

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUIMICAS**

"MODELADO MOLECULAR, SINTESIS, ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DEL CLORURO
DE CETILPIRIDINIO Y DETERMINACION DE LA EFICACIA EN
ALIMENTOS."

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Sergio Rodríguez Morales

TUTOR: DR. RAFAEL CASTILLO B



México, D. F.

2005

m 347815



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Sergio Rodríguez
Morales

FECHA: 14 - Sept 2005

FIRMA: PA 

A Mayra e Ian, por la alegría de verlos crecer. A Juanita, por la fortaleza. A Nico, por todas las enseñanzas. A mis hermanos.

Agradecimientos

Al Doc Castillo, por su dirección, entusiasmo, y apoyo durante todos estos años. Agradezco infinitamente su valiosa amistad.

A los Drs. Cesar y Lilia Compadre, por todas sus enseñanzas y su ayuda en Arkansas

A la maestra Alicia, por su eterno apoyo y confianza.

Al Beliceño Ian Cawich, que tiempos hermano....que tiempos....

A Mayra, por formar parte esencial de mi vida.

A Daniel y Reme, por su valiosa ayuda y amistad.

A Dr. Xiang Zhuo y Hamid Salaary, por sus enseñanzas y consejos durante mi estancia en Arkansas

A Luis, Lalo, Fabian, Alfonso, Miguel, Rousita, Ceci J, El profe, Aaron que hicieron del lab 122 mi segunda casa y que siguen enriqueciendo mi vida con su amistad

Al Maestro Alfonso Lira, por su invaluable ayuda en la parte de modelado.

A los compañeros del 122, 121, 124: Alfonso, Vane, Betty, Marco, Blanca, Isabel, Laurita, Adriana

A los bioquímicas: Pilo, Betty, Dairo y Rogelio, con los que espero seguir compartiendo gratos y divertidos momentos.

A los cuates de la UAIFA:

Toxicología : Mary, Cristi, Ileana, Emma.

Informatica: Marcos y Gerardo

Psicología: Adriana, por su ayuda en el momento mas difícil de mi vida.

Asuntos Internos: Lic. Roberto Ríos, Sergio Vázquez, y Víctor Ortega.

A toda la Coordinación de Posgrado, ya que siempre encontré a alguien
siempre dispuesto a ayudarme con una sonrisa

Al CONACyT por su beca desde la Maestría,

A la USAI, por todas las pruebas y análisis realizados durante el presente
trabajo...

.....y.....y.....y..un, dos, tres, por todos los amigos.....se los agradezco
infinitamente

| | ÍNDICE |
|---|---------------|
| | Página |
| Resumen..... | i |
| Capítulo I.- Introducción..... | 1 |
| Capítulo II.- Antecedentes..... | 7 |
| 2.1 Cloruro de cetilpiridinio..... | 7 |
| 2.2 Modelado molecular..... | 8 |
| 2.2.1 Relaciones estructura-actividad cuantitativas..... | 11 |
| 2.2.2 Relaciones estructura actividad-cuantitativas clásicas o en dos dimensiones (2D-QSAR)..... | 13 |
| 2.2.3 Relaciones estructura actividad-cuantitativas en tres dimensiones (3D-QSAR)..... | 15 |
| 2.2.4 CoMFA..... | 17 |
| 2.2.5 Relaciones Cuantitativas de Estructura-Actividad en los compuestos de alquilpiridinio..... | 21 |
| 2.3 Métodos generales de síntesis de derivados de alquilpiridinio..... | 27 |
| 2.4 Métodos de evaluación de susceptibilidad a agentes microbianos..... | 29 |
| 2.5 Métodos de Análisis de los compuestos de alquilpiridinio..... | 33 |
| Capítulo III.- Hipótesis y Objetivos..... | 37 |
| 3.1 Hipótesis..... | 37 |
| 3.2 Objetivos..... | 37 |
| Capítulo IV.- Desarrollo del trabajo experimental..... | 39 |
| 4.1 Modelado Molecular..... | 39 |
| 4.2 Selección de nuevas moléculas..... | 41 |
| 4.3 Síntesis de los compuestos de alquilpiridinio propuestos..... | 44 |
| 4.4 Determinación del coeficiente de partición agua/octanol..... | 48 |
| 4.5 Determinación de la actividad antibacteriana mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)..... | 50 |
| 4.6. Determinación del nivel residual de los compuestos seleccionados mediante HPLC..... | 51 |
| 4.6.1 Determinación de cloruro de cetilpiridinio en alimentos: carne de pollo.... | 51 |
| 4.6.2 Determinación de cloruro de cetilpiridinio en alimentos: res molida..... | 53 |

| | | |
|--|---|-----|
| 4.6.3 | Determinación en modelo de frutas: manzanas..... | 55 |
| 4.6.4 | Determinación de los compuestos seleccionados para su evaluación residual..... | 59 |
| Capítulo V.- Resultados y discusión..... | | 60 |
| 5.1 | Modelado Molecular..... | 60 |
| 5.1.1 | Estudios de la relación cuantitativa estructura actividad clásica (2D-QSAR)..... | 61 |
| 5.1.2 | Estudios de la relación cuantitativa estructura-actividad tridimensional (3D-QSAR)..... | 66 |
| 5.2 | Síntesis de los compuestos propuestos..... | 69 |
| A) | Disolvente, y la temperatura..... | 70 |
| b) | Presión..... | 73 |
| c) | El reactivo alquilante..... | 74 |
| d) | Aislamiento de los productos finales..... | 76 |
| 5.3 | Determinación del coeficiente de partición (LogP)..... | 88 |
| 5.4 | Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)..... | 92 |
| 5.5 | Determinación del nivel residual de los compuestos seleccionados mediante HPLC..... | 88 |
| 5.5.1 | Determinación del cloruro de cetilpiridinio en carne res..... | 88 |
| 5.5.2 | Determinación de Cloruro de cetilpiridinio en el modelo de frutas: Manzana..... | 99 |
| 5.5.3 | Determinación del nivel residual de los compuestos de alquilpiridinio seleccionados en alimentos mediante HPLC..... | 99 |
| Capítulo VI.- Conclusiones..... | | 114 |
| | Perspectiva..... | 116 |
| Capítulo VII.- Parte Química..... | | 117 |
| 7.1. | Estudios Computacionales..... | 117 |
| 7.2. | Métodos Analíticos..... | 117 |
| 7.3. | Trabajo Microbiológico..... | 118 |
| 7.4. | Instrumentación..... | 118 |
| 7.5. | Cromatografía..... | 119 |

| | |
|---|-----|
| 7.5.1 Aislamiento de los compuestos finales mediante cromatografía rápida de columna (Flash Column Chromatography). Intercambio del contraión por el ion bromuro..... | 120 |
| 7.6 Métodos Sintéticos..... | 121 |
| 7.6.1. Bromuro de 4-acetil-1-hexadecilpiridinio (3)..... | 121 |
| 7.6.2. Bromuro de 1-hexadecil-2,4,6-trimetilpiridinio (10)..... | 123 |
| 7.6.3. Bromuro de 4-acetil-1-dodecilpiridinio (11)..... | 124 |
| 7.6.4. Bromuro de 1-dodecil-2,4,6-trimetilpiridinio (12)..... | 125 |
| 7.6.5. 4-(Metoximetil)piridina (22)..... | 127 |
| 7.6.6. Bromuro de 1-hexadecil-4-(metoximetil)piridina (14)..... | 128 |
| 7.6.7. Bromuro de 1-dodecil-4-(metoximetil)piridina (18)..... | 129 |
| 7.6.8. Tosilato de 1-hexadecil-4-hidroxi-3,4-bis(hidroximetil)-2-metilpiridinio (19)..... | 130 |
| Capítulo VIII.- Espectros..... | 132 |
| Capítulo IX. Bibliografía..... | 144 |
| Anexo: Productos de la tesis doctoral..... | 153 |

Índice de Figuras.

| Fig. No. | Descripción | Página |
|----------|--|--------|
| 1 | Estructura del cloruro de cetilpiridinio (CPC), un surfactante catiónico.... | 2 |
| 2 | Una representación gráfica de la metodología QSAR (modificada de la ref. 30)..... | 19 |
| 3 | Contornos generados por CoMFA en los compuestos de alquilpiridinio, en la figura se muestra el compuesto 14 . Los contornos implican que aumentar (verde) o disminuir (amarillo) los grupos estéricos, o incrementar (rojo) o disminuir (azul) la densidad electrónica, aumentará la actividad antimicrobiana en <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 68 |
| 4 | Contornos generados por CoMFA en los compuestos de alquilpiridinio, en la figura se muestra el CPC. Los contornos implican que aumentar (verde) o disminuir (amarillo) los grupos estéricos, o incrementar (rojo) o disminuir (azul) la densidad electrónica, aumentará la actividad antimicrobiana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> | 68 |
| 5 | Elucidación estructural del Bromuro de 4-acetil-1-hexadecilpiridinio..... | 81 |
| 6 | Elucidación estructural del Bromuro de 1-hexadecil-2,4,6-trimetilpiridinio 10 | 82 |
| 7 | Elucidación estructural del Bromuro de 4-acetil-1-dodecilpiridinio 11 | 83 |
| 8 | Elucidación estructural del Bromuro de 1-dodecil-2,4,6-trimetilpiridinio 12 | 84 |
| 9 | Elucidación estructural del Bromuro de 1-hexadecil-4-(metoximetil)piridinio 14 | 85 |
| 10 | Elucidación estructural del Bromuro de 1-dodecil-4-(metoximetil)piridinio 18 | 86 |
| 11 | Elucidación estructural del 5-Hidroxi-3,4-bis (hidroximetil)-4-metil-1-hexadecilpiridinio 19 | 87 |
| 12 | Espectro de absorción del blanco (metanol) y del compuesto 11 en toda la región ultravioleta..... | 88 |
| 13 | Gráfica de la curva estándar del compuesto 12 | 90 |
| 14 | Cromatogramas representativos de los extractos de carne de res..... | 95 |
| 15 | Gráfica del CPC residual en carne de res, después de tratarla con una solución al 0.1% de CPC, a diferentes tiempos de lavado..... | 98 |

| | | |
|----|--|-----|
| 16 | Cromatogramas representativos de los extractos de manzana..... | 101 |
| 17 | Gráfica de la curva de calibración estándar para determinar al CPC en manzanas. Se empleó SPC como estándar interno..... | 102 |
| 18 | Gráfica de la curva de calibración estándar para determinar al compuesto 10 en alas de pollo. Se empleó CPC como estándar interno | 111 |

Índice de Tablas.

| Tabla No. | Descripción | Página |
|------------------|--|---------------|
| 1 | Derivados de Alquilpiridinio reportados en la literatura..... | 25 |
| 2 | Compuestos de alquilpiridinio diseñados para la primera fase (evaluación y validación del modelo de CoMFA)..... | 42 |
| 3 | Compuestos de alquilpiridinio considerados y la actividad virtual antimicrobiana..... | 43 |
| 4 | Compuestos de alquilpiridinio análogos de la vitamina B6 y la actividad virtual antimicrobiana..... | 44 |
| 5 | Derivados de alquilpiridinio seleccionados y los descriptores calculados | 62 |
| 6 | Tabla de la matriz de correlación entre la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos de alquilpiridinio sobre diferentes bacterias y descriptores moleculares calculados..... | 64 |
| 7 | Ecuaciones 2D-QSAR de la actividad antimicrobiana y el logaritmo del coeficiente de partición (Log P) de los compuestos de alquilpiridinio..... | 65 |
| 8 | Análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) entre la actividad antimicrobiana de los compuestos de alquilpiridinio y los campos electroestáticos y estéricos de CoMFA..... | 67 |
| 9 | Optimización de la reacción por cambio de disolvente en la preparación del cloruro de 4-acetil-1-hexadecilpiridinio (3)..... | 71 |
| 10 | Optimización de la reacción por cambio de disolvente en la preparación del cloruro de 4-acetil-1-dodecilpiridinio (11)..... | 72 |
| 11 | Optimización de la reacción por cambio de la presión en la síntesis del compuesto 3 | 74 |
| 12 | Condiciones de reacción utilizadas en la preparación de los compuestos de alquilpiridinio..... | 78 |
| 13 | Purificación, constantes físicas y rendimientos de los compuestos de alquilpiridinio sintetizados..... | 78 |
| 14 | Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos preparados..... | 79 |
| 15 | Longitud de onda óptima establecida para cada compuesto..... | 89 |
| 16 | Datos de absorbancia de las diferentes concentraciones del compuesto 12 , a 220 nm..... | 89 |

| | | |
|----|---|-----|
| 17 | Curva estándar determinada para cada compuesto..... | 90 |
| 18 | Concentración [mg/ml] del compuesto 12 en la fase acuosa y octanólica..... | 91 |
| 19 | Coeficiente de partición octanol-agua de los compuestos de alquilpiridinio sintetizados..... | 91 |
| 20 | Datos de la actividad antimicrobiana de los compuestos de alquilpiridinio sobre diferentes microorganismos..... | 93 |
| 21 | Datos del ensayo Inter-día para determinar la precisión y la exactitud en análisis del CPC en carne de res..... | 97 |
| 22 | Datos del ensayo Intra-día para determinar la precisión y la exactitud en al análisis del CPC en carne de res..... | 97 |
| 23 | CPC residual encontrado en muestras de carne de res..... | 98 |
| 24 | Datos del análisis de HPLC de la curva estándar de calibración para la determinación del CPC en manzana..... | 101 |
| 25 | Datos del ensayo inter-día para la determinación de la exactitud y precisión del método de cuantificación de CPC en manzanas..... | 103 |
| 26 | Datos del ensayo intra-día para la determinación de la exactitud y precisión del método de cuantificación de CPC en manzanas..... | 104 |
| 27 | Datos de recuperación del CPC mediante la extracción etanólica en el método de cuantificación del CPC..... | 104 |
| 28 | Datos de recuperación del CPC en la fase de extracción sólida de intercambio iónico del método de cuantificación del CPC..... | 105 |
| 29 | Nivel residual del CPC en manzanas Granny Smith enceradas..... | 106 |
| 30 | Nivel residual del CPC en manzanas Black Arkansas no-enceradas..... | 106 |
| 31 | Nivel residual del CPC en diferentes biomatrices..... | 107 |
| 32 | Nivel residual del CPC y del compuesto 12 en manzanas Granny Smith | 108 |
| 33 | Datos del análisis de HPLC de la curva estándar de calibración para la determinación del CPC en ala de pollo..... | 110 |
| 34 | Curva estándar determinada para cada compuesto en ala de pollo..... | 110 |
| 35 | Nivel residual de los compuestos de Alquilpiridinio en carne de pollo.... | 113 |

RESUMEN

En esta trabajo se describe el modelado molecular, la síntesis, la evaluación biológica antibacteriana y el nivel residual en alimentos de los siguientes bromuros de alquilpiridinio: 4-acetil-1-hexadecil (**3**), 2,4,6-trimetil-1-hexadecil (**10**), 4-acetil-1-dodecil (**11**), 2,4,6-trimetil-1-dodecil (**12**), 4-(metoximetilen)-1-hexadecil (**14**), 4-(metoximetilen)-1-dodecil (**18**) y del tosilato de 5-hidroxi-3,4-bis (hidroximetil)-4-metil-1-hexadecilpiridinio (**19**).

El modelado molecular se realizó empleando 54 derivados de alquilpiridinio reportados en la literatura con sus correspondientes actividades sobre 6 diferentes bacterias. Con estos datos se obtuvieron relaciones cuantitativas de estructura actividad (QSAR) significativas en dos (2D-QSAR) y tres dimensiones (3D-QSAR, COMFA). Se encontraron modelos con una linealidad ($r^2 > 0.795$), y una predictibilidad ($q^2 > 0.636$) buena. Los modelos generados revelaron que la actividad antimicrobiana en los compuestos de alquilpiridinio es debida principalmente al efecto estérico. Estos modelos permitieron diseñar diferentes compuestos. En función de la factibilidad de síntesis, actividad predicha y solubilidad, se sintetizaron las moléculas reportadas en este trabajo.

La síntesis de los compuestos **11**, **12** y **18** se llevó a cabo mediante la reacción de sustitución nucleofílica entre la piridina sustituida y el halogenuro de alquilo, en acetonitrilo a 120 °C y 200 PSI de nitrógeno.

Para los compuestos restantes (**3**, **10**, **14** y **19**) fue necesario emplear el tosilato de hexadecilo, y una temperatura de 130 °C. Los compuestos sintetizados se identificaron por sus datos espectroscópicos de IR, RMN y Masas, los cuales fueron concordantes con las estructuras esperadas, resultando nuevas seis de ellas.

La actividad antibacteriana contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 49063 y *Staphylococcus aureus* ATCC29123 se determinó mediante el método de Concentración Mínima Inhibitoria (macrodilución). Todos los compuestos sintetizados mostraron una actividad equiparable al CPC. El compuesto **10** presentó una mejor actividad que el CPC contra *S. typhimurium*.

A todos los compuestos se les determinó el coeficiente de partición octanol-agua mediante la metodología de matraz agitado, como medida de solubilidad de los compuestos en agua. Todos los compuestos presentaron un coeficiente de partición menor que el CPC, e inclusive el compuesto **12** fue 10 veces más soluble en agua que el compuesto líder.

Con los datos de coeficiente de partición y de actividad antibacteriana se seleccionaron aquellos compuestos que presentaron un buen balance solubilidad en agua- actividad antibacteriana y se les determinó el nivel residual en alimentos mediante Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento (CLAR).

Para realizar el análisis de nivel residual se validaron y desarrollaron los métodos analíticos del CPC en pollo, carne de res y manzana, como modelos para extrapolar el método a los compuestos seleccionados. El nivel residual del CPC, después de tratar a los alimentos por inmersión en una solución de 2 mg/ml de CPC, fue de 11.7 ± 3.05 , 37.3 ± 3.78 y 4.5 ± 0.57 ppm en pollo, carne de res y manzana respectivamente.

El nivel residual de los compuestos seleccionados en pollo resultó ser igual que el CPC, e inclusive en los compuestos con cadenas de 12 carbonos, más alto numéricamente, pero el análisis estadístico reveló no diferencias significativas entre ambos niveles residuales

ABSTRACT.

In this thesis the molecular modeling, synthesis, antibacterial and residue analysis in food of the following N-alkylpyridinium bromide derivatives, are described: 4-acetyl-1-hexadecylpyridinium (3), 2,4,6-trimethyl-1-hexadecylpyridinium(10), 4-acetyl-1-dodecylpyridinium (11), 2,4,6-trimethyl-1-dodecylpyridinium (12), 4-(methoxymethylene)-1-hexadecylpyridinium (14), 4-(methoxymethylene)-1-dodecylpyridinium (18), and 5-hydroxi-3,4-bis(hydroximethyl)-4-methyl-1-hexadecylpyridinium tosylate(19).

A set of antimicrobial alkylpyridinium derivatives (n=53) reported in the literature were minimized with the PM3 semiempirical method in Mopac and their conformation aligned using the cetylpyridinium chloride as a template. Then Comparative field analysis (CoMFA) study was carried out, using steric and electrostatic fields.

Based on the contours generated in CoMFA new derivatives were designed. Statistically significant CoMFA models were built ($q^2=0.65$, and $r^2=0.85$). Contour generated by CoMFA shown that the activity its more correlated to steric part. Based on this contours 25 new candidates were designed and their activity predicted. Based on synthesis factibility, predicted activity and water solubility, seven target molecules were synthesized.

Compounds **11**, **12** y **18** were synthesized using the proper substituted pyridine and alkyl halide, using DMF as solvent, at 120°C and 200 PSI of nitrogen. Compounds with sixteen carbons chain were prepared by using the hexadecyl tosylate and 130°C temperature. Compound isolation was carried out with flash column chromatography in silica gel deactivated with 12 % of NaBr methanolic solution.

Minimum inhibition concentration (MIC) was determined using the macrodilution broth method over *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 49063 y *Staphylococcus aureus* ATCC29123 in a 500-1 µg/ml range. All compounds had an equiparable activity to CPC. Compound **10** shown better activity over *S. typhimurium* than CPC

As measured of water solubility, Octanol/water partition coefficient was determined by the shaken Flask method. All the compounds presented a lower Log P than CPC, inclusively compound **12** was 10 times more soluble on water than CPC

With both data, MIC and Log P, we selected the compounds with a good profile of activity-water solubility to determinate their residue analysis after a treatment with 0.050% of aqueous alquilpyridinium solution in foods by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

For the residue level on food surface, analytics methods were developed and validated to quantitate the CPC on chicken, beef, and apple matrix. These analytic methods were then extrapolated to selected compounds. CPC residue analysis over food after treatment with 2mg/ml of CPC was 11.7 ± 3.05 , 37.3 ± 3.78 , and 4.5 ± 0.57 in chicken, beef, fish and apple, respectively.

Selected compounds and CPC were essayed over apple and chicken. After a treatment with a 0.050% of solution of tested compound for 1-minute immersion, the residue levels for compounds **10**, **11**, **18** and **CPC** were 12.598 ± 0.415 , 17.109 ± 0.715 , 16.225 ± 0.638 , and 14.088 ± 0.987 respectively

I. INTRODUCCIÓN

La prevención de las enfermedades causadas por ingestión de alimentos con contaminación microbiana es una de las principales preocupaciones de salud pública. De manera directa, también lo es de la industria de la carne, agencias reguladoras y, principalmente, de los consumidores. En los Estados Unidos de Norteamérica (EU) se ha estimado que estas enfermedades oscilan anualmente entre 6.5 y 33 millones de casos, y causan alrededor de 9,000 muertes.¹ En los países subdesarrollados, las enfermedades gastrointestinales constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. En México, para 1989 se reportaron 2,076,343 casos relacionados con el consumo de alimentos contaminados, y éstos, sólo corresponden a casos graves registrados de población hospitalizada o grupos numerosos; sin embargo, la mayoría de estas enfermedades transcurren sin ser reportadas.²

En los EU se ha estimado alrededor de 2.4 millones de casos de salmonelosis anuales y que el tratamiento de estas enfermedades rebasa los billones de dólares,¹ ya que sólo se reportan del 1 al 10 % de los casos, así que el impacto de la salmonelosis humana es asombroso.³ En nuestro país, en el año 1992,² el 3.5% de los brotes epidémicos alimentarios fue originado por salmonella, siendo los productos lácteos, cárnicos, los alimentos perecederos y los que requieren mucha manipulación, los más involucrados.⁴

Salmonella typhimurium es de especial interés para la industria avícola, ya que es un organismo que forma parte de la flora microbiológica en la piel de las aves, y que genera contaminación cruzada cuando los pollos son desplumados en las plantas procesadoras.⁵ En nuestro país, la SSA tiene normas para controlar este tipo de contaminación en los alimentos.⁶

Se han propuesto varios métodos físicos y químicos para reducir a los microorganismos adheridos en productos cárnicos: estimulación eléctrica, radiación con luz ultravioleta, cloro o dióxido de cloro, ozono, ácido láctico, carbonato de sodio y trifosfato de sodio.⁷⁻¹⁰ Estos métodos han demostrado efectividad limitada en la reducción de la contaminación microbiana o en la apariencia física de los productos. Por lo que la industria de procesamiento de la carne continúa teniendo la necesidad de una técnica efectiva y costeable para reducir o eliminar la contaminación microbiana.

En este sentido, Breen y colaboradores¹ han demostrado que el uso cloruro de cetilpiridinio (CPC, **Figura 1**), un agente desinfectante utilizado en enjuagues bucales en los últimos 30 años, es efectivo para reducir la contaminación causada por especies del género *Salmonella* y otros patógenos bacterianos en carne de aves y res.³ En carne de pollo, además, es efectivo en prevenir la adhesión de las bacterias al crear una película fina en la superficie de la carne, teniendo un uso potencial para disminuir el riesgo de contaminación cruzada, sin afectar la apariencia física de los productos.¹¹ Este compuesto está siendo desarrollado para que en un futuro próximo sea considerado como una alternativa para la reducción de la carga microbiana en alimentos.¹²

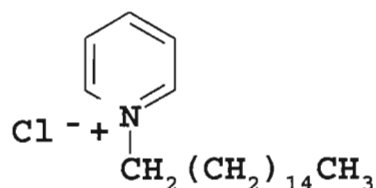


Figura 1. Estructura del cloruro de cetilpiridinio (CPC), un surfactante catiónico.

Para implementar un tratamiento práctico para la desinfección de cualquier alimento, mediante el uso del CPC, es necesario desarrollar métodos para determinar su nivel residual. En la bibliografía están reportados diferentes métodos para determinar la cantidad de CPC en diferentes productos, como enjuagues bucales, cosméticos, saliva, antisépticos y productos farmacéuticos. Las diversas técnicas de análisis incluyen cromatografía de líquidos de alta presión, cromatografía de pirólisis, calorimetría, espectrometría y voltametría de adsorción. Sin embargo, sólo una referencia ha reportado la determinación en tejidos biológicos, en la cual el método fue completamente validado,¹¹ por lo que es necesario el desarrollo de nuevos métodos para determinar el CPC en diversas biosuperficies, como frutas o verduras.

En este último método, la concentración residual, después de un tratamiento con soluciones de 0.1 a 0.4% de CPC en pollo y carne de res, puede limitar su aceptación por parte del consumidor. Este nivel residual parece estar relacionado con la polaridad del CPC, ya que el compuesto al tener carácter hidrofóbico, aunque es una sal de piridinio, es retenido por las membranas lipídicas de los tejidos en la piel de pollo y de carne de res.

Si se contara con moléculas más solubles en agua, éstas podrían ejercer su acción en la superficie de los alimentos a desinfectar y serían eliminadas mediante lavado.

Esta problemática crea, por un lado, la necesidad de establecer una serie de métodos para monitorear los residuos que pueden dejar estos antimicrobianos, y por otra parte, la de optimizar la estructura de alquilpiridinio, a fin de encontrar un surfactante que pueda ejercer su acción y ser eliminado, lo cual resultaría en un tratamiento efectivo y seguro.

Ahora bien, un parámetro que indica la polaridad de las moléculas, y que se emplea en estudios de QSAR, es el coeficiente de partición o Log P. Hansch y Fujita demostraron que el coeficiente de partición puede calcularse a través de la determinación de los fragmentos presentes en las moléculas; es decir, es una propiedad constitutiva.^{13,14} En el caso de los compuestos de alquilpiridinio todos los datos existentes se han determinado experimentalmente. Contar con este parámetro, ayudaría a seleccionar a un mejor candidato dentro de un grupo de compuestos que muestren una actividad antimicrobiana.

En los últimos años se han hecho diferentes estudios acerca del efecto antimicrobiano de los derivados de alquilpiridinio, pero pocos reportes se han publicado acerca del estudio sistemático de éstos y de la influencia de la estructura química sobre sus propiedades antimicrobianas.

Se ha tratado de encontrar relaciones estructura actividad, pero los esfuerzos han sido infructuosos y algunas técnicas resultan difusas.^{15,16} El contar con estas relaciones proporcionaría las bases para mejorar el diseño de nuevos compuestos antimicrobianos y optimizar su eficacia.

Todas las estrategias, así como las decisiones concernientes a los compuestos objetivo a sintetizar en un nuevo proyecto de investigación, pueden facilitarse por técnicas de modelado molecular. Estas técnicas pueden dar al químico más ideas de las implicaciones estructurales, estereoquímicas o electrónicas de las modificaciones moleculares propuestas. Por lo que resulta importante desarrollar una metodología de modelado molecular que pueda ayudar en el diseño de nuevos fármacos.

Una de las herramientas de Modelado Molecular son los métodos que estudian la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR). Los métodos QSAR correlacionan la estructura química y una actividad biológica específica. Los modelos derivados se emplean para predecir la actividad de compuestos químicos no evaluados.

El análisis QSAR es visto como una herramienta científicamente creíble para predecir y clasificar la actividad biológica de moléculas bioactivas,¹⁷ cuando la información que se tiene es escasa; siempre y cuando, el modelo sea generado siguiendo las precauciones sugeridas en la literatura.¹⁸

En la metodología QSAR, los métodos que localizan las propiedades estructurales basados en la estructura tridimensional de los compuestos modelados son llamados colectivamente QSAR en tres dimensiones (3D-QSAR). Dentro de los métodos 3D-QSAR, el análisis comparativo de campo molecular o CoMFA (por sus siglas en inglés) es el método que más se ha empleado. En la literatura existen más de 200 publicaciones desde su inclusión inicial en 1988.¹⁹ Debido a la hipótesis de que muchas de las interacciones intermoleculares implicadas en una unión no covalente son de naturaleza estérica y electrostática, comparado con los métodos tradicionales de QSAR, CoMFA refleja directamente las interacciones entre los receptores y sus ligandos en tres dimensiones, dando de manera gráfica los sitios que incrementan la actividad.²⁰ Realizar un estudio de esta naturaleza ayudaría en la selección de mejores moléculas para ser caracterizadas como agentes antimicrobianos.

En un esfuerzo para desarrollar análogos que puedan ser eliminados fácilmente de los alimentos, en esta tesis se contribuye a la generación de conocimiento básico a través de un estudio sistemático de modelado molecular usando relaciones cuantitativas de estructura-actividad en tres dimensiones (3D-QSAR), empleando la metodología de CoMFA. Con los datos obtenidos se diseñarán nuevas moléculas, se sintetizarán y se evaluará la actividad antimicrobiana de las nuevas moléculas. Al mismo tiempo se desarrollarán los métodos analíticos de HPLC para cuantificar los residuos en alimentos y, por último, se validará el método computacional de diseño.

II. ANTECEDENTES

2.1. CLORURO DE CETILPIRIDINIO

El CPC²¹ es un polvo blanco, con olor característico, cristaliza como monohidrato con un punto de fusión de 79-83 °C. Es muy soluble en alcohol y cloroformo, se disuelve en 20 partes de agua, es parcialmente soluble en éter. Es incompatible con jabones y otros surfactantes aniónicos. Es un sólido higroscópico que se debe de guardar en desecador.

El CPC es un desinfectante de amonio cuaternario, que en adición a sus propiedades emulsificantes y detergentes (surfactante), es un compuesto activo contra bacterias Gram positivas y negativas, siendo más activo contra las primeras. Pero es, sin embargo, ineficaz contra esporas, virus y hongos. Es relativamente ineficaz contra algunos microorganismo Gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Micobacterium tuberculosis*.

Es más eficaz en solución neutra o ligeramente alcalina, ya que su actividad se reduce en medio ácido. Es compatible con colorantes ácidos. La actividad de este compuesto puede reducirse por la formación de micelas en la presencia de agentes no iónicos, cuando la proporción del último excede ciertos niveles.

La dosis letal 50 (LD₅₀) reportada para el cloruro de cetilpiridinio es de 10 mg/kg de peso por vía intravenosa, y de 108 mg/kg por vía oral.

Esta toxicidad se ha atribuido a los efectos biológicos que produce el grupo de amonio cuaternario y a los productos de su metabolismo. Se cree que la propiedad de surfactante de la molécula causa alteraciones adicionales, particularmente en el hígado, de un número de actividades químicas, biológicas y de transporte.²²

2.2 MODELADO MOLECULAR

El Modelado Molecular es una parte fundamental de la Química Computacional, una área de la ciencia que trasciende las barreras que separan la Biología, Química y Física. El modelado molecular se define como la generación, visualización, manipulación y predicción de la estructura molecular y sus propiedades fisicoquímicas asociadas, teniendo como meta el caracterizar y predecir la estructura y estabilidad de sistemas químicos, el estimar las diferencias de energía entre diferentes estados, el explicar las rutas de reacción y el mecanismo a nivel atómico.²³ También, da ideas sobre la relación de la estructura molecular y la actividad biológica, aportando información valiosa que puede asistir en el diseño de nuevos fármacos.²⁴

En la literatura existen muchas referencias sobre el uso de esta herramienta de investigación,²⁵ resaltando el obtenido en el desarrollo de un inhibidor de la proteasa del HIV.²⁶

Los científicos usan software para el modelado molecular, ganando ideas en los procesos químicos, ya que su interés principal es el aplicarlo para mejorar el conocimiento químico.

El software está casi siempre basado en información empírica; para usarlo, se necesita comprender como es implementado y la naturaleza de la base de cálculo usada para parametrizar el método. En general, en cualquier software de modelado molecular existen al menos 5 módulos básicos los cuales pueden y deberían ser encontrados.²⁷

i) El constructor de moléculas o entrada de datos (Input Skecht Builder).

Este módulo permite la entrada de datos del problema y construye un modelo aproximado (skecht) en 3 dimensiones de la molécula. La entrada de las coordenadas x, y, z mediante el teclado es la manera más simple. Muchos programas tienen una interfase para leer coordenadas de bancos de datos cristalográficos (Protein Data Bank (PDB), CCB, etc.) o de un archivo estándar conteniendo coordenadas atómicas y una tabla de conexión. Una entrada de datos más amigable es la gráfica, por medio de un mouse (menos frecuente una pluma ligera) y un despliegue en pantalla gráfico.

ii) Constructor del modelo de 3 Dimensiones. El refinamiento del modelo es necesario, especialmente para sistemas tensionados. Este empieza de las coordenadas crudas calculadas por el módulo de construcción de entrada, utilizando ya sea Mecánica Molecular (MM) o Mecánica Cuántica (MQ) para obtener un modelo refinado. Cuando se usa MM, el programa deberá proveer la elección entre muchos campos de fuerza y dejar al usuario elegir entre diferentes formas de minimizar a la molécula (pasos descendientes, búsqueda de modelo, Montecarlo, Newton Raphson).

iii) **Modelo electrónico.** Los pasos previos dan la geometría conformacional óptima de la molécula. La información acerca de la distribución de los electrones, así como de la carga eléctrica pueden calcularse solamente por mecánica cuántica. Muchos sistemas tienen interfaces para programas estándares de Mecánica Cuántica. En muchos casos puede ser una interfase de entrada de datos, permitiendo al usuario el empezar un cálculo de QM de una geometría generada con MM.

iv).- **Visualización y manipulación.** Este módulo, donde la facilidad es lo más importante, permite al usuario el visualizar y manipular el modelo molecular tan convenientemente como sea posible. Esto incluye las siguientes facilidades: modelo de bolas y resortes, modelos de llenado de espacio (CPK), proyecciones de Newman, rotación completa, posicionamiento del modelo (p.e. una selección fácil de un plano molecular para un mejor despliegue en la pantalla), sobreposición de los modelos moleculares por un método simple o una optimización de la distancia intermolecular, representaciones de cintas y cilindros de proteínas, átomos y definiciones de arreglos de enlace junto con su visualización, representación de orbitales moleculares y despliegue de potenciales electrostáticos.

v) **Cálculo de propiedades.** Este módulo es el último desarrollado en muchos sistemas del mercado, es el de más interés para el químico. Requiere de un modelo matemático específico para cada propiedad y el desarrollo en sistemas químicos de simulación, los cuales usan modelos heurísticos y empíricos.

2.2.1. Relaciones Cuantitativas de Estructura Actividad

Todos los fármacos interactúan con estructuras biológicas (llamados receptores) como lipoproteínas receptoras, enzimas, biomembranas, ácidos nucleicos o moléculas pequeñas. Esta interacción da como resultado un cambio macroscópico y fisiológico, que constituye el efecto del fármaco. La interacción fármaco-receptor está determinada por parámetros fisicoquímicos del fármaco: polaridad, ionización y densidad electrónica. Todas estas propiedades electrónicas están determinadas por la composición, forma y tamaño del fármaco, o en otras palabras por su estructura química.

Como estos parámetros fisicoquímicos pueden medirse y expresarse en términos cuantitativos, las fuerzas de unión intermoleculares (como una función de la estructura) deberían de igual forma tener valores numéricos. De tal manera que si la actividad farmacológica dentro de una serie de análogos puede medirse, y el mecanismo de acción dentro de las series es idéntico, debería de ser posible calcular una relación cuantitativa de estructura-actividad (QSAR).²⁸

Los métodos QSAR generalmente constan de dos pasos: primero se generan los descriptores moleculares (parámetros fisicoquímicos) los cuales contienen la información química estructural, y segundo, un método de regresión estadística correlaciona los cambios de la estructura con los cambios en actividad biológica.

Los compuestos utilizados en la derivación del modelo (generalmente conocidos como grupo de entrenamiento) deberán ser diversos tanto en estructura química (diferentes sustituciones en las moléculas) como en actividad biológica (al menos 3 unidades logarítmicas), para asegurar un modelo estadísticamente robusto. Después, el modelo es validado mediante la predicción de la actividad biológica de un grupo de prueba (moléculas que no forman parte del grupo de entrenamiento). Esta validación se puede realizar de dos formas:

- a) Unas cuantas moléculas (generalmente 3 ó 4) del grupo de entrenamiento no son consideradas para el desarrollo del modelo QSAR. La actividad de este grupo es predicha por el modelo y se verifica la cercanía con la actividad determinada.
- b) Se consideran nuevas moléculas, y se predice la actividad de éstas empleando el modelo generado. Después de sintetizar las moléculas, se evalúa la actividad con el modelo biológico con cual se determinó la actividad del grupo de prueba. Se compara el dato de actividad determinado con el valor predicho por el método, a fin de determinar la validez del modelo. La inclusión de estos compuestos evaluados sirve para refinar el método.

En el método QSAR está implícito que la actividad biológica ejercida por todas las moléculas que derivaron el modelo tienen el mismo mecanismo de acción, es decir, se unen al mismo receptor.

El uso de análisis estadístico en las relaciones QSAR, permite: (1) el aceptar o rechazar las relaciones aparentes entre las moléculas y la actividad, (2) detectar moléculas que presentan un comportamiento diferente al esperado (outliers), (3) comparar la relación atractiva de una relación propiedad física-actividad alterna. Esta metodología está validada por las ecuaciones de correlación reportadas en la literatura,²⁹ así como en libros que le dedican espacio a esta herramienta.^{19, 20}

2.2.2 Relaciones Estructura Actividad Cuantitativas Clásicas o en Dos Dimensiones (2D-QSAR)

El método más popular es el método de energía lineal extratermodinámica o método de Hansch.¹⁸ Su premisa básica es que el efecto de los sustituyentes en la fuerza de las interacciones entre el fármaco, su receptor y otras biomoléculas, es una suma aditiva de los efectos de estos sustituyentes. Desde el punto de vista fisicoquímico estas interacciones son de naturaleza electrostática, estérica (repulsión), hidrofóbica y de dispersión. Los efectos de los sustituyentes en estas interacciones no covalentes se asumen que son proporcionales a los valores tabulados de la constante de Hammett σ , Taft E_s , Hansch π y la refractividad molar de los diferentes sustituyentes.

Sin embargo, el parámetro más utilizado en 2D-QSAR es el de hidrofobicidad (por ejemplo, π para fragmentos moleculares y Log P para moléculas), ya que está presente en 80% de las casi 3000 relaciones QSAR incluidas en la base de datos de la universidad de Pomona.¹³

La correlación entre estos descriptores y la actividad tiene un problema, la metodología estadística asume que cada columna representa una variable independiente. Muchos de los descriptores están relacionados. Este problema se resuelve empleando análisis lineal multivariado. Estos datos de proporcionalidad de los sustituyentes llevan a la expresión matemática de la ecuación clásica de Hansch:

$$\text{Log}(1/C) = a + b\pi + c E_s + d MR + e\sigma$$

Donde $1/C$ es la potencia relativa del derivado análogo, en la cual C es la concentración requerida para producir la respuesta biológica estándar. Los valores de las constantes a , b , c , d y e son ajustadas por el análisis estadístico de regresión lineal múltiple. Este método estadístico también da una medida de: (1) si cada coeficiente es significativamente diferente de cero; (2) el valor estadístico de r^2 , es la fracción de la variancia en el término de $\text{Log}(1/C)$, que es explicado por la ecuación; (3) el valor de s , es el valor de la desviación estándar de los valores observados del $\text{Log}(1/C)$ de los valores calculados.

Para la parte estadística del análisis QSAR se examinan las posibles ecuaciones de una serie de datos para encontrar aquellos que son de interés; esto es, encontrar ecuaciones que son estadísticamente significativas, que tienen sentido mecanístico y que no sobreajustan los datos.

Uno de los parámetros más difíciles de parametrizar es el referente al tamaño de la molécula, ya que es importante para la interacción intermolecular. Verloop desarrolló una serie de parámetros relacionados con el tamaño máximo y una sección cruzada de los sustituyentes, estos parámetros dan una buena correlación, pero sólo en casos particulares.³⁰

Una característica de los métodos de 2D-QSAR es que son relativamente baratos y fáciles de hacer. El equipo computacional, el tiempo de trabajo del personal y los recursos empleados, son de una magnitud menor que los requeridos para cálculos de química cuántica, análisis conformacional y métodos QSAR que emplean visualización gráfica (3D-QSAR). Por esta razón, los métodos 2D-QSAR están disponibles para la mayoría de químicos farmacéuticos, mientras que los segundos no.¹⁷

2.2.3 Relaciones cuantitativas de estructura-actividad en tres dimensiones (3D-QSAR)

El uso de descriptores moleculares de dos dimensiones (2D) no resuelve las preguntas sobre la influencia y la orientación de los diferentes sustituyentes en la arquitectura molecular de una manera directa, excepto en los métodos basados en la topología molecular. Aunque estos últimos son métodos bidimensionales, su aplicación es limitada en casos donde se requiere discriminación entre centros quirales.

Los métodos que localizan las propiedades estructurales basados en la estructura tridimensional de los compuestos modelados son llamados colectivamente QSAR en tres dimensiones (3D-QSAR). Estos métodos intentan identificar las regiones espaciales de propiedades complementarias moleculares que encajan en el sitio de acción.

Estos procedimientos extienden la metodología QSAR en tres dimensiones mediante la elección -manual o automática- de una geometría particular de cada compuesto modelado. Para enseguida realizar la sobreposición de cada molécula empleando un modelo farmacóforo, una característica molecular, y/o un campo molecular computarizado para las moléculas. Las premisas fundamentales de los métodos 3D-QSAR son las siguientes:

- El compuesto modelado, no sus metabolitos, o cualquier otra sustancia derivada de él, es la causante del efecto biológico observado
- La geometría propuesta (modelada) es la conformación bioactiva
- La unión y la ejecución del efecto medido implican sólo una conformación
- El sitio de unión es el mismo para todos los compuestos modelados
- La propiedad buscada, Y_{exp} , es explicada suficientemente por un proceso entálpico
- Los términos entrópicos son similares para todos los compuestos
- La velocidad de formación/disociación del complejo fármaco-receptor es similar para todos los compuestos (por ejemplo, todos los sistemas se consideran en equilibrio) así que los aspectos cinéticos no son considerados.

-La inclusión de efectos de disolvente, difusión, transporte, etc, no están considerados

Sin embargo, para los ligandos flexibles, la segunda premisa no es necesariamente correcta, debido a que múltiples alineamientos pueden satisfacer teóricamente el criterio molecular de similaridad, sin estar relacionados a la realidad fisicoquímica. Aunque esto reduce la predictibilidad y el poder explicativo del modelo, este aspecto no puede ser evitado cuando se utilizan métodos teóricos, a menos que exista evidencia concerniente a la conformación activa. Cuando no existe esta información estructural, se deben de considerar diferentes reglas de alineación de las moléculas, basadas en diferentes hipótesis iniciales, o utilizar un compuesto rígido presente en el grupo de prueba.

Existen varios métodos 3D-QSAR empleados en el diseño de nuevas moléculas: CoMFA, GRID, COMPASS, APEX-3D, etc., los cuales fueron revisados recientemente en la literatura.^{17,31} De ellos, el más empleado es la metodología de CoMFA.

2.2.4 CoMFA

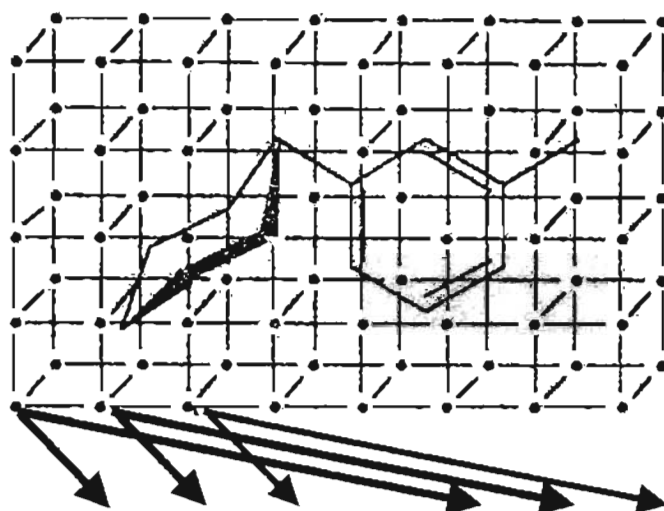
Una de las herramientas de Modelado Molecular es el análisis comparativo de campo molecular (CoMFA por sus siglas en inglés) el cual puede establecer las relaciones entre la actividad biológica y las interacciones estéricas y electrostáticas de los compuestos.

Debido a la hipótesis de que muchas de las interacciones intermoleculares implicadas en una unión no covalente son de naturaleza estérica y electrostática, comparado con los métodos tradicionales QSAR, CoMFA directamente refleja las interacciones entre los receptores y sus ligandos en tres dimensiones, dando de manera gráfica los sitios que incrementan la actividad.²⁹ Aunque la meta principal de CoMFA no sólo es la de predecir la actividad de los compuestos, sino también el detener un programa sintético.¹⁹

En CoMFA, las interacciones ligando-receptor se remplazan por interacciones estéricas (Lennard-Jones) y electrostáticas (Coulómbicas) en una rejilla alrededor del ligando. Las interacciones electrostáticas y estéricas entre un átomo de prueba hipotético ($C^+ sp^3$ generalmente) y el ligando se calculan en cada punto de la rejilla. Estos valores se tabulan, llenando el renglón correspondiente a esa molécula dentro de la serie. La matriz generada (n renglones con datos de actividad X número de compuesto) se analiza utilizando estadística multivariable (mínimos cuadrados parciales, o PLS), la cual lleva a una ecuación que relaciona los campos generados por CoMFA (X block) con la propiedad blanco (actividad biológica, Y block), **Figura 2**.

En general, un protocolo de generación de los contornos de CoMFA es el siguiente:²⁰

- 1.- Se postula un grupo de reglas para la alineación de las moléculas (un punto de partida puede ser deducido de la metodología de análogo activo)



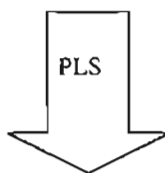
Reticulo o rejilla de átomos de prueba

Estructuras 3D

| | A | S1 | S... | E1 | E..... |
|----------|-------|----|------|----|--------|
| Comp.. 1 | 1 | | | | |
| | | | | | |
| Comp.. n | 0.5 | | | | |

Tabla QSAR

Serie de comp..



Análisis

Multivariable

Ecuación QSAR

$$Y = a + \beta_1 S_1 + \beta_2 S_2 + \dots + \beta_n S_n + \beta_{n+1} E_1 + \beta_{n+2} E_2 + \dots + \beta_{n+m} E_m$$

Figura 2. Una representación gráfica de la metodología QSAR (modificada de la ref. 30).

2.- Alinear el grupo de moléculas a evaluar de acuerdo al punto, y se crea una rejilla, o una red, como una caja de puntos en el espacio potencial del receptor que rodea a las moléculas alineadas.

3.- Calcular el campo (estérico y electrónico) que cada molécula ejerce sobre un átomo de prueba localizado en cada punto de la red o rejilla (los efectos estéricos y electrostáticos se separan para una fácil interpretación).

4.- Utilizar estadística de PLS para determinar una expresión lineal, la cual podría ser un grupo mínimo de puntos de la red o de la rejilla, necesarios para distinguir el grupo de compuestos de acuerdo a sus actividades medidas.

5.- Validar el método de PLS usando "validación cruzada" (cross-validated PLS); esto es, explorar su valor predictivo mediante eliminación sucesiva de cada observación, rederivar el modelo y predecir la observación eliminada

6.- Ajustar parcialmente los compuestos alineados cuya actividad predicha es pobre, casi siempre utilizando un procedimiento de "ajustado de campo", se repiten los pasos 1 a 5 (con los pasos 2 a 5 automatizados), hasta que se encuentra un alineamiento para todas las moléculas, y éste tiene un alto valor predictivo.

7.- Visualizar los contornos QSAR generados por CoMFA, que permiten la visualización de las regiones donde las diferencias en actividad observadas están fuertemente relacionadas con los cambios en campos electrostáticos (rojo y azul) y estéricos (amarillo y verde).

8.- Diseño de nuevas estructuras utilizando los contornos de CoMFA, modelar estas estructuras en el modelo creado, entonces sintetizar y probar la actividad experimentalmente.

Su análisis gráfico, así como generación automática de parámetros y su análisis estadístico permiten a CoMFA ser implementado en una manera extremadamente amigable dentro de un ambiente de modelado molecular estándar.

2.2.5. Relaciones Cuantitativas de Estructura-Actividad en los compuestos de alquilpiridinio

Dentro de la serie de alquilpiridinio se ha encontrado que la actividad depende del tamaño de la cadena y de la sustitución en el anillo de piridinio. Cuando la cadena hidrofóbica en posición 1 tiene menos de 8 carbonos los compuestos tienen poca actividad; a partir de 8 carbonos la actividad aumenta al aumentar el número de carbonos, alcanzando un máximo con un total de 16 carbonos; cuando se incrementa a 18 la actividad decrece rápidamente,³² y no hay mucha diferencia si la cadena es insaturada.¹⁵

La introducción de grupos hidrofílicos (hidroxilo o carbonilo)³³ o átomos que pueden formar puentes de hidrogeno (O y S)³⁴ en la cadena alquílica, no mejora la actividad, llegando inclusive a disminuirla. En cuanto al anión, estudios realizados revelaron que tiene poca influencia en cuanto a la actividad en la serie de cetilpiridinio.³²

Con respecto a la sustitución en el anillo de piridina se ha podido establecer que la sustitución en otras posiciones diferentes a la posición 1 incrementa la actividad con grupos alquilo menores a 5 carbonos, especialmente si está sustituido en posición 2, ó 3, y ó 4. Por otro lado, el metilar (picolina), colocar un anillo de benceno extra (quinolina), introducir otro heteroátomo (morfolina), o reducir completamente el anillo de piridinio (piperidina) resulta en la pérdida de la actividad.³²

En la literatura existen reportadas varias relaciones cuantitativas de relación estructura-actividad utilizando parámetros de hidrofobicidad (constante de π de Hansch y Log P) y la actividad antimicrobiana.

En los primeros estudios QSAR, Lien y Col.¹⁴ al desarrollar las primeras relaciones no lineales, mediante el método parabólico, encontraron una relación significativa entre la constante π (aditiva para la cadena lineal) y la actividad antimicrobiana de una serie de derivados de *N*-alquil-3-*N,N*-dietilaminopiridinio (niquetamidas).

En este estudio determinaron que el valor de Log P ideal (Log P₀, derivado del modelo parabólico) para las bacterias positivas es mayor (Log P₀ de 6) que el de las bacterias negativas (Log P₀ de 4). Este comportamiento es debido a la diferencia en la pared celular, ya que los Gram negativos presentan una mayor cantidad de lípidos en la membrana celular.

