

00570
2
2y



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS Y RELACIONES CUANTITATIVAS
ESTRUCTURA - ACTIVIDAD DE ALGUNAS
RIFAMICINAS CON PROPIEDADES
ANTIBACTERIANAS.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA-QUIMICA-FARMACEUTICA)
P R E S E N T A
Q.B.F. CARLOS MIGUEL HERNANDEZ COVARRUBIAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Página
RESUMEN -----	1
ABSTRACT -----	11
INTRODUCCION -----	1
OBJETIVOS -----	4
ANTECEDENTES -----	6
Historia -----	6
Estructura -----	6
Desarrollo de las rifamicinas -----	10
Tuberculosis y Salud Pública -----	12
Mecanismo de acción -----	13
Estudios de relaciones estructura-actividad para rifamicinas -----	15
Métodos cuantitativos para determinar la relación estructura-actividad -----	22

Determinación del log P y la actividad biológica -----	27
RESULTADOS Y DISCUSION -----	30
Síntesis de rifamicina O -----	30
Síntesis de rifamicina S -----	31
Síntesis de rifamicina SV -----	32
Síntesis de 3-formil rifamicina SV -----	33
Síntesis de rifampicina -----	33
Síntesis de 3-[(4-morfolinilimino)metil]rifamicina SV ---	34
Síntesis de la (S)-Rifaestradina -----	35
Síntesis de la (R)-Rifaestradina -----	38
Determinación del coeficiente de partición octanol-agua (P) -----	40
Evaluación de la actividad antibacteriana -----	42
Análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad -----	48

CONCLUSIONES -----	51
PARTE EXPERIMENTAL -----	53
Síntesis de derivados .	
Rifamicina O -----	55
Rifamicina S -----	55
Rifamicina SV -----	56
3-formil rifamicina SV -----	57
Rifampicina -----	58
3-[(4-morfolinilimino)metil]rifamicina SV -----	59
(S)-Rifaestradina -----	60
(R)-Rifaestradina -----	61
Determinación del coeficiente de partición octanol-agua (P) -----	62
Evaluación de la actividad antibacteriana -----	63

ESPECTROS ----- 65

BIBLIOGRAFIA ----- 82

* * * * *

RESUMEN

Se describe la síntesis de algunas rifamicinas y la preparación de dos nuevas rifamicinas modificadas en la posición 3, con el propósito de estudiar el efecto de los factores estereoquímicos de ese sustituyente sobre la actividad biológica.

La actividad in vitro de esas rifamicinas contra Bacillus subtilis fué correlacionada cuantitativamente, por medio del modelo de Hansch, con su lipofilicidad expresada por el coeficiente de partición octanol-agua (P), el cual fué medido por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en la que se encontró una dependencia parabólica con una buena correlación.

Las dos nuevas rifamicinas que fueron sintetizadas son análogos de rifampicina, las cuales presentan un sustituyente diferente en la posición 3, con la característica de que es quiral. Estas nuevas rifamicinas mostraron una mayor actividad in vitro que para rifampicina y entre ellas dos presentaron diferencias, contra Bacillus subtilis.

ABSTRACT

The synthesis of some rifamycins and the preparation of two new rifamycins modified at position 3 are described, those are analogues to rifampicin, they have different substituent which is chiral, in order to study the effect of stereochemical factors of substituent on the biological activity. This new rifamycins shown higher in vitro activity than rifampicin and each other had different activity on Bacillus subtilis.

The in vitro activity of these rifamycins on Bacillus subtilis was quantitatively correlated, with the Hansch approach, to their lipophilicity, expressed by the octanol-water partition coefficient (P), which were measured by high-pressure liquid chromatography (HPLCO, a parabolic dependence was observed with good correlation.

1.- INTRODUCCION

La era de los antibióticos comenzó hace 50 años y desde entonces, se han descubierto entre 5 000 y 10 000 antibióticos naturales los cuales se encuentran descritos en la literatura química y se han preparado entre 50 000 y 100 000 análogos semisintéticos.

El desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos ha alcanzado un punto crítico, debido a que el número de nuevos fármacos eficaces producidos en los últimos años es muy pequeño en relación a las inversiones que se han hecho para encontrar nuevos compuestos con propiedades antibacterianas.

En el mercado de los Estados Unidos existen un poco más de cien agentes antimicrobianos de los cuales 29 son de origen natural, 49 semisintéticos y 35 totalmente sintéticos! Lo anterior es debido a que las características de un antibiótico deben ser optimizadas, tales como espectro bacteriano, características farmacéuticas, estabilidad química, toxicidad, efectos secundarios y compatibilidad química con otros agentes farmacológicos, entre otros. Frecuentemente, se puede optimizar una característica a expensas de otra, por lo que el químico farmacéutico debe decidir que característica es más importante, siendo indispensable establecer como base para el desarrollo de nuevos antibióticos, el conocimiento de las bases bioquímicas de su acción, como son su inhibición de la función ribosomal, síntesis de los ácidos nucleicos, daños a las membranas

citoplasmáticas o bloqueo de la formación de la pared celular?

En la actualidad existen distintas familias de fármacos con las características deseadas, en los que se aprovecha el conocimiento de dichas bases bioquímicas.

La rifampicina, es un antibiótico de la familia de las rifamicinas, que es utilizada en el tratamiento de la tuberculosis, que debido a lo prolongado del mismo, debe ser administrada junto con otros antibióticos. Se piensa que realizar estudios encaminados a contribuir al conocimiento de las bases bioquímicas de su acción, se podría diseñar un antibiótico análogo que supere la efectividad terapéutica de la propia rifampicina.

Una forma de alcanzar ese objetivo, es con los métodos cuantitativos de relación estructura-actividad, los cuales han demostrado su utilidad en el diseño racional de nuevos fármacos.

Las rifamicinas son una familia de antibióticos, obtenidos por fermentación de cultivos bacterianos de Nocardia mediterranei y por modificaciones químicas de los mismos. Las rifamicinas son naftoquinonas o naftohidroquinonas cromóforas, las cuales presentan un puente alifático de 17 miembros, llamado cadena ansa.

La estructura general de las rifamicinas se presenta en la figura 1.

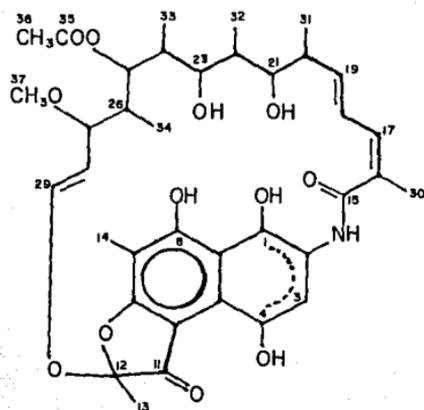


Figura 1.- Estructura general de las rifamicinas.

La biosíntesis del esqueleto molecular de estas rifamicinas, proviene del ácido 3-amino-5-hidroxi benzoico⁵. Este aminoácido inicia la formación de un policétido por reacción de unidades de acetato y propionato, dando lugar a la cadena ansa⁶. La ciclización oxidativa entre C6 del aminoácido y el policétido, ya sea antes o después de la formación de la lactama, cierra el segundo anillo del núcleo naftalenoide⁷. Al final ocurren modificaciones estructurales secundarias, tanto en la cadena del policétido, como en los núcleos para formar las diferentes rifamicinas conocidas⁸.

2.- OBJETIVOS

A pesar de que las rifamicinas han sido analizadas cuantitativamente en su relación estructura-actividad, estas no han sido estudiadas tomando en cuenta los factores estereoquímicos del sustituyente en la posición 3, que puedan influir sobre la respuesta biológica.

Además no se han descrito mediciones experimentales del coeficiente de reparto octanol-agua, para cada una de las rifamicinas que se han probado.

Considerando lo anteriormente expuesto, el propósito de esta tesis es la de contribuir al estudio del modo de acción, actividad y estructura de las rifamicinas. Para lograrlo se consideraron los siguientes objetivos :

- 1.- Efectuar la síntesis de varias rifamicinas, tales como: O, S, SV, 3-formil rifamicina SV y rifampicina.
- 2.- Sintetizar las hidrazonas de la 3-formil rifamicina SV con la 4-amino morfolina, (R)-(+)-1-amino-2(metoxi metil) pirrolidina y la (S)-(-)-1-amino-2(metoxi metil) pirrolidina.
- 3.- Determinar la actividad antibacteriana de todos los compuestos que fueron sintetizados.

4.- Diseñar un método para la evaluación experimental del coeficiente de reparto octanol-agua, que permita medir dicha constante para las rifamicinas sintetizadas.

5.- Analizar los datos obtenidos para establecer una relación cuantitativa estructura-actividad, expresada mediante una ecuación matemática.

6.- Comparar la actividad biológica de dos rifamicinas diastereoisoméricas, que muestren el efecto de la estereoquímica del sustituyente de la posición 3 en las rifamicinas.

3.- ANTECEDENTES.

3.1.- Historia.

En 1959, P. Sensi describió un antibiótico formado por un complejo de cinco compuestos biológicamente activos, denominados A, B, C, D y E.⁹ El antibiótico fué producido por una cepa de Nocardia mediterranei, proveniente de una muestra de tierra colectada en el sur de Francia por H. Pagani, el complejo fué llamado Rififi, el título de una película, para más tarde llamarse rifomicina y finalmente rifamicina!⁹

Margalith y Pagani, obtuvieron un mutante que mediante la adición de 0.2% de dietilbarbiturato de sodio, producía casi exclusivamente la rifamicina B.

3.2.- Estructura.

Las rifamicinas en general contienen 9 átomos de carbono asimétricos y 3 dobles enlaces carbono-carbono y el microorganismo sólo produce uno de los isómeros posibles.

Su estructura química fué elucidada por Prelog, Sensi y Oppolzer, mediante datos analíticos y reacciones químicas de degradación,^{11,12} misma que fué confirmada por análisis de rayos X del cristal de p-iodo-anilida de la rifamicina B.¹³

La configuración relativa de las rifamicinas ha sido determinada por análisis de rayos X y en parte por resonancia magnética protónica. Su configuración absoluta, ha sido derivada de la configuración de uno de los productos de oxidación de la rifamicina B, el (+)- ácido-2,6-dimetil heptanodioico, proveniente de la cadena ansa, por lo que se dedujo que su estructura debería ser 16,17-cis; 18,19-trans; 28-29-trans; 20(S), 21(S), 22(R), 23(R), 24(R), 25(S), 26(R) y 27(S).¹⁴ La estructura se presenta en la figura 2.

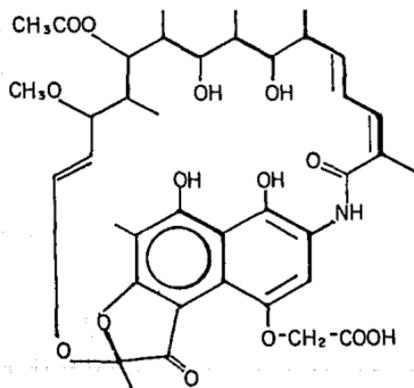
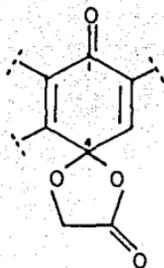
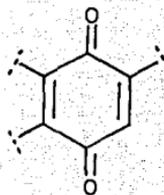


Figura 2.- Rifamicina B.

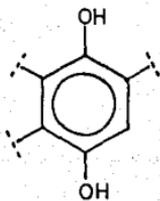
Las estructuras de las rifamicinas más usuales y que serán sintetizadas en este estudio se presentan en la figura 3.



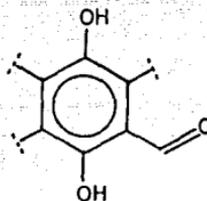
Rifamicina O



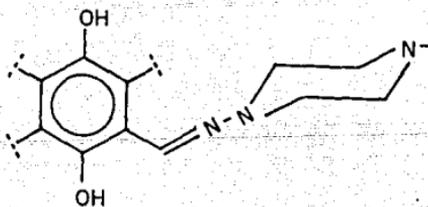
Rifamicina S



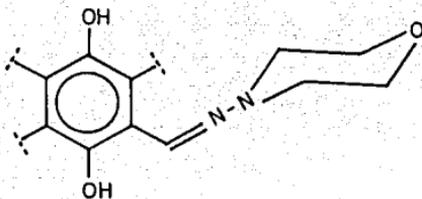
Rifamicina SV



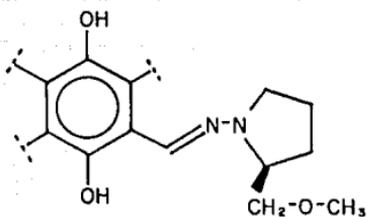
3-formil rifamicina SV



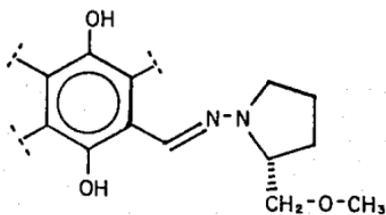
Rifampicina



3- [(4-morfolinilimino) metil] rifamicina SV



(S)- Rifaestradina *



(R)- Rifaestradina *

Figura 3.- Rifamicinas sintetizadas.

3.3.- Desarrollo de las rifamicinas.

La rifamicina B es separada fácilmente de los demás componentes del medio de cultivo, debido a su naturaleza ácida ($pK_a=2.8$ y $pK_a= 6.7$) y a su buena estabilidad¹⁵. La rifamicina B, resultó ser un antibiótico de interés clínico por su actividad contra bacterias gram-positivas y por su baja toxicidad. Sensi, utilizó agentes oxidantes para obtener un antibiótico, que mostró mayor actividad antibacteriana, denominándola rifamicina O, que por análisis elemental, presentaba dos átomos de hidrógeno menos y era muy interesante, que en su espectro de infrarrojo presentaba una banda a 1822 cm^{-1} , que justificaba una ciclización interna del grupo carboxilo, para formar una lactona y explicaba el bajo carácter ácido de la rifamicina O¹⁶.

Motivados por ese incremento en la actividad biológica, ése mismo grupo de investigadores, decidieron preparar más derivados. La rifamicina O, mediante una reacción de hidrólisis en medio ácido,¹⁷ genera la rifamicina S, la cual puede encontrarse en forma de varios conformeros, debido a la flexibilidad de los ángulos en la cadena ansa a partir de C-28 a C-19¹⁸. La rifamicina S resultó ser muy activa, contra microorganismos gram-positivos y Mycobacterium tuberculosis.

La rifamicina SV, fué obtenida por reducción de la rifamicina S,

con ácido ascórbico¹⁹, siendo fácilmente convertida en rifamicina S por la acción de agentes oxidantes por lo que pueden establecer un sistema reversible de óxido-reducción²⁰. La rifamicina SV es un ácido monobásico ($pK_a=2.7$), su característica ácida depende de la presencia de un grupo enol, por lo que puede formar sales en presencia de bases, su sal sódica es un fármaco que se utiliza parenteralmente²¹.

N. Maggi y colaboradores en 1967, decidieron examinar la posibilidad de obtener rifamicinas-3-sustituidas de mayor actividad biológica, para lo que estudiaron la reactividad de las 3-amino metilrifamicinas SV - N,N-disustituídas con agentes oxidantes, tales como el dióxido de manganeso, posteriormente en condiciones ácidas y finalmente una reducción con ácido ascórbico, fue obtenida la 3-formil rifamicina SV, un compuesto que presentaba en el espectro de resonancia magnética protónica una nueva señal en 10.59 ppm, para un protón, la cual no desaparecía por adición de agua deuterada, esta rifamicina presentaba una actividad antibacteriana, superior a las ya reportadas²².

