

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICÓLAS DE HIDALGO**

**ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL  
COMPLEJO  
CIPROFLOXACINO-Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl**

# **TESIS**

**Que para obtener el grado de**

**Químico Farmacobiólogo**

**PRESENTA**

**p.Q.F.B. Columba Citlalli Barrera Mendoza**

**DIRECTOR DE TESIS**

**D. C. Luis Chacón García**

Parte de este trabajo fue presentado en los siguientes congresos:

Síntesis y actividad antibacteriana de derivados del ciprofloxacino.

**Barrera Mendoza, C.C.;** Chacón García, L.

Primera reunión de la Academia Nacional de Química Orgánica, Apizaco, Tlaxcala, noviembre y diciembre del 2004.

Síntesis y actividad antibacteriana del complejo ciprofloxacino-Bi(III)-  
(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl

**Barrera Mendoza, C.C.;** Contreras Celedón, C.; Cortés Penagos, C.; Chacón García, L.

XL Congreso Mexicano de Química, Morelia, Michoacán, septiembre del 2005.

---

# ÍNDICE

---

|   |    |
|---|----|
| Índice  | I  |
| Índice de figuras                                       | II |
| Índice de gráficas                                      | IV |
| Índice de tablas  | IV |
| Lista de abreviaturas                                   | V  |
| <br>  |    |
| Introducción  | 1  |
| Antecedentes  | 2  |
| Generalidades   | 2  |
| Clasificación y mecanismo de acción de los antibióticos | 2  |
| Características generales de las quinolonas             | 3  |
| Historia y clasificación de las quinolonas              | 4  |
| Ciprofloxacino  | 11 |
| Mecanismo de acción de las quinolonas                   | 12 |
| Topoisomerasas  | 12 |
| Girasa o topoisomerasa II                               | 13 |
| Topoisomerasa IV  | 18 |
| Quinolonas como inhibidores de la girasa y topo IV      | 20 |
| Resistencia bacteriana                                  | 23 |
| Relaciones estructura actividad                         | 24 |
| Relaciones estructura farmacocinética                   | 26 |
| Relaciones estructura toxicidad                         | 27 |
| Interacciones con medicamentos                          | 29 |
| Complejos metálicos derivados de las quinolonas         | 30 |
| Bismuto y sus compuestos                                | 31 |
| <br>  |    |
| Hipótesis   | 32 |
| <br>  |    |
| Objetivos   | 32 |
| <br>  |    |
| Discusión y resultados                                  | 33 |
| <br>  |    |
| Conclusiones  | 57 |
| <br>  |    |
| Parte experimental                                      | 58 |
| <br>  |    |
| Referencias   | 62 |
| <br>  |    |
| Anexos  | 68 |

## INDICE DE FIGURAS:

|   |    |
|---|----|
| 1. Estructura básica de las quinolonas.   | 3  |
| 2. Estructura del antimalárico cloroquina.  | 4  |
| 3. Quinolonas clásicas o de primera generación.   | 5  |
| 4. Quinolonas de segunda generación o generación 2 a.   | 6  |
| 5. Quinolonas de generación 2b.   | 8  |
| 6. Quinolonas de tercera generación.  | 9  |
| 7. Garenoxacino, quinolona de cuarta generación.  | 10 |
| 8. Principales grupos de quinolonas.  | 11 |
| 9. Cambio de topología en el ADN por las Topoisomerasas.  | 14 |
| 10. Estructura de la girasa en donde se muestran las subunidades A y B.                         | 15 |
| 11. Ruptura del ADN por las Topoisomerasas.   | 16 |
| 12. Actividad de la girasa.   | 18 |
| 13. Modelo de una Topoisomerasa de tipo II activo.  | 19 |
| 14. Dominios funcionales en las quinolonas.   | 21 |
| 15. Quinolona con un grupo electroattractor en C3.  | 25 |
| 16. Relación Estructura Actividad.  | 26 |
| 17. Relación estructura Farmacocinética.  | 27 |
| 18. Relación Estructura Toxicidad.  | 28 |
| 19. Quelato insoluble formado entre CIP y Mg <sup>2++</sup>                                     | 29 |
| 20. Estrategia de síntesis.   | 34 |
| 21. Disociación del lactato y del clorhidrato de CIP.   | 35 |
| 22. Espectro de IR del complejo 31.   | 38 |
| 23. Posibles estructuras para el complejo de CIP-Bismuto.                                       | 39 |
| 24. Estructuras de complejos obtenidas por difracción de rayos X..                              | 40 |
| 25. Disociación de un compuesto de CIP- Bismuto en condiciones fisiológicas.                    | 42 |
| 26. Compuestos de tiobismuto que han presentado actividad contra <i>Clostridium difficile</i> . | 44 |
| 27. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos en <i>E. coli</i>               | 46 |
| 28. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos en <i>S. aureus</i> .           | 48 |
| 29. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos en <i>P.aeruginosa</i>          | 50 |

|   |    |
|---|----|
| 30. Pruebas de actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto disueltos en ácido acético por difusión con discos en <i>E. coli</i>       | 51 |
| 31. Pruebas de actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto disueltos en ácido acético por difusión con discos en <i>S. aureus</i> .   | 52 |
| 32. Pruebas de actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto disueltos en ácido acético por difusión con discos en <i>P. aeruginosa</i> | 53 |
| 33. Prueba de actividad en ADN mediante electroforesis.   | 56 |

### Indice de Gráficas:

|  |    |
|--|----|
| 1. Actividad antibacteriana del CIP y sus complejos de Bismuto en <i>Escherichia coli</i>                                    | 46 |
| 2. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto en <i>Staphylococcus aureus</i> .                             | 48 |
| 3. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .                            | 49 |
| 4. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto disueltos en ácido acético en <i>Escherichia coli</i> .       | 51 |
| 5. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto disueltos en ácido acético en <i>Staphylococcus aureus</i> .  | 52 |
| 6. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto disueltos en ácido acético en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . | 53 |

### Indice de tablas:

|  |    |
|--|----|
| I. Clasificación y función de las Topoisomerasas procariotas.  | 13 |
| II. Diámetros de los halos de inhibición en bacterias control. | 47 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>ADN</b>                          | Ácido desoxirribonucleico                                  |
| <b>ADP</b>                          | Adenosíndifosfato  |
| <b>Asp</b>                          | Acido aspártico  |
| <b>ATP</b>                          | Adenosintrifosfato   |
| <b>Cipro, Cip</b>                   | Ciprofloxacino   |
| <b>DMSO</b>                         | Dimetilsulfóxido   |
| <b><i>E. coli</i></b>               | <i>Escherichia coli</i>                                    |
| <b>IR</b>                           | Infrarrojo   |
| <b>kDa</b>                          | Kilodalton   |
| <b>mg</b>                           | Miligramo  |
| <b>mL</b>                           | Mililitro  |
| <b>mm</b>                           | Milímetro  |
| <b>mM</b>                           | Milimolar  |
| <b>mmol</b>                         | Milimol  |
| <b>nm</b>                           | Nanómetro  |
| <b>µg</b>                           | Microgramo   |
| <b>µL</b>                           | Microlitro   |
| <b>NCCLS</b>                        | National Committee for<br>Clinical Laboratory<br>Standards |
| <b>NH<sup>+</sup><sub>3</sub>-R</b> | Clorhidrato del<br>dimetilacetal de la<br>etilenamina      |
| <b><i>P. aeruginosa</i></b>         | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                              |
| <b>pKa</b>                          | Constante de disociación<br>para ácidos                    |
| <b>pKb</b>                          | Constante de disociación<br>para bases                     |
| <b>QRDR</b>                         | Quinolone Resistance<br>Determining Region                 |
| <b>QSAR</b>                         | Relación estructura<br>actividad cuantitativa              |
| <b>RMN</b>                          | Resonancia magnética<br>nuclear                            |
| <b><i>S. aureus</i></b>             | <i>Staphylococcus aureus</i>                               |
| <b><i>S. cerevisiae</i></b>         | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                            |
| <b>SAR</b>                          | Relación estructura<br>actividad                           |
| <b>Ser</b>                          | Serina   |
| <b>TEA</b>                          | Trietilamina   |
| <b>Tir</b>                          | Tirosina   |
| <b>Topo</b>                         | Topoisomerasa  |
| <b>UV-Vis</b>                       | Espectro de ultravioleta-<br>visible                       |
| <b>YPDA</b>                         | Agar papa dextrose extracto<br>de levadura                 |

## ***INTRODUCCIÓN***

En la época actual, de grandes avances científicos y tecnológicos, las infecciones bacterianas siguen causando estragos en la población mundial. En ocasiones, esto es debido a una atención médica indebida y falta de acceso a servicios de salud, pero también en muchos casos debida un fenómeno que se está convirtiendo en un problema de salud pública que va en aumento: la aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos disponibles. Ante este fenómeno, decenas de estos fármacos han dejado de ser eficaces.

En todo el mundo, científicos trabajan en la búsqueda de nuevos antibióticos, queriendo ganar la batalla a las bacterias. En la década de los 80, cuando diarreas e infecciones urinarias no cedían al tratamiento con los antibióticos usados, médicos e investigadores volvieron los ojos hacia un fármaco sintetizado fortuitamente en los 60, que era activo contra las bacterias productoras de esas enfermedades. Este fármaco es el Ácido Nalidíxico, el primer miembro de la familia de las quinolonas cuyo uso se había limitado por su estrecho espectro antibacteriano, toxicidad y baja biodisponibilidad. El hecho de que el ácido Nalidíxico fuese activo contra bacterias resistentes a otras clases de antibióticos, provocó el inicio de una síntesis frenética de derivados, con diversas modificaciones hechas al núcleo básico que les otorgaban mayor potencia, un espectro antibacteriano más amplio, mejores propiedades farmacocinéticas una baja incidencia en la selección de mutantes resistentes y pocos efectos secundarios. Así, las quinolonas han llegado a ser de los antibióticos mas prescritos en la actualidad. Pero aún en esta familia de antibióticos, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia. Tan sólo en el periodo de septiembre del 2004 a febrero del 2005, en un laboratorio clínico particular de la ciudad de Morelia se aislaron decenas de cepas resistentes. (Resultado de Información proporcionada por la Mtra. Bertha Ballesteros de Laboratorio CEDIMI, Para las estadísticas ver Anexo 1)

El mecanismo de acción detallado de las quinolonas no está claro hasta el momento. Se sabe que actúan inhibiendo al complejo girasa o topo IV- ADN, y que en esta unión el Mg juega un papel fundamental, pero los detalles moleculares de esta interacción no se conocen. En este trabajo se presenta la obtención de un complejo derivado de ciprofloxiacino con nitrato de bismuto y con actividad muy superior al ciprofloxacino mismo. Los resultados aportan datos importantes para el diseño de nuevas estructuras.

---

# I. ANTECEDENTES

---

**1.1 Generalidades:** La palabra antibiótico se usa en la actualidad para designar indistintamente a un agente antibacteriano derivado de una fuente natural (Patrick, 2001); sintetizado en un laboratorio químico o un híbrido de los dos, que suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlos (Page *et al*, 1998).

**1.1.1. Clasificación y mecanismo de acción:** El éxito de los agentes antibacterianos depende en gran medida de su acción selectiva; actúan contra células procariotas y no contra eucariotas, esto debido a las diferencias en constitución y metabolismo entre ambas.

Según su mecanismo de acción, los antibióticos se clasifican de la siguiente manera (Hardman, 1997; Page *et al* 1998; Patrick, 2001):

**1.-Compuestos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana:** La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana produce lisis celular, con la consecuente muerte bacteriana. La pared celular es un excelente blanco para los antibióticos, puesto que las células eucariotas están desprovistas de esta estructura y por lo tanto, no resultan afectadas por estos agentes. Un ejemplo clásico es la penicilina, que inhibe la peptidil transferasa en la biosíntesis de peptidoglicanos.

**2.-Compuestos que interfieren con la membrana plasmática:** Esto ocasiona que la membrana plasmática se vea afectada en su permeabilidad y exista fuga de los componentes intracelulares, con resultados fatales para la célula. Las polimixinas ejercen su efecto por esta vía.

**3.-Compuestos que inhiben la síntesis de proteínas:** Estos compuestos afectan la función de las subunidades ribosómicas 30 S o 50 S e inhiben la síntesis proteica, por lo que no se producen las enzimas esenciales para la supervivencia de la célula bacteriana.

Los aminoglucósidos y el cloranfenicol son un ejemplo de este grupo de antimicrobianos.

**4.- Compuestos que inhiben el metabolismo celular:** También se conocen como “antimetabolitos”, es decir, interfieren en un proceso metabólico inhibiendo alguna enzima de la ruta metabólica bacteriana. Las sulfonamidas son un claro ejemplo de este grupo de fármacos.

**5.- Compuestos que inhiben la transcripción y replicación de ácidos nucleicos:** Dentro del último grupo se encuentran los agentes que alteran los procesos del ADN como replicación o transcripción, afectando por lo tanto la división celular. En este grupo se ubican los compuestos que interactúan directamente con el material genético dañándolo o bien interfiriendo en su capacidad de reconocimiento a enzimas afectando su topología. En todos los casos las consecuencias pueden ser fatales para la bacteria. Este grupo es de particular interés para la presente tesis, ya que las quinolonas inhiben a la Topoisomerasa IV y a la girasa, enzimas fundamentales en la replicación del ADN, impidiéndola y provocando así la muerte bacteriana.

### ***1.2.- Características generales de las Quinolonas:***

Las quinolonas son un grupo de antibióticos sintéticos, con acción bactericida, derivados del ácido 4-oxo-3-carboxílico de una naftiridina, quinolina, cinnolina o piridopirimidina. ([http://www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0497/ponens.html](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0497/ponens.html) )

La estructura base es la siguiente:

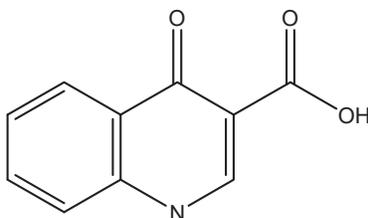
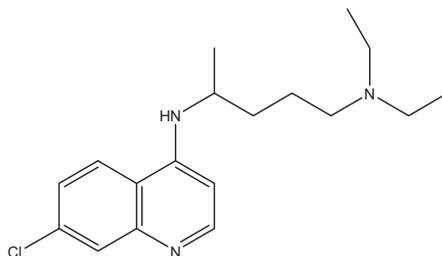


Figura 1. Estructura base de las quinolonas.

### 1.3.- Historia y clasificación de las quinolonas

En 1962, Leshner y colaboradores obtuvieron la primer quinolona mientras trabajaban en la síntesis de la cloroquina 0, medicamento contra la malaria. El ácido nalidíxico se obtuvo como producto secundario en este estudio (Oliphant, 2002; Taléns, 2001; Van Bambeke *et al*, 2005).



Cloroquina 0

Figura 2: Estructura del antimalárico cloroquina.

El ácido nalidíxico presentó actividad moderada frente a bacterias Gram negativas y en 1964 comenzó a utilizarse en clínica para tratar infecciones del tracto urinario. Pese a su actividad antibacteriana, se observó que sus propiedades farmacocinéticas no eran adecuadas, que presentaba una alta incidencia de efectos secundarios y que las bacterias que ocasionaban las enfermedades de las vías urinarias, rápidamente adquirían resistencia al fármaco. Estas fueron las razones que motivaron la síntesis de derivados que presentaran mejores características farmacológicas que su predecesor (Wilson y Gisvold, 1998).

De esta manera se obtuvieron y describieron en 1973 las llamadas quinolonas clásicas o de 1<sup>a</sup> generación y que comprenden los ácidos oxolínico, piromídico, pipemídico; el cinoxacino y el flumequino. Sus estructuras se muestran en la figura 3.

El espectro antibacteriano del ácido nalidíxico y sus derivados está básicamente confinado a bacterias Gram negativas, incluyendo los patógenos que comúnmente son la causa de infecciones de las vías urinarias. Especies de *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*, así como cocos Gram positivos y

bacterias anaerobias, son resistentes a las quinolonas clásicas (Taléns, 2001; Wilson y Gisvold, 1998).

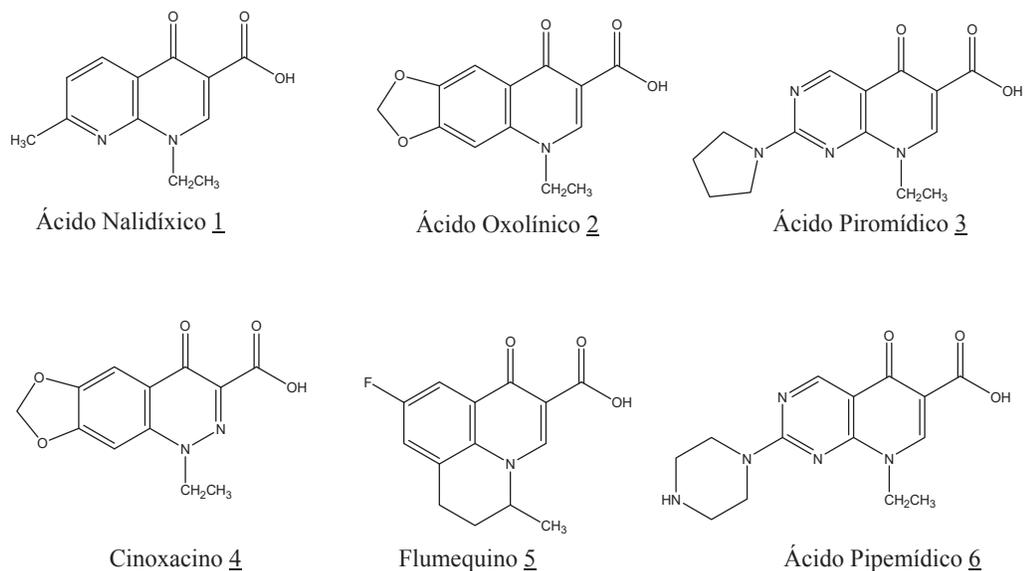


Figura 3. Quinolonas clásicas o de Primera Generación.

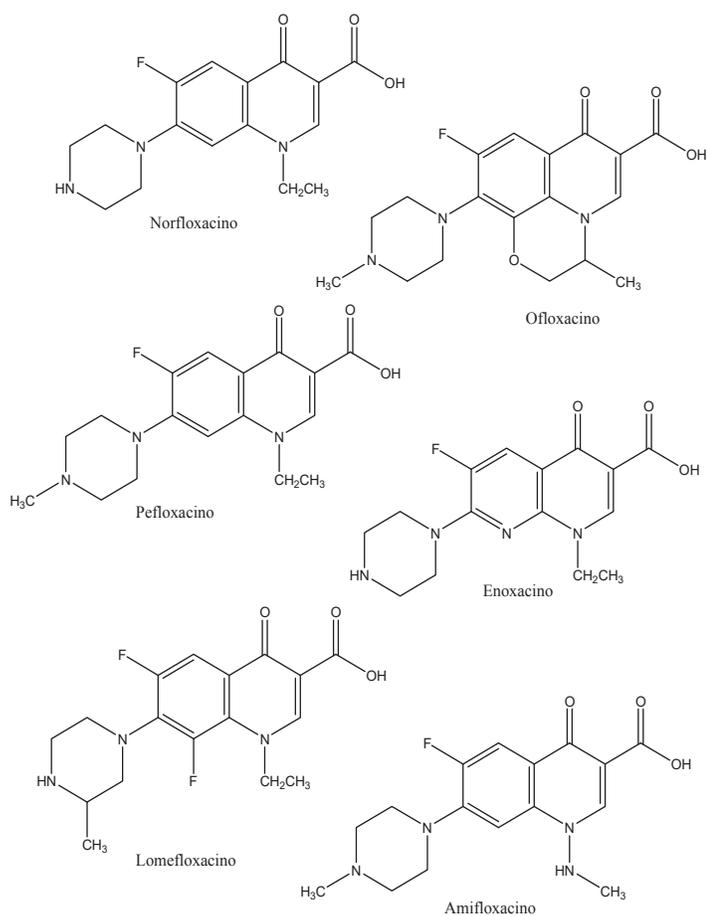
Todas estas quinolonas no difieren mucho de su farmacocinética ni de su espectro de actividad antibacteriana, a excepción del flumequino y del ácido pipemídico, este último quizás por el sustituyente piperazínico en la posición 7.

