

SINTESIS DE CUATRO BENZOXAZINAS Y DETERMINACION DE SU ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Piedad Gómez Gómez *
Hilda Pérez Pabón *
Manuel Arteaga Carvajal **
José María Rincón ***

I. INTRODUCCION

Las benzoxazinas y sus derivados conforman un grupo de sustancias de interés, tanto en el campo de la síntesis como en el de sus posibles usos y aplicaciones (1-2-21).

A pesar de ya ser conocidas las estructuras químicas de las cuatro benzoxazinas en estudio gracias a los trabajos realizados anteriormente (1) y haber iniciado su conocimiento como antimicrobianos, con este trabajo se pretende optimizar los procesos de síntesis, obtención y control químico de ellas, así como determinar en forma más clara el espectro de actividad que posean y los límites que manifiestan en las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Concentraciones Letales (CL) sobre los gérmenes de control. Por otra parte, se amplía el conocimiento en lo pertinente a las relaciones que existen entre las estructuras químicas y la actividad antimicrobiana.

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. Gérmenes de Control

— Fueron suministrados por el Instituto Nacional de Salud (INS), los siguientes Microorganismos: *Klebsiella pneumoniae I*, *Candida albicans II* y *Aspergillus niger*.

— Laboratorios Merck Colombia S.A. suministró los siguientes: *Bacillus subtilis I*, *Staphylococcus aureus I*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis I*, *Streptococcus faecalis I*, *Planococcus*

citreus, *Sarcina flava*, *Escherichia coli I y II*, *Shigella flexium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella s.p.*, *Proteus morgani*, *Aeromonas hydrophyla* y *Citrobacter freundii*.

— Laboratorios Pfizer suministró la siguiente: *Candida albicans I*.

— La Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia-Bogotá, suministró las siguientes: *Bacillus subtilis II*, *Bacillus anthracis II*, *Bacillus coagulans*, *Klebsiella pneumoniae II*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

— El Hospital Militar Central-Bogotá, suministró las siguientes: *Staphylococcus aureus II*, *Streptococcus faecalis II* y *Serratia marcescens*.

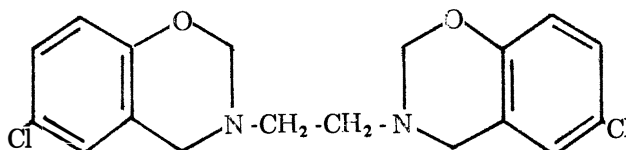
2. Métodos

2.1. Síntesis química de las benzoxazinas en estudio.

Se siguió el método general descrito en trabajo previo (1), pero en algunos casos se hicieron modificaciones con el fin de obtener mayores rendimientos. Básicamente las modificaciones consistieron en el cambio del tiempo de reflujo, el cual se llevó a cabo durante tres horas y en que se obtuvieron directamente los clorhidratos de las Benzoxazinas A, B y C; la D es líquida y no se le hizo clorhidrato.

Las fórmulas estructurales de las benzoxazinas sintetizadas son las siguientes:

Benzoxazina A: 2,2-Etil bis-(6-Cloro-3,4-Dihidrobenzoxazina).

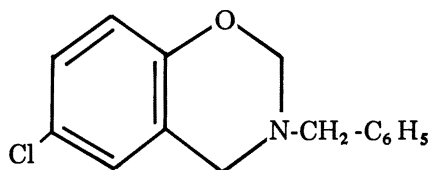


* *Estudiantes.*

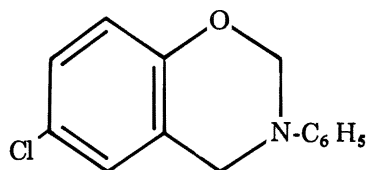
** *Profesor Asociado, Depto. Farmacia, Fac. Ciencias U.N. Director de Tesis.*

*** *Profesor Asociado, Depto. Química, Fac. Ciencias U.N. Director Asociado de Tesis.*

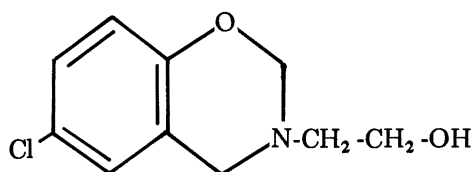
Benzoxazina B: 6-Cloro-3-Bencil-3,4-Dihidro-1,3,2H-Benzoxazina.



Benzoxazina C: 6-Cloro-3-Fenil-3,4-Dihidro-1,3-2H-Benzoxazina.