Se prepararon una gran cantidad de derivados de la 3-formil - rifamicina SV, resultando interesantes las oximas y las hidrazonas. Cuando se hizo la hidrazona de la 3-formil rifamicina SV con la 1-amino-4-metil-piperazina, se obtuvo la rifampicina²³

La rifampicina resultó ser un antibiótico que era absorbido oralmente y con amplio espectro antibacteriano, incluyendo a Mycobacterium tuberculosis, siendo hasta la fecha la rifamicina con mayor actividad terapéutica.

3.4.- Tuberculosis y Salud Pública.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa transmisible y caracterizada patológicamente por infiltraciones inflamatorias, lesiones exudativas, formación de tubérculos y fibrosis. Daña especialmente al pulmón, algunas veces daña al tracto genito-urinario, sistema nervioso y al sistema óseo ²⁴.

La tuberculosis aún es un gran problema de salud pública en México. La mortalidad por tuberculósis en todas sus formas fué de 9.6 por cien mil habitantes en el período de 1979-1983, la alta morbilidad demuestra que aproximadamente el 32 por ciento de la población se ha infectado con Mycobacterium tuberculosis y si se toma en cuenta que se presentan 34.8 nuevos casos por cien mil habitantes por año y una prevalencia de 80 casos por cada cien mil habitantes, se tendrá un panorama sobre la tubercuolisis como un problema de salud pública ²⁴.

3.5.- Mecanismo de acción.

La rifampicina inhibe la enzima RNA polimerasa DNA-dependiente, la cual cataliza la síntesis de RNA. La síntesis de proteínas se detiene a consecuencia de esta inhibición, bloqueando la reproducción bacteriana ⁸.

Sólo la RNA polimerasa eubacteriana y no la correspondiente a las células eucarióticas contiene un sitio específico de unión para la rifampicina, la cual actúa en concentraciones tan bajas como 8 mg/l ⁹. Esos experimentos explican la excelente tolerancia al fármaco a bajas concentraciones, por las células humanas.

Debido a que la RNA polimerasa DNA-dependiente no ha sido cristalizada, el análisis cristalográfico por rayos X del complejo enzima-antibiótico no ha sido llevado a cabo, por lo que no se sabe que parte del fármaco se encuentra directamente unido. Con la excepción de los sustituyentes en la posición 3 del anillo de la naftohidroquinona, casi no puede ser alterada la estructura del fármaco, sin una pérdida sustancial en la capacidad de unión a la enzima. El complejo enzima-rifampicina se disocia inmediatamente en presencia de cloruro de guanidina, la cual destruye la estructura tridimensional de la enzima, lo cual sugiere que el antibiótico no se une covalentemente a la enzima ¹⁰.

La RNA polimerasa DNA-dependiente de una eubacteria, es una protefna con un peso molecular de aproximadamente 500 000, la enzima de la Escherichia coli consiste de cuatro cadenas de polipéptidos, llamados alfa, beta, beta' y sigma, con una composición estequiométrica de (2-alfa, beta, beta', sigma) ²⁶.

Se han desarrollado cepas bacterianas resistentes a la rifampicina, en las que todas las mutaciones ocurren en el gene bacteriano que codifica para una subunidad de la cadena beta de la RNA polimerasa, siendo esto una evidencia de que este es el sitio blanco para la rifampicina.¹⁰

Este gen codifica para una secuencia de 50 aminoácidos cercanos al centro de la cadena beta del polipéptido, la cual está compuesta de 1342 aminoácidos . Se ha supuesto que esta región de la cadena beta es la parte fundamental del sitio de unión a la rifampicina, además éste sitio se protege contra una ruptura proteolítica si se encuentra unido a la rifampicina ¹⁰.

La rifampicina no requiere de un mecanismo especial de penetración , debido a su carácter lipofílico por lo que alcanza el citoplasma vía un equilibrio de distribución ²⁷. Mycobacterium tuberculosis, el agente causante de la tuberculosis, contiene muy altas cantidades de lípidos en su pared celular, lo que facilita la penetración de la rifampicina.

Con unas cuantas excepciones, muchas rifamicinas son activas contra bacterias cuando aquellas son activas contra RNA polimerasa, siendo la excepción las rifamicinas que poseen un grupo fuertemente polar, como un grupo carboxilo, las cuales son activas frente a la enzima pero no contra las células bacterianas, debido a su incapacidad para atravesar la pared celular ²². Un caso es el de la rifamicina B que es inactiva frente a la bacteria, pero activa frente a la enzima, si este antibiótico se transforma a rifamicina S, su actividad aumenta notablemente ²³. Es importante de tomar en cuenta lo anterior en el diseño de nuevas rifamicinas, para que por medio de la modificación de su estructura se pueda incrementar su permeabilidad a través de la pared celular.

Sin embargo, recientemente se han propuesto mecanismos de acción adicionales. Uno de ellos es el que la rifamicina SV en presencia de iones metálicos de transición, puede sustancialmente degradar a la molécula de DNA, debido a la formación del radical $\cdot\text{OH}$, el cual tiene la capacidad de degradar a la desoxirribosa ²⁴.

3.6.-Estudios de relaciones estructura-actividad para rifamicinas.

Se han llevado a cabo muchos estudios acerca de la relación estructural con su actividad de estos antibióticos.

La metanólisis de la rifamicina S, en condiciones ácidas da el epoxi-

derivado en 23 y 27, resultando ser un compuesto inactivo. También el 21 y 23 O-acetil rifamicina S, presentó una actividad muy baja³¹. La hexahidrorifamicina S muestra una actividad muy baja en comparación a los análogos dihidro y tetrahidro, debida a los cambios que se producen en la conformación de la cadena ansa³².

Esas conformaciones han sido estudiadas por resonancia magnética nuclear para las rifamicinas S, SV y las 3-sustituídas. Las rifamicinas presentan cuatro diferentes estereoisómeros conformacionales, debidos a la combinación de dos rotaciones, una relativa al plano que contiene el doble enlace en C-28 y C-29 y la otra relativa al plano de la amida³¹.

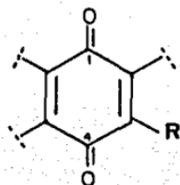
Maggi y colaboradores, encontraron que las rifamicinas en condiciones alcalinas, produjeron una desacetilación para dar el 25-desacetil derivado, sin pérdida de la actividad biológica, junto con otros dos productos: el 25-desacetil-23-acetil derivado y el 25-desacetil-21-acetil derivado, ambos biológicamente inactivos³¹.

El grupo hidroxilo unido a C-8, también es una parte esencial de las rifamicinas, debido a que la 8-metoxi rifamicina S es inactiva. Sin embargo, los hidroxilos de C-1 y C-4, pueden ser sustituidos por grupos cetónicos, sin pérdida sustancial de la actividad²⁸.

A partir de esos estudios se puede deducir que los requerimientos en

cuanto a su estructura, para la inhibición de la RNA polimerasa de la bacteria, son los grupos hidroxilos libres en C-8, C-21 y C-23, junto con una conformación adecuada del anillo ansa y un arreglo estereoquímico bien definido ³³.

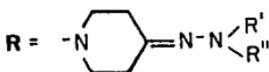
Además se han realizado diversas modificaciones en las rifamicinas, principalmente en las posiciones 3 y 4. A continuación se presentan algunos resúmenes de los estudios más relevantes:



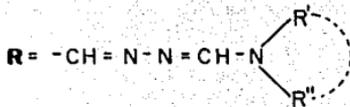
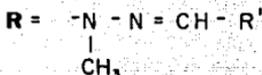
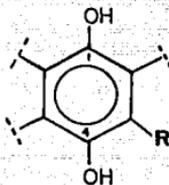
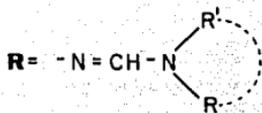
R = Cl, Br, I, CN

Actividad relativa a rifampicina.

Incrementando el carácter electro-atrayente del sustituyente, aumenta la inhibición a RNA polimerasa.^{35,36}



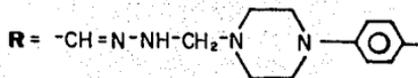
Disminuye la actividad contra gram negativos, misma actividad contra M. tuberculosis, mayor toxicidad ³⁷.



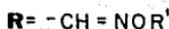
Mayor actividad contra M. tuberculosis, menor potencia contra gram negativas, inestable in vivo ³⁸.

Disminuye su actividad contra gram positivas y negativas, actividad similar o menor contra M. tuberculosis ³⁹.

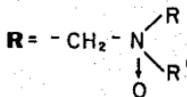
Actividad similar contra M. tuberculosis, mayores tiempos de vida media en plasma, algunos son más tóxicos ^{40,41}.



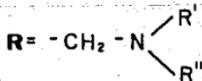
Menor actividad contra M. tuberculosis ⁴².



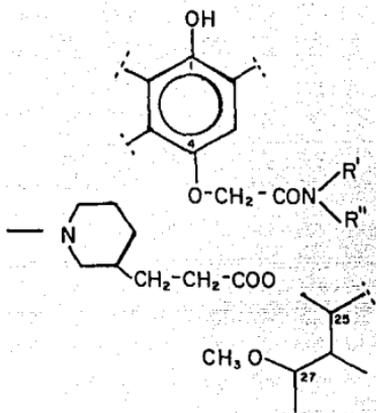
Disminución de la actividad in vitro y aumento de la toxicidad si se aumenta la lipofilidad ⁴³.



Menor actividad contra M. tuberculosis y gram negativas. Mayor actividad contra algunas gram positivas ⁴⁴.

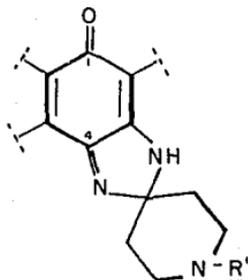


Menor actividad contra M. tuberculosis, conforme aumenta la lipofilidad de R y R' ⁴⁴.

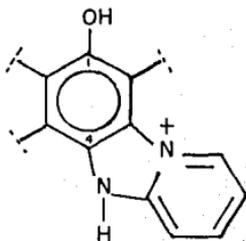


Menor actividad contra M. tuberculosis, aumento de actividad si los sustituyentes aumentan su caracter lipofílico ⁴⁵.

Muy activa contra gram negativas, misma actividad contra gram positivas e inhibición a RNA polimerasa ⁴⁶.



Potencia similar, aumenta la actividad in vitro contra M. tuberculosis, si se aumenta el número de átomos de carbono en la cadena lateral, aumentando la toxicidad ^{47,48}.

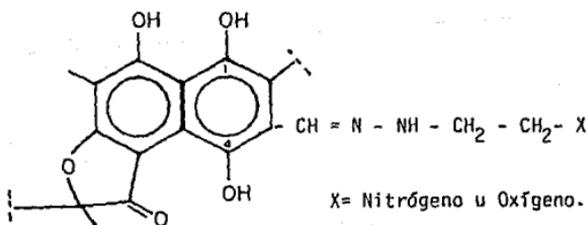


Buena actividad antibacteriana, no es absorbido en el tracto gastrointestinal ⁴⁹.

En general se observa que si los sustituyentes formados en C-3, son más lipofílicos o su carácter electroatrayente disminuye, la capacidad inhibitoria sobre la RNA-polimerasa disminuye.

Las rifamicinas con mayor utilidad terapéutica son las 3-sustituidas y particularmente las hidrazonas que puedan ser formadas en esa posición.

A partir de esos estudios se puede inferir que las características estructurales del antibiótico que interaccionan con la enzima y consecuentemente presentan una mayor actividad antibacteriana, son cuando en C-3 se encuentra un átomo de carbono, unido mediante un doble enlace a un átomo de nitrógeno, como puede ser una hidrazona, y este a su vez unido a dos átomos de carbono que finalmente se encuentran unidos a un elemento electronegativo como oxígeno o nitrógeno. Una representación general puede ser escrita como sigue:



Además es importante destacar que no se han estudiado los posibles factores estereoquímicos que podrían influenciar en esta parte de la molécula sobre la actividad que puedan presentar sobre la RNA-polimerasa¹⁰.

3.7.- Métodos cuantitativos para determinar la relación estructura-actividad.

Uno de los principios fundamentales en la química farmacéutica es la correlación entre la estructura molecular y la actividad biológica que pueda presentar una sustancia, siendo este un camino para el diseño racional de fármacos más efectivos. En los años 60 se comienza a encontrar descriptores adecuados de una estructura molecular, que puedan ser correlacionados con la reactividad química de una sustancia dada.

Hammett, fué el primero en encontrar una correlación entre la acidez de los ácidos benzóicos para y meta sustituidos y los descriptores moleculares llamados sigma¹⁰.

Se han desarrollado modelos matemáticos similares al de Hammett, que correlacionan alguna propiedad fisicoquímica de un fármaco con su actividad biológica. Burger, estableció que una propiedad fisicoquímica importante en la efectividad de un fármaco es la hidrofobicidad²¹. Por otra parte, Bell y Roblin, demostraron que en las sulfonami-

das existe un pK_a óptimo para presentar la mejor actividad antibacteriana ⁹¹.

Los métodos cuantitativos para establecer relaciones cuantitativas estructura- actividad (QSAR), describen matemáticamente la relación entre una propiedad biológica que se desea optimizar y las propiedades moleculares calculadas de su estructura ⁹².

Uno de esos métodos es el de Hansch o de energía libre lineal ⁹³. Se basa en la hipótesis de que el efecto de los sustituyentes sobre las interacciones de un fármaco y su receptor u otra biomolécula es de tipo aditivo. Esas interacciones pueden ser de tipo electrostático, estérico e hidrofóbico ⁹⁴.

Los descriptores moleculares de Hansch, son las constantes π , que representan el efecto de un sustituyente sobre el logaritmo del coeficiente de partición entre el 1-octanol y el agua de una sustancia dada ($\log P$). Esta variable fisicoquímica ha demostrado que puede correlacionar con la actividad biológica, toxicidad y la distribución de un fármaco ⁹⁵.

Esas correlaciones permitieron expresar matemáticamente la ecuación de Hansch (Ecuación 1).

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

El término $\log (1/C)$, es la potencia relativa de un análogo, don de C es la concentración requerida para producir una respuesta biológica. Los términos π , E_s y σ , representan las constantes de Hansch, Taft y Hammett, respectivamente. Los valores de los coeficientes a, b, c, d y e, pueden ser determinados por un análisis de regresión múltiple ⁵⁴.

Se ha observado que la relación entre actividad biológica y $\log P$, no es necesariamente lineal, por lo que se ha propuesto una ecuación 2, que contiene únicamente los términos π y π^2 , lo que permite calcular un $\log P$ óptimo, conocido como $\log P_o$. ⁵⁵.

$$\log (1/C) = a + b \pi + c \pi^2 + d E_s + e MR + F \sigma$$

Ecuación 2

El método de Hansch puede además ser estudiado estadísticamente, con el fin de diseñar nuevas series que reducen el número de análogos requeridos para ser investigados. Actualmente éste método se ha utilizado para la determinación de sustituyentes que puedan ser bioisómeros, en el mapeo de receptores y estudiar diversos parámetros farmacocinéticos ⁵².

Las principales ventajas de éste método es que a través de la extrapolación de correlaciones encontradas entre parámetros estructura-

les y la actividad biológica se puede proponer la síntesis de derivados con mayor actividad. Asimismo evita la síntesis y evaluación biológica de derivados con la misma actividad y se encuentra en la posibilidad de confirmar o rechazar la hipótesis de un modo de acción ⁵⁷.

Sin embargo, éste método presenta varias limitaciones, como es que no siempre se puede predecir correctamente la actividad de un nuevo análogo y que es todavía incapaz de transferir un descriptor molecular a un diagrama de tres dimensiones ⁵⁸.

En cuanto a las rifamicinas, estas han sido estudiadas mediante los métodos cuantitativos de relación estructura-actividad con buenos resultados.

