

10524
48



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“EVALUACION DE UN COMPUESTO COMO POSIBLE ANTIMICROBIANO OBTENIDO POR SINTESIS ORGANICA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

DAVID OLIVA MARTINEZ

DIRECTORES:

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

DR. RENE MIRANDA RUALCABA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación de un Compuesto como Posible Antimicrobiano

Obtenido por Síntesis Orgánica".

que presenta el pasante: David Oliva Martínez

con número de cuenta: 911117A-0 para obtener el título de :

Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Marzo de 2003

PRESIDENTE

Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya

Andrea Becerril Osnaya

VOCAL

Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda

Ma. Esther Revuelta Miranda

SECRETARIO

Dra. Susann E. Mendoza Elvira

Dra. Susann E. Mendoza Elvira

PRIMER SUPLENTE

M. en F.C. Cecilia Hernández Barba

M. en F.C. Cecilia Hernández Barba

SEGUNDO SUPLENTE

M. en C. Norma L. Delgado Buenrostro

M. en C. Norma L. Delgado Buenrostro

A Dios
Gracias por todo lo que me has dado..... en pocas palabras la vida
gracias por dejarme llegar hasta este momento y poder compartir
este logro con todas las personas que se han involucrado durante mi vida...

A Mis Padres
Gracias por darme su tiempo, su cariño, su amor,
por dar todo y este logro también es de ustedes
espero no defraudarlos en el futuro.

A mi Hermano
Por estar conmigo en las buenas y en las malas,
por tus consejos y por muchas cosas más.

A la Dr. Susana E. Mendoza
Por la oportunidad que me brindo al estar en el laboratorio,
por compartir su experiencia y sus conocimientos y brindándome su apoyo cuando lo necesitaba,
gracias por su amistad y por la confianza que me brindo y
siempre será un ejemplo para mí como Persona y como Profesionista,
por SER MI MADRE ACADÉMICA.

Al M. V. Z. David Trujillo C.
Por toda su ayuda y enseñanza en el área de computo,
por todos los momentos que hemos pasado buenos y malos,
en pocas palabras por ser mi AMIGO, y espero que sea por mucho tiempo.

Al Dr. Abel Ciprián Carrasco
Gracias por transmitir su conocimiento y apoyo para la realización del trabajo.

A la Q.F.B. Cecilia Rodríguez, a la Q.F.B. Annin S. Altamirano y a la pQ.F.B. Tania Alcántara.
Por su apoyo durante el trabajo,
POR SER MIS AMIGAS
y por todo lo que hemos vivido durante este tiempo
y espero que sigamos siempre unidos como hasta la fecha.

pQ.F.B. Ricardo Trejo
Gracias por tu sugerencia en la realización del trabajo de tesis con la Dr. Susana E. Mendoza.

A Silverio, Rogelio, Juanita, Ricardo A., Hamurabi y Gabriela.
Gracias por su amistad y su apoyo,
por los momentos que hemos pasado dentro y fuera del Laboratorio.

Al Sr. Gabino Sánchez
Por su amistad y por el apoyo durante este trabajo

A Mis Sinodales
Por su apoyo en la revisión de la tesis y sobre todo por ser mis profesores durante la carrera.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El trabajo se Realizo en las Instalaciones Del laboratorio de Virologia y Microbiologia de las Enfermedades Respiratorias de los Cerdos en la Unidad de Posgrado e Investigación en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.

INDICE

Resumen	i
1. Introducción	1
1.1. Origen de los Antibióticos	1
1.2. Resistencia a los Antibióticos	2
1.3. Grupo de β - Lactámicos	3
1.4. Síntesis de los Compuestos P1F1 y P1F2	4
1.5. Métodos para la Determinación de la Sensibilidad a los Antibióticos	5
1.5.1. Interpretación de los Resultados	6
1.6. Enfermedades de los Cerdos	7
1.7. Justificación	7
1.8. Hipótesis	8
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo General	9
2.2. Objetivos Particulares	9
3. Materiales y Métodos	10
3.1. Medios de Cultivo	10
3.2. Cepas Bacterianas	10
3.3. Pruebas Bioquímicas	10
3.4. Compuestos Obtenidos en el Laboratorio de Química Orgánica de la FES-C UNAM	10
3.5. Pruebas de Solubilidad	10
3.6. Antibiótico	10
3.7. Método de Difusión en Disco	10
3.8. Método Cilindro - Placa	11
3.9. Determinación de UFC's	11
4. Resultados	13
4.1. Identificación de las Cepas Bacteriana	13
4.2. Solubilidad de los Compuestos P1F1 y P1F	13
4.3. Método de Difusión en Disco	14
4.4. Método Cilindro - Placa	16
4.5. Determinación de UFC's	17
5. Discusión	21
6. Conclusiones	27
7. Bibliografía	28
8. Apéndice	32

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

En la FES-C se ha enfocado a desarrollar un compuesto originados a partir de la síntesis orgánica, donde el componente principal es el anillo β -lactámico. La necesidad de nuevos compuestos antimicrobianos es cada vez más importante, debido a las bacterias que afectan al tracto respiratorio del cerdo, cada vez son más resistentes a los antibióticos que se encuentran en el mercado. Los métodos utilizados para probar la actividad bactericida fueron por sensidiscos, cilindro-placa y determinación de unidades formadoras de colonias. Las cepas utilizadas fueron *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* y *Pseudomonas s.p.* Los compuestos que se utilizaron fueron P1F1 y P1F2, los cuales solamente eran solubles en DOMOSO, Acetona, Acetonitrilo y NN-Dimetilformamida. Por el método de sensidiscos no hubo inhibición de crecimiento (IC) de las cepas mencionadas. En el caso de método cilindro-placa, el compuesto P1F1 y P1F2 presento IC. Para *E. coli* los halos de IC fueron de 1 a 2 mm de diámetro; con *P. multocida* los halos de IC fueron diferentes para cada compuesto para P1F1 de 3 a 4 mm y P1F2 de 2 a 3 mm de diámetro respectivamente, ambos casos a una concentración de 512 $\mu\text{g/ml}$, para *Pseudomonas s.p.* y *S.suis* no hubo IC. Para las determinaciones de unidades formadoras de colonias las cepas utilizadas fueron *E. coli*, *S. Suis* y *P. multocida*, los compuestos P1F1 y P1F2 respectivamente, con una concentración de 512 $\mu\text{g/ml}$, con el cual no presentó IC, solamente el control positivo lo presento, es un análogo de los compuestos mencionados, llamado aztreonam a una concentración de 22.22 mg/ml. Las observaciones de los métodos de sensidiscos y cilindro-placa, en el primero no hubo difusión, la preparación de estos fue disolver el compuesto en los disolventes mencionados e impregnar los sensidiscos y dejar evaporar los compuestos, en el caso del método cilindro - placa el compuesto se disolvió totalmente, pero al agregarlo en los penicilindros precipitaba en el medio de cultivo, por lo tanto el compuesto fue totalmente insoluble en agua, a pesar de que se utilizo disolventes miscibles en agua. Los grupos funcionales que tienen el anillo β - lactámico como sustituyentes fueron grupos aromáticos, los cuales fueron insolubles en agua. Los compuestos P1F1 y P1F2 mostraron una actividad mínima en su efecto, esto muy relacionado a que no se solubilizaron completamente y se deberá trabajar más sobre los radicales que nos permitan hacer a está molécula más soluble.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen de los antibióticos.

Las enfermedades infecciosas causadas en humanos y animales han estado presentes durante siglos, el control y la erradicación de estas enfermedades siempre ha sido un trabajo de diferentes áreas como la microbiología, epidemiología, medicina humana, medicina veterinaria, entre otras; todas son de gran importancia debido a que se relacionan entre sí, formando un equipo de trabajo para la salud pública.

Las sustancias usadas en el control o erradicación de las enfermedades infecciosas se les llaman antibióticos, y son aquellas sustancias que matan (microbicidas) o inhiben el crecimiento (microbioestáticos) de los microorganismos, mas específicamente son llamados antibacteriales, antivirales, antiparasitarios y antifúngicos. Este trabajo se enfocara a los antibacteriales.

