

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO**

ESCUELA DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA



***Relación estructura-actividad de
derivados de ciprofloxacino***

T E S I S

Que para obtener el título de químico farmacobiólogo

PRESENTA:

MARIO ALBERTO AGUIRRE SERRANO

Morelia, Mich.

Junio 2006

**EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS FUE
DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE QUIMICA
ORGANICA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO-
BIOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCION DEL D.C. LUIS
CHACON GARCIA.**

**CON APOYO CONACYT (Proyecto 47907 “Síntesis de
Inhibidores Potenciales de la Topoisomerasa”)**

**CON APOYO DE LA COORDINACION DE LA
INVESTIGACION CIENTÍFICA DE LA UMSNH (Proyecto 2.21
“Síntesis de Derivados de Fluoroquinolonas”)**

A mis padres

A mis hermanos

A mis abuelos

A mis tíos

A mis amigos

A todas la personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo, en especial al D.C. Luis Chacón García, por su amistad y valiosa enseñanza.

Agradezco la útil ayuda, tanto técnica, de equipo para las pruebas de medición biológica, como intelectual que me brindó el D. C. Carlos Cortés Penados.

INDICE

Índice	I
Índice de figuras	II
Índice de tablas	II
Lista de abreviaturas	III
Resumen	IV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	7
2.1. Relación estructura-actividad de las quinolonas	7
2.2. Mecanismo de acción	15
2.3. Reactividad de las fluoroquinolonas	17
2.4. Influencia de los iones metálicos en la actividad de las quinolonas	19
3. Hipótesis	22
4. Objetivos	22
5. Parte experimental	23
5.1. Obtención de materia prima	23
5.2. Síntesis de complejos Ciprofloxacino-Bi(III)-YNH _n	24
5.3. Estudio cuantitativo de estructura actividad (QSAR)	25
5.4. Síntesis de fluoroquinolonas derivadas del ciprofloxacino	27
5.5. Pruebas biológicas	29
6. Resultados y discusión	32
6.1. Relación Estructura Actividad de Complejos de Ciprofloxacino-Bi(III)-YNH _n	32
6.2. Estudio cuantitativo de estructura-actividad (QSAR)	41
6.3. Susceptibilidad antimicrobiana de los carbamatos obtenidos	46
7. Conclusiones	48
8. Anexos	49
Espectroscopias	49
Fotografías de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	72

INDICE DE FIGURAS

1. Estructura del ácido nalidíxico.	1
2. Estructura propuesta para el complejo Ciprofloxacino-Bi(III)- (H ₃ CO) ₂ CHCH ₂ NH ₃ Cl.	6
3. Estructura y espectro antimicrobiano reducido de 4 quinolonas de estructura análoga con diferentes sustituyentes en posición 1.	8
4. Comparación de la potencia de una 6-fluoroquinolona contra una desfluoroquinolona.	10
5. Selección de análogos sintetizados con un sustituyente piperazil en posición 7	12
6. Algunas quinolonas sintetizados con un sustituyente pirrolidin posición 7.	13
7. Bíciclos presentes en algunas quinolonas en posición 7.	13
8. Relación estructura-actividad de las quinolonas.	15
9. Esquema de la protonación/desprotonación de las quinolonas.	17
10. Quelatación de las quinolonas.	18
11. Complejo Ciprofloxacino- Bi (III)- (CH ₃ O) ₂ CHCH ₂ NH ₃ Cl.	20
12. Estructura del ciprofloxacino.	23
13. Representación general de los complejos tipo Ciprofloxacino-Bi(III)-YNH _n .	24
14. Quinolonas seleccionadas para la serie de exploración.	26
15. Síntesis de carbamato de metilo.	27
16. Síntesis de carromato de etilo.	28
17. Síntesis del carbamato de isobutilo.	29
18. Aminas acomplexadas.	32
19. Diferentes complejos de quinolona-metal.	33
20. Estructura propuesta para los complejos del grupo 1.	39
21. Espectro de RMN H del compuesto 21.	30

INDICE DE TABLAS

1. Farmacóforo y estructura de las principales quinolonas aprobadas para el uso humano.	2
2. Bandas de absorción de los complejos del grupo I comparadas con las del ciprofloxacino.	35
3. Bandas de absorción del complejo del grupo II comparadas con las del ciprofloxacino.	36
4. Bandas de absorción de los complejos del grupo III comparadas con las del ciprofloxacino.	36
5. Actividad antimicrobiana de los complejos del grupo I comparada con la del ciprofloxacino.	37
6. Actividad antimicrobiana de los complejos del grupo II comparada con la del ciprofloxacino.	38
7. Actividad antimicrobiana de los complejos del grupo III comparada con la del ciprofloxacino.	38
8. Compuestos de serie de exploración, concentración mínima inhibitoria (CMI) contra la cepa H228 de S. aureus y valores de los descriptores del modelo elegido.	42
9. Comparación de Y calculada y Y experimental de los compuestos de la serie de exploración.	43
10. CMI calculada por medio de QSAR de fluoroquinolonas.	44
11. Actividad antimicrobiana de los carbamatos sintetizados comparada con la del ciprofloxacino.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AcEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Cfx	Ciprofloxacino
dA	Desoxiadenosina
dC	Desoxicitocina
dG	Desoxiguanosina
DMSO	Dimetil sulfóxido
dT	Desoxitimina
EM	Espectroscopia de masas
EtOH	Etanol
IR	Infrarrojo
MeOH	Metanol
MeoNa	Metoxido de sodio
mg	Miligramo
MIC	Concentración mínima inhibitoria (por sus siglas en ingles)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
µg	Microgramo
µL	Microlitro
Poli	Polímero
ppm	Partes por millón
QSAR	Relación cuantitativa estructura actividad (por sus siglas en ingles)
RMN	Resonancia magnetica nuclear
SAR	Relación estructura actividad (por sus siglas en ingles)
Topo	Topoisomerasa
UCF	Unidades formadoras de colonias (por sus siglas en ingles)

RESUMEN

Las quinolonas son un grupo de antibióticos sintéticos relacionados con el ácido nalidíxico, dentro de los cuales se incluye el ciprofloxacino. Se ha reportado que estos fármacos se unen con cationes multivalentes, formando complejos insolubles generalmente inactivos o en algunos casos con actividad antimicrobiana baja comparada con los compuestos libres de metal.

Recientemente, nuestro grupo de investigación describió la obtención de un complejo Ciprofloxacino-Bi(III)-(H₃CO)₂CHCH₂NH₃Cl. Este complejo a pesar de su baja solubilidad mostró actividad inhibitoria de crecimiento superior al ciprofloxacino. Además se observó que dicho complejo interactúa con el ADN en presencia de Mg⁺².

En este trabajo se presenta un estudio de relación estructura actividad cualitativo (SAR) y cuantitativo (QSAR).

La primera parte se hace con la finalidad de estudiar la participación de la amina en el complejo mencionado, para lo cual se obtiene un grupo de complejos organometálicos derivados del ciprofloxacino, nitrato de bismuto y aminas alifáticas y aromáticas. La actividad de los complejos fue probada por susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar siguiendo la técnica de Kirby-Bauer.

La segunda parte describe un estudio QSAR tomando una base de datos descritos en la literatura química, y se predice la actividad contra la cepa *Staphylococcus aureus* H228, de una novedosa serie de fluoroquinolonas 4'-7 piperazil sustituidas. Los resultados motivaron la síntesis y evaluación antimicrobiana de dichos compuestos validando las ecuaciones obtenidas.

1. INTRODUCCIÓN

Las quinolonas constituyen un grupo de antibióticos sintéticos los cuales se relacionan estructuralmente con el ácido nalidíxico, la primer quinolona descrita descubierta como una impureza en la producción del agente antimalarico cloroquina en 1962. Desde entonces se han realizado diversas modificaciones estructurales en su núcleo base y se han sintetizado más de 10,000 compuestos relacionados, aunque solo unos pocos han sido comercializados. Asimismo, se ha investigado ampliamente su mecanismo de acción y resistencia, así como también sus relaciones estructura - actividad, estructura - toxicidad y estructura - farmacocinética. (Oliphant, *et al* 2002)

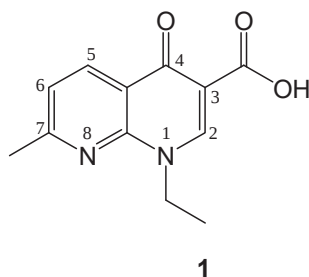
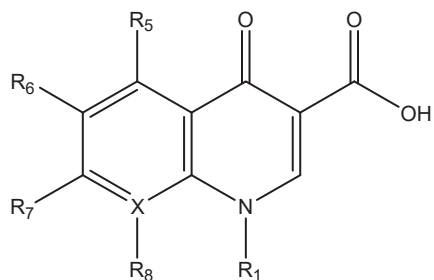


Figura 1. Estructura del ácido nalidíxico

Los principales representantes de las quinolonas se ilustran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Farmacóforo y estructura de las principales quinolonas aprobadas para el uso humano. (Van Bambeke, *et al*, 2005)



Generación	Fármaco	X	R ₈	R ₁	R ₅	R ₆	R ₇
1	Ácido nalidíxico	N		-CH ₂ -CH ₃	H	H	-CH ₃
2	Norfloxacino	C	H	-CH ₂ -CH ₃	H	F	
2	Pefloxacino	C	H	-CH ₂ -CH ₃	H	F	
2	Lomefloxacino	C	F	-CH ₂ -CH ₃	H	F	
2	Ciprofloxacino	C	H		H	F	
2	Ofloxacino	C			H	F	
2	Levofloxacino	C			H	F	
2	Sparfloxacino	C	F		-NH ₂	F	
3	Grepafloxacino	C	H		-CH ₃	F	
3	Gatifloxacino	C	-O-CH ₃		H	F	
3	Trovafloxacino	N			H	F	
4	Moxifloxacino	C	-O-CH ₃		H	F	
4	Gemifloxacino	N			H	F	
4	Garenofloxacino	C	-O-CHF ₂		H	H	

El ácido nalidíxico demostró actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas, sin embargo, su potencia y espectro de actividad no fue lo suficientemente significativa para ser utilizada como agente terapéutico.

Recuperó atención en la década de 1980 por su uso para el tratamiento de diarrea y de infecciones del tracto urinario que tenían como agentes responsables a *Shigella* y *Escherichia coli* resistentes a otras clases de antibióticos usados entonces. Consecuentemente el ácido nalidíxico fue comercializado, permaneciendo actualmente en el mercado y representando a la primera generación de quinolonas. (Mitscher, *et al*, 2005) Esto marcó el comienzo de una intensa campaña para la síntesis de nuevos análogos, buscando encontrar una relación estructura actividad, optimizar propiedades farmacocinéticas y reducir la toxicidad e interacción con otros fármacos. (Oliphant, *et al*, 2002; Taléns, 2001; Van Bambeke, *et al*, 2005)

Consecuentemente, las quinolonas han pasado de ser un modesto grupo de antibióticos usado para infecciones en tracto urinario, a un desarrollado grupo de cerca de docenas de agentes oficialmente utilizados, de los cuales, el ciprofloxacino y el levofloxacino han producido ganancias billonarias en dólares y constantemente son encontrados dentro de los 200 medicamentos más prescritos alrededor del mundo. (Hooper, *et al*, 1998)

Las quinolonas han sido clasificadas sobre la base de su uso clínico y espectro de actividad en cuatro generaciones. La segunda generación de quinolonas tuvo como principal característica la presencia de un átomo de flúor en la posición 6, (por lo que son nombradas frecuentemente como fluoroquinolonas), que incrementa considerablemente su actividad. Estos nuevos compuestos mostraban tener una potencia superior contra microorganismos gram negativos y también fueron indicados para el tratamiento de infecciones respiratorias de *Streptococcus pneumoniae*. De estos compuestos, el ciprofloxacino y el ofloxacino son los más usados aún

actualmente, siendo todavía el ciprofloxacino el más activo contra *Pseudomona aeruginosa*. Los otros miembros de la segunda generación de quinolonas, sparfloxacino y grepafloxacin, deben ser considerados por separado por tener sustituyentes en la posición 5 y un voluminoso sustituyente en posición 7 mejorando considerablemente su actividad contra *S. pneumoniae*, aunque ambos compuestos fueron descartados por razones relacionadas con su toxicidad. (Van Bambeke *et al*, 2005)

La tercera generación de quinolonas, tiene como característica, un importante incremento en la actividad contra bacterias gram positivas, junto con una significativa actividad contra organismos anaerobios. Estas moléculas, presentan un sustituyente alquil en la piperazina o pirrolidina en la posición 7, y un metoxilo en la posición 8 y mantienen el fluor en su estructura (ver figura 2). Un miembro importante de esta clase de quinolonas es el trovafloxacin (una naftiridona), que aunque no es una 8-metoxiquinolona, fue uno de los compuestos más activos y presentó el espectro de actividad más amplio al momento de su registro, aunque su uso fue restringido en Europa por un raro caso de citotoxicidad (García-Rodríguez, y *col*. 2002). El más reciente miembro desarrollado de esta familia, el gemifloxacin (también una naftiridona), posee amplio espectro antibacteriano que incluye algunos organismos anaerobios.

La cuarta generación de quinolonas, generación de las llamadas des-fluoroquinolonas por carecer de fluor en su estructura, incluye el garenoxacin, sin embargo el futuro de estas moléculas no es claro a la fecha. (García-Rodríguez y *col*. 2002; van Bambeke *et al*, 2005;)

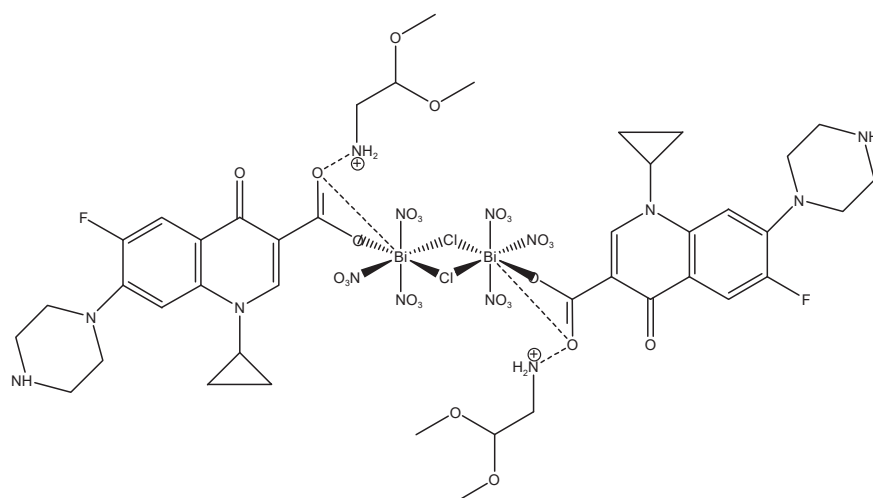
En la actualidad, las quinolonas son indicadas para una gran variedad de enfermedades, incluyendo infecciones en vías respiratorias altas y bajas,

infecciones gastrointestinales, infecciones ginecológicas, enfermedades de transmisión sexual, prostatitis y algunas infecciones en la piel, huesos y tejidos blandos. (Oliphant, 2002; Mitscher *et al*, 2005;)

En lo que refiere a su mecanismo de acción, se sabe que está relacionado con las topoisomerasas de tipo II (en gram negativos) y de tipo IV (en gram positivos), y que esta se atribuye al sustituyente en la posición 7 de la quinolona. También se ha comprobado que la presencia de los grupos carboxilato y el carbonilo en las posiciones 3 y 4 respectivamente, 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 Mg^{+2} . (Palú y col. 1992; Bonincontro y col., 2002; Heddle and Maxwell, 2002)

Se ha reportado que estos fármacos suelen unirse con cationes multivalentes, formando complejos organometálicos insolubles generalmente inactivos o con actividad antimicrobiana disminuida comparada con los compuestos libres de metal (Turel *et al* 2002).

Dentro de nuestro grupo de trabajo se ha sintetizado un complejo de **Ciprofloxacino-Bi(III)-(H₃CO)₂CHCH₂NH₃Cl**, el cual a pesar de su insolubilidad resultó tener una actividad inhibitoria de crecimiento superior al ciprofloxacino frente a las cepas probadas. Además se observó que dicho complejo cataliza la hidrólisis del ADN en presencia de Mg^{+2} . Sin embargo, al haberse sintetizado únicamente un compuesto no se estableció claramente el papel que asume la amina. (Barrera Mendoza, 2005)



2

Figura 2. Estructura propuesta para el complejo Ciprofloxacino-Bi(III)- $(\text{H}_3\text{CO})_2\text{CHCH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$

Con la finalidad de elucidar la importancia de la amina en el complejo descrito, se expone la obtención de un grupo de complejos de formula general **Ciprofloxacino-Bi(III)- YNH_n** , a partir de ciprofloxacino, nitrato de bismuto y aminas alifáticas y aromáticas elegidas tomando en cuenta su diversidad estructural. De ahí se realiza un estudio SAR para explicar el comportamiento biológico de esos compuestos.

Así mismo, se lleva a cabo y discute el análisis QSAR de fluoroquinolonas 4'-piperazinil sustituidas utilizando algoritmos genéticos y se reporta la síntesis de tres compuestos que de acuerdo al modelo matemático obtenido se predice una actividad antimicrobiana importante.

2. ANTECEDENTES

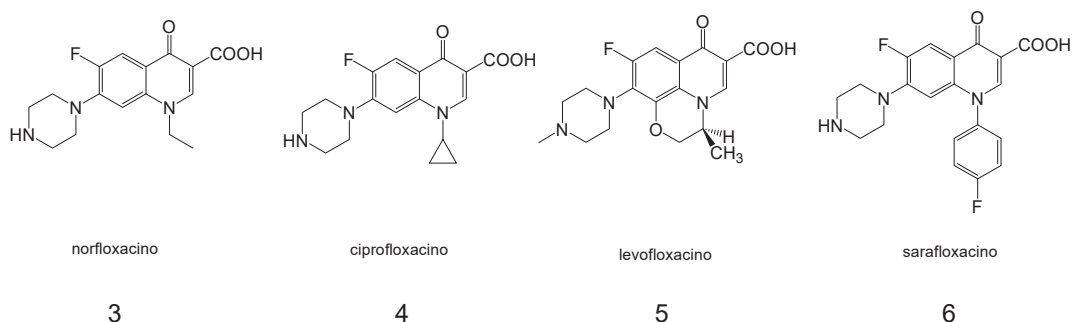
2.1. Relación estructura-actividad de las quinolonas

Gracias a la extensa búsqueda en la síntesis de nuevas quinolonas, se han llegado a definir las características que pueden aportar diversos sustituyentes alrededor de la región farmacófora, optimizando sus propiedades y reduciendo resistencia y toxicidad. (Hooper, 1998)

Una herramienta importante para la síntesis de nuevas quinolonas activas, es el desarrollo de estudios predictivos de QSAR. Estos estudios buscan relaciones entre la estructura molecular y una propiedad, particularmente actividad biológica, de una serie de moléculas análogas. Muchos de los estudios QSAR usan frecuentemente parámetros como la lipofilia, efectos electrónicos y factores estéricos. (Keun y col. 1996; Patrick 2001; Stanton, 2003)

Es importante analizar la relación de cada grupo en cada posición para observar como se relacionan estos con la actividad. (Mitscher *et al*, 2005). Así, en la intensa búsqueda de nuevos derivados de fluoroquinolonas, se han establecido, mediante estudios SAR y QSAR aspectos estructurales importantes que influyen en la actividad, algunos de los cuales se detallan a continuación:

2.1.1. Sustituyentes en posición 1.



Quinolona	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
Norfloxacin	0.25	0.2	0.8	1.6	-
Ciprofloxacin	0.012	0.05	0.1	0.39	6.25
Levofloxacin	0.008	1.2	0.12	0.5	-
Sarafloxacin	0.25	1.0	0.5	-	-

Figura 3. Estructura y espectro antimicrobiano reducido (MIC en µg/mL) de 4 quinolonas de estructura análoga con diferentes sustituyentes en posición 1. (Mitscher *et al*, 2005)

2.1.1.1 Etilo en posición 1. Es uno de los grupos más constantes en esta posición en quinolonas, tal es el caso del norfloxacin que presenta mejor actividad que el ciprofloxacin (con estructura similar que solamente varía en esta posición) contra gram positivos.

2.1.1.2 Ciclopropilo en posición 1. Presente por primera vez en el ciprofloxacin, que comparándolo con el norfloxacin, el primero presenta un incremento en la actividad y potencia contra gram negativos, por lo que se ha incluido constantemente en la estructura de varias quinolonas en conjunto con variaciones en las posiciones 5, 7 y 8. También empieza a presentarse comúnmente este sustituyente en quinolonas activas contra microorganismos anaerobios.

2.1.1.3 Triciclos con puente de N-1 a C-8. En este grupo un sustituyente en posición 8 está unido a un sustituyente N-etil en posición 1, resultando en una

molécula tricíclica. Esta característica restringe la rotación del grupo etilo y muestra un centro quiral. La rigidez de estos sustituyentes en posición 1 incrementa significativamente la actividad contra gram positivos, aunque la actividad contra gram negativos se ve reducida.

2.1.1.4 Arilos en posición 1. La introducción de un sustituyente N-aril con la presencia de un segundo átomo de flúor en este anillo, (como en el caso del tosufloxacino y trovafloxacino), aumenta la potencia tanto contra gram positivos, como contra gram negativos, también las propiedades farmacocinéticas se ven favorecida, llegando a ser comercializados estos dos fármacos. Desafortunadamente tal adición del sustituyente difluorobencilo fue acompañada por raras pero severas toxicidades que no fueron detectadas en investigaciones preclínicas.

En general, podemos resumir que la potencia de las quinolonas N-1 sustituidas obedece el siguiente orden contra gram positivos: aril > etil > 1, 8 fusionados > ciclopropil; y contra gram negativos de la siguiente forma: ciclopropil $\approx$ etil > aril > 1, 8 fusionados. (Klopman y col. 1996; Hayashi y col. 2004; Mitscher *et al*, 2005)

2.1.2. Sustituyentes en posiciones 2, 3 y 4.

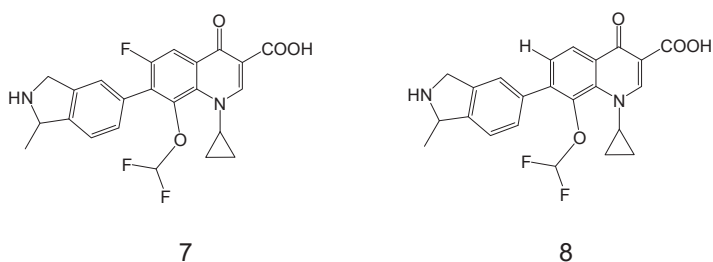
Comparados con otras posiciones, las 2, 3 y 4, no han sido el objeto de tantos estudios de en la búsqueda de análogos que permitan conocer su relación estructura actividad, incluso no ha habido en el mercado ningún análogo con otro sustituyente en posición 2 que el CH. Esto es explicado por la obtención sustituyentes en estas posiciones. Es posible la explicación de este

fenómeno sea que el grupo carboxilo en posición 3 necesite de estar coplanar con el grupo carbonilo en posición 4 para, posiblemente, formar algún puente de hidrogeno o acoplarse con Mg^{+2} y reconocer al ADN para la posterior inhibición de la girasa o topoisomeras IV. (García-Rodríguez y col. 2002)

2.1.3. Sustituyentes en posición 5.

A diferencia de las posiciones 2, 3 y 4, los sustituyentes en 5 permiten conservar la actividad de la quinolona, especialmente si se trata de sustituyentes pequeños, pudiendo incrementar la actividad en algunos casos cuando se incluyen grupos polares. Los sustituyentes que han sido estudiados en estas posiciones incluyen: N, COH, CNH_2 , $CNHMe_2$, $CNHAc$, CCH_3 , CEt , CCl y CF . Sparfloxacin y grepafloxacin son las quinolonas de este tipo que han tenido más éxito. (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004)

2.1.4. Sustituyentes en posición 6.



E. coli MIC	0.015	0.015
S. aureus MIC	0.007	0.007
Girasa de E. coli IC-50	0.16	0.17
Topo IV de S. aureus IC-50	4.6	2.19
Topo II humana	128	510

Figura 4. Comparación de la potencia (en $\mu g/mL$) de una 6-fluoroquinolona contra una desfluoroquinolona. (Mitscher et al, 2005)

Las investigaciones hechas con respecto a esta posición, están limitadas a los siguientes sustituyentes: metilendioxi unido a C-7 (ácido oxolinico, miloxacino y cinoxacino), CH (ácido nalidíxico y rosoxacino), y N (ácido pipemídico y ácido piromídico). Estas quinolonas llegaron a ser comercializadas, pero fueron suplantadas por análogos con un átomo de flúor en esta posición, se cree que este sustituyente aumenta notablemente la potencia contra la girasa y la penetración celular. Estas características han dado al átomo de flúor una presencia constante en la posición 6 de las quinolonas. Sin embargo, se ha intentado prescindir de este para disminuir la toxicidad, lo que da origen a las novedosas desfluoroquinolonas. Otros sustituyentes que han sido estudiados en posición 6 con resultados menos satisfactorios, son: Cl, Br, metil ceto, CN, nitro, metil y amonio. (Mitscher *et al*, 2005)

2.1.5. Sustituyentes en posición 7.

Esta ha sido la posición más versátil para las sustituciones de grupos en las quinolonas. Varios cientos de análogos han sido preparados empleando diferentes sustituyentes en esta posición. Se ha observado que un sistema cíclico conteniendo dos o tres grupos amino es usualmente mejor. Se desarrollan efectos benéficos que usualmente aumentan la potencia y favorecen la farmacocinética. La naturaleza del sustituyente en esta posición también afecta considerablemente la preferencia por el sitio diana (girasa o topoisomerasa IV) de las quinolonas. Se ha observado, que los sustituyentes voluminosos sobre el nitrógeno distal generalmente reducen la potencia.