Benzoxazina D: 6-Cloro-3-(2-hidroxi-etil)-3,4-Dihidro-1,3,2H-Benzoxazina.



2.2. Manejo de los Antimicrobianos. Se preparó en agua estéril una "Solución Madre" de cada uno de los clorhidratos de las Benzoxazinas A,

B y D, las cuales se emplearon en el mismo momento de su preparación o en algunos casos, a más tardar dentro de las tres semanas siguientes pero conservándolas bajo refrigeración y protegidas de la luz; de ellas se tomaron las cantidades adecuadas para cada ensayo. En relación a la Benzoxazina C, se solubilizó en el momento de su empleo.

2.3. Manejo de los Gérmenes de Control. Los microorganismos empleados en cada uno de los ensayos, se tomaron de cultivos frescos en caldos donde previamente se habían adaptado y las inoculaciones respectivas se hicieron en proporciones de 1% (v/v) en medio de cultivo.

2.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Letal (CL). Los medios de cultivo inoculados se repartieron en tubos, donde por separado se adicionaron las diferentes diluciones de las benzoxazinas, con el fin de contar con concentraciones finales de 5, 10, 20, 40, 60 y 80 mcg/ml., en cada uno de los ensayos. Gracias a las lecturas de la turbidez producida en los tubos después de una incubación a 37° C durante 18 hs. y de los cultivos que se obtienen por repiques de ellos en medios de cultivo sólidos, después de una incubación a 37° C durante 16-18 hs., se determinaron las correspondientes CMI y CL.

Tabla I
PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS BENZOXAZINAS
SINTETIZADAS

	B E N Z O X A Z I N A S			
	A	B	C	D
Aspecto Físico	Cristales blancos inodoros	Cristales blancos en forma de agujas	Polvo blanco inodoro	Líquido amarillo aceitado
Punto de fusión	234-235° C.	161-163° C	148-150° C	
Punto de ebullición				155° C
Indice de Refracción				1.5441 (25° C)
Solubilidad	Agua: sol. Acido clorhídrico: ins. etanol: ins éter de petróleo: ins hidróxido de sodio: sol. en caliente. Benceno: p.s.	Agua: sol. Acido clorhídrico: ins. etanol: ins éter de petróleo: ins hidróxido de sodio: sol. en caliente Benceno: p.s.	Agua: sol. Acido clorhídrico: sol. etanol: sol. éter de petróleo: ins hidróxido de sodio: sol. en caliente Benceno: p.s.	Agua: ins. Acido clorhídrico: ins etanol: ins éter de petróleo: sol. hidróxido de sodio: sol. Benceno: sol.
RENDIMIENTO:	75%	83.5%	63.18%	86.32%

Sol: Soluble.

ins: insoluble.

p.s.: poco soluble.

Tabla II

PORCENTAJE DE REDUCCION DE LA POBLACION PRODUCIDA POR LAS BENZOXAZINAS (40 mcg/ml) DESPUES DE DIFERENTES TIEMPOS (hs) DE CONTACTO CON LOS MICROORGANISMOS DE CONTROL