La mayoría de los antibacteriales son de origen natural, esto es, son producidos por microorganismos (bacterias y hongos) que son utilizados como mecanismos de defensa para otros microorganismos del microambiente, estos microorganismos se han aislado del suelo, agua, entre otros. (Waish, 2000). Los antibióticos obtenidos por hongos, bacterias y actinomicetos se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Fuente representativa de antibióticos (Tortora, 1998)

Bacterias (bacilos Gram –positivos)	Antibiótico
Bacillus subtilis	Bacitracina
<i>Bacillus polymyxa</i>	Polimixina
Actinomicetos	
Streptomyces nodosus	Anfotericina B
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Cloranfenicol
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Clortetraciclina y Tetraciclina
<i>Streptomyces erytraeus</i>	Eritromicina
<i>Streptomyces fradiae</i>	Noemicina
<i>Micromonospora purpurea</i>	Gentamicina
Hongos	
Cephalosporium spp	Cefalotin
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griseofulvina
<i>Penicillium notatum</i>	Penicilina

El modo de acción de los antibacteriales son tres: consisten en la inhibición de la 1) biosíntesis de la pared celular, 2) síntesis de proteínas y 3) en la replicación o reparación del ADN de las bacterias. (Waish, 2000)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el primero, es la inhibición de una enzima llamada transpeptidasa, es encargada de unir las cadenas peptídicas al peptidoglicano; en el segundo, se unen de forma covalente los antibacteriales a diferentes subunidades ribosomales, inhibiendo la síntesis de proteínas y el tercero, es la inhibición enzimática de tipo competitiva implicada en la replicación y transcripción del ADN. (Pelczar *et al.* 1993)

A partir de estos productos naturales se pueden realizar transformaciones químicas que permite distinguir dos procesos, la derivación y la síntesis. Por derivación se entiende variaciones de agrupamientos funcionales o reacciones análogas que no hacen variar la estructura fundamental de la materia prima. En la síntesis las variaciones son mas profundas. (Avendaño, 1993) El grupo de antibacteriales mas involucrado es este proceso son los β - lactámicos debido a que diversos géneros de bacterias han desarrollado resistencia a estos antibacteriales.

1.2. Resistencia a los Antibióticos

Los antibióticos administrados en un proceso infeccioso, así como el estudio de la sensibilidad a los mismos contra las bacterias; al no presentar su efecto bacterioestático o bactericida es conocido como resistencia a los antibióticos. Hace algunos años no se sospechaba que las bacterias tuvieran la facilidad de coleccionar de forma natural genes, así como el intercambio genético, esto permite que los factores de resistencia a los antibióticos con diferentes mecanismos bioquímicos estén presentes y listos en el medio ambiente que puedan ser tomados y pasados de un microorganismo a otro. (Davies, 1994)

Para comprender los mecanismos de resistencia bacteriana es necesaria entender la fisiología bacteriana, la farmacología de los antibióticos y la biología molecular de los agentes infecciosos. (Koneman *et al.* 1999)

La resistencia a los antibióticos puede ser inducidos por varios mecanismos: 1) cambios en la permeabilidad en la membrana celular, el cual limita la cantidad de antibiótico que tiene acceso a los blancos bacteriales, 2) flujo activo (transporte activo) del antibiótico hacia el exterior de la célula, 3) modificación de los sitios acción de los antibióticos, 4) rutas metabólicas provisionales, aquellas que han sido bloqueadas por las terapias antibacteriales y 5) destrucción o inactivación de los antibióticos. (Murray *et al.* 1999)

La ubicación de los mecanismos de resistencia está tanto en el cromosoma bacteriano, como un elemento extracromosómico llamado plásmido. El mecanismo más común por el cual se transfieren los genes de resistencia es la conjugación. Es necesario un factor de transferencia genética adicional antes de que un plásmido que transporta un gen de resistencia pueda transmitirse de un microorganismo a otro. El mecanismo de transferencia detectado mas recientemente es el transposon (elemento genético transposable). Los transposones pueden transportar porciones de plásmidos. De manera mas importante, ellos pueden llevar una pieza del cromosoma de una bacteria a otra

TRANSPOSÓN
FALLA DE ORIGEN

por transferencia conjugativa (transposones conjugante o gen saltarin). Se ha documentado la transferencia de resistencia a los antibióticos las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Un mecanismo de resistencia puede expresarse en forma continua en presencia o ausencia de un estímulo desencadenante. Esto se denomina expresión constitutiva. Algunas enzimas son segregadas de manera activa en el medio extracelular, donde pueden ejercer su acción antibacteriana. (Spratt, 1994; Davies, 1994)

La acumulación de antibióticos en sus sitios de acción de la célula bacteriana es la suma del transporte al interior de la célula, la inactivación es durante el proceso de transporte y la eliminación del antibiótico desde la célula. Al hablar de transporte, se tiene que considerar que las bacterias Gram negativas y Gram positivas son diferentes estructuralmente, en el caso de las bacterias Gram positivas el paso de los antibióticos se facilita, pero en las bacterias Gram negativas no se facilita el transporte de los antibióticos debido a que esta presenta la membrana externa, no favoreciendo la actividad del antibiótico. El método más simple para la entrada de los antibióticos en el interior de las células es la difusión a través de la membrana lipídica, pero incluso las sustancias hidrófobas no atraviesan la bicapa lipídica en forma eficiente. La razón para este bloqueo a la difusión es en parte la naturaleza polarizada, asimétrica de la membrana celular externa de las bacterias, que posee lipopolisacárido con lípido A y un oligosacárido adherido sólo sobre la cara más externa de la membrana. (Nikaido, 1994; Putman *et al.* 2000)

*Sin embargo, no solo se enfrenta el antibacteriano a este problema, sino también a las cargas que presenta, para que el antibiótico se desplace a través de la membrana externa las cargas tendrían que ser positiva o neutras. (Koneman *et al.* 1999)

Las porinas son las proteínas involucradas en el transporte de la mayoría de los antibióticos. (Putman *et al.* 2000)

1.3. Grupo de β - Lactámicos

Los antibióticos β - lactámicos es el grupo de antibióticos más usados y son comúnmente conocidos con el nombre de penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactámicos pueden ser de origen natural o semisintéticos conteniendo un núcleo al ácido 6-aminopenicilánico en el cual consiste en un anillo β -lactámico; este unido a un anillo de tiazolidina reciben el nombre de penicilina; o a un anillo dihidrotiazina que reciben el nombre de cefalosporina, así como el anillo β -lactámico es conocido como monobactámico. (Murray *et al.* 1999)

Los antibióticos monobactámicos constituyen el grupo de β -lactámicos a partir de 1981. El término monobactámico fue acuñado por Sykes, quien ha resumido las características principales: actividad antibacteriana derivada de su estructura monocíclica y la producción natural por bacterias Gram negativas, tales como *Cromobacterium violaceum*, *Gluconobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Agracterium*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

radiobacter, *Flexibacter sp.*, todas capaces de producir este nuevo antibiótico. (Bergolio, 1993)

Otra forma de evitar el efecto de las β - lactamasas es mostrada por aztreonam, el cual es una nueva clase de antibiótico, es totalmente sintético, conteniendo solamente una anillo conocido como un antibiótico monobactámico, tiene un espectro de actividad solamente sobre bacterias Gram negativas. (Hellinger y Brewer, 1999)

1.4. Síntesis de los Compuestos P1F1 y P1F2.

La necesidad de nuevos antimicrobianos es cada vez más importante, ya que las bacterias que afectan a los humanos y animales van generando resistencia a los antibióticos que se encuentran en el mercado o de mayor uso. En la FES-C en el Área de Química Orgánica se ha enfocado en desarrollar compuestos originados de la síntesis orgánica, el compuesto obtenido es un β - lactámico; el nombre de los compuestos es: Rac-cis-4-fenil-3-cloro-1-fenil-azetidín-2-ona (P1F2) y Rac-trans-4-fenil-3-cloro-1-fenil-azetidín-2-ona (P1F1). (Vazquez, 2001)

Figura 1. Moléculas de los compuestos P1F1(a) y P1F2 (b).



La obtención de los compuestos referidos son inducidos por irradiación infrarroja, forma energética que es aplicada en reacciones químicas, se le considera como una forma de "calentar" una mezcla de reacción, todas las reacciones químicas implican rupturas y formación de enlaces entre dos o más reactivos, estos reaccionan y forman productos, se rompen enlaces específicos en las materias primas y se forman enlaces específicos en los productos, a esto se le denomina síntesis orgánica, también está involucrado el tipo de reacción, que puede ser por adición, sustitución, eliminación y transposición (reordenamientos), además se da una explicación global de cómo sucede una reacción específica, a esta explicación se le denomina mecanismo de reacción; esto es, se describe con detalle que ocurre exactamente en cada paso de la transformación química en la obtención del nuevo compuesto o producto. (Vazquez, 2001; McMurry,1994)

La síntesis en el laboratorio de una molécula orgánica a partir de precursores simples pueden ser necesaria por varias razones. En la industria farmacéutica se

diseñan y sintetizan nuevas moléculas orgánicas con la esperanza de que algunas puedan usarse como nuevos fármacos. En la industria química, la síntesis se emprenden a menudo con objeto de hallar procesos más económicos para la formación de compuestos conocidos. (MacMurry, 1994)

La evaluación de un compuesto con un fin terapéutico requiere de un gran estudio desde su origen hasta su evaluación *in vitro* e *in vivo*. Cualquier aportación que se da sobre la evaluación del mismo es de gran ayuda, ya que puede ser tomado como referencia para trabajos posteriores.

La obtención y generación de diferentes antibióticos siempre requieren de un estudio para probar si presentan actividad antimicrobiana, para eso se utilizan diferentes métodos para evaluar la inhibición del crecimiento o la sensibilidad de las bacterias contra los antibióticos.

1.5. Métodos para la Determinación de la Sensibilidad a los Antibióticos.

El estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antibacteriales es necesario porque el espectro de actividad de los antibióticos es limitado y las bacterias tienen la capacidad para desarrollar resistencia. Los métodos utilizados con este fin permiten el estudio de la sensibilidad frente a antibióticos de elección en bacterias aisladas en procesos patológicos. Las técnicas basadas en la determinación de la sensibilidad, en forma general, es enfrentar la bacteria con los antibióticos y evaluar su viabilidad frente a las mismas.