Kourai³⁵ reportó que la actividad se aumenta si se encuentran presentes sustituyentes electrodonadores en posición 2, 4, ó 6 de la piridina, mientras que la presencia de grupos electroattractores en 2 y 4 reducen la actividad. Estos grupos electrodonadores incrementan la densidad electrónica en el nitrógeno, y por lo tanto, la actividad es proporcional a los valores de pKa. Sin embargo, en el caso de los compuestos con grupo ciano (en diferentes posiciones)³⁶ o 4-butenilo³⁷ esta relación no se presentó. En la serie de derivados de laurilpiridinio (cadena lineal con 12 carbonos) la relación entre el Log P y la actividad no resultó significativa.

Devinski³⁸ realizó la primera correlación cuantitativa con una serie de análogos de *N*-alquil-3-*N,N*-dietilaminocarbonilpiridinio (niquetamidas) empleando métodos lineales y no lineales (parabólico y bilineal). En esta serie, el modelo bilineal reveló una correlación estadísticamente significativa con el Log P.

Kourai y col.³⁹ determinaron el coeficiente de partición de 41 derivados de alquilpiridinio con sustituyentes en 2 (metilo), 3-carbamoilo y grupos dimetilo en 2,4 ó 3,4 ó 3,5, con diferentes cadenas alquílicas (de 6 a 18 carbonos).

En estas series, la hidrofobicidad se incrementa linealmente con el tamaño de la cadena hasta los derivados de 14 carbonos, pero no para los compuestos con 16 y 18 carbonos. En este mismo estudio, también realizaron el análisis de relación cuantitativa estructura-actividad entre las diferentes series (cada serie por separado), utilizando este parámetro y la actividad antimicrobiana mediante el modelo lineal y parabólico.

Los coeficientes de correlación en todos los estudios son mayores a 0.89, y sugieren el uso de estas ecuaciones para la determinación de la actividad, ya que resulta más rápido calcular el Log P que la concentración mínima inhibitoria. Esta última aseveración está basada en la determinación de los coeficientes estadísticos.

Una inspección detallada de cada relación QSAR reportada revela que los valores óptimos calculados utilizando el modelo bilineal están más cerca de los experimentales que aquellos calculados con el método parabólico. De estas relaciones QSAR es factible determinar que no existe un modelo QSAR integral, que emplee a todas las moléculas reportadas (**Tabla 1**),³⁵⁻³⁹ ya que la mayoría de ellas fueron determinadas empleando diferentes series.

Ahora bien, el cálculo del Log P para moléculas cargadas, como el cloruro de cetilpiridinio, mediante algoritmos computacionales no es factible debido a la poca predictibilidad de los modelos con respecto a las sales. Esto limita el uso de estas regresiones lineales como modelo de predicción de la actividad potencial de las moléculas como antimicrobianos, ya que si se requiere emplear estas ecuaciones es necesario sintetizar a la molécula y después determinar su Log P.

El uso de una técnica que logre relacionar la actividad antimicrobiana con la estructura química, o algún parámetro que pueda ser calculado mediante algoritmos computacionales, simplificaría el diseño de estas moléculas.

Tabla 1. Derivados de Alquilpiridinio reportados en la literatura^a

| Compuesto | | Log MIC (M) | | | | | | Log P |
|--|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| Cola ^b No de Carbonos | Cabeza ^b Sustituyente | <i>B.</i> <i>subtilis</i> | <i>B.</i> <i>megaterium.</i> | <i>S.</i> <i>aureus</i> | <i>E.</i> <i>coli</i> | <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> | <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> | |
| 16 | 2-metilo | 6.174 | 5.569 | 6.658 | 4.745 | 4.009 | 5.569 | 1.950 |
| 16 | 2,4-dimetilo | 6.187 | 6.000 | 6.699 | 5.187 | 3.824 | 5.284 | 3.900 |
| 16 | 3-carbamoilo | 5.678 | 4.921 | 5.77 | 4.678 | 3.886 | 4.824 | 1.440 |
| 16 | 3,4-dimetilo | 6.187 | 5.886 | 6.585 | 5.187 | 3.886 | 6.060 | 3.160 |
| 16 | 3-metilo | 5.187 | 5.959 | 6.886 | 5.187 | 3.959 | 6.000 | 3.350 |
| 16 | 3-DEAC ^c | | | 2.222 | 2.478 | | | |
| 16 | 4-butenilo | 6.125 | | 5.523 | 5.229 | | 5.824 | |
| 16 | No sustituida | 6.036 | 5.745 | 6.638 | 5.036 | 4.056 | 5.745 | 2.810 |
| 10 | 2-metilo | 4.260 | 4.086 | 4.854 | 3.678 | 3.260 | 4.387 | 0.185 |
| 10 | 2,4-dimetilo | 4.569 | 4.569 | 5.004 | 3.699 | 3.097 | 4.796 | 0.535 |
| 10 | 3-carbamoilo | 3.721 | 4.046 | 4.495 | 3.292 | 3.292 | 4.194 | -0.289 |
| 10 | 3,4-dimetilo | 4.569 | 4.569 | 5.097 | 3.796 | 3.097 | 4.678 | 0.655 |
| 10 | 3,5-dimetilo | 4.276 | 4.398 | 4.959 | 3.620 | 3.174 | 4.569 | 0.764 |
| 10 | 3-DEAC ^c | | | 2.481 | 2.559 | | | |
| 10 | 4-butenilo | 4.131 | | 4.131 | 4.130 | | 3.830 | |
| 10 | No sustituida | 3.959 | 4.066 | 5.066 | 3.699 | 3.149 | 4.244 | 0.108 |
| 12 | 2,4,6-trimetilo | 6.410 | | | 5.590 | | | 1.410 |
| 12 | 2,4-dimetilo | 5.523 | 5.523 | 5.921 | 4.398 | 3.523 | 5.658 | 1.440 |
| 12 | 2,6-dimetilo | 5.300 | | | 4.700 | | | 2.050 |
| 12 | 2-amino | 5.000 | | | 4.360 | | | 0.950 |
| 12 | 2-carboxilo | 3.420 | | | 2.960 | | | 0.640 |
| 12 | 2-ciano | 5.550 | | | 4.560 | | | 0.000 |
| 12 | 2-etilo | 4.920 | | | 4.350 | | | 1.340 |
| 12 | 2-metilo | 5.292 | 5.000 | 6.114 | 4.387 | 3.824 | 5.000 | 1.320 |
| 12 | 2-propilo | 5.200 | | | 4.620 | | | 1.750 |
| 12 | 3,4-dimetilo | 5.398 | 5.523 | 5.921 | 4.301 | 3.523 | 5.432 | 1.910 |
| 12 | 3,5-dimetilo | 5.301 | 5.398 | 5.921 | 4.301 | 3.602 | 5.284 | 1.920 |
| 12 | 3-amino | 5.740 | | | 4.540 | | | 0.602 |
| 12 | 3-carbamoilo | 4.620 | 4.721 | 5.319 | 4.066 | 3.770 | 4.620 | 0.600 |
| 12 | 3-carboxilo | 3.550 | | | 3.110 | | | -0.170 |
| 12 | 3-ciano | | | | 3.870 | | | 0.000 |
| 12 | 3-metilo | 5.310 | | | 4.290 | | | 1.210 |
| 12 | 4-amino | 5.800 | | | 5.000 | | | |
| 12 | 4-butenilo | 5.602 | | 5.292 | 4.690 | | 5.284 | 0.050 |

^aLos valores fueron transformados a unidades logarítmicas de acuerdo a la siguiente fórmula: $\text{Log MIC} = \text{Log}_{10} (1 / \text{MIC}_{50})$. Todos los MIC están en unidades molares.

^bSe considera como cola al sustituyente alquílico sobre el nitrógeno de la piridina y como cabeza al anillo de piridina sustituida

^c N'N'-dietil-3-aminocarbonilo

Tabla 1. (Continuación)

| Compuesto | | Log MIC (M) | | | | | | Log P |
|--|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| Cola ^b No de Carbonos | Cabeza ^b Sustituyente | B. <i>subtilis</i> | B. <i>megaterium.</i> | S. <i>aureus</i> | E. <i>coll</i> | P. <i>aeruginosa</i> | K. <i>pneumoniae</i> | |
| 12 | 4-carbamoilo | 4.620 | | | 4.080 | | | 0.630 |
| 12 | 4-carboxilo | 3.460 | | | 3.000 | | | 0.090 |
| 12 | 4-ciano | | | | 3.760 | | | 0.000 |
| 12 | 4-metilo | 5.340 | | | 4.510 | | | |
| 12 | No sustituida | 4.959 | 3.959 | 5.796 | 4.600 | 3.620 | 4.959 | 2.150 |
| 14 | 2-metilo | 6.149 | 5.620 | 6.444 | 4.921 | 4.260 | 5.444 | 2.270 |
| 14 | 2,4-dimetilo | 6.032 | 6.032 | 6.602 | 4.854 | 4.155 | 6.131 | 2.470 |
| 14 | 3-carbamoilo | 5.347 | 5.347 | 6.046 | 4.745 | 4.310 | 5.347 | 1.140 |
| 14 | 3,4-dimetilo | 6.032 | 5.921 | 6.377 | 4.921 | 4.027 | 6.032 | 2.930 |
| 14 | 3,5-dimetilo | 6.032 | 5.921 | 6.638 | 4.921 | 4.032 | 6.081 | 2.900 |
| 14 | 3-DEAC ^c | | | 2.247 | 2.419 | | | |
| 14 | 4-butenilo | 5.620 | | 5.319 | 5.021 | | 5.328 | |
| 14 | No sustituida | 5.824 | 5.699 | 6.523 | 4.824 | 4.051 | 5.699 | 3.560 |
| 8 | 2-metilo | 3.347 | 3.051 | 3.921 | 3.131 | 2.745 | 3.347 | -0.774 |
| 8 | 2,4-dimetilo | 4.456 | 3.456 | 4.131 | 3.215 | 2.854 | 3.538 | -0.570 |
| 8 | 3-carbamoilo | 2.854 | 2.959 | 3.387 | 2.854 | 2.886 | 2.947 | -0.699 |
| 8 | 3,4-dimetilo | 3.638 | 4.770 | 4.237 | 3.456 | 2.699 | 3.638 | -0.412 |
| 8 | 3,5-dimetilo | 3.161 | 3.456 | 3.921 | 3.161 | 2.699 | 3.538 | -0.169 |
| 8 | 3-DEAC ^c | | | 2.565 | 2.590 | | | |
| 8 | 4-butenilo | 3.246 | 2.945 | 3.848 | 3.246 | | 3.246 | |
| 8 | No sustituida | 3.041 | 3.071 | 3.959 | 3.081 | 2.602 | 3.208 | -0.084 |
| 18 | 2-metilo | 6.076 | 5.523 | 6.377 | 4.770 | 4.886 | 5.495 | 2.480 |
| 18 | 2,4-dimetilo | 6.086 | 5.602 | 6.602 | 4.796 | 3.854 | 5.745 | 3.730 |
| 18 | 3-carbamoilo | 5.620 | 4.796 | 5.796 | 4.398 | 3.796 | 4.796 | 1.930 |
| 18 | 3,4-dimetilo | 5.921 | 5.602 | 6.387 | 4.921 | 3.538 | 5.678 | 3.170 |
| 18 | 3,5-dimetilo | 5.921 | 5.602 | 6.678 | 5.086 | 3.678 | 5.538 | 3.160 |
| 18 | 3-aminocarbonilo | | | 2.292 | 2.567 | | | |
| 18 | 4-butenilo | 5.357 | | 4.754 | 4.453 | | 4.754 | |
| 18 | No sustituida | 5.658 | 4.824 | 6.523 | 4.585 | 4.000 | 5.367 | 3.680 |

^aLos valores fueron transformados a unidades logarítmicas de acuerdo a la siguiente fórmula: $\text{Log MIC} = \text{Log}_{10} (1/ \text{MIC}_{50})$. Todos los MIC están en unidades molares.

^bSe considera como cola al sustituyente alquílico sobre el nitrógeno de la piridina y como cabeza al anillo de piridina sustituida

^c N'N'-dietil-3-aminocarbonilo

2.3 MÉTODOS GENERALES DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ALQUILPIRIDINIO

La preparación de derivados de alquilpiridinio se ha realizado principalmente por dos métodos: cuaternización del átomo de nitrógeno de la piridina previamente sustituida y formación del anillo de piridina con la cadena integrada en el nitrógeno.

A) Cuaternización del átomo de nitrógeno de la piridina previamente sustituida

Este es el método más empleado para la preparación de los compuestos de alquilpiridinio,^{36-38, 42-43} en el cual se hace reaccionar a la piridina previamente sustituida con un agente alquilante, que generalmente es un halogenuro de alquilo; esta reacción procede vía una reacción S_N2 .

En general, esta reacción de sustitución se lleva a cabo en disolventes polares, como etanol, metanol.^{32,36} Recientemente, Devinski³⁸ propuso la utilización de acetonitrilo, que aceleró la reacción, comparada con los disolventes empleados anteriormente.

Las condiciones de reacción varían de acuerdo a la sustitución en la piridina, y como primera aproximación, si no se encuentran presentes efectos estéricos, las basicidades relativas pueden usarse como un índice de las reactividades.⁴⁴

Así, el pKa de 4.58 de la piridina indica que se requerirán altas temperaturas y tiempos largos de reacción, comparado esto con la alquilación de los compuestos lineales o cíclicos saturados con un pKa de ~10. De hecho, se ha reportado que la piridina reacciona con el yoduro de metilo 100 veces más lento que la trietilamina.

Las basicidades se incrementan si las piridinas están sustituidas en la posición 2, 3, ó 4. Algunas consideraciones de la reactividad de estas moléculas son:

a) Anillo no sustituido: Esta clase de compuestos pueden prepararse mediante la reacción de piridina con el halogenuro o sulfato de alquilo a 150 °C por dos horas en ausencia de disolvente.³²

b) Anillo con grupos alquilo en 2 ó 4. La formación del compuesto de alquilpiridinio es esencialmente la misma que para la piridina no sustituida. La reacción de Friedel-Crafts de alquilación en compuestos aromáticos, no se ha logrado aplicar a los compuestos piridínicos. Sin embargo, las 2 y 4 metilpiridinas (α y χ -picolinas) son asequibles comercialmente. Los átomos de hidrógeno del grupo metilo son algo ácidos, permitiendo la factibilidad de incrementar o funcionalizar la cadena en esas posiciones.

c) Anillos con sustituyentes en 3. La 3-metilpiridina (β -picolina) también es disponible comercialmente, pero en este caso los hidrógenos no son ácidos. La oxidación del 3-metilo lleva a la producción de ácido nicotínico (disponible comercialmente), que puede ser reducido a aldehído, o alcohol, y éstos a su vez funcionalizados.

B) Formación del anillo de piridina con la cadena integrada en el nitrógeno

Suyama y colaboradores^{45,46} sintetizaron una serie de sales de piridinio con sustituyentes en 1,3,4,5 y 1,2,3,5, mediante la condensación de aldehídos lineales y aminoácidos o aminas primarias. En el primer estudio sólo lograron sintetizar compuestos de alquilpiridinio con un máximo de 5 carbonos, pero en un segundo estudio fue factible el obtener derivados con 12 y 15 carbonos en la cadena lineal. El rendimiento general de las reacciones fue pobre debido a reacciones secundarias que ocurren en el paso de condensación.

2.4. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A AGENTES MICROBIANOS

Para evaluar la susceptibilidad microbiana a algún agente químico, existen en general, dos métodos:⁴⁷

a) Métodos de prueba basados en difusión

Conocido ampliamente como el método de disco; consiste en preparar cajas petri con el medio adecuado, se colocan discos impregnados con el agente antimicrobiano y las bacterias son cultivadas en presencia de estos discos. Este método lleva a resultados cualitativos (aunque tiene algunas bases cuantitativas) tales como la clasificación de un organismo en susceptible, no susceptible, o resistente.

La mayor ventaja de este método es la flexibilidad en el número de agentes antimicrobianos que se pueden evaluar y la facilidad de colocar una prueba individual a cualquier tiempo. Técnicamente, es fácil, pero requiere de una atención cuidadosa de los detalles para obtener resultados reproducibles y precisos.

Entre los inconvenientes de estos métodos están las interpretaciones no cuantitativas, la inaplicabilidad a organismos de crecimiento lento y anaerobios, la inexactitud en predecir la susceptibilidad (a diferencia de la resistencia) con algunos agentes antimicrobianos como las polimixinas, que se difunden pobremente.

b) Métodos de Dilución⁴⁸

En general llevan a resultados cuantitativos, que no son influenciados por la velocidad de crecimiento de los microorganismos, y evitan algunas de las complejidades causadas por la difusión de ciertos agentes antimicrobianos. Estos métodos se han convertido en rutinas prácticas y económicas a través del uso de técnicas de microdilución semiautomatizadas.

Los métodos de susceptibilidad de dilución son los más utilizados para determinar la concentración mínima, usualmente expresada como unidades o microgramos por mililitro, que un agente antimicrobiano necesita para inhibir o eliminar un microorganismo. Los procedimientos para medir esta actividad inhibitoria se llevan a cabo en agar o en caldo.

Los agentes antimicrobianos son evaluados en diluciones seriales Log₂ (o dobles). La concentración más baja que inhibe el crecimiento visible del microorganismo se le conoce como MIC. El intervalo de concentraciones empleadas puede variar de acuerdo al microorganismo y al compuesto a evaluar.

Sin embargo, cuando se utilizan los resultados cuantitativos, uno debe de tomar en cuenta que los MIC reportados no son valores absolutos. La concentración real que se requiere para inhibir el crecimiento está entre la dilución alta que inhibe el crecimiento y la dilución de menor concentración siguiente en la cual se observa el crecimiento. Otra ventaja incluye la habilidad para detectar ciertos esquemas de resistencia que son difíciles de detectar con el método de disco o los sistemas automatizados. Se conocen tres diferentes formas de llevar a cabo los métodos de dilución:

b1) Método de dilución en agar

El compuesto a evaluar (generalmente en un intervalo de concentración de 512 a 0.125 µg/ml) se añade al medio de cultivo (de 20 a 25 ml) y se vierte sobre cajas petri, a las cuales se les añade una concentración conocida del microorganismo de prueba (10⁴ CFU/ml). Las cajas son incubadas por 20 h. La concentración en la que no se presenta crecimiento se le conoce como MIC.

Este método está estandarizado y tiene una alta credibilidad como técnica para la determinación de la susceptibilidad. Se pueden probar diferentes colonias aisladas y se puede ver si existe contaminación de la muestra. El método es sumamente laborioso y se incrementa con el número de agentes a determinar.

b2) Método de macrodilución⁴⁹

El compuesto a evaluar (generalmente en un intervalo de concentración de 512-a 0.125 $\mu\text{g/ml}$) se añade al medio de cultivo en caldo, al cual se le añade una concentración conocida del microorganismo de prueba (10^4 CFU/ml). Los tubos se incuban por 20 h en condiciones aerobias. La concentración en la que no se presenta crecimiento se le conoce como MIC.

El método de macrodilución es estable y estandarizado. Como método de referencia en investigación es el más utilizado. Debido a su naturaleza laboriosa y a la aparición de métodos automatizados de microdilución, no se utiliza de rutina para la detección de susceptibilidad en industria. Su mayor desventaja es la dificultad para ver si existe contaminación de los microorganismos al realizar el ensayo.

b3) Método de microdilución o proceso automatizado

Se realiza de la misma forma y condiciones que en el método de macrodilución, pero la cantidad de medio y del inóculo es de 0.1 a 0.5 ml. Estos se colocan en placas de microdilución.

El método es estable y rápido para evaluar diferentes agentes antimicrobianos contra bacterias, hacer pruebas de susceptibilidad de rutina, además de ser barato. Sin embargo, el trabajo en la preparación de las placas, así como el costo del equipo para su preparación detrimentan su uso frecuente. El método además es muy susceptible a problemas de precisión, debido al poco volumen con el que se trabaja.

En cualquier método elegido es necesario un sistema de control de calidad con cepas de referencia estándar, que garanticen los intervalos de susceptibilidad de cada una de las series de diluciones del agente antimicrobiano, así como la determinación de la pureza del microorganismo a evaluar.

2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS DE ALQUILPIRIDINIO

Se han desarrollado varios métodos para la determinación de los surfactantes catiónicos.⁵⁰ Los métodos antiguos en general eran colorimétricos, en los cuales los surfactantes catiónicos se hacían reaccionar con colorantes aniónicos. El complejo surfactante-colorante era extraído con un disolvente orgánico y se determinaba la absorbancia de la solución. Pero las interferencias con surfactantes aniónicos y la baja sensibilidad han ido disminuyendo el uso de estos métodos.

Wee y Kennedy⁵¹ desarrollaron un método rápido y menos laborioso, el cual utiliza HPLC con un detector conductimétrico en medio no acuoso. El método puede detectar muestras entre 0.02 a 2 $\mu\text{g/L}$ de concentración del surfactante. Sin embargo, los métodos potenciométricos requieren la fabricación de electrodos selectivos para determinar el analito. En general el CPC ha sido detectado en cantidades no mayores de 0.2 a 2 mg/L .

Para el análisis de surfactantes catiónicos en muestras de laboratorio, la metodología que se requiere está en el intervalo de concentración de los miligramos, mientras que para el análisis de muestras ambientales (como efluentes y aguas de río)⁵⁰ las concentraciones están en el intervalo de microgramos por litro.

Esta capacidad analítica está disponible para un gran número de surfactantes catiónicos, con avances recientes en HPLC, extracción con disolvente post-columna, detección ultravioleta o de fluorescencia, espectrometría de masas de bombardeo rápido, etc. Pero se requiere más trabajo para extender esta capacidad analítica para la determinación de otros surfactantes catiónicos.

La técnica de HPLC es efectiva para determinar sensiblemente y específicamente a los compuestos de alquilpiridinio y aminas en el rango de aplicaciones de evaluación ambiental. El análisis de HPLC es particularmente adaptable para la separación y cuantificación de este tipo de moléculas cargadas no volátiles.

Los compuestos de amonio cuaternario, entre ellos el CPC,⁵² se pueden separar en una columna de sílica de fase reversa con grupos ciano, empleando un disolvente orgánico. El analito se detecta por conductimetría. Meyer y colaboradores emplearon una fase móvil, 60:40 de metanol/0.36 % (w/v) de hidróxido de tetrametilamonio pentahidratado en agua, ajustada a un pH de 3.5 con ácido acético. Estas condiciones aumentaron la recuperación del CPC. Este método se usó para determinar al CPC en un enjuague bucal a un nivel de 500 ppm (500 µg/ml).

Linares y col.⁵³ emplearon un método de HPLC con una columna de fase reversa de par iónico, con fase móvil de agua / cloroformo/ metanol, con 0.1 M de sulfosuccinato de dioctilo sódico. La detección se realizó con detector de arreglo de fotodiodos, con una longitud de onda de 244 nm. El límite de detección para el ion de cetilpiridinio fue de 175 µg/mg, siendo la reproducibilidad a 1000 µg/ml mejor al 3% de desviación estándar.

Sólo un método HPLC se ha reportado para la determinación del CPC en alimentos. Este método determina el nivel residual de CPC en carne de pollo después de un tratamiento con soluciones acuosas de CPC.¹¹ El límite de cuantificación de este método es de 3.5 µg/ml, empleando un detector de u.v, con una longitud de onda de 244 nm. Sin embargo, para la determinación de los análogos de alquilpiridinio se espera tener un nivel residual menor, lo cual deja abierta la posibilidad de desarrollar métodos analíticos para esta cuantificación.

Por otra parte, el éxito de las metodologías analíticas empleadas para la evaluación ambiental de los surfactantes catiónicos casi siempre es dependiente de tener técnicas para concentrar materiales libres de compuesto que interfieran en adición a una cuantificación analítica sensible.⁵⁰

Cuando los analitos están presentes en ppm o ppb en las muestras, se requieren muestras grandes que permitan concentrar suficiente material (unos pocos mg) para realizar una determinación analítica exacta. La forma física determina en mucho el tipo de técnica que podría ser utilizada para la separación de los surfactantes catiónicos.

Una de las técnicas más empleadas, dentro de las diversas técnicas para concentrar muestras en estado líquido, es la de enriquecimiento de trazas (o extracción de fase sólida (SPE)). Esta metodología emplea minicolumnas desechables que concentran compuestos orgánicos polares (p.e., surfactantes).

En este tipo de técnicas de concentración de muestras se han empleado un amplio rango de columnas de empaque absorbente. Estas columnas pueden tener diferentes fases estacionarias, como grupos octadecilo unidos a sílica, resinas de intercambio iónico y resinas macrorreticulares para concentrar selectivamente algunos de estos surfactantes. Después, se eluye con volúmenes pequeños de disolvente.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El modelado molecular, específicamente CoMFA, puede ayudar en el diseño de nuevas moléculas con mayor actividad antimicrobiana y con mayor solubilidad en agua, las cuales serían de utilidad en la desinfección de los alimentos y fáciles de eliminar por lavados, ya que permanecerían preferentemente en la fase acuosa, disminuyendo así su nivel residual en los alimentos.

3.2. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo de tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Realizar el modelado molecular de compuestos activos de alquilpiridinio reportados en la literatura, y, de forma paralela, implementar técnicas de modelado molecular en el área de Química Farmacéutica, para el diseño de nuevas moléculas con una actividad biológica potencial.
2. Búsqueda de las relaciones cuantitativas estructura-actividad en dos dimensiones (2D-QSAR) y tres dimensiones (3D-QSAR); específicamente, CoMFA, en los compuestos estudiados.
3. Con base a los resultados obtenidos, diseñar nuevos compuestos.
4. Síntesis y caracterización de los compuestos diseñados mediante el modelo computacional generado.

5. Determinación del coeficiente de partición como índice de solubilidad en agua de los compuestos sintetizados.
6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC_{50}) utilizando cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. y *Salmonella typhimurium*.
7. Validación del modelo obtenido del modelado molecular, mediante la actividad antimicrobiana determinada.
8. Evaluar la actividad de una serie de análogos de cetilpiridinio que inhiban o reduzcan la contaminación de *S. typhimurium* en productos alimenticios (biosuperficie).
9. Desarrollar métodos de HPLC para determinar CPC en diferentes biosuperficies, como modelo para extrapolar en los compuestos análogos de alquilpiridinio.
10. Determinación de la eficacia de los compuestos activos seleccionados sobre alimentos (carne de pollo, carne de res, y manzana), así como la implementación de un método de HPLC para determinar los residuos que llegaran a quedar después del tratamiento con estos compuestos.

IV. DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en seis etapas, las cuales se describen a continuación. Primeramente se realizó el modelado molecular de los compuestos enlistados en la **Tabla 1**, con los resultados obtenidos se procedió a la selección de nuevas moléculas con base a su estructura química, propiedades fisicoquímicas, factibilidad de síntesis y buena predicción de actividad virtual; y a la síntesis de los compuestos seleccionados, luego, se determinó el coeficiente de partición octanol/agua y la actividad antibacteriana in vitro y, por último, se cuantificó el nivel residual después de su aplicación en alimentos.

4.1 Modelado Molecular

Primero se construyeron las moléculas de la **Tabla 1** en dos dimensiones en el constructor de moléculas de Sybyl⁵⁴ 6.8 y enseguida se sometieron a una preoptimización utilizando el campo de fuerza de MM de Tripos; después, se realizó una optimización geométrica utilizando el Hamiltoniano semiempírico PM3,⁵⁵ con las siguientes especificaciones:

- Optimización utilizando el campo de fuerza Sybil⁵⁶ (Tripos Inc) para obtener las geometrías iniciales de cada molécula.

- Todas las moléculas se consideraron especies simples en estado basal.

- Corrección para el grupo amida (MMOK)⁵⁷ para PM3, en caso de presentarse en las moléculas.

- Como criterio de convergencia, se utilizó el valor establecido por MOPAC en Sybyl: RMS de 3×10^{-4}

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Para encontrar la conformación global de mínima energía (conformación que generalmente se une al receptor), se recurrió a uno de los siguientes tres métodos:

- a) Por búsqueda en la base de datos Cristalográficos Cambridge Database, en Unity 4.1 de Sybyl. Las estructuras tridimensionales encontradas se optimizaron completamente con PM3.
- b) Por modificación parcial de estructuras similares encontradas en Unity 4.1, y optimización parcial de los sustituyentes, siempre y cuando la modificación no comprendiera más de 3 átomos rotables.
- c) Por construcción total de las moléculas no presentes en Unity 4.1, las cuales se optimizaron de acuerdo a la siguiente metodología:

Primero se construyó el núcleo base de alquilpiridinio, el cual se preoptimizó usando el campo de fuerza de Sybyl. Después, se procedió a la construcción de las moléculas propuestas y se realizó el análisis conformacional usando el Método Sistemático.⁵⁸ El incremento del ángulo dihedral para todas las moléculas fue de 30 grados. Para el cálculo de energía de cada conformero se utilizó el campo de fuerza Sybyl de Tripos (Optimización de un solo punto). Después de obtener los conformeros de cada molécula, éstos se ordenaron de mayor a menor energía, eligiendo las conformaciones de menor energía y con mayor peso estadístico; al mínimo global encontrado se le sometió a un cálculo semiempírico con PM3.

Al mínimo global encontrado para cada molécula se le determinaron propiedades electrónicas como:

- Descriptores QSAR (LogP, Índice de Conectividad, CMR)

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

- Superficies de propiedades electrónicas (HOMO, LUMO, y Potencial electrostático).

Los datos de actividad reportados³⁵⁻³⁴¹ en la literatura se transformaron a unidades molares, y después a unidades de potencia de acuerdo a la siguiente ecuación: $\text{LogMIC} (= \text{Log } 1/\text{MIC})$

Los valores calculados para todos los derivados de alquilpiridinio, así como sus correspondientes valores de Log P se presentan en la **Tabla 1**.

Los estudios de QSAR se hicieron en dos partes:

- a) Los estudios de relaciones estructura actividad clásicos (2D-QSAR) se desarrollaron en el programa QSAR (BIOBYTE, Claremont, CA).
- b) Los estudios de relación estructura actividad en tres dimensiones (3D-QSAR) se procesaron usando el módulo de Análisis de Campo Molecular Comparativo (CoMFA)³⁹ en Sybyl 6.8. Para realizarlo, las moléculas se alinearon usando el comando Match en Sybyl, tomando como modelo la conformación de mínima energía del CPC (primeros 3 carbonos de la cadena lineal y el nitrógeno cuaternario) para el alineamiento. Después, a todas las moléculas se les calculó las cargas formales usando el algoritmo de PM3 (cargas de Mopac). Los campos estéricos y electrónicos de CoMFA se calcularon usando un carbono sp^3 como prueba electrostática y estérica. Los contornos de CoMFA se desarrollaron usando el método estadístico de mínimos-cuadrados parciales (PLS), utilizando primero el algoritmo de dejar uno afuera (Leave one out), para establecer la validez estadística del método y el número de componentes mínimos, para enseguida usar la rutina de PLS no validada y encontrar la linealidad del modelo.

4.2 Selección de nuevas moléculas

La información obtenida de los contornos de CoMFA se utilizó para predecir la actividad de derivados de alquilpiridinio con grupos que les confieren solubilidad en agua (metilo, metilhidroxilo, amino y acetilo), los compuestos estudiados, 1-12, se muestran en la **Tabla 2**, así como la actividad predicha para dichos compuestos. De este grupo de moléculas se seleccionaron aquellas que presentaron una mayor potencialidad de actividad y facilidad de síntesis. Los compuestos que se seleccionaron fueron 3, 10 y sus respectivos análogos de 12 carbonos 11 y 12.

Tabla 2. Compuestos de alquilpiridinio diseñados para la primera fase (evaluación y validación del modelo de CoMFA)

| Comp. No. | Cadena Alquílica | Sustituyente en la piridina | Log (1/MIC) ^a | | | |
|-----------|------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------|----------------------|--------------------|
| | | | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. megaterium</i> | <i>B. subtilis</i> |
| 1 | 16C | 2-acetilo | 4.35 | 6.73 | 5.61 | 5.96 |
| 2 | 16C | 3-acetilo | 4.61 | 6.15 | 5.59 | 5.75 |
| 3 | 16C | 4-acetilo | 4.63 | 6.25 | 5.98 | 6.00 |
| 4 | 16C | 2-metoxilo | 4.73 | 6.81 | 5.76 | 6.07 |
| 5 | 16C | 3-metoxilo | 4.80 | 6.33 | 5.61 | 5.78 |
| 6 | 16C | 4-metoxilo | 4.67 | 6.38 | 6.05 | 5.98 |
| 7 | 14C | 2-metoxilo | 5.15 | 6.30 | 5.80 | 5.92 |
| 8 | 16C | 2-hidroximetilo | 5.27 | 6.57 | 5.52 | 6.09 |
| 9 | 16C | 4-hidroximetilo | 4.85 | 6.36 | 5.91 | 6.06 |
| 10 | 16C | 2,4,6-trimetilo | 5.64 | 6.58 | 6.09 | 6.08 |
| 11 | 12C | 4-acetilo | 5.95 | 5.56 | 5.21 | 6.08 |
| 12 | 12C | 2,4,6-trimetilo | 6.02 | 5.95 | 5.11 | 5.62 |

^aActividad predicha por el modelo de CoMFA generado.

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Por otra parte, se decidió sintetizar el compuesto 1-dodecil-2,4,6-trimetilpiridinio (compuesto **12**) como control de la variabilidad del grupo de entrenamiento; además, este compuesto presentaba en el papel el perfil de selección: actividad potente (LogMIC=6.02) y la mejor solubilidad en agua de los compuestos encontrados en la literatura.

Ahora bien, considerando la naturaleza de los grupos metilo, acetilo, y la toxicidad de las piridinas, se consideró pertinente la síntesis de derivados con oxígeno en la posición 4, y por otro lado, derivados de la Vitamina B6. Las predicciones de la actividad de estas moléculas mediante CoMFA se presentan en las **Tablas 3 y 4**.

De manera análoga, se decidió sintetizar los compuestos 1-hexadecil-4-(metoximetil)piridinio (**14**), 1-dodecil-4-(metoximetilen)piridinio (**18**), y 5-hidroxi-3,4-bis(hidroximetil)-4-metil-1-hexadecilpiridinio (**19**), este último, análogo de la vitamina B6.

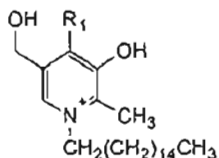
Tabla 3. Compuestos de alquilpiridinio considerados y la actividad virtual antimicrobiana

| Comp. No. | Cadena Alquílica | Sustituyente en la Piridina | Log (1/MIC) ^a | | | |
|-----------|------------------|--|--------------------------|------------------|--------------------|----------------------|
| | | | <i>E. coll</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>B. megaterium</i> |
| 14 | 16 | 4-CH ₂ OCH ₃ | 5.08 | 6.35 | 5.94 | 5.80 |
| 15 | 16 | 4-CH ₂ OCH ₂ OCH ₃ | 5.00 | | | |
| 16 | 16 | 4-CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₃ | 5.15 | | | |
| 17 | 16 | 4-CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₃ | 4.87 | | | |
| 18 | 12 | 4-CH ₂ OCH ₃ | 4.59 | 5.89 | 5.32 | 5.31 |

^aActividad predicha por el modelo de CoMFA generado.

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Tabla 4. Compuestos de alquilpiridinio análogos de la vitamina B6 y la actividad virtual antimicrobiana



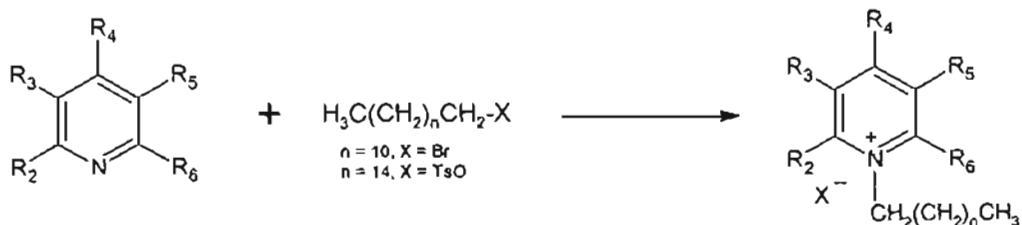
| Comp. No. | Cadena alquímica | Sustitución R ₁ | Log (1/MIC) ^a | | | |
|-----------|------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------|--------------------|----------------------|
| | | | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>B. megaterium</i> |
| 19 | 16 | -CH ₂ OH | 5.19 | 6.31 | 6.32 | 5.94 |
| 20 | 16 | -CHO | 5.14 | 6.14 | 6.24 | 5.74 |
| 21 | 16 | -CH ₂ NH ₂ | 5.32 | 6.32 | 6.32 | 5.92 |

^aActividad predicha por el modelo de CoMFA generado.

4.3 Síntesis de los compuestos de alquilpiridinio propuestos

Las moléculas propuestas, que resultaron más activas de acuerdo al modelo encontrado con CoMFA, se sintetizaron mediante el método reportado en la literatura³² que se ilustra en el Esquema 1.

Esquema 1



DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

En general, el método consistió en hacer reaccionar a la piridina adecuada con el cloruro o el bromuro de alquilo correspondiente en un disolvente polar de alto punto de ebullición, utilizando yoduro de potasio como catalizador. En el caso de los derivados de hexadecilo (cetilo) se sintetizaron mediante la reacción de la piridina adecuada con tosilato de hexadecilo, para formar el tosilato de piridinio, el cual intercambió el tosilato por el ion bromuro durante la purificación por Cromatografía Rápida de Columna (FCC, Flash Column Chromatography).

La mayoría de las reacciones se realizaron en un Reactor Parr de 300 mL, en atmósfera de nitrógeno. La estructura de los compuestos preparados se elucidó por los datos de los análisis de EM, RMN de ^1H y ^{13}C , y elemental.

Así, cuando se trató la 4-acetilpiridina con tosilato de cetilo en acetonitrilo a 130 °C con 200 psi de nitrógeno como presión interna, se obtuvo el tosilato de 4-acetil-1-hexadecilpiridinio. El compuesto se purificó mediante FCC, eluyendo el bromuro de 4-acetil-1-hexadecilpiridinio (**3**). El sólido resultante de la cromatografía se recrystalizó de acetona/éter, dando un polvo amarillo claro.

De manera similar, cuando se trató la 2,4,6-colidina con tosilato de cetilo, en acetonitrilo a 100 °C durante 9 días, llevó al tosilato de 1-hexadecil-2,4,6-trimetilpiridinio. El tosilato se purificó mediante cromatografía rápida de columna, con lo cual se separó el bromuro de 1-hexadecil-2,4,6-trimetilpiridinio (**10**). Éste se recrystalizó de acetona/éter dando agujas blancas.

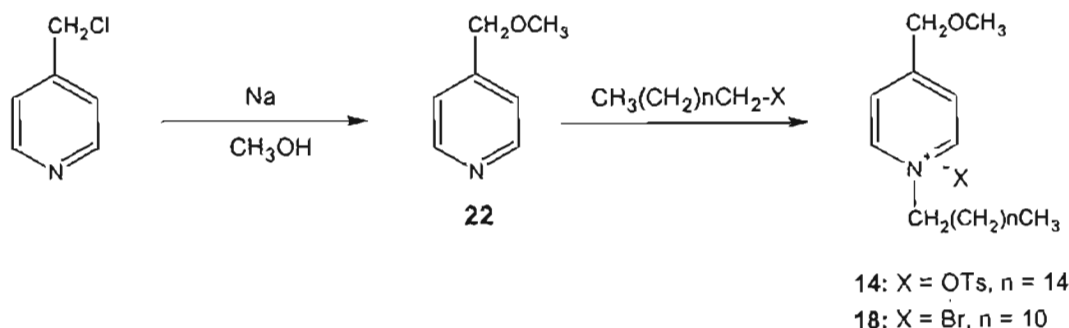
DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Cuando se hizo reaccionar a la 4-acetilpiridina con el bromuro de 1-dodecilo (bromuro de laurilo) en acetonitrilo y 0.1 % de yoduro de potasio como catalizador, después de 27 h de reacción a 100 °C y 200 psi de presión, se obtuvo el bromuro de 4-acetil-1-dodecilpiridinio (11). El compuesto se purificó mediante cromatografía en columna de fase normal, con gel de sílice como fase estacionaria, y una mezcla de cloroformo:metanol (95:5) como fase móvil. Después de concentrar a 5 mL en el rotavapor, a las fracciones que contenían al compuesto puro se les adicionó éter y se indujo la cristalización, obteniéndose así hojuelas color paja.

Por otra parte, cuando se trató a la 2,4,6-trimetilpiridina (2,4,6-colidina) con bromuro de dodecilo, en presencia de 1% de yoduro de potasio como catalizador y acetonitrilo a reflujo por 14 días, se obtuvo el bromuro de 1-dodecil-2,4,6-trimetilpiridinio (12). El compuesto se recrystalizó de acetato de etilo dando hojuelas blancas con un punto de fusión de 92-94 °C, concordante con el reportado en la literatura.³⁵

Un segundo grupo de moléculas que se consideró pertinente sintetizar (**Esquema 2**) fueron los derivados 4-metoximetilo (**14** y **18**).

Esquema 2



DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

La 4-(metoximetil)piridina (**22**) se sintetizó por tratamiento del cloruro de picolilo con metóxido de sodio recién generado. Después de 72 h, la reacción se completó y **22** se purificó mediante destilación de bulbo a bulbo, resultando un líquido incoloro (40%). Su punto de ebullición (90-97 °C, 6 mmHg) y el espectro de resonancia magnética protónica fueron concordantes con lo reportado en la literatura.⁵⁹

La piridina **22** recién destilada se hizo reaccionar con el tosilato de cetilo para dar el tosilato de 1-hexadecil-4-(metoximetil)piridinio. Después de purificarlo mediante FCC, se obtuvo el bromuro de 1-hexadecil-4-(metoximetil)piridinio (**14**), el cual se recristalizó de acetona/éter dando agujas blancas.

Por otro lado, cuando **22** se trató con bromuro de dodecilo, acetonitrilo, 169 psi de nitrógeno y se calentó a 120 °C durante 3 días, se obtuvo el bromuro de 1-dodecil-4-(metoximetil)piridinio (**18**). Al igual que los compuestos anteriores se purificó mediante FCC, se recristalizó de acetona/éter dando agujas blancas.

Finalmente, tomando en cuenta la toxicidad de las piridinas se decidió sintetizar un análogo de la vitamina B6, el cual tiene el anillo de piridina. Para ello, se formó la base libre del clorhidrato de piridoxina utilizando KOH en metanol. Después de concentrar a sequedad, el sólido remanente se transfirió al reactor Parr donde se le hizo reaccionar con tosilato de cetilo en acetonitrilo con 160 psi de nitrógeno como atmósfera inerte.

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Después de 6 h a 120 °C se obtuvo el tosilato de 1-hexadecil-3-hidroxi-4,5-bis(hidroximetil)-2-metilpiridinio (**19**), el cual se separó mediante FCC y se recristalizó de acetona/éter, dando agujas color paja.

4.4 Determinación del coeficiente de partición agua/octanol

El coeficiente de partición agua/octanol se determinó mediante el método de Hansch y Leo.¹³ De manera breve, el protocolo del estudio fue el siguiente:

Determinación de la longitud de onda en la región ultravioleta (u.v) para los compuestos seleccionados. Para cada uno de los compuestos sintetizados se preparó una solución con una concentración de 0.6 mg/mL en metanol. Cada solución se sometió a un barrido completo en la zona de 220 a 500 nm en el espectrofotómetro, de estos resultados se seleccionó la longitud de onda con una absorbancia mayor a 1.0 unidades.

Curva estándar de los compuestos. Una vez determinada la longitud de onda óptima se procedió a construir la curva estándar de cada compuesto en un rango de 0.01 a 0.10 mg/mL en la mayoría de los casos. Los datos estadísticos obtenidos permitieron obtener la ecuación lineal que relaciona la concentración con la absorbancia.

Determinación del coeficiente de partición. Para la determinación del coeficiente de partición se pesaron 10 mg del compuesto en cuestión y se disolvieron en 10 mL de agua deionizada (Waters MilliQ system), excepto para el compuesto **3**, el cual se disolvió en octanol. Para construir la curva estándar se tomaron alícuotas de la solución anterior y se diluyeron para tener concentraciones de 0.1 a 0.0001 mg/mL. Por otro lado, para el proceso de partición entre las dos fases se siguieron dos procedimientos:

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

a) Por centrifugación. De la solución original se tomaron alícuotas para adicionar 0.1, 0.5 y 1.0 mg/mL a la fase acuosa u octanólica de acuerdo al compuesto y se adicionaron a un tubo de centrífuga de 50 mL que previamente contenía 20 mL de agua (saturada toda la noche con octanol a 25 °C) y 1 mL de octanol (saturado con agua destilada toda la noche a 25 °C).

La partición se llevó acabo agitando el tubo por espacio de un minuto¹³ y enseguida se separaron las fases por centrifugación (15000 g, 15 min, a 25 °C). Se determinó la absorbancia de la fase acuosa, y se interpoló con la curva estándar generada para el compuesto correspondiente. Después, considerando las diluciones hechas, se calculó la cantidad de compuesto presente en la fase acuosa y por diferencia con la cantidad adicionada al inicio se determinó la cantidad en la fase octanólica.

b) Utilizando un embudo de separación. Para el proceso de partición entre las dos fases se transfirió un mL de cada solución estándar a un embudo de separación de 125 mL, el cual previamente contenía 20 mL de agua deionizada saturada toda la noche con octanol. Después, se pipeteó un mL de octanol saturado con agua

El embudo se acopló a un agitador Orbit, y se agitó por 1 h, a 200 rpm a 30 °C. Después de este tiempo se separaron las fases, a la fase acuosa se le determinó su absorbancia en el espectro de u.v. y cada absorción se interpoló en la curva correspondiente previamente preparada. La concentración en octanol se calculó de la diferencia de la solución inicial, menos la concentración en la fase acuosa, el experimento se hizo por duplicado para cada concentración.

Obtención del Coeficiente de partición Octanol/Agua. Para cada solución estándar se determinó el coeficiente de partición mediante la gráfica de la concentración en agua versus la concentración en octanol. El logaritmo base diez de la pendiente es el valor del Log P que se reporta.

4.5 Determinación de la actividad antibacteriana mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

En la determinación de la actividad antimicrobiana se utilizó a *Escherichia coli* (cepa ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Salmonella typhimurium* como microorganismos de prueba. El método que se siguió fue el de macrodilución establecido por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, por sus siglas en inglés).⁴⁹ Brevemente:

Preparación de las bacterias. Cada microorganismo se mantuvo a 4°C y se cultivó a 37 °C en agar Mueller-Hilton. Antes de su uso en el ensayo, las bacterias se inocularon en caldo Mueller-Hilton y se cultivaron a 37 °C por 16 hr.

Preparación de la solución estándar bacteriana. Se tomó una colonia aislada del agar Mueller-Hilton y se colocó en 25 mL caldo Mueller-Hilton (previamente esterilizado), luego, se incubó a 37°C por toda la noche (16 h).

La suspensión bacteriana se centrifugó a 4800 rpm por 10 min, el pellet se lavó dos veces con caldo Mueller-Hilton, y se resuspendió en el mismo caldo para obtener así una concentración final de $1-5 \times 10^8$ UFC (Unidades formadoras de colonias)/mL.

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Preparación de las diluciones del compuesto a ensayar. Se preparó una solución estándar del compuesto en cuestión disolviendo 10 mg en 1 mL de solución buffer de fosfatos (en compuestos con poca solubilidad, se utilizó etanol o sulfóxido de dimetilo en una concentración no mayor a 5%). De esta solución estándar (10 mg/mL) se prepararon series de diluciones: se tomó 0.1 mL de solución estándar y se transfirió a un tubo estéril con 1.9 mL de caldo Mueller–Hilton (concentración final 500 $\mu\text{g/mL}$), se mezcló el tubo, y de éste se tomó 0.1 mL y se colocó en otro tubo estéril con 1.9 mL de la solución bacteriana estándar en caldo Mueller-Hilton (concentración final 250 $\mu\text{g/mL}$); de igual forma, se prepararon 10 diluciones sucesivas (concentraciones finales 125, 62.5, 31.25, 15.65, 7.85, 3.975, 1.945, y 1 $\mu\text{g/mL}$). Se prepararon dos tubos adicionales, uno con caldo Mueller-Hinton y otro con buffer de fosfatos con 5% del disolvente utilizado. Los tubos se encubaron por 48 h a 37 °C, y se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) por visualización óptica, determinando aquella dilución en la cual no se presentó turbidez en el medio.

4.6 Determinación del nivel residual de los compuestos seleccionados mediante HPLC

4.6 1. Determinación de CPC en alimentos: carne de pollo

El cloruro de cetilpiridinio se determinó por el método reportado por Zhou y colaboradores.¹¹ Para esto, la carne se trató con una solución de CPC (0.1 a 0.4%); luego, se extrajo con 900 mL de etanol al 95% en una bolsa cerrada Stomach, durante una hora a 60 °C, a 200 rpm.

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Después de enfriar a temperatura ambiente, el extracto se transfirió a un matraz volumétrico de 1 litro y se llevó a la marca de aforo con etanol al 95%. Se tomaron alícuotas de 5 mL y se adicionaron 135 μg (en 56 μl) de una solución estándar de cloruro de dodecilpiridinio (DPC); se centrifugó a 15000 g por 8 min. Se inyectaron 20 μL de los sobrenadantes al sistema de HPLC (ver instrumentación).

Curva estándar. Se prepararon soluciones estándar tales que, 100 μL de estas dieran concentraciones de 32, 16, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al adicionarlas a 5 mL de extracto de pollo sin tratamiento (blanco) mas 135 μg (en 56 μl) de una solución estándar de cloruro de dodecilpiridinio (DPC) como estándar interno. Se calculó la razón de las áreas bajo la curva (ABC) del CPC adicionado entre el DPC añadido *versus* la concentración de CPC.

Las condiciones del sistema de HPLC fueron las siguientes:

Volumen de inyección de la muestra: 20 μl

Columna: Ciano Alltima

Fase móvil: 37% TMAHP 67% MeOH, Velocidad de flujo: 2 mL/min

Detector: U.V, 260 nm, 0.1 AUFS, Chart "1"

Estudios de especificidad para el análisis del CPC en extractos de alimentos. Para examinar la pureza de pico, se midió la absorbancia de pico a 254 y 260 nm para mezclas de CPC y de DPC en etanol al 95%. Las condiciones de HPLC fueron las mismas que las establecidas al inicio, y se midieron las razones de absorbancia a estas longitudes de onda.

4.6.2. Determinación de CPC en alimentos: carne de res

Ensayo sobre carne de res. En este ensayo se emplearon 5 muestras de carne de res donadas por la Dra. Catherine Cutter del Centro USDA, del centro de Investigación en cárnicos, en Nebraska, USA.

Las muestras, cortadas en cuadros de 4.5 X 6 cm², con un peso aproximado de 13-20 g, se descongelaron y cada una se extrajo con 70 mL de alcohol al 95% en un matraz erlenmeyer de 125 mL, a 60 °C por 1 h. El extracto frío se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca de aforo con etanol al 95%.

De esta solución estándar se tomaron alícuotas de 5 mL, a las cuales se les adicionaron 135 mg del estándar cloruro de dodecilmiridinio (título final 26.5 mg/mL) que sirvió como estándar interno. Estas alícuotas se centrifugaron a 15000 X G por 8 minutos. 20 µl de esta solución se analizaron mediante HPLC.