GERMEN DE CONTROL	PORCENTAJE DE LA REDUCCION DE POBLACION PRODUCIDA POR																			
	Benzoxazina A					Benzoxazina B					Benzoxazina C					Benzoxazina D				
	Tiempo de contacto (hs)					Tiempo de contacto (hs)					Tiempo de contacto (hs)					Tiempo de contacto (hs)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Staph. aureus I	63	91	100	100	100	58	71	78	100	100	40	59	89	99	100	64	92	98	100	100
Staph. aureus II	66	88	99	100	100	50	73	92	100	100	30	63	90	99	100	56	80	98	100	100
Strep. faecalis I	93	98	100	100	100	88	96	99	100	100	66	83	95	99	100	92	97	100	100	100
Strep. faecalis II	93	98	100	100	100	80	96	98	100	100	73	84	95	99	100	91	98	100	100	100
Planococcus citreus	95	98	100	100	100	45	87	98	100	100	28	68	93	100	100	94	97	100	100	100
Sarcina flava	83	99	100	100	100	64	96	100	100	100	61	94	99	100	100	76	98	100	100	100
VALOR PROMEDIO Cocos Gram +	82.2	95.3	99.8	100	100	64.2	86.5	94.2	100	100	49.7	75.2	93.5	99.3	100	78.8	93.7	99.3	100	100
B. subtilis I	54	78	98	99	100	51	69	95	100	100	32	65	91	100	100	53	93	100	100	100
B. subtilis II	58	82	97	100	100	57	79	100	100	100	51	77	92	100	100	62	93	100	100	100
B. cereus	77	91	100	100	100	77	85	99	100	100	73	87	98	100	100	81	84	99	100	100
B. anthracis I	99	99	100	100	100	67	88	100	100	100	54	80	91	99	100	92	96	100	100	100
B. anthracis II	90	98	100	100	100	76	80	85	100	100	46	67	96	100	100	89	93	99	100	100
B. coagulans	88	98	100	100	100	77	83	89	100	100	52	72	99	100	100	86	90	99	99	100
VALOR PROMEDIO Bacilos Gram +	77.7	91	99.2	99.8	100	67.5	80.7	94.7	100	100	51.3	74.7	94.5	99.8	100	72.2	91.5	99.5	99.8	100
Klebsiella pneumoniae I	69	89	98	100	100	77	92	99	100	100	64	77	94	100	100	45	66	90	99	100
Klebsiella pneumoniae II	66	87	91	100	100	70	90	94	99	100	66	87	93	100	100	46	61	90	99	100
E. Coli I	92	100	100	100	100	96	100	100	100	100	62	98	100	100	100	48	92	99	99	100
E. coli II	92	100	100	100	100	96	98	99	100	100	62	98	100	100	100	49	92	98	99	100
Pseudomonas aeruginosa	75	95	100	100	100	84	98	100	100	100	66	91	100	100	100	55	80	92	100	100
Shigella flexium	88	92	97	100	100	55	72	97	100	100	43	52	62	89	+	91	95	100	100	100
Salmonella typhi	83	98	100	100	100	89	99	100	100	100	78	95	99	100	100	77	98	100	100	100
Salmonella s.p.	84	97	100	100	100	92	99	100	100	100	77	87	99	100	100	76	84	95	99	100
Serratia marcescens	82	98	100	100	100	90	99	100	100	100	72	90	99	100	100	72	87	98	100	100
Proteus morganii	86	97	100	100	100	87	98	100	100	100	80	92	99	100	100	73	92	99	99	100
Aeromona hidrophyla	82	94	99	100	100	87	94	99	100	100	76	90	96	99	100	67	78	92	99	100
Citrobacter freundii	71	83	98	100	100	87	96	100	100	100	70	80	98	99	100	67	79	91	99	100
VALOR PROMEDIO Bacilos Gram -	80.8	94.2	98.6	100	100	84.2	94.6	99	99.9	100	68	86.4	94.9	98.9	100	63.8	83.7	95.3	99.3	100
Candida albicans I		93	97	100	100			81	98				78	94	+					89
Candida albicans II		93	97	100	100			74	98				77	95	+			78	97	
Aspergillus niger	49	82	100	100	100	35	97	99	100	100	31	38	49	70	+	32	80	95	99	

+ : Crecimiento

- : No hay crecimiento

NOTA: Los espacios en blanco son debido a ensayos no realizados.

2.5. Determinación de la Reducción de la Población (RP) de los microorganismos. Para la evaluación se contó con tubos que contenían el medio de cultivo líquido escogido, inoculado por separado con los diferentes microorganismos de control. Con ellos se conformaron dos series de tubos; una contenía la benzoxazina en ensayo en una proporción de 40 mcg/ml y la otra no la poseía. Después de incubar las series de tubos a 37°C durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 hs., se determinó por el sistema de siembra en "Derrame en Cajas de Petri", el número de microorganismos viables en cada una de las dos series y por comparación de esas poblaciones se estableció la RP que se produce en esos tiempos de contacto del germen con la benzoxazina.

III. RESULTADOS

1. Síntesis de las Benzoxazinas.

Los principales resultados obtenidos en la síntesis siguiendo el método general descrito en el trabajo anterior (1), se anotan en la tabla I.

2. Determinación de las Características Antimicrobianas.

2.1. En la Tabla II se aprecian los comportamientos de las benzoxazinas sobre diferentes gérmenes, en lo pertinente a los porcentajes de reducción de las poblaciones de microorganismos después de varios tiempos de contacto de ellos con concentraciones de 40 mcg/ml, de cada una de las benzoxazinas.

2.2. En la Tabla III se anota el porcentaje de microorganismos que responden a las concentraciones CMI y CL.

Tabla III
PORCENTAJES DE MICROORGANISMOS QUE RESPONDEN A VARIOS NIVELES DE CMI Y CL Y TIEMPOS PARA LA R.P. 100%

Benzoxazina	Tipo germen de control	CMI (mcg/ml)*			R.P. 100% tiempo en hs
		10	20	40	
A	Cocos Gram +	17	50	33	3
	Bacilos Gram +	—	100	—	4
	Bacilos Gram -	17	75	8	4
B	Cocos Gram +	17	50	33	4
	Bacilos Gram +	—	100	—	4
	Bacilos Gram -	8	84	8	4
C	Cocos Gram +	33	67	—	5
	Bacilos Gram +	67	33	—	4
	Bacilos Gram -	8	84	8	5
D	Cocos Gram +	83	17	—	4
	Bacilos Gram +	—	100	—	4
	Bacilos Gram -	33	67	—	5

* Iguales porcentajes de gérmenes responden respectivamente a los niveles de CL de 20, 40 y 60 mcg/ml.

NOTA: Dentro de estos resultados es de destacar la resistencia a 40 y 60 mcg/ml. del *Staphylococcus aureus* frente a las Benzoxazinas A y B, *Pseudomonas aeruginosa* frente a la Benzoxazina C y *Aeromonas hydrophyla* frente a la Benzoxazina B.

IV. CONCLUSIONES

De los resultados anotados se desprende que:

— El método de síntesis se pudo mejorar en cuanto a los rendimientos.

— Las benzoxazinas sintetizadas manifiestan propiedades inhibitorias (CMI) o propiedades bactericidas (CL) dependiendo de las concentraciones utilizadas.

— Se considera que estas sustancias de síntesis poseen un espectro de actividad amplio; son activas sobre gérmenes Gram positivos, Gram negativos, hongos y levaduras a concentraciones relativamente bajas.

— Al comparar los espectros de actividad de ellas se aprecia que la más activa es la Benzoxazina "A", luego la "B", posteriormente la "D" y por último la "C".

RESUMEN

Con el trabajo se optimizan los procesos de síntesis, y control químico de cuatro benzoxazinas, así como se aprecia más claramente el espectro de actividad antimicrobiano de ellas y los límites que manifiestan en las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Concentraciones Letales (CL) sobre los gérmenes de control.

SUMMARY

This work present the Optimization of the Synthesis and Chemical analysis of four benzoxazines, and the antimicrobial activity spectrum and the (MIC) minimum inhibitory concentration and lethal concentration (LC) against the control microorganisms used.

BIBLIOGRAFIA

1. ARTEAGA M., RINCON J., ROBAYO E. y MALDONADO M., Síntesis de algunas benzoxazinas y estudio de su posible actividad antibacteriana. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **3**, 63 (1980).
2. FUSON and JOSEIN, M.J. *Am. Chem. Soc.*, **78**, 3059 (1956).
3. WENFEEN W. and col., *Chem. Abst.*, **65**, 19028e (1956).
4. CALDWELL and THOMPSON, J. *Am. Chem. Soc.*, **61**, 2354 (1939).
5. CALDWELL and THOMPSON, J. *Am. Chem. Soc.*, **67**, 265 (1939).
6. CRONWELL and HOEKSEMA, J. *Am. Chem. Soc.*, **67**, 1658 (1945).
7. BURKE W.J. and col., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1677 (1954).
8. BURKE W.J. and col., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 602 (1952).
9. BURKE W.J. and col., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 609 (1949).
10. Koenig's *Journal Organic Chem.*, **35**, 4252 (1970).
11. PESSON and MARCELL, *Teacher Henri, Laboratorios Roger Bellon*, **134**, 20005 (1970).
12. ALBERT ROLAND and CHILLY MAZARIN, *Eur. J. Med. Chem. Abst.*, **84**, 3 (1975).
13. CHIOCCORA FRANCESCO, *Chem. Abst.*, **83**, 10 (1976).
14. SCHREIBER, HERBERT and J. SWISS, *Chem. Abst.*, **81**, 38305 (1974).
15. YOSHIDA TAKEHIKO, *Chem. Abst.*, **84**, 1587 (1976).
16. ZAGOREUSKII, KLYVEV, BEUDIKOV, *Chem. Abst.*, **84**, 3859 (1976).
17. HUBER, EMDEN, HLEMUT, *Ciba Ltda., Ger. Offen. 2,018.625 (Cl. CO7d,a,01n)*, 12 nov. 1970.
18. RODRIGUEZ, GARAY, *Laudana OM. II Fármaco*, **7**, 423 (1970).
19. BAVER A.W., KIRBY W.M., *AM. J. Clin. Path.*, **53**, 149 (1970).
20. VINCENT J.C., VINCENT W., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **55**, 162 (1955).
21. BARRY A.L., *The antimicrobial susceptibility test: Principles and Practice.*, Lea and Febiger, Philadelphia (1976).