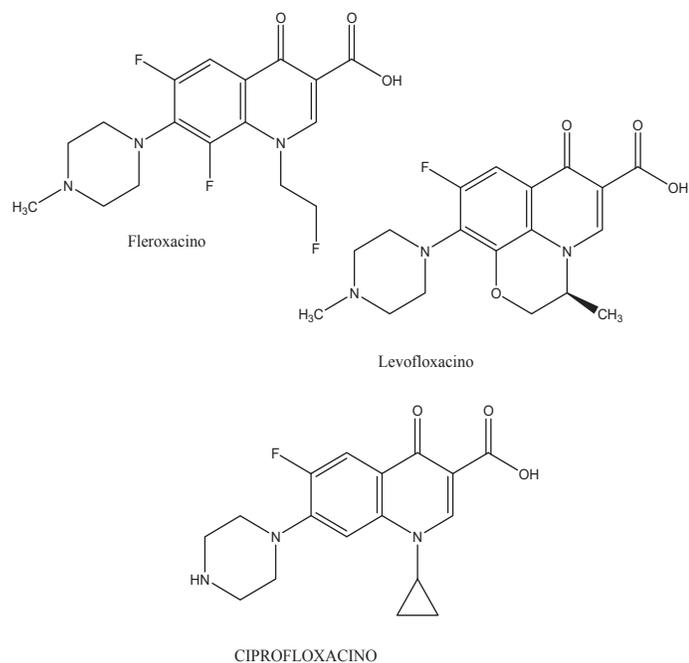
El flumequino fue la primer quinolona reportada con actividad antibacteriana que presenta un átomo de flúor en su estructura, en la posición 6, lo que incrementó significativamente la actividad antibacteriana, aunque sus propiedades farmacocinéticas no fueron satisfactorias (Taléns, 2001).

El incremento de la actividad antibacteriana debida a la presencia de un átomo de flúor en la posición 6, llamó poderosamente la atención, y motivó a la síntesis de una nueva serie de compuestos que se denominaron quinolonas de segunda generación o fluoroquinolonas.

Esta segunda generación de compuestos se caracteriza por pertenecer principalmente a la clase de las benzopiridonas y naftiridinas, además de presentar un átomo de flúor en la posición 6 y un anillo piperazínico o pirrolidinico en la posición 7. Las quinolonas clásicas o de primera generación fueron desplazadas rápidamente por las fluoroquinolonas, pues sus propiedades farmacocinéticas resultaron mejores, su espectro de acción antibacteriana es más amplio y presentan una menor incidencia en la aparición de resistencia bacteriana. El espectro de actividad antibacteriana de este grupo de compuestos incluye una mayor cantidad de patógenos Gram negativos, entre ellos *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*, además de ser activas contra cocos Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, y algunos estreptococos (Wilson y Gisvold, 1998).

Dentro de las Fluoroquinolonas de segunda generación se encuentran los compuestos que se presentan en la figura 4.





**Figura 4. Quinolonas de Segunda Generación o Generación 2<sup>a</sup>**

A pesar de las ventajas de las quinolonas de segunda generación (baja resistencia, tolerancia y pocos efectos secundarios), las fluoroquinolonas no son activas contra la mayoría de bacterias anaerobias, incluyendo la mayoría de especies de *Bacteriodes* y *Clostridium*, además de ser poco activas contra cocos Gram positivos aerobios, como es *Streptococcus pneumoniae* (Hooper, 1998; Taléns, 2001; Wilson y Gisvold, 1998)

Existen dos fluoroquinolonas de la segunda generación, que deben ser consideradas aparte: el sparfloxacin y el grepafloxacin (figura 5). Estas presentan sustitución en las posiciones 5 y 7, lo que aumenta de manera significativa su actividad contra *Streptococcus pneumoniae*. A pesar de esta ventaja, ambas fluoroquinolonas han sido reducidas o suspendidas en su prescripción en Europa por razones toxicológicas (Van Bambeke *et al*, 2005).

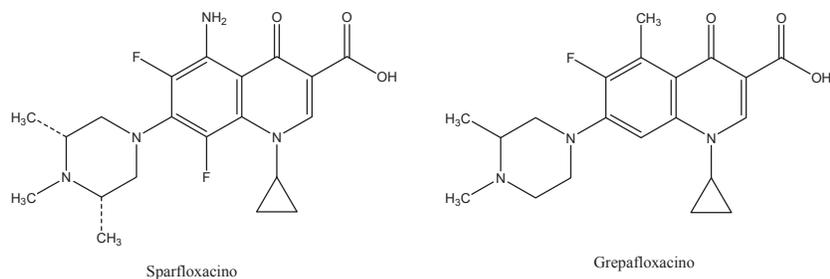


Figura 5. Quinolonas de la Generación 2b.

Con la finalidad de incrementar la potencia y la actividad contra una mayor cantidad de bacterias gram positivas y bacterias anaerobias, se sintetizaron nuevas fluoroquinolonas. Entre los intentos, al manipular el núcleo básico se insertaron dos y tres átomos de flúor, se introdujeron sustituyentes alquílicos en la piperazina o anillo pirrolidínico de la posición 7, y grupos como metoxilo en la posición 8. Estos compuestos pertenecen a las quinolonas de tercera generación (Taléns, 2001).

Las quinolonas de tercera generación presentan una mayor potencia contra bacterias Gram positivas incluyendo *Streptococcus pneumoniae*, patógenos atípicos y bacterias anaerobias. También poseen propiedades farmacocinéticas mejoradas, vida de eliminación más larga y mejor penetración en tejidos, por lo que estas fluoroquinolonas, pueden ser prescritas para tratamiento de infecciones sistémicas (Hooper, 1998; Taléns, 2001).

En este grupo se encuentran los compuestos que se presentan en la figura 6. El trovafloxacin, una naftiridona, no posee el metoxilo en la posición 8 pero posee el espectro antibacteriano más amplio de las quinolonas de tercera generación, aunque su uso fue restringido en Estados Unidos y en Europa debido a reportes de hepatotoxicidad. El gemifloxacin es la quinolona más reciente de esta generación y también posee un amplio espectro de actividad antibacteriana, pero su uso está aprobado sólo en Corea, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Canadá. Por su parte, el balofloxacin ha mostrado una actividad importante contra micobacterias.

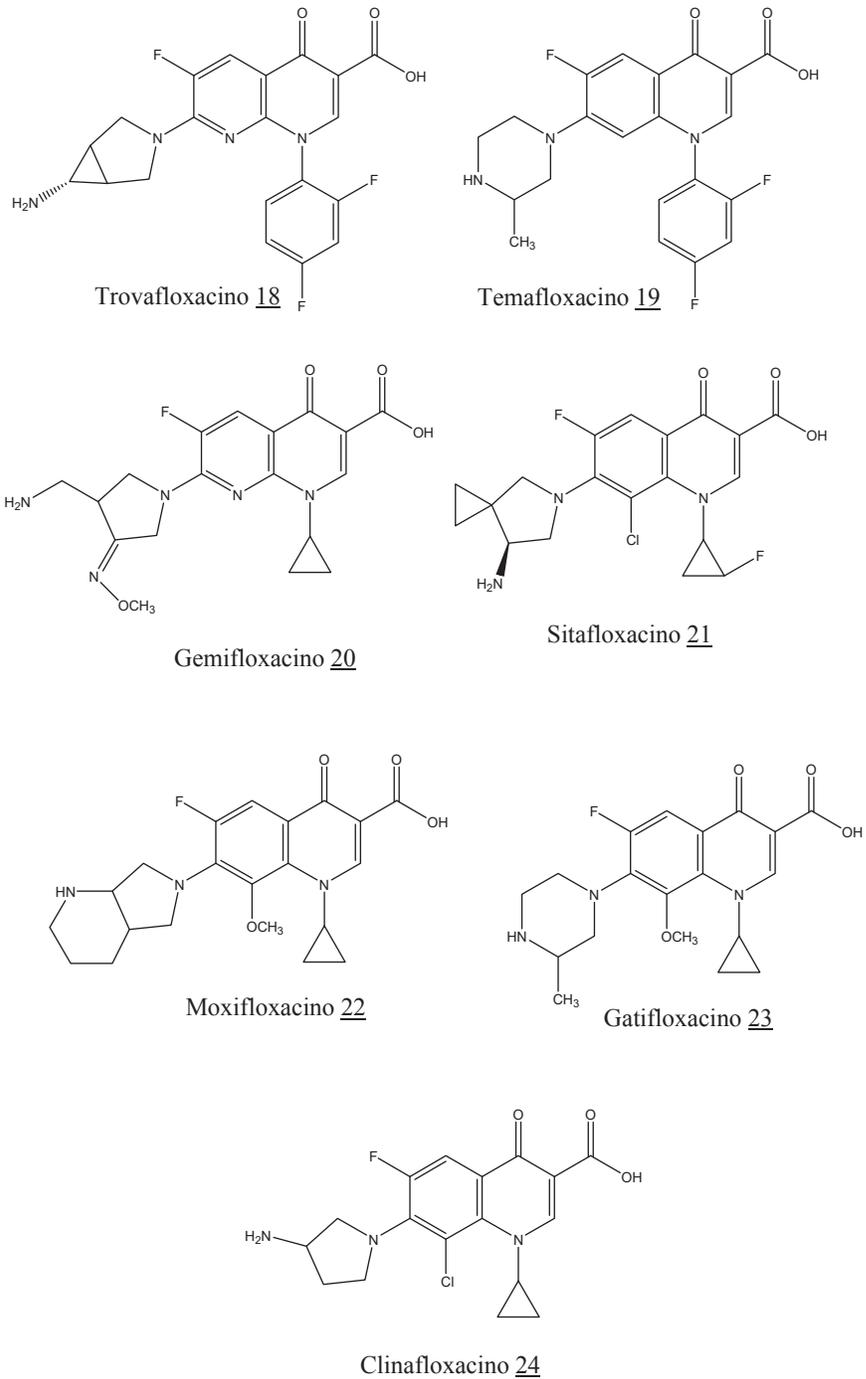


Figura 6. Quinolonas de Tercera Generación.

Basados en estudios de relación estructura actividad (SAR, por sus siglas en inglés), ha sido posible identificar el farmacóforo y se han determinado grupos

importantes para su actividad antibacteriana como son ciclopropilo en la posición 1, metoxilo en la posición 8 y pirrolidina o piperazina sustituidas en la posición 7 (Van Bambeke *et al*, 2005). Optimizando la actividad al modificar estos sustituyentes, ha sido posible eliminar el átomo de flúor de la posición 6 del anillo quinolónico, aunque se puede encontrar en otras posiciones, sin pérdida de la actividad antibacteriana. Esto ha dado paso a las quinolonas de cuarta generación, o defluoroquinolonas. El garenoxacino es el primer representante de esta generación (García y Gutiérrez, 2002; Van Bambeke *et al*, 2005). Esta defluoroquinolona ha presentado una excelente actividad contra bacterias gram positivas y anaerobios, menor probabilidad de selección de mutantes resistentes comparada con fluoroquinolonas comunes y muy buenas propiedades farmacocinéticas, En el año 2002 se encontraba en fase III, (García y Gutiérrez, 2002) pero a la fecha no se tienen más reportes.

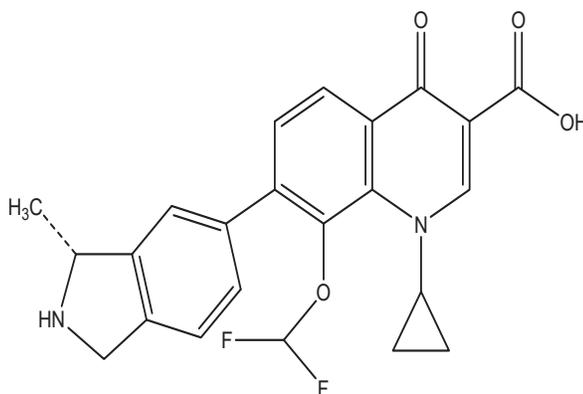


Figura 7. Garenoxacino, quinolona de Cuarta Generación.

Hasta el momento, las quinolonas han sido clasificadas básicamente por su espectro antibacteriano.

Existen otros criterios para clasificación de las quinolonas, como son: la clasificación biológica, en la cual este grupo de fármacos se dividen en cuatro grupos atendiendo al espectro de acción y al grado de metabolización; y la clasificación química, en la cual dependiendo del número de átomos de nitrógeno en el anillo quinolinico y su posición, las quinolonas pueden clasificarse en 4 grupos (Taléns, 2001):

|                   | Posiciones que pueden contener Nitrógeno |
|-------------------|--|
| Benzopiridonas    | 1  |
| Naftiridinas      | 1,8                                      |
| Piridopirimidinas | 1,6,8                                    |
| Cinnolinas        | 1,2                                      |

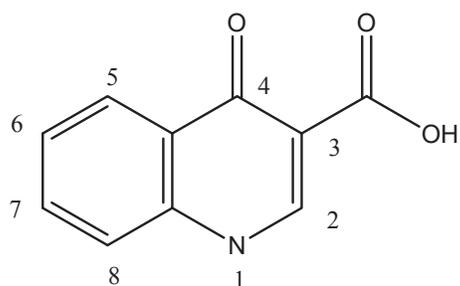


Figura 8. Principales grupos de quinolonas

Finalmente, una forma más de clasificación, es la que se basa en las propiedades de disociación en condiciones fisiológicas de las quinolonas (Wilson y Gisvold, 1998). De esta manera, las quinolonas se dividen en dos clases:

Dentro de la primer clase se encuentran las quinolonas clásicas o de primera generación, que solo tienen un grupo funcional ionizable, el carboxilo en la posición 3.

Pertencen a la segunda clase los compuestos con dos grupos funcionales ionizables, como las fluoroquinolonas que contienen, adicionalmente al carboxilo en la posición 3, un grupo funcional piperazino básico en la posición 7 y un átomo de flúor en la posición 6.

#### **1.4.- Ciprofloxacino:**

El ciprofloxacino es una quinolona de segunda generación de acuerdo a su espectro antibacteriano y es uno de los antibióticos más prescritos en todo el mundo (Taléns, 2001; Van bambeke *et al*, 2005). En el mercado se encuentra disponible en presentación oral y parenteral.

Se considera que el ciprofloxacino es la quinolona que mejor distribución posee de todas las quinolonas comerciales, pues presenta una amplia distribución en fluidos corporales y tejidos, incluyendo el líquido cefalorraquídeo (Wilson Gisvold, 1998).

Posee además una potencia contra bacterias Gram negativas más grande que otras fluoroquinolonas, y sigue siendo el más activo contra *Pseudomonas aeruginosa* (Oliphant, 2002; Van Bambeke *et al*, 2005; Wilson y Gisvold, 1998).

El ciprofloxacino es el agente de elección en el tratamiento de gastroenteritis bacteriana, infecciones de vías respiratorias y es particularmente efectivo para el control de bronquitis y neumonía causados por Gram negativos. También es usado en el tratamiento de infecciones de la piel, tejidos blandos, huesos y articulaciones, infecciones de las vías urinarias complicadas y no complicadas, y control de infecciones venéreas como gonorrea o chancroide (Hooper, 1998; Oliphant, 2002; Wilson y Gisvold, 1998).

### ***1.5. Mecanismo de acción de las quinolonas***

El blanco de acción de las quinolonas en las células bacterianas es un par de enzimas de la familia de las topoisomerasas: la girasa y la Topoisomerasa IV.

*1.5.1. Topoisomerasas.* Las Topoisomerasas están presentes tanto en células procariotas como eucariotas; estas enzimas se encargan de cambiar la topología o la geometría tridimensional de las moléculas de ADN sin modificar su estructura fundamental. Dicho de otra manera, estas proteínas catalizan reacciones de isomerización entre diferentes formas topológicas del ADN. Para cumplir con esta función, forzosamente necesitan romper momentáneamente el genoma. Estos cambios en la topología del ADN son necesarios para permitir la replicación del mismo y por lo tanto, la supervivencia celular (Anderson *et al*, 1998, Hardman y Limbird, 1997; Heddle *et al*, 2001, Holden, 2001; Mathews y Van Holde, 2001).

Las Topoisomerasas se clasifican en dos grupos: de tipo I o de tipo II. La diferencia fundamental entre estos grupos radica en el mecanismo de acción molecular, específicamente en la ruptura del ADN. Dentro del grupo I, se encuentran las que rompen transitoriamente 1 de las 2 hebras del ADN; las de tipo II lo hacen en ambas hebras. Una característica de las Topo II es que, a diferencia de las Topo I, requieren ATP para su funcionamiento (Holden, 2001; Roca, 2003)

A modo grueso, estos grupos de enzimas, se subdividen a su vez en subgrupos dependiendo de aspectos mecánicos más específicos como la dirección del corte o unión covalente al grupo fosfato en el ADN es decir si el OH libre es el correspondiente a 3' a 5'. De esta manera, las Topoisomerasas de tipo I se subdividieron en familias IA

y IB, si la enzima al realizar el corte transitorio en el ADN forma un enlace covalente con el fosfato 5' del sitio de ruptura, pertenecerá a la familia IA. En caso de que quede unida al extremo terminal 3' del ADN, la topoisomerasa será IB.

Las topoisomerasas de tipo II no tienen sub-clasificación; se ha observado que todas las enzimas de este tipo se unen covalentemente a los fosfatos 5' de las 2 hebras rotas del ADN (Holden, 2001; Roca, 2003).

**Tabla I.** Clasificación y función de las Topoisomerasas procariotas.

| <i>Nombre:</i>    | <i>Clasificación:</i> | <i>Función:</i>   |
|-------------------|-----------------------|---|
| Topoisomerasa I   | IA                    | Relaja ADN superenrollado en ausencia de ATP  |
| Topo II o Girasa  | II                    | Introduce superenrollamientos negativos en ADN circular cerrado en presencia de ATP |
| Topoisomerasa III | IA                    | Decatena moléculas de ADN en ausencia de ATP  |
| Topoisomerasa IV  | II                    | Decatena moléculas de ADN en presencia de ATP                                       |

La girasa es una de las topoisomerasas bacteriana y esta junto con la Topoisomerasa IV, son los blancos moleculares de las quinolonas; ambas enzimas son de tipo II.

**1.5.1.1. Girasa o Topoisomerasa II.** La girasa ha sido ampliamente estudiada en *Escherichia coli*, su función es la de introducir superenrollamientos negativos en ADN circular cerrado, eliminando con esto la superhelicidad positiva existente en el momento de la replicación del material genético. Esta enzima es única entre todas las topoisomerasas, que se caracterizan por relajar el material genético, siendo la única capaz de superenrollar al ADN, actividad exclusiva de células procariotas; aún en organismos más evolucionados no se ha detectado una enzima capaz de llevar a cabo la función de la girasa (Holden, 2001; Kampranis y Maxwell, 1998).