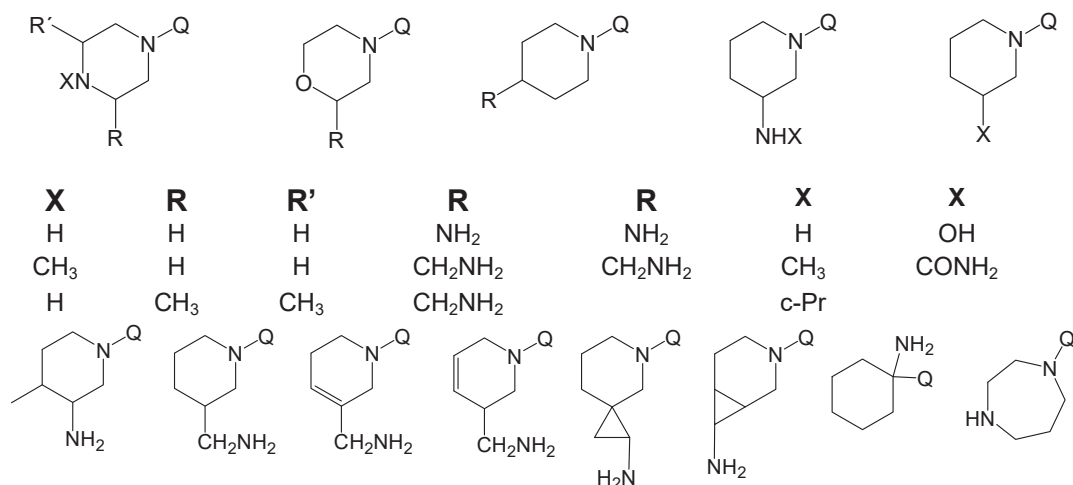
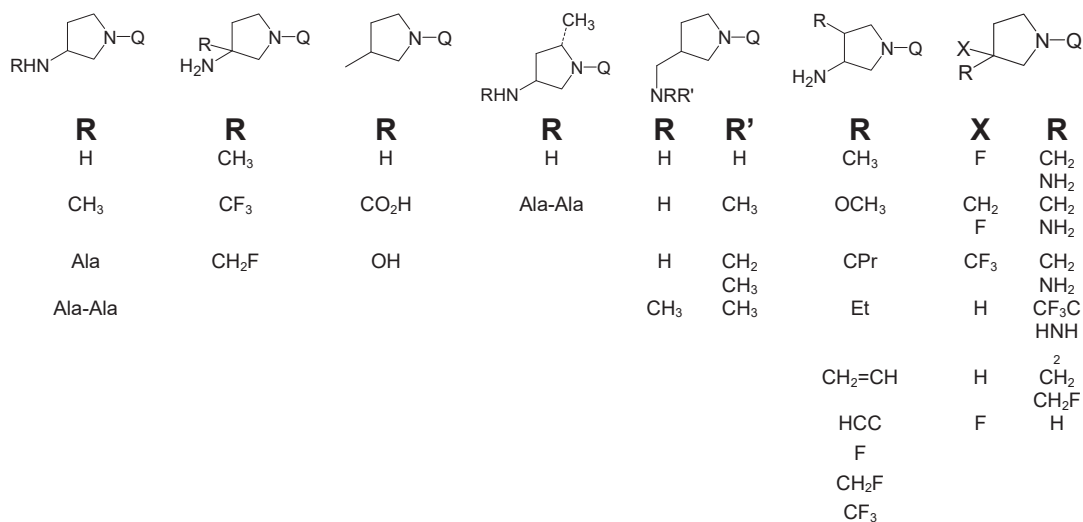


Figura 5. Selección de análogos sintetizados con un sustituyente piperazil en posición 7. "Q" representa una quinolona, naftiridona o piridona. (Mitscher *et al*, 2005)

Los análogos con piperazil como sustituyente en esta posición, generalmente tienen una alta potencia, son más activos contra gram negativos, mientras los análogos con pirrolidinil tienen mayor actividad contra gram positivos.



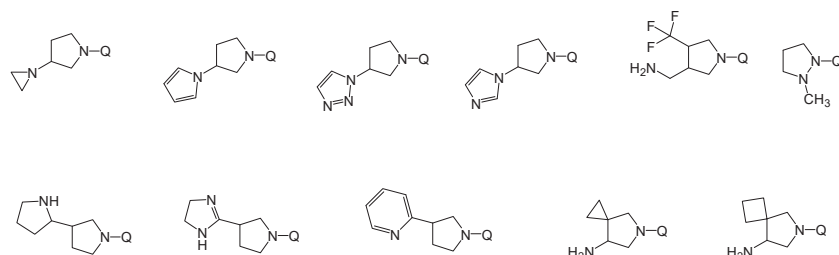


Figura 6. Algunas quinolonas sintetizados con un sustituyente pirrolidin posición 7. “Q” representa una quinolona, naftiridona o piridona. (Mitscher *et al*, 2005)

También es frecuente encontrar un anillo heterocíclico de cinco miembros, pirrolidinil, presente en la posición 7 de varias quinolonas, como isloxacino, moxifloxacino, clinifloxacino, gemifloxacino, olamufloxacino y tosufloxacino.

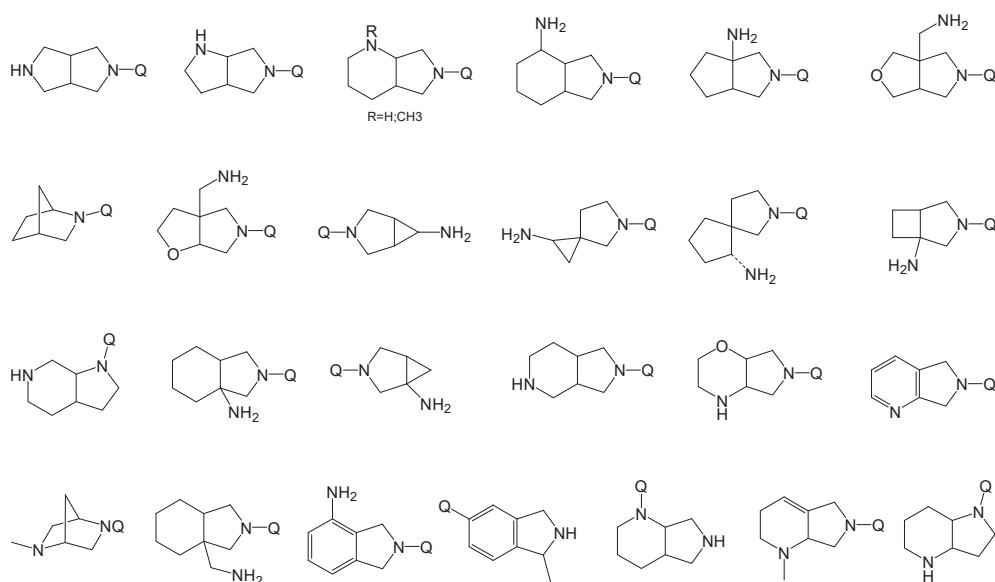


Figura 7. Biciclos presentes en algunas quinolonas en posición 7. “Q” representa una quinolona, naftiridona o piridona. (Mitscher *et al*, 2005)

Subsecuentemente, una gran variedad de sustituyentes bicíclicos han sido introducidos en esta posición, en los que se incluye el danofloxacino, olamufloxacino y trovafloxacino. (Mitscher *et al*, 2005)

También se han estudiado quinolonas que presentan un átomo de carbono unido a C-7, estas moléculas son de difícil síntesis. Algunos de estos

incluyen anillos aromáticos como sustituyentes y poseen una alta actividad contra microorganismos gram positivos. Estos compuestos son con frecuencia más activos contra la topoisomerasa II humana y por esto son potencialmente tóxicos. (Brossi y col. 1985; Keun y col. 1995; Domagala, y col. 1986)

Estudios de QSAR han revelado relaciones cuantitativas entre las estructuras de quinolonas C-7 sustituidas, tomando en cuenta parámetros como volumen molecular de van der Waals, área superficial, y algunos parámetros electrostáticos basados sobre el potencial electrostática molecular, que representan lipofilicidad. (Keun y col. 1995)

2.1.6. Sustituyentes en posición 8.

Los sustituyentes en esta posición han tenido un importante efecto sobre la eficacia *in vivo* y el espectro antimicrobiano de las quinolonas, presentando un papel determinante en la afinidad de las quinolonas por la girasa o topoisomerasa IV. Este efecto es complementado significativamente por la naturaleza del sustituyente en posición 5, especialmente si este es un átomo de flúor. Se ha observado que la presencia de un sustituyente metoxilo en posición 8 incrementa la potencia de la quinolona sin incrementar la fototoxicidad, como lo haría un halógeno en la misma posición. La primera modificación exitosa en esta posición fue el cambio del N (del ácido nalidíxico) por CH, lo que mejoró notablemente las características farmacocinéticas. Otros grupos que han sido investigados en esta posición incluyen: etoxilo, OH, OCH₂F, OCHF₂, OCF₃ y SMe, casualmente la mayoría son grupos electroatractores. (Sánchez y col. 1998; Renau y col. 1996)

quinolonas. (van Bambeke *et al*, 2005)

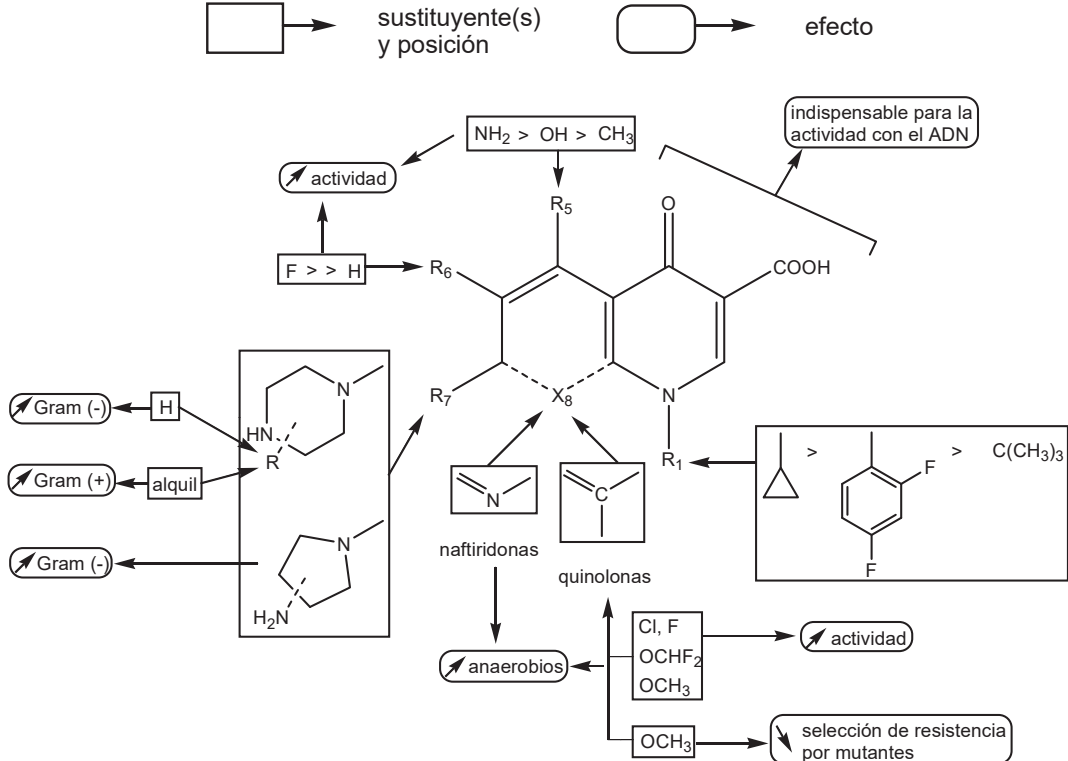


Figura 8. Relación estructura-actividad de las quinolonas. La parte central representa al fármaco. (van Bambeke *et al*, 2005)

2.2. Mecanismo de acción

La actividad de las quinolonas depende de la formación de un complejo ternario entre el ADN y la topoisomerasa de tipo II (llamada ADN girasa) y topoisomerasa IV, dos enzimas que juegan un papel crítico en el superenrollamiento del ADN. (Heddle and Maxwell 2002; Bonincinto y col. 2005)

Las fluoroquinolonas forman un complejo ternario que se compone del fármaco, el ADN y girasa y/o topoisomerasa IV, e inducen un cambio conformacional que resulta en el bloqueo del superenrollamiento, que es

responsable de la inhibición enzimática, provocando una rápida muerte celular, sin embargo este proceso no está totalmente elucidado. (Kampranis y Anthiiny, 1998) Por otra parte, la topoisomerasa II humana generalmente no es inhibida por estas moléculas. (Oliphant, 2002; Heddle and Maxwell 2002; Bunincontro y col. 2005)

La rápida muerte celular que producen las quinolonas, conduce a pensar que dicha muerte sería una consecuencia directa de la inhibición de la girasa o topoisomerasa IV. Sin embargo no está claro si esta inhibición es directamente responsable de la muerte celular y/o si la inhibición de la girasa es un evento inicial y necesario que desencadena una cascada de procesos que conducen finalmente a la muerte de la célula. (Drlica y Zhao, 1997)

Investigaciones han revelado que la concentración de quinolona, requerida para inhibir el superenrollamiento del ADN, es de 10 a 100 veces superior de la que se necesita para inhibir el crecimiento celular. Por ello se supone que no es necesaria una total inhibición de las actividades de la girasa para que se produzca la muerte celular. (Hallet y Maxwell, 1991; Drlica y Zhao, 1997)

Las quinolonas han mostrado reconocer a cadenas sintéticas de ADN con una afinidad por poli (dG) [poli (dG) > poli (dA) > poli (dT) > poli (dC)]. Sin embargo, el reconocimiento a la doble hélice de ADN es independiente de su secuencia. (Noble, y Maxwell, 2003)

2.3. Reactividad de las fluoroquinolonas.

La actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas se puede ver afectada por su reactividad. A continuación se discuten los aspectos más relevantes de esta reactividad que serán de interés para la discusión del presente trabajo.

2.3.1. *Carácter acido-base.*

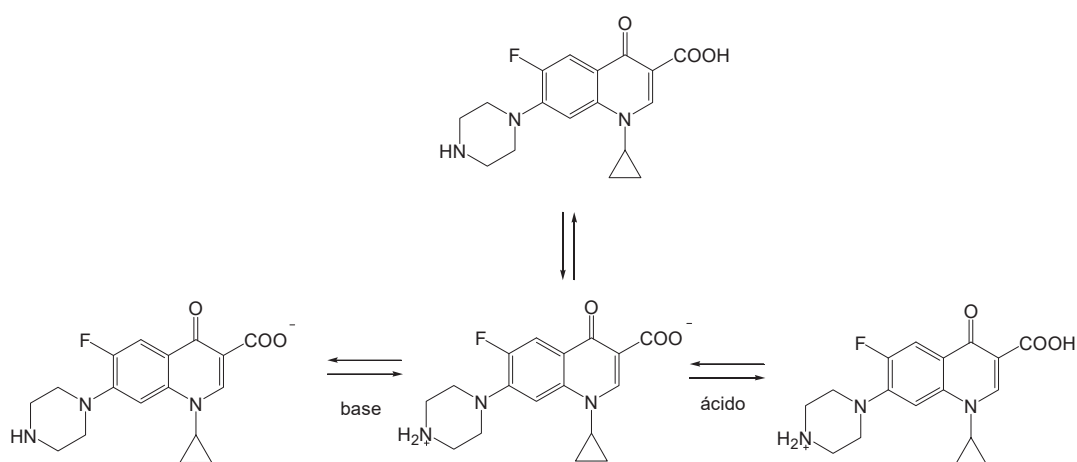


Figura 9. Esquema de la protonación/desprotonación de las quinolonas. (Turel *et al*, 2002)

Aunque la primera generación de quinolonas se caracteriza por estar compuesta de ácidos monovalentes con un carácter fuertemente hidrofóbico, el carácter anfotérico de las quinolonas de importancia clínica actual, les confiere una mayor hidrofiliidad. Consecuentemente, los compuestos más recientes poseen una mínima solubilidad acuosa en ambiente de pH neutro como es el caso de los tejidos dentro del organismo. En condiciones no fisiológicas de pH extremo, estas moléculas suelen ionizarse y adquirir mayor solubilidad. A pH alcalino, las quinolonas forman sales de carboxilato con una razonable solubilidad en agua, y en pH ácido el grupo amino es protonado formando una

sal, de igual forma adquiriendo solubilidad en agua. En pH neutro, cercano a su punto isoeléctrico, poseen dos formas en equilibrio. El zwitterion es el principal responsable de su disolución en agua que mantiene en estas condiciones. Por otra parte la forma no ionizada es también común y esta es la forma que es mejor absorbida. Se conoce que esta particular característica de las quinolonas tiene relevancia en la penetración a los diversos tejidos en mamíferos y en la mayoría de las bacterias por una combinación de difusión pasiva y transporte a través de porinas. (Turel *et al*, 2002; Wu y col. 2003; Kumar y col. 2003)

2.3.2. Quelatación.

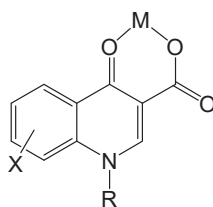


Figura 10. Quelatación de las quinolonas. (Turel *et al*, 2002)

El sustituyente carboxilato en posición 3 de las quinolonas forma compuestos con iones metálicos, particularmente en soluciones neutras o básicas. La proximidad de este grupo al carbonilo en posición 4 conduce a una fuerte quelatación con grupos electrodonadores. Es común la quelatación con iones metálicos multivalentes como Al^{+3} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} y Cu^{+2} , dando como resultado complejos insolubles en agua, que alcanzan concentraciones séricas después de la administración oral. Algunos de los efectos indeseables de las quinolonas son aumentados por este tipo de interacciones y se cree que la fotosensibilidad puede ser incrementada bajo estas condiciones, así como

también la erosión de tendones y la resistencia de mutantes. (Turel *et al*, 2002; Wu y col. 2003; Kumar y col. 2003)

2.4. Influencia de los iones metálicos en la actividad de las quinolonas

En 1985 se reporta por primera vez que la simultanea administración oral del cirpofloxacino con calcio y magnesio presentes en algunos antiácidos, resulta en la disminución de los niveles séricos de la quinolona. (Turel, *et al*. 2002)

La absorción del norfloxacin contra *E. coli* fue estudiada a diferente pH y en la presencia de iones metálicos monovalentes y divalentes, en donde el proceso de absorción se vio disminuido en condiciones ácidas. La presencia de iones Na^+ y K^+ no afectan los resultados apreciablemente, en contraste, la presencia de iones divalentes propició una dramática disminución de la incorporación del fármaco. (Wu y col. 2003)

El mecanismo propuesto para la interacción de las quinolonas con iones metálicos, es la quelatación entre el metal y los grupos carboxilato de C-3 y carbonilo de C-4. (Kumar y col. 2003)

Todas las quinolonas son parcialmente solubles en agua a pH entre 4 y 9. Una mezcla de una solución de agua y sales de metal y quinolona suele resultar en una precipitación de complejos. De esta manera, una serie de complejos de Ag, Co, Zn, Cd, Mg, B y Cu, han sido sintetizados. Pocos de estos productos han resultado tener una actividad antimicrobiana superior a la quinolona libre. (Turel, 2002)

También se ha sintetizado un grupo de compuestos iónicos, a partir de soluciones ácidas de quinolona y sal metálica. Estos compuestos generalmente

consisten en cationes de quinolonas protonadas y clorometalato o simples aniones inorgánicos. La solubilidad de todos estos compuestos iónicos de quinolonas, resulta mucho mejor que los complejos que han sido sintetizados. (Wu y col. 2003)

De esta manera se prepararon compuestos iónicos de Mg, Fe, Pt, Cu, Zn y siendo de nuestro especial interés, dos compuestos de Bi (III), $(\text{cfH}_3)(\text{cfH}_2)[\text{BiCl}_6]\cdot\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{cfH}_3)_2[\text{Bi}_2\text{Cl}_{10}]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (cfH_2 y cfH_3 son las formas protonadas del ciprofloxacino). En el primero de estos compuestos, una de las moléculas de ciprofloxacino está protonada en el oxígeno carbonílico y el nitrógeno distal del residuo de piperazina, mientras que en el otro compuesto, está protonado solo en átomo de nitrógeno. Estos dos productos fueron probados contra *Helicobacter pylori*. Los resultados mostraron que la actividad de ambos compuestos de bismuto (III) es comparable con la del clorhidrato de ciprofloxacino. (Kumar y col. 2003)

Recientemente, dentro de nuestro grupo de investigación, se ha desarrollado la síntesis en condiciones básicas de un complejo **Ciprofloxacino- Bi (III)- $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{CHCH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$** , para el cual se propuso la siguiente estructura. (Barrera, 2005)

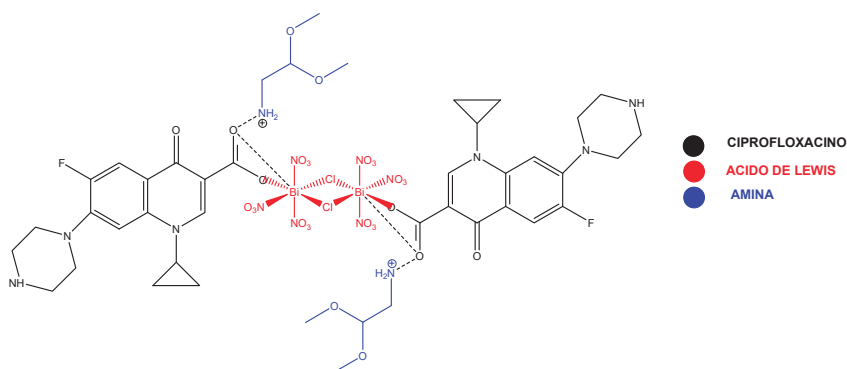


Figura 11. Complejo **Ciprofloxacino- Bi (III)- $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{CHCH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$** (Barrera, 2005)

Dicho complejo resulta inhibir el crecimiento bacteriano en mayor proporción que el ciprofloxacino en las cepas probadas, así como también mostró ser capaz de interactuar con el ADN. (C. Barrera, L. Chacon, 2005)

Los compuestos de bismuto han sido utilizados como fungicidas y agentes antitumorales y otros males por más de 200 años, los más reconocidos son el subcitrate de bismuto coloidal (CBS) y el subsalicilato de bismuto (BSS), usados para el tratamiento úlceras duodenales, gastritis, y diarreas. (H. Mahony y col. 1999). Asimismo, han demostrado tener actividad contra *H. Pylori* y otros organismos entericos y aunque se desconoce el mecanismo de acción se sabe que este metal puede agregarse a la pared bacteriana y al espacio periplasmático. La acción de algunos bactericidas de bismuto incluye inhibición de las ureasas y de la síntesis de adenosil trifosfato. (Phillips y col. 2000)

3. HIPÒTESIS

1. Dado que los sustituyentes en cualquier compuesto influyen en su actividad biológica, se espera que el cambio en la amina en los complejos de Ciprofloxacino-Bi(III)-YNH_n o YNH₃Cl afectará la actividad antibacteriana.
2. La actividad antibacteriana de nuevas fluoroquinolonas puede ser predicha mediante estudios QSAR obtenidos por inteligencia artificial que involucren descriptores no convencionales para este tipo de estudios.

4. OBJETIVOS

General:

Realizar estudio SAR de complejos Ciprofloxacino-Bi(III)-YNH_n y QSAR de fluoroquinolonas, este último mediante inteligencia artificial.

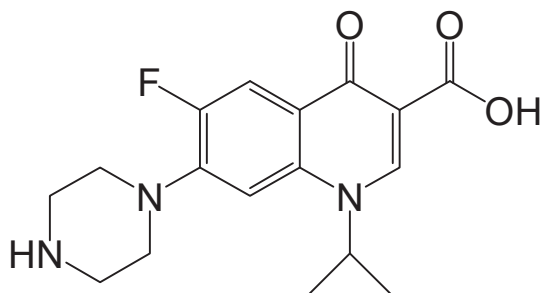
Particular:

1. Obtener una serie de complejos Ciprofloxacino-Bi(III)-YNH_n y determinar su actividad antimicrobiana *in vitro*.
2. Determinar la relevancia del grupo YNH_n sobre la actividad antibacteriana de estos complejos.
3. Realizar en estudio QSAR, utilizando algoritmos genéticos, que permita la predicción nuevas difluoroquinolonas 7-4'-piperazil sustituidas empleando una base de datos descrita en la literatura.
4. Sintetizar nuevas fluoroquinolonas 4'-piperazil sustituidas de acuerdo a las predicciones del mejor modelo obtenido por el estudio QSAR.

5. PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet FT Magna IR 750. Los espectros de RMN ^1H se obtuvieron con un equipo Varian Mercury Plus de 400MHz utilizándose DMSO-d y CHCl_3 -d como disolventes y tetrametil silano como referencia interna. Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón. Todos los reactivos, con excepción del ciprofloxacino, utilizados son de la marca Sigma-Aldrich. El Cpx se obtuvo a partir de tabletas comerciales de diversas marcas.

5.1. Obtención de materia prima.



4

Figura 12. Estructura del ciprofloxacino

Para la obtención de los derivados se utilizó como materia prima ciprofloxacino, el cual fue extraído a partir del clorhidrato de tabletas comerciales. Las tabletas fueron molidas y el polvo resultante se puso en un vaso de precipitados de 50 mL al que se agregaron 25 mL de agua destilada por cada 1g de clorhidrato de ciprofloxacino monohidratado con el fin de disolver dicha sal, a continuación se dejó en reposo con la intención de

precipitar el excipiente, el líquido se decantó y se filtró con papel, obteniendo así una solución de color amarillo claro.

La solución de clorhidrato de ciprofloxacino se puso en agitación en un matraz bola de 50 mL y se agregó gota por gota una solución de $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}$ hasta observar precipitado de color blanco, el cual se separó de la fase acuosa por filtración y se secó por evaporación a temperatura ambiente.

El sólido obtenido fue soluble en dimetilsulfóxido y el análisis espectroscópico de RMN ^1H confirma la obtención de ciprofloxacino en forma pura.

5.2. Síntesis de complejos Ciprofloxacino-Bi(III)- YNH_n .

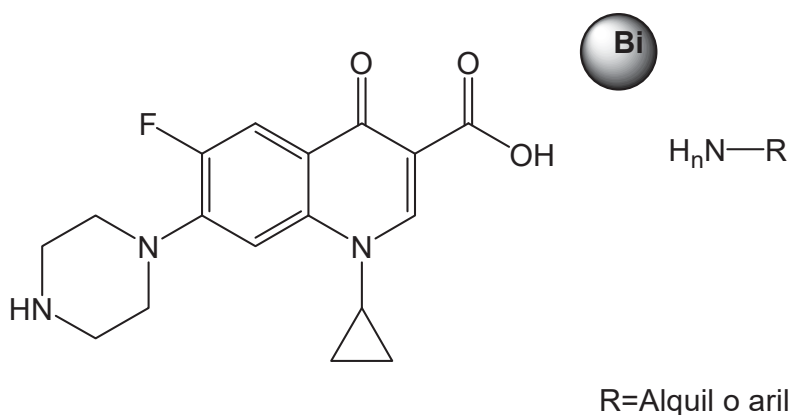


Figura 13. Representación general de los complejos tipo Ciprofloxacino-Bi(III)- YNH_n .

La obtención de estos complejos se realizó en medio alcalino, suspendiendo 40 mg (0.1208 mM) de ciprofloxacino en 3 mL de metanol en agitación vigorosa. Se agregó MeONa hasta su disolución; se adicionó la amina

correspondiente (ver figura 19) en concentración equivalente al mismo tiempo que se elevaba la temperatura a 70 °C. Finalmente se añadió una cantidad equimolar de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (59 mg) a lo que siguió la precipitación inmediata de un sólido amorfo. El precipitado fue lavado con acetona 3 veces y se dejó secar por evaporación a temperatura ambiente.

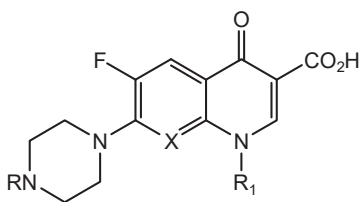
Los productos obtenidos fueron analizados por espectroscopia de infrarrojo. Los datos son discutidos posteriormente y se presentan en la tabla 1.

5.3. Estudio cuantitativo de estructura-actividad (QSAR)

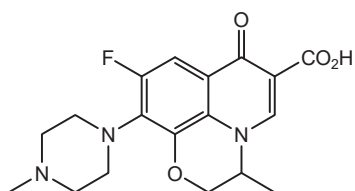
Las estructuras fueron generadas en Hyperchem 5.0 (Hypercube, Inc. 1996), en el que se realizó una optimización geométrica basada en cálculos semi empíricos AM1, usando el algoritmo de Polak-Ribiere y un límite de convergencia de 0.1 Kcal/(Åmol).

5.3.1. Serie de exploración.

Se tomó como base de datos el conjunto de moléculas y actividades descritas para la cepa *S. aureus* H228 en donde se describe un QSAR. (Domagala, 1986)

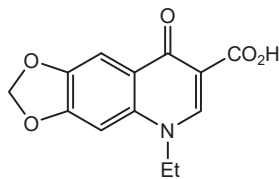


Nombre comercial	No.	X	R ₁	R
Norfloxacin	3	CH	Et	H
Ciprofloxacino	4	CH	c-Pr	H
Enoxacino	9	N	Et	H
Pefloxacin	10	CH	Et	Me
Amifloxacino	11	CH	NHCH ₃	Me



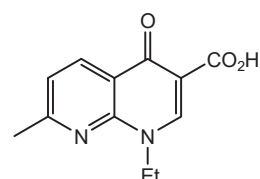
ofloxacin

12



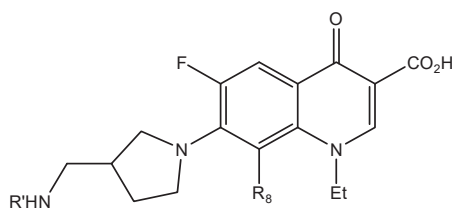
ácido oxolínico

13



ácido nalidíxico

14



Compuesto No.	R'	R ₈
15	H	H
16	Me	H
17	Et	H
18	H	F
19	Me	F
20	Et	F

Figura 14. Quinolonas seleccionadas para la serie de exploración.