Curva estándar de calibración. Para la curva estándar de calibración se prepararon soluciones estándar de CPC, para que adicionando 30 µL dieran concentraciones en un rango de 3-200 µg/mL. Estas soluciones estándar se adicionaron a extractos blancos de carne de res (inciso anterior) y se analizaron de acuerdo al método de extracción. Se calculó la razón de las áreas bajo la curva (ABC) del CPC adicionado entre el DPC añadido *versus* la concentración de CPC.

Estudios de recobro del CPC. Se prepararon soluciones estándar para los estudios de recobro, para ello, se pesaron exactamente 6.0 y 3.0 mg de CPC en una balanza analítica Sartorius, después se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a marca de aforo, llevando a concentraciones finales de 0.60 y 3.0 mg de CPC/mL de alcohol.

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Un mL de estas soluciones se aplicó a la superficie de cuadros de carne de res libres de CPC mediante una microjeringa en un tiempo de 2 h. Las muestras se guardaron a -70 °C hasta el día de su análisis. Las muestras se extrajeron de acuerdo al método establecido. EL recobro se calculó como la razón entre el CPC medido entre el CPC adicionado.

Determinación la recuperación del CPC aplicado a la carne de res. Cinco muestras de carne de res con un peso aproximado de 25 g se lavaron a presión (125 psi) con una solución al 0.1% de CPC por 15 seg. Este experimento se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones experimentales. Para ver el efecto del tiempo en el tratamiento con las soluciones de CPC, se dejó que la solución permaneciera por diferentes tiempos, y después se lavó la carne por 15 segundos mediante agua a presión. Los tiempos seleccionados fueron los siguientes: C0, sin lavado de agua, C5, C10, C15, C30 con lavado de agua después de 5, 10, 15 y 30 minutos de aplicada la solución de CPC.

Las muestras se empacaron al vacío y se guardaron a -4 °C hasta el momento del análisis. La cantidad de CPC residual se extrajo mediante el método desarrollado anteriormente.

4.6.3. Determinación en modelo de frutas: manzanas.

Se trató de emplear el método previamente descrito para cuantificar los residuos en manzanas, pero en el extracto etanólico aparecieron coextractos que interfirieron con la cuantificación del analito, por lo que fue necesario desarrollar una técnica de pretratamiento (extracción de fase sólida de intercambio iónico) para eliminar las interferencias presentes.

Al mismo tiempo, se mejoraron las condiciones del método de HPLC, ya que la velocidad de flujo de la fase móvil (2 mL/min) era muy agresiva para la vida de la columna. Así mismo, se realizó la validación completa del método, incluyendo la fase de pretratamiento.

Materiales. Para este método se utilizaron dos tipos de manzanas:

- a) Manzanas tratadas con cera del tipo Granny Smith, con un peso de 95 a 180 g, de la compañía First Fruit de Washington (Prescott, WA), las cuales se compraron en una tienda de autoservicio en Arkansas.
- b) Manzanas sin cera (orgánicas) del tipo Black Arkansas, con un peso de 150-220 g, las cuales también se compraron en un mercado en Arkansas

Para el pretratamiento de extracción en fase sólida de intercambio iónico se utilizaron cartuchos CBA bond elut de Varian (ácido carboxílico), de 500 mg (3 mL de volumen), que se acondicionaron de la siguiente forma:

- 1) Lavado del cartucho con 2.5 mL de metanol (grado HPLC)
- 2) Aplicación de 2.5 mL de 0.2 M trifosfato de sodio, para activación de los grupos de intercambio iónico.
- 3) Lavado del cartucho con 2.5 mL de agua deionizada.

Para el análisis de HPLC se utilizó el mismo sistema referido en la sección 4.4.2 en las siguientes fases:

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

A) Desarrollo del método para determinar el CPC in Manzanas

1) Extracción del analito:

Las manzanas se pesaron y se colocaron individualmente en una bolsa Stomach de polietileno, adicionándose enseguida etanol al 95% (2mL etanol por gramo de manzana) y se agitaron por espacio de 1 h, a 60 °C en un agitador Orbit. Después de enfriar a temperatura ambiente, se tomaron alícuotas de 50 mL y se guardaron a -20 °C hasta el día de su análisis.

2) Pretratamiento de la muestra con extracción de fase sólida de intercambio iónico:

Se tomaron alícuotas de 10 mL del extracto etanólico a analizar y se adicionaron 90 µg (30 µl) de una solución estándar de cloruro de estearilpiridinio (cloruro de octadecilpiridinio, SPC) como estándar interno. La muestra se aplicó a un cartucho de extracción de fase sólida de intercambio iónico (CBA bond elut, 500 mg) que previamente había sido acondicionado. Después de aplicar toda la muestra, el cartucho se lavó con 5 mL de metanol (grado HPLC). La muestra se eluyó con 2 mL de HCl al 2% en metanol (grado HPLC) y se colectó en un vial.

3) Inyección de la muestra:

Se inyectaron 20 µL de la muestra, colectada en el pretratamiento anterior, en el sistema de HPLC referido en la sección 4.4.2, pero se hicieron las siguientes modificaciones: se cambió el estándar interno, que en el método previo fue el derivado de 12 carbonos (cloruro de dodecilpiridinio, DPC), por un compuesto con un tiempo de retención mayor (cloruro de octadecilpiridinio, SPC), el cual se sintetizó de acuerdo al método reportado por Shelton,³² se identificó y se evaluó su pureza (98%).

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Para una mejor separación de los picos del estándar interno (SPC) y del CPC, se modificó la fase móvil (metanol: 0.008 M TMAHP) de 67:37 a una relación 29: 71, con lo cual los dos picos se diferenciaron perfectamente. De igual forma se modificó la velocidad de flujo de la fase móvil, de 2 mL/min (presión del sistema = 3880 psi) a 1min/mL (1400 psi) para aumentar la vida de la columna, así como eliminar problemas de alta presión. Todos los análisis se realizaron en un tiempo de 20 minutos.

B) Validación del método.

1) Curva de calibración

Se prepararon muestras de 10 mL de extracto etanólico de manzanas libre de CPC (blanco) y se les adicionaron 50 μ l de soluciones estándar de CPC para obtener concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μ g/mL. A cada muestra se le agregó 30 μ l de la solución estándar de SPC (30 μ l, 90 μ g). Las muestras se analizaron según lo descrito arriba (inciso A). Cada experimento se realizó por duplicado. Con estos datos se construyó la curva de calibración del sistema, graficando la relación de áreas del CPC entre el área de SPC versus la concentración de CPC, usando regresión lineal ajustada para determinar la linealidad del sistema.

2) Precisión y exactitud del método.

Se tomaron alícuotas de 10 mL de extracto etanólico blanco de manzana y a cada alícuota se le adicionó 50 μ l de solución estándar para dar concentraciones finales de 0.61, 15.00 y 30.00 μ g/mL. A las muestras se les agregó 30 μ l de solución estándar SPC (90 μ g) y se analizaron de acuerdo al inciso A. Los experimentos se realizaron por quintuplicado en el mismo día (intra día) o una determinación por 5 días consecutivos (inter-día).

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

3) Análisis de recuperación del analito mediante la extracción etanólica:

100 mL de soluciones estándar de CPC en agua (correspondientes a una concentración final de 0.212 y 7.48 mg) se aplicaron lo más homogéneamente posible en la superficie de las manzanas con microjeringa. Después de que las manzanas se secaron, se extrajeron y analizaron de acuerdo al método anterior (inciso A). El % de recuperación se calculó como la relación de la cantidad de CPC determinado entre la cantidad de CPC aplicada.

4) Análisis de la recuperación del analito en la fase de extracción sólida de intercambio iónico

Se tomaron alícuotas de extracto blanco de manzana y a cada alícuota se le adicionó 50 μ L de solución estándar de CPC para dar concentraciones finales de 0.6, y 30 μ g/mL respectivamente. Se realizó la extracción y análisis del sistema de acuerdo al inciso A señalado arriba, excepto que el estándar interno se adicionó después de la extracción de la fase de extracción sólida de intercambio iónico. El porcentaje de recuperación de la fase de EFS-II se calculó como la relación del CPC medido entre el CPC determinado.

5) Determinación del nivel residual en manzanas.

Se tomaron cinco manzanas de cada grupo (Granny Smith y Black Arkansas), se transfirieron a una bolsa Stomach en grupos de tres manzanas y se trataron con soluciones de CPC al 0.2 y 0.4% (0.4 mL de solución por gramo de manzana) por tres minutos con agitación suave.

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Se eliminó la solución por aspiración y se lavaron las manzanas con agua (0.8 mL de agua por gramo de agua, Temp. 0 25 °C, pH= 7.2) dos veces. Después de que se secaron, las manzanas se pesaron y se analizaron como se describe en el inciso A.

4.6.4 Determinación de los compuestos seleccionados para su evaluación residual.

Se evaluó el nivel residual de los compuestos sintetizados y que mostraron el mejor perfil (coeficiente de partición versus actividad antimicrobiológica), al menos en dos modelados (pollo, o pescado, o carne de res, y manzana) mediante los métodos arriba señalados.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto, así como el análisis de los mismos.

5.1 Modelado Molecular

La búsqueda exhaustiva en la literatura proporcionó la estructura de alrededor de 64 moléculas de alquilpiridinio con actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias, las cuales presentaban diferente tamaño de cadena y diferente sustitución en el anillo de piridina.^{14-16,32-41}

Estas estructuras se presentan en la **Tabla 1**. Aunque existen más moléculas de alquilpiridinio reportadas en la literatura,^{15,16} no fueron consideradas en el estudio de modelado molecular, ya que para determinar su actividad se empleó el método de disco,⁴⁷ el cual sólo da una medida cualitativa de la actividad.

La mayoría de las moléculas de la **Tabla 1** se encontraron en la base cristalográfica Cambridge en Unity 4.1 dentro de Sybyl 6.5, por lo que su optimización con el semiempírico PM3 fue directa. Sólo los derivados dimetilados, trimetilados, así como los derivados de 3-*N,N*-dietilamida se optimizaron modificando la estructura del cloruro de cetilpiridinio (CPC) para enseguida emplear el algoritmo de PM3.

5.1.1 Estudios de la relación cuantitativa estructura actividad clásica (2D-QSAR)

Una vez optimizadas las moléculas se determinaron algunos descriptores que se generaron con el semiempírico PM3, principalmente LUMO, HOMO, momento dipolar y el calor de formación. Al mismo tiempo se calcularon algunos índices topográficos para las moléculas, empleando el programa Cache 5.40 (Demo de evaluación, Fujitsu, USA). En la **Tabla 5** se presentan los resultados obtenidos.

Con estos datos, y los presentados en la **Tabla 1**, se calculó la matriz de correlación para encontrar aquellos descriptores que presentaran una correlación significativa y al mismo tiempo que entre ellos no fueran colineales. La **Tabla 6** presenta esta matriz de correlación.

Como se puede apreciar en la **Tabla 6**, sólo el Log P dio una buena correlación (resultados en negritas) con todas las actividades encontradas. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo una correlación mediana con el índice de conectividad (r de 0.7812), y con una predictibilidad buena (q^2 de 0.718).

La **Tabla 7** presenta las ecuaciones 2D-QSAR que se encontraron entre el Log P y el MIC para *Bacillus subtilis* (bacteria Gram positiva) y *Escherichia coli* (bacteria Gram negativa), empleando el programa Biobyte (Claremont, Ca. USA). Sólo se muestran las ecuaciones para estas bacterias debido a que presentan el mayor número de moléculas (n=49).

Tabla No. 5. Derivados de alquilpiridinio seleccionados y los descriptores calculados

| Compuesto | | Descriptores | | | | | | |
|---------------------------|--|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| Cola No de Carbonos | Cabeza Sustituyente en la piridina | Log P ^a | MD ^b | DH ^b | HOMO ^b | PI ^b | LUMO ^b | CI ^c |
| 16 | 2-Metilo | 1.95 | 1.89 | -51.62 | -9.71 | 6.66 | -3.31 | 11.343 |
| 16 | 2,4-Dimetilo | 3.90 | 1.75 | -61.06 | -9.61 | 6.58 | -3.29 | 11.736 |
| 16 | 3-Carbamoilo | 1.44 | 3.92 | -48.85 | -9.57 | 6.92 | -3.51 | 12.236 |
| 16 | 3,4-Dimetilo | 3.16 | 1.82 | -61.19 | -9.49 | 6.60 | -3.26 | 11.736 |
| 16 | 3-Metilo | 3.35 | 1.62 | -28.95 | -9.55 | 6.64 | -3.24 | 11.326 |
| 16 | 3-DEAC ^d | nd | 1.75 | -36.94 | -9.69 | 6.67 | -3.33 | 12.864 |
| 16 | 4-Butenilo | 2.81 | 1.91 | -43.17 | -9.98 | 6.73 | -3.32 | 10.932 |
| 16 | No sustituida | 0.19 | 1.91 | -19.05 | -9.72 | 6.65 | -3.29 | 8.343 |
| 10 | 2-Metilo | 0.54 | 1.77 | -28.49 | -9.61 | 6.58 | -3.27 | 8.736 |
| 10 | 2,4-Dimetilo | -0.29 | 3.92 | -48.85 | -9.57 | 6.92 | -3.51 | 9.236 |
| 10 | 3-Carbamoilo | 0.65 | 1.64 | -27.94 | -9.48 | 6.60 | -3.26 | 8.736 |
| 10 | 3,4-Dimetilo | 0.76 | 1.62 | -28.95 | -9.55 | 6.64 | -3.24 | 8.72 |
| 10 | 3,5-Dimetilo | nd | 1.92 | -9.36 | -9.88 | 6.47 | -3.06 | 9.864 |
| 10 | 3-DEAC ^d | 0.11 | 1.91 | -10.64 | -9.97 | 6.72 | -3.32 | 7.932 |
| 10 | 4-Butenilo | 1.41 | 1.92 | -47.7 | -9.53 | 6.45 | -3.17 | 10.147 |
| 10 | No sustituida | 1.44 | 1.73 | -39.31 | -9.6 | 6.59 | -3.29 | 9.736 |
| 12 | 2,4,6-Trimetilo | 2.05 | 1.99 | -38.4 | -9.53 | 6.54 | -3.20 | 9.753 |
| 12 | 2,4-Dimetilo | 0.95 | 1.52 | -28.82 | -8.63 | 6.52 | -3.04 | 9.343 |
| 12 | 2,6-Dimetilo | 0.64 | 5.32 | -114.71 | -10.37 | 7.21 | -3.98 | 10.236 |
| 12 | 2-Amino | nd | 4.04 | 13.41 | -10.24 | 7.27 | -4.01 | 9.881 |
| 12 | 2-Carboxilo | 1.34 | 1.88 | -35.64 | -9.76 | 6.67 | -3.32 | 9.864 |
| 12 | 2-Ciano | 1.32 | 1.89 | -29.93 | -9.71 | 6.66 | -3.31 | 9.343 |
| 12 | 2-Etilo | 1.75 | 1.89 | -39.95 | -9.72 | 6.64 | -3.28 | 10.381 |
| 12 | 2-Metilo | 1.91 | 1.64 | -38.78 | -9.48 | 6.60 | -3.26 | 9.736 |
| 12 | 2-Propilo | 1.92 | 1.64 | -39.75 | -9.56 | 6.63 | -3.23 | 9.72 |
| 12 | 3,4-Dimetilo | 0.60 | 1.52 | -28.82 | -8.63 | 6.52 | -3.04 | 10.236 |
| 12 | 3,5-Dimetilo | 0.60 | 1.52 | -28.82 | -8.63 | 6.52 | -3.04 | 10.236 |
| 12 | 3-Amino | -0.17 | 3.01 | -111.09 | -10.32 | 7.04 | -3.65 | 10.236 |
| 12 | 3-Carbamoilo | nd | 5.08 | 26.17 | -10.22 | 7.14 | -3.74 | 9.864 |
| 12 | 3-Carboxilo | 0.05 | 1.75 | -15.29 | -9.69 | 6.66 | -3.32 | 10.864 |
| 12 | 3-Ciano | 0.63 | 5.47 | -61.14 | -9.31 | 7.04 | -3.76 | 10.236 |
| 12 | 3-Metilo | 0.05 | 1.75 | -15.29 | -9.69 | 6.66 | -3.32 | 10.864 |
| 12 | 4-Amino | 0.63 | 5.47 | -61.14 | -9.31 | 7.04 | -3.76 | 10.236 |
| 12 | 4-Butenilo | 0.09 | 5.29 | -114.71 | -10.37 | 7.22 | -3.99 | 10.236 |
| 12 | 4-Carbamoilo | nd | 6.63 | 10.85 | -10.22 | 7.23 | -4.02 | 9.864 |
| 12 | 4-Carboxilo | nd | 1.76 | -30.98 | -9.68 | 6.65 | -3.31 | 9.326 |

MD= Momento bipolar; PI = Potencial de Ionización; CI = Índice de conectividad; ^aExperimental, Kourai³⁵⁻⁴¹; ^bMopac en Sybyl 6.8; ^cCache 5.041; nd= no determinado; ^d3-*N,N*-dietilaminocarbanoilo.

Tabla No. 5continuación

| Compuesto | | Descriptores | | | | | | |
|-----------------------------|---|-----------------------|-----------------|----------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| Cola* No de Carbonos. | Cabeza* Sustituyente en la piridina | Log P ^a | MD ^b | ΔH_f^b | HOMO ^b | PI ^b | LUMO ^b | CI ^c |
| 12 | 4-Clano | 2.15 | 1.91 | -21.49 | -9.98 | 6.72 | -3.32 | 8.932 |
| 12 | 4-Metilo | 2.27 | 1.88 | -40.77 | -9.71 | 6.66 | -3.31 | 10.343 |
| 12 | No sustituida | 2.47 | 1.73 | -50.21 | -9.61 | 6.59 | -3.29 | 10.736 |
| 14 | 2-Metilo | 1.14 | 2.97 | -70.50 | -9.57 | 6.95 | -3.54 | 11.236 |
| 14 | 2,4-Dimetilo | 2.93 | 1.86 | -56.33 | -9.43 | 6.42 | -3.01 | 10.736 |
| 14 | 3-Carbamoilo | 2.9 | 1.66 | -50.55 | -9.56 | 6.62 | -3.21 | 10.72 |
| 14 | 3,4-Dimetilo | nd | 1.76 | -26.12 | -9.69 | 6.66 | -3.32 | 11.864 |
| 14 | 3,5-Dimetilo | 3.56 | 1.93 | -32.32 | -9.97 | 6.72 | -3.31 | 9.932 |
| 14 | 3-3-DEAC ^d | -0.77 | 1.91 | -8.21 | -9.72 | 6.65 | -3.29 | 7.343 |
| 14 | 4-Butenilo | -0.57 | 1.76 | -17.65 | -9.61 | 6.58 | -3.28 | 7.736 |
| 14 | No sustituida | -0.7 | 3.89 | -37.95 | -9.57 | 6.92 | -3.51 | 8.236 |
| 8 | 2-Mello | -0.41 | 1.65 | -17.09 | -9.47 | 6.59 | -3.25 | 7.736 |
| 8 | 2,4-Dimetilo | -0.17 | 1.61 | -18.11 | -9.55 | 6.64 | -3.24 | 7.720 |
| 8 | 3-Carbamoilo | nd | 1.75 | 6.44 | -9.68 | 6.66 | -3.32 | 8.236 |
| 8 | 3,4-Dimetilo | -0.08 | 1.91 | 0.19 | -9.97 | 6.72 | -3.32 | 6.932 |
| 8 | 3,5-Dimetilo | 2.48 | 1.92 | -62.41 | -9.72 | 6.65 | -3.29 | 12.343 |
| 8 | 3-Niquetamida | 3.73 | 1.78 | -71.86 | -9.61 | 6.58 | -3.27 | 12.736 |
| 8 | 4-Butenilo | 1.93 | 3.93 | -92.17 | -9.57 | 6.92 | -3.52 | 13.236 |
| 8 | No sustituida | 3.17 | 1.62 | -72.03 | -9.48 | 6.59 | -3.26 | 12.736 |
| 18 | 2-Metilo | 3.16 | 1.62 | -72.30 | -9.55 | 6.63 | -3.24 | 12.720 |
| 18 | 2,4-Dimetilo | nd | 1.76 | -47.79 | -9.69 | 6.66 | -3.32 | 13.864 |
| 18 | 3-Carbamoilo | 3.68 | 1.91 | -54.01 | -9.98 | 6.73 | -3.32 | 11.932 |
| 18 | 3,4-Dimetilo | nd | 6.63 | 10.85 | -10.22 | 7.23 | -4.02 | 9.864 |
| 18 | 3,5-Dimetilo | nd | 1.76 | -30.98 | -9.68 | 6.65 | -3.31 | 9.326 |
| 18 | 3-3-DEAC ^d | 2.15 | 1.91 | -21.49 | -9.98 | 6.72 | -3.32 | 8.932 |
| 18 | 4-Butenilo | 2.27 | 1.88 | -40.77 | -9.71 | 6.66 | -3.31 | 10.343 |

MD= Momento bipolar; PI = Potencial de Ionización; CI = Índice de conectividad; ^aExperimental, Kourai³⁵⁻⁴¹; ^bMopac en Sybyl 6.8; ^cCache 5.041; nd= no determinado; ^d3-*N,N*-dietilaminocarbonilo.

Tabla 6. Tabla de la matriz de correlación entre la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos de alquilpiridinio sobre diferentes bacterias y descriptores moleculares calculados

| | E.coli | B. subtilis | B. megaterium | S. aureus | Ps. aeruginosa | K. pneumoniae | LogP | Momento. Dipolar | DH _r | HOMO | Pot. Ion | LUMO |
|-----------------------|---------|-------------|---------------|-----------|----------------|---------------|---------|------------------|-----------------|---------|----------|--------|
| <i>E. coli</i> | 1.0000 | | | | | | | | | | | |
| <i>B. subtilis</i> | 0.9428 | 1.0000 | | | | | | | | | | |
| <i>B. megaterium</i> | 0.9114 | 0.9015 | 1.0000 | | | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 0.9068 | 0.9082 | 0.9224 | 1.0000 | | | | | | | | |
| <i>Ps. aeruginosa</i> | 0.8545 | 0.8377 | 0.7898 | 0.8209 | 1.0000 | | | | | | | |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0.9291 | 0.9205 | 0.9337 | 0.9359 | 0.8312 | 1.0000 | | | | | | |
| Log P | 0.8306 | 0.8294 | 0.8384 | 0.9269 | 0.7599 | 0.8638 | 1.0000 | | | | | |
| Momento. Dipolar | -0.3675 | -0.3141 | -0.2808 | -0.2217 | 0.0070 | -0.2919 | -0.3009 | 1.0000 | | | | |
| DH _r | -0.1099 | -0.1701 | -0.6272 | -0.6429 | -0.6177 | -0.5759 | -0.2780 | -0.1542 | 1.0000 | | | |
| HOMO | 0.2668 | 0.1715 | 0.1340 | -0.0410 | -0.0163 | -0.0016 | -0.0096 | -0.4383 | 0.0870 | 1.0000 | | |
| Potencial Ionización | -0.4028 | -0.3325 | -0.3145 | -0.1256 | 0.0042 | -0.2749 | -0.3016 | 0.8944 | -0.1634 | -0.6378 | 1.0000 | |
| LUMO | 0.3665 | 0.2728 | 0.2648 | 0.0936 | 0.0299 | 0.2433 | 0.2716 | -0.8993 | 0.1772 | 0.6628 | -0.9676 | 1.0000 |

TABLA 7. Ecuaciones 2D-QSAR de la actividad antimicrobiana y el logaritmo del coeficiente de partición (Log P) de los compuestos de alquilpiridinio

| Modelo | n ^a | r ^b | s ^c | eq. |
|---|----------------|----------------|----------------|-----|
| Regresión lineal | | | | |
| LogMIC _{Bsubtilis} = 0.634 (0.125) Log P - 4.115 (0.245) | 49 | 0.846 | 0.533 | 1 |
| LogMIC _{Ecoli} = 0.468 (0.087) Log P + 3.592 (0.171) | 49 | 0.874 | 0.347 | 2 |
| Regresión Bilineal | | | | |
| LogMIC _{Bsubtilis} = 1.131 (0.239) Log P - 1.150 (0.498) BILIN (Log P) + 3.934 (0.220) | 49 | 0.904 | 0.443 | 3 |
| Log P óptimo = 3.548, Log (beta) = -1.788 | | | | |
| LogMIC _{Ecoli} = 0.825 (0.180) Log P - 0.759 (0.349) BILIN (Log P) + 3.475 (0.156) | 49 | 0.913 | 0.298 | 4 |
| Log(beta) = -1.651 | | | | |
| Regresión Parabólica | | | | |
| LogMIC _{Bsubtilis} = 1.189 (0.276) Log P - 0.179 (0.082) (Log P) ² + 3.986 (0.216) | 49 | 0.882 | 0.482 | 5 |
| Log P óptimo = 3.322 | | | | |
| LogMIC _{Ecoli} = 0.843 (0.195) Log P - 0.121(0.058) (Log P) ² + 3.505 (0.153) | 49 | 0.910 | 0.298 | 6 |
| Log P óptimo = 3.484 | | | | |

n^a numero de compuestos, r^b coeficiente de correlación s^c desviación estándar

En las ecuaciones de la **Tabla 7** se puede observar que la correlación es muy alta utilizando el modelo bilineal. Los datos del modelo lineal (pendiente e intercepto al origen) mostraron que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los compuestos de alquilpiridinio que las bacterias Gram negativas, como lo habían notado anteriormente Lien y col.¹⁴ En general, todos los modelos son relativamente buenos; si bien r no es 0.99, todos los métodos presentaron un r mayor a 0.85, que es considerado significativo para una ecuación 2D-QSAR con 49 compuestos. Estas ecuaciones se pueden utilizar para predecir la actividad de los compuestos diseñados.

Sin embargo, una de las desventajas del QSAR clásico en este tipo de compuestos (alquilpiridinio) es el de encontrar los valores de Log P, ya que su cálculo a través de algoritmos computacionales no es exacto, debido a la variación de la carga positiva en el nitrógeno. Los valores de Log P que se presentan en las **Tablas 1 y 5** son experimentales. Si se quisiera predecir la actividad de nuevos compuestos sería necesario, primero, sintetizar los compuestos, y luego, determinar el Log P. Esto implicaría no realizar un diseño racional, uno de los objetivos principales de esta tesis. Para resolver este escollo, se procedió al estudio de las relaciones cuantitativas estructura actividad en tres dimensiones,³¹ en el cual, los descriptores se generan sobre la estructura tridimensional de la compuestos.

5.1.2 Estudios de la relación cuantitativa estructura-actividad tridimensional (3D-QSAR)

Los estudios (3D-QSAR) se hicieron con el módulo (CoMFA)²⁰ en Sybyl 6.8. Para hacer esto, se utilizó el comando Macht de Sybyl para alinear las moléculas previamente optimizadas. Para el alineamiento se tomó como modelo la conformación de mínima energía del CPC (primeros 3 carbonos de la cadena lineal y el nitrógeno cuaternario). Con todas las moléculas alineadas se construyó la base de datos para determinar los contornos de CoMFA. Primero se procedió a evaluar el número de componentes del sistema, así como si el modelo era estadísticamente significativo.

Tabla 8. Análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) entre la actividad antimicrobiana de los compuestos de alquilpiridinio y los campos electroestáticos y estéricos de CoMFA

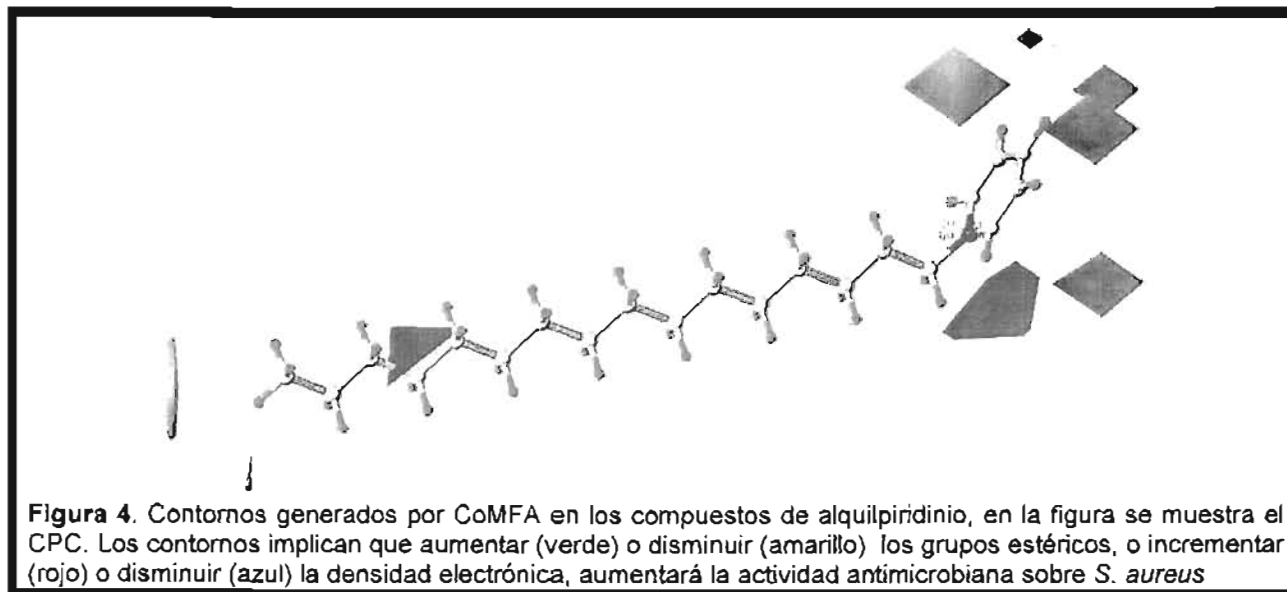
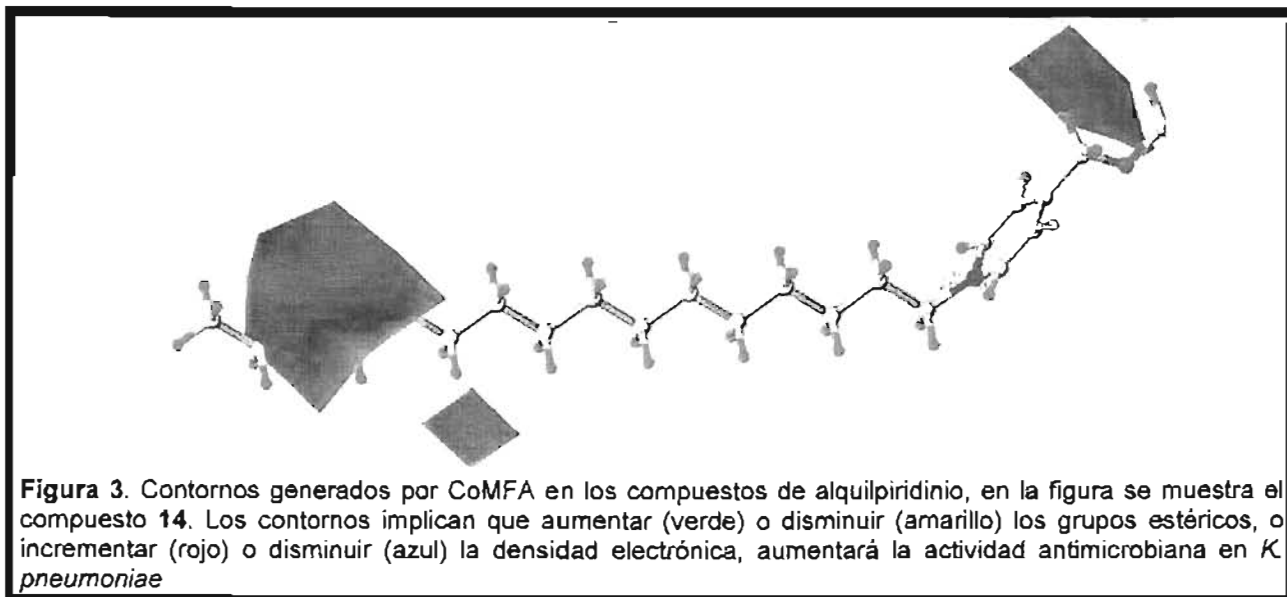
| Bacteria | q ² | No. comp. | r ² | S_ERR* | F* | n |
|----------------------|----------------|-----------|----------------|--------|--------|----|
| <i>P. aeruginosa</i> | 0.811 | 5 | 0.93 | 0.154 | 79.77 | 36 |
| <i>E coli</i> | 0.602 | 2 | 0.707 | 0.394 | 61.54 | 61 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0.933 | 9 | 0.981 | 0.145 | 145.78 | 42 |
| <i>B. subtilis</i> | 0.635 | 2 | 0.756 | 0.502 | 74.33 | 55 |
| <i>B. megaterium</i> | 0.835 | 4 | 0.927 | 0.268 | 97.70 | 36 |
| <i>S. aureus</i> | 0.973 | 6 | 0.994 | 0.089 | 739.68 | 48 |

*S_ERR es el error estándar. F es el valor estadístico de F ($\alpha=0.05$)

Para ello se utilizó el método de mínimos cuadrados parciales de validación cruzada dejando uno afuera (PLS, cross validated, Leave –one-out) y enseguida se evaluó la linealidad del sistema con PLS, pero ahora sin validación (PLS non validated), todos los datos obtenidos se presentan en la **Tabla 8**.

Las ecuaciones que se obtuvieron son estadísticamente significativas, ya que la correlación validada es alta ($q^2 > 0.6$, que significa que el modelo tiene una probabilidad mayor al 60%), y la linealidad es buena en algunos casos ($r^2 = 0.701$, y $r = 0.84$, para *E. coli*) y en otros es excelente ($r^2 = 0.92$, y $r = 0.96$, para *B. megaterium*). Las **Figuras 3 y 4** presentan los contornos estéricos y electrónicos generados por CoMFA, para una bacteria Gram negativa (*K. pneumoniae*) y una Gram positiva (*S. aureus*).

En las **Figuras 3 y 4** se puede ver que los contornos verdes y amarillos (indicando los campos estéricos) se encuentran en la cadena alquílica, mientras que los contornos azules y rojo (indicando los campos electrónicos) son predominantes en el anillo de piridina. La actividad se incrementa cuando se aumenta la cadena alquílica a 14-16 átomos (contorno verde).



Mientras que la actividad disminuye cuando el tamaño es mayor a 18 carbonos (contorno amarillo en el modelo de *K. pneumoniae*), concordando con lo que se reporta en la literatura.³²⁻⁴⁰ Otra de las ventajas de CoMFA es que puede predecir la actividad de los compuestos antes de ser sintetizados, ayudando en el diseño de nuevas moléculas.

Para ello sólo se necesita construir (o modificar una estructura similar, si el cambio no es muy drástico) la molécula, alinearla y calcular las cargas de todos los átomos presentes en la molécula.

Basándose en estos contornos se diseñaron compuestos con hidroximetilo, metoxi, acetilo y metilo en diferentes posiciones, los cuales se modelaron, alinearon y su actividad fue predicha empleando los diferentes modelos creados por CoMFA. Sólo aquellos compuestos que resultaron más activos, y que en el papel presentaban mayor factibilidad sintética, se consideraron para su síntesis.

5.2 Síntesis de los compuestos:

Para obtener las moléculas diseñadas se consideró en un principio emplear el método empleado en la literatura^{32,35} y que se presenta en el **Esquema 1**. En un principio se realizaron reacciones sin disolvente, como se manejaba en la literatura^{32,34-37} pero después de cierto tiempo (10 días) sólo se obtenían trazas de producto.

Al mismo tiempo, para el desarrollo de la técnica de HPLC para la determinación del cloruro de cetilpiridinio en manzanas, fue necesario sintetizar el cloruro de octadecilpiridinio (**20**). Se siguió el método de Devinski³⁸ con lo que se obtuvo **20** en un 50% de rendimiento y con una pureza excelente para su uso en HPLC.

Con este antecedente, la reacción en general parecía simple, sin embargo, con el poco rendimiento y el tiempo de síntesis tan largo, fue necesario el optimizar las condiciones de reacción para la preparación de los compuestos. Las variables consideradas para su optimización fueron el disolvente (con lo cual se logró obtener el compuesto **12** en los primeros tres semestres), la temperatura, la presión, el reactivo alquilante y por último el aislamiento de los compuestos.

Aun con estas modificaciones, sólo fue posible obtener los compuestos en un rendimiento máximo del 20%, pero debido a la accesibilidad de las materias primas se logró obtener los compuestos en cantidades necesarias para la actividad antimicrobiana y el nivel residual. A continuación se describe la optimización de las variables en las reacciones efectuadas

A) Disolvente, y la temperatura

Katritzky⁶⁰ sugirió el uso de disolventes de alta polaridad, como metanol y acetonitrilo, para estabilizar el producto de sustitución nucleofílica, el último fue empleado por Devisnky³⁸ para la síntesis de derivados de alquilpiridinio sustituidos con dietilcarbamoilo en posición 3. Tomando en cuenta este hecho se utilizaron disolventes polares, considerando primero la constante dieléctrica como parámetro, y en segundo término, el punto de ebullición.

La reacción se realizó empleando cantidades equimoleculares de reactivos en atmósfera de nitrógeno, al terminar, se retiró el disolvente mediante el rotaevaporador y la mezcla se vertió sobre éter. Así, para el compuesto 3, la **Tabla 9** muestra los resultados obtenidos en la optimización de la reacción. Como se puede observar, la reacción se llevó mejor en disolvente, de otra forma se quema (productos negros), y en general fue mejor emplear un disolvente con un punto de ebullición alto (comparar los resultados de los diferentes alcoholes). Pero al mismo tiempo, se favorece la formación del producto secundario (reacción de eliminación) al aumentar la temperatura por encima de 140 °C. En el caso particular del compuesto 3 se decidió emplear el alcohol isoamílico como disolvente, por su alto punto de ebullición.

Tabla 9. Optimización de la reacción por cambio de disolvente en la preparación del cloruro de 4-acetil-1-hexadecilpiridinio (3)^a

| Disolvente | Condiciones | Resultados | Ref. |
|------------------------------------|--|--|------|
| Sin disolvente | | Una pequeña fracción a las 5 h, después de 7 días sólo 2% de rendimiento, el producto obtenido fue negro con tres manchas en CCF. | 32 |
| Sin disolvente | 140 °C | La reacción terminó en dos días, pero presentó tres productos principales, y la mezcla fue café oscuro. | 32 |
| CH ₃ CN | Reflujo | 0.2 % g después de 8 días. | 38 |
| CH ₃ OH | Reflujo | Reacción lenta, sólo un 0.15% después de 9 días. | 41 |
| CH ₃ CH ₂ OH | Reflujo | Prácticamente no hubo reacción a los 7 días. | 32 |
| BuOH | Reflujo | La reacción terminó a los dos días, pero al igual que sin solvente, presentó tres manchas. | |
| BuOH | Reflujo por 36 horas, precipitación con éter | Sólo 5% de avance de la reacción a las 5 horas, con un solo producto, a las 24 horas el producto oscureció y el producto de eliminación se incrementó. | |
| Alcohol Isoamílico | Reflujo, 129-130 °C | 10 % de reacción a las 12 horas con una sola mancha, a las 24 horas tomó café. Sólo dos manchas en CCF del producto crudo final. | |

^aLa reacción se llevó a cabo con cantidades equimoleculares de reactivos, en atmósfera de nitrógeno.

Cuando se empleó este disolvente para preparar el compuesto **11**, la reacción se tornó oscura después de 2 horas, y a las 18 h había un 90% del producto de eliminación al realizar la CCF. Por lo que se decidió emplear una menor temperatura y al mismo tiempo, tres disolventes: acetonitrilo, monoglima y etanol.

Los resultados se presentan en la **Tabla 10**. Con estos resultados se decidió emplear etanol como disolvente para la preparación del compuesto **11**, a pesar del bajísimo rendimiento y de la presencia del producto secundario.

Tabla 10. Optimización de la reacción por cambio de disolvente en la preparación del cloruro de 4-acetil-1-dodecilpiridinio (11)^a

| Disolvente | Condiciones | Resultados | Ref. |
|------------------------------------|-------------|--|------|
| CH ₃ CN | 75-80 °C | Solución oscura al primer día, después de 6 días la reacción no terminó. | 38 |
| Monoglima | 75-80 °C | La solución se tornó oscura al colocar el disolvente, después de 7 días, la reacción no terminó, el producto presentó tres manchas en CCF. | |
| CH ₃ CH ₂ OH | 75-80 °C | La reacción se oscureció al segundo día, y al tercer día se detuvo por la aparición de un tercer producto. Rendimiento del 10% de un crudo con 2 productos principales. | 32 |

^aLa reacción se llevó a cabo con cantidades equimoleculares de reactivos, en atmósfera de nitrógeno.

De manera análoga se utilizó el acetonitrilo para la síntesis del compuesto 12. Después de 216 h de reacción, su purificación se logró mediante cromatografía en columna normal dando 20% de rendimiento. Los demás compuestos presentaron un rendimiento sumamente bajo, después de casi tres semanas de reacción. Por lo que sólo este compuesto fue evaluado en la primera fase.

En general, para los compuestos con cadenas de 12 carbonos se empleó el acetonitrilo como disolvente y una temperatura menor a 100 °C, salvo para el compuesto 11. Para el caso de los compuestos con cadenas de 16 carbonos fue necesario incrementar la temperatura, y por ende cambiar el disolvente. Al inicio del proyecto funcionó bien el alcohol isoamílico (punto de ebullición 132 °C), ya que disolvía perfectamente al halogenuro de alquilo, pero fue necesario cambiarlo cuando se empleo el tosilato de hexadecilo, reactivo que se solubilizó mejor en acetonitrilo caliente, y la temperatura se ajustó al utilizar un reactor Parr.

b) Presión

Por otra parte, fue necesario utilizar presión para llevar a cabo la reacción de los derivados con 16 carbonos, ya que a presión normal se incrementaba el tiempo de reacción. En las primeras síntesis de este tipo de compuestos sólo se realizaron con presión atmosférica

Pero al utilizar grupos electroattractores fue necesario incrementar la temperatura y al mismo tiempo emplear presión, la cual se generaba internamente o bien se inyectaba al reactor (adición de una atmósfera de nitrógeno). Esta última variable permitió incrementar el punto de ebullición de disolventes polares como el acetonitrilo o el alcohol, y por otro lado disminuyó el volumen en el estado de transición,⁶¹ acelerando de esta forma el avance de la reacción.

Para optimizar esta variable se realizaron diferentes reacciones, en un reactor Parr, con una mezcla equimolecular de reactivos en acetonitrilo como disolvente, con diferentes condiciones de presión, a una temperatura de 130 °C. La presión de trabajo es dependiente del reactor utilizado y del regulador del tanque del gas a inyectar. Al inicio del proyecto (estancia en UAMS), sólo se logró emplear un regulador con 100 psi. Al realizar la segunda fase, se empleó un regulador de 200 psi. Los resultados para la síntesis del compuesto **3** se presentan en la **Tabla No. 11**

Como se puede observar, aunque el porcentaje fue bajo, la presión sirvió para que la mezcla no se tornara oscura, y por otra parte, para obtener un ligero aumento del rendimiento de la reacción. Con esto fue posible tener a los compuestos con un rendimiento al 20%, pero que aún presentaban el producto secundario de eliminación.

Tabla 11. Optimización de la reacción por cambio de la presión en la síntesis del compuesto 3

| Disolvente | Condiciones | Resultados | Ref. |
|--------------------|-----------------|---|------|
| CH ₃ CN | 130 °C, PN | Solución oscura al primer día, incompleta después de 6 días. | |
| CH ₃ CN | 130 °C, 50 psi | La solución se tornó oscura al colocar el disolvente, incompleta después de 7 días, el producto presentó tres manchas en CCF. | |
| CH ₃ CN | 130 °C, 100 psi | La reacción se oscureció al segundo día, y al tercero se detuvo por la aparición de un tercer producto. Rendimiento del 10% de un sólido con 2 productos principales. | |
| CH ₃ CN | 130 °C, 200 psi | La reacción se oscureció al segundo día, y al tercero se detuvo por la aparición de un tercer producto. Rendimiento del 13% de un sólido con 2 productos principales. | |

c) El reactivo alquilante

Al inicio del proyecto se consideró obtener derivados con el ión cloruro como contraión, y que éste fuera equivalente al CPC. Es decir, si el compuesto es un derivado del cloruro de cetilpiridinio (p.e. con un acetilo en posición 4) su comparación con el líder llevaría a una mejor aceptación por parte de los consumidores y por otra parte de las agencias reguladoras (FDA, principalmente).

Para obtener estos derivados era necesario hacer reaccionar al cloruro de alquilo con el número de carbonos necesarios, 12 y 16 respectivamente. Esto conducía a dos salvedades:

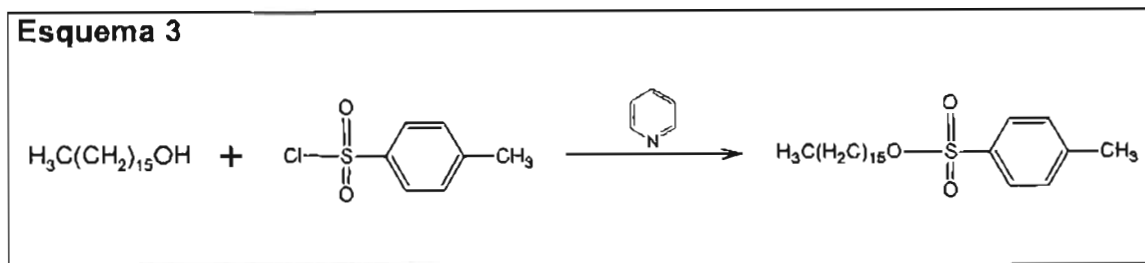
1) Poca reactividad de los cloruros frente a piridinas poco reactivas (desactivadas y orto sustituidas). En general, en las reacciones de alquilación de piridinas, la reactividad de los halogenuros de alquilo es I>Br>Cl.⁴³

2) Obtener el halogenuro de alquilo respectivo. Las empresas de reactivos químicos sólo venden el cloruro de hexadecilo, o bien, el bromuro de dodecilo.

Es importante resaltar que el contraión no está implicado en la actividad antimicrobiana,³² pero sí en la solubilidad del compuesto. Considerando esto, se decidió utilizar el bromuro de dodecilo para la obtención de los compuestos con cadenas de 12 carbonos.

Para los compuestos con 16 carbonos se decidió utilizar el cloruro de cetilo, lo que permitió sintetizar los compuestos **3** y **14**, pero su aislamiento fue difícil. En los primeros intentos se utilizó esta estrategia para sintetizar el compuesto **10**, pero debido al impedimento estérico en la materia prima casi no había producto después de 3 semanas. Se intentaron otras estrategias: incrementar la temperatura, utilizar diferentes disolventes, inyectar más presión y utilizar diferentes catalizadores (NaI, KI), sin lograr obtener el compuesto deseado.

Cuando se cambió el grupo saliente cloruro, por el tosilato (preparado en el laboratorio según la reacción del **Esquema 3**), se logró obtener el compuesto **10** con un buen rendimiento. Aplicando después la técnica de cromatografía en columna rápida, se logró cambiar el contraión tosilato por el ión bromuro.



d) Aislamiento de los productos finales

En la literatura se describen tres métodos para aislar los compuestos de la mezcla de reacción:³²

1.- Lavado del sólido obtenido con éter, recristalización empleando dos o tres volúmenes del disolvente en exceso, seguido de enfriamiento extremo para precipitar el compuesto.

2.- Decoloración de la mezcla de reacción con carbón activado empleando metanol como disolvente, seguido de recristalizaciones hasta obtener el compuesto blanco.

3.- Cuando el producto crudo de reacción muestra además el producto de eliminación, la mezcla se disuelve en metanol y se adicionan varias gotas de fenoftaleína. La solución se titula con hidróxido de sodio hasta obtener un color oscuro y después se decolora con carbón activado.

En todas las reacciones se presentó el producto de eliminación, por lo que se procedió a utilizar la técnica número tres, pero al analizar lo obtenido por CCF, sólo se encontró la materia de prima y varias manchas que no correspondían al producto esperado. Se intentaron las otras dos técnicas, en particular la más eficiente fue la decoloración con carbono seguido de cristalizaciones sucesivas, pero el compuesto enseguida se tornaba colorido, inclusive si se realizaba en atmósfera de nitrógeno.

Otra metodología muy empleada en el aislamiento de productos orgánicos es la cromatografía en columna.⁶²

Desgraciadamente los compuestos de alquilpiridinio al ser iones positivos se unen fuertemente al gel de sílice, por lo que la elusión se hace con disolventes muy polares, generalmente mezclas de cloroformo y metanol. Una estrategia implementada para evitar esta unión es la desactivación de la gel de sílice con agua.

Esta estrategia permitió el aislamiento del compuesto **12**, después de 3 días de elusión lenta y en un rendimiento del 20%. Después de tres columnas se logró obtener este compuesto en cantidad suficiente para realizar las pruebas de actividad antimicrobiana y el nivel residual en manzanas.

Sin embargo, esta técnica no funcionó para aislar el compuesto **3**, ya que durante la elusión la columna se tornó café y fue imposible obtenerlo después de 50 fracciones.

Una revisión en la literatura sobre este problema llevó a una publicación para el aislamiento de compuestos de alquilpiridinio.⁶³ En este artículo se describe el aislamiento de los compuestos mediante la desactivación de la gel de sílice con NaBr metanólico, seguido de una elusión mediante cromatografía en columna rápida (flash). Uno de los inconvenientes de esta técnica es el intercambio del contraión de la molécula aislada por el ión bromuro. Si se introduce, por ejemplo, cloruro de 1-dodecilpiridinio, después de la elusión se obtiene el bromuro de 1-dodecilpiridinio.

Por lo anterior, en un principio había una pequeña duda de emplear el método, ya que se necesitaba obtener el cloruro de alquilpiridinio y que éste fuera equivalente al CPC. Pero al cambiar el tosilato por el halogenuro de alquilo, el método funcionó muy bien, ya que ayudó en el cambio del contra ión para obtener el bromuro de alquilpiridinio a partir del tosilato de alquilpiridinio.

Una vez optimizadas las variables de la reacción, se procedió a la síntesis de los compuestos propuestos. La **Tabla 12** presenta los datos de síntesis, y la **Tabla 13** las constantes físicas determinadas para cada molécula. Todos los compuestos se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas (**Tabla 14**).