Barbaro et al, realizaron uno de los primeros estudios para relacionar el carácter lipofílico y la actividad antibacteriana de algunas rifamicinas contra S. aureus ⁵⁹. La propiedad fisicoquímica que fué utilizada para describir su estructura fué la determinación cromatográfica del R_m para cada una de ellas, el cual es el logaritmo de: $[(1/R_f) - 1]$ ^{60,61}, utilizando como eluyente acetona al 39% en agua. Los resultados mostraron una relación parabólica entre el R_m y el valor de $\log 1/C$, determinando la ecuación 3.

$$\log 1/C = - 0.370 R_m - 1.659 R_m^2 + 4.012 \quad \text{Ecuación 3}$$

Más tarde otro grupo de investigación evaluaron la actividad de 76 rifamicinas contra S. aureus y fueron correlacionados cuantitativamente con sus valores de R_m , donde fueron encontradas tres correlaciones parabólicas distintas para tres series estudiadas⁴². Se propuso en ese estudio la ecuación 4 que expresa una correlación general y que confirma que la actividad contra S. aureus por parte de las rifamicinas 3 y 4 sustituidas, se debe principalmente a la capacidad que tiene la molécula para penetrar a la bacteria.

$$\log 1/C = -0.84 R_m^2 - 0.18 R_m + 8.02 \quad \text{Ecuación 4}$$

Sin embargo, también se observó en ese estudio, que la actividad intrínseca de las rifamicinas, como la inhibición a la RNA-polimerasa DNA-dependiente, fué sustancialmente independiente de la lipofili-
dad.

Quinn y Driscoll, desarrollaron unas ecuaciones para una serie de 44 amidas y 25 hidrazidas de la rifamicina B en cinco sistemas bacterianos. Las ecuaciones 5 y 6 para esos compuestos también mostraron que la actividad es una función parabólica de $\log P$. Dos amidas de la rifamicina B fueron sintetizadas y evaluadas posteriormente en base a los resultados obtenidos anteriormente. Las predi-

cciones resultaron ser correctas, cuando se midió su actividad anti biótica en cinco de seis experimentos realizados ⁴⁵.

$$\log 1/C = 0.27 \log P^2 - 0.62 \log P - 0.15 \quad \text{Ecuación } \underline{5}$$

$$\log 1/C = 0.03 \log P^2 + 0.41 \log P + 0.76 \quad \text{Ecuación } \underline{6}$$

Es importante mencionar que en los estudios realizados, donde se utiliza el coeficiente de reparto octanol-agua, se parte de un solo valor experimental de una rifamicina y los valores de las demás rifamicinas en estudio, son derivados a partir de constantes teóricas.

También se han utilizado otros descriptores estructurales para las rifamicinas, tales como las constantes de entropía para cada sustituyente, obteniendo excelentes correlaciones ⁴⁵.

3.8.-Determinación del log P y la actividad biológica.

El sistema octanol-agua, ha demostrado una gran utilidad en los estudios de relaciones cuantitativas estructura-actividad. El 1-octanol es un compuesto que funciona como modelo de los componentes lipídicos de la membrana celular.

La determinación del coeficiente de partición octanol-agua (P), por medio de los métodos convencionales, resulta ser difícil de realizar y especialmente para compuestos que son escasamente solubles

en agua, por lo que se han desarrollado métodos cromatográficos para determinar el coeficiente de reparto (P), de un fármaco ⁶⁴.

Nahum y Horvath, utilizaron la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para determinar los coeficientes de reparto octanol-agua, utilizando una sustancia como referencia interna de coeficiente de partición conocido, la cual debe ser similar a la sustancia de interés ⁶⁵.

Con respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana, existen dos métodos que son frecuentemente empleados : el de difusión en agar y el del método de tubo. Las bases de ambos métodos es la comparación cuantitativa del efecto de dos sustancias sobre el crecimiento de un microorganismo adecuado en un medio de cultivo, una de las sustancias es un estándar y la otra es una muestra cuya actividad será determinada ⁶⁶.

Se ha establecido que de los dos métodos, el del ensayo de difusión en agar es más confiable , debido a que es un ensayo biológico donde existen diversas variables fisicoquímicas en las que se utiliza a un microorganismo como indicador ; muchas de las variaciones observadas son debidas a descuidos en los aspectos fisicoquímicos y no por una variación de orden biológico ⁶⁶.

Para el caso específico de las rifamicinas, se ha probado que la evaluación biológica es independiente del método utilizado ⁶⁹.

El método elegido para analizar tanto la actividad biológica, como para determinar el coeficiente de reparto P, traerá como resultado una mejor calidad de los datos biológicos, grado de varianza en los resultados y una buena relación del tiempo necesitado para la síntesis y las pruebas biológicas.

4.- RESULTADOS Y DISCUSION

Con el fin de analizar el comportamiento cuantitativo de la relación estructura-actividad de algunas rifamicinas, se sintetizaron varios de estos antibióticos que posteriormente fueron evaluados biológica y fisicoquimicamente.

Las síntesis realizadas fueron las siguientes:

4.1.- Síntesis de rifamicina O:

Existen varios métodos sintéticos reportados. El primeramente descrito fué el de Sensi, donde hizo una oxidación de la rifamicina B por medio de peróxido de hidrógeno, con un rendimiento del 60%¹⁸.

Uno de los métodos más recientes es el de Seons y Han, donde utilizaron dióxido de manganeso como oxidante, como se puede observar en la figura No. 4:⁶⁷

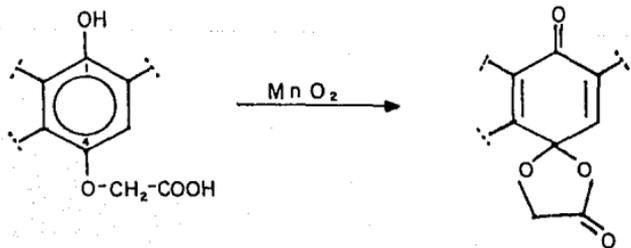


Figura 4.

En este trabajo se utilizó el método anterior, donde se obtuvo un rendimiento del 89.4%, similar al reportado (87%).

4.2.- Síntesis de rifamicina S:

Sensi, describió una síntesis a partir de rifamicina O, por medio de ácido clorhídrico¹⁷.

Esas reacciones de hidrólisis también pueden ser llevadas a cabo con ácido sulfúrico y a distintas temperaturas, con buenos resultados⁶⁸.

Seons y Han reportaron una síntesis a partir de la rifamicina B con bióxido de manganeso y posterior hidrólisis con ácido clorhídrico, para obtener rifamicina S con un rendimiento del 91%⁶⁷, la cual se esquematiza en la figura 5.

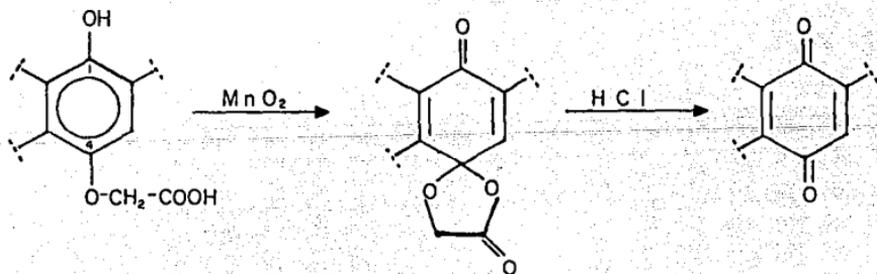


Figura 5.

La síntesis de la rifamicina S, se realizó por el método anterior con un rendimiento del 89.1%.

4.3.- Síntesis de rifamicina SV:

La rifamicina SV ha sido sintetizada a partir de rifamicina S, por medio de una reducción con ácido ascórbico¹⁷.

Posteriormente se publicó una técnica que reportaba un rendimiento del 78%¹⁷.

En esta tesis se realizaron estudios encaminados en aumentar el rendimiento de esta síntesis, variando la cantidad de disolvente y la relación de agente reductor. Finalmente se encontraron las condiciones que permitieron obtener un rendimiento del 86.6%, superior al descrito en la literatura química. La síntesis se representa en la figura 6.



Figura 6.

4.4.- Síntesis de 3-formil rifamicina SV:

La 3-formil rifamicina SV, fué sintetizada a partir de una oxidación con bióxido de manganeso de las N,N-disustituidas-3-amino metil rifamicina SV²².

En 1969 se reportó la síntesis de esta rifamicina a partir de rifamicina S con cantidades equimoleculares de formaldehído y terbutilamina en presencia de bióxido de manganeso, para finalmente ser reducida con ácido ascórbico en medio ácido⁶⁹.

Para sintetizar a la 3-formil rifamicina SV, se siguió el método anterior con un rendimiento del 71.5%, dicha síntesis se presenta en la figura 7.

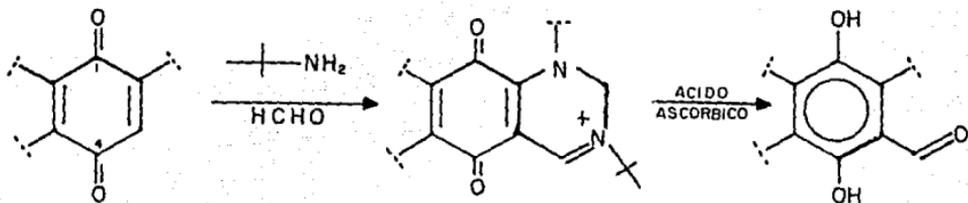


Figura 7.⁷⁰

4.5.- Síntesis de rifampicina:

Maggi y colaboradores, describieron la síntesis de la rifampicina, la cual es una hidrazona obtenida a partir de la 3-formil rifamicina SV y

la 1-amino-4-metil piperazina con un rendimiento del 90%, como se puede observar en la figura 8.²³

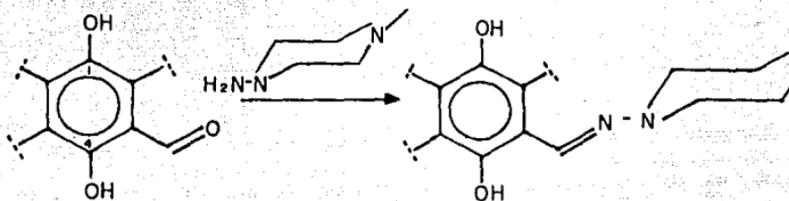


Figura 8.

Posteriormente fueron patentados los procesos sintéticos para obtener rifampicina a partir de rifamicina S, de manera directa^{71,72}

Con el propósito de obtener a la rifampicina, se siguió el método de Maggi, la cual es una reacción rápida y se obtuvo un rendimiento del 90.9%.

4.6.- Síntesis de 3-[(4-morfolinilimino)metil]rifamicina SV:

En 1966, Maggi y Sensi patentaron un procedimiento para sintetizar distintos derivados de las rifamicinas incluyendo a la 3-[(4-morfolinilimi

no)metil]rifamicina SV, la síntesis se realizó utilizando tetrahidrofurano como disolvente y recrystalizando de acetona ⁷³.

Para obtener este producto, se hizo a partir de la 3-formil rifamicina SV con 4-amino morfolina, utilizando como disolvente acetato de etilo y se recrystalizó de acetona, para obtener un rendimiento del 86.3%. La síntesis se representa en la figura 9.

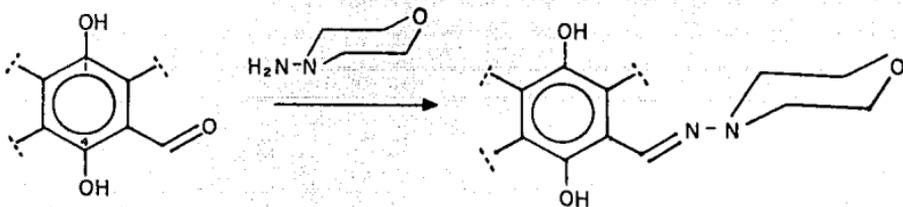


Figura 9.

4.7.- Síntesis de la (S)-Rifaestradina:

La (S)-Rifaestradina, se preparó formando la hidrazona de la 3-formil rifamicina SV con la (S)-(-)-1-amino-2-(metoximetil) pirrolidina, en acetato de etilo y cristalizada de acetona-acetato de etilo, con un rendimiento del 92.8%.

La estructura de la (S)-Rifaestradina, así como sus constantes físicas y espectroscópicas se indican en la Tabla 1.

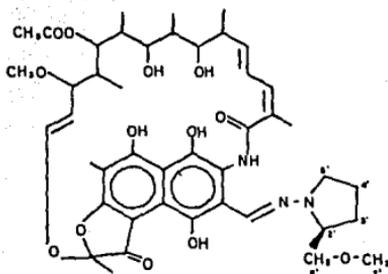
El espectro de infrarrojo, presentó bandas de absorción a 3450, 2968, 1718, 1645, 1718, 1522 y 1251 cm^{-1} , características para las rifamicinas. El espectro de ultravioleta, presentó máximos de absorción a 246 y 341 nm, que sugirieron la presencia de un cromóforo del tipo de la rifampicina^{74,75}

Con lo anteriormente expuesto se confirma que el cromóforo hidroquinoi de la (S)-Rifaestradina, permanece inalterado.

Por otra parte, la (S)-Rifaestradina es una molécula similar a la rifampicina, la diferencia entre ambas estriba en el sustituyente de la posición 3, en la rifampicina es un núcleo de 4-metil piperazina y en la (S)-Rifaestradina es un núcleo de (S)-(-)-2-(metoxi metil)pirrolidina.⁸³

Las señales en RMNP en conjunto con el espectro bidimensional COSY (Espectro 9), permitieron confirmar al núcleo de la 2-(metoxi metil) pirrolidina como sustituyente en la posición 3, el singulete a 3.38 ppm para el metoxilo, el multiplete a 3.4 ppm para los hidrógenos de C-2' y C-5', el multiplete a 1.95 ppm para los protones de C-3' y C-4' y los multipletes a 3.05 y 3.35 ppm para los protones de C-6'.

TABLA 1.- Constantes físicas y espectroscópicas
de la (5)-Rifaestradina.



P.F. : 182-184°C (descomposición)

$[\alpha]_D^{18} = -14.5^\circ$

Tiempo de retención HPLC: 1.87 s.

UV $\lambda_{max}^{MeOH} = 246, 341$

IR $\nu_{max}^{KBr} : 3450, 2968, 2928, 1718, 1645, 1562, 1522, 1456, 1417, 1376, 1331, 1251$ (Espectro 7)

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): -0.3(3H,d,J=7,CH₃-34); 0.65(3H,d,J=7,CH₃-33); 0.8(3H,d,J=7,CH₃-31); 1.0(3H,d,J=7,CH₃-32); 1.35(1H,ddq,J=10,1.5,7,H-26); 1.55(1H,ddq,J=10,1.7,H-24); 1.7(1H,ddq,J=1,1.5,7,H-22); 1.82(3H,s,CH₃-13); 1.95(4H,m,CH₂-3',CH₂-4'); 2.07(3H,s,CH₃-30); 2.15(3H,s,CH₃-36); 2.2(3H,s,CH₃-14); 2.35(1H,ddq,J=5.9,7,H-20); 3.05(1H,m,H α -6'); 3.05(3H,s,CH₃-37); 3.1(1H,dd,J=1.5,10,H-23); 3.35(1H,m,H β -6'), 3.38(3H,s,CH₃-7'); 3.40(3H,m,H-2',CH₂-5'); 3.45(1H,dd,J=1.5,7,H-27); 3.6-3.8(2H,s,OH-21,OH-22); 3.75(1H,dd,J=9.1,H-21); 4.95(1H,dd,J=1.1,H-25); 5.1(1H,dd,J=7,13,H-28); 5.9(1H,dd,J=15.5,H-19); 6.24(1H,d,J=13,H-29); 6.4(1H,dd,J=11.7,H-18); 6.5(1H,d,J=11,H-17); 7.8(1H,s,-CH=N-); 11.85(1H,s,-NH-); 13.22(1H,s,OH-1,OH-8,OH-4). (Espectros 8, 9)

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 7.45(C-14); 8.51(C-33); 8.96(C-34); 10.72(C-32), 17.35(C-31); 20.66, 20.98 (C-30, C-36); 21.63(C-13); 21.82(C-3'); 26.81(C-4'); 33.26(C-22); 37.42(C-24); 38.22(C-20); 39.66(C-26); 47.96(C-5'); 56.94(C-37); 59.26(C-7'); 61.85(C-2'); 70.47(C-21); 74.23(C-6'); 74.36(C-25); 76.74(C-23,C-27); 104.52, 105.32(C-9,C-2); 108.83(C-12); 111.74, 112.24(C-3,C-5); 117.68(C-10); 118.47(C-28); 119.85(C-7); 123.53(C-18); 129.9(C-16); 134.35(-CH=N-); 134.35(C-17); 138.46(C-1); 142.09(C-29); 142.88(C-19); 146.61(C-4); 169.19, 169.82(C-B,C-15); 172.02(C-35); 174.29(C-6); 194.93(C-11).

