

## ALGUNAS CONSIDERACIONES ESTEREOQUIMICAS DEL CLORANFENICOL

RUBÉN BRETÓN MANJARREZ

Académico de número

### 1. IMPORTANCIA DE LA ESTEREOQUÍMICA EN LA QUÍMICA BIOLÓGICA

La constitución estéreoquímica o constitución en el espacio de los compuestos orgánicos juega un papel muy importante en la Farmacodinamia, dado que un mismo compuesto puede presentar una gran diferencia en su acción farmacológica, diferencia que solamente es debida a su distinta estructuración estéreoquímica.

La estructuración estéreoquímica de la molécula de un compuesto orgánico explica la presentación del fenómeno conocido con el nombre de isomería óptica. Este fenómeno consiste en que una substancia, de idéntica constitución a otra, difiere en alguna de sus propiedades físicas, v. g., en la propiedad de desviar el plano de polarización de la luz. Esta desviación de la luz polarizada es idéntica para los dos isómeros físicos, sólo que de signo contrario; en tanto que uno de los compuestos desvía el plano de polarización un cierto número de grados hacia la derecha, el isómero provoca esta misma desviación hacia la izquierda.

Este fenómeno es debido, según la teoría de Van't Hoff y Le Bel, a la asimetría en la estructura de las moléculas, asimetría que se presenta cuando las cuatro valencias de un átomo de carbono están saturadas por cuatro grupos funcionales, radicales, o átomos diferentes entre sí. La hipótesis de Van't Hoff descansa sobre la teoría de que los átomos de carbono pueden representarse estéreoquímicamente como colocados en el centro de un tetraedro regular y con sus valencias dirigidas hacia los vértices (Figs. 1, 2 y 3).

Esta concepción del átomo de carbono permite, efectivamente, la existencia de dos diferentes estructuras, por la diferencia de colocación de los

\* Trabajo leído en la sesión del 17 de junio de 1953.

cuatro substitutivos diferentes, sobre las valencias del átomo de carbono asimétrico. Estas dos estructuras son enantiomorfas, es decir, no pueden superponerse, y una es a la otra como un objeto a su imagen en un espejo plano.

De lo anteriormente expuesto se concluye que una substancia que contiene en su molécula un átomo de carbono asimétrico puede presentarse en

