicos, inactivos sobre las bacterias y dotados de un definido espectro antifungico. Los principales productos son:

La Nistatina. Obtenida del *Streptomyces noursei*, mediante procesos de fermentación, presenta una fórmula química  $C_{46}H_{77}N O_{19}$  con cuatro grupos C-metilo, una porción molecular -- amino-azúcar y micosamina. El antibiótico posee 4 dobles enlaces conjugados que lo colocan entre los antibióticos poliéuticos tetraénicos.

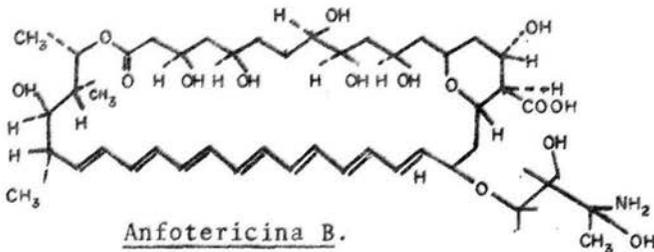


Nistatina.

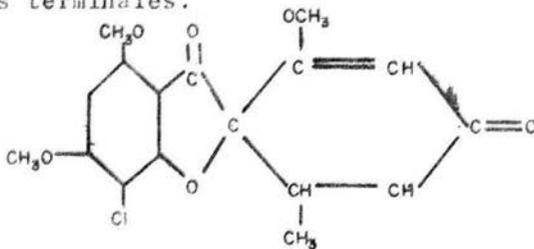
La nistatina es un fungistático y fungicida debido a la alteración de la membrana celular, tras la fijación sobre los esteroides de la misma, derivándose con ello, trastornos en la permeabilidad.

La Anfotericina B. Dotada de un espectro antifúngico más amplio ya que es activa sobre hongos levaduriformes y filamentosos. Es utilizable por vía general, pero es tóxico.

Su estructura química indica un polieno próximo a la nistatina. Su mecanismo de acción es el mismo que la nistatina ya que es muy similar en su estructura:



La Griseofulvina. Obtenida del crecimiento micelial de especies de *Penicillium*. Es activa sobre los dermatófitos, --- siendo las levaduras mucho menos sensibles. Se administra oralmente; es fungiestática pero no fungicida, se cree que produce distorsión, engrosamiento y rizado de las hifas, por lo que interfiere con el crecimiento y el desarrollo normales de las -- hifas terminales.



### III. O B J E T I V O S :

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

- 1.- Aislar y purificar el principio activo antimicrobiano.
- 2.- Elucidar la estructura del compuesto con actividad antimicrobiana.

## I V . MATERIAL Y METODO .

### A. COLECTA Y PRUEBAS PRELIMINARES.

El molusco Purpura pansa fue recolectado en la Bahía de Pichilingue en La Paz, Baja California Sur, durante el mes de octubre de 1984. Esta colecta se realizó manualmente con turnos matutinos en la zona litoral de las rompientes de las olas. Se colectaron aproximadamente tres kilogramos (peso húmedo) de este molusco.

El material fue fijado en alcohol etílico al 70% con el fin de evitar procesos de descomposición y fue trasladado al laboratorio en bolsas de polietileno etiquetadas y selladas -- con ligas de hule.

A todos los moluscos se les retiró la concha usando para ello, pinzas de disección. Posteriormente los organismos fueron homogenizados en etanol al 70%, en una licuadora marca "Internacional" de 10 litros.

La solución etanólica se evaporó hasta sequedad y se disolvió en agua estéril bidestilada. A partir de este residuo se tomaron 4 alícuotas de 30 gms.cada una, con las cuales se montaron 4 diferentes extracciones a temperatura de reflujo durante 12 horas, para lo cual se emplearon los siguientes sistemas de disolventes de diferente polaridad: Cloroformo, Hexano, Etanol y Agua (se utilizaron 300 ml de disolvente para cada uno de los reflujos).

Posteriormente, los extractos fueron filtrados y se concentraron a un volumen de 100 ml. a presión reducida en un rotavapor marca Buchler. Cada uno de los concentrados fueron enviados al Laboratorio de Microbiología de Pos-graduados de la F.E.S. Cuautitlán, para la determinación de actividad antimicrobiana "in vitro" sobre los siguientes microorganismos patógenos : Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Cephalosporium sp., Escherichia coli, Microsporium canis, Microsporium gypseum, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Trichophytum berrucosum y Trichophytum mentagrophyte.

## B. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL COMPUESTO ACTIVO.

Debido a que los resultados reportados por el Lab. de Mic. de P-G de la F.E.S.C. (comunicación personal) indicaron que la actividad antimicrobiana se encontraba en el extracto clorofórmico, se procedió a realizar el aislamiento del principio activo a partir de este extracto.

El extracto clorofórmico del Purpura pansa se cromatografió en columna de vidrio vía húmeda de 65 cm. de altura por 2.5 cm. de diámetro, usando como soporte sílica gel (Merck), de malla 70-230 (0.063-0.200 mm.), y como eluente cloroformo.

Las fracciones obtenidas de la separación cromatográfica fueron separadas de acuerdo a los máximos de absorción en el -- U.V./visible (Hewlett-Packard 8450-A).

A cada una de estas fracciones separadas se les determinó nuevamente la actividad antimicrobiana sobre Candida albicans, Escherichia coli y Staphylococcus aureus, en el Lab. de Mic. de P-G de la F.E.S.C.

La fracción activa se llevó a sequedad y el residuo fue tratado con eter etílico, usando un embudo de separación, con el fin de eliminar grasas. A continuación se filtró y se obtuvo un compuesto blanco amorfo, el cual se recristalizó cuatro veces consecutivas con 25 ml. de etanol caliente, dejándose cristalizar durante varios días.

