



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA.

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

***“PAPEL DE LOS COMPLEJOS
FLUOROQUINOLONA Bi(III) EN LA INHIBICIÓN DE
LAS TOPOISOMERASAS BACTERIANAS TIPO II”***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTA:

Q.F.B. SANDRA GABRIELA BARBOSA MUÑOZ.

Tutor: D.C. LUIS CHACÓN GARCÍA
Co-tutor: D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

Agosto, 2009

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinita bondad hacia mi persona.

A mis padres Miguel A. Barbosa y Graciela Muñoz por apoyarme siempre en cada decisión, por todo su amor, paciencia y dedicación, enseñándome y formándome como una mejor persona a través de su ejemplo.

A mis hermanos Perla, Adriana Miguel, Eders y Rodrigo por todo su apoyo y cariño, los admiro y amo a todos.

A Emy por toda su ternura y por esa sonrisa que alegra los corazones de toda mi familia.

A Angel Jordan por ser parte de ese motor que me impulsa a seguir adelante.

A los doctores Luis Chacón y Carlos Cortés por confiar en mí y brindarme su apoyo y asesoría durante la realización de este proyecto.

Al doctor Ernesto Pineda, M.C. Elda Castro, M.C. Maricarmen Ramírez y César Correa por compartir sus invaluable conocimientos conmigo y apoyarme en la parte biológica de mi tesis.

A toda mi familia y amigos, gracias por siempre estar ahí.

Indice

	Contenido	Página
	Índice de figuras	III
	Índice de compuestos	V
	Índice de tablas	VI
	Abreviaturas	VII
I.	Resumen	IX
II.	Abstract	XI
III.	Introducción	1
IV.	Hipótesis	5
V.	Objetivo	5
VI.	Antecedentes	6
6.1	Características generales, historia y clasificación de las quinolonas	6
6.2	Mecanismo de acción de las quinolonas	10
6.2.1	Topoisomerasas	11
6.2.2	Complejo quinolona-ADN-topoisomerasa	13
6.3	Complejos quinolona-metal	15
6.3.1	Complejos con bismuto	17
VII.	Resultados y Discusión	22
7.1	Obtención y caracterización del complejo ofloxacino-Bi(III)	22
7.1.1	Espectroscopía de infrarrojo	24
7.1.2	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN de ^1H)	26

7.1.3	Análisis Elemental	29
7.2	Evaluación de la actividad antibacteriana del complejo ofloxacino-Bi(III)	30
7.3	Pruebas de inhibición del complejo sobre la ADN girasa y topoisomerasa IV	35
7.3.1	Ensayos de inhibición del complejo sobre la actividad de superenrollamiento de la ADN girasa	36
7.3.2	Ensayos de inhibición del complejo sobre la actividad de relajación de la topoisomerasa IV	38
7.4	Ensayos de interacción del complejo con el material genético	40
VIII.	Conclusiones	45
IX.	Parte experimental	46
9.1	Extracción de ofloxacino	46
9.2	Procedimiento para la síntesis de los complejos ofloxacino-Bi(III).	46
9.3	Determinación de la actividad inhibitoria del complejo sobre la ADN girasa	49
9.4	Determinación de la actividad inhibitoria del complejo sobre la topoisomerasa IV	49
9.5	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	50
9.6	Ensayos de interacción de complejo ofloxacino-Bi con el ADN	50
X.	Referencias	51

Índice de figuras

Contenido	Página
1. Estructura del ciprofloxacino y ofloxacino.	2
2. Estructura del ácido nalidíxico (4) obtenido a partir de una modificación estructural del 1-etil-7-cloro-3-carboxiquinolona (3).	6
3. Estructura básica de las quinolonas.	7
4. Estructura del garenoxacino.	13
5. Modelo de unión cooperativa quinolona-ADN.	14
6. Diferentes complejos quinolona-metal.	16
7. Modelo de los complejos enrofloxacino-Fe ⁺³ (A) y ciprofloxacino-Fe ⁺³ (B) reportados por Efthimiadou y Psomas en 2008 respectivamente.	17
8. Estructura propuesta por Anwar en 2006 para el complejo norfloxacino-Bi	19
9. Modelo del complejo ofloxacino-Bi sugerido.	23
10. Espectros de IR del ofloxacino (A) y del complejo ofloxacino-Bi (B).	25
11. Asignación de protones para el ofloxacino.	27
12. Estructura propuesta para el complejo ofloxacino-Bi(III).	30
13. Determinación de la CMI del ofloxacino sobre cepas de <i>E.coli</i> ATCC 25922.	31
14. Determinación de la CMI del complejo ofloxacino-Bi sobre cepas de <i>E.coli</i> ATCC 25922.	32
15. Comparación de la CMI (µg/mL) entre el complejo ofloxacino-Bi(III) y ofloxacino frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	33
16. Determinación de la CMI utilizando absorbancia a 590nm.	33
17. Comparación de la CMI (µmol/mL) entre el complejo ofloxacino-Bi(III) y ofloxacino frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	35

18. Efecto del complejo ofloxacino-Bi sobre la actividad de superenrollamiento de la DNA girasa.	37
19. Efecto del complejo ofloxacino-Bi sobre la actividad de superenrollamiento de la topoisomerasa IV.	39
20. Propuesta de interacción del complejo ofloxacino-Bi con el ADN.	41
21. Interacción de complejo ofloxacino-Bi con ADN en presencia y ausencia de magnesio (Mg).	42
22. Ensayo de interacción del complejo ofloxacino-Bi con el ADN comparado la con interacción entre el material genético y Hind III.	43

Índice de compuestos

	Contenido	Página
1.	Ciprofloxacino (1)	2
2.	Ofloxacino (2)	2
3.	1-etil-7-cloro-3-carboxiquinolona (3)	6
4.	Ácido nalidíxico (4)	6
5.	Cinoxacino (5)	8
6.	Ácido piromídico (6)	8
7.	Enrofloxacino (7)	8
8.	Norfloxacino (8)	8
9.	Gatifloxacino (9)	9
10.	Levofloxacino (10)	9
11.	Clinafloxacino (11)	9
12.	Moxifloxacino (12)	9
13.	Garenoxacino (13)	10
14.	Complejo Ofloxacino-Bi(III) (14)	30

Índice de tablas

1.	Clasificación de las quinolonas	8
2.	Clasificación y función de las topoisomerasas	12
3.	Desplazamiento químico (ppm) en los espectros de RMN de ^1H del ofloxacino y complejo ofloxacino-Bi.	26
4.	Desplazamiento químico (ppm) en los espectros de RMN de ^1H del ofloxacino y la sal derivada de ofloxacino con ácido nítrico	28
5.	Análisis elemental del complejo ofloxacino-Bi(III)	29

Lista de abreviaturas

AE	análisis elemental
ADN	ácido desoxirribonucleico
ATP	adenosin trifosfato
Bi	Bismuto
BiCl ₃	cloruro de bismuto
Bi(NO ₃) ₃	nitrato de bismuto
BiPO ₄	fosfato de bismuto
Bi(TfO) ₃	triflato de bismuto
CH ₃ ONa	metóxido de sodio
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	Food and Drug Administration
Fig.	Figura
H ₂ O	Agua
Hr	Hora
IR	Infrarrojo
MeOH	Metanol
Mg	Miligramo
CMI	concentración mínima inhibitoria
Min	Minuto
mL	Mililitro

mm	Milímetro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromol
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ppm	partes por millón
RMN de ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

I. Resumen

Las fluoroquinolonas son agentes antimicrobianos con un amplio espectro antibacteriano que se han convertido en fármacos de primera elección para varias enfermedades infecciosas (Hooper y Rubinstein 2004), siendo su blanco de acción las topoisomerasas bacterianas: ADN girasa y topoisomerasa IV, enzimas encargadas de resolver problemas topológicos en el ADN (Bates y Maxwell 2005, Holden 2001). Estas moléculas son agentes acomplejantes para una gran variedad de iones metálicos (Turel 2002) con los que interaccionan formando compuestos y complejos cuya actividad biológica ha resultado de gran interés actualmente (Upadhyay *et al.* 2006).

Dentro de los metales pesados, el bismuto se distingue por su baja toxicidad y naturaleza no carcinogénica (Kotani *et al.* 2005). Se sabe que este metal posee actividad antibacteriana (Mahony *et al.* 1999); debido a estas propiedades, resulta importante el estudio de su interacción con ligandos orgánicos; en este caso con fluoroquinolonas tales como el ofloxacino que ha sido ampliamente utilizado en terapéutica debido a sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas (Oliphant 2002, Mitcher 2005). Hasta la fecha no existen reportes acerca del blanco de acción de los complejos fluoroquinolona-metal.

En el presente trabajo se realizó la obtención de un complejo ofloxacino-Bi(III) bajo condiciones alcalinas, caracterizado mediante espectroscopía de I.R., RMN de ^1H y A.E., que presenta una actividad biológica seis veces mayor frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 que su ligando. Asimismo se demuestra que los complejos quinolona-metal actúan al mismo nivel que las quinolonas, inhibiendo las topoisomerasas bacterianas.

Ensayos realizados sobre ADN plasmídico demuestran que el complejo es capaz de interactuar con el material genético; sin embargo, la naturaleza de dicha interacción no es del todo clara.

II. Abstract

Fluoroquinolones are broad-spectrum antimicrobial agents that have become first-choice drugs for several infectious diseases (Hooper y Rubinstein 2004); their targets are the bacterial topoisomerases DNA gyrase and topoisomerase IV, which are enzymes that solve topological problems that occur in DNA (Bates y Maxwell 2005, Holden 2001). These antibiotics are complexing agents for a variety of metal ions and as a result of the quinolone-metal interactions some compounds and complexes with an interesting biological activity have been obtained (Upadhay *et al.* 2006).

Bismuth is set apart from the rest of the heavy metals due to its low toxicity and non-carcinogenic nature (Kotani *et al.* 2005). It is known that this metal has antibacterial activity (Mahony *et al.* 1999) and, due to these properties, the analysis of its interaction with organic ligands; such as quinolones like ofloxacin (one of the most important fluoroquinolones used in therapy because of its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties) becomes important (Oliphant 2002, Mitcher 2005). Up to now, it has not been reported any ofloxacin-metal complexes, neither the target of the fluoroquinolone-metal complexes has been reported.

Here we report an ofloxacin-Bi(III) complex obtained under alkaline conditions and characterized by IR, RMN de ^1H spectroscopy and elemental analysis. It is demonstrated by determinations of the MIC that ofloxacin-Bi (III) complex is six times more active than its ligand. It is also demonstrated that quinolone-metal complexes and quinolones act under the same molecular action mechanism, by inhibiting bacterial topoisomerases.

Essays on plasmidic DNA demonstrate that the complex is capable of interaction with the genetic material, although the nature of such interaction is not completely clear.

III. Introducción

El descubrimiento de Fleming de la penicilina en 1928 marcó el comienzo de la era de los agentes antibacterianos e impulsó en los años siguientes la investigación en el desarrollo de agentes antimicrobianos, dando como resultado la síntesis de una gran cantidad de fármacos con diferentes mecanismos y espectros de acción (Ruiz 2003).

En 1962 fue obtenido el ácido nalidíxico (**3**), un agente antibacteriano de origen sintético, cuyo empleo clínico a partir de 1967 inició el uso de un novedoso grupo de fármacos: las quinolonas (Emmerson y Jones 2003). Tras su descubrimiento se han sintetizado numerosos análogos buscando optimizar tanto las características farmacocinéticas como farmacodinámicas de los mismos (Baker *et al.* 2004). De esta búsqueda surgen las fluoroquinolonas, que se caracterizan por poseer un átomo de flúor en su estructura. Desde 1980, estos fármacos han ocupado un importante lugar en el arsenal de agentes antimicrobianos clínicamente útiles y en la actualidad se han convertido en fármacos de primera elección para el tratamiento de varias enfermedades infecciosas (Ball 2000, Emmerson y Jones 2003, Farina *et al.* 2007). Dentro de esta familia destacan el ciprofloxacino (**1**) y el ofloxacino (**2**) (fig.1) que han sido las fluoroquinolonas más utilizadas en la práctica clínica por a sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas (Oliphant 2002, Mitscher 2005). Sin embargo, este grupo de compuestos no escapa al fenómeno de multirresistencia bacteriana y efectos colaterales indeseados, por lo que es necesario continuar con la investigación para el desarrollo de nuevas y más potentes fluoroquinolonas (Zhanela *et al.* 2004, De Sousa 2005).

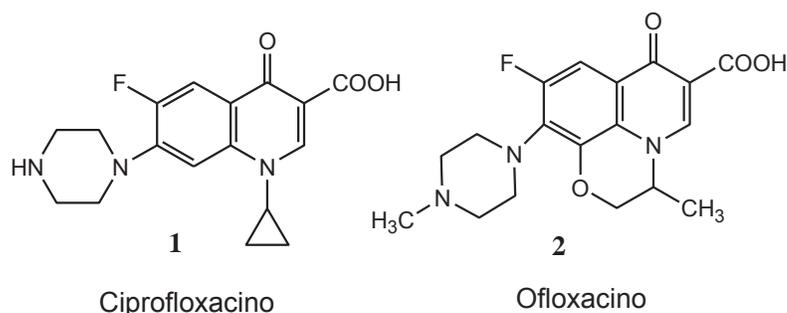


Figura 1. Estructura del ciprofloxacino y ofloxacino.

Las quinolonas tienen la propiedad de formar complejos con una gran variedad de iones metálicos siendo actualmente de gran interés su actividad biológica no solo para estos compuestos sino para los fármacos en general, ya que existen reportados en la literatura complejos de fármacos con diferentes metales, los cuales pueden incrementar la actividad biológica e incluso disminuir la toxicidad del ligando (Upadhyay *et al.* 2006).

Hasta el año 2002 se habían reportado algunos complejos y compuestos entre quinolonas, tales como el ciprofloxacino (**1**) y norfloxacino (**8**), con distintos metales como magnesio, calcio, cobre, zinc, bismuto, cadmio, hierro, plata, cobalto, boro y vanadio, donde la actividad antibacteriana de la mayoría de éstos resultó semejante a la de los ligandos o si acaso ligeramente superior, aunque en muchos casos, la actividad disminuyó considerablemente (Turel 2002).

En el 2008 se reportó la síntesis de complejos de enrofloxacin con varios metales, de los cuales los derivados de hierro y cobre presentaron actividad superior contra algunos microorganismos Gram negativos mientras que los derivados de cobre, níquel y zinc presentaron mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus* todos ellos con respecto al enrofloxacin (**7**) (Efthimiadou y Karaliota 2008).

Dentro de la serie de metales utilizados, el bismuto se distingue por su baja toxicidad y naturaleza no carcinogénica. Se sabe que este metal posee actividad antibacteriana; existen complejos ranitidina-citrato de bismuto que se usan frecuentemente en la clínica para tratar infecciones gastrointestinales, donde el citrato de bismuto presenta actividad contra *Helicobacter pylori* (Anwar et al.2006).