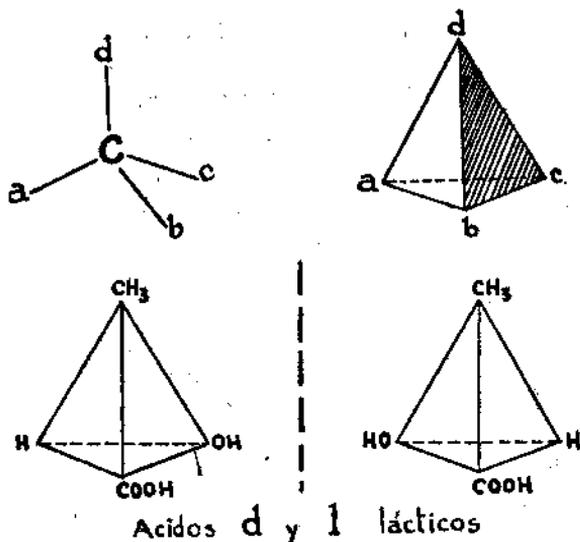


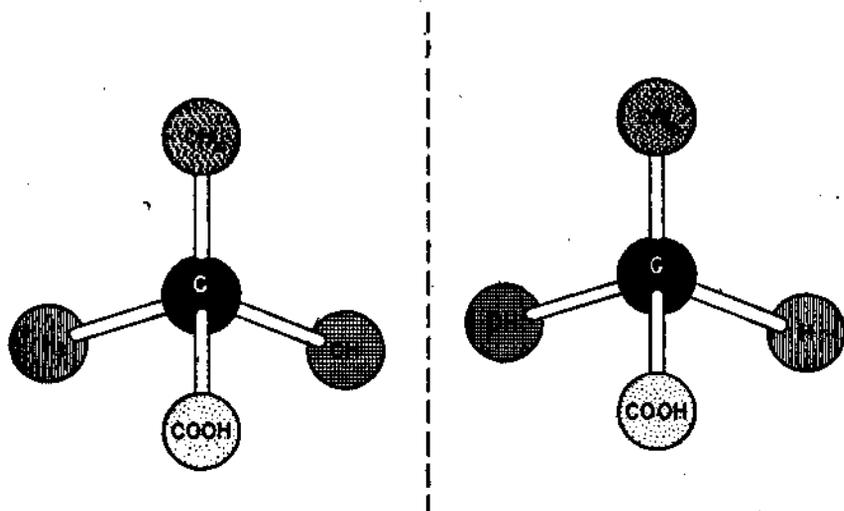
FIG. 1

dos formas isómeras ópticamente activas: la forma *dextrógira*, que es aquella que desvía el plano de luz polarizada hacia la derecha, y la forma *levógira*, que causa la misma desviación del plano de la luz polarizada, pero hacia la izquierda. La mezcla de partes equimoleculares de ambos isómeros, da lugar a la formación del tercer isómero llamado *compuesto racémico*, que no manifiesta ninguna actividad óptica porque no desvía en ningún sentido el plano de polarización de la luz; o mejor dicho: no manifiesta ninguna actividad óptica porque desvía el plano de la luz polarizada el mismo número de grados hacia la derecha que hacia la izquierda.

Siempre que se lleva a cabo una reacción en la que se forma algún carbono asimétrico se obtienen estos compuestos racémicos, porque hay el mismo número de probabilidades de que se forme el compuesto *dextrógiro* que de que se forme el compuesto *levógiro*. Es de estos compuestos racé-

micos y por medio de técnicas especiales, como se obtienen los isómeros ópticamente activos (fig. 4).

La diferente estructuración estereoquímica de un mismo compuesto orgánico no solamente confiere a éste propiedades físicas diferentes, sino que, lo que es más importante desde el punto de vista terapéutico, le con-



## MODELOS TRIDIMENSIONALES

FIG. 2

fiere también diferencias en cuanto a su farmacodinamia. Numerosos ejemplos de ello los encontramos entre los alcaloides, que son sustancias en su mayor parte farmacológicamente activas y que, también en su mayor parte, exhiben una definida actividad óptica.

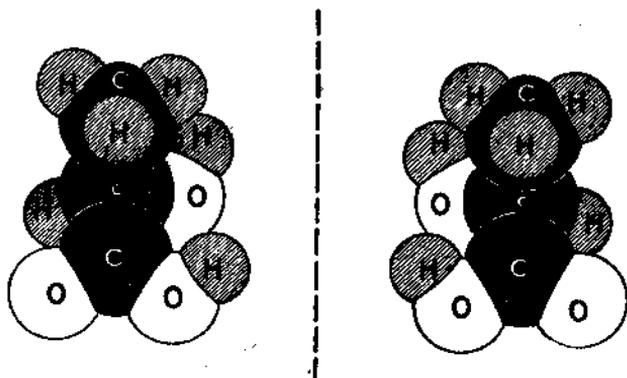
Ejemplos:

La atropina y la escopolamina o hioscina son los alcaloides más importantes del grupo de la belladona. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza en plantas de la familia de las solanáceas, y actúan como inhibidores o paralizantes de los aparatos inervados por el parasimpático.

Ambos alcaloides presentan formas estereoisómeras, que actúan diferentemente.

La atropina es un compuesto racémico, ya que es una mezcla de partes

iguales de los isómeros ópticos de la hiosciamina. En vista de que la dextro-hiosciamina tiene una débil acción periférica se concluye que la atropina debe su potencia principalmente a su contenido en levohiosciamina. Esta última ejerce la misma acción central que la atropina, pero es doblemente poderosa en sus efectos.



### MODELOS DE STUART

FIG. 3

En cuanto a la escopolamina o hioscina, la forma usualmente empleada y oficialmente reconocida de este alcaloide es la levorrotatoria, que actúa como un potente midriático y sedante cerebral y espinal. El compuesto ópticamente inactivo o racémico si bien tiene el mismo efecto sobre el sistema nervioso central que el compuesto levorrotatorio, en cambio manifiesta la mitad de la actividad en la periferia.

