

Artículo Científico

INTERVENCION DE LA RESONANCIA ELECTRONICA Y DE FENOMENOS DE SUPERFICIE EN LA ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS

por
Eugenio Riesz

Director del Laboratorio de Química de la Facultad de Humanidades y Ciencias

(Según comunicaciones presentadas al II Congreso Internacional de Bioquímica, París, Julio de 1952, y conferencia dictada en ocasión del Congreso anual de la Asociación Francesa para el Progreso de las Ciencias, Cannes, Setiembre de 1952).

Continuación (1)

Según lo expuesto en la primera parte de este artículo, los antibióticos, por su actividad de superficie, una vez fijados a la membrana de un microbio, pueden penetrar en el interior de éste e interferir, electrónicamente, en el metabolismo microbiano.

Por esta razón, nos pareció necesario estudiar la estructura electrónica de los antibióticos según el grupo al que pertenecen.

Refiriéndonos, primero, a las sulfamidas, hemos, desde 1937, tratado de aclarar su estructura electrónica, estudiando junto con R. Freymann (Sorbona, París) especialmente su espectro de absorción en el infrarrojo. De estas investigaciones, resultó que las sulfamidas no mostraron la banda característica del grupo OH, excluyendo así la fórmula IV para ellas. Pero, también, la banda característica del grupo N-H (con N trivalente) apareció muy debilitada en este espectro, de manera que una disposición según la fórmula V contribuye, probablemente muy poco en el sistema electrónico de las sulfamidas. Un compuesto de estructura electrónica V (no disociado) y también su sal alcalina VI (forma disociada), hubieran mostrado, normalmente, la banda característica del grupo N-H. El hecho sorprendente, encontrado por M. Freymann y P. Rumpf (2) de que las sales alcalinas de las sulfamidas mostraron de nuevo normalmente, la banda característica del grupo N-H, nos ha permitido interpretar de una manera adecuada estos fenómenos, que según las fórmulas V y VI quedan contradictorios. Para nuestra interpretación, nos sirvió otro fenómeno, encontrado ya, anteriormente por Job, M. y R. Freymann (3), que pudieron demostrar, que el enlace N-H, en el caso de tratarse de un nitrógeno tetra-coordinado con una carga positiva, no muestra más su banda característica en el espectro infrarrojo de absorción. Estos