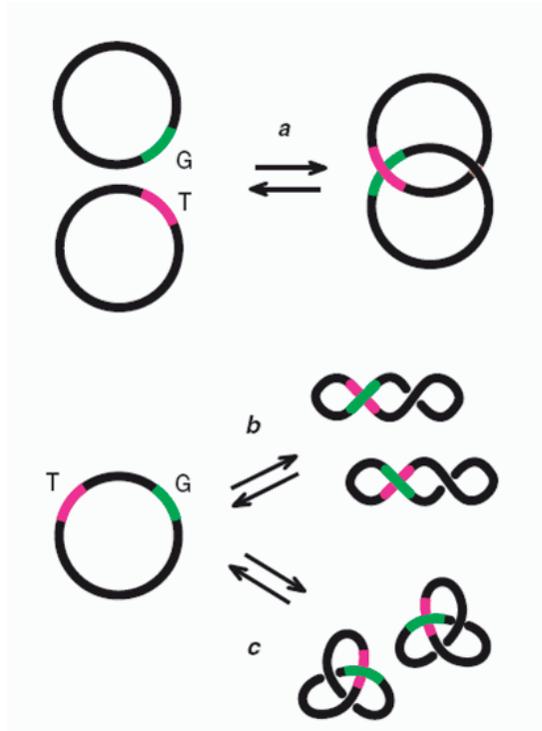


Figura 9: Cambio de topología del ADN por las topoisomerasas: a) Si el segmento G y el segmento T se encuentran en moléculas de ADN distintas, la Topo las encadenará o desencadenará. b) Si ambos segmentos residen en la misma molécula, la Topo producirá cambios en el grado de superenrollamiento o c) de anudamiento del ADN. (Tomado de Roca, 2003).

La Topoisomerasa II es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades A y dos subunidades B, que forman la holoenzima  $A_2B_2$ . Cada subunidad está codificada por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente.

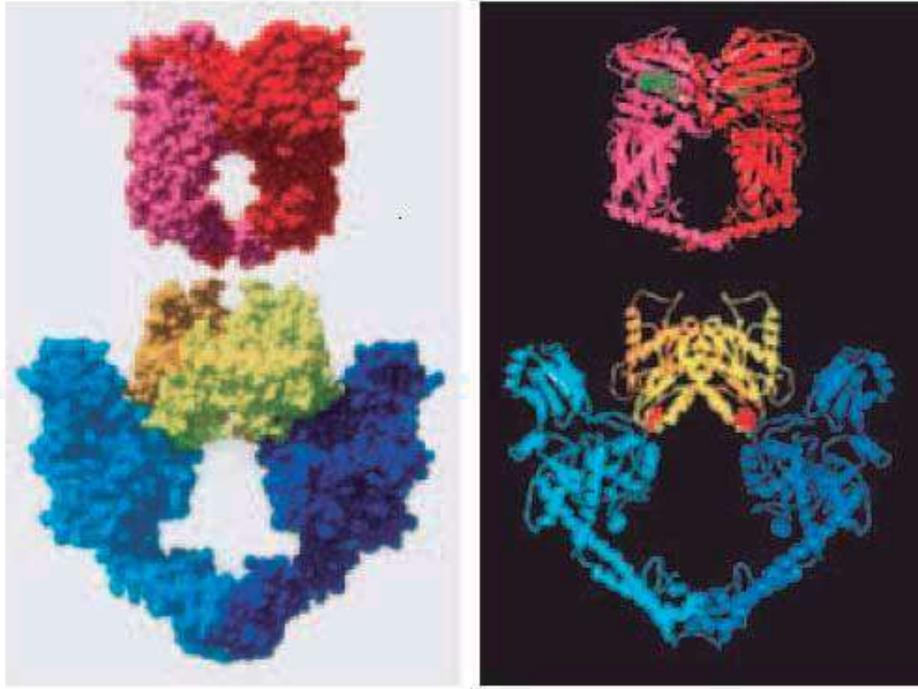


Figura 10. Reconstrucción de la estructura atómica de las topoisomerasas tipo II a partir de un fragmento de girasa de *E. coli* (en rojo) y un fragmento de la topo II de *S. cerevisiae* (en azul y amarillo). En rosa y rojo se muestra la subunidad B, que dimeriza modulado por la unión e hidrólisis del ATP. En azul y amarillo la subunidad A, responsable del corte y sellado del ADN (Tomado de Roca, 2003).

El mecanismo de acción consiste en la ruptura de ambas hebras de una molécula de ADN produciendo un espacio suficiente para permitir el paso de otra doble hélice y finalmente cerrar el dúplex escindido para dar como resultado una topología diferente a la original.

La subunidad A es la responsable del reconocimiento al ADN, además de romper la hebra y finalmente religarlo. Tiene un peso molecular de 97 kDa y contiene el sitio activo, en el cual la tirosina 122 forma un enlace fosfodiéster con el ADN durante el **Paso de rompimiento** (Hedde *et al*, 2001; Holden, 2001; Kampranis y Maxwell,

1998). Este paso es una reacción de sustitución nucleofílica en donde el grupo OH de la tirosina ataca al fosfodiéster.

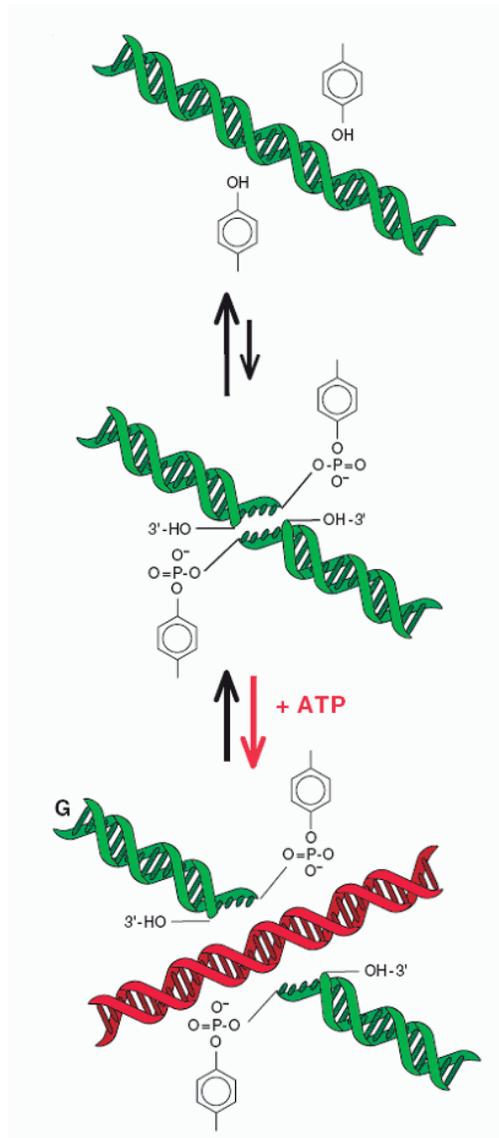


Figura 11. Ruptura del ADN por las Topoisomerasas.  
(Tomado de Roca, 2003)

Por su parte la subunidad B es la responsable de capturar el segmento de ADN que será transportado a través de la ruptura momentánea producida por la subunidad A. Tiene un peso molecular de 90 kDa y contiene el sitio de hidrólisis del ATP. Se ha estimado que en cada ciclo catalítico la girasa de ADN requiere de 2 moléculas de ATP. Se sabe que la unión del ATP a la enzima provoca en ella un cambio de conformación, formando un anillo proteico alrededor del ADN. Después, solo mediante la hidrólisis de los nucleótidos, la enzima volverá a su conformación original. Este extraordinario mecanismo hace de la girasa una verdadera maquina molecular.

En mas detalle, el mecanismo mas comunmente aceptado se puede apreciar en la figura 11, en donde se ilustra que el segmento de ADN que será escindido (segmento G), se une al dímero A. Mediante una transesterificación reversible, se forma un intermediario covalente entre el fosfato 5' del ADN y la tirosina 122 de cada mitad de esta subunidad. Después, la girasa dobla el ADN en sentido dextrógiro, enrollándose de esta manera en un fragmento del material genético de aproximadamente 130 pares de bases. Con este enrollamiento, la girasa se proporciona el segmento T que será transportado perteneciente a la misma molécula de ADN. A continuación la unión de ATP a la subunidad B provoca un cambio en la conformación de la enzima, lo que hace que esta misma subunidad capture el segmento T hacia la cavidad central de la girasa, atravesando en este momento el segmento G. Después este segmento es religado y ambos fragmentos salen inmediatamente de la topoisomerasa. La hidrólisis de ATP hará que la enzima recupere su conformación inicial, para comenzar con un nuevo ciclo catalítico (Holden, 2001; Roca, 2003).

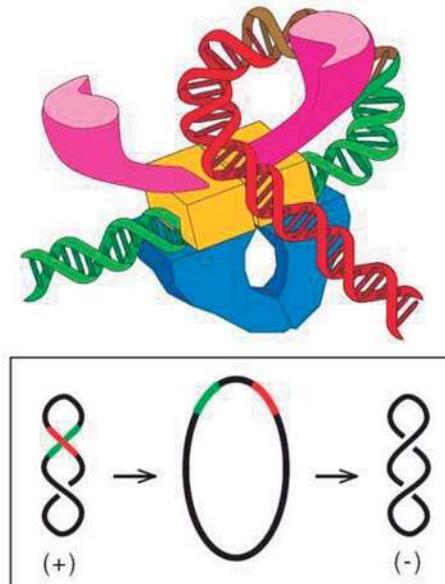


Figura 12. Actividad de la Girasa. La región en verde muestra el segmento G, en rojo el segmento T. En amarillo y azul, la subunidad A, que reconoce al ADN, lo rompe y finalmente lo religa. La subunidad B, que captura al segmento T y contiene el sitio de hidrólisis de ATP, se muestra en rosa. La girasa sólo puede eliminar la superhelicidad positiva y generar superhelicidad negativa en el ADN. (Tomado de Roca, 2003)

**1.5.1.2- Topoisomerasa IV.** Es también una enzima de tipo II que ocupa de la hidrólisis de ATP para llevar a cabo su función: decatenar ADN activamente, por lo que juega un papel crítico en la replicación del material genético al permitir una separación adecuada de los cromosomas hijos.

Es un heterotetrámero formado por 2 subunidades, E y C; la forma activa de esta enzima es  $C_2E_2$ . Cada subunidad de esta enzima es codificada por los genes *parE* y *parC*. Los dímeros codificados por estas proteínas son homólogos a las subunidades B y A de la girasa, respectivamente (Holden, 2001; Taléns, 2001)

La girasa fue descubierta antes que la Topoisomerasa IV, por lo que se atribuía a aquella la decatenación del ADN. Después se descubrió la Topoisomerasa IV y que ella era quien realizaba la actividad de decatenar, llevando a pensar que esta era su única

función. Ahora se sabe que también es capaz de eliminar superenrollamientos que ocurren en el material genético al momento de la replicación; así, ambas enzimas pueden estar involucradas en el alargamiento de la cadena de ADN. Se cree además que en la célula se combinan las actividades de la girasa y las Topoisomerasas I y IV para mantener una superhelicidad global negativa dentro de la bacteria. (Holden, 2001)

Hasta la fecha, no hay datos cristalográficos de la Topoisomerasa IV, pero por su similitud con la estructura de la girasa, se presume que pudiera tener un mecanismo de acción semejante a esta. Sin embargo, sí se conoce que la Topo IV no se enrolla en el ADN a diferencia de la girasa, por lo que no es capaz de superenrollar el ADN. (Holden, 2001)

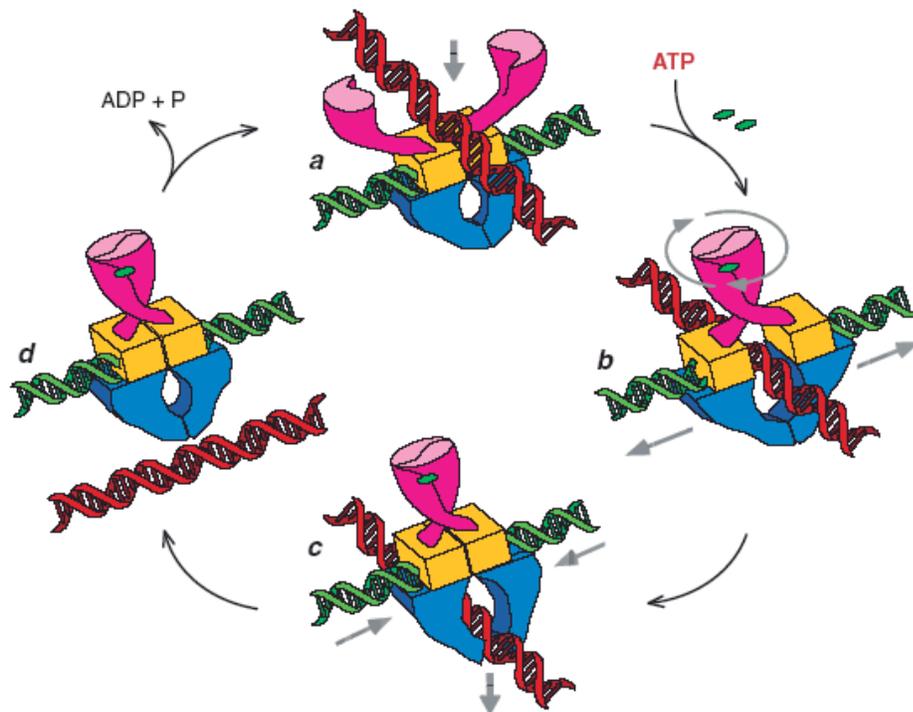


Figura 13. Modelo de una Topoisomerasa Tipo II activo.

(Tomado de Roca, 2003)

### ***1.5.2: Quinolonas como inhibidores de la Girasa y de la Topo IV:***

Las quinolonas ejercen su efecto bactericida involucrándose en el complejo ADN-Topo envenenando así al material genético y provocando de esta forma, la muerte celular bacteriana.

Los miembros de esta familia de fármacos son compuestos altamente polares y se cree que entran a la célula bacteriana a través de canales de porinas de la membrana externa altamente cargados, mediante un mecanismo de difusión pasiva (Wilson y Gisvold, 1998).

Los detalles moleculares de la inhibición de la girasa o Topo IV no están claros y hasta la fecha se han formulado varias teorías al respecto aunque todas están relacionadas entre sí.

Shen y colaboradores han propuesto un modelo denominado “Unión cooperativa Quinolona-ADN”. Este es el modelo en el que prácticamente se basan la mayoría de los modelos aceptados al respecto. Su fundamento radica esencialmente en estudios hechos en el norfloxacin en los que se sugiere que en presencia de ATP y en el momento en que el ADN se encuentra roto por la enzima, 4 moléculas de quinolona se unen a 4 bases desapareadas (ADN de una sola hebra) que forman este hueco mediante puentes de hidrógeno entre las bases y el grupo carbonilo de C4 y el carboxilo de C3. Las moléculas de quinolona se unen además entre sí, cooperativamente, probablemente mediante interacciones hidrofóbicas cola con cola entre los grupos del N1 y apilamientos  $\pi$ - $\pi$  entre sus anillos aromáticos. Este modelo plantea que la enzima induce un sitio de unión específico para quinolonas en su sustrato, el material genético (González, 2004; Noble *et al*, 2003; Palú *et al*, 1992; Turel, 2002).

En estudios posteriores se ha postulado que al complejo ADN-Enzima se unen dos moléculas de quinolona y no cuatro, además de que este modelo no toma en cuenta el hecho de que el magnesio es necesario en la interacción ADN-Enzima (Palú *et al*, 1992).

El modelo de Shen ha sido modificado y ahora incluye interacciones del sustituyente en C7 con la subunidad B de la girasa (Turel, 2002).

Un aspecto interesante que cabe mencionar es el hecho de que, en esta propuesta mecanística, se ha sugerido que la quinolona entra al ADN mediante una burbuja espontánea que se forma en el mismo, considerando que el ADN es una estructura dinámica.

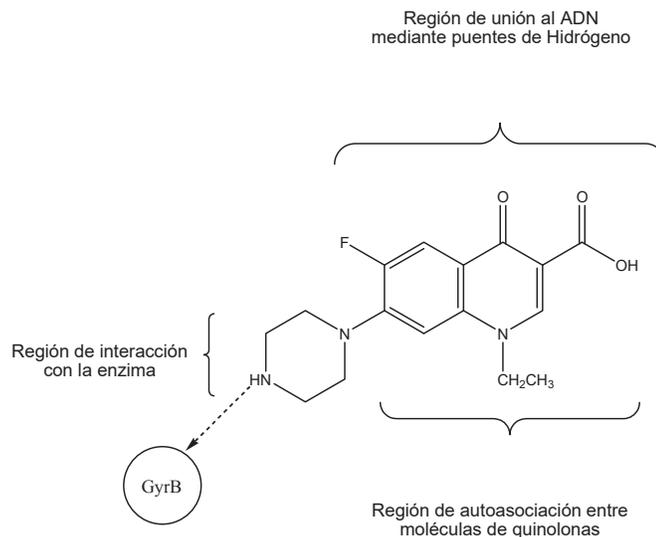


Figura 14. Dominios Funcionales en las quinolonas según el modelo de Shen. (Tomado de González, 2004)

### 1.5.2.1. El papel del Mg en el mecanismo de acción:

Como se mencionó anteriormente, se ha concluido que el  $Mg^{2+}$  modula la cantidad de moléculas de quinolona que se une al ADN. Así, la molécula de quinolona se une a los enlaces fosfodiéster del ADN mediante un puente de  $Mg^{2+}$  coordinado por el carbonilo en C4 y el carboxilato de C3 del fármaco, probablemente en una proporción 1:1. (Noble *et al*, 2003; Palú *et al*, 1992; Turel, 2002). La unión podría además estabilizarse por interacciones de empaquetamiento entre el fármaco y las bases, especialmente guanina y adenosina, lo que concuerda con la observación de la preferencia de las quinolonas de unirse a regiones de ADN de una sola hebra y ricas en purinas (Palú *et al*, 1992). En condiciones fisiológicas, el norfloxacin y las fluoroquinolonas con dos grupos ionizables, se encuentran en forma zwitteriónica, lo que propicia la formación del complejo con el magnesio; este complejo presenta una carga neta positiva, lo que le facilita llegar al ADN, que presenta carga neta negativa. El Mg del complejo ahora puede interactuar electrostáticamente con los grupos fosfato del ADN (Palú *et al*, 1992).

El equipo de Palú descubrió que con un exceso de iones  $Mg^{2+}$  no se modificaba la interacción entre la quinolona y el material genético. La concentración de magnesio que permitió la unión máxima de quinolona al ADN fue de 1 a 2 mM, que coincide con la concentración intracelular bacteriana de este metal, lo cual parece ser de gran importancia (Palú *et al*, 1992).

En el trabajo de Llorente *et al*, una serie de quinolonas fueron comparadas mediante un estudio de QSAR. Los resultados sugieren que las quinolonas se intercalan en una región de ADN de una sola hebra con el grupo N1 en el surco mayor y con el grupo de R7 en el surco menor, permitiendo que este grupo interactúe también con la subunidad A de la girasa, posiblemente por puentes de hidrógeno. En este modelo, el magnesio está presente también: un ión hidratado de este metal se une al complejo mediante los grupos carboxilato y carbonilo de la quinolona, dos oxígenos de dos fosfatos distintos y el nitrógeno 7 y el oxígeno 6 de una purina y una guanina, respectivamente.