La efedrina es otro importante alcaloide, que se encuentra en diversas especies de ephedra, las cuales han sido usadas como medicamentos por espacio de cientos de años en China bajo la denominación de Ma-Huang. La efedrina, descubierta y aislada por Nagai en 1887, obra como un excitante de los aparatos inervados por el simpático. La efedrina contiene en su molécula dos átomos de carbono asimétricos, lo que hace posible la existencia de cuatro isómeros ópticamente activos que se conocen y se encuentran naturalmente en una u otra especie de ephedra. Estos isómeros son: la dextro y la levofedrina y la dextro y la levopseudofedrina (isofedrina). Todos estos compuestos son más o menos activos fisiológicamente,

pero difieren entre sí no solamente en su poder relativo, sino también en la bondad de su acción.

Las farmacopeas americana y británica reconocen solamente la forma levógira. Los métodos de síntesis de la efedrina producen el compuesto racémico, el cual puede ser desdoblado en las dos formas ópticamente acti-

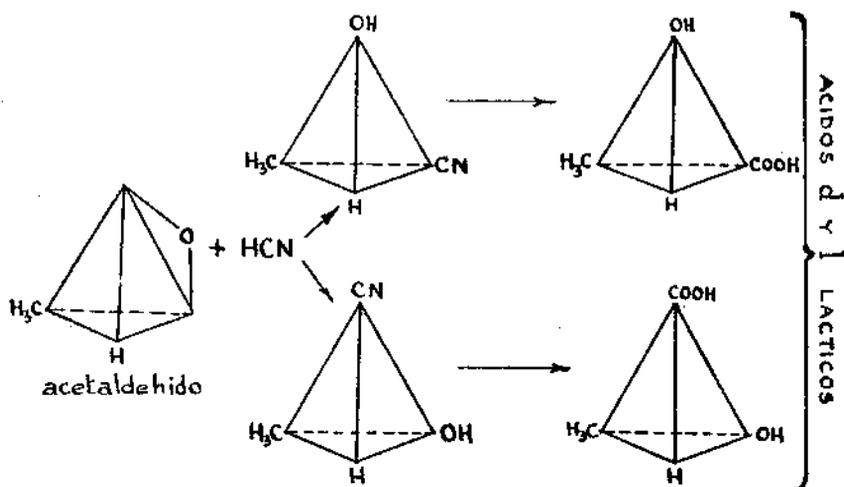


FIG. 4

vas. Se ha comprobado que este compuesto racémico es menos activo que el levoisómero.

Un ejemplo más de la influencia de la constitución estereoquímica de un compuesto sobre su actividad fisiológica es el de la ergotamina, uno de los principales alcaloides del cornezuelo de centeno, y que actúa sobre las terminaciones motoras de la sección simpática del sistema nervioso autónomo. La ergotamina exhibe una actividad óptica levógira, en tanto que la ergotaminina, isómero cristalino dextrorrotatorio, ejerce una acción menos potente que la ergotamina.

Y por último, otro ejemplo es el de la quinina, el alcaloide más importante obtenido de la quina, y que sigue constituyendo uno de los más valiosos antipalúdicos. La quinina es un compuesto levógiro, en tanto que su isómero dextrorrotatorio, la quinidina, aunque también actúa sobre los protozoarios y las bacterias como la quinina, manifiesta una acción mucho menos poderosa que ella.

En el campo más nuevo y de palpitante interés como es el de los

antibióticos se manifiesta también la importancia de la estereoisomería. Sobre este aspecto cabe hablar de uno de los más recientes y valiosos antibióticos (al que Fleming ha definido como el más importante entre los descubiertos después de la penicilina) que se ha sumado al ya rico arsenal terapéutico que constituyen estos nuevos compuestos.

Este antibiótico es el *Cloranfenicol*.

