



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**"EVALUACION DE LA POSIBLE ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DE UN COMPUESTO OBTENIDO  
SINTETICAMENTE"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**ANGEL ANDRES GARCIA ALCANTARA**

**ASESORES: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO  
DR. RENE MIRANDA RUVALCABA**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO**

**2005**

**m. 344933**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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  
AVENIDA DE  
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

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 la posible  
actividad antimicrobiana de un compuesto  
obtenido sintéticamente"

que presenta el pasante: Ángel Andrés García Alcántara  
con número de cuenta: 09951044-8 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.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 4 de Febrero de 2005

PRESIDENTE	<u>MVZ. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda.</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFI. Guadalupe Koizumi Castro</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Nathaniel Soto Guevara</u>	



## AGRADECIMIENTOS:

*A mis padres por ser pacientes y  
saber esperar, por darme la  
oportunidad de estudiar.*

*Mamá.  
Papá.  
Gracias.*

*A mis hermanos.  
Gracias*

*Gracias a quien me dio la oportunidad  
de realizar esta mi tesis, mil Gracias.*

*Dra. Susana.  
Dr. Rene*

*Gracias a quienes me apoyaron al  
realizar esta tesis.*

*Mis compañeros del laboratorio de  
Virología.*

*A quienes considere mis amigos.  
Y que nunca olvidare.*

*Gracias.*

*A toda mi familia,  
Gracias.*

*A todos ellos esta dedicada esta tesis.*





---

***EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA Y  
MICROBIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS DE LOS CERDOS,  
EN LA UNIDAD GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE  
ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, CAMPO 1.  
UNAM.***





# ÍNDICE:

<b>ABREVIATURAS.</b>	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b>	ii
<b>ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS.</b>	iii
<b>ÍNDICE DE GRAFICAS.</b>	iv
<b>RESUMEN.</b>	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	1
<b>1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.</b>	1
1.1.1 POR SU ORIGEN.	1
1.1.1.1 <i>Naturales.</i>	1
1.1.1.2 <i>Semisintéticos.</i>	1
1.1.1.3 <i>Sintéticos.</i>	1
1.1.2 POR SU EFECTO.	1
1.1.2.1 <i>Bacteriostáticos.</i>	1
1.1.2.2 <i>Bactericidas.</i>	1
1.1.3 SEGÚN SU ESPECTRO DE ACTIVIDAD.	1
1.1.3.1 <i>Amplio espectro.</i>	1
1.1.3.2 <i>Espectro selectivo o dirigido.</i>	1
1.1.3.3 <i>Primariamente efectivos contra cocos y bacilos G (+).</i>	1
1.1.3.4 <i>Primariamente efectivos contra bacilos G (-).</i>	1
1.1.4 POR EL GRUPO AL QUE PERTENECEN.	1
1.1.4.1 <i>Amfenicoles.</i>	1
1.1.4.2 <i>Aminoglucósidos.</i>	1
1.1.4.3 <i>Azúcares complejos.</i>	2
1.1.4.4 <i><math>\beta</math>-lactámicos.</i>	2
1.1.4.5 <i>Diaminopiridinas.</i>	2
1.1.4.6 <i>Macrólidos.</i>	2
1.1.4.7 <i>Polipeptídicos.</i>	2
1.1.4.8 <i>Rifamicinas.</i>	2
1.1.4.9 <i>Sulfas.</i>	2
1.1.4.10 <i>Tetraciclinas.</i>	2
1.1.5 POR SU MECANISMO DE ACCIÓN.	2
1.1.5.1 <i>Inhibidores de la síntesis de la pared celular.</i>	2
1.1.5.2 <i>Inhibidores de la membrana celular.</i>	2





1.1.5.3 <i>Inhibidores de la función del DNA.</i>	2
1.1.5.4 <i>Inhibidores de la síntesis proteica y del ensamblaje.</i>	2
1.1.5.5 <i>Análogos de metabolitos.</i>	2
<b>1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.</b>	<b>2</b>
1.2.1 INHIBIDORES DE LA PARED CELAR.	2
1.2.2 INHIBIDORES DE LA MEMBRANA CELULAR.	2
1.2.3 INHIBIDORES DE LA FUNCIÓN DEL DNA.	3
1.2.4 INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS PROTEÍCA Y DEL ENSAMBLAJE.	4
1.2.4.1 <i>Inhibidores de la transcripción.</i>	4
1.2.4.2 <i>Inhibidores de la traducción.</i>	4
1.2.4.2.1 <i>Inhibidores de la subunidad ribosómica 30s.</i>	4
1.2.4.2.2 <i>Inhibidores de la subunidad ribosómica 50s.</i>	4
1.2.4.3 <i>Inhibidores del ensamblaje de proteínas.</i>	4
1.2.5 ANÁLOGOS DE METABOLITOS.	4
1.2.5.1 <i>Inhibidores de la síntesis del tetrahidrofolato.</i>	4
1.2.5.1.1 <i>Sulfonamidas.</i>	4
1.2.5.1.2 <i>Otros análogos del ácido p-aminobenzoico.</i>	4
1.2.5.1.4 <i>Inhibidores de la dihidrofolatoreductasa.</i>	4
1.2.5.2 <i>Otros análogos de metabolitos.</i>	4
<b>1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.</b>	<b>4</b>
1.3.1 INACTIVACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.	5
1.3.1.1 <i>Hidrólisis enzimática.</i>	5
1.3.1.2 <i>Modificación enzimática de antibióticos.</i>	5
1.3.2 ALTERACIÓN DEL SITIO BLANCO DEL ANTIBIÓTICO.	6
1.3.2.1 <i>Pared celular.</i>	6
1.3.2.2 <i>Ribosoma.</i>	6
1.3.3 DISMINUCIÓN DEL TRANSPORTE DEL ANTIBIÓTICO AL INTERIOR DE LA CÉLULA.	6
1.3.3.1 <i>Modificación del la membrana externa.</i>	6
1.3.3.2 <i>Modificación de sistemas de transporte.</i>	6
<b>1.4 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD-SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS.</b>	<b>8</b>
1.4.1 MÉTODOS DE DIFUSIÓN.	8
1.4.1.1 <i>Método de kirby-bauer (sensidisco).</i>	8
1.4.1.2 <i>Método del cilindro en placa.</i>	8





---

1.4.2 MÉTODOS DE DILUCIÓN.	9
1.4.2.1 Método de dilución en agar.	9
1.4.2.2 Método de macrodilución en caldo.	9
1.4.2.3 Método de microdilución en caldo.	9
1.4.3 MÉTODOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.	10
1.4.3.1 Método de macrodilución en caldo.	10
1.4.3.2 Método de E-test (epsilometría).	10
1.4.4 MÉTODO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERÍDICA.	11
1.5 COMPUESTOS SINTETIZADOS EN LA FES-CUAUTITLÁN.	12
1.6 USO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LOS CERDOS.	15
2. JUSTIFICACIÓN.	16
3. HIPÓTESIS.	17
4. OBJETIVOS.	18
4.1 OBJETIVO GENERAL.	18
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	19
5.1 MEDIOS DE CULTIVO.	19
5.1.1 CALDOS.	19
5.1.1.1 Caldo BHI (infusión cerebro corazón)	19
5.1.1.2 Caldo Mueller-Hinton.	19
5.1.2 AGARES.	19
5.1.2.1 Agar BHI (infusión cerebro corazón).	19
5.1.2.2 Agar ST (soya tripticaseína).	19
5.1.2.3 Agar Mueller-Hinton.	19
5.1.2.4 Agar para antibióticos n° 11 (AA11).	20
5.2 METODOLOGÍA.	20
5.2.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE LOS COMPUESTOS A UTILIZAR.	20
5.2.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.	20
5.2.3 MÉTODO DE KIRBY-AUER (SENSIDISCO).	20

---







---

5.2.4 MÉTODO DEL CILINDRO EN PLACA.	21
5.2.5 METODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO.	21
5.2.5.1 <i>Inóculo.</i>	21
5.2.5.2 <i>Procedimiento.</i>	21
<b>6. RESULTADOS.</b>	<b>23</b>
<b>6.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS.</b>	<b>23</b>
<b>6.2 RESULTADOS PARA <i>Bacillus spp.</i></b>	<b>24</b>
<b>6.3 RESULTADOS PARA <i>Staphylococcus aureus</i> cowan 1.</b>	<b>30</b>
<b>6.4 RESULTADOS PARA <i>Salmonella typhi.</i></b>	<b>36</b>
<b>6.5 RESULTADOS PARA <i>Escherichia coli.</i></b>	<b>42</b>
<b>6.6 RESULTADOS PARA <i>Pasteurella multocida</i> serógrupo A.</b>	<b>48</b>
<b>6.7 RESULTADOS PARA <i>Pasteurella multocida</i> serógrupo D.</b>	<b>54</b>
<b>7. DISCUSIÓN.</b>	<b>60</b>
<b>8. CONCLUSIONES.</b>	<b>64</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>64</b>





## ABREVIATURAS:

- AA11:** agar para antibióticos número 11.  
**AAC:** acetiltransferasa.  
**AAD:** adeniltransferasa.  
**AMC:** agar Mc Conkey.  
**APH:** fosfatidiltransferasa.  
**BHIA:** agar infusión cerebro corazón.  
**BSAC:** The British Society for Antimicrobial Chemotherapy  
**CA-SFM:** Thé Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.  
**CC:** control de crecimiento.  
**C.E.:** control de esterilidad.  
**C.I.:** control de inoculo.  
**DIN:** Deutsches Institut für Normung.  
**DNA:** ácido desoxirribonucleico.  
**DPH:** dihidropiridinas.  
**EUCAST:** European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing  
**I:** intermedio.  
**INC:** incontables.  
**KIA:** agar hierro de Kliegl.  
**MBC:** concentración mínima bactericida.  
**MH:** Mueller-Hinton.  
**MIC:** concentración mínima inhibitoria.  
**NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory Standards.  
**NWGA:** Norwegian Working Group on Antibiotics.  
**PAS:** ácido *p*-aminosalicílico.  
**PBS:** proteínas de unión a la penicilina.  
**R:** resistente.  
**RM:** rojo de metilo  
**RNA:** ácido ribonucleico.  
**R.V.:** razón de varianza.  
**S:** sensible  
**SC:** sin crecimiento.  
**SEIMC:** Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.  
**SRGA:** Swedish Reference Group for Antibiotics.  
**ST:** sin turbidez.  
**T:** Turbidez.  
**UFC:** unidades formadoras de colonia.  
**VP:** Voges-Proskauer.