5.3.2. Metodología para la selección de los modelos.

Usando el software Dragon versión 5.0 se calcularon los valores de una serie de descriptores moleculares para cada uno de los compuestos de la serie de exploración, (R. Todeschini y col. 2005). Estos datos fueron exportados al software Movi Dig's versión 1.0 con el cual, siguiendo un sistema de selección por algoritmos genéticos, logró la formación de modelos de uno, dos y tres descriptores relacionando el MIC de cada molécula con respecto al valor de los descriptores de cada modelo. De esta manera se seleccionaron a los mejores 50 modelos, calificados por el software Movi Dig's versión 1.0, el cual consideró como factor primario el valor Q^2 el cual es relacionado con la capacidad predictora del modelo; y considerando como factores secundarios los valores de R^2 (coeficiente de determinación) y K_x (coeficiente total de correlación). Como último paso se revisaron los 50 modelos y se seleccionó un modelo integrado por los descriptores **GATS2e**, **RDF010v** y **RDF030p**. (Todeschini y col. 2005)

5.4. Síntesis de fluoroquinolonas derivadas del ciprofloxacino.

5.4.1. Síntesis del carbamato de metilo.

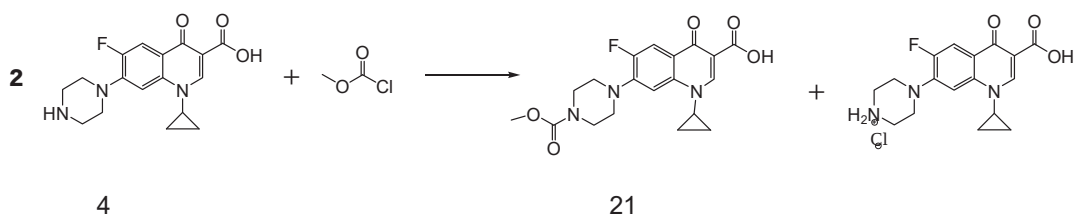


Figura 15. Síntesis de carbamato de metilo.

A una suspensión de 3.0211 mM de ciprofloxacino en 20 mL de CH_2Cl_2 con agitación vigorosa y temperatura ambiente se agregó gota a gota una cantidad equimolar (286 mg) de clorofornato de metilo, manteniéndose en agitación por 30 minutos.

Se obtuvo como subproducto clorhidrato de ciprofloxacino, el cual se recuperó para su posterior conversión a ciprofloxacino libre, el crudo de reacción se separó por filtración, la solución fue evaporada a temperatura ambiente, dando como resultado la aparición de pequeños cristales de color amarillo claro en forma de aguja de los que se obtuvo cromatografía en capa fina (con la mezcla AcEt 4:1 EtOH) en la que se observó un producto aislado, con un R. F. de 0.68. El producto fue analizado por espectroscopía de masas y RMN ^1H , los datos de este último se presentan y discuten en la tabla 5.

5.4.2. Síntesis del carbamato de etilo.

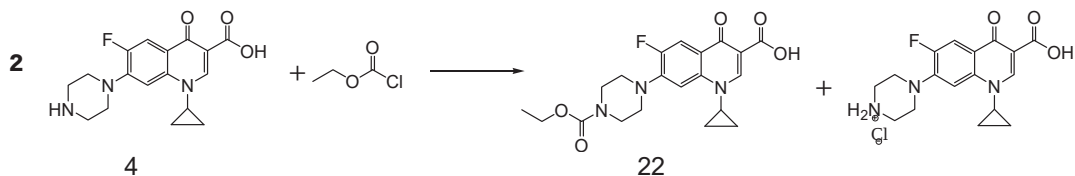


Figura 16. Síntesis de carbamato de etilo.

A una suspensión con 3.0211 mM de ciprofloxacino en 20 mL de CH_2Cl_2 con agitación vigorosa y temperatura ambiente se agregó gota a gota una cantidad equimolar (328 mg) de clorofornato de terbutilo, manteniéndose en agitación por 30 minutos.

El crudo de reacción se separó por filtración, el filtrado fue evaporado a temperatura ambiente, obteniendo un sólido amorfo de color blanco que en cromatografía de capa fina (con la mezcla AcEt 4:1 EtOH) mostró un producto

aislado con un R. F. de 0.76, el cual fue analizado por espectroscopía de RMN ^1H .

5.4.3. Síntesis del carbamato de isobutilo.

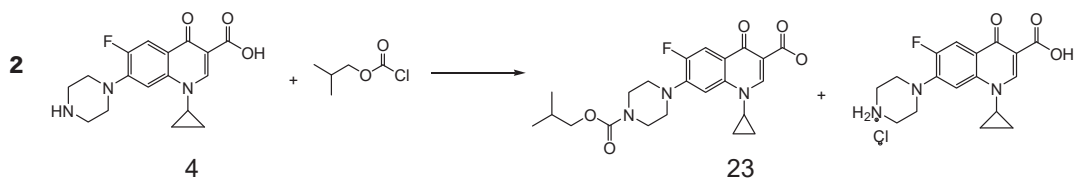


Figura 17. Síntesis del carbamato de isobutilo.

A una suspensión con 3.0211 mM de ciprofloxacino en 20 mL de CH_2Cl_2 con agitación vigorosa y temperatura ambiente se agregó gota a gota una cantidad equimolar (411 mg) de cloroformato de etilo, manteniéndose en agitación por una hora.

El crudo de reacción se separó por filtración, el filtrado fue evaporado a temperatura ambiente, obteniendo un sólido amorfo de color blanco que en cromatografía de capa fina (con la mezcla AcEt 4:1 EtOH) mostró un producto aislado con un R. F. de 0.82 el cual fue analizado por espectroscopía de RMN ^1H .

5.5. Pruebas biológicas.

5.5.1 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar.

Se utilizó el método de Kirby-Bauer, con cepas silvestres de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Pao1), las cuales fueron aportadas por el D.C. Carlos

Cortés Penagos sembradas en agar Muller-Hinton en placas de 90 mm de diámetro y bajo el siguiente procedimiento:

1. Preparación del inóculo.

Se tocó una colonia por arriba con un asa y fue transferida a un tubo con 5 mL de caldo nutritivo. El caldo de cultivo fue incubado a 36°C hasta alcanzar o exceder la turbidez del estándar de 0.5 McFarland (4 a 6 horas). Esto resultando en una suspensión que contiene aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UCF/mL. La turbidez del caldo fue ajustada con caldo nutritivo hasta obtener una turbidez ópticamente comparable a un estándar de 0,5 McFarland la cual fue medida usando un espectrofotómetro y una celda de 1 cm de paso de luz usando como blanco caldo nutritivo estéril.

2. Inoculación de placas.

En un lapso de tiempo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, un hisopo de algodón fue sumergido en ella. El hisopo fue rotado varias veces y presionado firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Con fin de remover el exceso de inóculo.

Se inoculó la superficie de una placa de agar Mueller -Hinton por rayado con el hisopo sobre toda la superficie. Este procedimiento fue repetido rayando dos veces, rotando la placa 90° para asegurar una distribución constante del inóculo. Finalmente el hisopo se pasó sobre los bordes del agar.

3. Preparación de los discos.

Se prepararon soluciones y suspensiones (en el caso de los productos insolubles) diluyendo 0.6 mg de los productos obtenidos en 3.4 mL de

solvente (DMSO), de estas diluciones o suspensiones tomo una alícuota de 0.5 µL e inoculó en un disco estéril de papel filtro de 6 mm de diámetro.

4. Aplicación de los discos a las placas inoculadas.

Los discos fueron dispersados a distancia constante sobre la superficie del agar sin quedar a menos de 24 mm de distancia entre estos. Cada disco fue presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Las placas fueron invertidas y puestas en un incubador a 36°C en el lapso de 15 minutos después de aplicados los discos. En cada placa se aplicó un disco con ciprofloxacino como control, también como controles, se aplicaron discos impregnados con las aminas libres usadas en la síntesis de los complejos.

5. Lectura de placas e interpretación de resultados.

Después de 16 a 18 horas de incubación, cada placa fue examinada. Los diámetros de la zona de inhibición completa fueron medidos en mm pasando por el centro del disco. (Bauer y col. 1966; Erna Cona *et al*, 2002)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Relación Estructura Actividad de Complejos de Ciprofloxacino-Bi(III)-YNH_n

6.1.1. Síntesis

Ya que uno de los objetivos de esta tesis es la elucidación del papel que asume la amina en este tipo de complejos, mediante un estudio de Relación Estructura Actividad, el primer paso fue la elección de un grupo de aminas cuyas características estructurales permitan el análisis.

Para lograr el objetivo, se eligieron 17 aminas de las cuales 13 fueron aromáticas y 4 alifáticas (2 son primarias y 2 secundarias). Las estructuras se presentan en la figura 19.

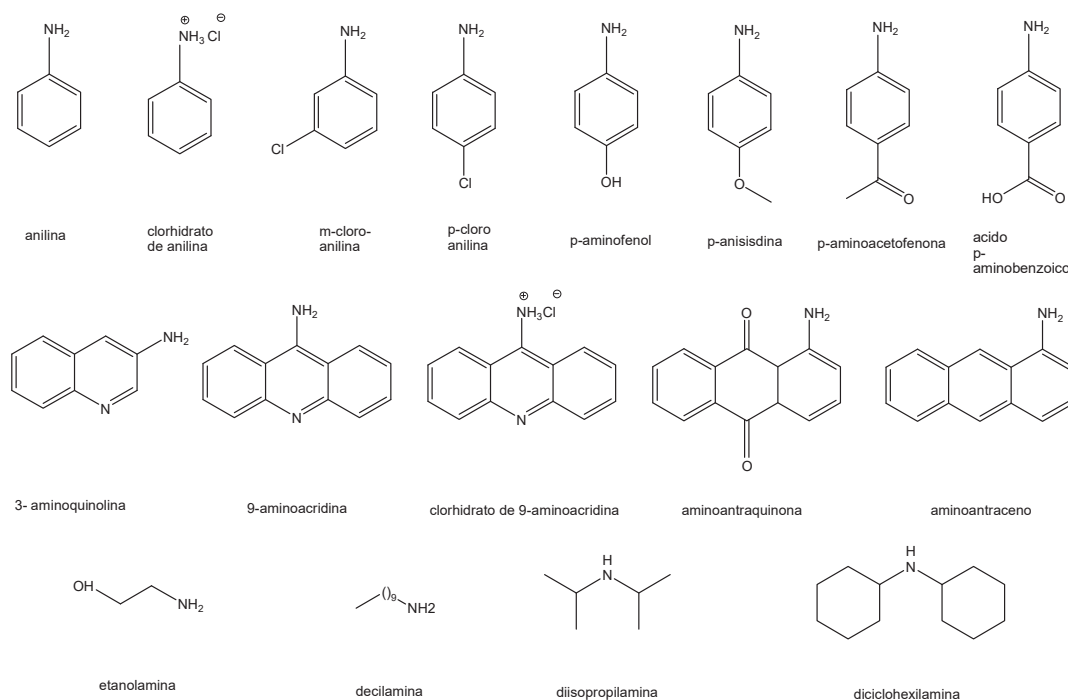


Figura 18. Aminas acomplejadas.

Los compuestos a evaluar se obtuvieron en condiciones alcalinas a partir del ciprofloxacino, la amina y la sal de bismuto, según se detalla en la sección de metodología.

Puesto que es difícil caracterizar compuestos organometálicos por espectroscopia convencional (RMN, EM), es común acudir a los datos de IR, que en el caso de las metalo-fluoroquinolonas han sido ampliamente estudiados y que han permitido demostrar que suelen coordinarse de diferentes maneras, como se aprecia en la figura 20.

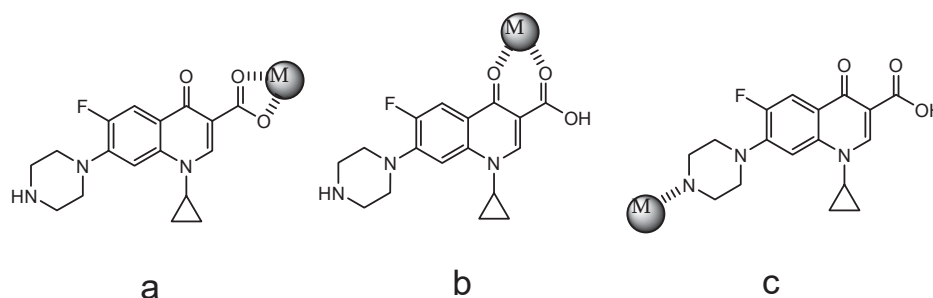


Figura 19. Diferentes complejos de quinolona-metal. (Turel *et al*, 2002; Guoping Wang y col. 2003; S. Padhye y col. 2003)

La figura 20a esquematiza la interacción entre el metal y el carboxilato, en donde cabe recordar que este último deslocaliza su carga sobre los tres átomos del grupo funcional y por lo tanto la interacción con el metal es el resultado de la carga deslocalizada con el orbital vacío del metal. La segunda opción (figura 20b) es la interacción del ácido de Lewis con el carbonilo de la piridona y con un oxígeno del carboxilato. De hecho este es el panorama que existe cuando la quinolona reconoce al Mg^{+2} y este a su vez al DNA para finalmente tener el efecto sobre la girasa, es decir forma parte crucial del mecanismo de acción molecular del antibiótico (Heddle and Maxwell 2002). El tercer caso (figura 20c), es más bien producto de una reacción ácido base de

Bronsted-Lowry en donde la amina se encuentra protonada y el metal funge como contraion. Los primeros dos son complejos organometálicos, mientras que el último es un compuesto iónico.

Para determinar el tipo de complejo formado en cada una de las estructuras aquí propuestas se consideró lo siguiente:

1. Se ha reportado que en el espectro de IR de cfx no se muestran bandas de absorción del enlace (C=O) del grupo carboxílico en C-3, señal que en otras quinolonas (norfloxacin) ocurre a 1725 cm^{-1} . Algunos autores han concluido que este fenómeno se debe a que el grupo carboxílico se encuentra desprotonado y la molécula existe como un zwitterion.
2. Es sabido que los iones carboxilato no muestran el clásico estiramiento del enlace (C=O) alrededor de 1700 cm^{-1} , no obstante, se le atribuyen dos bandas características en los rangos de $1650\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$ y $1400\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$ asignadas a los estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces (O-C-O).
3. Se ha observado que cuando se encuentran metales unidos a los grupos 4-oxo y oxígenos carboxílicos no se muestra absorción del enlace (C=O) correspondientes al carboxilato y la señal perteneciente al enlace (C=O) en C-4 se observa desplazada. (Turel *et al*, 2002).

Al hacer un análisis detallado de los espectros de IR (ver anexos), es posible darse cuenta que a pesar de haber aplicado la misma metodología de reacción, se han obtenido tres grupos principales de complejos:

GRUPO I. En el que se incluyen aquellas moléculas que no presentan bandas de absorción en 1725 cm^{-1} , sin embargo presentan una banda de

absorción entre $1625\text{-}1612\text{ cm}^{-1}$, que podría deberse a la absorción desplazada a frecuencia mas baja del enlace (C=O) de C-4, por lo que en estos complejos el Bi(III) podría estar acoplado con los oxígenos del carboxilato siguiendo el esquema “a” según la figura 26. este grupo incluye los productos **25**, **29**, **30**, **32**, **33**, **34**, **37**, **38** y **40**. Los datos espectroscópicos de estos complejos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Bandas de absorción de los complejos del grupo I comparadas con las del ciprofloxacino.

COMPLEJO	2821	1725	1627.5	1626-1612	1508	1477.7	1331.8
4(Cfx)*				X		X	X
25				X			
29			X			X	
30	X		X			X	
32	X			X		X	
33	X			X			
34				X		X	
37	X			X			
38			X				X
40				X		X	

*Datos del espectro de IR de cfx fueron corroborados en el trabajo realizado por Turel en 2002 “The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents” pag 39. Las absorciones son dadas en cm^{-1} .

GRUPO II. En el que se incluye como único miembro el complejo **39**, que a pesar de presentar absorción a 1725 cm^{-1} (siendo esta señal menos intensa que las de los complejos del grupo I), no muestra señal de absorción alrededor de 1627.5 cm^{-1} , y esta es desplazada a 1614.3 cm^{-1} , por lo que se ha considerado la posibilidad de que el Bi(III) se presente acomplexado en ambos carbonilos y el grupo carboxílico se conserve protonado, siguiendo de esta manera al esquema de la figura 26b. Los datos espectroscópicos de estos complejos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Bandas de absorción del complejo del grupo II comparadas con las del ciprofloxacino.

COMPLEJO	2821	1725	1627.5	1626-1612	1508	1477.7	1331.8
4(Cfx)*				X		X	X
39		X		X		X	

*Datos del espectro de IR de cfx fueron corroborados en el trabajo realizado por Turel en 2002. Las absorciones son dadas en cm^{-1} .

GRUPO III. El integrado por aquellos que muestran la banda de absorción cercana a 1725 cm^{-1} que sugiere la presencia de ácido carboxílico no acomplexado con Bi(III) y otra señal de absorción en 1627.5 cm^{-1} , asignada al enlace (C=O) de C-4 y por lo que se sugiere obedecen el orden estructural del esquema “c” de la figura 26, siendo estos **24, 26, 27, 31, 35, y 36**. Los datos espectroscópicos de estos complejos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4. Bandas de absorción de los complejos del grupo III comparadas con las del ciprofloxacino.

COMPLEJO	2821	1725	1627.5	1626-1612	1508	1477.7	1331.8
4(Cfx)*				X		X	X
24		X	X		X		X
26	X	X	X		X		X
27	X	X	X		X		X
31		X	X		X		X
35	X	X	X		X		X
36	X	X	X		X		X

*Datos del espectro de IR de cfx fueron corroborados en el trabajo realizado por Turel en 2002. Las absorciones son dadas en cm^{-1} .

Se a considerado que en todos los complejos la amina se encuentra acoplada directamente al Bi(III), excepto en **25 y 34**, en donde cabe la posibilidad de que conteniendo estas aminas cuaternarias con carga neta positiva pudieran formar un puente de hidrogeno con alguno de los oxígenos del carboxilato o en carbonilo en C-4.

6.1.2. Actividad antimicrobiana

Los resultados de actividad antibacteriana se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los complejos del grupo I comparada con la del ciprofloxacino.

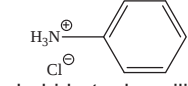
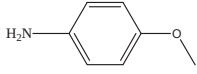
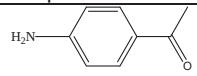
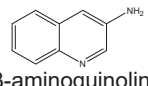
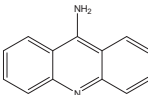
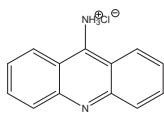
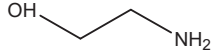
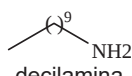
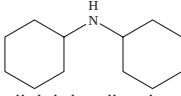
No.	Complejo formado	Aminas acomplejadas	Halo de inhibición (mm) P. aeruginosa	Halo de inhibición (mm) S. aureus	Halo de inhibición (mm) E. coli
25	Ciprofloxacino- Bi(III)- H ₂ NC ₆ H ₄ Cl	 clorhidrato de anilina	-	-	19
29	Ciprofloxacino- Bi(III)- H ₂ NC ₆ H ₄ OCH ₃	 p-anisidina	-	-	23
30	Ciprofloxacino- Bi(III)- H ₂ NC ₆ H ₄ COCH ₃	 p-aminoacetofenona	-	-	22
32	Ciprofloxacino- Bi(III)- (3- aminoquinolina)	 3-aminoquinolina	-	-	19
33	Ciprofloxacino- Bi(III)- (9-aminoacridina)	 9-aminoacridina	14	11	32
34	Ciprofloxacino- Bi(III)- (Clorhidrato de 9- aminoacridina)	 clorhidrato de 9- aminoacridina	-	-	19
37	Ciprofloxacino- Bi(III)- H ₂ N(CH ₂)OH	 etanolamina	8	8	24
38	Ciprofloxacino- Bi(III)- H ₂ N(CH ₂) ₉ CH ₃	 decilamina	-	-	26
40	Ciprofloxacino- Bi(III)- HN(C ₆ H ₅) ₂	 díciclohexilamina	-	-	20
4 (cfx)			15	14	30

Tabla 6. Actividad antimicrobiana de los complejos del grupo II comparada con la del ciprofloxacino.

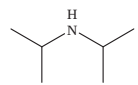
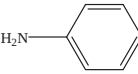
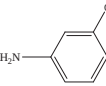
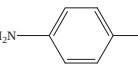
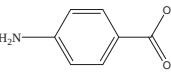
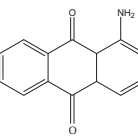
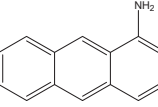
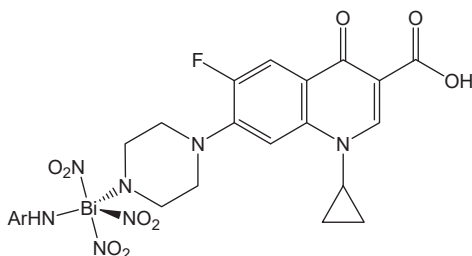
No.	Complejo formado	Aminas acomplejadas	Halo de inhibición (mm) P. aeruginosa	Halo de inhibición (mm) S. aureus	Halo de inhibición (mm) E. coli
39	Ciprofloxacino- Bi(III)- HN[CH(CH ₃) ₂] ₂	 diisopropilamina	14	13	31
4 (cfx)			15	14	30

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de los complejos del grupo III comparada con la del ciprofloxacino.

No.	Complejo formado	Aminas acomplejadas	Halo de inhibición (mm) P. aeruginosa	Halo de inhibición (mm) S. aureus	Halo de inhibición (mm) E. coli
24	Ciprofloxacino- Bi(III)- H ₂ NC ₆ H ₅	 anilina	19	17	35
26	Ciprofloxacino- Bi(III)- H ₂ NC ₆ H ₄ Cl	 m-cloroanilina	19	16	35
27	Ciprofloxacino- Bi(III)- H ₂ NC ₆ H ₄ Cl	 p-cloroanilina	19	16	34
31	Ciprofloxacino- Bi(III)- H ₂ NC ₆ H ₄ COOH	 acido-p- aminobenzoico	19	17	36
35	Ciprofloxacino- Bi(III)- (1-aminoantraquinona)	 1-aminoantraquinona	21	16	38
36	Ciprofloxacino- Bi(III)- (1- aminoantraceno)	 1-aminoantraceno	21	19	39
4 (cfx)			15	14	30

En todos los ensayos se incluyó como control la amina correspondiente y la respectiva sal de Bi smuto (ninguno de ellos mostró actividad representativa, por lo que se descarta que la actividad sea debida a l Bi o a la amina *per se*). Cabe mencionar que a algunas de las aminas probadas (3-aminoquinolina, 9-aminoacridina, aminoantraceno y aminoantraquinona) se les atribuye cierta toxicidad y podría esperarse que el resultado de la actividad de los complejos formados fuera en parte atribuido a estas propiedades. Sin embargo, a l a concentración de 0.6mg/3.4mL (concentración mayor que la utilizada con los compuestos) no se observó inhibición el crecimiento bacteriano.

Los resultados obtenidos muestran una clara superioridad en la actividad de los complejos del grupo III con respecto a los demás, por lo que hay que resaltar las características de estos complejos.



Amina	Complejo
Anilina	24
m-cloroanilina	26
p-cloroanilina	27
Acido-p-aminobenzoico	31
Aminoantraquinona	35
Aminoantraceno	36

Figura 20. Estructura propuesta para los complejos del grupo 1.

Este grupo presenta aminas aromáticas sin la presencia de C sp³, por lo que se considera la planaridad de la amina como un posible factor, tanto para la formación de este tipo de complejos, como para la actividad biológica de la

molécula. Es importante recordar que las aminas acopladas en los complejos **35** y **36**, 1-aminoantraquinona y 1-aminoantraceno respectivamente, son moléculas intercaladoras del ADN, y por lo tanto pueden favorecer la interacción de la quinolona con el material genético. Lo anterior ofrece una explicación de la observación de que los complejos **35** y **36**, presentan las actividades más altas de los productos obtenidos.

Por otra parte, es notable que los complejos **33** y **39** también muestran una actividad antibacteriana importante, a pesar de diferir en su forma de acoplarse con el metal.

Un aspecto de llamar la atención es el decremento de actividad de los complejos **25** y **34**, los cuales contienen como aminas a las sales clorhidrato de anilina y clorhidrato de 9-aminoacridina respectivamente, con respecto a los complejos **24** y **33**, los que integraron la misma amina pero en forma libre.

Vale la pena mencionar que a pesar de que los 17 complejos sintetizados resultaron ser insolubles en los solventes convencionales y tomando en cuenta que en la técnica de Kirby-Bauer las suspensiones preparadas para impregnar los discos tuvieron cada una mucho menos que 0.6mg/mL, es claro que la concentración fue menor que la del ciprofloxacino y a pesar de ello 6 de los complejos sintetizados mostraron un halo de inhibición superior a la quinolona de referencia. También hay que mencionar que para llevar a cabo las pruebas biológicas no se consideró importante incluir un complejo sin la presencia de amina, es decir un complejo de cfx-Bi (III), ya que en experimentos (aun no publicados) es claro que este complejo muestra una actividad muy inferior con respecto a aquellos en los que se incluye una amina en el complejo.

6.2. Estudio cuantitativo de estructura-actividad (QSAR)

Para obtener un estudio QSAR, se requiere de los datos de actividad; en el caso de antibióticos, el requisito es la Actividad Inhibitoria Media (MIC). Desgraciadamente, no es factible obtener ese dato en los complejos descritos en la sección anterior, debido a la insolubilidad que presentan, sin embargo, si es posible hacerlo tomando una base de datos de quinolonas y extrapolar los resultados a los complejos correspondientes. En base a esto se tomó como base de datos el reporte de una serie de 6,8-difluoro-7-pirrolidinil quinolonas (figura 15, Domagala, 1986). Se decidió usar los datos de MIC contra cepa *S.aureus* H228, ya que presenta una baja efectividad frente a ciprofloxacino (ver tablas 3 y 4) y se consideró de mayor importancia encontrar nuevas moléculas activas contra cepas resistentes. El inconveniente es que la cepa *S.aureus* H228 no fue usada para las pruebas de susceptibilidad ya que no se logró conseguir.

Se debe tomar en cuenta que entre las moléculas que integran la serie de compuestos se presentan diferencias estructurales poco convenientes para un QSAR tradicional, sin embargo, no se dispuso de datos de concentraciones mínimas inhibitorias de compuestos que guardaran una similitud más adecuada para este estudio.

El análisis se llevó a cabo mediante inteligencia artificial utilizando algoritmos genéticos y tomando en cuenta 1300 descriptores moleculares obtenidos mediante quimioinformática. El resultado fue una ecuación matemática (ecuación 1) que correlaciona la actividad mínima inhibitoria con tres descriptores cuyos valores se muestran en la tabla 3.

Tabla 8. Compuestos de serie de exploración, concentración mínima inhibitoria (CMI) µg/mL contra la cepa H228 de *S. aureus* (Domagala, 1986) y valores de los descriptores del modelo elegido.