(Espectros 10, 11)

Las 7 señales observadas en RMN¹³C a 61.85 ppm(C-2'), 21.82 ppm(C-3'), 26.81 ppm(C-4'), 47.96(C-5'), 74.23 ppm(C-6') y a 59.26 ppm(C-7'), son consistentes con la estructura de dicho sustituyente ⁷⁶

Con las evidencias hasta aquí presentadas, permitieron asignar la estrutura de la (S)-Rifaestradina, la cual es un compuesto no descrito en la literatura.

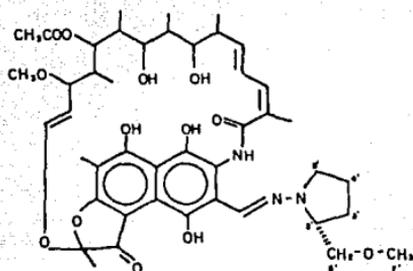
4.8.- Síntesis de la (R)-Rifaestradina.

La (R)-Rifaestradina, se sintetizó formando la hidrazona de la 3-formil rifamicina SV con la (R)-(+)-1-amino-2-(metoximetil)pirrolidina, en acetato de etilo y purificada por cromatografía en columna, con un rendimiento del 72.7%.

La estructura de la (R)-Rifaestradina, así como sus constantes físicas y espectroscópicas se indican en la Tabla 2.

La (R)-Rifaestradina presentó los mismos espectros de infrarrojo y ultravioleta que para la (S)-Rifaestradina, que indicaron su relación de isómeros. Sin embargo las propiedades de uno y otro, tales como punto de fusión, actividad óptica, tiempo de retención en HPLC y Rf, son completamente distintas, lo que indica su naturaleza de diastereoisómeros.

TABLA 2.- Constantes físicas y espectroscópicas
de la (R)-Rifaestradina.



P. F.: 125-127°C

$[\alpha]_D^{18} = +194^\circ$

Tiempo de retención HPLC: 5.2 s

UV λ_{max}^{MeOH} : 245, 341

IR ν_{max}^{KBr} : 3450, 2970, 2920, 1710, 1645, 1560, 1520, 1450, 1415, 1370, 1320, 1250 (Espectro 12)

RMNP (300MHz, $CDCl_3$): -0.3(3H,d,J=7,CH₃-34); 0.65(3H,d,J=7,CH₃-33); 0.8(3H,d,J=7,CH₃-31); 1.0(3H,d,J=7,CH₃-32); 1.35(1H,ddq,J=10,1.5,7,H-26); 1.6(1H,ddq,J=10,1.7, H-24); 1.75(1H,ddq,J=1.1,5.7,H-22); 1.8(3H,s,CH₃-13); 1.95(4H,m,CH₂-3',CH₂-4'); 2.07(3H,s,CH₃-30); 2.15(3H,s,CH₃-36); 2.2(3H,s,CH₃-14); 2.3(1H,ddq,J=5.9,7,H-20); 3.05(1H,m,H_a-6'), 3.05(3H,s,CH₃-37); 3.1(1H,dd,J=1.5,10,H-23); 3.4(1H,m,H_b-6'); 3.42(3H,s,CH₃-7'); 3.35(3H,m,H-2',CH₂-5'); 3.5(1H,dd,J=1.5,7,H-27); 3.5-3.65(2H,s,OH-21,OH-22); 3.75(1H,dd,J=9,1,H-21); 4.95(1H,dd,J=1,11,H-25); 5.9(1H,dd,J=15.5, H-19); 6.24(1H,d,J=13,H-29); 6.36(1H,dd,J=11,7,H-18); 6.4(1H,d,J=11,H-17); 7.95(1H,s,-CH=N-); 11.9(1H,s,NH); 12.65-13.25(3H,s,OH-1,OH-4,OH-8). (Espectros 13, 14)

RMN¹³C (300MHz, $CDCl_3$): 7.51(C-14); 8.81(C-33); 8.92(C-34); 11.00(C-32); 17.32(C-31); 20.75(C-30,C-36); 21.48(C-13); 22.06(C-3'); 27.11(C-4'); 33.32(C-22); 37.32(C-24); 38.26(C-20); 39.57(C-20); 49.85(C-5'); 57.14(C-37); 59.19(C-7'); 63.54(C-2'); 70.77(C-21); 74.14(C-6'); 74.43(C-25); 76.81(C-23,C-27); 104.45,105.76, (C-9,C-2); 108.75(C-12); 112.37(C3-C-5); 118.03(C-28); 118.13(C-10); 120.09(C-7); 122.92(C-18); 129.93(C-16); 134.54(-CH=N-); 134.54(C-17); 138.43(C-1); 142.16, 142.53(C-19,C-29); 147.39(C-4); 169.06,170.90(C-8,C-15); 172.23(C-35); 174.46(C-6); 195.45(C-11). (Espectros 15, 16)

Las señales en RMNP fueron asignadas y confirmadas mediante experimentos de tipo COSY (Espectro14), que revelaron la presencia del núcleo de la 2-(metoximetil)pirrolidina en la posición 3: un singulete a 3.42 ppm para el grupo metoxilo, el multiplete a 3.35 ppm para los protones de C-2' y C-5', un multiplete a 1.95 ppm para los hidrógenos de C-3' y C-4' y finalmente los multipletes a 3.05 ppm y 3.4 ppm para los protones de C-6'.

Por otra parte, las señales en RMN¹³C a 63.54 ppm(C-2'), 22.06 ppm(C-3'), 27.11 ppm(C-4'), 49.85 ppm(C-5'), 74.14 ppm(C-6') y 59.19 ppm (C-7'), indican la estructura del sustituyente de la (R)-Rifaestradina.⁷⁶

Con esta información, se asignó la estructura de la (R)-Rifaestradina, la cual es un compuesto nuevo.

La determinación de los coeficientes de partición octanol-agua (P), de los derivados anteriormente descritos se describe a continuación:

4.9.- Determinación del coeficiente de partición octanol-agua (P).

Considerando que el coeficiente de partición octanol-agua, es una constante de equilibrio que solamente puede ser aplicable en soluciones diluidas, la medición de esos coeficientes se ha realizado con ciertas difi-

cultades para ser llevados a cabo con exactitud y precisión ⁷⁷.

El uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), ha venido a solucionar en gran parte las dificultades anteriormente mencionadas, debido a su alta eficiencia, rapidez y sensibilidad ⁷⁸.

En base a esas consideraciones, se desarrolló en esta tesis un método analítico que permitió valorar los coeficientes de partición (P), por medio del uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Se determinaron las concentraciones del antibiótico entre el 1-octanol y agua (Buffer fosfatos pH=7.4) ⁷⁹, realizando la distribución por los métodos convencionales ⁸⁰.

Las concentraciones fueron evaluadas únicamente en la fase octanólica, por medio de técnicas de HPLC. Se determinó la concentración del antibiótico en el 1-octanol, antes de efectuar la distribución y después de esta, la diferencia entre esas dos mediciones debería ser la concentración aproximada en la fase acuosa.

El coeficiente de partición (P), fué calculado a partir de la ecuación

7.⁸⁰

$$P = \frac{W_1 / V_1}{(W - W_1) / V_2} \quad \text{Ecuación } \underline{7}$$

donde:

W_1 = cantidad de rifamicina en octanol, después de extraerla.

W = cantidad de rifamicina inicial en octanol.

V_1 = volúmen de octanol.

V_2 = volúmen de agua.

La diferencia $W-W_1$, es la cantidad de rifamicina en la fase acuosa. En la Tabla 3, se presentan los resultados obtenidos bajo estas condiciones.

La mayoría de los resultados obtenidos, no han sido reportados previamente por medio de evaluaciones experimentales y es importante destacar que el valor encontrado para la rifampicina, fué muy similar al reportado por Seygel, el cual lo determinó bajo condiciones experimentales similares.

Sin embargo, el método desarrollado no fué capaz para determinar el coeficiente de partición octanol-agua de la rifamicina O, debido a su escasa solubilidad en agua.

Una vez que se determinaron los coeficientes de partición (P), todos los derivados fueron evaluados con respecto a su actividad antibacteriana.

4.10.- Evaluación de la actividad antibacteriana.

La evaluación de la actividad antibacteriana, se realizó mediante un ensayo biológico de difusión en agar.

El ensayo se realizó para todos los derivados obtenidos con un inóculo de Bacillus subtilis ATCC 6633, un medio de cultivo y los métodos de disolución y dilución descritos en la USP XXII ⁸¹.

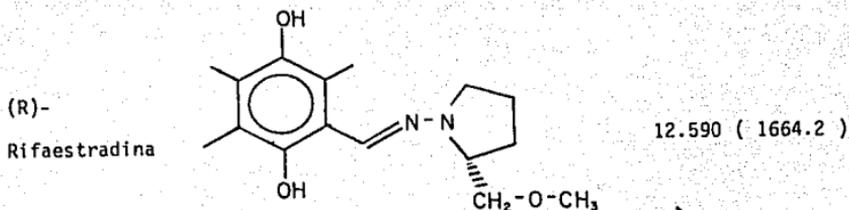
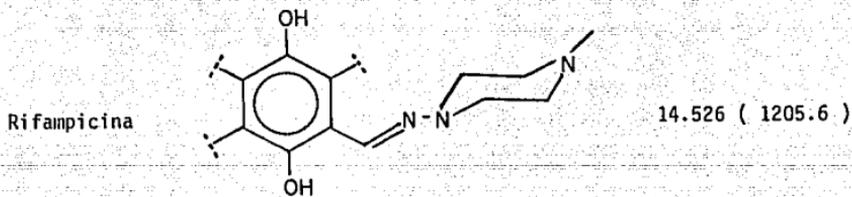
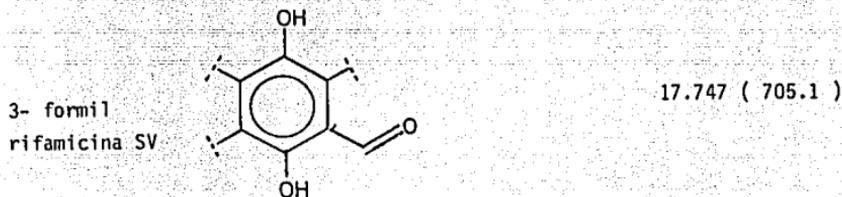
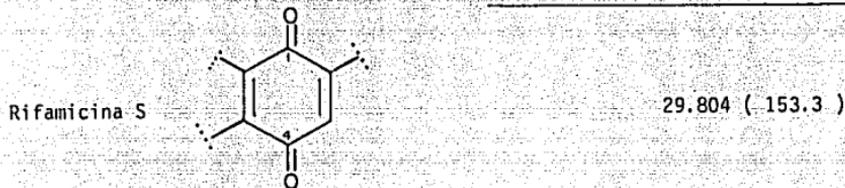
Por otra parte, con el fin de minimizar la variabilidad de la respuesta en estas pruebas, se decidió aplicar la muestra de antibiótico al azar por medio de un diseño de cuadro latino ⁸². Los resultados obtenidos para cada rifamicina sintetizada, se reportan en la Tabla 3 y están expresados en $\mu\text{mol/g}$ de rifamicina estándar.

A partir de esos resultados se puede observar que la introducción de un grupo fuertemente polar, como en la rifamicina B, trajo como resultado que la molécula presentara una actividad biológica demasiado baja. Por otra parte, la rifamicina O, que no presenta dicho grupo polar libre, presenta una mejor actividad biológica con respecto a la rifamicina B, debido a que la permeabilidad de la membrana bacteriana se ve disminuida para moléculas con grupos polares.

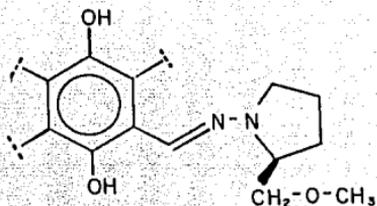
La actividad entre la rifamicina S y SV fué prácticamente igual, lo cual confirma el hecho de que los hidroxilos de C-1 y C-4, pueden ser sustituidos por grupos carbonilos, sin una pérdida de la actividad ⁸⁴.

TABLA 3.- Evaluación del coeficiente de reparto (P) y actividad microbiológica de rifamicinas.

Rifamicina:	(P)	Actividad Microbiológica (mmol/g rifampicina)
-------------	-----	-----------------------------------------------

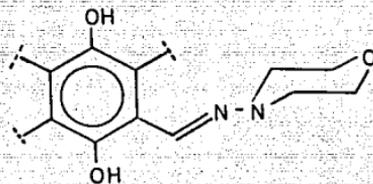


(S)-
Rifaestradina



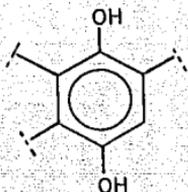
11.416 (1936.4)

3-[(4-morfoli-
nilimino)metil]
rifamicina SV



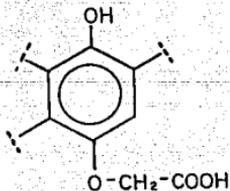
10.801 (1815.6)

Rifamicina SV



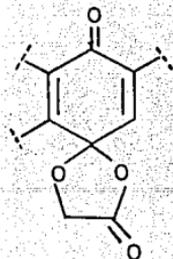
1.391 (161.7)

Rifamicina B



0.241 (9.2)

Rifamicina O



— (56.7)

La 3-formil rifamicina SV, presentó una actividad biológica mayor con respecto a la rifamicina SV, posiblemente debido a que en aquella existe un grupo carbonilo que puede formar un puente de hidrógeno con el grupo -NH- de la cadena ansa, que posiblemente genere una nueva conformación que facilite su paso a través de la membrana bacteriana³⁴.

Para los antibióticos: 3[(4-morfolinilimino)metil]rifamicina SV, rifampicina, (R)-Rifaestradina y (S)-Rifaestradina, se presentó la mayor actividad antibacteriana, los cuales presentan un grupo electroattractor que se encuentra conjugado con la naftohidroquinona. Estos resultados son consistentes con la observación reportada de que si se incrementa el carácter electroatrayente del sustituyente de la posición 3, aumenta la inhibición a la RNA-polimerasa³⁵.

La diferencia en actividad antibacteriana entre la rifampicina y la (S), (R)-Rifaestradina, 3-[(4-morfolinilimino)rifamicina SV, en conjunto se deba posiblemente a que el oxígeno de la morfolina y el del grupo metoximetil se una más fuertemente por medio de un puente de hidrógeno (O: ---H-O) y produzca una inhibición más marcada sobre la RNA-polimerasa, comparado con el que puede formar el hidrógeno protonado de la piperazina (-N-H + ---:O-) sobre N-4, el cual es de naturaleza más débil, además por una posible interacción dipolo-dipolo que favorezca la unión no covalente entre la enzima y el fármaco, siendo estas proposiciones consistentes con las hipótesis de Arora y con otros estudios previos^{34,10}.