## INDICE DE FIGURAS :

<b>Figura # 1.</b> Pared celular bacteriana.	3
<b>Figura # 2.</b> Membrana celular bacteriana.	3
<b>Figura # 3.</b> Sitios de acción de los antibióticos.	5
<b>Figura # 2.</b> Tira de E-test.	11
<b>Figura # 3.</b> DHP-01A y DHP-03A.	12
<b>Figura # 4.</b> DHP-02IR y DHP-04BIR.	12
<b>Figura # 5.</b> Amlodipina.	13
<b>Figura # 6.</b> Nifendipina.	13
<b>Figura # 7.</b> Nitrendipina.	14
<b>Figura # 8.</b> Nimodipina.	14
<b>Figura # 9.</b> Nivaldipina.	14





## ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS:

<b>Cuadro # 1.</b> Mecanismos de resistencia.	7
<b>Cuadro # 2.</b> Método de macrodilución el caldo.	22
<b>Tabla # 1</b> Caracterización de las cepas bacterianas.	23
<b>Tabla # 2.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 01A para <u>Bacillus spp.</u>	24
<b>Tabla # 3.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 02IR para <u>Bacillus spp.</u>	25
<b>Tabla # 4.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 03A para <u>Bacillus spp.</u>	26
<b>Tabla # 5.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 04BIR para <u>Bacillus spp.</u>	27
<b>Tabla # 6.</b> Análisis de varianza de un factor para <u>Bacillus spp.</u>	28
<b>Tabla # 7.</b> Prueba del sensidisco para <u>Bacillus spp.</u>	29
<b>Tabla # 8.</b> Prueba del cilindro en placa para <u>Bacillus spp.</u>	29
<b>Tabla # 9.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 01A para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	30
<b>Tabla # 10.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 02IR para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	31
<b>Tabla # 11.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 03A para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	32
<b>Tabla # 12.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 04BIR para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	33
<b>Tabla # 13.</b> Análisis de varianza de un factor para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	34
<b>Tabla # 14.</b> Prueba del sensidisco para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	35
<b>Tabla # 15.</b> Prueba del cilindro en placa para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	35
<b>Tabla # 16.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 01A para <u>Salmonella typhi.</u>	36
<b>Tabla # 17.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 02IR para <u>Salmonella typhi.</u>	37
<b>Tabla # 18.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 03A para <u>Salmonella typhi.</u>	38
<b>Tabla # 19.</b> Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 04BIR para <u>Salmonella typhi.</u>	39
<b>Tabla # 20.</b> Análisis de varianza de un factor para <u>Salmonella typhi.</u>	40
<b>Tabla # 21.</b> Prueba del sensidisco para <u>Salmonella typhi.</u>	41
<b>Tabla # 22.</b> Prueba del cilindro en placa para <u>Salmonella typhi.</u>	41





Tabla # 23. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 01A para <u>Escherichia coli</u> .	42
Tabla # 24. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 02IR para <u>Escherichia coli</u> .	43
Tabla # 25. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 03A para <u>Escherichia coli</u> .	44
Tabla # 26. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 04BIR para <u>Escherichia coli</u> .	45
Tabla # 27. Análisis de varianza de un factor para <u>Escherichia coli</u> .	46
Tabla # 28. Prueba del sensidisco para <u>Escherichia coli</u> .	47
Tabla # 29. Prueba del cilindro en placa para <u>Escherichia coli</u> .	47
Tabla # 30. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 01A para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	48
Tabla # 31. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 02IR para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	49
Tabla # 32. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 03A para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	50
Tabla # 33. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 04BIR para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	51
Tabla # 34. Análisis de varianza de un factor para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	52
Tabla # 35. Prueba del sensidisco para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	53
Tabla # 36. Prueba del cilindro en placa para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	53
Tabla # 37. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 01A para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	54
Tabla # 38. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 02IR para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	55
Tabla # 39. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 03A para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	56
Tabla # 40. Método de turbidimeria para el compuesto DHP - 04BIR para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	57
Tabla # 41. Análisis de varianza de un factor para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	58
Tabla # 42. Prueba del sensidisco para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	59
Tabla # 43. Prueba del cilindro en placa para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	59





## ÍNDICE DE GRAFICAS:

Grafica # 1. Compuesto DHP-01A para <u>Bacillus spp.</u>	24
Grafica # 2. Compuesto DHP-02IR para <u>Bacillus spp.</u>	25
Grafica # 3. Compuesto DHP-03A para <u>Bacillus spp.</u>	26
Grafica # 4. Compuesto DHP-04BIR para <u>Bacillus spp.</u>	27
Grafica # 5. Compuesto DHP-01A para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	30
Grafica # 6. Compuesto DHP-02IR para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	31
Grafica # 7. Compuesto DHP-03A para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	32
Grafica # 8. Compuesto DHP-04BIR para <u>Staphylococcus aureus</u> cowan 1.	33
Grafica # 9. Compuesto DHP-01A para <u>Salmonella typhi.</u>	36
Grafica # 10. Compuesto DHP-02IR para <u>Salmonella typhi.</u>	37
Grafica # 11. Compuesto DHP-03A para <u>Salmonella typhi.</u>	38
Grafica # 12. Compuesto DHP-04BIR para <u>Salmonella typhi.</u>	39
Grafica # 13. Compuesto DHP-01A para <u>Escherichia coli.</u>	42
Grafica # 14. Compuesto DHP-02IR para <u>Escherichia coli.</u>	43
Grafica # 15. Compuesto DHP-03A para <u>Escherichia coli.</u>	44
Grafica # 16. Compuesto DHP-04BIR para <u>Escherichia coli.</u>	45
Grafica # 17. Compuesto DHP-01A para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	48
Grafica # 18. Compuesto DHP-02IR para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	49
Grafica # 19. Compuesto DHP-03A para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	50
Grafica # 20. Compuesto DHP-04BIR para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo A.	51
Grafica # 21. Compuesto DHP-01A para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	54
Grafica # 22. Compuesto DHP-02IR para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	55
Grafica # 23. Compuesto DHP-03A para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	56
Grafica # 24. Compuesto DHP-04BIR para <u>Pasteurella multocida</u> serógrupo D.	57





## RESUMEN:

En el presente trabajo se determinó la actividad antimicrobiana de cuatro dihidropiridinas (DHP-01A, DHP-02IR, DHP-03A y DHP-04BIR) que fueron obtenidas por síntesis orgánica la sección de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan (campo 1), de la Universidad Nacional Autónoma de México. La FES-Cuautitlan ha sintetizado compuestos nuevos que puedan presentar posible actividad antimicrobiana, esto ante el hecho del incremento de la resistencia a los antimicrobianos por las bacterias patógenas. Las cepas bacterianas que se utilizaron son *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus* cowan 1, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* serógrupo A y *Pasteurella multocida* serógrupo D. Los compuestos mostraron solubilidad únicamente en dimetilsulfóxido con unas gotas de etanol. Los métodos para determinar la actividad antimicrobiana fueron sensidisco (Kirby-Bauer), cilindro en placa y macrodilución en caldo (turbidimétrico). El método de sensidisco mostró inhibición del crecimiento bacteriano de solo un milímetro más que el diámetro del disco de papel filtro utilizado. Del mismo modo el método del cilindro en placa no muestra halos de inhibición del crecimiento. Lo anterior se puede deber a la solubilidad que presentan los cuatro compuestos. El método de macrodilución en caldo presenta inhibición del crecimiento bacteriano en todas las bacterias estudiadas, siendo este el método más eficaz para determinar la inhibición del crecimiento y la concentración mínima inhibitoria.





# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.

La clasificación de los agentes antibacterianos se puede hacer de distintas formas de acuerdo a: su origen, su efecto, su espectro antibacteriano, grupo al que pertenecen y mecanismo de acción <sup>41</sup>:

### 1.1.1 POR SU ORIGEN:

*1.1.1.1 Naturales:* se obtienen a partir de microorganismos (hongos, bacterias): penicilinas, polimixinas, estreptomicina, kanamicina, cefalosporinas, tirotricina, colistina, etc. <sup>41</sup>

*1.1.1.2 Semisintéticos:* se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos: penicilinas resistentes a pseudomonas, penicilinas de espectro ampliado, etc. <sup>41</sup>

*1.1.1.3 Sintéticos:* se obtienen totalmente por síntesis química. <sup>41</sup>

### 1.1.2 POR SU EFECTO:

*1.1.2.1 Bacteriostáticos:* inhiben el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, pero no los destruyen, la máxima concentración no tóxica que se alcanza en suero y tejidos impide el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos, pudiendo estos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano. Sirven para complementar los mecanismos defensivos del huésped: sulfonamidas, tetraciclinas, cloranfenicol. <sup>41</sup>

*1.1.2.2 Bactericida:* provocan la lisis y/o muerte del microorganismo, su acción es letal sobre los microorganismos, por lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad: penicilinas, cefalosporinas polipéptidos. <sup>41</sup>

### 1.1.3 SEGÚN SU ESPECTRO DE ACTIVIDAD:

*1.1.3.1 Amplio espectro:* efectivos contra bacilos gram (+) y gram (-): tetraciclinas, penicilinas de espectro ampliado, cefalosporinas (generaciones recientes) cloranfenicol, macrólidos, etc. <sup>41</sup>

