



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Químico Farmacobiología
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE COMPLEJOS *L*- α - DIPÉPTIDO-Bi (III) Y SU EVALUACIÓN EN *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli* COMO POTENCIALES AGENTES ANTIMICROBIANOS

TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA:
Q.F.B ROXANA COLÍN AVILÉS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS: D.C. LUIS CHACÓN GARCÍA
CO-ASESOR: D.C. JUDITH ARACELI AVIÑA VERDUZCO

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO

AGOSTO DE 2011



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Diseño Molecular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas bajo la asesoría del Dr. Luis Chacón García y la co-asesoría de la Dra. Judit Araceli Aviña Verduzco. Se contó con apoyo económico ciencia básica 2009 CONACYT 131812, CIC-UMSNH 2.18.

Así mismo, la QFB Roxana Colín Avilés contó con beca de maestría otorgada por CONACYT para la realización de este trabajo.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron en el laboratorio del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con el apoyo del Dr. Joel Edmundo López Meza.

Congresos en los que se presentó parte de este trabajo

“SYNTHESIS OF SOME L- α -DIPÉPTIDES-BISMUTH (III) COMPLEXES AS
POTENTIAL ANTIMICROBIAL AGENTS”

1° Reunión Mexicana de Química Pura y Aplicada.

México, D.F., 16 – 20 de Mayo, 2011.

“SÍNTESIS Y ANÁLISIS DEL RECONOCIMIENTO MOLECULAR DEL
BISMUTO (III) HACIA MOLÉCULAS α -DIPÉPTIDICAS DE
[L-Ala-L-Phe], [L-Trp-Gly] y [L-Ala-L-Gly]”

45° Congreso Mexicano de Química y 29° Congreso Nacional
de Educación Química.

Riviera Maya, Q. Roo, 18 – 22 de Septiembre, 2010.

“FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE (L-ALANIL-L-FENILALANINA)-Bi (III)”

6° Reunión de la academia Mexicana de Química Orgánica.

Toluca, México, 28 – 30 de Abril, 2010.

“SÍNTESIS DE α -PÉPTIDOS COMO POTENCIALES AGENTES
ANTIBACTERIANOS”

1° Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Uruapan, Michoacán, 4 – 6 de noviembre, 2009.

Dedicatoria

A mis padres. Este trabajo que culmino hoy se lo dedico a las dos personas más importantes de mi vida, mis padres, Ma. Magdalena Avilés Herrejón y Mario Alberto Colín Soto, quienes me enseñaron siempre a ir por el camino de la rectitud y me impulsaron en todo momento de mi vida para ser una buena persona; quienes me enseñaron a aprender de mis tropiezo y me levantaron con su incondicional apoyo y amor, pero lo más importante se lo dedico a ellos porque me dieron la vida y porque nunca podre expresarles todo el amor que les tengo con palabras. ¡Muchas gracias papis!

A mi esposo. Alejandro Soria Cruz, por estar conmigo en todo momento y que con su cariño, comprensión y amor, he encontrado la felicidad de mi vida.

A mis hermanas. Mitzy y Marianita, por ser como son conmigo y considerarme siempre en los momentos más importantes de su vida, porque en ellas, he encontrado las más grandes amigas y confidentes.

A mis Abuelos. Esperanza y Luis, por ser parte esencial de mi vida, por su sabiduría y consejos valiosos que me han dado siempre; quienes han estado presentes a lo largo de mi vida.

A todos mis tíos, primos por el amor y cariño que me han brindado siempre.

¡Muchas Gracias!

Agradecimientos

Agradezco a mis asesores, Dr. Luis Chacón García y Dra. Judit Araceli Aviña Verduzco, por haberme guiado durante el desarrollo de este trabajo, por su asesoría, dedicación y apoyo académico; por su amistad y por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y darme la confianza para la realización de este proyecto.

Por supuesto, también quiero agradecer a mis maestros, Dr. Joel Edmundo López, Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, Dr. Carlos Cortés Penagos, Dr. Gabriel Navarrete Vázquez y Dra. Claudia Contreras, quienes además de transmitirme el conocimiento, me ayudaron a tener una perspectiva más amplia del proyecto y me proporcionaron las herramientas necesarias para cumplir con los objetivos marcados; les agradezco por los valores éticos y profesionales que inculcaron en mi persona.

A todos mis compañeros de la maestría, pero principalmente a Vani y Marisol por su valiosa amistad incondicional y compañía a lo largo de estos dos años de la maestría. También quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos de laboratorio, con los cuales he crecido y fortalecido aptitudes del laboratorio, por compartir experiencias maravillosas durante mi estancia en el instituto.

Al personal de espectroscopía, gracias por su apoyo para la caracterización de este trabajo ya que sin ustedes no hubiera sido posible su realización. También al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y a la Facultad de Químico Farmacobiología, por la oportunidad que me brindaron para llevar a cabo mis estudios y experimentos de postgrado y con ello mi superación personal.

Al CONACYT, por su valioso apoyo económico para la realización de este proyecto de investigación. Pero ante todo agradezco a Dios por permitirme llegar hasta este momento y concluir otra etapa más de mi vida estudiantil.

D.C. Joel Edmundo López
D.C. Gabriel Navarrete Vázquez
D.C. Carlos Cortés Penagos
D.C. Judit Aviña Verduzco

*Por aceptar ser mis sinodales y por sus valiosas aportaciones en el
trabajo experimental y escrito.*

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE ESQUEMAS	vii
ABREVIATURAS	viii
COMPLEJOS DIPÉPTIDO-Bi (III)	xii
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. ANTECEDENTES	6
4.1 Metal antibióticos	6
4.2 Generalidades del bismuto	6
4.2.1 El bismuto en la medicina	7
4.2.2 Nuevos compuestos de bismuto	10
4.2.3 Mecanismo de acción de los compuestos de bismuto	11
4.3 Generalidades de los péptidos antimicrobianos	12
4.3.1 Clasificación de los PAs	13
4.3.2 Mecanismo de acción de los PAs	15
4.3.3 Resistencia bacteriana a los PAs	17
4.3.3.1 Mecanismos de resistencia extracelular	17
4.3.3.2 Mecanismos de resistencia intracelular	18
4.4 Metal antibióticos de dipéptidos	18

5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVO GENERAL	21
6.1 Objetivos particulares	21
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
8. MATERIALES Y MÉTODOS	23
8.1 Aminoácidos	23
8.2 Cepas bacterianas	23
8.3 Síntesis de <i>L</i> - α -dipéptidos	24
8.3.1. Generalidades	24
8.3.2. Vía sintética	25
8.3.3. Reacciones de <i>N</i> -protección	26
8.3.4. Reacciones de <i>O</i> -protección	26
8.3.5. Reacciones de acoplamiento	26
8.3.6. Reacciones de <i>O</i> -desprotección	27
8.3.7. Reacciones de <i>N</i> -desprotección	28
8.3.8. Reacciones de desprotección asistida por microondas	28
8.4 Análisis y Formación de complejos dipéptido-Bi ⁺³	29
8.5 Estudios de susceptibilidad antimicrobiana	29
8.5.1 Pruebas de dilución en tubo	29
8.5.2 Pruebas de difusión en disco	29
8.6 Análisis estadístico	30
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
9.1 Síntesis peptídica. Obtención de <i>L</i> - α -dipéptidos	31
9.2 Síntesis y análisis de los complejos dipéptido-Bi ⁺³	39
9.3 Actividad antimicrobiana de los complejos dipéptido-Bi ⁺³	48

10. CONCLUSIÓN	55
11. REFERENCIAS	56
12. COLECCIÓN DE ESPECTROS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura del complejo citrato/bismuto a pH ácido (a) y neutro (b)	8
Figura 2. Acción del bismuto sobre la chaperonina HspA de <i>Helicobacter pylori</i>	12
Figura 3. Clasificación de los PAs según su estructura	13
Figura 4. Clasificación general de los PAs según su composición, carga y estructura	14
Figura 5. Mecanismo de acción de PAs. Modelo de poro toroidal desordenado (vista lateral)	16
Figura 6. Estructuras propuestas para el complejo <i>L</i> -cisteina•Bi ⁺³ (a) y DL-homocisteina•Bi ⁺³ (b) (Burford <i>et al.</i> , 2002)	20
Figura 7. Aminoácidos seleccionados para la síntesis de los complejos dipéptido-Bi ⁺³	23
Figura 8. Cromatografía en capa fina de la hidrólisis básica en microondas del dipéptido diprotectados en AcOEt	36
Figura 9. Espectros de RMN- ¹ H de la desprotección asistida por microondas	37
Figura 10. Espectros de RMN- ¹³ C de la desprotección asistida por microondas	38
Figura 11. Análisis del complejo Ala-Fen•Bi ⁺³ Bi24 por RMN- ¹ H a 400 MHz	41

Figura 12.	TOCSY a 200 MHz del complejo Ala-Fen•Bi ⁺³ Bi24 en proporción 1:1 dipéptido/bismuto	42
Figura 13.	Análisis del complejo Ala-Fen•Bi ⁺³ Bi24 por RMN- ¹³ C a 400 MHz	43
Figura 14.	Análisis del complejo Ala-Fen•Bi ⁺³ Bi24 por IR	45
Figura 15.	Estructura propuesta para el complejo Ala-Fen•Bi ⁺³ Bi24	46
Figura 16.	Análisis del complejo Trp-Gli•Bi ⁺³ Bi26 por RMN- ¹ H a 200 MHz	46
Figura 17.	Análisis del complejo Trp-Gli•Bi ⁺³ Bi26 por RMN- ¹³ C a 200 MHz	47
Figura 18.	Estructura propuesta para los complejos dipéptido-Bi ⁺³ con Alanina o Glicina en el C-terminal	48
Figura 19.	Doble halo inhibitorio en <i>Escherichia coli</i> del complejo Tir-Gli•Bi ⁺³ Bi25	49
Figura 20.	Ensayos de difusión en disco en <i>Escherichia coli</i>	50
Figura 21.	Comparación de medias de la inhibición de los complejos en <i>Escherichia coli</i>	50
Figura 22.	Ensayos de difusión en disco en <i>Staphylococcus aureus</i>	51
Figura 23.	Comparación de medias de la inhibición de los complejos en <i>Staphylococcus aureus</i>	52
Figura 24.	Comparación de la actividad de los compuestos en <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Principales características químicas del bismuto	7
Tabla 2. Compuestos de bismuto en uso clínico	9
Tabla 3. PAs clasificados según su fuente de origen	14
Tabla 4. Obtención de los dipéptidos diprottegidos 7-16 y rendimientos	33
Tabla 5. O- y N-desprotección para la obtención de los dipéptidos libres 17-26 y rendimientos	34

ÍNDICE DE ESQUEMAS

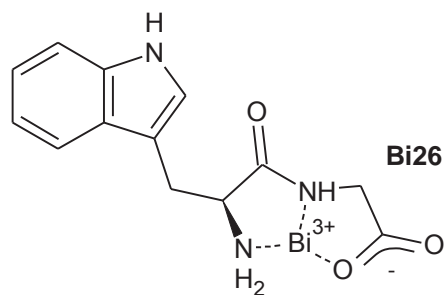
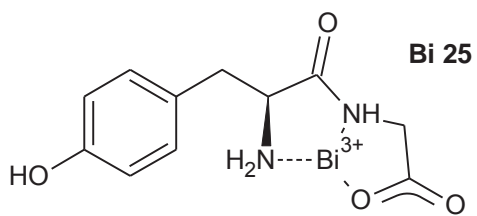
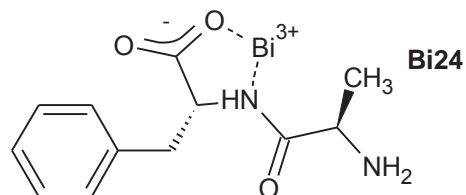
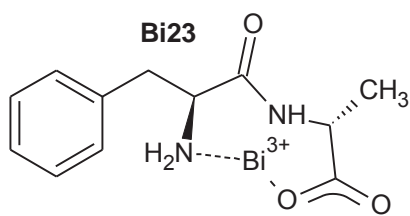
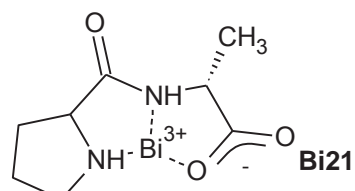
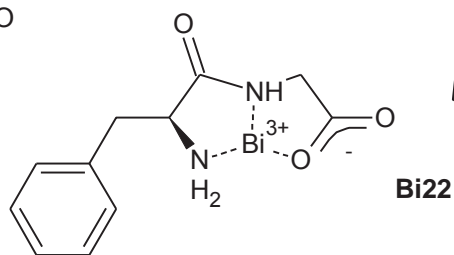
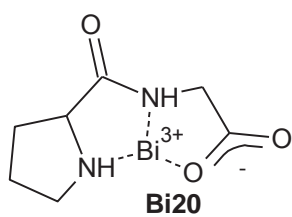
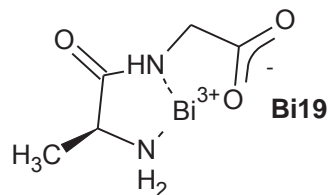
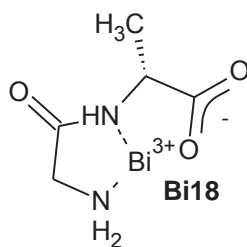
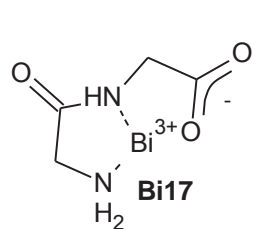
	Página
Esquema 1. Vía sintética para la obtención de dipéptidos	25
Esquema 2. Síntesis de los aminoácidos <i>N</i> -protegidos 1a-6a	31
Esquema 3. Síntesis de los aminoácidos <i>O</i> -protegidos 1b-3b	32

ABREVIATURAS

Å.....	Amstrong
AcOEt.....	Acetato de etilo
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
Ala.....	Alanina
Arg.....	Arginina
Asp.....	Ácido aspártico
ATP.....	Adenosín trifosfato
Bi ⁺³	Bismuto trivalente
Bi(NO ₃) ₃	Nitrato de bismuto (III)
¹³ C.....	Carbono isotopo 13
°C.....	Grados Celsius
CbzCl.....	Cloroformiato de bencilo
Cbz.....	Benciloxicarbonilo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD.....	Metanol deuterado
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metilo
CH ₃ COOH.....	Ácido acético
Cis.....	Cisteína
DO.....	Densidad óptica
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
DMSOd ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eq.....	Equivalente químico
Fe ⁺³	Hierro trivalente
Fen.....	Fenilalanina
g.....	Gramo

Gli	Glicina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
h	hora
^1H	Hidrógeno
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ O	Agua
His	Histidina
HNO ₃	Ácido nítrico
<i>i</i> -BbCl	Cloroformiato de isobutilo
Ile	Isoleucina
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
Kd	Constante de disociación
KDa	Kilo Dalton
Leu	Leucina
LiOH	Hidróxido de litio
M	Molar
μM	Micro molar
MeOH	Metanol
Met	Metionina
μg	Microgramos
MH	Muller Hinton
MHz	Megahertz
CMI	Concentración mínima inhibitoria
ml	Mililitro
μmol	Micromol

mm	Milímetro
N	Normal
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NCCLS	Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos
nm	Nanómetros
OMe	Grupo Metoxilo
Pd/C	Paladio sobre carbono
PAs	Péptidos antimicrobianos
Pf	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
pm	Picómetro
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rto %	Rendimiento en porcentaje
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SO ₂	Dióxido de azufre
SOCl ₂	Cloruro de tionilo
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
Tir	Tirosina
Trp	Triptófano
UCF	Unidades formadoras de colonias
Zn ⁺²	Zinc divalente
Z	Benciloxycarbonilo

COMPLEJOS DIPÉPTIDO-Bi (III)

1. RESUMEN

Con el aumento de la selección de la resistencia antibiótica, surge una continua necesidad de desarrollar nuevos agentes para tratar enfermedades infecciosas de difícil manejo clínico. En este contexto, se han desarrollado más de 1, 000 antibacterianos. Muchos de ellos han demostrado ser tóxicos en fases preclínica, y los poco más de 100 que se encuentran actualmente en el mercado son ineficaces ante al menos una, de las muchas bacterias antibiótico resistentes. Ante esto, la química medicinal, dentro de las múltiples estrategias a las que recurre, ha permitido el desarrollo de nuevos compuestos organometálicos mejor conocidos como metaloantibióticos, en donde los complejos organobismutados reciben particular interés, por sus propiedades bacteriostáticas y astringentes. Así mismo, se han reportado varios complejos organometálicos que utilizan como ligandos *L*- α -aminoácidos, *L*- α -dipéptidos e inclusive péptidos, con importantes propiedades antimicrobianas y/o anticancerígenas, por lo que representan un campo activo de investigación. En el presente trabajo se sintetizó una serie de diez dipéptidos (*L*- α -dipéptidos) en solución y sus correspondientes complejos con sales de bismuto en proporción 1:1, con la finalidad de valorar su actividad antibacteriana frente a cepas de interés clínico por el método estandarizado de difusión en disco (NCCLS). La caracterización de los complejos dipéptidos-Bi⁺³, se realizó en solución por resonancia magnética nuclear de carbono e hidrógeno (RMN-¹³C e ¹H) en una y dos dimensiones, y por espectroscopía de IR. Dichos resultados sugieren que en el complejo Ala-Fen•Bi⁺³ el bismuto interacciona con el carboxilato y nitrógeno amida formando un anillo de cinco miembros, y en los complejos con glicina y alanina en el C-terminal es probable que el bismuto además de interactuar con el carboxilato y nitrógeno amida, también interactúe con el amino N-terminal, formando un biciclo [3.3.0] pentano. La actividad de los complejos fue significativamente mayor en *Escherichia coli* que en *Staphylococcus aureus* (P<0.5, t-student). Los de mayor actividad en *Escherichia coli* fueron Tyr-Gly•Bi⁺³, Phe-Ala•Bi⁺³ y Phe-Gly•Bi⁺³ con halos inhibitorios de 16.4, 14.2 y 13.8 mm, respectivamente y en *Staphylococcus*

aureus sólo Tyr-Gly•Bi⁺³ con 9.7 mm. Con estos resultados se concluye que los complejos dipéptido-Bi⁺³ poseen actividad antimicrobiana, la cual depende en gran parte de la solubilidad de los complejos pero también de cierta lipofilicidad lograda por la presencia de aminoácidos aromáticos en los dipéptidos.

2. SUMMARY

With increasing antibiotic resistance, there is a continuing need to create new agents to treat infectious diseases of difficult clinical management. In this context, it has developed over 1, 000 antibacterials. Many of them have proven to be toxic in preclinical stages, and just over 100 who are currently on the market are ineffective in at least one of the many antibiotic resistant bacteria. Given this, the medicinal chemistry within the multiple strategies that used, has enabled the development of new organometallic compounds, better known as metaloantibióticos. In this group, the organobismuth complex receives particular attention, for its bacteriostatic and astringent properties. It has also reported organometallic complexes that use as ligands *L*- α -amino acids, *L*- α -dipeptides and even peptides with significant antibacterial, antifungal and/or anticancer properties, so therefore represent an active field of research. In this work we synthesized a series of ten dipeptides (*L*- α -dipeptides) in solution and their corresponding complexes with bismuth salts in a 1:1 ratio, in order to assess their antibacterial activity against strains of clinical interest by the standardized method of disc diffusion (NCCLS). The characterization of complex dipeptides-Bi⁺³ was performed in solution by nuclear magnetic resonance of carbon and hydrogen (¹³C and ¹H-NMR) in one and two dimensions, and IR spectroscopy. These results suggest that the bismuth in the complex Ala-Phe•Bi⁺³ interacts with the carboxylate and amide nitrogen forming a ring of five members. In the complex with glycine and alanine in the C-terminal is likely that the bismuth interact with carboxylate, amide nitrogen and the amino N-terminal, forming a bicyclo [3.3.0] pentane. The complex activity was significantly higher in *Escherichia coli* than in *Staphylococcus aureus* (P<0.5, t-student). The most active in *Escherichia coli* were Tyr-Gly•Bi⁺³, Phe-Ala•Bi⁺³ and Phe-Gly•Bi⁺³ with inhibitory zones of 16.4, 14.2 and 13.8 mm respectively and in *Staphylococcus aureus* Tyr-Gly•Bi⁺³ with only 9.7 mm. With these results we conclude that the complex dipeptide-Bi⁺³ exhibit antimicrobial activity, which depends largely on the solubility of the complex but also a certain lipophilicity achieved by the presence of aromatic amino acids in dipeptides.

3. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son uno de los pilares básicos de la terapéutica. Se definen como sustancias químicas que a bajas concentraciones son capaces de matar o detener el desarrollo de microorganismos patógenos susceptibles. En los 1940s, el término se usaba para referirse a una sustancia química producida por microorganismos con la capacidad de inhibir el crecimiento, e incluso destruir a otro microorganismo en soluciones diluidas. Actualmente, el término también engloba a aquellos fármacos antimicrobianos de uso clínico de origen sintético y semisintético. Desde su introducción, han sido considerados un arma terapéutica muy valiosa en el combate de enfermedades infecciosas, gracias a ellos se han salvado millones de vidas. Sin embargo, en los últimos años su uso excesivo ha generado mecanismos de resistencia entre microorganismos patógenos que limitan su acción eficiente, lo cual se aumenta el riesgo de terapias inadecuadas y se prolongan las infecciones, facilitando a su vez, la transmisión de bacterias resistentes a otros hospederos (Timaná, 2002). Esta secuencia de hechos hace que las infecciones reemerjan como una causa importante de morbilidad en el mundo con grandes pérdidas humanas y económicas (Crespo, 2005).

En este sentido, es más frecuente la presencia de escenarios infecciosos de difícil manejo clínico como, por citar un ejemplo, el incremento en la incidencia de pacientes hospitalizados con *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), que en algunos países es superior a 60%. También, está en aumento el número de infecciones hospitalarias asociadas a *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV), *Neumococo* resistente a penicilina (PRSP), *Staphylococcus* coagulasa negativo resistente a meticilina (SCNRM) y *Staphylococcus* heterorresistentes a vancomicina (Tenover, 2004; Cornejo *et al.*, 2005), fenómeno biológico reportado en nuestro país (Reyna *et al.*, 2007). Otros retos como la producción de carbapenemasas, especialmente en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y en bacterias de la familia Enterobacteriaceae (Livermore y Woodford, 2000), así como, la producción de betalactamasas de espectro extendido en gran número de microorganismos, hacen que

la resistencia antibiótica se convierta en una preocupación mundial y de particular interés para la medicina en países como México (Ortiz, 2009).

La respuesta tradicional ante el problema clínico de la resistencia antibiotica, ha sido la introducción de nuevos fármacos (Coates *et al.*, 2002). Así, entre los métodos actuales para el desarrollo de antibióticos, están: 1) La búsqueda de compuestos naturales presentes en el espectro filogenético que no han sido explorados (Pelaez, 2006); 2) La ruta química semisintética para producir análogos a partir de estructuras básicas de los antibióticos naturales o conocidos (Zhanel *et al.*, 2004; Zuckerman, 2004); 3) La ruta química sintética de nuevos compuestos que ha dado lugar a una gran cantidad de compuestos antimicrobianos (Fernandez, 2006); y 4) la ruta genómica usada para seleccionar nuevos blancos antimicrobianos (Arcus *et al.*, 2006).

Cabe mencionar que la introducción de nuevos antibióticos en los últimos años no ha sido del todo exitosa, sólo dos nuevas clases de antibióticos, las oxazolidinonas (linezolid) (García de Lomas *et al.*, 2002) y los lipopéptidos cíclicos (daptomicina) (Kern, 2006), han entrado en el mercado en los pasados 20 años. Durante este tiempo, se han logrado análogos, pero cada vez, resulta más difícil obtener nuevos compuestos activos. Ante esta situación, la química medicinal ha propuesto una nueva clase de antibióticos basada en metales conocidos como metaloantibióticos, en donde el bismuto figura como un metal de interés por sus diversas características bacteriostáticas, antiácidas y astringentes, además de ser considerado un metal ecológicamente amigable de baja toxicidad. Como parte de los objetivos de nuestro equipo de trabajo enfocados a la búsqueda de nuevos antibióticos, en el presente trabajo se describe la síntesis del diez complejos dipéptido-Bi⁺³, obtenidos a partir de Bi(NO₃)₃ y L- α -dipéptidos en proporción 1:1, caracterizados en solución por técnicas espectroscópicas de IR y RMN en una y dos dimensiones como primera etapa de desarrollo de estos posibles antimicrobianos.

4. ANTECEDENTES

4.1 Metaloantibióticos

Los metaloantibióticos se definen como aquellos complejos metálicos con actividad antimicrobiana que derivan de antibióticos naturales o ligandos sintéticos. Esta nueva clase de antimicrobianos, surge como nueva alternativa para combatir el problema de la resistencia antibiótica. Su desarrollo se estimuló al observar que muchos compuestos biológicamente activos tras la quelación adquirirían nuevas propiedades bacteriostáticas, bactericidas y en algunos casos anticancerígenas. En la actualidad, está comprobado que numerosos antibióticos precisan de iones metálicos para ejercer su actividad. Por ejemplo, los antibióticos: bacitracina (Storm y Strominger, 1984), bleomicina (Claussen y Long, 1999; Petering *et al.*, 1990) y estreptonigrina (Hajdu y Armstrong, 1981) mantienen su estructura y actividad por la presencia de iones metálicos en su estructura.

Los iones metálicos juegan un papel importante en la acción de los metaloantibióticos y están involucrados en interacciones específicas de los ligandos con su blanco de acción, ya sean proteínas, membranas, ácidos nucleicos u otra biomolécula. No todos los metales han demostrado poseer actividad. Diversos estudios han descartado al Mg^{+2} para la obtención de metaloantibióticos activos (Turel *et al.*, 2000; Hoffken *et al.*, 1995). En cambio, metales como el $Fe^{+2/+3}$, Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} y Al^{+3} , han demostrado formar complejos más activos que sus ligandos de oxitetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol y ampicilinas (Ogunniran *et al.*, 2007, Macias *et al.*, 2001; Yukinori *et al.* 1996; Gao *et al.*, 1995). El bismuto es otro metal atractivo para el desarrollo de nuevos metaloantibióticos, debido a sus propiedades antimicrobianas antiácidas y antisépticas (Tiwari *et al.*, 2010).

4.2 Generalidades del bismuto

La palabra bismuto se deriva de la palabra alemana Weissmuth que significa sustancia blanca. El bismuto es el elemento número 83, localizado en el grupo 15 de la tabla periódica, posee una masa de 208.9 uma. Es el elemento más pesado de mayor estabilidad y menor toxicidad (Pinto *et al.*, 2006). A pesar de su estabilidad, es un elemento relativamente escaso (elemento 64° en abundancia en la corteza terrestre) que se obtiene principalmente como subproducto del refinado de los minerales de cobre y plomo. El gran radio atómico de 143 pm y elevada carga iónica le permite formar complejos estables con azufre, nitrógeno y oxígeno. En los sistemas biológicos se encuentra en estado trivalente (Bi^{+3}). Bajo este estado, el bismuto induce una fuerte estereoquímica de “pares desapareados” que le brindan mayor estabilidad al formar complejos (Sun y Sadler, 1997). Algunas de sus principales características químicas se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Principales características químicas del bismuto

Número atómico	83	Spin nuclear	9/2
Abundancia natural	^{209}Bi (100%)	Punto de ebullición	1564°C
Presencia en la corteza terrestre	0.17 – 0.2 ppm	Estado de la materia	Sólido cristalino
Radio iónico. Bi^{+3}	1, 20 Å	Estados de oxidación	0,+1,+2,+3,+4,+5
Bi^{+5}	0, 74 Å		
Radio atómico	143 pm	Punto de fusión	271,4°C

4.2.1 El bismuto en la medicina

El bismuto ha estado ligado a la medicina por más de 200 años (Marshall, 1991; Bierer, 1990) para tratar alteraciones gastrointestinales como: dispepsia, ulcera péptica, colitis, diarreas, infecciones parasitarias y bacterianas. Entre otras aplicaciones, se incluyen el

uso tópico en heridas de la piel, y recientemente, se ha propuesto el uso de películas de bismuto en catéteres para disminuir la colonización bacteriana (Schindler *et al.*, 2010).

A pesar de su uso popular, el bismuto por si mismo exhibe modesta actividad antimicrobiana, que mejora al aumentar la estabilidad y solubilidad (Manhart, 1990). En forma de complejo, el bismuto es más estable y mejor tolerado que en forma de sal (Shaikh *et al.* 2006a). La solubilidad a su vez, depende de factores como el pH, temperatura y proporción ligando/bismuto. A diferentes pH, los complejos llegan a adquirir diferentes conformaciones. Tales son los casos de los complejos de citrato de bismuto que a pH ácido forman hojas aniónicas estabilizadas por puentes de hidrógeno (Figura 1, a) y a pH neutro dan lugar a agregados multinucleares estabilizados por fuerzas de Van der Wals (Figura 1, b).

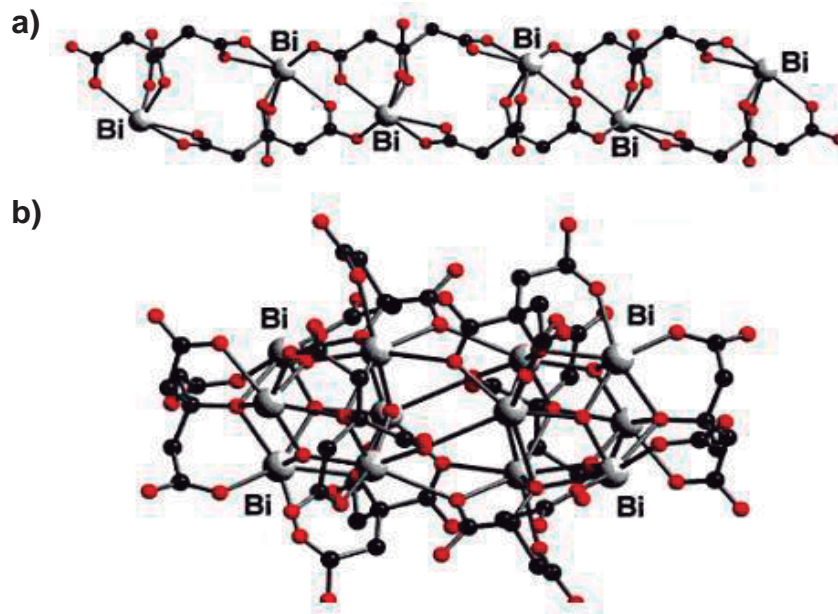


Figura 1. Estructura del complejo citrato/bismuto a pH ácido y neutro. Se muestra los átomos de bismuto en gris y el citrato en barras y esferas rojas y negras.

El aprovechamiento de las propiedades medicinales del bismuto decayó en el año 1940, pero en Australia y Francia continuó hasta el año 1970 cuando su uso excesivo (más de 10 gramos por día) por periodos largos causó neurotoxicidad e incluso mortalidad (Lowe, 1974). No obstante, el aislamiento de *H. pylori* renovó el interés por los compuestos de bismuto (Klapotke, 1988), al observar que estos disminuían las infecciones causadas por esta bacteria.

Se han realizado diferentes estudios de biodisponibilidad que aseguran el uso de complejos de bismuto para erradicar a *Helicobacter pylori* y otras infecciones (Hong y Fu-Lian, 2009; Ford *et al.*, 2008). Así, se ha observado que en un tratamiento normal de 1 a 2 semanas, ya sea sólo o en combinación con otros antibióticos, los niveles plasmáticos de bismuto se mantienen por debajo de 50 µg/ml y bajo este nivel, es poco probable que se desencadene una respuesta tóxica alarmante (Noach *et al.*, 1995). Actualmente existe una gran variedad de compuestos de bismuto en el mercado. En la tabla 2 se enlistan algunos ejemplos.

Tabla 2. Compuestos de bismuto en uso clínico

Compuesto	Nombre comercial	Indicación
Subnitrato de bismuto y yodoformo	OxBipp	Infecciones de piel
Subnitrato de bismuto	Roter	Diarrea: Desordenes gástricos
Subsalicilato de bismuto	Pepto-Bismol	Diarrea: Dispepsia
Subcitrato de bismuto coloidal	De-Nol, Lihudele	Gastritis y ulcera duodenal
Citrato de bismuto y ranitidina	Pylorid, Tritree	Ulcera gástrica y duodenal
Tribromofenato de bismuto	Xeroform	Antimicrobiano

4.2.2 Nuevos compuestos de bismuto

La investigación de nuevos compuestos de bismuto es muy amplia, se basa principalmente en mejorar la solubilidad de los compuestos y ampliar su rango de acción para ser utilizados frente a bacterias Gram positivas y negativas. De esta forma, nuevos compuestos de bismuto se han reportado con interesante actividad antimicrobiana (Kotani *et al.* 2005). Por ejemplo, los compuestos organobismuto amida recién sintetizados por Tiwari y colaboradores (Tiwari *et al.*, 2010), y los compuestos heterocíclicos de bismuto con nitrógeno y azufre (Toshiaki *et al.*, 2005), ambos con gran actividad antimicrobiana de amplio espectro, están siendo considerados como candidatos para aplicaciones clínicas.