Debido a las propiedades que presenta este metal, resulta de gran interés el estudio de su interacción con las fluoroquinolonas. Hasta el año 2002 sólo se había reportado la obtención de dos compuestos ciprofloxacino-Bi (III) preparados bajo condiciones ácidas, cuya actividad resultó menor que la del ciprofloxacino (Turel 2002). Recientemente en el 2006 se reportó la obtención de un complejo norfloxacino-Bi (III) con mayor actividad frente a diferentes microorganismos Gram positivos y Gram negativos comparado con la actividad del ligando (Anwar 2006).

Nuestro equipo de trabajo se ha enfocado en gran parte al estudio de fluoroquinolonas y complejos entre éstas y el bismuto. Previamente se sintetizaron algunos complejos quinolona-Bi (III) en condiciones alcalinas, los cuales presentaron una mayor actividad que su ligando frente a cepas clínicas de algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas (Barrera 2005, Aguirre 2006). Dentro de los compuestos obtenidos se encontraban algunos sustituidos en el nitrógeno distal de la piperazina, con grupos voluminosos que estéricamente no favorecerían un complejo con el blanco molecular y que en cambio podrían acarrear al bismuto fácilmente; puesto que se sabe que la actividad antibacteriana está relacionada con los sustituyentes de esa posición, sería de esperar que si el bismuto fuese el responsable de la actividad, todos los compuestos hubieran sido activos en mayor o menor grado, sin embargo éstos últimos resultaron inactivos. Como conclusiones de este trabajo se descartó al Bi (III) como responsable por sí mismo del incremento de la actividad atribuyendo ésta al complejo *per se* (Barbosa 2007). También resultó claro que la presencia de bismuto formando un complejo con la fluoroquinolona podría modificar su blanco de acción lo cual no fue corroborado o descartado.

En el presente trabajo se describe la síntesis de un complejo ofloxacino-Bi(III) (**14**) y estudios de su actividad frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922. Se demuestra que los complejos fluoroquinolona-Bi(III) actúan bajo el mismo mecanismo de acción molecular que las fluoroquinolonas, es decir, inhiben las topoisomerasas bacterianas tipo II. Asimismo se prueba la capacidad del complejo ofloxacino-Bi(III) para interactuar con el material genético.

IV. Hipótesis

El mecanismo de acción de los complejos Fluoroquinolona-Bi(III) es mediante la inhibición de las DNA topoisomerasas bacterianas de tipo II.

V. Objetivo

Objetivo general

Establecer la relación mecánica entre los complejos Fluoroquinolona-Bi(III) y las quinolonas.

Objetivos particulares

- Obtener y caracterizar un complejo ofloxacino-Bi(III).
- Determinar la sensibilidad de cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 frente al complejo.
- Demostrar la actividad inhibitoria del complejo sobre las topoisomerasas bacterianas: ADN girasa y topoisomerasa IV.

VI. Antecedentes

6.1 Características generales, historia y clasificación de las quinolonas.

Las quinolonas son estructuras bicíclicas heteroatómicas, constituidas por un núcleo piridona-funcionalizada con un ácido carboxílico y fusionada a un anillo aromático (fig. 2) (Mella *et al.* 2000).

La primera quinolona fue descubierta por serendipia a principios de los años 1960's por químicos de los laboratorios Sterling-Winthrop en Resselear, New York, quienes durante la síntesis del antimalárico cloroquina obtuvieron el compuesto **3** (fig.1) como subproducto, molécula que presentó actividad antibacteriana. Una pequeña modificación química a este compuesto permitió la síntesis del ácido nalidíxico (**4**), la primer quinolona (Andriole 2000).

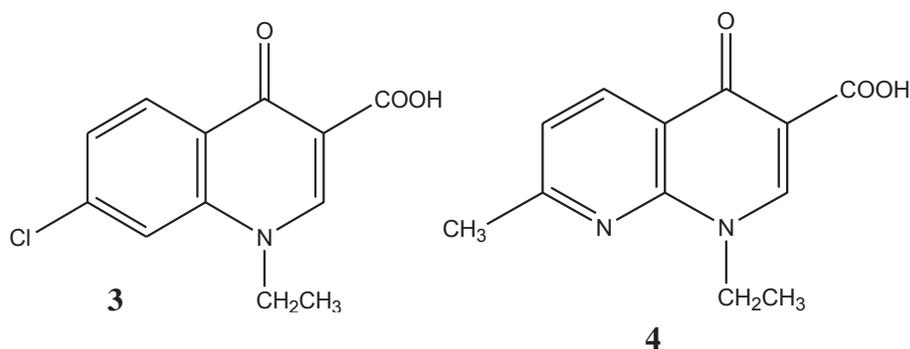
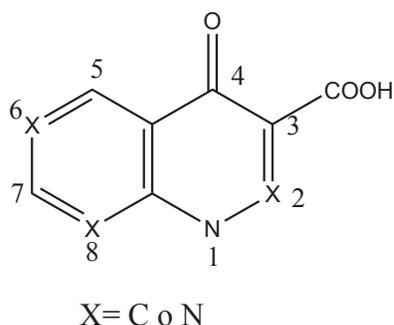


Figura 2. Estructura del ácido nalidíxico (**4**) obtenido a partir de una modificación estructural del 1-etil-7-cloro-3-carboxiquinolona (**3**).

El ácido nalidíxico (**3**) es un derivado de la 1,8 naftiridina el cual presentó actividad moderada frente a microorganismos Gram negativos además de lograr concentraciones adecuadas en orina tras su administración oral; debido a esto, en 1963 fue introducido en Estados Unidos en el tratamiento de infecciones en las vías urinarias (Andriole 2000, Taléns 2001, Pérez 2004). Desgraciadamente, las propiedades farmacocinéticas de éste no eran adecuadas; presentaba baja

penetración intracelular, reducido espectro de actividad y además pronta aparición de resistencia al fármaco; estas razones impulsaron la síntesis de derivados que presentaran mejores características farmacológicas que su predecesor (Wilson y Gisvold 1998, Mella *et al.* 2000).

En el afán de encontrar quinolonas con mejores propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas se han sintetizado un sinnúmero de análogos del ácido nalidíxico (Mitscher 2005). Estos compuestos difieren entre sí en su estructura heterocíclica básica en relación con el número y posición de átomos de nitrógeno y pertenecen a alguno de los grupos químicos mostrados en la figura 3:



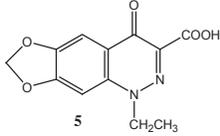
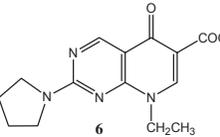
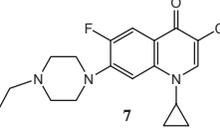
Grupo químico	Posición de N
Naftiridinas	1,8.
Cinolinas	1,2.
Piridopirimidinas	1,6,8.
Quinolinas	1

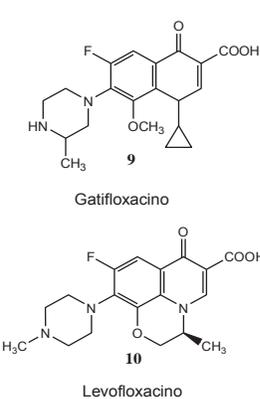
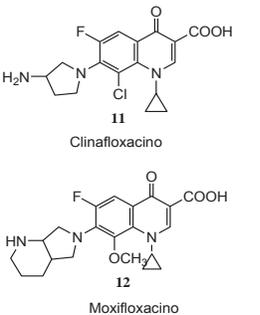
Figura 3. Estructura básica de las quinolonas.

Independientemente del grupo químico al que pertenezcan, todas las quinolonas tienen en común un ácido carboxílico en posición 3 y una cetona en posición 4, los cuales son esenciales para su actividad antibacteriana, así como un nitrógeno en posición 1 con un grupo alquilo (generalmente etilo o ciclopropilo) como sustituyente. Las modificaciones en las posición 5, 6, 7 y 8 han permitido la síntesis de nuevos compuestos con mejores características farmacológicas (Verbist 1986, Sárközy 2001).

Las quinolonas han sido clasificadas en cuatro generaciones en base a su actividad antimicrobiana (Tabla 1) (Oliphant 2002).

Tabla 1. Clasificación de las quinolonas (Mella *et al.* 2002, Emmerson y Jones 2003, Brugueras *et al.* 2005).

Generación	Moléculas representativas	Actividad antibacteriana	Estructura de algunas moléculas representativas
Primera	Ácido pipemídico, ácido oxolónico, ácido piromídico, cinoxacino, flumequino.	Buena actividad contra microorganismos Gram negativos como <i>E.coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> .	 <p>5 Cinoxacino</p>  <p>6 Ácido piromídico</p>
Segunda	Ofloxacino, ciprofloxacino, norfloxacino, lomefloxacino, fleroxacino, perfloxacino, enrofloxacino.	Mejor actividad frente Gram negativos comparadas con las de primera generación. Destaca su actividad frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Presentan además buena actividad contra algunos Gram positivos como <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> y <i>M. catarrhalis</i> , micobacterias y patógenos atípicos.	 <p>7 Enrofloxacino</p>  <p>8 Norfloxacino</p>

<p>Tercera</p>	<p>Levofloxacin, esparfloxacin, grepafloxacin, tosufloxacin.</p>	<p>Mantienen buena actividad frente a Gram negativos y patógenos atípicos pero presentan mejor actividad frente a Gram positivos como <i>S. pyogenes</i>, <i>S. pneumoniae</i>. Mejor actividad estafilocócica y frente a anaerobios que quinolonas de generación anterior.</p>	 <p>9 Gatifloxacin</p> <p>10 Levofloxacin</p>
<p>Cuarta</p>	<p>Moxifloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, clinafloxacin</p>	<p>Excelente actividad frente a Clostridium y bacteroides. Conservan buena actividad frente a enterobacterias, anaerobios y cocos Gram positivos.</p>	 <p>11 Clinafloxacin</p> <p>12 Moxifloxacin</p>

La posibilidad de lograr una mejor actividad intrínseca a partir de nuevas modificaciones en la estructura no está cerrada, como lo demuestra el desarrollo del nuevo grupo de 6-desfluoroquinolonas activas, que son moléculas que carecen del átomo de flúor en posición 6, considerado por años imprescindible para su actividad. El garenoxacin (**13**) es la molécula representativa de esta nueva clase de quinolonas (Bambeke *et al.* 2005, Brugueras *et al.* 2005).

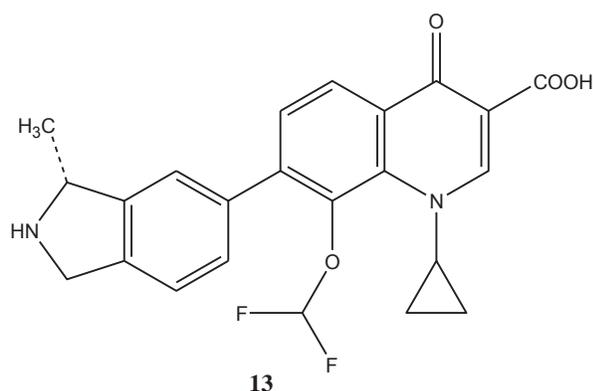


Figura 4. Estructura del garenoxacino.

Este compuesto ha presentado una excelente actividad contra bacterias Gram positivas y anaerobias, teniendo además muy buenas propiedades farmacocinéticas (García y Gutiérrez 2002). El garenoxacino (**13**) fue aceptado en abril del 2006 para su aplicación farmacológica por la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos como un antibiótico de amplio espectro para tratar infecciones ocasionadas por microorganismos Gram positivos, Gram negativos y anaerobios (Kenilworth 2006).

6.2 Mecanismo de acción de las quinolonas

Las quinolonas ejercen su acción antibacteriana tras penetrar en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los canales acuosos transmembranales de las porinas, o de la capa de los polisacáridos. Una vez dentro de la célula, actúan por mecanismos complejos (Taléns 2001).

Su blanco de acción son las topoisomerasas bacterianas de tipo II, enzimas encargadas de resolver problemas topológicos en el ADN con ayuda de ATP, siendo generalmente la ADN girasa el blanco en bacterias Gram negativas y la topoisomerasa IV en bacterias Gram positivas (Holden 200, Noble *et al.* 2003).

6.2.1 Topoisomerasas

Las enzimas encargadas de catalizar las interconversiones topológicas del ADN sin modificar su estructura fundamental son conocidas como topoisomerasas (Bates y Maxwell 2005). Por su carácter ubicuota, están presentes tanto en células procariotas como eucariotas (Anderson *et al.* 1998, Holden 2001).

Dos rasgos distintivos que caracterizan estas enzimas son: En primer lugar, pueden cortar y empalmar repetidamente los enlaces fosfodiéster que unen los nucleótidos constituyentes de las cadenas de ADN. En segundo lugar, permiten que otras cadenas de ADN pasen entre las dos hebras momentáneamente escindidas.

Para evitar que las hebras del ADN escindido vayan a la deriva, las topoisomerasas los sujetan con firmeza, mientras otras cadenas de ADN los atraviesan. En el desempeño de esa tarea, las topoisomerasas utilizan la energía del enlace internucleotídico escindido para unirse covalentemente al extremo 3' o 5' del ADN. Cuando empalman nuevamente el ADN, se revierte esa unión covalente restableciéndose el enlace internucleotídico inicial (Roca 2003).

La comparación de las propiedades catalíticas y de la secuencia de aminoácidos lleva a la clasificación de las topoisomerasas en dos tipos distintos: topoisomerasas de tipo I y topoisomerasas de tipo II. A su vez existe una subdivisión de estos dos grupos en topoisomerasas del tipo IA y IB y topoisomerasas del tipo IIA y IIB respectivamente (Holden 2001, Bates y Maxwell 2005).

Las topoisomerasas se han clasificado según la función que desempeñan sobre el material genético de acuerdo a la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación y función de las topoisomerasas (Bates y Maxwell 2005).

Enzima	Tipo	Fuente	Función
Topoisomerasa I bacteriana	IA	Bacteria	Relaja superenrollamientos negativos.
Topoisomerasa I eucariótica	IB	Eucariota	Relaja superenrollamientos positivos y negativos.
Topoisomerasa III	IA	Bacteria	Potente actividad de decatenación
Girasa reversa	IA	Arquea	Introduce superenrollamientos positivos.
DNA girasa	IIA	Bacteria	Introduce superenrollamientos negativos.
T4 topoisomerasa	IIA	Bacteriófago T4	Relaja el ADN.
Topoisomerasa II eucariótica	IIA	Eucariota	Relaja el ADN y es una potente decatenasa.
Topoisomerasa IV	IIA	Bacteria	Relaja el ADN.
Topoisomerasa VI	IIB	Arquea	Relaja el ADN.

Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas bacterianas de tipo IIA: ADN girasa y topoisomerasa IV (Holden 2001, Roca 2003, Ruíz 2003).