A este compuesto blanco-amorfo se le verificó la pureza por medio de cromatografía en placa fina, empleando los siguientes sistemas de disolventes (Q.P.) :

- Cloroformo - Acetato de Etilo 1 : 1
- Acetona - Diclorometano 2 : 8
- Hexano - Acetato de Etilo 3 : 7
- Cloroformo .

En todos los casos se observó una sola mancha. Las cromatografías de placa fina (sílica gel 60 -2 mm.- Merck), fueron reveladas dentro de una cámara de vidrio con Iodo sublimado.

C. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO ACTIVO.

El compuesto que presentó la actividad antimicrobiana, - fue pesado dando un total de 12 mg. A continuación, este compuesto fue sometido al siguiente análisis estructural:

- 1.- Espectro de Ultravioleta (Hewlett-Packard 8450-A).
- 2.- Espectro de Infrarrojo (Beckman Acculab 10)
- 3.- Resonancia Magnética de Protones (Varian 60, usando como se ñal de referencia el tetrametilosilano).
- 4.- Espectrometría de masas (Hewlett-Packard 5985 a 70 e.v. con introducción directa.
- 5.- Punto de Fusión (Fisher-Johns)

## V . R E S U L T A D O S .

Como resultado de los estudios preliminares antimicrobianos practicados a los cuatro extractos iniciales, se reportó - (Lab. de Mic. de P-G de la F.E.S.C. -comunicación personal-) - que la actividad antimicrobiana estaba en el extracto clorofórmico. Esta actividad se presentó sobre Candida albicans, Escherichia coli y Staphylococcus aureus, por lo que se continuó --trabajando con este extracto.

Los resultados de la separación cromatográfica a que fue sometido el extracto clorofórmico, se ilustran en la tabla 2. De acuerdo a las longitudes de onda ( $\lambda$  max.), de las 85 muestras recogidas de la cromatografía vía húmeda, se agruparon en 12 diferentes fracciones.

A cada una de estas fracciones se les probó actividad -- antimicrobiana y los resultados reportados nos dicen que la actividad antimicrobiana se presentó en las fracciones 1 (sobre E. coli, C. albicans y S. aureus), 2 (sobre E. coli), 4 (sobre E. coli), y 7 (también sobre E. coli).

Debido al bajo rendimiento obtenido en la mayoría de las fracciones activas, únicamente se pudo trabajar con la fracción # 1.

El residuo de la fracción activa (No. 1) tratado con ---eter etílico, presentó una forma amorfa de color blanco. Este residuo fué recristalizado 4 veces consecutivas en etanol con el fin de purificarlo y posteriormente se le determinó el punto de fusión, el cual fue de 94°C.

Los resultados del análisis estructural practicado al -- compuesto puro, son los siguientes :

Fórmula General =  $C_{15} H_{26}$  (obtenida por el análisis elemental), siendo las proporciones de los elementos del compuesto las siguientes:

$$C = 87.38\%$$

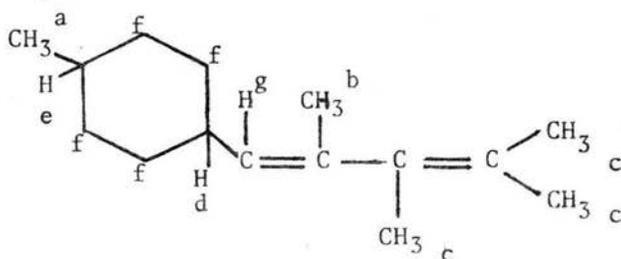
$$H = 12.62\%$$

En Resonancia Magnética de Protones, en  $\int_{p.p.m.}^{CHCl_3}$ , se obtuvieron señales en :

- 0.93 en un doblete que corresponde a 3 protones (H).p.p.m.
- 1.39 en un singulete (S) que corresponde a 3 H, p.p.m.
- 1.50 (9H,S) p.p.m.
- 1.75 (1H,S) p.p.m.
- 2.30 (2H,S) p.p.m.
- 1.22 (8H,S) p.p.m.
- 5.52 (1H,S) p.p.m.

En la estructura sugerida para el compuesto antimicrobiano, las señales anteriores, obtenidas en P.M.R. (Gráfica 1), se pueden marcar de la siguiente manera :

- a= 0.93 (3H,D) ppm
- b= 1.39 (3H,S) ppm
- c= 1.50 (9H,S) ppm
- d= 1.75 (1H,S) ppm
- e= 2.30 (2H,S) ppm
- f= 1.22 (8H,S) ppm
- g= 5.52 (1H,S) ppm



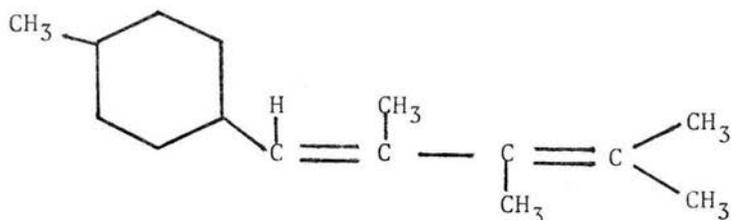
En el espectro Infrarrojo, se observa la presencia de --- las siguientes bandas de absorción (Gráfica 2) :

- una banda que se bifurca en 2 entre 2980 y 2700  $\text{cm}^{-1}$ .
- dos bandas de intensidad débil a 1700 y a 1600  $\text{cm}^{-1}$ .
- dos señales a 1340 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ .
- la estereoquímica del doble enlace es Cis debido a la presencia de fuertes bandas de absorción a 730 y a 1420  $\text{cm}^{-1}$ .

En el espectro Ultravioleta, el compuesto presentó un max imo de absorvancia a 275 nm.

Por espectrometría de masas se obtuvo la fragmentación -- del compuesto que se ilustra en la tabla No. 3.

Por lo tanto, se sugiere la siguiente estructura para el \_ compuesto antimicrobiano:



2,3,4 trimetil, 5 (4' metil-ciclohexil) 2,4 pentadieno.