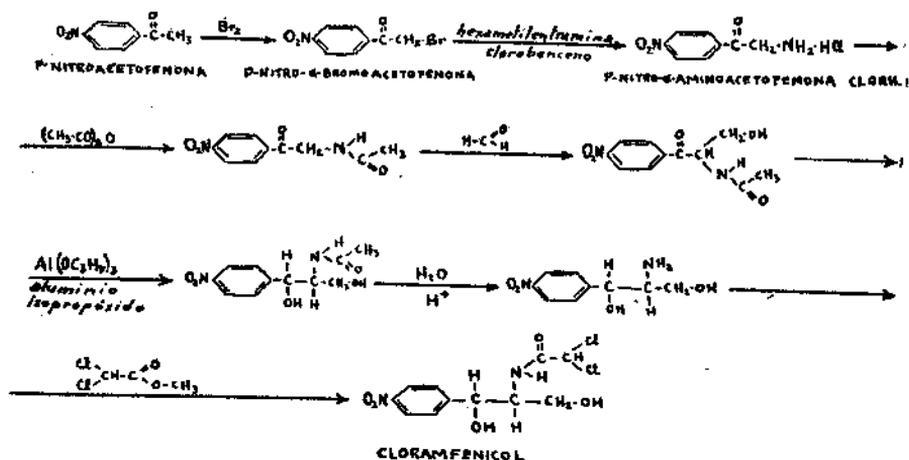


FIG. 5

## 2. RESEÑA HISTÓRICA DEL DESCUBRIMIENTO DEL CLORANFENICOL

A fines del año de 1947, Paul R. Burkholder, botánico de la Universidad de Yale (Estados Unidos de América), en el curso de un estudio sobre aproximadamente 6,000 muestras de terreno reunidas de todas partes del mundo, aisló de una muestra recogida cerca de Caracas, Venezuela, un nuevo actinomiceto. Este actinomiceto, aunque muy parecido al *Streptomyces lavendulae*, productor de la *estreptotricina*, difería, por características morfológicas y de cultivo, de todos los anteriormente descritos y clasificados. Por lo tanto, se catalogó como una especie nueva, para la que se propuso el nombre de *Streptomyces venezuelae*.

Los cultivos de esta nueva cepa de streptomices manifestaron una marcada actividad bacteriostática, y poco después Ehrlich y sus colaboradores aislaron, de los filtrados de los cultivos de dicho hongo, una substancia cristalina dotada de un gran poder antibiótico, a la que denominaron cloranfenicol.

De todas las investigaciones modernas sobre los antibióticos, la refe-

rente al cloranfenicol es la que tiene el mérito de haberse realizado en todos sus pasos, siguiendo la vía teórica más racional: aislamiento de la sustancia en forma pura, estudio y determinación precisa de su fórmula estructural y síntesis química.

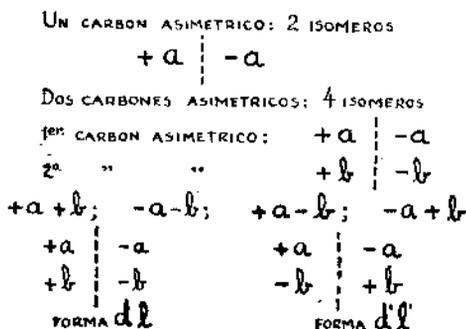


FIG. 6

### 3. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL CLORANFENICOL

a) *Proceso biológico.* El proceso biológico para la manufactura del cloranfenicol puede ser reseñado brevemente como sigue:

La semilla, constituida por esporas de *Streptomyces venezuelae*, se va desarrollando sucesivamente. Primero se hace la siembra en tanques de 50 galones, que sirven después de siembra para tanques de 500 galones, los cuales, finalmente, se utilizan para los tanques de fermentación de 5,000 galones. El desarrollo se hace en un medio nutritivo compuesto de gluten de trigo, glicerina, carbonato de sodio y cloruro de sodio, el cual se somete a una aereación conveniente. El caldo del tanque de fermentación se filtra y en el filtrado se lleva a cabo la extracción con acetato de amilo y esta última solución se concentra al vacío, hasta alcanzar el punto de cristalización del cloranfenicol crudo. El antibiótico impuro es disuelto en agua caliente, tratado después con carbón para remover las impurezas y, finalmente, cristalizado de esta solución.