La DNA girasa es una enzima tetramérica compuesta de dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. La principal función de esta enzima es catalizar el superenrollamiento negativo del ADN (Bates y Maxwell 2005); es una enzima singular entre todas las topoisomerasas que se caracterizan por relajar el ADN, siendo la única capaz de superenrollarlo, 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 (Kampranis y Maxwell 1998, Holden 2001).

La topoisomerasa IV es una enzima tetramérica de secuencia muy similar a la ADN girasa, la cual está codificada por los genes *parC* y *parE*. La topoisomerasa IV es capaz de relajar el ADN, pero no superenrollarlo, además de mostrar potente actividad decatenadora (Ruiz 2003, Bates y Maxwell 2005).

6.2.2 Complejo quinolona-ADN-topoisomerasa

Las quinolonas ejercen su efecto bactericida involucrándose en el complejo ADN-topoisomerasa formando un complejo ternario quinolona-ADN-topoisomerasa el cual se vuelve un veneno para la célula y provoca la muerte celular (Eisea *et al.*1992, Wilson y Gisvold 1998). Sin embargo, los detalles moleculares de cómo las quinolonas interfieren con la acción de las topoisomerasas o con el complejo ADN-topoisomerasa no están completamente claros (Kampranis y Maxwell 1998, Tuma *et al.* 2002, Siegmund *et al.*2005).

Shen y colaboradores (1989) han propuesto que la inhibición de la ADN girasa se debe a la unión cooperativa entre la quinolona y el ADN, modelo proveniente de estudios realizados con el norfloxaciono donde se sugiere que en presencia de ATP, en el momento en que el ADN se encuentra roto por la enzima, cuatro moléculas de quinolona se unen a cuatro bases desapareadas (ADN de una sola hebra) que forman un hueco mediante puentes de hidrógeno entre las bases y el grupo carbonilo de C-4 y el ácido carboxílico de C-3. Las moléculas de quinolona se unen además entre sí cooperativamente; probablemente mediante interacciones hidrofóbicas cola con cola entre los grupos del N-1 y apilamientos entre sus anillos aromáticos. Este modelo plantea que la enzima induce un sitio de unión específico para quinolonas en su sustrato, el material genético (fig 5).

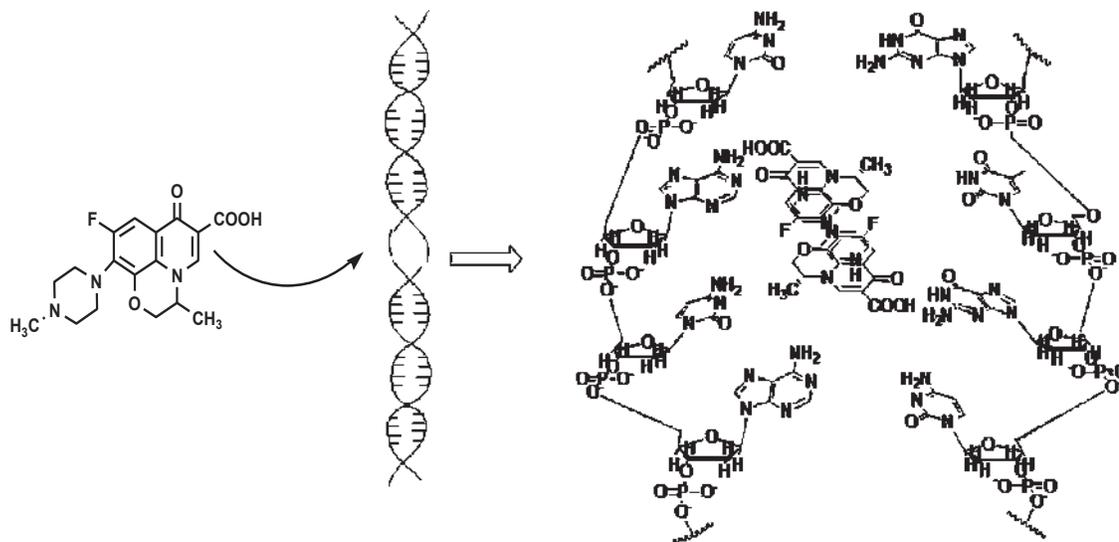


Figura 5. Modelo de unión cooperativa quinolona-ADN.

Esta propuesta implica cuatro moléculas de quinolona en cada sitio de unión; trabajos posteriores sugieren que dos moléculas pueden ser suficientes, pero el fundamento del modelo no se ve alterado. En ambos casos las moléculas de quinolona tienen sus grupos polares expuestos hacia fuera interactuando con las bases del ADN y la región interna no polar estabiliza el complejo por asociaciones lipofílicas (Mitscher 2005).

El modelo de Shen no toma en cuenta el hecho de que se requiere Mg^{2+} para la interacción ADN-quinolona. Ha sido demostrado que el Mg^{2+} se une a las quinolonas mediante los grupos carbonilo y carboxilato C-3 y C-4. Se ha propuesto que las quinolonas se unen a los grupos fosfodiéster de la columna de ADN mediante una coordinación electrostática entre éstos, el Mg^{2+} y los grupos C-3 y C-4 del fármaco y que esta coordinación puede ser estabilizada por la interacción entre las bases y la quinolona (Noble *et al.* 2003).

Otra modificación que se ha hecho al modelo de Shen es incluir interacciones electrostáticas entre el sustituyente del C-7 de la quinolona y la subunidad B de la girasa (Turel 2002).

6.3 Complejos quinolona-metal

El diseño de complejos fármaco-metal es de particular interés en la investigación farmacológica ya que la combinación con metales puede incrementar la actividad y en ocasiones disminuir la toxicidad del fármaco (Upadhyay *et al.* 2006). Se ha reportado también que el transporte de ligandos orgánicos puede ser facilitado por la formación de complejos con metales (Anwar *et al.* 2006).

Por su parte, las quinolonas son agentes acomplejantes para una gran variedad de iones metálicos. La coordinación de iones metálicos con estos antibióticos desempeña un importante papel en el mantenimiento de su estructura y función. (Upadhyay *et al.* 2006).

Se ha reportado en la literatura la síntesis de varios complejos Quinolona-Metal. En 2002, Turel recopila y reporta la obtención y caracterización de complejos entre diferentes quinolonas, tales como norfloxacin, ciprofloxacino y cinoxacin con diversos metales como bismuto, cadmio, hierro, plata, cobalto, zinc, boro y vanadio; en estos estudios se ha visto que el enlace más comúnmente observado en los complejos es el quelato que se forma entre el C-4 y uno de los oxígenos carboxílicos. Sin embargo, algunos complejos son diferentes; en casos aislados como en los complejos de plata y zinc con perfloxacin y norfloxacin respectivamente, el nitrógeno terminal de la piperazina participa en la unión con el metal (fig.6), parece ser que la diferencia en la unión con el metal radica en las condiciones de la reacción, en condiciones básicas es posible la formación de complejos con la piperazina lo cual no se lleva a cabo bajo condiciones ácidas debido a la protonación de la misma. Se encontró que estos complejos pueden formar desde dímeros hasta

tetrámeros, por ejemplo, se ha visto que el calcio forma complejos 1:1 (metal:fármaco), el magnesio, bismuto y hierro forman complejos 1:2 y el aluminio complejos 1:3 quinolona-metal (Turel 2002).

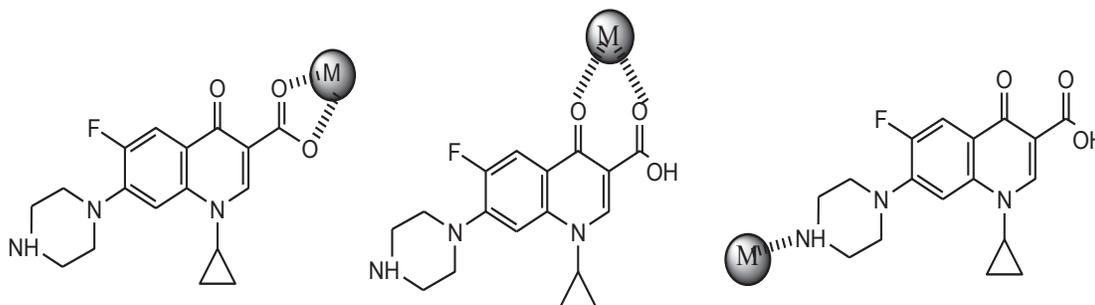


Figura 6. Diferentes complejos quinolona-metal.

La actividad antibacteriana de complejos quinolona-metal reportados hasta 2002 resultó semejante a la de los ligandos o ligeramente superior, y en muchos casos la actividad disminuyó considerablemente (Turel 2002).

En 2008 se reportó la síntesis y caracterización de complejos de enrofloxacin (7) con magnesio(II), hierro(III), cobalto(II), níquel(II), zinc(II) y cadmio(II) en todos los casos el enrofloxacin desprotonado actúa como ligando bidentado a través del oxígeno de la piridona y uno de los oxígenos del carboxilato. Cada metal está hexacoordinado y se propone una geometría octaédrica ligeramente distorsionada (fig.6a). Se evaluó la actividad antibacteriana de los complejos obteniendo como resultado que los derivados con hierro y cobre presentaron mayor actividad frente a cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* que el enrofloxacin; el resto de los complejos presentaron menor o igual actividad que la quinolona base frente a los mismos microorganismos. Los complejos con cobre, níquel y zinc presentaron mayor actividad que el enrofloxacin y el resto de los complejos frente a *S. aureus* (Efthimiadou *et al.*2008).

En el mismo año se reporta la síntesis y caracterización de cinco nuevos complejos de ciprofloxacino (1) con manganeso(II), hierro(III), cobalto(II), níquel y

molibdeno(II), en todos los complejos el ciprofloxacino actúa como ligando bidentado, proponiéndose una geometría similar a la propuesta para los complejos con enrofloxacino. Aún no se ha reportado la actividad antibacteriana de estos complejos (Psomas 2008).

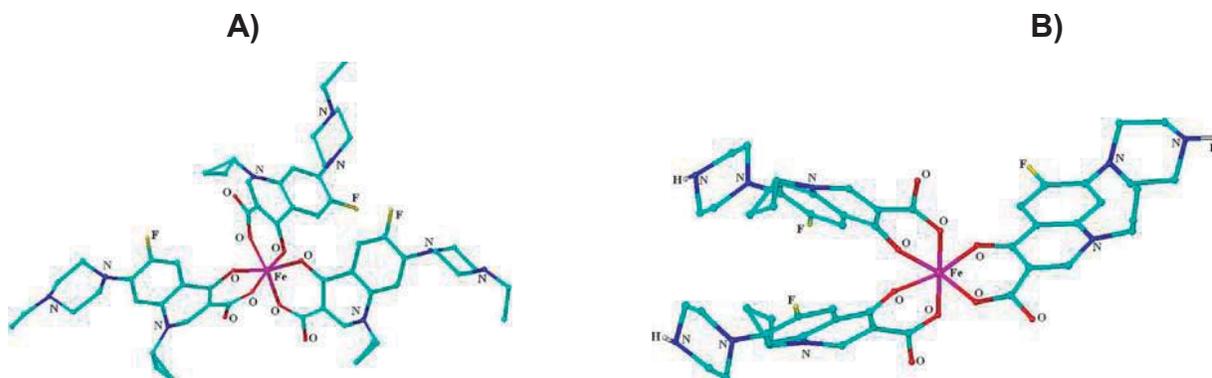


Figura 7. Modelo de los complejos enrofloxacino- Fe^{+3} (A) y ciprofloxacino- Fe^{+3} (B) reportados en 2008 por Efthimiadou y Psomas respectivamente.

6.3.1 Complejos con bismuto

El bismuto es un elemento metálico escaso en la naturaleza, de color rosáceo. Su número atómico es 83 y se encuentra en el grupo 5A de la tabla periódica. En compuestos, tiene valencias de +3 o +5, siendo más estables los compuestos de bismuto trivalente. Existen varios nitratos, especialmente el nitrato de bismuto, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, o trinitrato de bismuto, y su pentahidrato, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, que se descompone a oxinitrato de bismuto.

El bismuto es un elemento único por su baja toxicidad y su naturaleza no carcinogénica, a pesar de ser un metal pesado (Kotani *et al.* 2005). La química del bismuto no ha recibido tanta atención comparada con otros elementos como el N o el P; sin embargo, en los últimos años ha crecido el interés por investigar más acerca de este elemento (Silvestru 1999).

Los compuestos de bismuto han sido utilizados por sus propiedades medicinales y antimicrobianas durante siglos, incluyendo su aplicación tópica en ciertas alteraciones de la piel, administración parenteral para la sífilis y administración oral y rectal para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales como úlceras duodenales, gastritis, diarrea crónica, diarrea del viajero y algunas diarreas infantiles. También han sido empleados como fungicidas (Domenico *et al.* 1997, Mahony *et al.* 1998) y algunos complejos han sido utilizados como agentes anticancerígenos (Hongzhe y Szeto 2003).

Varias preparaciones de bismuto como el subsalicilato de bismuto (Pepto Bismol), subnitrate de bismuto y subcitrato coloidal de bismuto se emplean muy frecuentemente en combinación con otros antibióticos para la erradicación de *Helicobacter pylori*. Los complejos ranitidina-citrato de bismuto se usan frecuentemente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales (Anwar *et al.* 2006). El mecanismo de acción del bismuto no está del todo claro (Phillips *et al.* 2000).

La investigación farmacológica de nuevos compuestos de bismuto ha permitido el desarrollo de medicamentos con interesante actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Kotani *et al.* 2005). Por ejemplo los tioles de Bismuto que son una nueva clase de agentes antibacterianos con una elevada actividad contra Gram positivos y Gram negativos. En estos compuestos el tiol actúa como un acarreador lipofílico que permite al bismuto entrar en la célula y una vez dentro actuar como un veneno inhibiendo el crecimiento y causando muerte celular (Veloira *et al.* 2003).

Los compuestos heterocíclicos con Bi (III) así como los tioles de bismuto son un grupo prometedor de nuevos agentes antibacterianos, candidatos para el desarrollo de compuestos con aplicaciones clínicas (Kotani *et al.* 2005). Se ha

encontrado que los compuestos con bismuto pueden prevenir la aparición de resistencia bacteriana (Carvalho *et al.* 1998, Phillips *et al.* 2000). También se cree que el bismuto en forma de complejo es más estable y mejor tolerado que en forma de sal (Anwar *et al.* 2006).

Como se mencionó en el apartado anterior, las quinolonas tienen la capacidad de acomplejar iones metálicos a través de distintos sitios donde puede llevarse a cabo una coordinación. Debido a las propiedades que presenta el bismuto, resulta de gran interés el estudio de su interacción con estos agentes farmacológicos.

Existe un reporte en la literatura de dos compuestos iónicos entre bismuto y ciprofloxacino obtenidos por Turel en 2002, ambos preparados bajo condiciones ácidas y resultaron derivados con muy baja actividad antimicrobiana comparados con el ligando.