Compuesto	<i>S. aureus</i> H228	GATS2e	RDF010v	RDF030p
3	0.8	0.688	1.455	5.525
4	3.1	0.676	1.6	5.21
9	1.6	0.675	1.358	4.982
10	0.2	0.727	1.449	6.445
11	1.6	0.775	1.508	4.447
12	0.4	0.813	1.423	5.49
13	1.6	0.841	0.946	3.221
14	100	0.551	1.276	1.835
15	1.6	0.631	1.767	6.228
16	0.8	0.675	1.761	7.048
17	0.2	0.661	1.91	7.763
18	0.1	0.623	1.658	7.702
19	0.2	0.654	1.654	7.133
20	0.1	0.64	1.802	8.297

En donde:

GATS2e. - Geary autocorrelation-lag 2/weighted by atomic Sanderson electronegativities.

RDF010v. - Radial Distribution Funcion-1.0/weighted by atomic van der Waals volumes.

RDF030p. - Radial Distribution Funcion-3.0/weighted by atomic polarizabilities.

El primero se clasifica como un descriptor 2D y están involucradas las electronegatividades de los grupos participantes y los otros dos se clasifican como descriptores RDF e involucran radios de van der Waals y polarizabilidad, ambos directamente relacionados con la inhibición enzimática como se esperaría en la inhibición de la girasa.

El modelo se presenta en la ecuación 1:

Ecuación 1

$$-\log(1/\text{CMI}) = -2.223 (0.71) \text{ GATS2e} + 1.499 (0.37) \text{ RDF030p} - 0.564 (0.046) \text{ RDF010v} + 2.399 (0.78)$$

$$R^2 = 0.96804661, s = 0.15902897, F = 100.985295$$

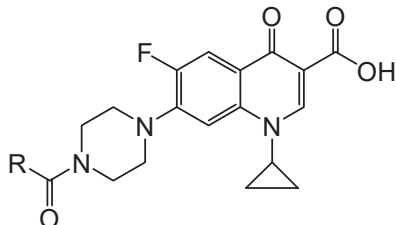
Como puede apreciarse, la validación estadística es aceptable al contar con R^2 cercana a 1. Asimismo, t a F es elevada y descarta que la alta correlación sea producto de la casualidad. Los datos de actividad calculada vs experimental se muestran en la tabla 4.

Tabla 9. Comparación de actividad calculada contra experimental de los compuestos de la serie de exploración.

Compuesto	Y experimental	Y calculada
3	-0.097	-0.067
4	-0.699	-0.682
9	0.204	0.123
10	0.491	0.355
11	0.204	0.427
12	-0.398	-0.373
13	0.204	0.13
14	2	2.052
15	0.204	0.13
16	-0.097	-0.439
17	-0.699	-0.588
18	-1	-0.846
19	-0.699	-0.6
20	-1	-1.004

Una validación final y contundente de una ecuación QSAR es medir la capacidad de predicción del modelo mediante la síntesis y obtención de la actividad experimental de quinolonas no consideradas en el modelo; mejor aún si estas no han sido descritas. De esta forma, se predijo la MIC de una serie de fluoroquinolonas contra la cepa H228 de *S.aureus* cuyas estructuras se muestran en la tabla 5.

Tabla 10. CMI calculada por medio de QSAR de fluoroquinolonas. Los productos sintetizados se exponen en negritas.



No.	R	CMI calculada	No.	R	CMI calculada
21	CH₃O-	1.281	48		0.736
22	CH₃CH₂O-	1.76	49		8.941
23	(CH₃)₂CHCH₂O-	14.098	50		0.002
41	(CH ₃)CO-	0.3999			
42	n-Butil	1.219	51		1.657X10 ⁻⁴
43	HN-	1.639	52		0.053
44	CH ₃ NH-	0.667	53		1.479 X 10 ⁻⁴
45		1.53	54		0.159
46		0.789	55		0.205
47		0.421	56		0.013

Se decidió explorar la actividad de los compuestos **21**, **22** y **23** y así validar finalmente el model QSAR. La elección se realizó tomando en cuenta su alta actividad predicha y la simplicidad de su síntesis.

La obtención de los compuestos fue a partir del ciprofloxacino y el carbamato de alquilo correspondiente, como se detalla en la sección experimental de esta tesis.

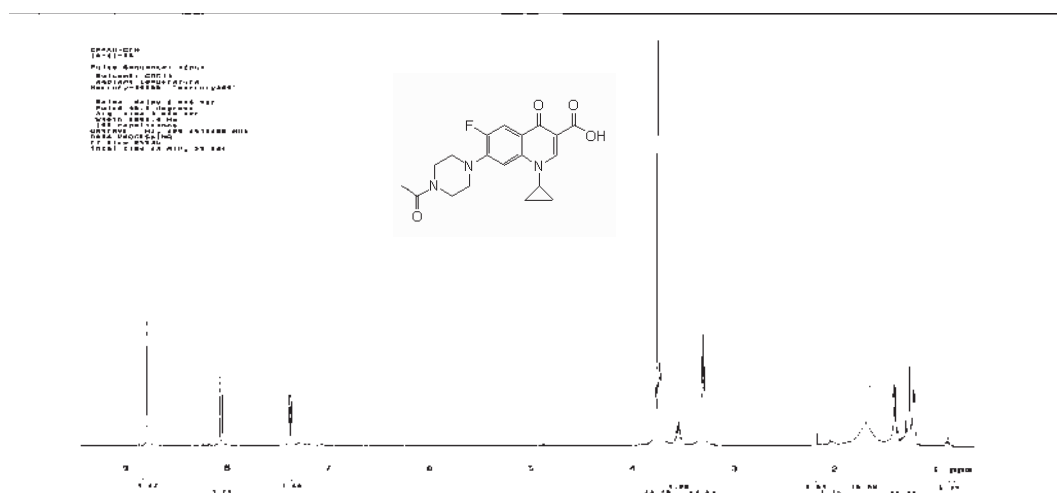


Figura 21. Espectro de RMN H del compuesto 21.

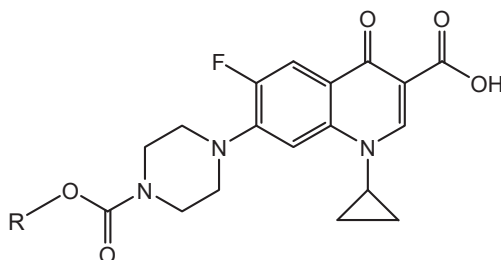
La caracterización del producto **21** se llevo a cabo basándose principalmente en su espectroscopia de RMN ^1H , el cual al compararlo con el espectro de cfx se aprecia un desplazamiento de las dos señales triples características del grupo piperazinil (originalmente en 2.5 y 2.9 ppm) que se desplazan a 3.3 y 3.7 ppm respectivamente, también se aprecia un singulete en 3.8 ppm, que sugiere la presencia del grupo metoxilo.

La caracterización de los compuestos **22** y **23** se definió de manera similar y los correspondientes espectros de RMN ^1H se presentan en los anexos.

6.3. Susceptibilidad antimicrobiana de los carbamatos obtenidos.

Los resultados de actividad antibacteriana se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 11. Actividad antimicrobiana de los carbamatos sintetizados comparada con la del ciprofloxacino.



No.	R	Halo de inhibición (mm) <i>P. aeruginosa</i>	Halo de inhibición (mm) <i>S. aureus</i>	Halo de inhibición (mm) <i>E. coli</i>
4 Cfx		30	20	35
21	CH ₃ -	9	25	29
22	CH ₃ CH ₂ -	25	21	30
23	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ -	-	20	22

No obstante que la cepa probada no corresponde a la descrita en la base de datos, sí es interesante que se mantenga una relación entre la actividad esperada y relativa al ciprofloxacino, es decir la actividad predicha para el derivado isobutilo se aleja negativamente a la del Cfx, mientras que la del derivado de etilo la supera.

A pesar de que la ecuación no arrojó ningún dato que permitiera correlacionar la capacidad quelatante de las quinolonas hacia el bismuto y apoyara los datos del análisis de Relación Estructura Actividad, si queda claro que el modelo tiene capacidad predictiva y que puede utilizarse para diseñar estructuras novedosas reduciendo costos de síntesis, de trabajo-hombre,

ecológicos y sobre todo de tiempo, pues es urgente la obtención de nuevos antibióticos que permitan combatir cepas multirresistentes.

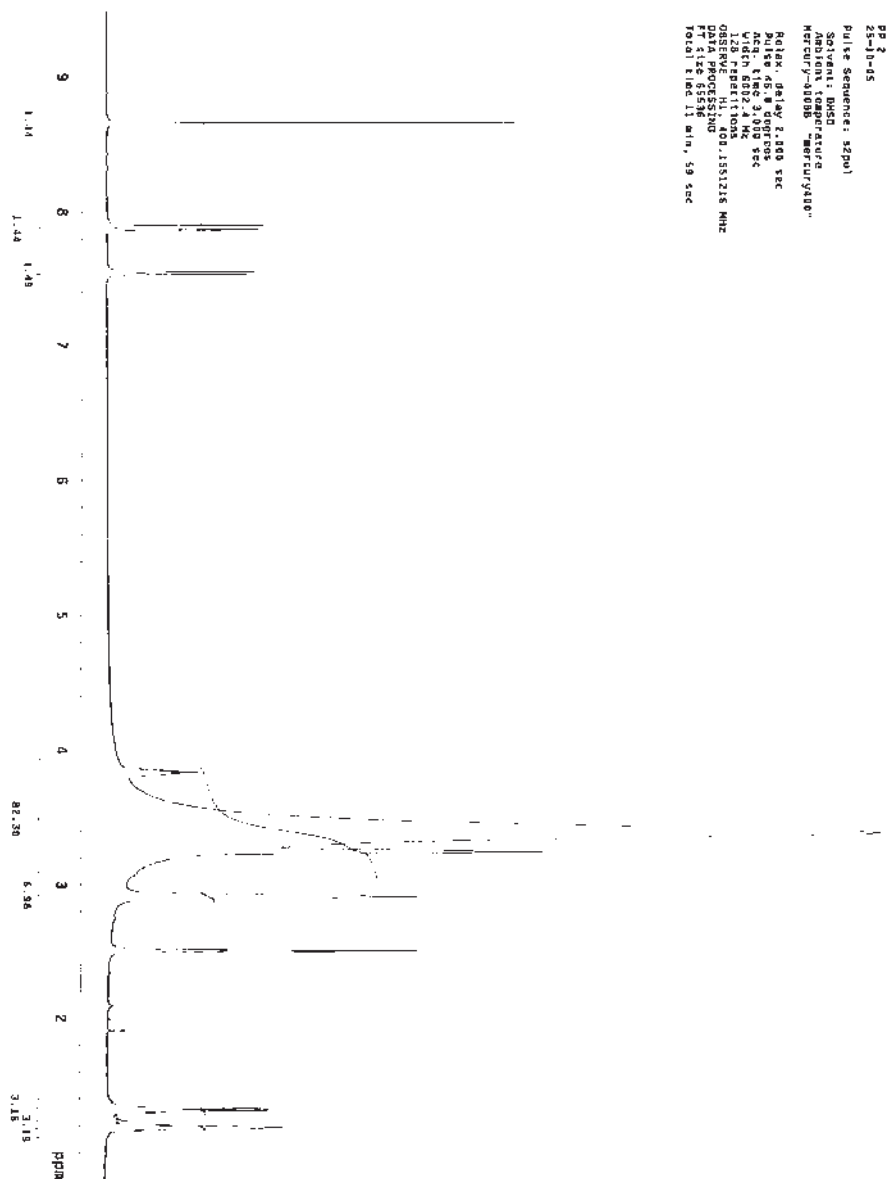
7. CONCLUSIONES

1. La actividad biológica de los complejos de Ciprofloxacino-Bi(III)-YNH_n varia dependiendo de la amina acomplejada. Se observó que sí existe una relación entre la estructura de la amina y la actividad del complejo y aunque la estructura de este último no ha sido determinada inequívocamente, es posible correlacionar los datos de IR con la actividad.
2. El modelo QSAR obtenido no muestra relación entre la capacidad quelatante del Cfx con el Bismuto pero se cuenta con la metodología para obtener más modelos y buscar la relación deseada.
3. El modelo QSAR obtenido tiene alta capacidad predictiva y puede ser utilizado en el diseño de nuevas estructuras con potencial actividad antibacteriana.
4. Puesto que se sabe que la piperazina está relacionada con la inhibición de la girasa, se puede deducir que los cambios propuestos en la posición 4' también lo estarán. Así, los carbamatos derivados muestran un alto potencial de nuevos derivados de fluoroquinolonas.

8. ANEXOS

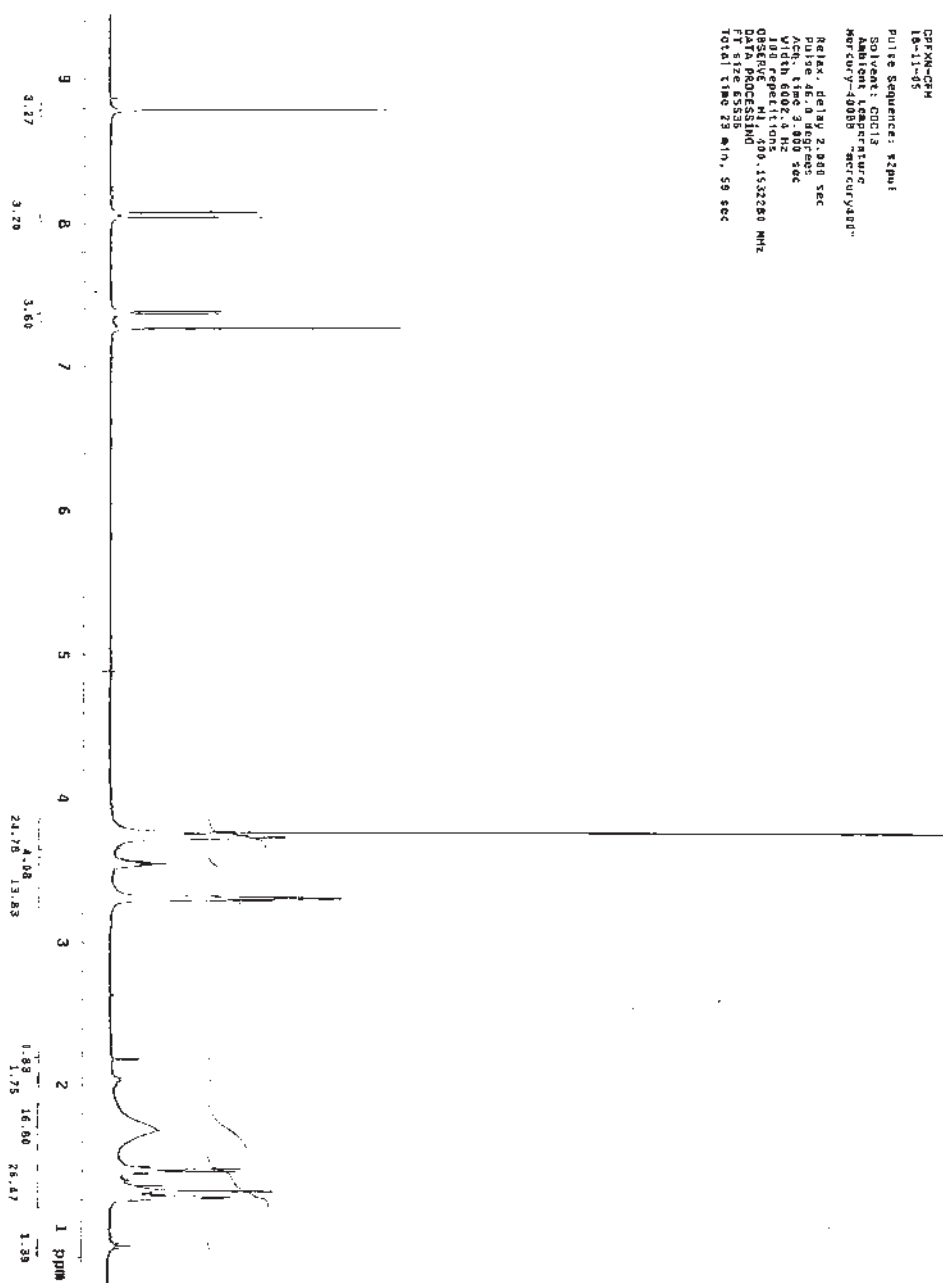
8.1. Espectroscopias

8.1.1. Espectroscopias de RMN H



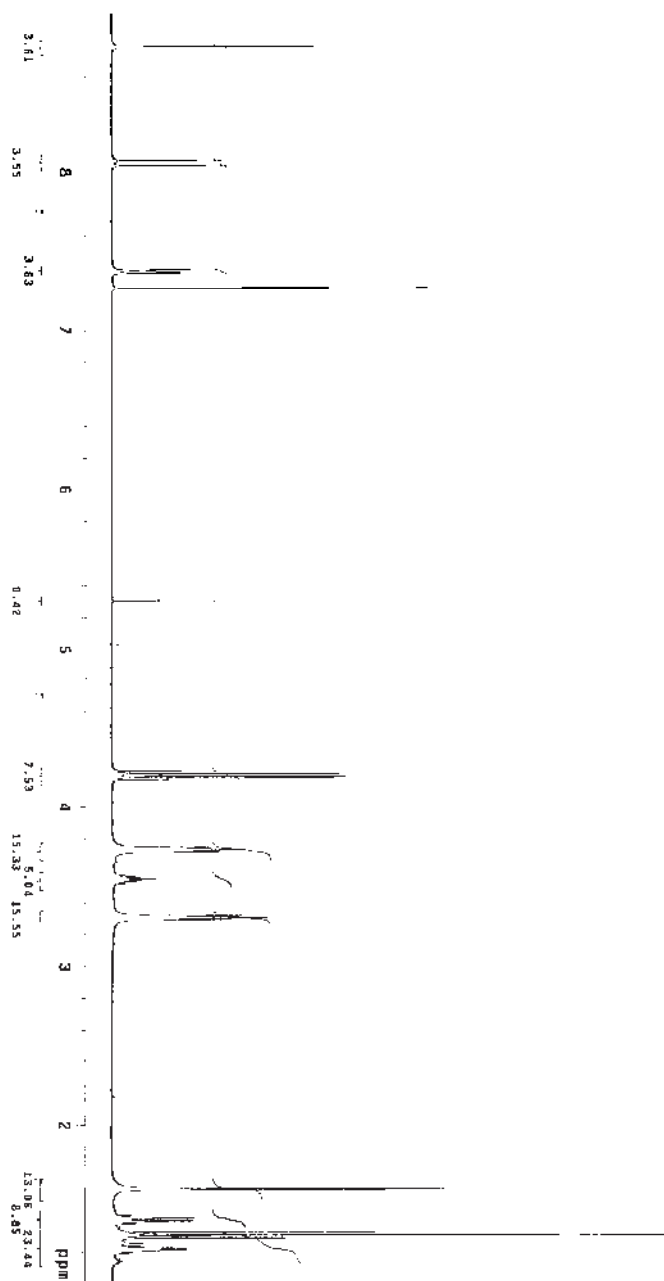
Compuesto 4 (Ciprofloxacino)

CPMX-CPH
 18-11-05
 Pulse Sequence: zgpg3
 Solvent: CDCl3
 Ambient Temperature
 Mercury-100MR "mercury400"
 Relax delay 2.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 3.000 sec
 Width 6002.5 Hz
 FID 11.00000000
 OBSERVE F1 500.132660 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 23 min, 58 sec



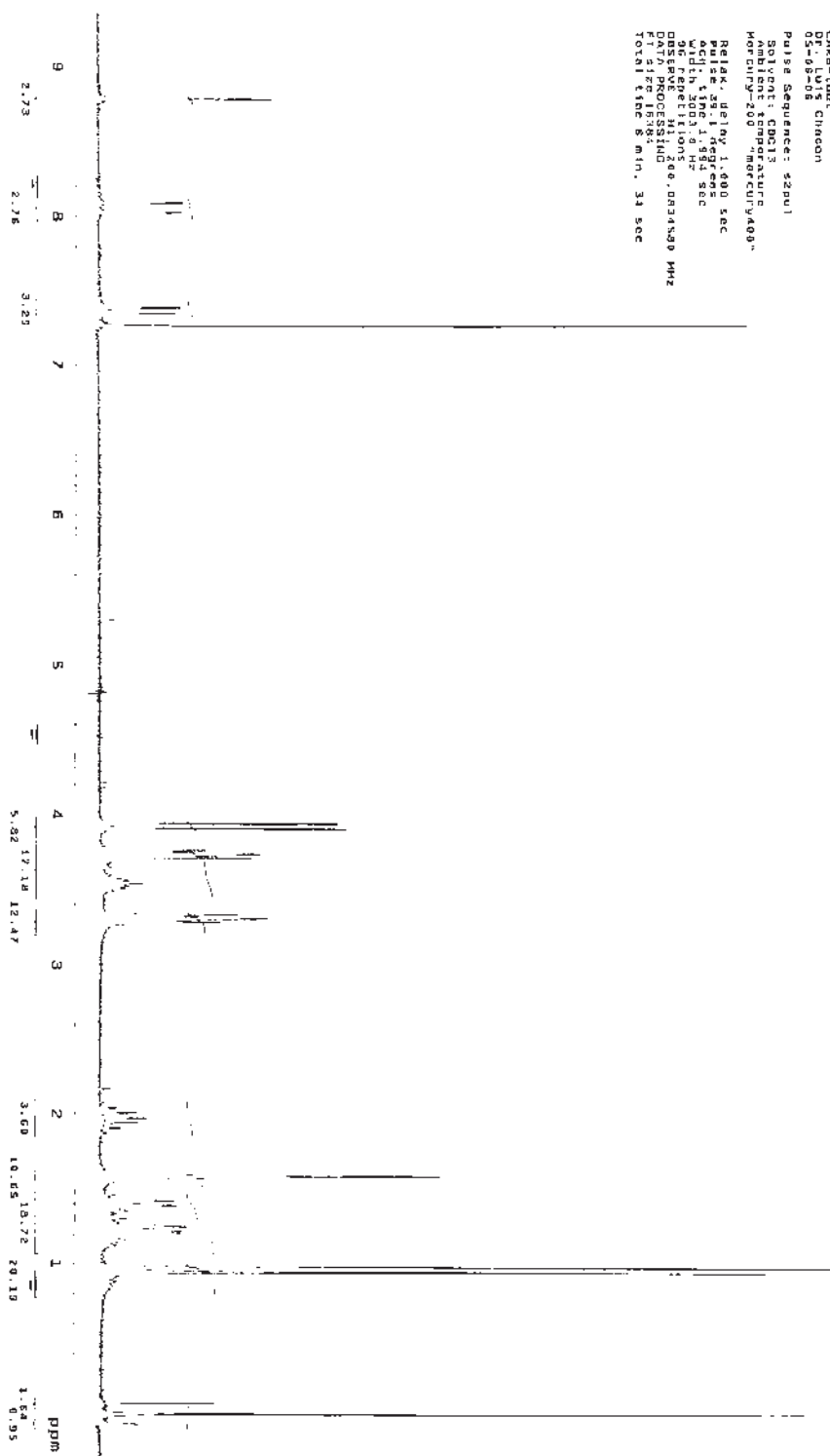
Compuesto 21

CPKCODEX
 18-03-06
 Pulso Sequence: zgpg1
 Solvent: CDCl3
 Acquisition: 1000000000
 File: M-CPKCODEX
 Mercury-40066 "Mercury200"
 Relax: delay 1.000 sec
 Acq: 16.1300000000
 Acq: 16.1300000000
 Width 5980.8 Hz sec
 44 repetitions
 0.05500000000.1502000 MHz
 0.05500000000.1502000 MHz
 FT size 65536
 Total time 11 min, 22 sec



Compuesto 22

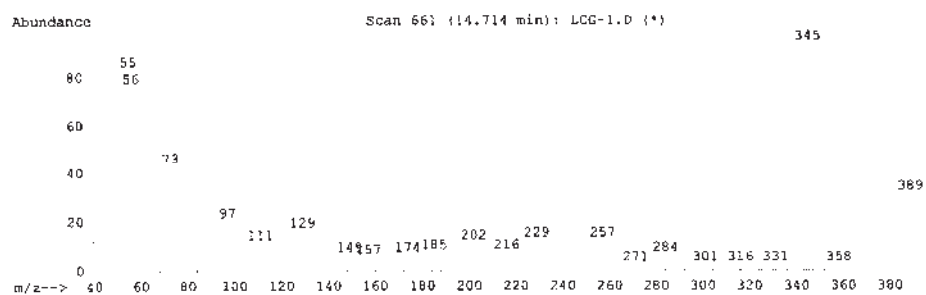
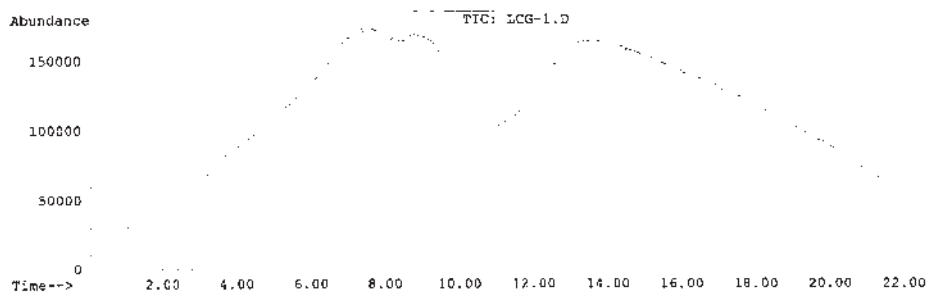
C:\MSD\1015
 DT: LUIS Chacon
 05-06-08
 Pulse Sequence: zgpg30
 Solvent: CDCl3
 Ambient Temperature
 H₂O: 200 MHz
 Relax, delay 1.000 sec
 Pulse, 90.1 degrees
 Width, 1003.4512 sec
 30 Repetitions
 Data Acquisition: 0.03359 MHz
 Data Processing:
 F1: 400.150 MHz
 Total time 8 min. 34 sec