Hay otro proceso de extracción descrito por Gottlieb y sus colaboradores que consiste en: extracción con éter, evaporación de extracto etéreo, purificación del residuo con benceno, recristalización del residuo con una mezcla de benceno y alcohol metílico, cromatografía sobre alúmina, concentración del eluido y recristalización con cloroformo y alcohol metílico.

b) *Proceso químico.* La manufactura del cloranfenicol por síntesis química comprende diez reacciones principales, con un total de alrededor

de treinta pasos o etapas. El proceso se lleva a cabo a partir de p-nitro-bromo-acetofenona, y las diez reacciones sucesivas de esta síntesis son las siguientes: condensación con metenamina, hidrólisis ácida, acetilación, hidroximetilación, reducción con isopropilato de aluminio, otra hidrólisis ácida, neutralización, separación del isómero activo de una mezcla de cuatro isó-

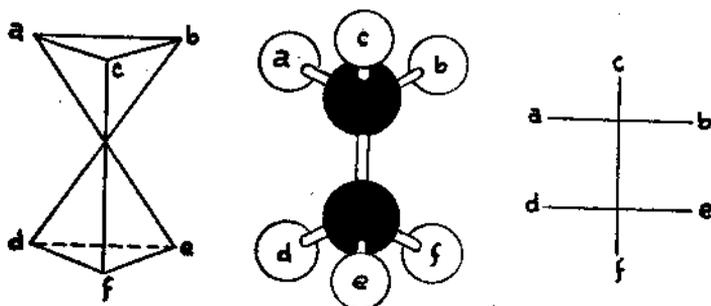


FIG. 7

meros mediante el uso de ácido d-canfo-sulfónico, neutralización y reacción con metil dicloro-acetato, para producir finalmente el cloranfenicol.

Se puede decir que, en la actualidad, el proceso químico de síntesis ha substituído completamente a los procesos biológicos.

El producto sintético obtenido es absolutamente igual al producto natural en todas sus propiedades físicas, químicas y biológicas y Smadel (Proc. S. Exp. Biol. Med., 70:191, 1949), ha demostrado que los productos tienen los mismos efectos terapéuticos.

#### 4. QUÍMICA DEL CLORANFENICOL

El cloranfenicol corresponde químicamente al (D(-)-Treo-1-p-nitrofenil-2-dicloroacetamida-1,3-propanodiol).

*Características.* El cloranfenicol se presenta en forma de cristales semejantes a agujas de color blanco, blanco grisáceo y blanco amarillento o bien en forma de láminas alargadas. Tiene sabor amargo. Sus soluciones son prácticamente neutras al papel litmus. Es razonablemente estable en soluciones neutras o moderadamente ácidas. Es un compuesto ópticamente activo (su solución alcohólica es dextro-rotatoria y su solución en acetato de etilo es levo-rotatoria). Es poco soluble en agua (un gramo en alrededor de 400 c.c.), bastante soluble en propilénglicol y muy soluble en los alcoholes, metílico, etílico y butílico, en acetona, en acetato de etilo y en éter etílico. Funde entre 149 y 153 grados. El cloranfenicol es rápidamente des-

truido en soluciones alcalinas: a un pH de 10.8, más del 87 por ciento es inactivo en un lapso de 24 horas a 25 grados (Bartz, J. Biol, Chem, 172:445, 1948).

El cloranfenicol tiene un espectro de absorción característico en la zona ultravioleta (entre 298 y 278 milicrones). Su actividad óptica oscila entre

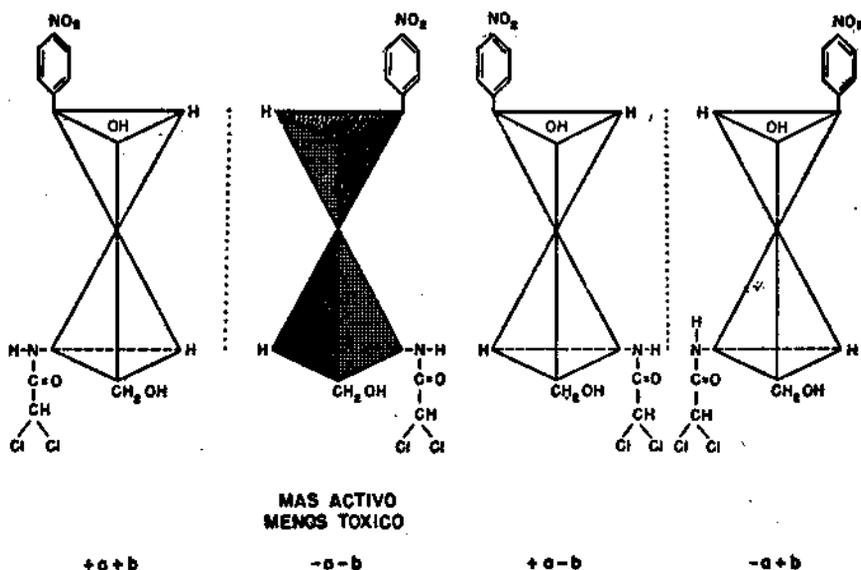
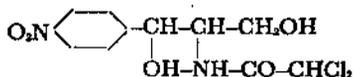