En el 2006 se reportó la formación de un complejo norfloxacino (**8**) con bismuto, sintetizado bajo condiciones alcalinas partiendo del citrato de bismuto, con mayor actividad frente a diferentes microorganismos Gram positivos y Gram negativos que el norfloxacino solo. En este complejo el metal se coordina con los oxígenos carboxílicos de la quinolona; la relación metal-quinolona es 1:4 (fig.8) (Anwar *et al.* 2006).

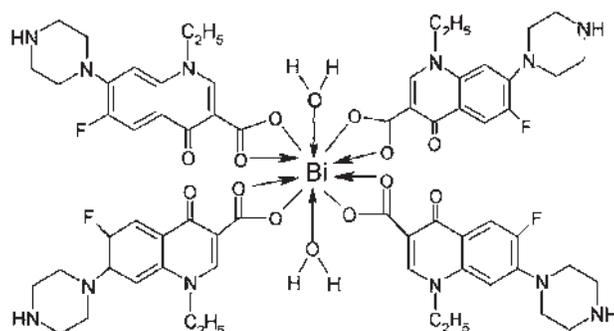


Figura 8. Estructura propuesta por Anwar en 2006 para el complejo norfloxacino-Bi.

Nuestro equipo de trabajo se ha enfocado al estudio de las fluoroquinolonas y de los complejos que éstas pueden formar con Bi(III). Previamente se obtuvo un complejo derivado de ciprofloxacino (**1**) con nitrato de bismuto, el cual mediante pruebas de susceptibilidad por difusión en agar, presentó una mayor actividad que el ciprofloxacino contra algunas cepas clínicas de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Sin embargo, este complejo así como otros sintetizados con ciprofloxacino, nitrato de bismuto y distintas aminas resultaron insolubles, razón por la cual fue imposible determinar cuantitativamente su actividad. (Barrera, 2005, Aguirre 2006). Posteriormente se obtuvo un complejo ofloxacino-Bi(III) (**14**) el cual resultó soluble en dimetil sulfóxido, permitiendo la determinación de su CMI sobre cepas clínicas de *P. aeruginosa* donde el complejo mostró tener el doble de actividad comparado con el ligando. Dentro de la serie de complejos obtenidos, se encontraban algunos sustituidos en la posición 7 con sustituyentes que originan impedimento estérico como los adamantanilos. La actividad antibacteriana de éstos fue considerablemente disminuída o anulada lo que indica que no es el metal el único responsable de la actividad sino el complejo propiamente dicho (Barbosa 2007).

Estos antecedentes hacen surgir el interés por investigar la posible relación mecanística entre los complejos y la quinolona de la que derivan para entonces estudiar si actúan bajo el mismo mecanismo de acción molecular o bien si el incremento de actividad se debe a que éstos estén dirigidos hacia un blanco diferente. Hasta el momento no se han reportado en la literatura estudios acerca del blanco de acción de los complejos quinolona-metal. Así como tampoco existen reportes de la obtención de complejos ofloxacino-Bi(III) (**14**).

En el presente trabajo se realizó la obtención de un complejo ofloxacino-Bi(III) y estudios de su actividad frente a *E. coli* ATCC 25922, demostrándose que el complejo presenta una mayor actividad comparada con la actividad del ligando frente a esta cepa de referencia. Así mismo se demuestra la relación mecanística

entre los complejos fluoroquinolona-Bi(III) y las fluoroquinolonas mediante ensayos de inhibición de los complejos sobre topoisomerasas bacterianas.

VII. Resultados y discusión

7.1 Obtención y caracterización del complejo ofloxacino-Bi(III)

Inicialmente se pretendió obtener una serie de complejos de ofloxacino (**2**) con diferentes sales de bismuto y evaluar la función de la sal en la formación y actividad del complejo. Las sales de bismuto empleadas para acomplejarse con ofloxacino fueron $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, BiCl_3 , BiPO_4 y $\text{Bi}(\text{TfO})_3$. Las síntesis se llevaron a cabo con metóxido de sodio. La decisión de utilizar condiciones alcalinas cumple con dos funciones: la primera es que en condiciones ácidas se forman sales con la piperazina y estas, como es sabido, son inactivas, la segunda es que el oxígeno cargado negativamente forma complejos con el bismuto dada la oxofilia de éste.

La formación de complejos con cloruro, fosfato y triflato de bismuto originaron compuestos insolubles mientras que el complejo derivado de nitrato de bismuto presentó solubilidad en dimetil sulfóxido (DMSO) y agua (H_2O) razón por la cual se decidió trabajar sólo con este último ya que este sí permitiría llevar a cabo exitosamente las pruebas de actividad antibacteriana así como los ensayos sobre las topoisomerasas, que implican un análisis cuantitativo

Es importante mencionar que el complejo ofloxacino-Bi (III) (**14**) es soluble en los mismos solventes reportados para otros complejos caracterizados como ciprofloxacino-metal (Psomas 2008) y enrofloxacino-metal (Efthimiadou 2006, Efthimiadou 2008).

Como se mencionó en los antecedentes, se encuentran descritas tres posibilidades de complejación entre quinolona y metales (Fig.6). Debido a que el átomo de Bi (III) con ligandos electronegativos actúa como ácido fuerte de Lewis (Thurston y Withmire 2001), el metal es capaz de coordinarse con cualquier átomo dentro de la estructura de la quinolona con posibilidad de proporcionarle pares

electrónicos para que se efectúe tal coordinación. Considerando esta premisa, es de esperar que los átomos de la fluoroquinolona que se acomplejan con el metal más fácilmente sean los oxígenos, dentro de los cuales los del carboxilato, al estar cargados negativamente, favorecerían la formación del complejo representado en la figura 9.

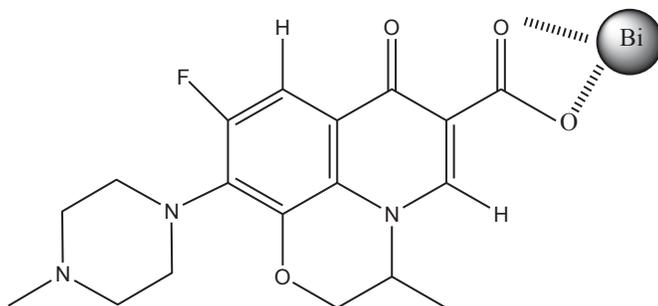


Figura 9. Modelo del complejo ofloxacino-Bi sugerido.

Idealmente, la caracterización del complejo sería mediante difracción de rayos X, por lo que se intentó cristalizar el complejo. Sin embargo, no fue posible obtener cristales a temperatura ambiente en DMSO y agua. Probablemente en parte debido a que el complejo descompone espontáneamente con el tiempo en solución y en presencia de calor.

Debido a la imposibilidad de caracterizar el complejo mediante difracción de rayos X se recurrió a otras técnicas espectroscópicas que aportan información estructural relevante y que han sido utilizadas para caracterizar complejos fluoroquinolona-metal: espectroscopía de Infrarrojo (IR), espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN de ^1H) y Análisis Elemental (AE).

7.1.1 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

La espectroscopia de IR ha sido ampliamente utilizada para la elucidación de este tipo de complejos pues aporta información relevante sobretodo de carbonilos acomplejados con metales. La región más representativa para las quinolonas está ubicada entre 1300 y 1800 cm^{-1} ; en esta región se encuentran las bandas correspondientes a los grupos carbonilo de la piridona y del ácido carboxílico, las cuales han sido completamente caracterizadas y generan el acomplejamiento con metales (Turel 2002, Anwar 2006, Psomas 2008). En la mayoría de las quinolonas el grupo carbonilo de la piridona presenta una banda típica alrededor de 1620 cm^{-1} , mientras que la banda correspondiente al ácido carboxílico se encuentra alrededor de 1716 cm^{-1} (Turel 2002, Anwar 2006). La ausencia, desplazamiento o bien disminución de la intensidad de estas bandas es indicativa de la formación de complejo con piridona y carboxilato.

En la figura 10 se muestran los espectros de IR obtenidos para el ofloxacino (**2**) y su complejo derivado de bismuto (**14**).

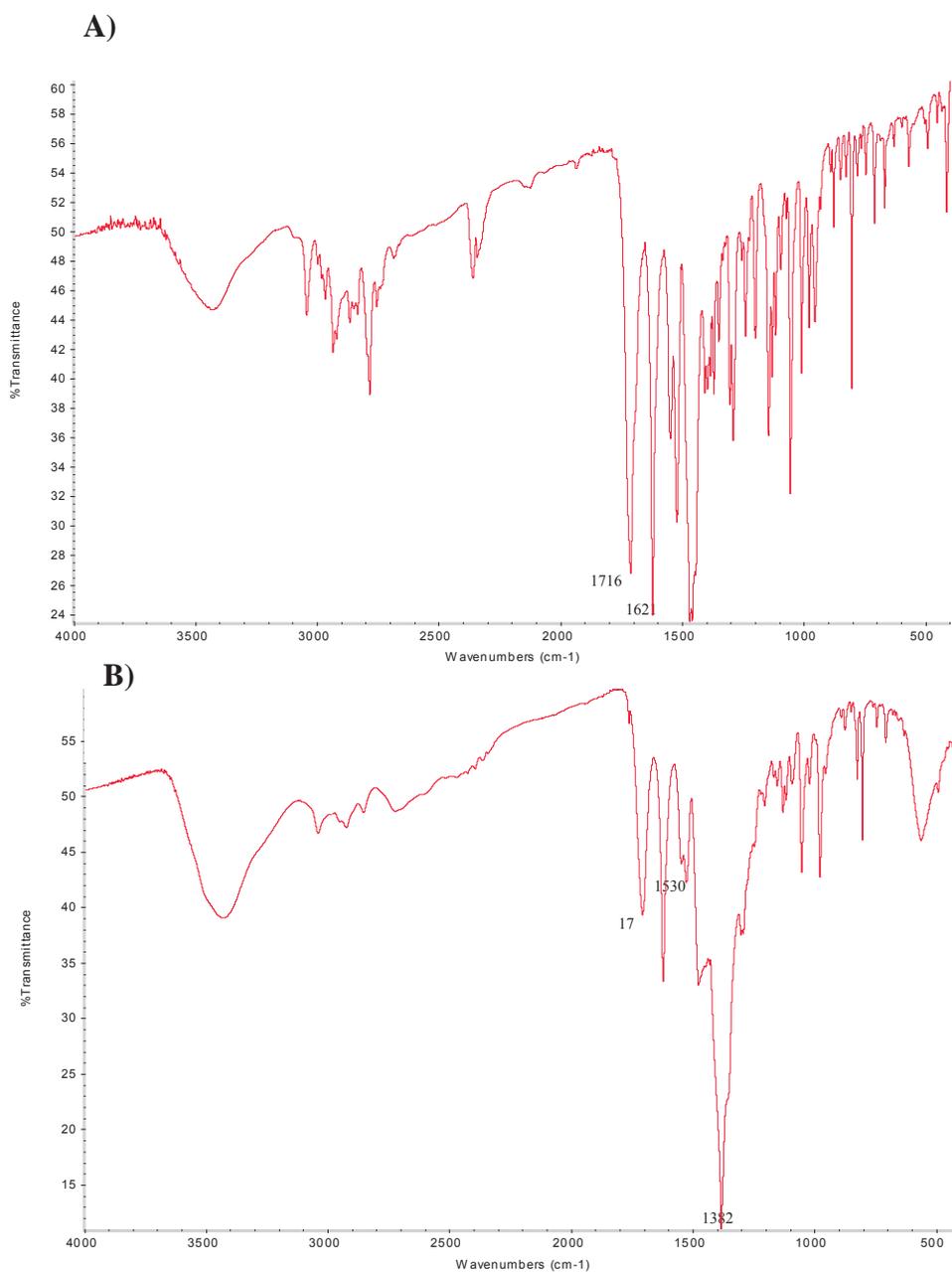


Figura 10. Espectros de IR del ofloxacino (A) y del complejo ofloxacino-Bi (B).

En la figura 10A se puede apreciar el espectro correspondiente al ofloxacino (2), el cual presenta la banda característica para el alargamiento de C=O de ácido carboxílico en 1716 cm^{-1} mientras que la banda correspondiente al C=O de la piridona se encuentra en 1621 cm^{-1} . En el espectro correspondiente al complejo

ofloxacino-Bi(III) (**14**) se reduce notablemente la intensidad de la banda correspondiente al ácido, mientras aparecen 2 nuevas bandas en 1530 cm^{-1} y 1382 cm^{-1} (fig.10B), las cuales en la literatura se han asignado como bandas correspondientes a los estiramientos simétricos y asimétricos del anión carboxilato (O-C-O), respectivamente. El espectro es muy similar al reportado para el complejo ciprofloxacino- Cu^{+2} (Turel 1994).

7.1.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN de ^1H)

La formación de complejo metálico se sustentó asimismo mediante RMN de ^1H ; la comparación de los desplazamientos químicos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Desplazamiento químico (ppm) en los espectros de RMN de ^1H del ofloxacino y del complejo ofloxacino-Bi.

Átomo *	Ofloxacino	Ofloxacino-Bi ⁺³
H1a	4.65	4.90
H1b	4.38	4.41
H1b'	4.59	4.61
H1c	1.42	1.42
H2	8.90	9.26
H5	7.60	7.62
H2',H6' o H3',H5'	3.50-2.40	3.58-2.30
H4'	2.22	2.84

* Numeración de protones de acuerdo con la figura 11

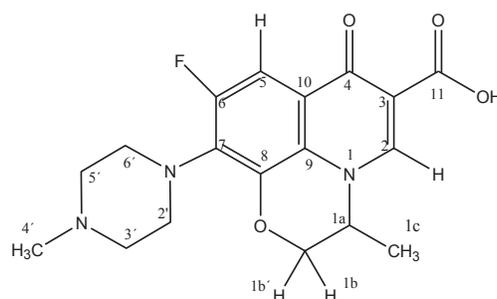


Figura 11. Asignación de protones para el ofloxacino.

Al comparar los datos espectroscópicos del complejo ofloxacino-Bi (**14**) con respecto al de su ligando se observa una diferencia en los desplazamientos químicos de los protones H1a (0.25 ppm) y H2 (0.36 ppm) hacia campo bajo, lo cual da indicio de la presencia de un grupo electroatractor cercano a ellos indicando que el bismuto se está acomplejando con el carboxilato de la quinolona.

También se observa una perturbación en el desplazamiento del protón H4' (0.62 ppm). En principio, no se esperaba desplazamiento químico representativo en esta región pues el complejo se encuentra relativamente lejano al carboxilato. Este cambio en el desplazamiento de los protones de la piperazina puede deberse a que el bismuto se encuentra acomplejado con el nitrógeno de la misma, lo cual sería improbable habiendo un carboxilato presente en la molécula con el cual puede interactuar. Sin embargo se sabe que las sales de nitrato de bismuto al descomponerse liberan el ácido correspondiente, pudiendo ocurrir una protonación de la piperazina, lo cual explicaría el cambio en el ambiente químico y por lo tanto la diferencia en los desplazamientos del heterociclo. De ser así, sería un desplazamiento similar al que se encontrara si se tratase de ofloxacino protonado por HNO_3 .