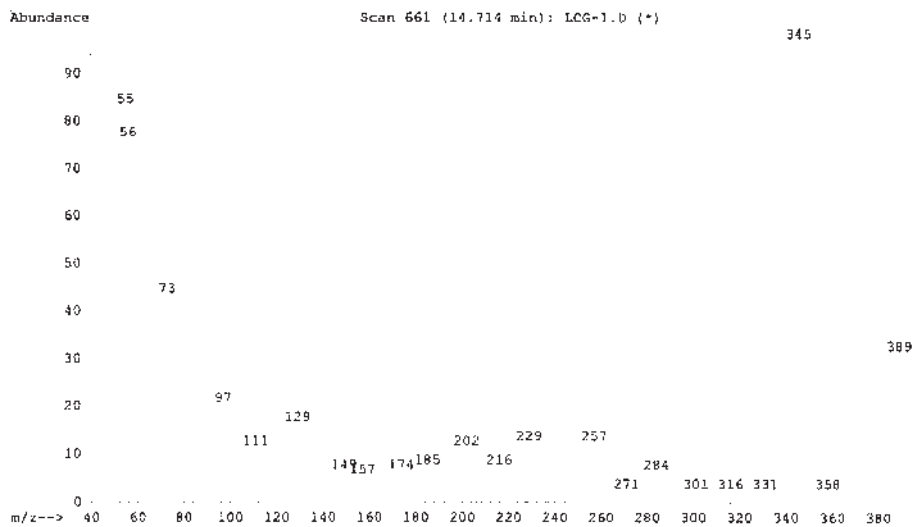
Compuesto 23

8.1.2. Espectroscopía de Masas

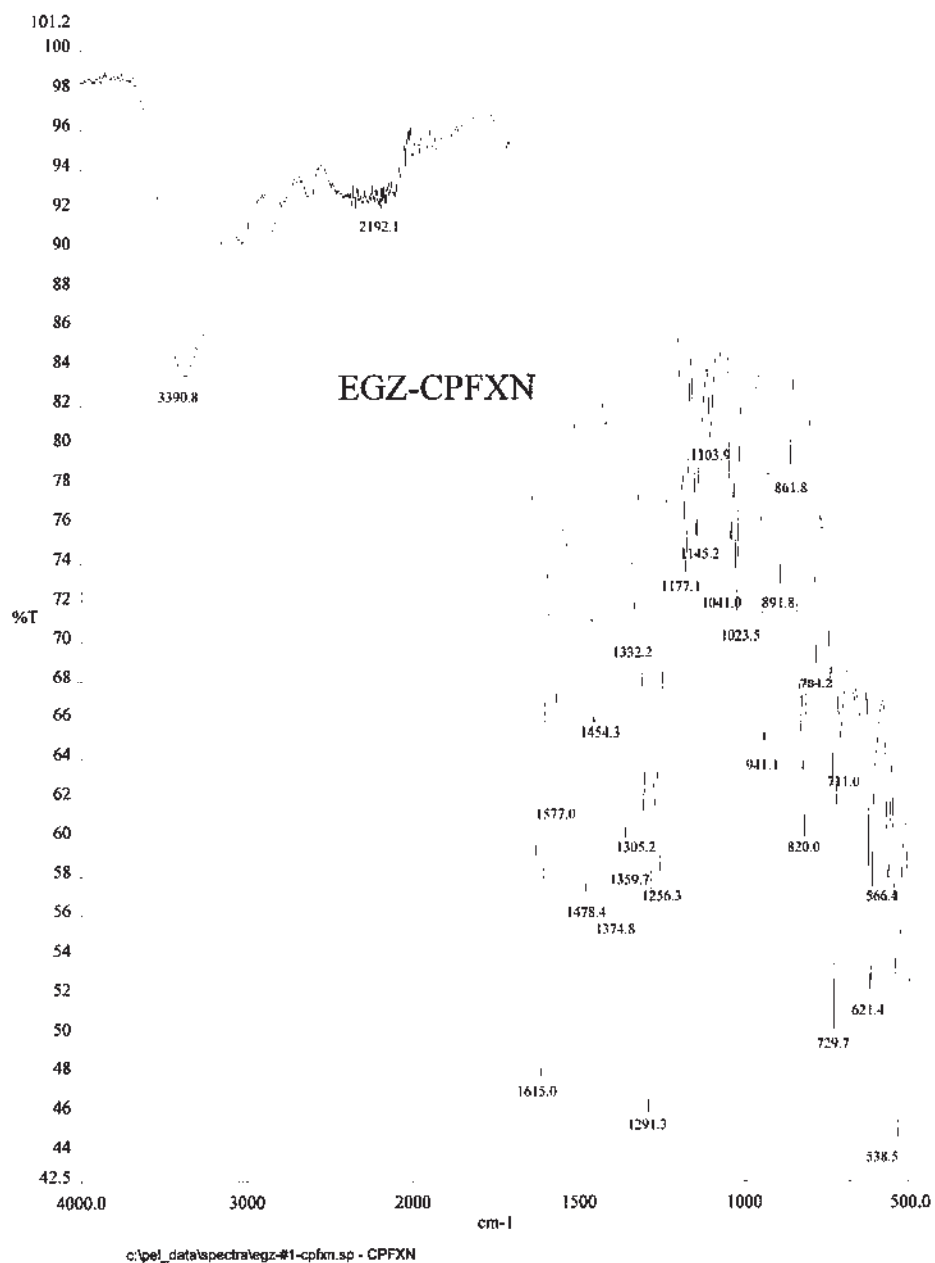
File : C:\HPCHEM\2\DATA\LCG-1.D
Operator : J. L. Salvador.
Acquired : 10 Feb 1996 10:21 am using AcqMethod DIP-1
Instrument : 5989 - MA
Sample Name: CPPXN-CFM.
Misc Info :
Vial Number: 1



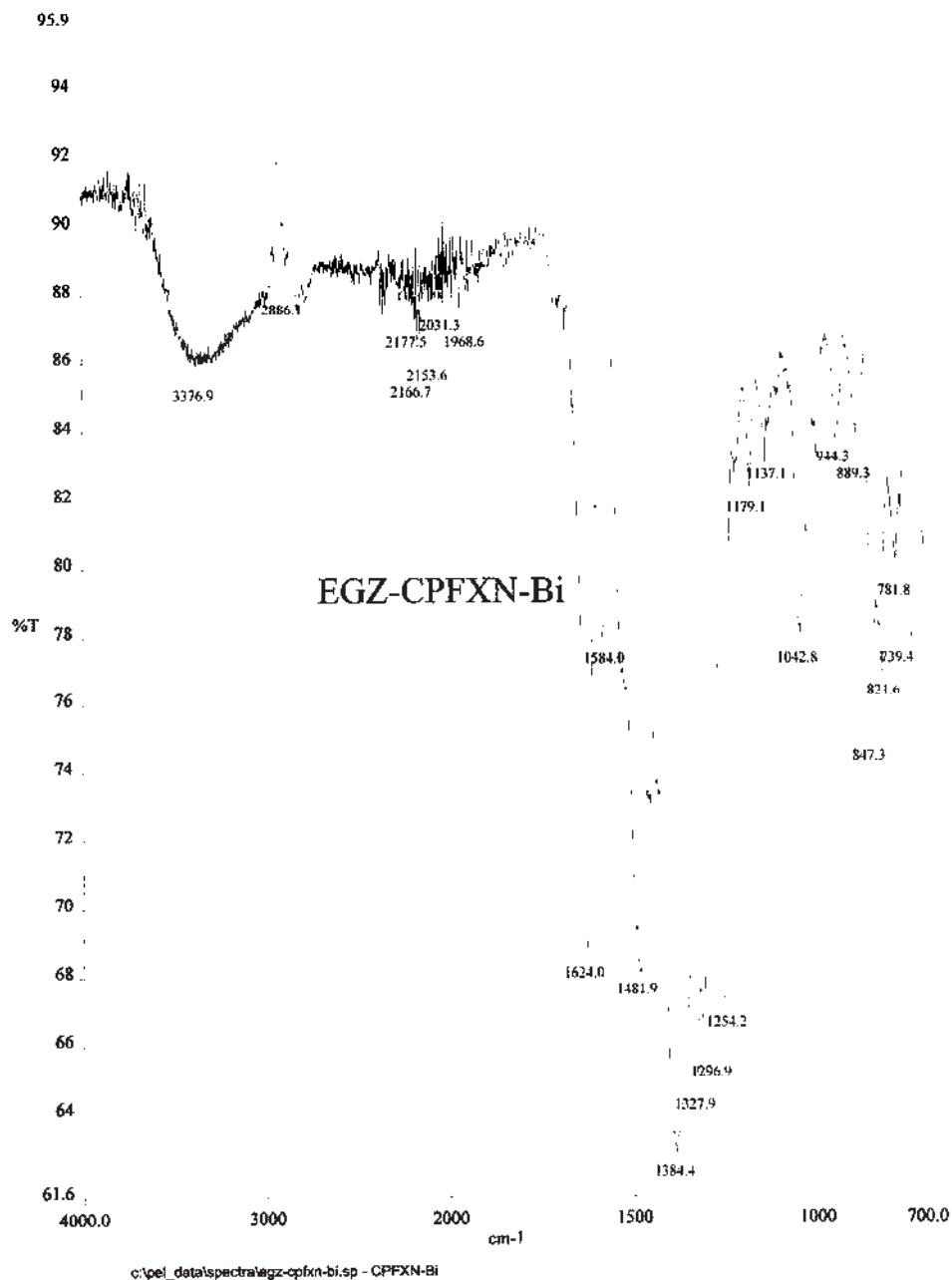
File : C:\HPCHEM\2\DATA\LCG-1.D
Operator : J. L. Salvador.
Acquired : 10 Feb 1996 10:21 am using AcqMethod DIP-1
Instrument : 5989 - MA
Sample Name: CPPXN-CFM.
Misc Info :
Vial Number: 1



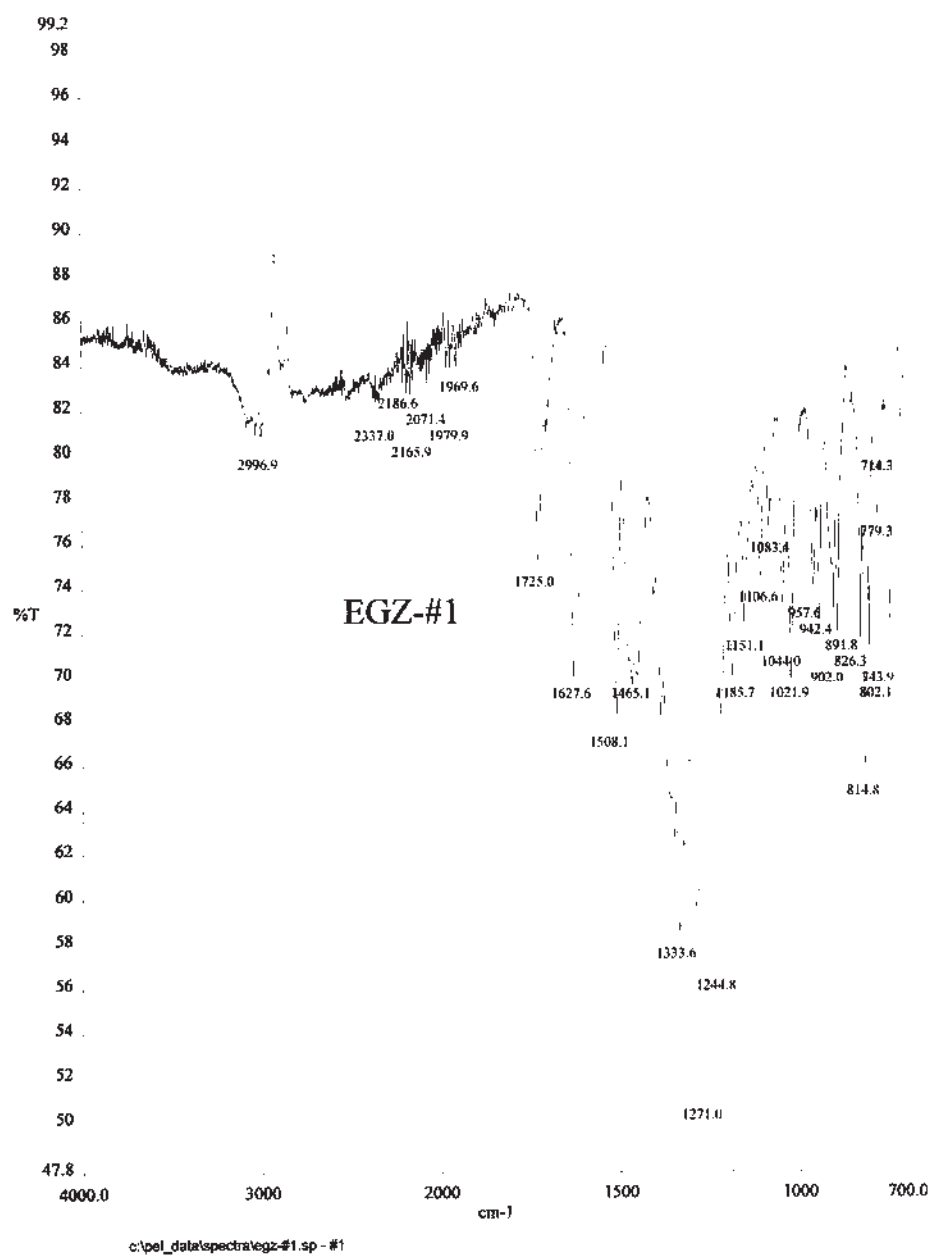
8.1.3. Espectroscopias de Infrarrojo

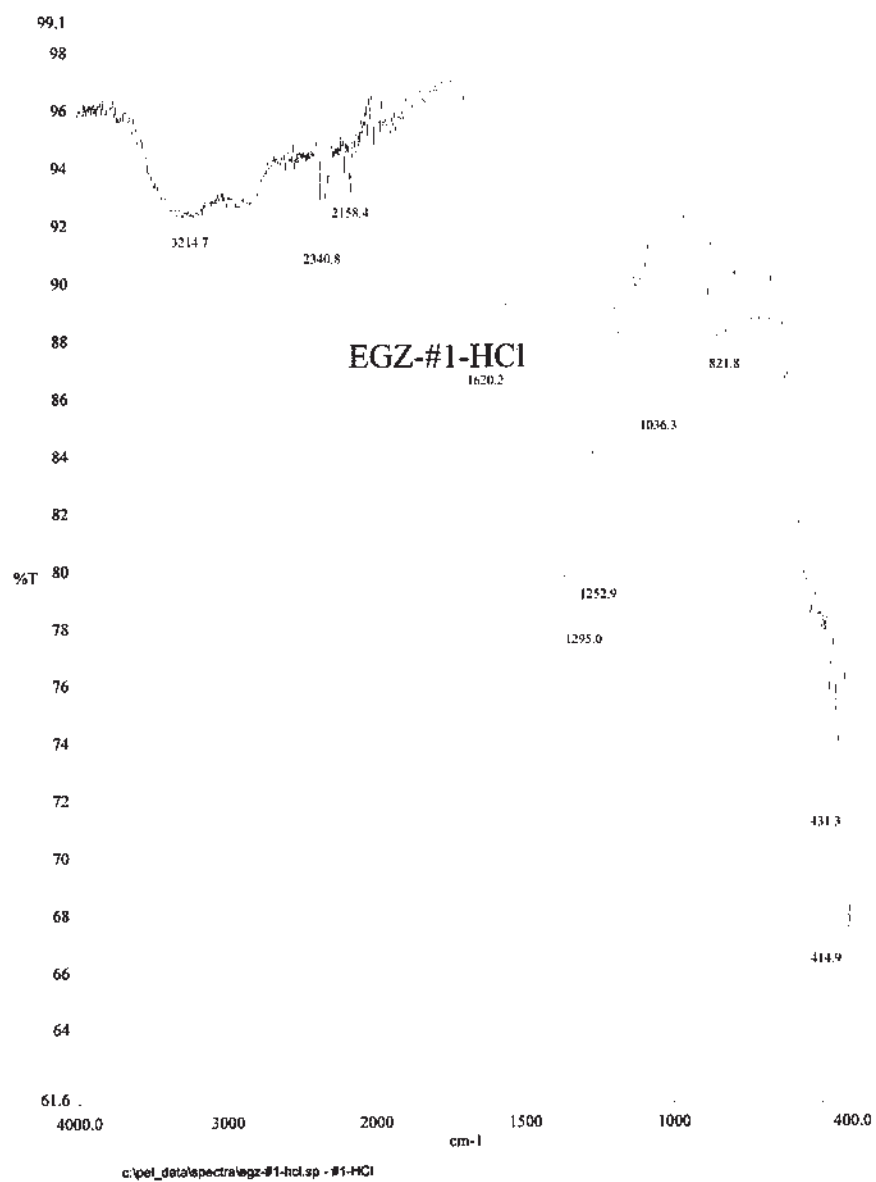


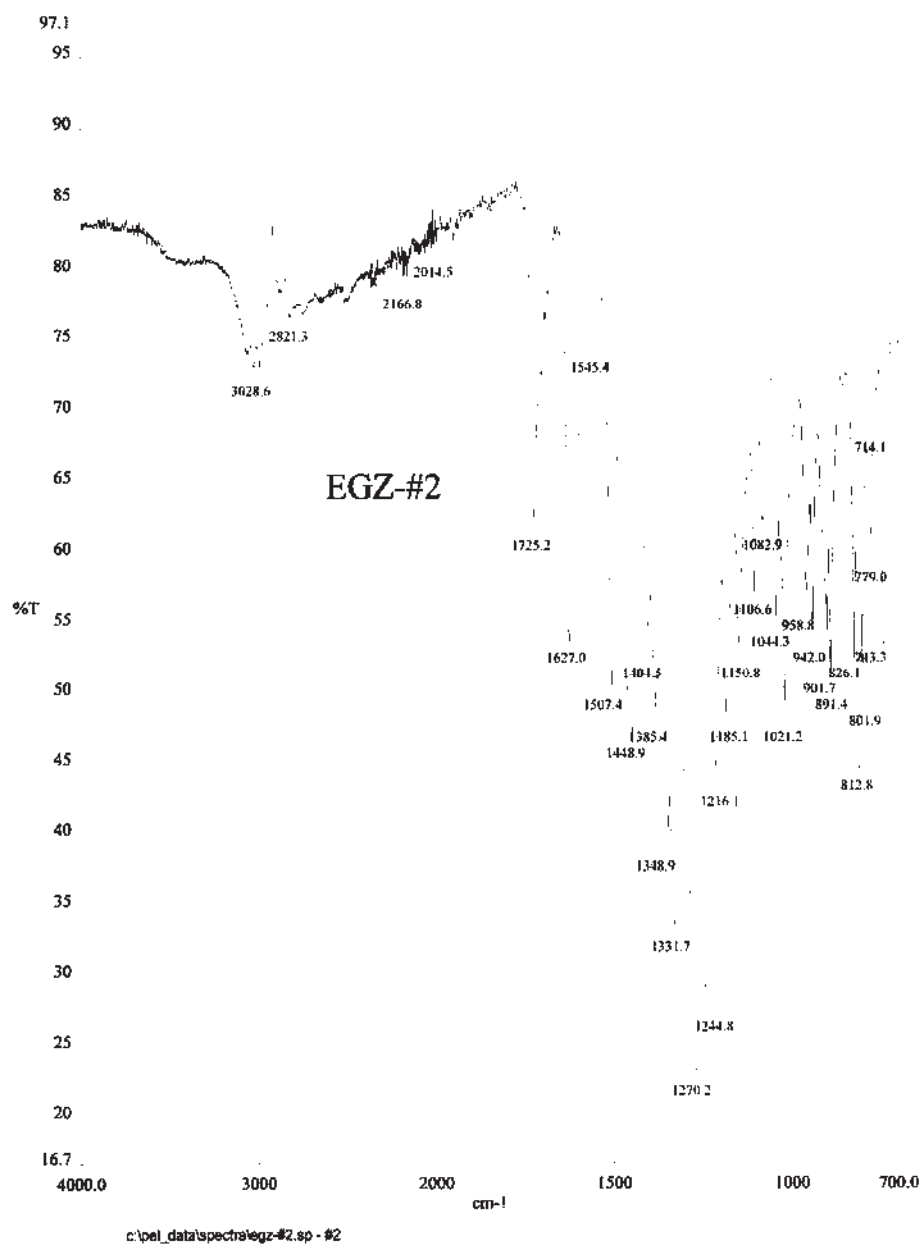
Compuesto 4 (Ciprofloxacino)

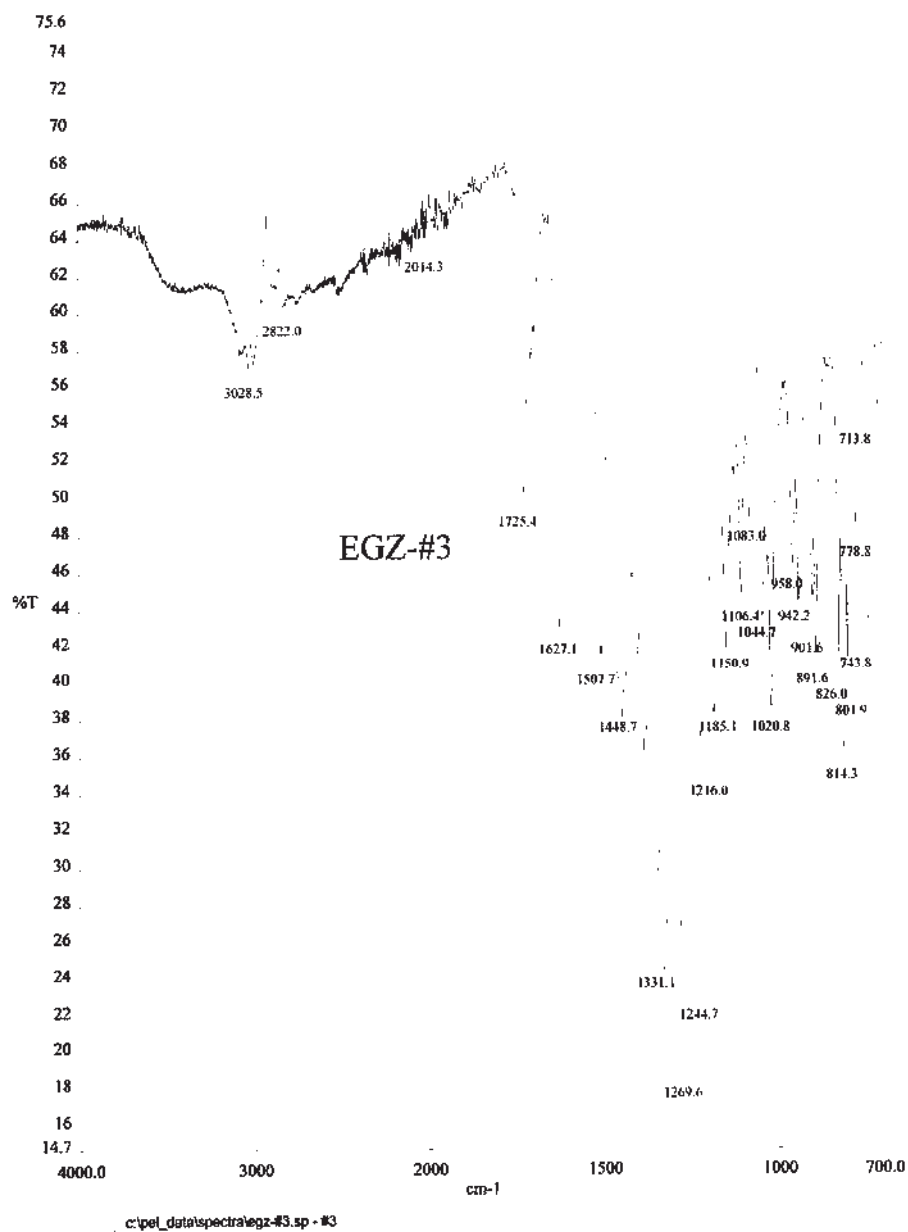


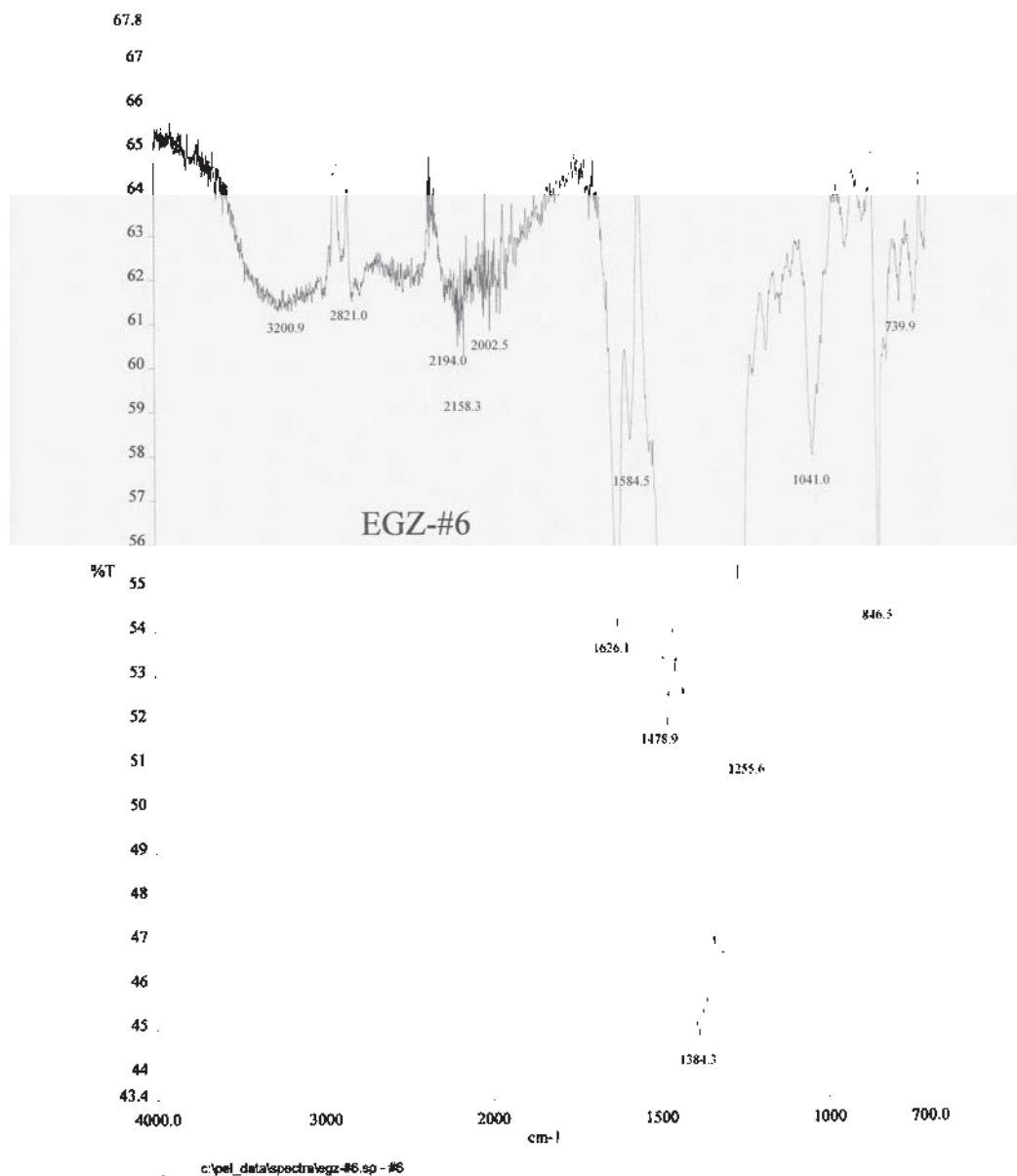
Complejo de Ciprofloxacino-Bi(III)