Es muy interesante observar que de los dos estereoisómeros sintetizados,

la (R)-Rifaestradina y la (S)-Rifaestradina, presentan actividades cualitativamente diferentes, lo cual demuestra que la quiralidad de un fármaco puede ser muy importante, debido a la naturaleza asimétrica de las biomacromoléculas.⁸⁴

La distinta afinidad que presentan este par de diasterosi6meros frente a la RNA-polimerasa de Bacillus subtilis, indica la importancia de la orientación espacial del sustituyente de la posición 3, influenciada además por interacciones no covalentes como son los puentes de hidrógeno ⁸².

Por otra parte, es importante señalar que no se habfan hecho estudios que demostraran la importancia de la estereoselectividad en el sustituyente de la posición 3 de las rifamicinas.

Una vez llegado a este punto, es oportuno destacar que el mayor problema en un análisis de estructura actividad es la complejidad de un sistema biológico. Una acción farmacológica es el resultado de una reacción en varios pasos, por lo que están involucrados varios equilibrios y generalmente uno de ellos puede limitar dicha acción farmacológica ⁸⁷.

En el caso de las rifamicinas, inhibidores enzimáticos antibacterianos, el problema se limita a la acción sobre la bacteria en un medio de cultivo y sobre la enzima aislada, por lo que los posibles pasos deter

minantes en su acción farmacológica se pueden reducir a: 1) La permeabilidad de la membrana bacteriana y 2) Una unión estereoselectiva a la RNA-polimerasa.

4.11.- Análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad.

Una vez obtenidos los datos sobre la actividad biológica y la medición del coeficiente de reparto octanol-agua, se procedió a correlacionar esas dos variables. La gráfica obtenida, puede observarse en la figura 10.

En esa figura se puede observar una clara correlación parabólica entre la actividad biológica contra Bacillus subtilis y el carácter lipofílico de la rifamicina, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura ^{59, 61}.

Posteriormente se graficó y analizó los valores logarítmicos de ambas variables por medio de un análisis de regresión lineal, de donde se derivó la ecuación 8.

$$\text{Log } 1/C = -2.642 P^2 + 3.228 P + 2.141 \quad \text{Ecuación 8}$$

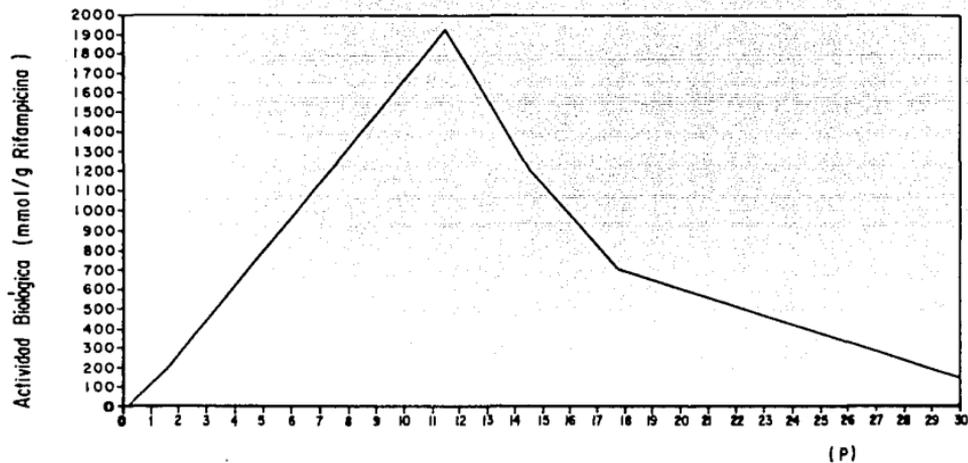


Figura 10

RELACION CUANTITATIVA ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Este análisis reportó una desviación estándar de 0.159, indica una buena correlación entre ambas variables y a la vez se pudo observar que las condiciones experimentales fueron adecuadas para la realización de las relaciones cuantitativas estructura-actividad .

Asimismo se reportó un valor de $\log P_o = 1.05$, el cual puede usarse como referencia para diseñar nuevos análogos de la rifampicina.

La desviación estándar es similar a la reportada en los estudios anteriores , sin embargo el $\log P_o$ no pudo compararse debido a que el que fué reportado por Quin y Driscoll , fué reportado para amidas de la rifamicina B .

5.- CONCLUSIONES

- 1.- En este estudio se sintetizaron las siguientes rifamicinas: Rifamicina O, Rifamicina S, Rifamicina SV, 3-formil rifamicina SV, Rifamicina, 3- (4-morfolinilimino)metil rifamicina SV, (R)-Rifaestradina y la (S)-Rifaestradina, siendo estas dos últimas dos rifamicinas no descritas en la literatura.
- 2.- Con el propósito de determinar el coeficiente de reparto para las rifamicinas sintetizadas, se desarrolló un método que emplea a la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), el cual es eficiente y presenta la ventaja de que la muestra no debe ser necesariamente pura.
- 3.- La determinación de la actividad antibacteriana se realizó contra Bacillus subtilis, mediante la metodología descrita en la USP XXII y además tratada por un diseño de cuadro latino, el cual disminuye el riesgo de lecturas erróneas. En general se observó que la actividad encontrada fue similar a las reportadas.
- 4.- En general la (R) y la (S)-Rifaestradina, mostraron un comportamiento físico y químico característico para una pareja de diastereoisómeros, por lo que era de esperarse que su actividad biológica entre

ellos fuera distinta. Dicha diferencia está influenciada por interacciones no covalentes y por factores estéricos y que finalmente demostró la importancia de la estereoselectividad en el sustituyente de la posición 3 de las rifamicinas.

- 5.- Al realizar las relaciones cuantitativas estructura-actividad, se observó una dependencia claramente parabólica entre la actividad antibacteriana contra Bacillus subtilis y su lipofilidad, por lo que se desarrolló una ecuación que describe matemáticamente dicho comportamiento.

6.- PARTE EXPERIMENTAL

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo la metodología convencional utilizando placas de vidrio recubiertas con Sílica-Gel 60 F-254 de Merck, utilizando varios sistemas de eluyentes.

La cromatografía en columna se realizó sobre Sílica-Gel 60 (0.04-0.063 mm) de Macherey Nagel.

Las constantes físicas y espectroscópicas fueron determinadas en los siguientes aparatos:

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no se encuentran corregidos.

Los espectros de IR fueron realizados en un instrumento Perkin - Elmer Mod. 599B en pastilla de KBr. (Facultad de Química UNAM)

Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrofotómetro UV - Perkin-Elmer Mod. 202. (Facultad de Química UNAM)

Los espectros de RMNP y RMN¹³C, se determinaron en un aparato Varian VXR-300S, utilizando como disolvente CDCl₃ y como referencia interna TMS. Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm). (Instituto de Química UNAM)

La rotación óptica fué determinada en un polarímetro Perkin-Elmer 241 a una temperatura de 18⁰C, utilizando una lámpara de radiación de sodio.

Las determinaciones por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, fueron hechas en un instrumento Varian 5000, equipado con detector de UV y un integrador Varian 4290.

La evaluación de la actividad biológica fué realizada por el método de difusión en agar, utilizando un diseño de cuadro latino. El medio antibiótico utilizado fué el DIFCO No.2 y la bacteria empleada fué Bacillus subtilis ATCC 6633.

Los reactivos y disolventes se emplearon como se encuentran comercialmente, ya sea grado reactivo o industrial. La rifamicina B que se empleó fué una muestra proporcionada por el QFB Francisco Aguilar Pérez de la compañía Fermic S.A.. La (R)-(+)-1-amino-2-(metoximetil)pirrolidina, fué adquirida a Merck-Schuchardt; la (S)-(-)-1-amino-2-(metoximetil)pirrolidina, fué suministrada por Aldrich Chemical Co.

6.1.- SINTESIS DE DERIVADOS.

Rifamicina O: En un matraz de bola de 3 bocas de 500 ml, equipado con agitador mecánico y refrigerante, se colocaron 4 g de dióxido de manganeso (0.046 moles) y una solución de 3.8 g de rifamicina B (0.005 moles) en 250 ml de benceno. Esta mezcla fué agitada durante 15 minutos a temperatura ambiente. La conversión a rifamicina O, se siguió por cromatografía en placa fina, utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo-metanol-agua (80-20-2.5), la rifamicina O aparece como una mancha de $R_f = 0.83$. Se filtró el dióxido de manganeso y se concentró la solución bajo presión reducida, hasta que comienza a precipitar la rifamicina O, obteniendo 3.71 g de un polvo de color amarillo, el cual se recristalizó de metanol para dar 3.22 g de rifamicina O, con un rendimiento del 84.9%.

La rifamicina O fundió a 160°C , con descomposición. Su identificación se realizó por IR, coincidiendo con el de un estándar de rifamicina O y con el reportado en la literatura¹⁶. (Espectro 1).

Rifamicina S: En un matraz de bola de 3 bocas de 5 litros, equipado con agitación mecánica, se colocaron 48 g de dióxido de manganeso (0.487 moles), 42.4 de rifamicina B (0.056 moles), 3.2 litros de metanol y 160 ml de HCl al 10%.

Después de agitar durante 15 minutos, se filtró el dióxido de manganeso. El filtrado se continuó agitando durante 5 horas y se siguió

La hidrólisis por cromatografía en capa fina, se utilizó como eluyente benceno-acetona (8-2), la rifamicina S apareció como una mancha de $R_f = 0.68$.

La solución se concentró hasta un volumen de 800 ml, por medio de presión reducida. Esta solución se enfrió a 5°C , se mantuvo la agitación hasta que precipitó un sólido de color amarillo, el cual se filtró y se recristalizó de metanol-agua (1-1), se obtuvieron 35.72 g de rifamicina S, con un rendimiento del 92.3%.

La rifamicina S se obtuvo en forma de cristales amarillos, los cuales fundieron con descomposición a $180-182^{\circ}\text{C}$. La identificación de la misma fue realizada por IR, se comparó con el de una muestra estandar y con el reportado en la literatura⁷⁴ (Espectro 2)

Rifamicina SV: En un matraz de bola de 3 bocas de 250 ml, equipado con agitador mecánico, embudo de adición y refrigerante, se colocaron 5 g de rifamicina S (0.0072 moles) y 50 ml de metanol, los cuales fueron agitados a una temperatura de 50°C . Posteriormente fue adicionada, gota a gota, una solución que contenía 5.38 g de ácido ascórbico (0.0288 moles) en 33 ml de agua. Se mantuvo la temperatura y la agitación durante 45 minutos.

La reacción terminó cuando por cromatografía en capa fina, desaparece la mancha de rifamicina S ($R_f=0.81$) y aparece la mancha de rifa-

micina SV ($R_f=0.33$), cuando se usó como eluyente cloroformo-metanol-agua (80-20-2.5).

Se enfrió a 10°C durante 30 minutos, se filtró el sólido y se lavó con 15 ml de agua fría. Se obtuvieron 4.35 g de un polvo amarillo pálido con un rendimiento del 86.6%, que corresponde a la rifamicina SV, la cual funde con descomposición a 140°C .

La identificación de la rifamicina SV, se realizó por comparación de su espectro IR, con el reportado en la literatura⁷⁴; resultando ambos idénticos. (Espectro 3)

3-formil-rifamicina SV: En un matraz de bola de 3 bocas de 250 ml, equipado con agitador magnético, refrigerante y termómetro, se colocaron 60 ml de tetrahydrofurano, 9.3 ml de terbutilamina (0.088 moles), 6.76 ml de formaldehído acuoso al 39% (0.088 moles), la mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora.

En otro matraz de bola de 3 bocas de 500 ml, equipado con agitación mecánica y refrigerante, se colocaron 100 ml de tetrahydrofurano, 20 g de rifamicina S (0.0287 moles) y 11.4 g de dióxido de manganeso (0.131 moles). Se adicionó el contenido del primer matraz sobre éste y se mantiene con agitación y a reflujo durante 17 horas.

La reacción de oxidación se verificó que se llevó a cabo completa-

mente por cromatografía en placa fina, el derivado de Mannich formado, se observó como una mancha de color naranja de $R_f=0.9$, cuando el eluyente fue cloroformo-metanol-agua (80-20-2.5).

El dióxido de manganeso se eliminó por filtración y al filtrado se le adicionaron 100 ml de ácido sulfúrico al 10% y 22 g de ácido ascórbico (0.125 moles). Se continuó la agitación y se elevó la temperatura hasta 45°C durante 2 horas. En cromatografía en placa fina la 3-formil rifamicina SV, presenta un $R_f=0.51$, utilizando como eluyente cloroformo-metanol-agua (80-20-2.5).

Una vez terminada la reacción, la solución se destiló, hasta que aparecieron unos cristales rojos, los cuales se filtraron y se obtuvieron 14.9 g de 3-formil rifamicina SV, con un rendimiento del 71.5%.

La 3-formil rifamicina SV funde con descomposición a $175-177^{\circ}\text{C}$, su identificación se realizó por métodos espectroscópicos de IR, por medio de comparación con el reportado en la literatura⁷⁴: (Espectro 4)

Rifampicina: En un matraz de bola de 3 bocas de 250 ml, equipado con agitación magnética y refrigerante, se adicionaron 10 gramos de 3-formil rifamicina SV (0.0138 moles) y 100 ml de acetato de etilo. Se agregó gota a gota 1.653 g de 1-amino-4-metil piperazina (0.0152 moles) a temperatura ambiente, manteniendo la agitación

durante 20 minutos , la formación de rifampicina se siguió por cromatografía en placa fina utilizando como eluyente cloroformo-metanol-agua (80-20-2.5), la cual presenta un $R_f=0.60$ y es una mancha de color naranja. El acetato de etilo fué evaporado a presión reducida, hasta que tomó una consistencia de pasta y se cristalizó con 75 ml de acetona, se obtuvieron unos sólidos en forma de cristales rojizos que se filtraron y lavaron con acetona fría. Las aguas madres se concentraron a 1/5 parte de su volúmen por medio de presión reducida, recuperando 0.9 gramos de producto. En total se obtuvieron 10.3 g de producto que corresponde a la rifampicina pura, para un rendimiento del 90.9%.

La rifampicina funde con descomposición entre 183-186°C. Su identificación se hizo por comparación de su IR, con el ya descrito en la literatura química²³ (Espectro 5)

3-[(4-morfolinilimino)metil]- rifamicina SV: En un matraz de 3 bocas de 250 ml, equipado con agitación mecánica, se colocaron 90 ml de acetato de etilo, 20 g de 3-formilrifamicina SV (0.0276 moles), una vez que se disolvió, se adicionó gota a gota 2.73 ml de 4-amino morfolina(0.0283 moles).

ESTA
SALVA
DE
LA
NO
ESTR
SIBLIS

El avance de la reacción se siguió por cromatografía en placa fina, se utilizó como eluyente cloroformo-metanol (9-1), el producto presentó un $R_f=0.5$. Se enfrió la reacción a 5°C y precipitó un sólido de color naranja, el cual se filtró y recristalizó de acetona. Se obtuvieron 19.3 gramos de producto puro, con un rendimiento del 86.3%, el cual fundió con descomposición a $255-257^{\circ}\text{C}$.

La identificación del 3-[(4-morfolinilimino)metil]-rifamicina SV, se realizó por comparación de su IR, con el reportado en la literatura⁷ (Espectro 6)

(S)-Rifaestradina: En un matraz bola de 25 ml, de una boca, equipado con agitador magnético, se colocaron 15 ml de acetato de etilo, 2.5 g de 3-formil rifamicina SV (0.0035 moles) y se adicionó gota a gota 0.493 g de (S)-(-)-1-amino-2-(metoximetil)pirrolidina (0.0038 moles), se dejó bajo agitación durante 20 minutos y se verificó el avance de la reacción por cromatografía en placa fina, el producto mostró una mancha de color naranja de $R_f=0.40$ cuando el eluyente fue cloroformo-metanol (9-1).