Con la finalidad de comprobar si efectivamente se estaba formando una sal con la piperazina como parte del complejo y además descartar la posibilidad de que el producto obtenido fuese simplemente una sal, es decir nitrato de ofloxacino y no

un complejo ofloxacino-Bi(III), se decidió obtener la sal de nitrato de ofloxacino haciéndose reaccionar este con ácido nítrico dando lugar a un compuesto altamente soluble en agua e insoluble en DMSO y cuyas señales en el espectro de RMN de ^1H se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Desplazamiento químico (ppm) en los espectros de RMN de ^1H del ofloxacino y la sal derivada de ofloxacino con ácido nítrico (numeración de protones de acuerdo con la figura 11).

Átomo *	Ofloxacino	Ofloxacino- HNO_3
H1a	4.65	4.65
H1b	4.38	4.4
H1b'	4.59	4.61
H1c	1.42	1.42
H2	8.90	9.00
H5	7.60	7.61
H2',H6' o H3',H5'	3.50-2.40	3.58-3.20
H4'	2.22	2.86
Nitrógeno protonado		9.64

Como se puede apreciar en la tabla 4, los cambios más notables en los desplazamientos químicos del nitrato de ofloxacino son las encontradas para los protones H3', H5' (0.8 ppm) y para el H4 (0.64 ppm), señales correspondientes a protones de la piperazina, pero a diferencia del complejo ofloxacino-Bi(III), el resto de las señales de la quinolona se mantienen prácticamente en el sitio de la materia prima, lo que confirmó que se está obteniendo un complejo en el que se forma además el nitrato de la piperazina.

7.1.3 Análisis elemental

Finalmente fue posible determinar el porcentaje de cada elemento presente en el complejo mediante la técnica de análisis elemental.

Los resultados del análisis se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Análisis elemental del complejo ofloxacino-Bi(III)

Elemento	Datos analíticos observados (%)	Datos analíticos calculados (%)	Pesos atómicos (g/mol)	Proporciones atómicas relativas (mol/g)	Relaciones atómicas.
C	21.7	21.711288	12.01	1.809	20
H	2.4	2.459659	1.008	2.440	27
N	8.71	8.861562	14.01	0.633	7
Bi		37.775662	209.0	0.181	2
F		1.717092	19.0	0.090	1
O		27.474748	16.0	1.717	19

En base a los resultados obtenidos mediante espectroscopía y análisis elemental, se propone la siguiente estructura para el complejo ofloxacino-Bi(III) obtenido:

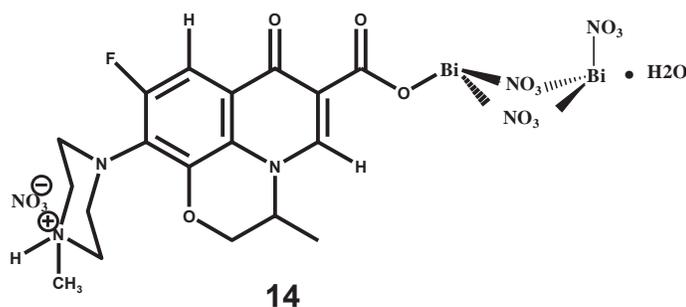


Figura 12. Estructura propuesta para el complejo ofloxacino-Bi(III).

7.2 Evaluación de la actividad antibacteriana del complejo ofloxacino-Bi(III)

Los complejos entre moléculas orgánicas y metales generalmente resultan insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos, razón que dificulta evaluar su actividad biológica. El complejo ofloxacino-Bi obtenido en el presente trabajo resultó soluble en dimetil sulfóxido (DMSO) y agua, facilitando así la determinación de su actividad a través de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del mismo. Este valor proporciona la eficacia de un agente quimioterápico y se define como la concentración más baja de un fármaco que impide el crecimiento de un determinado patógeno (Prescott 2003).

El patógeno seleccionado para evaluar la actividad antibacteriana del complejo fue *Escherichia coli*. La elección de esta enterobacteria se sustenta en base a lo siguiente: a) Es la especie bacteriana más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido responsabilizada de un sin número de enfermedades infecciosas que involucran virtualmente todos los tejidos y sistemas en humanos. (Koneman *et al.* 2001); b) Es el patógeno principal causante de infecciones en vías urinarias, patología para la cual las quinolonas se están convirtiendo en fármacos de primera elección debido a la continua aparición de cepas multiresistentes a los antibióticos tradicionales (Farina *et al.* 2007, Narros *et al.* 2007); c) el ofloxacino, al

igual que todas las quinolonas de segunda generación, presenta una mayor actividad sobre bacterias Gram-negativas, entre las que se incluye *E. coli* (Alós 2003).

Para realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria se utilizó el Método de Macrodilución en Tubo establecido por el NCCLS en 1997, el cual se encuentra descrito en el apartado de material y métodos. Se decidió utilizar este método ya que es el recomendado cuando la cantidad de microorganismos en estudio no es muy elevada (Osheroff y Bjornsti 2001, NCCLS 1997).

El ensayo consiste en añadir concentraciones crecientes del antibiótico a tubos con caldo de cultivo a los que también se adiciona una cantidad estandarizada del cultivo bacteriano. Al final del cultivo (18 horas), la CMI se reportó a través de la observación de la turbidez a ojo desnudo (NCCLS,1997). El ensayo se llevó a cabo por duplicado y los resultados se muestran en las figuras 13 y 14:



Figura 13. Determinación de la CMI del ofloxacino sobre cepas de *E.coli* ATCC 25922.

Los cultivos estandarizados de la cepa bacteriana se incubaron por 18h en presencia de distintas concentraciones del antibiótico ($1\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta $1.95 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$).



Figura 14. Determinación de la CMI del complejo ofloxacino-Bi sobre cepas de *E.coli* ATCC 25922.

Se partió de una concentración de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico y se realizó una serie de diluciones 1:2 hasta una concentración de $1.95 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados mostrados son tras 18 horas de incubación con una cantidad estandarizada de bacteria, bajo condiciones de temperatura y ambientes ideales para su crecimiento.

En las figuras 13 y 14 se aprecian los resultados de la determinación de la CMI observados a contraluz a ojo desnudo. En la figura 13, correspondiente al ofloxacino se observa ausencia de turbidez hasta la dilución de $0.125 \mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para el complejo ofloxacino-Bi (fig. 14), la ausencia de turbidez se mantiene hasta la concentración de $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$. Estos resultados se pueden resumir en la figura 15,

donde se muestra el incremento de actividad del complejo con respecto a la actividad de su ligando.

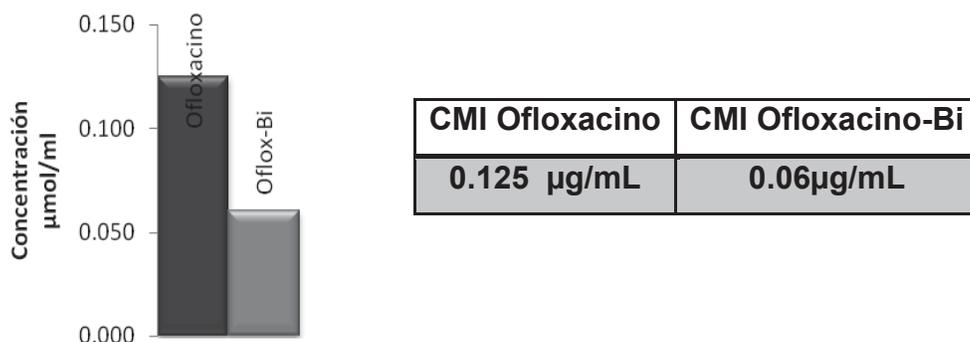


Figura 15. Comparación de la CMI ($\mu\text{g/mL}$) entre el complejo ofloxacino-Bi y ofloxacino frente a cepas de *E. coli* ATCC 25922.

Con el fin de establecer una relación cuantitativa respecto a la prueba de CMI, se obtuvieron las lecturas de absorbancia a 590nm de cada uno de los cultivos.

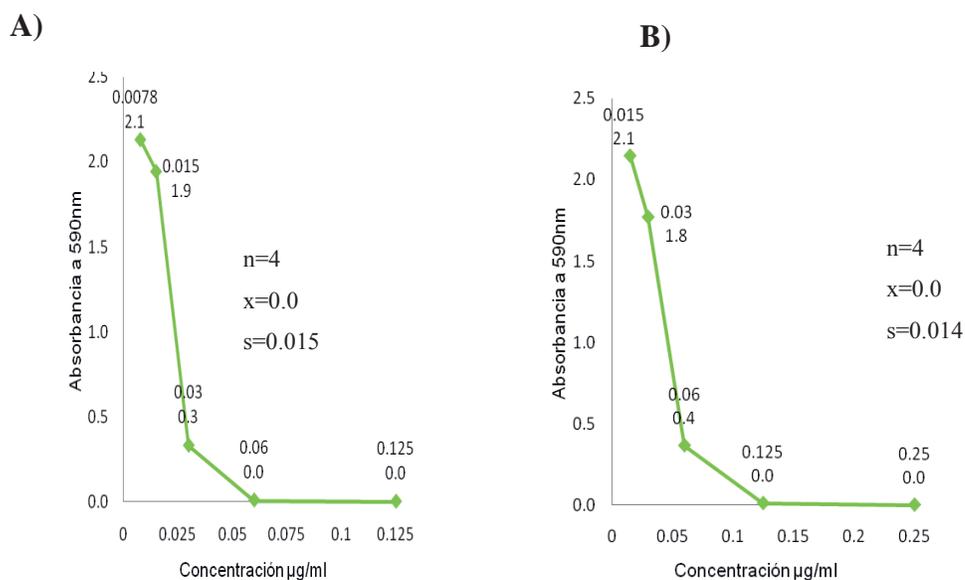


Figura 16. Determinación de la CMI utilizando absorbancia a 590nm.

Los cultivos en tubo de cada uno de los tratamientos A) ofloxacino-Bi y B) ofloxacino se leyeron a 590nm y los resultados se graficaron de acuerdo a la concentración de cada uno de los compuestos.

En la gráfica 16A se aprecia que la última concentración con ausencia de turbidez para el complejo ofloxacino-Bi detectada por el espectrofotómetro a 590nm es de 0.06 $\mu\text{g/ml}$ mostrando una absorbancia promedio de 0.0 ± 0.015 . A una concentración de 0.03 $\mu\text{g/ml}$ se aprecia un incremento bastante notable en la absorbancia alcanzando un valor promedio de 0.3 ± 0.15 .

En la gráfica 16B, correspondiente al ofloxacino, se aprecia que la última concentración con ausencia de turbidez es de 0.125 $\mu\text{g/mL}$ mostrando una absorbancia promedio de 0.0 ± 0.014 . A una concentración de 0.06 $\mu\text{g/mL}$ se aprecia un incremento bastante notable en la absorbancia alcanzando un valor promedio de 0.4 ± 0.11 . Con estos resultados se corroboran los datos obtenidos a ojo desnudo; la CMI para el ofloxacino es de 0.125 $\mu\text{g/mL}$, el doble a la obtenida para su complejo derivado con bismuto que presenta una CMI de 0.06 $\mu\text{g/mL}$.

La forma más práctica y común de reportar los resultados de este ensayo es en términos de $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, teniendo en cuenta que los complejos con Bi(III) poseen un mayor peso molecular que las quinolonas solas, para hacer un análisis más preciso, es conveniente comparar la CMI en términos de micromoles/ mL en lugar de microgramos/ mL.

El peso molecular del ofloxacino es 361g/mol, mientras que el peso correspondiente al complejo con bismuto es 1044g/mol. Haciendo las conversiones necesarias en base a los datos obtenidos de la determinación de la CIM en $\mu\text{g/mL}$, tenemos los resultados mostrados en la figura 17:

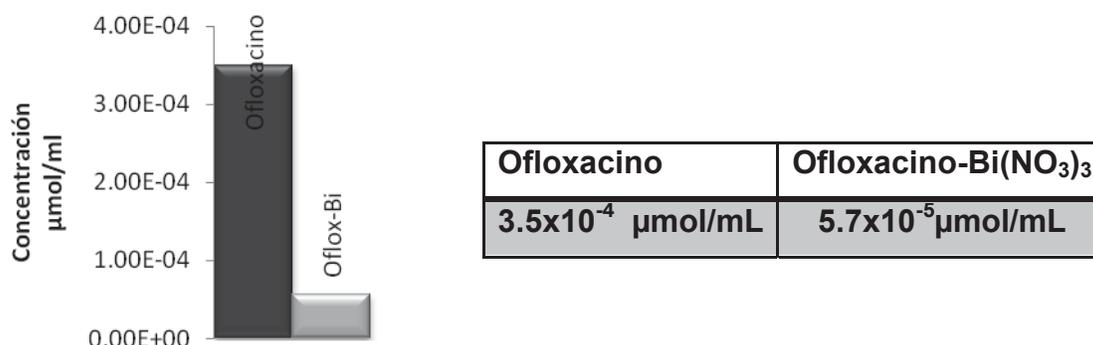


Figura 17. Comparación de la CMI (μmol/mL) entre el complejo ofloxacino-Bi y ofloxacino frente a cepas de *E. coli* ATCC 25922.

Haciendo la relación para comparar la actividad del complejo frente a la de su ligando en μmol/mL tenemos:

$$\frac{\text{CMI oflox } 3.5 \times 10^{-4} \text{ } \mu\text{mol/mL}}{\text{CMI oflox-Bi(III) } 5.7 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{mol/mL}} = 6.14$$

Por lo tanto, el complejo Ofloxacino-Bi presenta una actividad seis veces mayor in vitro frente *E.coli* ATCC 25922 comparada con la actividad del ofloxacino.

7.3 Pruebas de inhibición del complejo sobre la ADN girasa y topoisomerasa IV.

Los fármacos son típicamente compuestos polifuncionales, diseñados para interactuar con receptores específicos. Como se ha mencionado en apartados anteriores, el receptor o blanco de acción de las quinolonas son las topoisomerasas bacterianas: ADN girasa y topoisomerasa IV (Anderson *et al.* 1998, Holden 2001). Una pequeña modificación en la estructura de cualquier fármaco puede provocar cambios muy significativos en la actividad biológica de éste (Wilson y Gilsvold 1998).

La presencia de un metal, en este caso bismuto, acomplejado con la quinolona podría modificar el blanco de acción de la misma.

El incremento en la actividad antibacteriana del complejo ofloxacino-Bi comparada con la de su ligando como se mostró en el apartado anterior, podría deberse a que no estén actuando al mismo nivel. Para establecer si existe relación mecanística entre las quinolonas y los complejos quinolona-Bi(III) se realizaron pruebas de inhibición del complejo sobre la ADN girasa y topoisomerasa IV.