Los métodos utilizados en la sensibilidad a los antibacteriales, es el método por dilución y el método por difusión.

El método de sensibilidad por dilución, consta en preparar una serie de tubos con caldo o placas de agar, adicionando el antibiótico a ensayar a diferentes concentraciones, después se inocula con la bacteria, se incuban, y al día siguiente se determina la concentración con menor contenido de antibiótico que inhibe al crecimiento de la misma, o sea, el MIC, que es la concentración de antibacterial suficiente que inhibe el crecimiento bacteriano, o bien la concentración mínima bactericida (CMB), que es la concentración suficiente que mata a la bacteria, que es un segundo parámetro a estudiar a los antibióticos bactericidas. Casi siempre se estudian diluciones dobles progresivas. Con esta metodología se puede obtener resultados de gran precisión y se utilizan como referencia para la evaluación de otras técnicas.

El empleo de concentración bactericida está indicado para aquellos con alteraciones en el sistema inmune y para el tratamiento de procesos localizados en zonas donde no se puede contar con los mecanismos de defensa del huésped para la erradicación final de las bacterias.

El método por dilución está diseñado y estandarizado para el estudio de la sensibilidad de bacterias aerobias de crecimiento rápido.

El estudio en medio líquido puede realizarse en tubos o en microplacas. Este método por dilución se emplea para el estudio de la actividad de nuevas sustancias.

A estas metodologías se pueden realizar modificaciones, referidas a los medios de cultivo, la preparación del inóculo, condiciones de incubación, lectura y ocasionalmente interpretación de los resultados, con el fin de evaluar a las bacterias de difícil crecimiento

El método por difusión, ensaya la sensibilidad de una bacteria haciéndola crecer en placas de agar, en este mismas se colocan discos de papel impregnado del antibacteriana a ensayar, esto es, se siembra la placa con una suspensión bacteriana, y a continuación, se colocan los discos y se incuba. Al día siguiente, si la bacteria es sensible a alguno de los antibióticos, alrededor del disco correspondiente aparecerá una zona libre de crecimiento bacteriano (denominado halo de inhibición). Otra manera de llamar el estudio de la sensibilidad a los antibióticos es antibiograma. El antibiograma por difusión está indicado para probar la sensibilidad de bacterias patógenas aerobias de crecimiento rápido. Adaptada convenientemente, puede utilizarse para el estudio de la sensibilidad frente a cepas de especies bacterianas exigentes.

Para obtener resultados precisos y reproducibles con esta técnica se han elaborado normas para su realización e interpretación que permiten equipararlos con los que se obtienen con el estudio de la concentración inhibitoria mínima y permiten categorizar la amplitud de los halos de inhibición. Para ellos se determina en paralelo la sensibilidad por difusión y por dilución de series de cepas de diferentes especies, seleccionadas sensibles y resistentes a los antibióticos. Los resultados se relacionan mediante una línea de regresión. De acuerdo con la correlación de los resultados de ambas técnicas, los halos correspondientes a las concentraciones críticas, según la línea de regresión, serán la base para categorizar los resultados de difusión. Con esto se consiguen resultados equiparables entre ambos métodos.

En los estudios de sensibilidad por dilución y difusión se estudia el efecto bacteriostático de los antimicrobianos, o sea su acción inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano. Las técnicas para la valoración del efecto bactericida son la determinación de la concentración bactericida, las curvas de letalidad y el estudio de la acción bactericida en el suero. Estas técnicas son complejas y laboriosas. (Koneman *et al*, 1999, Roy y Tirado, Calderón, 2001)

1.5.1. Interpretación de los Resultados.

La finalidad de un estudio de sensibilidad *in vitro* consiste en determinar el grado de actividad de un antibacteriana frente a una bacteria. Se admite además la categoría de moderadamente sensible referido a las cepas bacterianas que se inhiben con concentraciones que no se alcanzan *in vivo* con la dosis terapéuticas habituales, pero pueden alcanzarse con dosis más elevadas tolerables. Esta

categoría es aplicable a antibióticos en los que la diferencia entre la dosis terapéutica y las dosis tóxica es amplia. (Koneman *et al*, 1999, Roy y Tirado, Calderón, 2001)

1.6. Enfermedades de los Cerdos.

Las enfermedades en las pjaras generan pérdidas económicas elevadas a nivel de producción debido que hay una morbilidad y mortalidad alta en los lechones y en cerdos de destete, además por otros factores físicos. (temperatura, manejo, entre otros)(Mendoza y Ciprián, 2001)

Las diarreas y las infecciones extraintestinales son generadas por *Escherichia coli*, y en algunos casos *Pseudomonas s.p.*, afectando más al tracto urinario. Las neumonías en los cerdos son producidas por muchos microorganismos entre ellos están *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Streptococcus suis*, entre otros. Hay un enfoque particular en las infecciones causadas por *S. suis*, recientemente se tiene mas conocimiento de la patología, signos clínicos, diagnóstico y prevención. Además es un agente zoonotico de consecuencias severas (septicemia, meningitis, artritis y neumonía) y que este se presenta en un amplio rango de especies animales y puede influir en la epidemiología y en el control de las enfermedades infecciosas en cerdos. (Straw *et al*, 1999)

En este trabajo se evaluarán algunas de las bacterias tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas s.p.*, *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis*, estos dos últimos están involucrados en los nuevos agentes en el Complejo Respiratorio Porcino (CRP). (Mendoza y Ciprián, 2001)

Para la erradicación de estas infecciones se dan diversas terapias de antibióticos que van desde β -lactámicos hasta fluoroquinolonas que han sido objeto de estudio para verificar su actividad como antimicrobianos, obteniendo resultados satisfactorios presentando una inhibición del crecimiento de los microorganismos mencionados, pero se ha encontrado que algunas cepas presentan resistencia a estos antibióticos.

1.7. Justificación

En los últimos años se ha encontrado una alta incidencia de factores de resistencia en diferentes cepas bacterianas, resurgiendo enfermedades que en el pasado estaban controladas incluso erradicadas. Estos factores de resistencia surgen a partir del uso de antibacteriales de forma indiscriminada, esto es, consumo excesivo, tratamientos interrumpidos, y automedicación. Los antibióticos más involucrados en la resistencia son la penicilina, ampicilina, sulfas, tetraciclinas, entre otras, por lo que los tratamientos no son eficaces y no hay un control y erradicación del agente infeccioso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La industria farmacéutica es una de tantas entidades que desarrolla e investiga nuevas sustancias que presentan inhibición del crecimiento bacteriano. En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, también se tiene ese interés por lo que se llevo a cabo la síntesis de compuestos con posible actividad antimicrobiana.

1.8. Hipótesis

Si el compuesto β -lactámico monocíclico producido por síntesis orgánica tiene actividad antimicrobiana, entonces inhibirá el crecimiento microbiano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el compuesto β -lactámico monocíclico con configuración cis – trans obtenido por síntesis orgánica, por diferentes métodos de sensibilidad a los antibióticos para determinar su actividad antimicrobiana.

2.2. Objetivos particulares

Evaluar el compuesto β -lactámico monocíclico con su respectiva configuración cis-trans por el método difusión en disco para determinar la actividad antimicrobiana con diferentes cepas bacterianas.

Evaluar el compuesto β -lactámico monocíclico con su respectiva configuración cis-trans por el método cilindro - placa para determinar la actividad antimicrobiana con diferentes cepas bacterianas.

Evaluar el compuesto β -lactámico monocíclico con su respectiva configuración cis-trans por unidades formadoras de colonias (UFC's) para determinar la actividad antimicrobiana con diferentes cepas bacterianas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron Agar Infusión cerebro corazón (BIOXON), Agar para antibióticos No. 11 (BIOXON), Agar soya tripticaseína (BIOXON), Müller – Hinton (MERCK), e Infusión cerebro corazón. (BIOXON) (ver apéndice)

3.2. Cepas Bacterianas

Las cepas utilizadas son de origen porcino de casos neumónicos (n), diarreicas (d) y tracto urinario (tu).

Pasteurella multocida (n)

Streptococcus suis (n)

Pseudomonas sp (tu)

Escherichia coli (d)

3.3. Pruebas bioquímicas

Para la identificación de las cepas mencionadas las pruebas bioquímicas a utilizar están referidas en Cowan y Steels (1974); Straw *et al.* (1999)

3.4. Compuestos obtenidos en el Laboratorio de Química Orgánica de la FES-C U.N.A.M.

Rac-cis-4-fenil-3-cloro-1-fenil-azetidín-2-ona (P1F2)

Rac-trans-4-fenil-3-cloro-1-fenil-azetidín-2-ona (P1F1)

Los compuestos se prepararon a una concentración de 512 µg/ml con el disolventes más adecuado.

3.5. Prueba de solubilidad

Se tomo una cantidad considerable de los compuestos y se disuelven en diferentes disolventes como acetona, acetonitrilo, dimetilsulfoxido (DOMOSO), N'N'-dimetilformamida (DFMA) y agua destilada.