Por otro lado, los compuestos tioles de bismuto (Domenico *et al.*, 1997c) son también un grupo prometedor de nuevos agentes antibacterianos con elevada actividad contra Gram negativos y Gram positivos. En estos compuestos, la presencia del tioles aumenta la actividad del bismuto de 25 hasta 300 veces con marcada actividad frente *S. aureus* (CMI 5 a 7 μM) y *H. pylori* (CMI 2.2 μM) y se ha propuesto que dichos tioles actúan como acarreadores lipofílicos del bismuto, necesarios para potenciar su actividad (Domenico *et al.*, 2001d).

Recientemente se han reportado complejos de bismuto con ligandos naturales no tóxicos con especial interés en medicina. Los complejos de maltol- Bi^{+3} reportados por Sukhov y colaboradores, son un ejemplo (Sukhov *et al.*, 2008). De igual forma, se han obtenido nuevos complejos de Bi^{+3} asociados a fármacos para aumentar sus efectos bactericidas. Shaikh y su grupo de trabajo, reportaron la síntesis de siete complejos de fluoroquinolona- Bi^{+3} . Todos con inferiores CMIs que sus respectivas fluoroquinolonas libres. Además, dichos complejos fueron activos contra cepas resistentes a fluoroquinolona (Shaikh *et al.*, 2009b). Un año después, Andrews y colaboradores obtuvieron diez complejos de bismuto asociados a fármacos analgésicos no esteroideos (AINEs), los cuales además de conservar las propiedades analgésicas presentaron actividad antimicrobiana en cepas de *H. pylori* ($\geq 6.25 \mu\text{g/ml}$) (Andrews *et al.*, 2010).

4.2.3 Mecanismo de acción de los compuestos de bismuto

El mecanismo de acción del bismuto no es del todo claro. No obstante, un gran número de estudios han sugerido que la actividad se debe al bloqueo en la captación del ion hierro (Fe^{+3}), por inhibición competitiva del bismuto a sideróforos exógenos y transportadores asociados a la membrana. Una vez en la membrana o citoplasma, se une a centros Fe^{+3} (tioles) de enzimas redox ocasionando disminución de los niveles de energía (ATP) y muerte bacteriana (Sox y Olsen, 1989). En este sentido, la actividad del bismuto se ve aumentada cuando las concentraciones de Fe^{+3} son bajas y la producción de sideróforos y transportadores aumenta.

Estudios en *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* y otras bacterias Gram negativas encapsuladas han llevado a la conclusión de que el bismuto suprime la expresión de la cápsula bacteriana, exponiendo a las bacterias susceptibles a la respuesta inmune del hospedero (Wu *et al.*, 2002; Domenico *et al.*, 1991a, 1999b).

Probablemente en *H. pylori* se haya hecho más investigación para comprender el mecanismo por el cual el bismuto ejerce su actividad. Estudios recientes indicaron que su acción en esta bacteria, imita pero no es causada por la privación de Fe^{+3} (Bland *et al.*, 2004). En el 2008, Shujian Cun y colaboradores, demostraron que el bismuto interactúa con una chaperonina de membrana llamada HspA de la familia GroES (Shujian *et al.*, 2008). Esta chaperonina es esencial para la activación de la ureasa, la cual representa hasta el 10% total de las proteínas celulares, y es indispensable para la virulencia y colonización de *H. pylori* en el epitelio gástrico (Bauerfeind *et al.*, 1997). La ureasa cataliza la hidrólisis de urea en amoníaco y carbamatos, para neutralizar su entorno y crecer bajo condiciones ácidas (Scott *et al.*, 1998). Entre otras funciones, la chaperonina HspA se une reversiblemente ($K_d=1.1\mu\text{M}$) a níquel extracelular (Ni^{+2}), para proteger a la bacteria cuando existen altas concentraciones de este metal en el medio. Sin embargo, el bismuto se une a la HspA de forma irreversible ($K_d=5.9 \times 10^{-19} \mu\text{M}$) y altera la estructura cuaternaria de la proteína de heptamero a dímero (Figura 2), con lo cual, la chaperonina pierde su función y en consecuencia no se activa la vía de la ureasa (Shujian *et al.*, 2008).

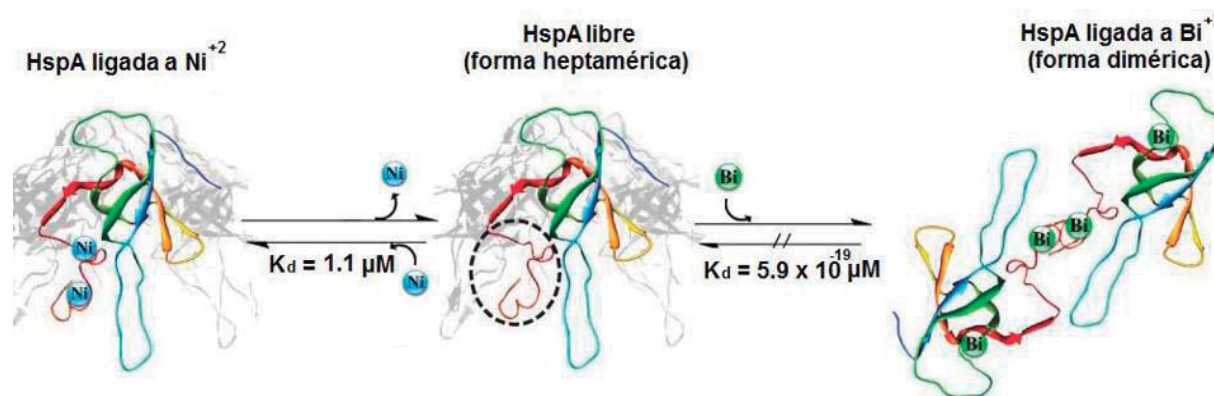


Figura 2. Acción del bismuto sobre la chaperonina HspA (presencia de bismuto y níquel). Las constantes de disociación (K_d) muestran que la unión del Ni^{+2} es reversible, mientras que la unión del bismuto afecta la estructura heptamérica a dimérica de manera irreversible.

4.3 Generalidades de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAs) representan una nueva alternativa para combatir el problema de la resistencia antibiótica. Su gran relevancia biológica y clínica se debe a dos de sus características generales: amplio rango de patógenos susceptibles y baja inducción de resistencias (Rivas y Andreu, 2003). Los PAs forman parte esencial de la respuesta inmune en todos los organismos. Actúan como primera línea de defensa contra una gran cantidad de microorganismos patógenos en plantas, insectos, anfibios, reptiles, mamíferos y aves. A pesar de sus orígenes diversos, la mayoría de los péptidos comparten ciertas características esenciales para su actividad, incluyendo peso molecular (PM) pequeño de ≤ 10 kDa, anfipaticidad, hidrofobicidad, ángulo polar y cationicidad (+2 a +9), aunque también se han descrito algunos péptidos aniónicos ricos en ácido aspártico (Asp) y glutámico (Glu). En total se han logrado identificar alrededor de 900 péptidos antimicrobianos en todo el espectro filogenético (Yount *et al.*, 2006).

Los primeros indicios de la existencia de PAs datan de más de 50 años, al observar que en plantas existían péptidos con actividad antimicrobiana, a las que llamaron tioninas. Años más tarde se demostró su actividad *in vitro* ante hongos y bacterias patógenas (Fernandez de Caleyá *et al.*, 1972). En ese tiempo se creyó que los PAs eran exclusivos

de un grupo muy limitado de especies pero hoy en día se han aislado de gran cantidad de organismos como peces, escorpiones, moluscos, crustáceos, semillas, plantas y de bacterias (bacteriocinas).

4.3.1 Clasificación de los PAs

No existe una forma absoluta para clasificar a los PAs aunque suelen ser agrupados de acuerdo a su tamaño (cantidad de aminoácidos o PM), fuente natural proveniente (Tabla 3), organización de sus fragmentos, estructuras terciarias que adoptan (Figura 3) y al número de puentes disulfuro intramoleculares. Sin embargo, la conformación de los PAs puede cambiar de acuerdo al medio en el que se encuentren. En soluciones acuosas, la mayoría presentan estructuras no organizadas, pero al contacto con ambientes que mimetizan la membrana, adoptan estructuras estables para su actividad antimicrobiana.

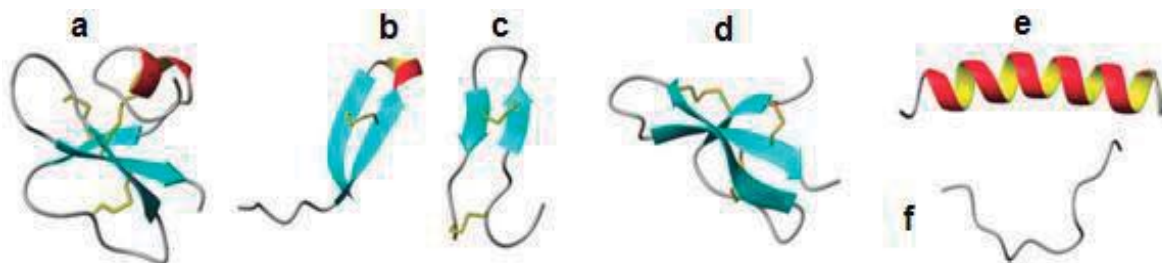


Figura 3. Clasificación de los PAs de acuerdo a su estructura. Estructura mezclada: β -defensina 2 humana (a); En cuña: Tanatina(b); De dos a cuatro β -plegadas: Polifemucina (c), defensina-1 de riñón de conejo (d); α -hélice: Magainina-2 (e); Extendida: Indolicidina (f). Los puentes disulfuro se indican en amarillo. Esta ilustración ha sido tomada de *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, 19:3, 491–511(492).

Tabla 3. PAs clasificados según su fuente de origen

Mamíferos		Insectos		Anfibios		Bacterias
Catelicidina	Histatina	Apidaecina	Drosocinas	Bombinina	Escuntina	Nisina
Criptidina	Kaliocina	Altacinas	Drosomicina	Brevinina	Gaegurina	Microcinas
Defensinas	Lactoferrina	Cecropinas	Pirrocorticina	Buforina II	Magainina	Galidermina
Granulisina	Protegrinas	Defensinas	Sarcotoxina	Caerueina	Temporina	Subtilina

Hasta ahora, la forma más aceptada los clasifica en cinco grupos de acuerdo a su naturaleza catiónica, aniónica, abundantes en algún aminoácido, fragmentos proteicos y con puentes disulfuro (Figura 4).

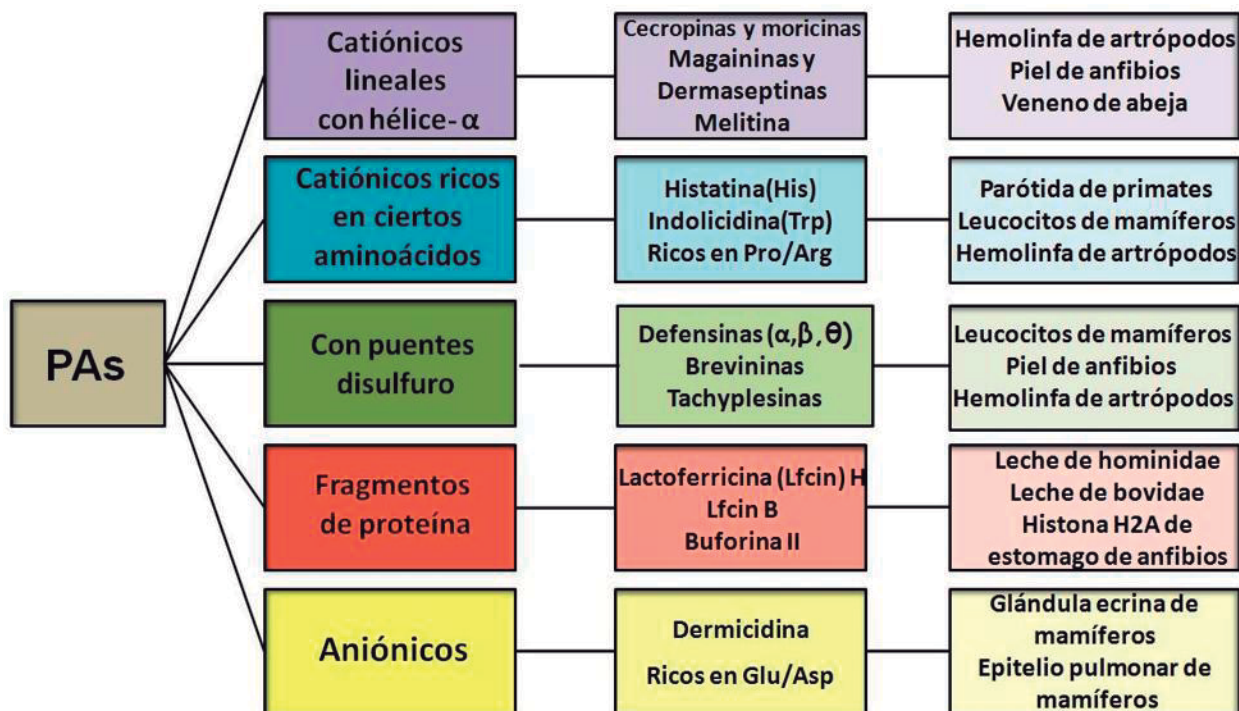


Figura 4. Clasificación general de los PAs según su composición, carga y estructura. Algunos ejemplos representativos con sus respectivas fuentes de origen.

4.3.2 Mecanismo de acción de los PAs

El principal mecanismo de acción de PAs catiónicos es la perturbación selectiva de las membranas microbiana que provoca salida de componentes intracelulares hasta producir la muerte bacteriana. Esta selectividad está dada por atracciones electrostáticas entre los PAs catiónicos y componentes electronegativos en las superficies microbianas, como lipopolisacáridos y lípidos aniónicos en Gram negativos; ácidos teicóico y teicurónico en Gram positivos; y fosfomananas en las superficies de hongos y levaduras. Entre los fosfolípidos electronegativos en las superficies bacterianas está el fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina. La cápsula y el glicocálix también poseen polisacáridos electronegativos tales como poliribitol fosfato y dextran sulfato que ayudan a la selectividad de los PAs hacia procariontes (Yeaman y Yount, 2003).

Se han propuesto cinco modelos para explicar cómo los PAs, luego de ser atraídos electrostáticamente, permeabilizan y dañan las membranas bacterianas. En cualquiera de los modelos, los péptidos primero interactúan con las cabezas cargadas de los fosfolípidos y después se translocan entre las monocapas de la membrana celular.

El **Modelo de Carpetas** sugiere que a medida que se satura la superficie, los PAs se acumulan en la superficie de la bicapa lipídica cubriendo la superficie de la membrana celular como una carpeta. En altas concentraciones interrumpen la continuidad de la membrana insertándose mediante sus regiones hidrofóbicas. Las regiones polares de los péptidos quedan expuestas al exterior, de modo que desintegran las membranas formando micelas de manera similar a los detergentes (Shai y Oren, 2001).

En el **Modelo de defectos frontera en la fase lipídica**, algunos péptidos β -plegados (principalmente ricos en Arg/Pro) se agregan en las superficies membranales formando dominios rígidos y gruesos, que al reordenarse, permiten la inserción de residuos de aminoácidos aromáticos, generando defectos en diferentes zonas de la membrana celular originando daño, permeabilidad celular y muerte celular (Castano *et al.*, 2008)

En el **Modelo de poro toroidal**, los PAs se orientan perpendicularmente a la membrana, se insertan e intercalan entre los fosfolípidos generando complejos supramoleculares en forma de canales transmembrana (Jenssen *et al.*, 2006).

En el 2006 se propuso el **Modelo de poro toroidal desordenado** (Leontadiou *et al.* 2006), en el cual los canales toroidales son formados por un sólo péptido que al insertarse en la membrana se estabilizan de manera difusa entre las monocapas lipídicas (Figura 5). A diferencia del modelo anterior, en éste, los péptidos que no forman el poro permanecen paralelos a la membrana cerca del borde.

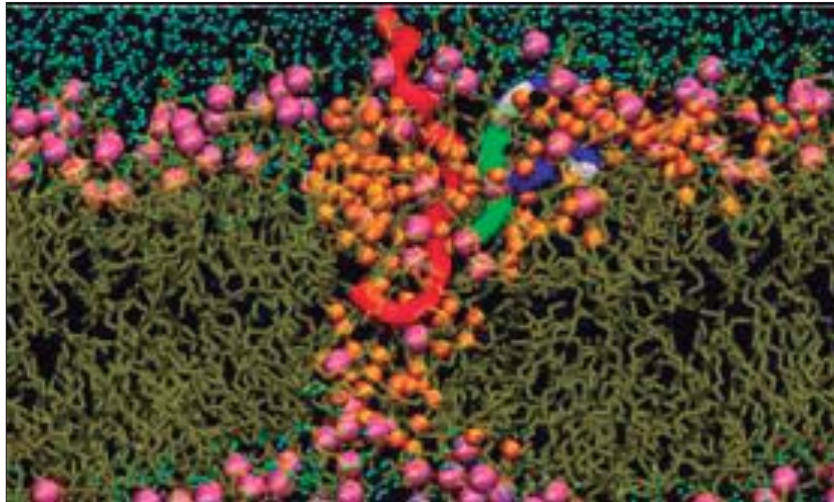


Figura 5. Mecanismo de acción de PAs. Modelo de poro toroidal desordenado (vista lateral).

Los fosfolípidos en morado (grupos fosfato) y café (ácidos grasos). Las moléculas de agua próximas al poro se muestran en anaranjado y en azul las del espacio extracelular. En rojo el péptido que forma el poro toroidal, con fracciones no polares (blanco), básicas (azul) y polares (verde). Tomada de Biophysical Journal, 2008, 95:1, 5748–5756 (5751).

En el **Modelo palo de barril**, los PAs forman canales en forma de barril perpendiculares al plano de la membrana, con las regiones hidrofóbicas de los péptidos orientadas hacia el núcleo lipídico y las regiones hidrofílicas hacia la luz del canal. Se forma así, un poro

transmembrana muy similar a un barril sin fondo cuyas paredes son los PAs (Shai, 1999)

Algunos PAs no actúan directamente sobre las membranas celulares bacterianas. Una vez atraídos por fuerzas electrostáticas, se translocan al citoplasma y bloquean funciones vitales para la célula, como: replicación del ADN, transcripción, traducción, plegamiento de proteínas asistido por chaperonas, síntesis de la pared celular y muchos procesos enzimáticos del ciclo celular. Poco se sabe del mecanismo bactericida de PAs aniónicos, pero se cree que está relacionado con funciones del Zinc (Fales *et al.*, 2002).

4.3.3 Resistencia bacteriana a los PAs

La inducción de resistencias de los PAs son raras, aun así, los microorganismos han desarrollado varias medidas preventivas extracelulares e intracelulares para evadir sus efectos (Yount *et al.*, 2006).

4.3.3.1 Mecanismos de resistencia extracelular

1) **Proteólisis.** La elaboración y liberación de enzimas proteolíticas proporciona resistencia ante un gran número de PAs. Por ejemplo, la endopeptidasa de membrana PgtE en enterobacterias, confiere resistencia ante algunos PAs principalmente aquellos de estructura hélice- α (Guina *et al.*, 2000). En *E. coli*, la proteasa de serina DegP, confiere una reducida susceptibilidad a la lactoferricina B y a otros PAs (Ulvatne *et al.*, 2002). Otros patógenos secretan proteasas que inactivan principalmente catelicidinas y defensinas (Schmidtchen *et al.*, 2002).

2) **Síntesis de cápsula.** La presencia de cápsula bacteriana es un medio eficaz que han desarrollado muchas bacterias para evadir la acción de los PAs. La cápsula limita la inserción de los PAs a la membrana celular e impide su acceso a blancos

intracelulares. Por ejemplo, el ácido algínico (exopolisacarido aniónico) en la cápsula de patógenos de vías respiratorias, interfiere con la eficacia de algunos PAs (Friedrich *et al.*, 1999).

3) **Pared celular.** La ausencia o modificación de ciertos componentes en la pared celular está relacionada con la resistencia que adquieren algunas bacterias ante los PAs. Por ejemplo, la modificación de ciertos lípidos en las membranas de Gram negativos, aumenta la carga catiónica, por lo que, se reduce la afinidad de los PAs hacia ellas (Gunn *et al.*, 1998).

4) **Membrana plasmática.** Son relativamente pocos los mecanismos de resistencia relacionados con alteraciones en la carga de la membrana plasmática. Sin embargo se han reportado, patógenos que disminuyen los niveles de fosfolípidos aniónicos y aumentan componentes catiónicos (ornitina-amida) para resistir a los PAs. En *S. aureus* ésta resistencia se vincula a una modificación de fosfatidilglicerol a lisil-fosfatidilglicerol.

4.3.3.2 Mecanismos de resistencia intracelular

Este tipo de resistencia es adquirida por alguna mutación en los blancos de acción intracelular o por la presencia de sistemas de eflujo dependientes de energía (Bengoechea y Skurnik 2000; Andrade *et al.*, 2000; Shafer *et al.*, 1998). Por ejemplo, la mutación en la ADN girasa de *E. coli* (reemplazo de Trp → Arg) confiere una resistencia considerable a la microcina B17 (Castillo y Moreno, 2001).

4.4 Metaloantibióticos de dipéptidos

El número de reportes de complejos *L*- α -dipéptido-metal con actividad antimicrobiana son pocos en comparación a los complejos de *L*- α -aminoácidos (Braicu *et al.*, 2006; Chohan *et al.*, 2006, Iqbal, 1990) y *L*- α -péptidos (Papakyriakou *et al.*, 2003; Epperson y Ming, 2000). Sólo un complejo de dipéptido-metal, el zinc-*L*-carnosina (β -Ala-*L*-His•Zn⁺²

de nombre genérico Polaprezinc, se encuentran en uso comercial (Matsukura y Tanaka, 2000). Una razón, puede ser la falta de procedimientos económicos y/o eficaces para la obtención de dipéptidos.

Sin embargo, la gran demanda de nuevos agentes antibacterianos ha permitido que la investigación de metaloantibióticos dipéptidicos continúe. De esta forma, se han logrado sintetizar metaloantibióticos de dipéptidos como los complejos de *L*- α -dipéptido-Sn⁺⁴ reportados por Nath y colaboradores, con ligandos de Ala-Fen, Fen-Leu, Gli-Leu, Fen-Fen y Gli-Ile. Todos solubles en DMSO y activos frente bacterias y hongos con CMI de 6.5 hasta 50 μ g/ml (Nath *et al.*, 1999).

Por otro lado, varios estudios de complejos metálicos de aminoácidos, dipéptidos y péptidos se han reportado con la finalidad de explicar la bioactividad de algunos metales en los sistemas biológicos.

En 1992 se analizó la formación de algunos complejos de DL- α -aminoácido-Bi⁺³ en solución (*L*-Cis•Bi⁺³, *DL*-homocisteína•Bi⁺³ y *D*-Met•Bi⁺³) y de glutanion-Bi⁺³ utilizando BiCl₃, subsalicilato de bismuto o Bi(NO₃)₃, a fin de explicar la participación de pequeñas biomoléculas en el destino final de este metal en agentes farmacéuticos. En la siguiente figura, se muestran las estructuras propuestas para estos complejos, para *L*-cisteína•Bi⁺³ los autores proponen dos estructura y para *DL*-homocisteína•Bi⁺³ tres (Burford *et al.*, 2003), en donde el bismuto interactúa con el carboxilato, el nitrógeno amida y el grupo tiolato (Figura 6).

Recientemente, en el 2008 se reportó la síntesis del primer complejo dipéptido-Bi⁺³ de Gli-*L*- α -Gln caracterizado por IR y análisis térmicos (Luan *et al.*, 2008). No obstante, a pesar del papel del bismuto en la medicina (ver sección 4.2.1), hasta la fecha no hay reportes que valoren su actividad antimicrobiana.

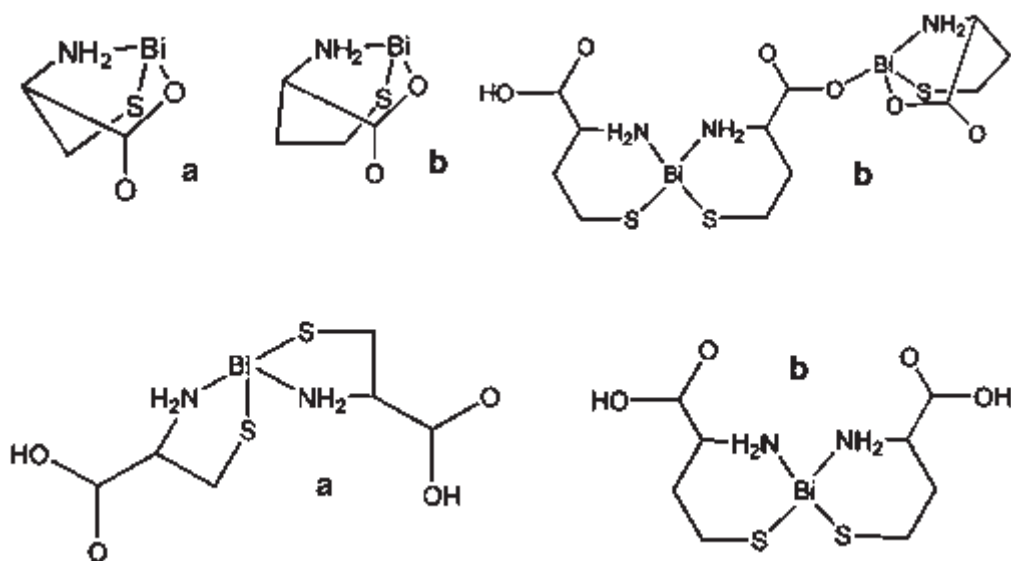


Figura 6. Estructuras propuestas para el complejo complejo L -cisteína• Bi^{+3} (a) y DL -homocisteína• Bi^{+3} (b) (Burford *et al.*, 2002).

En base a lo mencionado, resulta evidente el auge que siguen teniendo los complejos de bismuto, y la necesidad de buscar nuevas alternativas para combatir el problema de la resistencia antibiótica. Es por ello, que en el presente trabajo se se sintetizó una serie de dipéptidos y sus contrapartes acomplejadas con bismuto, para valorar su actividad antibacteriana frente a cepas de interés clínico de *E. coli* y *S. aureus* por método estandarizado de difusión en disco descrito por el NCCLS, como primera etapa de búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de tipo peptídico acoplados a bismuto.

5. HIPÓTESIS

Los *L*- α -dipéptidos poseen la funcionalidad necesaria para reconocer al bismuto y formar complejos dipéptido-Bi⁺³ con actividad antibacteriana.

6. OBJETIVO GENERAL

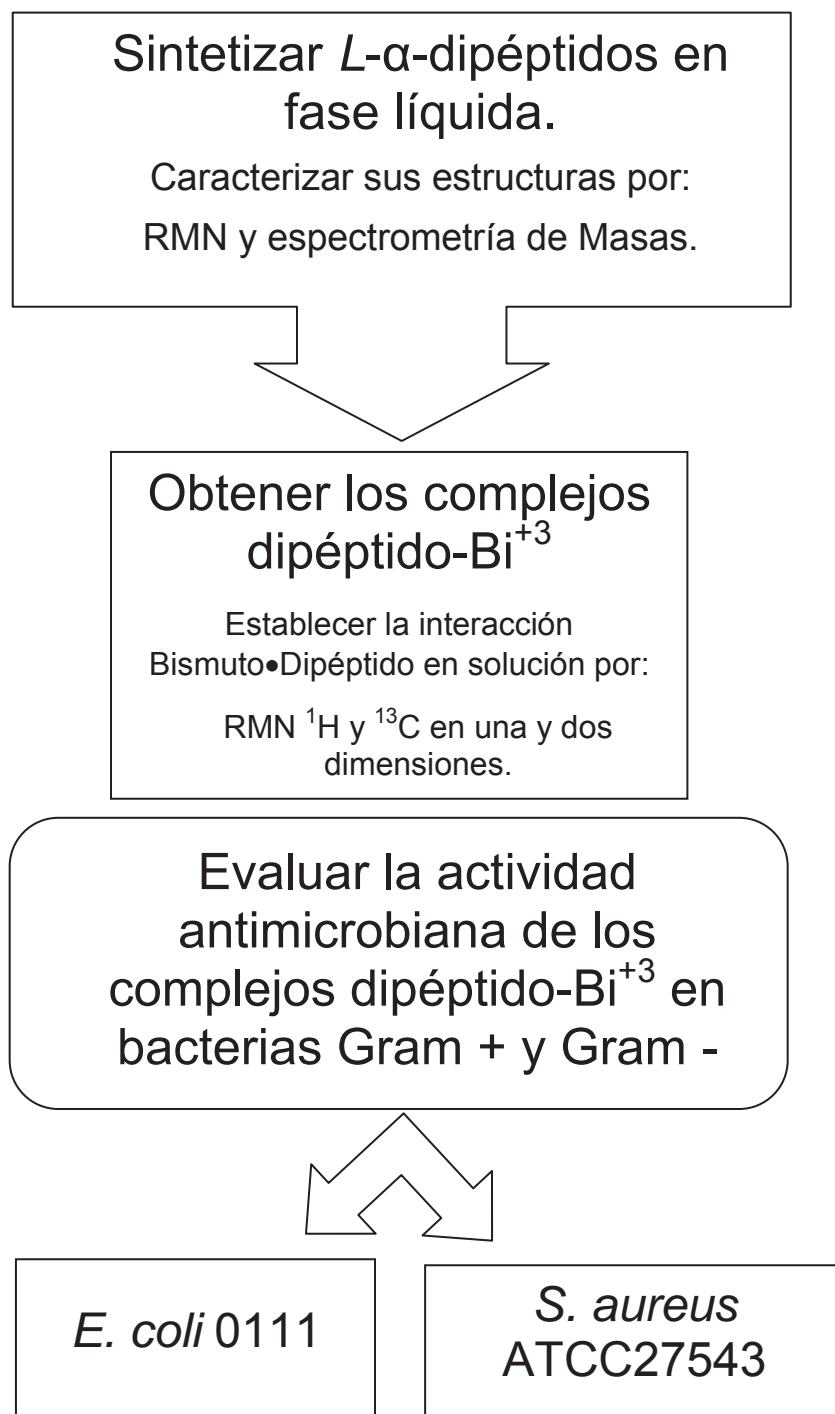
Sintetizar y caracterizar una serie de *L*- α -dipéptidos y sus respectivos complejos con bismuto, así como evaluar su actividad antimicrobiana frente a cepas de interés clínico.

6.1 Objetivos particulares

- I. Sintetizar los *L*- α -dipéptidos y sus correspondientes complejos dipéptido-Bi⁺³.
- II. Establecer y analizar la interacción del bismuto en los complejos por RMN e IR.
- III. Realizar los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de los complejos dipéptido-Bi⁺³ en cepas de interés clínico.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Diagrama general de la estrategia experimental.



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Aminoácidos

Los aminoácidos glicina (Gli) **1**, alanina (Ala) **2**, fenilalanina (Fen) **3**, tirosina (Tir) **4**, prolina (Pro) **5** y triptófano (Trp) **6** (Figura 7), fueron adquiridos en los laboratorios Sigma-Aldrich, todos pertenecen a la configuración *L-α* y se seleccionaron por su importancia y/o abundancia relativa en los PAs presentes en la base de datos: <http://aps.unmc.edu/AP/main.html>; www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm. Los aminoácidos arginina, lisina y cisteína también son comunes en los PAs; sin embargo, no se consideraron para la síntesis de los dipéptidos por la dificultad y tediosa purificación que representan. Dada la oxofilia del bismuto, se eligieron aminoácidos pequeños de alanina y glicina para el C-terminal y fenilalanina como comparativo.

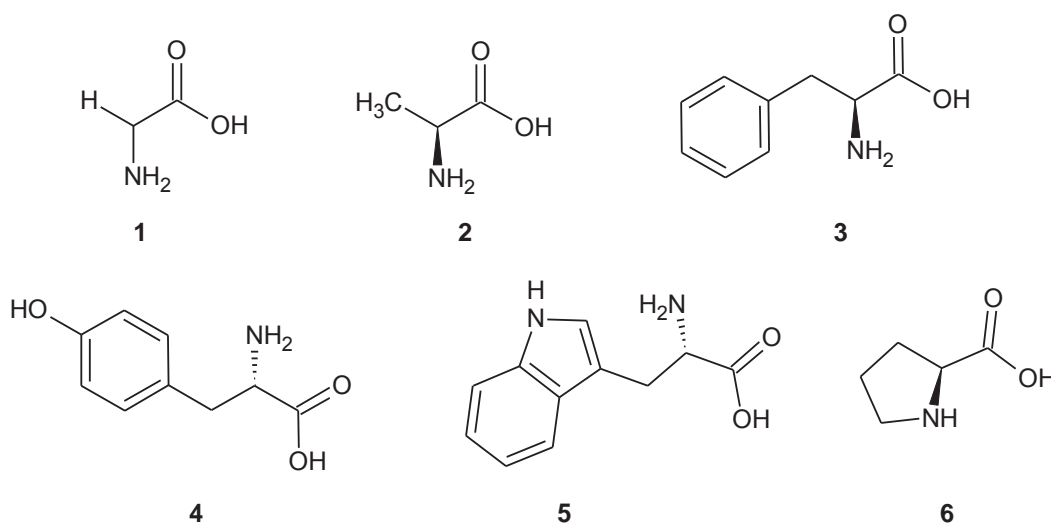


Figura 7. Aminoácidos seleccionados para la síntesis de los complejos dipéptido-Bi⁺³.