Kwok *et al* estudiaron el mecanismo de acción de estos fármacos utilizando quinobenzoxacinas y extrapolando sus resultados a las quinolonas. En topoisomerasa tipo II de levadura, descubrieron que las quinobenzoxacinas requieren  $Mg^{2+}$  para su unión al ADN pues también contienen los grupos carboxilato y carbonilo en las posiciones C3 y C4 respectivamente y forman un complejo intercalador con el ADN más estable que las quinolonas. En el modelo se propone que dos pares de moléculas de quinobenzoxacina se unen al ADN mediante interacciones con el magnesio. De cada par, una molécula se intercala entre bases adyacentes del sitio de ruptura del genoma y la otra molécula se ubica externamente, donde puede interactuar con la enzima. Este modelo se extrapola a las quinolonas porque se ha observado que el norfloxacin forma dímeros con las quinobenzoxacinas en el ADN, lo que sugiere que esta manera de unión podría aplicarse a las quinolonas (Kwok *et al*, 1999; Noble *et al*, 2003).

Un estudio teórico-experimental llevado a cabo por Robles y colaboradores, sugiere que la intercalación de las quinolonas acomplejadas a un metal, es un paso importante en el mecanismo de acción de estos fármacos. Ellos basan esta premisa en los resultados de sus estudios sobre la interacción de quinolonas acomplejadas con cobre y un modelo de ADN (Turel, 2002).

Sissi *et al* sugieren basados en un estudio posterior, que la unión de las quinolonas a la enzima mediante magnesio puede ser un rasgo del mecanismo de acción de esta familia de fármacos (Turel, 2002).

### **1.6.- Resistencia bacteriana.**

Las mutaciones que producen resistencia bacteriana pueden aparecer durante la terapia con quinolonas; este puede ser el principal factor limitante de su uso (Oliphant, 2002). Además, el abuso de estos fármacos no solamente en medicina clínica sino también en alimentos agrícolas promueve la resistencia en bacterias gram positivas y Gram negativas, lo que podría limitar la efectividad de las quinolonas en un futuro cercano (Oliphant, 2002).

Existen dos mecanismos principales por los que se desarrolla la resistencia bacteriana:

A) Disminución de la concentración intrabacteriana de fármaco.

Este mecanismo es inducible principalmente y permite la supervivencia inmediata bacteriana. Ocurren cambios en las porinas de la membrana externa, lo que disminuye la penetración del fármaco a la célula. Se ha reportado en Gram negativos. La resistencia adquirida mediante este mecanismo es de bajo nivel, ya que la entrada del antibiótico a la célula no se bloquea del todo (Van Bambeke *et al*, 2005).

A últimas fechas se ha reconocido a las bombas efflux como uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos. Estas bombas efflux son ubicuos y se cree que son esenciales en la fisiología bacteriana. Estos sistemas son codificados por genes cromosomales o genes asociados a elementos móviles, que al ser activados, provocan una resistencia de bajo nivel a fluoroquinolonas, aunque ha habido casos en los que los sistemas efflux pueden causar una resistencia de alto nivel por ellas mismas, sin estar presentes otros mecanismos. Las bombas efflux presentan una importancia especial, porque favorecen la aparición de resistencia bacteriana al permitir a la célula sobrevivir en un medio en el que el antibiótico se encuentra en una concentración sub-óptima.(Taléns, 2001; Van Bambeke *et al*, 2005).

La presencia de sustituyentes voluminosos en la posición 7 disminuye el transporte de quinolonas por las bombas efflux. En bacterias Gram negativas, las bombas efflux son de baja especificidad, lo que produce resistencia a varias familias de antibióticos una

gran cantidad de antibióticos, aunque las moléculas no estén relacionadas entre sí químicamente (Van Bambeke *et al*, 2005).

#### B) Alteración del blanco.

En este mecanismo que es estable y se disemina más fácilmente, los cambios en ocurren por mutaciones en los genes cromosomales que codifican para la girasa, *gyrA* y *gyrB* y para la Topoisomerasa IV, *parC* y *parE*. Se ha observado que las mutaciones se agrupan en una región de la enzima denominada QRDR, que se encuentra localizada en la subunidad A de la girasa, cerca del residuo Tir<sup>122</sup>, el sitio activo (Barnard y Maxwell, 2001; Heddle *et al*, 2001; Van bambeke, *et al*, 2005). Estas mutaciones producen cambios en los aminoácidos que dichos genes codifican, disminuyendo así la unión de la fluoroquinolona al complejo Enzima-ADN, y ocurren con mucha frecuencia en los residuos Ser<sup>83</sup> y Asp<sup>87</sup> de la subunidad A, lo que sugiere que estos residuos se involucran en la unión del antibiótico (Barnard y Maxwell, 2001; Hooper, 1998; Van Bambeke *et al*, 2005). El cambio de un solo aminoácido en la subunidad A de la girasa incrementa 100 veces la resistencia al ácido nalidíxico, pero sólo 16 para ciprofloxacino y otras fluoroquinolonas (Hooper, 1998).

Hasta la fecha no se han detectado enzimas que degraden las quinolonas, ni resistencia mediada por plásmidos (Hooper, 1998; Van Bambeke *et al*, 2005).

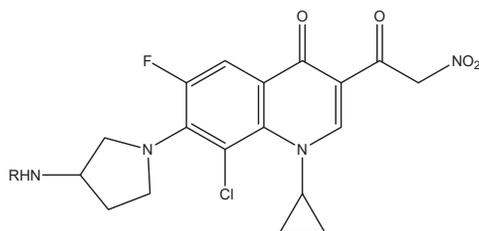
#### **1.7: Relación Estructura Actividad.**

Como se mencionó anteriormente, el ácido nalidíxico, el primer compuesto sintetizado de la familia de las quinolonas, presentó un estrecho espectro antibacteriano, bajos niveles en suero y toxicidad en tejidos este último factor determinante para abandonar el tema hasta los años 80 en los que surgió nuevamente el interés en él, al observarse que poseía actividad antibacteriana contra cepas de *Escherichia coli* y *Shigella* que eran resistentes a muchas otras clases de antibióticos (Van Bambeke *et al*, 2005). Este hecho marcó la pauta para que se sintetizaran derivados, que hasta la fecha han alcanzado miles, modificando el núcleo básico mediante la introducción de diversos sustituyentes, con la finalidad de incrementar la potencia y el espectro antibacteriano, mejorar las propiedades farmacocinéticas y disminuir los efectos secundarios.

Mediante estudios SAR, se ha identificado al farmacóforo, como al ácido 1,4-dihidro-4-oxo-3 piridin carboxílico (Wilson y Gisvold, 1998).

Cabe resaltar que las modificaciones en las posiciones 3 y 4 han conducido a la pérdida de actividad antibacteriana (Van Bambeke *et al*, 2005), pues están relacionados con el reconocimiento del fármaco al complejo enzima-ADN (Hooper y Rubinstein, 2003; Taléns, 2001).

Se han sintetizado varios derivados de esta familia de fármacos con sustituciones incluso en la posición 3 sin pérdida considerable de la actividad. Llama la atención un derivado que presentó excelente actividad contra *Staphylococcus aureus* (0.025 µg-mL) y *Escherichia coli* (0.013 µg-mL). Dicha quinolona presenta un grupo nitroacetilo en esta posición; (figura 15) la justificación de su actividad se fundamentó en el hecho de que el pKa del proton inmediato al grupo nitro es tan ácido como el protón carboxílico de las quinolonas convencionales, por lo que los autores concluyeron que la actividad antibacteriana es paralela a la acidez del grupo funcional presente en la posición 3 (Hooper y Ruinstein, 2003).



26

Figura 15. Quinolona con modificación en la posición 3.

En la siguiente figura se resume la relación entre la actividad antibacteriana y la estructura de las quinolonas.

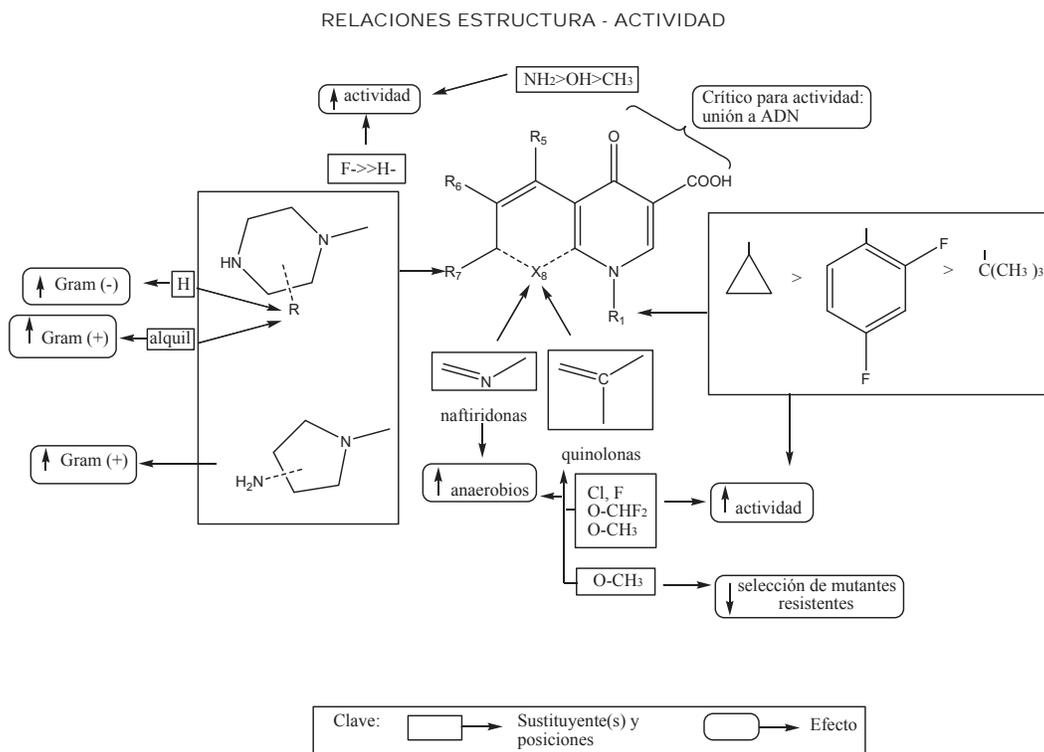
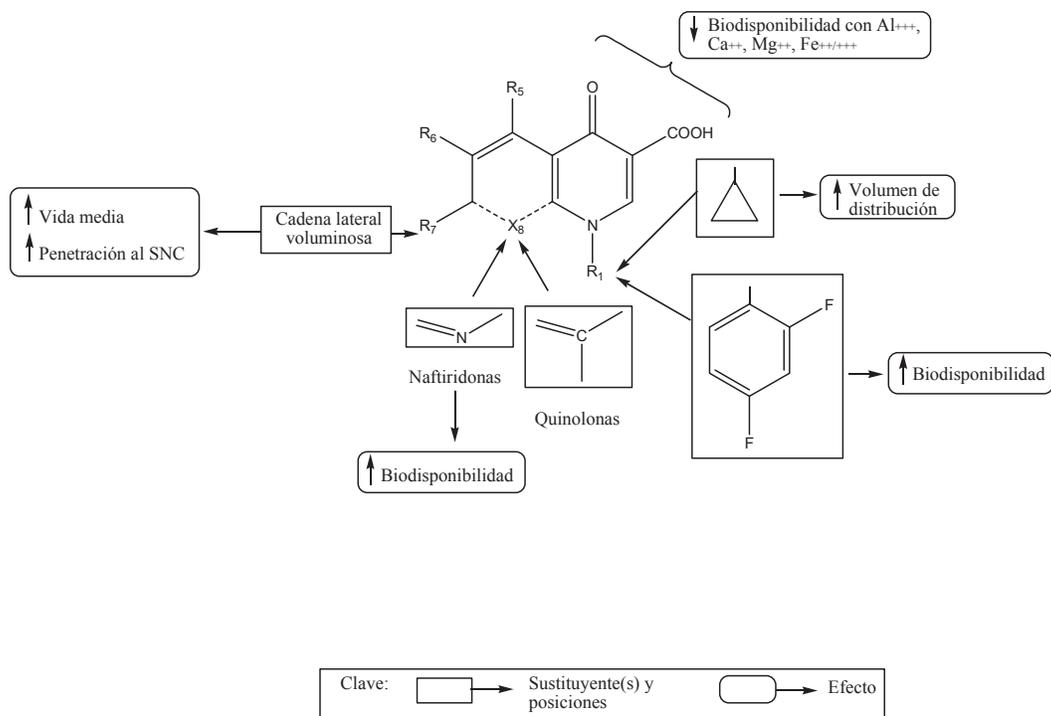


Figura 16. Relaciones estructura actividad.  
(Tomado de Van Bambeke *et al*, 2005)

### 1.8: Relaciones Estructura – Farmacocinética:

Las quinolonas generalmente son bien toleradas. La figura 17 resume la relación estructura-farmacocinética. Cabe resaltar que el mismo carboxilato crítico para la actividad es también importante para la biodisponibilidad y como se verá adelante, también para la toxicidad.

RELACIONES ESTRUCTURA - FARMACOCINÉTICA



**Figura 17. Relaciones estructura farmacocinética**  
(Tomado de Van Bambeke *et al*, 2005)

**1.9: Relaciones Estructura – Toxicidad**

En la figura 18 puede apreciarse la relación entre la estructura de las quinolonas y su toxicidad. Un aspecto importante a considerar es el papel que juega el carboxilato y que también lo hace en la farmacocinética y farmacodinamia de este grupo de antibióticos y es la condrotoxicidad.

La condrotoxicidad es típica en infantes que presentan deficiencia en Mg y que se encuentran en la etapa de crecimiento, en donde el adecuado desarrollo de los tendones requiere de este mineral. Es de suponerse que, como se ampliará adelante, si el carboxilato juega un papel de agente quelatante, atrape al magnesio y tenga como consecuencia condrotoxicidad cuando se administren quinolonas a personas en pleno



### 1.10: Interacciones con medicamentos:

Esta familia de antibióticos presenta excelentes propiedades quelatantes, por lo que son incompatibles con antiácidos, hematínicos, suplementos minerales o vitamínicos que contengan cationes di o trivalentes como  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , Fe, pues son quelatados por el carboxilato de la quinolona, misma que como ya se mencionó, es básica para la actividad antibacteriana y por lo tanto está presente en todos los miembros de esta familia de antibacterianos. Los quelatos formados son insolubles en agua, lo que reduce la biodisponibilidad oral. La estequiometría del complejo formado dependerá de la concentración relativa del agente quelatante (quinolona) y el ión metálico presente; valencia o carga de este y el pH (Hooper, 1998; Oliphant et al, 2002; Turel, 2002; Van Bambeke *et al*, 2005).

Por esto se debe evitar la administración simultánea de quinolonas con los medicamentos señalados.

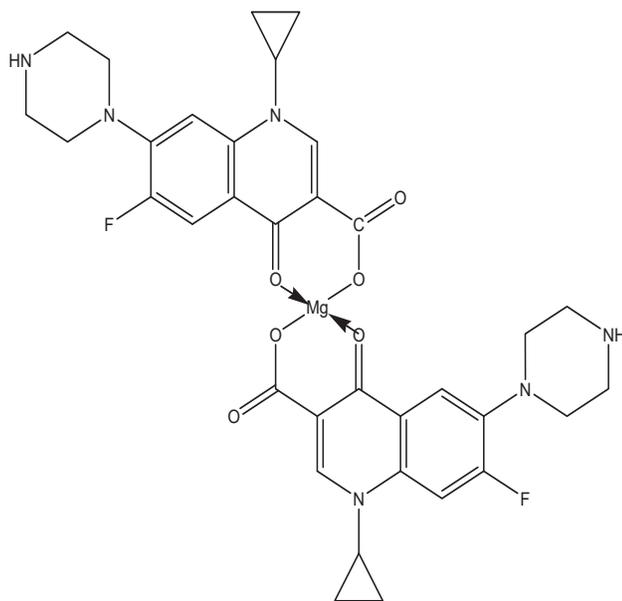


Figura 19. Quelato insoluble formado entre Ciprofloxacino y Magnesio 2:1.

### ***1.11: Complejos metálicos derivados de las quinolonas.***

Como se mencionó en el apartado anterior, las quinolonas forman quelatos con iones metálicos divalentes o trivalentes, lo que se traduce en una disminución de la biodisponibilidad, aunque también se ha sugerido que la actividad antibacteriana se pierde casi totalmente. Paradójicamente, esta misma quelatación es importante en la actividad como se mencionó en el apartado 1.5.2.1. Con la finalidad de estudiar la formación de complejos entre iones metálicos y quinolonas, se han obtenido una serie de complejos y compuestos, siempre en condiciones ácidas. En general, la actividad antibacteriana de estos productos es semejante a la de los ligandos o si acaso ligeramente superior, aunque en muchos casos, la actividad disminuyó considerablemente.

La unión más frecuente es un quelato entre el metal y los oxígenos del carbonilo y del carboxilo, aunque en casos aislados como en complejos de plata y zinc con pefloxacino y norfloxacino respectivamente, el nitrógeno terminal de la piperazina participa en la unión con el metal, y parece ser que la diferencia en la unión con el metal radica en las condiciones de reacción.

Se han estudiado complejos metal- ciprofloxacino y se ha encontrado que a pH ácido se favorece la formación del complejo 1:1; y los complejos 1:2 (metal quinolona) se ven favorecidos a pH alcalino. La coordinación del segundo ligando está más favorecida que el primero.

En cuanto a los compuestos derivados de metal:quinolona sintetizados por Turel, cabe destacar los derivados de Bismuto, obtenidos también en condiciones ácidas. Estos no presentaron actividad importante (Turel, 2002).

Wu y colaboradores sintetizaron un complejo con cobre, derivado de ciprofloxacino. La actividad de este compuesto es igual a la del ligando.

Kumar y colaboradores sintetizaron también complejos de cobre derivados de ciprofloxacino y probaron su actividad en micobacterias. Ellos encontraron que la estabilidad y reactividad de los complejos metálicos se ven influenciadas por ligandos

auxiliares, que al estar presentes en los complejos, incrementan su capacidad de dañar al ADN. Estos ligandos auxiliares son moléculas donadoras de nitrógeno, como son 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina y 4,5-diazafluoren-9-ona.

#### *1.12: Bismuto y sus compuestos.*

Los compuestos bismuto han sido ampliamente utilizados desde la antigüedad por sus propiedades medicinales. Se les ha administrado para mejorar la apariencia de la piel, para el tratamiento de la sífilis por vía parenteral y por vía rectal y oral para desórdenes gastrointestinales. Han sido ampliamente prescritos en combinación con antibióticos para la erradicación de *Helicobacter pylori* en el tratamiento de úlcera péptica. Su mecanismo de acción no está claro hasta la fecha, pero este metal es capaz de agregarse en la pared celular y el espacio periplásmico de bacterias, y se le ha relacionado con inhibición de la síntesis de ureasa y ATP. (Phillips *et al*, 2000) Se ha señalado también que los compuestos de bismuto pueden prevenir la aparición de resistencia bacteriana y tener propiedades citoprotectoras al incrementar la prostaglandina E2 gástrica. Además, al menos hasta el año 1998, no se reportó resistencia bacteriana a las sales de bismuto (Carvalho *et al*, 1998; Phillips *et al*, 2000).

---

## *II. HIPÓTESIS*

---

La presencia de un grupo fuertemente electroattractor, como es el nitrato de Bismuto, en el ciprofloxacino facilitará el reconocimiento a los iones Mg y por lo tanto al ADN y como resultado se incrementará la actividad antibacteriana.

---

## *III. OBJETIVOS*

---

**General:** Demostrar el efecto de actividad antibacteriana del complejo Ciprofloxacino-Bismuto (III) obtenido en condiciones alcalinas.