3.6. Antibióticos

Aztreonam (AZ), solución inyectable 500 mg (BRISTOL) Se preparo a una concentración de 22 mg/ml con agua desionizada.

3.7. Método de sensibilidad por difusión por disco (Hernández-Medel y Márquez, 1996. Konemam *et al.* 1999.)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Preparación de los discos

La preparación de los discos de papel, se utilizo papel filtro del No. 4 y se obtuvieron mediante el corte de una perforadora, con un diámetro aproximado de 6mm, se esterilizo en autoclave a 15 libras, 121° C por 15 minutos, se realizo prueba de esterilidad.

Ya estériles, se impregnan los discos con los compuestos P1F1 Y P1F2 a una concentración de 200, 100, 25, 15, 10 µg/ml disueltos con los disolventes adecuados para esta prueba.

El medio de cultivo utilizado en este método el MH a una temperatura entre 32° a 37° C, para la preparación del inóculo, la cepa a utilizada debía de tener un crecimiento de por lo menos de 18 hrs, sembrada en placa de BHI, se tomo una asada y se resuspendió en caldo BHI ajustándolo a la turbidez del tubo 0.5 del nefelómetro de Macfarland, después con un hisopo estéril se humedeció en el caldo inoculado y se siembro de forma masiva la placa de MH, se distribuyeron los discos de papel en la placa de forma que tengan un radio de 2.8 cm, se incubaron a 37° C de 18 a 24 horas. Se midieron los halos de inhibición con un vernier.

Los controles fueron los siguientes: se utilizo como control positivo sensibiliscos de Ceftriaxona y controles negativos fueron discos de papel estériles. Para evitar falsos positivos o negativos se pusieron discos de papel impregnados con los disolventes.

3.8. Método Cilindro – Placa (Hernández, 1994; USP, 2000)

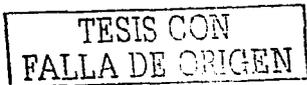
El método cilindro – placa se preparo en dos etapas: 1. Consta de una capa base agregando 21 ml de medio AA11, se deja solidificar en una superficie lisa y nivelada. 2. se agrega la capa inoculante que consta de 4 ml de AST o BHIa previamente inoculado con 1ml de la cepa bacteriana a estudiar ajustada al tubo 0.5 del Nefelometro de Macfarland, al agregar esta capa debe quedar distribuida uniformemente, ya solidificado se procede a colocar 6 cilindros de forma que quedaran distribuidos con un radio de 2.8 cm cada uno, ya colocados se les adiciona los compuestos diluidos así como los controles. Se coloco papel filtro en la tapa de la caja petri para que absorbiera la humedad generada, se incubo a 37° C de 18 a 24 hrs. Se medirán los halos de inhibición con un vernier.

La concentración de los compuestos P1F1 y P1F2 es de 512 µg/ml con el disolvente más adecuado, mencionados anteriormente.

Los controles fueron los siguientes: como control positivo se utilizo Aztreonam y controles negativos fueron cilindros vacíos estériles. Para evitar falsos positivos o negativos se puso un cilindro con el disolvente utilizado.

3.9. Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Flores, 1997. Hanley, 1990)

Se sembró la cepa a estudiar en placas de agar BHI, incubando a 37° C por 18 horas, verificando la pureza de la cepa observando la morfología colonial, así



como la microscópica. A partir de este cultivo, se tomo de una a dos asadas y sé resuspendió en un tubo con 10 ml de caldo BHI ajustándolo a una turbidez del 0.5 del Nefelómetro de Macfarland. Se inocularon los matraces erlenmeyer con 120 ml de caldo BHI con un inóculo de 1 ml del tubo ajustado por turbidez, incubandolo a 37 ° C con agitación suave, tomando muestra a las 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas de incubación para determinar Absorbancia (ABS) y UFC's. Graficar ABS y UFC's v.s. tiempo.

De los matraces utilizados uno solamente llevaba el inóculo (control negativo), otro iba el compuesto P1F1, otro con el compuesto P1F2 y el antibiótico AZ en otro matraz (control positivo) y por ultimo un matraz con el disolvente utilizado para disolver los compuestos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. RESULTADOS

4.1. Identificación de las cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en el trabajo fueron obtenidas de casos neumónicos de cerdos, aislandolas de pulmón, a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas para su identificación.

Las cepas identificadas fueron *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Pseudomonas sp* y *Escherichia coli*.

Pasteurella multocida

Su morfología colonial fue de aspecto cremoso, redondo; su morfología al microscopio con la tinción de Gram se observaron cocobacilos Gram negativos, las pruebas bioquímicas aplicadas en la identificación fueron: catalasa, indol, maltosa, manitol, sucrosa y motilidad negativa

Escherichia coli

Su morfología colonial fue de aspecto cremoso, redondo; su morfología al microscopio con la tinción de Gram se observaron bacilos Gram negativos, las pruebas bioquímicas aplicadas en la identificación fueron: catalasa, indol, rojo de metilo, lactosa, motilidad negativa, Voges Proskauer negativo, citrato (Simmons) negativo y H₂S (TSI) negativo.

Streptococcus suis

Su morfología colonial fue de aspecto puntiforme, redondas, y en agar sangre fueron β-hemolíticas su morfología al microscopio con la tinción de Gram se observaron cocos en cadena Gram positivos, las pruebas bioquímicas aplicadas en la identificación fueron: oxidasa, indol, maltosa, manitol, sucrosa y motilidad negativa

Pseudomonas sp

Su morfología colonial fue de aspecto transparentes, rugosas y presentan fluorescencia con luz UV; su morfología al microscopio con la tinción de Gram se observaron bacilos Gram negativos, las pruebas bioquímicas aplicadas en la identificación fueron: oxidasa, ureasa, motilidad y crecimiento en MacConkey

4.2. Solubilidad de los compuestos P1F1 y P1F2

La selección de los disolventes, se eligieron de acuerdo a sus características fisicoquímicas; punto de ebullición y su polaridad, y fuesen miscibles en agua, a su vez que disolvieran los compuestos P1F1 y P1F2. (tabla 1)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Resultados de solubilidad de los compuestos P1F1 y P1F2.

DISOLVENTE	P1F1	P1F2
Acetona	+	+
Dimetilsulfoxido (DOMOSO)	+	+
Acetonitrilo	+	+
N,N'-Dimetilformamida (DFMA)	+	+
Agua destilada	-	-

+ soluble
- insoluble

4.3. Método de Difusión en disco de papel

Las cepas bacterianas aisladas de enfrentaron con los compuestos P1F1 y P1F2, los cuales se disolvieron en acetona.

Con la cepa de *E. coli* no hubo inhibición del crecimiento bacteriano con ambos compuestos, solamente con el control positivo mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Determinación de la actividad antimicrobiana de *E. coli* por el método de difusión de discos.

Sustancias	CONCENTRACIONES				
	200 µg/ml	100 µg/ml	25 µg/ml	15 µg/ml	10 µg/ml
P1F1	-	-	-	-	-
P1F2	-	-	-	-	-
Control Positivo	30*	30*	30*	30*	30*
Control Negativo	-	-	-	-	-

* diámetro del halo de inhibición en mm.

Con la cepa de *P. multocida* no hubo inhibición del crecimiento bacteriano con ambos compuestos, solamente con el control positivo mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Determinación de la actividad antimicrobiana de *P. multocida* por el método de difusión de discos.

CONCENTRACIONES					
Sustancias	200 µg/ml	100 µg/ml	25 µg/ml	15 µg/ml	10 µg/ml
P1F1	-	-	-	-	-
P1F2	-	-	-	-	-
Control Positivo	35*	35*	35*	35*	35*
Control Negativo	-	-	-	-	-

* diámetro del halo de inhibición en mm

Con la cepa de *Pseudomonas sp.* no hubo inhibición del crecimiento bacteriano con ambos compuestos, solamente con el control positivo mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Determinación de la actividad antimicrobiana de *Pseudomonas sp* por el método de difusión de discos.

CONCENTRACIONES					
Sustancias	200 µg/ml	100 µg/ml	25 µg/ml	15 µg/ml	10 µg/ml
P1F1	-	-	-	-	-
P1F2	-	-	-	-	-
Control Positivo	28*	28*	28*	28*	28*
Control Negativo	-	-	-	-	-

* diámetro del halo de inhibición en mm

Con la cepa de *S. suis* no hubo inhibición del crecimiento bacteriano con ambos compuestos, solamente con el control positivo mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Determinación de la actividad antimicrobiana de *S. suis* por el método de difusión de discos.

CONCENTRACIONES					
Sustancias	200 µg/ml	100 µg/ml	25 µg/ml	15 µg/ml	10 µg/ml
P1F1	-	-	-	-	-
P1F2	-	-	-	-	-
Control Positivo	27*	27*	27*	27*	27*
Control Negativo	-	-	-	-	-

* diámetro del halo de inhibición en mm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4. Método Cilindro – Placa.

En este método los compuestos P1F1 y P1F2 se disolvieron en DOMOSO, los resultados obtenidos fueron diferentes para cada cepa bacteriana y compuesto.