8.2 Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron: *Escherichia coli* 0111 productora de verotóxina con importancia clínica en el hombre desde el 1994 y la ATCC27543 de *Staphylococcus aureus* proviene de un caso de mastitis bovina clínica.

8.3 Síntesis de *L*- α -dipéptidos

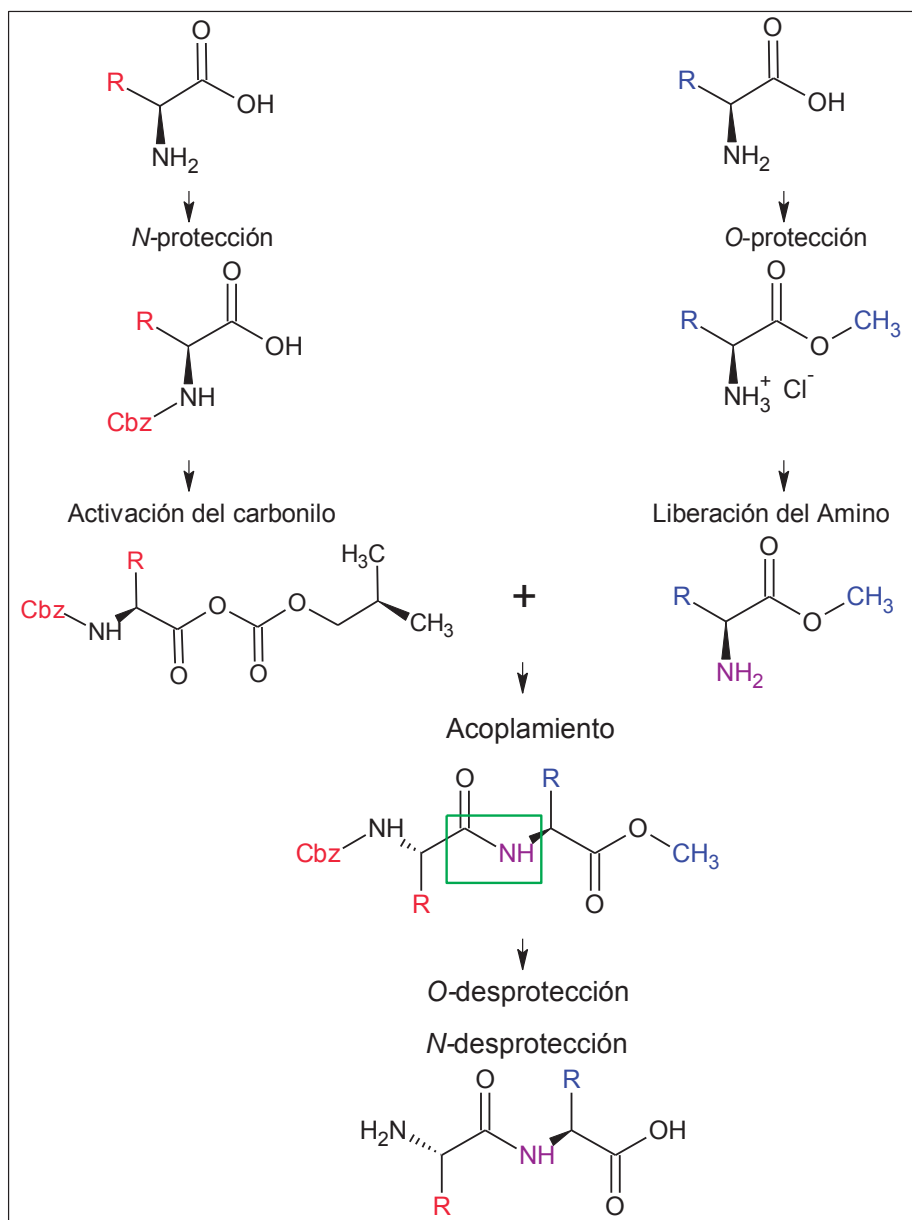
Durante la síntesis química de péptidos conviene proteger los grupos funcionales que no participaran en la formación del enlace peptídico. Todos los grupos protectores tanto del α -amino, α -carboxilo y de cadenas laterales, deben ser químicamente estables durante la formación del enlace peptídico y fácilmente removibles para no afectar el enlace recién formado. La forma más estable de proteger el α -amino y α -carboxilo es formando carbamatos y ésteres, respectivamente. El acoplamiento peptídico es iniciado con la activación del grupo carboxilo, seguida del ataque nucleofílico de un segundo aminoácido al carboxilo recién activado. Así se tendrá un dipéptido diprotegido que según los requerimientos, si se desea agregar otro aminoácido se deberá desproteger en el amino o carboxilo según las necesidades.

8.3.1 Generalidades de la síntesis peptídica

Todo el material de laboratorio utilizado se lavó, enjuagó con acetona y se secó en una estufa antes de ser usado. Los solventes utilizados (*n*-hexano), acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (CH₂Cl₂), acetona, metanol (MeOH) y tetrahidrofurano (THF) se purificaron, secaron y almacenaron con nitrógeno. El curso de las reacciones se siguió en cromatografía en capa fina utilizando diferentes mezclas de *n*-hexano:AcOEt y CH₂Cl₂:MeOH, y como reveladores radiación ultravioleta y yodo. La purificación de cada intermediario, se realizó por recristalización y por cromatografía en columna. Empleando como fase estacionaria sílica gel (70-230 Mesh), y como fase móvil distintas mezclas de disolventes. Los productos purificados se analizaron por espectrometría de masas y RMN-¹H y ¹³C en 200 MHz y 400 MHz en equipos Varian y Mercury, utilizando disolventes deuterados como cloroformo (CDCl₃), dimetil sulfóxido (DMSO-d₆), acetona y metanol (CD₃OD). Los archivos FIDs (caída libre de la inducción = Free Induction Decay) se procesaron en el programa MestReNova versión 6.0.2-5475.

8.3.2 Vía sintética

La vía sintética propuesta para la obtención de los dipéptidos, se muestra en el siguiente esquema.



Esquema 1. Vía sintética para la obtención de dipéptidos. En rojo y azul se indican los grupos protectores del α -amino (Cbz) y α -carboxilo (OMe). La formación del enlace peptídico (verde) es precedida por la activación del carboxilo y ataque nucleofílico del amino (morado). Por último, la O- y N- desprotección liberan el dipéptido.

8.3.3 Reacciones de N-protección

En un matraz provisto de agitación se colocó el aminoácido con 40 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 1 N por gramo de aminoácido, se le adicionó 1.12 equivalentes químicos (eq) de cloroformiato de bencilo (CbzCl) en baño de hielo a 0°C, manteniendo un pH de diez y se dejó reaccionar durante toda la noche con agitación vigorosa. La mezcla de reacción resultante, se lavó con CH₂Cl₂. La fase acuosa se acidificó con ácido clorhídrico (HCl) 1N hasta pH de cuatro, y en seguida, se hizo una extracción del compuesto con AcOEt. El AcOEt resultante, se secó con sulfato de sodio (Na₂SO₄) y se llevó al rotavapor. El monitoreo de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina con una mezcla de 7:3, *n*-hexano:AcOEt.

8.3.4 Reacciones de O-protección

En un matraz balón provisto de agitación y en baño de hielo, se colocó 25 ml de MeOH por gramo de aminoácido, se suspendió el aminoácido y se llevó a agitación por 15 min. A la solución se le añadió gota a gota 2 eq de cloruro de tionilo (SOCl₂) como catalizador y se dejó reaccionar toda la noche. A la mezcla de reacción resultante se le agregó CH₂Cl₂ y se llevó a un rotavapor sin vacío y con trampa de NaOH para neutralizar los gases producidos (HCl y SO₂). Se repitió esta operación hasta la obtención de cristales blancos. El monitoreo de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina con una mezcla de fase 9:1 de CH₂Cl₂:MeOH.

8.3.5 Reacciones de acoplamiento

Primeramente se realizó la liberación del grupo amino en el clorhidrato amino éster. Para ello, en un matraz balón provisto de agitación, se colocó 1.1 eq del aminoácido, se suspendió en THF a fin de tener una solución 0.2 M, se agregó 2.5 eq de TEA y se dejó en agitación por 3 h.

En un segundo matraz, se colocó 1 eq del aminoácido *N*-protegido en un matraz balón, se disolvió en la cantidad necesaria de THF para tener una solución 0.2M y se le agregó 1.1 eq de trietilamina (TEA). Se llevó a baño de hielo y en agitación. Se le agregó en frío y lentamente, una solución 0.2M de THF con 1.05 eq cloroforniato de isobutilo (*i*-BBOCl) y se dejó en agitación por 20 min en baño de hielo. Una vez transcurrido los 20 min, se le agregó gota a gota y por embudo de adición la *O*-protección con el grupo amino liberado. La reacción se dejó en hielo 1 h y en agitación toda la noche. Se eliminó las sales por filtración y se concentró en un rotavapor. El concentrado se resuspendió en AcOEt, se lavó tres veces con agua. La fase orgánica resultante, se secó con Na₂SO₄ y por último se concentró en un rotavapor. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando la diferentes mezclas de *n*-hexano:AcOEt.

8.3.6 Reacciones de *O*-desprotección

En un matraz provisto de agitación magnética se colocó 1 eq del dipéptido diprottegido y disolvió en una mezcla de THF:H₂O:MeOH en proporción 25:3:0.1 (10 ml/g de dipéptido). Posteriormente se adicionó 3 eq de hidróxido de litio (LiOH) en solución acuosa 2 M y se dejó reaccionar durante 3 h. El crudo de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se suspendió en la mínima cantidad de agua, se lavó con CH₂Cl₂ para eliminar restos de materia prima y se acidificó a pH de tres con HCl 1 N. Inmediatamente después se extrajo el producto con AcOEt. El cual se secó con Na₂SO₄ antes de concentrar en un rotavapor. El monitoreo de la reacción se realizó por cromatografía en capa fina en una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH:CH₃COOH en proporción 9:0.9:0.1.

8.3.7 Reacciones de *N*-desprotección

Para la hidrogenólisis se colocó el dipéptido *N*-protegido en un matraz provisto de agitación. Se le agregó paladio sobre carbono (Pd/C) en un 10% del peso del dipéptido con la mínima cantidad de MeOH. Se dejó reaccionar por 3 h en atmósfera de H₂. Luego de concluido el tiempo de reacción, se filtró con MeOH y eliminó el disolvente en un rotavapor. Finalmente se obtuvieron los cristales de los dipéptidos desprotegidos.

8.3.8 Reacciones de desprotección asistida por microondas.

En un matraz balón provisto de agitación se coloca la cantidad de dipéptido en una mezcla de disolventes THF:H₂O:MeOH en proporción 25:3:0.1 (10 ml/g de dipéptido) con 3 eq de LiOH en solución acuosa 2 M, a 100 Watts, 80°C y agitación vigorosa durante 12 min de reacción. A la mezcla resultante, se le eliminó el solvente en un rotavapor y se suspendió el sólido en la mínima cantidad de agua, se acidificó con HCl 1 N a pH de tres y se extrajo con AcOEt y concentró nuevamente en un rotavapor.

8.4 Análisis y formación de complejos dipéptido-Bi³⁺

En un pequeño vial se colocó 2.5 mg del dipéptido y la cantidad correspondiente a 1 eq de nitrato de bismuto pentahidratado (Bi(NO₃)₃), se agregó 100µl de DMSOd₆ y fue llevado a 50°C en baño maría y agitación durante 15 min. La solución resultante fue analizada por IR y RMN-¹H y ¹³C en una y dos dimensiones. Los análisis no se hicieron por triplicado. Como control negativo se obtuvieron las respectivas sales de nitrato de los dipéptidos al hacer reaccionar cada uno con ácido nítrico (HNO₃), los productos de igual forma fueron analizados por RMN.

8.5 Estudios de susceptibilidad antimicrobiana

8.5.1 Pruebas de dilución en tubo

Para determinar la CMI se realizaron pruebas de sensibilidad por dilución en tubo de acuerdo al NCCLS. Se reactivaron las cepas para la preparación del inóculo por el método de suspensión directa de colonias en caldo MH ajustando la turbidez a 0.2 DO 600 nm (aprox. 1 a 2×10^8 UCF/ml), usando como blanco el mismo caldo MH. Se preparó una batería de 10 tubos con 1 ml de medio de cultivo a los que se le agregó diluciones decrecientes del compuesto microdiluido en DMSO, para tener finalmente una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ en el primer tubo y en el último 0.97 $\mu\text{g/ml}$. A cada tubo se le agregó 1 ml del inóculo preparado y se llevó a incubar a 35°C en agitación durante 16 h. La CIM se consideró como la concentración más baja del compuesto que inhibió completamente el crecimiento del microorganismo.

8.5.2 Pruebas de difusión en disco

Los ensayos de difusión en disco se realizaron de acuerdo a lo establecido por el NCCLS en agar Muller Hinton (MH). El inóculo se preparó por el método de suspensión directa de colonias en caldo MH ajustando la turbidez a 0.2 DO 600 nm (aprox. 1 a 2×10^8 UCF/ml), usando como blanco el mismo caldo MH. En cada placa petri se descargó 200 μl del inóculo preparado y se expandió con varilla de vidrio. Antes de aplicar los sensidiscos, se dejaron las placas entreabiertas por 3 min para disminuir la humedad. Los discos se hicieron con papel filtro Whatman® y perforadora previamente esterilizada. En cada disco se agregó 6.4×10^{-7} mol que corresponde a agregar 500 μg a 400 μg de complejo dipéptido-Bi⁺³ (1:1). Esta cantidad se colocó con 5 μl de una solución apropiada de DMSO. En cada caja se colocaron máximo 5 sensidiscos. Se utilizó DMSO, Bi(NO₃)₃ y los dipéptidos libres como controles negativos, y ciprofloxacino como positivo. Después de 16 h de incubación a 37°C, cada placa se examinó y se midieron los halos de inhibición con vernier manual pasando por el centro del disco (6 mm).

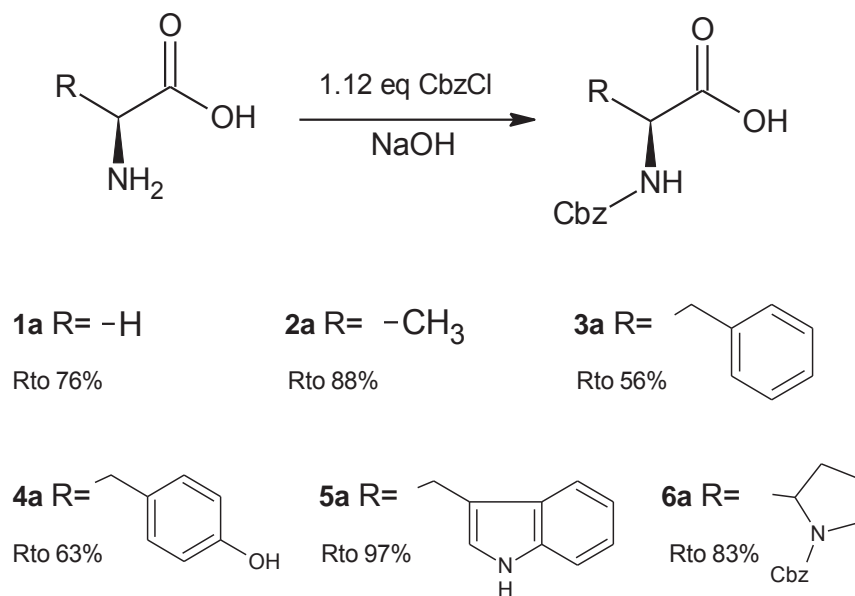
8.6 Análisis estadístico

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de cada complejo se realizaron 3 veces por triplicado. Los resultados se analizaron mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey Karmer, para un diseño balanceado (mismo número de repeticiones) en el programa JMP versión 6.0.0. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

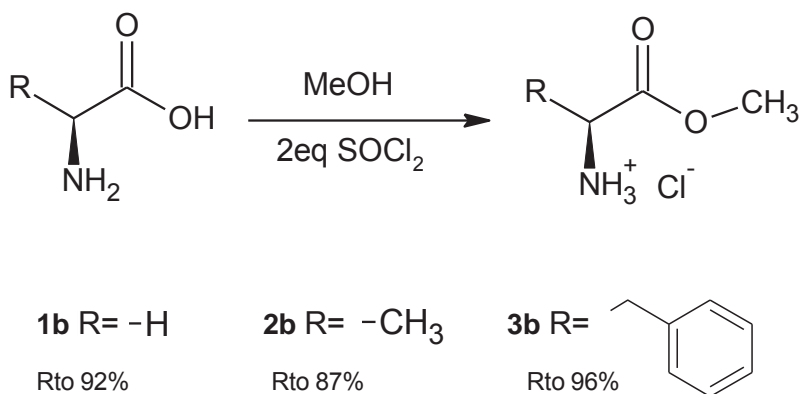
9.1 Síntesis peptídica. Obtención de *L*- α -dipéptidos

Las reacciones de *N*-protección se llevaron a cabo utilizando CbzCl en medio alcalino (NaOH 1N) para obtener los carbamatos correspondientes (Esquema 2). Este grupo protector se eligió debido a que tanto la protección como la eliminación del mismo se realizan en condiciones suaves de reacción. Como se aprecia, los rendimientos fueron superiores al 75 % para **1a**, **2a**, **5a** y **6a**, y del 56% y 63% para **3a** y **4a**, respectivamente, debido principalmente a la dificultad de purificación.



Esquema 2. Síntesis de los aminoácidos *N*-protegidos **1a**-**6a**.

Por su parte, las protecciones en el carboxilo **1b-3b** para obtener los amino ésteres metílicos (Esquema 3), utilizando MeOH y SOCl₂ a temperatura ambiente, fueron más limpias con rendimientos del 87% hasta 96%.



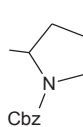
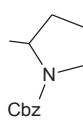
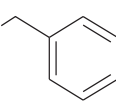
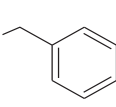
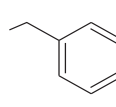
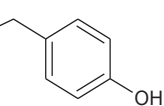
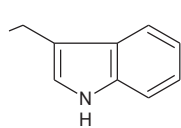
Esquema 3. Síntesis de los aminoácidos O-protegidos **1b-3b**.

Una vez protegidos los aminoácidos, el siguiente paso fue la obtención de los dipéptidos diprottegidos **7-16** de acuerdo con la tabla 4. La reacción se llevó a cabo en medio básico de TEA en THF empleando *i*-BBrCl como agente activante.

La purificación de todos los productos resultantes se realizó por cromatografía en columna y posterior recristalización, a excepción del **16**, que sólo se purificó por recristalización. Al parecer el carácter hidrofóbico del indol facilitó su purificación por recristalización con mezclas de AcOEt:*n*-hexano, con rendimientos de hasta 96%. Esto mismo se observó durante la purificación del intermediario *N*-protegido **5a** (Rto del 97%).

Tabla 4. Obtención de los dipéptidos diprottegidos 7-16 y rendimientos.

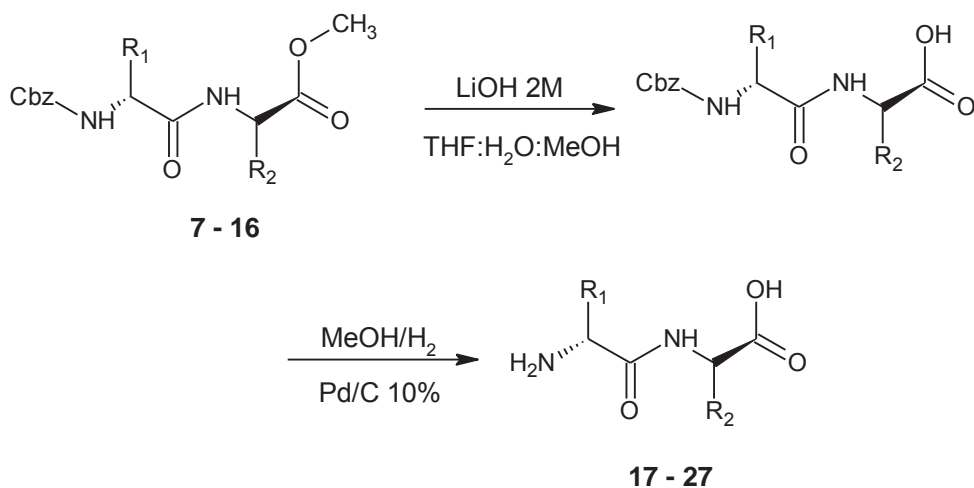
7 - 16

Compuesto	R ₁	R ₂	Rto%
7	-H	-H	84
8	-H	-CH ₃	74
9	-CH ₃	-H	89
10		-H	63
11		-CH ₃	52
12		-H	68
13		-CH ₃	56
14	-CH ₃		89
15		-H	61
16		-H	96

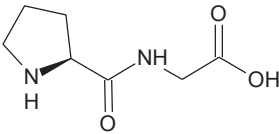
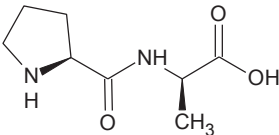
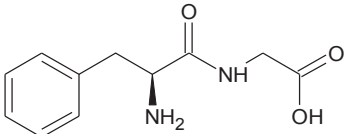
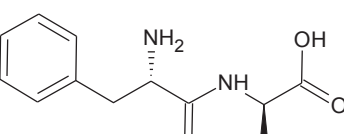
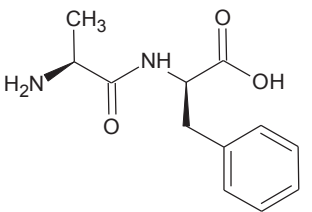
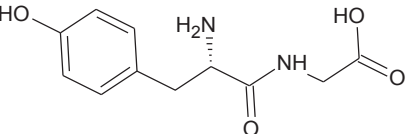
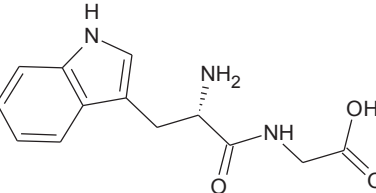
Por último los compuestos **7-16**, se sometieron a una hidrólisis alcalina con LiOH en una mezcla de THF:H₂O:MeOH y posteriormente a una hidrogenólisis catalítica con

Pd/C al 10% en MeOH, para eliminar el grupo protector Cbz y así obtener los diez dipéptidos libres **17-26** (Tabla 5).

Tabla 5. O- y N-desprotección para la obtención de los dipéptidos libres 17-26 y rendimientos.



Compuesto	Dipéptido libre	Rto %
17		46
18		50
19		68

20	 <chem>C[C@@H](C(=O)NCC(=O)O)C(=O)N1CCCC1</chem>	50
21	 <chem>C[C@H](C(=O)NCC(=O)O)[C@@H](C)C(=O)N1CCCC1</chem>	63
22	 <chem>C[C@@H](C(=O)NCC(=O)O)[C@@H](N)Cc1ccccc1</chem>	52
23	 <chem>C[C@H](C(=O)NCC(=O)O)[C@@H](N)Cc1ccccc1</chem>	64
24	 <chem>C[C@@H](C(=O)NCC(=O)O)[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)N[C@@H](C)N</chem>	68
25	 <chem>C[C@@H](C(=O)NCC(=O)O)[C@@H](N)Cc1ccc(O)cc1</chem>	54
26	 <chem>C[C@@H](C(=O)NCC(=O)O)[C@@H](N)Cc1c[nH]c2ccccc12</chem>	70

Cabe destacar, que a medida que se fueron desprotegiendo los dipéptidos, su polaridad aumentó drásticamente, dicho aumento redujo la solubilidad en los disolventes convencionales durante la extracción y purificación, por lo que los rendimientos fueron relativamente bajos.

Siguiendo con la ruta sintética se propuso realizar la reacción de O-desprotección de los dipéptidos **7-16**, mediante el uso de radiación de microondas para optimizar y disminuir el tiempo de reacción. La hidrólisis se llevó a cabo en medio alcalino y en condiciones suaves, utilizando una solución acuosa saturada de LiOH 2 M, para evitar la racemización por exceso de H₂O. Los resultados monitoreando cada 4 seg en cromatografía en capa fina, indicaron que la reacción concluye a los 12 min, tiempo en el cual no se observó restos de materia prima (Figura 8).

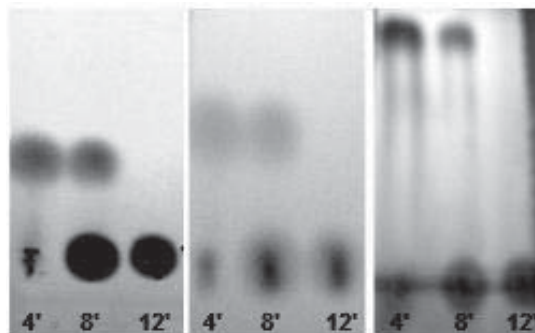


Figura 8. Cromatografía en capa fina de la hidrólisis básica en microondas del dipéptido diprotectidos en AcOEt. El 1er. punto (4 min de reacción), solo se observa la materia prima. A los 8 min aparece una mancha del producto en el punto de aplicación por su alta polaridad. A los 12 min termina la reacción al no observarse la materia prima.

Hasta este punto se pensó que se habían obtenido los dipéptidos monoprotectidos con el grupo Carbobenciloxi (Cbz, Z). Sin embargo, al analizar los espectros de RMN de los productos resultantes, se observaron diferencias entre los dipéptidos. En aquellos con glicina en el C-terminal no se observaron las señales de ninguno de los grupos protectores, indicando la desprotección completa de los dipéptidos. En cambio, en los

dipéptidos diprottegidos con alanina y fenilalanina, eliminaron sólo el grupo metoxilo (OMe) y conservaron el grupo Cbz. Los espectros de RMN-¹H de los productos de desprotección completa del Cbz-Fen-Gli-OMe **12** y la desprotección parcial de su contraparte Cbz-Fen-Ala-OMe **13** se muestran en la siguiente figura.

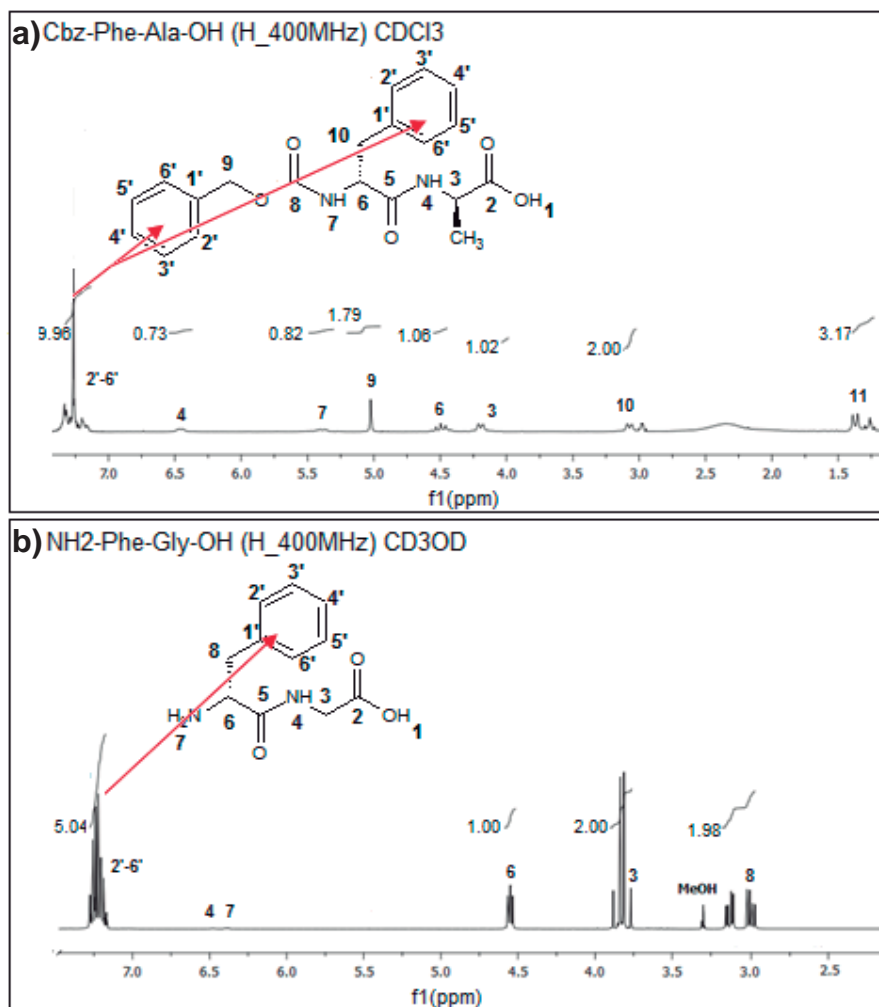


Figura 9. Espectros de RMN-¹H de la desprotección asistida por microondas. Cbz-Fen-Ala-OMe **13** (a) y Cbz-Fen-Gli-OMe **12** (b).

En **13** se mantuvo la señal (H-9) que integra para dos protones correspondientes al metileno del Cbz en 5.5 ppm y en la región de los aromáticos (7 a 7.5 ppm) la integral fue para diez protones, cinco protones de la fenilalanina y cinco del grupo Cbz,

indicando que sólo se *O*-desprotegió. En cambio, en **12** no se observó la señal en 5.5 ppm y la integral en la región de los aromáticos fue para cinco protones del fenilo de la fenilalanina. Los espectros de RMN-¹³C coincidieron con los resultados de RMN-¹H (Figura 10). En **13** se observaron señales propias del grupo Cbz, como la señal CH₂ (C-9), un mayor número de carbonos en la región de los aromáticos (120-130 ppm) y el C=O (C-8). A diferencia de **12**, en donde no se observó ninguna de estas señales, indicando así la desprotección completa del dipéptido.

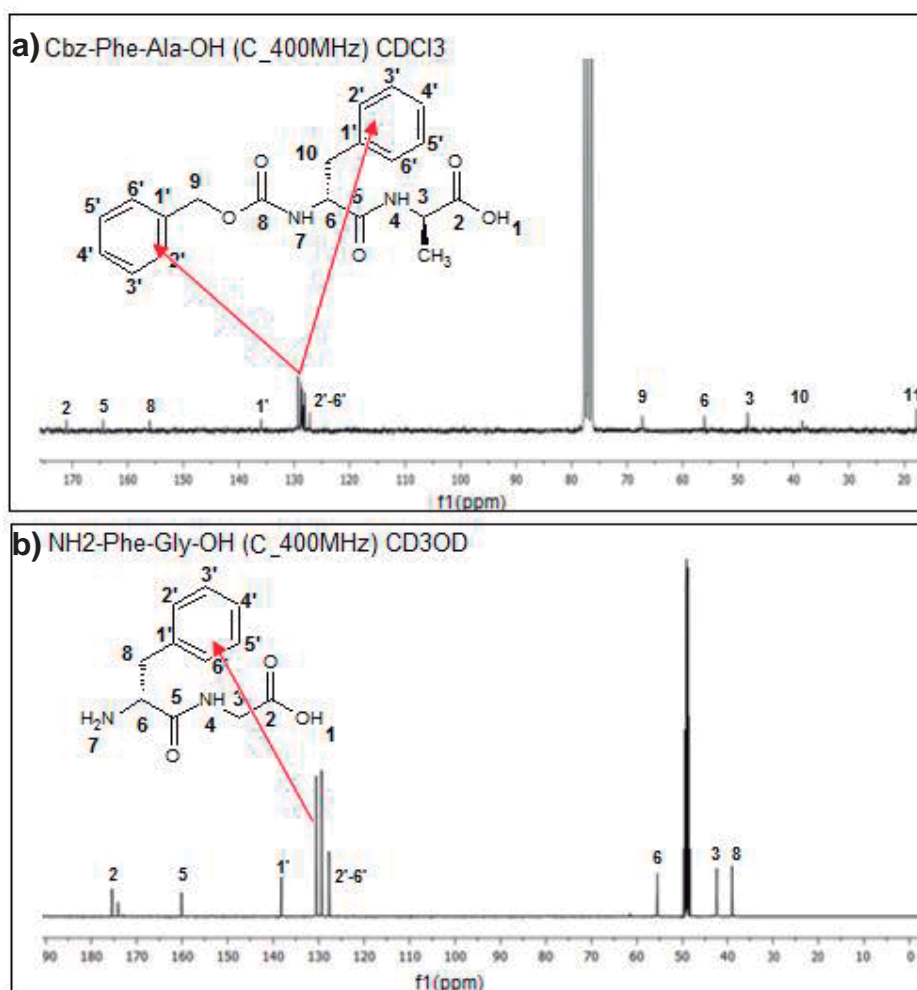


Figura 10. Espectros de RMN-¹³C de la desprotección asistida por microondas. Cbz-Fen-Ala-OMe **13** (a) y Cbz-Fen-Gli-OMe **12** (b)

Resulta interesante que ocurra la desprotección de ambos grupos en un sólo paso, lo cual hasta nuestro conocimiento no ha sido descrito en la literatura especializada. Esta reacción de desprotección completa, en un tiempo reducido y en condiciones suaves de reacción, parece estar determinada por el grupo glicil en C-terminal en los dipéptidos pues no se dió en los otros casos, aunque resulta recomendable realizar un estudio más extenso al respecto.