**Particular:**

1. Obtener el complejo Ciprofloxacino-Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl bajo condiciones alcalinas.
2. Obtener los complejos Ciprofloxacino-Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>Cl y Ciprofloxacino-Bi (III)
3. Evaluar el efecto de estos complejos metálicos frente a ADN.
4. Evaluar la actividad en células procariotas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) y eucariotas (*Saccharomyces cerevisiae*).

---

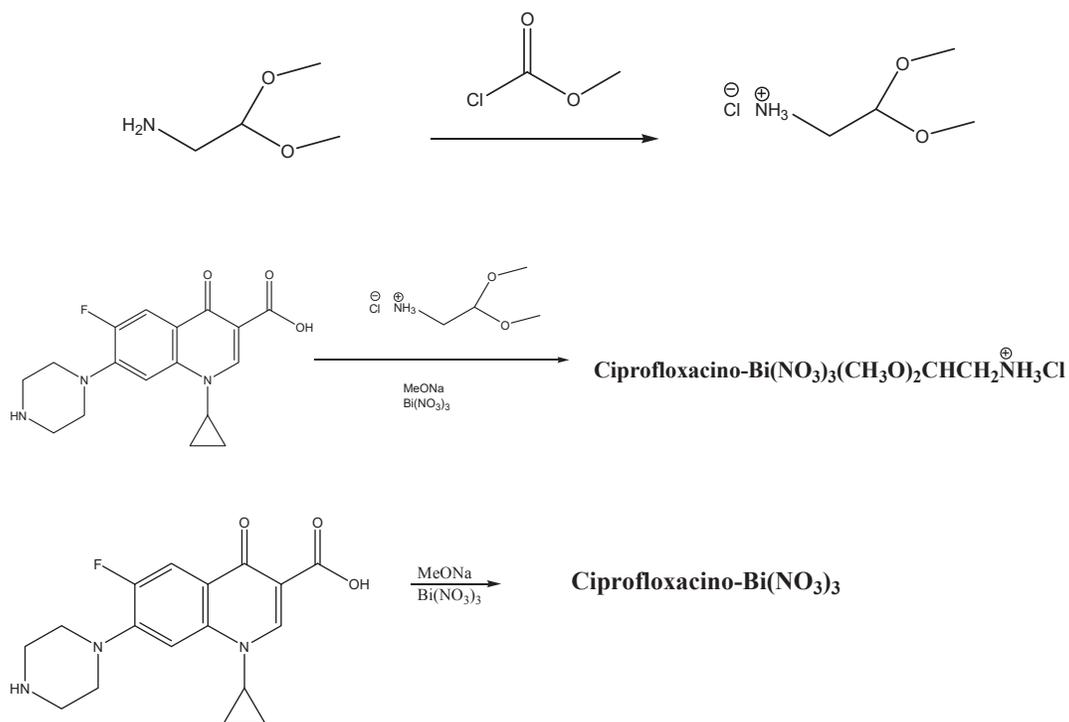
## IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

---

### 4.1. Parte química:

Como se dejó claro en los antecedentes, el carboxilato y el carbonilo en las posiciones 3 y 4 respectivamente de las quinolonas es fundamental para mantener la actividad antibacteriana. Se ha propuesto que estos grupos juegan un papel importante específicamente en el reconocimiento al ADN a través de su coordinación con metales. (Kumar et al, 2003; Noble et al, 2003; Taléns, 2001).

Este proyecto tiene como fin incorporar un grupo metálico fuertemente electroatractor al ciprofloxacino como es el nitrato de bismuto y así poder estudiar el papel de este efecto sobre la actividad antibacteriana. La obtención de los complejos que se obtuvieron se muestra en la figura 20.



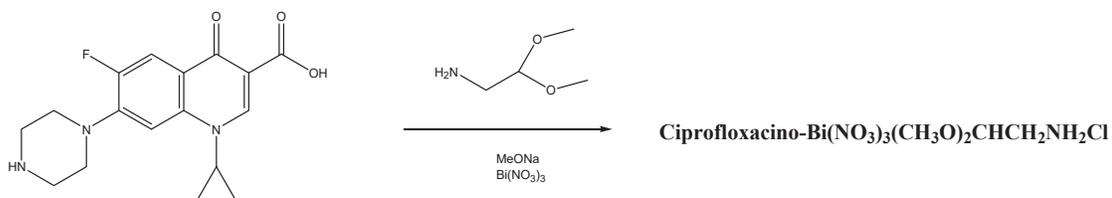


Figura 20. Estrategia de síntesis.

### 1. Extracción del Ciprofloxacino:

Pese a que existen varios métodos descritos en la literatura química para la síntesis del ciprofloxacino, resulta poco práctico obtenerlo por esta vía pues el compuesto se encuentra de forma pura en el mercado. Aun así, los gastos de importación y el producto mismo son costosos, por lo que se decidió proceder a extraerlo de formas farmacéuticas de fácil acceso comercial y relativamente bajo costo.

Las formas farmacéuticas del ciprofloxacino se encuentran disponibles como lactato de ciprofloxacino (administración intravenosa) o clorhidrato (administración oral). La razón del uso de diferentes sales se encuentra en la diferencia de disociación. Pese a que ambas son el ácido conjugado de la base libre, el lactato es un ácido conjugado más débil que el clorhidrato, aunque este último es definitivamente de mucho más bajo costo que el primero.

Por razones de costo, inicialmente se intentó liberar la base del clorhidrato. Desgraciadamente, la extracción no tuvo éxito aun con el uso de bases fuertes como aminas o hidróxido de sodio.

Como una segunda alternativa, se partió de solución inyectable de Ciproxina® al 2% y se utilizó trietilamina (pK<sub>b</sub>= 10.72), que es una base más fuerte que la piperazina protonada del fármaco (pK<sub>b</sub> = 8.73). En una solución acuosa conteniendo tanto lactato de ciprofloxacino como TEA, precipitaron agujas blancas de cipro, cuya pureza fue determinada por RMN.

### Obtención del clorhidrato del dimetilacetal de la etilenamina



Figura 21. Esquema de disociación del lactato y clorhidrato de ciprofloxacino.  
A) Disociación ácido base B) Disociación del clorhidrato de cip C). Disociación del lactato de cip

El uso de esta estrategia se debió a que el clorhidrato de la amina fue previamente obtenido en el laboratorio como un producto colateral en un intento por sintetizar amidas.

El producto de la reacción, aparte de la amida, es HCl que a su vez reacciona con amina del medio. Cuando la estequiometría de la reacción es 1:1 cloroformato:amina, la sal y la amida se obtienen en proporciones de 1:1. formándose de inmediato un precipitado abundante colorido que varía del ámbar oscuro a amarillo muy claro. Lo más razonable en este punto sería utilizar directamente ácido clorhídrico al 35% con la amina de manera directa, sin embargo bajo esta técnica se obtenía producto de descomposición por lo que se usó esta estrategia, costosa por cierto, debido a que el clorhidrato de la amina fue previamente obtenido, con excelentes rendimientos, en el laboratorio como un producto colateral en un intento por sintetizar amidas. Una opción diferente sería el uso de cloruro de hidrógeno (HCl gas), desgraciadamente se carecía de este reactivo.

Después de lavar el precipitado, se obtuvieron sólidos blancos y brillantes insolubles en los disolventes convencionales y altamente solubles en agua. Las señales en el espectro de RMN concordaron con el clorhidrato de amonio etilen dimetilacetal.

### **Obtención del complejo Ciprofloxacino-Bi (III)-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl**

La formación del primer complejo se llevó a cabo en condiciones alcalinas en presencia de metóxido de sodio. El orden de adición fue metóxido de sodio, ciprofloxacino, la sal de amonio y finalmente el Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, todo en baño de hielo.

Debido a la muy baja solubilidad del producto obtenido en los disolventes convencionales, incluyendo los muy polares colares como DMSO, del compuesto obtenido, la caracterización del producto por RMN fue difícil, por lo que se para este fin se aprovecho el espectro de IR. Cabe mencionar que la caracterización de complejos organometálicos se lleva a cabo infaliblemente por difracción de rayos x, sin embargo la espectroscopia de IR es de gran ayuda cuando se carece de mejores condiciones de infraestructura; de hecho es común encontrar reportado en la literatura especializada datos de IR para caracterización estructural de los complejos. En el caso del ciprofloxacino, sus complejos metálicos han sido ampliamente descritos por IR y se conocen datos específicos que ayudan a caracterizar derivados novedosos(Turel, 2002 ).

Primeramente cabe resaltar la banda del grupo carbonilo que ha sido descrita en  $1628\text{ cm}^{-1}$  para el cip (Kumar et al, 2003; Turel, 2002; Wu et al, 2003). Esta banda es de gran ayuda pues cuando se encuentra desplazada hacia frecuencia más baja indica un acomplejamiento con metales, lo cual resulta lógico si se considera que los metales actúan como ácidos de Lewis y tienden a “jalar” electrones. En la figura 22 se muestra que efectivamente la banda se localiza en  $1628\text{ cm}^{-1}$ , lo cual coincide perfectamente con el dato reportado para el ciprofloxacino no quelatado. Por otra parte es también interesante que en el cipro la banda característica del carboxilato que normalmente se ubica en  $1700\text{ cm}^{-1}$  no aparece en el espectro del complejo. Este dato es también típico de carboxilatos que forman complejo con metales. De acuerdo a ambos datos queda claro que el cipro se encuentra formando el complejo entre el carboxilato y el Bi (III) mientras que el carbonilo permanece intacto.

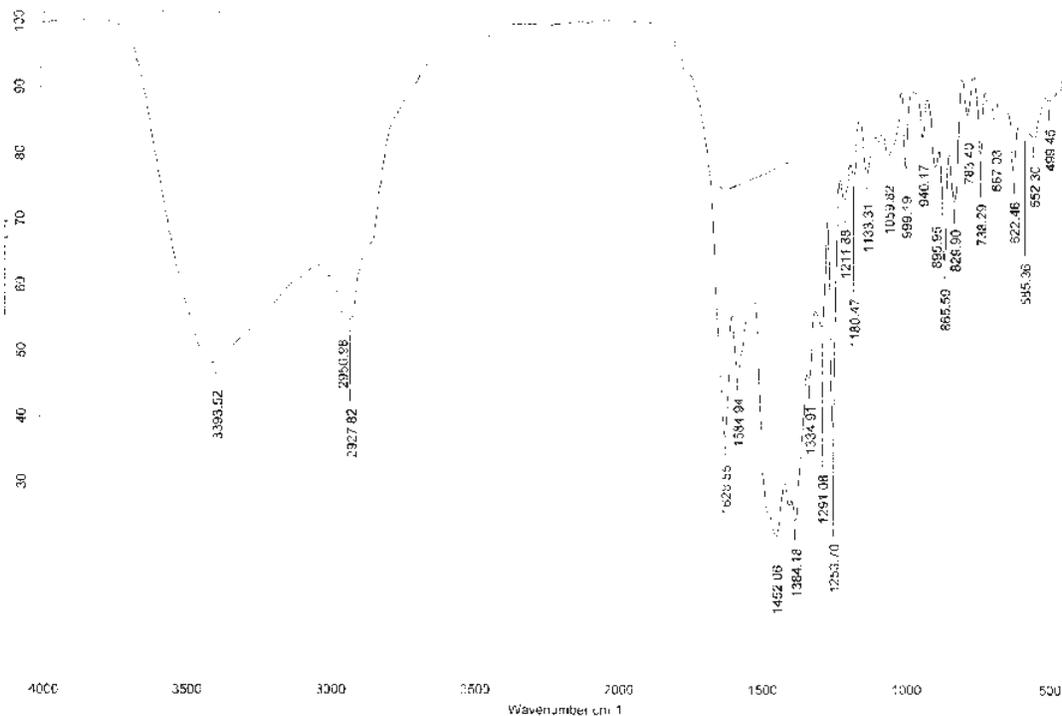


Figura 22: Espectro de IR del complejo 31

En este punto cabe señalar la diferencia entre complejo y compuesto. En la terminología organometálica, se denomina compuesto a aquel compuesto iónico propiamente dicho. En el caso específico de las quinolonas algún nitrógeno, generalmente el de la piperazina, se encuentra protonado y existe una interacción iónica de su carga positiva con la de algún contraión que suele ser el metal. A diferencia de un compuesto, los complejos organometálicos son neutros. En términos macroscópicos, la diferencia se refleja sobretodo en solubilidad, pues un compuesto presenta cierta solubilidad, mientras que el complejo es prácticamente insoluble. Tanto el manejo de condiciones alcalinas como la baja solubilidad y la ausencia de la señal de carboxilato en IR indican que el producto obtenido es un complejo, pues la posibilidad de obtener un compuesto en el caso que aquí se discute, implicaría condiciones ácidas.

Una característica de los complejos de Bismuto es que se rompen fácilmente en condiciones ácidas y se forma el compuesto iónico si las condiciones de la molécula lo permiten. Así, se realizaron pruebas en ácido acético y el producto en estas condiciones fue soluble.

Ahora bien, de acuerdo a las condiciones de reacción, existen varias posibilidades de complejos pues el Bi a pesar de encontrarse como Bi (III) puede formar ligandos en diferentes cantidades estequiométricas con la sal de amonio y la quinolona, así las estructuras propuestas son las siguientes:

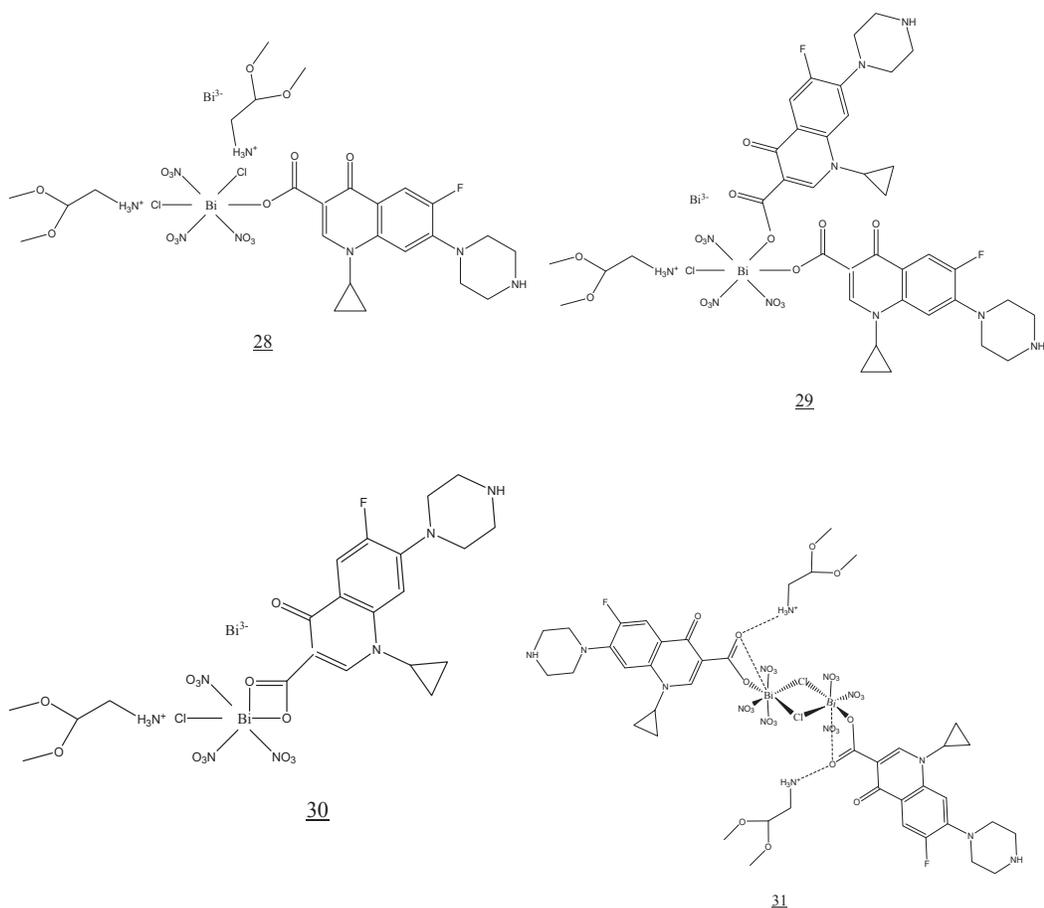


Figura 23. Propuestas de complejos para la reacción CIP-Bi (III)-  
(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl

Analizando las posibles estructuras se puede deducir primeramente que por las cantidades estequiométricas utilizadas (equimolares) para los tres reactivos las estructuras **28** y **29** se descartan y de las dos estructuras restantes, la estructura **30** queda eliminada pues en ella el carbonilo de la piridona está coordinándose directamente al ligando y por los datos de IR este en realidad se encuentra libre.

Hasta la fecha se ha descrito una gran cantidad de complejos de Bi (III) entre los cuales se encuentran precisamente complejos con carboxilatos y aminas de manera análoga a los esperados en este caso. Como ejemplo se encuentran los complejos **a**, **b**, **c** y **d** de la figura 24 que presentan analogía a la estructura propuesta pues en ellos está presente carboxilato, amina y Bi. Estas estructuras fueron determinadas por difracción de rayos x.

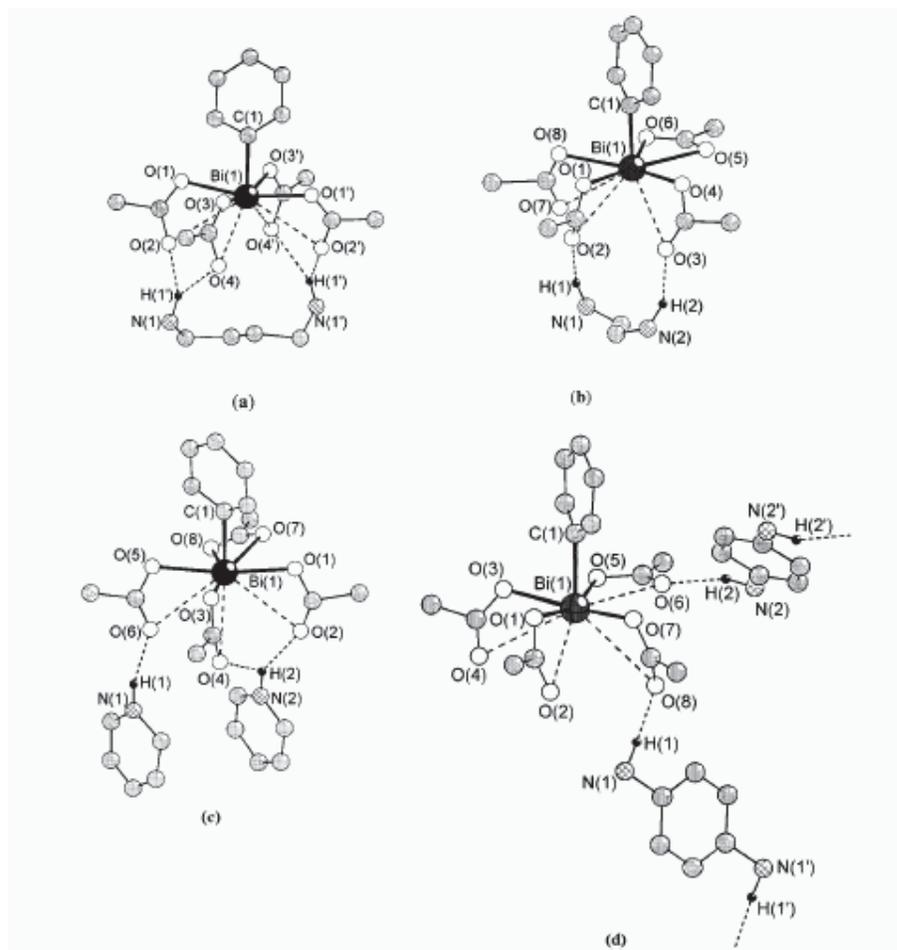
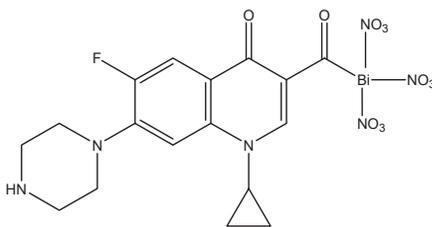


Figura 24: Estructuras de complejos **a**, **b**, **c** y **d** obtenidas por difracción de rayos X.