Los resultados de *E. coli* presentaron una inhibición de 1 a 2 mm de diámetro para ambos compuestos mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Determinación del método cilindro – placa para *E. coli*

Sustancias	Diámetro de Inhibición*
P1F1	1-2
P1F2	1-2
Control Positivo	28-30
Control Negativo	0

* diámetro del halo de inhibición en mm.

Los resultados de *Pseudomonas sp.* no hubo inhibición del crecimiento con ambos compuestos mostrados en la tabla 7

Tabla 7. Determinación del método cilindro – placa para *Pseudomonas s.p.*

Sustancias	Diámetros de inhibición*
P1F1	0
P1F2	0
Control Positivo	38 – 40
Control Negativo	0

* diámetro del halo de inhibición en mm.

Los resultados de *P. multocida* presentaron una inhibición de 3 a 4 mm de diámetro con el compuesto P1F1 y con el compuesto P1F2 presentaron una inhibición de 2 a 3 mm de diámetro, mostrados en la tabla 6.

Tabla 8. Determinación del método cilindro – placa para *P. multocida*.

Sustancias	Diámetros de inhibición*
P1F1	3 – 4
P1F2	2 – 3
Control Positivo	28 – 35
Control Negativo	0

* diámetro del halo de inhibición en mm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados de *S. suis* no hubo inhibición del crecimiento con ambos compuestos, mostrados en la tabla 9.

Tala 9. Determinación del método cilindro – placa para *S. suis*.

Sustancias	Diámetros de inhibición*
P1F1	0
P1F2	0
Control Positivo	25-28
Control Negativo	0

* diámetro del halo de inhibición en mm

4.5. Unidades Formadoras de Colonias

La evaluación de las UFC's fue a partir de la cinética de crecimiento de las cepas bacterias enfrentándolas a los compuestos en estudio, graficando absorbancia contra tiempo (■) y UFC's contra tiempo. (▲)

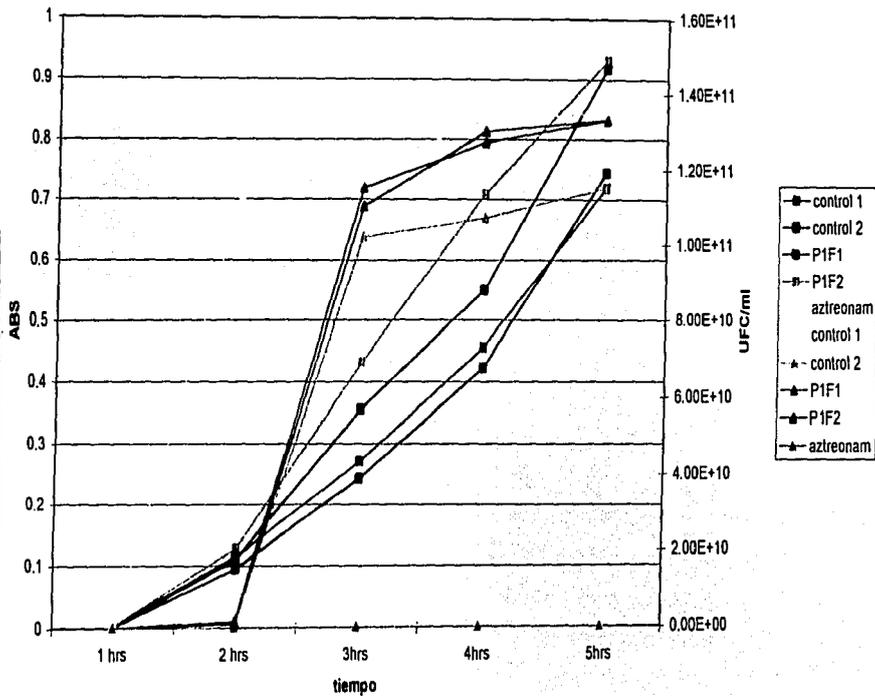
Pseudomonas sp., se observo una curva de crecimiento con sus tres fases (fase de iniciación, fase logarítmica y fase estacionaria), de los compuestos en estudio, P1F1 y P1F2, no encontrando una inhibición del crecimiento bacteriano o una disminución logarítmica del mismo por lo tanto el resultado es negativo, solamente se observo la inhibición del crecimiento bacteriano con aztreonam, mostrados en la gráfica 1.

Escherichia coli, se observo una curva de crecimiento con sus tres fases (fase de iniciación, fase logarítmica y fase estacionaria), de los compuestos en estudio, P1F1 y P1F2, no encontrando una inhibición del crecimiento bacteriano o una disminución logarítmica del mismo por lo tanto el resultado es negativo, solamente se observo la inhibición del crecimiento bacteriano con aztreonam, mostrados en la grafica 2.

Pasteurella multocida, se observo una curva de crecimiento con sus tres fases (fase de iniciación, fase logarítmica y fase estacionaria), de los compuestos en estudio, P1F1 y P1F2, no encontrando una inhibición del crecimiento bacteriano o una disminución logarítmica del mismo por lo tanto el resultado es negativo, solamente se observo la inhibición del crecimiento bacteriano con aztreonam, mostrados gráfica 3.

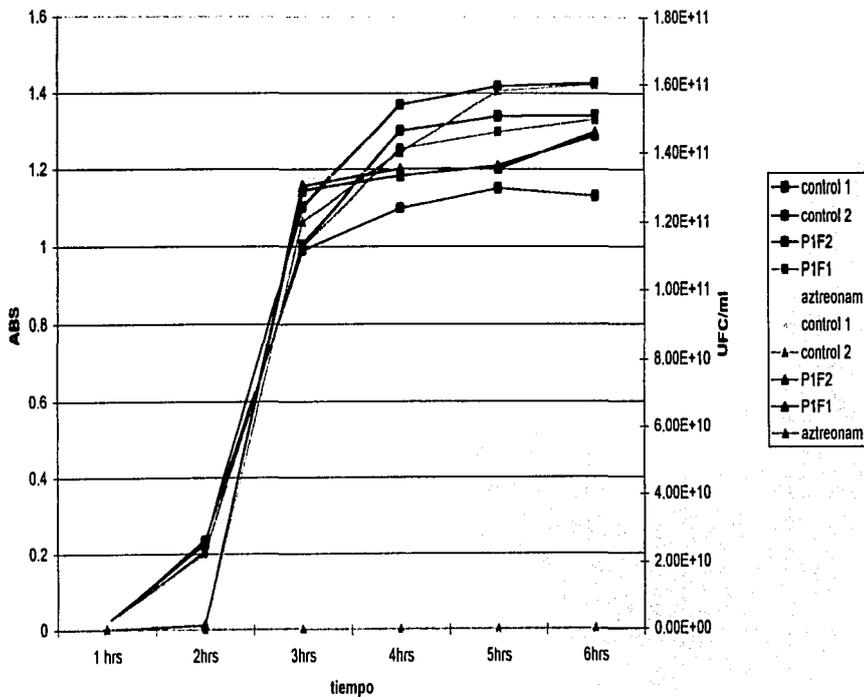
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 1. Cinética de Crecimiento de *Pseudomonas sp* V.S. P1F1 y P1F2



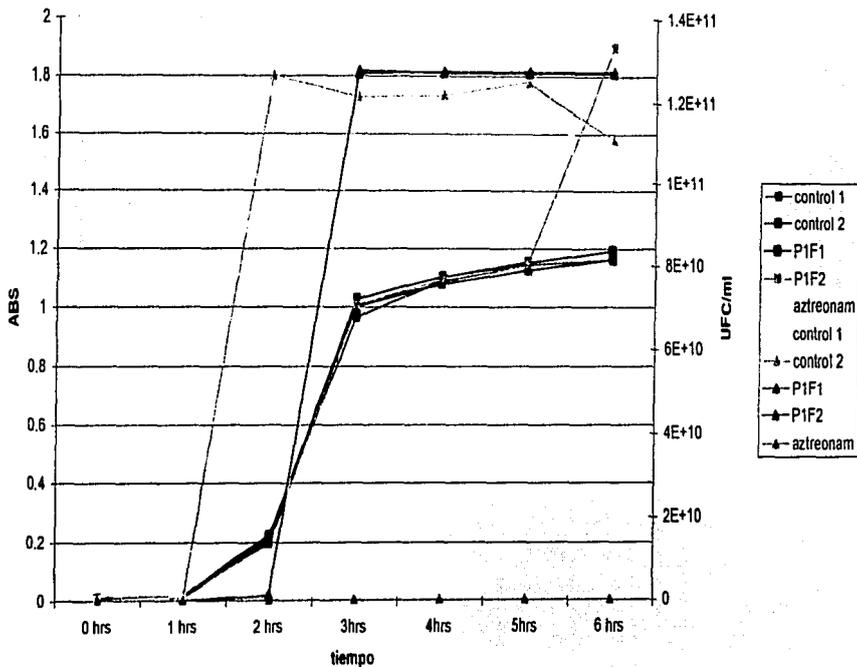
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Gráfica 2. Cinética de Crecimiento de *E. coli* V.S. P1F1Y P1F2



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3. Cinética de Crecimiento de *P. multocida* V.S. P1F1 y P1F2



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

5. DISCUSIÓN

Las cepas bacterianas utilizadas en el trabajo fueron algunas de tantas que afectan el tracto respiratorio y aparato digestivo del cerdo. Los antibacteriales fueron una forma de control de las enfermedades ocasionadas por bacterias, estos se emplean como aditivos en alimento y en el agua, además como profilácticos; es la forma más común del uso de antibacteriales. Cuando hay un brote en la granja se administra antibacteriales de forma masiva para un rápido control del brote, previamente de haber realizado el aislamiento y el antibiograma del agente infeccioso.