*1.1.3.2 Espectro selectivo o dirigido:* carbenicilina, piperacilina, mezlocilina, ticarcilina, espeticinomicina, imipenem, aztreonam, etc. <sup>41</sup>

*1.1.3.3 Primariamente efectivos contra cocos y bacilos gram (+):* penicilinas, cefalosporinas de 1ª generación, lincomicina, clindamicina, vancomicina, bacitracina, etc. <sup>41</sup>

*1.1.3.4 Primariamente efectivos contra bacilos gram (-):* aminoglucósidos, polimixinas. <sup>41</sup>

### 1.1.4 POR EL GRUPO AL QUE PERTENECEN:

*1.1.4.1 Anfenicoles:* cloranfenicol. <sup>41</sup>

*1.1.4.2 Aminoglucósidos:* gentamicina. <sup>41</sup>







- 1.1.4.3 *Azúcares complejos*: clindamicina.<sup>41</sup>
- 1.1.4.4 *β-láctamicos*: penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenems.<sup>41</sup>
- 1.1.4.5 *Diaminopiridinas*: trimetoprima.<sup>41</sup>
- 1.1.4.6 *Macrólidos*: eritromicina.<sup>41</sup>
- 1.1.4.7 *Poliéptidicos*: polimixina.<sup>41</sup>
- 1.1.4.8 *Rifamicinas*: rifampicina.<sup>41</sup>
- 1.1.4.9 *Sulfas*: sulfonamida.<sup>41</sup>
- 1.1.4.10 *Tetraciclinas*: clortetraciclinas.<sup>41</sup>

### 1.1.5 POR SU MECANISMO DE ACCIÓN:

- 1.1.5.1 *Inhibidores de la síntesis de la pared celular*: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams, cicloserina, vancomicina, teicoplanina, bacitracina.<sup>29,41</sup>
- 1.1.5.2 *Inhibidores de la membrana celular*: polimixina.<sup>29,41</sup>
- 1.1.5.3 *Inhibidores de la función del DNA*: mitomicina, quinolonas, norfloxacin, ciprofloxacina, metronidazol, novobiocina.<sup>29,41</sup>
- 1.1.5.4 *Inhibidores de la síntesis proteica y del ensamblaje*: actinomicina, tetraciclinas, nitrofuranos, cloramfenicol, eritromicina, ácido fusídico.<sup>29,41</sup>
- 1.1.5.5 *Análogos de metabolitos*: sulfonamidas, sulfonas, ácido *p*-aminosalicílico, trimetoprima, isoniazida, flucitosina.<sup>29,41</sup>

## 1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.

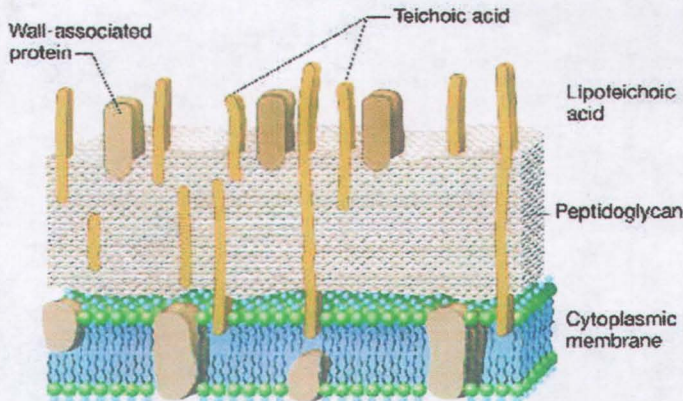
1.2.1 INHIBIDORES DE LA PARED CELULAR: la célula bacteriana esta rodeada por una pared rígida que protege a la membrana celular de traumatismos osmóticos y mecánicos. Cualquier sustancia que destruya la pared celular, impida su síntesis o la incorporación de los polímeros de las células en desarrollo conducirá a la creación de células osmóticamente débiles y estas perecerán. El componente de la pared que confiere rigidez es el peptidoglicano. Los antibióticos que dañan la pared celular actúan de distintas formas como ejemplo tenemos a los antibióticos β-lactámicos que actúan de la siguiente manera: el último estadio en la síntesis de la pared celular se identifica como la fase durante la cual se produce la inhibición. El sistema enzimático de uniones cruzadas del peptidoglicano, es el blanco inhibido de forma específica por la penicilina. Durante esta etapa, en las cadenas lineales de peptidoglicano se producen ligaduras cruzadas por una reacción de transpeptidación en la cual se forma un puente peptídico entre dos cadenas adyacentes con la eliminación de la D-alanina terminal. Cuando las bacterias se desarrollan en presencia de penicilina se acumulan intermediarios de síntesis de la pared celular, nucleótidos de uridina sin uniones cruzadas y las nuevas paredes no se pueden formar. De igual forma se inhiben las D-alaninacarboxipeptidasas, que son las que eliminan de manera específica la D-alanina de la cadena pentapeptídica lateral. Otros antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular son: cefalosporinas, monobactámicos, tienamicinas, cicloserina, vancomicina y bacitracina.<sup>29,46,59</sup>

1.2.2 INHIBIDORES DE LA MEMBRANA CELULAR: la membrana celular controla la concentración de los metabolitos y nutrientes dentro de la célula. Varios antibióticos deterioran estas funciones y producen perturbaciones importantes para la célula, la acción



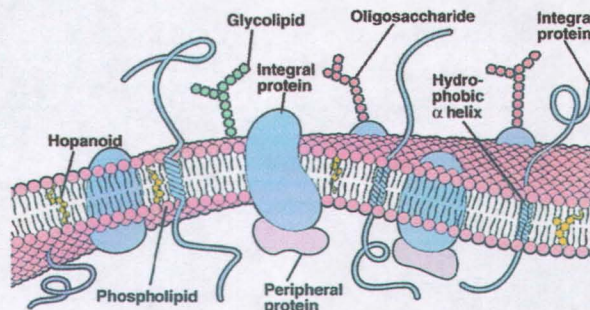


de estos antibióticos es independiente de la multiplicación y se inicia en el momento en que la célula y el antibiótico se ponen en contacto. Los antibióticos que afectan a la membrana celular también atacan a las células del organismo huésped. Algunos de los antibióticos de este tipo son: polimixinas, polienos y azoles.<sup>29, 46, 59</sup>



**Figura # 1.** Pared celular bacteriana.

<http://www.urg.es/~eianez/Microbiologia/06membrana.htm>



**Figura # 2.** Membrana celular bacteriana.

<http://www.urg.es/~eianez/Microbiologia/05pared.htm>

1.2.3 INHIBIDORES DE LA FUNCIÓN DEL DNA: existen algunos antimicrobianos que interfieren de manera específica en la estructura y función del DNA. Cualquier agente que altere la estructura del la doble hélice del DNA tiene una capacidad potencial de provocar efectos sobre la fases de la multiplicación y el metabolismo de la célula. Algunos de los mecanismos empleados por los antimicrobianos son: la alteración de la estructura o la función del DNA mediante la formación de uniones cruzadas y la intercalación entre las





bases apiladas de la doble hélice. Algunos de los antimicrobianos empleados son: mitomicina, quinolonas, metronidazol y novobiocina.<sup>29, 46, 59</sup>

**1.2.4 INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS PROTEICA Y DEL ENSAMBLAJE:** un antibiótico que inhiba cualquiera de los procesos de síntesis de ácido ribonucleico dependiente del DNA (transcripción) y síntesis proteica dependiente de RNA (traducción), inhibirá la síntesis proteica, así tenemos a:<sup>29, 46, 59</sup>

*1.2.4.1 Inhibidores de la transcripción:* actinomicina, rifampicina.<sup>29, 46, 59</sup>

*1.2.4.2 Inhibidores de la traducción:* los antibióticos han sido subdivididos en clases principales sobre la base de su unión con las subunidades ribosómicas 30S o 50S.<sup>29, 46, 59</sup>

*1.2.4.1.1 Inhibidores de la subunidad ribosómica 30S:* aminociclitol, aminoglucósidos: estreptomicina, kasugamicina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, nitrofuranos, tetraciclinas y amikacina.<sup>29, 46, 59</sup>

*1.2.4.1.2 Inhibidores de la subunidad ribosómica 50S:* cloranfenicol, eritromicina, lincomicina, clindamicina, puromicina y ácido fusídico.<sup>29, 46, 59</sup>

*1.2.4.3 Inhibidores del ensamblaje de proteínas:* griseofulvina.<sup>29, 46, 59</sup>

**1.2.5 ANÁLOGOS DE METABOLITOS:** las enzimas en ocasiones se inhiben por compuestos con estructura similar a su sustrato natural, lo que ocasiona que se impida la combinación normal sustrato-enzima y la reacción catalítica ulterior.<sup>29, 46</sup>

Muchos de estos compuestos son análogos de los factores de crecimiento bacteriano, factores orgánicos requeridos por todas las bacterias para su multiplicación. Estos factores de crecimiento incluyen a las vitaminas del complejo B, los aminoácidos, las purinas y las pirimidinas.<sup>29, 46</sup> Se dividen en:

*1.2.5.1 Inhibidores de la síntesis del tetrahidrofolato:*

*1.2.5.1.1 Sulfonamidas:* sulfadiazina, sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfacitina y sulfasalazina.

*1.2.5.1.2 Otros análogos del ácido p-aminobenzoico:* sulfonas, ácido p-aminosalicílico (PAS).

*1.2.5.1.3 Inhibidores de la dihidrofolato reductasa:* trimetoprima.