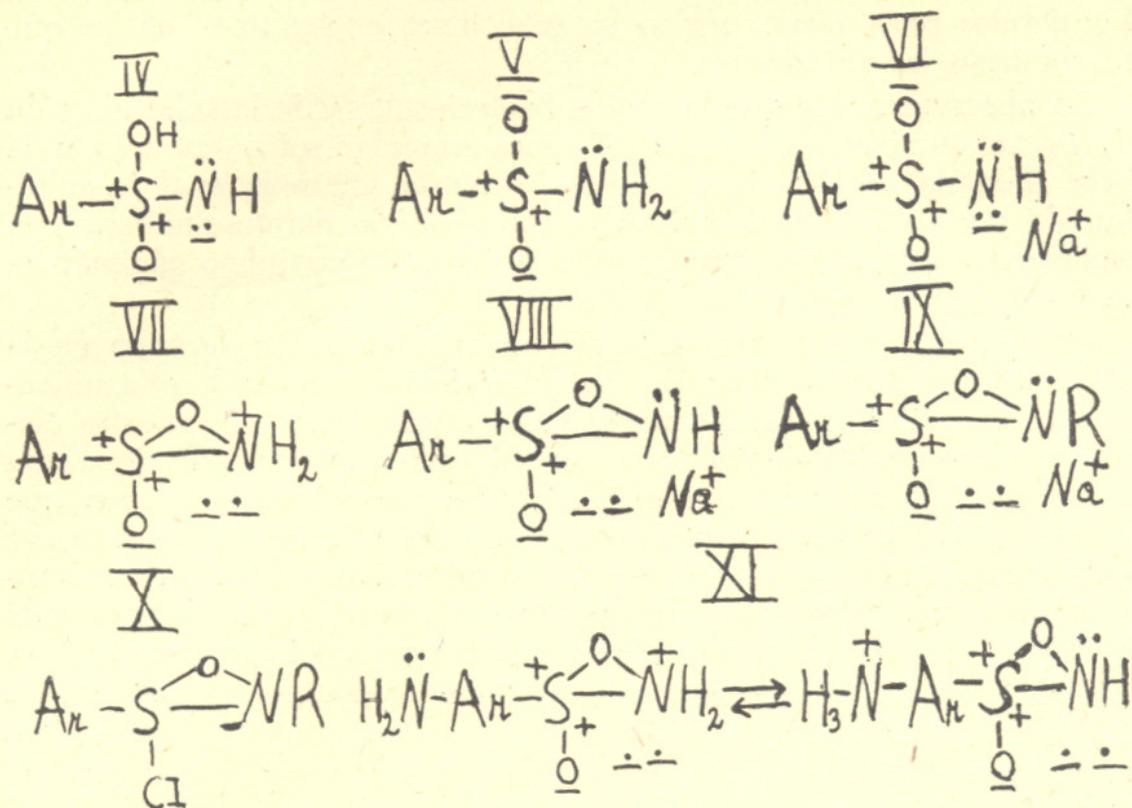


Fig. 1

antecedentes, nos han llevado a interpretar una sulfamida no disociada, según la fórmula VII (con N tetracoordinado) y su sal alcalina disociada según la fórmula VIII (con N trivalente). Es significativo, que sulfamidas monosustituídas en el grupo amido, no muestran más, tampoco en su forma disociada (sales alcalinas), la banda característica del enlace N-H, lo que se explica perfectamente según la fórmula IX., en la cual no aparece más un H ligado a un N trivalente.

Estas fórmulas con el puente de oxígeno, están de acuerdo con la gran estabilidad de las sulfamidas contra la acción de ácidos y álcalis, y es interesante mencionar que, ya en 1930, dos investigadores: J. v. Braun y K. Weissbach (4) se han visto en la necesidad de adoptar para un derivado de las sulfamidas, obtenido por acción de PCl_5 sobre las mismas, una fórmula semejante (X).

Pero lo más característico de las fórmulas con puente de oxígeno, son los dos electrones disponibles, representando dos cargas negativas no localizadas en la molécula y, por esta razón, probablemente aptos para ser captados por fisuras electrónicas en otras moléculas que se aproximen bastante. Es nuestra opinión que este tipo de **electrones "disponibles"** de las sulfamidas, puede intervenir, en el traslado normal de electrones que ocurre entre las moléculas de otras sustancias; traslado que es, también, básico para el metabolismo biológico.

La acción de las sulfamidas consistiría pues, según nuestra opinión, en la intervención con sus electrones disponibles en el metabolismo microbiano. En las reacciones normales del metabolismo, dirigidas por enzimas, se trata principalmente de la síntesis de los metabolitos esenciales y de su transformación en forma encadenada, y nos

preguntamos pues, cuales serían las reacciones enzimáticas, en las que intervendrían las sulfamidas.

La observación de que la acción bacteriostática de la sulfanilamida (XI) es antagonizada por el ácido para-aminobenzoico condujo a la teoría, llamada de Woods y Fildes (5), teoría según la cual la sulfanilamida por su similitud molecular con el ácido para-aminobenzoico, desplazaría a este último, por competencia, en un complejo enzimático, que queda así anómalo.

Para nosotros, esta teoría, según la cual el factor decisivo en la acción de la sulfanilamida y de las sulfamidas en general sería únicamente la similitud molecular, no es satisfactoria, lo que demuestra claramente el comportamiento del ácido sulfanílico mismo, que tiene aún más similitud molecular con el ácido para-aminobenzoico, pero que es inactivo. La similitud molecular, en el mecanismo de la acción de muchos antibióticos como en el de las sulfamidas, sirve según nuestra opinión solamente para aproximar el antibiótico a determinado metabolito esencial ó a su predecesor en las reacciones metabólicas.

Tales metabolitos esenciales son: la cocarboxilasa (tiamina-difosfato) y las coenzimas I y II (di- y trifosfo-adenino-nicotinamido-dinucleotidos), a los cuales ciertas sulfamidas pueden aproximarse para intervenir después en su función. Un predecesor de un metabolito es el ya mencionado ácido p-aminobenzoico contenido en la molécula del ácido fólico, indispensable para el crecimiento y la división de muchos microbios.

El ácido fólico (XII) está constituido por los restos: pterínico, aminobenzoilo y glutamínico. La última etapa en la síntesis biológica del ácido fólico, se realiza por condensación del ácido pterino-aminobenzoico (resto "pteroilo") con ácido glutámico, en la cual con la intervención de un fermento y de un dador de energía (adenosinotriphosfato) se forma un enlace $-\text{CO}-\text{NH}-$. Una interpretación electrónica de la síntesis peptídica biológica hemos presentado al II Congreso Internacional de Bioquímica, junto con el Dr. Pascual Rubino en otra comunicación y repetimos aquí brevemente lo fundamental de esta interpretación, a fin de comprender porqué la sulfanilamida u otras sulfamidas, después de haberse aproximado al resto aminobenzoico del ácido pteróilico, gracias a su similitud molecular, pueden intervenir con sus electrones disponibles en esta síntesis.