La (S)-Rifaestradina, fue cristalizada de acetona-acetato de etilo, se filtró el producto y se obtuvieron 2.68 g de un polvo naranja, para obtener un rendimiento del 92.8%, el cual fundió con descomposición a $182-184^{\circ}\text{C}$ y presentó una $[\alpha]_D^{18} = -14.5^{\circ}$.

La identificación de la (S)-Rifaestradina, se realizó por métodos espectroscópicos de IR, RMNP y RMN¹³C. (Espectros 7, 8, 9, 10 y 11)

(R)- Rifaestradina: En un matraz bola de 25 ml, equipado de agitador magnético, se colocaron 15 ml de acetato de etilo, 2.5 g de 3-formil rifamicina SV (0.0035 moles) y se adicionó gota a gota 0.493 g de (R)-(+)-1-amino-2(metoximetil)pirrolidina (0.0038 moles), cuando pasaron 20 minutos se comprobó la completa formación del producto por cromatografía en placa fina, el cual presenta una mancha de color naranja de R_f=0.42, cuando se empleó cloroformo-metanol(9-1) como eluyente. Una vez terminada la reacción, se evaporó el disolvente y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica - gel, usando como eluyente una mezcla de cloroformo-acetona (9-1).

Se obtuvieron 2.1g de producto puro, con un rendimiento del 72.7%, la (R)-Rifaestradina es un sólido en forma de cristales rojos, los cuales presentan un P.F.= 125-127°C y una actividad óptica $[\alpha]_D^{18} = 194^{\circ}$.

Su identificación se realizó por métodos espectroscópicos de IR, RMNP, RMN¹³C y UV. (Espectros 12, 13, 14, 15 y 16).

6.2.- DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE PARTICION

OCTANOL-AGUA (P).

Se prepararon 30 ml de una solución de rifamicina en 1-octanol. La concentración que se empleó estuvo en función de la rifamicina en estudio, dichas concentraciones se presentan a continuación:

<u>Rifamicina</u>	<u>Concentración (mg/ml)</u>
.Rifampicina	
.(S)-rifaestradina	
.(R)-rifaestradina	4 mg/ml
.3-[(4-morfolinilimino)metil]- rifamicina SV,	
. Rifamicina S	
. Rifamicina O	1 mg/ml
. 3-formil rifamicina SV	
. Rifamicina SV	
. Rifamicina B	0.1 mg/ml

Diez mililitros de esa solución se filtraron a través de Millipore tipo HV de 0.45 micrómetros y se determinó por cromatografía de

líquidos de alta eficiencia (HPLC), la concentración del antibiótico, a partir de la medición del área bajo la curva del cromatograma respectivo. (Medición A)

Por otra parte, se colocaron por duplicado diez mililitros de la solución octanólica en un embudo de separación de 150 ml y se adicionaron 50 ml de una solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4. Se invirtió el embudo de separación en 100 ocasiones, aproximadamente en 5 minutos, se cuidó que la agitación no fuera muy vigorosa con el fin de evitar emulsiones.

La mezcla se centrifugó a 1500 rpm, durante 30 minutos. Se separó la fase octanólica y se filtró a través de Millipore tipo HV de 0.45 micrómetros y la solución se analizó por HPLC. (Medición B)

La concentración de la fase acuosa fue obtenida por diferencia, entre las dos mediciones A y B.

6.3.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Se pesaron 25 mg de la rifamicina en cuestión, excepto para rifamicina B y O donde se pesaron 50 mg, se disolvieron y aforaron a 25 ml con metanol.

Se tomó 1 ml de la solución y se aforó a 100 ml con una solución

amortiguadora de fosfatos pH 6. A partir de esta solución, se prepararon dos diluciones distintas:

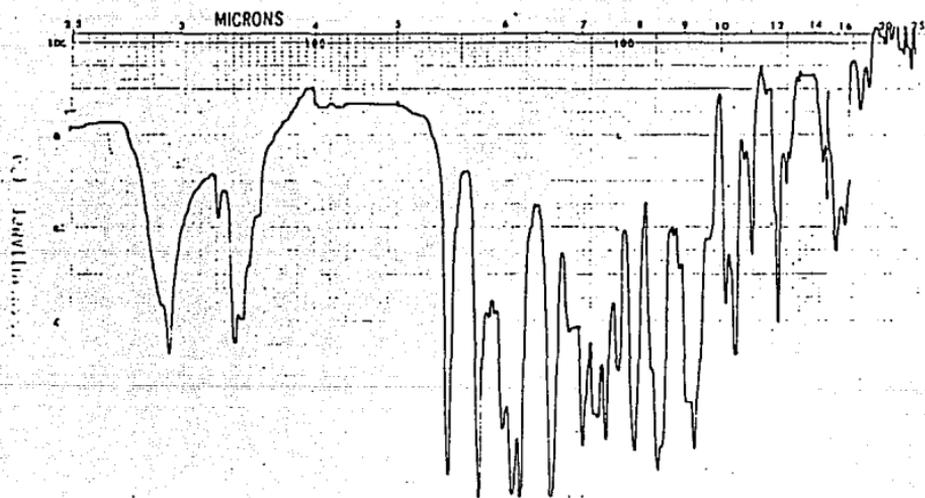
Dilución 1: Se tomaron 5 ml de la solución y se aforaron a 100 ml con una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.

Dilución 2: Se tomaron 5 ml de la solución y se aforaron a 50 ml con una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.

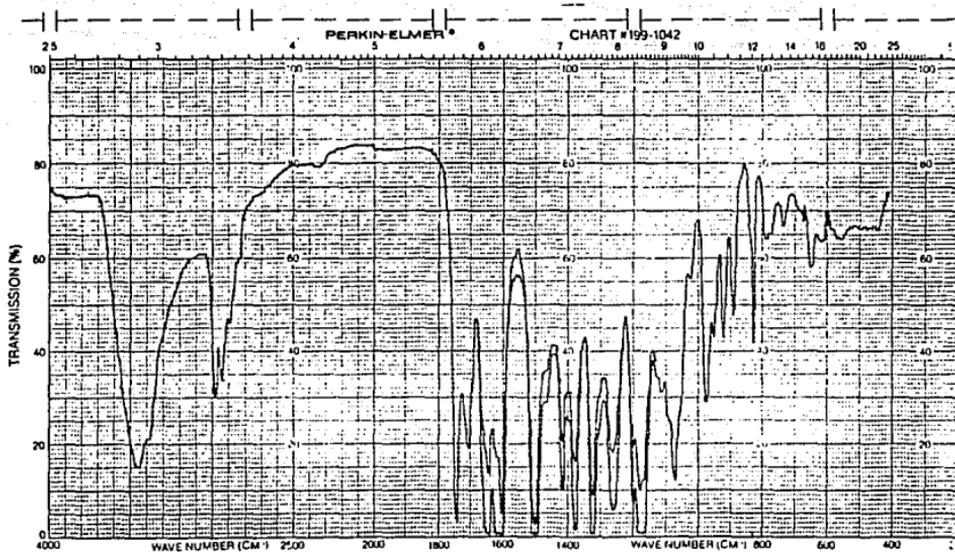
Se prepararon placas de medio antibiótico No. 2 DIFCO, inoculado con Bacillus subtilis ATCC 6633, de 30 cm de longitud en las cuales se hicieron 64 zonas de aplicación en un arreglo de 8X8, ordenados al azar bajo un diseño de cuadro latino.

Finalmente se aplicaron 0.1 ml de cada dilución, junto con una muestra estándar de rifampicina que fué previamente diluída como el de la muestra de la rifamicina en estudio, sobre las zonas previamente determinadas al azar.

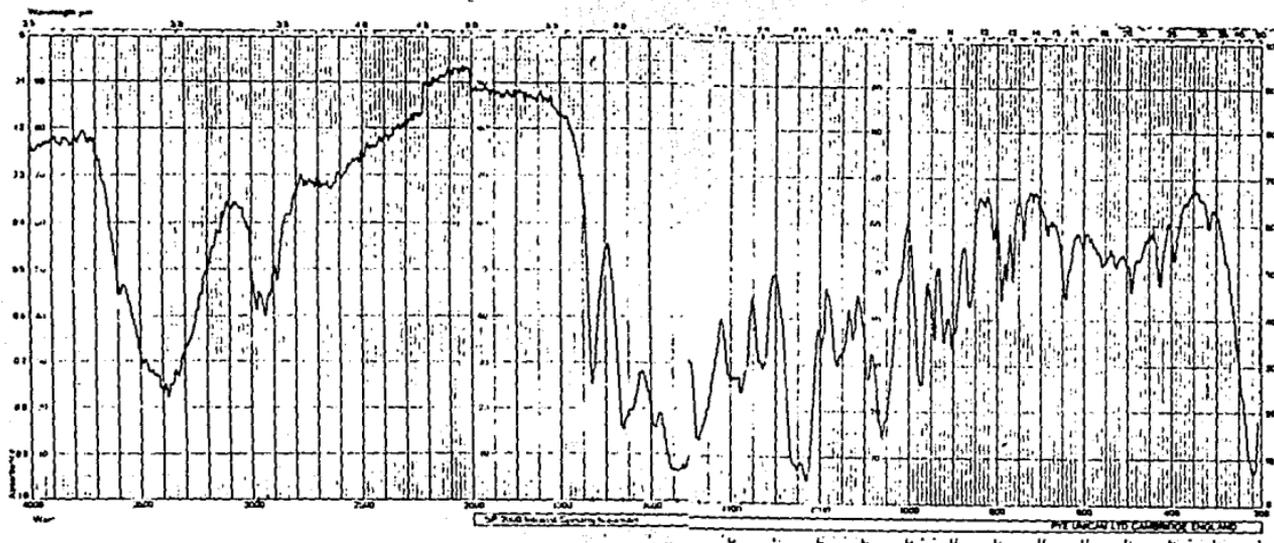
Se incubaron a 35⁰C, durante 18 horas y se midieron los halos de inhibición, comparados con los producidos por la muestra estándar de rifampicina.