Tabla 12. Condiciones de reacción utilizadas en la preparación de los compuestos de alquilpiridinio

| Compuesto | Disolvente | Tempertura (°C) | Presión (psi) | Tiempo (h) |
|-----------|---------------|-----------------|-----------------|------------|
| 3 | Acetonitrilo | 130 | 150 | 26 |
| 10 | Acetonitrilo | 132 | 150 | 192 |
| 11 | Etanol | 100 | 50 | 27 |
| 12 | Acetonitrilo | 83 | PN ^a | 336 |
| 14 | Acetonitrilo. | 130 | 150 | 26 |
| 18 | Acetonitrilo | 132 | 150 | 192 |
| 19 | Etanol | 100 | 50 | 27 |

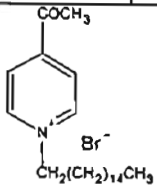
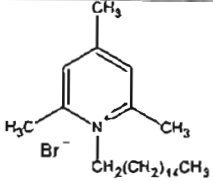
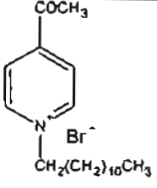
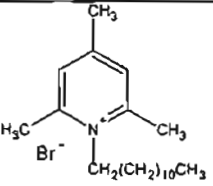
^aPN = presión normal

Tabla 13. Purificación, constantes físicas y rendimientos de los compuestos de alquilpiridinio sintetizados

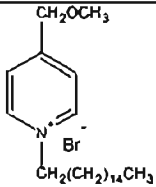
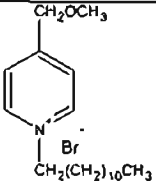
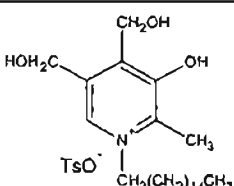
| Compuesto | Purificación | p.f. (°C) | Rf | Rend. (%) |
|-----------------|---|-----------|-------------------|-----------|
| 3 | FCC ^a | 99-100 | 0.72 ^b | 70 |
| 10 | FCC ^a + recrist. de acetona/éter | 106-107 | 0.35 | 35 |
| 11 | Etanol/éter | 82-83 | 0.12 | 37 |
| 12 ^b | Etanol/acetato de etilo + FCC ^a | 92-94 | 0.51 ^b | 20 |
| 14 | FCC ^b | 99-100 | 0.72 ^b | 70 |
| 18 | FCC ^a +cetona/éter | 106-107 | 0.35 | 35 |
| 19 | Etanol/éter | 82-83 | 0.12 | 37 |

^aFCC Cromatografía en columna rápida, ^bReferencia 33

Tabla 14. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos preparados

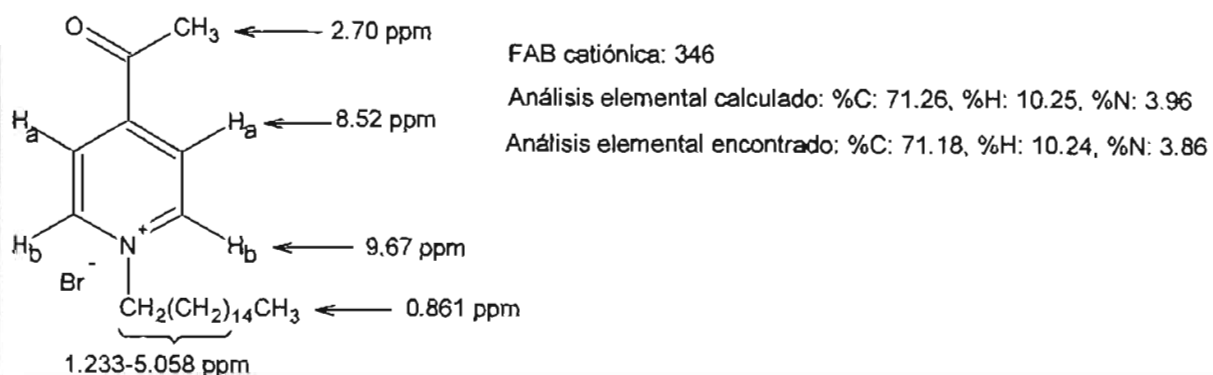
| Compuesto | Señales de IR, RMN ¹ H y Masas |
|--|--|
|  <p>3 Bromuro de 4-acetil-1-hexadecilpiridinio</p> | <p>RMN ¹H (No. 01): 9.67 (dd, 2H, J = 6 Hz) 8.52 (dd, 2H, J = 6 Hz), 5.058 (t, 2H, +N-CH₂), 2.80 (s, 3H, CH₃-C=O) 2.05 (m, 2H, +N-CH₂-CH₂), 1.233 (m, 26H, H en la cadena), 0.861 (t, 3H, CH₃ de la cadena)</p> <p>Masas (No. 02): M⁺ de 346, (Fab catiónica)</p> <p>Análisis elemental: calculado %C: 71.26, %H: 10.25, %N: 3.96; encontrado: %C: 71.18, %H, 10.24, %N: 3.86).</p> |
|  <p>10 Bromuro de 1-hexadecil-2,4,6-trimetilpiridinio</p> | <p>RMN ¹H (No. 03): 7.6 (s, 2H, H arom), 4.6 (t, 2H, ⁺N-CH₂), 2.95 (s, 6H, CH₃ arom <i>orto</i>), 2.55 (s, 3H, CH₃ arom <i>para</i>), 1.76 (sext, 1H, ⁺N-CH₂-CH₂), 1.53 (sext, 2H, ⁺N-CH₂-CH₂-CH₂), 1.4-1.2 (m, 22H, CH₂ cadena), 0.88 (s, 3H, CH₃).</p> <p>RMN ¹³C (No. 04): 157.45 (C_{2,6} piridina), 153.96 (C₄ piridina), 128.93 (C_{3,5} piridina), 53.45 (⁺N-C), 31.80 (C₂ cadena), 29.55-29.45 (C₃₋₇), 29.13 (C₈ cadena), 28.95 (C₉ cadena), 29.361 (C₉ cadena), 29.27 (C₁₁ y ₁₀ cadena), 28.00 (C₁₂ cadena), 28.79 (C₁₃ cadena), 26.63 (C₁₄ cadena), 22.57 (C₁₅ cadena), 21.68 (CH₃ <i>orto</i> en anillo de piridina), 21.59 (CH₃ <i>para</i> en anillo de piridina) y 14.01 (C₁₈ cadena).</p> <p>Análisis elemental: calculado: %C: 67.58, %H: 10.40, %N: 3.28; encontrado %C: 67.92, %H: 10.89, %N: 3.25</p> |
|  <p>11 Bromuro de 4-acetil-1-dodecilpiridinio</p> | <p>RMN ¹H (No. 05): 9.7 (dd, 2H arom, H_{orto} piridina, J = 6 hz), 8.60 (dd, 2H arom, H_{meta}, J = 6 Hz.), 5.0 (t, 2H, ⁺N-CH₂), 2.8 (s, 3H, CH₃ grupo cetona), 2.01 (m, 2H, ⁺N-CH₂-CH₂), 1.13 (m, 10H, CH₂ cadena), 0.92 (s, 3H, CH₃).</p> <p>Análisis elemental: calculado: %C: 61.62, %H: 8.71, N: 3.78; encontrado: %C: 61.68, %H: 8.70, %N: 3.99</p> |
|  <p>12 Bromuro de 1-dodecil-2,4,6-trimetilpiridinio</p> | <p>RMN ¹H (No. 06): 7.6 (s, 2H, H-arom), 4.6 (m, 2H, ⁺N-CH₂), 2.95 (s, 6H, CH₃ arom <i>orto</i>), 2.55 (s, 3H, CH₃ arom <i>para</i>), 1.98 (s, 1H, ⁺N-CH₂-CH₂), 1.78 (m, 2H, ⁺N-CH₂-CH₂-CH₂), 1.45 (m, 2H, ⁺N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂) 1.13 (m, 14H, CH₂ cadena), 0.92 (s, 3H, CH₃).</p> <p>RMN ¹³C (No. 7): 157 (C_{2,6} piridina), 154 (C₄ piridina), 129.03 (C_{3,5} piridina), 53.55 (⁺N-C), 31.72 (C₂ cadena), 29.40 (C₁₀ cadena), 29.28 (C_{5,6} cadena), 29.21 (C₇ cadena), 29.13 (C₈ cadena), 28.95 (C₉ cadena), 28.73 (C₄ cadena), 26.67 (CH₃ <i>orto</i> en anillo de piridina), 22.49 (C₃ cadena), 21.64 (C₁₁ cadena), 21.49 (CH₃ <i>para</i> en anillo de piridina) y 13.91 (C₁₂ cadena).</p> <p>Análisis elemental: calculado: %C: 64.83, %H: 9.80, %N: 3.78; encontrado %C: 64.63, %H: 10.13, %N: 4.00</p> |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|--|--|
|  <p style="text-align: center;">14 Bromuro de 1-hexadecil-4-(metoximetil)piridinio</p> | <p>RMN ¹H (No. 8): 9.38 (d, 2H, H arom, 2,6-piridina), 8.06 (d, 2H, H arom, 3,5-piridina), 4.97 (t, 2H, *N-CH₂), 4.75 (s, 2H, CH₂-O), 3.53 (s, 3H, CH₃-O), 2.02 (sext, 2H, *N-CH₂-CH₂), 1.4-1.2 (m, 26H, CH₂ cadena), 0.875 (s, 3H, CH₃).</p> |
|  <p style="text-align: center;">18 Bromuro de 1-dodecil-4-(metoximetil)piridinio</p> | <p>RMN ¹H (No. 9): 9.46 (d, 2H, H arom, 2,6-piridina), 8.05 (d, 2H, H arom, 3,5-piridina), 4.97 (t, 2H, *N-CH₂), 4.75 (s, 2H, CH₂-O), 3.53 (s, 3H, CH₃-O), 2.02 (sext, 2H, *N-CH₂-CH₂), 1.4-1.2 (m, 18H, CH₂ cadena), 0.875 (s, 3H, CH₃)</p> <p>Masas (No. 10): M⁺ de 292, (Fab catiónica)</p> <p>Análisis elemental: calculado: %C: 61.28, %H: 9.20, %N: 3.76; encontrado %C: 60.50, %H: 9.32, %N: 3.67</p> |
|  <p style="text-align: center;">19 Tosilato de 1-hexadecil-3-hidroxi-4,5-bis(hidroximetil)-2-metilpiridinio</p> | <p>RMN ¹H (No. 11): 8.06 (s, 1H, H arom, H piridino), 7.45 (d, 2H, H arom, orto al sulfonato, del TsO⁻), 7.05 (d, 2H, H arom, orto al metilo, del TsO⁻), 5.74 (s, 1H, HO-piridoxina), 4.798 (s, 2H, Ar-CH₂-O piridoxina), 4.67 (s, 2H, Ar-CH₂-O piridoxina), 4.52 (t, 2H, *N-CH₂), 2.617 (s, 3H, CH₃ arom, TsO⁻), 2.271 (s, 3H, CH₃-arom, piridoxina), 1.760 (sext, 2H, *N-CH₂-CH₂), 1.284-1.20 (m, 26H, CH₂ cadena), 0.838 (s, 3H, CH₃)</p> <p>Masas (No. 12): M⁺ de 394 (FAB⁺),</p> <p>Análisis elemental: calculado: %C: 65.81, %H: 9.09, %N: 2.48; encontrado %C: 65.68, %H: 9.14, %N: 2.52,</p> |

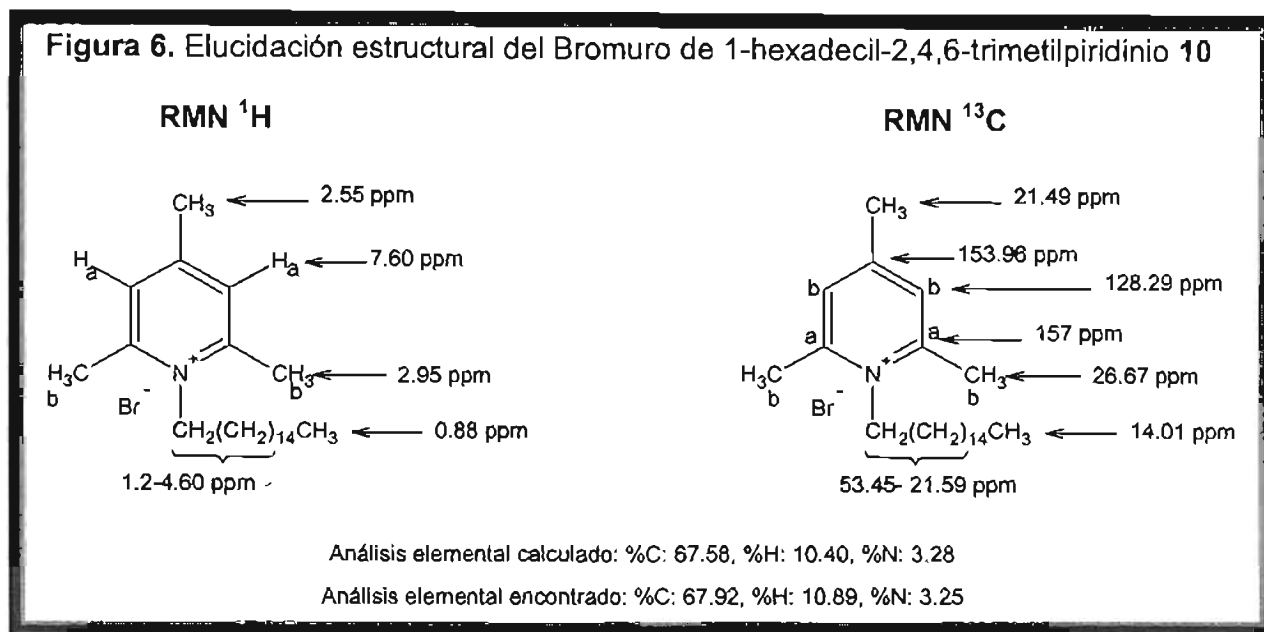
Así, la elucidación estructural del compuesto **3** se basó en los datos del espectro de RMN ¹H (**No. 1**) en el cual se aprecia la señal en 2.70 ppm del CH₃ del grupo acetilo en la posición 4 del anillo, lo que se confirma por los dos dobletes a 8.52 y 9.67 ppm, característicos de un patrón de sustitución A₂B₂ que concuerda para una sal de piridinio 1,4 disustituida, aunadas a estas señales también se aprecian las del CH₃ alifático en 0.861 ppm y el resto de la cadena, 30 H, entre 1.233 y 5.058 ppm. El espectro de masas por FAB catiónica (**No. 2**) es coincidente con la masa esperada del catión; el análisis elemental encontrado también concuerda con el calculado para este compuesto. Estas deducciones se ilustran en la **Figura 5** siguiente.

Figura 5. Elucidación estructural del Bromuro de 4-acetil-1-hexadecilpiridinio 3

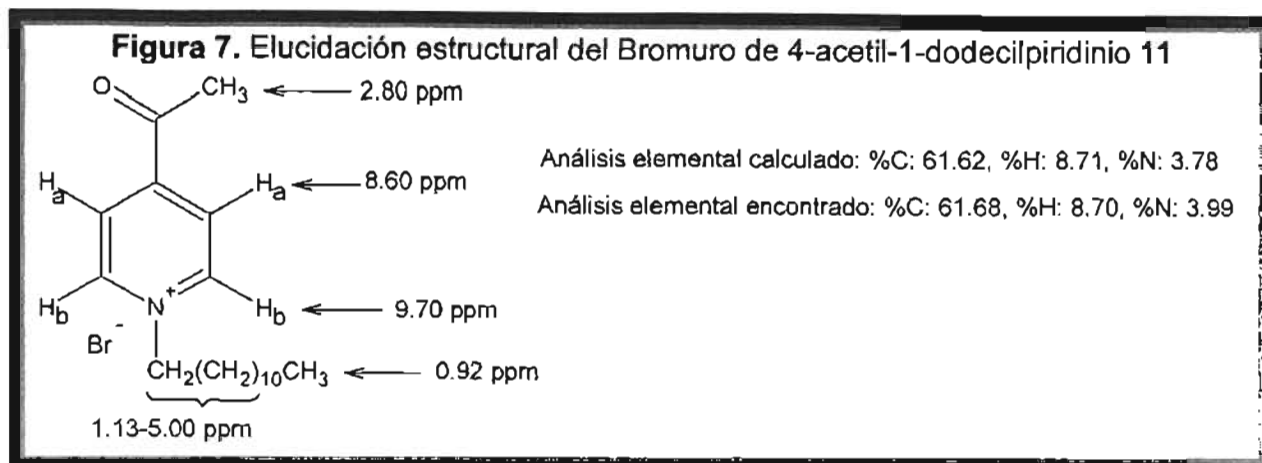


La estructura del compuesto **10** se estableció primero de su espectro de RMN ^1H (**No 03**) que presentó una señal simple en 7.6 ppm que integró para los dos hidrógenos característicos de un compuesto de alquilpiridinio 1,2,4,6 tetrasustituido simétrico, además de dos señales, una en 2.95 ppm para seis hidrógenos correspondientes a los dos metilos químicamente indistinguibles en las posiciones 2,6, y otra, en 2.55 ppm correspondiente al metilo en 4 del anillo de piridinio. La señal más importante fue un triplete en 4.6 ppm que integró para dos hidrógenos, asignado al carbono unido al nitrógeno positivo, mientras que las señales de los hidrógenos restantes (31 H) entre 1.76 -0.88 ppm. Su espectro de RMN ^{13}C (**No. 04**) mostró desplazamientos químicos en 157.45 ppm correspondientes a dos carbonos asignados a la posición 2 y 6 del anillo de piridinio, en 153.96 para el carbono en *para*, y en 128.93 ppm para los carbonos en *meta*. La señal en 53.45 ppm se asignó al carbono unido al nitrógeno positivo, mientras que los metilos aromáticos en *orto* se presentaron como una señal en 21.68. El metilo aromático en *para* se desplazó a 21.59 ppm y el alifático terminal de la cadena en 14.01 ppm.

Los carbonos restantes se desplazaron entre 53.46-22.57. Por otra parte, el análisis elemental correspondió al esperado. La **Figura 6** resume la elucidación estructural realizada.

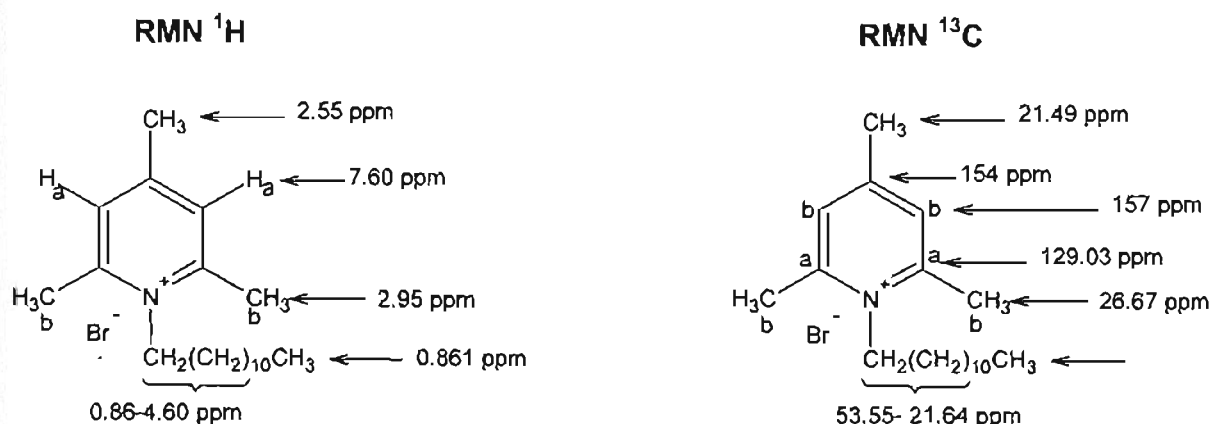


De igual manera a la elucidación estructural de su análogo de 16 carbonos, el espectro de RMN ¹H (**No. 05**) del compuesto **11** presentó la señal en 2.80 ppm del CH₃ del grupo acetilo en la posición 4 del anillo, y los dos dobletes a 8.60 y 9.70 ppm, característicos de un patrón de sustitución A₂B₂ que concuerda para una sal de piridinio 1,4 disustituida. En el mismo espectro también se aprecian las señales del CH₃ alifático en 0.92 ppm y el resto de la cadena, 24 H, entre 1.13 y 5.00 ppm. El análisis elemental encontrado también concuerda con el calculado para este compuesto. Estas deducciones se ilustran en la **Figura 7** siguiente.



La estructura del compuesto **12** se estableció por las señales casi idénticas al de su análogo de 16 carbonos. Su espectro de RMN ^1H (**No 06**) presentó en 7.6 ppm una señal simple que integró para los dos hidrógenos característicos de un compuesto de alquilpiridinio 1,2,4,6 tetrasustituido simétrico, la señal en 2.95 ppm para seis hidrógenos correspondientes a los dos metilos químicamente indistinguibles en *orto*, y en 2.55 ppm correspondiente al metilo en *para* del anillo de piridinio. En 4.6 ppm una señal que integró para dos hidrógenos, asignado al carbono unido al nitrógeno positivo, mientras que las señales de los hidrógenos restantes (23 H) entre 1.76 -0.88 ppm. Su espectro de RMN ^{13}C (**No. 7**) mostró desplazamientos químicos en 157.00 ppm correspondientes a dos carbonos asignados a la posición 2 y 6 del anillo de piridinio, en 154.0 para el carbono en 4, y en 129.03 ppm para los carbonos en la posición 3,5. La señal en 53.55 ppm se asignó al carbono unido al nitrógeno positivo, mientras que los metilos aromáticos en 2 y 6 se presentaron como una señal en 26.67. El metilo aromático en la posición 4 se desplazó a 21.49 ppm y el alifático terminal de la cadena en 13.91 ppm. Los carbonos restantes se desplazaron entre 53.46-22.57. Por otra parte, el análisis elemental correspondió al esperado. La **Figura 8** presenta un resumen de la elucidación estructural.

Figura 8. Elucidación estructural del Bromuro de 1-dodecil-2,4,6-trimetilpiridinio 12

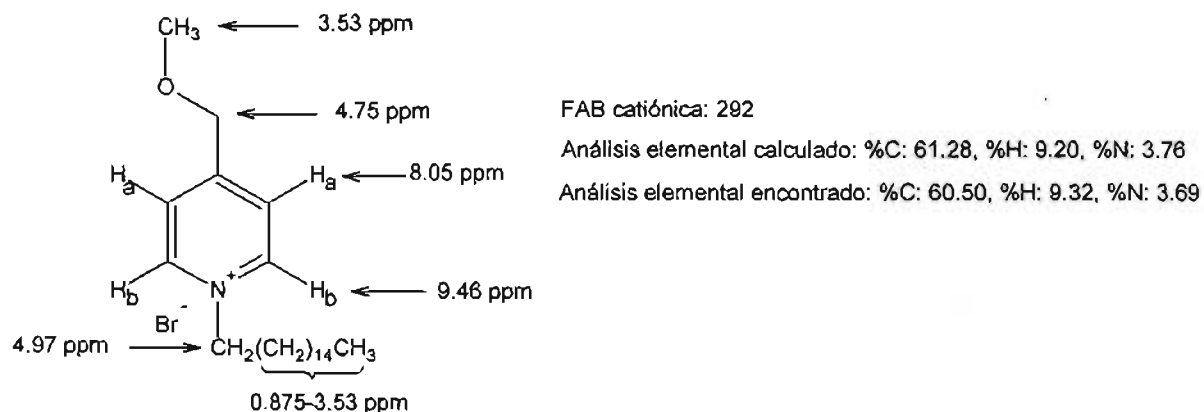


Análisis elemental calculado: %C: 64.83, %H: 9.80, %N: 3.78

Análisis elemental encontrado: %C: 64.63, %H: 10.13, %N: 4.00

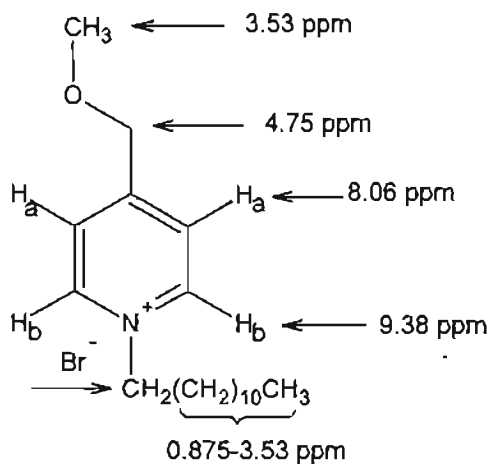
La identidad del compuesto **14** se basó en los datos del espectro de RMN ¹H (**No. 8**) en el cual se aprecian las señales del sustituyente de la posición 4 del anillo: en 3.53 ppm del CH₃ del grupo metóxido y en 4.75 ppm el metileno, además de dos dobletes a 8.05 y 9.46 ppm, característicos de un patrón de sustitución A₂B₂ que concuerda para una sal de piridinio 1,4 disustituída. En el mismo espectro, las señales del CH₃ alifático se desplazaron a 0.875 ppm y el resto de la cadena, 30 H, entre 1.2-4.97 ppm. Estas deducciones se ilustran en la **Figura 9**.

Figura 9. Elucidación estructural del Bromuro de 1-hexadecil-4-(metoximetil)piridinio 14



La elucidación estructural del compuesto **18** se basó en los datos del espectro de RMN ^1H (**No. 9**) muy parecidos a la de su análogo de 16 carbonos: en 3.53 ppm el CH_3 del grupo metóxido y en 4.75 ppm el metileno del sustituyente de la posición 4 del anillo, en 8.06 y 9.38 ppm los dos dobletes del sistema A_2B_2 , que concuerda para una sal de piridinio 1,4 disustituida; las señales del CH_3 alifático se desplazaron a 0.875 ppm y el resto de la cadena, 22 H, entre 1.2-4.97 ppm. El espectro de masas por FAB catiónica (**No. 10**) es coincidente con la masa esperada del catión; el análisis elemental encontrado también concuerda con el calculado para este compuesto. En la **Figura 10** se ilustra la elucidación estructural realizada.

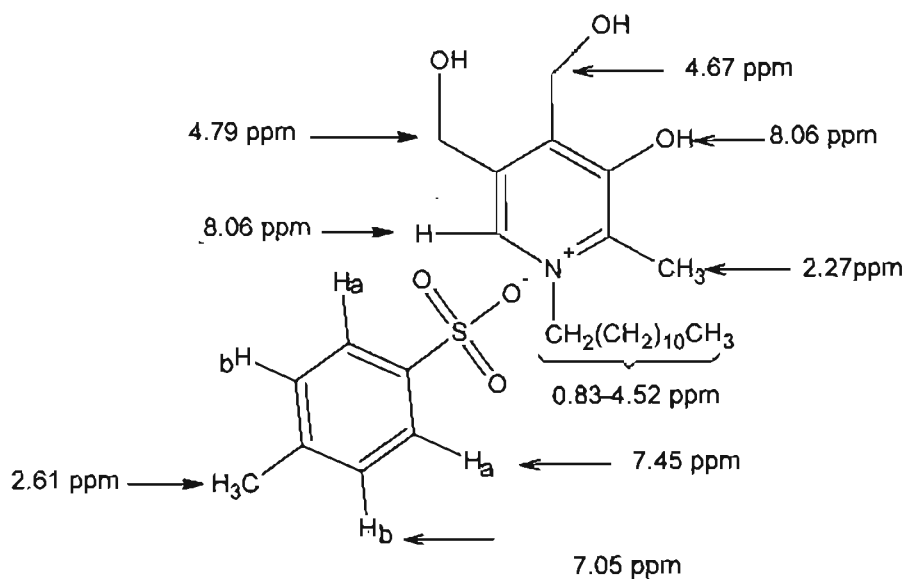
Figura 10. Elucidación estructural del Bromuro de 1-dodecil-4-(metoximetileno)piridinio 18



Por ultimo, la estructura del compuesto **19** se determinó de su espectro de RMN ^1H (No. 11), donde los sustituyentes del anillo de piridinio presentaron las siguientes señales: en 8.06 ppm una señal simple del H en la posición 2, en 4.67 y 4.79 ppm dos señales simples que integran para dos hidrógenos respectivamente, y que fueron asignados a los dos metilenos en la posición 4,5, el metilo en 6 se desplazó a 2.27 ppm, mientras que en 5.74 ppm la señal simple del OH de la posición 3 (este último intercambió con D_2O). Las señales de la cadena en 1 mostraron las siguientes señales: en 4.52 ppm una triplete asignado al carbono unido al nitrógeno positivo, en 0.83 el metilo terminal, y de 3.53-2.67 ppm el resto de la cadena.

A diferencia de los compuestos anteriores, durante el aislamiento mediante la técnica de Cromatografía de Columna Rápida (FCC), este compuesto no intercambia el contraión, por lo que aparecen las señales del ion tosilato: en 7.45 y 7.05 ppm dos dobletes que integran para dos hidrógenos cada uno, y que fueron asignados a los hidrógenos 2,6 y 3,5 del anillo bencénico respectivamente (sistema A_2B_2 , que concuerda para un anillo de fenilo 1,4 disustituido). Por último la señal del metilo se presentó en 2.67 ppm como una señal simple que integró para tres hidrógenos. El espectro de masas por FAB catiónica (**No. 12**) es coincidente con la masa esperada del catión; el análisis elemental encontrado también concuerda con el calculado para este compuesto. Estas deducciones se ilustran en la **Figura 11**

Figura 11. Elucidación estructural del 5-Hidroxi-3,4-bis (hidroximetil)-4-metil-1-hexadecilpiridinio 19



FAB catiónica: 394

Análisis elemental calculado: %C: 65.81, %H: 9.09, %N: 2.48

Análisis elemental encontrado: %C: 65.68, %H: 9.14, %N: 2.52

5.3 Determinación del Coeficiente de Partición Octanol-Agua (Log P).

Para determinar el coeficiente de partición se siguieron las precauciones establecidas por Hansch.¹³ A continuación se da una breve descripción de los resultados:

Determinación de la longitud de onda óptima. Para cada compuesto se calcularon las longitudes de onda óptimas para trabajar. Para ello, se preparó una solución estándar (0.6 mg/mL en metanol) del compuesto a determinar. Enseguida se realizó un barrido en todo el espectro de ultravioleta (220 a 450 nm) para el disolvente y después se hizo para la solución estándar. En la **Figura 12** se presentan los espectros de absorción del blanco como del estándar del compuesto **11**. Basados en estos espectros se decidió emplear la longitud de onda que presento una mayor absorción. Las longitudes de onda elegidas se presentan en la **Tabla 15**.

Figura 12. Espectro de absorción del blanco (metanol) y del compuesto **11** en toda la región ultravioleta

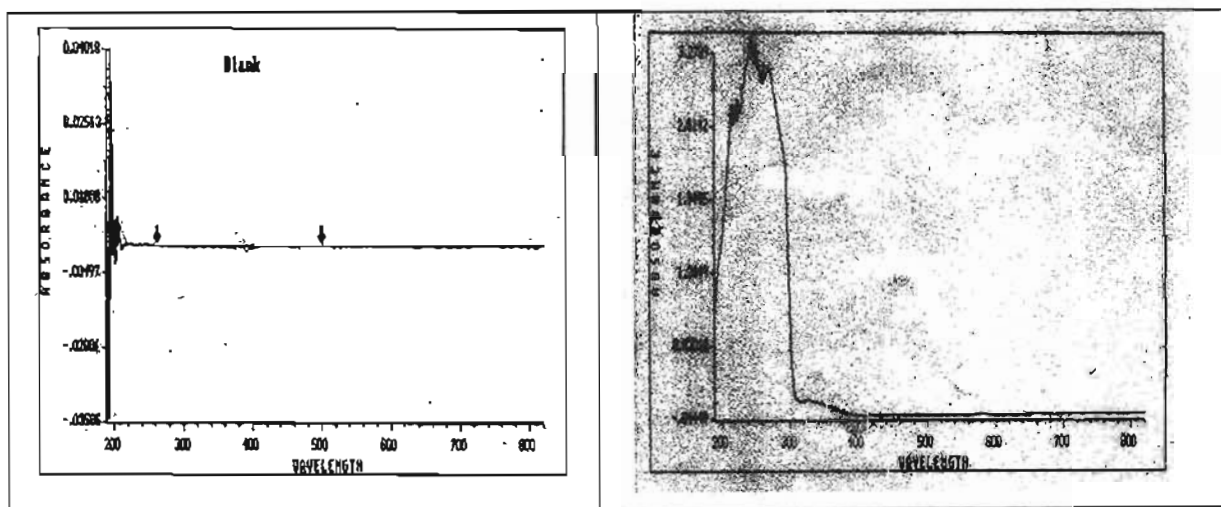


Tabla 15. Longitud de onda óptima establecida para cada compuesto^a

| Compuesto | Longitud de onda óptima (nm) | Absorbancia |
|-----------|------------------------------|-------------|
| 3 | 230 | 1.94 |
| 10 | 220 | 2.47 |
| 11 | 244 | 3.24 |
| 12 | 220 | 1.48 |
| 14 | 224 | 2.44 |
| 18 | 242 | 3.15 |
| 19 | 222 | 2.03 |
| CPC | 262 | 3.25 |

^aPara cada compuesto se realizó un barrido en la región ultravioleta.

Curva estándar de los compuestos. Una vez determinada la longitud de onda se procedió a construir la curva estándar de cada compuesto en un intervalo de 0.01 a 0.10 mg/mL en la mayoría de los casos. Así, para el compuesto 12, los datos de absorbancia obtenidos se presentan en la **Tabla 16**. Con estos datos se construyó la curva estándar que se presenta en la **Figura 13**.

Tabla 16. Datos de absorbancia de las diferentes concentraciones del compuesto 12, a 220 nm

| Punto | Concentración | Absorbancia ^a | % Error* |
|-------|---------------|--------------------------|----------|
| 1 | 0.10 | 1.5842 | -2.856 |
| 2 | 0.08 | 1.1986 | 3.244 |
| 3 | 0.05 | 0.7761 | 0.349 |
| 4 | 0.04 | 0.5962 | 3.783 |
| 5 | 0.01 | 0.1486 | 5.320 |

^aPromedio de dos determinaciones *El error se determinó por la regresión lineal para cada punto

De manera análoga se procedió para todos los compuestos, los datos estadísticos obtenidos para cada uno de ellos se presentan en la **Tabla 17**, así como la ecuación lineal obtenida.

FIGURA 13. Gráfica de la curva estándar del compuesto 12

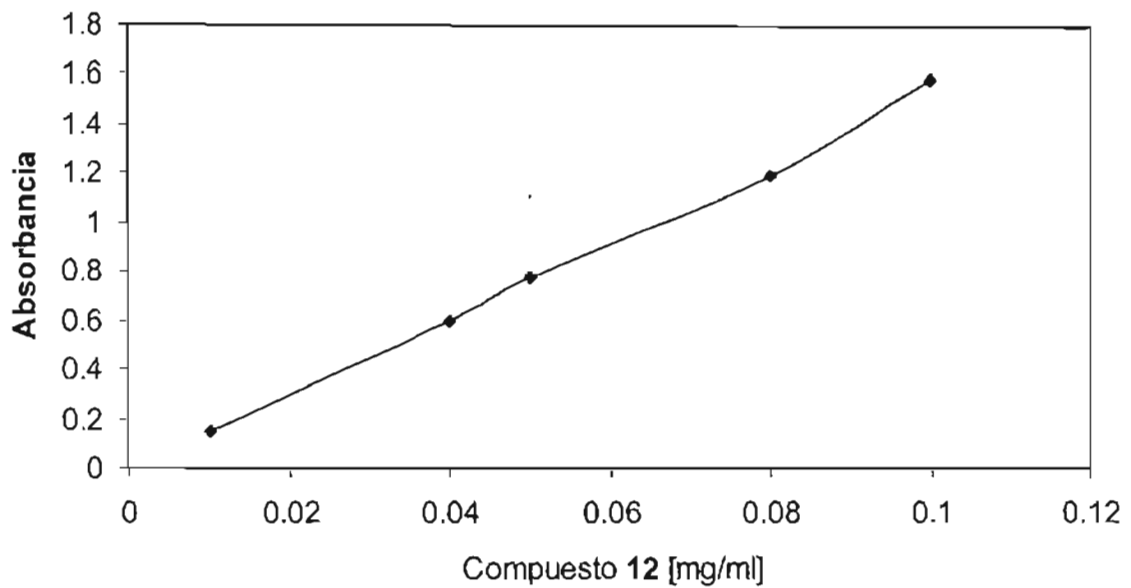


Tabla 17. Curva estándar determinada para cada compuesto^a

| Compuesto | Curva std | n | r ² |
|-----------|--|---|----------------|
| 3 | Conc. = 4.835×10^{-2} Abs + 0.00005 | 5 | 0.9983 |
| 10 | Conc. = 6.308×10^{-2} Abs - 0.0019 | 5 | 0.9980 |
| 11 | Conc. = 8.798×10^{-2} Abs + 0.004 | 5 | 0.9996 |
| 12 | Conc= 6.463×10^{-2} Abs + 0.001 | 5 | 0.9967 |
| 14 | Conc= 6.415×10^{-2} Abs + 0.0006 | 5 | 0.9998 |
| 18 | Conc= 1.172×10^{-1} Abs + 0.0006 | 5 | 0.9998 |
| 19 | Conc= 3.101×10^{-2} Abs + 0.007 | 4 | 0.9944 |
| CPC | Conc= 8.427×10^{-2} Abs - 0.004 | 5 | 0.9922 |

^aCada punto de la curva se hizo por duplicado.

Determinación del coeficiente de partición. Como ejemplo, los datos obtenidos para el compuesto **12** se presentan en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Concentración [mg/ml] del compuesto **12** en la fase acuosa y octanólica

| Muestra | Concen. Comp 12 | Absorbancia | Concen. Agua | Concen. Octanol* |
|---------|-----------------|-------------|--------------|------------------|
| 1 | 10 | 1.8436 | 1.08035 | 8.91965 |
| 2 | 10 | 1.8723 | 1.097168 | 8.902832 |
| 3 | 5 | 1.2482 | 0.731445 | 4.268555 |
| 4 | 5 | 1.2625 | 0.739825 | 4.260175 |
| 5 | 1 | 0.7421 | 0.434871 | 0.565129 |
| 6 | 1 | 0.7857 | 0.46042 | 0.53958 |

*La concentración se calculó como sigue: (cantidad del compuesto **12**)- (Concentración en agua X 20 mL)

El valor del Log P se obtuvo graficando los datos de la **Tabla 18**, el logaritmo de la pendiente es el valor reportado, como se muestra en la **Figura 13**. De manera análoga se determinó el coeficiente de partición de los compuestos sintetizados, los cuales se reportan en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Coeficiente de partición octanol-agua de los compuestos de alquilpiridinio sintetizados.

| Compuesto | Log P |
|-------------|-------------|
| 3 | 2.712 |
| 10 | 1.569 |
| 11 | 1.006 |
| 12 | 0.527 |
| 14 | nd |
| 18 | 1.115 |
| 19 | 0.870 |
| CPC | 1.78 (1.71) |
| (reportado) | |

En general, todos los compuestos tienen más afinidad por la fase acuosa que el CPC (líder), ya que su coeficiente de partición es más pequeño, salvo el compuesto 3 que es 0.6 unidades logarítmicas más grande. Con este resultado se cumplió uno de los objetivos de este trabajo, ya que no sólo se sintetizaron compuestos análogos del CPC, sino también, éstos fueron más solubles en agua.

5.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

La evaluación biológica antibacteriana se realizó utilizando la técnica de concentración mínima inhibitoria (MIC) mediante el método de macrodilución.⁴⁹ Las bacterias que se utilizaron fueron *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 49063 y *S. aureus* ATCC29123. Los controles positivos que se emplearon fueron el CPC y ampicilina (Sigma-Aldrich) y como control negativo medio Mueller Hinton solo. Los experimentos se hicieron por triplicado, los resultados se presentan en la **Tabla 20**. Al mismo tiempo, con el fin de comparar estos resultados con los del modelado molecular, los valores predichos por el modelo de CoMFA se presentan (entre paréntesis) en la misma Tabla

Es importante aclarar que:

1) Si bien es cierto que en el estudio de modelado molecular se utilizaron los datos de actividad MIC reportados en la literatura, se sobrentiende que la actividad real de un compuesto está entre el valor reportado y una concentración más alta. Por lo que el error inherente es mayor con un MIC mayor. Es decir, si el MIC es de 64 µg/mL su actividad real está entre 64 y 128. Claro que este efecto disminuye al disminuir el MIC.

Tabla 20. Datos de la actividad antimicrobiana de los compuestos de alquilpiridinio sobre diferentes microorganismos

| Compuesto | MIC en mg/mL (predicho*) | | | |
|------------|--------------------------|----------------|------------------|------------------|
| | <i>S. typhimurium</i> | <i>E. coli</i> | <i>B. cereus</i> | <i>S. aureus</i> |
| 3 | 64 | 15(10) | 10 | 0.406(0.24) |
| 10 | 25 | 5(0.98) | 15 | 0.103(0.12) |
| 11 | 40 | 15(0.42) | 35 | 6.50(1.02) |
| 12 | nd | 64(0.35) | nd | 2.00(0.42) |
| 14 | 64 | 5(3.57) | 20 | 0.203(0.49) |
| 18 | 45 | 10(9.63) | 35 | 1.656(1.79) |
| 19 | >50 | >50(3.57) | 10 | 6.50(0.23) |
| CPC | 35 | 5(0.35) | 20 | 0.203(0.41) |
| Amp | 0.4 | 2 | 64 | 0.812 |

* Predicción de CoMFA antes de validar el modelo.

Esto era muy notorio cuando se determinó el MIC a los compuestos **3** y **10**, y se compararon con el CPC. Al emplear el esquema de diluciones de 258 a 0.5 µg/mL, los compuestos resultaron tener el mismo MIC (32 µg/mL), lo cual no era el resultado esperado. Cuando se procedió a un segundo estudio con concentraciones entre 50 y 5 µg/mL, el compuesto **10** resultó ser ligeramente más activo que el CPC. Ahora bien, el compuesto **18** presentó una actividad muy equiparable con el CPC, pero es 7 veces más afín a fases acuosas (ver Log P). Estos resultados demostraron que los compuestos diseñados son activos, inclusive un poco más que el líder, tal y como lo había sugerido CoMFA.

Por otro lado, el compuesto **12** resultó ser menos activo que lo reportado en la literatura, esto puede ser debido a que se empleó una cepa de *E. coli* más resistente que la reportada en la literatura. El control de calidad en la determinación del MIC fue garantizado por los resultados obtenidos con ampicilina sobre la cepa de *S. aureus* ATCC29123, ya que el MIC determinado está en el intervalo reportado.⁴⁹

5.5. Determinación del nivel residual de los compuestos de alquilpiridinio seleccionados en alimentos mediante HPLC

Al inicio de este proyecto existía un solo método analítico de HPLC validado para cuantificar al CPC en alimentos.¹¹ Por lo que fue necesario desarrollar y validar nuevos métodos para cuantificar, primero, al CPC, y luego, a los compuestos seleccionados.

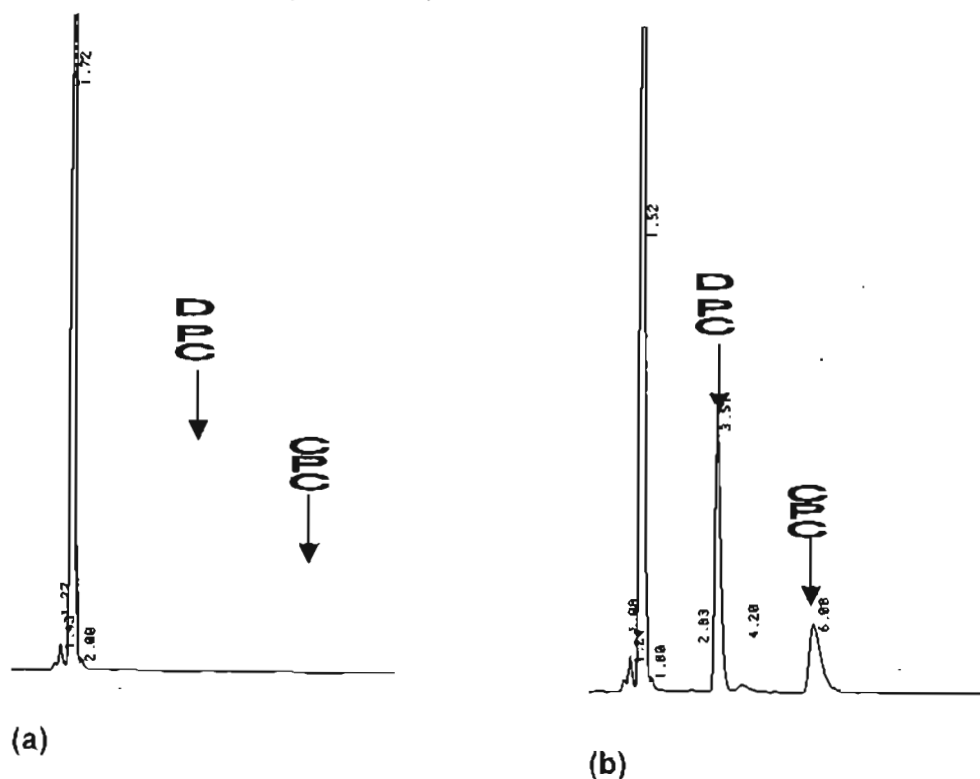
Cuantificación del CPC en diferentes biosuperficies

5.5.1 Determinación del cloruro de cetilpiridinio en carne res:

Resultados

Los cromatogramas para el extracto blanco, extracto blanco con DPC y extracto de carne de res tratada con CPC más DPC como estándar interno se presentan en la **Figura 14**. Los tiempos de retención encontrados para cada analito fueron 3.65 min y 6.30 min para el CPC y el DPC respectivamente. Como se ve en la **Figura 14**, en estas regiones no existen interferencias debidas a los coextractos de la carne de res. La especificidad se estableció dividiendo la absorbancia a 254 nm entre la absorbancia a 260 nm del pico del CPC. El valor encontrado fue de 0.44, el cual fue el mismo valor encontrado para el pico del CPC en muestras de carne de res extraído.

Figura 14. Cromatogramas representativos de los extractos de carne de res^a



^a(a) extracto sin tratamiento de CPC o DPC. (b) Extracto con tratamiento de CPC y DPC añadido. Condiciones: Columna ciano alltima, fase móvil metanol:TMAPH, 63:37, 260 nm, 20 mL del sobrenadante

Línea de calibración y linealidad. Se obtuvo una curva de calibración de siete puntos al graficar las razones del área bajo la curva del CPC (ABC CPC) entre el área bajo la curva del DPC versus la cantidad de CPC adicionado. La ecuación de la línea encontrada fue: $Y = 0.03108X - 0.03234$, donde X es la concentración de CPC añadida y Y es la razón de áreas $ABCCPC/ABCDPC$. Por otra parte, el coeficiente de variación encontrado fue alto ($r^2 = 0.9998$) y básicamente la ecuación lineal obtenida fue la misma que la determinada por Zhou para pollo.¹¹

Los ensayos de precisión y exactitud inter-día e intra-día para carne de res se determinaron mediante análisis del extracto blanco al cual se le añadieron 3.57, 91.3 y 183 $\mu\text{g/mL}$ de CPC respectivamente, cada experimento se realizó por quintuplicado. A cada muestra se le adicionaron 26.9 $\mu\text{g/mL}$ de DPC como estándar interno.

Como se muestra en las **Tablas 21 y 22**, el error obtenido fue menor al 5% para las concentraciones media y alta. El error intra-día para la concentración más baja (3.57 mg/mL) fue del 9.37%, el cual es menor que el error máximo aceptado para métodos analíticos.⁶⁵ El coeficiente de variación fue menos del 7% para todas las muestras analizadas. Estos datos documentan que el análisis de CPC en extractos de carne de res es preciso y exacto en el intervalo de 3.57-200 $\mu\text{g/mL}$.

Limite de cuantificación. Se define como la concentración más baja que se puede determinar con precisión ($CV < 20\%$) y exactitud (error $< 20\%$) aceptable.⁶⁶ En este método resultó ser de 3.52 $\mu\text{g/mL}$. En un análisis preliminar se determinó que el nivel residual del CPC en carne de res fue de 10-90 mg/kg carne, por lo que el método resultó adecuado para el análisis del CPC en carne de res.

Recobro del CPC en carne de res. El recobro del CPC en muestras de carne de res; a las cuales se les aplicó las soluciones de 0.6 y 3.0 mg de CPC en la superficie; después de la extracción etanólica, fueron 10.16 ± 6.64 y $102.2 \pm 6.63\%$ respectivamente. Este resultado demostró que el CPC residual se extrajo eficientemente por el método de extracción etanólica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 21. Datos del ensayo Inter-día para determinar la precisión y la exactitud en análisis del CPC en carne de res^a

| Conc. CPC ($\mu\text{g/mL}$) | Conc. CPC medida ($\mu\text{g/mL}$) | C.V. (%) | Error Std. |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------|------------|
| 3.57 | 3.71 ± 0.21 | 5.71 | 3.92 |
| 91.3 | 92.10 ± 3.49 | 3.79 | 0.88 |
| 183 | 184.50 ± 5.93 | 3.76 | 0.82 |

^a(n=5)

Tabla 22. Datos del ensayo Intra-día para determinar la precisión y la exactitud en al análisis del CPC en carne de res^a

| Conc. CPC ($\mu\text{g/mL}$) | Conc. CPC medida ($\mu\text{g/mL}$) | C.V. (%) | Error Std. |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------|------------|
| 3.57 | 3.91 ± 0.20 | 5.13 | 9.52 |
| 91.3 | 88.20 ± 3.75 | 4.25 | -3.4 |
| 183 | 174.50 ± 12.09 | 6.94 | -4.75 |

^a(n=5)

Determinación del CPC en muestras de carne de res tratadas. El porcentaje de CPC residual encontrado en tres experimentos, cada uno con 5 muestras de carne de res molida y lavada a presión con una solución del CPC al 0.1%, está en un intervalo de 31.4 a 81.6 mg/kg de carne de res. Los datos se presentan en la **Tabla 23**. En la **Figura 15** se presenta de manera gráfica los promedios de los resultados del análisis en carne de res. Como se puede observar, la cantidad de CPC disminuye al aumentar el tiempo de acción del CPC en la carne, quizás debido a que el CPC se adsorbe en los primeros 15 minutos, y por eso la cantidad detectada es menor que en los demás tiempos, aunque se requieren más estudios para determinar el comportamiento del CPC en esta superficie.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 23. CPC residual encontrado en muestras de carne de res^a

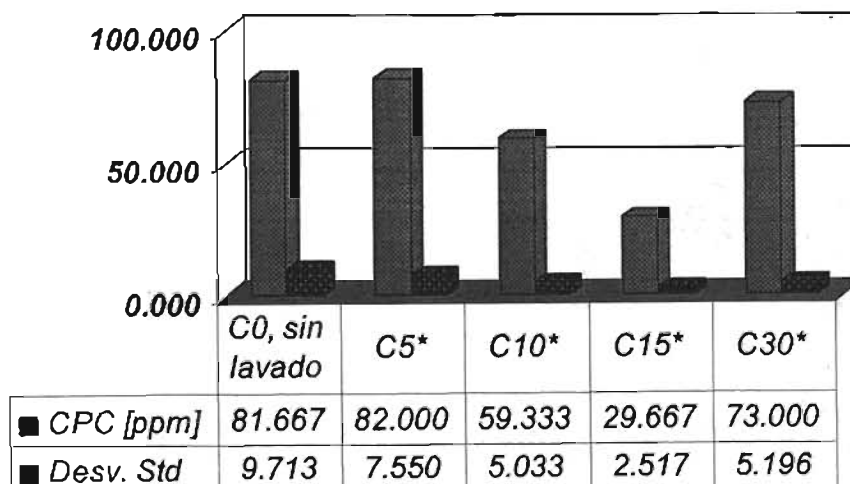
| Muestra | Peso (g) | CPC/muestra (mg) | CPC (mg/g) | ppm (mg/kg) |
|----------------|----------|------------------|------------|-------------|
| C0, sin lavado | 25.1 | 2.23 | 0.09 | 90 |
| C5* | 25.0 | 2.33 | 0.09 | 90 |
| C10* | 25.3 | 1.48 | 0.06 | 60 |
| C15* | 25.1 | 0.64 | 0.03 | 30 |
| C30* | 25.4 | 1.87 | 0.07 | 70 |

| Muestra | Peso (g) | CPC/muestra (mg) | CPC (mg/g) | ppm (mg/kg) |
|----------------|----------|------------------|------------|-------------|
| C0, sin lavado | 25.1 | 1.78 | 0.071 | 71 |
| C5* | 25.0 | 1.88 | 0.075 | 75 |
| C10* | 25.0 | 1.61 | 0.064 | 64 |
| C15* | 25.0 | 0.79 | 0.032 | 32 |
| C30* | 25.0 | 2.13 | 0.085 | 70 |

| Muestra | Peso (g) | CPC/muestra (mg) | CPC (mg/g) | ppm (mg/kg) |
|----------------|----------|------------------|------------|-------------|
| C0, sin lavado | 25.1 | 2.10 | 0.084 | 84 |
| C5* | 25.0 | 2.03 | 0.081 | 81 |
| C10* | 25.0 | 0.92 | 0.054 | 54 |
| C15* | 25.0 | 1.46 | 0.027 | 27 |
| C30* | 25.0 | 1.98 | 0.079 | 79 |

^aDespués de haber sido tratadas con una solución de CPC al 0.1% y lavadas a diferentes tiempos. * Lavado después de aplicado el CPC, así para C5 se aplicó la solución de CPC, se esperó 5 minutos y se lavó, para C10, C15 y C20 aplicó la solución, se esperó 10, 15 y 20 minutos respectivamente y se lavó.