Las afecciones ocasionadas por estas bacterias fueron diarreas, infecciones extraintestinales, neumonía y septicemia, según sea el caso. *Escherichia coli* es el agente causal de las diarreas en lechones, *Pasteurella multocida* es el agente causal de la Pasterelosis Neumónica, *Streptococcus suis* es el agente causal de neumonía, endocarditis meningitis, entre otros, *Pseudomonas sp* es el agente causal de infecciones del tracto urinario, además, estos agentes fueron zoonóticos. (Straw *et al.*, 1999)

La importancia de estas cepas bacterianas, es debido a que en los últimos años se ha incrementado la resistencia en los antibacteriales administrados con mayor frecuencia (β -lactámico, sulfas) e incluso antibacteriales que apenas han salido al mercado.

Escherichia coli de origen animal puede colonizar el intestino humano por un periodo temporal, dando como resultado la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia, por una movilización de plásmidos y transposones conjugativos dando una significancia mayor a la incidencia en el incremento de cepas resistentes. Oppegaard *et al.* (2001) en un estudio encontraron que los trabajadores que laboraban en las granjas y tuvieron contacto con animales infectados, identificaron mecanismos de resistencia contra antibacteriales que fueron utilizados en animales presentes en cepas aisladas de los trabajadores, esto fue demostrado con *E. coli*. Incluso, mencionan que en el intestino hay *E. coli* multiresistentes no patogénicas que puede ser un reservorio de genes de resistencia.

En este tipo de enfermedades diarreicas donde esta involucrada *E. coli*, los antibacteriales usados con mayor frecuencia son: ampicilina, trimetoprim – sulfametoxazol y deoxiciclina, entre otros; se ha observado la disminución de la sensibilidad a estos en cuatro regiones geográficas. (Gomi *et al.*, 2001)

En el caso de *P. multocida* hace 20 años se informo del aislamiento de cepas que mostraban resistencia a uno o más antibacteriales. En particular, en México existe muy poca información confiable sobre los niveles de resistencia antimicrobiana en *Pasteurella sp*. La información disponible tiene mas de 10 años de haber sido publicada. En un estudio realizado por Pijoan *et al.*(2000) se observo que la

oxitetraciclina, kanamicina, estreptomocina y lincomicina fueron resistentes, y en el caso de penicilina y tilmocina fueron de sensibilidad media de 34 cepas aisladas. Además, se recomienda determinar regionalmente los patrones de resistencia a diversos antibacteriales, podría haber variaciones significativas, la incidencia es mayor que hace 20 años.

Por último, *S. suis* por ser un agente zoonótico y sistémico, se tiene en consideración debido a que se ha reportado que presenta resistencia contra macrólidos, lincosamidas y penicilina; la mayoría de cepas aisladas entre 1999 – 2000 en Europa, tanto en trabajadores y animales en granjas porcícolas, además se plantea el intercambio de genes de resistencia entre humanos y animales así como la presencia elementos móviles de DNA. (Aarestrup *et al.*, 1998)

En el estudio de Talavera *et al.* (2001) menciona que el serotipo 2 de *S. suis* esta involucrado en las infecciones en humanos, donde se evaluó la virulencia de este agente infeccioso y los resultados muestran una virulencia media, determinado estadísticamente. También se menciona la interacción entre trabajadores y animales infectados y el riesgo que los trabajadores sean portadores y sea fuente de propagar el microorganismo a otras granjas y humanos.

Considerando lo mencionado, la interacción que existe entre los animales y los humanos, y viceversa, se propicia la transferencia de factores de resistencia dando como resultado un difícil control de estas enfermedades infecciosas sin olvidar el uso masivo y repetitivo de un antibacterial, favoreciendo la resistencia a los antibacteriales. (Opegard *et al.*, 2001)

Las pérdidas económicas en las enfermedades respiratorias en la industria porcícola son muy elevadas, sin tomar en cuenta el costo y tratamiento en estas enfermedades. Incluso se ha empezado a utilizar antibióticos como el ceftifur que se usa en bovinos, ahora se ha estado empleando en porcinos teniendo resultados satisfactorios. (Salmon *et al.*, 1995)

Históricamente se ha buscado sustancias que inhiban el crecimiento bacteriano por ejemplo: en la llamada Época de los "Preantisépticos" se utilizaban las resinas aromáticas, el antimonio, el azufre, el mercurio y el salvarsán, este último era uno de las más utilizados en el tratamiento de la sífilis en aquella época, pero eran demasiado nocivos; luego llega la época de los antisépticos como los hipocloritos, yodo, etanol, agua oxigenada y atonxil, utilizados como desinfectantes.

En 1928 A. Fleming observa la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* por un hongo, nombrado en la actualidad como *Penicillium notatum* la sustancia producida es conocida como penicilina; y Waksman fue quien propuso el término de antibiótico. También una de las sustancias muy utilizada al igual que en la actualidad son las "sulfas" que es de origen sintético, y a través de los años fueron surgiendo otros. (Tortora *et al.*, 1998; Pelczar *et al.*, 1993)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A partir de las ciencias experimentales se ha podido comprender la acción, el metabolismo y la toxicidad de los antibióticos y también de otros fármacos, así como, conocer la estructura de los receptores o bien los mas cercano a los mismos, además se ha establecido la relación entre estructura química y su acción biológica. (Avendaño, 1997)

No nada mas se debe a los antibacteriales en control de la enfermedades infecciosas; el decremento de estas mismas depende de muchos factores tales como, vacunas, antibióticos, nutrición, agua y comida segura; todos estos factores favorecen la disminución de la susceptibilidad del huésped. En cambio, las enfermedades infecciosas emergentes están influenciadas por factores como, cambios demográficos y de conducta, en la tecnología e industria, en el ambiente y el uso del suelo, comercio y turismo, adaptación y cambios en los microorganismos, y el fracaso en la salud publica, por lo tanto, incrementando la susceptibilidad del huésped ante infecciones que hace algunos años ya estaban erradicadas o controladas. (Cohen, 2000)

Un error de las industrias farmacéuticas en los 80's, creyeron que se tenían una amplia gama de antibióticos y se redujo el desarrollo de nuevos antibióticos, en estos mismos años resurgieron muchas enfermedades ya controladas, en la actualidad llamadas enfermedades emergentes y con ello la resistencia a los antibióticos. (Cohen, 2000)

Hace algunos años se reinicio la búsqueda de nuevas sustancias que inhiba el crecimiento bacteriano desarrollado trabajos de investigación con respecto a la modificación (adición, sustitución, eliminación y transposición (productos isomérico) de grupos funcionales) y síntesis de moléculas con probable actividad biológica, así como la búsqueda de nuevas sustancias de origen natural. (Memury, 1994; Avendaño, 1997) En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan el caso fue la síntesis de las moléculas P1F1 y P1F2.

Dentro del grupo de antibacteriales β -lactámicos se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, carbapenoms y monobactámicos, este ultimo podemos situar a los compuestos P1F1 y P1F2; aztreonam el primer monobactámico desarrollado en 1981. (Bergolio, 1993)

P1F1 y P1F2 se describen en la figura 1 presentan la misma fórmula condensada pero tienen diferente estructura, esto se le denomina isomería cis- trans, esta diferencia entre estas dos moléculas puede ser significativa para la actividad antimicrobiana. Esto esta demostrado en el trabajo de Savluchinske *et al* (2001) realizaron modificaciones a diterpenos, la adición de diferentes grupos funcionales (carbonilo, isopropilo) favoreció la actividad antimicrobiana, estos mismos compuestos presentaban isomería cis-trans, en el cual no cambiaba su efecto antimicrobiano. Birne *et al* (2000) hace mención de la importancia de los grupos funcionales en la actividad antimicrobiana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

También es cierto que las características fisicoquímicas de los compuestos dependen de los grupos funcionales y de la isomería presente en la molécula, por este motivo se realizaron pruebas de solubilidad. (Velázquez, 2000)

La selección de los disolventes utilizados en los métodos de difusión en disco, cilindro – placa y UFC's fue basándose en su punto de ebullición y la miscibilidad en agua, debido a que los compuestos P1F1 y P1F2 son insolubles en agua. Recordemos que la composición de los medios de cultivo, es de un 70% al 80% de agua, por esta razón se utilizaron diferentes disolventes en cada método realizado.