### Obtención del complejo Ciprofloxacino-Bi (III).

Con la finalidad de definir el posible papel de la sal de la amina en la actividad biológica fue necesario sintetizar el complejo en las mismas condiciones que las descritas para **31** pero en esta ocasión en ausencia de la sal cuaternaria. El producto fue también un precipitado poco soluble. La estructura propuesta es la siguiente:



32

### Obtención del complejo Ciprofloxacino-Bi (III)-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>Cl

Es sabido que los fármacos cuyas moléculas cuentan con una carga neta, pueden presentar variaciones en su absorción celular, pues disminuye la penetración por la capa lipídica de las membranas celulares (Patrick, 2001; Page *et al*, 1998; Hardman y Limbird, 1997) lo que finalmente puede reflejarse en una disminución de su actividad, ya que es poca cantidad de fármaco la que alcanzará el blanco farmacológico. Aunque también es cierto que las drogas que más fuerte se unen al receptor son moléculas polares o ionizadas, aunque tengan pocas probabilidades de atravesar las membranas lipídicas como las de la pared intestinal (Patrick, 2001).

A pesar de que el complejo **31** no presenta carga neta, el grupo amino de clorhidrato de etilén amino dimetilacetal se encuentra protonado. Para conocer el efecto que esta carga pudiera tener en la actividad antibacteriana, fue necesario sintetizar el mismo complejo pero partiendo de la amina neutra. Para esto se siguió la misma ruta de síntesis para la obtención del complejo, pero utilizando el amino acetaldehído dimetilacetal como base libre. El producto fue insoluble en los disolventes convencionales incluido el DMSO, pero al igual que **31** y **32**, fue soluble en ácido acético, esto además de que las condiciones de reacción fueron las mismas que para la obtención de **31**, hace pensar que el producto obtenido es un complejo.

#### 4.2. Actividad antibacteriana.

Esta ampliamente documentado el hecho de que la administración concomitante de antiácidos, hematóxicos o suplementos vitamínicos con quinolonas provoca una disminución en la biodisponibilidad de estas, debido a que el piridocarboxilato quelata a los iones metálicos di y trivalentes presentes en estas formulaciones (Hooper, 1998; Oliphant et al, 2002; Turel, 2002; Van Bambeke et al, 2005). En trabajos realizados anteriormente, se han sintetizado complejos de quinolona-metal, en condiciones ácidas, en estos participan también otra clase de ligandos: moléculas donadoras de nitrógeno como son 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina y 4,5-diazafluoren-9-ona. Estos complejos presentaron una actividad antibacteriana no mayor a la de los ligandos correspondientes (Turel, 2002; Wu et al, 2003). Cabe mencionar que hasta el momento se han descrito únicamente dos compuestos iónicos de Bismuto y ciprofloxacino y ninguno de los cuales presentó una actividad mayor al cipro. También es importante resaltar que estos fueron compuestos y no complejos sintetizados en condiciones alcalinas, lo que hace pensar inmediatamente en un equilibrio y la liberación inmediata del ciprofloxacino libre o bien un equilibrio con otros metales que se encuentren en la célula como el  $Mg^{2+}$ . Dando lugar a una molécula de ciprofloxacino sin mas efecto que el que lleva por sí mismo.

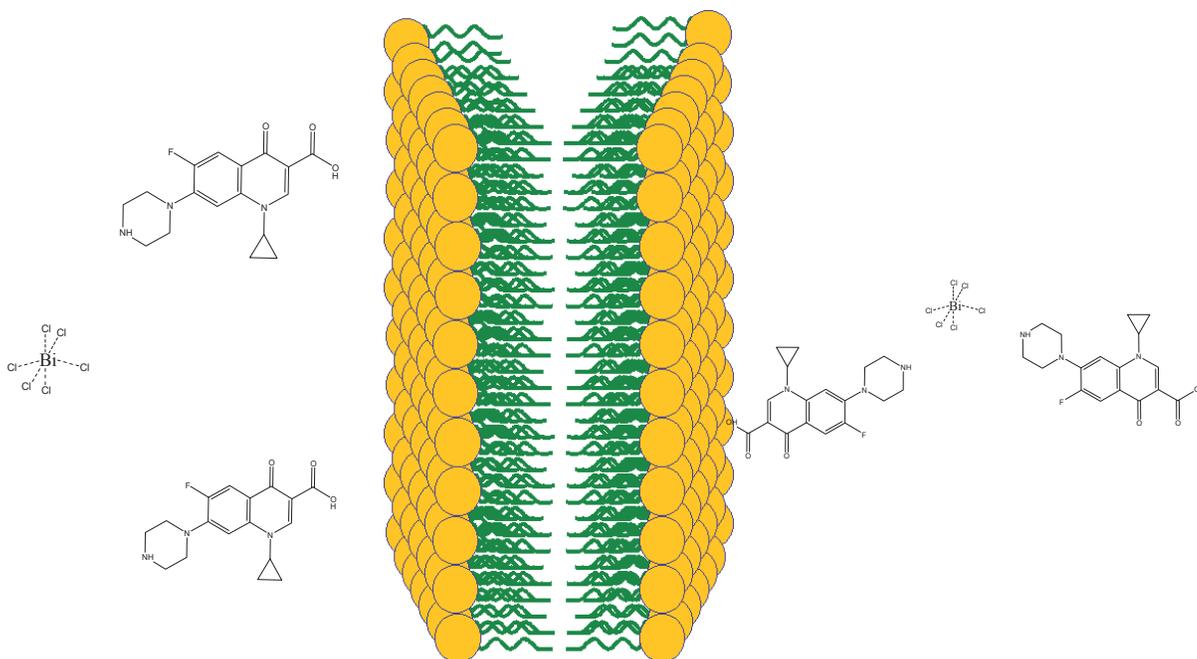


Figura 25: Disociación de un compuesto de CIP-Bismuto en condiciones fisiológicas.

En el caso de este trabajo de investigación no se cuenta con compuestos iónicos sino complejos organometálicos que además involucran al carboxilato del cipro, razón por lo que se espera un comportamiento diferente a los compuestos previamente descritos.

Así, una vez obtenidos los complejos, se dio inicio a las pruebas de susceptibilidad bacteriana, para lo cual se eligieron tres cepas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las tres especies son patógenos importantes en hospitales y en la comunidad. Son la primera, segunda y tercera causa, respectivamente, de infecciones nosocomiales, las cuales representa un grave problema en la actualidad, ya que muchos de los microorganismos aislados de infecciones intrahospitalarias, son multirresistentes (Joklik et al, 1998).

*E. coli* y *P. aeruginosa* son bacterias Gram negativas, mientras que *S. aureus* es una especie Gram positiva. Se sabe que hay diferencias en el blanco farmacológico de acción de las quinolonas entre ambos tipos de bacterias: en Gram negativas la diana molecular es la girasa, mientras que en Gram positivas es la Topo IV (Oliphant et al, 2002; Taléns, 2001) con algunas excepciones, como el caso de *Streptococcus pneumoniae*, que dependiendo de la fluoroquinolona, inhibirá a la Topoisomerasa IV o a la girasa (Van Bambeke, 2005; Taléns, 2001).

Se ha hablado también de que algunos efectos secundarios de las quinolonas podrían deberse a interacción de esta familia de fármacos con la Topoisomerasa II eucariota (Hooper, 1998) También existen reportes de compuestos derivados de quinolonas que actúan contra la Topo II (Elsea et al, 1993), y de otros que dañan el ADN mitocondrial en eucariotas (Enzmann et al, 1999). Por lo anterior, un modo sencillo de investigar si los complejos sintetizados presentan algún tipo de actividad contra células eucariotas era realizar pruebas en una levadura ya que el metabolismo de ambas es similar. Para este efecto, se utilizó *Saccharomyces cerevisiae*, por ser una levadura de fácil manejo y adquisición además de ser una referencia común.

Como se ha mencionado, una característica de los complejos es su baja solubilidad. De hecho los pocos reportes de derivados de bismuto, como lo son las sales de tioles con actividad antibacteriana (figura 1.17), han requerido de técnicas como espectrometría de plasma para conocer con precisión la concentración a la que actúan.

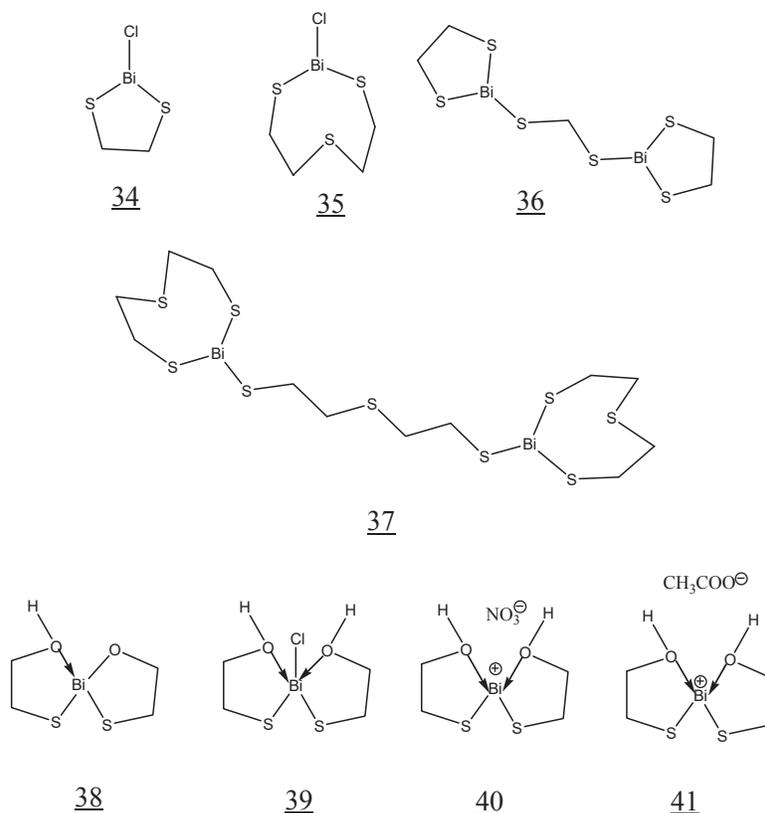


Figura 26. Compuestos de tiobismuto que han presentado actividad contra *Clostridium difficile*.

De cada compuesto se pesaron 0.6 mg y se adicionaron 3.4 ml de DMSO. El ciprofloxacino es totalmente soluble pero los compuestos **31**, **32** y **33** lo son escasamente. En este punto cabe resaltar que, por la baja solubilidad, la concentración de los compuestos a probar es considerablemente menor que la que se prueba en el cipro y que la concentración exacta es muy difícil determinarla con los recursos con que cuenta nuestro grupo de trabajo.

10  $\mu$ L de las soluciones (1.76  $\mu$ g del ciprofloxacino y  $\ll$  1.76  $\mu$ g de los complejos 31, 32 y 33) se impregnaron en discos de papel filtro. La cantidad de ciprofloxacino utilizada en el disco, es casi tres veces menor a la indicada para la prueba de susceptibilidad por la USA Pharmacopea (ver apéndice para toda la información concerniente al ciprofloxacino). Sería de esperarse que la actividad de los compuestos es mayor o igual a cipro si el halo de inhibición de los compuestos es igual o mayor al del ciprofloxacino.

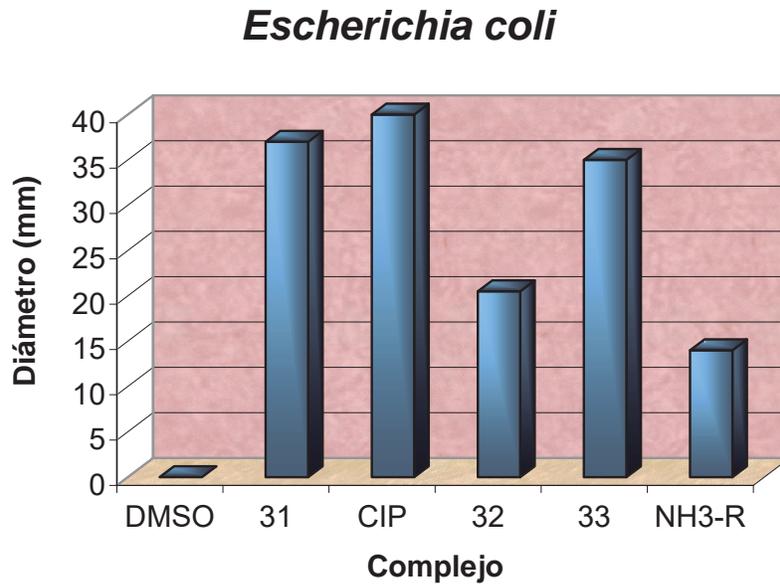
En todos los ensayos se utilizó como referencia DMSO o ácido acético y amina libre y la sal de bismuto. Ninguno presento actividad antibacteriana importante.

Como se aprecia en la gráfica 1, en el caso de *Escherichia coli*, todos los compuestos probados presentaron un menor halo de inhibición que el ciprofloxacino, pero llama la atención que el complejo 31, utilizado en una concentración tan baja, haya producido un halo tan solo 3 mm más pequeño que el correspondiente ligando. Esto indica la elevada actividad de la sal sobre esta cepa y aunque a priori el compuesto es sumamente activo, en vista de la baja cantidad de compuesto que se utilizó, no corrobora una actividad superior aunque tampoco la descarta.

El clorhidrato del dimetil acetal de la etilendiamina, presenta una actividad antibacteriana prácticamente despreciable, este compuesto fue soluble en DMSO, y se probó a la misma concentración que el cipro.

El complejo 33, formado por la amina libre, Bi y cipro presenta una actividad menor que el ciprofloxacino y el complejo 31, esto indica que la carga positiva de la amina juega un papel importante en la actividad antibacteriana y aunque se sabe que una molécula neutra penetra mejor en las membranas celulares lipídicas hay que recordar que el complejo 31 es globalmente neutro.

Por otra parte el complejo 32 también presenta una actividad menor con respecto al complejo 31, lo que hace interesante el análisis pues al parecer se requiere tanto del bismuto como de amina protonada para lograr una actividad elevada.



Gráfica 1: Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto en *Escherichia coli*.

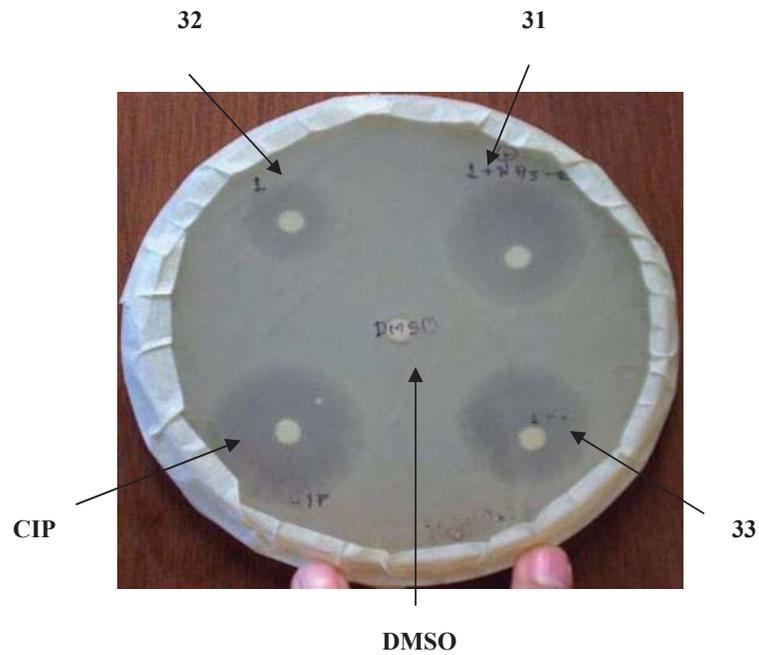


Figura 27. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos en *Escherichia coli*

El NCCLS reporta los datos mostrados en la tabla II para la técnica de difusión a una concentración de 5- $\mu$ g de ciprofloxacino.

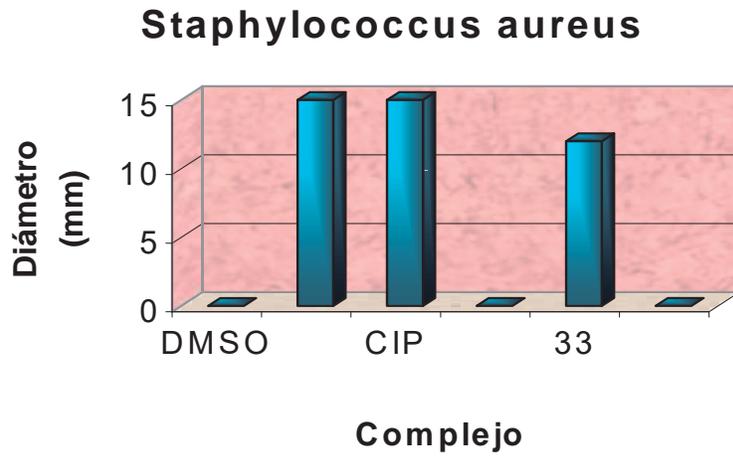
**Tabla II.** Diámetros de los halos de inhibición en bacterias control.

| <b>Bacteria:</b>                | <b>Diámetro (mm)</b> |
|---------------------------------|----------------------|
| <i>E. coli</i> ATCC 25922       | 30-40                |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | 25-33                |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923     | 22-30                |

En las pruebas realizadas se obtuvo con 1.76- $\mu$ g de la fluoroquinolona un halo de inhibición de 40mm, esto puede deberse a que la cepa de *Escherichia coli* es diferente a la de referencia, en el experimento se utilizó la cepa Pao-01.

Un fenómeno que se repitió en todas las pruebas con *E. coli* fue la aparición de colonias aisladas que se desarrollaron dentro de los halos de inhibición, que son resistentes a todos los compuestos probados. Este fenómeno es conocido como “satelitismo”, pero no afecta la interpretación de los resultados.

En las pruebas realizadas al *Staphylococcus aureus* se aprecia claramente que el complejo 31 es más activo que el ciprofloxacino, pues pese a la diferencia de concentración presentaron ambos iguales halos de inhibición. Y el complejo con la amina libre, 33, presentó una actividad considerable, aunque menor al complejo 31. Una evidencia más de que la carga positiva amina protonada juega un papel importante en la actividad antibacteriana. Ningún otro complejo o compuesto presentó actividad en *S. aureus*. El efecto de la concentración del ciprofloxacino en la actividad antibacteriana quedó de manifiesto en las pruebas realizadas con *S. aureus*: al disminuir la concentración de fármaco, disminuye el halo de inhibición, pues la concentración utilizada fue casi la tercera parte de la estipulada por el NCCLS, y el halo disminuyó casi la mitad.



Gráfica 2. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto en *Staphylococcus aureus*.