Es nuestra opinión que los fermentos responsables de la síntesis y también hidrólisis peptídica actuarían modificando por inducción la disposición electrónica de sus substratos de manera que éstos reaccionen después en cierto sentido. Así los fermentos responsables de la síntesis peptídica modificarían el sistema de resonancia del grupo carboxílico de un componente de la reacción, de manera que su forma con fisura electrónica $-\overset{+}{\text{C}}\overset{-}{\text{O}}\text{OH}-$ y de nivel energético más alto contribuya más. En esta forma el grupo carboxílico (del ácido pteróilico en caso de la síntesis del ácido fólico) puede captar los dos electrones no compartidos del grupo amino del ácido glutámico, formándose, primero un producto intermediario de adición y finalmente el péptido (en el caso presente ácido fólico) según el esquema (XIII). Con respecto al poder inductivo de los fermentos en cuestión, es nuestra

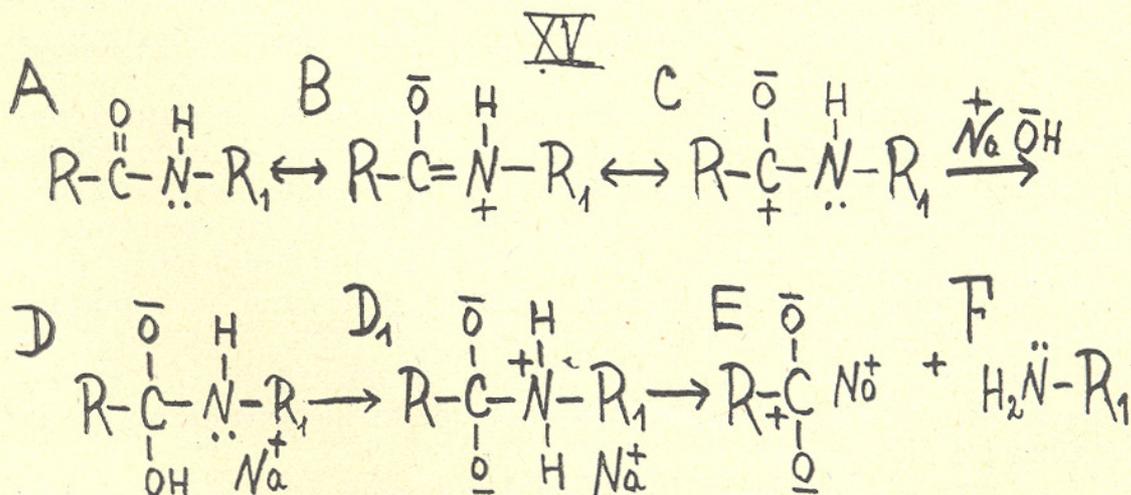
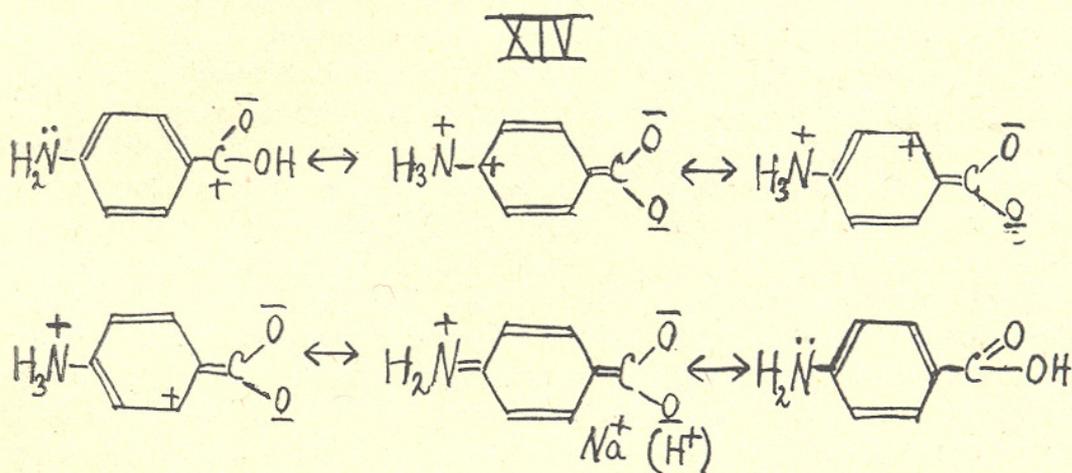
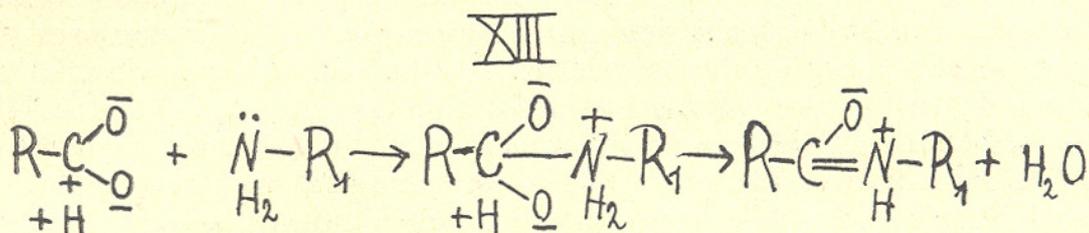
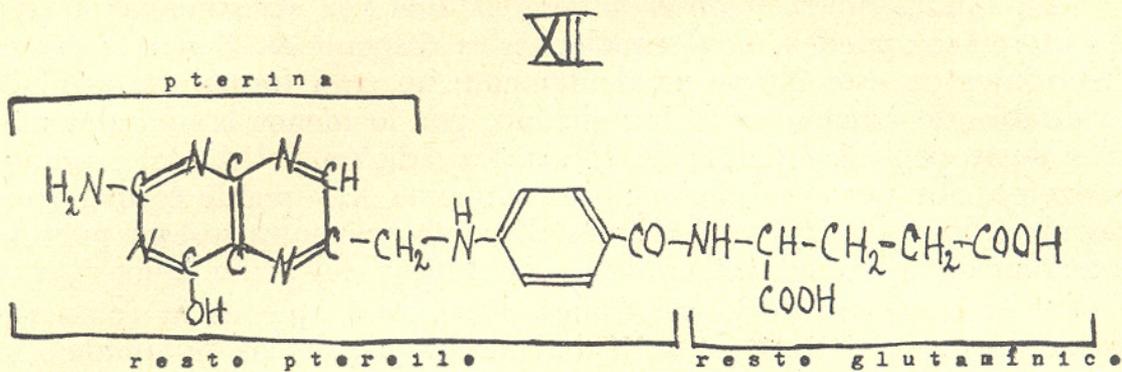


Fig. 2

opinión, que se trata de sustancias altamente polarizadas por tener polos opuestos, de un lado en la parte prostética, del otro lado en la parte protínica. Aumentando la distancia entre los dos polos, por la magnitud de la parte proteínica, aumentaría también el momento dipolar, actuando así, la parte proteínica como "amplificador".

La sulfanilamida, u otras sulfamidas, una vez aproximadas al ácido pteróico, pueden, con sus electrones disponibles, llenar la fisura electrónica de este último, evidentemente no para formar un producto estable de adición, pero impidiendo, por lo menos temporalmente, la síntesis peptídica del ácido fólico. La adición del ácido p-amino-benzoico, que por sí mismo según el esquema XIV puede formar fisuras electrónicas y atraer electrones disponibles, contrarrestará pues la intervención de la sulfanilamida en la síntesis del ácido fólico.

A la intervención de electrones disponibles, que es la causa según nuestra opinión, de la actividad antibiótica de las sulfamidas, se puede también, atribuir la responsabilidad por un fenómeno, observado por Emilio Abderhalden con nosotros y otros colaboradores (6), no explicado hasta ahora: la relativa lentitud de la saponificación alcalina de sulfamidopéptidos de la fórmula general $\text{Ar-SO}_2\text{-NH-CHR-CO-NH-CHR}_1\text{-COOH}$, en comparación con los péptidos respectivos no así substituídos. Los iones OH^- de soluciones alcalinas modifican por inducción (como lo hacen también según nuestra opinión los fermentos proteolíticos) el sistema de resonancia del grupo -CO-NH- peptídico, de manera que de las tres formas límites A, B, C (del esquema XV) la forma C contribuye más que normalmente.

La fisura electrónica de esta última podrá entonces captar un ión OH^- , formándose primero un compuesto de adición D, D_1 (XV), que se desdobra después en E y F. En el caso de los sulfamido-péptidos, los electrones disponibles del grupo $\text{-SO}_2\text{-NH-}$ serán captados por la fisura electrónica del grupo -CO-NH- dificultando así, al ión OH^- el acceso a ésta y demorando así la hidrólisis. Los electrones disponibles de las sulfamidas, mientras que provocarían en el último caso solamente la polarización dentro de una sola molécula, podrían, por desplazarse a las fisuras electrónicas de grupos -CO-NH- de otras moléculas, causar la formación de combinaciones moleculares por fuerzas polares y ser así responsables de la afinidad entre sulfamidas y fibras animales o la parte proteínica de las membranas microbianas.

Las sulfamidas parecen pues inhibir temporalmente la síntesis biológica de un metabolito esencial para los microbios: el ácido fólico; pero interfieren también con las funciones de metabolitos esenciales ya presentes, como lo son la cocarboxilasa (XVI) y las coenzimas I (XVII) y II. Una vez más, el hecho de la similitud molecular, para poder aproximarse al metabolito en cuestión, tiene aquí su importancia. Así, la sulfadiazina (XVIII) y el sulfatiazol (XIX), semejantes cada uno a una parte distinta de la tiamina, podrán fácilmente aproximarse a ésta y la sulfapiridina (XX) a la parte nicotinamídica de la coenzima I o II.

Pero esto no impide a las sulfamidas mencionadas el aproximarse también, gracias a sus restos sulfanilamídicos, al ácido pteróico para impedir la síntesis del ácido fólico y parece esta múltiple función causar la gran actividad antimicrobiana de las sulfamidas mencionadas.

Si ahora preguntamos en que función de la co-carboxilasa y de la coenzima I interfieren las sulfamidas en cuestión, expresamos nuestra opinión, de que interfieren con sus electrones disponibles en la

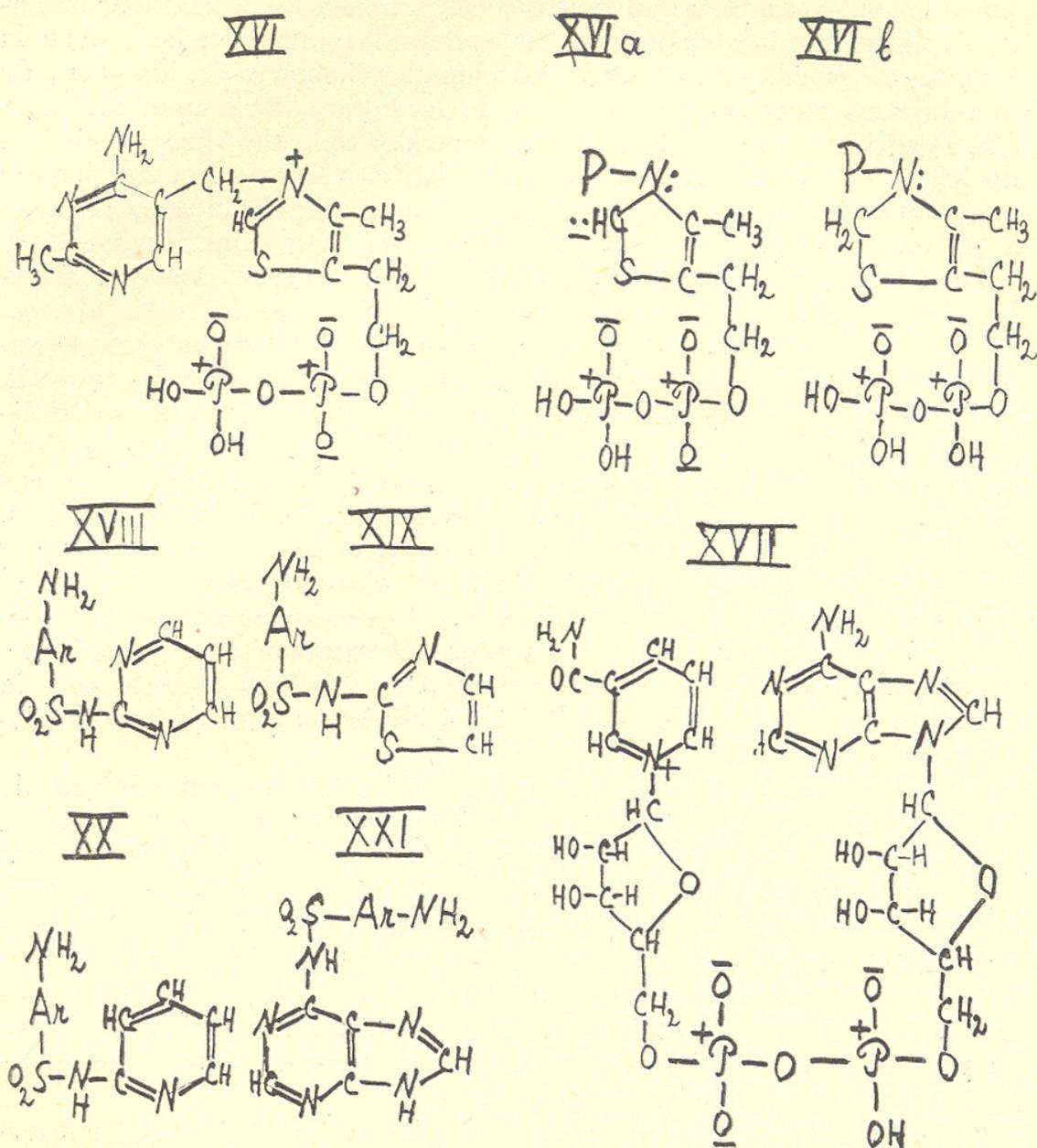


Fig. 3

función de óxido-reducción de estos metabolitos. La co-carboxilasa interviene al lado de la coenzima I, como uno de los aceptores de hidrógeno en la decarboxilación oxidativa del ácido pirúvico $\text{CH}_3\text{CO-COOH}$ a CO_2 y ácido acético, catalizada por una carboxilasa.

Son reducidas en estas reacciones el resto tiazólico de la cocarboxilasa (al cual el resto diazínico está directamente ligado por un grupo metilénico), y el resto nicotinamídico (piridínico) de la coenzima I, (separado por 2 restos de ribosa y 2 restos fosfóricos de la adenina). Por poder aproximarse al resto tiazólico de la cocarboxilasa son pues muy activos el sulfatiazol y la sulfadiazina, y por poder aproximarse al resto nicotinamídico de la coenzima I o II, la sulfapiridina y lo es mucho menos la sulfa-adenina (sulfamido-purina) (XXI) (7).

A la co-carboxilasa reducida corresponde la fórmula XVI b des-

pués de haber aceptado en una reacción enzimática 2 hidrógenos. Para explicar la intervención de las sulfamidas mencionadas, sobre la función de la co-carboxilasa (como ejemplo), hacemos la hipótesis, de que los dos electrones disponibles de la sulfamida se fijan al grupo CH ligado con doble enlace al nitrógeno del ciclo tiazólico, adquiriendo así la co-carboxilasa dos cargas negativas (XVIa). Por adición de dos protones provenientes del agua del ambiente fisiológico se llega a la forma reducida (XVI b) ya mencionada. Esta transferencia de 2 protones deja disponibles 2 iones oxhidrilo negativos, los que ahora podrían ser atraídos por las dos cargas positivas de la sulfamida, así oxidada a una hidroxí-sulfamida (postulada por algunos autores (8) pero sólo excepcionalmente (9) encontrada). Es más probable, que la sulfamida recupere solamente sus dos electrones, formándose H_2O_2 (8^a) o trasladándose el oxígeno, que se forma según la ecuación: $2 OH^- \rightarrow H_2O + O + 2e$, directamente a otra sustancia más fácilmente oxidable que la sulfamida. La interferencia de las sulfamidas, por ej. del sulfatiazol en la decarboxilación oxidativa sería, pues, la siguiente: la co-carboxilasa es reducida, sea en el caso normal, sea en el caso de presencia del sulfatiazol, pero en el caso normal el acetaldehído en forma específica es el aceptor del oxígeno; en presencia del sulfatiazol, lo serán otras sustancias. Algo análogo sucede con la coenzima I y II (reducidas en el ciclo piridínico) y también con el adenino-flavino-dinucleótido.

La tiamina, la nicotinamida y la riboflavina son antagonistas de las sulfamidas (10) por atraer a sí mismas los electrones disponibles, quedando así la co-carboxilasa, la coenzima I y II y el adenino-flavino-dinucleótido en su función normal.

Así, la acción de las sulfamidas consistiría en provocar catalíticamente en las células microbiana procesos de óxido-reducción competitivos con los normales, lo que está de acuerdo con las observaciones de varios investigadores (11), cuyas teorías respectivas, sin embargo, no explican satisfactoriamente las mencionadas propiedades catalíticas de las sulfamidas.

Esta interpretación de la acción de las sulfamidas como "antifermentos" nos lleva a hacer una hipótesis más con respecto al mecanismo de la acción de los propios fermentos de óxido-reducción. Según nuestra hipótesis estos fermentos podrían formar electrones disponibles, con los cuales y con protones reducirían los substratos reducibles (los diferentes cofermentos), recuperando sus dos electrones de dos iones oxhidrilo y trasladando el oxígeno así liberado de un modo muy específico a sus substratos oxidables. ($2 OH^- \rightarrow H_2O + O + 2e$). De esta manera podría ser interpretada como fermento la clorofila misma, la cual, según nuestra opinión, (12) reduce el ácido carbónico con los electrones disponibles del sistema tetrapirrólico, mediante este mecanismo de "electrólisis biológica, liberando sin embargo el oxígeno, sin trasladarlo. Es significativo que, todos los fermentos de óxido-reducción parecen tener como grupo prostético un resto homocromogénico, capaz, según nuestra opinión, de formar electrones disponibles gracias a su sistema tetrapirrólico y eventualmente también a su contenido de hierro, que puede cambiar de valencia.

De las sulfonas y de los sulfóxidos nos ocuparemos en otra oca-

sión y trataremos de interpretar allí, todavía el mecanismo de la acción de la penicilina, basándonos en su fórmula química (XXII).

Lo más característico de esta fórmula es el ciclo de 4 eslabones al lado de un ciclo tiazólico. Es conocido que los ciclos tetra-atómicos son, en general, inestables por su tensión interna, provocada por cambios forzados en los ángulos de valencia.

En la penicilina la tensión está aún aumentada por pertenecer el enlace CH-N a la vez a un ciclo tetra y penta-atómico teniendo así los 4 eslabones del ciclo tetra-atómico aún menos libertad de disponerse en una forma relativamente estable. Por este ciclo tetra-atómico, la penicilina debe tener un nivel energético alto y en efecto fué encontrado que la penicilina es sumamente inestable, inactivándose fácilmente por transformación en ácido penílico (XXIII), que tiene un ciclo penta-atómico en lugar del tetra-atómico (bajando así mucho el nivel energético del compuesto). También el alcohol metílico abre fácilmente el ciclo tetra-atómico, fijándose el resto $-OCH_3$ al grupo $-CO-$ y el H' al nitrógeno, formándose primero un producto intermedio (XXIV) y después el éster metílico del ácido penílico (XXV).

Así, podemos admitir que también ciertos amino-ácidos pueden ser captados en esta "trampa" del ciclo tetra-atómico, para formar compuestos del tipo (XXVI) (con la eventual ciclización subsiguiente). Además, el traslado de un amino-ácido al sistema de la penicilina, por el alto nivel energético de ésta, se hará con suma facilidad, de manera que el amino-ácido en cuestión puede ser sustraído a la síntesis peptídica biológica normal, en la cual se necesita un fermento y un dador de energía (adenosinotri-fosfato). Tampoco debemos excluir la posibilidad de que un enlace $-CO-NH-$ de un compuesto peptídico o proteínico sea "atacado" por la "trampa" en el sistema de la penicilina,

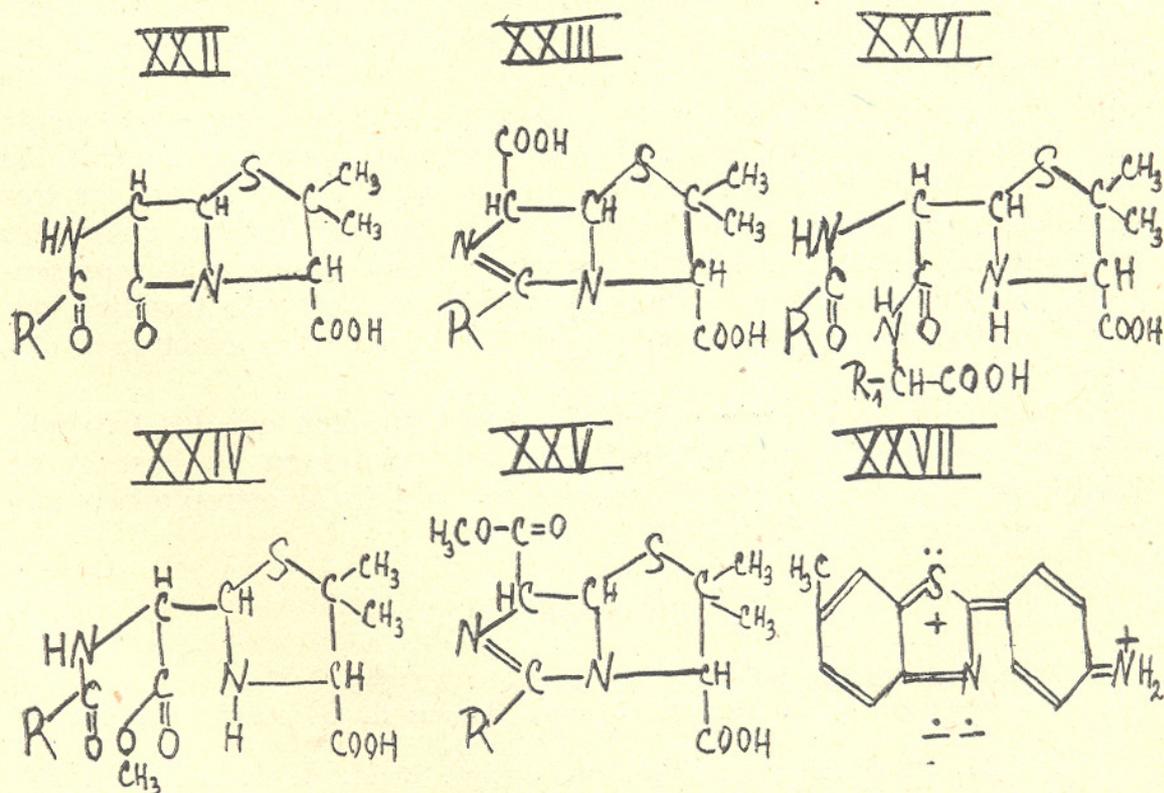


Fig. 4

como ocurre con el grupo R-CO-NH— de su propia molécula en el caso de su transformación en ácido penílico.

Nuestra teoría, según la cual la actividad de la penicilina consiste en su capacidad de apoderarse de amino-ácidos, está de acuerdo con el fenómeno, observado por diferentes investigadores (13) (14), de que la penicilina inhibe los microbios en la síntesis peptídica biológica, especialmente en aquella en la que el ácido glutámico está involucrado. En fin, la observación hecha por diferentes investigadores (13) (14) (15) de que los microbios bajo la influencia de la penicilina acumulan en una forma anormal los mononucleótidos y los nucleósidos hace probable, que el sistema de la penicilina puede también intervenir en la formación y el metabolismo de los polinucleótidos y de las nucleoproteínas, responsables por el crecimiento y la división celular, actuando con su "trampa" sobre restos fosfóricos, pentósicos o purínicos (15) y no solamente sobre los aminoácidos. Tenemos la intención de preparar, por su relación con la estructura de la penicilina, ciertos compuestos con ciclos tetra-atómicos o tetra- y penta-atómicos condensados para estudiar su eventual actividad contra los microbios.