La acetona fue utilizada en el método de difusión en disco, ya que su punto de ebullición es de 52°C, favoreciendo el secado de los discos de papel, en cambio, DOMOSO su punto de ebullición es de 189°C, esto nos permitió que cuando se realizo el método cilindro-placa al incubar a 37°C no se evaporara tan rápido tratando de favorecer la difusión de los compuestos; y en la determinación de las UFC's también se utilizo el mismo disolvente. Estos disolventes son los recomendados por Velázquez, 2000 y por la USP, 2000.

La importancia del punto de ebullición fue por el hecho de que hay disolventes que a temperatura ambiente se evaporan con facilidad. La miscibilidad en el agua es muy importante debido a que los medios de cultivo parte de su composición es agua por lo que no se puede usar disolventes no polares o sea insoluble en agua, debido a que se quiere que el compuesto se homogenice en soluciones acuosas.

En el método difusión en disco los compuestos P1F1 y P1F2 no presentaron actividad antimicrobiana a pesar de haber utilizado diferentes concentraciones, no es el caso en el trabajo de Calderón (2001) en donde uno de los métodos utilizados para la evaluación de diferentes derivados de carbamatos fue por difusión en disco, obteniendo una inhibición del crecimiento de 12 cepas de 20, modificando la concentración inicial. También determina las UFC's a diferentes concentraciones de estos compuestos inhibiendo el crecimiento bacteriano, no es el caso de nuestro trabajo en donde no se observa inhibición del crecimiento bacteriano con una sola concentración; se tomo la decisión de usar una sola concentración debido que el trabajo de McAttee *et al.* (2002) menciona que al incrementar la concentración de un nuevo compuesto, la inhibición del crecimiento puede no estar interviniendo el metabolismo bacteriano sino se estén realizando cambios estructurales reversibles sobre la pared celular.

Los resultados del método cilindro-placa, muestra una actividad antimicrobiana "parcial" con ambos compuestos, la cepa de *E. coli* con halos de inhibición de 1mm de diámetro y *P. multocida* con diferentes halos de inhibición para cada compuesto, esto es para P1F1 de 3 a 4mm y P1F2 de 2 a 3 mm. En el caso de las cepas de *S. suis* y *Pseudomonas sp.* no hubo inhibición del crecimiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se observa los resultados no corresponden entre sí, el método de difusión en disco y la determinación de las UFC's fueron negativos, en cambio el método cilindro-placa son positivos los resultados.

Los compuestos P1F1 y P1F2 fueron insolubles en agua no permitiendo observar su efecto antibacterial, variando los resultados de los métodos aplicados, este fue un impedimento para observar la inhibición del crecimiento bacteriano. Los sustituyentes involucrados en estas molécula fueron sustituyentes aromáticos (fenil) y halogenos (cloro). El cloro se ha reportado que incrementa la potencia y su eficiencia antibacterial. En el caso de los grupos aromáticos no hay algún reporte del cual se su beneficio, sin embargo este sustituyente hace a la molécula no polar, esto es que sea insoluble en agua precipitando al compuesto. También esta reportado que los antibacteriales deben de tener cargas positivas para facilitar su la difusión. (Krohn *et al.*, 1993)

OH *et al* (2000) sugieren que se deben utilizar métodos diferentes para la evaluación *in vitro* de nuevos compuestos para poder tomar en cuenta la estabilidad, actividad y difusión, entre otras características fisicoquímicas de los compuestos a evaluar. Por lo tanto, los resultados a pesar de que no fueron satisfactorios, tampoco los podemos descartar debido a las propiedades fisicoquímicas de P1F1 y P1F2, donde el método cilindro placa resulto es mas adecuado. Este fenómeno se observo en el trabajo de Hernández (1994), de dos métodos que se utilizo, el método cilindro - placa fue el mas adecuado para la evaluación de quinolonas.

Sin embargo para poder corroborar los resultados esta recomendado un segundo método para comparar los resultados obtenidos y no dar falsos positivos o falsos negativos, según sea el caso, (Shryok *et al.*, 1995) y poder establecer MIC's y diámetros de halos de inhibición.

A pesar de que existen recomendaciones para la evaluación de sustancias con posible actividad antimicrobiana, en el trabajo de Hernández-Medel y Vázquez. (1996) evaluaron diferentes sustancias de origen natural con posible actividad antimicrobiana con un solo método, para su evaluación dependió de las características fisicoquímicas de las sustancias.

Estos métodos utilizados fueron los más frecuentes para evaluar antibióticos y/o sustancias con probable actividad antimicrobiana. (Cowan, 1999; Calderón, 2001)

Un punto importante que Smith y Navilliat (1997) y Odland *et al.* (2000) fue el control de calidad que se deben de tener al evaluar sustancias (metabolito secundario o moléculas sintetizadas) con actividad antimicrobiana, esto se lleva acabo con metodologías estandarizadas; en el caso del trabajo tuvimos que apegarnos a metodologías o trabajos parecidos, debido a que no hay una norma que establezca los parámetros para la evaluación de nuevas sustancias con probable actividad biológica, medida por la inhibición del crecimiento bacteriano. Como ejemplo: la Tiamulina que a pesar de que es un antibacterial utilizado contra

infecciones en cerdos en el estudio de Jones *et al.* (2002) establecieron criterios de control para la interpretación con el fin de monitorear la resistencia e este antibacterial.

También Washington (1999) recomienda que al realizar pruebas de susceptibilidad se utilizan siempre los antibióticos de rutina para tener un registro de la presencia de sensibilidad, los métodos de evaluación deben de estar modificando constantemente para poder dar resultados confiables de los aislamientos clínicos realizados y difundir esta información.

La evaluación de productos antibacterianos esta establecido con normas estandarizadas, sin embargo cuando hay sustancias con posible actividad antimicrobiana no hay parámetros que nos permitan una evaluación confiable, por lo cual el trabajo trata de evaluar los compuesto con diferentes métodos, pero también tomemos en cuenta que también depende de las características fisicoquímicas de los compuestos. Esperemos que este trabajo pueda servir como base para otros trabajos posteriores en la evaluación de actividad antimicrobiana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. CONCLUSIONES

Las propiedades fisicoquímicas de P1F1 y P1F2 influyeron en los resultados de los métodos difusión en disco y la determinación de las UFC's para su realización.

El método cilindro – placa fue al mas adecuado para observar la actividad antimicrobiana.

Los compuestos P1F1 y P1F2 solamente presentaron actividad antimicrobiana "parcial" contra las cepas de *E. coli* y *P. multocida*.

Sugerimos realizar las modificaciones pertinentes a las moléculas P1F1 y P1F2 para que sean solubles en agua y tener resultados significantes en la actividad antimicrobiana de estos compuestos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. BIBLIOGRAFÍA

F.M: Aarestrup, S.R. Rasmussen, K. Artursson, N.E. Jensen. 1998. Trends in the resistance agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Vet. Microbiol.* **63**. p. 71 – 80.

Avendaño L. M. C. 1997. Evolución de los Métodos de Búsqueda y Descubrimiento de Fármacos. Introducción a la Química Farmacéutica. MacGraw-Hill Interamericana. España.

Al. Balows, W.J. Hasuler Jr., L. Kenneth, H. Henry. 1991: Manual Of Microbiology 5th Edition. Jean Shadomy. U.S.A.

Bergolio R.M. Antibióticos. 5 edición. Panamericana. Argentina.1993.

Bloom RB. (2000) On the particularity of pathogens. *Nature*. Vol. **406** p.760-761

Birne CR, Malamud D and Shnaare RL. 2000. Antimicrobial evaluation of n- alkyl betaines and n-alkyl-n,n-dimethylamine oxides with variations in chain length. *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol. **44**, No. 9 p. 2514-2517

Calderón,VB. 2001. Estudio de la Susceptibilidad Antimicrobiana que Presentan Bacterias de Importancia Clínica ante una serie de 4-R-fenilcarbamatos de metilo. Tesis de Licenciatura de Q.F.B. México. U.N.A.M. FES-Cuautitlan.

Cohen M. 2000. Changing Patterns of Infectious Disease. *Nature* Vol. **406**, p. 762-767.

Cowan M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *C. Micro. Reviews*. Vol. **12**, No.4. p. 564 – 582

Davies J. 1994. Inactivación of antibiotics and the Dissemination of resistance genes. *Science*. Vol. **264** p. 375 – 381.

Flores Castellanos E.P. 1997. Efecto Sinérgico entre Antibióticos Comercialmente Usados en el Control y Tratamiento de la Pleuroneumonía Contagiosa. Tesis de Licenciatura de Q.F.B. México. U.N.A.M. FES- Cuautitlan.

Gomi, H., Jilang, Z-D., Adachi, JA., Ashley, D., Lowe, B., Verenkar, MP., Steffen, R., Dupont., HL. 2001. *In vitro* Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Enteropathogens Causing Traveler's Diarrhea in Four Geographic Regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol.**45**, No. 1, p. 212-216.

Hanley P., Lansing M., Prescottz Wm. Laboratory Exercise in microbiology. C. Brown Publishers. 1990. U.S.A.

Helinger W. C., Brewer N. S. 1999. Carbapenems and Monobactams: Imipenem, Meropenem and Aztreonam. Mayo Clin. Proc. Vol. **74** (4) p.420-434.