*1.2.5.2 Otros análogos de metabolitos:* isoniazida y flucitosina (5-fluorocitosina).<sup>29, 46</sup>

## 1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.

Básicamente son tres los mecanismos mediante los cuales las bacterias son resistentes a los antibióticos:<sup>16</sup>



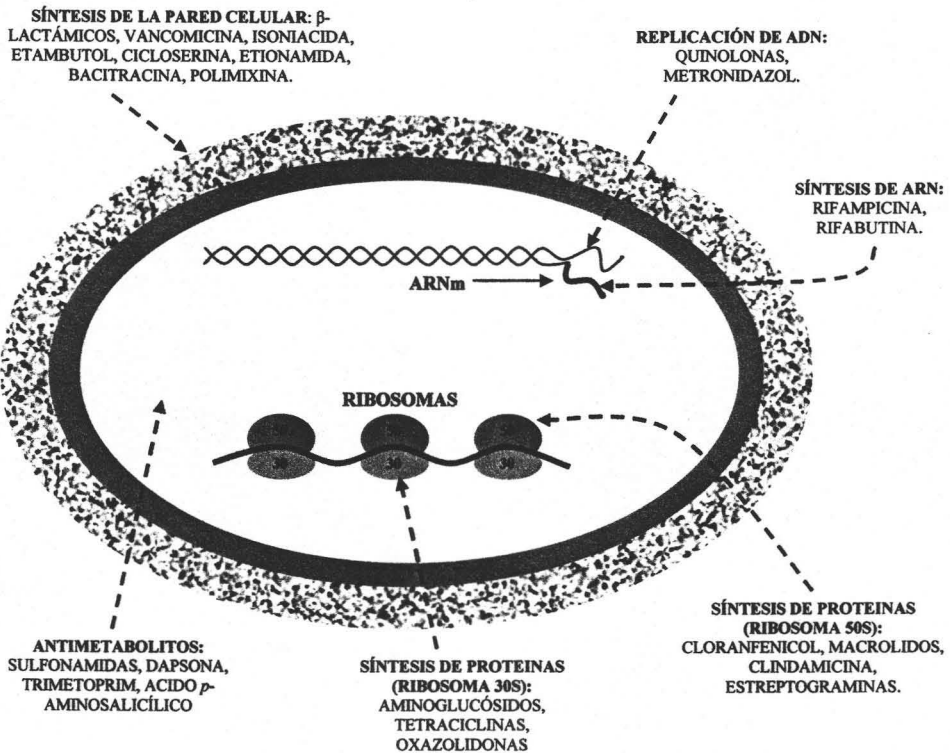


FIGURA # 1: SITIOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.<sup>46</sup>

1.3.1 POR INACTIVACIÓN DEL ANTIBIÓTICO: se lleva a cabo por los siguientes medios:

1.3.1.1 *Hidrólisis enzimática*: existen enzimas que proporcionan resistencia a los antibióticos como son las  $\beta$ -lactamasas, que hidrolizan el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporánico, produciendo derivados ácidos sin propiedades antibacterianas. El mecanismo común de resistencia a la eritromicina es la producción de eritromicina esterasas, que catalizan la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico.

1.3.1.2 *Modificación enzimática de antibióticos*: para los aminoglucósidos las bacterias producen enzimas modificadoras codificadas en plásmidos que inactivan estos antibióticos y son dos los mecanismos de modificación: N-acetilación de grupos amino y o-fosforilación de grupos hidroxilo. Entre las principales enzimas que catalizan la modificación están la acetiltransferasa (AAC), fosfatidiltransferasa (APH) y adeniltransferasa (ANT o AAD). El factor más importante de la modificación, es la afinidad de la enzima modificadora por su sustrato.<sup>10, 16., 28, 29, .59</sup>





1.3.2 ALTERACIÓN DEL SITIO BLANCO DEL ANTIBIÓTICO: se da en dos sitios:

*1.3.2.1 Pared celular:* los  $\beta$ -lactámicos utilizan unas proteínas en la pared llamadas PBS (proteínas de unión a la penicilina), las mutaciones en esas proteínas, disminuyen la afinidad de los antibióticos y por lo tanto permiten la formación de la pared celular.<sup>16, 29, 59</sup>

*1.3.2.1 Ribosoma:* la resistencia involucra a los componentes 30S (modificación del RNA ribosomal 16S por metilasa hacia los aminoglucosidos), 50S (la resistencia a los macrólidos se da por metilación postranscripcional del rRNA 23S).<sup>16, 29, 59</sup>

1.3.3 DISMINUCIÓN DEL TRANSPORTE DEL ANTIBIÓTICO AL INTERIOR DE LA CÉLULA: se puede dar de dos formas:

*1.3.3.1 Modificación de la membrana externa:* la permeabilidad de las porinas se afecta por la mutación que ocasiona en *Escherichia coli* por ejemplo el cambio de la proteína OmpF por la OmpC, lo que causa un incremento en la concentración mínima inhibitoria de varios  $\beta$ -lactámicos.

*1.3.3.1 Modificación en sistemas de transporte:* existen determinantes genéticos que confieren resistencia a las tetraciclinas y son: TetA y TetF (para bacterias Gram (+)); TetK, TetL, TetN y TetP (para bacterias Gram (-)); y TetM para ambas y que confiere elevado nivel de resistencia y se localiza con frecuencia en transposones. El producto del gen TetM se une al ribosoma e impide la acción del antibiótico sobre la proteína S-7.<sup>11, 16, 29, 59</sup>



CUADRO # 1: MECANISMOS DE RESISTENCIA.<sup>16</sup>

ANTIBIÓTICOS	MECANISMOS DE ACCIÓN	BLANCO DE ACCIÓN	MECANISMO DE RESISTENCIA	RESISTENCIA DEBIDO A:	BASE GENÉTICA
<b>β-LACTÁMICOS: PENICILINAS, CEFALOSPORINAS.</b>	INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.	PROTEÍNAS UNIDORAS DE PENICILINAS	a) HIDROLISIS DEL ANILLO b) ALTERACIÓN DEL BLANCO. c) PERMEABILIDAD: CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA.	β-LACTAMASAS PB2 MODIFICADA OmpF SUSTITUIDA OmpC	PLASMIDO Y CROMOSOMA CROMOSOMA CROMOSOMA
<b>MACRÓLIDOS Y LINCOSÁMIDAS.</b>	INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.	SUBUNIDAD 50S	a) METILACIÓN DEL RNA RIBOSOMAL. b) HIDROLISIS DE LA LACTONA DE ERITROMICINA Y CLINDAMICINA.	METILASA ERITROMICIN-ESTERASAS	PLASMIDO CROMOSOMA PLASMIDO
<b>CLORAMFENICOL.</b>	INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.	SUBUNIDAD 50S	MODIFICACIÓN DEL ANTIBIÓTICO EVITANDO SU UNIÓN AL RIBOSOMA	CLORAMFENICOL- ACETILTRANSFERASA	PLASMIDO
<b>AMINOGLUCÓSIDOS: ESTREPTOMICINA, KANAMICINA, GENTAMICINA, NEOMICINA, ETC.</b>	INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.	SUBUNIDAD 50S	a) MODIFICACIÓN DEL ANTIBIÓTICO EVITANDO SU TRANSPORTE. b) MODIFICACIÓN DEL RNA 16S DE LA SUBUNIDAD 20S DEL RIBOSOMA c) BAJO POTENCIAL DE MEMBRANA Y TRANSPORTE DE ELECTRONES INADECUADO, CAMBIOS EN LPS.	ACETILTRANSFERASA, FOSFATIDILTRANSFERASA, ADENILTRANSFERASA, METILASAS  LPS ALTERADO	PLASMIDO CROMOSOMA METILASAS  CROMOSOMA
<b>ESTREPTOMICINA.</b>	INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.	SUBUNIDAD 50S	MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES	PROTEÍNA S12 DE LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL	CROMOSOMA
<b>FLUOROQUINOLONAS Y ÁCIDO NALIDIXICO.</b>	INHIBICIÓN DE REPLICACIÓN, TRANSCRIPCIÓN, RECOMBINACIÓN, SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA.	DNA GIRASA	a) MUTACIÓN SOBRE DNA GIRASA. b) DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD. c) EFLUJO	DNA GIRASA MODIFICADA MUTACIÓN NAIR	CROMOSOMA CROMOSOMA CROMOSOMA
<b>TETRACICLINAS</b>	INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.	PROTEÍNA DE LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL 30S	PROTEÍNA DE LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL 30S	PROTEÍNAS INDUCIBLES	Tet PLASMIDO





## 1.4 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD-SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS.

1.4.1 MÉTODOS DE DIFUSIÓN. Una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología es el estudiar la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos. Esto se logra utilizando los métodos de sensibilidad o antibiograma lo cual tiene como principal objetivo evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación.

El panorama actual de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos hace ineludible su determinación, incluso en aquellos casos en los que la sensibilidad se considera universal y no se han descrito, por el momento, mecanismos de resistencia. Los ensayos de sensibilidad deben de estar normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad.<sup>38, 51</sup>

1.4.1.1 *Método de Kirby-Bauer (sensidisco)*: El antibiograma o difusión en disco se basa en el trabajo de Kirby, Bauer y colaboradores, es uno de los métodos que el Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Consiste en depositar, en la superficie de agar de una caja de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel filtro impregnado con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el papel filtro absorbe agua y el antibiótico difunde en el agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.<sup>28, 38, 51</sup>

La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (MIC) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos de difusión en disco no permiten una lectura directa del valor de la MIC. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la MIC, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las MIC y los diámetros de inhibición. Para determinar la MIC de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la MIC.<sup>28, 38, 51</sup>

Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS.<sup>28, 38, 51</sup>

1.4.1.2 *Método de cilindro en placa*. Depende de la difusión del antibiótico que se encuentra contenido en un cilindro de metal, a través de una capa de agar contenido en una caja petri, de tal modo que el crecimiento del microorganismo inoculado se impide completamente en un área o zona circular alrededor del cilindro que contiene el antibiótico.<sup>48, 49</sup>





1.4.2 MÉTODOS DE DILUCIÓN. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución.<sup>38, 51</sup>

Comúnmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la MIC y la concentración mínima bactericida (MBC) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocular dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida.<sup>38, 51</sup>

1.4.2.1 *Método de dilución en agar*: Este método es cómodo para probar muchas cepas simultáneamente, por su capacidad de detectar la heterogeneidad o contaminación microbiana, y por su reproducibilidad un poco mejor que el método de dilución en caldo.