7.3.1 Ensayos de inhibición del complejo sobre la actividad de superenrollamiento de la ADN girasa

Al ser la ADN girasa una enzima implicada en procesos necesarios para mantener la integridad celular, y dado que sólo se encuentra presente en células procariotas, se convierte en un blanco ideal para agentes antibacterianos. La evaluación de fármacos como potenciales inhibidores de la DNA girasa se realiza mediante ensayos de inhibición de la actividad de superenrollamiento de la enzima (Osheroff y Bjornsti 2001).

Para realizar los ensayos de inhibición del complejo sobre la ADN girasa se utilizó el kit comercial "DNA relajado y DNA girasa purificada de *E.coli*" fabricado por la compañía inspiralis . La utilización de este kit ha sido reportada en la literatura para ensayos de diferentes agentes antibacterianos como potenciales inhibidores de la topoisomerasa (Galm *et al.* 2004, Hashimi *et al.* 2007).

Los estudios de inhibición enzimática consistieron en incubar el plásmido pBR322 relajado (incluido en el kit comercial) con diferentes concentraciones del complejo en presencia de la enzima y bajo las condiciones de temperatura y ambiente adecuados, descritos en el apartado de material y métodos. El resultado de

la interacción plásmido-enzima-complejo se analizó electroforéticamente, esperando únicamente la aparición de la banda perteneciente al plásmido relajado en caso de que el complejo esté inhibiendo la actividad enzimática, es decir, la banda perteneciente a ADN superenrollado no debe aparecer.

Se realizaron 3 repeticiones del ensayo. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura 18:

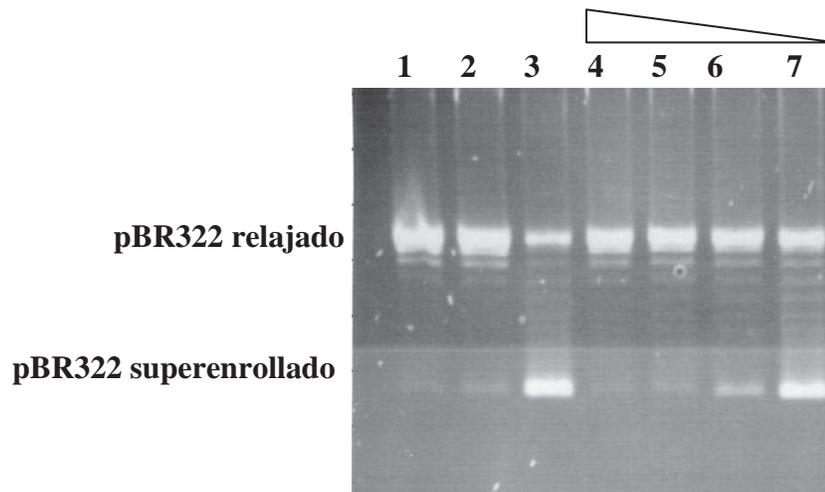


Figura 18. Efecto del complejo ofloxacino-Bi sobre la actividad de superenrollamiento de la ADN girasa.

Se incubaron distintas concentraciones del complejo en presencia de ADN girasa bajo condiciones requeridas para el desarrollo de la actividad superenrolladora de la enzima, esperando comprobar si el complejo inhibe esta función. Carril 1: pBR322 relajado, carril 2: control negativo (ADN + enzima + ciprofloxacino), carril 3 :control positivo (ADN + enzima), carril 4 a 7 plásmido + enzima + concentraciones decrecientes de complejo (se partió de una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, carril 4; y se realizaron diluciones 1:10 hasta una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, carril7).

En el carril 1 de la figura 18 se observa el corrimiento electrofóretico del plásmido pBR322 relajado, en el carril 2 (control negativo) se observa que el plásmido corre al mismo nivel que en el carril 1, ya que la actividad de superenrollamiento de la enzima se encuentra inhibida por el ciprofloxacino. En el carril 3 (control positivo) se aprecia que el plásmido relajado en presencia de la ADN girasa se interconvierte a su isoforma superenrollada, la cual al ser más compacta tiene una migración electroforética mayor que aparece como una nueva banda al final del gel. En los carriles 4, 5 y 6 se ve ausencia de la banda perteneciente a la isoforma superenrollada del plásmido, por lo tanto, el complejo ofloxacino-Bi es capaz de inhibir la actividad enzimática a estas concentraciones, es decir, el complejo ofloxacino-Bi es capaz de inhibir la actividad de la ADN girasa a concentraciones mayores de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

7.3.2 Ensayos de inhibición del complejo sobre la actividad de relajación de la topoisomerasa IV

La topoisomerasa IV es el segundo blanco de acción de las quinolonas en *Escherichia coli*; esta enzima es menos sensible a dichos antibióticos que la ADN girasa. Ensayos de inhibición de la actividad relajante de la topoisomerasa IV han sido ampliamente utilizados para evaluar la actividad de diferentes fluoroquinolonas como potenciales inhibidores de la actividad relajante de dicha enzima (Hoshino *et al.* 1994). Para realizar los ensayos de inhibición del complejo sobre la topoisomerasa IV se siguió el protocolo establecido por los fabricantes del kit comercial “Ensayos de relajación de topoisomerasa IV” de la compañía Inspiralis. El ensayo es muy similar al ensayo de inhibición de la ADN girasa.

Se utilizó el plásmido pBR322 superenrollado (incluido en el kit comercial) para realizar la prueba, la cual se encuentra descrita en el apartado de material y métodos, y consiste en incubar el plásmido con diferentes concentraciones del

complejo en presencia de la enzima. En el análisis electroforético se espera únicamente la aparición de la banda perteneciente al plásmido superenrollado en caso de que el complejo esté inhibiendo la actividad enzimática, es decir, la banda perteneciente al ADN relajado no debe aparecer.

Se realizaron 3 repeticiones del ensayo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 19:

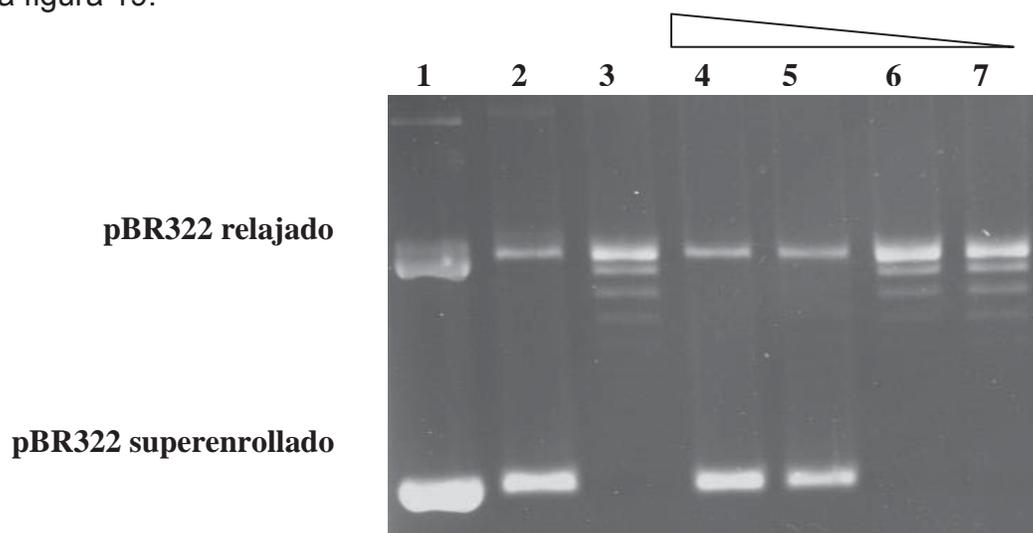


Figura 19. Efecto del complejo ofloxacino-Bi sobre la actividad de superenrollamiento de la topoisomerasa IV.

Se incubaron distintas concentraciones del complejo en presencia de topoisomeras IV bajo condiciones requeridas para el desarrollo de la actividad relajante de la enzima, esperando comprobar si el complejo inhibe esta función. Carril 1 : pBR322 superenrollado, carril 2 : control negativo (ADN + enzima + ciprofloxacino), carril 3:control positivo (ADN + enzima), carril 4 a 7 ADN + enzima + concentraciones decrecientes de complejo (se partió de una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, carril 4; y se realizaron diluciones 1:10 hasta una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, carril 7).

En la parte inferior del carril 1 de la figura 19 se observa el corrimiento electrofóretico del plásmido pBR322 superenrollado, en el carril 2 (control negativo) se observa que el plásmido corre al mismo nivel que en el carril 1, ya que la actividad relajante de la enzima se encuentra inhibida por el ciprofloxacino. En el carril 3 (control positivo) se aprecia que el plásmido superenrollado en presencia de la topoisomerasa IV se interconvierte a su isoforma relajada, la cual al ser menos compacta tiene una migración electroforética menor que aparece como una banda en la parte superior del gel. En los carriles 4 y 5 se observa claramente la banda correspondiente a la isoforma superenrollada del plásmido y disminución de la banda correspondiente a ADN relajado; por lo tanto, el complejo ofloxacino-Bi es capaz de inhibir la actividad enzimática a estas concentraciones; es decir, el complejo ofloxacino-Bi es capaz de inhibir la actividad de la topoisomerasa IV a concentraciones mayores de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Los estudios de inhibición del complejo sobre la ADN girasa y topoisomerasa IV indican que el incremento de actividad del complejo ofloxacino-Bi no se debe a que éste actúe a un nivel distinto al de su ligando.

7.4 Ensayos de interacción del complejo con el material genético.

El incremento de actividad del complejo ofloxacino-Bi sobre la actividad del ligando podría deberse a la presencia de un grupo fuertemente electroattractor como el bismuto acompañado con el carboxilato en posición 3 de la quinolona pudiendo facilitar la coordinación de la fracción piridona-carboxílica de ésta con el magnesio, coordinado con los grupos fosfatos del ADN, de acuerdo con el modelo propuesto por Noble *et al.* en 2003, y a su vez favorecer el ataque nucleofílico de la topoisomerasa mediante el cual se lleva a cabo la ruptura o hidrólisis del material genético (Fig.20) ocurriendo la formación del complejo ternario quinolona-ADN-topoisomerasa.

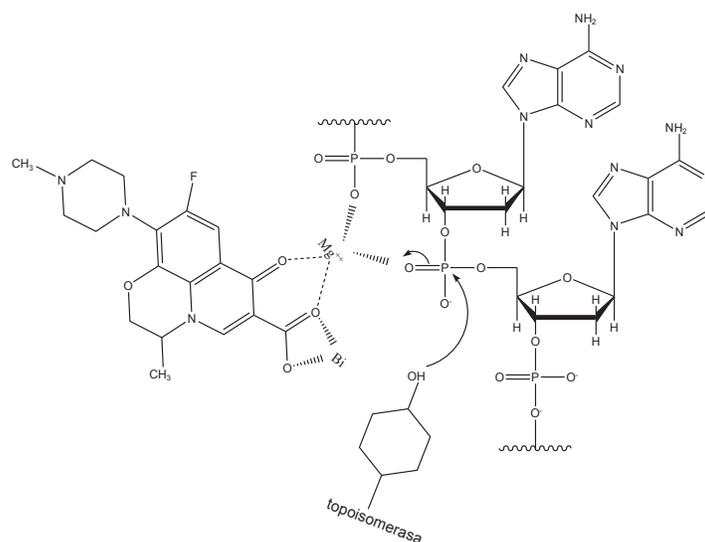


Figura 20. Propuesta de interacción del complejo ofloxacino-Bi con el ADN.

Para comprobar esta teoría se realizaron pruebas sobre ADN plasmídico, pUCP20; los ensayos consistieron en enfrentar el material genético con el complejo quinolona-Bi(III) en presencia de magnesio y verificar si se favorece la hidrólisis del mismo. Estos ensayos están basados en los reportados en 2004 por Yang *et al.*, quien sintetizó un complejo dietilentriamina con magnesio capaz de promover la hidrólisis del ADN actuando como una nucleasa artificial (Ping Yang 2004).

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 21 y 22:

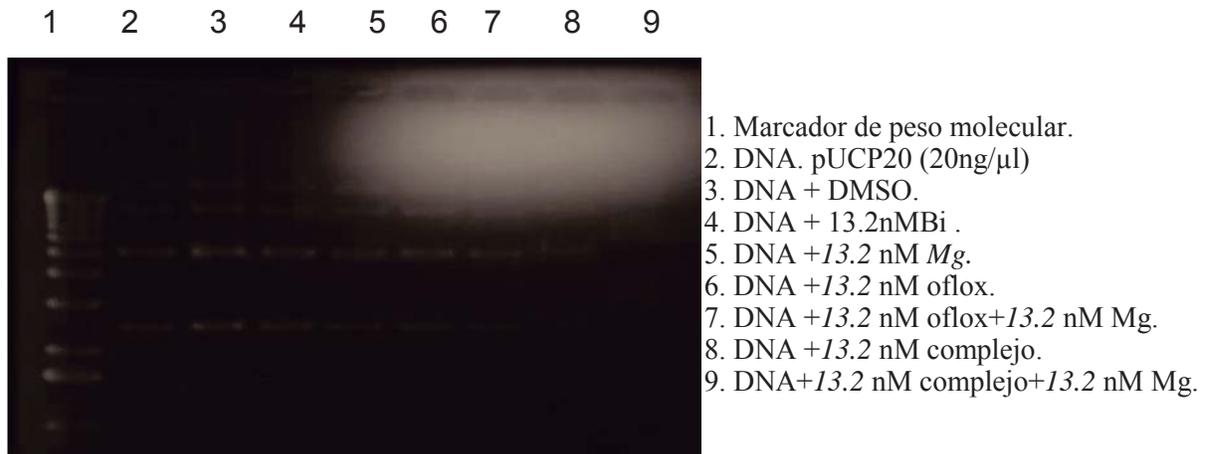


Figura 21. Interacción del complejo ofloxacino-Bi con ADN en presencia y ausencia de Magnesio (Mg).

En todos los casos se colocaron 5 μL de ADN. El tiempo de incubación del experimento fue de 12 horas, los resultados se analizaron en agarosa al 1%.

En el carril 1 de la figura 21 se observa el corrimiento del marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestran el corrimiento de las distintas isoformas de pUCP20, plásmido utilizado para realizar el ensayo; en el carril 3 se observa que el solvente utilizado para las pruebas, DMSO, no interacciona con el material genético ya que el plásmido sigue presentando las isoformas presentes en el carril 2; en los carriles 4 y 5 se aprecia que el plásmido no interacciona con el bismuto ni con el magnesio; en los carriles 6 y 7 se observa que ni el ofloxacino, ni esta molécula en presencia de magnesio presentan interacción con el material genético ya que se sigue conservando el mismo patrón de corrimiento del plásmido que en el carril 2.

En el carril 8 se aprecia claramente una interacción del material genético con el complejo ofloxacino-Bi y dicha interacción se ve incrementada en presencia de

magnesio, lo cual se observa claramente en el carril 9, aunque al parecer dicha interacción parece retardar la migración del material genético más que hidrolizarlo.