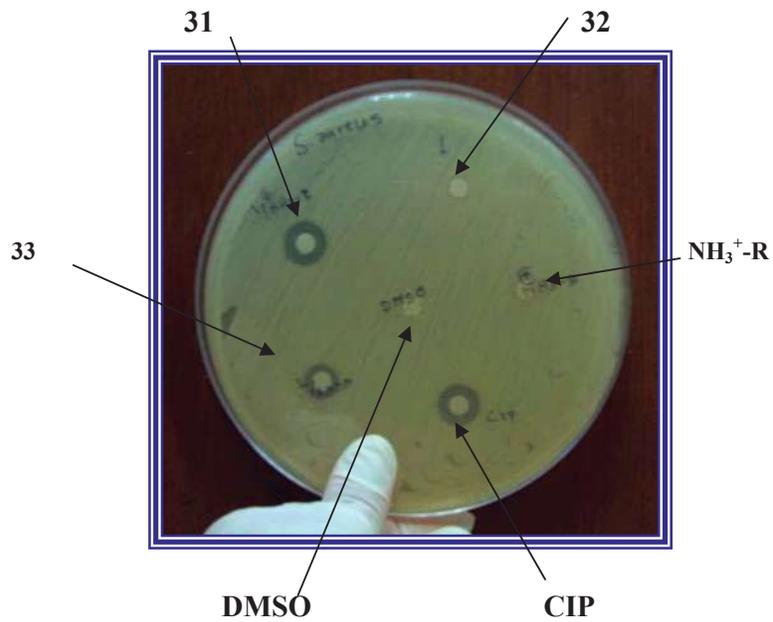
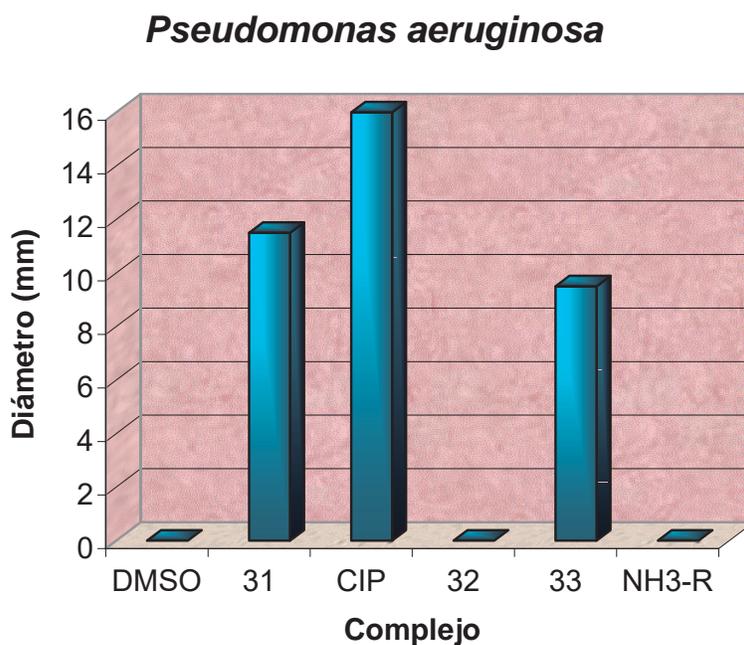


Figura 28. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos en *Staphylococcus aureus*.

Para *Pseudomonas aeruginosa*, se presentaron algunos problemas: en primer lugar el crecimiento de esta cepa bacteriana es más lento que *E. coli* o *S. aureus*, y por lo tanto tardan más en alcanzar la fase logarítmica, que es la etapa óptima para realizar la prueba de susceptibilidad. Otro problema que se presentó fue la producción de pigmentos, ya que al momento de medir los halos de inhibición, la falta de experiencia provocó lecturas erróneas, pues era difícil medir el halo debido a que los pigmentos no permitían distinguirlo bien.

Nuevamente, el complejo **31** presentó una buena actividad, en esta ocasión el halo producido por el complejo fue menor que el ciprofloxacino. Igualmente, el efecto de la amina protonada quedó de manifiesto una vez más.

También en *P. aeruginosa* se notó el efecto de la concentración en la actividad antibacteriana: Tras una disminución de casi 2/3 partes de la concentración utilizada por el NCCLS, el halo de inhibición disminuyó casi a la mitad.



Gráfica 3. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto en *Pseudomonas aeruginosa*.

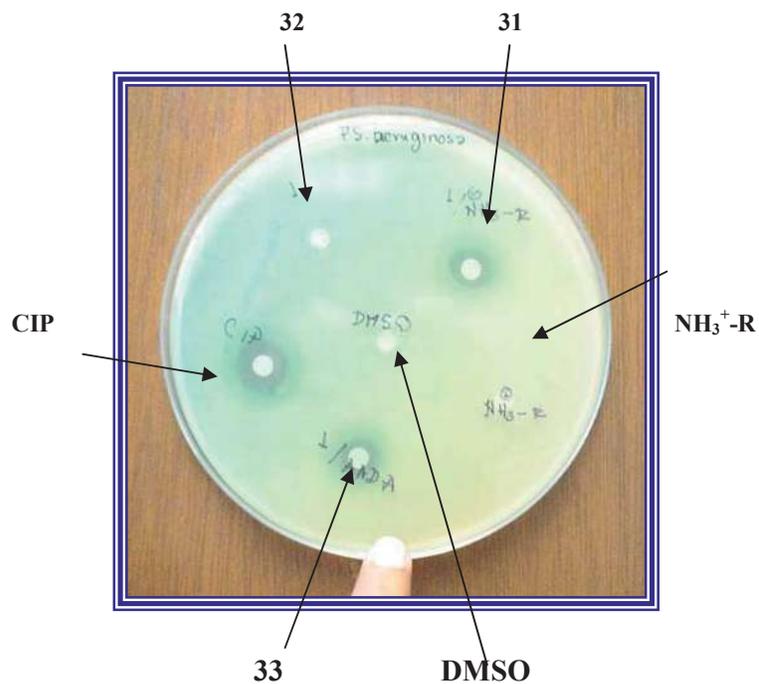
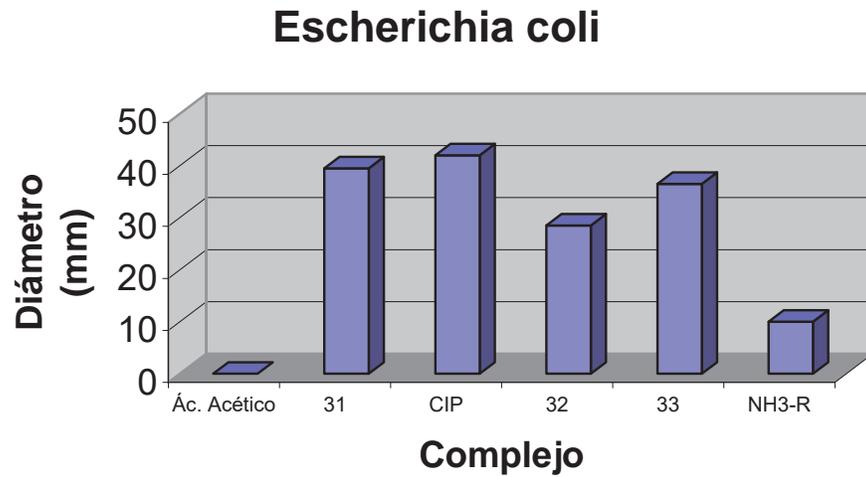


Figura 29. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos en *Pseudomonas aeruginosa*

Como se explico con anterioridad, se espera que los complejos obtenidos se disocien en medio ácido, en el que sí son solubles. Una prueba para corroborarlo fue precisamente disolver los compuestos en ácido acético y evaluar la actividad en la misma técnica de difusión en disco. Si el complejo se disocia, se esperaría que los halos de inhibición que se obtendrían serían menores o iguales a los producidos por el cipro, que quedaría libre a menos que el bismuto o la amina por si mismo tuviesen actividad.

Los resultados se muestran en las siguientes gráficas.



Gráfica 4. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de Bismuto disueltos en ácido acético en *Escherichia coli*.

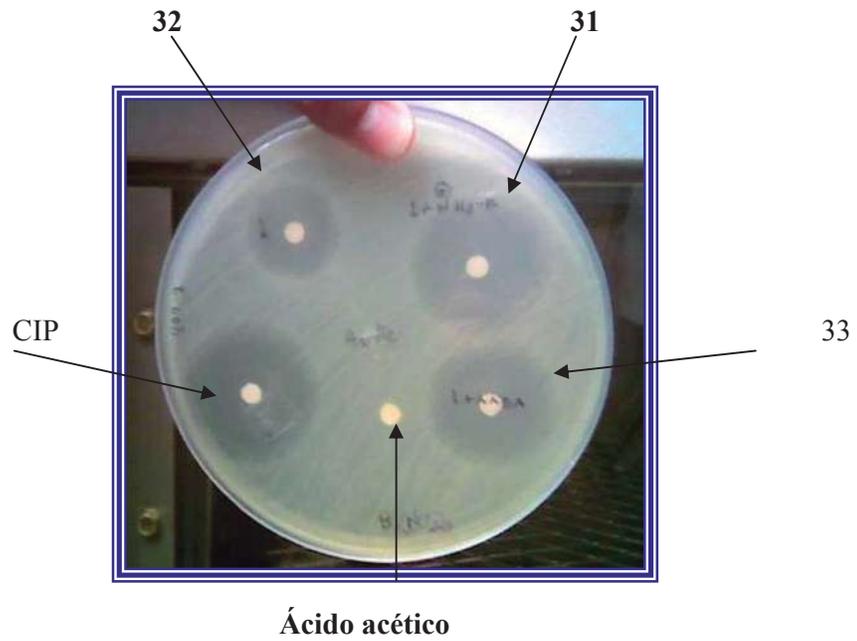
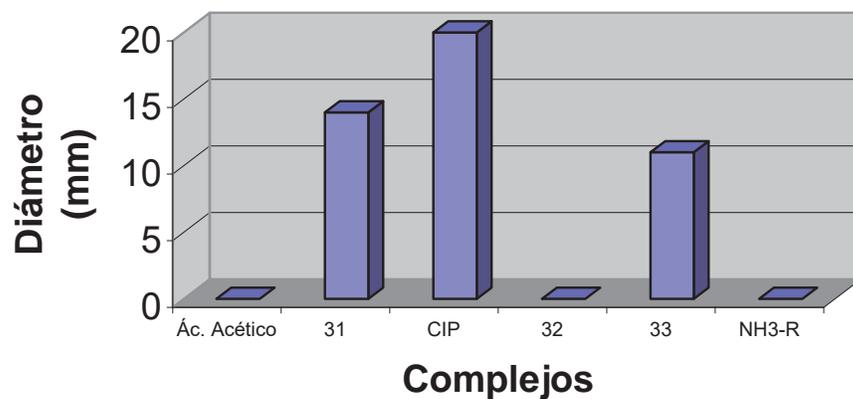


Figura 30: Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos en *Escherichia coli*

## Staphylococcus aureus



Gráfica 5. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de bismuto disueltos en ácido acético en *Staphylococcus aureus*.

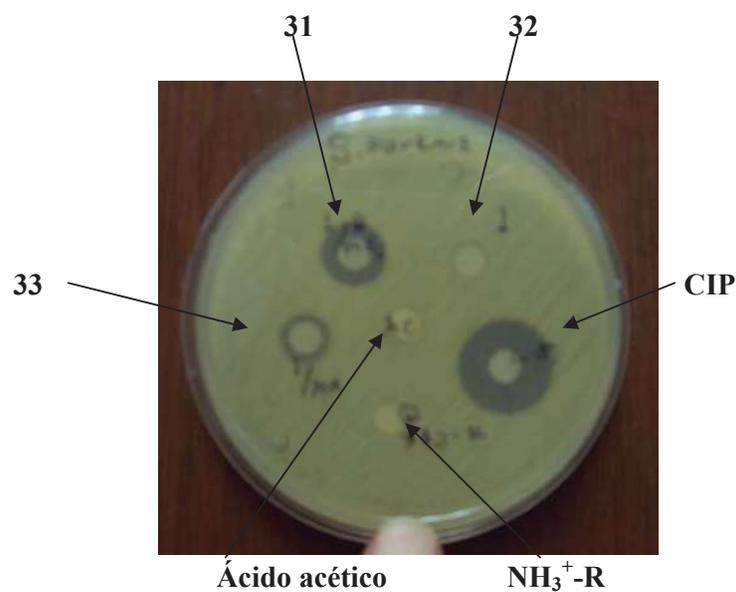
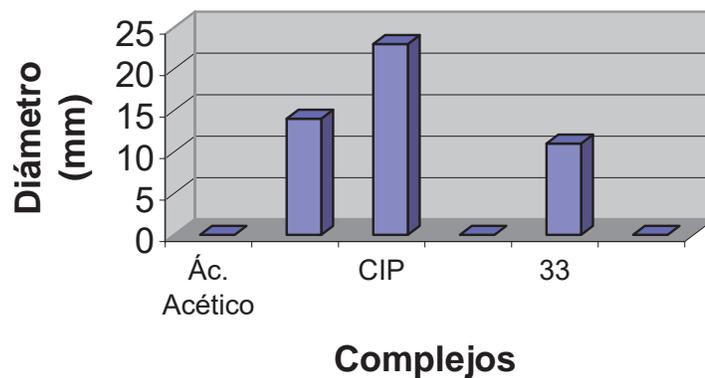


Figura 31. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos en *Staphylococcus aureus*.

## *Pseudomonas aeruginosa*



Gráfica 6. Actividad antibacteriana del cip y sus complejos de bismuto disueltos en ácido acético en *Pseudomonas aeruginosa*.

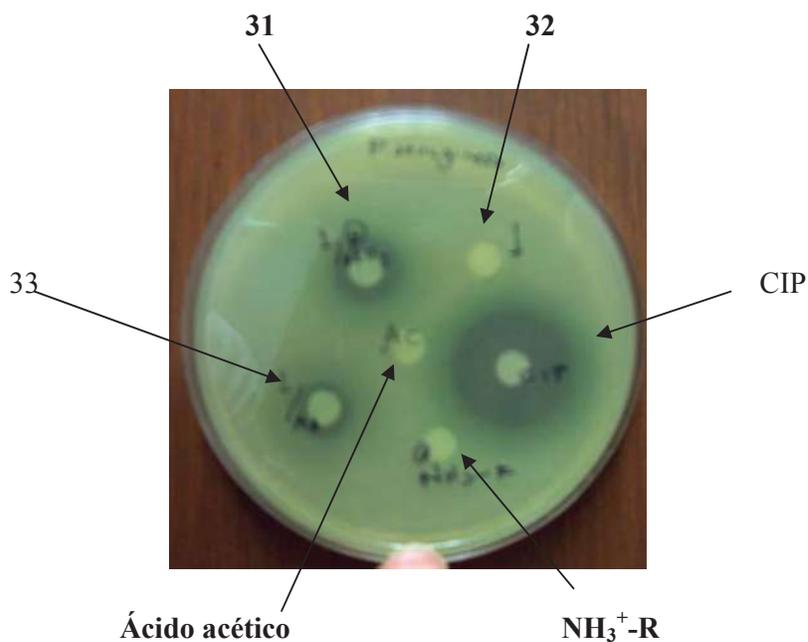


Figura 32. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos en *Pseudomonas aeruginosa*

En principio es de esperarse que la actividad antibacteriana de las quinolonas esté directamente relacionada con la penetración celular de estas, lo que a su vez es una

función de la carga neta de estos fármacos. Las quinolonas en la forma zwitteriónica presentan una máxima permeabilidad celular, mientras que al presentar una carga neta, como resultado de ionización o de la formación de complejos con iones divalentes, la penetración se ve fuertemente disminuida.(Turel, 2002). Cuando se utiliza medio ácido, se corre el riesgo de que el complejo se disocie y se forme el compuesto iónico. Los resultados de actividad antibacteriana obtenidos están de acuerdo con este dato pues como se aprecia en las gráficas anteriores, la actividad es mucho menor a la que presentaron los complejos disueltos en DMSO, y en todos los casos, los halos de inhibición de **31** fueron mucho menores que el ciprofloxacino.

En *Saccharomyces cerevisiae*, una célula eucariota, ni el cipro ni los complejos obtenidos inhibieron la proliferación del crecimiento de la levadura (dato no mostrado).

#### 4.3. Pruebas en ADN.

Está ampliamente documentado el hecho de que el  $Mg^{2++}$  están involucrado en el mecanismo antibacteriano de las quinolonas, pues participa en la interacción ADN-enzima, y se habla también de que este metal modula la cantidad de moléculas de quinolona que se une al material genético (Noble et al, 2003; Palú et al, 1992; Turel, 2002).

Fue interesante descubrir si la actividad antibacteriana presentada por el complejo **31** podía deberse a una interacción directa de este con el ADN, por lo que, en una prueba preliminar se realizó una electroforesis, ensayando la actividad de este complejo en presencia y en ausencia de Mg.

Los resultados indican que en ausencia de Mg, ni el CIP ni el complejo **31** tienen algún efecto en el material genético, mientras que en presencia del metal, ambos presentaron una gran actividad sobre el ADN, sobre todo el complejo **31**, observándose la degradación del material genético. Este efecto se debe probablemente a un mejor reconocimiento del ADN por **31** respecto del ciprofloxacino debido a la presencia en la molécula de un grupo fuertemente electroattractor. Se sabe que la diferencia en la potencia de la actividad antibacteriana entre las quinolonas clásicas y las fluoroquinolonas, es precisamente la inserción en la estructura base de un átomo de flúor ( Hooper, 1998; Taléns, 2002; Van bambeke *et al*, 2005; Wilson y Gisvold, 1998). Este es el elemento más electronegativo que existe.

Aún en las denominadas defluoroquinolonas, el mencionado halógeno se encuentra presente, aunque no en la posición 6. Además, se pensaba que cualquier modificación en la posición 3 conduciría a derivados inactivos, pero la quinolona con un grupo nitro en el carboxilato de C3 demostró lo contrario. El nitro es un grupo electroatractor, pero los investigadores que sintetizaron esta nueva molécula adjudicaron la elevada actividad antibacteriana a la acidez del proton inmediato al grupo nitro, que es tan ácido como el protón carboxílico de las quinolonas convencionales (Hooper y Rubinstein, 2003).

Como se mencionó en el apartado 4.1, en el complejo **31** se encuentra unido el ciprofloxacino al bismuto mediante el carboxilato en C3 mientras que el carbonilo en C4 se encuentra libre. Pero en el medio celular se encuentran presentes iones metálicos como Mg, y tanto C3 como C4 pueden quelatar al metal, este a su vez puede interactuar con los enlaces fosfodiéster del ADN que quedan susceptibles de sufrir hidrólisis por las moléculas de agua presentes en el medio celular.