Fig. 8

17° y 20°, medida en una solución de alcohol deshidratado, que contenga 500 miligramos de cloranfenicol seco por cada 10 c.c.

El cloranfenicol, cuando es reducido con zinc en polvo, produce un color que varía del rojo violeta al morado, por la adición del cloruro de benzoilo y cloruro férrico.

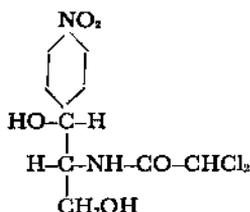
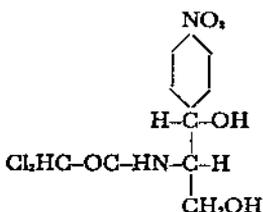
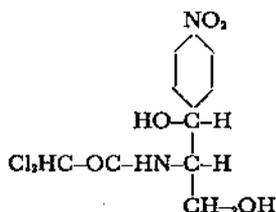
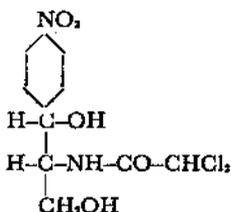
La fórmula estructural del cloranfenicol es la siguiente:



La molécula del cloranfenicol se caracteriza por la presencia de un grupo nitrobenicénico y un radical dicloroacético.

*Estereoisomería del cloranfenicol.* El cloranfenicol es un compuesto ópticamente activo, su actividad óptica depende de la presencia en la molécula

de dos átomos de carbono asimétricos no equivalentes, lo que hace posible la presencia de cuatro estereoisómeros (figs. 5, 6 y 7), que pueden representarse estructuralmente como sigue:



Como ya se dijo anteriormente, la síntesis de compuestos orgánicos donde se forma algún carbono asimétrico produce siempre compuestos racémicos, ya que hay la misma posibilidad de que se forme el compuesto levógiro que de que se forme el compuesto dextrógiro. Así, el cloranfenicol sintético es un compuesto racémico, ópticamente inactivo, y que puede ser desdoblado por medio de técnicas especiales en sus dos formas ópticamente activas: levógira y dextrógira.

La diferente estructuración estereoquímica del cloranfenicol, que permite la formación de estereoisómeros con propiedades físicas diferentes, determina también una gran diferencia en la actividad biológica de dichos estereoisómeros. En efecto, se ha comprobado que la única forma del cloranfenicol que posee propiedades antibióticas es la forma levógira; la forma dextrógira es inactiva biológicamente y, además, las recientes investigaciones realizadas en Italia (en la Universidad de Florencia), ponen de manifiesto su toxicidad, propiedad que ha impedido su empleo en terapéutica.

De aquí que el compuesto racémico, que tiene capacidad para desdoblarse proporcionalmente en ambas formas, manifieste solamente el 50 por ciento de la actividad del isómero levorrotatorio.

Esta diferencia en la acción farmacológica de los cloranfenicoles está indiscutiblemente regida por la situación en el espacio de los agrupamientos

funcionales ya que viene a imprimir una nueva modalidad estimativa entre los medios de valoración del cloranfenicol; esta nueva modalidad es la apreciación de la desviación de la luz polarizada.

El estudio de la desviación de la luz polarizada se ha empleado muy poco en el control de los medicamentos y de los antibióticos y este es un asunto al que se le debería de poner más atención, pues no es difícil que la carencia o deficiencia de actividad farmacológica de muchos medicamentos estribe precisamente en que se trate de cantidades racémicas en mayor o menor proporción.

### RESUMEN

El autor estudia la influencia que la rotación de la luz producida por los compuestos isómeros, tiene sobre sus propiedades fármacodinámicas. En relación al cloranfenicol, estas diferencias son de consideración, ya que este antibiótico tiene mezcla de la forma dextrógira y de la levógira; y ésta es la única que posee actividades antibióticas, mientras que aquélla, a más de inactiva, es tóxica.