En estos métodos se incorpora el antimicrobiano a estudiar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. El número de placas de cada concentración a preparar vendrá dado por el número de microorganismos que se vaya a estudiar.<sup>38, 51</sup>

1.4.2.2 *Método de macrodilución en caldo*: En este método se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 ml de caldo. Después de 18 o 24 horas de incubación, se lee la absorbancia de cada tubo a 530 nm.<sup>28, 38, 51</sup>

1.4.2.3 *Método de microdilución en caldo*. En este método cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación con fondo en "U" representa uno de los tubos del método de macrodilución. Las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos se pueden preparar en el propio laboratorio o bien se pueden comprar a diferentes compañías que los suministran congelados, deshidratados o liofilizados.







Teniendo en cuenta que la mayoría de placas disponibles tienen 96 pocillos (12 x 8), podemos estudiar con cada una de ellas y para el mismo microorganismo 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. En ocasiones se preparan placas con 12 diluciones de antimicrobiano y se utiliza una placa adicional para realizar los controles. El volumen final de cada pocillo es habitualmente de 100  $\mu$ l, por lo que antes de la inoculación de la placa, cada pocillo debe contener 100  $\mu$ l de caldo con antimicrobiano (volumen de inóculo menor de 10  $\mu$ l) o 50  $\mu$ l (si se van a usar también 50  $\mu$ l para inocular la placa).<sup>38, 51</sup>

1.4.3 MÉTODOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC). Las pruebas de dilución se utilizan para determinar la concentración mínima de un antibacteriano necesaria para matar o inhibir a un microorganismo. La concentración mínima inhibitoria (MIC) es la menor concentración donde no se observa crecimiento alguno a simple vista.<sup>2</sup>

1.4.3.1 *Método de macrodilución en caldo.* Es un método referencial para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. Se requiere de una serie de tubos con caldo a los cuales se les agrega el antimicrobiano en distintas concentraciones, luego se inoculan con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio y se incuban bajo condiciones y tiempos recomendados. Este método es similar al descrito en la sección 1.4.2 inciso b).<sup>12, 38</sup>

1.4.3.2 *Método de e-test (epsilometría).* El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test (Fig. 2) podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación, la MIC será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.<sup>51, 56</sup>

En contra de lo que ocurre en la difusión en disco donde la orientación del disco no importa, si colocamos la tira al revés no se observa elipse de inhibición ya que el gradiente de concentraciones se sitúa solo sobre una de las caras de la tira. El método de E-test se ha utilizado para determinar la MIC de diversos antibióticos en una amplia gamma de bacterias, incluyendo *Helicobacter pylori*, *Corynebacterium spp.*, estreptococos nutricionalmente deficientes, enterococos con resistencia elevada a aminoglicósidos. En algunos casos como vancomicina y *S. pneumoniae*, la MIC es más alta utilizando el E-test que la obtenida por los métodos de microdilución, produciendo resultados que se encuentran en el rango superior de aislamientos susceptibles y con resultados de control de calidad por encima de los límites aceptables. El E-test se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe





destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la MIC.<sup>51,56</sup>

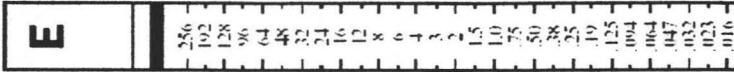


Figura # 2. Tira de E-test. En su cara superior se aprecia la escala de dilución del antimicrobiano impregnado por su cara inferior.<sup>56</sup>

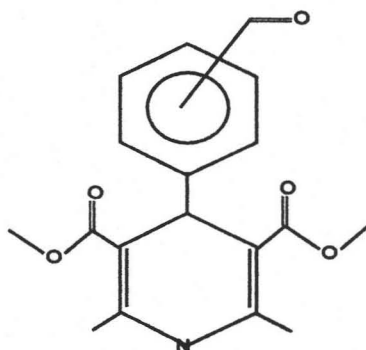
1.4.4 MÉTODO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (MBC). La concentración bactericida mínima (MBC) de un antibiótico es aquella que mata por lo menos el 99,9 % de un inóculo bacteriano estandarizado. Su objetivo es determinar la menor concentración de un antimicrobiano que es capaz de matar una cepa bacteriana. Para calcularla se emplean procedimientos en los que bacteria y antimicrobiano se enfrentan en un caldo. Se parte de los mismos métodos utilizados para obtener la MIC por dilución en caldo y sus modificaciones para bacterias exigentes. Se puede obtener empleando el procedimiento de macrodilución en tubo o microdilución en placa. Lo que se pretende es comprobar en los tubos o pocillos sin crecimiento qué concentración de antimicrobianos ha matado, no sólo inhibido, el aislado bacteriano estudiado.<sup>35, 3 8, 52</sup>

En general la MIC (concentración mínima inhibitoria) y la MBC, en los antibióticos considerados bactericidas, están próximas. Habitualmente difieren en una o dos diluciones. En ocasiones esto no ocurre y estamos ante los fenómenos: paradójico, de tolerancia y de persistencia. El fenómeno paradójico o de Eagle consiste en la presencia de un mayor número de bacterias supervivientes a concentraciones superiores a la MBC. Parece ser que no tiene trascendencia en los tratamientos antimicrobianos. La tolerancia es la disminución o desaparición de la capacidad de matar de un antibiótico bactericida en un determinado aislamiento o especie. Su significado clínico es dudoso aunque puede determinar en algunas infecciones la necesidad de asociar este antimicrobiano con otro. La persistencia refleja el hecho de que una pequeña población resiste a la acción bactericida. Su número suele ser menor del 0,1% y por esto, la definición de MBC se refiere a la muerte del 99,9% del inóculo. Aparece sobre todo con  $\beta$ -lactámicos.<sup>35, 3 8, 52</sup>



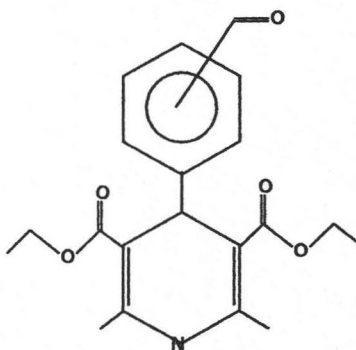


## 1.5 COMPUESTOS SINTETIZADOS EN LA FES-CUAUTITLAN:



Posicion:  
*meta* (m): DHP - 01A  
*para* (p): DHP - 03A

Figura # 3.



Posicion:  
*meta* (m): DHP - 02IR  
*para* (p): DHP - 04BIR

Figura # 4.

Debido al surgimiento cada vez mayor de la resistencia a los antimicrobianos, surge la necesidad de descubrir nuevos compuestos que tengan actividad antimicrobiana o de experimentar con los ya existentes.

El estudio de los compuestos para probar su actividad como agentes antimicrobianos es extenso, se debe de probar primeramente *in vitro* con estudios preliminares y después si estos presentan actividad favorable contra los microorganismos, se procederá a realizar pruebas mas extensas para después probarlos *in vivo* y medir su actividad biológica como: absorción, distribución, biotransformación, eliminación, biodisponibilidad, toxicidad, efecto a nivel celular, así como la dosis a la que se ha de administrar.

En el caso de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, la sección de Química Orgánica ha sintetizado compuestos nuevos a través de métodos modernos de síntesis orgánica con la finalidad de encontrar nuevas formas de síntesis para compuestos ya existentes y crear a través de estos mismos métodos compuestos nuevos que pudieran tener actividades antimicrobianas.

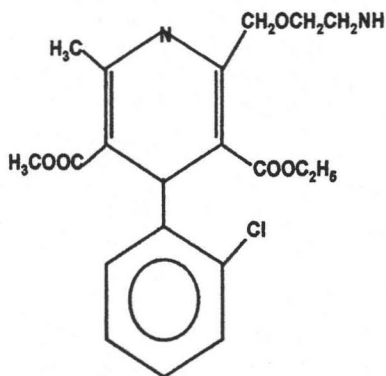
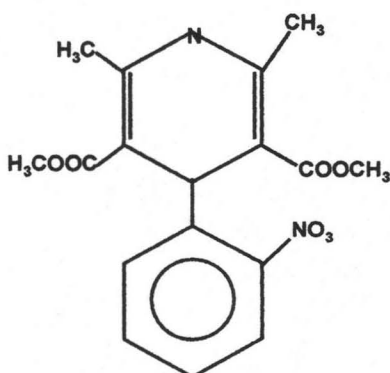
Por esta razón a partir de los compuestos que la sección de Química Orgánica ha sintetizado el laboratorio de Virología y Microbiología de la unidad general de posgrado de la Facultad de estudios Superiores Cuautitlan en Campo 1 se ha dado la tarea de investigar dichos compuestos y de reportar si estos presentan actividad como antimicrobianos.

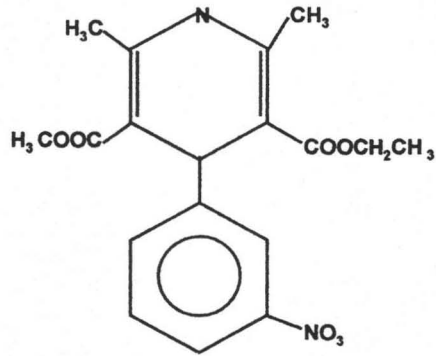
De esta forma los compuestos que se evaluaron son los 4 que se presentan en las figuras 3 y 4, compuestos que fueron obtenidos por síntesis orgánica.