Figura 15. Gráfica del CPC residual en carne de res, después de tratarla con una solución al 0.1% de CPC, a diferentes tiempos de lavado



5.5.2 Determinación de Cloruro de cetilpiridinio en el modelo de frutas y verduras: Manzana

Se trató de emplear el método previamente utilizado,¹¹ pero en el extracto etanólico aparecieron coextractos que interfirieron con la cuantificación del analito. Por lo que fue necesario desarrollar una técnica de pretratamiento (extracción de fase sólida de intercambio iónico) para eliminar las interferencias presentes. Analizando la estructura del CPC, visualizamos que la carga positiva del CPC sería retenida por una columna de intercambio catiónica, y las impurezas se lavarían con metanol.

Por otro lado, esta técnica permitió concentrar la muestra, aumentando la sensibilidad del método. Al mismo tiempo se mejoraron las condiciones del método de HPLC, ya que la velocidad de flujo de la fase móvil (2 mL/min) era muy agresiva para la vida de la columna. Así mismo se realizó la validación del método, incluyendo la fase de pretratamiento.

Por otra parte, se decidió cambiar el estándar interno, que en el método previo fue el derivado de 12 carbonos (cloruro de dodecilpiridio, DPC), por un compuesto con un tiempo de retención mayor (cloruro de octadecilpiridinio, SPC), el cual se sintetizó de acuerdo al método reportado por Shelton,³² y su pureza determinada (98%). El cambio se debió a la interferencia de algún componente en el extracto etanólico de las manzanas y en algunos picos ("ruido") después de la elusión con HCl.

Para una mejor separación de los picos del estándar interno (SPC) y del CPC, se modificó la fase móvil (metanol: 0.008 M TMAHP) de 67:37 a una relación 29:71, con lo cual los dos picos se diferenciaron perfectamente. De igual forma se modificó la velocidad de flujo de la fase móvil, de 2 mL/min (presión del sistema = 3880 PSI) a 1min/mL (1400 PSI) para aumentar la vida de la columna, así como eliminar problemas de alta presión. Todos los análisis se realizaron en un tiempo de 20 minutos.

Validación del método.

Especificidad. En la **Figura 16** se presentan cromatogramas representativos de extractos etanólicos blanco, blanco con CPC y DPC adicionados, y extracto de una manzana tratada con una solución de CPC de 2 mg/mL. Los tiempos de retención del CPC y del SPC fueron de 7.9 y 9.5 min respectivamente. En estas regiones no hay interferencias del extracto de manzana.

Curva de calibración y linealidad del sistema. Se prepararon muestras de 10 mL de extracto etanólico de manzanas libre de CPC (blanco), y se le adicionó 50 μ L de solución estándar de CPC para obtener concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μ g/mL. A cada muestra se le agregó 30 μ L de la solución estándar de SPC (30 μ L, 90 μ g). Las muestras se analizaron según el método de extracción. Cada experimento se realizó por duplicado, los datos se presentan en la **Tabla 24**. Con estos datos se construyó la curva de calibración del sistema, graficando la relación de ABC del CPC entre el ABC del SPC *versus* la concentración de CPC, usando regresión lineal para determinar la linealidad del sistema (**Figura 17**).

Figura 16. Cromatogramas representativos de los extractos de manzana. (a) extracto blanco, sin CPC o SPC. (b) Extracto blanco con SPC añadido, (c) Extracto blanco con CPC y SPC añadido (d) Extracto de manzana tratada con CPC al 2%, con SPC adicionado. Condiciones: pretratamiento con extracción de fase sólida de intercambio iónico, inyección de 20 µL del sobrenadante después del pretratamiento. Columna ciano alltima, fase móvil metanol:TMAPH, 71:29, 260 nm

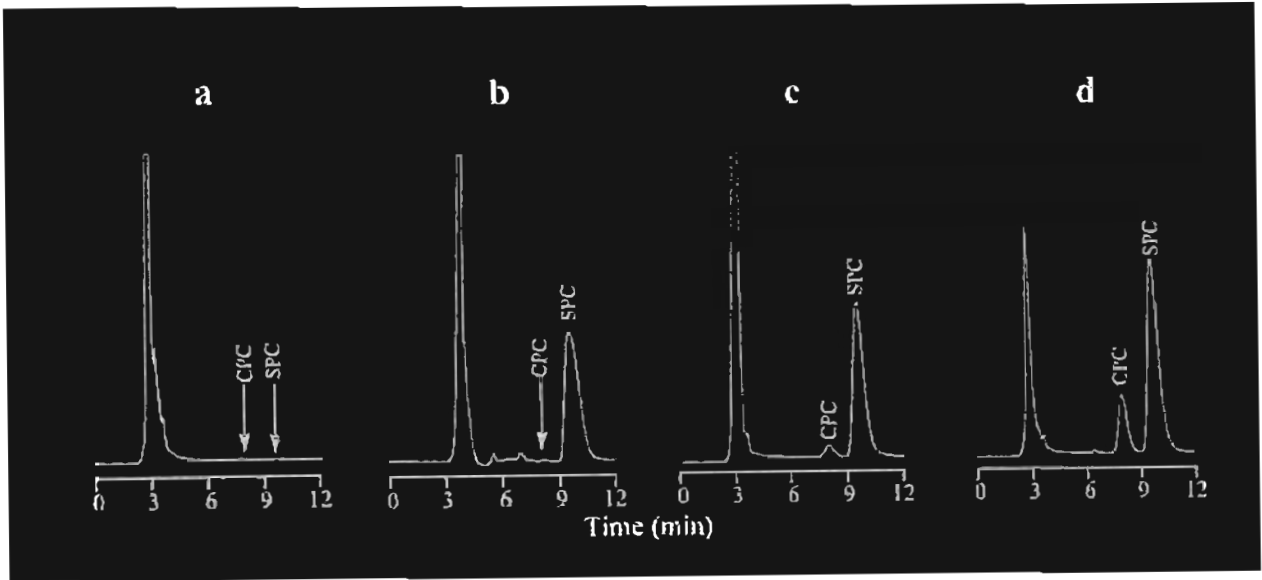
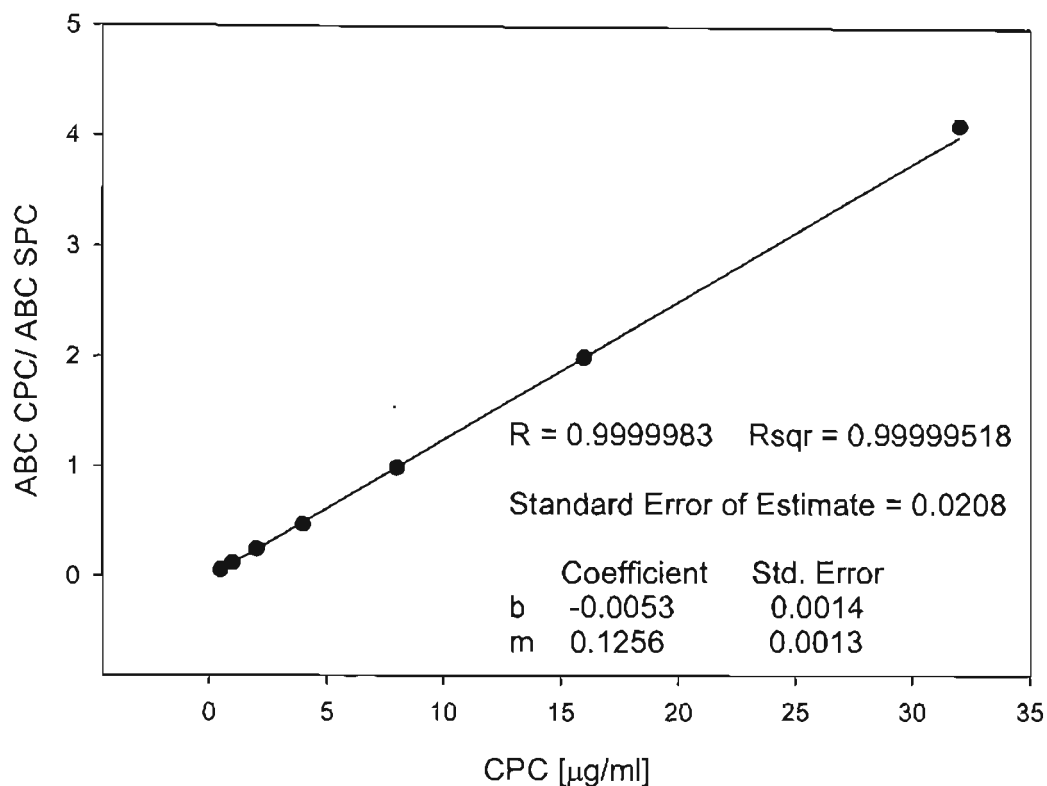


Tabla 24. Datos del análisis de HPLC de la curva estándar de calibración para la determinación del CPC en manzana

| CPC [µg/mL] | ABC CPC/ABC SPC (1era vez) | ABC CPC/ABC DPC (2da vez) | Promedio ABC CPC/ABC DPC |
|----------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 0.50 | 0.057 | 0.061 | 0.059 |
| 1.00 | 0.1204 | 0.115 | 0.118 |
| 2.00 | 0.2502 | 0.245 | 0.248 |
| 4.00 | 0.4803 | 0.4865 | 0.483 |
| 8.00 | 1.030 | 1.076 | 1.053 |
| 16.00 | 2.004 | 1.964 | 1.984 |
| 32.00 | 3.7804 | 4.1154 | 3.948 |

Figura 17. Gráfica de la curva de calibración estándar para determinar al CPC en manzanas. Se empleó SPC como estándar interno



Como se puede observar en la Gráfica de la curva estándar, la linealidad del sistema es excelente (0.999983), y la ecuación de la gráfica es $y = 0.1256 X - 0.0079$, donde y es la razón del área del CPC entre el ABC del SPC, y X es la concentración del CPC.

Precisión y exactitud del método. Se tomaron alícuotas de 10 mL de extracto etanólico blanco de manzana, y se adicionaron 50 µL de solución estándar para dar concentraciones finales de 0.61, 15.00 y 30.00 µg/mL. A las muestras se les agregó 30 µL de solución estándar SPC (90 µg) y se analizaron de acuerdo al método recién desarrollado. Los experimentos se realizaron por quintuplicado en el mismo día (intra día) o una determinación por 5 días consecutivos (inter-día).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las **Tablas 25 y 26** muestran los valores encontrados, así como los valores estadísticos. Los valores obtenidos de error fueron menores al 5.5% para las concentraciones media y alta. El error para la concentración baja fue de 8.13%, el cual es menor al máximo error aceptable (20%).⁶⁶ El coeficiente de variación fue menor al 11%, satisfactorio para estos ensayos.

Límite de cuantificación. El límite de cuantificación en los extractos etanólicos es la concentración más baja que se puede determinar con una precisión (CV <20%) y exactitud (error < 20%) aceptables, que en este método fue de 0.5 µg/mL.^{65,66} Bajo estas condiciones, el límite de cuantificación en manzanas fue de 1 ppm.

Los ensayos *a priori* del nivel residual demostraron que la concentración a determinar está en un intervalo de 3-10 ppm., por lo que este método es adecuado para el análisis.

Tabla 25. Datos del ensayo inter-día para la determinación de la exactitud y precisión del método de cuantificación de CPC en manzanas^a

| Conc. CPC añadida (µg/mL) | Conc. Determinada (µg/mL) ^b | Coficiente De Variación (%) | Error Relativo (%) |
|---------------------------|--|-----------------------------|--------------------|
| 0.61 | 0.66 ± 0.07 | 11.06 | 8.19 |
| 14.99 | 15.96 ± 0.69 | 4.38 | 5.24 |
| 30.00 | 29.64 ± 2.26 | 7.65 | 1.28 |

^aEnsayo por quintuplicado, ^bpromedio ± S.D

Tabla 26. Datos del ensayo intra-día para la determinación de la exactitud y precisión del método de cuantificación de CPC en manzanas^a

| Conc. CPC añadida (µg/mL) | Conc. Determinada (µg/mL)^b | Coefficiente de Variación (%) | Error Relativo (%) |
|----------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------|
| 0.61 | 0.62 ± 0.05 | 8.51 | 2.34 |
| 14.99 | 14.66 ± 0.50 | 3.38 | 2.20 |
| 30.00 | 28.47 ± 0.96 | 3.39 | 5.11 |

^aEnsayo por quintuplicado, ^bpromedio ± S.D

Análisis de recuperación del analito mediante la extracción etanólica. 100 µl de soluciones estándares de CPC en agua, correspondientes a una concentración final de 1.58 y 56.99 µg/g de manzana, se aplicaron lo más homogéneamente posible, en la superficie de las manzanas con una microjeringa. Después de que las manzanas se secaron, se extrajeron y analizaron de acuerdo al método de extracción. El porcentaje de recuperación se calculó como la relación de la cantidad de CPC determinado entre la cantidad de CPC aplicada (**Tabla 27**).

Tabla 27. Datos de recuperación del CPC mediante la extracción etanólica en el método de cuantificación del CPC^a

| Conc. CPC añadida (µg/g manzana) | Conc. recuperada (µg/g manzana)^b | % de recuperación | Error Relativo(%) |
|---|--|--------------------------|--------------------------|
| 1.58 | 1.65± 0.06 | 105.5 | 6.24 |
| 56.99 | 56.83± 2.40 | 99.85 | 1.07 |

^aEnsayo por triplicado, ^bpromedio ± S.D

Análisis de la recuperación del CPC en la fase de extracción sólida de intercambio iónico (SPE-IE). Se tomaron alícuotas de extracto blanco de manzana, y se les adicionaron 50 µL de soluciones estándar de CPC para dar concentraciones finales de 0.6 y 30 µg/mL, respectivamente. Se realizó la extracción y análisis del sistema de acuerdo al método señalado arriba, excepto que el estándar interno se adicionó después de la extracción de la fase de extracción sólida de intercambio iónico. El porcentaje de recuperación de la fase SPE-IE se calculó como la relación del CPC añadido entre el CPC recuperado, los cuáles se presentan en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Datos de recuperación del CPC en la fase de extracción sólida de intercambio iónico del método de cuantificación del CPC^a

| Conc. CPC añadida (µg/mL) | Conc. recuperada (µg/mL)^b | % de recuperación | Error Relativo (%) |
|--------------------------------------|---|------------------------------|-------------------------------|
| 0.60 | 0.63± 0.0415 | 103.4960 | 0.0186 |
| 30.00 | 29.1059± 1.1354 | 96.9800 | 0.5078 |

^aEnsayo por triplicado, ^bpromedio ± S.D

Determinación del nivel residual en manzanas. Se tomaron cinco manzanas de cada grupo (granny Smith y Black Arkansas), se transfirieron a una bolsa Stomach en grupos de tres manzanas, y se trataron con soluciones de CPC al 0.2 y 0.4% (0.4 mL de solución por gramo de manzana) por tres minutos con agitación suave. Se eliminó la solución por aspiración, y se lavaron las manzanas con agua (0.8 mL de agua por gramo de agua, temp. 25 °C, pH= 7.2) dos veces. Después de que se secaron las manzanas, se pesaron y se analizaron de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Los resultados del análisis se presentan en las **Tablas 29 y 30**.

En estos resultados es claro que el nivel residual es dependiente de la concentración, pero no de una forma proporcional. Resalta la diferencia de concentraciones de CPC residual para los dos tipos de manzanas, y como era de esperarse, probablemente la cera en la superficie de las manzanas Granny Smith colaboró para retener al CPC, lo que aumento la cantidad de CPC remanente. Por otro lado, este nivel residual resultó menor al determinado para el pollo, lo cual era esperado debido a la hidrofobicidad del tejido de pollo.

Tabla 29. Nivel residual del CPC en manzanas Granny Smith enceradas^a

| Solución de CPC | Nivel residual (ppm, µg/g) | Error relativo |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 1mg /mL | 7.618±1.124253 | 2.513905 |
| 2mg /mL | 8.3958±2.019762 | 0.903265 |
| 4mg /mL | 10.962±4.783233 | 2.139127 |

^aRemanente después de un tratamiento con soluciones de CPC.

Tabla 30. Nivel residual del CPC en manzanas Black Arkansas no-enceradas^a

| Solución de CPC | Nivel residual (ppm, µg/g) | Error relativo |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 2mg /mL | 2.35±0.18 | 0.08 |
| 4mg /mL | 3.22±0.60 | 0.27 |

^aRemanente después de un tratamiento con soluciones de CPC.

5.5.3 Determinación del nivel residual de los compuestos de alquilpiridinio seleccionados en alimentos mediante HPLC

Al inicio del proyecto en la literatura sólo estaba reportado el método de cuantificación del CPC en una biosuperficie: pollo.¹¹ A lo largo de este trabajo experimental se validaron y desarrollaron los métodos para cuantificar al CPC en: carne de res y manzana. La **Tabla 31** presenta los avances alcanzados en este proyecto. Estos métodos se utilizaron para extrapolarlos y cuantificar los compuestos seleccionados. De los resultados del Log P y MIC, se seleccionaron los compuestos **10, 11, 12 y 18** para determinar su nivel residual, ya que éstos presentan una actividad equiparable con el CPC y que por otro lado tienen un Log P menor a este último.

Tabla 31. Nivel residual del CPC en diferentes biomatrices

| Biosuperficie | Concentración del CPC aplicado | Nivel residual [ppm] ± SD | Estudio realizado |
|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--|
| Carne de res | 2.0 mg/mL | 37±33.78 | Determinación J. Food Prot. 2000 |
| Pollo | 0.125 mg/mL | 11.7 ±3.05 | Determinación |
| Manzana Granny Smith (con cera) | 2 mg/mL 4mg/mL | 4.35±1.34 4.33±0.57 | Desarrollo y validación del método, J. Chrom. A, 2005 |
| Black Arkansas | 2mg/mL | 2.35±0.18 | |
| | 4mg/mL | 3.21±0.61 | |

En un primer intento se empleó el método recién desarrollado en manzanas para cuantificar el CPC y al compuesto **12**, esto por que era el único compuesto sintetizado en ese período. La **Tabla 32** muestra los resultados obtenidos. Como se puede notar, el nivel residual; después de tratar a las manzanas con el compuesto **12**, es equiparable al del CPC, aunque el Log P del compuesto es diez veces menor. Este resultado contradecía la hipótesis generada.

Tabla 32. Nivel residual del CPC y del compuesto **12** en manzanas Granny Smith

| Solución al 0.1 % de CPC | Nivel residual (ppm, µg/g) | Error relativo |
|--------------------------|----------------------------|----------------|
| CPC | 2.10±0.24 | 0.20 |
| 12 | 2.04±1.14 | 0.66 |

Por otra parte, estudios realizados en diversas frutas⁶⁷ demostraron que la reducción del nivel residual de pesticidas organofosforados no está correlacionado con su solubilidad en agua, y por ende, del Log P. De la **Tabla 31** es evidente que los niveles residuales están fuertemente influenciados por la naturaleza de la superficie de los alimentos o tejidos. Se ha demostrado que el CPC se une a proteínas⁶⁸ y grasas.⁶⁹ Las frutas y vegetales son en general ricos en carbohidratos y tienen muy bajas concentraciones de proteínas y grasas.^{70,71}

Considerando lo anterior, no quedaba claro si el nivel residual de ambos compuestos en las manzanas era debido a que realmente no hay una correlación entre la solubilidad en agua (y por lo tanto con el Log P), o bien a la poca lipofilia de la superficie de la manzana. Para resolver esta duda se procedió a realizar la determinación del nivel residual en una biosuperficie más lipofílica.

Por otra parte, previamente en este proyecto, se habían validado los métodos para carne de res y pollo, pero debido a la cantidad necesaria y la metodología para realizar las pruebas de nivel residual en carne de res, se procedió a utilizar el pollo como modelo de biosuperficie.

Así, todos los compuestos se determinaron utilizando el método reportado.¹¹ En esta metodología se emplea pollo entero, pero son necesarios cerca de 3 g de compuesto por prueba, por lo que se extrapoló la metodología a una pieza de pollo. En este caso se decidió utilizar las alas de pollo como parte representativa, y el nivel residual alcanzado por el CPC es el mismo que el reportado en pollo entero: 11 ppm al tratar el pollo con una solución de CPC al 0.0125%.

Curva estándar. Para cada compuesto se preparó una curva estándar (empleando CPC como estándar interno con compuestos de 12 carbonos en la cadena, o bien DPC en compuestos con 16 carbonos en la cadena). Se prepararon soluciones estándares tales que, 100 μ L de éstas dieran concentraciones de 32, 16, 8, 4, 2 y 1 μ g/mL al adicionarlas a 5 mL de extracto de ala de pollo sin tratamiento (blanco). En la **Tabla 33** se presentan los datos generados para el compuesto **10** y en la **Figura 18** se presenta la gráfica; mientras que la **Tabla 34** contiene los datos de la regresión lineal de la curva estándar determinada para todos los compuestos seleccionados.

Tabla 33. Datos del análisis de HPLC de la curva estándar de calibración para la determinación del CPC en ala de pollo

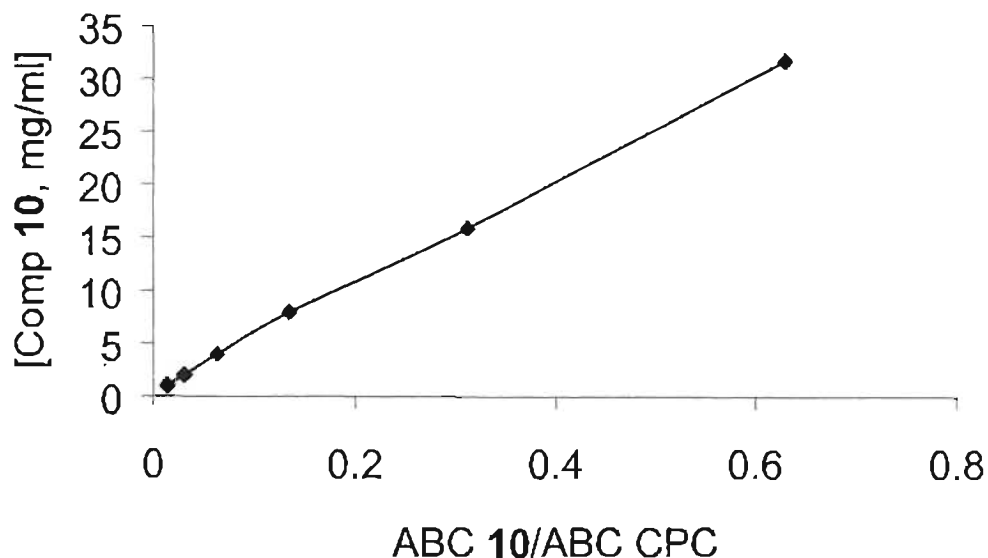
| Comp. 10 [µg/mL] | ABC Comp10/ABC DPC (1era vez) | ABC Comp10/ABC DPC (2da vez) | Promedio ABC Comp10/ABC DPC |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1.00 | 0.0103 | 0.0177 | 0.0140 |
| 2.00 | 0.0262 | 0.0337 | 0.0300 |
| 4.00 | 0.0613 | 0.0649 | 0.0631 |
| 8.00 | 0.1210 | 0.1494 | 0.1352 |
| 16.00 | 0.3110 | 0.3123 | 0.3117 |
| 32.00 | 0.6352 | 0.6247 | 0.6300 |

Tabla 34. Curva estándar determinada para cada compuesto en ala de pollo

| Compuesto | Curva std | n | r ² |
|-----------|---|---|----------------|
| 3 | | 5 | 0.9983 |
| 10 | Conc. = 47.73 (ABC 10/ABC DPC) -0.01543 | 5 | 0.9998 |
| 11 | Conc. = 31.20727(ABC 11/ABC CPC)- 0.011 | 5 | 0.9998 |
| 12 | | 5 | 0.9967 |
| 14 | Conc= 6.415 X 10 ⁻² Abs + 0.0006 | 5 | 0.9998 |
| 18 | Conc= 21.459(ABC 18/ABC CPC) - 0.00815 | 5 | 0.9998 |
| 19 | Conc= 3.101 X 10 ⁻² Abs + 0.007 | 4 | 0.9944 |
| CPC | Conc= 36.88 (ABC CPC/DPC) - 0.26192 | 5 | 0.9993 |

^aCada punto de la curva se determinó por duplicado

Figura 18. Gráfica de la curva de calibración estándar para determinar al compuesto 10 en alas de pollo. Se empleó CPC como estándar interno



Cuantificación del derivado de alquilpiridinio. A cada muestra se le adicionaron 135 μg (en 56 μL) de una solución estándar de cloruro de dodecilpiridinio (DPC) para compuestos con cadena de 16 carbonos, o bien 100 μg (en 50 μL) de cloruro de cetilpiridinio para compuestos con cadena de 12 carbonos. Los tubos se centrifugaron a 15000 g por 8 min. 20 μL del sobrenadante se inyectó al sistema de HPLC para su cuantificación. Las condiciones del sistema de HPLC fueron las siguientes:

Volumen de inyección de la muestra: 20 μL

Columna: Ciano Alltima

Fase móvil: 37% TMAHP 67% MeOH, Velocidad de flujo: 2 mL/min

Detector: u.v, 260 nm, 0.1 AUFS, Chart "1"

Nivel residual. El ala de pollo, después de ser tratada por un minuto con la solución de CPC (0.05%), se extrajo con etanol al 95% (190 mL en una bolsa cerrada de polietileno (Stomach), durante una hora a 60 °C, a 200 rpm. Después de enfriar a temperatura ambiente, el extracto se transfirió a un matraz volumétrico (250 mL) y se aforó con etanol al 95%. Se tomó una alícuota de 5 mL, se le adicionó el estándar interno y se cuantificó la cantidad de compuesto.

Recobro del método (Eficiencia de la extracción). Para determinar la eficiencia de la extracción con etanol, se aplicó en toda la superficie del ala de pollo 1 mL de una solución estándar de cada compuesto. Se tomaron dos concentraciones, 4.2 y 0.6 mg/mL respectivamente. Después de permitir que la solución secase, se extrajo el compuesto de acuerdo al protocolo del nivel residual, y se cuantificó la cantidad recuperada de compuesto.

Resultados. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 35**. Todos los compuestos resultaron con un nivel residual equiparable o más alto que el CPC. Sólo uno de ellos, el compuesto **10**, demostró tener un nivel residual más bajo numéricamente, pero estadísticamente no hay diferencias con el CPC al comparar las medias obtenidas (prueba de $t = 1.49$, $t_{critica} = 2.77$, $\alpha = 0.05$).

Este resultado inesperado se puede explicar si se toma en cuenta que los compuestos de alquilpiridinio presentan una unión intrínseca a diferentes superficies, como sólidos en aguas residuales e inclusive metales. Pero también se ha señalado que las variables que intervienen principalmente son la hidrofobicidad y el contenido de carbón de ambos, el adsorbente y el soluto.⁷²

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que en este estudio se han considerado moléculas que son de mayor polaridad y Log P que el CPC y que su nivel residual es equiparable, puedo concluir que el nivel residual de los compuestos de alquilpiridinio no está correlacionado con la solubilidad en agua, y al mismo tiempo con la distribución del compuesto en fase acuosa y lípide.

Tabla 35. Nivel residual de los compuestos de Alquilpiridinio en carne de pollo^a

| Com. No. | Solución | Nivel residual (ppm) | Recobro (%±CV) | Log P |
|------------|----------|----------------------|----------------|-------------|
| 3 | nd | Nd | Nd | 2.712 |
| 10 | 0.05% | 12.598±0.415* | 98±1.55 | 1.569 |
| 11 | 0.05 % | 17.109±0.715 | Nd | 1.006 |
| 12 | nd | Nd | Nd | 0.527 |
| 14 | nd | Nd | Nd | nd |
| 18 | 0.05% | 16.225±0.638 | 80±17 | 1.115 |
| 19 | nd | nd | nd | 0.870 |
| CPC | 0.05% | 14.088±0.987 | 84.1±4.7 | 1.78 (1.71) |

^aPara cada compuesto se le determinó su curva estándar, el nivel residual es el resultado de tres determinaciones *No significativo estadísticamente al compararlo con el CPC, mediante t de Student, con $\alpha=0.05$

VI CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes que derivan de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, son las siguientes:

1.- Los estudios QSAR en dos dimensiones indicaron que la actividad antimicrobiana de los compuestos de alquilpiridinio esta correlacionada con el log P de manera bilineal, aunque la carga en el nitrógeno piridínico impidió el uso de estos modelos.

2.- En cambio, los modelos de CoMFA (3D-QSAR), generados con las estructuras moleculares de los 64 compuestos de alquilpiridinio reportados en la literatura, indicaron que la actividad antimicrobiana de estos compuestos está correlacionada con el efecto estérico más que el electrónico, y que en general, los cambios en la estructura de alquilpiridinio que impactan más en la actividad antimicrobiana son: el tamaño de la cadena lineal (óptima con cadenas entre 12 y 18 carbonos) y la sustitución en las posiciones 1 y 4 del anillo piridínico.

3.- En general, la actividad entre análogos con un solo sustituyente en diferentes posiciones del anillo de piridina son equiparables.

4.- Los modelos de CoMFA correlacionaron bien la actividad antimicrobiana y ayudaron al diseño de compuestos de alquilpiridinio con un mejor perfil de solubilidad en agua y de actividad potencial antimicrobiana.

5.- Se logró la síntesis de todos los compuestos seleccionados en el diseño molecular. Para cada uno de ellos, los datos espectroscópicos y espectrométricos, así como de análisis elemental, concordaron con la estructura esperada.

6.- Seis de los siete compuestos sintetizados resultaron ser nuevas estructuras químicas, sólo el compuesto **12** se encuentra reportado en la literatura.

7.- En general, todos los compuestos sintetizados presentaron un log P más bajo que el CPC, con lo cual su distribución en agua es mayor que en octanol.

8.- Los compuestos sintetizados resultaron ser activos, en el intervalo establecido por CoMFA, validando el método computacional.

9.- Los métodos de cuantificación del CPC por HPLC desarrollados fueron adecuados para determinar la cantidad remanente de CPC después de tratar al pollo, o a una manzana con una solución acuosa de CPC.

10.- Los métodos analíticos anteriores se extrapolaron satisfactoriamente para determinar el nivel residual de los compuestos recién sintetizados.

11.- El nivel residual de los compuestos preparados fue equiparable con el del CPC, con lo cual se puede concluir que el nivel residual en los compuestos de alquilpiridinio es independiente de su solubilidad en agua y de la polaridad de la superficie del alimento.

PERSPECTIVA.

Considerando la unión de los compuestos de alquilpiridinio a los alimentos es importante el investigar los factores que realmente tienen un impacto en esta unión, y, de manera colateral, establecer qué parte de la molécula es la que influye en la unión.

Una vez que esto sea esclarecido, se podría generar un mejor modelo de CoMFA, diseñar nuevas moléculas que logran disminuir el nivel residual y que contaran con una mayor actividad.

VII. PARTE EXPERIMENTAL

La investigación realizada en la presente tesis se llevó a cabo en dos Universidades.

En la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas, EUA, se realizaron: los estudios computacionales, en el Biopharmaceutical Visualization Center (BVC); el desarrollo de los métodos analíticos, en el laboratorio 230 y las evaluaciones microbiológicas, en el laboratorio 240. Lo anterior, bajo la dirección de los Drs. César y Lília Compadre.

En la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, conjunto E, Departamento de Farmacia, Lab. 122, se llevó a cabo la parte sintética del proyecto.

7.1. Estudios Computacionales

La parte correspondiente al modelado molecular se realizó en su primera fase en el BVC. Todos los cálculos de PM3, CoMFA (3D-QSAR), 2D-QSAR y Unity se realizaron con la paquetería de modelado molecular SYBYL 6.8, en una computadora Octane de Silicon Graphics.

7.2. Métodos Analíticos

La determinación del Log P se hizo en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo FT-IR-1600. Los análisis de HPLC se realizaron en un sistema de Waters Corp. (Milford, MA, USA) con los siguientes módulos: Sistema de Bombeo de Liberación de Multidisolventes Waters 600E (Multisolvent Delivery System Waters 600E), Detector Programable Multilongitud de Onda Waters 490E (Programmable Multiwavelength Detector Waters 490E), Modulo de Datos Waters 746 (Data Module Waters 746), y un Controlador del Sistema Waters 600E (System Controller Waters 600E).

La columna empleada fue una Alltima ciano (250 x 4.6 mm, 5 μ m) y un cartucho de precolumna de seguridad Alltima ciano (guard cartridge, 7.5 x 4.6 mm, 5 μ m) de Alltech Associates (Deerfield, IL, USA). Como fase móvil se empleo una mezcla 29:71 de metanol-buffer 0.008 M TMAHP (trimetoxiamonio pentahidratado) ajustado con ácido acético hasta un pH 3.6; a un velocidad de flujo de 1 mL/min. La molaridad el ácido acético fue de 0.14M. La detección ultravioleta se determinó a 260 nm. Cada corrida no duró más de 20 min.

7.3. Trabajo Microbiológico

La parte biológica se realizó en el laboratorio 240, el cual cuenta con todas las regulaciones para trabajar con microorganismos inocuos y patógenos.

7.4. Instrumentación

Muchas de las reacciones se hicieron en un reactor marca Parr (Parr Instruments, Illinois, USA) de 300 mL, con una presión de trabajo hasta de 2000 PSI.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de transformadas de Furier modelo FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio, las señales se reportan en cm^{-1} .

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se determinaron en un espectrofotómetro Varian Gemini 300 usando deuterocloroformo, sulfóxido de dimetilo o acetona como disolventes y tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se dan en ppm (δ). Los símbolos de las señales son: s = señal simple, sa = señal simple amplia, d = señal doble, t señal triple, sxt = señal séxtuple, m = señal múltiple; las constantes de acoplamiento se dan en Hertz (Hz).

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato Buchi Mod 530, y no están corregidos.

Para concentrar se empleó un evaporador rotatorio marca Buchi RE 11, con vacío generado con una bomba reciprocante Vacuum Sergeant mod 457 ajustada a 10 mm de Hg y condensador de hielo seco.

7.5. Cromatografía

Para la cromatografía en capa fina (ccf) se usaron placas de vidrio recubiertas con gel de sílice GF₂₅₄ de la casa Merck. Para la ccf de fase reversa se usaron placas recubiertas de gel de sílice C18 de la casa Merck.

Para la cromatografía en columna se utilizó una columna de vidrio de 18 cm por 2 cm de diámetro empacada con gel de sílice 60, gránulos de 0.2-05 mm, malla 35-70.

Para la cromatografía rápida de columna (Flash Column Chromatography) se utilizó el equipo de vidrio de la marca Aldrich, así como una bomba Marca Felisa de 200 psi de presión máxima. En ambas columnas se utilizó arena de Cancún previamente lavada con agua corriente, agua destilada y secada en la estufa a 80 °C toda la noche.

Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta y por exposición a vapores de yodo.

Los sistemas de elusión utilizados fueron los siguientes:

| SISTEMA | COMPOSICIÓN | PROPORCIÓN |
|---------|----------------------------------|----------------------|
| I | Hexano-Cloroformo-AcOEt | 50:35:15 |
| II | Hexano-AcOEt | 90:10 |
| III | Cloroformo-MeOH | 95:5 (1% AcOH) |
| IV | Cloroformo-MeOH-H ₂ O | 87:13:1 (1% de AcOH) |

7.5.2 Aislamiento de los compuestos finales mediante cromatografía rápida de columna (Flash Column Chromatography). Intercambio del contraión por el ion bromuro .

La mayoría de los compuestos finales se aislaron mediante la técnica de cromatografía rápida de columna (FCC), descrita por Bluhm.⁶³ Durante este procedimiento se intercambia el contra ión por bromuro, así, cuando se introduce el tosilato de alquilpiridinio el producto final es el bromuro de alquilpiridinio. Brevemente el procedimiento general que se siguió fue el siguiente:

Acondicionamiento de la columna. Se pesaron 20 g de gel de sílice para cromatografía rápida en columna (60, gránulos de 0.2-05 mm, malla 35-70) por gramo de compuesto, y se colocaron en un matraz con 160 mL de una solución al 6% de NaBr en metanol durante 5 minutos. La suspensión se adicionó a una columna para FCC (20 mm de diámetro interno) en la cual previamente se colocó un pedazo de algodón y una capa de arena de Cancún (5 cm de espesor). Una vez nivelada la columna se agregaron 50 mL de la solución de NaBr y enseguida se aplicó presión (10 psi) para llevar a sequedad. Una vez seca la columna se adicionó suficiente cloroformo para rehidratar la columna y se forzó la elusión con presión (20 psi) hasta la desaparición de las burbujas dentro de la columna.

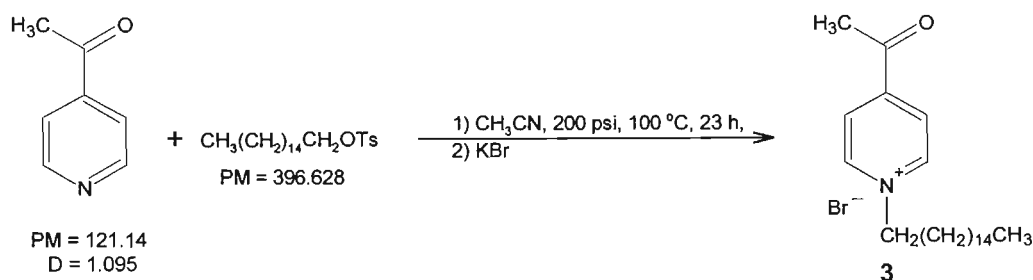
Aplicación de los compuestos a separar. Si el compuesto era soluble en cloroformo se preparó una solución concentrada del compuesto, y se eluyó sin presión, evitando que se secase la columna. En caso de que no fuera soluble, el compuesto se disolvió en acetona o metanol y se agregó 5 g de gel de sílice para FCC, la suspensión se agitó y se concentró a vacío.

El sólido, con el compuesto impregnado, se agregó a 50 mL de cloroformo y enseguida se adicionó a la columna. Una vez nivelada la columna se agregó otra capa de arena de Cancún (5 cm de espesor).

Elusión de los compuestos. Una vez aplicado el compuesto, la columna se eluyó con CHCl_3 -MeOH con un gradiente de 1% de metanol por cada 100 mL de cloroformo y con una presión tal que se eluyeran 2 pulgadas/min. La separación de los compuestos se siguió mediante cromatografía de capa fina, desactivando el gel de sílice con una solución de NaBr al 12 %. Generalmente se utilizaron de 800 a 1000 mL de fase móvil para la purificación. Durante la separación se intercambié el ión tosilato por el ión bromuro, lo cual se notó en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C . Las fracciones con el compuesto separado se juntaron y se concentraron a sequedad en el rotaevaporador. El sólido remanente se extrajo con cloroformo o acetona y se filtró para quitar el exceso de NaBr y gel de sílice. El filtrado se concentró aproximadamente a 1 mL y se indujo la cristalización con el cosolvente indicado para cada compuesto.

7.6 Métodos Sintéticos

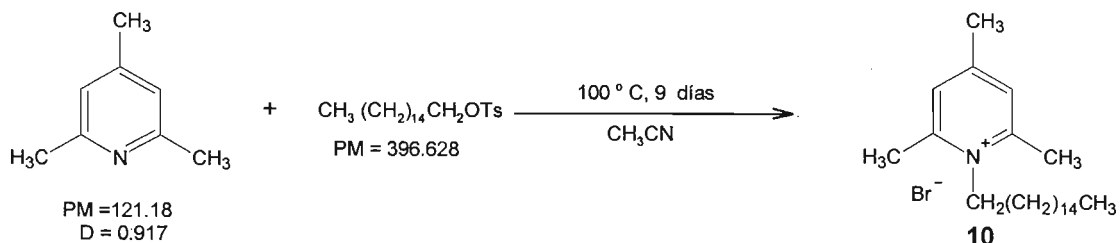
7.6.1. Bromuro de 4-acetil-1-hexadecilpiridinio (3)



En un reactor Parr de 300 mL se colocaron 2.40 mL (2.628 g, 21.7 mmol) de 4-acetilpiridina, 8.4 g (21.2 mmol) de tosilato de cetilo y 200 mL de acetonitrilo. Se cerró el reactor, se le inyectaron 200 psi de nitrógeno y se calentó a 130 °C por espacio de 23 h. Pasado este tiempo se dejó enfriar y el contenido se concentró en el rotaevaporador hasta 10 mL, se diluyó con 50 mL de éter y la mezcla se guardó en el congelador. Después de 10 h de enfriamiento se colectaron unas lentejuelas crema (7.5 g, 70%), dos manchas en la CCF. Una parte (4 g) del compuesto se disolvió en cloroformo y se separó por cromatografía en columna rápida, previamente acondicionada (ver sección 7.5.2), utilizando como sistema eluyente una mezcla de cloroformo-metanol en un gradiente de 0 a 10%. Se recolectaron 20 fracciones de 200 mL cada una, las cuales se llevaron a sequedad en el rataevaporador. Las fracciones 9 a 16, que contenían al compuesto deseado, se extrajeron con acetona, los extractos reunidos se concentraron hasta 2 mL y se indujo la cristalización por adición de éter. El compuesto **3** se obtuvo como agujas color paja (1.5 g, 37%) con un pf de 88-89.3 °C

Su espectro de RMN ¹H (**No 01**) mostró señales en 9.67 (dd, 2H, J = 6 Hz) 8.52 (dd, 2H, J = 6 Hz), 5.058 (t, 2H, ⁺N-CH₂), 2.80 (s, 3H, CH₃-C=O) 2.05 (m, 2H, ⁺N-CH₂-CH₂), 1.233 (m, 26H, H en la cadena), 0.861 (t, 3H, CH₃ de la cadena). El espectro de masas (**No 02**), mediante la técnica de Fab (catiónica), presentó el M⁺ de 346, concordante con el peso molecular del catión piridinio esperado El análisis elemental resultó ser el esperado para la estructura. (Calculado: %C: 71.26, %H: 10.25, %N: 3.96; encontrado: %C: 7.18, %H, 10.24, %N: 3.86).

7.6.2. Bromuro de 1-hexadecil-2,4,6-trimetilpiridinio (10)

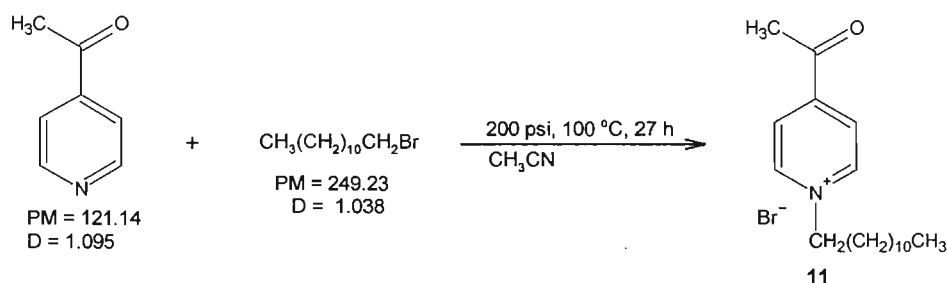


En un reactor Parr se colocaron 12.6 g (31.8 mmol) de tosilato de hexadecilo, 4.8 mL (4.40 g, 36.3 mmol) de 2,4,6-colidina y 150 mL de acetonitrilo. La mezcla se agitó mecánicamente y se calentó a 100 °C durante 9 días. Después de este tiempo la reacción se concentró y se vertió sobre 200 mL de éter frío. Luego de 5 h en el congelador se recolectaron 6.5 g de un sólido blanco, el cual mostró dos manchas principales en CCF. Se pesó 1 g del sólido obtenido y se separó mediante cromatografía en columna rápida previamente acondicionada con KBr (ver sección 7.5.2), empleando una fase móvil de cloroformo-metanol en un gradiente de 1% de metanol cada 100 mL hasta llegar a un 10% total. Después de 21 fracciones se obtuvieron 0.5 g del compuesto **10**. Este sólido amorfo se disolvió en 20 mL de acetona y se filtró para remover el gel de sílice disuelto por el metanol. La solución incolora se concentró a 2 mL, y se indujo la recristalización con 7 mL de éter.

El compuesto **10** se obtuvo como agujas cristalinas blancas, un solo producto por CCF, con un punto de fusión de 106.3-106.9 °C. Su espectro de RMN ¹H (**No 03**) mostró señales en 7.6 (s, 2H, H arom), 4.6 (t, 2H, ⁺N-CH₂), 2.95 (s, 6H, CH₃ arom *orto*), 2.55 (s, 3H, CH₃ arom *para*), 1.76 (sext, 1H, ⁺N-CH₂-CH₂), 1.53 (sext, 2H, ⁺N-CH₂-CH₂-CH₂), 1.4-1.2 (m, 22H, CH₂ cadena), 0.88 (s, 3H, CH₃).

Su espectro (**No 04**) de RMN ^{13}C presentó señales en: 157.45 ($\text{C}_{2,6}$ piridina), 153.96 (C_4 piridina), 128.93 ($\text{C}_{3,5}$ piridina), 53.45 ($^+\text{N-C}$), 31.80 (C_2 cadena), 29.55-29.45 (C_{3-7}), 29.13 (C_8 cadena), 28.95 (C_9 cadena), 29.361 (C_9 cadena), 29.27 (C_{11} y 10 cadena), 28.00 (C_{12} cadena), 28.79 (C_{13} cadena), 26.63 (C_{14} cadena), 22.57 (C_{15} cadena), 21.68 (CH_3 *orto* en anillo de piridina), 21.59 (CH_3 *para* en anillo de piridina) y 14.01 (C_{16} cadena). El análisis elemental concordó con lo esperado (calculado: %C: 67.58, %H: 10.40, %N: 3.28; encontrado %C: 67.92, %H: 10.89, %N: 3.25)

7.6.3. Bromuro de 4-acetil-1-dodecilpiridinio (11)

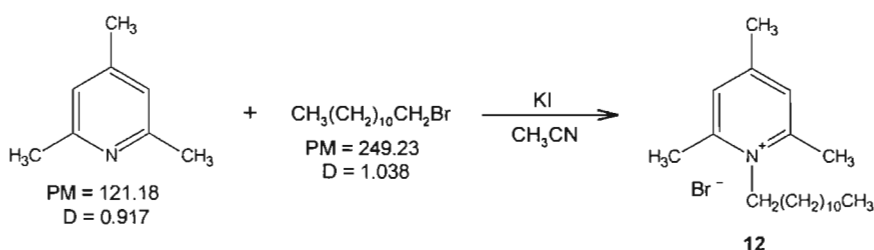


En un reactor Parr de 300 mL se disolvieron 3.3 mL (3.61 g, 29.8 mmol) de 4-acetilpiridina recién destilada (p.eb. 79-80 °C a 6 mmHg) y 6.7 mL (6.95 g, 27.9 mmol) de bromuro de dodecilo en 50 mL de acetonitrilo. Se cerró el reactor, se le inyectó 200 psi de nitrógeno y se calentó a 100 °C por espacio de 27 h. Pasado este tiempo se dejó enfriar y el contenido se concentró en el rotaevaporador hasta 10 mL, luego, se le adicionaron 70 mL de éter. El sólido amorfo amarillo obtenido se disolvió en etanol y se trató con carbón activado. Después de filtrar, la solución se concentró a 3 mL y se indujo la cristalización con éter. Se obtuvieron 2.0 g de un sólido color paja (pf 82-83 °C). Un espectro de RMN ^1H de este sólido presentó una impureza menor al 0.1 %.

Su análisis elemental corroboró la pureza del compuesto, por lo que se empleó como tal para pruebas biológicas.

El espectro de RMN ^1H (**No 05**) presentó señales en 9.7 (dd, 2H arom, H_{orto} piridina, $J = 6$ Hz), 8.60 (dd, 2H arom, H_{meta} , $J = 6$ Hz.), 5.0 (t, 2H, $^+\text{N}-\underline{\text{CH}_2}$), 2.8 (s, 3H, CH_3 grupo cetona), 2.01 (m, 2H, $^+\text{N}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}$), 1.13 (m, 10H, CH_2 cadena), 0.92 (s, 3H, CH_3). El análisis elemental correspondió con lo esperado. (Calculado: %C: 61.62, %H: 8.71, N: 3.78; encontrado: %C: 61.68, %H: 8.70, %N: 3.99).

7.6.4. Bromuro de 1-dodecil-2,4,6-trimetilpiridinio (12)



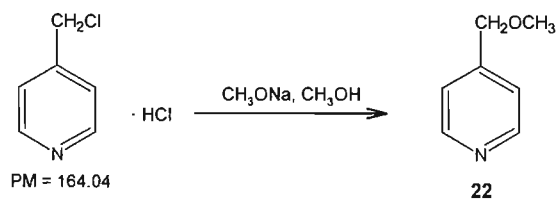
En un matraz de bola de 100 mL se mezclaron 4.36 g, 17.5 mmol) de bromuro de dodecilo, 3.5 mL (3.21 g, 26.5 mmol) de 2,4,6-colidina y 1 % de yoduro de potasio como catalizador. La mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 24 h, luego, se le adicionaron 50 mL de acetonitrilo y se llevó a reflujo, donde se mantuvo por 14 días. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar y se concentró a presión reducida. Al líquido remanente (10 mL) se le adicionaron 50 mL de éter y se dejó enfriando toda la noche. Al día siguiente, la mezcla se filtró, el sólido obtenido se lavó con éter y se dejó secar al vacío. Se obtuvieron 1.058 g (20.81 %) de un sólido color crema.