9.2 Síntesis y análisis de complejos dipéptido-Bi⁺³

Una vez sintetizado los dipéptidos libres se procedió con la obtención de sus correspondientes complejos dipéptido-Bi⁺³. Se obtuvieron en solución al hacer reaccionar el dipéptido libre con nitrato de bismuto (BiNO₃)₃ en condiciones neutras de reacción utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente. Para determinar el sitio de interacción del metal en los dipéptidos, los complejos se analizaron por RMN en una y dos dimensiones y se compararon con los respectivos ligandos libres. Se espera que en presencia de Bi⁺³ se observen cambios en las señales propias de los dipéptidos, como el ensanchamiento de señales, cambio en la multiplicidad y en los desplazamientos químicos de los protones que interactúen con el metal. Cabe mencionar que la interacción del metal puede ser mediante reconocimiento por fuerzas intermoleculares débiles y esto lleve a un proceso reversible, mismo que puede estar desplazado hacia reactivos más que hacia productos, lo cual resulta improductivo para los fines de este trabajo pues no sería factible utilizar los complejos como posibles agentes antibacterianos. Si por el contrario, la formación del complejo es estable, este podrá ser utilizado con confianza para su evaluación biológica. Para determinar, tanto la estabilidad del complejo, como la estequiometría del mismo, fue necesario llevar a cabo primeramente una titulación del dipéptido por medio de resonancia magnética nuclear, del péptido variando las concentraciones de nitrato de bismuto. Un equilibrio rápido en la formación del complejo dará lugar a un desplazamiento de señales gradual conforme se incrementa la cantidad del metal. Por su parte un equilibrio lento, que es el que se

desea, dará lugar a al menos dos grupos de señales: las del péptido libre y las del complejo.

Por otro lado, una característica de los ácidos de Lewis es que en solución suelen liberar los respectivos ácidos próticos de donde provienen y éstos a su vez llegan a formar sales de amonio en presencia de aminas. Así, con el fin de descartar que el cambio en los desplazamientos químicos sea debido a la presencia de HNO_3 , se obtuvo la sal de amonio (nitrato) del dipéptido como control negativo y se corroboró por RMN ^1H que la estructura correspondiera a los complejos de bismuto.

En los espectros de RMN- ^1H del complejo Ala-Fen• Bi^{+3} **Bi24** mostrados en la figura 11, se observó, el efecto de la variación en la concentración del metal a diferentes equivalentes de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, (0.3, 1 y 2 eq). Las señales de los protones de CH_3 (H-8), CH_2 (H-9), CH (H-3) y NH (H-4) se duplicaron en presencia del metal y no en la sal de amonio (b). Por medio de la espectroscopia de correlación total (TOCSY) (Figura 12) y espectroscopia de correlación (COSY), se dedujo que esta duplicidad de señales puede ser debida a dos poblaciones de moléculas diferentes, las afectadas por el metal que desplazaron sus señales de 0.6 a 0.3ppm a campo bajo (mostradas en recuadro rojo, Figura 12) y moléculas “libres” que conservaron los desplazamientos químicos propios del dipéptido en ausencia de bismuto (Figura 11, a).

Generalmente dichos desplazamientos a campo bajo suelen interpretarse como resultado de la carga parcial positiva adyacente a estos sitios por ocupación parcial de iones metálicos (Rivas *et al.*, 2001), o simplemente por cambios en la estructura supramolecular que modifica protones magnéticamente idénticos en protones no equivalentes (Gingter *et al.*, 2011). En este caso, los desplazamientos se atribuyeron al efecto del bismuto. En donde el protón amida NH (H-4) desplazado 0.58 ppm a campo bajo en presencia de metal, indicó la cercanía del bismuto al nitrógeno, donde probablemente, cediera su par de electrones desapareados a los orbitales vacíos del metal al estabilizar el complejo **Bi24** (Figura 11, c, d y e). Dicho efecto en los protones amida ya ha sido reportado en interacciones de metales pesados con péptidos Zinc-finger sintéticos y concuerda con los resultados obtenidos (Razmiafshari *et al.*, 2001).

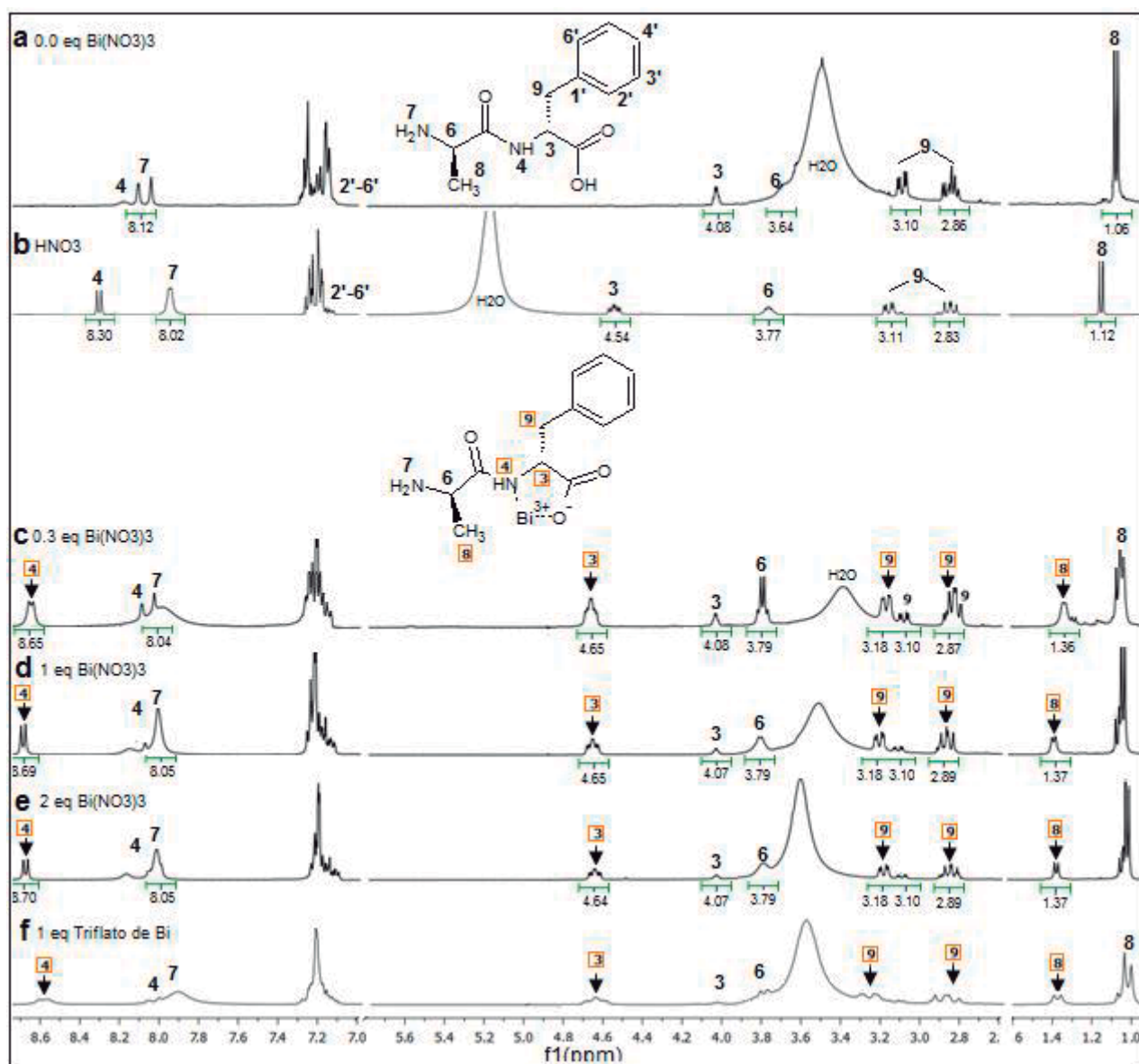


Figura 11. Análisis del complejo Ala-Fen-Bi 24 por RMN- ^1H a 400 MHz. A diferentes eq de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (c, d, e) las señales se doblan, un grupo de señales indicadas en recuadro rojo se desplazan a campo bajo mientras que otras conservan los desplazamientos propios del dipéptido (a) y en (b) el control negativo. En (f) se ratifica el efecto con otra sal de bismuto.

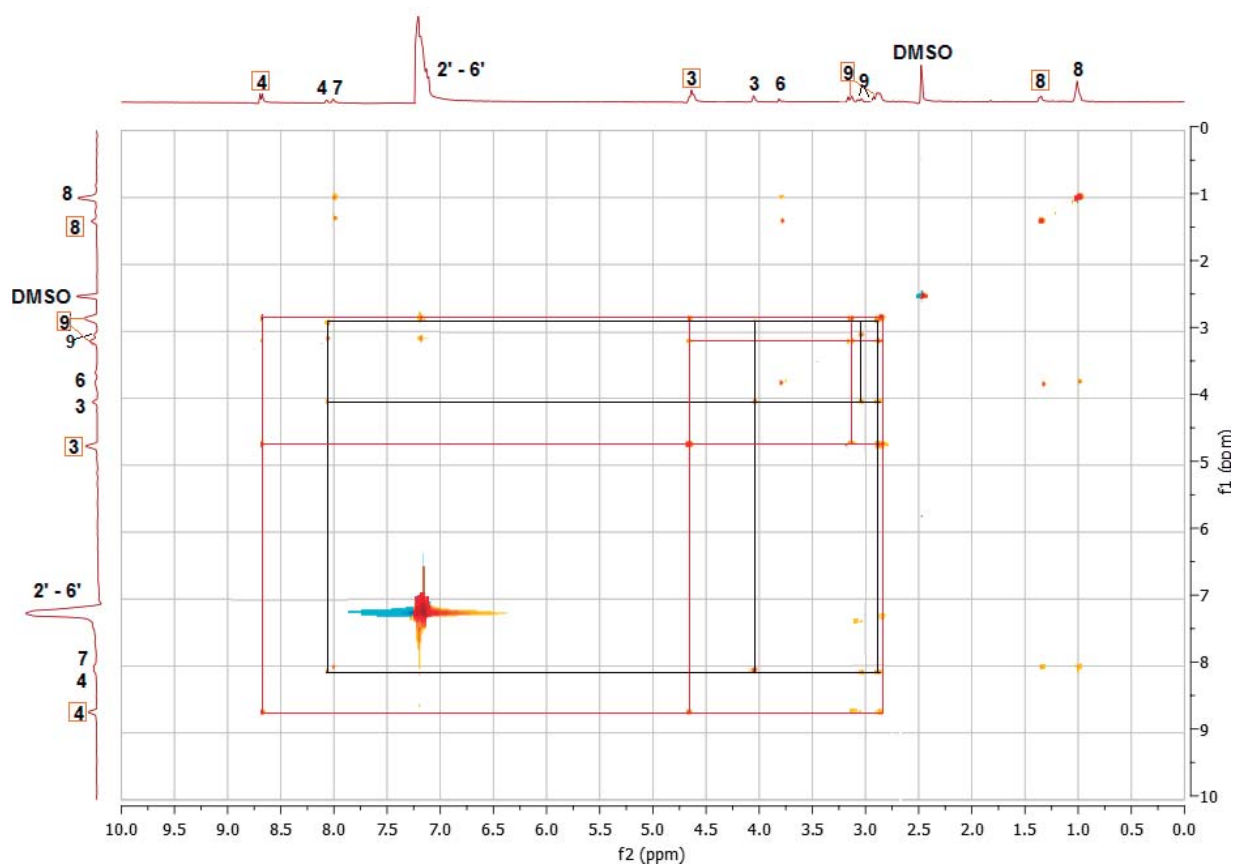


Figura 12. TOCSY a 200 MHz del complejo Ala-Fen•Bi³⁺ Bi24 en proporción 1:1 dipéptido/bismuto. Las líneas rojas indican la correlación que guardan las señales del complejo y en negro las propias del dipéptido no acomplexadas al metal.

Los resultados de la RMN-¹³C del mismo complejo **Bi24** mostrados en la figura 13, muestran diferencias claras cuando el dipéptido está en forma libre (a) y en complejo (c, d y e). Conforme se fueron incrementando los equivalentes de bismuto, se observó una disminución de las señales C=O (C-2) del ácido entre 165-170ppm y CH (C-3) entre 54-57 ppm. Esta disminución de señales indicó la participación del C=O (C-2) en la formación del complejo y el efecto inductivo que resientieron el CH (C-3) y núcleos vecinos al desplazarse a campo bajo.

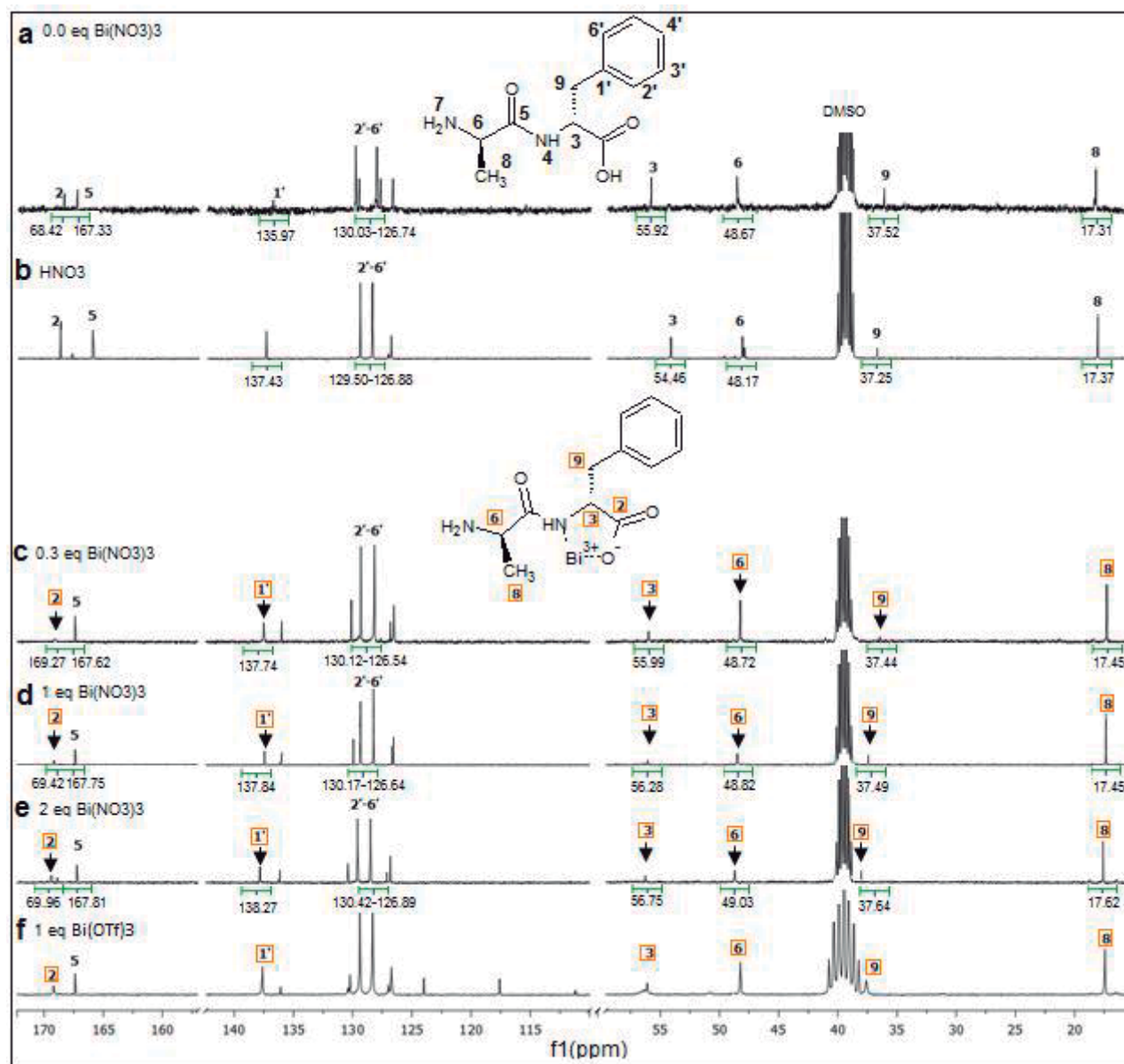


Figura 13. Análisis del complejo Ala-Fen·Bi³⁺ Bi24 por RMN-¹³C a 400 MHz. A diferentes equivalentes de Bi(NO₃)₃ (c, d, e) las señales en rojo muestran un mayor desplazamiento a campo bajo y disminución de tamaño, indicando la cercanía del metal a estos sitios. En (a) el dipéptido libre y en (b) el control negativo. En (f) se ratifica el efecto del bismuto con otra sal.

Para explicar la disminución de la magnitud de estas señales hay que tener en cuenta que generalmente la sensibilidad de RMN-¹³C es baja, principalmente por la poca abundancia isotópica del carbono 13 y la constante giromagnética de dicho núcleo.

Además en los experimentos de RMN-¹³C existen acoplamientos C-H que ocasionan multiplicidad en las señales dependiendo del número de protones unidos al carbono. Estas señales no se ven como singuletes sino como multipletes, por lo que es necesario irradiar a la frecuencia de un protón determinado (en el centro de la señal si se trata de un multiplete) antes de registrar el espectro de carbono, para que las señales finalmente aparezcan como singuletes (espectro BB o de desacoplamiento de banda ancha) con lo que la asignación del carbono es inequívoca. La sensibilidad de los experimentos de RMN-¹³C aumenta debido al denominado efecto NOE (Efecto Nuclear Overhauser), que es el resultado de la relajación bipolar inducida por el movimiento molecular en los líquidos, dicho efecto depende de las constante giromagnéticas de los núcleos acoplados y de la distancia entre los mismos ($1/r^6$), mejorando el tamaño de señal de 50% a 200%.

Ahora, la ausencia o disminución de señales en RMN-¹³C (Figura 13 c, d y e) puede indicar que los NOEs se han desestabilizado en gran medida por la presencia del Bi⁺³ (centro paramagnético) de forma que no son detectables.

En un sistema paramagnético, la velocidad de relajación de un núcleo “próximo” al centro metálico se incrementa radicalmente respecto a un sistema diamagnético análogo. Por ello, las señales se ven afectadas drásticamente, llegando incluso a no detectarse (González *et al.*, 2006). Además, las señales CH₃ (C-8), CH₂ (C-9), CH (C-6), CH (C-3), C=O (C-5) y C=O (C-2) van siendo desplazadas a campo bajo hasta 0.31, 0.12, 0.36, 0.83, 0.48 y 1.54, respectivamente. En donde, las señales más desplazadas corresponden al C=O (C-2) y CH (C-3).

Dado que los espectros de IR aportan información relevante de carbonilos acomplejados a metales, se decidió sacar los IRs de los complejos y comparar con sus ligandos. En el espectro de infrarrojo del dipéptido **24** se puede apreciar la banda característica para el alargamiento de C=O (C-2) del ácido carboxílico en 1668.12 cm⁻¹ y la banda de C=O (C-5) amida en 1641.14 cm⁻¹ (Figura 14, a). Al compararlo con el espectro del complejo **Bi24** (Figura 14, b), se aprecia la desaparición de la banda del C=O (C-2), el corrimiento de C=O (C-5) a 36.64 cm⁻¹ y la aparición de dos bandas en

1386.57 cm^{-1} y 1550.46 cm^{-1} , las cuales corresponden a los estiramientos simétricos y asimétricos del anión carboxilato (O-C-O), respectivamente.

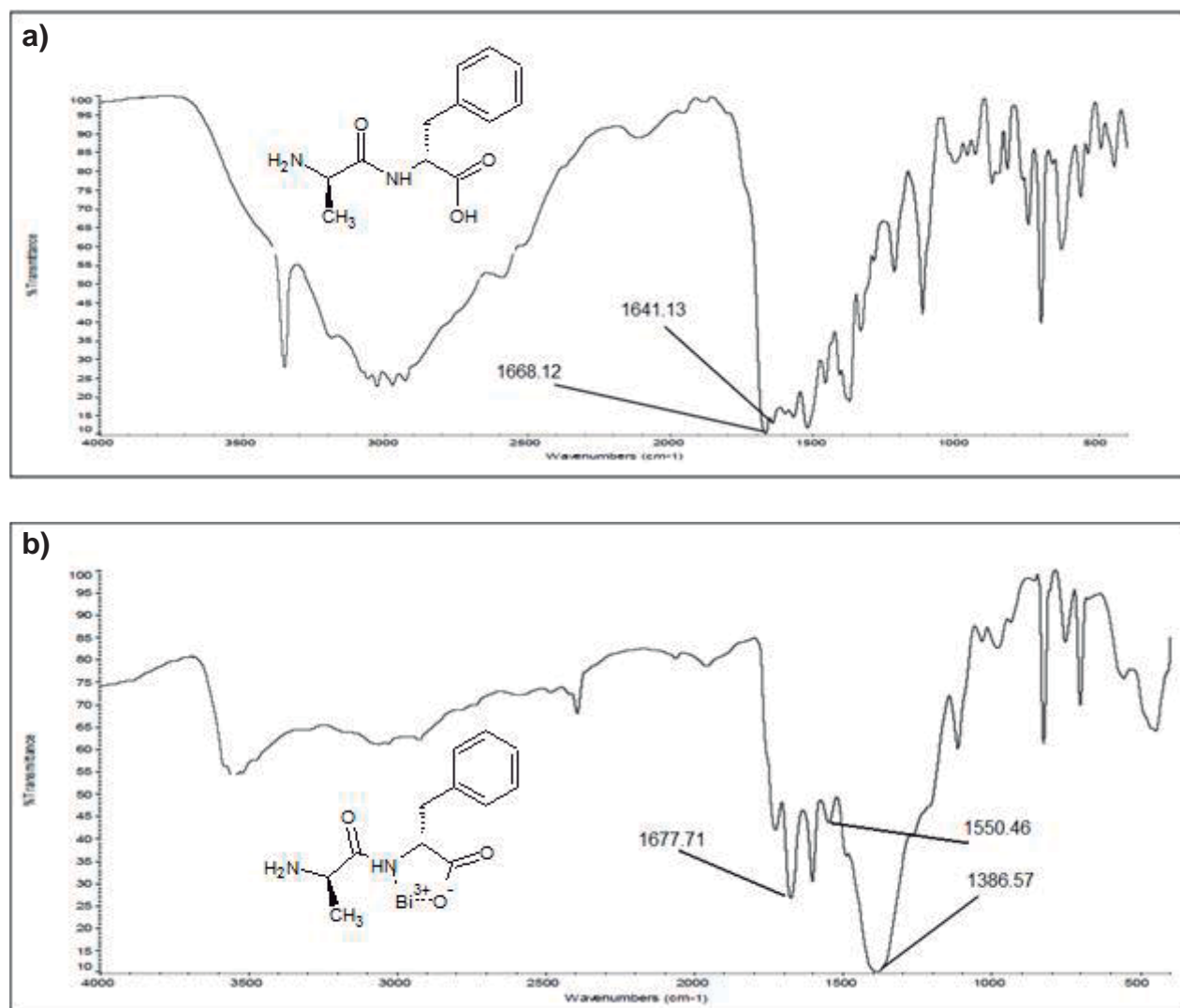


Figura 14. Análisis del complejo Ala-Fen•Bi³⁺ Bi24 por IR.

Estos resultados indican que en el complejo **Bi24**, es muy probable que el metal este interaccionando con el carboxilato y coordinado por electrones donados por el NH (H-4), formando un anillo de cinco miembros como se propone en la figura 15.

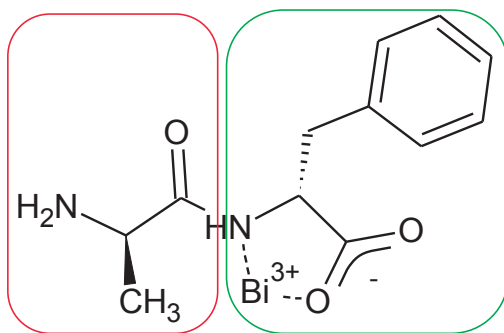


Figura 15. Estructura propuesta para el complejo Ala-Fen•Bi³⁺ Bi24.

El resto de los dipéptidos se analizó de la manera anterior, en presencia y ausencia de Bi(NO₃)₃. No obstante, los análisis de RMN de estos complejos mostraron cambios en la señal NH₂ (H-7) desplazados a campo bajo, como se observa en los espectros de RMN-¹H de la figura 16 para el complejo Trp-Gli•Bi³⁺ Bi26.

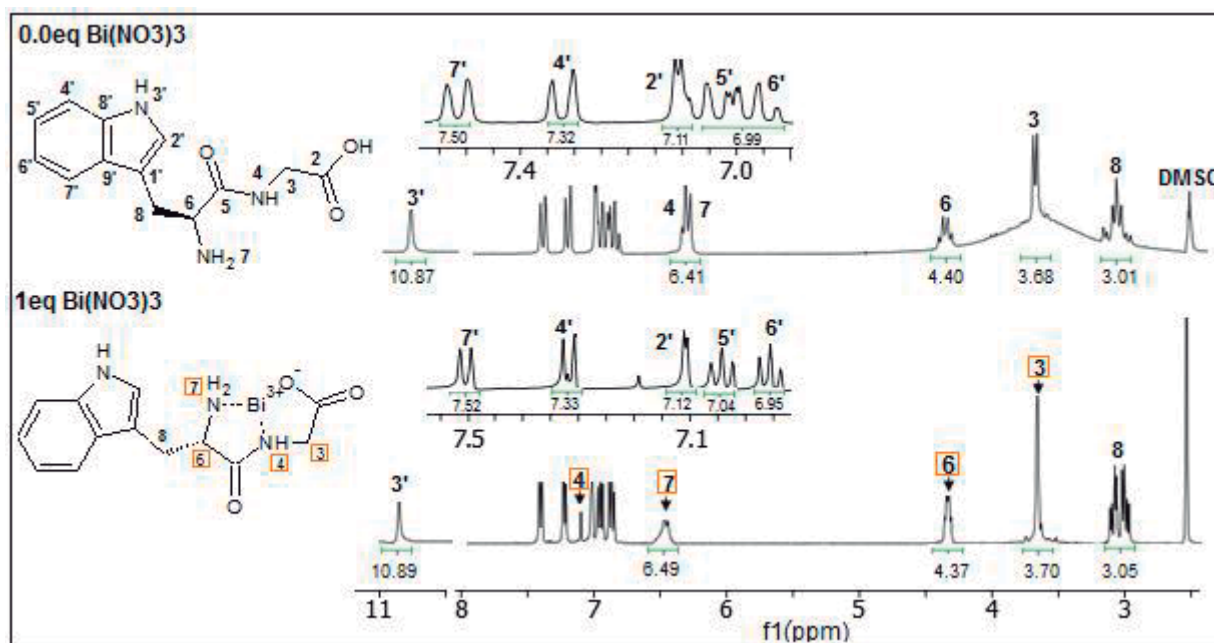


Figura 16. Análisis del complejo Trp-Gli•Bi³⁺ Bi26 por RMN-¹H a 200 MHz. A 1 eq de Bi(NO₃)₃ las señales en rojo se afectan y desplazan a campo bajo, indicando la formación de los complejos dipéptido-Bi³⁺. A 0 eq de bismuto se muestran las señales propias de los dipéptidos.

En donde, al igual que en el complejo **Bi24**, el protón de amida NH (H-4) se desplazó a campo bajo de 6.41 hasta 7.18 ppm, pero también la señal de NH₂ (H-7) se desplaza ligeramente a campo bajo hasta 0.08 ppm, indicando la posible participación de *N*-terminal en la formación del complejo.

Los espectros de RMN-¹³C a 200 MHz de **Bi26** muestran mayor evidencia del efecto del bismuto (Figura 17). De igual manera, se observó como las intensidades de las señales de C=O (C-2), C=O (C-5), CH (C-6) y CH₂ (C-3), disminuyen drásticamente desplazándose hasta 0.5 ppm a campo bajo.

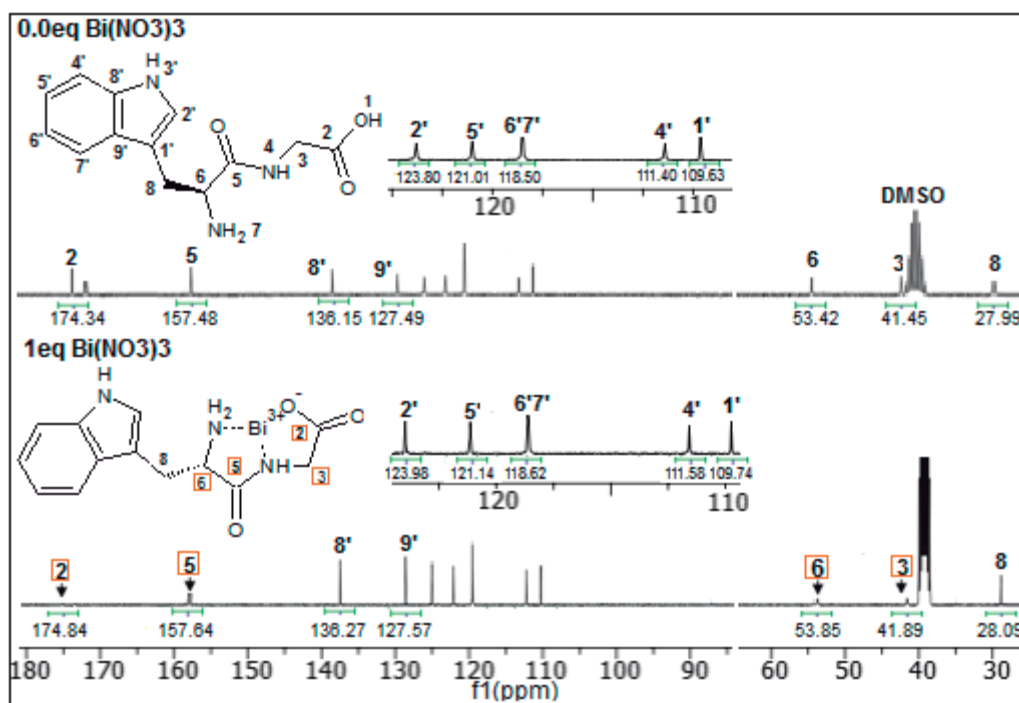


Figura 17. Análisis del complejo Trp-Gli-Bi³⁺ Bi26 por RMN-¹³C a 200 MHz. A 1 eq de Bi(NO₃)₃ las señales en rojo muestran mayor desplazamiento a campo bajo y disminución de tamaño, a diferencia de lo observado en los espectros a 0 eq de bismuto.

Por lo que para ellos se propone la formación de un biciclo [3.3.0] pentano (Figura 18), formado por la unión del metal al carboxilato y la interacción al amino NH (H-4) de glicina o alanina, según sea el caso y al NH₂ (H-7) del segundo aminoácido.

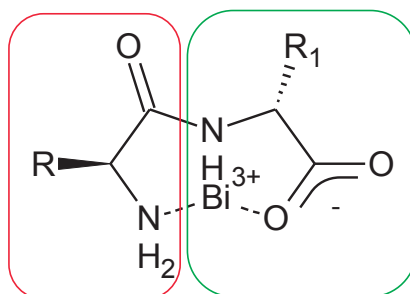


Figura 18. Estructura propuesta para los complejos dipéptido- Bi^{+3} con Alanina o Glicina en el C-terminal.

9.3 Actividad antimicrobiana de los complejos dipéptido- Bi^{+3}

Las pruebas de actividad antimicrobiana de los complejos no pudieron ser realizadas por el método de dilución en tubo, debido a la baja solubilidad de los compuestos en el medio de cultivo. Por esta razón, los ensayos se realizaron por el método de difusión en agar. Los ensayos se realizaron con discos de papel filtro Whatman® con 6.4×10^{-7} mol en 5 μl de DMSO, que corresponde a agregar de 500 μg a 400 μg dependiendo del peso molecular, considerando una relación de dipéptido/ Bi^{+3} 1:1. Después de 16 h de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes fueron uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. No se observaron colonias individuales en ninguna placa, indicando la correcta descarga y preparación del inóculo. Cabe señalar que en algunos discos se observaron dobles halos inhibitorios (Figura 19), que pueden ser justificados por la baja hidrosolubilidad de los complejos (Nadinic *et al.*, 2002). En todos estos casos, se tomó como inhibición verdadera la cercana al disco.

Los controles negativos utilizados fueron los dipéptidos libres y el $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$. Los primeros no mostraron actividad antibacteriana, pero el $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ si mostró un reducido halo inhibitorio pegado al disco.

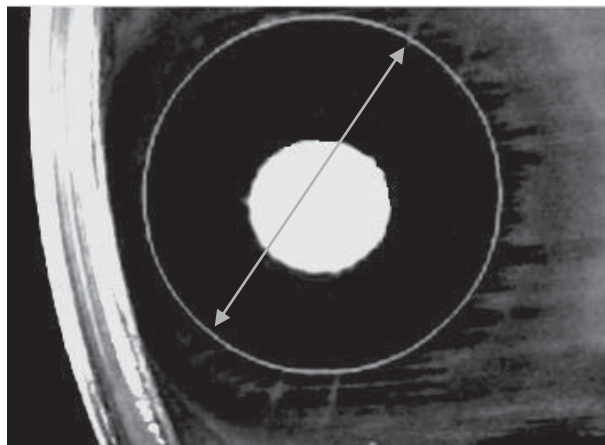


Figura 19. Doble halo inhibitorio en *Escherichia coli* del complejo Tir-Gli•Bi⁺³ Bi25.

Los halos inhibitorios de los complejos dipéptido-Bi⁺³ obtenidos de los ensayos de difusión en disco en *E. coli* se muestran en la figura 20. Los complejos que mostraron mayor actividad antimicrobiana fueron Tir-Gli•Bi⁺³ Bi25, Fen-Ala•Bi⁺³ Bi23 y Fen-Gli•Bi⁺³ Bi22 con 16.4, 14.2 y 13.8 mm, respectivamente. Todos ellos poseen aminoácidos aromáticos de tirosina y fenilalanina. Otros complejos con aromaticidad Trp-Gli•Bi⁺³ Bi26 y Ala-Fen•Bi⁺³ Bi24 también mostraron zonas de inhibición importantes (13.7 y 12.5 mm, respectivamente).

Estos resultados sugieren que la actividad de los complejos en *E. coli* depende de la presencia de fragmentos aromáticos en los dipéptidos. Por otro lado, a pesar de la gran presencia de la prolina en los PAs, ninguno de sus complejos de Pro-Gli•Bi⁺³ Bi20 y Pro-Ala•Bi⁺³ Bi21 mostraron actividad significativa con respecto al control Bi(NO₃)₃, al igual que el complejo Gli-Gli•Bi⁺³ Bi17. La presencia de alanina o glicina en el extremo C-terminal en los complejos Bi22, Bi23 y Gli-Ala⁺³ Bi18, Ala-Gli•Bi⁺³ Bi19, al parecer no modificó la actividad de éstos, ya que entre ellos no existieron diferencias significativas (Figura 21).

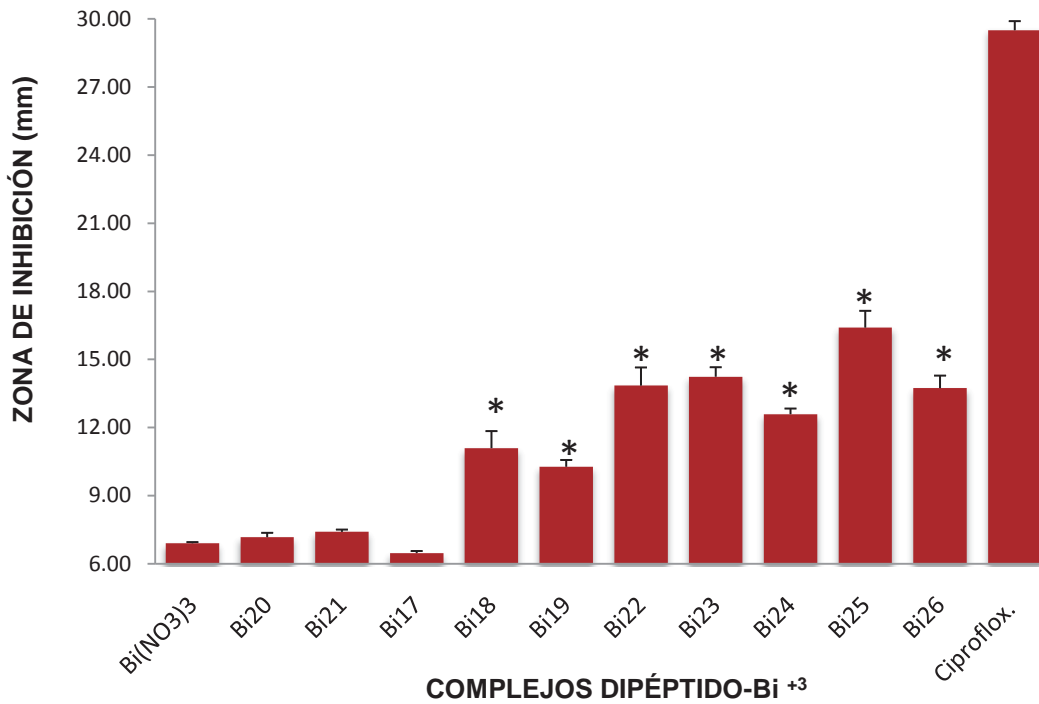


Figura 20. Ensayos de difusión en disco en *Escherichia coli*. Cantidad en disco 6.4×10^{-7} mol. Se muestra la media de triplicados con las desviaciones estándares de 3 experimentos.* $P < 0.05$ significativo en comparación al control $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (prueba de Tukey Karner). Tamaño de disco 6 mm.

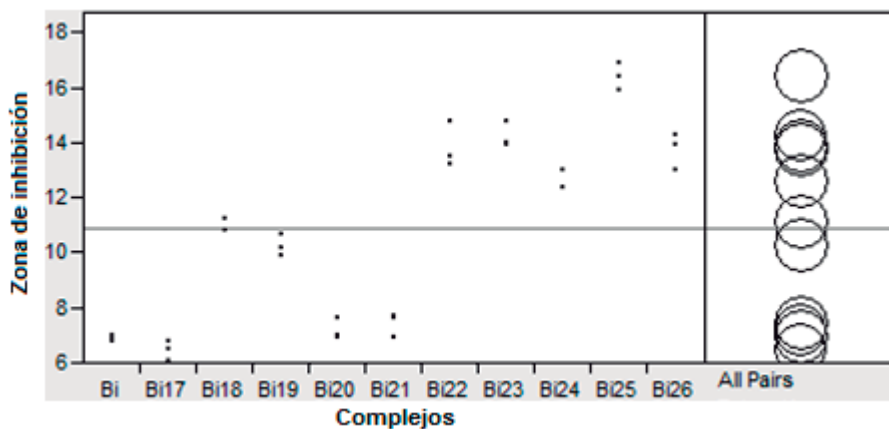


Figura 21. Comparación de medias de la inhibición de los complejos en *Escherichia coli*. Círculos no conectados son significativamente diferentes * $P < 0.05$ (prueba Tukey Karner).

En cambio, en los complejos **Bi23** y **Bi24**, la inversión de los aminoácidos alanina y fenilalanina si provocó una diferencia significativa en cuanto a su actividad, siendo mayor cuando alanina se encuentra en el C-terminal.

Los halos inhibitorios de los complejos dipéptido-Bi⁺³ obtenidos de los ensayos de difusión en disco en *S. aureus* se muestran en la figura 22. Como se puede observar, además de **Bi17**, **Bi20** y **Bi21** que no mostraron actividad en *E. coli*, en *S. aureus* los complejo **Bi19**, **Bi24** y **Bi26** tampoco inhibieron el crecimiento significativamente.

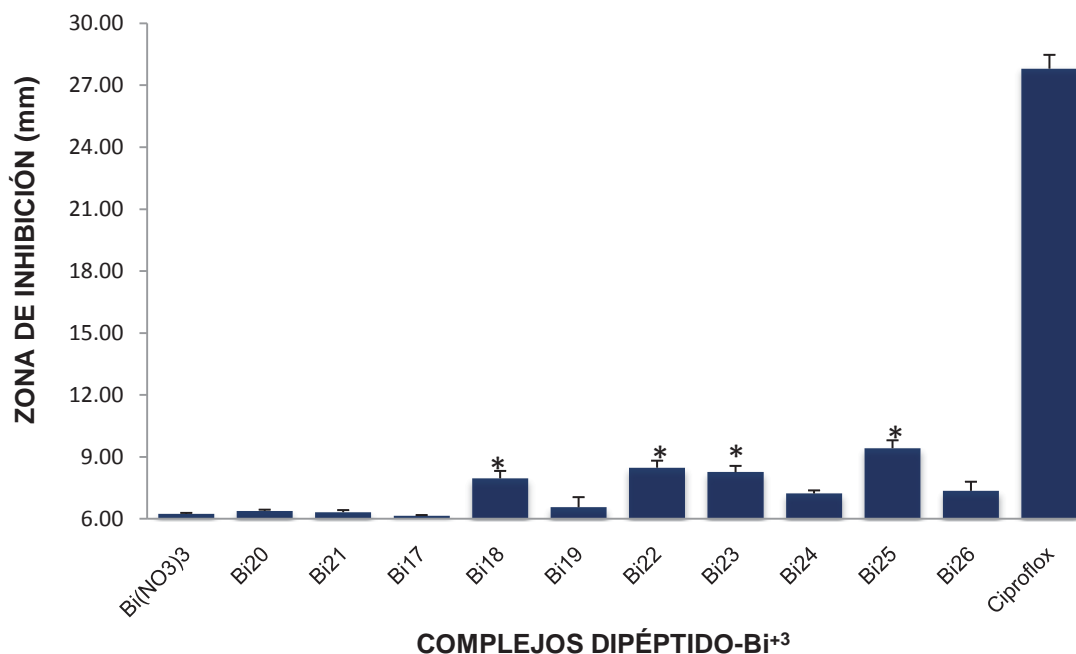


Figura 22. Ensayos de difusión en disco en *Staphylococcus aureus*. Cantidad en disco 6.4×10^{-7} mol. Se muestra la media de triplicados con las desviaciones estándares de 3 experimentos.* $P < 0.05$ significativo en comparación con el control Bi(NO₃)₃ (prueba de Tukey Karner). Tamaño de disco 6 mm.

En el diagrama de comparación de medias mostrado en la figura 23 se observó que no existe una diferencia clara en cuanto a la actividad de uno u otro complejo. Aún así, los

complejos de mayor actividad fueron **Bi25**, **Bi22**, con halos inhibitorios de 9.7, 8.4mm, respectivamente.

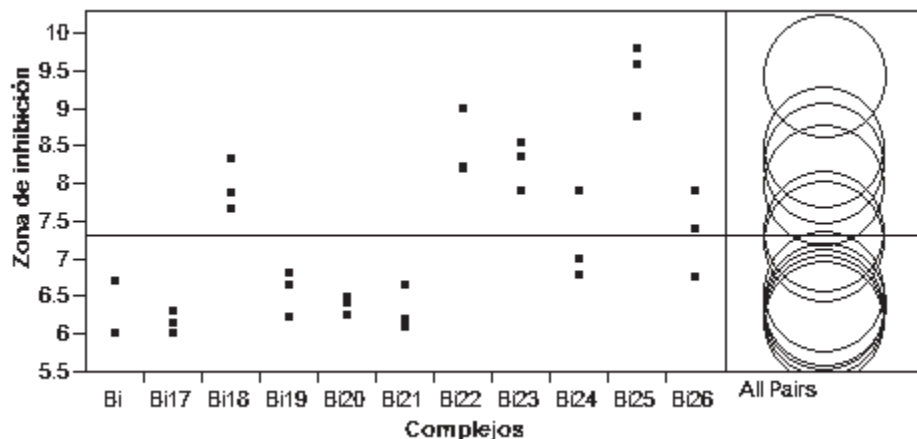


Figura 23. Comparación de medias de la inhibición de los complejos en *Staphylococcus aureus*. Círculos no conectados son significativamente diferentes * $P < 0.05$ (prueba Tukey Kärner).

La actividad de los complejos, significativamente ($P < 0.05$, t-student) mayor en *E. coli* que en *S. aureus* (Figura 24), puede asociarse a diferencias estructurales en ambas bacterias como la presencia de membrana externa en *E. coli*. En este sentido, es muy probable que la actividad de los complejos dipéptido- Bi^{+3} esté relacionada con los mecanismos de acción de PAs en combinación con el efecto bactericida del bismuto. En donde los dipéptidos por sí sólo no fueron activos y la sal de bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$) mostró mínima actividad. La sinergia de estos dos componentes en *E. coli*, puede ser el resultado del efecto permeabilizante de los dipéptidos que facilita la acción del bismuto. No obstante, esta sinergia no fue general para todos los complejos dipéptido- Bi^{+3} . Al parecer la actividad depende de cierta hidrofobicidad de los dipéptidos para poder interaccionar con las membranas bacterianas.

En *S. aureus*, prácticamente más de la mitad de los complejos fueron inactivos. En efecto, esto puede ser debido a una resistencia natural; sin embargo, no se puede

descartar la existencia de algún mecanismo de resistencia adquirida que evada los efectos de los complejos.

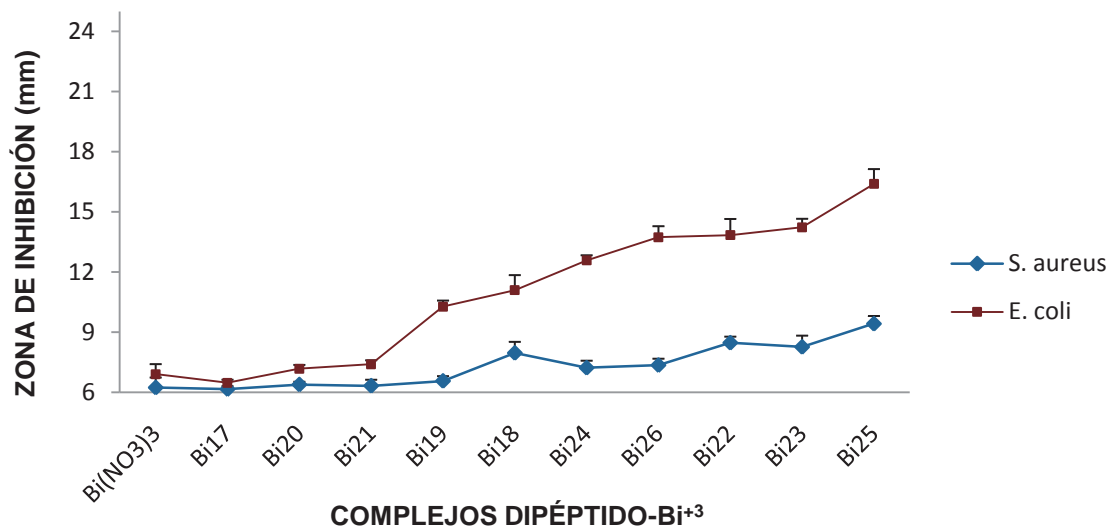


Figura 24. Comparación de la actividad de los compuestos en *E. coli* y *S. aureus*. Se muestra la media de triplicados con las desviaciones estándares de 3 experimentos.* $P < 0.05$ diferencias significativa (t-student). Tamaño de disco 6 mm, inóculo ajustado a 0.2 DO 600 nm para ambas bacterias.

La importancia de uno u otro aminoácido en PAs ha sido muy estudiada. Generalmente se ha determinado, al observar el efecto que ocurre por la sustitución de diferentes aminoácidos en su estructura. El triptófano es uno de los aminoácidos muy frecuente en PAs. En indolicidina y tritripticina el Trp representa hasta el 24% y 39% de los residuos totales. El cambio de Trp \rightarrow Fen en el análogo TWF de tritripticina, ha demostrado aumentar la actividad frente a *E. coli* y *S. aureus* (Yang *et al.*, 2006). Esto concuerda con nuestros resultados, en donde el complejo **Bi26** de Trp-Gli resultó menos activo que los complejos con fenilalanina en ambas bacterias. Cerca de la CMI, la indolicidina causa una significativa despolarización de la membrana bacteriana por la formación de poros transitorios, sin causar lisis bacteriana por lo que se sugiere que existe algún otro

mecanismo de acción (Hsu *et al.*, 2005). La prolina a pesar de ser también un aminoácido muy común en los PAs, ninguno de sus complejos **Bi20** y **Bi21** presentó actividad significativa en ambas bacterias analizadas. Otros complejos, como el **Bi17** y **Bi19** no exhibieron actividad antimicrobiana, lo que sugiere la importancia de fragmentos aromáticos en la efectividad de los complejos dipéptido-Bi⁺³. La tirosina presente en el complejo **Bi25**, que mostró mayores halos inhibitorios en ambas bacterias, no es tan común entre los PAs. Sin embargo, en el análogo T-22 ([Tir5,12,Lis7]-polifemusina II) la presencia de tirosina es indispensable para su actividad (Masuda *et al.*, 1992).

Desafortunadamente, la insolubilidad de los complejos en medios de cultivos impidió el cálculo de las CMI's por dilución en tubo, por ese motivo resulta imposible la comparación de su actividad con otros compuestos de bismuto reportados, con valores de CMI's que van de >270 a 3.7 µg/ml en *E. coli* y *S. aureus* (Kotani *et al.*, 2005; Mahony *et al.*, 1999) y de 4 a 64 µg/ml en *H. pylori* (Andrews *et al.* 2010).

Por otro lado, la actividad observada es suficiente para continuar con estudios posteriores de otros péptidos y en otras cepas, sobretodo en Gram negativas antibiótico resistentes.

10. CONCLUSIÓN

La caracterización a través de IR y RMN de los complejos dipéptido-Bi⁺³, estableció la estabilidad de los complejos para su evaluación antimicrobiana y dos posibles estequiometrias. En ambas, el bismuto interactúa con los grupos carboxilato y amida formando un anillo de cinco miembros. En los complejos con alanina y glicina en C-terminal, es posible una interacción adicional del bismuto con el amino *N*-terminal para formar un bicyclo tipo [3.3.0] pentano. Por otra parte, se concluye que los complejos dipéptido-Bi⁺³ poseen actividad antimicrobiana mayor en *E. coli* que en *S. aureus*, dicha podría estar relacionada con la presencia de aminoácidos aromáticos en los dipéptidos.

11. REFERENCIAS

- Andrade A.C., Van Nistelrooy J.G., Peery R.B., Skatrud P.L., De Waard M.A., **2000**, The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production, *Molecular and General Genetics*, 263:6, 966–977.
- Andrews C.P., Ferrero L.R., Junk C.P., Kumar I., Luu Q., Nguyena K., Taylora W.J., **2010**, Bismuth(III) complexes derived from non-steroidal anti-inflammatory drugs and their activity against *Helicobacter pylori*, *Dalton Transactions*, 39:21, 2861–2868.
- Arcus V.L., Lott J.S., Johnston J.M., Baker E.N., **2006**, The potential impact of structural genomics on tuberculosis drug discovery, *Drug Discovery Today*, 11:5, 28–34.
- Bauerfeind P., Garner R., Dunn B.E., Mobley, H.L., **1997**, Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH, *Gut*, 40:1, 25–30.
- Bengoechea J.A., Skurnik M., **2000**, Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*, *Molecular Microbiology*, 37:1, 67–80.
- Bierer D.W., **1990**, Bismuth subsalicylate: history, chemistry and safety, *Reviews Of Infectious Diseases*, 12:1, 3–8.
- Bland V.M., Ismail S., Heinemann A. J., Keenan I. J., **2004**, The Action of Bismuth against *Helicobacter pylori* Mimics but Is Not Caused by Intracellular Iron Deprivation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1983–1988.
- Braicu C., Stanila A., Rotar M., Petran M., Socaciu C., **2006**, Antifungal Activity Of Some Amino Acids Complexes Against *Candida Albicans*, *Buletin USAMV-CN*, 207-212.
- Burford N., Eelman D.M., Mahonyb E.D., Morashb M., **2003**, Definitive identification of cysteine and glutathione complexes of bismuth by mass spectrometry: assessing

- the biochemical fate of bismuth pharmaceutical agents, *Chemical Communications*, 146–147.
- Castano S., Jean-François F., Desbat B., Odaert B., Roux M., Metz-Boutigue M.H., Dufourc E.J., **2008**, Aggregation of cateslytin beta-sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides? *Biochemistry*, 47:12, 6394–6402.
- Castillo F.J., Moreno F., **2001**, Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase, *Journal of Bacteriology*, 183:6, 2137–2140.
- Chohan H.Z., Arif M., Akhtar A.M., Supuran T.C., **2006**, Metal-Based Antibacterial and Antifungal Agents: Synthesis, Characterization, and In Vitro Biological Evaluation of Co(II), Cu(II), Ni(II), and Zn(II) Complexes With Amino Acid-Derived Compounds, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2006:1, 1–13.
- Claussen C.A., Long E.C., **1999**, Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin, *Chemical Reviews*, 99:5, 2797–2816.
- Coates A., Hu Y., Bax R., **2002**, The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs, *Nature Reviews Drug Discovery*, 1:3, 895–910.
- Cornejo J., Díaz G., Volkow P., **2005**, Tendencia del perfil de sensibilidad antimicrobiana en los aislamientos de sangre en un hospital oncológico, *Salud Pública Mexicana*, 47:4, 288-293.
- Crespo M.P., **2005**, La Resistencia Bacteriana: ¿Estamos preparados para detectarla?, *Infectología Pediátrica*; 9:1, 31-45

- Domenico P., Baldassarri L., Schoch P.E., **2001**, Activities of bismuth thiols against staphylococci and staphylococcal biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:7, 1417–1421.
- Domenico P., Landolphi D.R., Cunha B.A., **1991**, Reduction of capsular polysaccharide and potentiation of aminoglycoside inhibition in Gram-negative bacteria by bismuth subsalicylate, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28:9, 801–810.
- Domenico P., Salo R.J., Novick S.G., Schoch P.E., Van Horn K., Cunha B.A., **1997**, Enhancement of bismuth antibacterial activity with lipophilic thiol chelators, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41:11, 1697–1703.
- Domenico P., Tomas M.J., Merino S., Rubires X., Cunha A.B., **1999**, Surface antigen exposure by bismuth-thiol suppression of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide, *Infection and Immunity*, 67:13, 664–669.
- Epperson D.J., Ming L.J., **2000**, Proton NMR Studies of Co(II) Complexes of the Peptide Antibiotic Bacitracin and Analogues: Insight into Structure-Activity Relationship, *Biochemistry*, 39:17, 4037-4045.
- Fales W.A.J., Brogden K.A., Huffman E., Gallup J.M., Ackermann M.R., **2002**, Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary inflammation, *Veterinary Pathology*, 39:6, 706-711.
- Fernandez de Caleyá R, Gonzalez P.B, García O.F, Carbonero P., **1972**, Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro, *Journal of Applied Microbiology*, 23;5, 998–1000.
- Fernandez P., **2006**, Antibacterial discovery and development-the failure of success?, *Nature Biotechnology*, 24:2, 1497–1503.
- Ford CA., Malfertheiner P., Giguère M., Santana J., Khan M., Moayyedi P., **2008**, Adverse events with bismuth salts for *Helicobacter pylori* eradication: Systematic review and meta-analysis, *World Journal of Gastroenterology*, 14:48, 7361-7370.

- Friedrich C., Scott M.G., Karunaratne N., Yan H., Hancock R.E., **1999**, Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:7, 1542–1548.
- Gao F., Yang P., Xie J., Wang H., **1995**, Synthesis, characterization and antibacterial activity of novel Fe(III), Co(II), and Zn(II) complexes with norfloxacin, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 60:5, 61–67.
- García de Lomas J., Gimeno C., Esteban E., **2002**, Las oxazolidinonas: Una nueva clase de antimicrobianos, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1:1, 8-14.
- Gingter S., Bezdushna E., Ritter H., **2011**, Chiral recognition of macromolecules with cyclodextrins: pH- and thermosensitive copolymers from N-isopropylacrylamide and N-acryloyl-D/L-phenylalanine and their inclusion complexes with cyclodextrins, *Journal of Organic Chemistry*, 7, 204–209.
- González D.A., Alcaraz M.A.L., **2006**, Resonancia magnética nuclear en sistemas paramagnéticos, *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 1:2, 27-33.
- Guina T., Yi E.C., Wang H., Hackett M., Miller S.I., **2000**, A PhoP-Regulated Outer Membrane Protease of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Promotes Resistance to Alpha-Helical Antimicrobial Peptides, *Journal of Bacteriology*, 182:6, 4077-4086.
- Gunn J.S., Lim K.B., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S.I., **1998**, PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance, *Molecular Microbiology*, 27:6, 1171–1182.
- Hajdu J., Armstrong E.C., **1981**, Interaction of metal ions with streptonigrin. Formation of copper(II) and zinc(II) complexes of the anti-tumor antibiotic, *Journal of the American Chemical Society*, 103:4, 232–234.

- Hoffken G., Borner K., Glatzel P.D., Koeppe P., Lode H., **1995**, Reduced enteral absorption of ciprofloxacin in the presence of antacids, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 4:2, 345–345.
- Hong C., Fu-Lian H., **2009**, Furazolidone, amoxicillin, bismuth and rabeprazole quadruple rescue therapy for the eradication of *Helicobacter pylori*, *World Journal of Gastroenterology*, 15:7, 860-864.
- Hsu C.H., Chen C., Jou M.L., Lee A.Y., Lin Y.C., Yu Y.P., Huang W.T., Wu S.H., **2005**, Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA, *Nucleic Acids Research*, 33:11, 4053–4064.
- Iqbal M.S., Khurshid S.J., **1990**, Antibacterial activity of copper-amino acid complexes, *Journal of Pakistan Medical Association*, 40:9, 211-222.
- Jenssen H, Hamill P., Hancock R., **2006**, Peptide Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 19:3, 491–511.
- Kern W.V., **2006**, Daptomycin: first in a new class of antibiotics for complicated skin and soft-tissue infections, *International Journal of Clinical Practice*, 60:2, 370–378.
- Klapotke T, **1988**, Mini Review: Biological activity of organometallic bismuth compounds, *Biology of Metals*, 1:2, 69–76.
- Kotani T., Nagai D., Asahi K., Suzuki H., **2005**, Antibacterial properties of some cyclic organobismuth (III) compounds, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:7, 2729-2734.
- Leontadiou H., Mark A.E., Marrink S.J., **2006**, Antimicrobial peptides in action, *Journal of the American Chemical Society*, 128:37, 12156–12161.
- Livermore D.M., Woodford N., **2000**, Carbapenemases: A problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology*, 3:5, pp. 489-95.

- Lowe D.J., **1974**, Adverse effects of bismuth subgallate, *Medical Journal of Australia*, 2:2 (18), 664-666.
- Luan S., Zhu Y., Jia Y., **2008**, Synthesis and characterization of complex of glycyl-L-glutamine and bismuth trichloride, *Protein & Peptide Letters*, 15:10, 1094-1099.
- Macias B., Villa M.V., Rubio I., Castiñeiras A., Borrás J., **2001**, Complexes of Ni(II) and Cu(II) with ofloxacin crystal structure of a new Cu(II) ofloxacin complex, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 84:1, 163–170.
- Mahony D. E., Lim-Morrison S., Bryden L., Faulkner G., Hoffman P. S., Agocs L., Briand G. G., Burford N., Maguire H., **1999**, Antimicrobial Activities of Synthetic Bismuth Compounds against *Clostridium difficile*, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 43:3, 582–588.
- Manhart M.D., **1990**, In vitro antimicrobial activity of bismuth subsalicylate and other bismuth salts, *Reviews Of Infectious Diseases*, 12:1, S11–S15.
- Marshall B.J., **1991**, The use of bismuth in gastroenterology, *American Journal Gastroenterol.*, 86:2, 16–25.
- Masuda M., Nakashima H., Ueda T., Naba H., Ikoma R., Otaka A., Terakawa Y., Tamamura H., Ibuka T., Murakami T., Koyanagi Y., Waki M., Matsumoto A., Yamamoto N., Funakoshi S., Fujii N., **1992**, A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr^{5,12},Lys⁷]-polyphemusin II), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189:2, 845-850.
- Matsukura T., Tanaka H., **2000**, Applicability of Zinc Complex of L-Carnosine for Medical Use, *Biochemistry*, 65:7, 817-823.
- Nadinic L.E., Penna C., Saavedra C., Coussio J., Gutkind G., Debenedetti S., **2002**, Aislamiento de los Compuestos con Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae), *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21:2, 123-30.

- Nath M., Yadav R., Eng G., Nguyen T.T., Kumar A., **1999**, Characteristic spectral studies, and antimicrobial and anti-inflammatory activities of diorganotin(IV) derivatives of dipeptides, *Journal of Organometallic Chemistry*, 577:1, 1–8.
- Noach L.A., Eekhof J.L., Bour L.J., Posthumus F.E., Tytgat G.N., Ongerboer de Visser B.W., **1995**, Bismuth salts and neurotoxicity. A randomised single-blind and controlled study, *Human & Experimental Toxicology*, 14:4, 349-55.
- Ogunniran K.O., Tella A.C., Alensela M., Yakubu M., T., **2007**, Synthesis, physical properties, antimicrobial potentials of some antibiotics complexed with transition metals and their effects on alkaline phosphatase activities of selected rat tissues, *African Journal of Biotechnology*, 6:10, 1202-1208.
- Ortiz F.J., **2009**, El reto de la resistencia bacteriana en México: Una nueva alternativa de manejo antimicrobiano eficaz, *Medicina Interna de México*, 25:5, 361-371.
- Papakyriakou A., Bratsos I., Katsaros N., **2003**, Structural studies on metalbleomycins: The interaction of Pt(II) and Pd(II) with bleomycin, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 68:4–5, 337–348.
- Pelaez F., **2006**, The historical delivery of antibiotics from microbial natural products. can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, 71:2, 981–990.
- Petering D.H., Byrnes R. W., Antholine W. E., **1990**, The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin, *Chemico-Biological Interactions*, 73:3, 133–182.
- Pinto R.M.A., Salvador J.A.R., Roux C.L.R., **2006**, Reaction Mediated by Bismuth(III) Salts: One-Step Conversion of Epoxides into vic-Acylamino-Hydroxy Compounds, *Synlett*, 2006:13, 2047-2050.
- Razmiafshari M., Kao J., d'Avignon A., Zawia N.H., **2001**, NMR identification of heavy metal-binding sites in a synthetic zinc finger peptide: toxicological implications for

- the interactions of xenobiotic metals with zinc finger proteins, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172:1, 1-10.
- Reyna F.J., Ramírez L.A., Villeda G.G., **2007**, Primer informe de *Staphylococcus haemolyticus* con susceptibilidad reducida a vancomicina aislado de un paciente con neuroinfección neonatal en una institución mexicana, *Gaceta Médica de México*, 143:2, 165-67.
- Rivas C.J.M., Schwalbe H., Lippard J.S., **2001**, Interchain hydrogen-bonding interactions may facilitate translocation of K⁺ ions across the potassium channel selectivity filter, as suggested by synthetic modeling chemistry, *PNAS*, 98:1, 9478–9483.
- Rivas L., Andreu D., **2003**, Péptidos antibióticos eucarióticos: ¿una nueva alternativa en clínica? *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 21:7, 358-356.
- Schindler R., Heemann U., Haug U., Stoelck B, Karatas A., Pohle C., Deppisch R., Beck W., Hollenbeck M., **2010**, Bismuth coating of non-tunneled haemodialysis catheters reduces bacterial colonization: a randomized controlled trial, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25:3, 2651–2656.
- Schmidtchen A., Frick I.M. Andersson E., Tapper, H., Bjorck L., **2002**, Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide L-37, *Molecular Microbiology*, 46:1, 157-168.
- Scott D.R., Weeks D., Hong C., Postius S., Melchers K., Sachs G., **1998**, The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*, *Gastroenterology*, 114:1, 58–70.
- Shafer W.M., Qu X., Waring A.J., Lehrer R.I., **1998**, Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:4, 1829–1833.

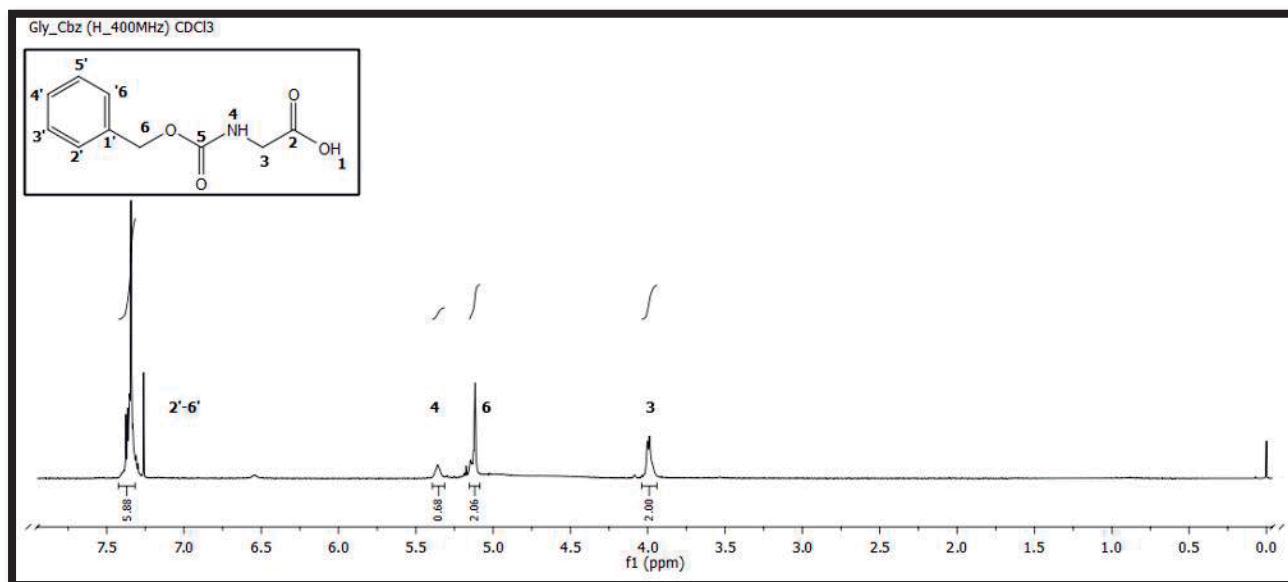
- Shai Y., **1999**, Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by K-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 55-70.
- Shai Y., Oren Z., **2001**, From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides, *Peptides*, 22:10, 1629-1641.
- Shaikh R.A., Giridhar R., Megraud F., Yadav M., **2006**, Bismuth-norfloxacin complex: Synthesis, physicochemical and antimicrobial evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, 332:17, 24–30.
- Shaikh R.A., Giridhar R., Megraud F., Yadav M., **2009**, Metalloantibiotics: Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of bismuth-fluoroquinolone complexes against *Helicobacter pylori*, *Acta Pharmaceutica*, 59:3, 259–271.
- Shujian C., Hongyan L., Ruiguang G., Lin C.M., Hongzhe S., **2008**, A Histidine-rich and Cysteine-rich Metal-binding Domain at the C Terminus of Heat Shock Protein A from *Helicobacter pylori*, *The Journal Of Biological Chemistry*, 283:22, 15142–15151.
- Sox T.E., Olsen C.A., **1989**, Binding and killing of bacteria by bismuth subsalicylate, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33:12, 2075–2082.
- Storm D.R., Strominger J.L., **1984**, Binding of bacitracin to cells and protoplasts of *Micrococcus lysodeikticus*, *Journal Biol. Chem.*, 249:13, 1823–1827.
- Sukhov G.B., Mukha A.S, Antipova A.I., Medvedeva A.S., Larina I.L., Chipanina N.N., Kazheva N.O., Shilov V.G., Dyachenko A.O., Trofimova A.B., **2008**, Stereoactive lone pair of electrons on bismuth(III): tris(3-hydroxy- 2-methyl-4H-pyran-4-onato)bismuth(III), *ARKIVOC*, 8:6, 139-149.
- Sun H., Li H., Sadler P.J., **1997**, The Biological and Medicinal Chemistry of Bismuth. *Chemische Berichte*, 130:8, 669–681.

- Tenover F.C., **2004**, Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48:2, pp. 275-280.
- Timaná D.C.A., Aranda A.C.M., **2002**, Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos, *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22:4, 192-199.
- Tiwari V.K., Shukla S.K., Chauhan V.S., Ravi K., Sushma R., Tewari I.C., **2010**, Antimicrobial, antitumor and gastroprotective studies of some new water soluble organic derivatives of bismuth, *International Journal of Pharmaceuticals Analysis*, 2:1, 09-14.
- Toshiaki K., Daisuke N., Kensuke A., Hitomi S., Fumiaki Y., **2005**, Antibacterial Properties of Some Cyclic Organobismuth (III) Compounds, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 49:7, 2729–2734.
- Turel I., Sonc A., Zupancic M., Sepcic K., Turk T., **2000**, The synthesis and biological activity of some magnesium (II) complexes of quinolones, *Metal-Based Drugs*, 7:2, 101–104.
- Ulvatne H., Haukland H. H., Samuelsen O., Kramer M., Vorland L.H., **2002**, Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50:4, 461–467.
- Wu C.L., Domenico P., Hassett D.J., **2002**, Subinhibitory bismuth-thiols reduce virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26:4, 731–738.
- Yang S.T., Shin S.Y., Hahm K.S., Kim J.I., **2006**, Different modes in antibiotic action of tritrypticin analogs, cathelicidin-derived Trp-rich and Pro / Arg-rich peptides, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758:24, 1580–1586.

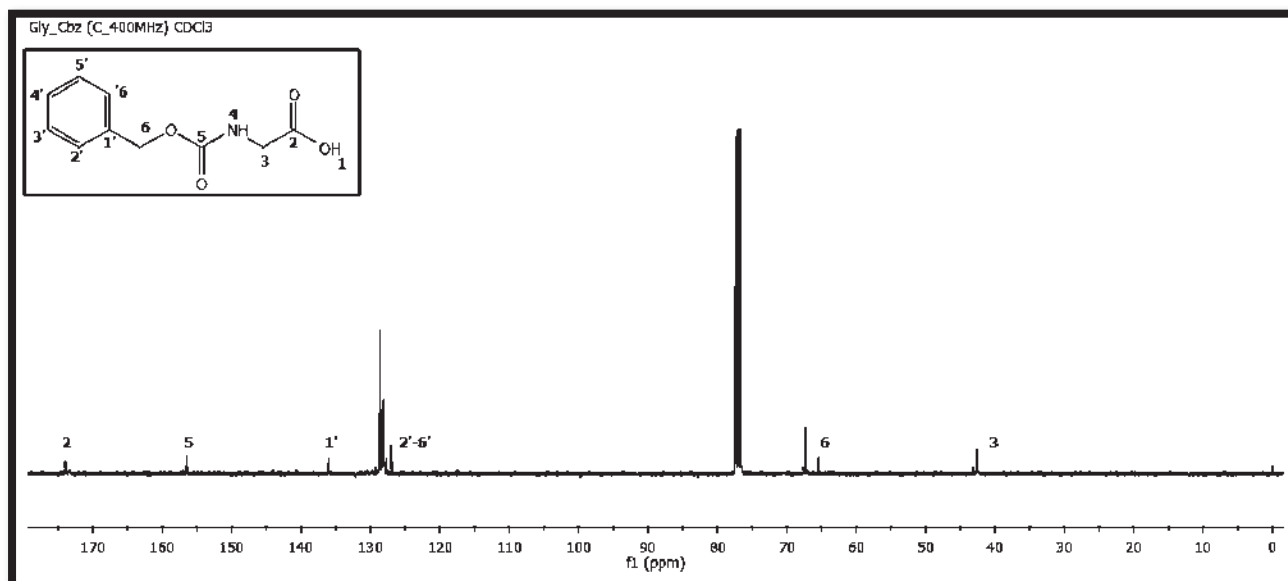
- Yeaman M.R., Yount N.Y., **2003**, Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance, *Pharmacological Reviews*, 55:3, 27–55.
- Yount Y. N., Bayer S. A., Xiong Q. Y., Yeaman R. M., **2006**, Advances in Antimicrobial Peptide Immunobiology, *Biopolymers (Peptide Science)*, 84:1, 435–458.
- Yukinori K., Kyuichi M., Hideo H., **1996**, Interaction of quinolones with metal cations in aqueous solution, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 44:2, 1425–1430.
- Zhanel G.G., Homenuik K., Nichol K., Noreddin A., Vercaigne L., Embil J., **2004**, The glycyclines: a comparative review with the tetracyclines, *Drugs*, 64:4, 63–88.
- Zuckerman J.M., **2004**, Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin, *Infectious Disease Clinics of North America*, 18:3, 621–649.

12. COLECCIÓN DE ESPECTROS

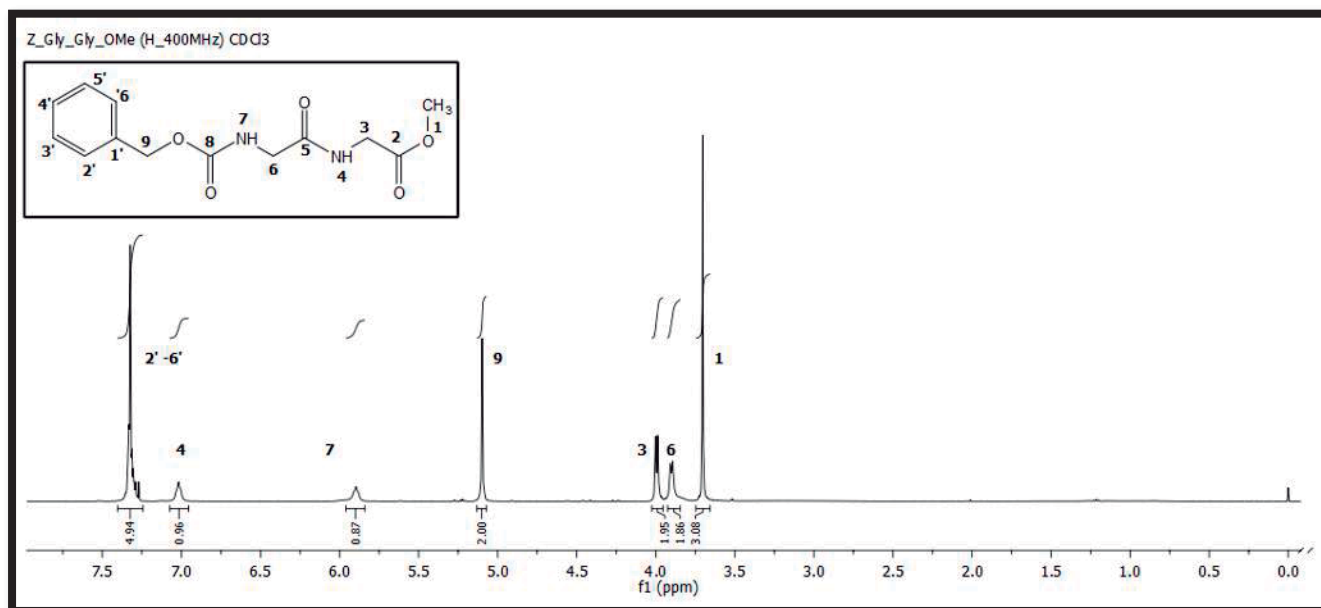
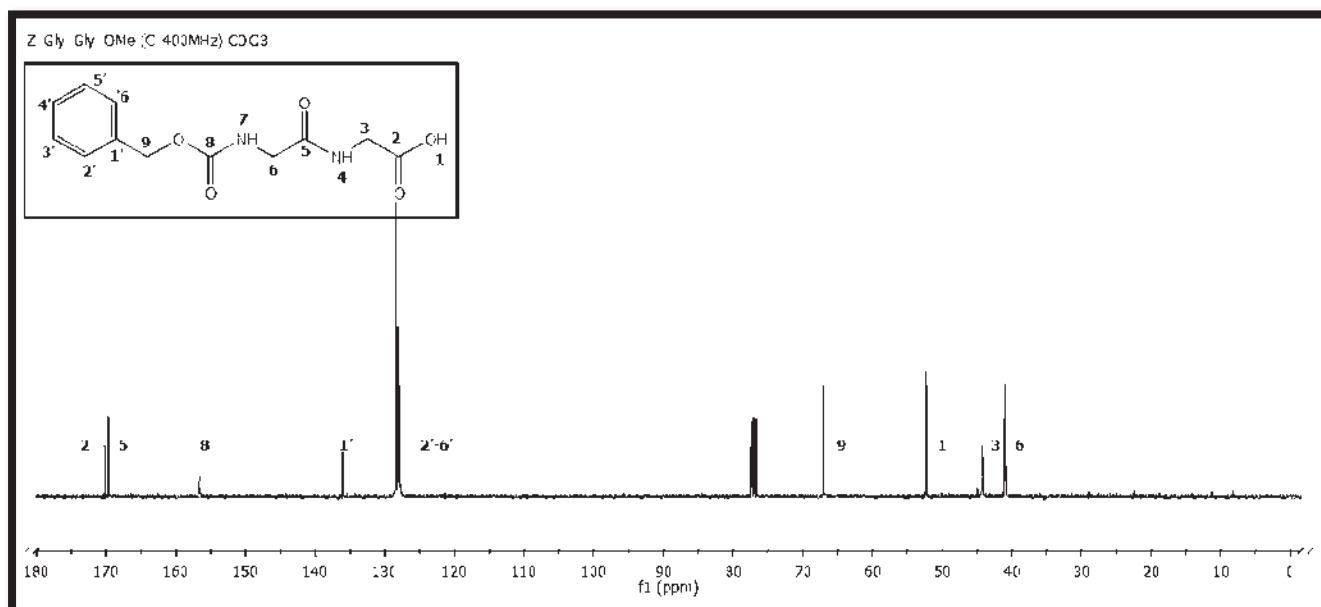
A continuación se presentan algunos espectros de RMN- ^{13}C e ^1H obtenidos de cada compuesto sintetizado.

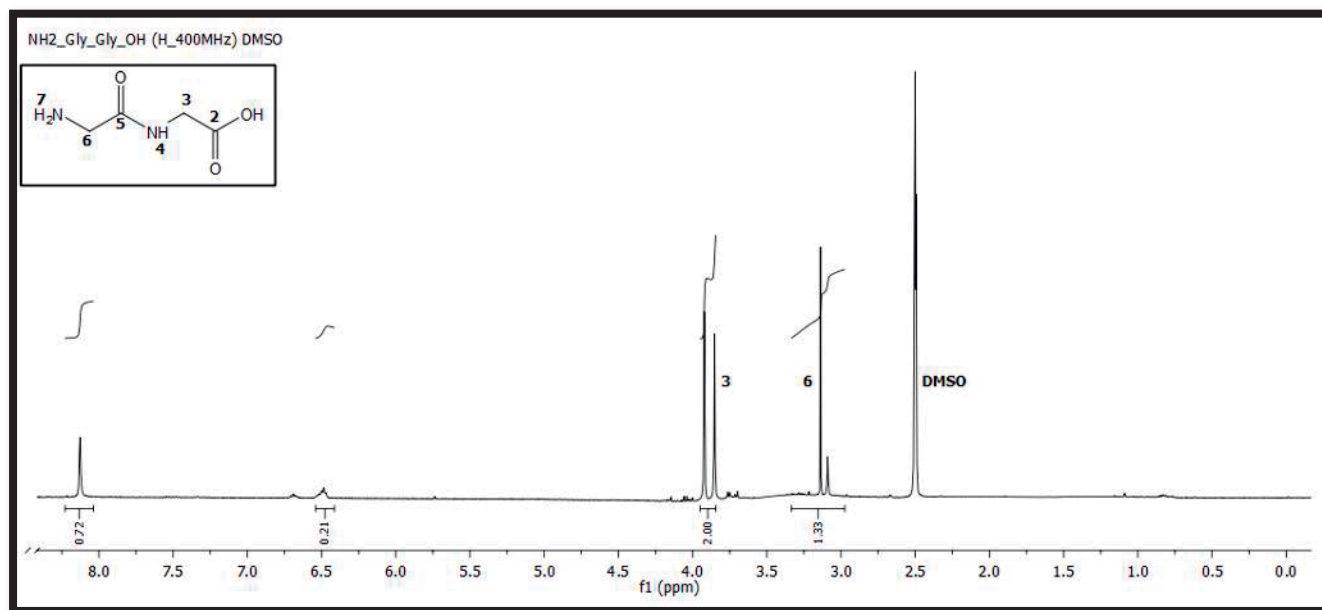
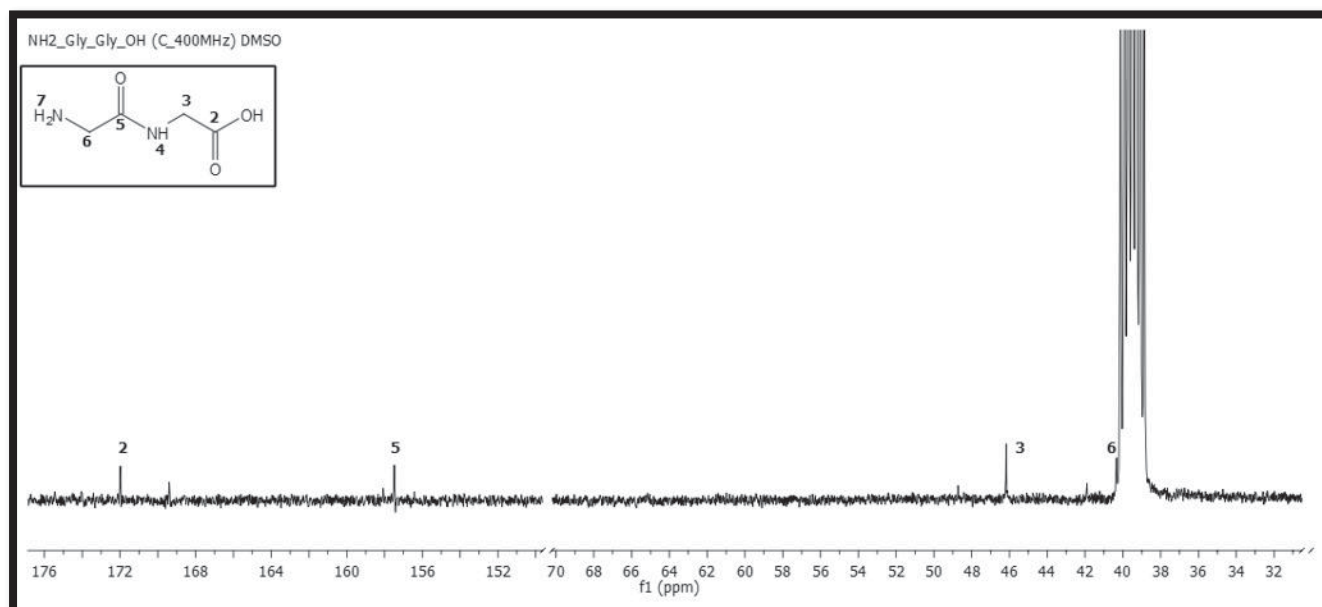


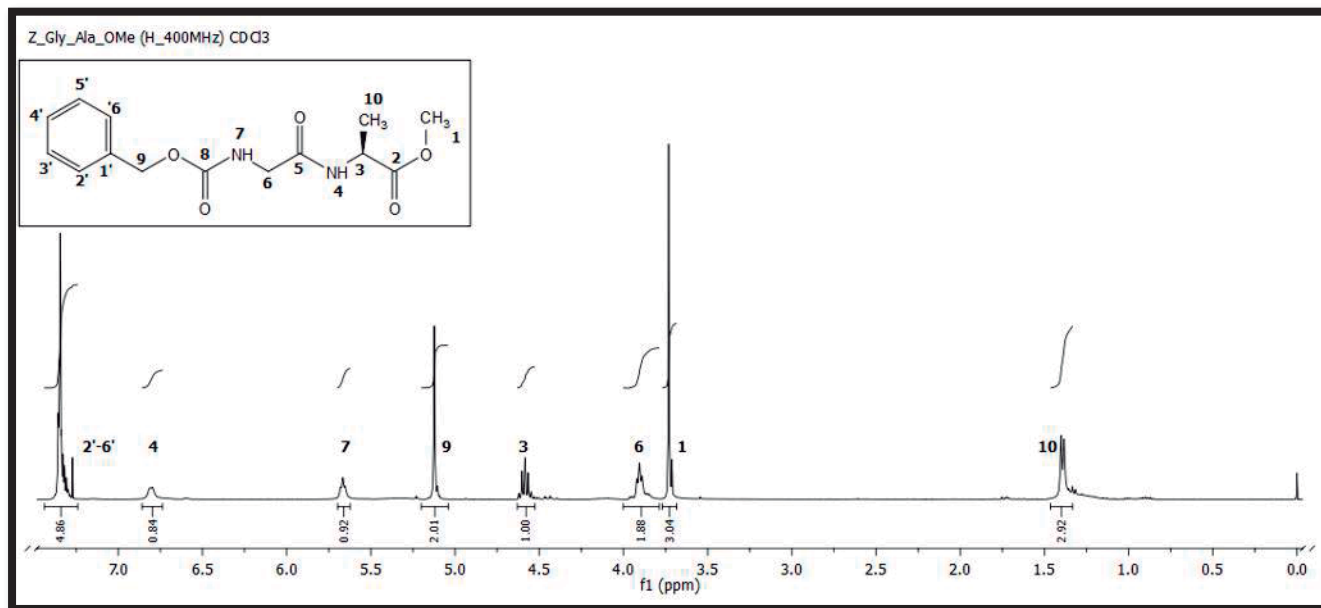
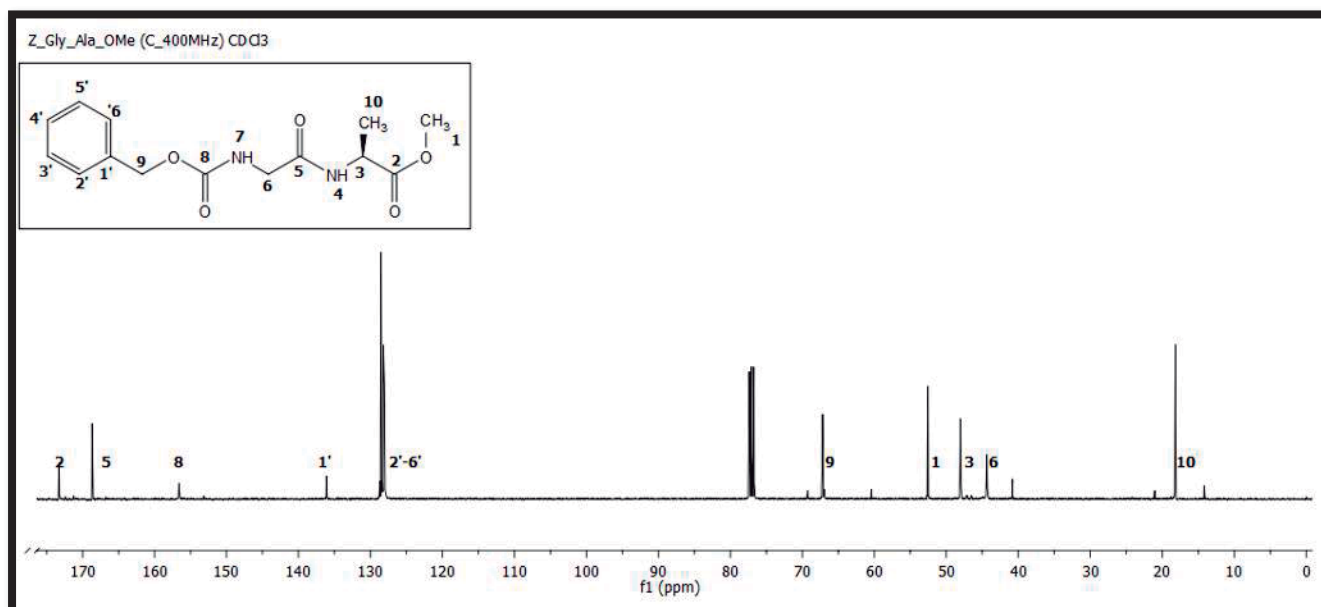
Espectro de RMN- ^1H de **1a** a 400 MHz en CDCl₃

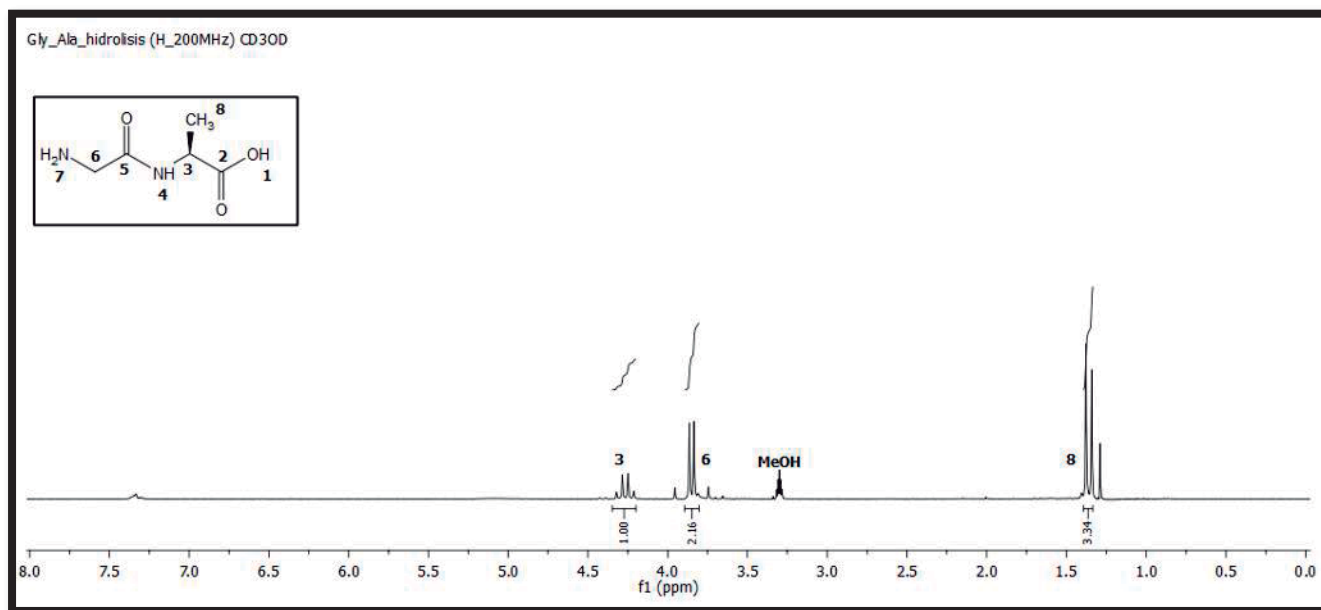
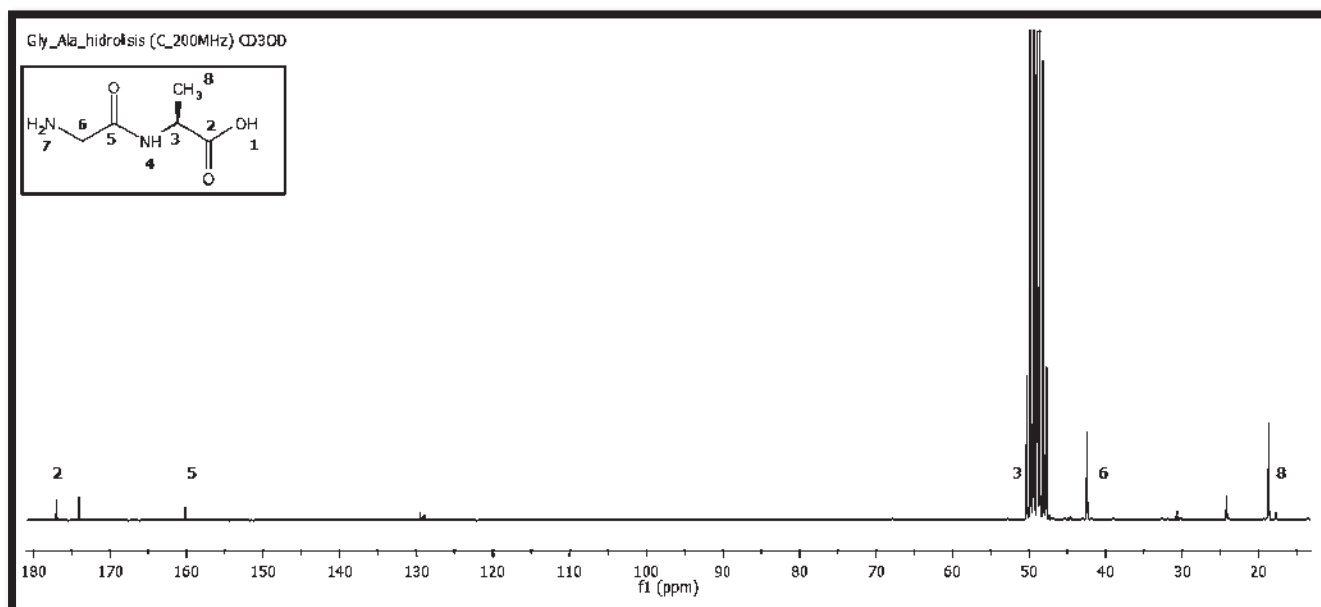


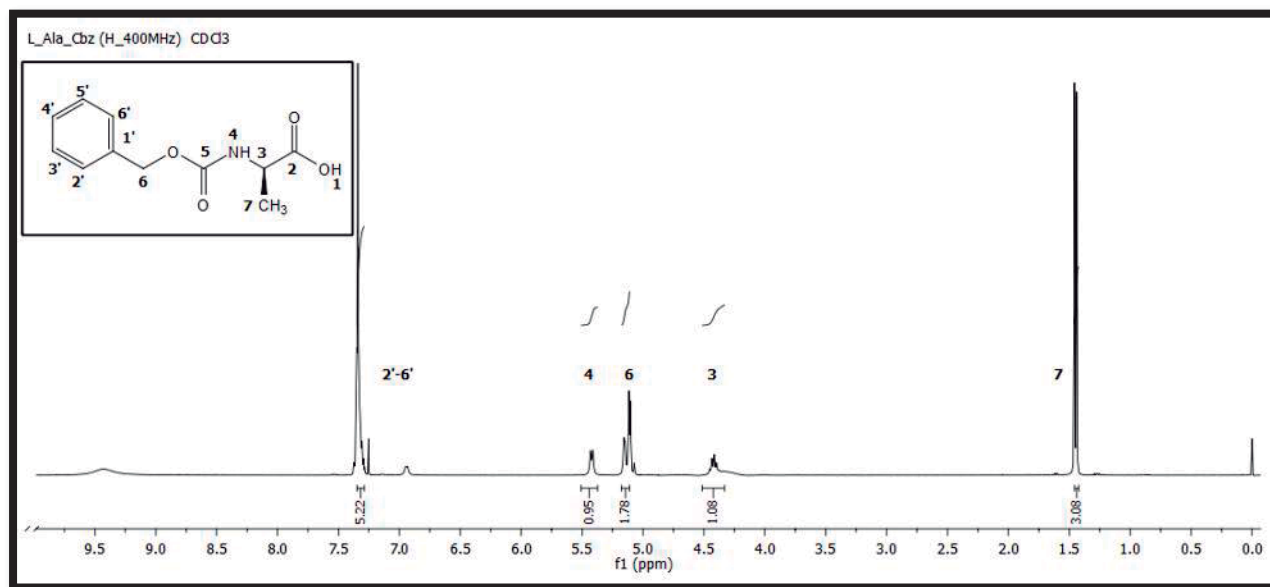
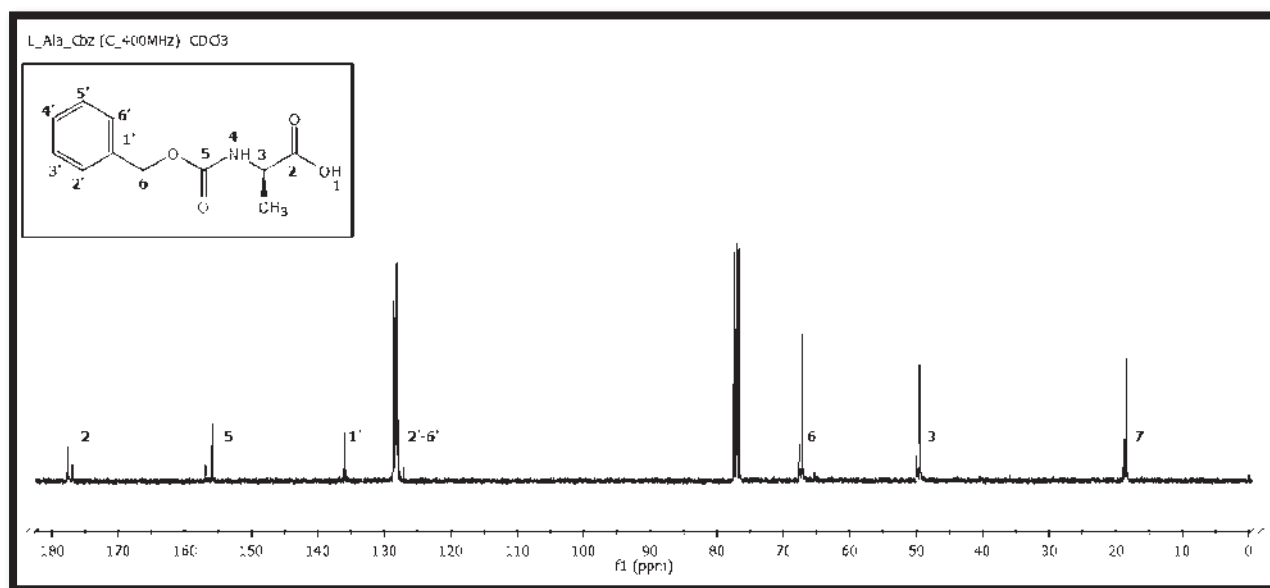
Espectro de RMN- ^{13}C de **1a** a 400 MHz en CDCl₃

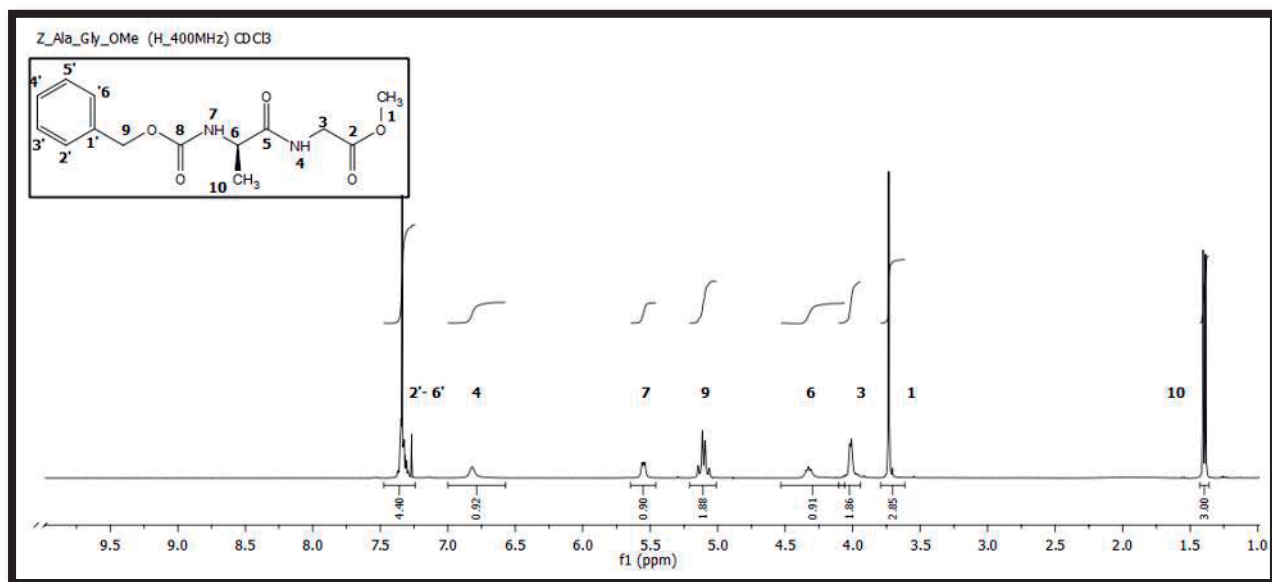
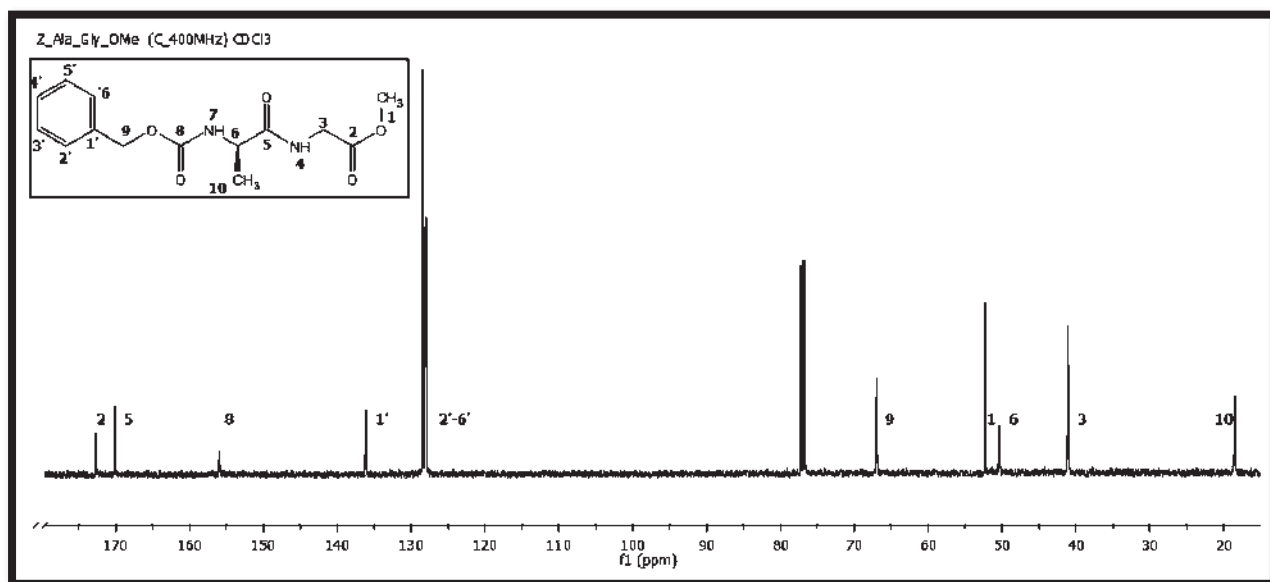
Espectro de RMN-¹H de **7** a 400 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **7** a 400 MHz en CDCl₃

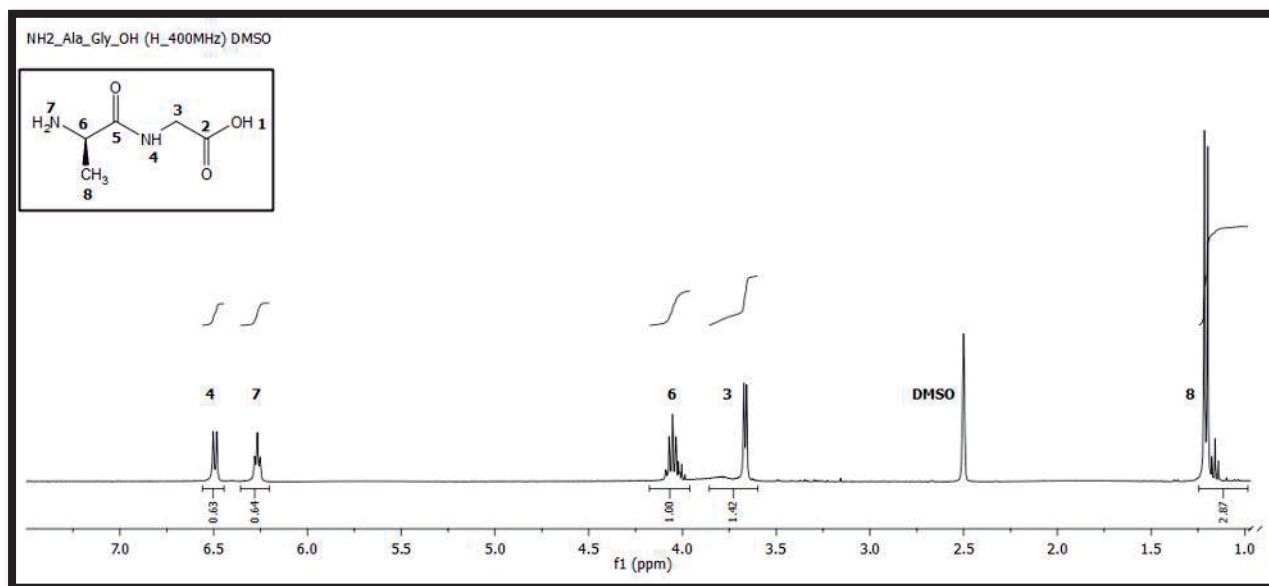
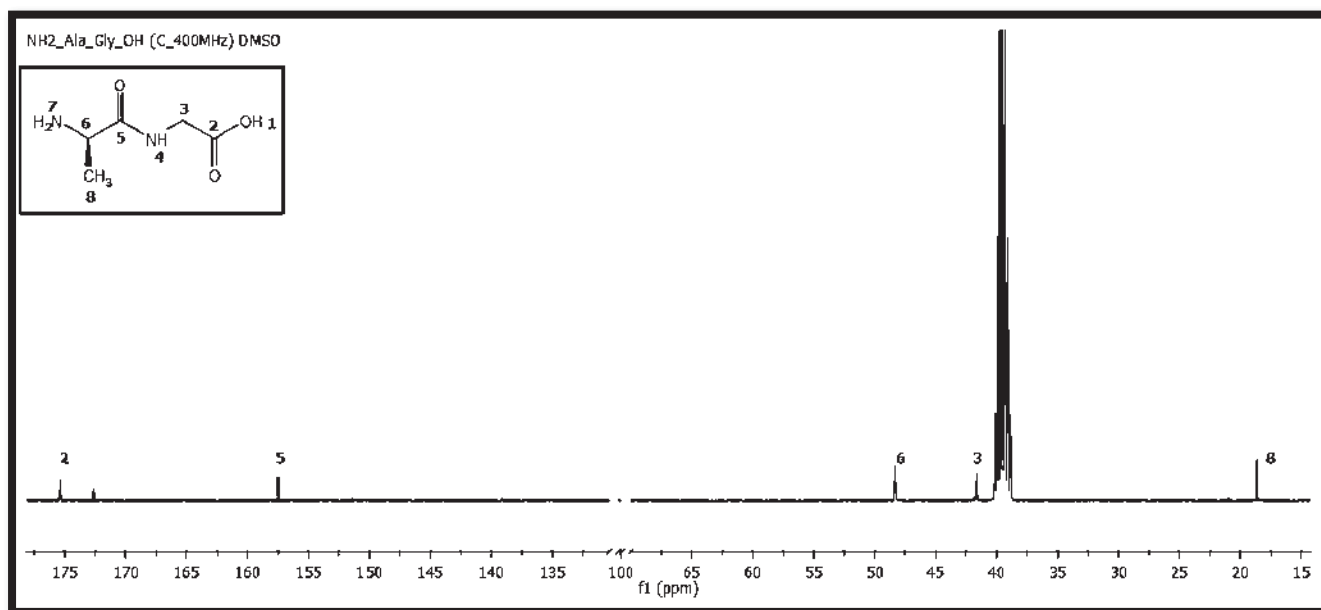
Espectro de RMN-¹H de **17** a 400 MHz en DMSOEspectro de RMN-¹³C de **17** a 400 MHz en DMSO

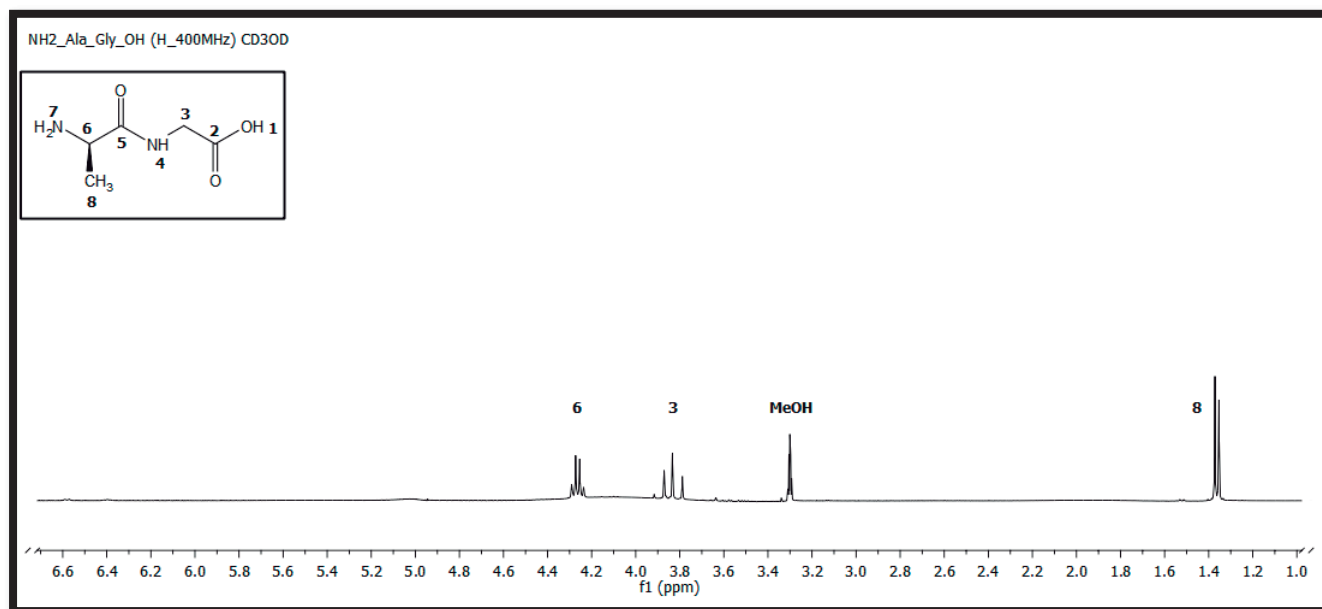
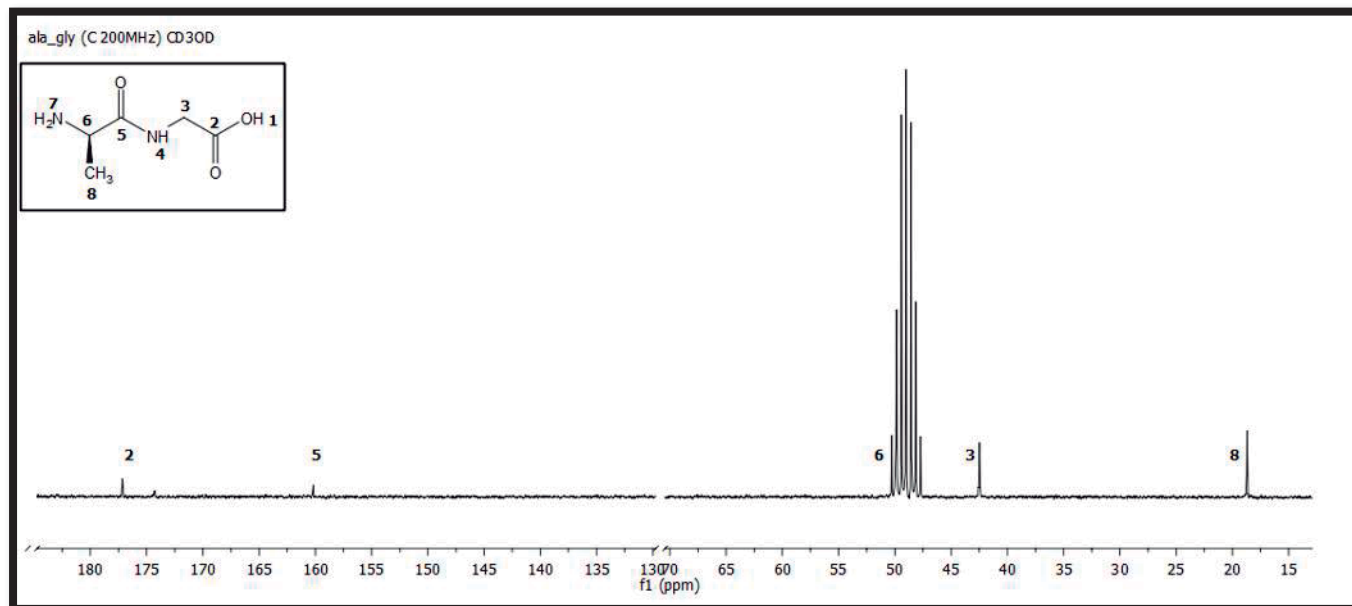
Espectro de RMN-¹H de **8** a 400 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **8** a 400 MHz en CDCl₃

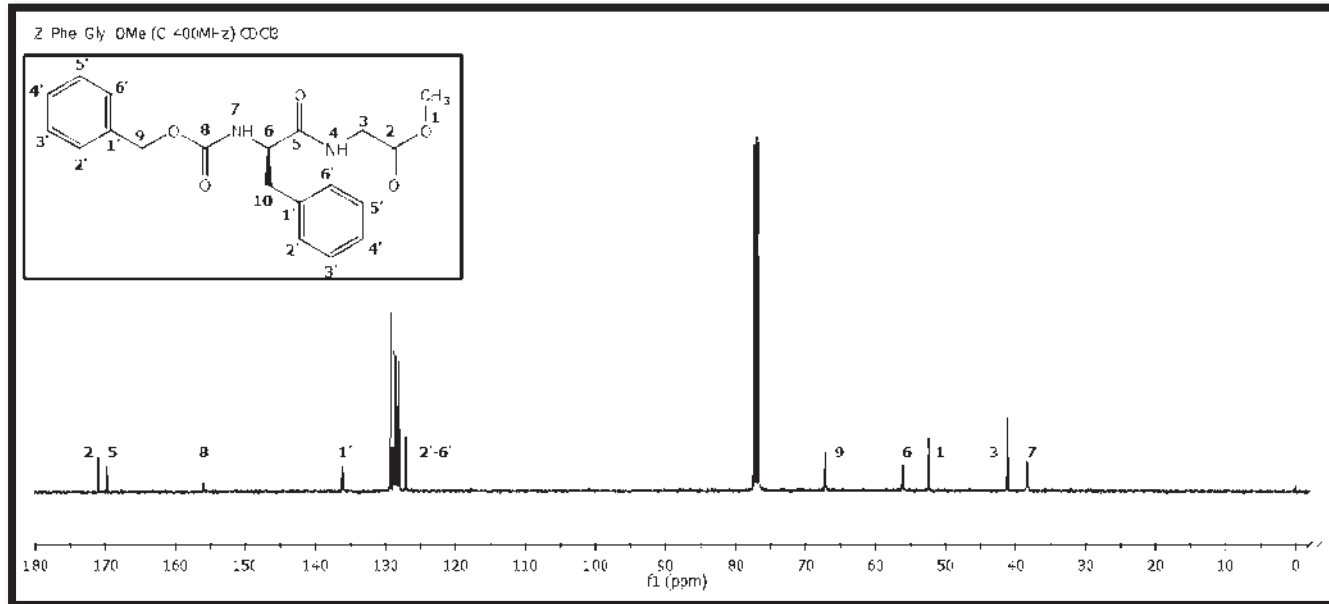
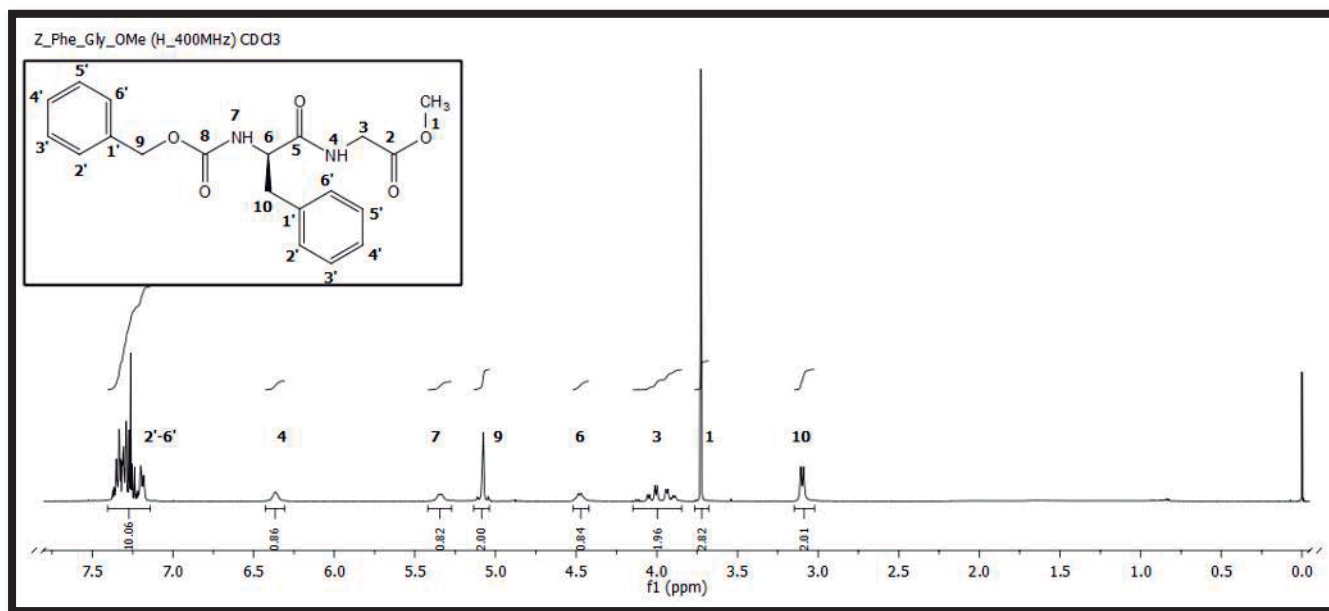
Espectro de RMN-¹H de **18** a 200 MHz en CD₃ODEspectro de RMN-¹³C de **18** a 200 MHz en CD₃OD

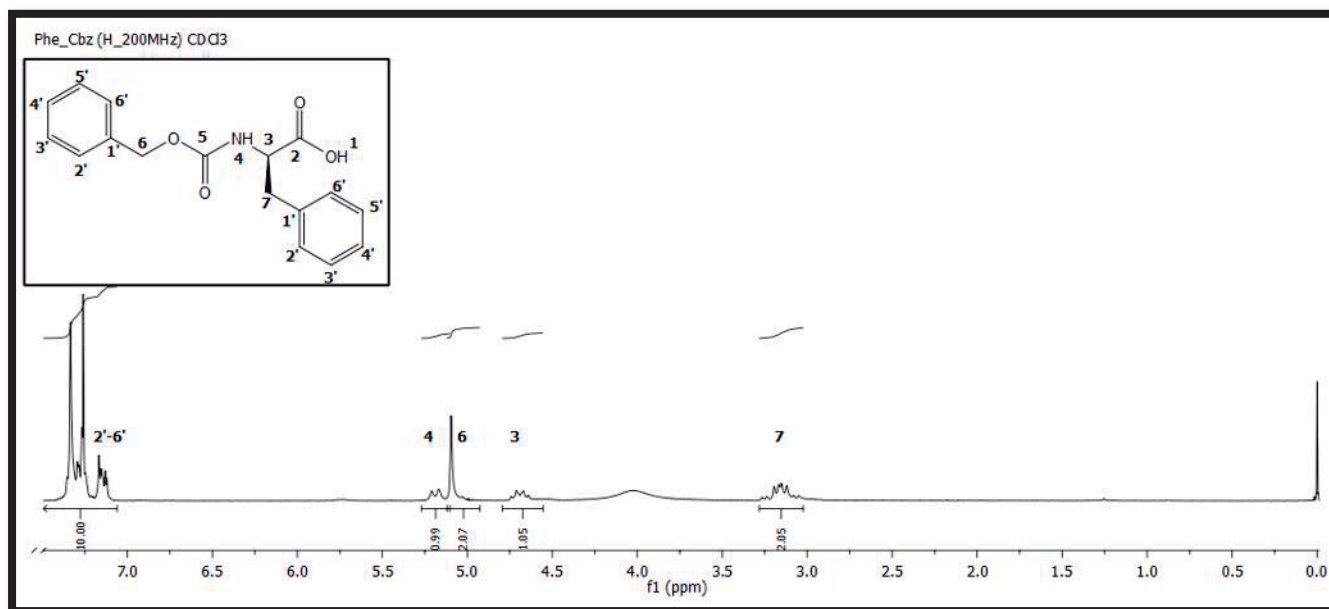
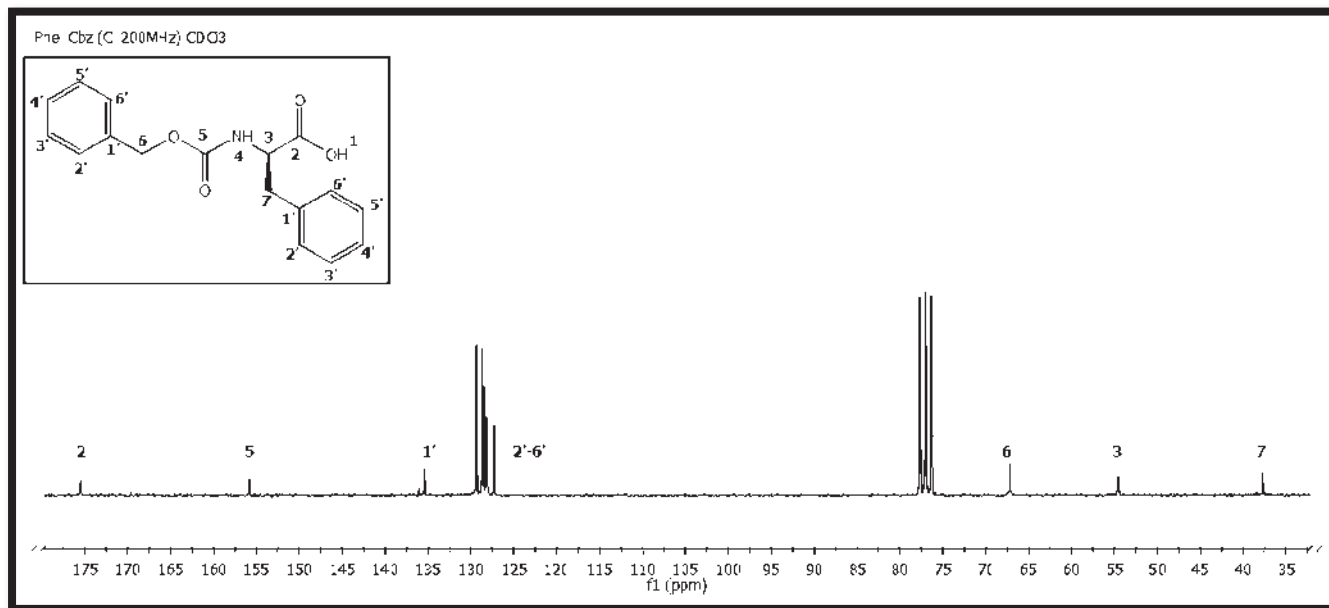
Espectro de RMN-¹H de **2a** a 400 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **2a** a 400 MHz en CDCl₃

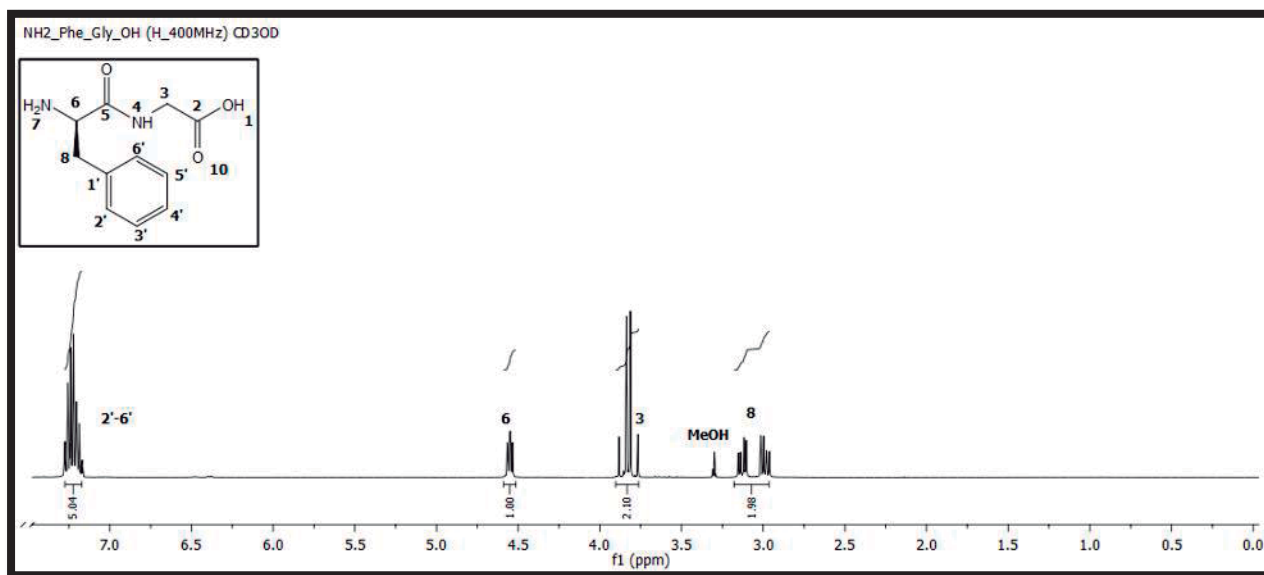
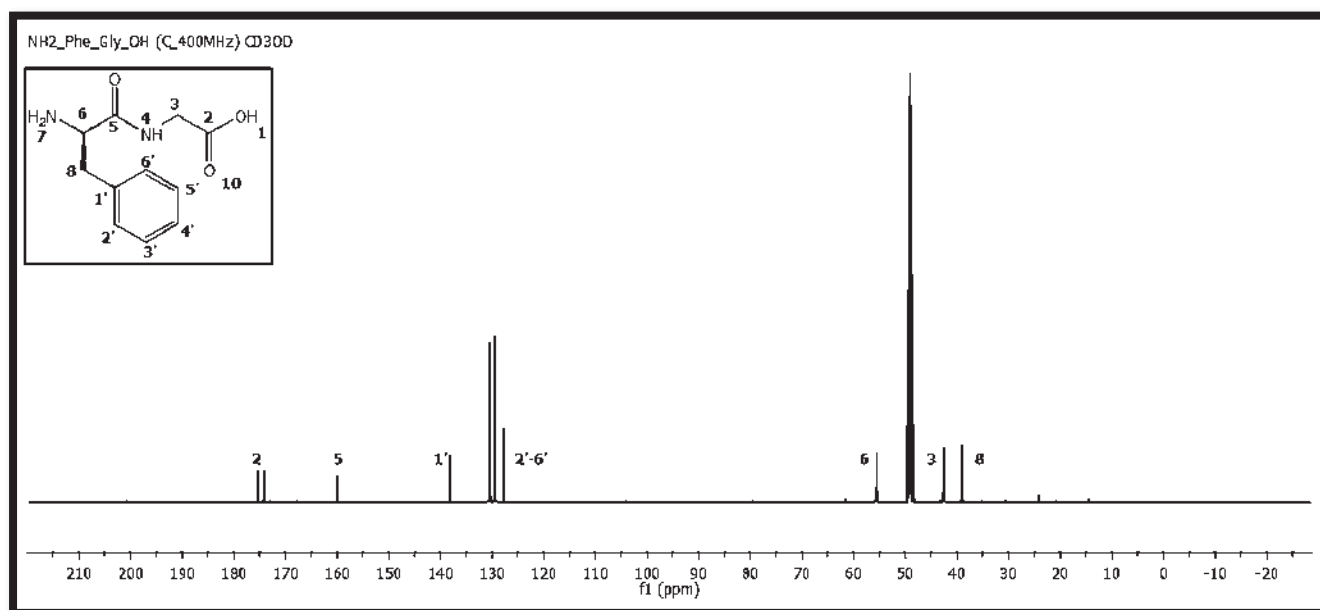
Espectro de RMN-¹H de **9** a 400 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **9** a 400 MHz en CDCl₃