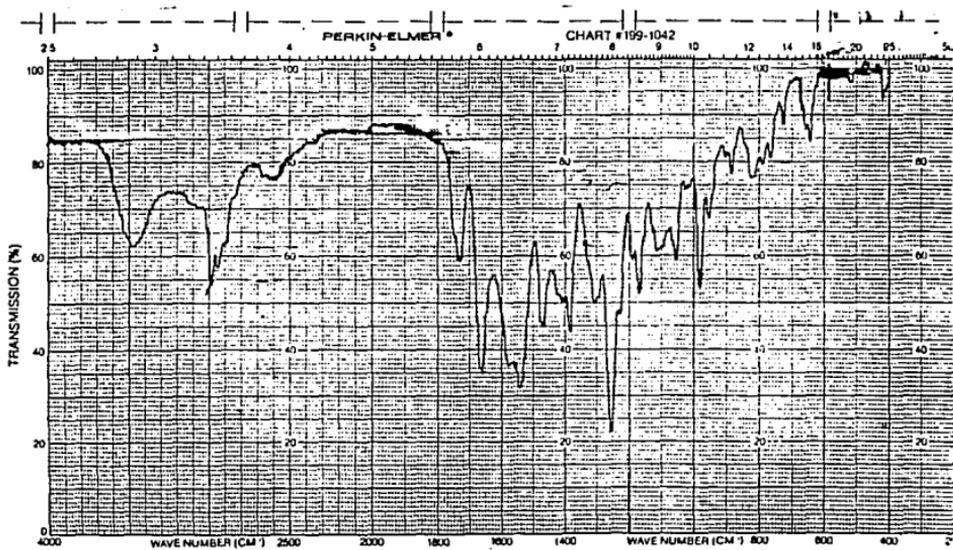
ESPECTRO 1



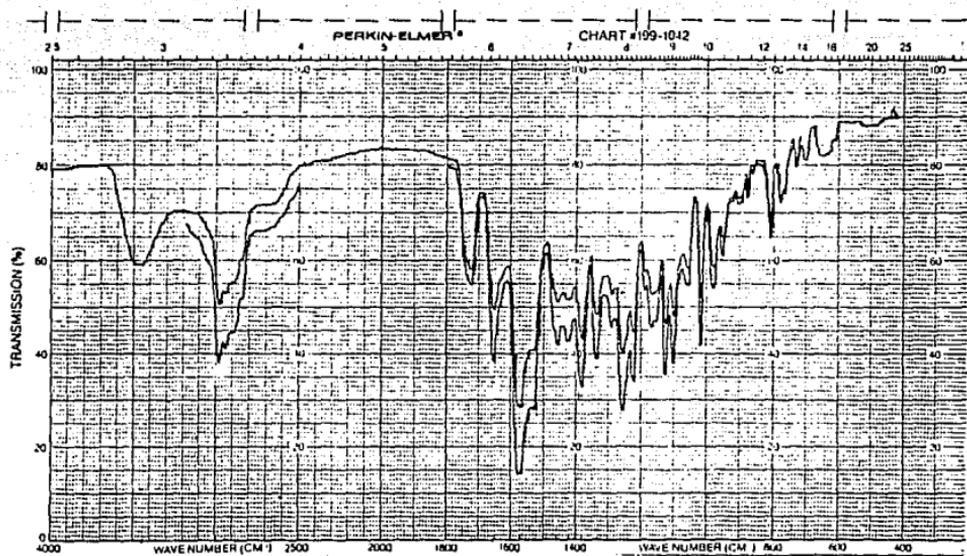
ESPECTRO 2



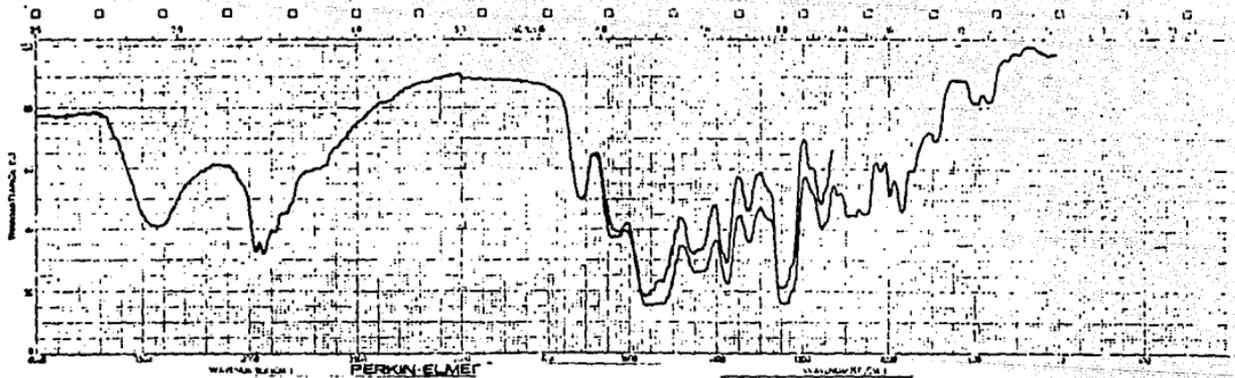
ESPECTRO 3



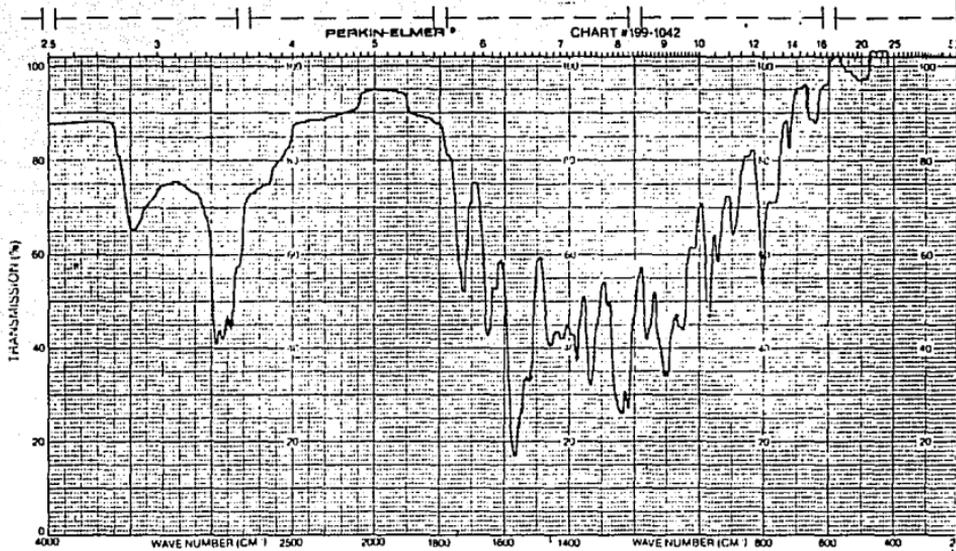
ESPECTRO 4



ESPECTRO 5

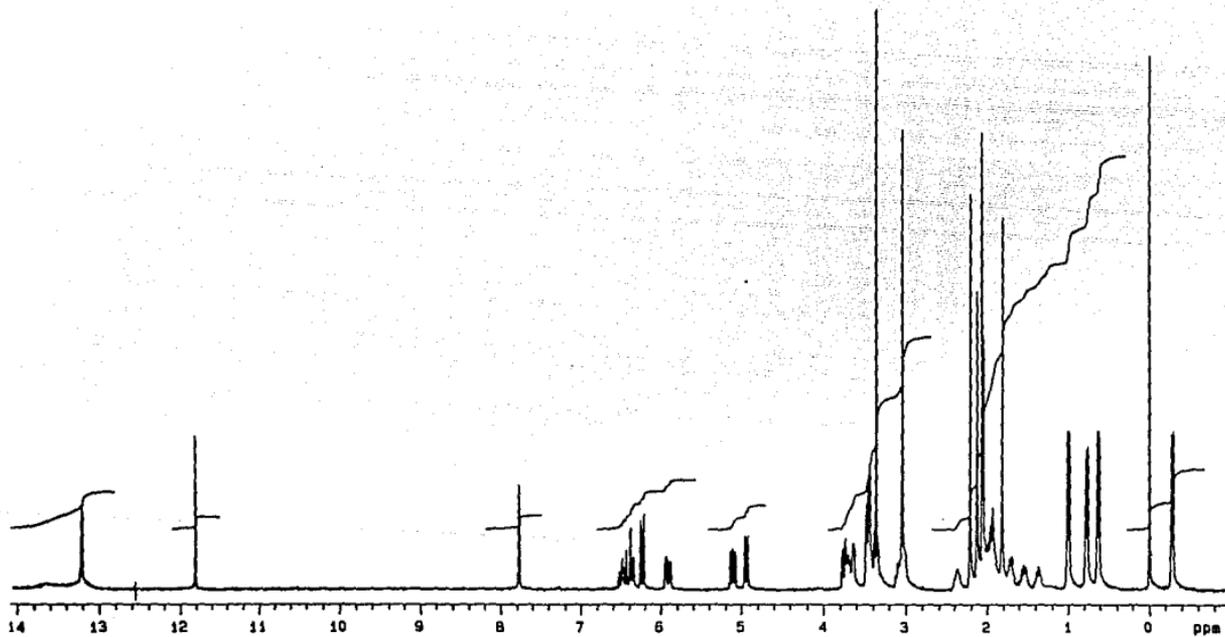


ESPECTRO 6

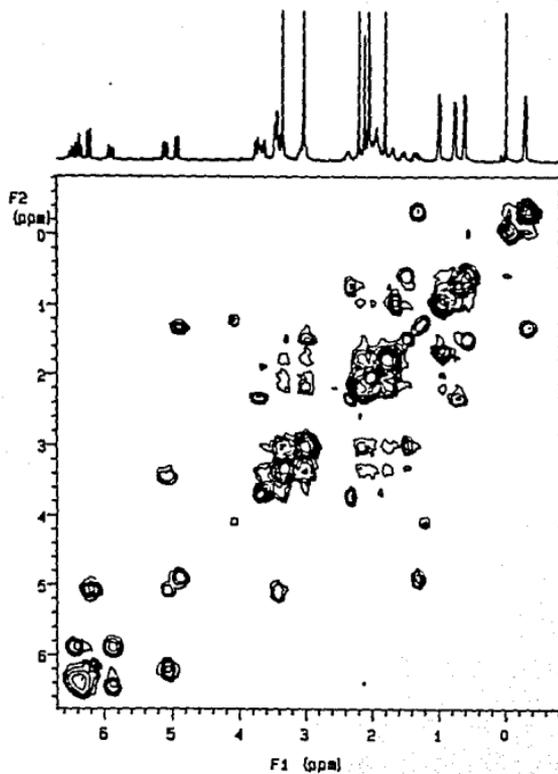


ESPECTRO 7

U.S.A.M. Institute de Química
Química XI D-ribofurose



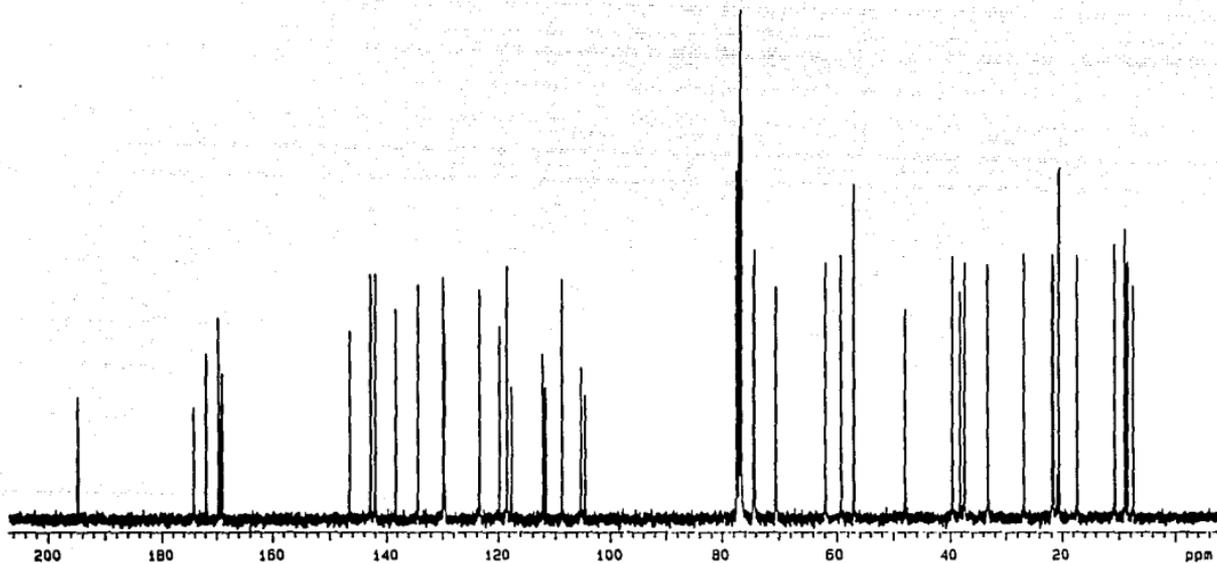
ESPECTRO 8



ESPECTRO 9

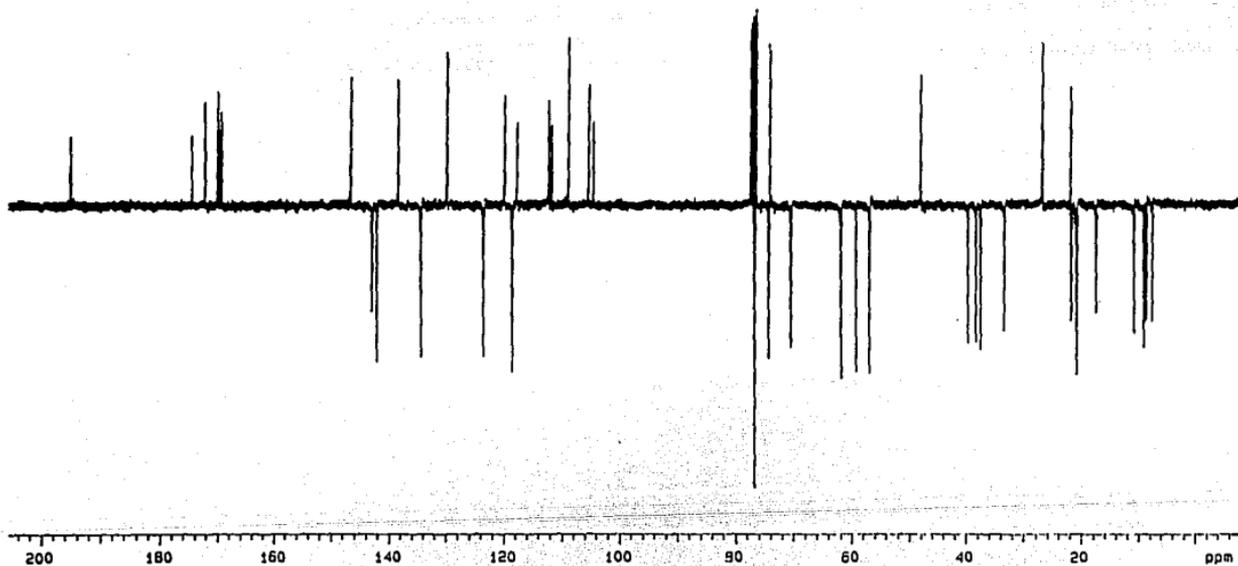
U.N.S.S. Instituto de Química
ESPECTRO C13

D-ribose-1,2:5,6-O-isopropylidene-C13

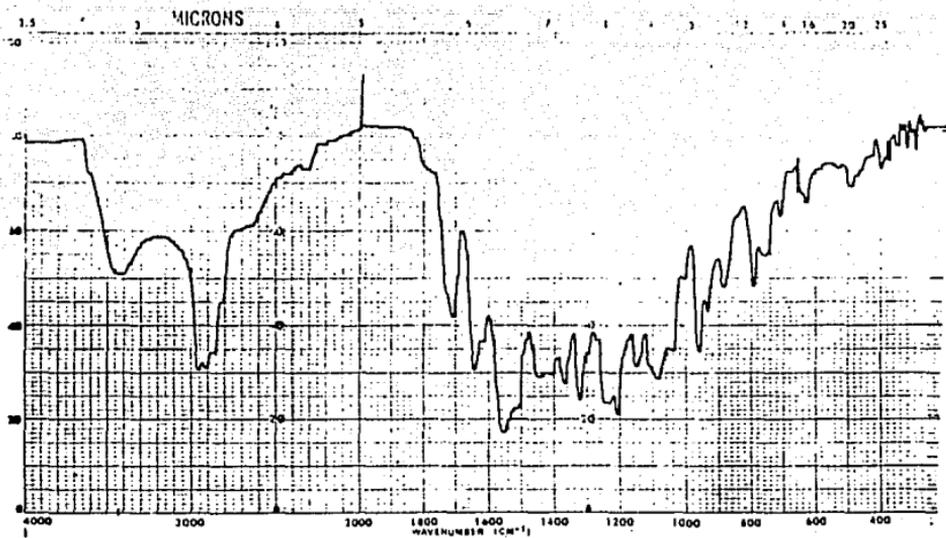


ESPECTRO 10

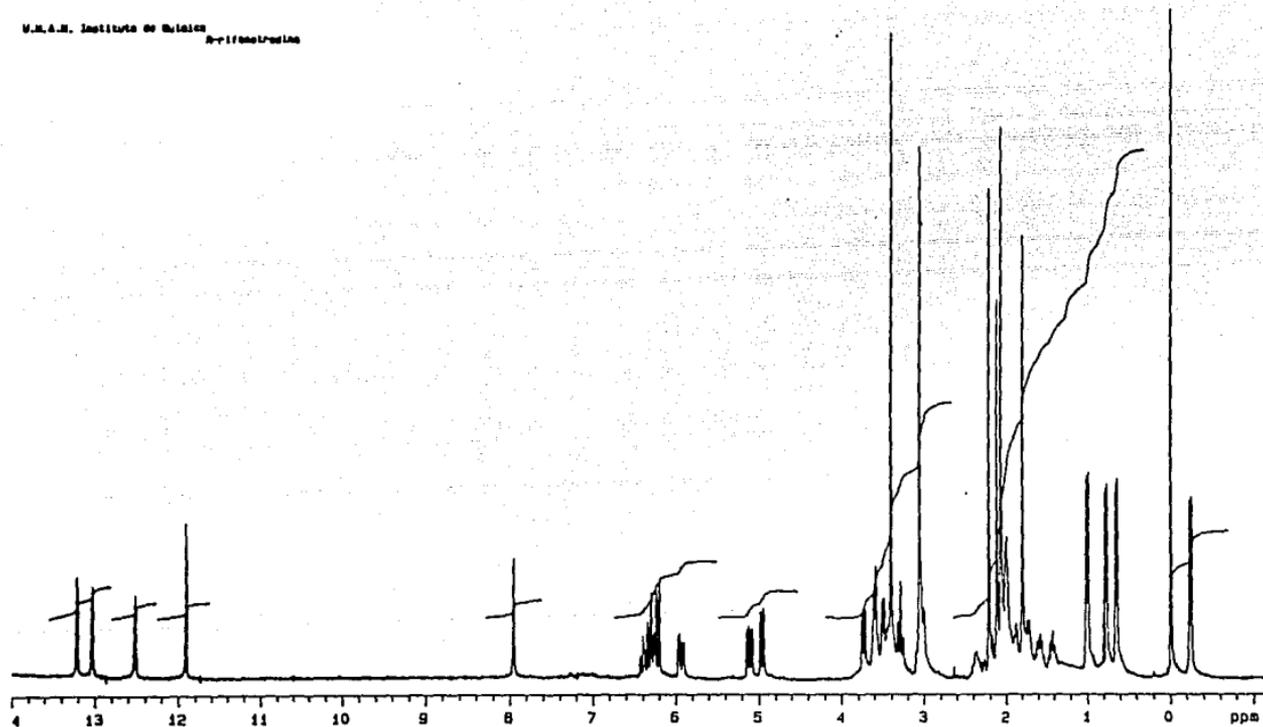
U.S.A.N. Instituto de Química
PALM GIB/DCS 801