Recomienda, por último, que el estudio de la desviación de la luz polarizada se emplee en el control de los medicamentos.

### SUMMARY

The author studies the different deviation of polarized light brought about by isomers, and its bearing on their pharmacodynamic properties. Such differences on their pharmacodynamic behavior are especially interesting on the chloranphenicol, whose levo-rotatory fraction is the only one biologically active, while its dextro-rotatory fraction is, not only inactive, but actually toxic.

He recommends that the study of the deviation of polarized light should be used in the assay of medical drugs as chloranphenicol.

## COMENTARIO AL TRABAJO DEL DOCTOR BRETON MANJARREZ

RAMÓN PÉREZ CIRERA

Académico de número

El trabajo del doctor Bretón Manjarrez está orientado en el sentido de la importancia que tiene la estereoisomería sobre la actividad farmacodinámica y terapéutica de los medicamentos.

Los ejemplos de los alcaloides de la belladona, efedra, cornezuelo de centeno y quina son bien demostrativos.

De entre los antibióticos es el cloranfenicol, cuya fórmula se conoce perfectamente, el que ha sido posible de obtener por síntesis. Su forma levógira es la verdaderamente activa y el compuesto racémico tiene solamente el 50 por ciento de actividad.

La explicación que podemos dar a la diferencia de actividad de los estereoisómeros, es muy interesante. Son cuerpos que tienen análoga fórmula química y cuyas propiedades físicas y químicas son idénticas.

La actividad farmacológica estriba en que reaccionan con determinadas sustancias del organismo las cuales son también ópticamente activas, como son las proteínas, que son levóginas.

Si tenemos dos estereoisómeros, uno levógiro y otro dextrógiro, que reaccionan con una proteína levógira, los compuestos resultantes son distintos, no son simétricos, y tienen propiedades físicas y químicas diferentes.

Un ejemplo sencillo sería el de la página 226.

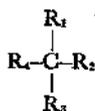
Estos dos compuestos resultantes son distintos, no son simétricos, no se pueden ver como su imagen en un espejo plano y sus propiedades físicas y químicas son diferentes.

Esto es lo que seguramente ocurre con el l-cloranfenicol y el d-cloranfenicol los cuales reaccionan con determinadas proteínas protoplasmáticas bacterianas formando compuestos distintos, uno activo (el formado por l-cloranfenicol) y otro inactivo y tóxico, el formado por el d-cloranfenicol.

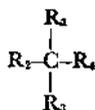
Señala el doctor Bretón la importancia que puede tener el estudio

polarimétrico de las sustancias ópticamente activas como método de control, y esperamos que en comunicaciones posteriores nos informe de datos precisos sobre la aplicación de este método en la valoración del cloranfenicol que, como él indica, sería de gran utilidad.

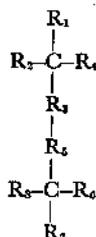
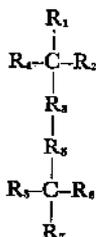
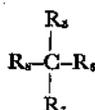
Dos estéreoisómeros:



d



l



Los métodos químicos para la valoración de los medicamentos son generalmente más rápidos y más exactos, cuando pueden emplearse.

Los estudios biológicos son menos sensibles que los químicos y dan un porcentaje mayor o menor de error, pero, para muchas sustancias, constituyen el único método de control y en el caso de los antibióticos, debido a que se desconoce en muchos de ellos la fórmula química o a que son productos con un cierto grado de impurezas, el único método de control empleado hasta hoy es la prueba biológica en el sentido de su actividad inhibidora de crecimiento sobre determinado microorganismo sobre el cual son verdaderamente activos.

Los métodos de las diluciones para la valoración de los antisépticos son conocidos desde hace mucho tiempo. Fué Florey, al estudiar la penicilina, el que ideó el método de las torres, llamado método de Florey o método de difusión, en el que coloca sobre placas de agar, trozos de tubos de porcelana o cristal de determinada altura y diámetro, en los que se coloca la dilución

del antibiótico y se observa en la placa sembrada la zona de inhibición de crecimiento del germen, y se mide el radio de estas zonas circulares.