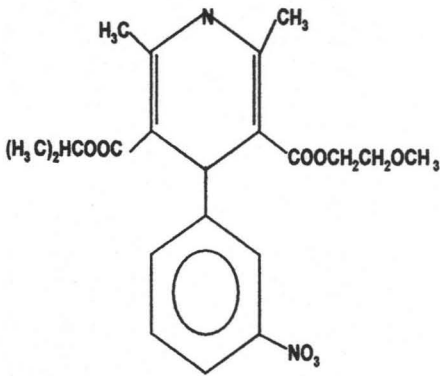
Los compuestos de las figuras 3 y 4 presentan una estructura similar a los compuestos de las figuras 5, 6, 7, 8 Y 9. Los cuales por lo general se emplean como agentes contra la hipertensión arterial (amlodipine, nifendipine, nitrendipine, nivaldipine,) contra la angina de pecho (amlodipine, nifendipine. nitrendipine) y como vasodilatador cerebral (nimodipine).

**AMLODIPINA**Figura 5. <sup>26</sup>**NIFENDIPINA.**Figura 6. <sup>26</sup>



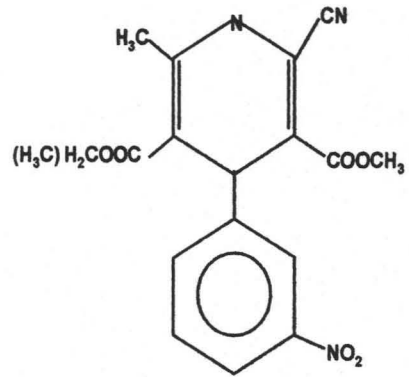
**NITRENDIPINA.**

Figura 7. <sup>26</sup>



**NIMODIPINA.**

Figura 8. <sup>26</sup>



**NIVALDIPINA.**

Figura 9. <sup>26</sup>





## 1.6 USO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LOS CERDOS.

Tras su éxito en medicina humana, los antimicrobianos se han utilizado cada vez más para tratar enfermedades de los animales terrestres, peces y plantas. Han llegado a ser también un importante elemento de la ganadería intensiva, debido a su efecto observado de aumento del crecimiento, cuando se añaden en dosis subterapéuticas a los piensos animales. Algunos promotores de crecimiento, pertenecen a grupos de antimicrobianos (por ejemplo: los glucopéptidos y a las estreptograminas) que son medicamentos esenciales en medicina humana para el tratamiento de enfermedades bacterianas graves y que pueden amenazar la vida. Entre ellas figuran las infecciones por *Staphylococcus* o *Enterococcus*. El difundido uso de los antimicrobianos en la agricultura y la ganadería plantea graves preocupaciones, pues algunas de las bacterias resistentes de creciente emergencia en los animales se transmiten a personas, principalmente por los alimentos de origen animal o por el contacto directo con los animales de granja. Tratar las enfermedades provocadas por esas bacterias resistentes en las personas resulta más difícil y costoso; y en algunos casos, los antimicrobianos disponibles no son ya eficaces.<sup>63</sup>

La administración de los antimicrobianos a los animales con fines no terapéuticos como la de promover el crecimiento o prevenir enfermedades, propicia la selección de bacterias resistentes. La práctica común de las explotaciones porcinas que emplean diferentes tipos de antibióticos para lo mencionado anteriormente, lleva al riesgo latente de favorecer la resistencia a los antibióticos de una amplia variedad de bacterias Gram (+) como Gram (-).<sup>1</sup>

Con el uso indiscriminado de los antibióticos sin fines curativos en animales destinados para el abasto, hace que la carne contenga altos niveles de antibióticos. Esta carne, al ser consumida puede provocar la aparición de hipersensibilidad y/o la aparición de las cepas bacterianas resistentes.<sup>1</sup>





## 2. JUSTIFICACIÓN.

La utilización indiscriminada de los agentes antimicrobianos en animales y humanos ha ejercido una gran presión a favor del desarrollo de microorganismos resistentes, lo cual se convierte en un grave problema de salud pública, por varios motivos: 1) los patógenos resistentes aparecen y se difunden con una mayor rapidez que en décadas pasadas, 2) la resistencia es un problema de tipo mundial, afecta a países desarrollados y a subdesarrollados, con una veloz propagación, 3) el tratamiento de este tipo de enfermedades infecciosas provocadas por microbios resistentes, se obstaculiza por el alto costo de los antibióticos de "nueva generación" ya existentes y por la falta de antimicrobianos eficaces.<sup>58</sup>

Por lo que algunas instituciones y/o laboratorios se han dado a la tarea de investigar nuevos compuestos con posible actividad antimicrobiana, como es el caso de la FES-Cuautitlan campo 1 a través de la sección de Química Orgánica se ha sintetizado nuevos compuestos, y el Laboratorio de Virología y Microbiología de la Unidad General de Posgrado investiga sobre la posible actividad antimicrobiana de dichos compuestos.





### 3. HIPÓTESIS.

Si los compuestos DHP-01A, DHP-02IR, DHP-03A y DHP-04BIR poseen actividad antimicrobiana, entonces mostraran inhibición del crecimiento microbiano con las cepas bacterianas empleadas.







## 4. OBJETIVOS.

### 4.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar diferentes compuestos que han sido obtenidos sintéticamente, utilizando distintas técnicas como son el método de Kirby-Bauer (sensidisco), método del cilindro en placa y método de macrodilución en caldo (turbidimetría), para determinar su posible actividad antimicrobiana utilizando diversas cepas bacterianas.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

4.2.1 Evaluar diferentes compuestos que han sido obtenidos sintéticamente utilizando la técnica del método de Kirby-Bauer (sensidisco) para determinar su posible actividad antimicrobiana.

4.2.2 Evaluar diferentes compuestos que han sido obtenidos sintéticamente utilizando la técnica del método del cilindro en placa para determinar su posible actividad antimicrobiana.

4.2.3 Evaluar diferentes compuestos que han sido obtenidos sintéticamente utilizando la técnica del método de macrodilución en caldo (turbidimetría) para determinar su posible actividad antimicrobiana.





## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 MEDIOS DE CULTIVO.

#### 5.1.1 CALDOS:

*5.1.1.1 Caldo BHI (infusión cerebro corazón):* se prepara como lo indica el marbete, se pesa la cantidad del polvo equivalente a la cantidad que se desea preparar, seguido se disuelve en un matraz Erlen-Meyer con la cantidad de agua destilada requerida y se calienta el medio hasta que desaparezcan los grumos, después se esteriliza a 15 libras de presión por 15 minutos a 121 °C, y se mete a prueba de esterilidad a 37 °C de 18 a 24 horas.

*5.1.1.2 Caldo Mueller-Hinton:* se prepara como lo indica el marbete, se pesa la cantidad del polvo equivalente a la cantidad que se desea preparar, seguido se disuelve en un matraz Erlen-Meyer con la cantidad de agua destilada requerida y se calienta el medio hasta que desaparezcan los grumos, después se esteriliza a 12 libras de presión por 10 minutos a 118 °C, se mide el pH del agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7.2 y 7.4 a temperatura ambiente. Esta medición puede realizarse utilizando un electrodo de inmersión.

#### 5.1.2 AGARES:

*5.1.2.1 Agar BHI (infusión cerebro corazón):* se prepara como lo indica el marbete, se pesa la cantidad del polvo equivalente a la cantidad que se desea preparar, seguido se disuelve en un matraz Erlen-Meyer con la cantidad de agua destilada requerida y se calienta el medio hasta que desaparezcan los grumos, después se esteriliza a 15 libras de presión por 15 minutos a 121 °C, después se enfría a 40-45 °C y se sirve en cajas petri de plástico estériles, se deja gelificar el medio a temperatura ambiente y se mete a prueba de esterilidad a 37 °C de 18 a 24 horas, pasado el tiempo se desechan las cajas que presenten crecimiento bacteriano y las restantes se guardan en refrigeración a 4 °C.

*5.1.2.2 Agar ST (soya tripticaseína):* se prepara como lo indica el marbete, se pesa la cantidad del polvo equivalente a la cantidad que se desea preparar, seguido se disuelve en un matraz Erlen-Meyer con la cantidad de agua destilada requerida y se calienta el medio hasta que desaparezcan los grumos, después se esteriliza a 15 libras de presión por 15 minutos a 121 °C, después se enfría a 40-45 °C y se sirve en cajas petri de plástico estériles, se deja gelificar el medio a temperatura ambiente y se mete a prueba de esterilidad a 37 °C de 18 a 24 horas, pasado el tiempo se desechan las cajas que presenten crecimiento bacteriano y las restantes se guardan en refrigeración a 4 °C.

*5.1.2.3 Agar Mueller-Hinton:* se prepara como lo indica el marbete, se pesa la cantidad del polvo equivalente a la cantidad que se desea preparar, seguido se disuelve en un matraz Erlen-Meyer con la cantidad de agua destilada requerida y se calienta el medio hasta que desaparezcan los grumos, después se esteriliza a 12 libras de presión por 10 minutos a 118 °C, Después se enfría a 40-45 °C y se sirve en cajas petri de plástico estériles, se deja gelificar el medio a temperatura ambiente. Una vez solidificado, se mide el pH del





agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7.2 y 7.4 a temperatura ambiente. Esta medición puede realizarse: a) Utilizando un electrodo de superficie, b) Macerando el medio en agua destilada y utilizando un electrodo de inmersión, c) Solidificando el agar con el electrodo del potenciómetro. Después se somete a prueba de esterilidad a 37 °C de 18 a 24 horas. Pasado el tiempo se desechan las cajas que presenten crecimiento bacteriano y las restantes se guardan en refrigeración a 4 °C.