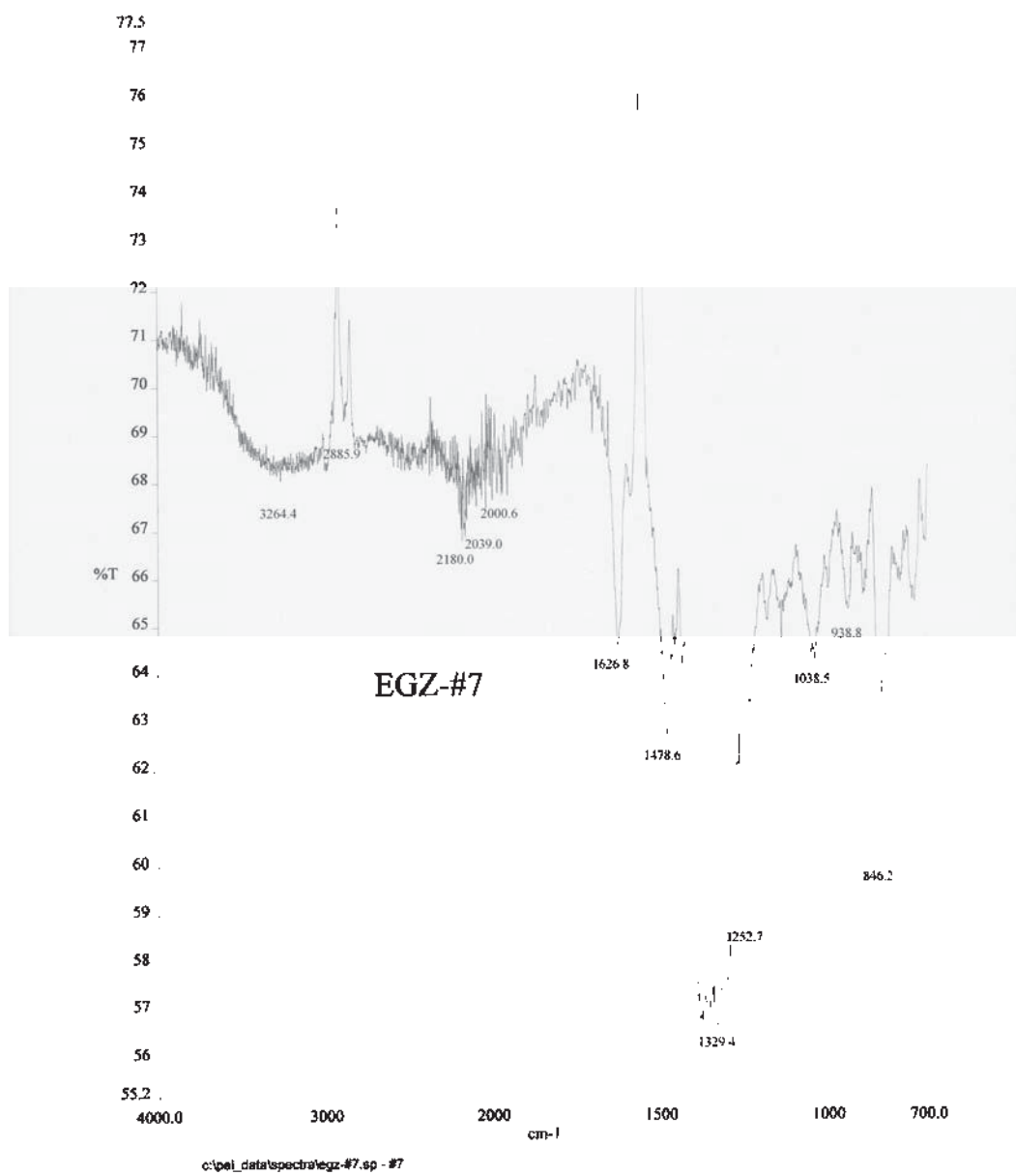




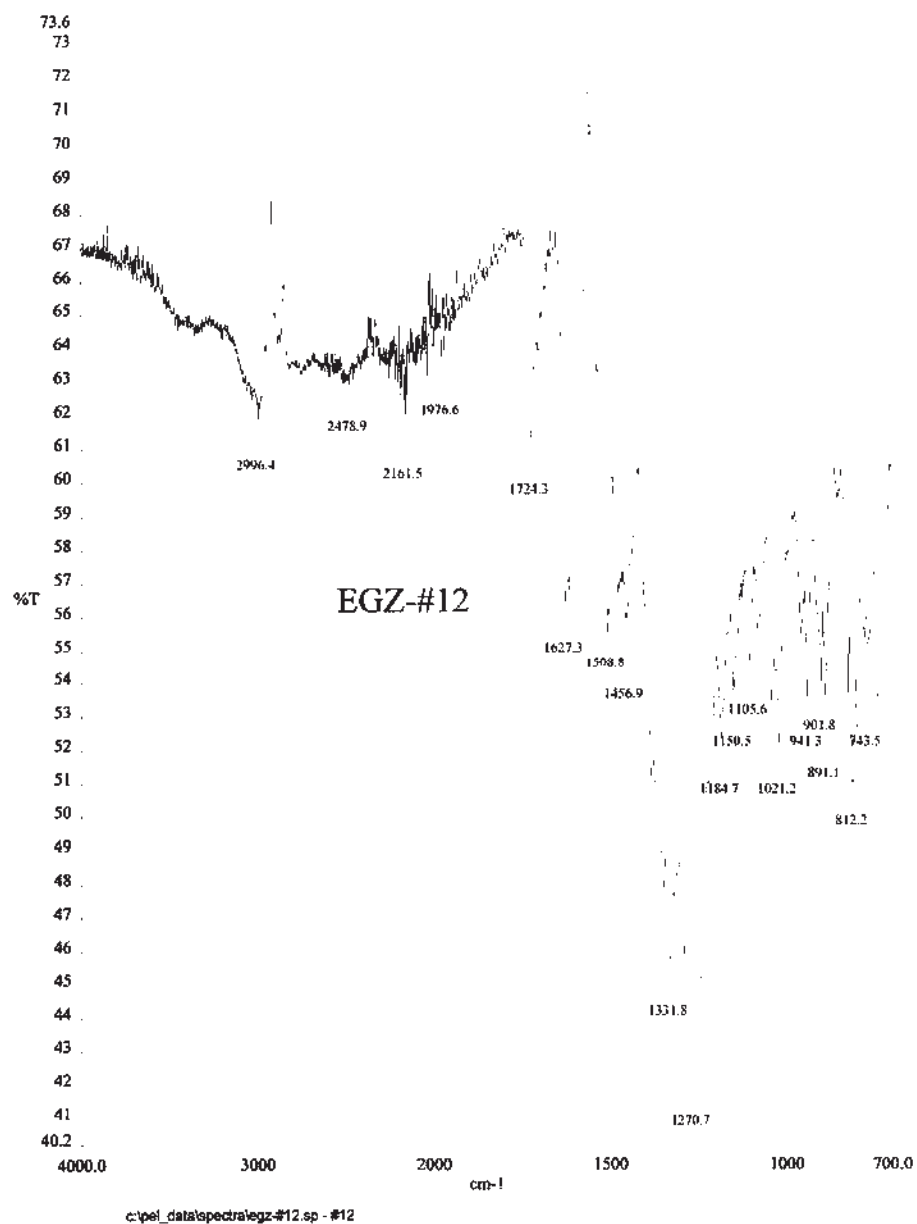


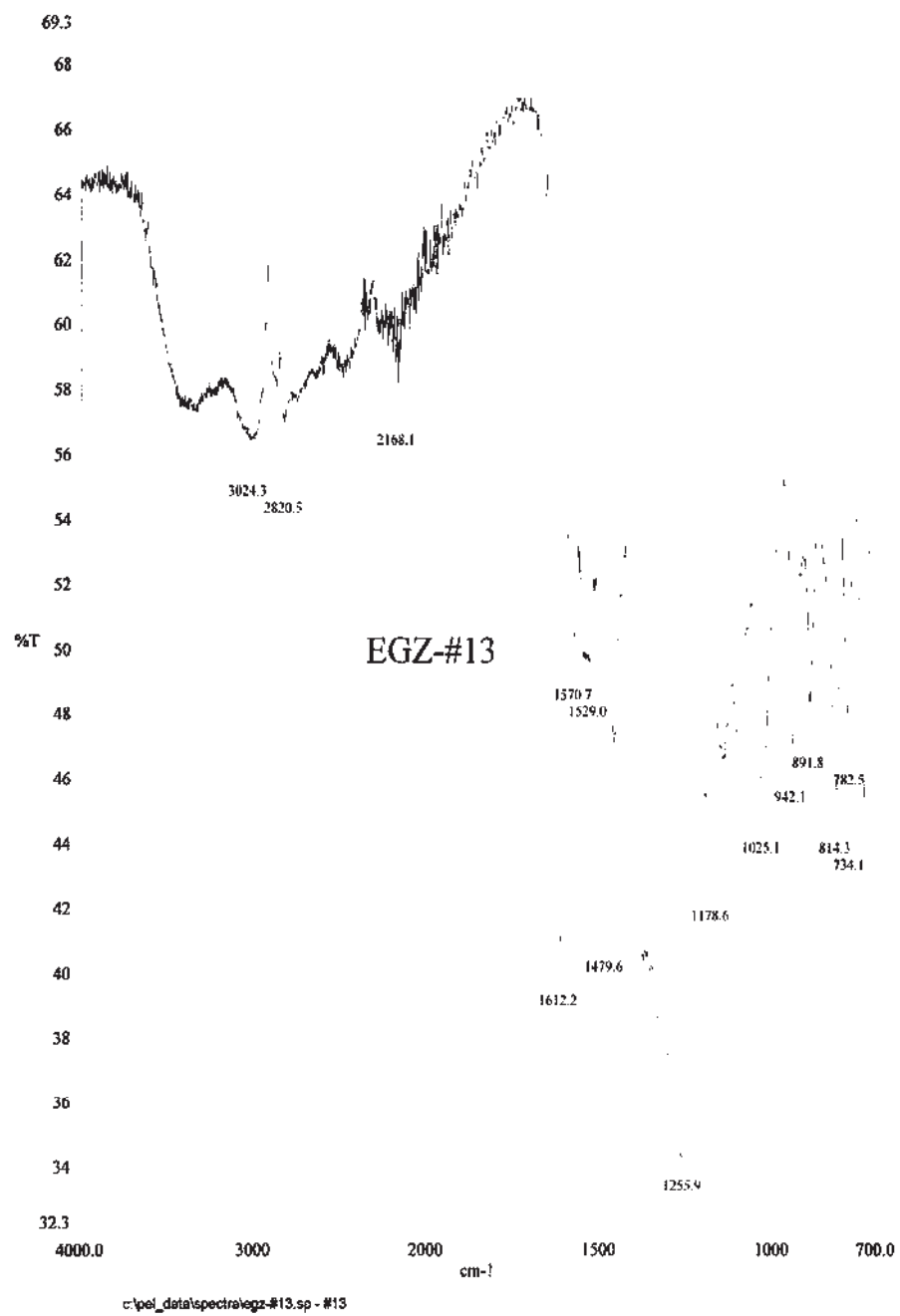


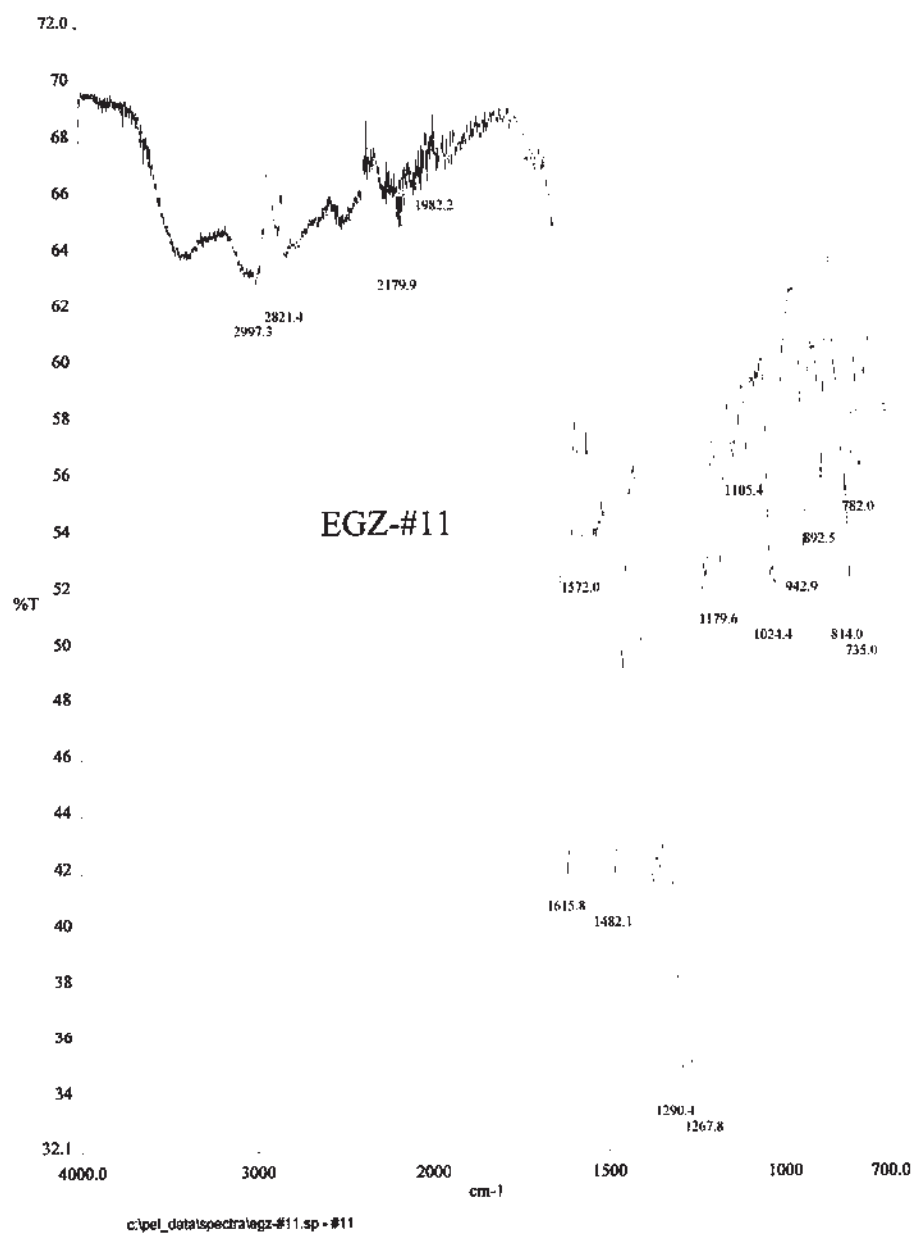
Complejo 29

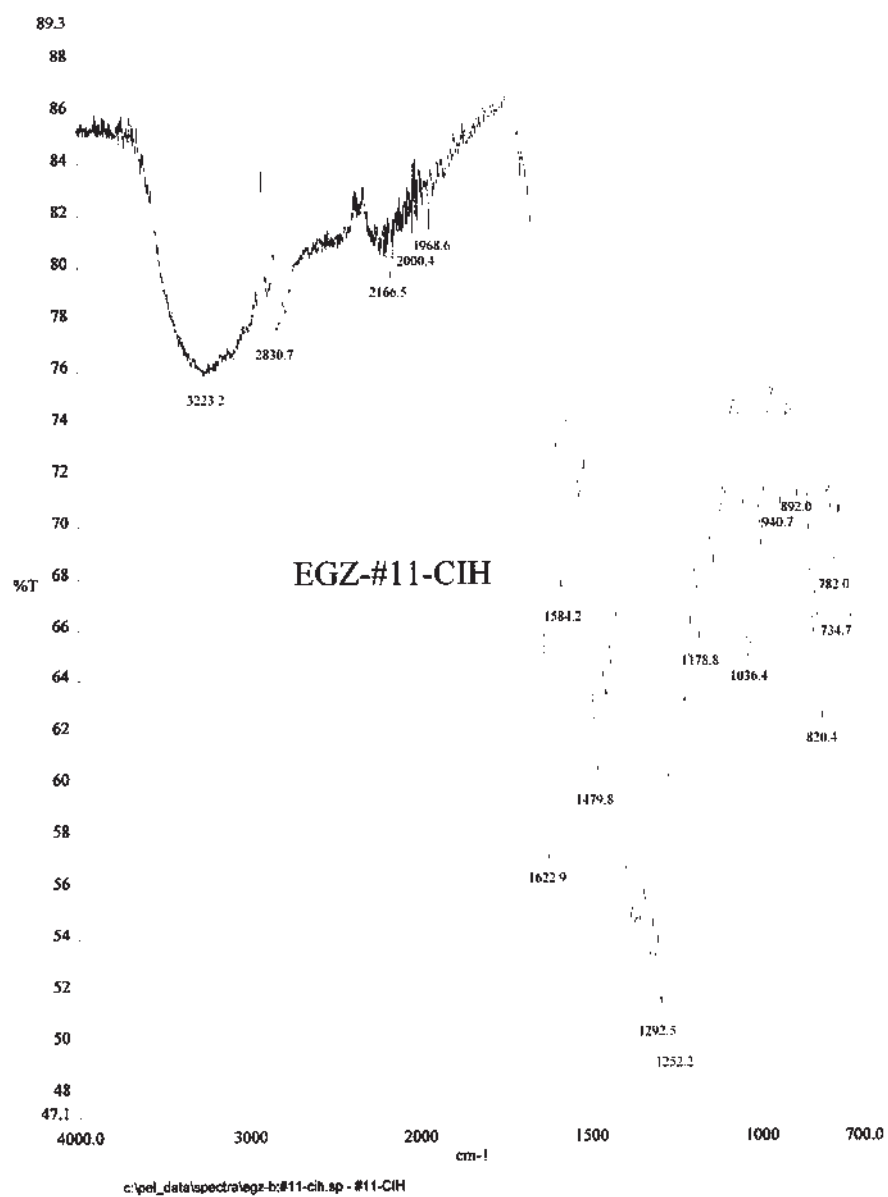


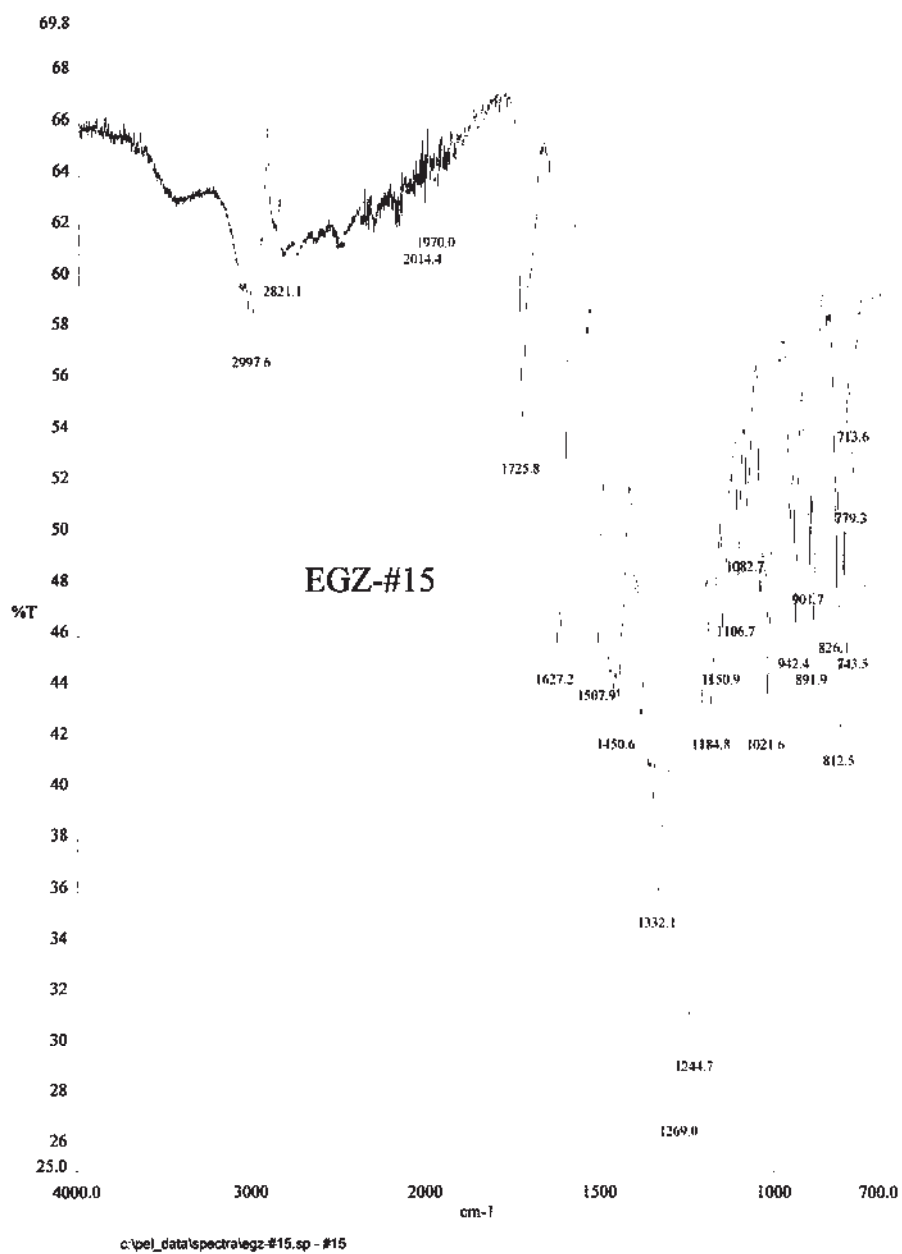
Complejo 30

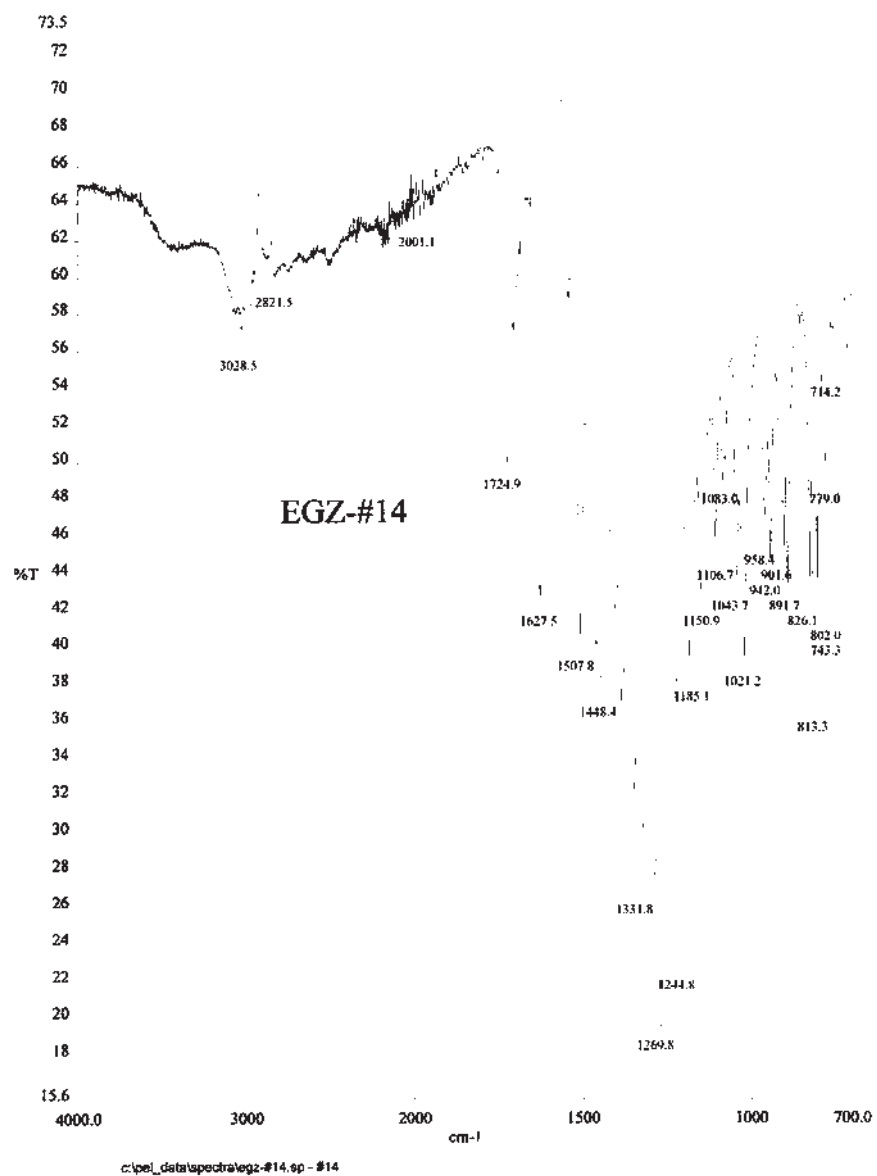




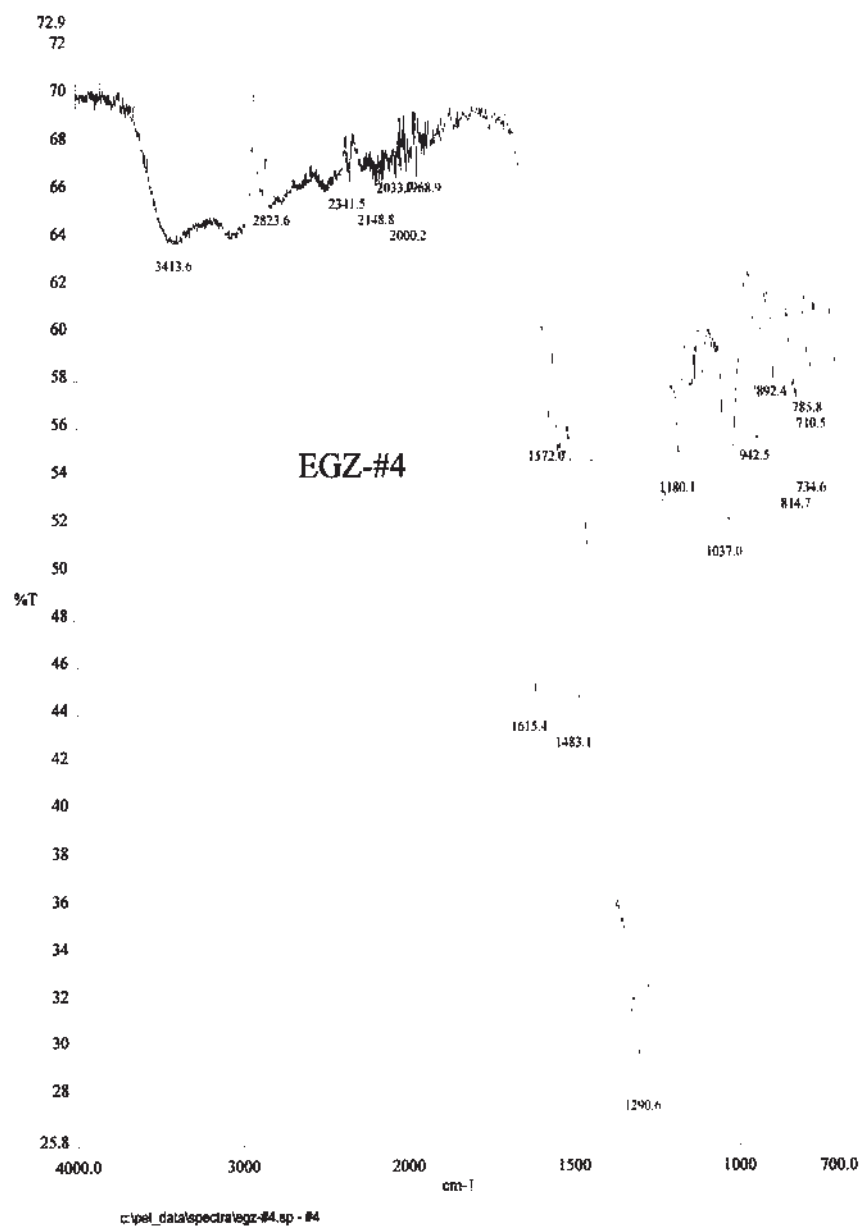


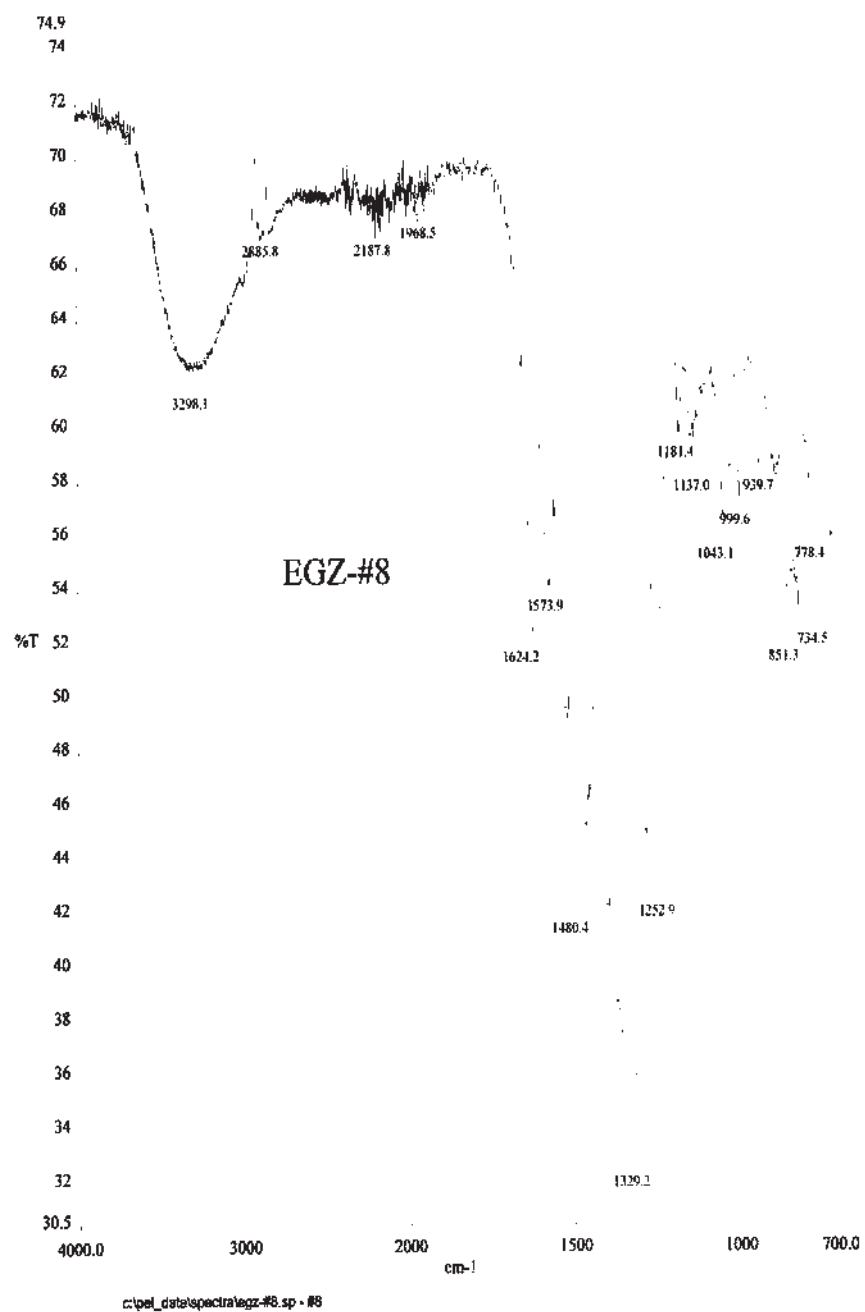


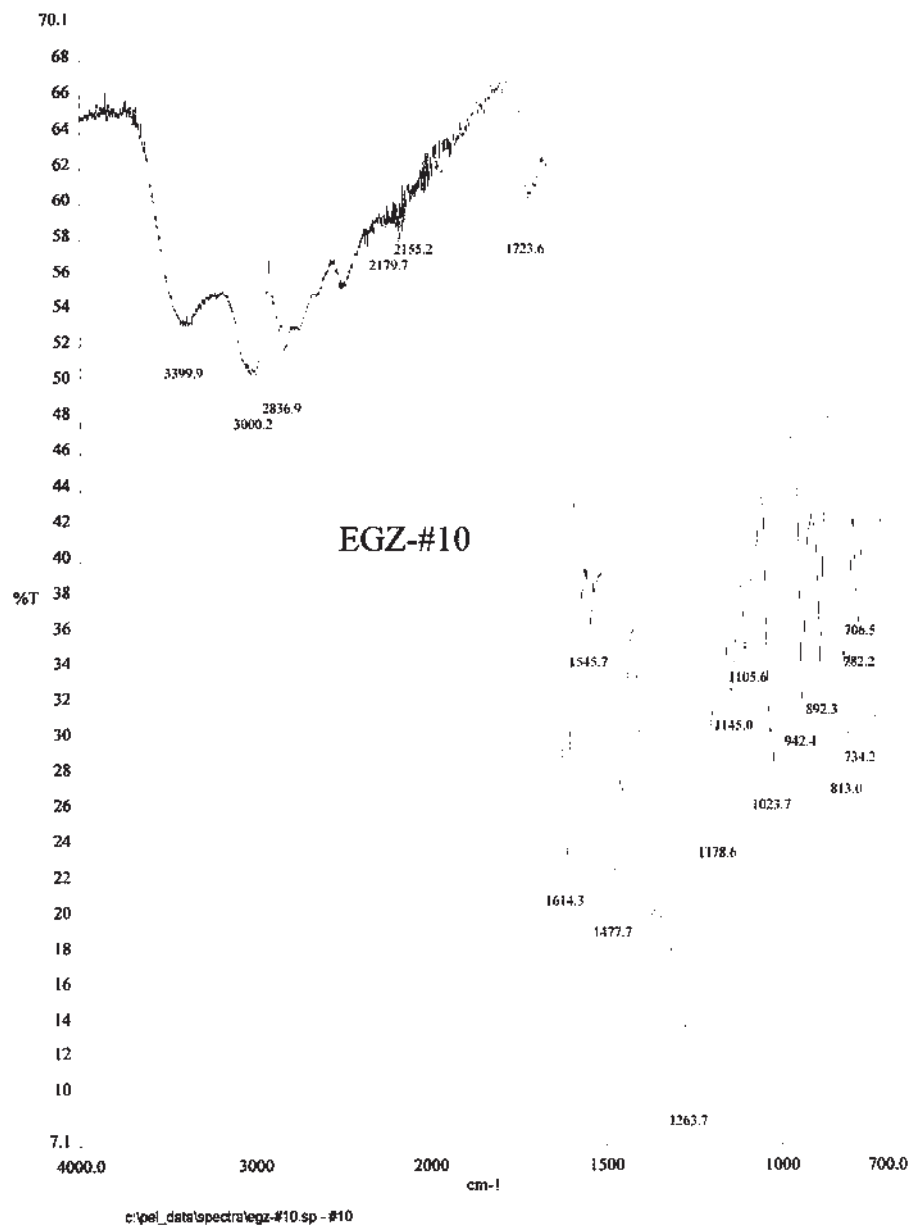


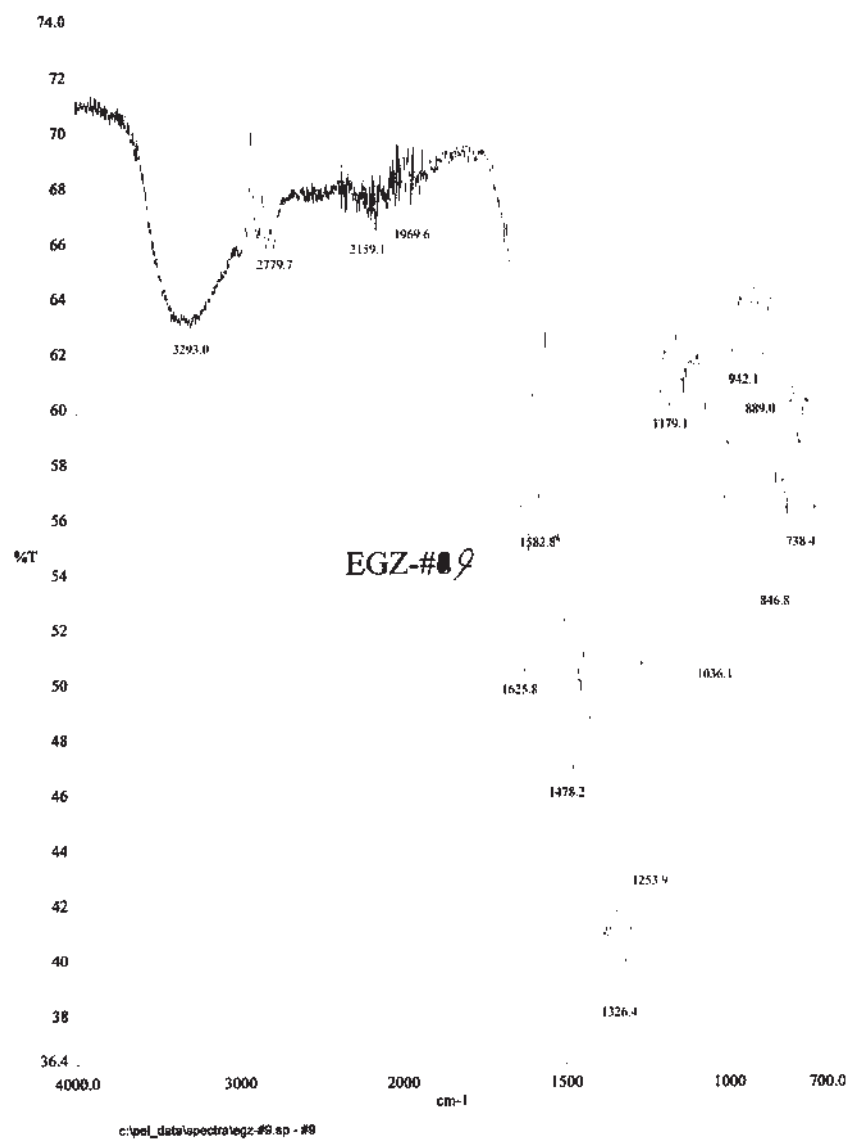


Complejo 36





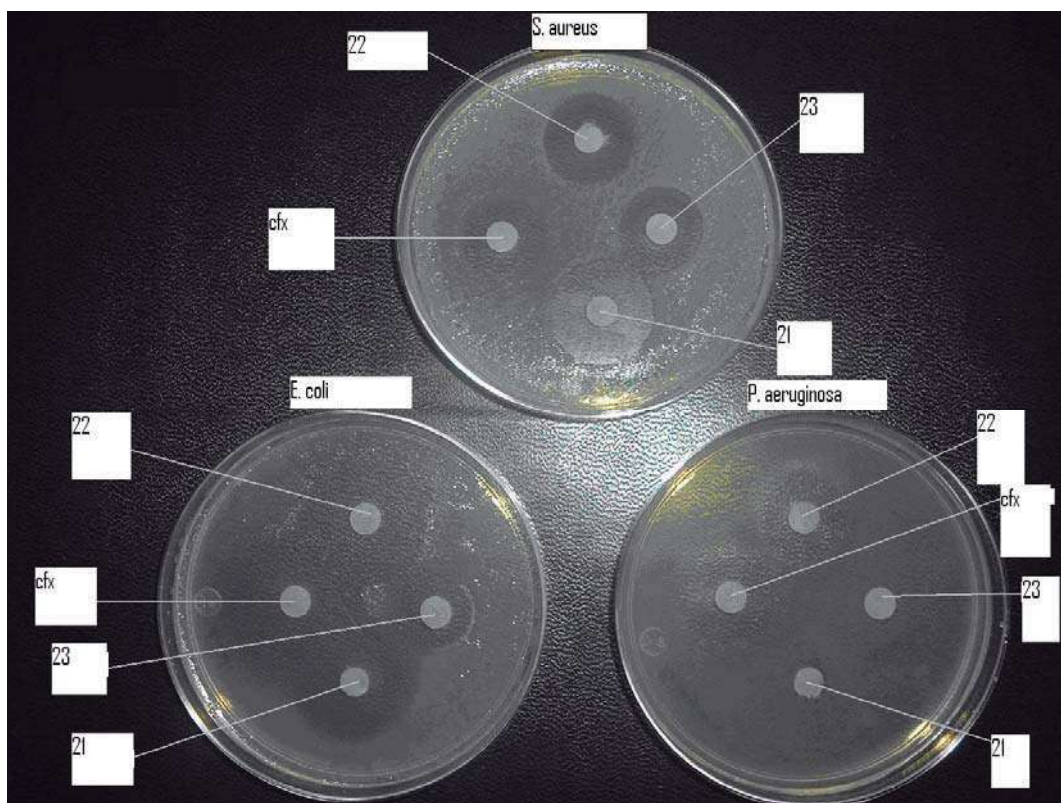




Complejo 40