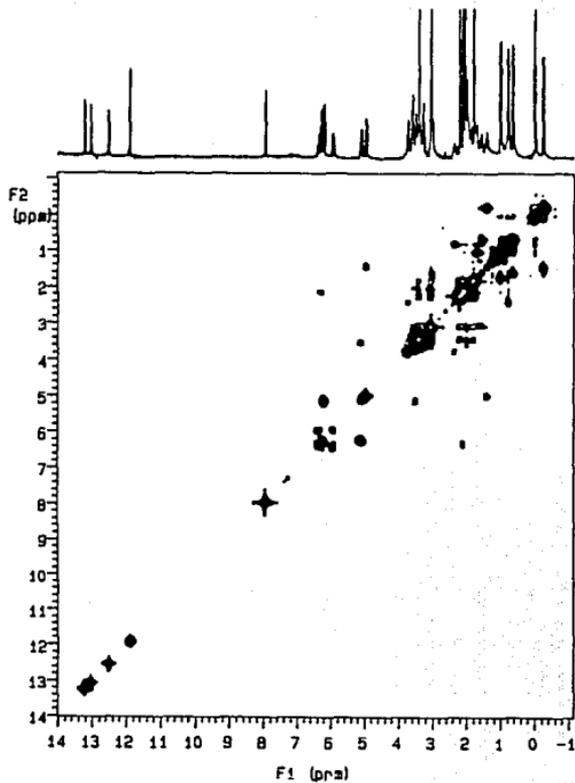
ESPECTRO 11

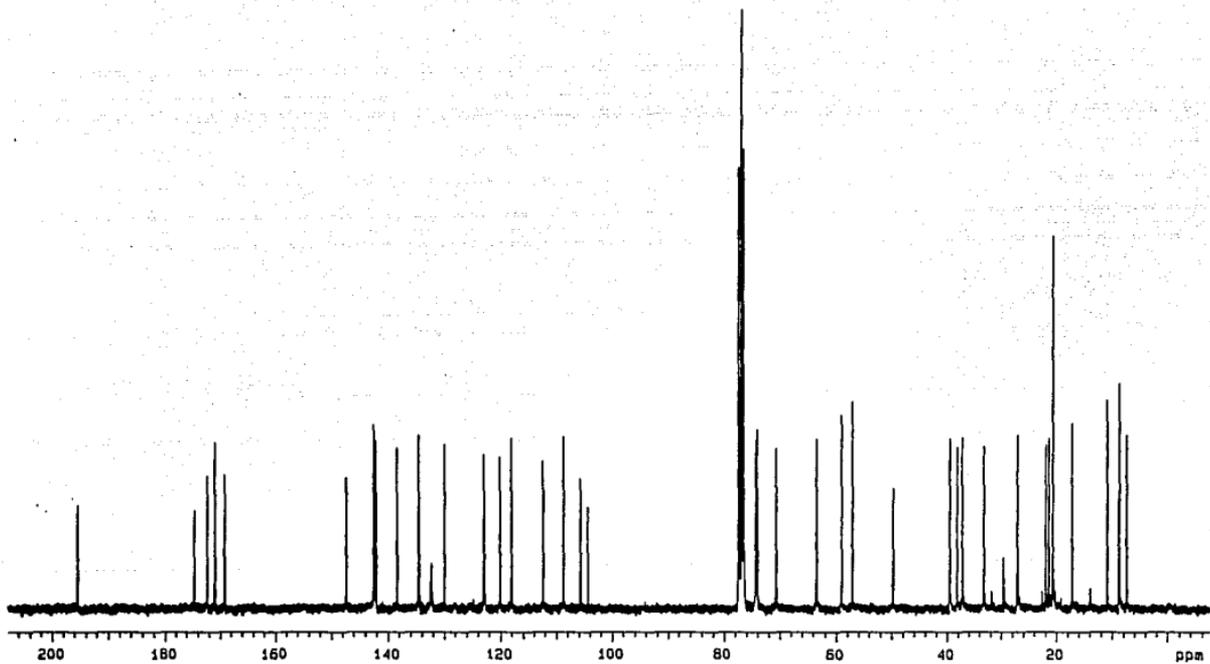


ESPECTRO 12



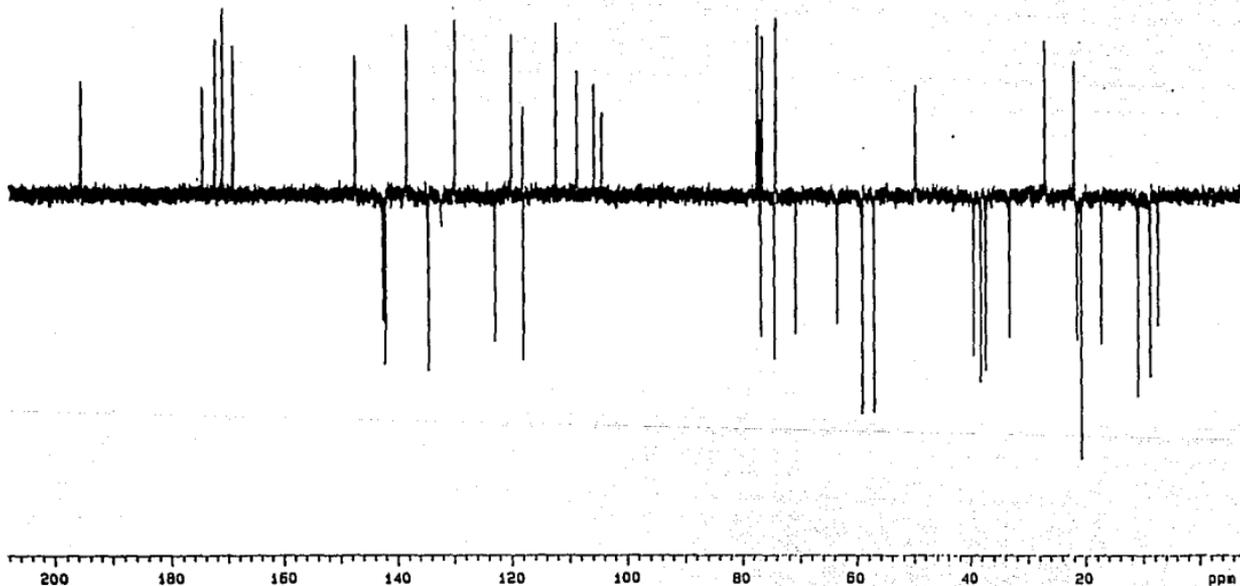
ESPECTRO 13





ESPECTRO 15

U.S.A.M. Instituto de Quimica
PLATE NUMBER 101 R-rifametrina



ESPECTRO 16

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Mitscher, L.A.; Bull. N.Y. Acad. Med., 63, 3, 269 (1987).
- 2.- Neu, H.; Bull. N.Y. Acad. Med., 63, 3, 295 (1987).
- 3.- Wehrli, W.; Top. Curr. Chem., 72, 21 (1977).
- 4.- Gallo, G.; Martinelli, E.; Pagani, P.; Sensi, P.; Tetrahedron, 30, 3093 (1974).
- 5.- Kibby, J.; Mc Donald, A.; Richards, W.; J. Chem. Soc. Chem. Commun. 768, (1980).
- 6.- Brufani, M.; Kluepfel, D.; Lancini, G.; Prelog, V.; Mesentsev, A.; Sensi, P.; Helv. Chim. Acta., 56, 7, 2315 (1973).
- 7.- Ghisalba, O.; Auden, J.; Schupp T.; Nüesch, J.; Drugs Pharm. Sci. (Biotechnol. Ind. Antibiot.), 22, 281 (1984).
- 8.- Anderson, M.; Monypenny, D.; Rickards, R.; Rothschild, J.; J. Chem. Soc. Chem. Commun. 311 (1989).
- 9.- Sensi, P.; Timbal, M.; Greco, A.; Farmaco, Ed. Sci., 14, 146 (1959).
- 10.- Hartman, G.; Heinrich, P.; Kollenda, K.; Skrobranek, B.; Tropschug, M.; Weib, W.; Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 24, 1009 (1985).
- 11.- Prelog, V.; Pure Appl. Chem., 7, 551 (1963).
- 12.- Oppolzer, W.; Prelog, V.; Sensi, P.; Experientia, 20, 336 (1964).
- 13.- Brufani, M.; Fedeli, W.; Giacomello, G.; Vaciago, A.; Experientia, 20, 344 (1964).

- 14.- Leitich, J.; Oppolzer, W.; Prelog, V.; Experientia, 20, 342 (1964).
- 15.- Sensi, P.; Greco, A.; Ballota, R.; Antibiot. Annual, 262 (1960).
- 16.- Sensi, P.; Ballota, R.; Greco, A.; Farmaco Ed. Sc., 15, 228 (1960).
- 17.- Sensi, P.; Ballota, R.; Greco, A.; Gallo, G.; Farmaco Ed. Sc., 16, 165 (1961).
- 18.- Casey, M.; Whitlock, H.; J. Am. Chem. Soc., 97, 623 (1975).
- 19.- Sensi, P.; Timbal, M.; Maffii, T.; Experientia, 16, 412 (1960).
- 20.- Gallo, G.; Chiesa, L.; Sensi, P.; Anal. Chem., 34, 423 (1962).
- 21.- Burger, A. Medicinal Chemistry, 3a. Ed.; Part I, II, Wiley Interscience, New York (1970).
- 22.- Maggi, N.; Gallo, G.; Sensi, P.; Farmaco Ed. Sc., 22, 316 (1967)
- 23.- Maggi, N.; Pasqualucci, R.; Ballota, R.; Sensi, P.; Chemotherapia, 11, 285 (1966).
- 24.- Cárdenas, V.; Valdespino, J.; Guerrero, P.; Koopman, J.; Epidemiología, 1, 11, 137 (1986).
- 25.- Hartman, G.; Honikel, K.; Knusel, F.; Nüesch, J.; Biochim. Biophys. Acta, 145, 843 (1967).
- 26.- Osawa, S.; Ozeki, H.; Ucinda, H.; Yura, T.; RNA Polymerase, t RNA and Ribosomes, 1st Ed.; University of Tokyo (1980).
- 27.- Nikaïdo, H.; Biochim. Biophys. Acta, 433, 118 (1976).
- 28.- Maggi, N.; Furesz, S.; Sensi, P.; J. Med. Chem., 11, 368 (1968).
- 29.- Quinlan, G.; Guttridge, J.; Biochem. Pharmacol., 36, 3629 (1987).

- 30.- Maggi, N.; Vigevani, A.; Gallo, G.; Pasqualucci, C.; J. Med. Chem. 11, 936 (1968).
- 31.- Maggi, N.; Vigevani, A.; Pallanza, R.; Experientia, 24, 209 (1968).
- 32.- Sensi, P.; Pure Appl. Chem. 35, 383 (1973).
- 33.- Brufani, M.; Fedeli, W.; Vaciago, A.; J. Org. Chem., 47, 2652 (1982).
- 34.- Arora, S.; Mol. Pharmacol., 23, 133 (1983).
- 35.- Dampier, M.; Whitlock, H.; J. Am. Chem. Soc., 97, 6254, (1975).
- 36.- Dampier, M.; Chen, C.; Whitlock, H.; J. Am. Chem. Soc., 98, 7064 (1976).
- 37.- Marsili, L.; Franceschi, G.; Galliani, C.; Sanfilippo, A.; Vigevani, A.; Farmaco Ed. Sci., 37, 781 (1982).
- 38.- Marsili, L.; Franceschi, G.; Ballabio, M.; Oronzo, G.; Vigevani, A.; J. Antibiot., 36, 1495 (1983).
- 39.- Marsili, L.; Franceschi, G.; Gioia, B.; Oronzo, G.; Schioppacassi, G.; Vigevani, A.; Farmaco. Ed. Sci. 37, 641 (1982).
- 40.- Marsili, L.; Franceschi, G.; Ballabio, M.; Vioglio, S.; Vigevani, A.; J. Antibiot., 37, 1209 (1984).
- 41.- Vigevani, A.; Arlandini, E.; Ballabio, M.; Franceschi, G.; Gioia, B.; Vioglio, S.; Farmaco Ed. Pract., 40, 131 (1985).
- 42.- Kiritsy, J.; Yung, D.; J. Med. Chem., 21, 1301 (1978).
- 43.- Cricchio, R.; Lancini, G.; Tamborini, G.; Sensi, P.; J. Med. Chem. 17, 396 (1974).

- 44.- Maggi, N.; Arioli, V.; Sensi, P.; J. Med. Chem., 8, 790 (1965).
- 45.- Quinn, F.; Driscoll, J.; Hansch, C.; J. Med. Chem., 18, 332 (1975).
- 46.- Wehrli, W.; Zimmermann, W.; Kump, W.; Tosch, W.; J. Antibiot., 40, 1733, (1987).
- 47.- Sanfilippo, A.; Bruna, C.; Marsili, L.; Morvillo, E.; Pasqualucci, C.; Schioppacassi, G.; Ungheri, D.; J. Antibiot., 33, 1193 (1980).
- 48.- Bruna, C.; Schioppacassi, G.; Ungheri, D.; Jabes, D.; Morvillo, E.; Sanfilippo, A.; J. Antibiot., 36, 1502 (1983).
- 49.- Cellai, L.; Cerrini, S.; Segre, A.; Battistoni, C.; Cossu, G.; Mattogno, G.; Brufani, M.; Marchi, E.; Mol. Pharmacol., 27, 103, (1985).
- 50.- Jaffé, S.; Chem. Rev., 53, 191 (1953).
- 51.- Bell, P.; Roblin, R.; J. Am. Chem. Soc., 64, 2905 (1942).
- 52.- Martin, Y.; J. Med. Chem., 24, 229 (1981).
- 53.- Tute, M.; Advances in Drug Research.; Vol. 6; Academic Press, London (1971).
- 54.- Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C.; J. Am. Chem. Soc., 86, 5175 (1964).
- 55.- Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D.; Chem. Rev., 71, 525 (1972).
- 56.- Hansch, C.; Fujita, T.; J. Am. Chem. Soc., 86, 1616 (1964).
- 57.- Sandler, M.; Enzyme Inhibitor as Drugs. 1st Ed.; Macmillan Press LTD; London (1980).

- 58.- Cramer, R.; Snader, K.; Willis, C.; Chakrin, L.; Thomas, J.; Sutton, B.; J. Med. Chem., 22, 714 (1979).
- 59.- Barbaro, A.; Guerra, M.; Biagi, L.; Boll. Soc. Ital. Sper. Biol., 556 (1971).
- 60.- Tomlinson, E.; J. Chromatography, 113, 1 (1975).
- 61.- Biagi, L.; Guerra, M.; Barbaro, A.; Gamba, M.; J. Med. Chem., 13, 511, (1970).
- 62.- Pelizza, G.; Lancini, G.; Allievi, G.; Gallo, G.; Farmaco Ed. Sci., 28, 298 (1973).
- 63.- Kawaki, H.; Takagi, T.; Sasaki, Y.; Chem. Pharm. Bull., 31, 144 (1983).
- 64.- Kalizan, R.; J. Chromatography, 220, 71 (1981).
- 65.- Nahum, A.; Horvart, C.; J. Chromatography, 192, 315 (1980).
- 66.- Hewitt, W. Microbiological Assay. An Introduction to Quantitative Principles and Evaluation. Academic Press, New York (1977).
- 67.- Seons, B.; Han, M.; Chem. Lett., 627(1982).
- 68.- Patente Francesa: 14 426 (1975).
- 69.- C.A. : 71, 50 008, (1969).
- 70.- Taguchi, M.; Aikawa, N.; Tsukamoto, G.; Bull. Chem. Soc. Jpn., 61, 2431 (1988).
- 71.- Patente Estadounidense: 3 542 762 (1970).
- 72.- Patente Japonesa: 80 133 384 (1980).

- 73.- C.A.: 102, 17 072x (1984).
- 74.- Gallo, G.; Radaelli, P.; Anal. Profiles Drug Subst., 5, 467 (1976).
- 75.- Ferrari, P.; Gallo, G.; Farmaco Ed. Sci., 30, 676 (1975).
- 76.- Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W.; Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Editorial Alhambra, España, 2a. Edición (1989).
- 77.- Hulshoff, A.; Perrin, J.; J. Chromatography, 120, 65 (1976).
- 78.- Mc Call, J.; J. Med. Chem., 18, 549 (1975).
- 79.- Wang, P.; Lien, E.; J. Pharm. Sci., 69, 662 (1980).
- 80.- Martin, A.; Swarbrick, J.; Cammarata, A.; Physical Pharmacy. Lea & Febiger. Filadelfia (1969).
- 81.- USP. XXII; 1488 (1990).
- 82.- Lehman, P.; Receptors and Recognition; Chapman and Hall, London (1978).
- 83.- Taguchi, M.; Yamane, Y.; Aikawa, V.; Chem. Pharm. Bull., 36, 4157 (1988).
- 84.- Gale, E.; Cundliffe, E.; Reynolds, P.; Richmond, M.; The Molecular Basis of Antibiotic Action. 1st. Ed. John Wiley & Sons LTD, Bristol (1972).