**Falta página**

**N° 33**

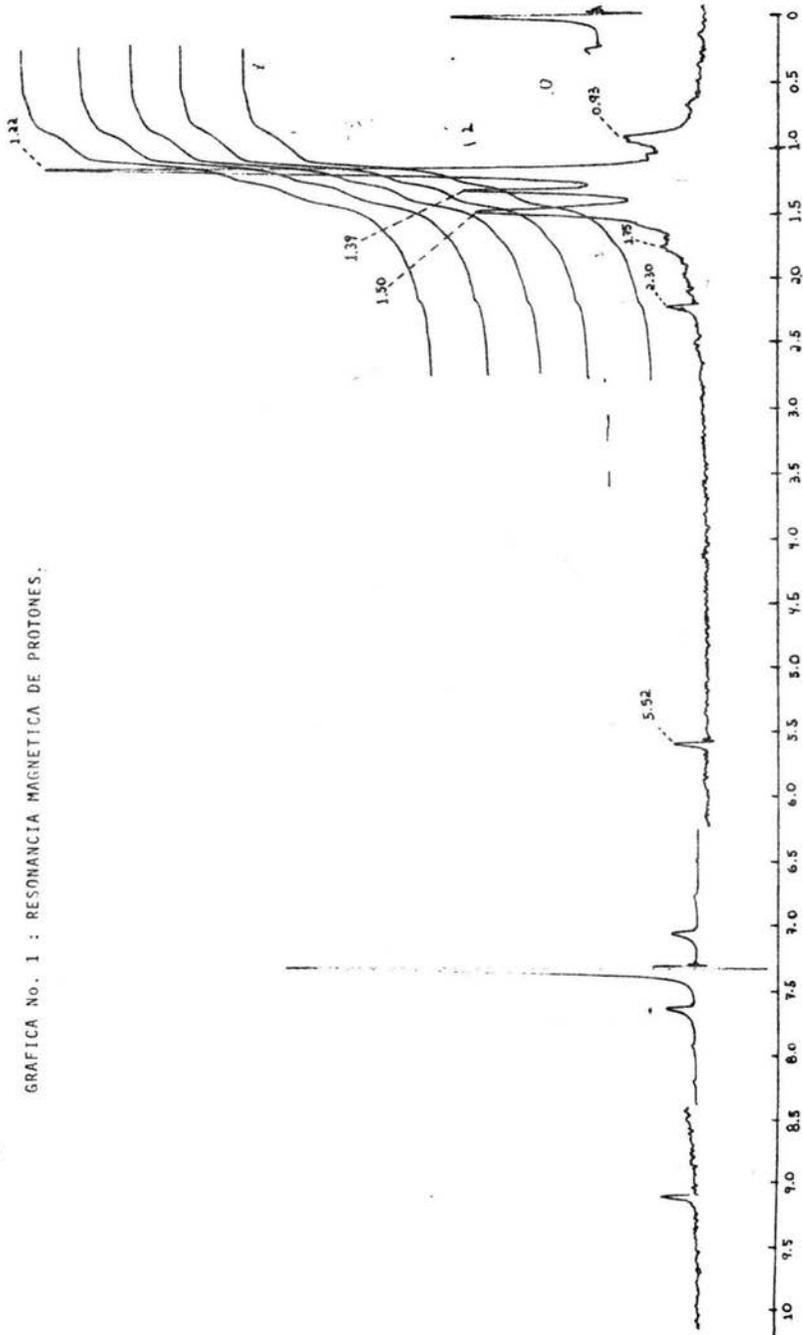
TABLA 2 : RESULTADOS DE LA SEPARACION CROMATOGRAFICA  
DEL EXTRACTO CLOROFORMICO .

# DE MUESTRA	LONG. DE ONDA EN EL U.V./V .	ABSORBANCIA	
1	270	0.354	FRACCION 1
2	278	1.620	
3	293	2.460	FRACCION 2
4	292	2.290	
5	294	2.580	
6	291	2.320	
7	294	2.550	
8	294	2.560	
9	288	2.130	
10	285	1.860	FRACCION 3
11	274	0.799	
12	275	0.637	
13	275	0.797	
14	273	0.676	
15	274	0.763	
16	272	0.600	
17	273	0.559	
18	273	0.523	
19	271	0.520	
20	270	0.510	FRACCION 4
21	274	0.414	
22	273	0.496	
23	276	0.653	
24	274	0.655	
25	275	0.451	
26	278	1.046	FRACCION 5
27	277	0.784	
28	275	0.395	
29	278	0.82	
30	277	0.745	
31	280	1.224	FRACCION 5
32	279	1.123	
33	277	0.846	

# DE MUESTRA	LONG. DE ONDA EN EL UV/VIS.	ABSORBANCIA	
34	2 80	1.290	FRACCION 5
35	2 79	1.099	
36	2 76	0.850	FRACCION 6
37	2 76	0.898	
38	2 76	0.788	
39	2 77	0.798	
40	2 76	0.805	
41	2 76	0.764	
42	2 76	0.644	FRACCION 7
43	2 75	0.592	
44	2 77	0.38	
45	2 75	0.459	
46	2 76	0.461	
47	2 72	0.260	
48	2 72	0.154	FRACCION 8
49	2 73	0.237	
50	2 72	0.391	
51	2 73	0.440	
52	2 73	0.225	
53	2 73	0.463	
54	3 00	2.740	FRACCION 9
55	2 96	2.610	
56	2 78	0.960	FRACCION 10
57	2 79	0.71	
58	2 78	0.850	
59	2 78	0.769	
60	2 80	1.150	
61	2 80	0.980	
62	2 81	1.080	FRACCION 10
63	2 82	1.260	
64	2 83	1.470	
65	2 77	0.582	FRACCION 10
66	2 78	0.910	
67	2 77	0.635	
68	2 76	0.558	

# DE MUESTRA	LONG. DE ONDA EN EL UV/VIS.	ABSORBANCIA	
69	2 78	0.978	
70	2 77	0.781	
71	2 78	0.740	
72	2 79	1.063	
73	2 78	0.85	— FRACCION 10
74	2 77	0.611	
75	2 8	1.451	
76	2 76	0.70	— FRACCION 11
77	2 77	0.750	
78	2 76	0.633	
79	2 78	0.742	
80	2 76	0.617	
81	2 76	0.614	
82	2 78	0.880	
83	2 78	0.622	
84	2 76	0.520	
85	2 78	0.629	
			— FRACCION 12

GRAFICA No. 1 : RESONANCIA MAGNETICA DE PROTONES.