5.1.2.4 *Agar para antibióticos n° 11 (A11)*: se prepara como lo indica el marbete, se pesa la cantidad del polvo equivalente a la cantidad que se desea preparar, seguido se disuelve en un matraz Erlen-Meyer con la cantidad de agua destilada requerida y se calienta el medio hasta que desaparezcan los grumos, después se esteriliza a 15 libras de presión por 15 minutos a 121 °C, después se enfría a 40-45 °C y se sirve en cajas petri de plástico estériles, se deja melificar el medio a temperatura ambiente y se mete a prueba de esterilidad a 37 °C de 18 a 24 horas, pasado el tiempo se desechan las cajas que presentes crecimiento bacteriano y las restantes se guardan en refrigeración a 4 °C.

## 5.2 METODOLOGÍA.

5.2.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE LOS COMPUESTOS A PROBAR. Para preparar las soluciones de los compuestos pesamos 5.12 mg de cada compuesto en una balanza analítica y aforamos en un matraz limpio y lavado con agua desionizada, de 10 ml de esta manera tenemos una solución cuya concentración es de 512 µg/ml. Se coloca la solución en un frasco ámbar con tapa de rosca y se guarda en refrigeración a 4 °C por no más de 7 días, etiquetamos el frasco como solución stock de 512 µg/ml. A partir de esta solución madre podemos realizar diluciones de trabajo.<sup>23</sup>

5.2.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO. A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas tomamos varias colonias con un asa y ajustamos el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de Mac-Farland en solución salina fisiológica. Agitamos en un vortex durante 15-20 segundos.<sup>12, 28</sup>

5.2.3 MÉTODO DE KIRBY-BAUER (SENSIDISCO). 15 minutos después de haber ajustado el inóculo, se introduce un hisopo estéril dentro de la suspensión y al retirarlo se rota varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido para eliminar el exceso de inóculo. Se inoculan las placas de Mueller-Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el hisopo por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Se dejar secar de 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.<sup>28, 38, 51</sup>

Los discos se colocan con pinzas estériles asegurándose que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que se presiona ligeramente sobre la superficie del agar. (NOTA: no deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición. Para





placas de 150 mm no se emplearán más de 12 discos y para las de 100 mm no más de 6). Los discos se preparan con concentraciones de 500, 400, 300, 200, 100 y 50  $\mu\text{g/ml}$  del compuesto a estudiar. Se incuban las placas en posición invertida, a 37 °C en atmósfera aeróbica por 18-24 horas. Después del tiempo de incubación se mide el diámetro de las zonas de completa inhibición con una regla.<sup>28, 38, 51</sup>

**5.2.4 MÉTODO DE CILINDRO EN PLACA.** Agregamos 21 ml de medio AA11 a cajas petri de vidrio hondas, dejamos solidificar sobre una superficie lisa y nivelada a esta capa se le llama capa base. Después agregamos 4 ml de AST previamente inoculado con 1 ml de la cepa bacteriana a estudiar, preparada como se indica en el punto 3.2.3, se deja solidificar en una superficie lisa y nivelada, a esta capa se le llama capa siembra.<sup>48, 49</sup>

Distribuimos 6 cilindros de metal estériles en la superficie del agar en forma de hexágono, utilizando pinzas estériles y distribuidos cada uno en un radio de 2.8 cm. para después adicionarles los compuestos diluidos en el disolvente adecuado y los controles, colocamos un disco de papel filtro en la tapa de la caja con el fin de que este absorba la humedad que se genere, incubamos a 37°C por 18 a 24 horas pasado el tiempo se mide la zona de inhibición alrededor de los cilindros. Las diluciones a ensayar son 10, 20, 30, 40, 70 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , en el disolvente dimetilsulfóxido. Todo se realiza por triplicado.<sup>48, 49</sup>

### 5.2.5 MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO.

**5.2.5.1 Inóculo:** Del inóculo preparado al 0.5 de la escala de Mac-Farlán, dentro de los 15 minutos siguientes diluimos en caldo MH para lograr una dilución 1/100 (inóculo de trabajo =  $1 \times 10^6$  UFC/ml).<sup>28, 38, 51</sup>

#### 5.2.5.2 Procedimiento:

- i) Se coloca 0.5 ml de Caldo Mueller-Hinton desde el tubo N°2 al N°12.
- ii) Se coloca 0.5 ml de solución del compuesto al tubo N°1 y N°2. Se agita y del tubo N°2 se transfiere 0.5 ml al tubo N°3.
- iii) Agitamos el tubo N°3 y transferimos 0.5 ml de este tubo al tubo N°4. continuamos con el mismo procedimiento hasta el tubo N°10.
- iv) Descartamos 0.5 ml de la dilución del tubo N°10.
- v) Se coloca 0.5 ml del inóculo desde el tubo N°1 al N°11.
- vi) Incubamos a 37 °C por 18-24 horas.
- vii) Una vez finalizada la incubación leemos cada tubo en el espectrofotómetro a 530 nm como blanco se utiliza caldo Mueller-Hinton sin inocular.<sup>28, 38, 51</sup>





TUBO Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CALDO MUELLER-HINTON	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	C.I.	C.F.
SOLUCIÓN DEL ANTIBIÓTICO.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-
INÓCULO.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
VOLUMEN FINAL.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

CLAVE.

C.I.: CONTROL DEL INÓCULO, C.F.: CONTROL DE ESTERILIDAD.

Cuadro # 2. Método de macrodilución en caldo. <sup>51</sup>





## 6. RESULTADOS:

### 6.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS:

Las cepas bacterianas empleadas son cepas causantes de infecciones respiratorias, diarreas, enfermedades gastrointestinales, aisladas de pulmón de cerdo, ganglios linfáticos y de diarreas de cerdos.

Tabla # 1. Caracterización de las cepas bacterianas.

BACTERIA. Pba. BQ.	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> cowan 1.	<i>Salmonella</i> <i>typhi</i> .	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> .	<i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> .
Gram.	G (+) pares o cadenas.	G (+) cocos en racimos de uvas.	G (-) bacilos.	G (-) bacilos.	G (-) coco bacilos.
Catalasa.	+	+	+	+	+
Oxidasa.	-	-	-	-	+
O/F glu.	O/F	F	F	F	O
Motilidad.	+	-	+	+	-
Nitratos.	+	+	+	+	+
Indol.	-		-	+	+
Citrato de Simons.	-		-	-	
Voges-Proskauer.	-	+	-		-
Rojo de metilo	+		+	+	-
Urea.	-	+	-	-	-
Coagulasa.		+			
Lactosa.			-	+	
H <sub>2</sub> S			+	-	
KIA			Alc/A	A/A	
Lisina.			+	+	-
Ornitina.			+		
Crecimiento en AMC.			+	+	-





## 6.2 RESULTADOS PARA *Bacillus spp.*

En relación con los resultados obtenidos mediante el método turbidimétrico, tablas 2, 3, 4 y 5, para la bacteria *Bacillus spp.* podemos observar que las MICs para los compuestos DHP-01A, DHP-02IR y DHP-04BIR son de 32, 64 y 64  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, para el compuesto DHP-03A no hay presencia de inhibición del crecimiento por lo tanto no hay MIC. En la tabla 6, se muestra el análisis de varianza donde observamos que no hay diferencia significativa entre la actividad bactericida de los cuatro compuestos puesto que como observamos el valor crítico de F ( $F = 2.8387$ ) es mayor que el valor obtenido de  $R.V = 2.3027$ .

TABLA # 2: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP - 01A PARA *Bacillus spp.*

# TUBO	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	256	8	ST	0.1687	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.2606	120	52	9	1
3	64	6	ST	0.2606	INC	130	40	11
4	32	5	ST	0.3233	INC	INC	INC	160
5	16	4	T	0.4059	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.4774	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.5233	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.5990	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	0.6290	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	0.7277	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	0.7694	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

Grafica # 1. Compuesto DHP-1A para *Bacillus spp.*

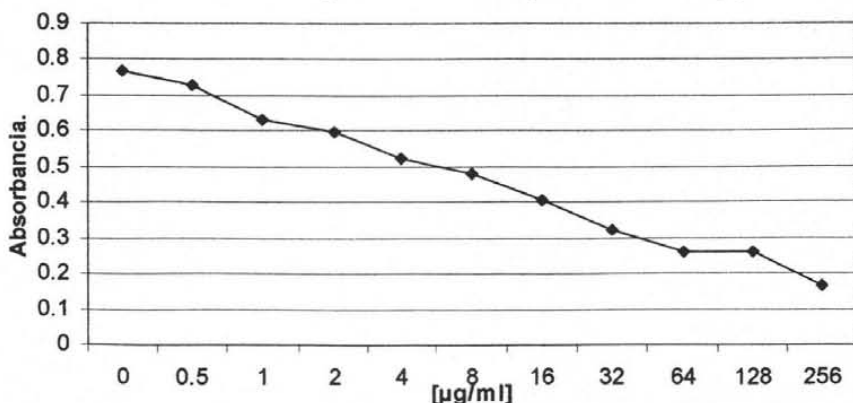


TABLA # 3: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP - 02IR PARA *Bacillus spp.*

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.0257	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.3377	SC	SC	SC	SC
3	64	6	ST	0.5102	SC	SC	SC	SC
4	32	5	T	0.6983	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.8922	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.9038	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.9047	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.9644	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.6409	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.6409	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.6500	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