Para comprobar o descartar una posible hidrólisis se decidió realizar un ensayo comparando la actividad del complejo frente al ADN con la actividad de la enzima de restricción Hind III, endonucleasa natural encontrada en la cepa D de *Haemophilus influenzae*.

El ensayo realizado consiste brevemente en incubar ADN con el complejo Ofloxacino-Bi(III) bajo condiciones iguales a las necesarias para que actúe la Hind III y comprobar si se favorece la hidrólisis del mismo mediante un análisis electrofóretico.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22:

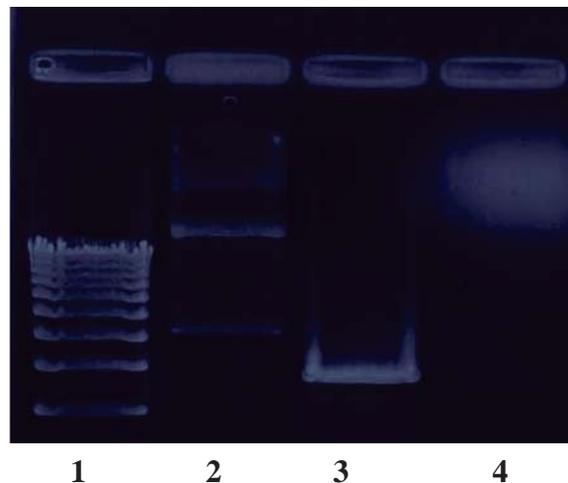


Figura 22. Ensayo de interacción del complejo ofloxacino-Bi con el ADN comparado con la interacción entre el material genético y Hind III.

Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: plásmido Pucp 20, carril 3: Pucp20 + Hind III, carril 4: Pucp 20 + 13.2 nm de complejo ofloxacino-Bi. El tiempo

de incubación del ensayo fue de 2 horas a 37°C, utilizando buffer no. 2 para enzima Hind III de la marca invitrogen.

En el carril 1 se muestra el corrimiento electroforético correspondiente al marcador de peso molecular; en el carril 2 se aprecia el corrimiento electroforético de las distintas isoformas presentes en el plásmido pUCP20. Carril 3: Se utilizó la enzima de restricción Hind III como control para realizar la prueba; esta enzima hidrolisa Pucp 20 en un único sitio (1611 pb, 5'A↓ AGCT T-3'), por lo tanto el plásmido se linealiza y aparece una sola banda. Si el complejo promueve la hidrólisis del DNA mediante la ruptura en un único sitio, se debe observar un patrón similar al resultante en este carril. El resultado de la interacción del complejo con el plásmido se observa en el carril 4, donde se aprecia la desaparición de la isoforma más compacta del plásmido, comprobándose la capacidad del complejo para interactuar con el material genético. No se observa un patrón similar al resultante de la interacción con enzima de restricción, lo que indica que el complejo no hidroliza del ADN en un sitio preciso. La desaparición de la isoforma superenrollada del plásmido se puede deber a que el complejo al coordinarse con el ADN impida un acomodo tridimensional superenrollado del mismo y de esta manera sólo sigan apareciendo las isoformas relajadas. Por otra parte no se descarta la posibilidad de que el complejo esté hidrolizando el ADN pero a diferencia de la enzima de restricción éste lo haga de manera aleatoria.

Este resultado es interesante, aunque no forma parte de los objetivos del presente trabajo; abriendo la posibilidad de explorar el tema en futuras investigaciones.

VIII. Conclusiones

1. Se demuestra que el complejo ofloxacino-Bi(III) presenta una actividad 6 veces mayor comparado con su ligando sobre cepas de *E.coli* ATCC 25922.
2. Se comprueba por primera vez que el mecanismo de acción del complejo ofloxacino-Bi es el descrito para las fluoroquinolonas, es decir, actúa inhibiendo las topoisomerasas bacterianas. Sin embargo, no se descartan mecanismos adicionales que puedan contribuir a la actividad antibacteriana.
3. Se demuestra que el complejo ofloxacino-Bi(III) es capaz de interactuar con el ADN, sin embargo la naturaleza de esta interacción no está del todo clara.

IX. Parte experimental

9.1 Extracción de ofloxacino

Se trituró una tableta comercial de ofloxacino de 200 mg (laboratorios JANSSEN – CILAG) hasta obtener un polvo fino, el cual se colocó en un matraz bola pequeño y se agregaron 10 mL de cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y 10 mL de agua (H_2O) destilada agitándose durante 1 h. Se separaron las fases y a la fase orgánica se le realizó una segunda extracción. Se separó nuevamente la porción orgánica y se eliminó la humedad añadiendo sulfato de sodio anhidro, se filtró y se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 día.

9.2 Procedimiento para la síntesis de los complejos ofloxacino–Bi(III) bajo condiciones alcalinas

Se colocaron 30 mg (0.083 mmol) de ofloxacino en 4 mL de metanol y se llevaron a agitación durante 5 min. Se añade metóxido de sodio a una concentración de 1mg/1.5ml gota a gota hasta solubilizar totalmente la quinolona, se corroboró el pH alcalino de la solución (8-9). Enseguida se añadieron 0.083 mmol de nitrato de bismuto pentahidratado, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, con lo que inmediatamente se observó la formación de un precipitado, se dejó en agitación aproximadamente 15 min. Después de este tiempo se dejó en reposo 6 h hasta precipitación completa del complejo. Se separó el precipitado por decantación, se lavó con acetona y cloruro de metileno y se dejó secar a temperatura ambiente.

9.3 Determinación de la actividad inhibitoria del complejo sobre la ADN girasa

Se siguió el protocolo de ensayos de inhibición de la girasa establecido por los fabricantes del kit DNA relajado y DNA girasa purificada de *E.coli* (compañía Inspiralis). Mezcla de reacción (20 μ L) : 4 μ L de buffer (35 mM Tris.HCl (pH 7.5), 24 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM ditioneitol (DTT), 1.8 mM espermidina, 1 mM ATP, 6.5% (m/v) glicerol) , 1U de DNA girasa, 500 ng de DNA relajado de pBR322 y varias concentraciones de complejo fueron incubadas a 37° C durante 45 min. La reacción se detuvo utilizando 20 μ l cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y 8 μ L de solución de detención (40% sacarosa, 100 mM Tris.HCl, pH 7.5, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético EDTA, 0.5 mg/ml de azul de bromofenol). Los resultados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE corridos a 55 V durante 5 horas.

9.4 Determinación de la actividad inhibitoria del complejo sobre la topoisomerasa IV

Se siguió el protocolo establecido por los fabricantes del kit ensayos de relajación de la topoisomerasa IV (Compañía inspiralis). Mezcla de reacción (20 μ L): 4 μ L de buffer (40 mM ácido(4-(2-hidroximetil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), KOH (pH 7.6), 100 mM glutamato de potasio, 10 mM acetato de magnesio, 10 mM DTT, 1 mM ATP), 1U de topoisomerasa IV, 400 ng de DNA superenrollado de pBR322 y varias concentraciones del complejo fueron incubadas a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo adicionando 3 μ L de EDTA 0.5 M, 20 μ L cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y 8 μ l de solución de detención. Los resultados fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE corridos a 55 V durante 5 horas.

9.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se siguió el método de determinación de la concentración mínima inhibitoria por macrodilución en tubo establecido por el NCCLS, 1997. Se prepararon 10 tubos de cultivo con concentraciones crecientes de complejo de $1.95 \times 10^{-3} \mu\text{g/ mL}$ a $1.0 \mu\text{g/ mL}$ en 1 mL de caldo Müller-Hinton estéril, se agregó 1 mL de inóculo de *E. coli* ATCC 25922 ajustado a 5×10^5 UFC/mL dejando incubar a 35°C durante 18 hr en incubadora de aire ambiental. Se reportó como CMI la concentración del último tubo sin crecimiento detectado a ojo desnudo. Este resultado se corroboró mediante la utilización de un espectrofotómetro con una λ de 590nm.

9.6 Ensayos de interacción de complejo ofloxacino-Bi con el ADN

5 μL (de una concentración de 100 ng totales) de ADN plasmídico de pUCP20 se incubaron con 1 μL (13.2nM) del complejo durante 2 h a 37°C en 3 μL de H_2O y 1 μL de buffer 2 para enzima de restricción Hind III de la marca invitrogen . Para el control se utilizaron los mismos volúmenes colocando en lugar del complejo 1 μL de enzima de restricción Hind III. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en agarosa al 1%.

X. Referencias

1. Aguirre S.M.A. 2006 **Relación estructura actividad de derivados de ciprofloxacino**. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico farmacobiología. U.M.S.N.H.
2. Alós J. I. 2003. **Quinolonas**. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 21(5): 261-268.
3. Anderson E.V., Gootz D.T., Osheroff N. 1998. **Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action**. *The Journal of Biological Chemistry* 28 (237): 17879-17885.
4. Andriole V. T. 2000. **The quinolones**. <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780120595174> (Accesada en diciembre de 2007).
5. Anwar R. S., Rajani G., Mange R. Y. 2006. **Bismuth-norfloxacin complex: Synthesis, physicochemical and antimicrobial evaluation**. *International Journal of Pharmaceutics* 332: 24–30.
6. Baker W.R., Cai S., Bimitroff M. 2004. **A prodrug approach toward the development of water soluble fluoroquinolones and structure-activity relationships of quinoline-3-carboxylic acids**. *Journal of Medicinal Chemistry* 47: 4693-4709.
7. Ball P. 2000. **Quinolone generation: Natural history or natural selection**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 17-24.
8. Bambeke, J.M., Michot, J., Eldere V., Talkens P.M. 2005. **Quinolones in 2005: an update**. *Clinical Microbiology and Infection* 11: 256-280.
9. Barbosa M.S. 2007. **Obtención de nuevos complejos Quinolona- Bi(III) y estudios de su actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa***. Facultad de Químico farmacobiología U.M.S.N.H. Tesis de licenciatura. 59pp.
10. Barrera M. C. 2005. **Síntesis y actividad del complejo ciprofloxacino-Bi(III)-(CH₃O)₂CHCH₂NH₃Cl**. Facultad de Químico Farmacobiología U.M.S.N.H. Tesis de licenciatura. 67pp.

11. Bates A.D., Maxwell A. 2005. **DNA Topology**. Ed.Oxford.2nd edición.186pp.
12. Brugueras C.M., Morrejon G.M., Salup D.R.2005. **Actualidad de las quinolonas**. *Revista Cubana de Farmacia* 39 (1): 1-9.
13. Carvalho A.F., Fiorelli L.A., Jorge V.N., De Nucci G., Ferraz J.G. Pedrazzoli J. 1998. **Addition of bismuth subnitrate to omeprazole plus amoxicillin improves eradication of *Helicobacter pylori***. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 12: 557-561.
14. De Souza M. V.N. 2005. **New fluoroquinolones: A Class of Potent Antibiotics**. *Reviews in Medicinal Chemistry* 5(11): 1009-1017.
15. Domenico P., Salo J.R., Novick G. 1997. **Enhancement of bismuth antibacterial activity with lipophilic thiol chelators**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(8): 1697-1703.
16. Efthimiadou E.K., Karaliota A. 2008. **Mononuclear metal complexes of the second generation quinolone antibacterial agent enrofloxacin: Synthesis, structure, antibacterial activity and interaction with DNA**. *Polyhedron* 27: 1729-1738.
17. Efthimiadou E.K., Psomas G., Sanakis Y., Katsaros N., Karaliota A. 2006. **Metal complexes with the quinolone antibacterial agent N-propyl-norfloxacin: Synthesis, structure and bioactivity**. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101: 525-535.
18. Elsea H.S., Osheroff N., Nitiss J.L. 1992. **Citotoxicity of quinolones toward eukaryotic cells. Identification of topoisomerase II as the primary cellular target for the quinolone cp-115,953 in yeast**. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 13150-13153.
19. Emmerson A.M., Jones A.M. 2003. **The quinolones: decades of development and use**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 13-20.
20. Farina N., Sanabria R., Laspina F. 2007. **In vitro activity of fluoroquinolones in gramnegative rods isolated from ambulatory patients urocultures**. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 3(1): 15-18

21. García R.J., Gutiérrez Z.N. 2002. **Desfluoroquinolonas frente a quinolonas.** *Revista Española de Quimioterapia* 15(4): 303-305.
22. Hawkey M. M. 2003. **Mechanisms of quinolone action and microbial response.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 29-35.
23. Galm U., Heller S., Shapiro S., Page M., Li S., Heide L. 2004. **Antimicrobial and DNA Gyrase-Inhibitory Activities of Novel Chlorobiocin Derivatives Produced by Mutasynthesis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(4): 1307-1312.
24. Hashimi S.M., Wall K.M., Smith B.A., Maxwell A., Birch G.R. 2007. **The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(1): 181–187.
25. Holden J. A. **DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic.** 2001. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 1: 1-25.
26. Hongzhe S., Szeto K.Y. 2003. **Binding of bismuth to serum proteins: Implication for targets of Bi(III) in blood plasma.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 94: 114-120.
27. Hooper D.C., Rubinstein E. 2004. **Quinolone Antimicrobial Agents.** *Agents and Chemotherapy Press.* 3rd edition. pp 3-8.
28. Hooper D.C., Wolfson J.S.1991. **Fluoroquinolone antimicrobial agents.** *New England Journal of Medicine* 324 (6): 384-394.
29. Hoshino K., Kitamura A., Morrissey I., Sato K., Kato J., Ikeda H. 1994. **Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 38(11): 2623-2627.
30. Kampranis C.S.,Maxwell A.1998. **The DNA gyrase-quinolone complex.** *The Journal of Biological Chemistry* 3(5): 22615-22626.
31. Kenilworth, N.J. 2006 Schering-Plough Reports Garenoxacin NDA Accepted for FDA Review. Schering-Plough Corporation.

32. Koneman W. E., Allen D.S., Janda M.W. 2001. **Diagnóstico microbiológico**. Editorial Panamericana.España. 5ª edición. 1432pp.
33. Kotani T, Nagai D., Asahi K, Suzuki H. 2005.**Antibacterial properties of some cyclic organobismuth(III) compounds**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(7): 2729-2734.
34. Liu C., Wang M.,Zhang T., Sun H. 2004. **DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes**. *Coordination Chemistry Reviews* 248: 147-168.
35. Mahony D.E., Morrison L., Fulkner G, Hoffman S.P. 1999. **Antimicrobial activities of synthetic bismuth compounds against *Clostridium difficile***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(3): 582-588.
36. Mather R.M., Karenchak L.M., Romanowski E.G., Kowalski R.P. 2002. **Fourth generation fluoroquinolones: new weapons in the arsenal of ophthalmic antibiotics**. *American Journal of Ophthalmology* 133: 463-466.
37. Mella M. S., Acuña I. G., Muñoz M., 2000. **Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación**. *Revista Chilena de Infectología* 17(1):53-66.
38. Mitscher L.A. 2005. **Bacterial topoisomerase inhibitors: Quinolone and pyridine antibacterial agents**. *Chemical Reviews* 105: 559-592.
39. Nakashi A., Imajoh-Ohmi S., Hanaoka F. 2005. **Characterization of the interaction between DNA gyrase inhibitor and DNA gyrase of *Escherichia coli***. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 8949-8954.
40. Narros C.M., Real H.S, González C.P., Carbajosa S.G. 2007. **Estudio de multirresistencia antibiótica de *Escherichia coli* en urocultivos**. *Medicina clínica* 129(11): 409-411.
41. Noble G.C., Barnard M.F., Maxwell A. 2003. **Quinolone-DNA interaction: Sequence dependent binding to single-stranded DNA reflects the interaction within the gyrase-DNA complex**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 854-862.