Hernandez-Medel M., Márquez F.O. 1996. Actividad antimicrobiana de los extractos de tallo y raíz de *Picramnia xapelensis*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. **27**, No. 3. p.18-20

Hernandez Morales O.E. 1994. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Tres Quinolonas para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotipo 1, 3, 5, y 7). Tesis de Licenciatura de Q.F.B. México. U.N.A.M. FES – Cuautitlan.

Jones NR, Pfaller AM, Rhomberg RP, Walter HD. 2002. Tiamulin Activity Against Fastidious and Nonfastidious Veterinary and Human Bacterial Isolates: Initial Development of *In Vitro* Susceptibility Test Methods. J. Clin.Microbiol. Vol.**40**, No.2 p. 461-465.

Konnemam E. W., Allen S.D., Janda W.M., Shreckenberger P.C., Winn W.C. 1999. Diagnóstico Microbiológico. 5a Edición. Editorial Médica Panamericana. España. p. 763 – 832.

Krohn K., Kirst H.A., Maag H.1993. Antibiotics and antiviral Compounds: Synthesis and antimicrobial spectrum of some new synthesis monobactams. VCH. Alemania.

Murray P.R., Baron E.S., Plaster M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. 1999. Antibacterial Agents. Manual of Microbiology 7th Edition. ASM Press. U.S.A. p. 1578 –592.

McAtee JI, Castle ST, Jin Q and Boger DL. 2002. Synthesis and Evaluation of Vancomycin and Vancomycin Aglycon Analogues that Bear Modifications in the Residue 3 Asparagine. Bioorg. Med. Chem. Lett. **12** p.1319-1322.

McMurry J. 1994. Naturaleza de los Compuestos Orgánicos. Alcanos y Cicloalcanos. Química Orgánica. Grupo Editorial Iberoamericana. México.

Mendoza S. y Ciprián A. 2001. Tercer ciclo Nacional de Enfermedades Respiratorias del Cerdo. Memorias. UNAM.

Martel A, Baele M, Devriese L.A, Goossens H, Wisselink H.J, Decostere A, Haesebrouck. 2001. Prevalence and Mechanism of resistance against macrolides and lincosamides in *Streptococcus suis* isolates. Vet. Microbiol. **83**, 287-297.

Nikaido H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. Science. Vol. **264** p. 382 – 387.

OH H, Hedberg M, Wade D And Edlund C. 2000. Activities of Synthetic Hybrid Peptides Against Anaerobic Bacteria: Aspects of Methodology and Stability. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. **44**, No. 1 p. 68-72



Odland AB, Erwin M, Jones NR. 2000. Quality Control Guidelines for Disk Diffusion and Broth Microdilution Antimicrobial Susceptibility Tests with Seven Drugs for Veterinary Applications. J. Clin. Microbiol. Vol. **38**, No.1 P. 453-455.

Oppergaard H, Steinum MT and Wasteson Y. 2001. Horizontal Transfer of A Multi-Grug Resistance Plasmid Between Coliform Bacteria of Human and Bovine Origin in a Farm Enviroment. Appl. Environ. Microbiol. Vol. **67**, No. 8 P.3732-3734.

Pelczar M.J., Chan E.C.S. & Krieg N. R. 1993. Antibiotic and other Chemotherapeutic. Microbiology Concepts and Aplications. MacGraw – Hill Inc.

Pijoan AP, Aguilar RF. 2000. Resistencia y Sensibilidad a Antimicrobianos en Cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somus*, Aisladas en Becerras Lecheras en Estables de Tijuana. Vet. Méx. **31** (2). p.153-156.

Putman M., Veen H., Konings W. 2000. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. **64**, No. 4. p.672-693

Roy C., Tirado M. Métodos para el estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos Patología Infecciosa. Instituto Municipal de Investigación Medica (Barcelona) y Microbiología – Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. p 1 – 9.

Savluchinske S., Gigante Feio, B., Roseiro J.C., Marcelo-Curto M.J. 1999. Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivates. Journal of antimicrobial Methods. **35** p.201-206.

Smith MD, Navilliat P.L. 1997.A New Protocol for Antimicrobial Testing of Oils. Journal of Microbiological Methods. **285** p.21-24.

Shryock TR, White WD, Werner SC, Staples MJ. 1995. Proposed Quality Control Guidelines for Antimicrobial Susceptibility Test Using Tilmicosin. J. Clin. Microbiol. Vol. **33**. No 2 p 331-335.

Salmon AS, Watts IJ, Case AC, Hoffman JI, Wegener CH and Yancey JR. Comparison of MIC's of Ceftiofur and Other Antimicrobial Agents Against Bacterial Pathogens of Swine From the United States, Canada and Denmark. J. Clin. Microbiol. Vol. **33**, No.9 p.2435-2444.

Spratt B.G. 1994. Resistance to Antibiotics Mediate by Target alterations. Science. Vol. **264**. p.388 – 393.

Straw B.E., A'Allaire S., Mengeling W.L. and Taylor D.J. 1999. Diseases of swine 8th edition. Iowa State University Press. U.S.A.

Talavera M., Gottshalk M., Velásquez V. 2001. Evaluación de la virulencia y serotipos de *Streptococcus suis* aislados de trabajadores de rastros en el Valle de Toluca, Estado de México, México. *Vet. Méx.*, **32** (3) p: 201 – 205.

Tortora G., Funke B.R., Case C.L. 1998. *Antimicrobial Drug Microbiology an Introduction 6th Edition*. Benjamin Cummings. U.S.A. p.

2000, USP 24 NF 19 The United States Pharmacopeia. The National Formulary. U.S.A. Pharmacopeial Convention Inc. Official from January 1, 2000. National Publishing, Philadelphia, PA. p.

Vazquez Guevara M.A. Síntesis de N-aril-4aril-3-cloro-azetidin-2-onas con posible actividad biológica por irradiación infrarroja. 2000. Tesis de Maestría en Ciencias. México. I.PN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Waish C. 2000. molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. Vol. **406**. p. 775- 781.

Washington AJ. 1999. The Role of the Microbiology Laboratory in Antimicrobial Susceptibility Testing. *Infect Med* **16**(8). P. 531-532.

8. APÉNDICE

Agar Infusión Cerebro Corazón (BH1a)

La preparación es realizada como lo indica el proveedor, colocar el polvo en un matraz erlenmeyer , adicionar agua destilada y calentar el medio de cultivo hasta la clarificación, esterilizar a 15 libras 121°C por 15 minutos. Servir el medio de cultivo a una temperatura entre 45 a 50°C en cajas petri (placas) con un volumen aproximado de 20 ml. Se realiza prueba de esterilidad, esto es, se incuban a 37°C por 18 horas. Desechar aquellas placas que presenten crecimiento bacteriano. (BIOXON, Cat 214700)

Agar Soya Tryptocaseina (AST)

La preparación es realizada como lo indica el proveedor, colocar el polvo en un matraz erlenmeyer , adicionar agua destilada y calentar el medio de cultivo hasta la clarificación, esterilizar a 15 libras 121°C por 15 minutos. Servir el medio de cultivo a una temperatura entre 45 a 50°C en cajas petri (placas) con un volumen aproximado de 20 ml. Se realiza prueba de esterilidad, esto es, se incuban a 37°C por 18 horas. Desechar aquellas placas que presenten crecimiento bacteriano. (Bioxon, Cat. 210800)

Agar para Antibióticos No. 11 (AA11)

La preparación es realizada como lo indica el proveedor, colocar el polvo en un matraz erlenmeyer , adicionar agua destilada y calentar el medio de cultivo hasta la clarificación, esterilizar a 15 libras 121°C por 15 minutos. Servir el medio de cultivo a una temperatura entre 45 a 50°C en cajas petri (placas) con un volumen aproximado de 21 ml. Se realiza prueba de esterilidad, esto es, se incuban a 37°C por 18 horas. Desechar aquellas placas que presenten crecimiento bacteriano. (BIOXON, Cat 243-1)

Miüller – Hinton (MH)

La preparación es realizada como lo indica el proveedor, colocar el polvo en un matraz erlenmeyer , adicionar agua destilada y calentar el medio de cultivo hasta la clarificación, esterilizar a 12 libras 118°C por 10 minutos. Servir el medio de cultivo a una temperatura entre 45 a 50°C en cajas petri (placas) con un volumen aproximado de 20 ml. Se realiza prueba de esterilidad, esto es, se incuban a 37°C por 18 horas. Desechar aquellas placas que presenten crecimiento bacteriano. (Merck. 5437)

Infusión Cerebro Corazón (BH1)

La preparación es realizada como lo indica el proveedor, colocar el polvo en un matraz erlenmeyer , adicionar agua destilada y calentar el medio de cultivo hasta la clarificación, esterilizar a 15 libras 121°C por 15 minutos. Servir el medio de cultivo a una temperatura aproximada de 45 a 50°C en cajas petri (placas) con un volumen aproximado de 20 ml. Se realiza prueba de esterilidad, esto es, se incuban a 37°C por 18 horas. Desechar aquellas placas que presenten crecimiento bacteriano. (BIOXON, Cat. 112)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN