

ESTUDIO DE LA ACCIÓN ANTIBACTERIANA DE NITRODERIVADOS ISOXAZÓLICOS

Del Valle, J.L. (*); Piriz, S. (**); Polo, C. (*); Ramos, V. (*); Torroba, T. (*); Vadillo, S. (**); Valle, J. (**).

Departamento de Química Orgánica (*) y Departamento de Medicina y Sanidad Animal (**), Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10071 Cáceres.

Summary: Del Valle, J.L.; Piriz, S.; Polo, C.; Ramos, V.; Torroba, T.; Vadillo, S.; Valle, J. Study of the antibacterial action of isoxazole nitroderivatives. Acta Veterinaria 2, 15-19, 1988.

Twenty isoxazolyl derivatives 1a-g and 2a-m were tested against six bacterial species: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.* and *Escherichia coli*, the results of the tests are reported. The general structure of 1a-g was 1,3-di-(3-methyl-4-nitroisoxazol-5-yl)-2-arylpropane and the corresponding to 2a-m was 3-methyl-4-nitro-5-(2-arylvinyl)isoxazole. Five compounds tested show moderate antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. 1a was the most active compound, which prevents the growth of *P. aeruginosa* at 250 mg. litre⁻¹. 1a and 2j show very low activity against *S. aureus* and *Salmonella spp.* respectively. All the compounds show no activity against the other three tested species.

Key Words: Isoxazole, antibacterial, inhibitory, minimum, concentration.

Palabras Clave: Isoxazol, antibacteriano, inhibitoria, mínima, concentración.

INTRODUCCION.

El anillo de isoxazol es una agrupación química que forma parte como grupo activo en gran número de fármacos con acción antifúngica o antibacteriana (1). En ocasiones, el anillo de isoxazol aparece asociado químicamente (2) a otras agrupaciones con acción bactericida como penicilinas y cefalosporinas semisintéticas (Oxaciclina y Cefoxazol) o bacteriostática en sulfanilamidas isoxazólicas (Sulfametoxazol y Sulfisoxazol). Las sales de isoxazolio convenientemente sustituidas muestran asimismo acción antibacteriana (3) frente a bacterias gram-positivas. Algunos nitroisoxazoles o isoxazoles unidos a un resto nitroimidazol o nitrofurano muestran actividad frente a tripanosomas o tricomonas (1). Los nitrotiazolilisoxazoles también han mostrado actividad antimicrobiana. Por otra parte, amidas y bases de Schiff de 3-metil-4-amino-5-(2-arilvinil)isoxazoles (4) han mostrado una apreciable actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*.

Aunque los 4-nitro-3,5-dialquil (o aril) isoxazoles son conocidos desde hace tiempo, y han demostrado ser muy útiles en síntesis orgánica, no existe un estudio sistemático de su actividad antimicrobiana. En el presente trabajo se exponen los resultados del estudio de la actividad antibacteriana de 1,3-di-(3,metil-4-

nitroisoxazol-5-il)-2-arilpropano (1a-g) cuya síntesis ha sido puesta a punto recientemente (5), contrastada con el estudio, en las mismas condiciones, de 3-metil-4-nitro-5-(2-arilvinil)isoxazoles (2a-m), que en su mayor parte constituyen precursores sintéticos de los anteriores.

Se han escogido para el screening seis bacterias, tres gram-positivas y tres gram-negativas, todas ellas potencialmente patógenas para el hombre y los animales.

MATERIAL Y MÉTODO.

Síntesis de los compuestos de partida.

La estructura de cada uno de los compuestos 1a-g y 2a-m, que han sido sometidos a screening, se muestra en la Figura 1, con las especificaciones correspondientes.

Los compuestos 1a-g han sido sintetizados mediante una modificación del método general (5). Se dejaron reaccionar en un matraz, 4-nitro-3,5-dimetilisoxazol (58,2 mmol), piperidina (2 ml) y el correspondiente 3-metil-4-nitro-5-(2-arilvinil)isoxazol (19,4 mmol), a reflujo de etilenglicolmonometiléter (50 cc) durante 8 horas, bajo agitación magnética. La masa de reacción, una vez enfriada, se filtra y el sólido filtrado se recristaliza varias veces sucesivas de etanol, proporcionando 1a-g con un

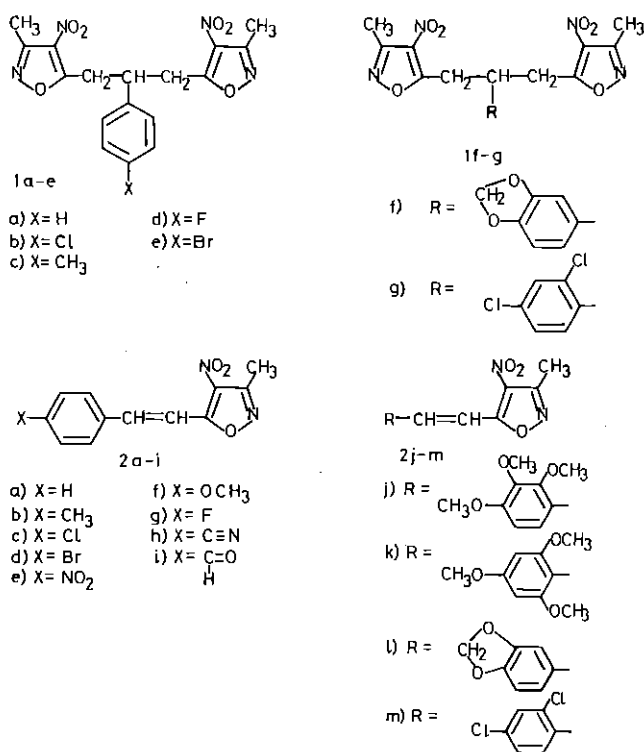


Figura 1.

rendimiento aproximado del 50-60%.

Por otra parte, los compuestos 2a-m se han obtenido, tal como ha sido descrito (6), por reacción del 4-nitro-3,5-dimetilisoxazol (50 mmol) y el correspondiente arilcarbaldehído (50 mmol), utilizando como catalizador piperidina (2,5 ml), y realizando la reacción a reflujo de etanol (25 cc). El tratamiento habitual de la masa resultante proporciona 2a-m en rendimiento análogo al encontrado en la bibliografía.

Los compuestos 1a-b, 1g y 2l-m coinciden en su punto de fusión y datos espectroscópicos con los encontrados en la bibliografía. Los compuestos 1c-f y 2g-k se describen a continuación, siendo los análisis elementales de todos ellos suficientemente satisfactorios. Los puntos de fusión han sido determinados en un aparato Gallenkamp MFB-595 y no han sido corregidos. Los espectros de I.R. han sido registrados en un espectrofotómetro Shimadzu IR-408, en emulsión con nujol. Los espectros de U.V. han sido registrados en un espectrofotómetro Hitachi 150-20, en cloroformo. Los espectros de ¹H-R.M.N. han sido obtenidos en un aparato Perkin Elmer R-32, en deutero-cloroformo, y los análisis elementales se han realizado en un aparato Perkin Elmer 240-B.

1,3-Di-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)-2-arilpropanos 1a-b y 1g (5).

Han sido preparados de acuerdo con el procedimiento explicado anteriormente. 1a: p.f. 92-93°C (recristalizado de etanol, rendimiento 75%). 1b: p.f. 109-110°C (de etanol, rendimiento 60%). 1g: p.f. 114-115 °C (de etanol, rendimiento 40%).

1,3-Di-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)-2-(4-metilfenil)propano 1c.

Preparado según el método descrito. P.f. 103-104 °C (de etanol, rendimiento 60%). I.R. (cm⁻¹): 1600, 1515, 1380, 820. ¹H-R.M.N. (Cl₃CD): 2,35 (s, 3H, CH₃), 2,47 (s, 6H, 2xCH₃), 3,67 (d, 4H, J=7 Hz, 2xCH₂), 3,80-4,10 (m, 1H, CH), 7,05-7,10 (m, 4H_{arom}).

1,3-Di-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)-2-(4-fluorofenil)propano 1d.

Preparado según el método descrito. P.f. 95,5-96 °C (de etanol, rendimiento 50%). I.R. (cm⁻¹): 1600, 1510, 1380, 825. ¹H-R.M.N. (Cl₃CD): 2,47 (s, 6H, 2xCH₃), 3,68 (d, 4H, J=7 Hz, 2xCH₂), 3,70-4,00 (m, 1H, CH), 7,00-7,20 (m, 4H_{arom}).

1,3-Di-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)-2-(4-bromofenil)propano 1e.

Preparado según el método descrito. P.f. 119-119,5 °C (de etanol, rendimiento 50%). I.R. (cm⁻¹): 1600, 1520, 1380, 825. ¹H-R.M.N. (Cl₃CD): 2,47 (s, 6H, 2xCH₃), 3,67 (d, 4H, J=7 Hz, 2xCH₂), 3,80-4,05 (m, 1H, CH), 7,15-7,50 (m, 4H_{arom}).

1,3-Di-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)-2-(3,4-metilendioxfenil)propano 1f.

Preparado según el método descrito. P.f. 132,5-133 °C (de etanol, rendimiento 60%). I.R. (cm⁻¹): 1600, 1520, 1380, 830. ¹H-R.M.N. (Cl₃CD): 2,49 (s, 6H, 2xCH₃), 3,68 (d, 4H, J=7 Hz, 2xCH₂), 3,90-4,20 (m, 1H, CH), 5,90 (s, 2H, OCH₂O), 6,70-6,90 (m, 3H_{arom}).

3-Metil-4-nitro-5-(2-arylvinil)isoxazoles 2a-f y 2l-m.

Han sido preparados de acuerdo con el procedimiento explicado anteriormente. 2a (7): P.f. 153 °C (de etanol, rendimiento 90%). 2b (8): P.f. 161-162 °C (de etanol, rendimiento 80%). 2c (8): P.f. 172-173 °C (de etanol, rendimiento 90%). 2d (9): P.f. 188-190 °C (de etanol, rendimiento 75%). 2e (7): P.f. 218-220 °C (de etanol, rendimiento 70%). 2f (7): P.f. 163-164 °C (de etanol, rendimiento 85%). 2l (7): P.f. 208-209 °C (de etanol, rendimiento 90%). 2m (8): P.f. 164-165 °C (de etanol, rendimiento 80%).

3-Metil-4-nitro-5-(4-fluoroestiril)isoxazol 2g.

Preparado según el método general. P.f. 178 °C (de etanol, rendimiento 75%). I.R. (cm⁻¹): 1625, 1590, 1575, 1380, 1160, 970, 825. U.V. λ max, nm (log ε): 240 (4,11), 267 (4,14), 362 (4,37).

3-Metil-4-nitro-5-(4-cianoestiril)isoxazol 2h.

Preparado según el método descrito. P.f. 190,5-191 °C (de etanol, rendimiento 90%). I.R. (cm⁻¹): 1740, 1630, 1580, 1505, 1380, 1145, 980, 830. U.V. λ max, nm (log ε): 239 (4,05), 265 (4,25), 350 (4,45).

3-Metil-4-nitro-5-(4-formilestiril)isoxazol 2i.

Preparado según una modificación del método general: Se deja gotear una solución alcohólica (250 cc) diluída de 4-nitro-3,5-dimetilisoxazol (50 mmol) y piperidina (2,5 cc) sobre otra disolución alcohólica diluída (250 cc) de aldehído terftálico (50 mmol) durante 2 horas, a reflujo de etanol. El trata-

miento habitual de la masa resultante proporciona 2i, p.f. 208,5 °C (de etanol, rendimiento 90%). I.R. (cm⁻¹): 2840, 1690, 1580, 1510, 1375, 1140, 970, 820. U.V. λ max, nm (log ε): 239 (4,06), 275 (4,23), 356 (4,48).

3-Metil-4-nitro-5-(2,3,4-trimetoxiestiril)-isoxazol.

Preparado según el método general. P.f. 135-136 °C (de etanol, rendimiento 80%). I.R. (cm⁻¹): 1620, 1585, 1380, 1270, 1090, 825. U.V. λ max, nm (log ε): 239 (4,10), 270 (3,99), 401 (4,24).

3-Metil-4-nitro-5-(2,4,6-trimetoxiestiril)-isoxazol 2k.

Preparado según el método general. P.f. 214-215 °C (de etanol, rendimiento 80%). I.R. (cm⁻¹): 1600, 1565, 1380, 1280, 1160, 1120, 980, 860, 815. U.V. λ max, nm (log ε): 240 (4,16), 296 (4,08), 422 (4,46).

Pruebas microbiológicas.

Se han seleccionado para el estudio tres bacterias gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria spp.*) y tres gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*). El método empleado está basado en la técnica de dilución en agar (10). Se preparó una solución de cada compuesto probado en dimetilsulfóxido, en cantidad suficiente para conseguir concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125 y 62,5 mg.litro⁻¹. La solución fue diluída en el medio de Mueller-Hinton hasta conseguir las concentraciones deseadas. Aproximadamente 25 ml de cada una de las soluciones preparadas fueron colocados en sendas placas de Petri estériles de un diámetro de 9 cm. Los seis microorganismos, obtenidos de cultivos en fase logarítmica de crecimiento, fueron sembrados en cada una de las placas, que se pusieron a incubar inmediatamente a 37 °C durante 72 horas. Cada 24 horas se hizo una lectura de crecimiento positivo o negativo en cada placa. Los resultados se han expresado mediante la concentración mínima inhibitoria de sustancia capaz de evitar el crecimiento visible de las bacterias en el tiempo máximo estudiado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los 1,3-di(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)-2-arylpropanos 1a-g muestran una acción moderada o nula frente a la serie de bacterias estu-

Compuesto nº	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella spp.</i>
1a	1000	250	>1000
1c	>1000	1000	>1000
1d	>1000	1000	>1000
2g	>1000	500	>1000
2j	>1000	500	1000

Tabla I. Actividad antibacteriana de compuestos con estructuras 1 y 2, expresada como concentración mínima inhibitoria [C.M.I. (mg.litro⁻¹)].

diadas. *Bacillus cereus*, *Listeria spp.*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* han resultado ser insensibles totalmente a estos compuestos hasta concentraciones de 1000 mg.litro⁻¹. *Staphylococcus aureus* ha resultado poco sensible frente a 1a, siendo su C.M.I. la más alta en estudio, 1000 mg.litro⁻¹. En cambio, algunos compuestos de esta serie, han mostrado una actividad apreciable frente a *Pseudomonas aeruginosa*, cuyo crecimiento resulta totalmente inhibido a concentraciones de 250 mg.litro⁻¹ para 1a y de 1000 mg.litro⁻¹ para 1c-d. La Tabla I muestra las C.M.I. de los compuestos que han mostrado actividad frente a alguna de las bacterias en estudio. Resulta sorprendente que el compuesto más activo con estructura tipo 1 sea el término más bajo de la serie, lo que podría ser explicable en términos de menor solubilidad en lípidos de los compuestos con el grupo fenilo sustituido.

Por otra parte, los 3-Metil-4-nitro-5-(2-arilvinil)isoxazoles 2a-m muestran asimismo actividad moderada o nula frente a la serie de bacterias estudiada. *Salmonella spp.* ha resultado ser sensible en un solo caso, frente a 2j, a una C.M.I. de 1000 mg.litro⁻¹. Sin embargo, los compuestos 2g y 2j han mostrado actividad apreciable frente a *Pseudomonas aeruginosa*, de manera análoga a los compuestos de la serie anterior. La Tabla I muestra las C.M.I. de los compuestos que son activos frente a alguna de las bacterias estudiadas. En esta serie, parece ser que la toxicidad frente a estas bacterias está determinada por la presencia de determinados sustituyentes sobre el grupo fenilo de los compuestos con estructura tipo 2.

En el conjunto de los screening realizados es de destacar que una bacteria gram-negativa, como *Pseudomonas aeruginosa*, altamente patógena, y que puede presentar resistencia a los antibióticos comunes, sea la que manifiesta una mayor sensibilidad frente a cinco de los veinte compuestos probados. Este hecho ha

resultado inesperado ya que en anteriores trabajos (3) se había demostrado que tanto *P. aeruginosa* como *E. coli*, ambas gram-negativas, resultaban ser insensibles a los tetrafluoroboratos de 2-metil-3(2-arilvinil)-2-metilisoxazolio, compuestos muy relacionados químicamente con las estructuras 1 y 2. En cambio, *S. aureus* o *Listeria spp.*, ambas gram-positivas, sí resultaban sensibles frente a dichas sales de isoxazolio. Estos resultados permiten la consecución de una cierta selectividad en la acción antibacteriana de los compuestos estudiados, dependiendo de la activación del anillo de isoxazol mediante un grupo nitro o la formación de la sal de isoxazolio. Una aplicación inmediata sería la preparación de medios de cultivo selectivos para determinados grupos de bacterias.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a la profesora M.L. Campo, del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Univ. de Extremadura, su asistencia en la realización de los espectros de ultravioleta.

RESUMEN.

Un total de veinte compuestos del isoxazol, cuya estructura general es 1,3-di-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)-2-arilpropano para los compuestos 1a-g, y 3-metil-4-nitro-5-(2-arilvinil)isoxazol para los 2a-m, han sido sometidos a tests biológicos frente a seis especies bacterianas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. Cinco compuestos estudiados han mostrado una actividad antimicrobiana moderada frente a *Pseudomonas aeruginosa*. El compuesto 1a ha resultado ser el más activo, inhibiendo el crecimiento de *P. aeruginosa* a 250 mg.litro⁻¹. Los compuestos 1a y 2j han mostrado una actividad baja frente a *S. aureus* y *Salmonella spp.* respectivamente. Ninguno de estos compuestos ha mostrado actividad frente a las otras tres especies estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA.

- (1) LANG, JR. S. A.; LIN, Y. (1984): Isoxazoles and their Benzo Derivatives. En: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*. Katritzky A. R. ed., Vol. 6. Part 4B. pp. 127-130. Pergamon Press. London.
- (2) USAN and the USP Dictionary of Drug Names (1982), Griffiths, M.C. ed., U.S. *Pharmacopoeia Convention*, Rocville, Md., U.S.A.
- (3) DALPIAZ, V.; CICIANI, G.; BAÑEZ, M.; VADI-

- LLO, S.; VALLE, J.; TORROBA, T. (1986): 5-Aryl-3-(2-arylvinyl)-2-methylisoxazolium tetrafluoroborates as selective antibacterial compounds. *Boll. Chim. Farm.*, 125: 384-386.
- (4) KRISHNAMURTHY, A.; KRISHNA MOHAN RAO, K.S.R.; SUBBA RAO, N.V. (1976): Amides and Schiff Bases from 4-Amino Isoxazoles and their Physiological Activity. *J. Indian Chem. Soc.*, 53: 1047-1048. IBID. (1972): Isoxazolyl Sulphanilamides. *Indian J. Appl. Chem.*, 35: 90-92.
- (5) BARACCHI, A.; CHIMICHI, S.; DE SIO, F.; DONATI, D.; NESI, R.; SARTI-FANTONI, P.; TORROBA, T. (1988): Michael Condensation between 3,5-Dimethyl-4-nitroisoxazole and 3-Methyl-4-nitro-5-styrylisoxazoles: A new Synthetic Route for 3-Arylglutaric Acids. Synthesis (en prensa).
- (6) KOCHETKOV, N.K.; SOKOLOV, S.D.; LUBOSHNIKOVA, V.M. (1962): Investigations in the Isoxazole Series. XII. Some Reactions of 3,5-Dimethyl-4-nitroisoxazole. *Zhur. Obshchei Khim.* 32: 1778-1785.
- (7) QULICO, A.; MUSANTE, C. (1942): Sopra il Dimetilnitroisossazolo. *Gazz. Chim. Ital.*, 73: 399-411.
- (8) SARTI-FANTONI, P.; DONATI, D.; FIORENZA, M.; MOSCHI, E.; DAL PIAZ, V. (1980): The use of 3,5-Dimethyl-4-nitroisoxazole for the Preparation of α,β -Unsaturated Aromatic Acids. *J. Heterocycl. Chem.*, 17: 621-622.
- (9) CHIMICHI, S.; DE SIO, F.; DONATI, D.; PEPINO, R.; RABATTI, L.; SARTI-FANTONI, P. (1983): The Preparation of Arylpropionic Acids via Styrylisoxazoles. *J. Heterocycl. Chem.*, 20: 105-107.
- (10) LINNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; SHADOMY, H. J. Eds. (1985): Manual of Clinical Microbiology, 4th. ed., *American Society for Microbiology*, Washington D.C., pp. 967-971.