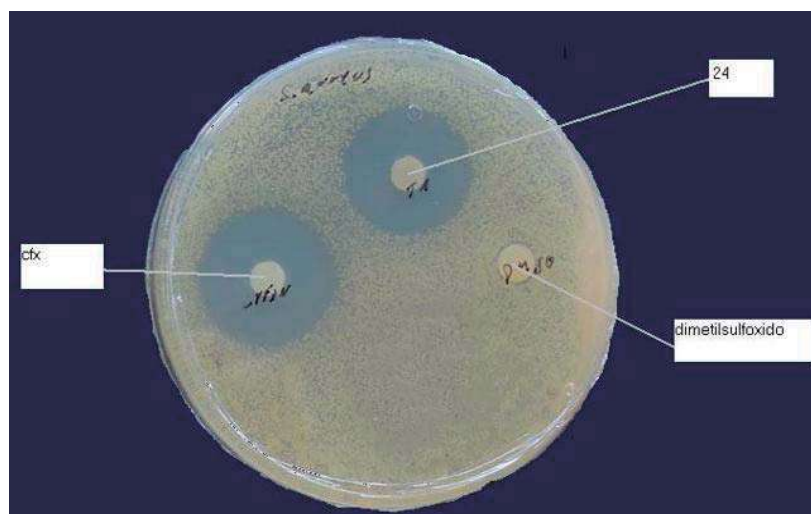
8.2. Fotografías de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

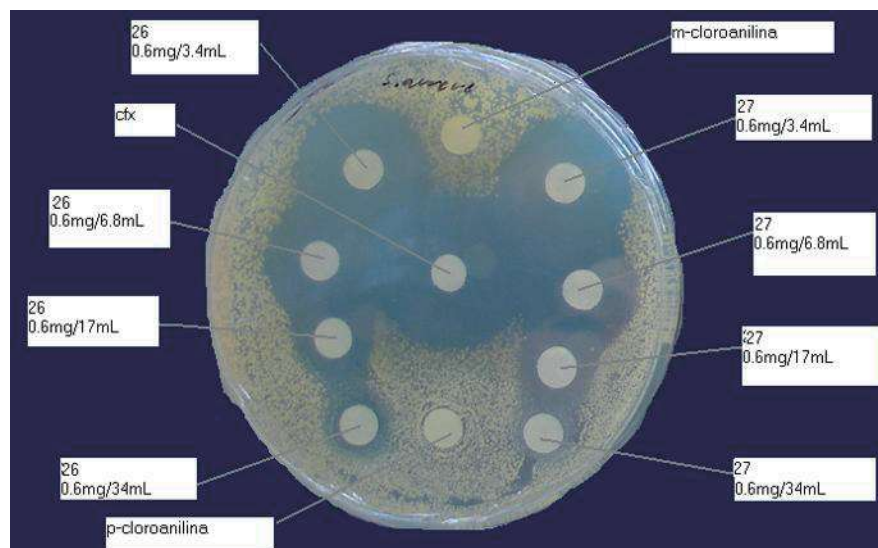
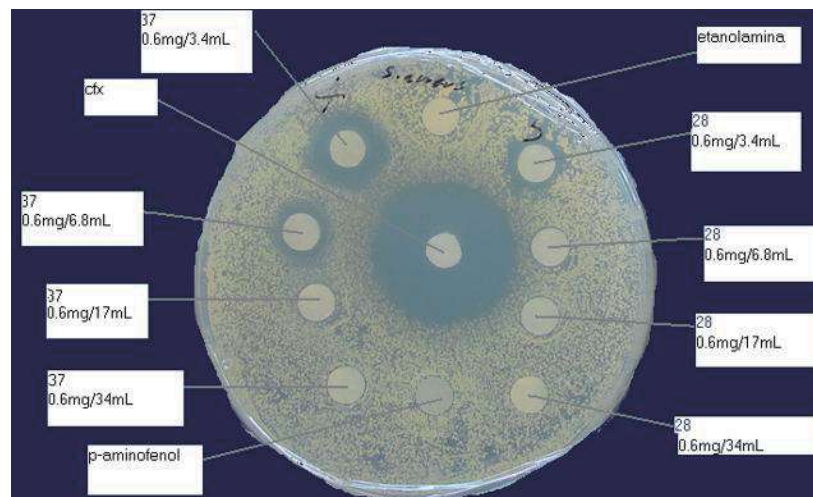
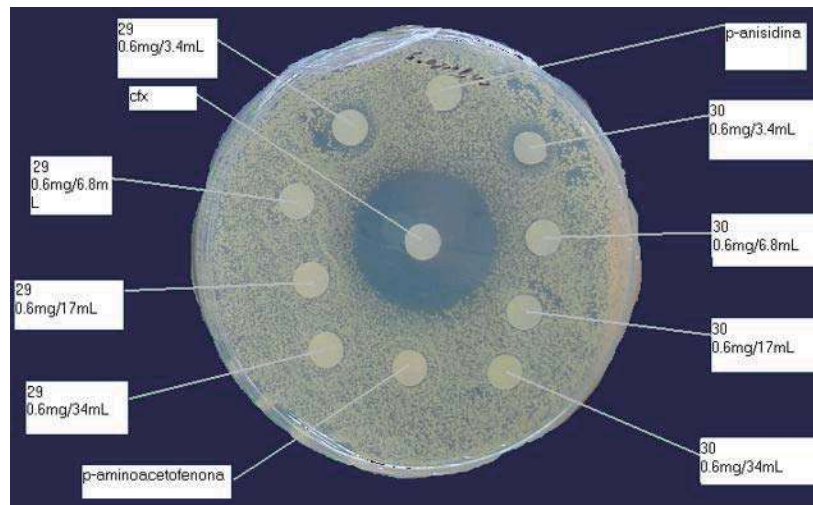
8.2.1. Halos de inhibición de las fluoroquinolonas sintetizadas 21, 22 y 23.

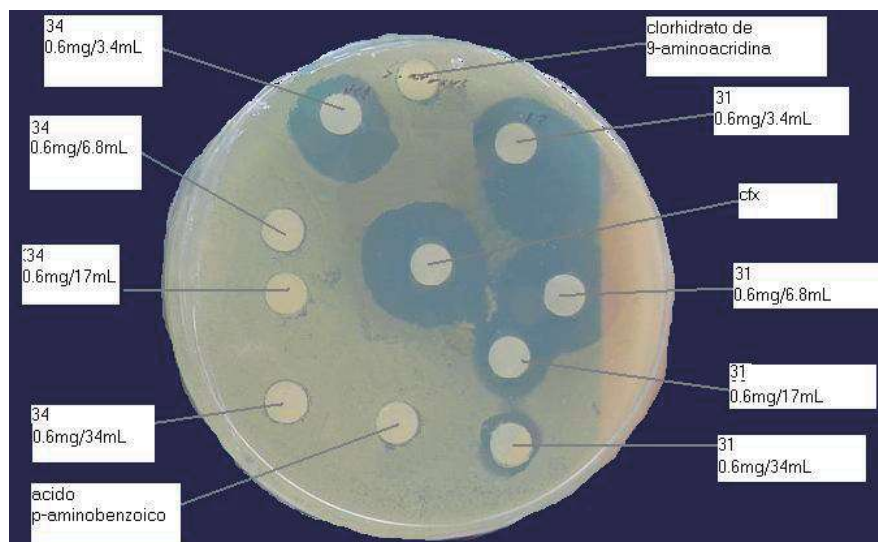
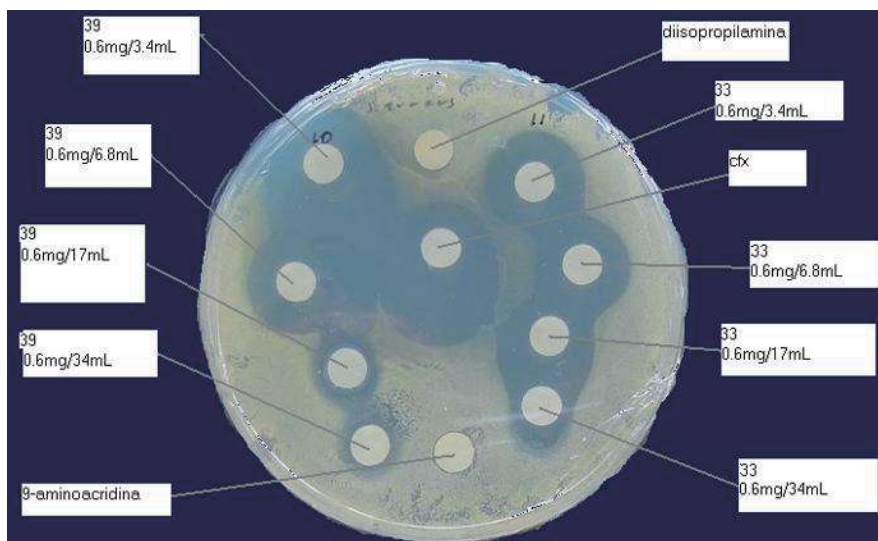
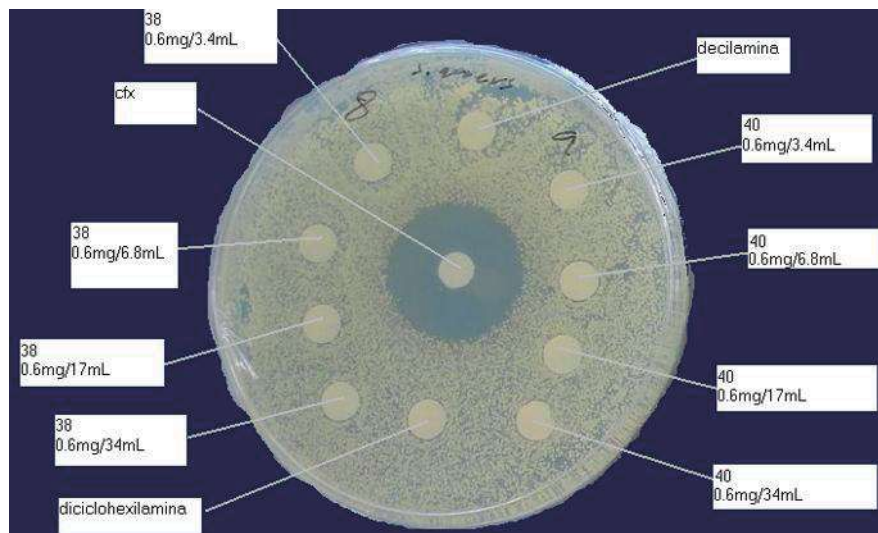


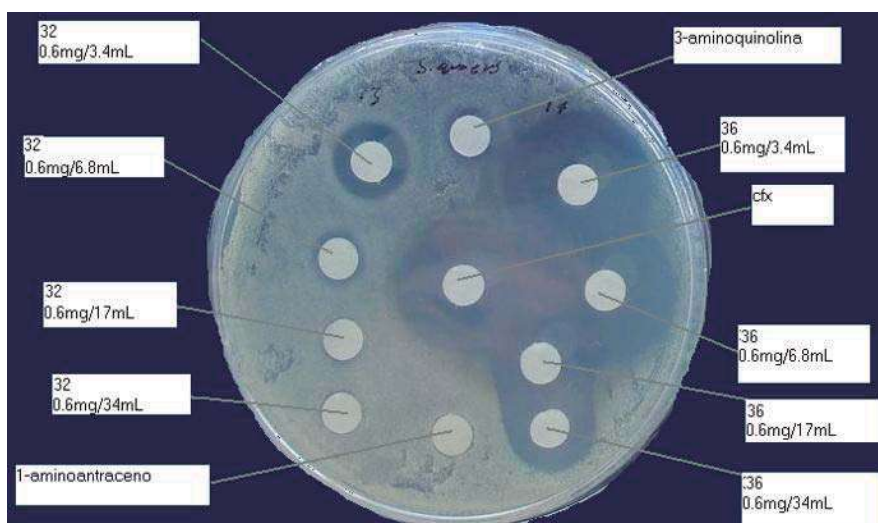
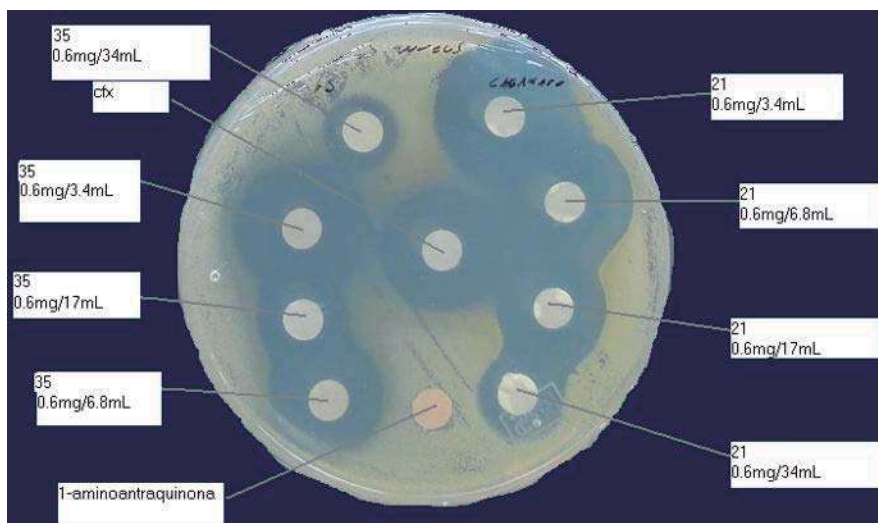
7.2.2. Halos de inhibición de los complejos de Ciprofloxacino-Bi(III)-Amina