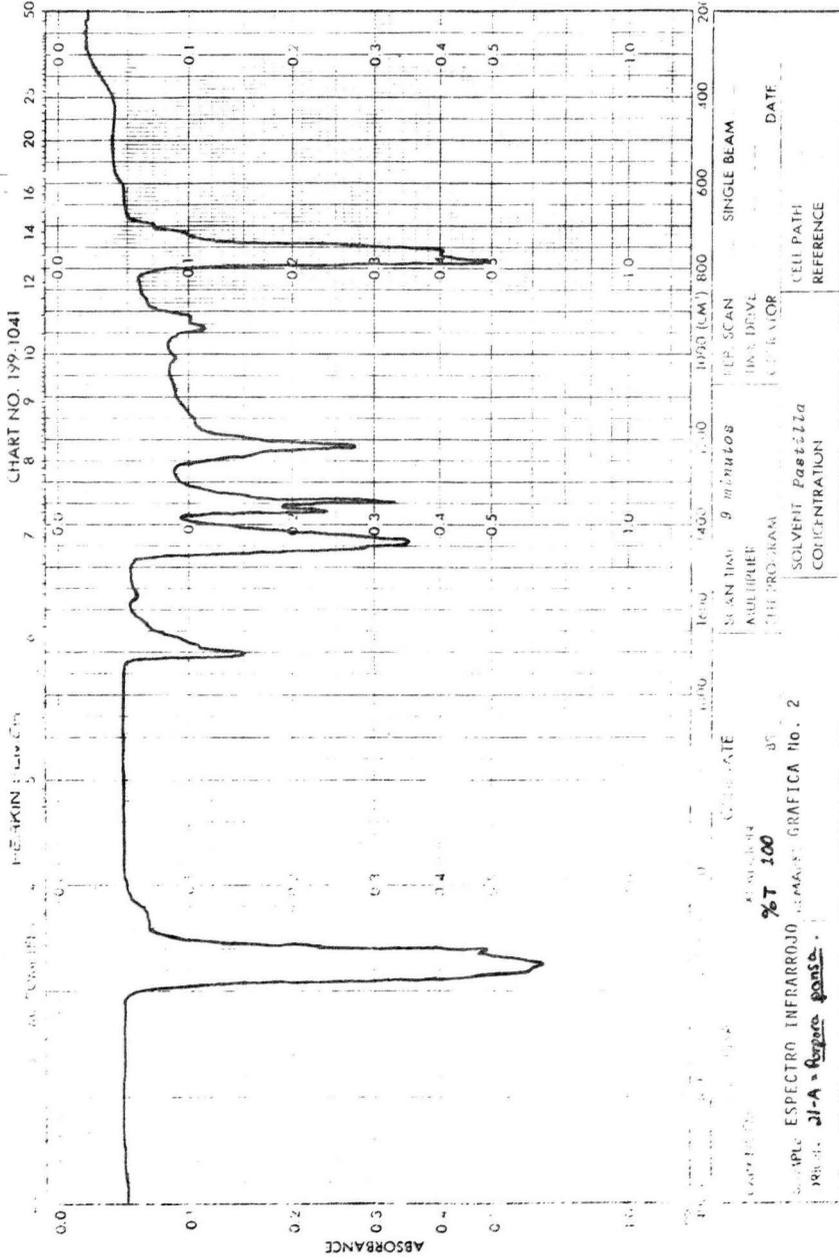
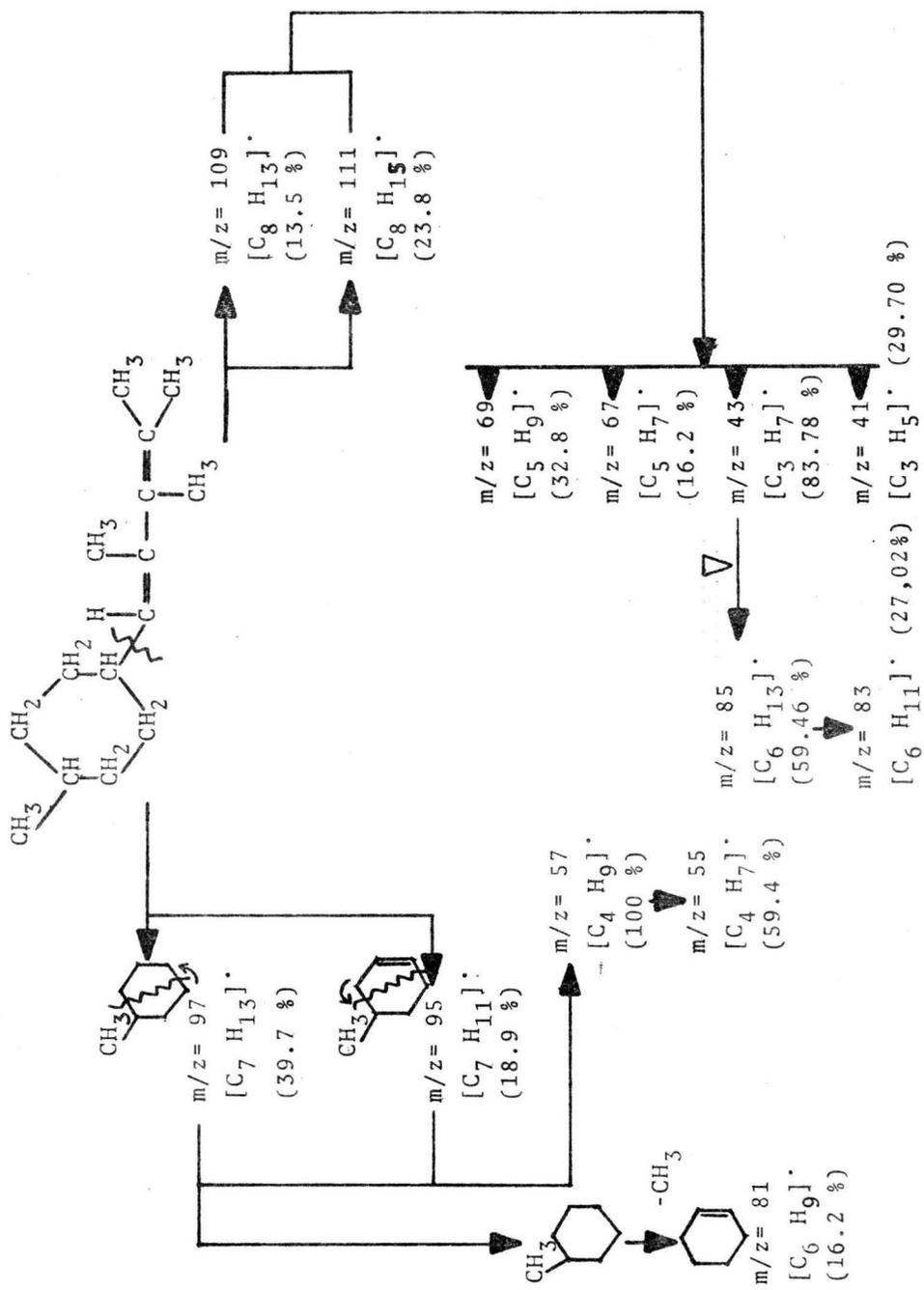
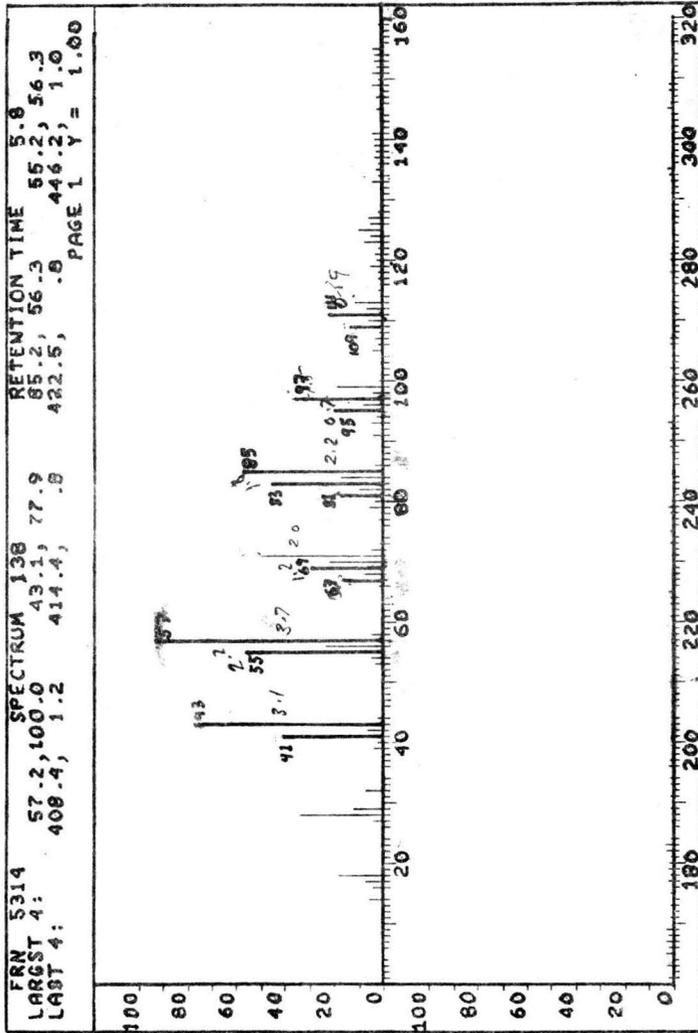


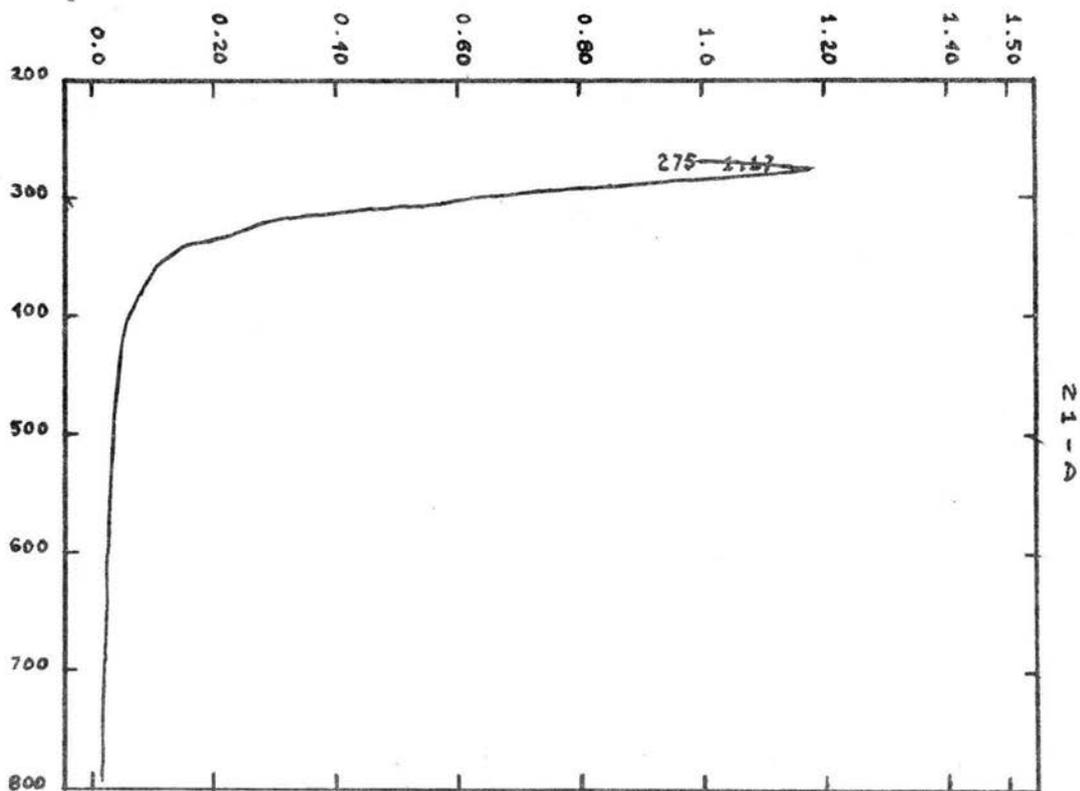
TABLA No. 3 : FRAGMENTACION DEL ESPECTRO DE MASAS DEL COMPUESTO.



GRAFICA No. 3 : ESPECTRO DE MASAS DEL COMPUESTO.



SMOOTH 11 (ABSORBANCE)



L 200 TO 800

TIME AUTO

Y-SCALE 0 TO 1.5

SMOOTH 11 (ABS)

DISP TO PLOT

Meas TIME 1,1,0 TO 0

8/3/85

REALIZO VICTOR TERRON

DISOLVENTE CLOROFORMO

ESPECTRO ULTRAVIOLETA

## V I . D I S C U S I O N .

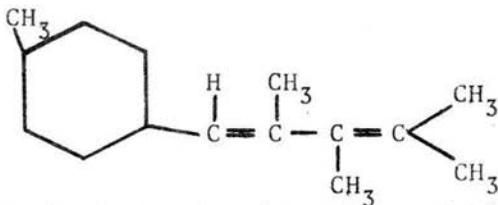
De acuerdo con los resultados reportados de las pruebas de actividad antimicrobiana, practicadas a los cuatro extractos iniciales, se obtuvo que la actividad estaba presente en el extracto clorofórmico, por lo que solamente se trabajó con este extracto a fin de purificar y elucidar el compuesto activo.

Los resultados que muestra la tabla No. 2, sirven para ilustrar cómo fueron agrupadas las muestras obtenidas de la separación cromatográfica en columna de vidrio vía húmeda. De acuerdo a las longitudes de onda que presentaron cada una de las muestras (en total 85), se agruparon y promediaron las más parecidas de acuerdo también al orden de secuenciación en que se obtuvieron. De esta manera, al final se separaron 12 diferentes fracciones, que oscilaron entre 272 y 300 nm en el U.V. visible. En la cromatografía se empleó como eluyente al Cloroformo, debido a que este solvente presentó 11 manchas distinguibles por el revelado de placa fina en cámara de yodo.

El segundo reporte de actividad antimicrobiana indicó que las fracciones 1,2,4 y 7 presentaban la actividad, sin embargo, en la mayoría de estas fracciones hubo un bajo rendimiento, por lo que únicamente se pudo trabajar con la fracción No. 1, que además de tener un buen rendimiento, fue activa contra los tres microorganismos patógenos con los que fue probada (Escherichia coli, Candida albicans y Staphylococcus aureus).

El proceso de purificación prosiguió con la evaporación del cloroformo y con la eliminación de las grasas del residuo, por medio de un tratamiento con eter etílico. Al final de este tratamiento, se obtuvo un compuesto blanco amorfo que fue recristalizado cuatro veces consecutivas en etanol y al cual se le verificó pureza por medio de la cromatografía en placa fina con diferentes sistemas de disolventes. Debido a que en todas las placas se obtuvo una sola mancha, se pudo deducir que el compuesto se encontraba puro.

Para elucidar la estructura de este compuesto, fue preciso realizar una serie de análisis espectroscópicos tales como la Resonancia Magnética de Protones, la Espectroscopía al Infrarrojo, la Espectroscopía Ultravioleta y además la Espectrometría de Masas. Los resultados de estas pruebas se apoyan entre sí, y gracias a ello se sugiere la siguiente estructura para el compuesto antimicrobiano:



El 2, 3, 4 trimetil, 5(4' metil-ciclohexil)2,4 pentadieno

De acuerdo a la Gráfica No. 2, que muestra los resultados del espectro infrarrojo, se observa una banda bifurcada entre 2980 y 2700  $\text{cm}^{-1}$  que es debida a la vibración simétrica stretching de la presencia de un doble enlace adyacente a un metil. Dos bandas débiles a 1700 y a 1600  $\text{cm}^{-1}$  son producidas por el stretching simétrico y asimétrico del doble enlace conjugado ( $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$ ); en cambio, cuando el doble enlace se presenta no conjugado, la absorción se muestra entre 1620 y 1680  $\text{cm}^{-1}$ . Asimismo, los picos de 1340 y 1700  $\text{cm}^{-1}$  indican la presencia de un grupo  $\text{C}=\text{C}$ , y ésto lo confirma el hecho de que si existiera un grupo vinil terminal, los picos aparecerían en las bandas de 995, 980 y 1665  $\text{cm}^{-1}$ .

La estereoquímica del doble enlace es CIS, debido a la presencia de las fuertes bandas de absorción observadas a 730 y 1420  $\text{cm}^{-1}$ ; en caso de doble enlace TRANS, las bandas existirían a 980 y 1325  $\text{cm}^{-1}$ .

En cuanto al espectro Ultravioleta, el compuesto presentó un  $\lambda_{\text{max}}$  de 275 nm.

La fragmentación del compuesto obtenida por Espectrometría de Masas nos muestra, en la tabla No. 3, y de acuerdo con la Gráfica 3, que a partir del compuesto  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}$ , se separaron dos fragmentos más ligeros: uno que representa al anillo y otro

-que representa la cadena lineal del compuesto original. Posteriormente se obtuvieron fragmentos más pequeños a partir del anillo y de la cadena lineal. Cabe hacer notar que el fragmento  $C_6 H_{13}$  corresponde a una recombinación de los radicales  $C_3 H_7$  con y sin transición de los protones. Todos los datos del espectro de masas corresponden a los reportados en la bibliografía para los cicloalcanos.

Por consiguiente, y comparando todos los resultados anteriores, se sugiere que el compuesto antimicrobiano es el 2,3,4 trimetil,5(4' metilciclohexil)2,4 pentadieno.

Cabe preguntarse qué función podría tener este compuesto aislado del molusco y/o porqué es producido. Gracias a la ecología química (cuyo objetivo es el estudio de las interacciones químicas entre los organismos vivos), sabemos que en el medio terrestre son generalmente los metabolitos secundarios los que sirven para transmitir la información (sobre todo en insectos y vegetales); y aunque en relación a la comunicación química entre organismos marinos hay muy pocos datos, sí se podría suponer que sucede lo mismo tanto en la tierra como en el mar, ya que prácticamente todos los tipos de interacción química se encuentran presentes en el medio marino.

Así, el hecho de que la mayoría de los metabolitos secundarios aislados de esponjas, algas, cnidarios etc!, sean tóxicos para los peces, inhibidores de la fijación y del crecimiento de larvas de organismos incrustantes y/o antifungicos, permite suponer que acaso constituyan para los organismos sésiles un sistema de defensa químico comparable, por ejemplo, al adquirido por numerosos vegetales que elaboran sustancias tóxicas para protegerse de los herbívoros y de los insectos fitófagos.

De esta manera, el compuesto antimicrobiano aislado a partir del Purpura pansa, podría servir como un medio de defensa contra bacterias y hongos. Este compuesto bien podría ser un metabolito secundario que se excrete como un medio de ayuda al débil sistema inmune que desarrollan los moluscos.

En esta investigación no fue posible determinar si el --

compuesto antimicrobiano es excretado por alguna glándula específica, debido a que se trabajó con el organismo entero (exceptuando la concha).

También podría suponerse que el compuesto antimicrobiano formara parte de la dieta que generalmente ingiere el molusco, pero al parecer no hay punto de comparación entre los compuestos antimicrobianos hasta ahora reportados en las algas y el compuesto que ahora se presenta.

## VII. CONCLUSIONES.

El 2,3,4 trimetil, 5(4' metil-ciclohexil)2,4 pentadieno logró aislarse y purificarse a partir del extracto clorofórmico del molusco *Purpura pansa*, y fue reportada actividad antimicrobiana sobre los siguientes microorganismos patógenos: -- *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, - estos dos últimos son considerados como patógenos oportunistas que ya ofrecen resistencia a los antimicrobianos de carácter convencional.

La estructura de este compuesto antimicrobiano no tiene punto de comparación con los antibióticos hasta ahora conocidos, por lo que es imposible ofrecer una explicación de su -- probable mecanismo de acción.

Para una mayor certidumbre de la actividad reportada en este compuesto aislado, deberán repetirse los estudios microbiológicos de actividad antimicrobiana, de una manera más -- cuantitativa y cualitativa. Si después de realizar estas pruebas se concluye que el compuesto es realmente efectivo contra los microorganismos antes mencionados, y si es factible y/o -- rentable su síntesis artificial, faltará valorar desde su introducción en un organismo vivo hasta su eliminación, la mejor vía de administración, distribución, mecanismo de acción, vida media, vías de eliminación, así como la LD<sub>50</sub> y el índice terapéutico.

Dada la situación actual, se puede pensar que aún es -- muy temprano para ofrecer un balance definitivo sobre la aportación que puedan dar trabajos como el presente a la Quimioterapia. Sin embargo, sí se debe remarcar la importancia de la -- búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, dada la resistencia que presentan muchas cepas de microorganismos hacia los -- antimicrobianos convencionales.

Por último, se puede intuir que el origen del compuesto antimicrobiano puede deberse a que el molusco haya desarrollado evolutivamente un mecanismo de defensa auxiliar contra las bacterias y los hongos, dado su tipo de vida semi-sésil.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Andersen, F.J. & Faulkner, D.J., (1973). Antibiotics from marine organisms of the Gulf of California. En --- "Food Drugs from the Sea" Proceeding 1972, editado por C.R. Worhin, Marine Technology Society . pp. 111-115 .
- 2.- Appendini, G. (1985). La explotación del tinte de origen animal corresponde a los indígenas de Mesoamérica Excelsior jul. 28 Sec. B pp. 17-18.
- 3.- Baslow, D., (1969). Marine Pharmacology. A Study of Toxins and Other Biologically Active Substances of Marine Origin. Editado por The Williams & Will -- kins Co. Baltimore U.S. pp. 1-181.
- 4.- Braekman, J.C. & Daloz, D. (1983). Los medicamentos del mar Mundo Científico 3, 23:600-610
- 5.- Burkholder, P.R., Pfister, R.M. and Leitz, F.M., (1966). Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. Appl. Microbiol. 14, 649
- 6.- Burkholder, P.R. & Reutzler, K., (1969). Antimicrobial activity of some marine sponges. Nature, Lond. 222: 938-984.
- 7.- Calderón, J.E. (1981). Aplicación Clínica de Antibióticos y Quimioterápicos. 4ª edición, Méndez Cervantes . México D.F.
- 8.- Cierezko, L.S., (1962). Chemistry of Coelenterates III, occurrence of antimicrobial terpenoid compounds in Zooxantellae of Alcyonoma. Trans. N.Y. Acad. - Sci., 24:502-503.
- 9.- Di Salvo, L.H. (1971). Regenerative functions and microbial ecology of coral reefs : labelled bacteria in a coral reef microcosm. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 7, (2):123-136.
- 10.- Duval, J.B. & Soussy, C.J. (1980). Manual de Antibioterapia. Ed. Toray-Masson, S.A., Barcelona, Esp. pp. 1-176.
- 11.- Faulkner, D.J. (1978) en: Topics in Antibiotic Chemistry. - editado por Gammes R., Ellis Horwood, Chichester

-Inglaterra. pp 2-9.

