

“SINTESIS DE ALGUNAS BENZOXAZINAS Y ESTUDIO DE SU POSIBLE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA”

*Mireya Maldonado

*Enrique Robayo Cortázar

**Manuel Arteaga Carvajal

**José María Rincón

I. INTRODUCCION

Las benzoxazinas y sus derivados, forman un grupo de sustancias poco estudiadas tanto en el campo de su síntesis orgánica, como en el de su análisis y sus posibles usos y aplicaciones. (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Los estudios realizados parecen demostrar que se podrían utilizar como antibacterianos y aún como posibles agentes anticancerígenos. Los resultados dependen del tipo de radicales o anillos aromáticos empleados en cada una de las síntesis (1, 2).

Wenffen y colaboradores (2) ensayaron las 2-hidroxitobenilanilidas y las tio-dihidro-1, 3-benzoxazinas, a fin de determinar sus efectos bacteriostáticos sobre *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, encontrando que eran más efectivos sobre los gérmenes Gram-positivos que sobre los Gram-negativos.

En la mayoría de los casos se encontró que si se hace una sustitución con bromo, se aumenta la actividad sobre los gérmenes Gram-positivos y se disminuye sobre los Gram-negativos; igualmente se encontró que la solubilidad en agua no influye en la actividad.

Drukker y colaboradores (12), hallaron que la 6-bromo-3-bencil-3, 4-dihidro-1, 3-2H-benzoxazina, en solución acuosa, posee propiedades bacteriostáticas sobre *Salmonella thyphosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

* Estudiantes

** Profesores o colaboradores de Tesis.

II. OBJETIVOS

Con el trabajo se pretende realizar la condensación de una amina primaria con formaldehído y para-clorofenol, la separación e identificación de las oxazinas formadas y estudiar las propiedades antibacterianas de las sustancias sintetizadas.

III. MATERIALES Y METODOS

A las respectivas benzoxazinas sintetizadas y purificadas en la forma que se anota posteriormente, se les determinó sus constantes físicas, el porcentaje de nitrógeno (13, 14) y de cloro (15, 16) y sus espectros de RNM, infrarrojo y de masas

1. Materiales

Los reactivos, materias primas, solventes y medios de cultivo empleados fueron de calidad analítica. Por otra parte se utilizaron los siguientes instrumentos:

Fusiómetro Fischer-Johnson (20-320°C)
 Espectrofotómetros infrarrojo Perkin-Elmer 137 y 467
 Espectrómetros de RNM Perkin-Elmer R-12B y R-24
 Espectrómetro de masas Jeol JMS-01 SG-2
 Medidor de zona de inhibición, Fischer-Lilly
 Cuentas colonias Hellige
 Incubadoras Nemmert
 Autoclave (esterilizaciones a 121°C durante 15 minutos)

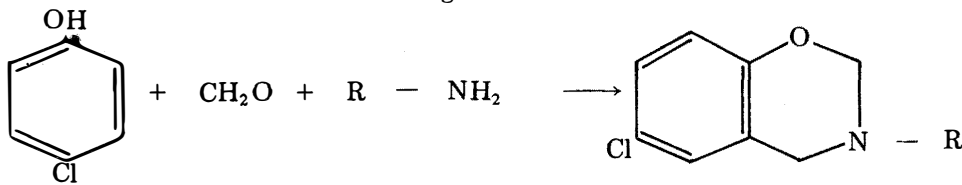
Los gérmenes empleados para los controles de actividad fueron los siguientes:

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, suministrados por el Instituto Nacional de Salud (INAS) y *Bacillus subtilis* (ATCC-12301) adquirido de la American Type Culture Collection.

2. Métodos

Síntesis. El procedimiento descrito por Burke (8) fue empleado para la síntesis de las benzoxazinas, utilizando para-clorofenol, formaldehído y aminas primarias (R-:Etilendiamina, Bencilamina, Anilina y Etanolamina) en las proporciones molares 1:2:1. La reacción de condensación es:

Figura No. 1



Con el fin de obtener información referente a los rendimientos, se varió la temperatura de reacción según los dos métodos anotados a continuación:

2.1. *Método A.*

Se mezclaron para-clorofenol, formaldehído y una de las aminas primarias, en proporciones molares de 1:2:1 respectivamente, empleando metanol como solvente. La mezcla se colocó bajo reflujo durante 20 minutos y el solvente se removió por destilación al vacío.

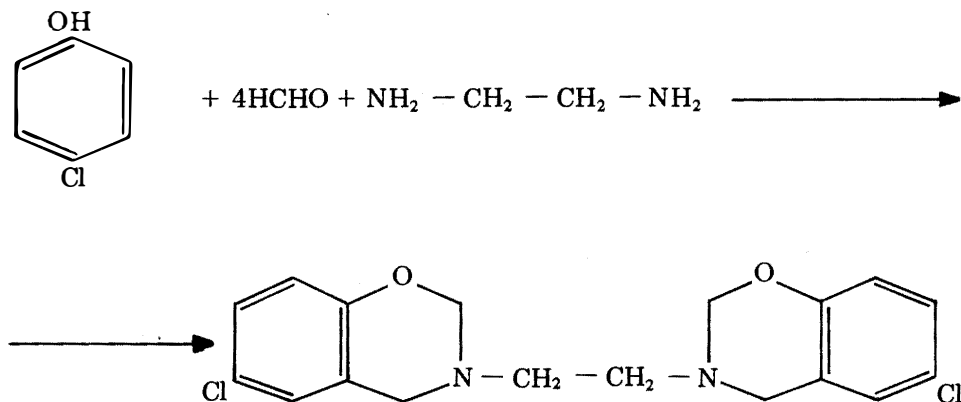
2.2. *Método B.*

Se mezclaron para-clorofenol, formaldehído y una de las aminas primarias en proporciones molares de 1:2:1 respectivamente, usando metanol como solvente. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas y se eliminó el solvente por destilación a presión reducida.

2.3. *Síntesis de la Benzoxazina (A). -2, 2-Etilen bis-(6-Cloro-3, 4-2H-Benzoxazina).*

El compuesto se obtuvo por los métodos A y B, empleando los reactivos en las proporciones siguientes: 1.83 ml (0.027 moles) de etilendiamina, 10.9 ml (0.108 moles) de solución acuosa de formaldehído al 37% y 3.52 gramos de para-clorofenol; se utilizó el metanol como solvente para la reacción.

Figura No. 2 Benzoxazina (A)

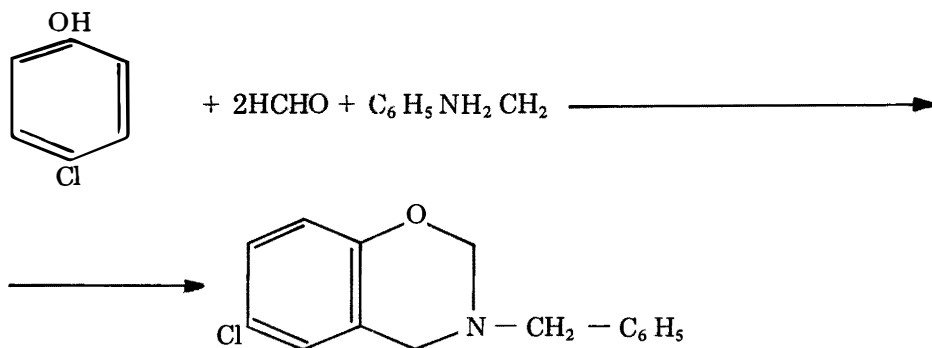


Se lavó repetidas veces el producto de síntesis con agua y etanol, se secó al vacío y se cristalizó hasta lograr que el punto de fusión y el espectro infrarrojo fueran constantes.

2.4. *Síntesis de la Benzoxazina (B). -6-Cloro-3-Bencil-3, 4-Dihidro-1, 3, 2H-Benzoxazina.*

Se obtuvo siguiendo los métodos A y B y empleando las siguientes cantidades de los reactantes: 4.2 ml (0.038 moles) de bencilamina, 7,56 ml (0.076 moles) de solución acuosa de formaldehído al 37% y 5.0 gramos de para-clorofenol; como solvente para la reacción se empleó el metanol.

Figura No. 3 Benzoxazina (B)

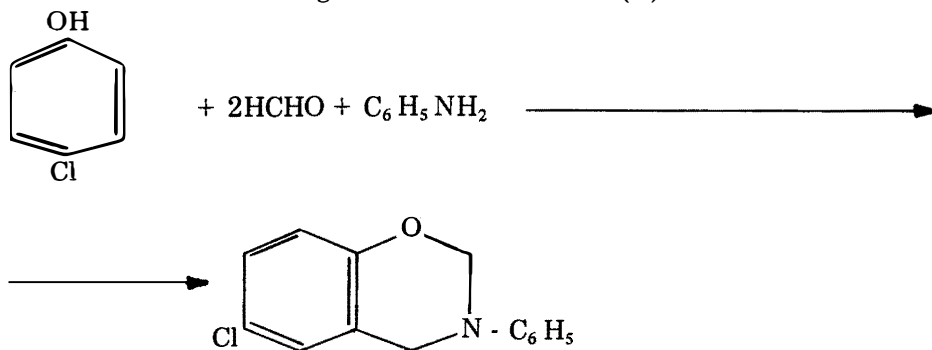


La Benzoxazina (B) obtenida, se purificó bajo las condiciones que se anotan más adelante y empleando como solvente el diclorometano. El producto resultante se recrystalizó en etanol hasta que su espectro infrarrojo no presentó variación con respecto al anterior y el punto de fusión permaneció constante.

2.5. Síntesis de la Benzoxazina (C). -6-Cloro-3-Fenil-3, 4-Dihidro-1, 3-2H-Benzoxazina.

Se obtuvo por los métodos A y B usando las siguientes cantidades de sustancias reactantes: 3.7 ml (0.040 moles) de anilina, 7.9 ml (0.040 moles) de solución acuosa de formaldehído al 37% y 5.2 gramos (0.040 moles) de para-clorofenol; como solvente para la reacción se empleó el metanol.

Figura No. 4 Benzoxazina (C)

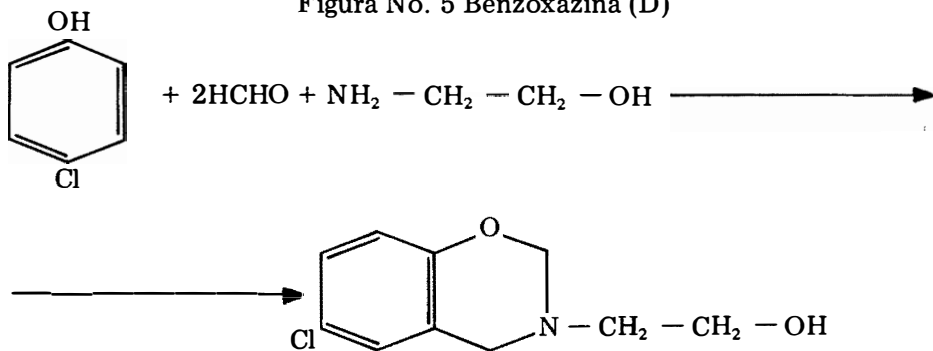


El producto logrado se purificó según el método general que más adelante se anota y utilizando diclorometano como solvente. El compuesto se recristalizó en etanol hasta lograr un punto de fusión constante y un espectro infrarrojo sin variación con respecto al anterior.

2.6. *Síntesis de la Benzoxazina (D). -6-Cloro-3-(2-hidroxi-etil)-3, 4-Dihidro-1, 3, 2H-Benzoxazina.*

El compuesto se obtuvo siguiendo los métodos A y B y utilizando las siguientes cantidades de sustancias reactantes: 2.5 ml (0.047 moles) de etanolamina, 9.33 ml (0.094 moles) de solución acuosa de formaldehído al 37% y 6.02 gramos (0.047 moles) de para-clorofenol; se empleó como solvente para la reacción el metanol.

Figura No. 5 Benzoxazina (D)



La benzoxazina se purificó según el procedimiento que más adelante se describe.

2.7. *Método de purificación de los compuestos*

Para tal propósito se utilizó la cromatografía de columna, usando 10 gramos de alúmina activada básica por gramo de compuesto obtenido y como solvente, el dicloro-metano. El punto final de elución se determinó con el reactivo de Draggendorff (17) (por ensayos previos se determinó que las sustancias obtenidas daban reacción positiva con el reactivo).

Además, se empleó la cromatografía en capa delgada, utilizando placas de 20 x 10 cm con sílica Gel G en un espesor de 0.25 mm y activadas a 110° C durante una hora y se usaron las siguientes mezclas de solventes:

1. Cloroformo-éter de petróleo-metanol-dietilamina en proporción de 70-30-0.5.
2. Eter de petróleo-cloroformo-metanol-dietilamina en proporción de 70-24-6-0.5
3. Eter de petróleo-cloroformo-dietilamina en proporción de 80-20-1.

4. Benceno-cloroformo-dietilamina en proporción de 20-75-15.
5. Ciclohexano-acetato de etilo en proporción de 2-1.
6. Benceno-acetato de etilo en proporción de 1-1.
7. Benceno-acetato de etilo-ácido acético en proporción de 60-40-1.
8. Ciclohexano-acetato de etilo en proporción de 1-1.

Las placas se revelaron con el reactivo de Draggendorff (18) y con vapores de yodo. A fin de solubilizar algunos de los compuestos sintetizados y facilitar los ensayos microbiológicos, fue necesario preparar las sales de las aminas terciarias correspondientes (17, 19).

3. Técnicas para el control de la actividad antibacteriana

3.1. *Método del disco*

Para llevar a cabo este método, se impregnaron discos de papel de filtro con diluciones de la sustancia antimicrobiana en estudio y a concentraciones variables; se colocaron luego sobre el medio de cultivo, el cual se había inoculado previamente con los gérmenes de control

Los inoculos se prepararon haciendo cultivos en caldo nutritivo y de estos se inocularon al 1.5% *E. coli* y *S. aureus*, al 1% *P. aeruginosa* y al 2% *B. subtilis*. Las incubaciones se efectuaron a 37° C y durante 18 horas (20,21).

3.2. *Método de los agujeros o cúpulas*

Este método se llevó a cabo colocando diluciones de la sustancia en estudio (0.1 ml) o concentraciones diferentes, en agujeros o cúpulas hechos en el medio de cultivo previamente inoculado con el germen de control.

Las condiciones bajo las cuales se prepararon y emplearon los inoculos fueron las mismas que se siguieron en el método anterior (20, 21).

3.3. *Método de dilución en serie del antimicrobiano*

(Método de reducción de población).

Este método consistió en comparar el número de colonias que se logran obtener de una población microbiana no tratada con agente antimicrobiano alguno, con las que se obtienen al someter los mismos gérmenes, bajo idénticas condiciones, a una concentración dada del compuesto en estudio.

Para la realización del método, se adaptó previamente el germen al caldo nutritivo que se usó para el control, a fin de tenerlo en su fase logarítmica de crecimiento. Una vez listo el cultivo del germen, se inoculó al 1% en el caldo que sirvió para realizar el ensayo, (este valor se determinó en ensayos pre-

vios), se homogenizó la siembra y se dividió en dos porciones; una se empleó para cuantificar la población total de microorganismos no tratados con antimicrobiano alguno que se desarrolla después de un tiempo de incubación a la temperatura adecuada para el germen (en este caso 37° C y 14 horas de incubación) y la otra porción, para determinar, por separado, la actividad de las diferentes diluciones de la sustancia antibacteriana en estudio y cuantificar la cantidad de gérmenes que permanecen viables después de igual tiempo de incubación y a la misma temperatura.

Con los resultados obtenidos se determinó el porcentaje de sobrevivientes a un tratamiento dado durante un tiempo y a una temperatura conocidos.

IV. RESULTADOS

1. Síntesis de las Benzoxazinas

TABLA 1

VALORES OBTENIDOS PARA LAS BENZOXAZINAS

BENZOXAZINAS SINTETIZADAS

		Benzoxazina A	Benzoxazina B	Benzoxazina C	Benzoxazina D	
Rendimiento	Método A	53.77 %	91.26 %	65.00 %	91.48 %	
	Método B	70.37 %	60.56 %	40.23 %	82.97 %	
Forma física		crisales blancos	crisales blancos	crisales blancos	líquido amarillo aceitoso	
Puntos de fusión		172°C y 236°C*	55-56°C 160-162°C*	46° - 48°C 150°C*	155°C	
Indice de refracción					15.640 a 25° C	
SOLVENTES		No. 1 Rf. 0.84	No.3 Rf.048	No.3 Rf.0.71	No.6 Rf.0.49	
Nos. Rf.		No.2 Rf.0.75	No.4 Rf.0.71	No.5 Rf.0.64	No.7 Rf.0.46 No.8 Rf.0.40	
ANALISIS	Nitrógeno	Teórico	7.86 %	5.39 %	5.70 %	6.55 %
		Hallado	7.40 %	5.48 %	5.63 %	6.50 %
	Cloro	Teórico	19.45 %	13.68 %	14.46 %	16.62 %
		Hallado	19.25 %	13.80 %	14.68 %	16.38 %

* Clorhidrato de la Benzoxazina

2. Controles de Actividad antibacteriana

TABLA 2

DIAMETROS DE LA ZONA DE INHIBICION EMPLEANDO EL METODO DE DISCOS*

	Clorhirato Benzoxazina (A)		Clorhidrato Benzoxazina (B)		Clorhidrato Benzoxazina (C)		Benzoxazina (D)	
	concentración mcg/ml	diámetro (mm)	concentración mcg/ml	diámetro (mm)	concentración mcg/ml	diámetro (mm)	concentración mcg/ml	diámetro (mm)
Escherichia coli	2000	13.60	2000	9.00	2000	8.90	2000	9.72
Staphylococcus aureus	2000	12.94	2000	11.36	2000	9.72	2000	13.64
Bacillus subtilis	2000	9.76	2000	8.16	2000	8.68	3000	9.24
Pseudomonas aeruginosa	2000	13.85	2000	8.10	3000	8.56	3000	8.20

* Diámetro del disco: 7.3 mm; tiempo de predifusión: 1 hora; Temperatura de incubación: 37°C
 Los valores de los diámetros de las zonas de inhibición son el promedio de 5 determinaciones.

TABLA 3

DIAMETROS DE LAS ZONAS DE INHIBICION EMPLEANDO EL METODO DE AGUJERO*

	Clorhidrato de Benzoxazina (A)		Clorhidrato de Benzoxazina (B)		Clorhidrato de Benzoxazina (C)		Benzoxazina (D)	
	concentración mcg/ml	diámetro (mm)	concentración mcg/ml	diámetro (mm)	concentración mcg/ml	diámetro (mm)	concentración mcg/ml	diámetro (mm)
Escherichia coli	2000	19.50	2000	14.98	2000	10.34	2000	10.42
Staphylococcus aureus	2000	20.30	2000	12.80	2000	10.70	2000	16.48
Bacillus subtilis	2000	16.98	2000	12.12	2000	10.38	3000	10.26
Pseudomonas aeruginosa	2000	20.70	2000	9.02	3000	10.54	3000	9.48

* Diámetro de los agujeros: 7.5 mm; Tiempo de predifusión: 1 hora; Temperatura de incubación: 37°C; Volumen de la solución de la sustancia colocada en cada agujero: 0.1 ml

Los valores de los diámetros de las zonas de inhibición con el promedio de 5 determinaciones.

TABLA 4

RECuento bacteriano después del tratamiento con las benzoxazinas por el método de reducción de población^a

Sustancia		NUMERO DE COLONIAS POR 0.1 ml					
Benzo- xazina	Concent. mcg/ml	Escherichia coli		Staphylococcus aureus		Bacillus subtilis	
		P.T. ^b	P.N.T. ^c	P.T. ^b	P.N.T. ^c	P.T. ^b	P.N.T. ^c
A	125	17		23		INC ^d	
	150	9	360	12	425	131	202
	175	6		9		80	
B	550	188		INC ^d		INC ^d	
	600	150	360	INC ^d	425	INC ^d	202
	650	36		400		222	
C	350	INC ^d		INC ^d		INC ^d	
	400	INC ^d	360	INC ^d	425	INC ^d	202
	450	337		195		223	
D	700	INC ^d		423		INC ^d	
	850	INC ^d	360	249	425	INC ^d	202
	1.000	17		101		180	

^a Lecturas después de 18 horas de incubación a 37°C; los resultados son valores y promedios de 4 determinaciones.

^b P.T.: Población tratada.

^c P.N.T.: Población no tratada.

^d INC.: Incontable.

V. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los análisis de los espectros infrarrojo, de resonancia magnética nuclear y de masas de los compuestos obtenidos, se puede demostrar la estructura esperada para los benzoxazinas sintetizadas, ya que:

- Los espectros infrarrojo, por absorciones entre 1215 y 1235 cm^{-1} para la tensión del enlace C-aril-O y entre 1072 y 1102 cm^{-1} para la tensión del enlace C-alquil-O y absorciones en la región entre 1130 y 1149 cm^{-1} , para la unión C-N-C, demuestran la formación del anillo heterocíclico.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear corroboran la estructura asignada para las benzoxazinas, por los diferentes tipos de protones encontrados en ellos.