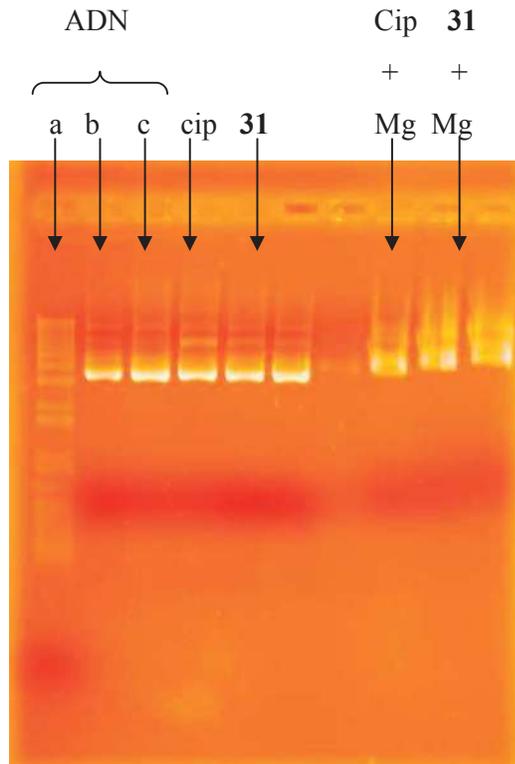


Figura 33. Análisis del efecto del cip y **31** en ADN plasmídico. a) Marcador de peso molecular b)ADN c)ADN + DMSO

---

## V. CONCLUSIONES

---

1.- La presencia de un grupo fuertemente electrotractor en la estructura de las quinolonas, como lo es el nitrato de bismuto, favorece la quelatación de Mg por la fracción  $\gamma$ -piridona- $\beta$ -carboxílica, lo que podría explicar la elevada actividad antibacteriana que el complejo **31** presentó frente a distintas cepas bacterianas. Aún con estos resultados y para asegurar que, efectivamente grupos electroattractores dentro de la molécula de quinolona son los responsables de la actividad antibacteriana, faltaría sintetizar nuevas quinolonas con grupos electrodonadores.

2.- Aunque no se puede asegurar que el mecanismo de acción del complejo **31** sea el mismo por el cual las quinolonas ejercen su acción antibacteriana, las pruebas realizadas en esta tesis dejan de manifiesto que el complejo obtenido sí tiene una acción directa sobre el ADN. La confirmación definitiva del mecanismo de acción compete a otras disciplinas.

3.- Sería interesante estudiar si la presencia de un metal como el bismuto en la estructura del complejo influye en una menor selección de mutantes resistentes, como se ha observado en algunos otros fármacos complejados con metales.

---

## VI. PARTE EXPERIMENTAL

---

### 5.1: Parte química.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se dan sin corregir. Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet FT Magna IR 750. Los espectros de RMN de protón se obtuvieron en el equipo Varian Mercury Plus de 400MHz utilizándose en todos los casos DMSO-d como disolvente y tetrametil silano como referencia interna. Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón. Todos los reactivos utilizados son de la marca Sigma-Aldrich.

- 1) **Extracción del Ciprofloxacino.** Una mezcla de lactato de ciprofloxacino al 0.2% (100 mg, 0.3 mmol), trietanolamina (72 mg, 0.71 mmol) y acetato de etilo (5ml), se agita mecánicamente 10 minutos en agua fría. La mezcla se retira del agua y se coloca en la plancha incrementando la temperatura progresivamente durante 10 minutos hasta 60 °C. Se retira de la plancha y se deja reposar para la formación de cristales. Se elimina el sobrenadante con una pipeta Pasteur y las agujas largas y blancas obtenidas se secan con acetona. La estructura del ciprofloxacino libre fue corroborada por RMN.
- 2) **Síntesis de  $\text{ClNH}_3^+\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$**  En baño de hielo, colocar un matraz bola provisto de barra de agitación magnética con aminoacetaldehído dimetil acetal (250 mg, 2.37mmol) y agregar lentamente el cloroformato de metilo (224.7 mg, 2.37mmol). El precipitado formado se filtra al vacío con acetona. Se obtiene un polvo fino, blanco y brillante que fué caracterizado mediante RMN. Rendimiento: Cuantitativo. P.f: descompone.
- 3) **Síntesis del complejo Ciprofloxacino-Bi (III)- $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{CHCH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$**  En baño de hielo se mezcla 1 mL de metanol con sodio. Retirar del hielo la base

obtenida y colocar un agitador magnético. Agregar ciprofloxacino (30 mg, 0.09 mmol), después  $\text{Cl}^-\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$  (13.31 mg, 0.09 mmol). Colocar en la plancha e incrementar progresivamente la temperatura durante 10 minutos hasta 60 °C. Agregar  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  (16 mg, 0.03mmol). Retirar la temperatura y agitación. Se obtiene un precipitado amarillo claro. Rendimiento: Cuantitativo. P.f: descompone.

- 4) **Síntesis del complejo Ciprofloxacino-Bi (III)** En baño de hielo se mezcla 1 mL de metanol con sodio. Retirar del hielo la base obtenida y colocar un agitador magnético. Agregar ciprofloxacino (19 mg, 0.05 mmol). Colocar en la plancha e incrementar progresivamente la temperatura durante 10 minutos hasta 60 °C. Agregar  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  (27.81 mg, 0.05 mmol). Retirar la temperatura y agitación. Se obtiene un precipitado amarillo claro. Rendimiento: Cuantitativo. P.f: descompone.
- 5) **Síntesis del complejo Ciprofloxacino-Bi (III)-AADA** Añadir un fragmento de sodio a 1 mL de metanol, esto en baño de hielo. Una vez obtenido el metóxido de sodio, se agrega el ciprofloxacino (30 mg, 0.09mmol) y se continua la agitación por 5 minutos, pasado este tiempo se añade aminoacetaldehído dimetil acetal (9.65 0.09mg, mmol), se mantiene la agitación 5 minutos más al tiempo que la temperatura se incrementa progresivamente hasta 60 ° C. Se incorpora el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  (43.92 mg, 0.09mmol). Tras la formación inmediata del precipitado amarillo claro, se retira la mezcla de la parrilla. Rendimiento: Cuantitativo. P.f: descompone.

## ***5.2. Pruebas de actividad antibacteriana por difusión con discos.***

Todos los compuestos sintetizados se sometieron a pruebas de susceptibilidad antibacteriana, teniendo como referencia el ciprofloxacino. Se prepararon dos stocks de los compuestos a probar, el primero disolviendo 0.6 mg de cada uno en 3.4 mL de DMSO. El segundo stock fue preparado disolviendo la misma cantidad de cada compuesto en 1 mL de ácido acético. Se impregnaron con 10 $\mu$ L de las diferentes soluciones discos de 6 mm de papel filtro del número 4, incluyendo discos con los

disolventes únicamente, esto para descartar que el DMSO o el ácido acético presenten actividad antibacteriana por sí solos.

La prueba se llevó a cabo según lo especificado por el NCCLS. Los compuestos se probaron en *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* Pao 01, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

La turbidez del inóculo se midió en espectrofotómetro de UV-Vis a 600 nm.

El ensayo se realizó de la siguiente manera: Se toman 4 a 5 colonias aisladas de la bacteria a probar, se suspenden en 4 a 5 mL de caldo nutritivo y se incuban a 36° C de 4 a 8 horas (dependiendo de la cepa). Pasado este tiempo, se toma una muestra del medio de cultivo para medir la densidad óptica en el espectro, que debe ser aproximadamente de 0.245 leído a una longitud de onda de 600nm. Esta densidad equivale a la del estándar 0.5 de McFarland. Si la turbidez del medio de cultivo es mayor a la del estándar, se agrega solución salina estéril al 0.9% o caldo nutritivo también estéril.

Una vez que la turbidez es equiparable a la del estándar, se estría con un hisopo estéril la superficie de placas de agar Mueller-Hinton y después de 3 a 5 minutos, se colocan los discos. Se invierten las placas y se colocan en la incubadora a 36° C durante 16 a 18 horas. Pasado este tiempo, se miden los halos de inhibición de los compuestos.

Las pruebas de susceptibilidad en disco se repitieron dos veces.

La prueba de susceptibilidad para *Saccharomyces cerevisiae* se realizó tomando tres a cinco colonias aisladas de la levadura y suspendiéndolas en un mililitro de agua destilada. Se introduce un hisopo estéril en esta suspensión y se estría la superficie de placas con medio de cultivo YPDA. Pasados de 5 a 10 minutos se colocan los discos impregnados con los compuestos, se invierten las placas y se incuban a 37°C durante 72 horas pasadas las cuales, se miden los halos de inhibición.

### 5.3. Pruebas en ADN.

Se prepara el soporte disolviendo 1 g de gel de agarosa en 100 mL de TAE al 1%. Aplicar calor para disolver perfectamente. Se vierte en la cámara para electroforesis, cuando esté sólido se quita el peine. Se agrega el TAE hasta el límite indicado en la misma cámara y se cargan las muestras en las muescas. Se corrió a 90

volts durante 40 minutos. Para revelar, se sumerge el gel en una solución de bromuro de etidio, y en la cámara de U.V. se toma la fotografía.

En la muesca número 1 se colocó únicamente un marcador de peso molecular. En cada muesca restante se colocaron 3  $\mu\text{L}$  del plásmido pBR322 y 3  $\mu\text{L}$  del buffer de carga. Además, en la muesca 3 se agregó 3  $\mu\text{L}$  de DMSO, en las muescas 7, 8, 9 y 10, 1  $\mu\text{L}$  de Mg, en las 3 últimas se vertió 1  $\mu\text{L}$  de cipro, el complejo **31** y el de  $\text{BiCl}_3$ , respectivamente. Las muescas 4, 5 y 6 contienen cipro, **31** y  $\text{BiCl}_3$  respectivamente, todas sin Mg. Los complejos y el cip están disueltos en DMSO, es el mismo stock que se utilizó para las pruebas de difusión por discos.

---

## *VII. REFERENCIAS*

---

1. Antibióticos. Criterios de uso racional y guía práctica terapéutica. <http://www.sepeap.es/libros/antibioticos/6.pdf>
2. Anderson, V.E., Gootz, T.D., Osheroﬀ, N.: “Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action”. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, (28), 17879-17885.
3. Barnard, F.M., Maxwell A.: “Interaction between DNA gyrase and quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA subunit residues Ser<sup>83</sup> and Asp<sup>87</sup>”. *Antimicrob. Agents Chem.* **2001**, 45, No 7, 1994-2000.
4. Carvalho A.F, Fiorelli L.A, Jorge V.N.C, Da Silva C.M.F, De Nucci G, Ferraz J.G.P. and Pedrazzoli J. “Addition of bismuth subnitrate to omeprazole plus amoxicillin improves eradication of *Helicobacter pylori*.” *Blackwell Science Ltd, Aliment Ther* **1998**, 12:557 – 561.Brazil
5. Chu, DT et al: “Structure – activity relationship of quinolone antibacterial agents: the effects of C-2 substitution“. *Drugs Exp Clin Res.* **1990**; 16(5):215-224.
6. Domagala J.M. “Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials.” *J.Antimicrob. Chemother* **1994**, 34(5) 851.
7. Domagala J.M, Hanna L.D.Heifetz C.L, Hutt M.P,Mich T.F, Sanchez J.P, Solomon M. “New Structure-activity relations of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay.” *J Med Chem.* **1986**, 29 (3): 394-404.
8. Elsea S.H, McGuirk P.R, Gootz T.D, Moynihan M, and Osheroﬀ N. “Drugs features that contribute to the activity of quinolones against mammalian topoisomerase II and cultured cells: correlation between enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage in vitro and cytotoxic potencial.” *Antimicrob. Agents Chem.* **1993**, 37(10): 2179-2186. USA Tennessee.
9. Enzmann, H.W.; Ahr, H.J.; Schluter, G.: “Damage to mitochondrial DNA induced by the quinolone Bay y 3118 in embryonic turkey liver”. *Entrez Pub. Med.* **1999**, 425 (2): 213-224
10. Fernández, E., Sánchez G., Navarrete E., Del Acázar, F.: “Pérdida de la actividad antibacteriana de quinolonas por efecto de la radiación UVA “.

Trabajos originales, facultad de Farmacia. Valparaíso, Chile.  
<http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/284.pdf>

11. Fox, M.A.; Whitesell, J.K.: Química Orgánica. 2ª ed., Pearson Educación. Addison Wesley Longman. Toluca. México. **2000**
12. García-Rodríguez, J.A., Gutiérrez Zufiaurre, N.: “Desfluoroquinolonas frente a Fluoroquinolonas.” *Rev Esp Quimioterap.* **2002**; Vol.15 (Nº 4): 303-305
13. González Cabeza, José Guillermo. }“Estudio de los mecanismos de mutagénesis y potencia mutagénica de quinolonas”. Directora: Montserrat Llagostera Casas. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias, Departamento de Genética y Microbiología. **2004**
14. Gozalbes Rafael, *et al.*” Anti-*Toxoplasma* Activities of 24 Quinolones and Fluoroquinolones in vitro: Prediction of Activity by Molecular Topology and Virtual Computational Techniques.” *Antimicrob. Agents Chem.* **2000**, 44(10):2771-2776. Francia, Paris.
15. Gozalbes Rafael, *et al.* “Prediction of Quinolone Activity against *Mycobacterium avium* by Molecular Topology and Virtual Computational Screening.” *Antimicrob. Agents Chem.* **2000**, 44 (10): 2764-2770. Francia, Paris.
16. Hardman, J.G.; Limbird, L.E.: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9ª ed., McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. **1997**
17. Hayashi, N., Nakata, Y., Yazaki, A.: “New findings on the Structure-Phototoxicity Relationship and Photostability of Fluoroquinolones with various substituents at position 1”. *Antimicrob. Agents Chem.* **2004**. 48 (3) 799-803
18. Heddle J.G, Blance, S.J., Zamble, D.B., Hollfelder, F., Miller, D.A., Wentzell, L.M., Walsh, C.T., Maxwell, A.: “The Antibiotic Microcin B17 is a DNA Gyrase Poison: Characterisation off the Mode of inhibition.” *J. Mol. Biol.* **2001**, 307: 1223-1234.
19. Holden Joseph A.: “DNA Topoisimerases as Anticancer Drug Targets: From the Laboratory to the Clinic”. *Curr. Med. Chem.* **2001**,1, 1-25. USA.
20. Hooper, David C.: “Clinical applications of quinolones”. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, 45-61

21. Hooper, D.C.; Rubinstein, E.: "Quinolone Antimicrobial Agents". ASM Press; 3rd edition.2003.Cap 1, 3-8
22. Joklik, W.K.; Willett, H.P.; Amos, D.B.; Wilfert, C.W.: Zinsser Microbiología. 20ª ed, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. **1998**
23. Kampranis Sotirios C. And Maxwell Anthony. "The DNA Gyrase-Quinolone Complex. ATP Hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage". *J. Biol. Chem.* **1998** ,273 (35): 22615-22626. United Kingdom
24. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, D.C.; Winn, W.C.: Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed., Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. **2001**
25. Kumar S.D., Padhye, S.,Anson, C.E., Powell,A.K.: "Antimycobacterial activity of mixed-ligand copper quinolone complexes". *Transition Metal Chemistry*, **2003**, 28, 579-584.
26. Kwok Y., Zeng Q., Hurley H.L.: "Structural insight into a quinolone-Topoisomerase II-DNA Complex. Further evidence for a 2:2 quinobenzoxazine-Mg<sup>2+</sup> self-assembly model formed in the presence of topoisomerase II". *J. Biol. Chem.* **1999** 274 (24) 17226–17235.
27. Macinga, D.R., Renick, P.J., Makin, K.M., Ellis, D.H., Kreiner, A.A., Li, M., Rupnik, K.J., Kincaid, E.M., Wallace, C.D., Ledoussal, B., Morris, T.W.: "Unique biological properties and molecular mechanism of 5,6- bridged quinolones". *Antimicrob. Agents Chem.* **2003**. 47 (8): 2526-2537
28. Mahony, D.E.; Lim-Morrison, S.; Bryden, L.; Faulkner, G.; Hoffman
29. Mathews, C.K.; Van Holde, K.E.: Bioquímica. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. **2001**
30. Noble Christian G. Barnard Faye M. And Maxwell. "Quinolone-DNA Interaction: Sequence-Dependent Binding to Single-Strand DNA Reflects the Interaction within the Gyrase- DNA Complex." *Antimicrob. Agents Chem.* **2003** 47 (3): 854-862. United Kingdom
31. Oliphant, Catherine M. et al: "Quinolones: a comprehensive review". *Clinical Pharmacology*. 65, 455-464 **2002**

32. Page, C.P; Sutter, M.C; Curtis, M.J; Walker, M.J.A; Hoffman, B.B: "Farmacología Integrada". 1998 Harcourt Brace. 437.
33. Palú G, Valisena S, Ciarrocchi G, Gatto B, and Palumbo M. "Quinolone binding to DNA is mediated by magnesium ions". *Proc. Natl. Acad. Sei* **1992**, *89*: 9671-9675.
34. Patrick, Graham L.: "An introduction to medicinal chemistry" 2<sup>nd</sup> Ed, Oxford University Press Inc., New York, **2001**
35. Peterson, L.R.: Quinolone molecular structure – activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clinical Infectious Diseases* **2001**; *33*: 180-186.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=11524717&dopt=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11524717&dopt=)
36. Phillips R.H., Whitehead, M.W., Lacey S., Champion, M., Thompson, R.P., Powell, J.J. "Solubility, absorption, and Anti-Helicobacter pylori Activity of Bismuth Subnitrate and Colloidal Bismuth Subcitrate: In vitro Data Do Not Predict in Vivo Efficacy". *Blackwell Science Inc.* **2000**, *5(3)*:176-182. England
37. Renau T.E., Gage, J.W., Dever, J.A., Roland, G.E., Joannides, E.T., Shapiro, M.A., Sanchez, J.P., Gracheck, S.J., Domagala, J.M., Jacobs, M.R., Reynolds, R.C. : « Structure -Activity Relationships of Quinolone Agents against Mycobacteria: Effect of structural Modifications at the 8 Position." *Anticarb. Agents Chem.* **1996**, *40* (10): 2363-2368. USA Cleveland.
38. Roca Joaquim. "Topoisomerasas de ADN de tipo II". *Investigación y Ciencia* **2003**:40-48.
39. Silvestru, C.; Breunig, H.J.; Althaus, H.: "Structural chemistry of Bismuth compounds. I. Organobismuth derivatives" *Chem. Rev.*, **1999**. *99*: 3277-3327
40. Sugar, A.M; Liu, X.P; Chen, R.J: "Effectiveness of Quinolone Antibiotics in Modulating the Effects of Antifungal Drugs" *Antimicrob. Agents Chem.* **1997**. *41* (11): 2518-2521.
41. Taléns Visconti, Raquel. "Actividad antimicrobiana in vitro de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por vía oral. Relación Estructura – Actividad". Directoras: Emilia Cantón Lasca, Teresa M<sup>a</sup> Garrigues Pelufo.

Universidad de Valencia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. **2001**

42. Turel Iztok. "The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents". *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 27 – 47.
43. Van Bambeke, F., Michot, J.M., Van Eldere, J., Tulkens, P.M. "Quinolones in 2005: an update" *Clin. Mic. Inf.* **2005**, 11, 256 – 280.
44. Veloira W.G., Domenico P., LiPuma, J.J., Davis, J.M., Gurzenda, E., Kazzaz J.: "In vitro activity and synergy of bismuth thiols and tobramycin against *Burkholderia cepacia* complex." *J. Antimicrob. Chem.* **2003**, 52: 915-919. USA
45. Wilson and Gisvold: "Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry" 10<sup>th</sup> Ed, Delgado Remers, Lippincott – Raven Publishers **1998**. 197-202
46. Wu, G.; Wang, G.; Fu, X.; Zhu L.; "Synthesis, Crystal structure, Stacking Effect and Antibacterial Studies of a Novel Quaternary Copper (II) Complex with Quinolone". *Molecules* **2003**, 8: 287-296. China
47. Zlotos, G.; Bücker, A.; Jürgens, J.; Holzgrabe, U.; "Protein binding in a congeneric series of antibacterial quinolone derivatives".
48. [http://www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0497/ponens.html](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0497/ponens.html)

**ANEXO I.** Resistencia bacteriana al ciprofloxacino en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En azul se muestra el porcentaje de bacterias sensibles, en color crema el porcentaje de bacterias resistentes y en púrpura el porcentaje de bacterias moderadamente resistentes