Este método se ha aplicado para diferentes antibióticos y ha sido modificado por Benedict y Stodola para la valoración de la poliximina. Ellos emplean torres o discos de papel de filtro impregnados de la dilución del antibiótico, y siguen normas precisas referentes a dilución del antibiótico, preparación del medio de cultivo, cantidad de inóculo empleado, factores de difusión, etc., con el objeto de que los resultados sean lo más constantes posibles. A pesar de ello el por ciento de error es de un 20.

En este método, las diluciones del antibiótico se hacen en regulador de glicina CIH 0.05M a pH 2 y la siembra de las placas se hace con 4 ml. de medio de cultivo con agar al 1.2 por ciento y Tween 80 al 1 por ciento previamente inoculado. La incubación se hace a 37° C durante 18 horas:

Joslyn, D. J. y Galbraith, M. publican, en el *Journal of Bacteriology* Vol. 59, p. 711, 1950, un nuevo método turbidimétrico para valoración de antibióticos, empleado en nuestro laboratorio por Gavarrón y sus colaboradores en la valoración de la polimixina, la bacitracina, etc., con excelentes resultados.

El método consiste en hacer una serie de diluciones basadas en la potencia que se calcula al antibiótico (muestra), tomando en cuenta que la adición del antibiótico va a producir una dilución del mismo de 1:10. Se toman una serie de tubos previamente seleccionados y se les agrega 8.8 ml. de medio de cultivo caldo-cerebro-corazón Difco de fuerza 1.1 (4.07 por ciento). Después, se agrega 1 ml. de cada dilución del antibiótico y 0.2 ml. de un cultivo de dos horas en el mismo medio diluido, de tal manera que dé en el fotocolorímetro una densidad óptica de 0.05.

Estos tubos se incuban durante tres horas a 37° C en baño María y después se lee la densidad óptica de cada tubo en el fotocolorímetro.

En la serie de tubos se incluyen dos testigos: uno que lleva 8.8 ml. de caldo-cerebro-corazón y 1 ml. de agua destilada y otro igual al anterior; pero inoculado.

El por ciento de crecimiento se calcula dividiendo la densidad óptica de cada tubo entre la densidad óptica del testigo de crecimiento y multiplicando por 100.

El por ciento de inhibición se calcula restando de 100 el por ciento de crecimiento.

Este método da resultados muy exactos y constantes, si se conserva siempre la cepa en el mismo medio con resiembras frecuentes y si se tiene mucho cuidado en hacer la dilución de la cepa a la densidad óptica indicada.

Poniendo en gráficas el por ciento de inhibición en función de la con-

concentración del antibiótico (microgramos/mililitro), se obtiene una línea recta que no pasa por el origen, cuyo coeficiente angular depende de la actividad de la preparación.

El cálculo de las unidades, correspondiente a la muestra que se ensaya debe hacerse por comparación con los resultados obtenidos con un standard de actividad conocida.

Este método da un porciento de error de 5, mientras que el de Florey da un error de 20 por ciento.

En la valoración de antibióticos, especialmente del cloranfenicol, se nos ocurre que el método polarimétrico propuesto por el doctor Bretón requiere determinadas condiciones:

1. Que el producto sea ópticamente activo, como ocurre con el cloranfenicol.
2. Que sea químicamente puro, pues las impurezas (si son ópticamente activas) y la turbidez, interfieren con las pruebas polarimétricas.
3. Que las soluciones sean perfectas e incoloras.
4. Que se disponga de cantidad suficiente, pues las pruebas polarimétricas requieren concentraciones altas.
5. En los preparados comerciales no sería posible esta prueba, pues casi siempre el antibiótico va mezclado con un excipiente que interferiría con la polarografía, o habría que separarlo de él.
6. Siempre la prueba polarimétrica debería ir acompañada de una valoración de actividad, pues son muchas las substancias ópticamente activas.

Creemos que el caso del cloranfenicol la polarimetría puede ser un método complementario de la valoración biológica.

Me permito felicitar sinceramente al doctor Rubén Bretón Manjarrez por su trabajo en que resalta la importancia de la estereoquímica en la actividad farmacológica y terapéutica y nos indica un nuevo método de interés para la valoración del cloranfenicol.