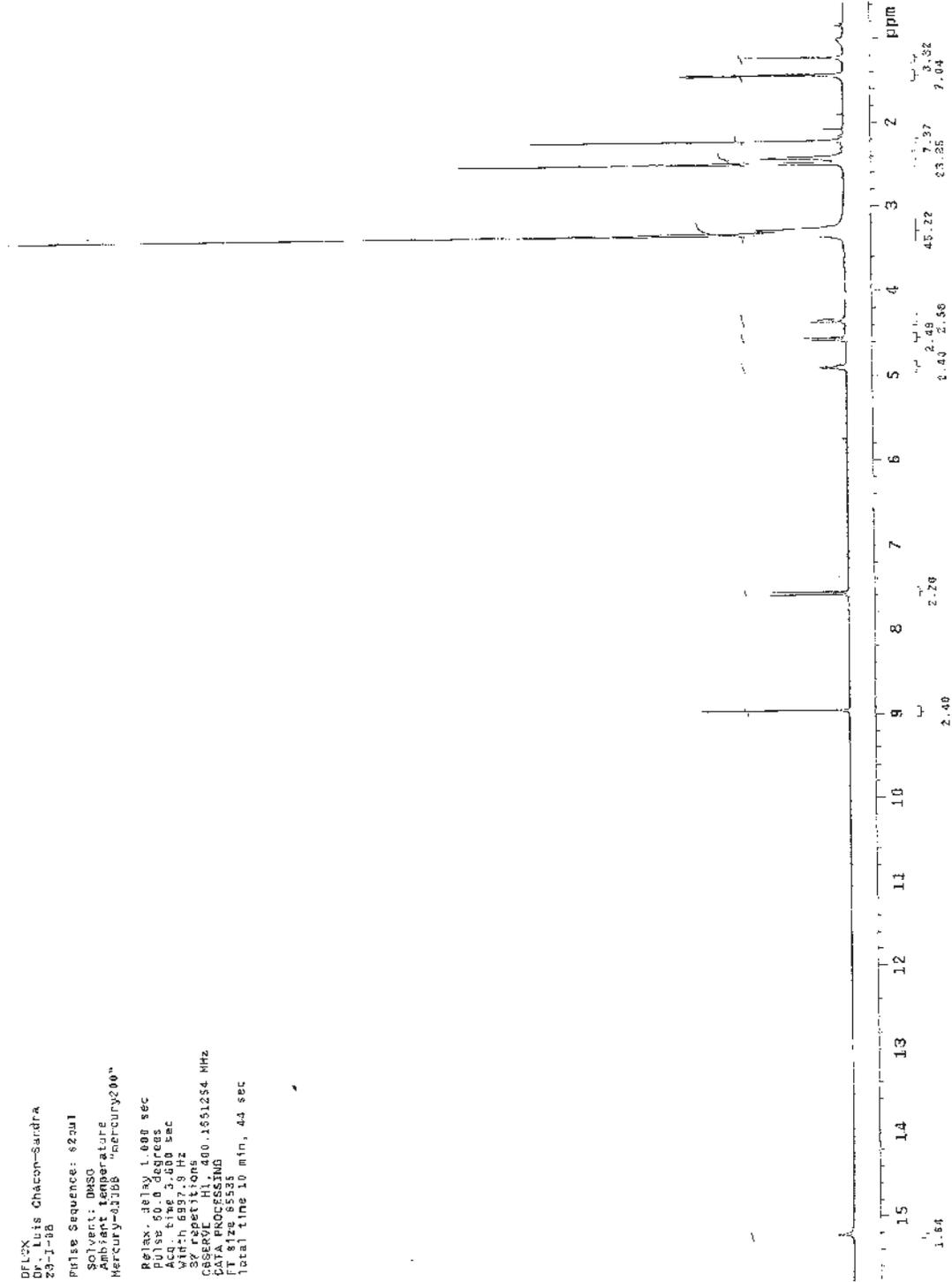
42. Oliphant C.M. 2002. **Qinolones: A comprehensive review.** *Clinical Pharmacology* 65: 455-463.
43. Osheroff N., Bjornsti M-A. 2001. **DNA topoisomerase protocols enzymology and drugs.** Ed. Humana Press. 333pp.
44. Pérez V. M. 2004. **Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a quinolonas en *Haemophilus influenzae*.** Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de farmacia.
45. Phillips H. R., Whitenhead W. M., Lacey S. 2000. **Solubility, absorption, and anti-*Helicobacter pylori* activity of bismuth subnitrate and colloidal bismuth subnitrate: in vitro data do not predict in vivo efficacy.** *Blackwell Publishing.* 5: 176-182.
46. Prescott, Harey, Klein 2003. **Microbiología.** 4ª ed., Mc Graw Hill. Madrid. 1005pp.
47. Psomas G. 2008. **Mononuclear metal complexes with ciprofloxacin: Synthesis, characterization and binding-DNA properties.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 102: 1798-1811.
48. Reguera R., Pérez P., Redondo Y. 2007. **La ADN topoisomerasa tipo I de protozoos patógenos como diana terapéutica de fármacos antitumorales.** *Medicina (Buenos Aires)* 67(6): 747-757.
49. Roca J. 2003. **Topoisomerasas de ADN de tipo II.** *Investigación y Ciencia* 327: 40-48.
50. Rothlin P. 1999. **Quinolones: historic review.** *Medicina (Buenos Aires)* 59: 3-7.
51. Ruiz J. 2003. **Mechanism of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 51: 1109-1117.
52. Sárközy G. 2001. **Quinolones: a class of antimicrobial agents.** *Veterinary Medicine.* 46: 247-254.

53. Shen, L.L., Baranowski, J., Pernet, A. G. 1989. **Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: Specificity and cooperativity of drug binding to DNA.** *Biochemistry* 28: 3879-3885.
54. Shen, L.L., Mitscher, L.A., Sharma, P.N., O'Donnell, T.J., Chu, D.W., Cooper, C.S., Rosen, T., Pernet, A.G. 1989. **Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: A cooperative drug-DNA binding model.** *Biochemistry* 28: 3886-3894.
55. Siegmund, K., Maheshwary, S., Narayanan, S., Connors, W. 2005. **Molecular details of quinolone-DNA interactions.** *Nucleic Acids Research* 15(33): 4838-4884.
56. Silvestru, C., Hans, J.B., y Henrik, A. 1999. **Structural chemistry of bismuth compounds. I. Organo-bismuth derivatives.** *Chemical Reviews* 99: 3277-3327.
57. Sukhov, B.G., Mukha, S.A., Antipova, I.A., Medvedeva, S.A., Larina, L.I., Chipanina, N.N., Kazheva, O.N., Shilov, G.V. et al. 2008. **Stereoactive lone pair of electrons on bismuth(III): tris(3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-onato)bismuth(III).** *ARKIVOC* 8: 139-149
58. Taléns, V.R. 2001. **Actividad antimicrobiana in vitro de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por vía oral. Relación estructura-actividad.** Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. 332 pp.
59. Thurston, J.H., Whitmire, K.H. 2001. **Heterobimetallic bismuth-transition metal salicylate complexes as molecular precursors for ferroelectric materials. Synthesis and structure of $\text{Bi}_2\text{M}_2(\text{sal})_4(\text{Hsal})_4(\text{OR})_4$ (M = Nb, Ta; R = CH_2CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $\text{Bi}_2\text{Ti}_3(\text{sal})_8(\text{Hsal})_2$, and $\text{Bi}_2\text{Ti}_4(\text{OiPr})(\text{sal})_{10}(\text{Hsal})$ (sal = $\text{O}_2\text{CC}_6\text{H}_4-2-\text{O}$; Hsal = $\text{O}_2\text{CC}_6\text{H}_4-2-\text{OH}$).** *Inorganic Biochemistry* 41: 4194-4205.
60. Tuma, J., Connors, H.W., Siteman, H.D., Richert, C. 2002. **On the effect of covalent appended quinolones on termini of DNA duplexes.** *Journal of the American Chemical Society* 124: 4236-4246.

61. Turel I., Leban I., Bukovec N. 1994. **Synthesis, characterization, and crystal structure of a copper (II) complex with quinolone family member (ciprofloxacin): bis(1)-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7- piperazin-1-yl-quinoline-3-carboxylate) copper (II) chloride hexahydrate.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 56: 273–282.
62. Turel I. 2002. **The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents.** *Coordination Chemistry Reviews* 232: 27-47.
63. Upadhyay S.K., Kumar P., Arora V. 2006. **Complexes of quinolone drug norfloxacin.** *Chemistry* 47(6): 1078-1083.
64. Velloira G. W., Domenico P., Li P., *et al.* 2003. **In vitro activity and synergy of bismuth thiols and tobramycin against burkholderia cepacia complex.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 915-919.
65. Verbist L. 1986. **Quinolones: Pharmacology.** *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* 8(1): 22-25.
66. Weber M., Piddock L. J. 2001. **Quinolone resistance in *Escherichia coli*.** *INTRA, EDP Sciences* 32: 257-284.
67. Wilson y Gisvold. 1998. **Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry.** 10^a Ed. Delgado Remers, Lippincott-Raven Publishers. pp. 197-202.
68. Yang P., Ren R., Guo M., Song A., Meng X., Yuan C., Zhou Q., Chen H., Xiong Z., Gao X. 2004. **Double-strand hydrolysis of DNA by a magnesium(II) complex with diethylenetriamine.** *The Journal of Biological Inorganic Chemistry* 9: 495-506.
69. Zhanela G., Hobana D., Schurek K., Karlowsky J. 2004. **Role of efflux mechanism on fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 24: 529-535

XI. Anexos

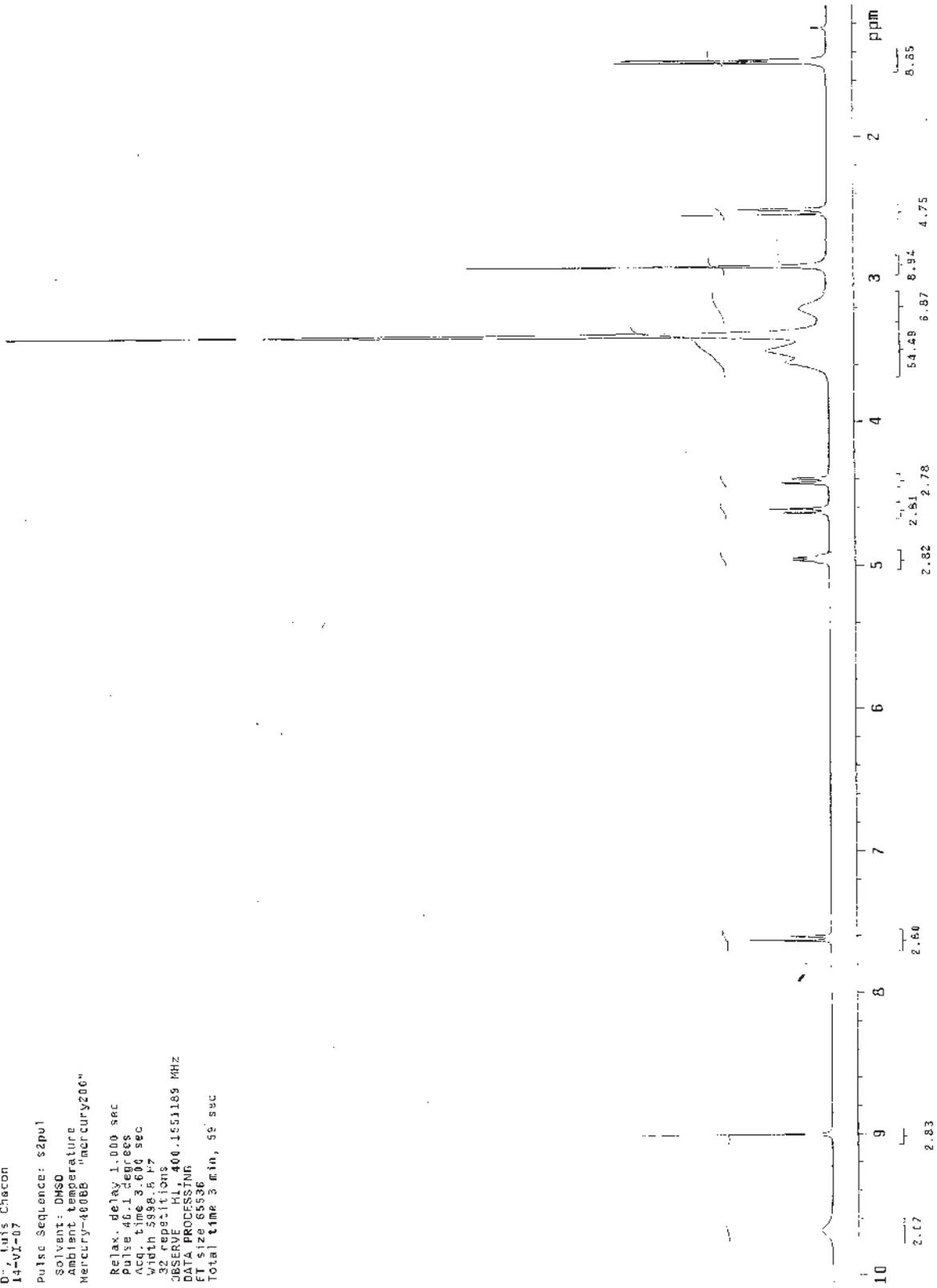
Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN de ^1H).



OFLOX-HNOS
0.7ml's Chacon
14-VI-07

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: DMSO
Ambient temperature
Mercury-480BB "mercury200"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 40.1 degrees
Acq. time 3.606 sec
Width 5998.5 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 400.155189 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 3 min, 59 sec



Irradiado 3.29 ppm
ORF1[NO3]3
Jr. Luis Chacor.
21-V-07

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: OMSO
Ambient temperature
Mercury-200 "me-cury400"

Relax. delay 1.200 sec
Pulse 39.1 degrees
Acq. time 1.984 sec
width 3003.0 Hz
218 repetitions
OBSERVE HI, 200.084413 MHz
DECUPLE HI, 200.085696 MHz
Power 30 dB
continuously on
single frequency
DATA ACQUISITION
File 16303
Total time 10 min, 25 sec