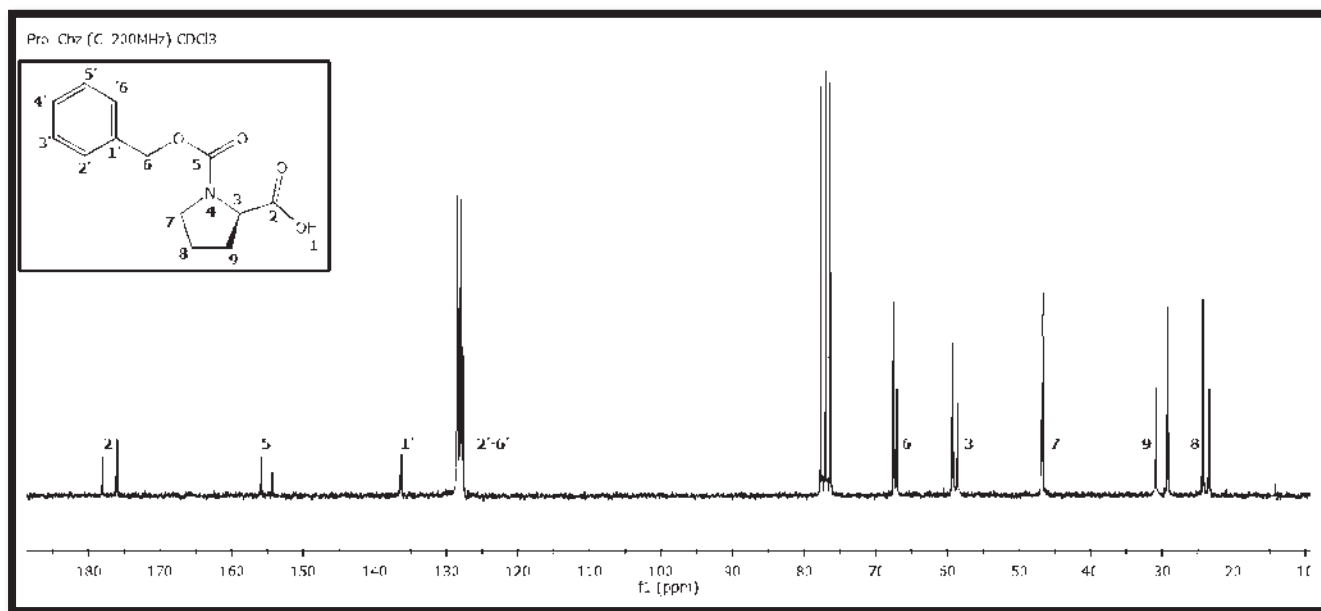
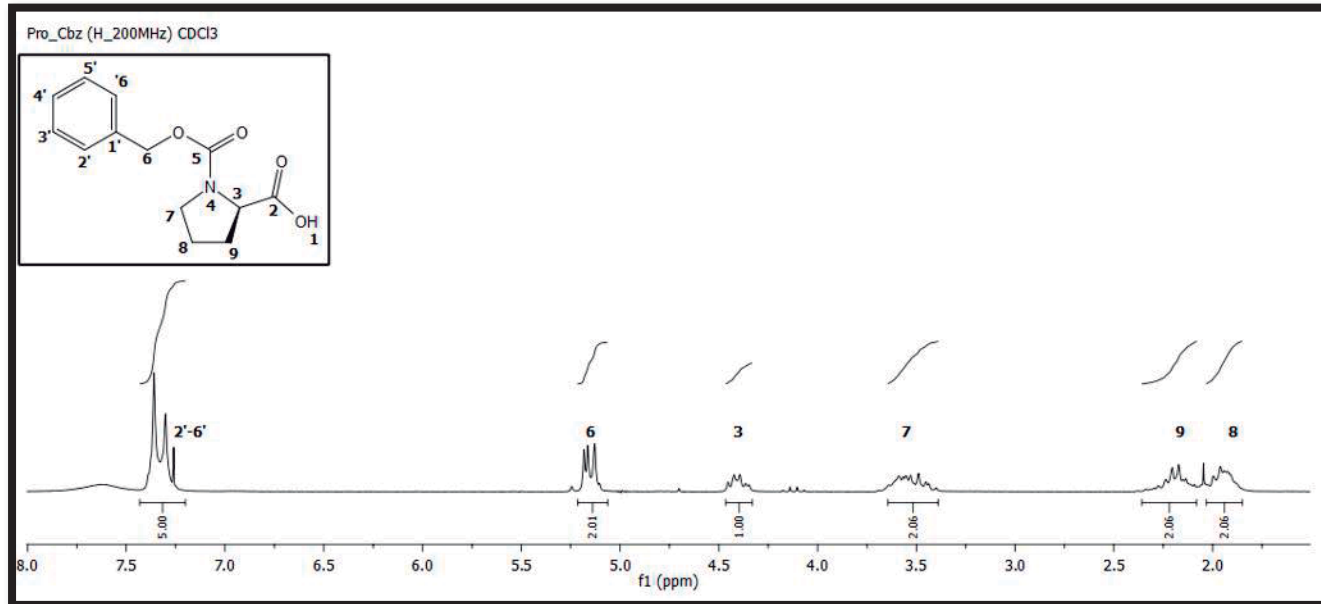
Espectro de RMN-¹H de **19** a 400 MHz en DMSOEspectro de RMN-¹³C de **19** a 400 MHz en DMSO

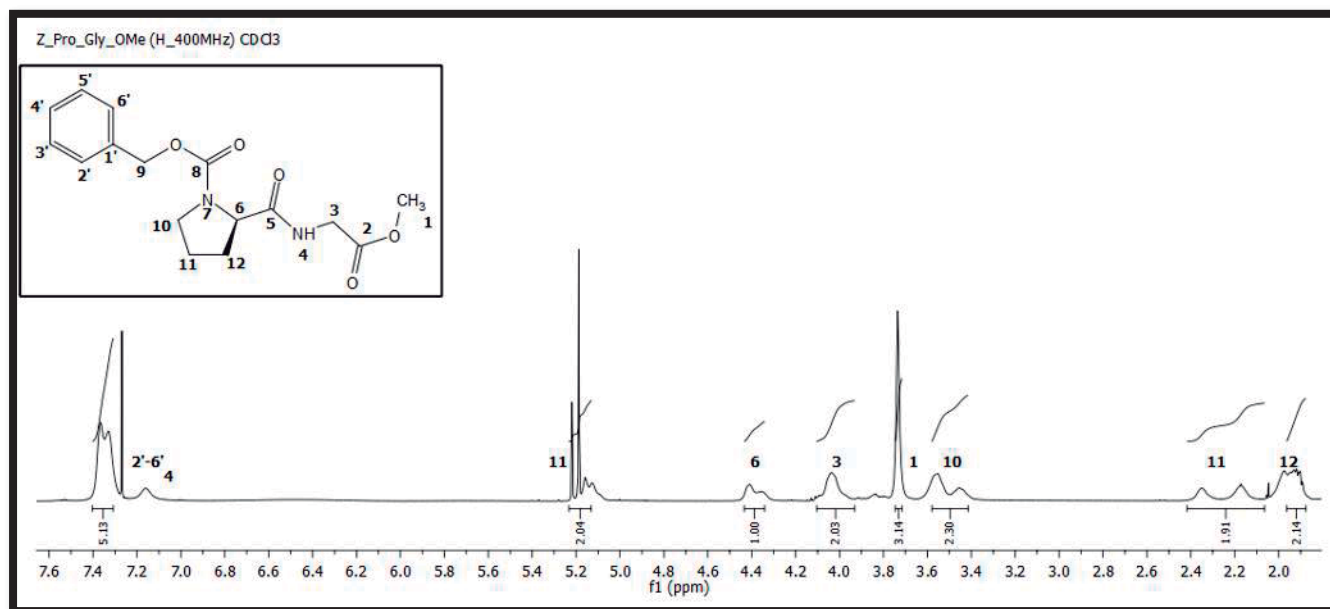
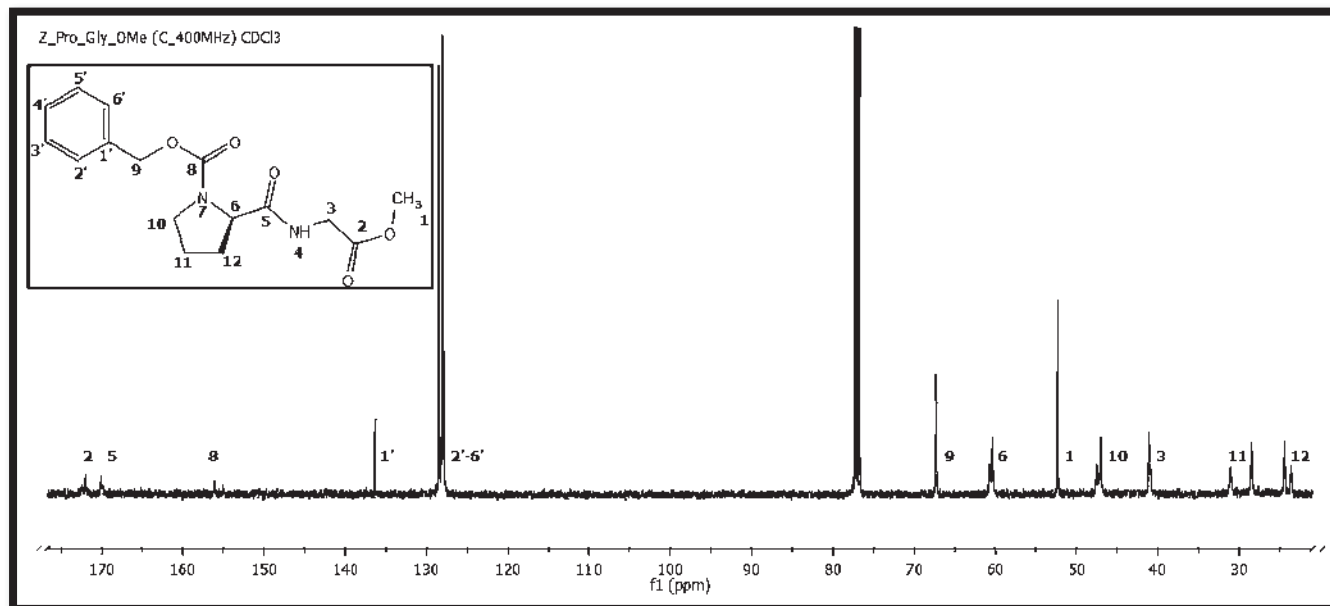
Espectro de RMN-¹H de **19** a 400 MHz en CD₃ODEspectro de RMN-¹³C de **19** a 200 MHz en CD₃OD

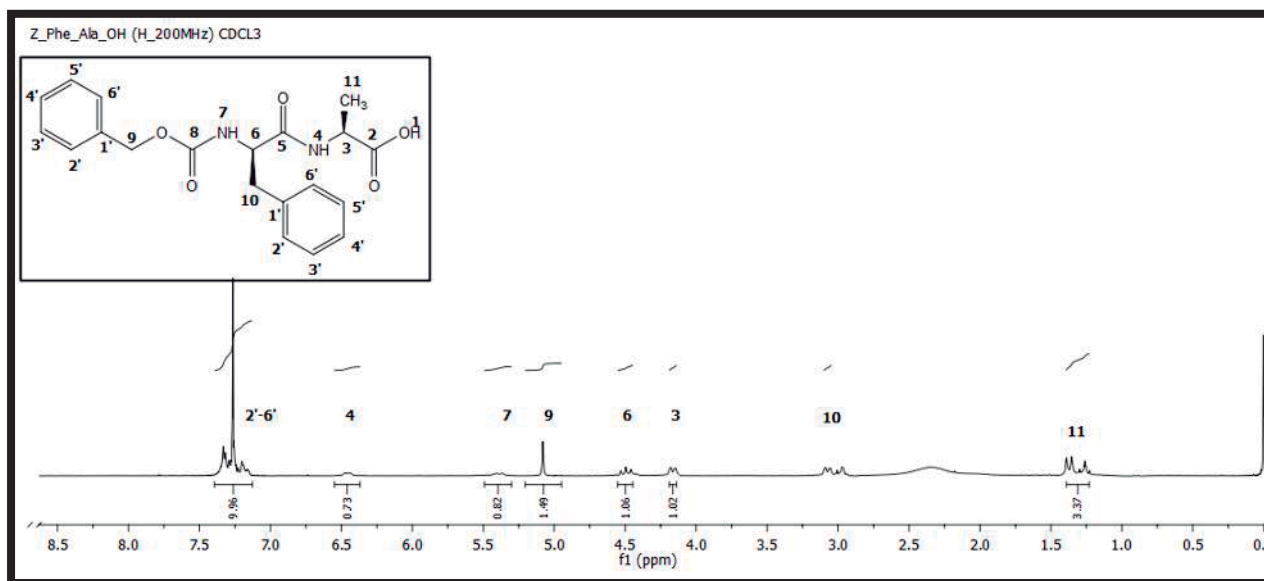
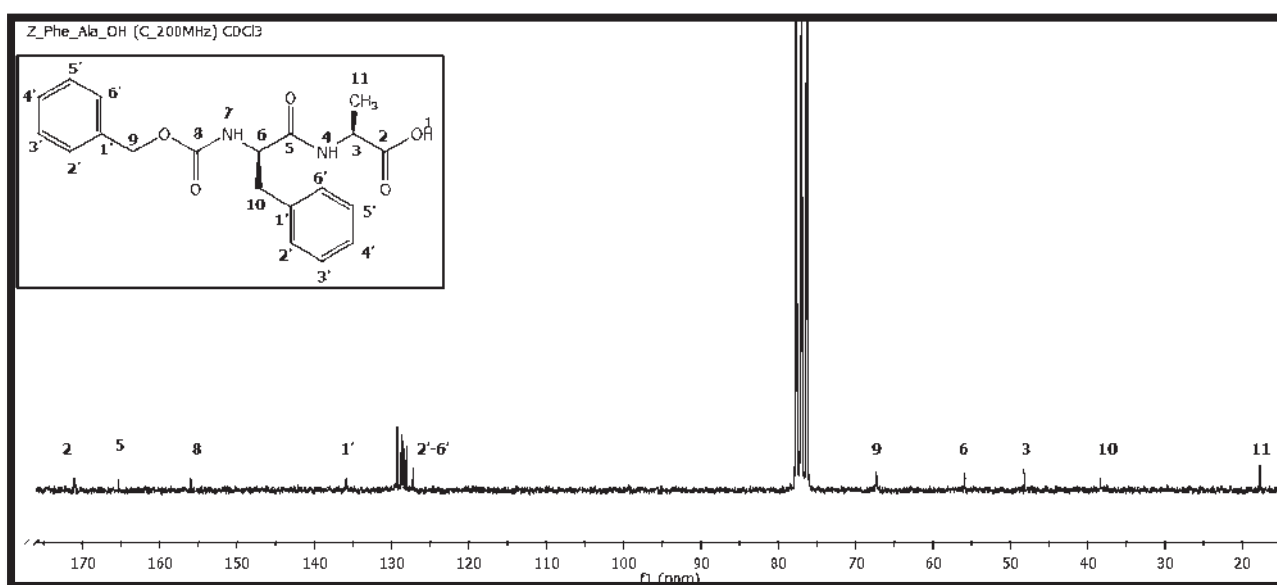


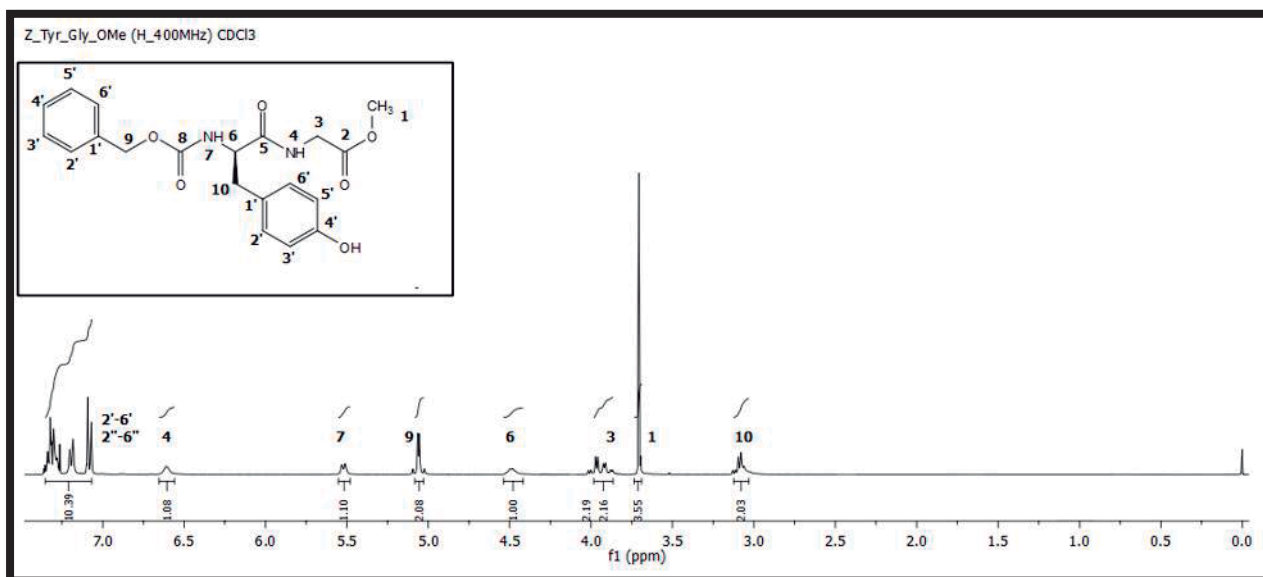
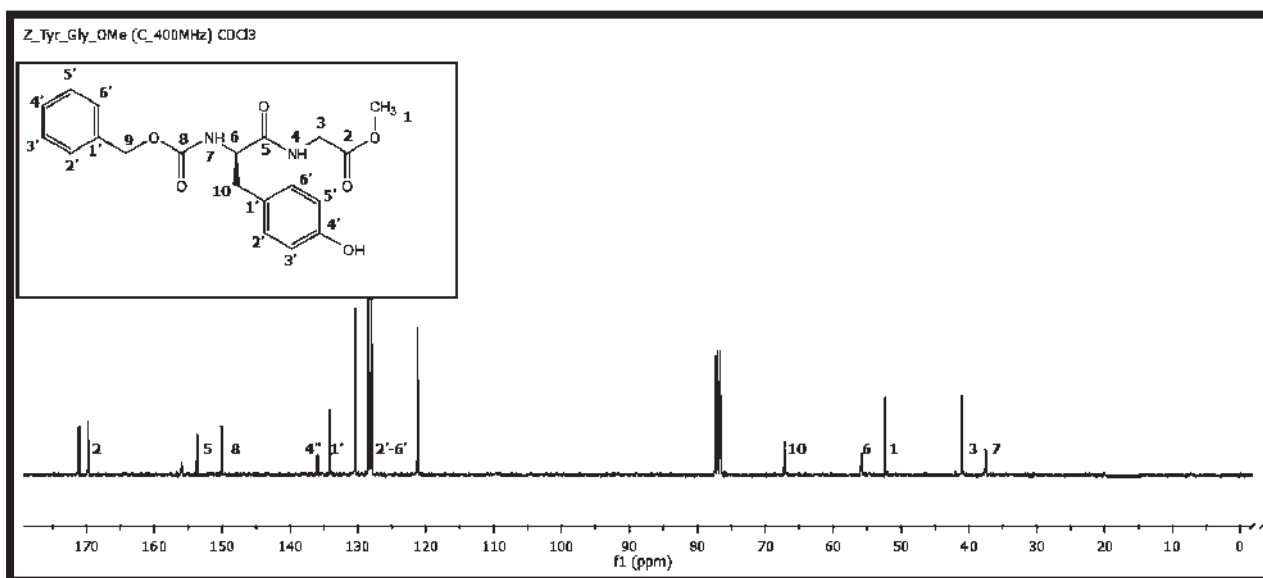
Espectro de RMN-¹H de **3a** a 200 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **3a** a 200 MHz en CDCl₃

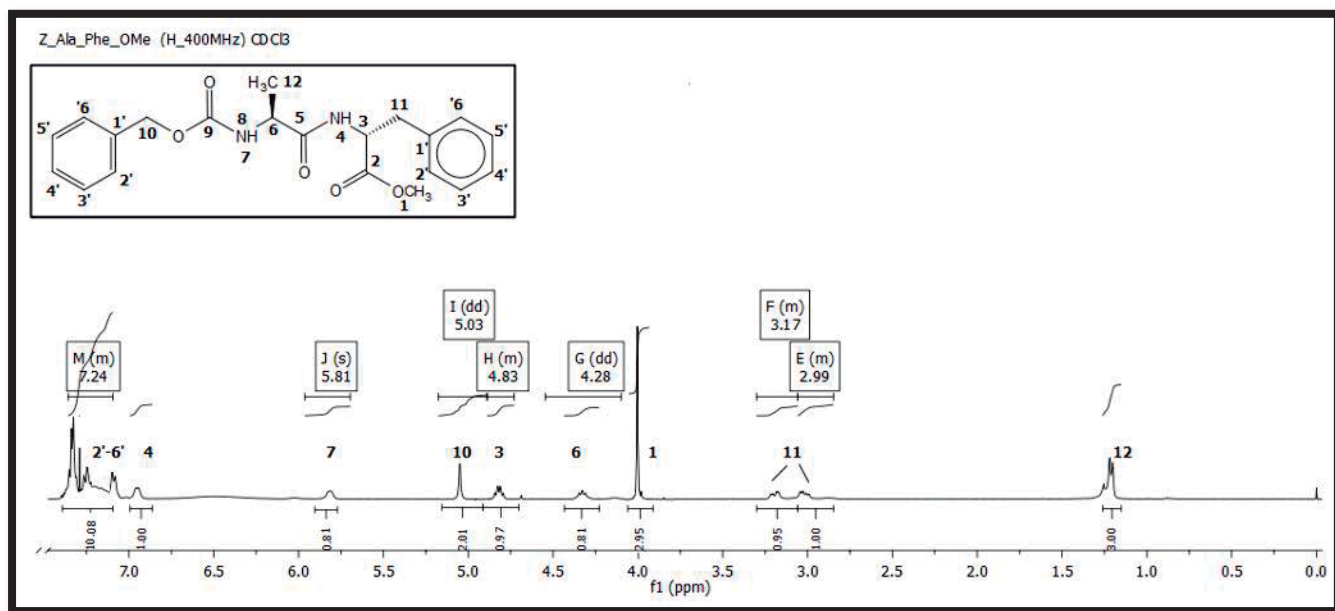
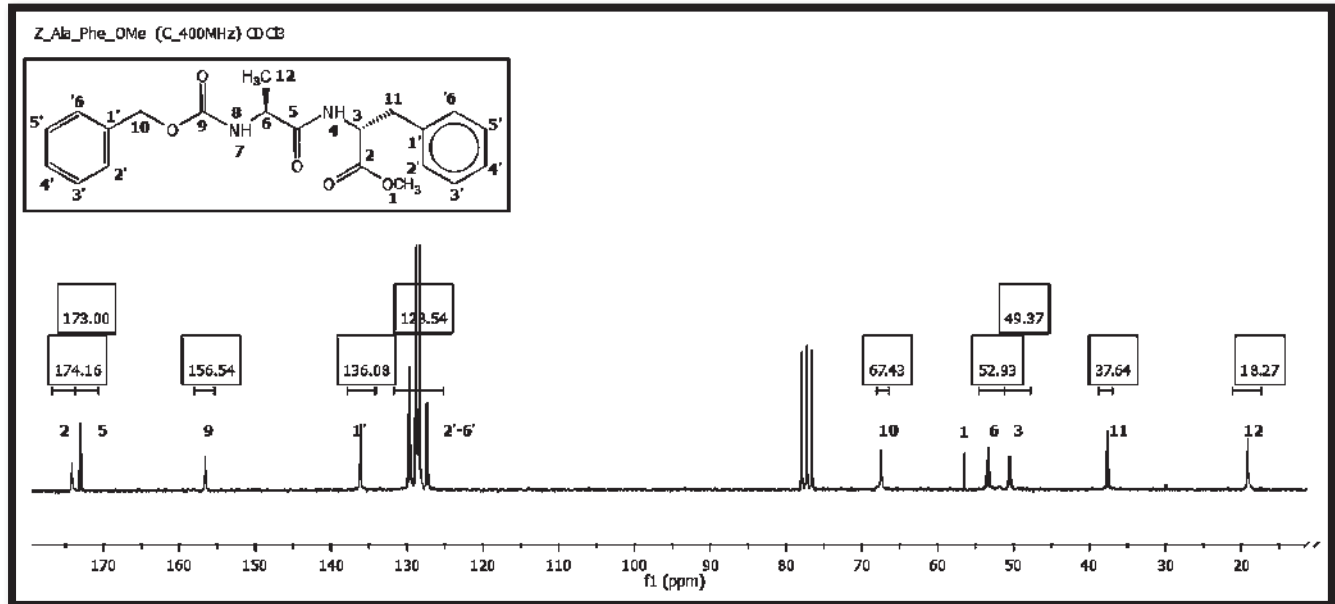
Espectro de RMN-¹H de **22** a 400 MHz en CD₃ODEspectro de RMN-¹³C de **22** a 400 MHz en CD₃OD

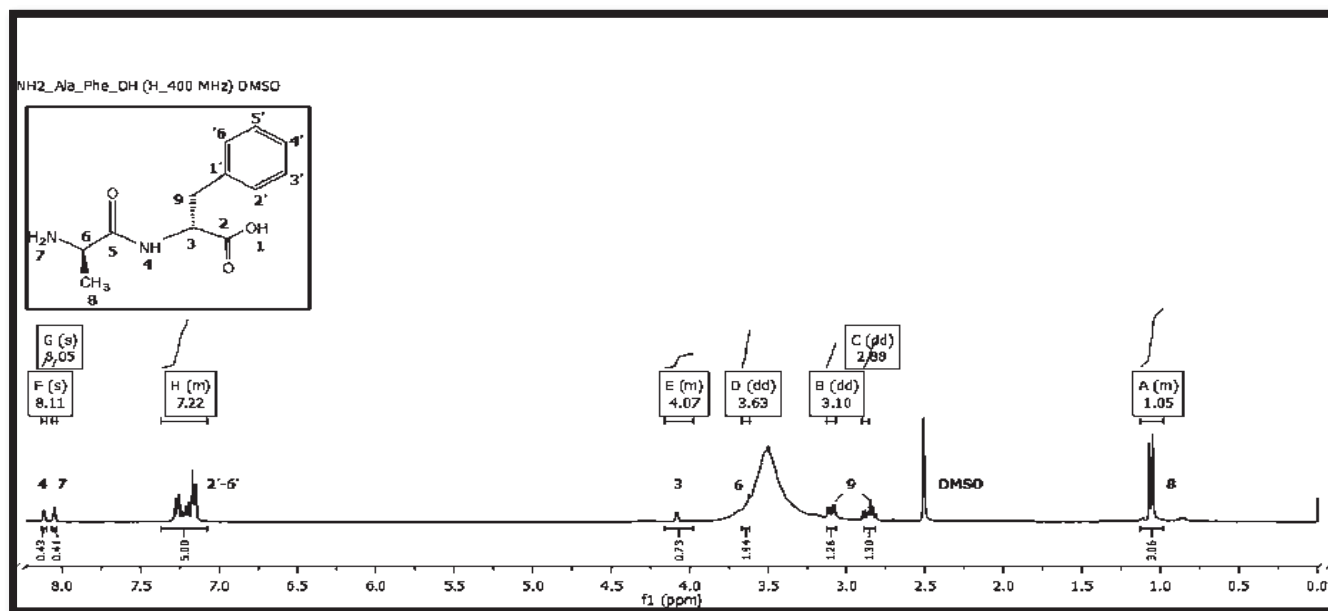
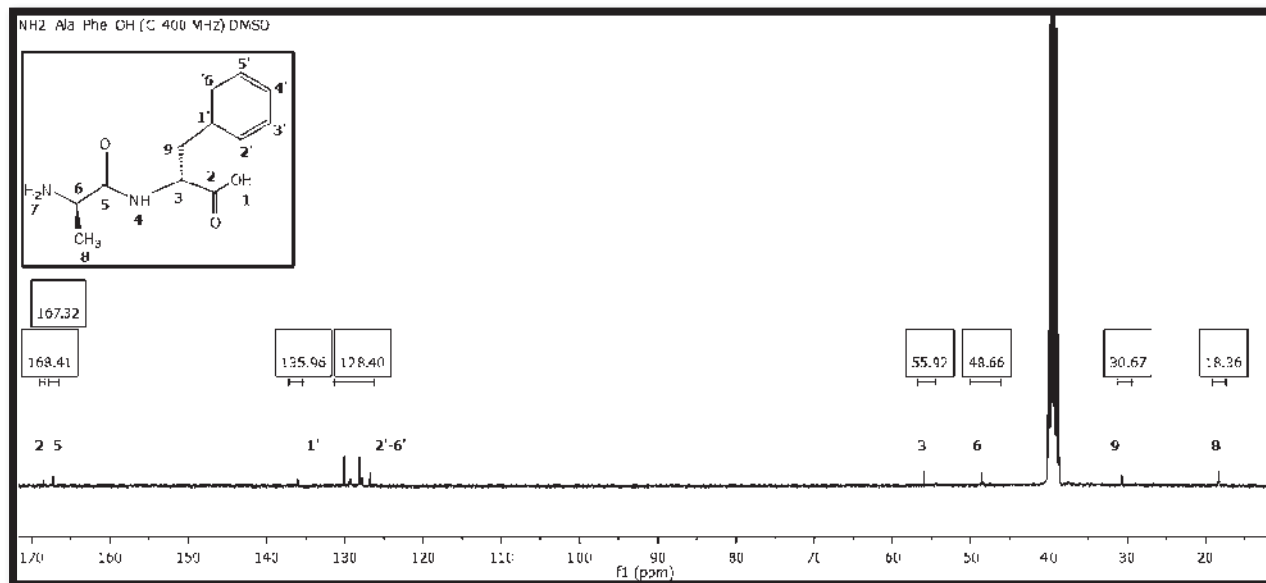
Espectro de RMN-¹H de **6a** a 200 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **6a** a 200 MHz en CDCl₃

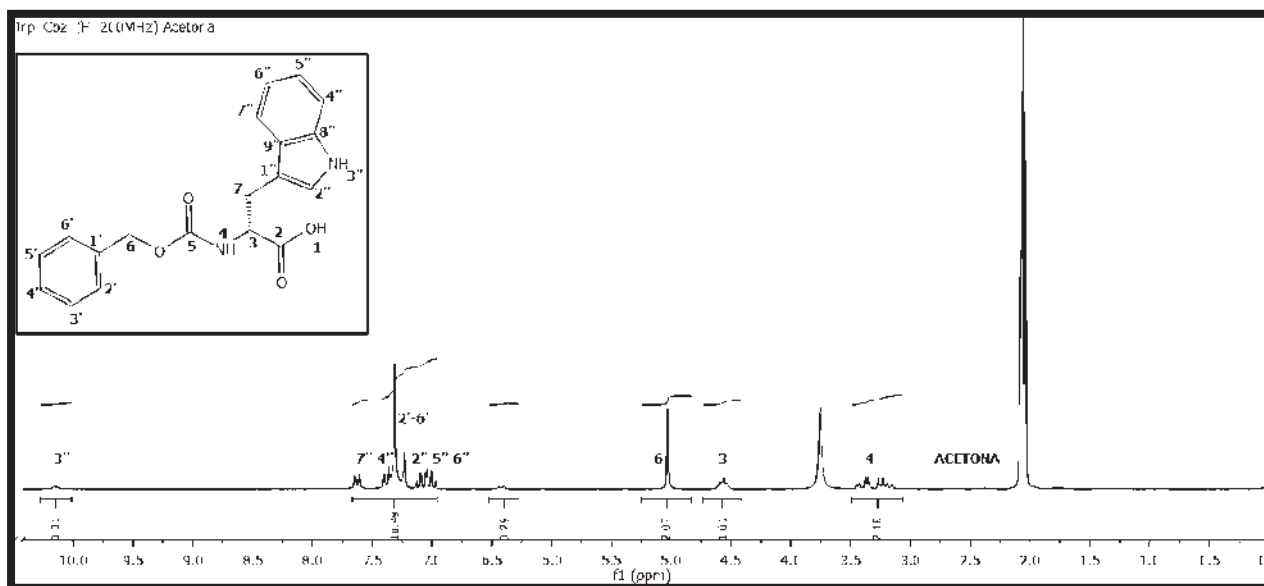
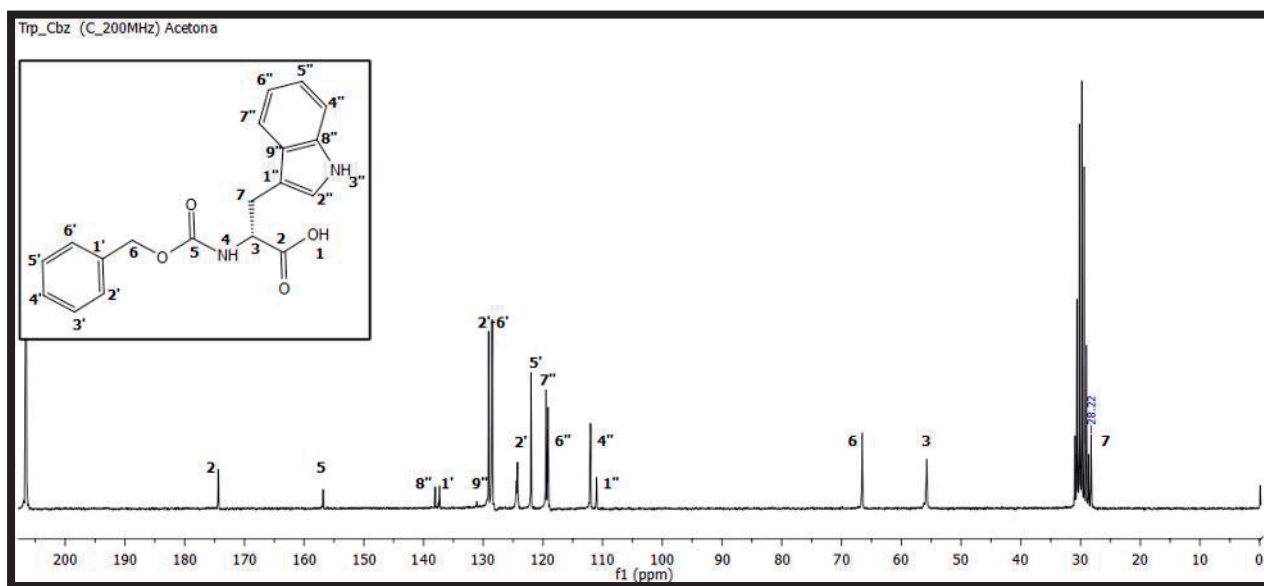
Espectro de RMN-¹H de **10** a 400 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **10** a 400 MHz en CDCl₃

Espectro de RMN-¹H de **23** a 200 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **23** a 200 MHz en CDCl₃

Espectro de RMN-¹H de **15** a 400 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **15** a 400 MHz en CDCl₃

Espectro de RMN-¹H de **14** a 400 MHz en CDCl₃Espectro de RMN-¹³C de **14** a 400 MHz en CDCl₃

Espectro de RMN-¹H de **24** a 400 MHz en DMSOEspectro de RMN-¹³C de **24** a 400 MHz en DMSO

Espectro de RMN-¹H de **5a** a 200 MHz en Acetona deuteradaEspectro de RMN-¹³C de **5a** a 200 MHz en Acetona deuterada