- c) Los espectros de masas, demuestran que los pesos moleculares corresponden a las fórmulas propuestas para las benzoxazinas de síntesis.
2. Los resultados del análisis de nitrógeno y cloro hechos a las benzoxazinas, coinciden con los datos teóricos, lo cual contribuye a comprobar la estructura esperada.
3. Se puede apreciar que el mejor método para la síntesis de las benzoxazinas preparadas es el método A, puesto que se obtienen mayores rendimientos.
4. Los controles de actividad antibacteriana de las benzoxazinas demuestran que ellas poseen acción sobre los microorganismos de control empleados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*). Y que las 2,2'-Etilen-bis (6-cloro-3,4-dihidro 1,3,2,H benzoxazina) o benzoxazina (A), es la que manifiesta mayor actividad sobre los diferentes microorganismos de control.
5. La actividad que manifiesta la benzoxazina (A) sobre los gérmenes de control es la siguiente; posee efecto similar sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y menor actividad sobre *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*.
6. De las otras benzoxazinas se puede concluir que la benzoxazina (B) es más activa sobre *Escherichia coli*, que sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. La benzoxazina (D) posee mayor actividad sobre *Staphylococcus aureus* y la benzoxazina (C) es la de menor actividad sobre los gérmenes de control.
7. Al revisar la estructura de las benzoxazinas, se puede apreciar la influencia que tiene en la actividad antibacteriana los radicales sustituyentes en la posición 3 de las benzoxazinas.

VI. RESUMEN

Se reportaron cuatro benzoxazinas nuevas con propiedades antibacterianas, las cuales fueron obtenidas por síntesis. Además, se llevó a cabo una evaluación y un estudio comparativo de la actividad antibacteriana sobre *E. Coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, y *P. aeruginosa*, lo mismo que de los sistemas de síntesis propuestos y las formas de purificación.

VII. SUMMARY

Four new synthetical benzoxazines with bactericidal properties are reported.

The bactericidal activity against *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* is evaluated.

The systems for synthesis and purification of the compounds are discussed.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Fuson and Josein. M., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3059 (1956).
2. Wenffen W. and col., *Chem. Abst.* 65, 19028e (1966).
3. Caldwell and Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* 67, 265 (1939).
4. Caldwell and Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2354 (1939).
5. Burckhater J.H., *J. Am. Chem. Soc.* 72, 5309 (1950).
6. Burckhater J. H., *J. Am. Chem. Soc.* 68, 1894 (1946).
7. Burckhater J. H., and Leib. R. I., *J. Org. Chem.* 26, 4078 (1961).
8. Burke W. J., *J. Am. Chem. Soc.* 71, 609 (1949).
9. Burke W. J. and col., *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1677 (1954).
10. Burke W. J. and col., *J. Am. Chem. Soc.* 74, 602 (1952).
11. Burke W. J. and col., *J. Chem. Soc.* 74, 1518 (1952).
12. Drukker A. E. and Grodzckie, *Chem. Abst.* 67, 3094c (1967).
13. Steyermark A., *Quantitative Organic Microanalysis*, 2nd Ed. p. 188, New York and London, Academic Press, 1961.
14. Bradstreet R., *The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen*, p. 57, New York and London, Academic Press, 1965.
15. Fisher R. B. y Peter D., *Análisis Químico Cuantitativo*, p. 340, México, Editorial Interamericana S.A., 1970.
16. Norma ICONTEC No. 303 (1969).
17. Calderón G.E., *Guía para Análisis de Plantas y Notas Prácticas sobre Fitoquímica*, p. 25, Bogotá, Universidad Nacional, 1963.
18. Randerath K., *Thin Layer Chromatography*, p. 74, New York and London, Academic Press, 1963.
19. Cheronis N.D. and Entrinkin, *Identification of Organic Compounds*, p. 276, New York and London, Wiley International Edition, 1963.
20. Kavanagh F., *Analytical Microbiology*, p. 4-12, London, Academic Press, 1963.
21. Walter A.M. and Heilmeyer L., *Manual de Antibióticos en la Terapéutica Moderna*, p. 173-8, Barcelona, Ed. Praxis S.A., 1958.