- 12.- Fenical, W.H., (1976). en: Proceedings, Food-Drugs from the Sea. editado por Webber, H. & Ruggiere, G.D., Marine Technology Society, Washington, D.C. p. 388.
- 13.- Fenical, W.H., (1982). Natural products chemistry in the marine environment. Science, 215, (4535):923-28.
- 14.- Flores, C. Los moluscos: morfología, taxonomía e importancia. Dpto. Biol. Mar. Instituto Oceanográfico - U.D.O. Cumaná, Venezuela.
- 15.- Grant, P.T. & Mackie, A.M. (1977). Drugs from the sea - fact or fantasy?. Nature, 267:786-788.
- 16.- Green, G. (1983). La farmacología marina. Inf. Cient. y Tec., 3, (51):32-33.
- 17.- Green, G. Antibiotics in marine sponges. F.A.O. Fisheries Report 200, pp. 199-205.
- 18.- Grein, A. & Meyers, S.P., (1958). Growth characteristics and antibiotics production of actinomycetes isolated from litoral sediments and material suspended in sea water. J. Bacteriol., 76: 157-163.
- 19.- Gupta, A.B., & Shrivostava, G.C., (1965). On antibiotics properties of some fresh-water algae. Hidrobiología. 25: 285-288.
- 20.- Irie, T., Suzuki, M., Kurosawa, E. and Masamune, T., (1966). Laurienterol and de-bromo-laurienterol, constituents from Laurencia intermedia. Tetrahedron Lett., 17: 1837-1840.
- 21.- Irkland, C. & Faulkner, D.J. (1978). en: Topics in antibiotic chemistry. editado por Gammes, R., Ellis Horwood Ltd. Publishers, Chichester, Inglaterra 2: 33.
- 22.- Jakowska, S. & Nigrelli, R.F., (1960). Antimicrobial substance from sponges. Ann. N.Y. Acad. Sci., 90:913-916.
- 23.- Jomes, O.A. & Endean, R. (1973) en: Biology and geology of coral reefs. editado por Burkholder, P.R., - Biology, 2: 117-182. Academic Press, N.Y.
- 24.- Katzung, B.G., (1984). Farmacología Básica y Clínica. Ed. El Manual Moderno, México, D.F. pp. 503-547.

- 25.- Kennet, H.L., Renehart, J., Paul, D.S., (1981). Marine natural products as sources of antiviral, antibacterial and antineoplastic agents. Pure & Appl. Chem., 53: 795-817.
- 26.- MacLeod, R.A., (1965). The question of the existence of specific marine bacteria. Bacteriol. Rev., 29: 9-23.
- 27.- Manderosian Der. A., (1969). Marine pharmaceuticals. Journal of Pharmaceuticals Sciences, 58: 1-33.
- 28.- Martínez Nadal, N.G., Rodríguez, L.V. & Casillas, C., --- (1964). Isolation and characterization of sarganin complex, a new broad-spectrum antibiotic isolated from marine algae. en: "Antimicrobial Agents and Chemiotherapy". Publ. por Am. Soc. for Microbiol., pp.131-134.
- 29.- Minale, L., (1976). Natural product chemistry of the marine sponges. Pure & Appl. Chem. 48: 7-23 .
- 30.- Nigrelli, R.F., Jakowska, S. & Calventi, I., (1959). Ecetyonina an antimicrobial agent from the sponge Microciona prolifera Verill. Zoologica, 44: 173-176 .
- 31.- Parikh, V.M., (1974). Absorption Spectroscopy of Organic Molecules. Addison-Wesley Publishing Co. U.S.
- 32.- Rosenfeld, W.D. & Zobell, C.E., (1947). Antibiotics production by marine organisms. J. Bacteriol., 54: 393-398.
- 33.- Saito, T. & Ando, Y., (1955). Bromine compounds in seaweeds. I. A bromophenolic compound from the red alga Polysiphonia marrowii. Chem. Abstr., 51: 17810i
- 34.- Sesín, S., (1985), Extranjeros exterminan al caracol Purpura pansa. Unomasuno, jun. 2 pag. 17.
- 35.- Sharma, G.M. & Burkholder, P.R., (1967). Studies on the antimicrobial substances of sponges III. Structure and synthesis of a bromine-containing antibacterial compound from a marine sponge. Tetrahedron Letters, 42: 4147.

- 36.- Sharma, G.M., Vig, B. & Burkholder, P.R. (1970). Studies on the antimicrobial substances of marine sponges III. Studies on the chemistry of antibacterial compounds from different types of sponges. Conference on drugs from the sea, Marine Technology Society, Washington D.C.
- 37.- Stempien, M.F., (1969). Physiologically active substances from extracts of marine sponges, en: "Food-Drugs from the Sea ,Procedings", Marine Technology Soc. Washington, D.C.
- 38.- Tucker, A.R., (1963). American Seashells. 2ª edición, Nostrand Reinhold Co. N.Y.
- 39.- Walls, F., (1984). La Química Contemporánea. U.N.A.M., México D.F. pp. 177-220.
- 40.- Welch, A.M., (1962). Preliminary survey of fungistatic properties of marine algae. J. Bacteriol., 81:97-99.