Este producto se recristalizó de etanol/acetato de etilo. Se obtuvo ahora un sólido color púrpura (0.850 g). Una segunda recristalización de este producto con etanol/éter dio unos cristales finos blancos (0.70 g), dos compuestos por HPLC: el principal, con $t_r = 5.82$ min y uno secundario, con $t_r = 8.23$ min. La mezcla anterior se separó por cromatografía en columna en fase normal, con gel de sílice (desactivada con agua) como fase estacionaria y una mezcla de cloroformo-metanol (95:5) como fase móvil. Después de recolectar 42 fracciones de 25 mL, se detectó el compuesto principal en las fracciones 17-38. Estas fracciones se juntaron y se concentraron a presión reducida hasta poco volumen, se adicionó acetato de etilo y se indujo la cristalización. Se obtuvieron 495 mg, de unas hojuelas blancas con un punto de fusión de 92-94 °C.

El espectro de RMN ^1H (**No 06**) mostró señales en 7.6 (s, 2H, H-arom), 4.6 (m, 2H, $^+\text{N-CH}_2$), 2.95 (s, 6H, CH_3 arom_{orto}), 2.55 (s, 3H, CH_3 arom_{para}), 1.98 (s, 1H, $^+\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.78 (m, 2H, $^+\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.45 (m, 2H, $^+\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$) 1.13 (m, 14H, CH_2 cadena), 0.92 (s, 3H, CH_3).

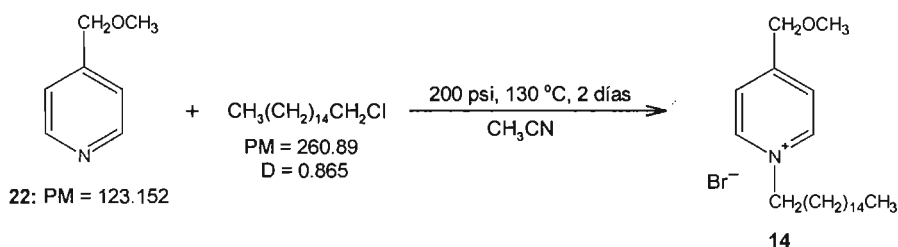
El espectro de RMN ^{13}C (**No 7**) presentó señales en 157 ($\text{C}_{2,6}$ piridina), 154 (C_4 piridina), 129.03 ($\text{C}_{3,5}$ piridina), 53.55 ($^+\text{N-C}$), 31.72 (C_2 cadena), 29.40 (C_{10} cadena), 29.28 ($\text{C}_{5,6}$ cadena), 29.21 (C_7 cadena), 29.13 (C_8 cadena), 28.95 (C_9 cadena), 28.73 (C_4 cadena), 26.67 (CH_3 orto en anillo de piridina), 22.49 (C_3 cadena), 21.64 (C_{11} cadena), 21.49 (CH_3 para en anillo de piridina) y 13.91 (C_{12} cadena). El análisis elemental concuerda con lo esperado (calculado: %C: 64.83, %H: 9.80, %N: 3.78; encontrado %C: 64.63, %H: 10.13, %N: 4.00)

7.6.5. 4-(Metoximetil)piridina (22)



En un matraz "Kontes Taper" de 125 mL; acondicionado con termómetro, condensador de aire en posición de reflujo con un globo con nitrógeno en su extremo y un embudo de adición; se colocaron 1.5 g (0.0652 atom-g) de sodio metálico recién cortado y se gotearon 25 mL de metanol absoluto. La adición del metanol se hizo a una velocidad tal que se llegó hasta el reflujo suave. Después de que se disolvió todo el sodio, la mezcla de reacción se enfrió con un baño de hielo y luego se goteó una solución de 5 g (0.030 mol) de clorhidrato del cloruro de 4-picolilo [clorhidrato de 4-(clorometil)piridina] disueltos en 25 mL de metanol absoluto. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 72 h, controlando la total desaparición de la materia prima por CCF; después de que terminó la reacción, ésta se filtró y concentró a sequedad. El aceite residual se destiló de bulbo a bulbo. Se obtuvieron 2.0 g (40%) de un líquido incoloro. Su punto de ebullición (90-97 °C, 6 mmHg) y el espectro de RMN ¹H fueron concordantes con lo reportado en la literatura para la 4-(metoximetil)piridina.⁵⁹

7.6.6. Bromuro de 1-hexadecil-4-(metoximetil)piridina (**14**)

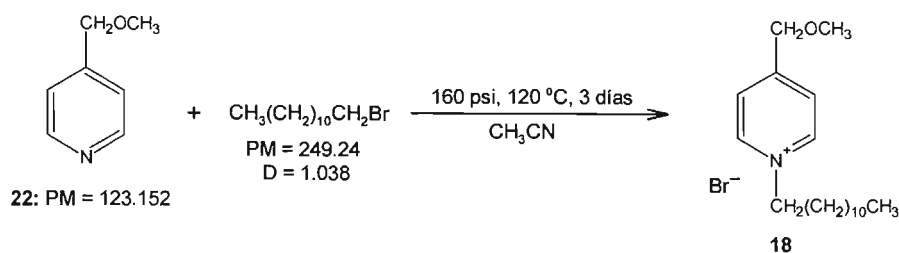


En un reactor Parr de 300 mL se colocaron 5.5 mL (4.76 g, 18.2 mmol) de cloruro de hexadecilo, 2 g (16.2 mmol) de 4-(metoximetil)piridina (**22**) y 150 mL de acetonitrilo. Una vez cerrado el reactor se le inyectaron 200 psi de nitr\u00f3geno y se calent\u00f3 a 130 °C con agitaci\u00f3n mec\u00e1nica durante 2 d\u00edas. Despu\u00e9s, la mezcla de reacci\u00f3n se concentr\u00f3, se verti\u00f3 sobre \u00e9ter y se guard\u00f3 en el congelador toda la noche. La suspensi\u00f3n obtenida se filtr\u00f3 y se lav\u00f3 con \u00e9ter fr\u00edo, dando 1.6 g (25.7%) de un s\u00f3lido rojo que en CCF presento dos manchas.

La mezcla anterior se separ\u00f3 mediante cromatograf\u00eda en columna r\u00e1pida acondicionada con KBr, empleando como disolvente cloroformo-metanol, con un gradiente de metanol del 1% cada 250 mL hasta llegar a un 10%. S\u00f3lo las fracciones 9 y 10 presentaron al compuesto deseado puro. De esta reacci\u00f3n se obtuvieron 600 mg de un s\u00f3lido blanco rojizo. Sucesivas recristalizaciones llevaron a **14**, que cristaliz\u00f3 como agujas blanquecinas con un pf de 72-76 °C.

El espectro (**No 8**) de RMN ¹H present\u00f3 se\u00f1ales en 9.38 (d, 2H, H arom, 2,6-piridina), 8.06 (d, 2H, H arom, 3,5-piridina), 4.97 (t, 2H, ⁺N-CH₂), 4.75 (s, 2H, CH₂-O), 3.53 (s, 3H, CH₃-O), 2.02 (sext, 2H, ⁺N-CH₂-CH₂), 1.4-1.2 (m, 26H, CH₂ cadena), 0.875 (s, 3H, CH₃).

7.6.7. Bromuro de 1-dodecil-4-(metoximetil)piridina (**18**)

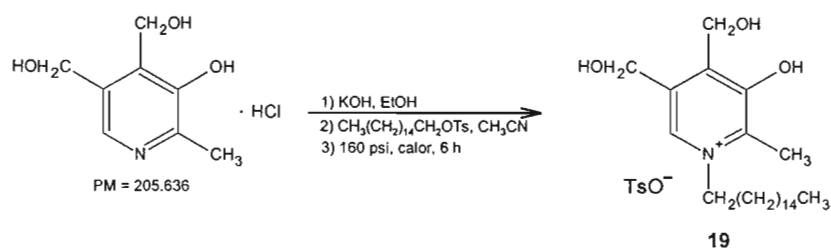


En un reactor Parr de 300 mL, se colocaron 5 mL (5.19 g, 20.8 mmol) de bromuro de dodecilo, 2 g (16.2 mmol) de 4-(metoximetil)piridina (**22**) y 150 mL de acetonitrilo. Una vez cerrado el reactor se le inyectaron 160 psi de nitr\u00f3geno y se calent\u00f3 a 120 °C en agitaci\u00f3n mec\u00e1nica durante 3 d\u00edas. Despu\u00e9s de este el tiempo, la mezcla de reacci\u00f3n se concentr\u00f3, se verti\u00f3 sobre \u00e9ter y se guard\u00f3 en el congelador toda la noche. La suspensi\u00f3n obtenida se filtr\u00f3 y se lav\u00f3 con \u00e9ter fr\u00edo, dando 4.0 g de un s\u00f3lido caf\u00e9, dos manchas por CCF, una de ellas correspondiente al producto esperado. El producto crudo se separ\u00f3 mediante cromatograf\u00eda en columna r\u00e1pida, utilizando gel de s\u00edlice tratada con soluci\u00f3n metan\u00f3lica de NaBr al 12%, el disolvente de elusi\u00f3n fue cloroformo-metanol, con un gradiente de 0 a 10% de metanol.

El compuesto parcialmente puro se obtuvo en las fracciones 4-20 (40 mL): Las fracciones recolectadas se concentraron a sequedad y el s\u00f3lido blanquecino resultante se disolvi\u00f3 en 30 mL de acetona. La soluci\u00f3n se filtr\u00f3 y se concentr\u00f3 a 2 mL, para enseguida inducir la cristalizaci\u00f3n con \u00e9ter. El compuesto **18** cristaliz\u00f3 como agujas blancas con un pf de 69-70 °C, una sola mancha por CCF. Su espectro (**No 9**) de RMN ¹H present\u00f3 se\u00f1ales en 9.46 (d, 2H, H arom, 2,6-piridina), 8.05 (d, 2H, H arom, 3,5-piridina), 4.97 (t, 2H, ⁺N-CH₂), 4.75 (s, 2H, CH₂-O), 3.53 (s, 3H, CH₃-O), 2.02 (sext, 2H, ⁺N-CH₂-CH₂), 1.4-1.2 (m, 18H, CH₂ cadena), 0.875 (s, 3H, CH₃).

El espectro (**No 10**) de masas, mediante la técnica de Fab (catiónica), presentó el M^+ de 292, concordante con el peso molecular del catión piridinio esperado. El análisis elemental concordó con el esperado (calculado: %C: 61.28, %H: 9.20, %N: 3.76; encontrado %C: 60.50, %H: 9.32, %N: 3.699).

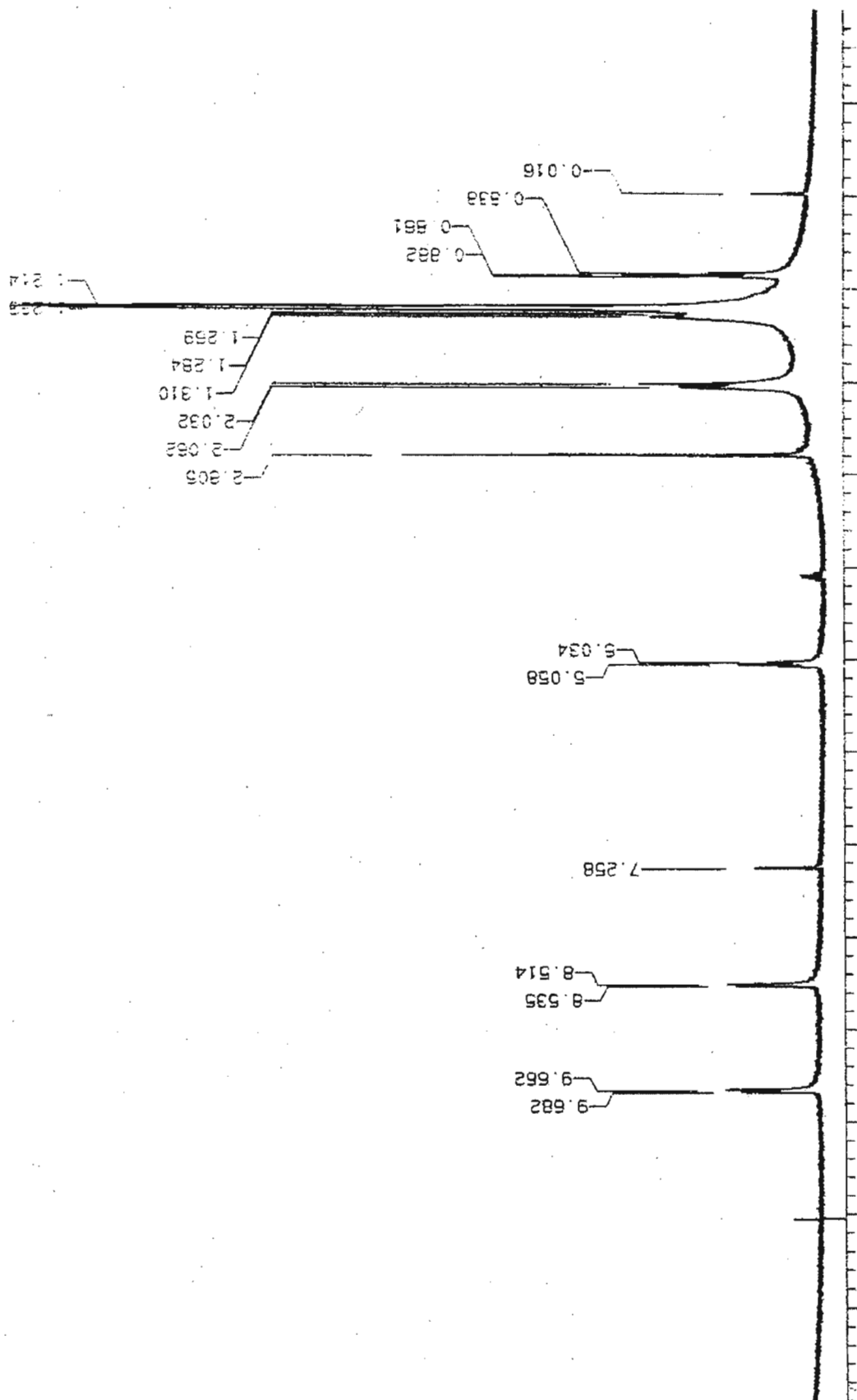
7.6.6. Tosilato de 1-hexadecil-4-hidroxi-3,4-bis(hidroximetil)-2-metilpiridinio (19)



En un matraz de 500 mL se disolvieron 4 g de clorhidrato de piridoxina (19.5 mmol) en 250 mL de etanol. Después 30 minutos de agitación se adicionaron 1.09 g (19.5 mmol) de hidróxido de potasio, disueltos en 25 mL de etanol. La mezcla se agitó por espacio de 1 h y después se concentró a sequedad. El sólido blanco obtenido se transfirió a un reactor Parr de 300 mL, se agregaron 7.7 g (19.4 mmol) de tosilato de hexadecilo y 100 mL de acetonitrilo. Se cerró el reactor y se le inyectó 160 psi de N_2 . Todo el sistema en agitación mecánica se calentó por espacio de 6 h, tiempo en el cual la reacción transparente se tornó roja, y al analizarlas por CCF se observaron 4 manchas. Esta mezcla de reacción se enfrió, se vertió sobre éter frío y se guardó en el congelador por dos horas. La suspensión obtenida se filtró y lavó con éter frío. El sólido blanco obtenido se disolvió en cloroformo y se filtró para eliminar la piridoxina.

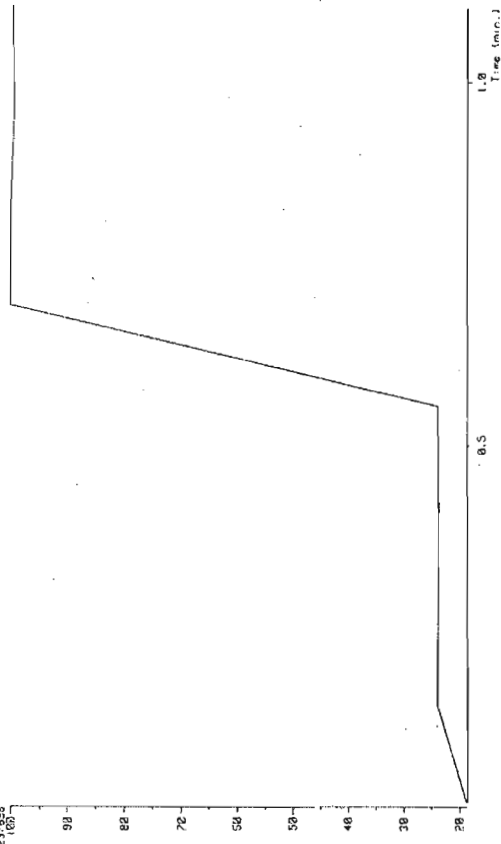
El líquido remanente se separó mediante cromatografía en columna rápida. Se empleó una mezcla de cloroformo-metanol 90:10, en un gradiente de 0 a 10% de metanol, incrementando 2 % cada 300 mL de fase móvil adicionada. Después de 20 fracciones, se aisló **19** en las fracciones 3-16 (fracciones de 40 mL). Las fracciones se concentraron a sequedad y el sólido blanco (1.7 g, 10% de rendimiento global) se extrajo con cloroformo (40 mL). La solución resultante se filtró y la solución clara se concentró en el rotaevaporador. El compuesto se recristalizó de acetona-éter, dando agujas color paja con un pf de 118-120 °C.

Su espectro (**No 11**) de RMN ^1H mostró señales en 8.06 (s, 1H, H arom, H _{pirido}), 7.45 (d, 2H, H arom, *orto* al sulfonato, del TSO⁻), 7.05 (d, 2H, H arom, *orto* al metilo, del TSO⁻), 5.74 (s, 1H, HO-piridoxina), 4.798 (s, 2H, Ar-CH₂-O piridoxina), 4.67 (s, 2H, Ar-CH₂-O piridoxina), 4.52 (t, 2H, ⁺N-CH₂), 2.617 (s, 3H, CH₃ arom, TSO⁻), 2.271 (s, 3H, CH₃-arom, piridoxina), 1.760 (sext, 2H, ⁺N-CH₂-CH₂), 1.284-1.20 (m, 26H, CH₂ cadena), 0.838 (s, 3H, CH₃). Su espectro (**No 12**) de masas (FAB⁺), dio un M⁺ concordante con el peso molecular del catión piridinio (M/z = 394). El análisis elemental determinado es similar con el esperado: Calculado: %C: 65.81, %H: 9.09, %N: 2.48, encontrado %C: 65.68, %H: 9.14, %N: 2.52,

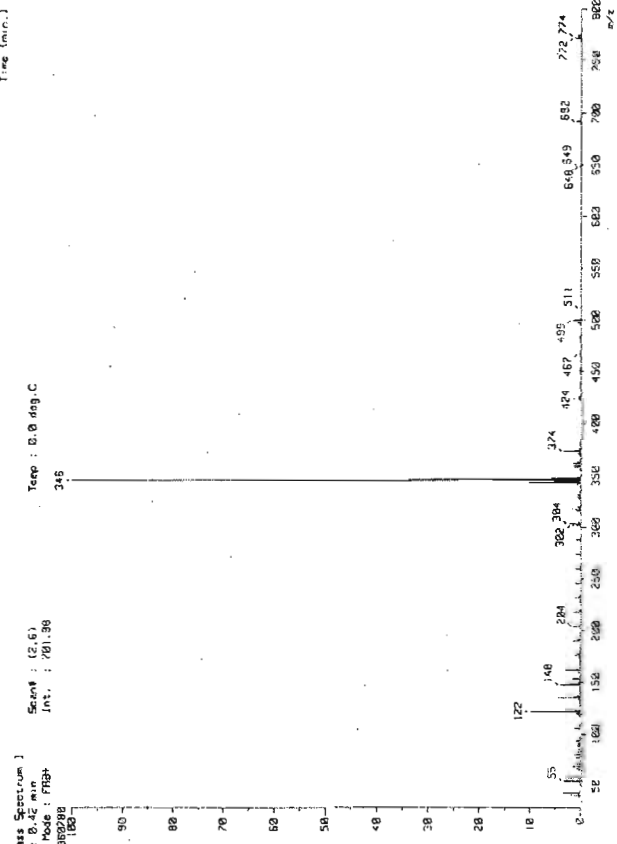


ESPECTRO No. 01. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H DEL BROMURO DE 4-ACETIL-1-
HEXADECILPIRIDINIO (3)

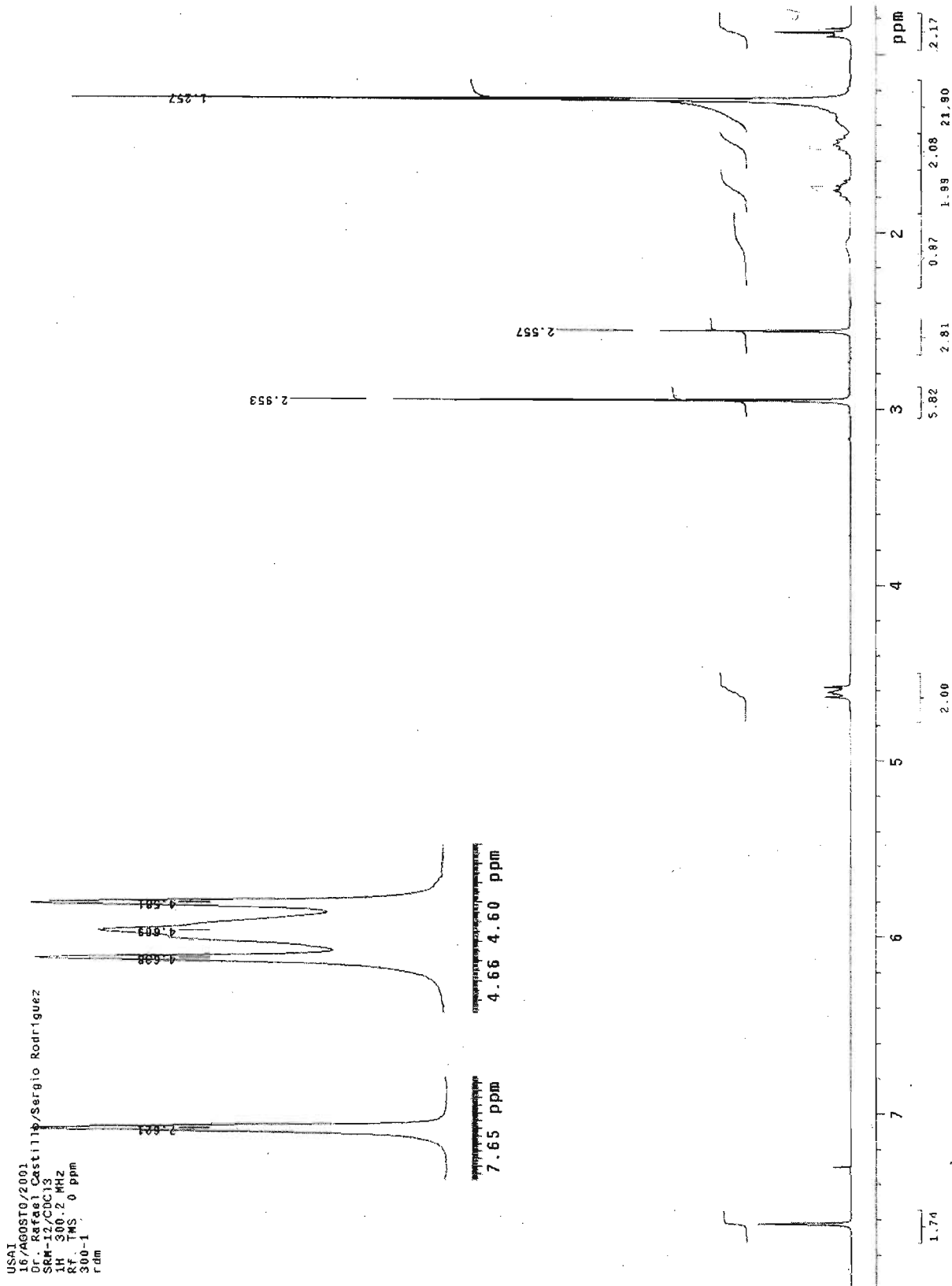
[TIC]
 Date : 015441_SRM-3_001 Date : 12-Oct-1992 02:56
 Sample: MATRIZ:OL.CCROL
 Note : Uniao de Servicos de Apoio e de Investigacion (USRI), F. O. UNIF
 File : Disc: Normal Ion (F-F-L-mxar)
 TIC Range : m/z 10 to 2882 Output: RT Range : 0.00 to 1.10 min
 53237855



[Mass Spectrum]
 RT : 0.42 min Scan# : (2,6)
 Ion Mode : FISH Int. : 781.96



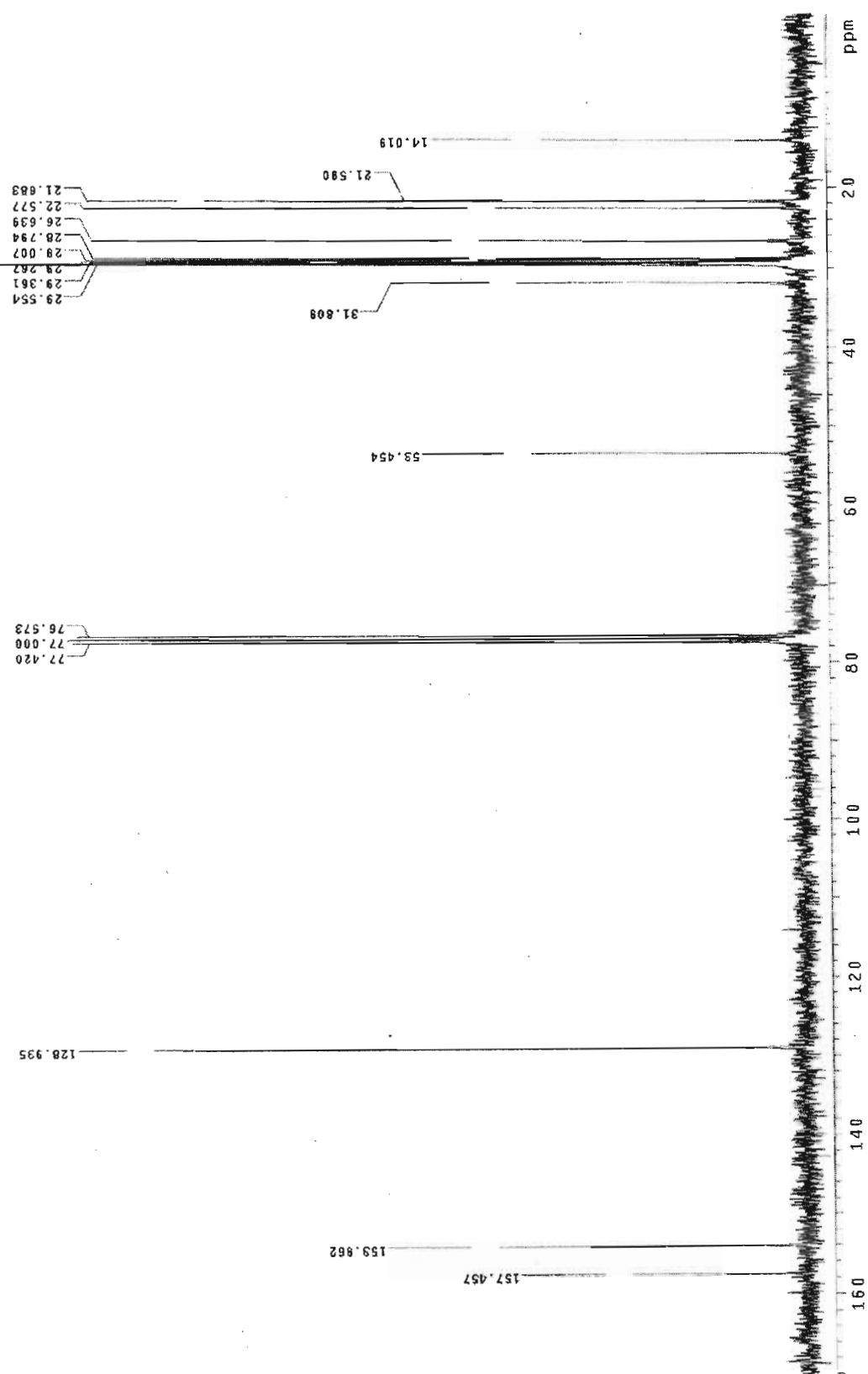
ESPECTRO No. 02. CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A MASAS (TECNICA FAB+) DEL BROMURO DE 4-ACETIL-1-HEXADECILPIRIDINIO (3)



USA1
16/AGOSTO/2001
Dr. Rafael Castillo/Sergio Rodriguez
SRM-12/CUC13
1H 300.2 MHz
Rf. TMS 0 ppm
300-1
rdm

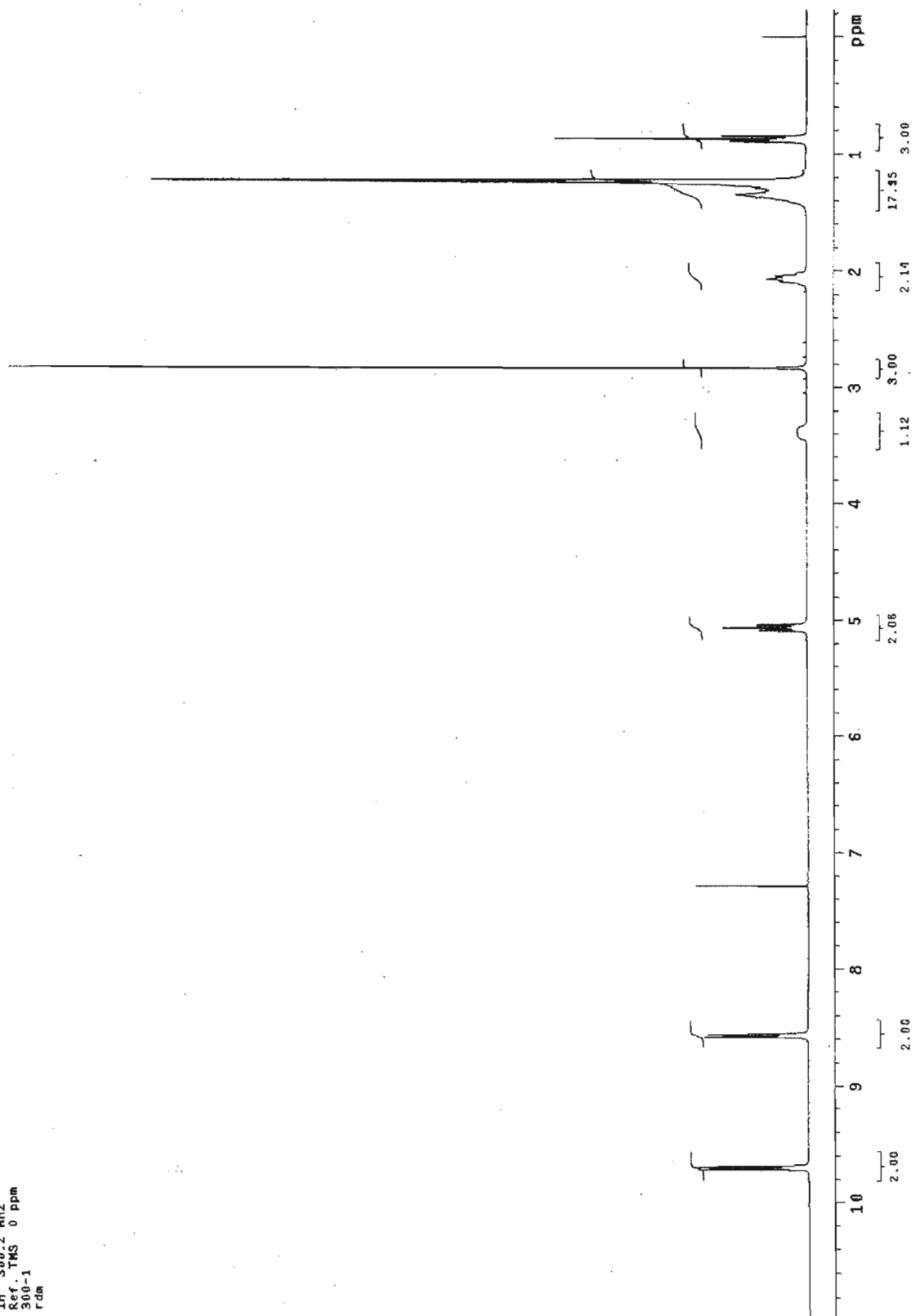
ESPECTRO No. 03. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H DEL BROMURO DE 1-HEXADECIL-2,4,6-TRIMETILPIRIDINIO (10)

ESPECTRO No. 04. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³C DEL BROMURO DE 1-HEXADECIL-2,4,6-TRIMETILPIRIDINIO (10)

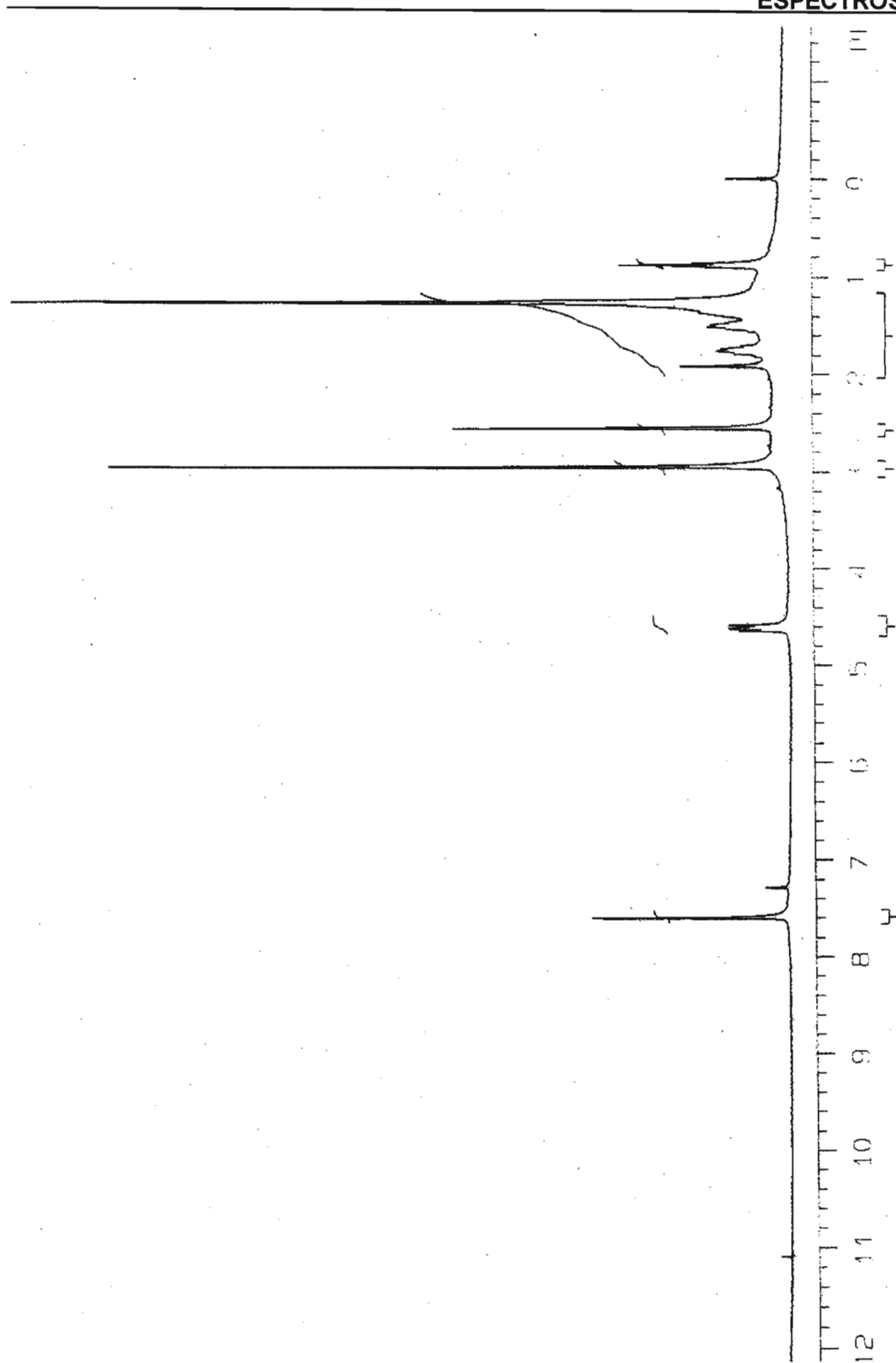


USAT
16/AGOSTO/2001
Dr. Rafael Castillo/Sergio Rodriguez
SRM-12/CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC19 77 ppm
300-1
rdm

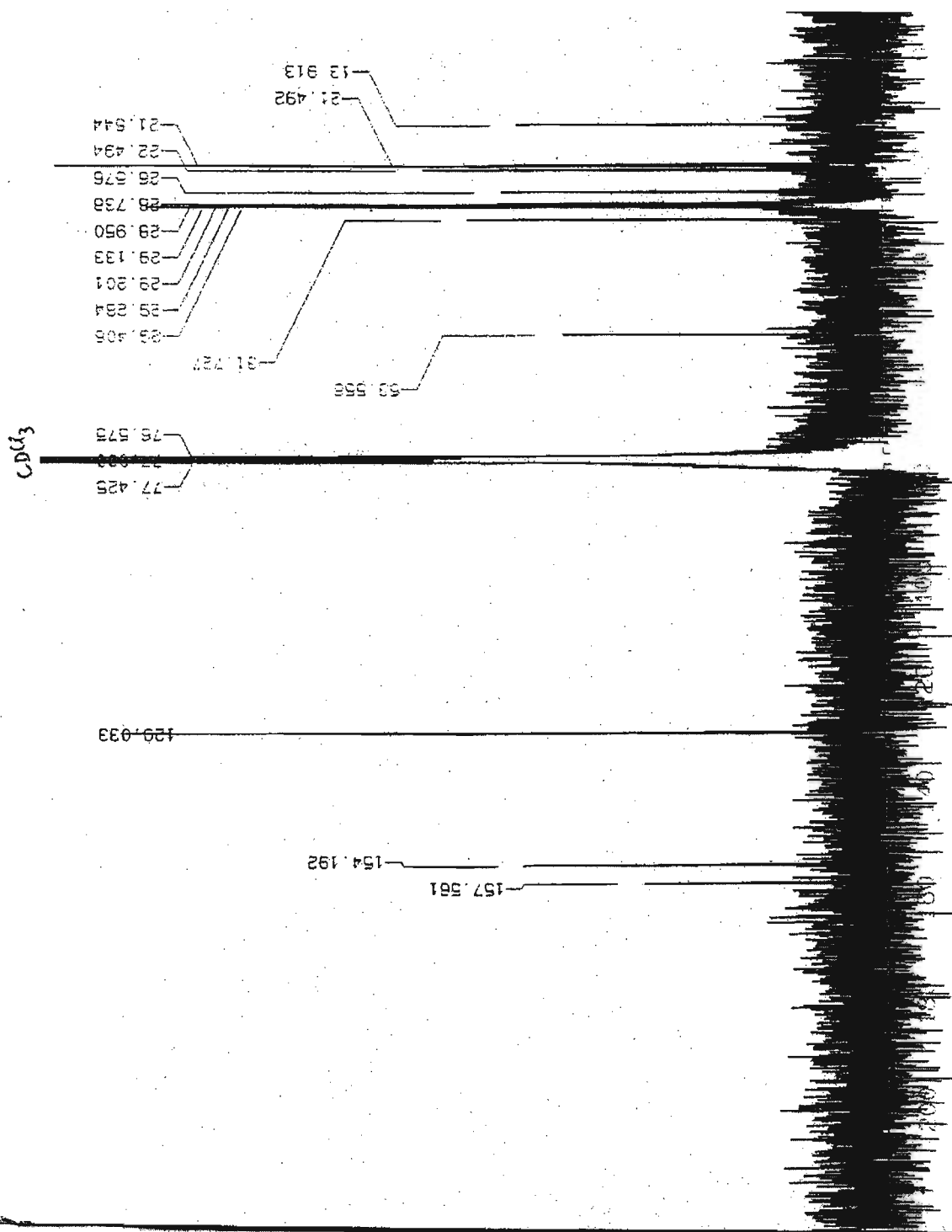
USAI
21/NOVIEMBRE/2001
Dr. Rafael Castillo/Sergio Rodriguez
SR4-LGac/CUC13
1H 300.2 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-1
rdm



ESPECTRO No. 05. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H DEL BROMURO DE 1-DODECIL-4-ACETILPIRIDINIO (11)

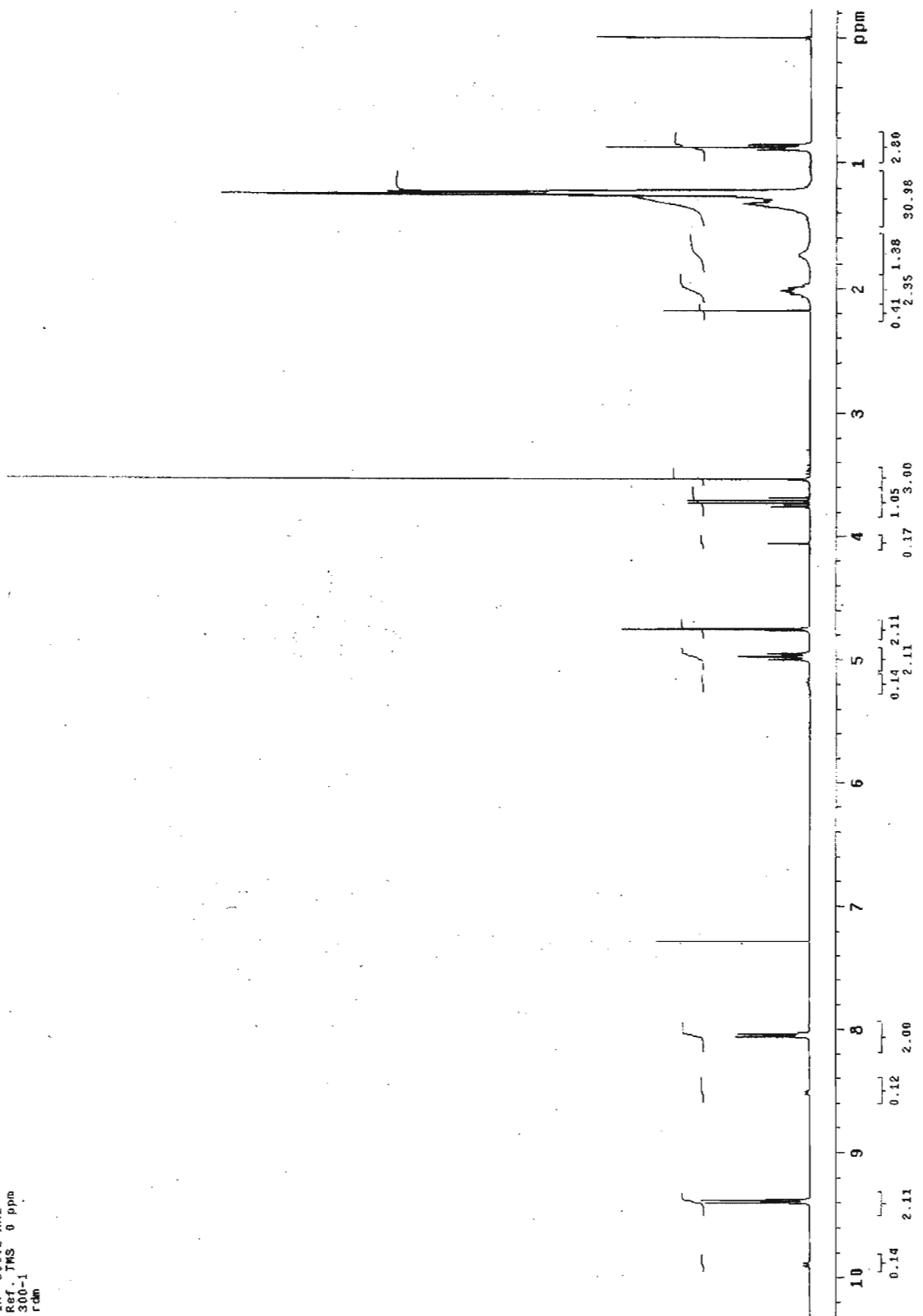


ESPECTRO No. 06. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H DEL BROMURO DE 1-DODECIL-2,4,6-TRIMETILPIRIDINIO (12)



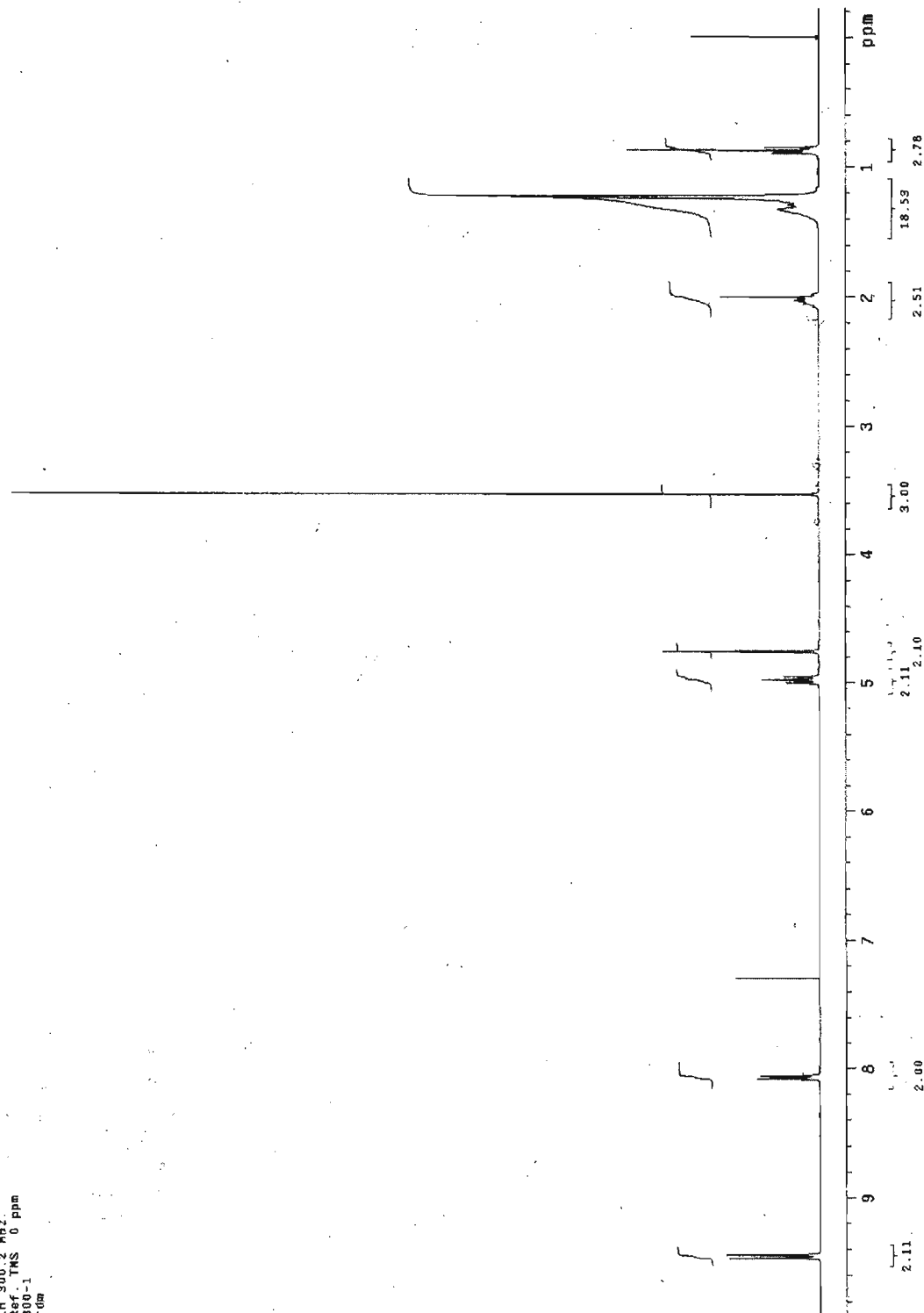
ESPECTRO No. 7. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³C DEL BROMURO DE 1-DODECIL-2,4,6-TRIMETILPIRIDINIO (12)

USAI
 02/MAYO/2002
 Dr. Rafael Castillo/Sergio Rodríguez
 LPHF-15/CUC13
 1H 300.2 MHz
 Ref. TMS 0 ppm
 300-1
 run

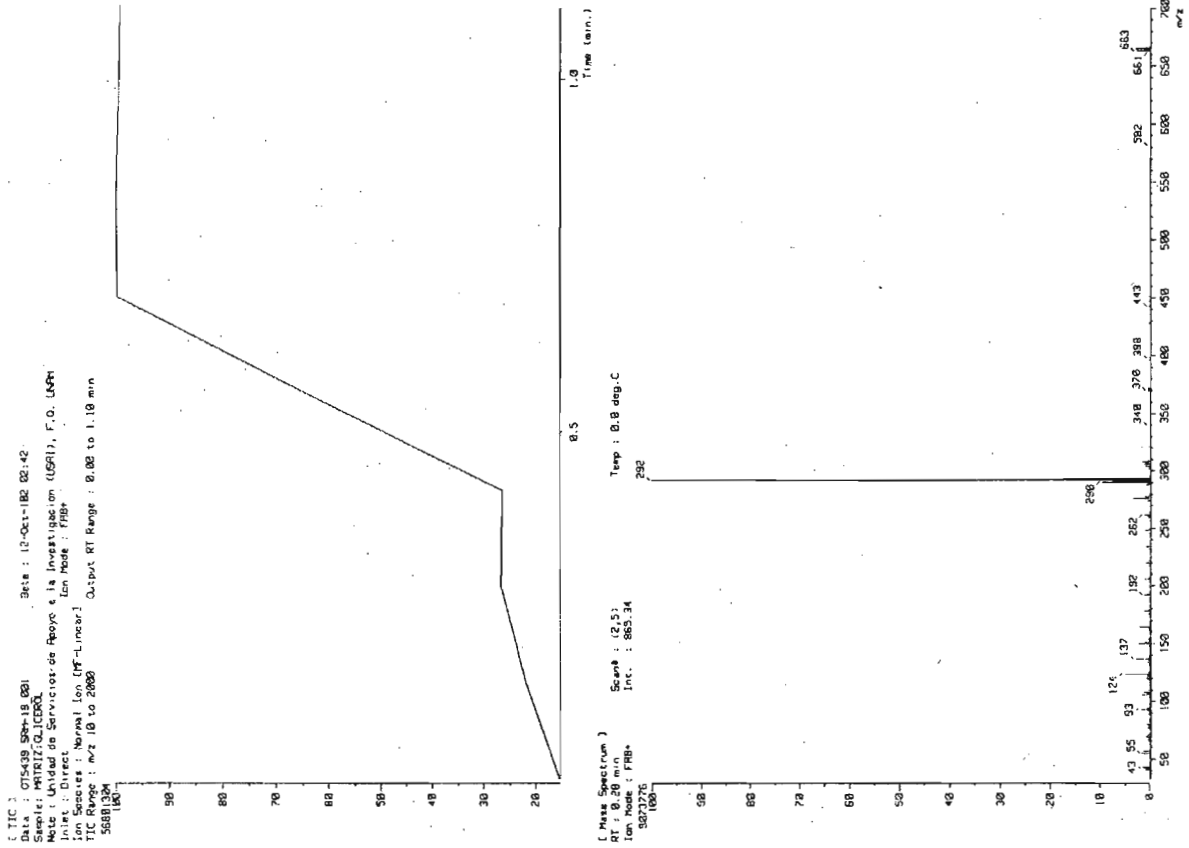


ESPECTRO No. 8. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H DEL BROMURO DE 1-HEXADECIL-4-(METOXIMETIL)PIRIDINIO (14)