Según los conceptos expuestos, nos hemos dedicado a preparar compuestos, capaces, 1) de fijarse por su actividad de superficie a la membrana microbiana (a los cuales pertenecen según nuestra opinión los productos con afinidad por la fibra del algodón); 2) de aproximarse por su similitud estructural a ciertos metabolitos esenciales para los microbios y, 3) de formar por resonancia electrones disponibles, que puedan intervenir en el metabolismo microbiano. Nos hemos pues ocupado especialmente de los colorantes substantivos, que cumplen el primer postulado (16) y de combinaciones de la sulfanilamida que cumple el segundo y tercero. Expondremos los resultados de nuestros experimentos en otra ocasión, mencionando aquí solamente que hemos encontrado una actividad antimicrobiana pronunciada "in vitro" en un grupo de sustancias, que cumple por sí mismo los tres postulados, el grupo de la primulina, de la cual derivan colorantes substantivos conocidos. La disposición atómica básica está representada, en este grupo, por la dehidrotiotoluidina, derivado tiazólico, cuyas fórmulas de resonancia por ej. XXVII presentan electrones disponibles.

Derivados de la serie naftalénica, que cumplen con los tres postulados, han dado también resultados interesantes en los ensayos de inhibición y uno de ellos, en particular, inhibió al estreptococo aún en la concentración de 0,1 gama por cm³.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Primera parte: este boletín, Vol. II, No. 1-2 (1953).
- (2) M. Freymann y P. Rumpf, Comptes Rendus d. S. Acad. Sc. 201, p. 606 (1953).
- (3) Job, M. Freymann y R. Freymann, Compt. Rend. d. S. Acad. Sc. 200, p. 1043 (1935).
- (4) J. v. Braun y K. Weissbach, Ber. D. Ch. Ges. 63 p. 2836 (1930).

- (5) D. D. Woods, Brit. J. exp. Path. 21, p. 74-90 (1940).
P. Fildes, Lancet 1 p. 955-957 (1940).
- (6) E. Abderhalden y Moeller, Z. physiol. Chem. 174 p. 200, 176 p. 207 (1928).
E. Abderhalden, Rindtorff y Schmitz, Fermentforsch. 10 p. 213 (1928).
E. Abderhalden y E. Riesz, Fermentforsch. 12 p. 180 (1930) Chem. Abstr. 25, p. 491 (1931).
- (7) Evert Berlin y Bertil Sjoegren, Svensk. Kem. Tid 53, p. 457 (1941) Chem. Abstr. 37, p. 3744 (1943).
A. Rune Frisk, Acta Med. Scand. Suppl. 142 p. 1-199 (1943) Chem. Abstr. 38, p. 4692 (1944).
- (8) R. L. Mayer, Bull. Acad. de Med. 117 p. 727 (1937), R. L. Mayer y C. Oechslin, Compt. rend. 205, p. 181 (1937).
- (8a) Ver también Nathan L. Levitan, I. M. Kolthoff, W. G. Clark, y D. J. Tenenberg, Journ. Am. Chem. Soc. 65, p. 2265 (1945).
- (9) Información privada de parte de D. W. Woolley, (The Rockefeller Institute for Medical Research, New York) (1950).
- (10) Nord, Advances in Enzymology, Vol. VI, p. 64 (M. G. Sevag, enzyme problems in relation to chemotherapy).
- (11) G. Carrara y F. M. Chiancone, Chimica e Industria (Italia) 23, p. 435 (1941). Chem. Abstr. 36, p. 7033 (1942), M. C. Sevag y M. Shelburne, J. Bact. 43, p. 411 (1942), M. C. Sevag, M. Shelburne y M. Ibsen, J. biol. Chem, 144, p. 711 (1942). M. C. Sevag, Advances in Enzymology (Nord) Vol. VI. p. 120.
- (12) E. Riesz, Rev. Fac. Humanidades y Ciencias, Montevideo, II No. 3 p. 53 (1948).
Zeitschrift f. Vitamin-Hormon-u-Fermentforschung IV. H. 5., p. 417 (1951).
- (13) E. F. Gale, Simposium sobre el modo de acción de los antibióticos, II. Congreso Internacional de Bioquímica, París (1952).
- (14) F. Gros y M. Macheboeuf, Simposium sobre el modo de acción de los antibióticos II. Congreso internacional de Bioquímica, París (1952).
- (15) Ver M. Macheboeuf y F. Gros, Exposés annuels de Biochimie Médicale (Direction: M. Polonovski) 12. serie p. 148 (1951).
- (16) La gran eficacia de la combinación Estreptomina - Rojo Congo contra el bacilo de Koch, observada por G. Pescetti y E. Destefanis, (Torino), Chem. Abstr. 46 p. 10411 (1952) es seguramente debida a la unión del antibiótico con un componente fuertemente "substantivo".