S. aureus

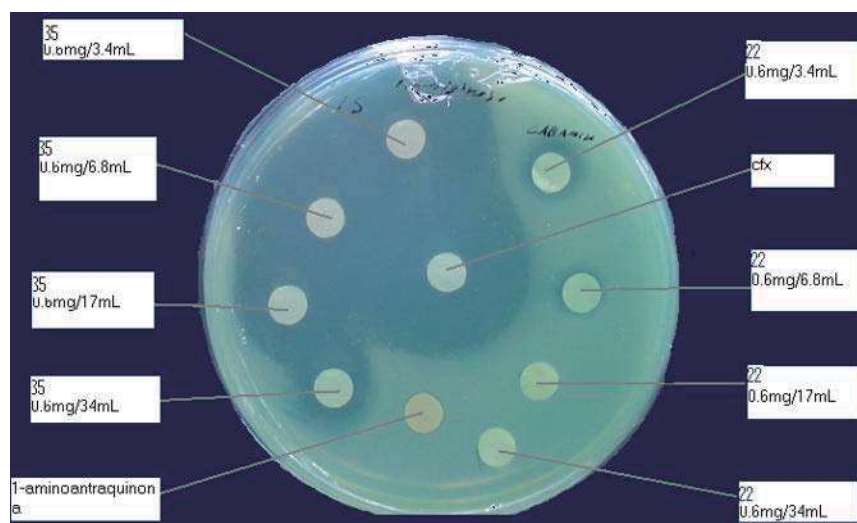


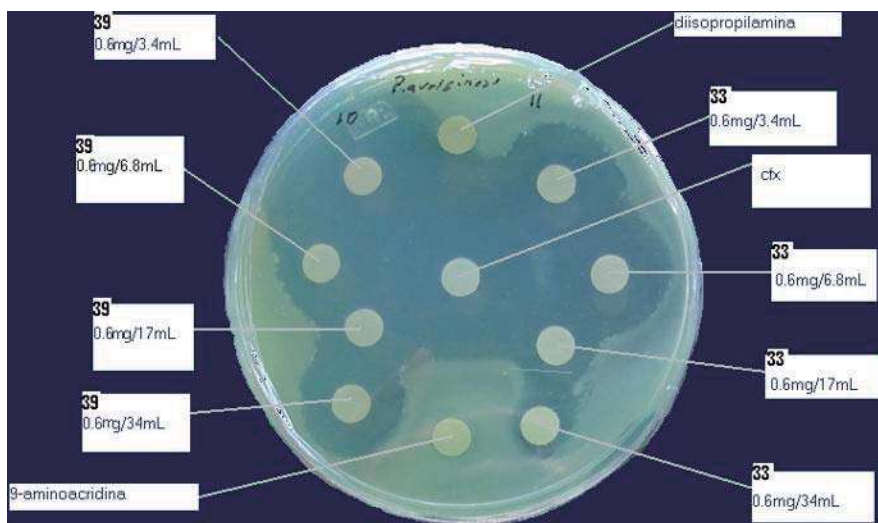
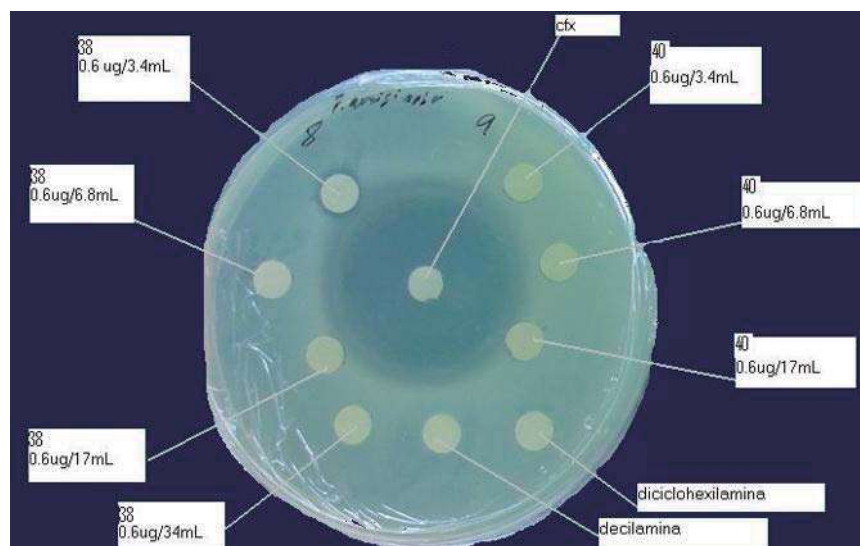
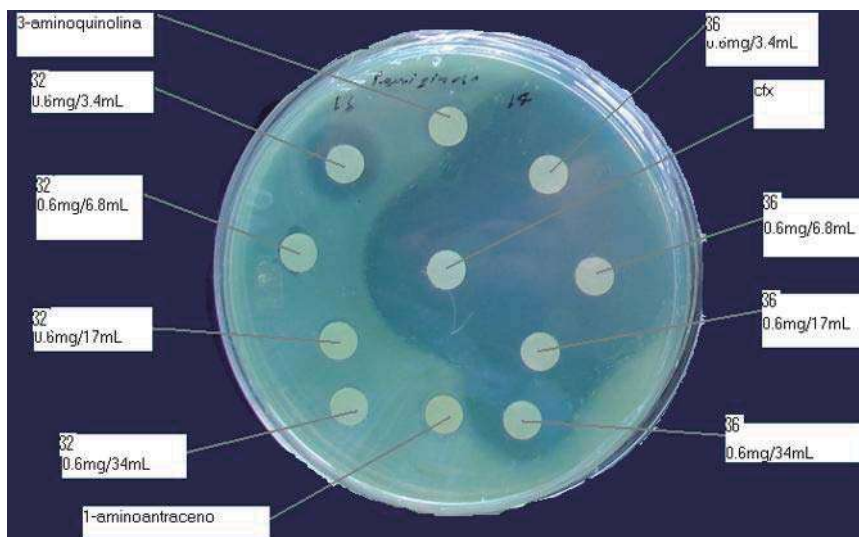


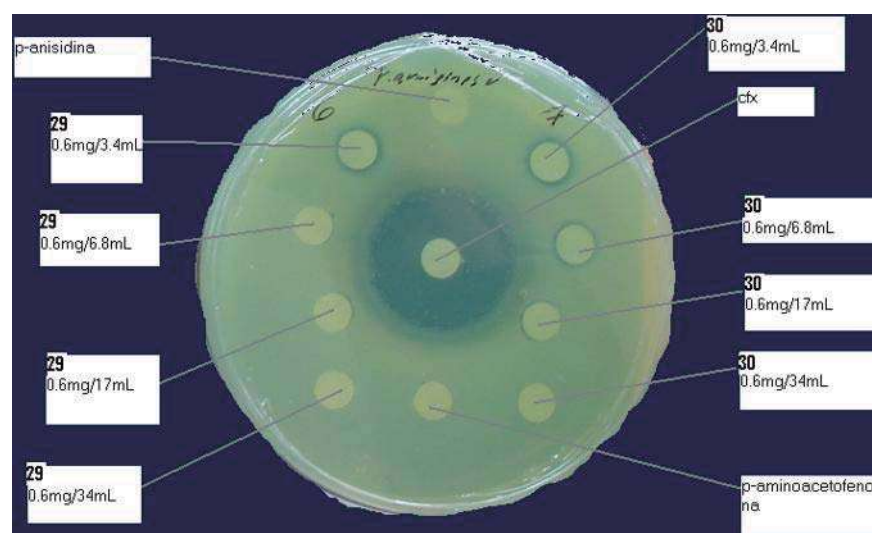
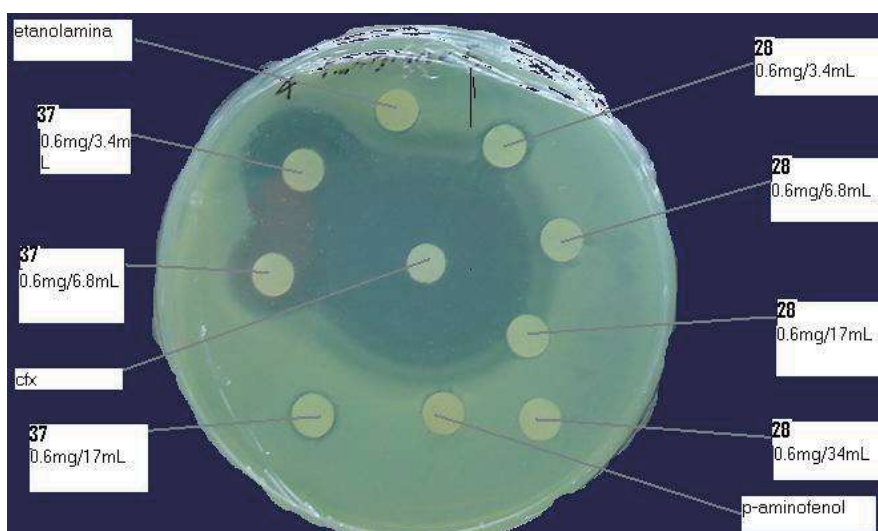
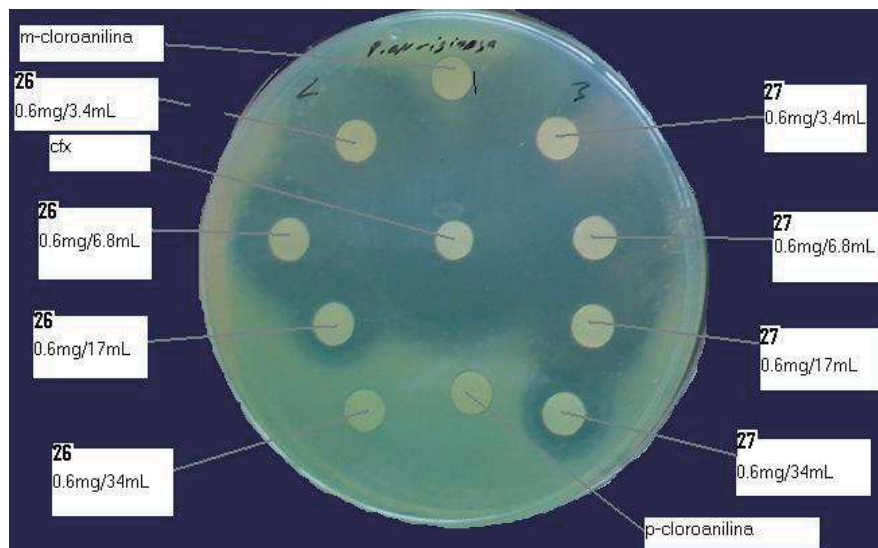




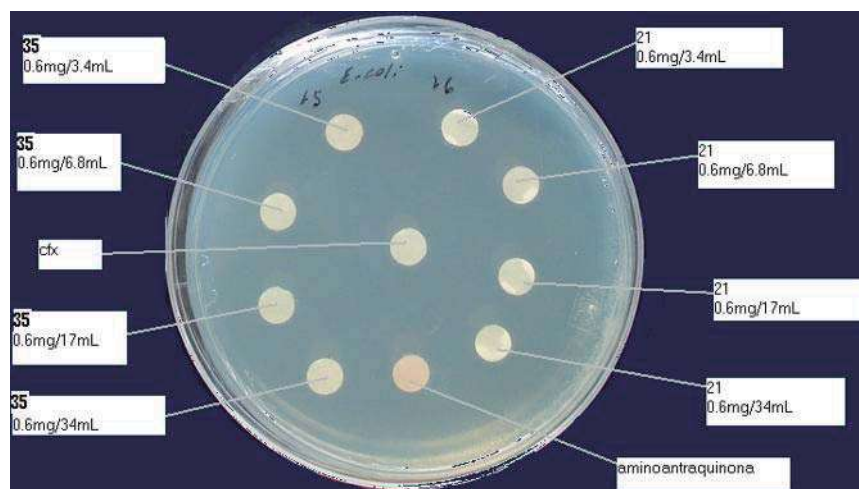
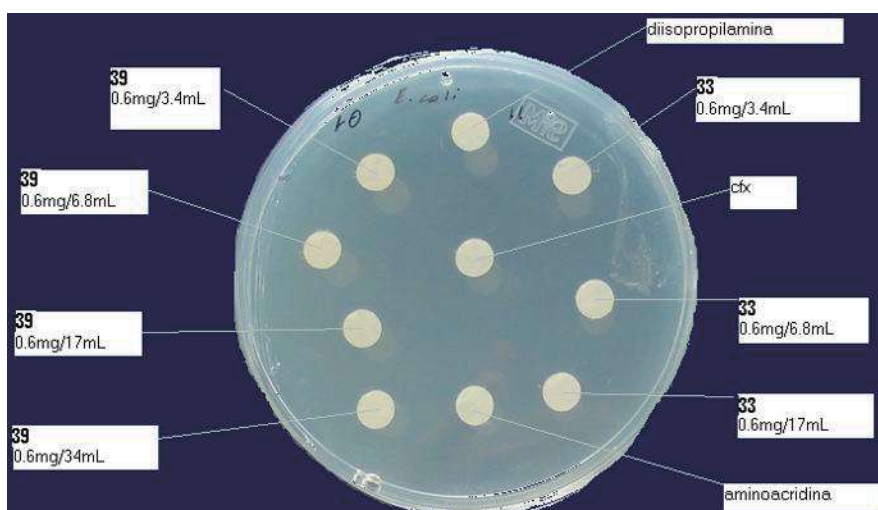
P. aeruginosa

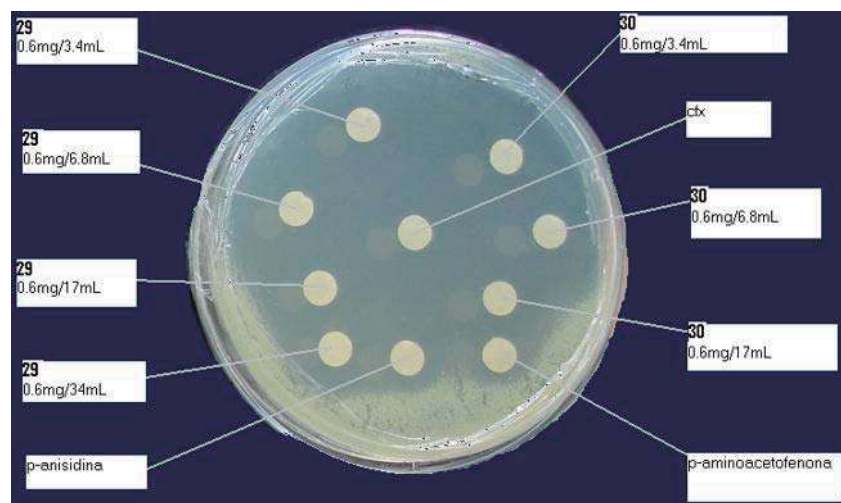
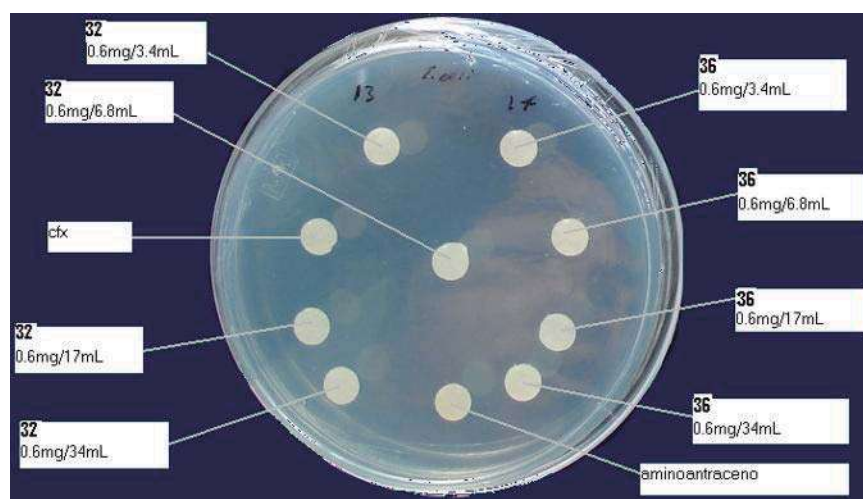
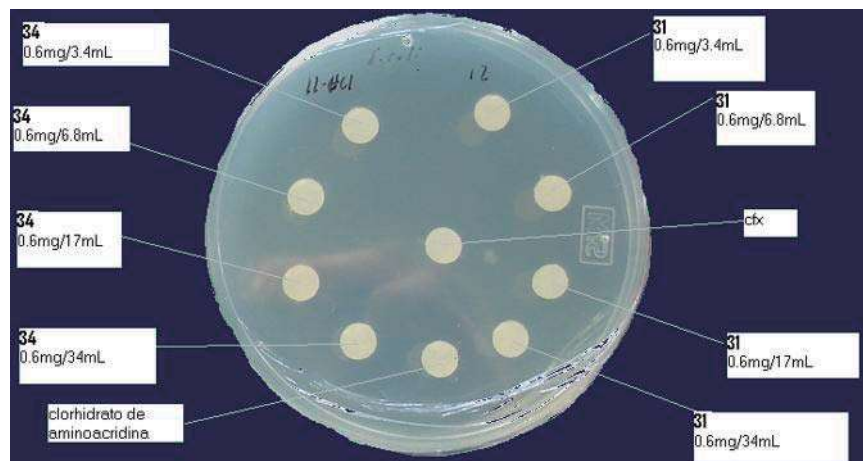


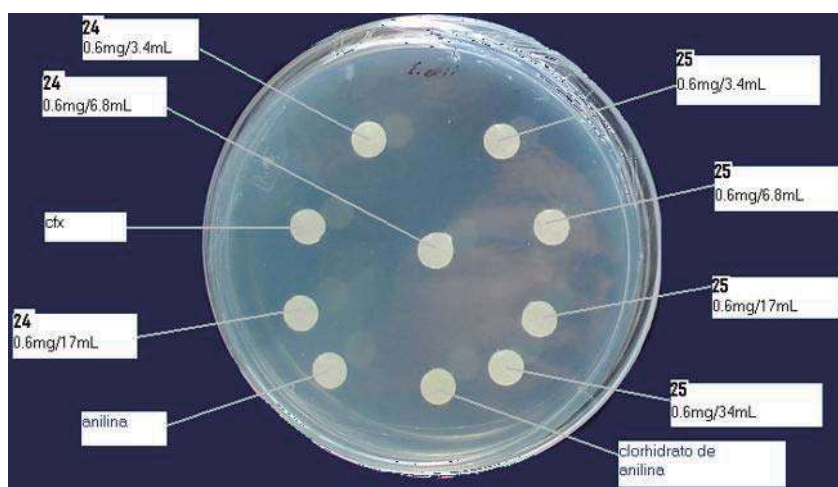
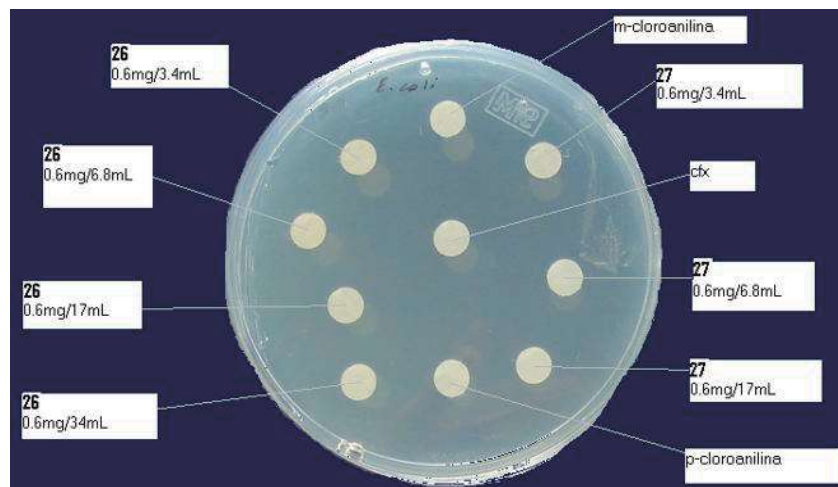




E. coli







8. REFERENCIAS

1. Anderson, V. E. Goetz, T. D. Osheroff, N. 1998. *Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action*; J. Biol. Chem.; 273: 17879-17885.
2. Barrera Mendoza, C. C. Tesis: “*Síntesis y actividad del complejo Ciprofloxacino-Bi(III)-(CH₃O)₂CHCH₂NH₃Cl*”; 2005.
3. Barnard, F.M. Maxwell, A. 2001. *Interaction between DNA gyrase and quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA subunit residues Ser⁸³ and Asp⁸⁷*; Antimicrob. Agents Chem.; 45: 1994-2000.
4. Bauer, A. W. Kirby, W. M. Sherris, J. C. Tenover, M. 1966. *Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method*; Am. J. Clin. Pathol.; 45 : 493-6.
5. Bonincontro, A. Bultrini, E. Onori, G. And Risuelo, G. 2005. *Interaction of Mg⁺² with DNA investigated by dielectric spectroscopy*; ScienceDirect-Journal of Non-Crystalline Solids; 310: 863-867.
6. Carvalho, A. F. Fiorelli, L. A. Jorge, V. C. Da Silva, C. M. F. De Nucci, G. Ferraz, J. G. P. and Pedrazzoli, J. 1998. *Addition of bismuth subnitrate to omeprazole plus amoxycillin improves eradication of Helicobacter pylori*; Blackwell Science Ltd, Aliment Ther.; 12: 557-561.
7. Chu, D. T. Licio, I.M. Claiborne, A. K. Plattner, J.J. Pernet, A. G. 1990. *Structure – activity relationship of quinolone antibacterial agents: The effects of C-2 substitution*; Drug Exp. Clin. Res.; 16: 215-224.

8. Domagala J. M. 1994. *Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials*; J. Antimicrob. Chemother; 34: 851.
9. Domagala, J. M. Hanna, L. D. Heifetz, C. L. Hutt, M. P. Mich, T. F. Sanchez, J. P. Solomon, M. 1986. *New Structure-activity relations of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay*; J. Med. Chem.; 29: 394-404.
10. Domagala, J. M. Heifetz, C. L. Mich, T. F. Nichols, J. B. 1986. *1-Ethyl-7-[3-[(ethylamino)methyl]-1-pyrrolidinyl]-6,8-difluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinoline-carboxylic acid. New Quinolone Antibacterial with potent Gram-Positive Activity*; J. Med. Chem.; 29 : 448-453.
11. Drlica, K. and X. Zhao. 1997. *Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones*; Microbiology and Molecular Biology Reviews; 61: 377-392.
12. Elsea, S. H. McGuirk, P. R. Gootz, T. D. Moynihan, M. and Osheroff, N. 1993. *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 potential*; Antimicrob. Agents Chem.; 37: 2179-2186.
13. Erna Cona, T. 2002. *Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar*; Rev. Chil. Infectol; 19 : 77-81.
14. Fernández, E. Sánchez, G. Navarrete, E. Del Alcázar, F. 2004. *Pérdida de la actividad antibacteriana de quinolonas por efecto de la radiación UVA*; Trabajos originales, facultad de Farmacia, Valparaíso, Chile. 45 (2): 111-119.

15. García-Rodríguez, J. A. Gutiérrez Zufiaurre, N. 2002. *Desfluoroquinolonas frente a Fluoroquinolonas*; Rev. Esp. Quimioter.; 15: 303-305.
16. Gonzalbes, R. Brun-Pascaud, M. García-Domenech, R. Gálvez, J. Girard, P. M. Doucet, J. P. Derouin, F. 2000. *Anti-Toxoplasma Activities of 24 Quinolones and Fluoroquinolones in vitro: Prediction of Activity by Molecular Topology and Virtual Computational Techniques*; Antimicrob. Agents Chem.; 44: 2771-2776.
17. Gonzalbes, R. Brun-Pascaud, M. García-Domenech, R. Gálvez, J. Girard, P. M. Doucet, J. P. Derouin, F. 2000. *Prediction of Quinolone Activity against Mycobacterium avium by Molecular Topology and Virtual Computational Screening*; Antimicrob. Agents Chem.; 44: 2764-2770.
18. Gutiérrez-Zufiaurre, N. 2004. Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas; Esp Quimioterap; 17 : 233-243.
19. Hayashi, N. Nakata, Y. Yazaki, A. 2004. *New findings on the Structure-Phototoxicity Relationship and Photostability of Fluoroquinolones with various substituents at position 1*; Antimicrob. Agents Chem.; 48: 799-803.
20. Hallet, P. and A. Maxwell. 1991. *Novel quinolone resistance mutations of the Escherichia coli DNA gyrase protein: enzymatic analysis of the mutant proteins*; Antimicrobial Agents Chemother; 35 : 335-340.
21. Heddle, J. G. and A. Maxwell. 2002. *Quinolone-Binding Pocket of DNA Gyrase: Role of GyrB*; Antimicrob. Agents and Chemotherapy; 46 : 1805-1815.

22. Heddle, J. G. Blance, S. J. Zamble, D. B. Hollfelder, F. Miller, D. A. Wentzell, L. M. Walsh, C. T. Maxwell, A. 2001. *The Antibiotic Microcin B17 is a DNA Gyrase Poison: Characterisation of the Mode of inhibition*; J. Mol. Biol; 307 : 1223-1234.
23. Holden, J. A. 2001. *DNA Topoisomerases as Anticancer Drug Targets: From the Laboratory to the Clinic*; Curr. Med. Chem.; 1 : 1-25.
24. Hooper, D. C. 1998. *Clinical applications of quinolones*; Biochimical et Biophysica Acta.; 1400 : 45-61.
25. Hypercube, Inc. 1996. HyperChem Release 5.0 for Windows.
26. Kampranis, S. C. And M. Anthiiny. 1998. *The DNA Gyrase-Quinolone Complex. ATP Hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage*; J. Biol. Chem.; 273 : 22615-22626.
27. Keun, W. L. Soon, Y. K. Sungu, H. Jae-Uk, L. and H. Kim. 1996. *Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Study on C-7 Substituted Quinolone*; Bull. Korean Chem. Soc; 17 : 147-151.
28. Klopman, G. Fercu, D. Renau, T. E. and M. R. Jacobs. 1996. *N-1-tert-Butyl-Substituted Quinolones: In Vitro Anti-Mycobacterium avium Activities and Structure-Activity Relation Studies*; Antimicrob. Agents and Chemotherapy; 46: 2637-2643.
29. Kumar, S. D. Padhye, S. Anson, C. E. Powell, A. K. 2003. *Antimycobacterial activity of mixed-ligand copper quinolone complex*; Transition Metal Chemistry; 28 : 579-584.
30. Kwok, Y. Zeng, Q. Hurley, H. L. 1999. *Structural insight into a quinolone-topoisomerase II-DNA Complex. Further evidence for a 2:2*

quinobenzoxazine-Mg⁺² self-assembly model formed in the presence of topoisomerase II. J. Biol. Chem; 274 : 17226-17235.

31. D. E. Mahony, S. Lim-Morrison, L. Bryden, G. Faulkner, P. S. Hoffman, L. Agocs, G. G. Briand, N. Burford, and H. Maguire. 1999. *Antimicrobial Activities of Synthetic Bismuth Compounds against Clostridium difficile*; *Antimicrob. Agents Chemother*; 43 : 582-588.
32. Mitscher, L. A. 2005. *Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents*; *Chem. Rev*; 105 : 559-592.
33. Noble, C. G. Barnard, F. M. and A. Maxwell. 2003. Quinolone-DNA Interaction: Sequence-Dependent Binding to Single-Strand DNA Reflects the Interaction with the Gyrase-DNA Complex; *Antimicrob. Agents Chem*; 47 : 854-862.
34. Oliphant, C. M. 2002. Quinolones: a comprehensive review; *Clinical Pharmacology*; 65 : 455-464.
35. Palú, G. Valisena, S. Ciarrochi, G. Gatto, B. and M. Palumbo. 1992. Quinolone binding to DNA is mediated by magnesium ions; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 89 : 9671-9675.
36. Patric, G. L. 2001. *An introduction to medicinal chemistry 2nd Ed*, Oxford University Press Inc. Ed; 11 : 258-288.
37. Peterson, L. R. 2001. "Quinolone molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity; *Clin. Infect. Dis.*; 33 : 180-186.
38. Phillips, R. H. Whitehead, M. W. Lacey, S. Champion, M. Thompson, R. P. Powell, J. J. 2000. 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.; 5 : 176-182.
39. 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. 1996. Structure- activity relationship of quinolone agents against Mycobacteria: Effects of structural modifications at the 8 position; *Antimicrob. Agents Chem.*; 40 : 2363-2368.
 40. Roca, J. 2003. Topoisomerasas y AND de tipo II; *Investigación y ciencia*; 40-48.
 41. Sanchez, J. P. Domagala, J. M. Hagen, S. E. Heifetz, C. L. Hutt, M. P. Nichols, J. B. and A. K. Trehan. 1998. Quinolone antibacterial agents. Synthesis and Structure-activity relationships of 8-Substituted quinolone-3-carboxylic acids and 1,8-Naphthyridine-3-carboxylic acids; *J. Med. Chem*; 31 : 983-991.
 42. Silvestru, C. Breunig, H. J. Althaus, H. 1999. Structure chemistry of Bismuth compounds: Organobismuth derivatives; *Chem. Rev.*; 99 : 3277-3327.
 43. Stanton, D. T. 2003. On the Physical Interpretation of QSAR Models; *J. Chem Inf. Comput. Sci.*; 43 : 1423-1433.
 44. Sugar, A. M. Liu, X. P. Chen, R. J. 1997. Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs; *Antimicrob. Agents Chem.*; 41 : 2518-2521.
 45. Taléns, V. R. 2001. Actividad antimicrobiana in vitro de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por vía oral: Relación estructura

actividad; Universidad de Valencia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica; 48 : 311-324

46. Todeschini, R. Ballabio, D. Consonni, V. Mauri, A. Pavon, M. Moby Dig's Version 1-2004; Milano Chemometrics and QSAR Research Group Copyright 2004-2005 by Talote srl, Milano, Italy.
47. Todeschini, R. Consonni, V. Mauri, A. Pavon, M. Dragon for Windows and Linux 2005. Copyright 2003-2004 by Talote srl, Milano, Italy.
48. Turel, I. 2002. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents; Coord. Chem. Rev.; 232 : 27-47.
49. van Bambeke, F. Michot, J. M. van Eldere, J. Tulkens, P. M. 2005. Quinolones in 2005: an update; Clin. Mic. Inf.; 11 : 256-280.
50. Wu, G. Wang, G. Fu, X. Zhu, L. 2003. Synthesis, crystal structure, stacking effect and antibacterial studies of a novel quaternary copper (II) complex with quinolone; Molecules; 8 : 287-296.