ISAT
 13/MAYO/2002
 Dr. Rafael Castillo/Sergio Rodriguez
 .PME-14/CDC13
 LH 300.2 MHz
 Ref. TMS 0 ppm
 300-1
 .0m

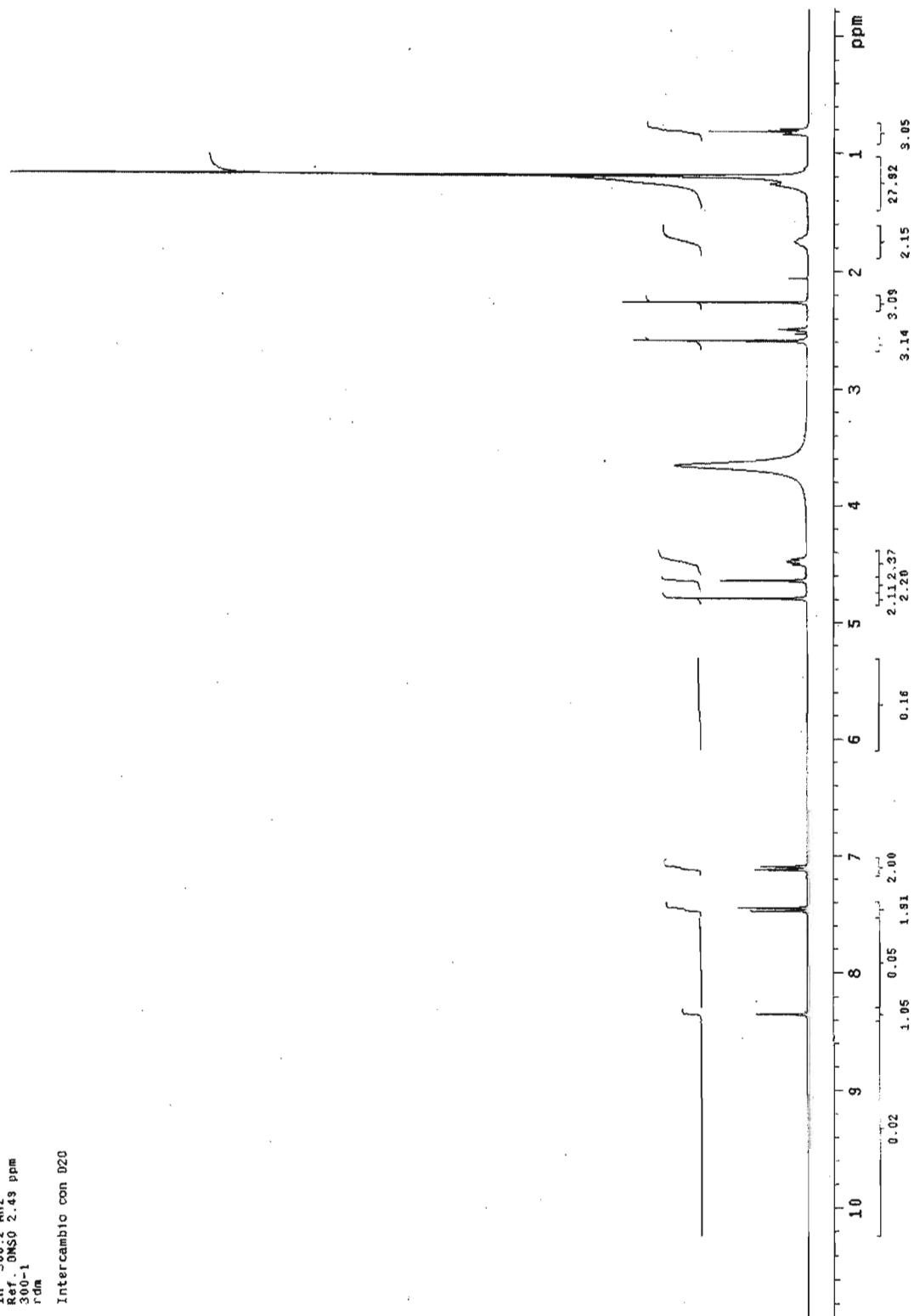


ESPECTRO No. 9. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H DEL BROMURO DE 1-DODECIL-4-(METOXIMETIL)PIRIDINIO (18)

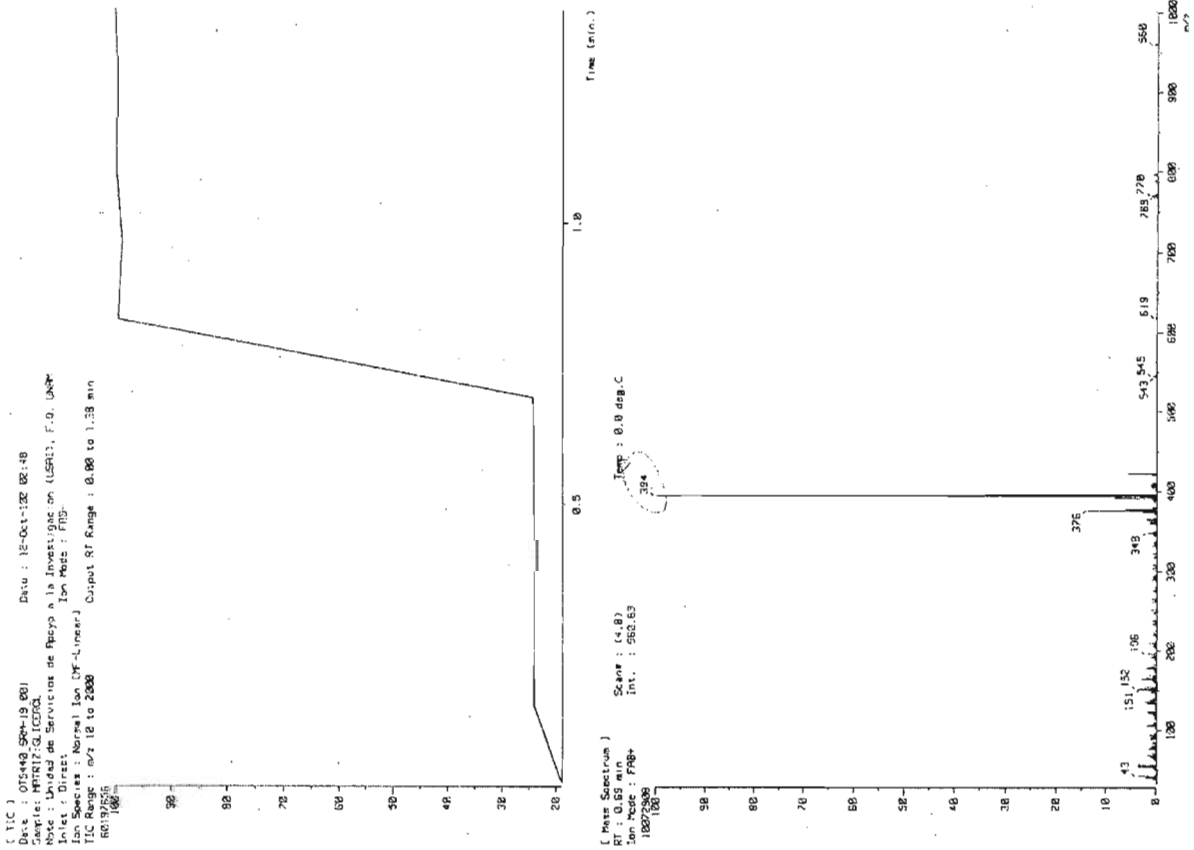


ESPECTRO No. 10. CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A MASAS (TECNICA FAB+) DEL BROMURO DE 1-DODECIL-4-(METOXIMETIL)PIRIDINIO (18)

USAI
 14/OCTUBRE/2002
 Ref: Ref. Castillo/Sergio Rodriguez
 Sol: DMSO
 JH: 300.2 MHz
 Ref: DMSO 2.49 ppm
 300-1
 rdm
 Intercambio con D2O



ESPECTRO No. 11. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE ¹H DEL TOSILATO DE 1-HEXADECIL 4-HIDROXI-3,4-BIS(HIDROXIMETIL)-2-METILPIRIDINIO (19)



ESPECTRO No. 12. CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A MASAS (TECNICA FAB+) DEL TOSILATO DE 1-
HEXADECIL- 4-HIDROXI-3,4-BIS(HIDROXIMETIL)-2-METILPIRIDINIO (19))

IX. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Breen, P.J.; Compadre C.M.; Fifer, E.K.; Salari, H.; Serbus, D.C.; Lattin, D.L. Quaternary Ammonium Compounds Inhibit and Reduce the Attachment of Viable *Salmonella typhimurium* to Poultry Tissues. *J. Food Prot.* **1995**, 6,1191-1196
- 2.- Parrilla-Cerillo, M.C.; Vázquez-Castellanos, J.L.; Saldade-Castellanos, O.; Nava-Fernández, L.M. Brotes de Toxiinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y Parasitario. *Salud Publica de México*, **1993**, 35, 1-10.
- 3.- Breen, P.J.; Salari, H.; Compadre, C.M. Elimination of Salmonella Contamination from Poultry Tissues by Cetylpyridinium Chloride Solutions. *J. Food Prot.* **1997**, 60, 1019-1021.
- 4.- Buzby, J.; Roberts, T.; Lin, J.; and Macdonald, J. Bacterial Foodborne Disease: Medical Costs and Productivity Losses. *Agric. Econ. Rep.* **1996**, 741-765, August. Available from :
<http://www.econ.ag.gov/epubs/pdf/aer741/AER741fm.PDF>
- 5.- Brock, T.D.; Smith, W.D.; Madigan, M. *Microbiología*. 4^{ta} Ed. Prentice-Hall. **1987**, Cap. 17.
- 6.- Norma NOM-114-SSA-1994. Determinación del género *Salmonella* en Alimentos. Publicado en el diario Oficial de la Federación el 20 de septiembre de 1995.
- 7.- Xiong, H.; Li, Y.B.; Slavik, M.F.; Walker, J.T. Spraying Chicken Skin with Selected Chemicals to reduced Attached *Salmonella typhimurium*. *J. Food Prot.* **1998**, 61, 272-275.
- 8.- Wang, W.C.; Li, Y.B.; Slavik, M.F.; Xiong, H.A. Trisodium Phosphate and Cetylpyridinium Chloride Spraying on Chicken Skin reduced Attached *Salmonella typhimurium*. *J. Food Prot.* **1997**, 60, 992-994.

- 9.- Kim, J.W.; Slavik, M.F. Cetylpyridinium chloride (CPC) treatment on Poultry Skin to Reduce Attached Salmonella. *J. Food Prot.* **1996**, *59*,322-326.
- 10.- Li, Y.B.; Slavik, M.F.; Walker, J.T.; Xiong, H. Pre-chilled Spray of Chicken Carcasses to reduce *Salmonella typhimurium*. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 605-607.
- 11.- Zhou, X.; Handie, A.; Salari, H; Fifer, K.; Breen, P.J.; Compadre, C.M. High-Performance Liquid Chromatography Determination of Residue Levels on Chicken Carcasses Treated with Cetylpyridinium Chloride. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1999**, *728*, 273-277
- 12.- Lattin, D.L. International Business Venture Grows from UAMS use patent. *Update Magazine*. U.A.M.S. Arkansas, USA. October, 1999, 1-3
- 13.- Hansch, C.; Leo, A. *Exploring QSAR: Fundamentals and applications in Chemistry and Biology*. 1st Ed. ACS, **1995**, Cap. 4.
- 14.- Lien, J.E., Hansch, C.; Anderson, M.S. Structure-Activity Correlations for Antibacterial Agents on Gram Positive and Gram Negative Cells. *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 430-441.
- 15.- Krysinski, J. Application of the Rough Sets Theory to the analysis of Structure-Activity Relationships of Antimicrobial Pyridinium Compounds. *Pharm.* **1995**, *50*, 593-597.
- 16.- Devinsky, F.; Zamocka, J.; Lacko, I.; Polakovicova, M. Qsar and CAMM Study of Amphipillic Antimicrobially active 2,2'-Bipyridil monoammonium salts. *Pharm.* **1996**, *51*, 727-731.

- 17.- Tong, W.; Perkins, R.; Strelitz, R.; Collantes, E.; Keenan, S.; Welsh, W.; Branham, S.; Sheenan, D. Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) for Strogen Binding to the Strogen Receptor: Prediction Across the Species". *Environ. Health Persp.* **1997**, *105*, 1116-1124.
- 18.- Martin, I.Y. A Practitioner Perspective of the Role of Quantitative Structure-Activity Analysis on Medicinal Chemistry" *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 229-237.
- 19.- Oprea, T.I.; Waller, Ch. Theoretical and Practical Aspect of Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships, *in Reviews in Computational Chemistry*, Boyd, D.B.; Lipkowitz, K. Vol. 11, Wiley-VCH. 1997, 127-182
- 20.- Cramer III, R.D.; Patterson, D.E.; Bunce, D.F. Recents Advances on Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *291*, 161-165
- 21.- Martindale, W. *The Extrapharmacopeia*, 27th Ed. Pharmaceutical Society of Great Britain, 1979, Cap. 12
- 22.- Bodor, N. Soft drugs. 1. Labile Quaternary Ammonium Salt as a Soft Antimicrobials. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 474-480.
- 23.- McCracken, R.O.; Lipkowitz, K.B. Molecular Modeling: a Tool for Predicting Anthelmintic Activity *in vivo*. *Parasitol. Res.* **1993**, *79*, 475-479
- 24.- Dearing, A. Computer Aided Molecular Modelling: Research Study or Research Tool". *J. Comp. Aid. Mol. Des.* **1988**, *2*, 179-189.
- 25.- Boyd, B. D. Successes of Computer-Assisted Molecular Design. *in Reviews in Computational Chemistry*, Boyd, D.B.; Lipkowitz, K. Vol. 1, Wiley-VCH. 1990, 355-371.
- 26.-Lunney, E.A.; Hagen, S.E.; Domagala, J. M.; Humblet, C.; Kosinski, J.; Tait, B.D. A novel Nonpeptide HIV-1 Protease Inhibitor: Elucidation of the Binding Mode and its Application in the Design of Related Analogs" *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2664-2677

- 27.- Chopin, F. Computers and the medicinal Chemist in *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Hansch, C. 1st Ed. Pergamon Press. 1990, Vol. IV.
28. Nogrady, T. *Medicinal Chemistry*. 2nd Ed. Oxford U.P. NY 1988, Cap. 1
- 29.- Zhu, Q.; Guo, Z.; Huang, N.; Chu, F. Comparative Molecular Field Analysis of a Series of Paclitaxel Analogues. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4319-4328.
- 30.- Verloop, A.; Hogenstraaten, W.; Tipker, J. Development and application of new steric substituent parameter in drug design, in *Drug Design*, Ariens, E.J. Academic Press, N.Y 1976, Vol. 7.
- 31.- Greco, G.; Novellino, E.; Martín, Y.C. Approaches to Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship. in *Reviews in Computational Chemistry*, Boyd, D.B.; Lipkowitz, K. Vol. 11, Wiley-VCH. 1997, 183-240.
- 32.- Shelton, R.S.; Van Campen, C.H.; Lang, L. Quaternary Ammonium Salts as Germicides. I, II, III. " *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 753-759
- 33.- Davey, T.W.; Hayman, A.R. Synthesis of Omega-hydroxi Quaternary Ammonium Bolaform Surfactants. *Aust J. Chem.* **1998**, *51*, 581-586.
- 34.- Weglewski, J.; Pernak, J.; Krysinski, J. Synthesis and Bactericidal Properties of Pyridinium Chlorides with Alkylthiomethyl and Alkoxymethyl Hydrophobic Groups. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 91-94.
- 35.- Kourai, H.; Machicawa, F.; Takechi, H.; Horie, T; Takeichi, K.; Shibasaki, I. "The Antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts. Part XI. Quantitative Structure-Activity Relationships of Antimicrobial of N-laurylpyridium Iodide". *J. Antibact. Antifung. Agents* **1985**, *13*, 245-253.

- 36.- Maeda, T.; Goto, S.; Manabe, Y.; Okazaki, K.; Nagamune, H.; Kourai, H. Bactericidal Action of N-alkylcyanopyridinium Bromides Against *Escherichia coli* K12 W3110. *Biocontrol Sci.* **1996**, *1*, 41-9.
- 37.- Kourai, H.; Hasegawa, Y.; Wada, K. "Bactericidal Characteristics of N-alkyl-4-Butenylpyridinium Bromides. *J. Antibact. Antifung. Agents* **1994**, *22*, 653-661.
- 38.- Devinsky, F.; Lacko, I.; Nlyncik, E.; Svajdleka, E.; Borovska, V. Quaternary Ammonium Salts XXXIII. QSAR of Antimicrobially Active Nicketamide Derivatives" *Pharm.* **1996**, *51*, 727-731.
- 39.- Kourai, H.; Machicawa, F.; Tateishi, K.; Horie, T.; Takeichi, K.; Shibasaki, I. The Antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts. Part IX. Quantitative Structure-Activity Correlations on Antimicrobial Activity and Hydrophobicity of N-Alkylpyridium Iodide Derivatives". *J. Antibact. Antifung. Agents* **1983**, *11*, 553-562.
- 40.- Kourai, H.; Horie, T.; Takeichi, K.; Shibasaki, I. The Antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts and Their Alkyl Chain Length". *Bokin Bobai* **1980**, *8*, 191.
- 41.- Kourai, H.; Sato, T.; Horie, H.; Takeichi, K.; Shibasaki, I. The Antimicrobial Characteristic of Quaternary Ammonium Salts". *Bokin Bobai* **1980**, *8*, 8-9.
- 42.- Bayle, B. Aromatic and Cyclic cationic surfactants in *Cationic surfactants: Organic Chemistry*. Richmond, J. Dekker Inc. 1990, Cap. 3.
- 43.- Zoltewicz, J.; Deady, L. Quaternization of Heteroaromatic Compounds: Quantitative Aspects". *Adv. Heterocycles*, **1978**, *22*, 72-107
- 44.- Wysocki, E.; Taber, D. Cyclical Alkylammonium Compounds in *Cationic surfactants* Jungermann, E. Dekker Inc.1970. Cap. 1

- 45.- Suyama, K.; Adachi, S. Reaction of alkanals and aminoacids or primary amines. Synthesis of 1,2,3,5- and 1,3,4,5-substituted quaternary pyridinium salts". *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1417-1420.
- 46.- Suyama, K.; Sukanuma, O.; Adachi, S. Quaternary Pyridinium Compounds Formed by Reaction of Primary Amines with Alkanals and their Antimicrobial Activities". *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 1535-1534
- 47.- Thornsberry, C. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Considerations" in *Manual of clinical microbiology*. Lennette, E.H.; Bullows, A; Hausler W.J.; Sadhomy, H.J. 4th Ed. American Society for Microbiology, 1985.
- 48.- Sahm, D.F.; Washington II, J.A.; "Antibacterial Suceptibility Test: Dilution Methods". in *Manual of clinical microbiology*. Lennette, E.H.; Bullows, A; Hausler W.J.; Sadhomy, H.J. 4th Ed. American Society for Microbiology, 1985.
- 49.- Waitz, A.; et al. "Methods for Dilution Antimicrobial susceptiblity Test for Bacterial Grow Aerobically". *NCCLS* **1990**, *10* (8). M7-A2.
- 50.- Boethling, R. Enviromental aspect of cationic surfactants in *Cationic surfactants: Analytical and biological evaluation*. Cross, J.; Singe, E. Dekker Inc, 1994, Cap 12.
- 51.- Wee, V.T; Kennedy, J.M. Determination of Trace Levels of Quaternary Ammonium Compounds in River Water by Liquid Chromatography with Conductometric Detection *Anal. Chem.*, **1982**, *54*, 1631-1633.
- 52.- McPherson, P.B.; Rassmusen, H.T. Chromatography of cationic surfactants: HPLC, TLC, and GLC in *Cationic surfactants: Analytical and biological evaluation*. Cross, J.; Singe, E. Dekker Inc. 1994. Cap. 7.

- 53.- Linares, P.; Gutierrez, M.C.; Lazaro, F.; Luque de Castro, M.D.; Valcarcel, M. Lidocaine, Dextromethorphan and Cetylpyridinium ion by High-Performance Liquid Chromatography with UV detection. *J. Chromatogr.* **1991**, *558*, 147-153.
- 54.- Vinter, J.G.; Davies, A.; Saunders, M.R.; Strategic Approaches to Drug Design I. An Integrate Software Framework for Molecular Modelling. *J. Comp. Aided Mol. Design* **1987**, *1*, 31-51
- 55.- Dewar, M.S.J.; Stroch, D.M. Comparative Test of Theoretical Procedures of Studying Chemical Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3898-3902.
- 56.- Clark, M.; Cramer III, R.D.; Van Opdenbosh, N. Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field. *J. Comp. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.
- 57.-Pettersson, I.; Liljefords, T. Molecular Mechanics Calculated Conformational Energies Of Organic Molecules: A Comparision of Force Fields *in Reviews in Computational Chemistry*, Boyd, D.B.; Lipkowitz, K. Vol. 9, Wiley-VCH. 1996, 167-189
- 58.-Leach, A.R. A Survey of Methods for Searching the Conformational Space of Small and Medium Sized Molecules". *in Reviews in Computational Chemistry*, Boyd, D.B.; Lipkowitz, K. Vol. 2, Wiley-VCH. 1991, 1-55.
- 59.- Takeo, N.; Ueno K. Synthesis of Vitamin B6 Derivatives, Catalytic Reduction of Hydroxymethyl Group Substituted in Pyridine Ring *Yakugaku Zasshi* **1959**, *79*, 1277-80. *CA* **1960**, *54*, 4566h.
- 60.- Katritzky, A.R. *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, Pergamon Press. 1985 Chapter 26.
- 61.- Okamoto, Y.; Lee, K.I. Reactions of Crowded Molecules Under High Pressure. Reactions of 2,6-Di-tert-butylpyridine with Methyl Iodide and Methyl Fluorosulphonate Under High Pressure. *J. Am.Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4015-4018

- 62.- Fessenden, R.; Fessenden, J.S. *Techniques and experiments in Organic Chemistry*. PWS publishers, 1983, Cap. 6.
- 63.- Bluhm, L.H.; Li, T. Chromatographic Purification of Quaternary Ammonium and Pyridinium Compounds on Normal Phase Silica Gel *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3623-3626
- 64.- Wang, H.; Li, Y.B.; Slavik, M.F. Efficacy of Cetylpyridinium Chloride in Immersion Treatment for Reducing Populations of Pathogenic Bacteria on Fresh-cut Vegetables. *J. Food Prot.* **2001**, 64, 2071-2074.
- 65.- Shah, P.; Midha, K.K.; Dighe, S.; McGilveray, I.J.; Skelly, J.P.; Yacobi, A.; Layloff, C.T.; Viswanathan, T.; Cook, C.E.; McDowall, R.D.; Pittman, K.A; Spector S. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *J. Pharm. Sci.*, **1992**, 81, 309-312.
- 66.- Flesch, G.; Mann, Ch.; Degen, P.H. Quantitative Determination of CGP 61755, a Protease Inhibitor, in Plasma and Urine by High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1997**, 696, 123-130
- 67.- Krol, W.; Arsenault, H.; Pylypiw, Jr.; Mattina, M.; Reduction of Pesticide Residues on Produce by Rinsing. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 4666-4670
- 68.- Deckers, C.; Ohgke, H. Comparison of in vitro Action of Cetylpyridinium Chloride Containing Preparations. *Arzneim. Forsch.* **1995**, 45,1335-1337.
- 69.- Cutter, C.N.; Dorsa, W.J.; Handie, A.; Rodriguez-Morales, S.; Zhou, X.; Breen, P.J.; Compadre; C.M. Antimicrobial Activity of Cetylpyridinium Chloride Washes against Pathogenic Bacteria on Beef Surfaces. *J. Food Prot.* **2000**, 63, 593-600
- 70.- Ray, B. *Fundamental Food Microbiology*, DRD Press, Boca Raton, Fla.,1996, Cap. 6.

71.- Jay, J.M. *Modern Food Microbiology*, VNR Co.,NY, 1978.

72.- Brownawell, B.; Chen, H.; Collier, M.; and Westall, J. Adsorption of Organic cations to Natural Materials. *Environ.I Sci. Technol.* **1990**, 24, 1234-1241



Original article

3D-QSAR, Synthesis, and antimicrobial activity of 1-Alkylpyridinium Compounds as Potential Agents to Improve Food Safety

Sergio Rodríguez-Morales ^{a,*}, R. Lilia Compadre ^b, Rafael Castillo ^a,
Philip J. Breen ^b, Cesar M. Compadre ^b

^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM, CU Mexico, DF 04510, Mexico

^b Department of Pharmaceutical Sciences, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas 72205, USA

Received 26 March 2004; received in revised form 1 February 2005; accepted 3 February 2005

Abstract

Cetylpyridinium chloride (CPC), an alkylpyridinium compound has been recently approved by the US Food and Drug Administration to reduce bacterial contamination in poultry. Although CPC is very effective and has a very good safety record, its relatively high lipophilicity may limit its use in high fat containing foods such as beef. In this study we present the CoMFA analysis (3D-QSAR) of the antimicrobial activity of 60 *N*-alkylpyridinium compounds against different bacteria. CoMFA contours showed that the activity is highly influenced by the steric factor. Based in these contours we designed new candidates, which were synthesized and characterized by spectroscopic data. MIC activity over Gram positive and Gram negative microorganisms validated the 3D-QSAR study.
© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Cetylpyridinium chloride; Alkylpyridinium analogues; 3D-QSAR; CoMFA analysis; MIC activity

1. Introduction

Foodborne diseases are one of the mayor concerns around the world. While the American food supply is considered among the safest in the world, recent estimates suggest that as many as 9,000 deaths and 6.5 to 33 million illnesses in the United States each year are food-related. Medical costs and productivity losses range between \$1.8 billion and \$4.8 billion annually [1]. The need to develop strategies to eliminate and prevent microbial contamination of food products is made more urgent by the appearance of new strains and types of food pathogens, new and more frequent outbreaks of food-borne disease, and the increased susceptibility to foodborne infections in population groups with lowered immunity [2].

In this context we have demonstrated that cetylpyridinium chloride (CPC), a chemical safely used for more than 50 years in oral hygiene products, can reduce *Salmonella* and other bacterial contamination in poultry, meat, fish, fresh fruits, and vegetables [3]. CPC is also effective in preventing bacterial

attachment and thus, has potential to reduce the risk of cross-contamination [3,4]. Furthermore, CPC has been recently approved by the US Food and Drug Administration to reduce bacterial contamination in poultry. Although CPC is very effective and has been safely used in the pharmaceutical field as a mouthwash, its relatively high chemical residue in some foods products, such as beef, may limit its acceptance by the consumer [5]. Recently, polymeric quaternary ammonium derivatives have been used as bacteria killing surfaces [6–8].

In an effort to develop CPC analogues that could be easily removed from food products after treatment, we have developed a systematic study of quantitative structure activity relationships (QSAR) of CPC and its analogues using 2D-QSAR and 3D-QSAR techniques. Previous SAR studies for these compounds have shown that the antimicrobial activity is significantly affected by the substituents on the pyridine moiety, the length of the alkyl chain, the hydrophobicity of the compound, their absorbability on the cell, and the pKa of the parent pyridine [9–13]. However, these studies were performed in individual subsets of pyridinium compounds, and no effort has been made to generate an overall picture of the SAR or quantitative SAR (QSAR) for these compounds.

* Corresponding author: Lab 122, Departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM, CU, DF 04510, Mexico. Fax: (525) 56225329.
E-mail address: rafaelc@servidor.unam.mx (R. Castillo).

Among 3D-QSAR methods [14], Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) is widely applied on the medicinal chemistry field. Comprehensive reviews [14,15], criteria for derivation of the models [16], guidelines for publishing [17], and scope and limitations [18] of the method have been published.

In this paper we report the QSAR analysis (2D and 3D-QSAR) of the antimicrobial activity of 60 *N*-alkylpyridinium compounds against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus megaterium*. Also, we present the synthesis of the analogues that were selected, and the antimicrobial activity, which validated the CoMFA models generated.

2. Chemistry

2.1. Molecular modeling studies

2.1.1. Biological Data

A data set of 60 antimicrobial activities (Minimum Inhibitory Concentration (MIC)) and the logarithm of the octanol water partition coefficients (log *P*) were retrieved from the literature [5,9,10,19–21]. For the analysis, the antimicrobial activities are expressed as the LOGMIC (LOGMIC = log 1/MIC).

2.1.2. Molecule 3D-Building

The structures of the compounds were obtained from the Cambridge Crystallographic Database as implemented in Unity 4.1 or by small modifications of structures available in the database using Sybyl 6.8. All the analogues were minimized by the PM3 semiempirical Hamiltonian in MOPAC 6.0 package in Sybyl (keywords used: Precise, Full, Mullik and in some cases MMOK). After minimization, the following descriptors were retrieved from the output file: Dipolar Moment (DM), Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO), Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO), Ionization Potential (IP), and Heat of formation (DHF). These data are shown in Table 2.

2.1.3. QSAR Analysis

Classical QSAR (2D-QSAR) studies were performed using the CoMFA module in Sybyl 6.8. The compounds included in this study, the antimicrobial activity, as well as the descriptors obtained after minimization, are listed in Tables 1 and 2.

2.1.4. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)

3D-QSAR studies were performed using the program CoMFA analysis as implemented in SYBYL 6.8 molecular

modeling software from Tripos Inc., St. Louis, MO (Tripos, 2002). See experimental protocols for full details.

2.2. Synthesis of the analogues selected

Target alkylpyridinium compounds were synthesized according to reaction shown in Scheme 1. The proper substituted pyridine was reacted with the corresponding alkyl bromide (for derivatives with a 12-C chain) or alkyl tosylate (for derivatives with a 16-C chain) in equimolar quantities in a suitable solvent, under 200 PSI of nitrogen in a 300 ml Parr reactor (Parr instruments, Ill. USA). After the time of reaction, the solvent was evaporated under vacuum, and 100 ml of ether were added. The reaction mixture was chilled at 0 °C for 10–12 h, and the solid obtained was filtered and dried. Isolation of the compounds was performed by a flash chromatography column technique [22], using chloroform:methanol in a gradient of 0 to 10% (increments of 1% every 300 ml of mobile phase) and silica gel deactivated with 12% NaBr, as mobile and stationary phase respectively. After separation, the counter ion was exchanged for a bromide ion; so, most of the final compounds are alkylpyridinium bromides. All the synthesized compounds are very hygroscopic and newly described, except for compound 12 [5]. Reaction conditions and physicochemical data of these compounds are shown in Table 3. Elemental analysis, for C, H, N, were within the range $\pm 0.4\%$ of theoretical values. Structural IR, ¹H NMR and ¹³C NMR data for compounds 3 are given in full detail in the experimental protocol. Complete data for the other compounds can be obtained from the authors on request.

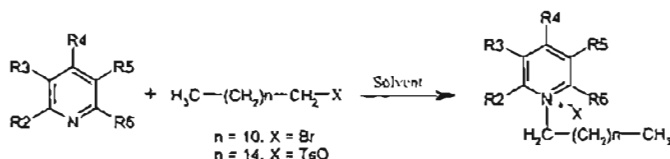
3. Biology

3.1. Partition coefficient (log *P*) determination

Log *P* octanol/water was measured using the guidelines of Hansch and Leo [23].

3.2. Antimicrobiological activity

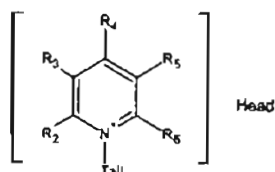
Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC29123 was determined as antimicrobial activity using the macrodilution method, as reported in the literature [24]; CPC and ampicillin were used as controls.



Scheme 1.

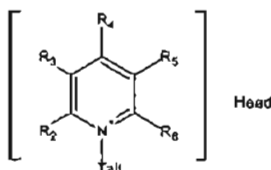
Table 1

Log P and antimicrobial activity of N-Alkylpyridinium compounds reported in the literature



| Tail Nr C | Compound | MIC (log 1/IC50) | | | | | | LOGP |
|-----------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------|----------------|----------------------|----------------------|-------|
| | | <i>B. subtilis</i> | <i>B. megaterium</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>K. pneumoniae</i> | |
| 16 | 2-methyl | 6.17 | 5.57 | 6.66 | 4.75 | 4.01 | 5.57 | 1.95 |
| 16 | 2,4-dimethyl | 6.19 | 6.00 | 6.70 | 5.19 | 3.82 | 5.28 | 3.90 |
| 16 | 3-carbamoyl | 5.68 | 4.92 | 5.77 | 4.68 | 3.89 | 4.82 | 1.44 |
| 16 | 3,4-dimethyl | 6.19 | 5.89 | 6.59 | 5.19 | 3.89 | 6.06 | 3.16 |
| 16 | 3,5-methyl | 5.19 | 5.96 | 6.89 | 5.19 | 3.96 | 6.00 | 3.35 |
| 16 | 3-niketamide | | | 2.22 | 2.48 | | | |
| 16 | 4-butenyl | 6.13 | | 5.52 | 5.23 | | 5.82 | |
| 16 | Unsubstituted | 6.04 | 5.75 | 6.64 | 5.04 | 4.06 | 5.75 | 2.81 |
| 10 | 2-methyl | 4.26 | 4.09 | 4.85 | 3.68 | 3.26 | 4.39 | 0.19 |
| 10 | 2,4-dimethyl | 4.57 | 4.57 | 5.00 | 3.70 | 3.10 | 4.80 | 0.54 |
| 10 | 3-carbamoyl | 3.72 | 4.05 | 4.50 | 3.29 | 3.29 | 4.19 | -0.29 |
| 10 | 3,4-dimethyl | 4.57 | 4.57 | 5.10 | 3.80 | 3.10 | 4.68 | 0.66 |
| 10 | 3,5-dimethyl | 4.28 | 4.40 | 4.96 | 3.62 | 3.17 | 4.57 | 0.76 |
| 10 | 3-DEAC ^a | | | 2.48 | 2.56 | | | |
| 10 | 4-butenyl | 4.13 | | 4.13 | 4.13 | | 3.83 | |
| 10 | Unsubstituted | 3.96 | 4.07 | 5.07 | 3.70 | 3.15 | 4.24 | 0.11 |
| 12 | 2,4,6-trimethyl | 6.41 | | | 5.59 | | | 1.41 |
| 12 | 2,4-dimethyl | 5.52 | 5.52 | 5.92 | 4.40 | 3.52 | 5.66 | 1.44 |
| 12 | 2,6-dimethyl | 5.30 | | | 4.70 | | | 2.05 |
| 12 | 2-amino | 5.00 | | | 4.36 | | | 0.95 |
| 12 | 2-carboxyl | 3.42 | | | 2.96 | | | 0.64 |
| 12 | 2-cyano | 5.55 | | | 4.56 | | | 0.00 |
| 12 | 2-ethyl | 4.92 | | | 4.35 | | | 1.34 |
| 12 | 2-methyl | 5.29 | 5.00 | 6.11 | 4.39 | 3.82 | 5.00 | 1.32 |
| 12 | 2-propyl | 5.20 | | | 4.62 | | | 1.75 |
| 12 | 3,4-dimethyl | 5.40 | 5.52 | 5.92 | 4.30 | 3.52 | 5.43 | 1.91 |
| 12 | 3,5-dimethyl | 5.30 | 5.40 | 5.92 | 4.30 | 3.60 | 5.28 | 1.92 |
| 12 | 3-amino | 5.74 | | | 4.54 | | | 0.60 |
| 12 | 3-carbamoyl | 4.62 | 4.72 | 5.32 | 4.07 | 3.77 | 4.62 | 0.60 |
| 12 | 3-carboxyl | 3.55 | | | 3.11 | | | -0.17 |
| 12 | 3-cyano | | | | 3.87 | | | 0.00 |
| 12 | 3-methyl | 5.31 | | | 4.29 | | | 1.21 |
| 12 | 4-amino | 5.80 | | | 5.00 | | | |
| 12 | 4-butenyl | 5.60 | | 5.29 | 4.69 | | 5.28 | 0.05 |
| 12 | 4-carbamoyl | 4.62 | | | 4.08 | | | 0.63 |
| 12 | 4-carboxyl | 3.46 | | | 3.00 | | | 0.09 |
| 12 | 4-cyano | | | | 3.76 | | | 0.00 |
| 12 | 4-methyl | 5.34 | | | 4.51 | | | |
| 12 | Unsubstituted | 4.96 | 3.96 | 5.80 | 4.60 | 3.62 | 4.96 | 2.15 |
| 14 | 2-methyl | 6.15 | 5.62 | 6.44 | 4.92 | 4.26 | 5.44 | 2.27 |
| 14 | 2,4-dimethyl | 6.03 | 6.03 | 6.60 | 4.85 | 4.16 | 6.13 | 2.47 |
| 14 | 3-carbamoyl | 5.35 | 5.35 | 6.05 | 4.75 | 4.31 | 5.35 | 1.14 |
| 14 | 3,4-dimethyl | 6.03 | 5.92 | 6.38 | 4.92 | 4.03 | 6.03 | 2.93 |
| 14 | 3,5-dimethyl | 6.03 | 5.92 | 6.64 | 4.92 | 4.03 | 6.08 | 2.90 |
| 14 | 3-DEAC ^a | | | 2.25 | 2.42 | | | |
| 14 | 4-butenyl | 5.62 | | 5.32 | 5.02 | | 5.33 | |
| 14 | Unsubstituted | 5.82 | 5.70 | 6.52 | 4.82 | 4.05 | 5.70 | 3.56 |
| 8 | 2-methyl | 3.35 | 3.05 | 3.92 | 3.13 | 2.75 | 3.35 | -0.77 |
| 8 | 2,4-dimethyl | 4.46 | 3.46 | 4.13 | 3.22 | 2.85 | 3.54 | -0.57 |

(continued on next page)

Table 1
(continued)

| Compound | MIC (log LTC50) | | | | | | | |
|----------|-----------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 8 | 3-carbamoyl | 2.85 | 2.96 | 3.39 | 2.85 | 2.89 | 2.95 | -0.70 |
| 8 | 3,4-dimethyl | 3.64 | 4.77 | 4.24 | 3.46 | 2.70 | 3.64 | -0.41 |
| 8 | 3,5-dimethyl | 3.16 | 3.46 | 3.92 | 3.16 | 2.70 | 3.54 | -0.17 |
| 8 | 3-DEAC * | | | 2.57 | 2.59 | | | |
| 8 | 4-butenyl | 3.25 | 2.95 | 3.85 | 3.25 | | 3.25 | |
| 8 | Unsubstituted | 3.04 | 3.07 | 3.96 | 3.08 | 2.60 | 3.21 | -0.08 |
| 18 | 2-methyl | 6.08 | 5.52 | 6.38 | 4.77 | 4.89 | 5.50 | 2.48 |
| 18 | 2,4-dimethyl | 6.09 | 5.60 | 6.60 | 4.80 | 3.85 | 5.75 | 3.73 |
| 18 | 3-carbamoyl | 5.62 | 4.80 | 5.80 | 4.40 | 3.80 | 4.80 | 1.93 |
| 18 | 3,4-dimethyl | 5.92 | 5.60 | 6.39 | 4.92 | 3.54 | 5.68 | 3.17 |
| 18 | 3,5-dimethyl | 5.92 | 5.60 | 6.68 | 5.09 | 3.68 | 5.54 | 3.16 |
| 18 | 3-DEAC * | | | 2.29 | 2.57 | | | |
| 18 | 4-butenyl | 5.36 | | 4.75 | 4.45 | | 4.75 | |
| 18 | Unsubstituted | 5.66 | 4.82 | 6.52 | 4.59 | 4.00 | 5.37 | 3.68 |

* (Diethylamino)carbonyl.

4. Results and discussion

4.1. 2D-QSAR studies

For the molecular modeling study, an extensive search of the literature was performed. Nearly 60 molecules were found with different substitution patterns in the pyridine head and / or the linear carbon chain. All the molecules for the training set are presented in Table 1. There are more molecules reported in the literature; but their activity was determined using the disc method, which precluded their use in this study. Most of the molecules in Table 1 were found in the crystallographic database Unity 4.1. The crystal structure was minimized directly with the semiempirical PM3 algorithm. Only dimethyl, trimethyl, and amido derivatives were modeled by small modifications of the corresponding analogue and then minimized by PM3 methodology. After the minimization process, some descriptors were retrieved from calculations (dipolar moment, heat of formation, the Lowest Unoccupied Molecular Orbital, and the Highest Occupied Molecular Orbital) and others were taken from the literature (LogP). Table 2 summarizes the descriptors retrieved from calculations. Using these data, a correlation matrix was calculated to find the correlation, as well as the colinearity, between descriptors (Table 4). Results indicate that only the LogP describes the antimicrobial activity, as is seen in equation 1 for *E. coli*, and in equation 2 for *S. aureus*:

$$\text{LogMIC}_{B.\text{subtilis}} = 0.634 (0.125) \log P + 4.115 (0.245) \quad (1)$$

(n = 49, r = 0.846, s = 0.533)

$$\text{LogMIC}_{E.\text{coli}} = 0.468 (0.087) \log P + 3.592 (0.171) \quad (2)$$

(n = 49, r = 0.874, s = 0.347)

In these equations, n is the number of data points used in the regression analysis, r is the correlation coefficient and s is the standard deviation. On the other hand, Mopac descriptors are poorly correlated and did not increment the statistical significance when added to the equation.

In search for a better model, a bilinear and parabolic model was computed in the same dataset. Equations 3 and 4 show the results for a good correlation between the LogP and MIC with the bilinear model.

$$\text{LogMIC}_{B.\text{subtilis}} = 1.131 (0.239) \log P - 1.150 \quad (3)$$

(0.498) BILIN (log P) + 3.934 (0.220)

$$\text{LogP optimum} = 3.548, \log$$

(beta) = -1.788 n = 49, r = 0.904, s = 0.443

$$\text{LogMIC}_{E.\text{coli}} = 0.825 (0.180) \log P - 0.759 \quad (4)$$

(0.349) BILIN (log P) + 3.475 (0.156)

log (beta) = -1.651

The slopes and intercepts in the equations show the fact that Gram positive bacteria are generally more sensitive to the alkyipyridinium compounds than the Gram negative bacteria, as Lien and coworkers has demonstrated [25].

In general, the models are significant, with an r = 0.85 for the lowest correlation model. Although these equations could be used in predicting the antimicrobial activity of new compounds, computational calculation of the LogP for the alky-

Table 2
Descriptors calculated for the alkyipyridinium compounds in Mopac

| Tail Nr | Compound | Descriptors | | | | |
|---------|---------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|------|
| | | MD ^a | DH ^a | HOMO ^a | LUMO ^a | PI |
| C | Substituent | | | | | |
| 16 | 2-methyl | 1.89 | -51.62 | -9.71 | -3.31 | 6.66 |
| 16 | 2,4-dimethyl | 1.75 | -61.06 | -9.61 | -3.29 | 6.58 |
| 16 | 3-carbamoyl | 3.92 | -48.85 | -9.57 | -3.51 | 6.92 |
| 16 | 3,4-dimethyl | 1.62 | -61.19 | -9.49 | -3.26 | 6.60 |
| 16 | 3,5-methyl | 1.62 | -28.95 | -9.55 | -3.24 | 6.64 |
| 16 | 3-DEAC ^b | 1.75 | -36.94 | -9.69 | -3.33 | 6.67 |
| 16 | 4-butenyl | 1.91 | -43.17 | -9.98 | -3.32 | 6.73 |
| 16 | Unsubstituted | 1.91 | -19.05 | -9.72 | -3.29 | 6.65 |
| 10 | 2-methyl | 1.77 | -28.49 | -9.61 | -3.27 | 6.58 |
| 10 | 2,4-dimethyl | 3.92 | -48.85 | -9.57 | -3.51 | 6.92 |
| 10 | 3-carbamoyl | 1.64 | -27.94 | -9.48 | -3.26 | 6.60 |
| 10 | 3,4-dimethyl | 1.62 | -28.95 | -9.55 | -3.24 | 6.64 |
| 10 | 3,5-dimethyl | 1.92 | -9.36 | -9.68 | -3.06 | 6.47 |
| 10 | 3-niketamide | 1.91 | -10.64 | -9.97 | -3.32 | 6.72 |
| 10 | 4-butenyl | 1.92 | -47.7 | -9.53 | -3.17 | 6.45 |
| 10 | Unsubstituted | 1.73 | -39.31 | -9.6 | -3.29 | 6.59 |
| 12 | 2,4,6-trimethyl | 1.99 | -38.4 | -9.53 | -3.20 | 6.54 |
| 12 | 2,4-dimethyl | 1.52 | -28.82 | -8.63 | -3.04 | 6.52 |
| 12 | 2,6-dimethyl | 5.32 | -114.71 | -10.37 | -3.98 | 7.21 |
| 12 | 2-amino | 4.04 | 13.41 | -10.24 | -4.01 | 7.27 |
| 12 | 2-carboxyl | 1.88 | -35.64 | -9.76 | -3.32 | 6.67 |
| 12 | 2-cyano | 1.89 | -29.93 | -9.71 | -3.31 | 6.66 |
| 12 | 2-ethyl | 1.89 | -39.95 | -9.72 | -3.28 | 6.64 |
| 12 | 2-methyl | 1.64 | -38.78 | -9.48 | -3.26 | 6.60 |
| 12 | 2-propyl | 1.64 | -39.75 | -9.56 | -3.23 | 6.63 |
| 12 | 3,4-dimethyl | 1.52 | -28.82 | -8.63 | -3.04 | 6.52 |
| 12 | 3,5-dimethyl | 1.52 | -28.82 | -8.63 | -3.04 | 6.52 |
| 12 | 3-amino | 3.01 | -111.09 | -10.32 | -3.65 | 7.04 |
| 12 | 3-carbamoyl | 5.08 | 26.17 | -10.22 | -3.74 | 7.14 |
| 12 | 3-carboxyl | 1.79 | -30.3 | -9.64 | -3.25 | 6.66 |
| 12 | 3-cyano | 2.21 | -22.97 | -8.79 | -3.22 | 7.04 |
| 12 | 3-methyl | 1.75 | -15.29 | -9.69 | -3.32 | 6.66 |
| 12 | 4-amino | 5.47 | -61.14 | -9.31 | -3.76 | 7.04 |
| 12 | 4-butenyl | 5.29 | -114.71 | -10.37 | -3.99 | 7.22 |
| 12 | 4-carbamoyl | 6.63 | 10.85 | -10.22 | -4.02 | 7.23 |
| 12 | 4-carboxyl | 1.76 | -30.98 | -9.68 | -3.31 | 6.65 |
| 12 | 4-cyano | 1.91 | -21.49 | -9.98 | -3.32 | 6.72 |
| 12 | 4-methyl | 1.88 | -40.77 | -9.71 | -3.31 | 6.66 |
| 12 | Unsubstituted | 1.73 | -50.21 | -9.61 | -3.29 | 6.59 |
| 14 | 2-methyl | 2.97 | -70.5 | -9.57 | -3.54 | 6.95 |
| 14 | 2,4-dimethyl | 1.86 | -56.33 | -9.43 | -3.01 | 6.42 |
| 14 | 3-carbamoyl | 1.66 | -50.55 | -9.56 | -3.21 | 6.62 |
| 14 | 3,4-dimethyl | 1.76 | -26.12 | -9.69 | -3.32 | 6.66 |
| 14 | 3,5-dimethyl | 1.93 | -32.32 | -9.97 | -3.31 | 6.72 |
| 14 | 3-DEAC ^b | 1.91 | -8.21 | -9.72 | -3.29 | 6.65 |
| 14 | 4-butenyl | 1.76 | -17.65 | -9.61 | -3.28 | 6.58 |
| 14 | Unsubstituted | 3.89 | -37.95 | -9.57 | -3.51 | 6.92 |
| 8 | 2-methyl | 1.65 | -17.09 | -9.47 | -3.25 | 6.59 |
| 8 | 2,4-dimethyl | 1.61 | -18.11 | -9.55 | -3.24 | 6.64 |
| 8 | 3-carbamoyl | 1.75 | 6.44 | -9.68 | -3.32 | 6.66 |
| 8 | 3,4-dimethyl | 1.91 | 0.19 | -9.97 | -3.32 | 6.72 |
| 8 | 3,5-dimethyl | 1.92 | -62.41 | -9.72 | -3.29 | 6.65 |
| 8 | 3-DEAC ^b | 1.78 | -71.86 | -9.61 | -3.27 | 6.58 |
| 8 | 4-butenyl | 3.93 | -92.17 | -9.57 | -3.52 | 6.92 |
| 8 | Unsubstituted | 1.62 | -72.03 | -9.48 | -3.26 | 6.59 |
| 18 | 2-methyl | 1.62 | -72.3 | -9.55 | -3.24 | 6.63 |
| 18 | 2,4-dimethyl | 1.76 | -47.79 | -9.69 | -3.32 | 6.66 |

| Compound | Descriptors | | | | | |
|----------|---------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------|------|
| | MD ^a | DH ^a | HOMO ^a | LUMO ^a | PI | |
| 18 | 3-carbamoyl | 1.91 | -54.01 | -9.98 | -3.32 | 6.73 |
| 18 | 3,4-dimethyl | 6.63 | 10.85 | -10.22 | -4.02 | 7.23 |
| 18 | 3,5-dimethyl | 1.76 | -30.98 | -9.68 | -3.31 | 6.65 |
| 18 | 3-DEAC ^b | 1.91 | -21.49 | -9.98 | -3.32 | 6.72 |
| 18 | 4-butenyl | 1.88 | -40.77 | -9.71 | -3.31 | 6.66 |
| 18 | Unsubstituted | 1.73 | -50.21 | -9.61 | -3.29 | 6.59 |

^a Mopac en Sybyl6.8.

^b (Dichylaminocarbonyl).

pyridinium is not possible, because the positive charge in the pyridine group introduces a variation which is difficult to predict. Since a systematic study was implied in the beginning of this study, a migration to the 3D-QSAR was pursued [16] since the descriptors are generated in the 3D structure of each ligand.

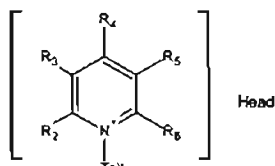
4.2. 3D-QSAR studies

In this part of the study, all the molecules selected from the literature were aligned using CPC as template. After alignment, CoMFA routine was performed over the 60 molecules of the dataset. Then, predictability was measured by the cross validated (Leave-one-out) PLS methodology, and the linearity by the PLS non validated. The results are presented in Table 5. The CoMFA analyses reported in Table 5 are statistically significant, the validated correlation is high ($q > 0.6$) and the linearity is good in all of the models, except for those of *E. coli* and *B. subtilis*, which have the lowest linearity and predictability possible due to the larger number of compounds used in the derivation (60 and 55, respectively). However, these results are more relevant since they include variation in both the pyridine substituents and in the alkyl chain. Figs. 1,2 show the steric and the electronic CoMFA contours for Gram negative (*E. coli*) and Gram positive (*S. aureus*) bacteria, respectively. The steric dependency of the antimicrobial activity is notable in these figures. For the alkyl chain, the activity is increased when the length of the chain is 14-16 carbons (green contours) and the activity is decreased when the length is more than 18 carbons (yellow contours), as reported [9-11,13]. Unexpectedly, the steric effect of substituents on the pyridine head also has a large influence on activity. According to the CoMFA analysis, bulky groups are allowed at position 2 of the pyridine moiety (green contour), but they should be avoided on the other positions (yellow contours) for the activity to be increased. In this models electrostatic effects were not evident, with the exception of small contribution on the *S. aureus* (5%).

CoMFA analysis could be used to predict the activity of new candidate compounds prior to their synthesis, and this new information is used to validate the model. Table 6 summarizes the results for all of the candidates. The synthetic strategy was based on the models for Gram negative bacteria, because of their relevance in food safety, for example *E. coli* and *Salmonella typhimurium* that are major concerns. Based on the CoMFA contours in the first part of the study hydroxymethyl, methoxy, acetyl and methyl groups were con-

Table 3

Reaction conditions for the synthesis of the analogues selected



| Tail Nr C | Head Pyridine Subst. | Analysis (C, H, N) | m.p. °C | Yield % | Press (PSI) | Temp °C | Time (h) | |
|-----------|----------------------|--|--|---------|-------------|------------------|------------------|-----|
| 16C | 4-acetyl | C ₂₃ H ₄₀ BrNO | 88-89 | 37 | 150 | 130 ^a | 26 | |
| 10 | 16C | 2,4,6-trimethyl | C ₂₄ H ₄₄ BrN | 106-107 | 35 | 150 | 132 ^a | 192 |
| 11 | 12C | 4-acetyl | C ₁₉ H ₃₂ BrNO | 82-83 | 56 | 50 | 100 ^b | 27 |
| 12 | 12C | 2,4,6-trimethyl | C ₂₀ H ₃₆ BrN | 92-94 | 20 | NP | 83 ^a | 336 |
| 14 | 16C | 4-(methoxy)methyl | C ₂₃ H ₄₃ BrNO | 72-76 | 32 | 150 | 130 ^a | 26 |
| 18 | 12C | 4-(methoxy)methyl | C ₁₉ H ₃₄ BrNO | 69-70 | 35 | 150 | 130 ^a | 192 |
| 19 | 16C | 3,4-dimethylhydroxy-5-hydroxy-2-methyl | C ₃₁ H ₅₇ NO ₅ ^c | 118-120 | 37 | 200 | 100 ^b | 27 |

^a Acetonitrile.^b Ethanol.^c crystallizes as tosylate.

Table 4

Correlation matrix between the MIC over different bacteria and molecular descriptor for the alkylpyridinium compounds

| | E.coli | B. subtilis | B. megaterium | S. aureus | Ps. aeruginosa | K. pneumoniae | LogP | M.D | DH _r | HOMO | Pot. Ion | LUMO |
|-----------------------|---------|-------------|---------------|-----------|----------------|---------------|---------|---------|-----------------|---------|----------|--------|
| <i>E. coli</i> | 1.0000 | | | | | | | | | | | |
| <i>B. subtilis</i> | 0.9428 | 1.0000 | | | | | | | | | | |
| <i>B. megaterium</i> | 0.9114 | 0.9015 | 1.0000 | | | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 0.9068 | 0.9082 | 0.9224 | 1.0000 | | | | | | | | |
| <i>Ps. aeruginosa</i> | 0.8545 | 0.8377 | 0.7898 | 0.8209 | 1.0000 | | | | | | | |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0.9291 | 0.9205 | 0.9337 | 0.9359 | 0.8312 | 1.0000 | | | | | | |
| log P | 0.8306 | 0.8294 | 0.8384 | 0.9269 | 0.7599 | 0.8638 | 1.0000 | | | | | |
| MD | -0.3675 | -0.3141 | -0.2808 | -0.2217 | 0.0070 | -0.2919 | -0.3009 | 1.0000 | | | | |
| DH _r | -0.1099 | -0.1701 | -0.6272 | -0.6429 | -0.6177 | -0.5759 | -0.2780 | -0.1542 | 1.0000 | | | |
| HOMO | 0.2668 | 0.1715 | 0.1340 | -0.0410 | -0.0163 | -0.0016 | -0.0096 | -0.4383 | 0.0870 | 1.0000 | | |
| Pot. Ion | -0.4028 | -0.3325 | -0.3145 | -0.1256 | 0.0042 | -0.2749 | -0.3016 | 0.8944 | -0.1634 | -0.6378 | 1.0000 | |
| LUMO | 0.3665 | 0.2728 | 0.2648 | 0.0936 | 0.0299 | 0.2433 | 0.2716 | -0.8993 | 0.1772 | 0.6628 | -0.9676 | 1.0000 |

Table 5

PLS analysis of the antimicrobial activity of N-alkylpyridinium compounds

| Bacteria | q ² | Ncomp | r ² | S_ERR | F | n |
|----------------------|----------------|-------|----------------|-------|--------|----|
| <i>P. aeruginosa</i> | 0.811 | 5 | 0.93 | 0.154 | 79.77 | 36 |
| <i>E. coli</i> | 0.602 | 2 | 0.707 | 0.394 | 61.54 | 61 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 0.933 | 9 | 0.981 | 0.145 | 145.78 | 42 |
| <i>B. subtilis</i> | 0.635 | 2 | 0.756 | 0.502 | 74.33 | 55 |
| <i>B. megaterium</i> | 0.835 | 4 | 0.927 | 0.268 | 97.70 | 36 |
| <i>S. aureus</i> | 0.973 | 6 | 0.994 | 0.089 | 739.68 | 43 |

sidered, since the steric part of the pyridine moiety predicts that small groups are needed in order to increase activity. Hydrogen donors and hydrogen acceptors were used in an attempt to increase water solubility. According to predicted activity and feasibility of synthesis, compounds 3, 10, 14 and their C12 chain analogs 11, 18, and 12 were chosen for synthesis. The latter was considered because the control of MIC variability in the training set as well as the compounds showed a good profile: highest potency (reported log MIC = 6.0) and water solubility (log P = 5.51).

In addition, we decided to synthesize analogues of vitamin B6. These analogues also have the pyridine moiety in

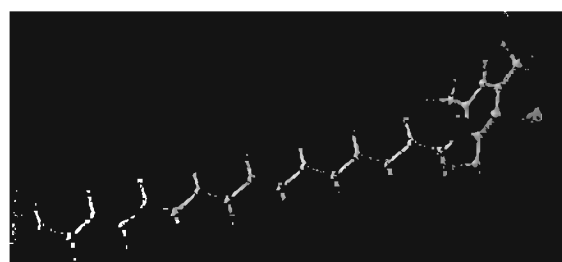


Fig. 1. CoMFA contours of the activity in *E. coli* in the alkylpyridinium series. Bioactive measurement increases when there is more bulk near green, less bulk near yellow, more electrostatic near red, and less electrostatic near blue.

addition to hydrophilic groups (two hydroxyl groups). Three different molecules were proposed and modeled to predict the activity. These are presented in Table 7. Although these compounds showed comparable antimicrobial predicted values, only compound 19 was selected and synthesized.



Fig. 2. CoMFA contours of the activity in *S. aureus* in the alkylpyridinium series. Bioactive measurement increases when there is more bulk near green, less bulk near yellow, more electrostatic near red, and less electrostatic near dark red.

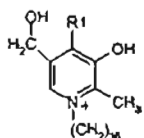
Table 6

CoMFA analysis prediction of the candidates designed. Compounds were modeled as data set for CoMFA

| Compound | | Predicted LOGMIC (M) | | |
|----------|-------|--|-------------|---------------|
| Comp | Tail | Head | <i>E.</i> | <i>S.</i> |
| Nr. | No. C | Pyridine Subst. | <i>coll</i> | <i>aureus</i> |
| 1 | 16C | 2-acetyl | 4.35 | 6.73 |
| 2 | 16C | 3-acetyl | 4.61 | 6.15 |
| 3 | 16C | 4-acetyl | 4.63 | 6.25 |
| 4 | 16C | 2-methoxy | 4.73 | 6.81 |
| 5 | 16C | 3-methoxy | 4.80 | 6.33 |
| 6 | 16C | 4-methoxy | 4.67 | 6.38 |
| 7 | 14C | 2-methoxy | 5.15 | 6.30 |
| 8 | 16C | 2-hydroxymethyl | 5.27 | 6.57 |
| 9 | 16C | 4-hydroxymethyl | 4.85 | 6.36 |
| 10 | 16C | 2,4,6-trimethyl | 5.64 | 6.56 |
| 11 | 12C | 4-acetyl | 5.95 | 5.56 |
| 12 | 12C | 2,4,6-trimethyl | 6.02 | 5.95 |
| 14 | 16C | 4-(methoxymethyl) | 5.08 | 6.35 |
| 15 | 16C | 4-[(methoxymethoxy)methyl] | 5.00 | |
| 16 | 16C | 4-[2-(methoxyethoxy)methyl] | 5.15 | |
| 17 | 16C | 4-[(2-(2-(ethoxyethoxy)ethoxy)methyl)] | 4.87 | |
| 18 | 12C | 4-(methoxymethyl) | 4.59 | 5.89 |

Table 7

Vitamin B6 analogues designed for CoMFA evaluation



| Compound | | Predicted LOGMIC (M) | | |
|----------|-----------|----------------------|----------------|------------------|
| Comp Nr | Tail Nr C | R1 | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| 19 | 16 | -CH2-OH | 5.19 | 6.31 |
| 20 | 16 | CHO | 5.14 | 6.14 |
| 21 | 16 | -CH2-NH2 | 5.32 | 6.32 |

4.3. Chemistry

All the target compounds were synthesized, some of them in a low yield, due mainly to the elimination side reaction. Although these reactions have inherently low yields, modifi-

cations in temperature and alkylating reagent (from chloride to tosylate), allowed the synthesis of selected compounds in yields above 20%. In other cases, however, the accessibility of starting materials allowed the synthesis of adequate quantities of compounds despite low yields.

Compounds 3, 10, 14, and 16 were obtained as tosylates, that were exchanged by the bromide after the flash chromatography purification. However, compound 19 did not exchange the tosylate group by this process.

4.4. Biology

After the synthesis, the log P of the compounds was determined using Hansch methodology. Table 8 shows the data obtained. Nearly all compounds tested presented lower log P than CPC. Only compound 3 had a higher log P.

MICs against *E. coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium* are presented in Table 9. These were determined using CPC and ampicillin as a positive control. Due to the nature of the MIC, data in Table 9 shows a better correspondence with *S. aureus* predicted values, since MICs are lower than for *E. coli*. In these results the MIC presented is a range value where the actual activity is between the lower concentration which shows no growth and the next concentration where bacteria grow, according to the dilution scheme. So the variations in the residual values are higher in lower activity data. This was noted when a double dilution scheme was determined for *E. coli*. In order to establish the differences between compounds, a narrower dilution scheme was used. So, MICs in a range of 5- to 100 µg/ml against *E. coli* were tested and the obtained values presented in Table 9.

In this second dilution scheme, compound 10 showed slightly more activity than CPC. Note that 18 was as active as CPC, but is 7 times more hydrophilic, and probably could be easier to wash from the applied food. These results show that all the compounds were active, which validates the CoMFA model that was generated.

On the other hand, compound 12 was an outlier in the CoMFA model, it was retained because it was the alkylpyridinium analogue with the highest activity and a lower logP reported in the literature. This compound was used as an indicator of the variability on the training set. Structural data, as well as physical constants, confirmed the identity of 12. Pre-

Table 8

Water Octanol partition coefficient (log P) determined for the alkylpyridinium compounds selected

| Compound | LogP |
|----------|-------------|
| 3 | 2.712 |
| 10 | 1.569 |
| 11 | 1.006 |
| 12 | 0.527 |
| 14 | nd |
| 18 | 1.115 |
| 19 | 0.870 |
| CPC | 1.78 (1.77) |

nd: no determined, (reported [23]).

Table 9

MIC data of the compounds synthesized over different microorganisms. The MIC values predicted by the CoMFA model are also presented

| Comp | <i>E. coli</i> | | | MIC $\mu\text{g/ml}$ (LogMIC) | | | |
|------|----------------|---------|----------|-------------------------------|------------|------------------|---------|
| | exp | pred | resid | <i>S. typhimurium</i> | | <i>S. aureus</i> | |
| 3 | 15(4.45) | (5.077) | (-0.62) | 64 | 0.40(6.02) | (6.25) | (-0.23) |
| 10 | 5(4.93) | (5.24) | (-0.319) | 25 | 0.10(6.62) | (6.56) | (0.06) |
| 11 | 15(4.39) | (4.5) | (-0.11) | 40 | 6.50(4.75) | (5.56) | (-0.81) |
| 12 | 64(3.66) | (4.57) | (-0.91) | | 2.00(5.16) | (5.95) | (-0.79) |
| 14 | 5(4.93) | (5.07) | (-0.14) | 64 | 0.20(6.32) | (6.35) | (-0.03) |
| 18 | 10(4.57) | (4.58) | (-0.01) | 45 | 1.65(5.35) | (5.89) | (-0.54) |
| 19 | >50(3.87) | (5.18) | (-1.31) | >50 | 6.50(4.86) | (6.31) | (-1.45) |
| CPC | 5(4.85) | (4.902) | (-0.05) | 35 | 0.20(6.25) | (6.638) | (-0.39) |
| Amp | 2 | | | 0.4 | 0.812 | | |

liminary MIC determination showed a lower activity, actually better predicted by the CoMFA model, which was later confirmed by a second laboratory. The use of a different strain might, perhaps, explain the data obtained, since ampicillin and CPC are in the range reported [3,5,24].

Based in the log P and the activity determined, we will select candidates for the next phase of the study were their residual analysis will determined in different food as chicken, meat and fruits.

5. Conclusions

The alkyipyridinium compounds show a relationship with the log P parameter, but computationally it is difficult to predict log P for alkyipyridinium compounds. It is in these cases where 3D-QSAR is helpful in the design of new potential candidates. Models created with CoMFA were statistically significant and showed that the activity is highly correlated with the steric part in the chain, and surprisingly also in the pyridine moiety. Based in these contours, 7 derivatives were designed and synthesized and their structure was elucidated by NMR, MS and IR spectroscopy. All of the compounds presented a good activity, especially compound 10. The activity determination validated the CoMFA model generated.

6. Experimental

6.1. Chemistry

Compounds were synthesized according to the general procedure described before. Specific quantities, conditions and results are given next to each compound.

6.1.1. 1-Hexadecyl-4-acetylpyridinium bromide (3)

2.40 mL (2.24 g, 0.0220 mol) of 4-acetylpyridine, 8.4 g (0.0220 mol) cetyl tosylate, and 200 mL acetonitrile. 23 h at 130 °C. Crude compound was recrystallized from acetone ether mixture, crystallized as a pale yellow solid (1.5 g, 37% yield), mp 88-89.3 °C. IR: 3854.86 (N⁺), 3101, 2915, 2848, 1455 (CH sat), 1702 (C=O), 3023, 1634 (ArCH), 3443 (OH, monohydrate). ¹H-NMR: 9.67 (dd, 2H, J= 6 Hz) 8.52 (dd, 2H, J=6 Hz), 5.058 (t, 2H, *N-CH₂) 2.80 (s, 3H, CH₃-C=O)

2.05 (m, 2H, *N-CH₂-CH₂), 1.233 (m, 26H, H chain) 0.861 (t, 3H, CH₃ chain). Elemental analysis: Calculated: %C: 71.26, %H: 10.25, %N: 3.96; found: %C: 71.28, %H, 10.24, %N: 3.86).

6.1.2. 1-Dodecyl-2,4,6-trimethylpyridinium bromide (12)

4.20 mL (3.60 g, 0.01309 mmol) of dodecyl bromide, 3.5 mL (3.205 g, 0.02618 mmol) collidine, 1% of Potassium iodide as catalyst. Mix was heated at 90 °C for 24, then 50 ml of acetonitrile was added and refluxed for 14 days. Compound 12 was recrystallized from ethyl acetate, giving white leaves, mp 92-94 °C. IR: 3668.16 (N⁺), 3201, 2918, 2850 (CH sat), 3030 (ArCH), 3352 (H₂O). ¹H-NMR: 7.6 (s, 2H, Harom), 4.6 (m, 2H, *N-CH₂), 2.95 (s, 6H, CH₃ arom_{ortho}) 2.55 (s, 3H, CH₃ arom_{meta}), 1.98 (s, 1H, *N-CH₂-CH₂), 1.78 (m, 2H, *N-CH₂-CH₂-CH₂), 1.45 (m, 2H, *N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂) 1.13 (m, 14H, CH₂ sat chain), 0.92 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR: 157 (C2,6 pyridine), 154 (C4 pyridine), 129.03 (C3,5 pyridine), 53.55 (*N-C), 31.72 (C2 chain), 29.40 (C10 chain) 29.28 (C5,6 chain), 29.21 (C7 chain), 29.13 (C8 chain) 28.95 (C9 chain), 28.73 (C4 chain), 26.67 (2 CH_{3ortho} pyridine ring), 22.49 (C3 chain), 21.64 (C11 chain), 21.49 (CH_{3para} pyridine ring), 13.91 (C12 chain). Elemental analysis. Calculated: %C: 64.83, %H: 9.80, %N: 3.78; found %C: 64.63, %H: 10.13, %N: 4.00)

6.1.3. 1-Dodecyl-4-acetylpyridinium bromide (11)

3.3 mL (3.083 g, 0.0270 mol) of 4-acetylpyridine, 6.7 mL (7.22 g, 0.0270 mol) dodecyl bromide, 50 mL of acetonitrile, heated at 100 °C for 27 h. 11 was recrystallized from ethanol/ether, to give pale yellow solid (mp 82-83 °C). IR: 3668.16 (N⁺), 3201, 2912, 2841, 1460 (CH sat), 1705 (C=O) 3048, 1634 (ArCH) 3456 (OH monohydrate). ¹H-NMR: 9.7 (dd, 2H arom., H_{ortho} pyridine., J=6 Hz), 8.60 (dd, 2H arom., H_{meta}, J=6 Hz.) 5.0 (t, 2H, *N-CH₂) 2.8 (s, 3H, CH₃ acetyl) 2.01 (m, 2H, *N-CH₂-CH₂), 1.13 (m, 10H, CH₂ chain), 0.92 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR: 198.20(carbonyl) 148.20 (C2,4 pyridine), 146.87 (C4 pyridine) 126.52 (C5,3 pyridine), 61.425 (*N-C), 31.78 (C2 chain), 31.68 (C10 chain), 29.39, (C5,6 chain), 29.31 (C7 chain), 29.17 (C8 chain), 29.12 (C9 chain) 28.89 (C4 chain), 27.43 (C3 chain), 25.94 (CH₃ acetyl group), 22.45 (C11 chain) 13.88 (C12 chain). Element-

tal analysis: calculated %C: 61.62, %H: 8.71, N: 3.78; found: %C: 61.68, %H: 8.70, %N: 3.99).

6.1.4. 1-hexadecyl-2,4,6-trimethylpyridinium Bromide (10)

12.6 g (0.0317 mol) cetyl tosylate, 4.8 mL (4.33 g, 0.0360 mol) 2,4,6-collidine, 150 mL acetonitrile, heated at 100 °C for 9 days. Compound 10 was recrystallized from acetone/ether, giving white needles with a melting point of 106.3-106.9 °C. ¹H-NMR: 7.6 (s, 2H, Harom), 4.6 (t, 2H, +N-CH₂), 2.95 (s, 6H, CH₃ arom_{ortho}), 2.55 (s, 3H, CH₃ arom_{para}), 1.76 (sext, 1H, +N-CH₂-CH₂), 1.53 (sext, 2H, +N-CH₂-CH₂-CH₂), 1.4-1.2 (m, 22H, CH₂ chain), 0.88 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR: 157 (C2,6 pyridine), 154 (C4 pyridine), 129.03 (C3,5 pyridine), 53.45 (+N-C), 31.8 (C2 chain), 29.55 (C10 chain) 29.361 (C5,6 chain), 29.21 (C7 chain), 29.13 (C8 chain) 28.95 (C9 chain), 28.73 (C4 chain), 21.68 (2 CH₃_{ortho} pyridine ring), 22.49 (C3 chain), 22.57 (C11 chain), 21.59 (CH₃_{para} pyridine ring), 14.01 (C16 chain). Elemental analysis: calculated %C: 67.58, %H: 10.40, %N: 3.28; found %C: 67.92, %H: 10.89, %N: 3.25

6.1.5. 1-Dodecyl-4-methoxymethylenepyridinium bromide (18)

5 mL (4.67 g, 0.01947 mol) dodecyl bromide, 2 g (0.01623 mol) of 4-methoxymethylenepyridine (22) and 150 mL of acetonitrile, heated at 120 °C for 3 days. Target compound was obtained as white needles with a melting point of 69-70 °C. ¹H-NMR: 9.46 (d, 2H, H arom, 2,6-pyridine), 8.05 (d, 2H, H arom, 3,5-pyridine), 4.97 (t, 2H, *N-CH₂), 4.75 (s, 2H, CH₂-O), 3.53 (s, 3H, CH₃-O), 2.02 (sext, 2H, *N-CH₂-CH₂), 1.4-1.2 (m, 18H, CH₂ chain), 0.875 (s, 3H, CH₃). MS-FAB+: 292 (m/e, M⁺) corresponding to pyridinium cation. Elemental analysis: calculated: %C: 61.28, %H: 9.20, %N: 3.76; found %C: 61.15, %H: 9.51, %N: 4.12

3.1.6. 1-Hexadecyl-4-methoxymethylenepyridinium bromide (14)

5.9 ml (4.67 g, 0.01850 mol) cetyl tosylate, 2 g (0.01623 mol) of 4-methoxymethylpyridine (22) and 150 ml acetonitrile, heated at 130 °C for 2 days. Compound 14 was obtained after elution, white needles, mp 72-76 °C. ¹H-NMR 9.38 (d, 2H, Harom, 2,6-pyridine), 8.06 (d, 2H, Harom, 3,5-pyridine), 4.97 (t, 2H, *N-CH₂), 4.75 (s, 2H, CH₂-O), 3.53 (s, 3H, CH₃-O), 2.02 (sext, 2H, *N-CH₂-CH₂), 1.4-1.2 (m, 26H, CH₂ sat chain), 0.875 (s, 3H, CH₃).

6.1.7. 1-Hexadecyl-4-hydroxy-3,4-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridinium tosylate (19)

4 g (0.01945 mmol) of pyridoxine hydrochloride was dissolved in 250 ml of ethanol with stirring under nitrogen, 1.09 g (0.01945 mol) of KOH (previously dissolved in 25 ml of ethanol) was added. After 1 h, the mixture was concentrated over vacuum, and the solid was transferred to the Parr reactor where 7.7 g (0.01945 mol) of cetyl tosylate plus 100 ml of acetonitrile were added and the mixture heated at 120 °C for 6 h.

The white solid obtained was recrystallized from acetone/ether. Compound 19 was obtained as pale yellow needles with a melting point of 118-120 °C. ¹H-NMR: 8.06 (s, 1H, Harom, Hpyridine), 7.45(d, 2H, Harom, *ortho* sulpho-nate, TSO-), 7.05(d, 2H, Harom, *ortho* methyl of tosylate-), 5.740 (s, 1H, HO-pyridoxine), 4.798 (s, 2H, Ar-CH₂-O pyridoxine), 4.67 (s, 2H, Ar-CH₂-O pyridoxine), 4.52 (t, 2H, *N-CH₂), 2.617 (s, 3H, CH₃-arom, tosylate), 2.271 (s, 3H, CH₃-arom, pyridoxine), 1.760 (sext, 2H, *N-CH₂-CH₂), 1.284-1.20(m, 26H, CH₂ sat chain), 0.838 (s, 3H, CH₃). MS (FAB⁺) presented M⁺ corresponding to the expected pyridinium cation (M/z = 394). Elemental analysis: calculated: %C: 65.81, %H: 9.09, %N: 2.48, %S 5.67; found %C: 65.68, %H: 9.14, %N: 2.52.

6.2. Computational Studies

Molecular modeling studies were performed on a Silicon Graphics Octane 2 workstation, using SYBYL 6.8 molecular modeling software from Tripos Inc., St. Louis, MO (Tripos, 2002).

6.2.1. Molecular 3D Structure Building

For the QSAR study, the structure of the compounds were obtained from the Cambridge Crystallographic Database as implemented in Unity 4.1 or by small modifications of the structure available in the database using Sybyl 6.8. All of the analogues were minimized by the PM3 semiempirical Hamiltonian in Mopac 6.0 package in Sybyl (keywords used: Precise, Full, Mullik and in some cases MMOK).

6.2.2. Alignment Rule

For the 3D-QSAR studies, the structures were aligned using the Match command in Sybyl. CPC was the template and the atoms selected for the rms fitting are marked with an asterisk (*) in Fig. 3. MOPAC charges were retrieved from the PM3 file for each molecule.

6.2.3. COMFA analyses

3D-QSAR analyses were performed using the Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) program, as implemented in Sybyl. CoMFA fields were calculated using a positive charge and a carbon sp³ as electrostatic and steric probes, respectively. Steric and electrostatic interactions were calculated using Tripos Force field with a distance-dependent dielectric constant at all intersections in a regular spaced (2 Å) grid. The minimum σ (column filtering) was set to 2 Kcal/mol, with a cutoff of 30 Kcal/mol.

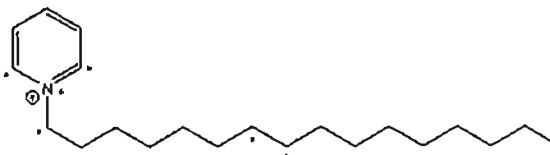


Fig. 3. CPC molecule where asterisk mark shows the atoms selected for the Atom Based Alignment.

6.2.4. PLS Analysis

The CoMFA models were developed using partial least-squares (PLS) by following the standard implementation in Sybyl. The different descriptor blocks have been scaled to each other using CoMFA standard scaling option. To check the statistical significance of the models, cross-validations were done by means of the leave one out (LOO) procedure. The results from the cross-validation analysis were expressed as the cross-validated q^2 (r^2_{cv}). It is defined as $r^2_{cv} = 1 - \text{PRESS} / \sum(Y - Y_{\text{mean}})^2$ where $\text{PRESS} = \sum(Y - Y_{\text{pred}})^2$. The optimum number of components was determined by selecting the smallest s_{press} value. S_{press} value is the root mean predictive error of the sum of the squares. It is the expected uncertainty in the prediction for the individual compounds in the set. $S_{\text{press}} = (\text{PRESS} / (n - c - 1))^{1/2}$ where n is the number of rows and c is the number of components. Usually the standard smallest S_{press} value corresponds to the highest r^2_{cv} . The optimal number of components was subsequently used to derive the final QSAR models. For conventional analysis (not cross validated) the minimum σ standard deviation threshold (column filtering) was set to 2 Kcal/mol to improve the signal-noise ratio. The r^2_{cv} , S_{press} , r^2 , and SE values were computed as defined in SYBYL. SE is the standard error of the estimate. It is the measure of the target property uncertainty still unexplained after the QSAR has been derived.

6.3. Biology

6.3.1. Partition coefficient (log P) determination

Log P was measured using the guidelines of Hansch and Leo [23]. Stock solutions (0.1, 0.5, and 1 mg/mL) of each compound were prepared. Then 1 mL of each solution was dissolved in 20 mL of deionized water (presaturated overnight with octanol) in a centrifuge tube. Then 1 mL of octanol (presaturated overnight with water) was added. The centrifuge was shaken for 1 hour at 150 rpm at 30 °C. The layers were separated at 1500 rpm, and the amount of compound in the aqueous layer measured. A graph of concentration of the compound in octanol vs concentration in water was prepared, and the log of the slope is log P value.

6.3.2. Antimicrobial activity

The macrodilution susceptibility test in Muller-Hinton Broth (GIFCO) was used for the determination of antibacterial activity [24]. The utilized test organisms were: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC25922 *S. aureus* ATCC29123. Ampicillin and CPC were used as standard antibacterials. Solutions of the test compounds, ampicillin and CPC prepared in phosphate buffer (pH= 7.0) and deionized water at concentration of 512 mg mL⁻¹. The two fold dilutions of the compounds were prepared (256, 128, ..., 6.25 mg mL⁻¹). The microorganism suspensions at 10⁶ CFU mL⁻¹ (Colony Forming Unit mL⁻¹) concentration were inoculated into the corresponding test tube. Plates were incubated at 38 °C for 24 h. The incubation chamber was kept sufficiently humid. At the end the incubation period, the MICs

were determined controls for the DMSO, solvents, microorganisms and media microorganisms were also done (Table 9).

Acknowledgements

Sergio Rodríguez-Morales is grateful to the PhD thesis scholarships from the National Council of Science and Technology, Mexico, and from the Graduate Studies General Board, National Autonomous University of Mexico.

References

- [1] Report of Economical research services. U. S. Agricultural Department, web site. Available from: <http://www.econ.ag.gov/briefing/foodsafte>.
- [2] M. McCoy, Chem. Eng. News 6 (1998) 21–41.
- [3] P.J. Breen, C.M. Compadre, E.K. Pifer, H. Salari, D.C. Serbus, D.L. Lattin, J. Food Sci. 6 (1995) 1191–1196.
- [4] P.J. Breen, H. Salari, C.M. Compadre, J. Food Pro. 60 (1997) 1019–1021.
- [5] H. Kourai, K. Tatechi, T. Horie, K. Takeichi, I. Shibasaki, J. Antibact. Antifung. Agents 13 (1983) 245–253.
- [6] J. Lin, S. Qiu, K. Lewis, A.M. Klibanov, Biotechnol. Prog. 18 (2002) 1082–1086.
- [7] J.C. Tiller, S.B. Lee, K. Lewis, A.M. Klibanov, Biotechnol. Bioeng. 79 (2002) 465–471.
- [8] J.C. Tiller, C.J. Liao, K. Lewis, A.M. Klibanov, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 5981–5985.
- [9] H. Kourai, T. Horie, K. Takeichi, I. Shibasaki, Bokin Boba 8 (1980) 191–199.
- [10] H. Kourai, F. Machicawa, K. Tateishi, T. Horie, K. Takeichi, I. Shibasaki, J. Antibact. Antifung. Agents 11 (1983) 553–562.
- [11] Q. Zhu, Z. Guo, N. Huang, F. Chu, J. Med. Chem. 40 (1997) 4319–4328.
- [12] Y.B. Li, M.F. Slavik, J.T. Walker, H. Xiong, J. Food Sci. 62 (1997) 605–607.
- [13] R.S. Shelton, C.H. Van Campen, L. Lang, J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 753–75911.
- [14] T.I. Oprea, C. Waller, Reviews in Computational Chemistry, in: Boyd and Lipkowitz, VCH, Pub. 1997 Vol XI.
- [15] G. Greco, E. Novellino, Y.C. Martín, Reviews in Computational Chemistry, in: Boyd and Lipkowitz, VCH, Pub. 1997 Vol XI.
- [16] Y.M. Martin, K.H. Kim, T.C. Lin, in: Advances in Quantitative Structure Property Relationships, Charton, JAI Press, Greenwich, CT, 1996 Vol. 1 Chapter 1.
- [17] U. Thibaut, G. Folkers, G. Klebe, H. Kubinyi, A. Merz, D. Rognan, in: H. Kubinyi (Ed.), 3D-Qsar in Drug Design: Theory Methods and Applications, Kluwer Academic Publishers, 1993 Vol 1.
- [18] G. Folkers, A. Merz, D. Rognan, in: H. Kubinyi (Ed.), 3D-Qsar in Drug Design: Theory Methods and Applications, Kluwer Academic Publishers, 1993 Vol 1.
- [19] T. Maeda, S. Goto, Y. Manabe, K. Okazaki, H. Nagamune, H. Kourai, Biocontrol Sci. 1 (1996) 41–49.
- [20] H. Kourai, Y. Hasegawa, K. Wada, J. Antibact. Antifung. Agents 22 (1994) 653–661.
- [21] F. Devinsky, I. Lacko, E. Nlyncik, E. Svajdleka, V. Borovska, Pharmazie 51 (1996) 727–731.
- [22] L.H. Bluhm, T. Li, Tetrahedron Lett. 39 (1998) 3623–3626.
- [23] C. Hansch, A. Leo, Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology, ACS Pub, 1995.
- [24] A. Waitz et al., in: NCCLS, 10, 1990 M7-A2.
- [25] J.E. Lien, C. Harsch, M.S. Anderson, J. Med. Chem. 11 (1968) 430–441.



Short communication

Liquid chromatography determination of residue levels on apples treated with cetylpyridinium chloride

Sergio Rodríguez-Morales^{a,b}, Xiang Zhou^a, Hamid Salari^a, Rafael Castillo^b, Philip J. Breen^a, Cesar M. Compadre^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, University of Arkansas for Medical Sciences, 4301 West Markham, Slot 522-3, Little Rock, AR 72205, USA

^b Pharmacy Department, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico DF 04710, Mexico

Received 19 March 2004; received in revised form 2 November 2004; accepted 11 November 2004
Available online 8 December 2004

Abstract

Cetylpyridinium chloride (CPC) has been found to be effective in reducing microbial contamination in apples. A sensitive and specific HPLC method was developed to determine CPC residues in apples treated with CPC. This method involves ion exchange solid-phase extraction, and the use of stearylpyridinium chloride (SPC) as internal standard. Limit of quantitation, was 0.5 µg/ml of CPC for the apple ethanolic extracts. The observed residues in apple (2.35–4.35 µg/g of apple) were lower than those previously reported for chicken and beef. The method is specific, sensitive, reproducible and accurate.
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cetylpyridinium chloride; Apples; Residue levels

1. Introduction

The incidence of food poisoning in humans by *Escherichia coli* O157:H7 is increasingly of concern. This microorganism was first recognized as a cause of food-borne illness in a 1982 outbreak, which was traced to contaminated hamburgers [1]. Since then, many other outbreaks of *E. coli* O157:H7 infections have been associated with contaminated hamburgers [2], dry-cured salami [3], mayonnaise [4], drinking water [5], and unpasteurized commercial apple juice [6]. Apple juice contamination has been traced to apples that had contact with soil and possibly animal feces [7–10].

Previously we have established that cetylpyridinium chloride (CPC, Fig. 1) is effective in reducing bacteria in poultry [11–13] and beef [14] and apples [15]. The U.S. Food and Drug Administration has recently approved the use of CPC to reduce bacterial contamination on poultry. It is in this con-

text that we have explored the potential of CPC as a chemical rinse to reduce bacteria from contaminated apples. In order to establish the practicality of the use of chemical rinses for microbial decontamination of a particular food, it is necessary to assess the chemical residues produced by the treatment.

Recently we reported an HPLC method for measuring the CPC residues that is applicable to beef and chicken carcasses [14,16], where a description of methods for CPC analysis in different matrix was reviewed. Since then, another assay methodology has been described [17] but its suitability and validation on biosurfaces remains to be determined. Additionally, CPC residue analysis of treated vegetables has been performed, but validation of the method was not reported [18].

From the evaluation of CPC residues in beef and chicken tissues [14,16] it is evident that CPC residues levels are strongly influenced by the nature of the treated food surface or tissue. In particular, it has been demonstrated that CPC binds to proteins [19] and fats [14]. Fruits are very rich in carbohydrates and very low in proteins and fat [20,21]. Thus, in apples

* Corresponding author. Tel.: +1 501 686 6493; fax: +1 501 686 6057.
E-mail address: compadrecsarro@uams.edu (C.M. Compadre).

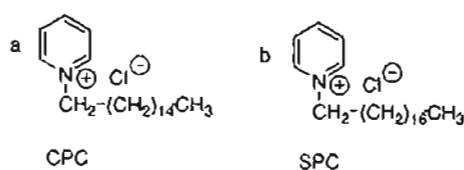


Fig. 1. Chemical structures of (a) cetylpyridinium chloride and (b) stearylpyridinium chloride.

we were anticipating lower residue levels than those observed in beef or chicken. Therefore, it became necessary to develop a more sensitive analytical method than previously available.

During the application of our method to measure CPC residues on apples, significant interference from the matrix was found for both CPC and the internal standard peaks. Thus in the present study we have developed a method which includes a solid-phase extraction step using a carboxylic acid, cationic exchange cartridge. Under the conditions presented, this method selectively separates CPC from apple extract. In addition, the method detects this compound with increased sensitivity.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

CPC (Fig. 1a) was purchased from Zeeland Chemicals, Inc. (Zeeland, MI). Stearylpyridinium chloride (SPC; Fig. 1b) was synthesized according to the literature [22], and its purity and identity was confirmed by melting point, NMR and elemental analysis data (theoretical: 71.56%C, 11.49%H, 3.63%N, found 71.83%C, 11.51%H, 3.65%N). Tetramethylammonium hydroxide pentahydrate (TMAHP) was obtained from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). HPLC grade methanol and water were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Deionized water was obtained from a Milli-Q50 unit (Millipore Corp., Bedford, MA). Alcohol USP (95% ethanol and 5% water) was obtained from Aaper Alcohol Co. (Shelbyville, KY).

Concentrated HCl and trisodium phosphate were analytical reagent grade. Presample preparation was carried out in a 500 mg carboxylic acid (CBA), cationic exchange Bond Elut cartridge from Varian (Harbor City, CA) which was used in conjunction with a Visiprep 24-port model vacuum manifold (Supelco, Bellefonte, PA). CBA cartridges were preconditioned before use by successive treatment with 2.5 ml of methanol, 0.2 mol/l trisodium phosphate, and deionized water.

Granny Smith apples, weighing between 110 and 150 g, were purchased from a grocery store. Arkansas Black apples, weighing between 140 and 200 g were purchased from a local farmer. The latter apples were not waxed or processed. Shaking for the apple extractions was performed using an Orbit Environ-Shaker (Lab-Line Instruments Inc., Melrose Park, IL).

2.2. HPLC conditions

HPLC analyses were performed using a Waters Corp. (Milford, MA) system consisting of Waters 600E Multisolute Delivery System, Waters 490E Programmable Multiwavelength Detector, Waters 746 Data Module, and Waters 600E System Controller. The column (Alltima cyano, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) and the guard cartridge (Alltima cyano, 7.5 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) were obtained from Alltech Associates (Deerfield, IL). Mobile phase was buffer:methanol (29:71) mixture. The buffer was a TMAHP (0.008 M) in aqueous acetic acid (0.14 M), pH 3.6. Ultraviolet absorbance detection was at 260 nm. Each run was completed within 16 min. The flow rate was 1 ml/min and the injection volume was 20 μ l.

2.3. Ethanol extraction

Arkansas Black and Granny Smith apples were weighed and individually placed in polyethylene bags (12 in. \times 20 in.), extracted with 95% ethanol (2 ml ethanol/g of apple) at 60 $^{\circ}$ C for 1 h, 150 rpm. After the bags were cooled to room temperature, the ethanol extract was collected and stored at -20° C for analysis.

2.4. Assay

For the analysis, aliquots (10 ml) of apple ethanol extract were spiked with 90 μ g (30 μ l) of ethanolic SPC as internal standard. The spiked solutions were applied to a 500 mg CBA. After application of the test solutions, the cartridges were washed with 2.5 ml of methanol, and eluted with 2.0 ml of methanol containing 2% HCl, and collected in a glass vial. Twenty microlitres of the samples were injected in to HPLC for CPC quantitation.

2.5. Calibration

Calibration of the method was performed using blank extract of Granny Smith waxed apples obtained by extraction with 95% ethanol (2 ml ethanol/g of apple, 60 $^{\circ}$ C, 1 h, shaking at 150 rpm). Aliquots (10 ml) of the blank extract were spiked with 50 μ l of ethanolic CPC standard to give concentrations 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, and 32 μ g/ml. Ethanolic SPC (30 μ l, 90 μ g) was added to each sample. The samples were analyzed as described in Section 2.4 above. A calibration curve was obtained by performing weighted linear regression of CPC/SPC peak-area ratio versus CPC concentration.

2.6. Recovery of ethanol extraction

Aqueous solutions (100 μ l) containing CPC (0.212 and 7.48 mg) were applied to the surface of waxed Granny Smith apples using a micro-syringe. After the applied solutions dried out, the apples ($n = 5$) were extracted with 95% of ethanol (2 ml ethanol/g of apple, 60 $^{\circ}$ C, 1 h, shaking at

150 rpm). The amount of CPC was measured as described in Section 2.4 above. The extraction recovery was calculated as the ratio of measured CPC to added CPC.

2.7. Ion exchange solid-phase recovery

Ten-millilitre aliquots of the blank extract were spiked with 50 μ l of ethanolic CPC standards to give concentrations 0.6 and 30 μ g/ml. Samples were treated and analyzed for CPC in the same way as described in Section 2.4 except that the internal standard was added after ion exchange SPE. Twenty microlitres of the solution were injected on the HPLC system. The recovery was calculated as the ratio of measured CPC to added CPC.

2.8. Assay application

Arkansas Black ($n=5$) and Granny Smith ($n=5$) apples were weighed and individually placed in a polyethylene bag (12 in. \times 20 in.), and treated for 3 min with 0.4 ml of CPC solution per gram of apple. The solutions tested contain 0, 2 or 4 mg/ml of CPC in deionized water. After treatment, apples were rinsed with tap water (0.8 ml/g of apple, pH 7.3, 25 $^{\circ}$ C), placed individually in polyethylene bags (7 in. \times 11.5 in.), and extracted with 95% ethanol. After the bags were cooled to room temperature, the ethanol extract was collected and stored at -20° C for analysis. The residual CPC levels in the apples were analyzed as described above (Section 2.4).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of experimental conditions

The HPLC method developed uses an internal standard to reduce analytical errors due to variations in such factors as detector sensitivity and injection volume. We have previously used dodecylpyridinium chloride (DPC) as internal standard for measuring CPC on beef and chicken carcasses [14,16].

However, there is significant interference to both CPC and DPC from apple extractives. In a effort to increase the specificity of the method we have introduced a solid-phase extraction step using a carboxylic acid, cationic exchange cartridge, which under proper conditions can selectively separate CPC from apple extract.

Unfortunately, even with the use of the ion exchange cartridge there was interference with the DPC peak. The fact that the interfering peaks appeared to be less lipophilic than CPC suggested the use of a more lipophilic compound as internal standard. SPC, which has two more methylene carbons than CPC, was found to be an appropriate internal standard. Under the conditions used, the retention times were about 7.9 and 9.5 min for CPC and SPC, respectively. There is no significant interference from apple extract at either of these two times (Fig. 2). In addition, it was possible to reduce flow rate from 2 to 1 ml/min, causing a reduction in back pressure.

3.2. Assay validation: linearity and precision

A seven-point calibration curve was obtained over the CPC concentration range 0.5–32 μ g/ml of ethanolic extract, equivalent to 1.0–64 μ g/g of apple. Linearity was satisfactory as shown by the high correlation coefficient ($r=0.9999987 \pm 0.0169$; R.S.D. = 1.69%). Weighted linear regression produced the equation $y=0.12565x - 0.0059$, where x is the CPC concentration and y is the peak-area ratio (CPC/SPC). The standard deviation for the slope and the intercept were 0.0010 and 0.0011, respectively. This corresponded to R.S.D. of 0.796 and 18.6%, respectively.

The error and the coefficient of variation (CV) were within 11% for both intra- and inter-assay, which was less than the maximum acceptable limit, 15% (Tables 1 and 2). [23]

3.3. Limit of quantitation

Solid-phase extraction allows baseline separation from any interfering peaks. Moreover, the high efficiency of this technique maximizes sensitivity [24].

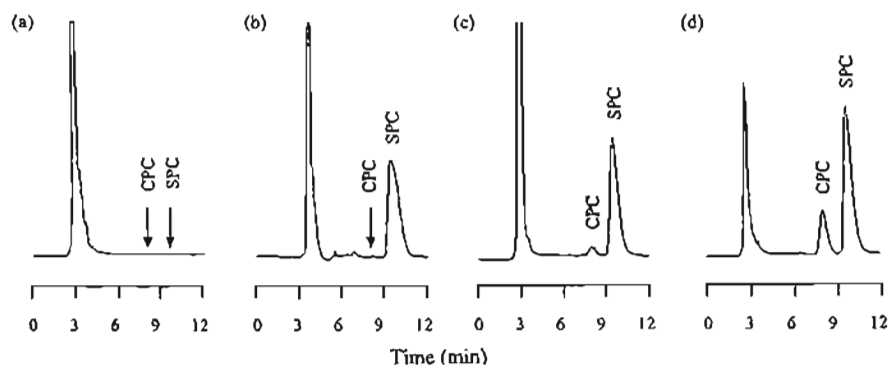


Fig. 2. High performance liquid chromatograms of (a) blank extract, (b) blank extract spiked with SPC at 90 μ g/ml, (c) blank extract spiked with SPC and CPC at 90 and 0.5 μ g/ml, respectively, and (d) extract of a CPC-treated apple spiked with SPC at 90 μ g/ml (measured CPC concentration: 1.80 μ g/ml in the extract or 3.58 μ g/g in the apple).

Table 1

Intra-day assay precision and accuracy for the determination of cetylpyridinium chloride in spiked apple extract ($n=5$)

| Spiked concentration ($\mu\text{g/ml}$) | Measured concentration (mean \pm S.D.) ($\mu\text{g/ml}$) | Coefficient of variation (%) | Relative error (%) |
|---|---|------------------------------|--------------------|
| 0.61 | 0.62 \pm 0.05 | 8.51 | 2.34 |
| 15.0 | 14.7 \pm 0.50 | 3.38 | 2.20 |
| 30.0 | 28.5 \pm 0.96 | 3.39 | 5.11 |

Table 2

Inter-day assay precision and accuracy for the determination of cetylpyridinium chloride in spiked apple extract ($n=5$)

| Spiked concentration ($\mu\text{g/ml}$) | Measured concentration (mean \pm S.D.) ($\mu\text{g/ml}$) | Coefficient of variation (%) | Relative error (%) |
|---|---|------------------------------|--------------------|
| 0.61 | 0.66 \pm 0.07 | 11.1 | 8.19 |
| 15.0 | 15.0 \pm 0.69 | 4.38 | 5.24 |
| 30.0 | 29.6 \pm 2.26 | 7.65 | 1.28 |

In the present method, use of an ion exchange cartridge resulted in an increase in sensitivity. The limit of quantitation, defined as the lowest concentration that can be determined with acceptable precision (CV < 20%) and accuracy (error < 20%) [25], was 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for the apple ethanolic extracts, representing 1.0 $\mu\text{g/g}$ of apple.

Incidentally, the limit of detection was 0.026 $\mu\text{g/ml}$.

3.4. Recovery of ethanol extraction and ion exchange SPE

The ethanol extraction method was very efficient in recovering CPC from the apple surface. Likewise, the solid-phase extraction procedure had high recovery of CPC. When apples ($n=5$) were treated with 0.212 and 7.48 mg of CPC, the recoveries were 106 \pm 14 and 99.9 \pm 4.88% respectively. These high extraction recoveries suggest that applied CPC remains on the surface of the apples, where it is accessible to extraction. Ion exchange SPE recoveries were 103 \pm 6.94, and 97.0 \pm 3.85% for CPC concentrations of 0.6 and 30 $\mu\text{g/ml}$ in ethanol extracts, respectively.

3.5. Assay application

The method was applied to evaluate the residue level on Granny Smith (waxed) and Arkansas Black (non-waxed) apples treated with aqueous solution of CPC. When Granny Smith apples were treated with aqueous CPC solution of 2 and 4 mg/ml, the residue levels were 4.35 \pm 1.34 and 4.33 \pm 0.53 $\mu\text{g/g}$ of apple, respectively. For non-waxed apples, the respective residue levels were 3.21 \pm 0.60 and 2.35 \pm 0.18 $\mu\text{g/g}$ of apple when treated with the above concentrations of aqueous CPC.

According to these results, an apple weighing 150 g treated with CPC under the conditions proposed would have a residue of this compound between 0.35 and 0.65 mg. Interestingly, even though CPC's antimicrobial efficacy varied greatly between waxed and non-waxed apples and was influenced by the CPC concentration used, the residue level changed very little over the range of concentrations of applied CPC.

4. Conclusion

An HPLC assay for determination of CPC residual levels on apples has been developed. The assay employs 95% ethanol for the efficient extraction of CPC from apples. The interferences from apple extractives are well separated from CPC and the internal standard SPC by ion exchange solid-phase extraction and then HPLC. The method is specific, sensitive, reproducible and accurate.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the Arkansas Science and Technology Authority, USDA/CSREES through the Food Safety Consortium, and USDA/NRICGP (grant number: 9802739).

References

- [1] Center for Disease Control and Prevention, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 31 (1982).
- [2] Center for Disease Control and Prevention, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 43 (1994).
- [3] Center for Disease Control and Prevention, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 44 (1995).
- [4] J.P. Erickson, J.W. Stamer, M. Hayes, D.N. McKenna, L.A. Van Alstine, J. Food Prot. 58 (1995) 1059.
- [5] Center for Disease Control and Prevention, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 45 (1996).
- [6] B.T. Steel, N. Murphy, C.P. Rance, J. Pediatr. 101 (1982) 963.
- [7] R.E. Besser, S.M. Lett, J.T. Beber, M.P. Doyle, T.J. Barret, J.G. Wells, P.M. Griffin, JAMA 269 (1993) 2217.
- [8] W.B. Keene, B. Sazie, J. Kok, D.H. Rice, D.D. Hancock, V.K. Bodon, T. Zhou, M.P. Doyle, JAMA 277 (1997) 1229.
- [9] I.T. Kudva, P.G. Hatfield, C.J. Hovde, Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995) 1363.
- [10] T. Zhao, M.P. Doyle, J. Shere, L. Garber, Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995) 1290.
- [11] P.J. Breen, C.M. Compadre, H. Salari, J. Food Prot. 60 (1997) 1019.
- [12] P.J. Breen, C.M. Compadre, E.K. Fifer, H. Salari, D.C. Serbus, D.L. Latin, J. Food Sci. 6 (1995) 1191.
- [13] D. Latin, P.J. Breen, C.M. Compadre, K. Fifer, H. Salari, M. Slavik, US Patent 5,366,983 (1994).

- [14] C.N. Cutter, W.J. Dorsa, A. Handic, S. Rodríguez-Morales, X. Zhou, P.J. Breen, C.M. Compadre, *J. Food Prot.* 63 (2000) 593.
- [15] H. Salari, Personal communication.
- [16] X. Zhou, H. Handic, K. Fifer, P. Breen, C.M. Compadre, *J. Chromatogr. B* 728 (1999) 273.
- [17] G.A. Mostafa, *Anal. Sci.* 17 (2001) 1043.
- [18] H. Wang, Y. Li, M.F. Slavik, *J. Food Prot.* 64 (2001) 2071.
- [19] C. Deckers, H. Ohgke, *Arzneimittel-Forschung* 45 (1995) 1335.
- [20] B. Ray, *Fundamental Food Microbiology*, DRD Press, Boca Raton, FL, 1996.
- [21] J.M. Jay, *Modern Food Microbiology*, VNR Co., New York, NY, 1978.
- [22] R.S. Shelton, M.G. Van Campen, C.H. Tilford, H.C. Lang, L. Nisonger, F.J. Bandelin, H.L. Rubenkoenig, *J. Am. Chem. Soc.* 68 (1946) 757.
- [23] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, C.T. Layloff, T. Viswanathan, C.B. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, S. Spector, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 309.
- [24] M. Ibañez, Y. Picó, J. Mañez, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 137.
- [25] G. Flesch, Ch. Mann, P.H. Degen, *J. Chromatogr. B* 696 (1997) 123.