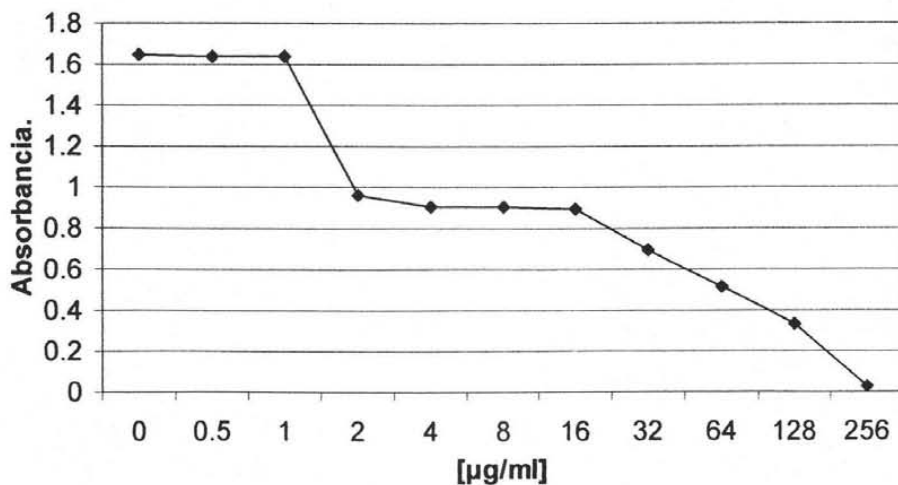
Gráfica # 2. Compuesto DHP-02IR para *Bacillus spp.*



TABLA # 4: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP - 03A PARA *Bacillus spp.*

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	T	0.2185	1	SC	SC	SC
2	128	7	T	0.2185	1	SC	SC	SC
3	64	6	T	0.2185	INC	INC	INC	INC
4	32	5	T	0.3992	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.7455	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.8690	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.9172	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.9459	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	0.9571	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	0.9596	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.0446	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

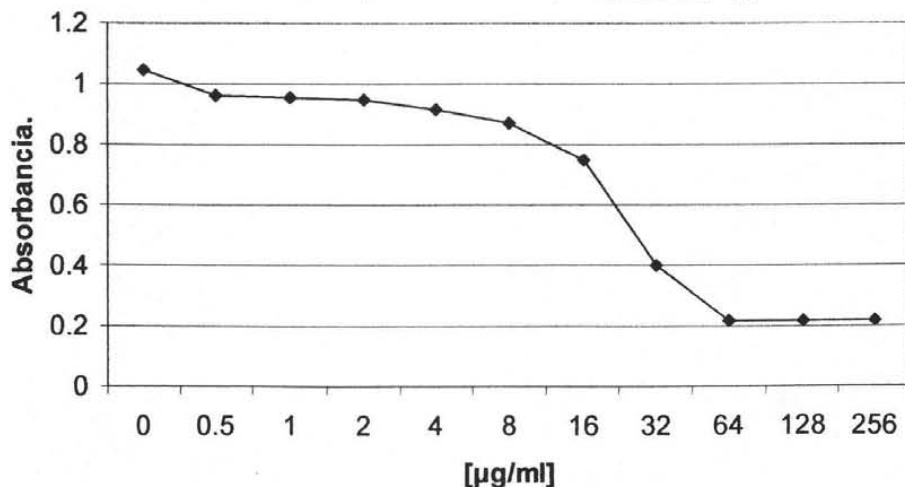
Grafica # 3. Compuesto DHP-03A para *Bacillus spp.*

TABLA # 5: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP - 04BIR PARA *Bacillus spp.*

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.0036	1	1	SC	SC
2	128	7	ST	0.0222	INC	SC	2	1
3	64	6	ST	0.0407	INC	INC	115	43
4	32	5	T	0.3521	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.8571	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.8926	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.9385	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.9462	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.1369	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.1369	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.1447	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

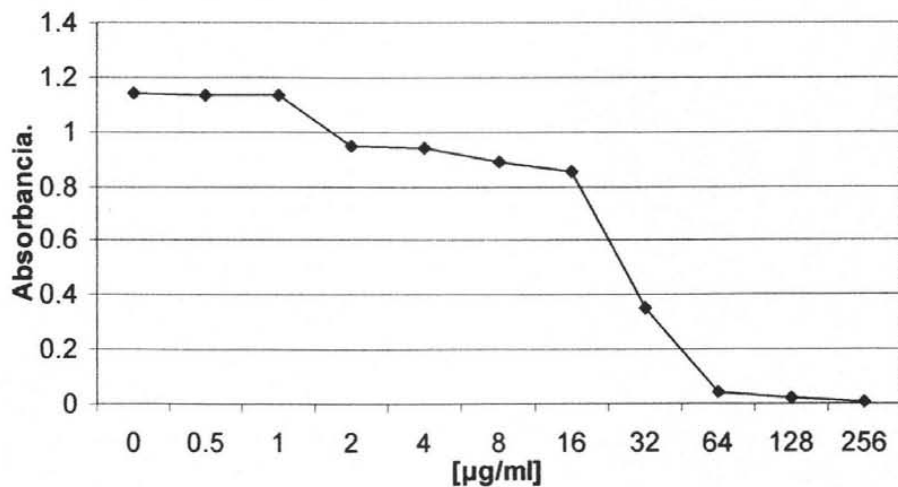
Grafica # 4. Compuesto DHP-04BIR para *Bacillus spp.*

Tabla # 6: Análisis de varianza de un factor para *Bacillus spp.*

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
DHP-01A	11	5.1449	0.467718182	0.040491814
DHP-02IR	11	10.2526	0.932054545	0.305923907
DHP-03A	11	7.4936	0.681236364	0.117265021
DHP-04BIR	11	7.4715	0.679227273	0.22541433

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.190116935	3	0.396705645	2.302762924	0.09164012	2.838746127
Dentro de los grupos	6.890950711	40	0.172273768			
Total	8.081067646	43				





En lo que respecta para el método del sensidisco, tabla 7, solo observamos inhibición del crecimiento de 1 mm, para todos los compuestos. Para el método del cilindro en placa, tabla # 8, no observamos actividad antimicrobiana e inhibición del crecimiento para cada uno de los compuestos utilizados.

TABLA # 7: PRUEBA DEL SENSIDISCO  
PARA *Bacillus spp.*

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [ $\mu$ /ml]					
	500	400	300	200	100	50
DHP-O1A	7	7	7	7	7	7
DHP-02BIR	7	7	7	7	7	7
DHP-03A	7	7	7	7	7	7
DHP-O4BIR	7	7	7	7	7	7

Diámetro de los discos = 6 mm.

TABLA # 8: PRUEBA DEL CILINDRO EN PLACA  
PARA *Bacillus spp.*

CONCENTRACIÓN [ $\mu$ /ml]	ANTIBIÓTICO			
	DHP-01A	DHP-02IR	DHP-03A	DHP-04BIR
10	7	7	7	7
20	7	7	7	7
30	7	7	7	7
40	7	7	7	7
70	7	7	7	7
100	7	7	7	7

Diámetro del halo de inhibición en mm. Diámetro del cilindro = 7 mm.





### 6.3 RESULTADOS PARA *Staphylococcus aureus* cowan 1.

Para *Staphylococcus aureus* cowan 1, del método de turbidimetría, tablas 9, 10 11 y 12, las MICs son de 256  $\mu\text{g/ml}$  para los compuestos DHP-01A y DHP-02IR, de 64  $\mu\text{g/ml}$  para los compuestos DHP-03A y DHP-04BIR. El análisis de varianza, tabla 13, nos muestra que el valor crítico de F ( $F = 2.2327$ ) es menor a la razón de varianza ( $R.V = 3.3426$ ) obtenida de los datos experimentales, lo que nos indica una diferencia en la actividad bactericida de los compuestos estudiados. La prueba de Tukey nos muestra similitud entre las medias de los compuestos dividiéndolos en dos grupos, el primero de ellos con valores de 0.38, 0.55 y 0.70 para los compuestos DHP-01A, DHP-02IR y DHP-03A respectivamente donde no hay diferencia significativa en los valores obtenidos, el otro grupo tiene valores de 0.55, 0.70 y 0.81 para los compuestos DHP-03A, DHP-04BIR y DHP-02IR respectivamente donde no hay diferencia significativa en los valores obtenidos.

TABLA # 9: MÉTODO DE TURBIDIMETRÍA PARA EL COMPUESTO DHP - 01A PARA *Staphylococcus aureus* cowan 1.

# TUBO	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	256	8	ST	0.0716	SC	SC	SC	SC
2	128	7	T	0.0738	SC	SC	SC	SC
3	64	6	T	0.0738	SC	SC	SC	SC
4	32	5	T	0.1534	SC	SC	SC	SC
5	16	4	T	0.2156	9	1	SC	SC
6	8	3	T	0.2219	INC	INC	INC	2
7	4	2	T	0.2219	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.3900	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	0.4246	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	0.8126	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	0.9371	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

Gráfica # 5. Compuesto DHP-01A para *Staphylococcus aureus* cowan 1.

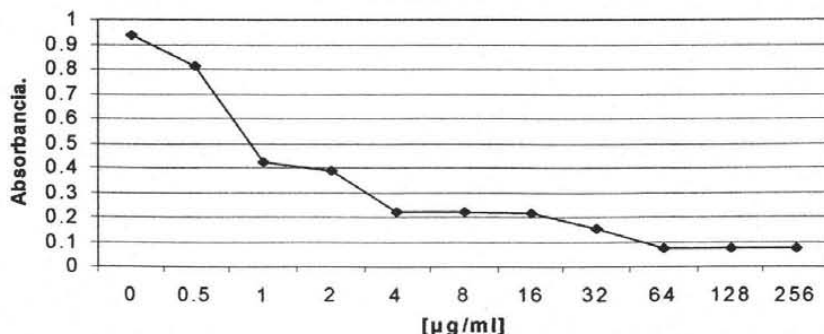


TABLA # 10: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP-02IR PARA *Staphylococcus aureus* cowan 1.

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.1283	1	SC	SC	SC
2	128	7	T	0.2556	3	SC	SC	SC
3	64	6	T	0.7852	INC	INC	INC	74
4	32	5	T	0.7937	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.8235	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.8257	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.8420	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.9506	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	0.9723	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.1531	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.474	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

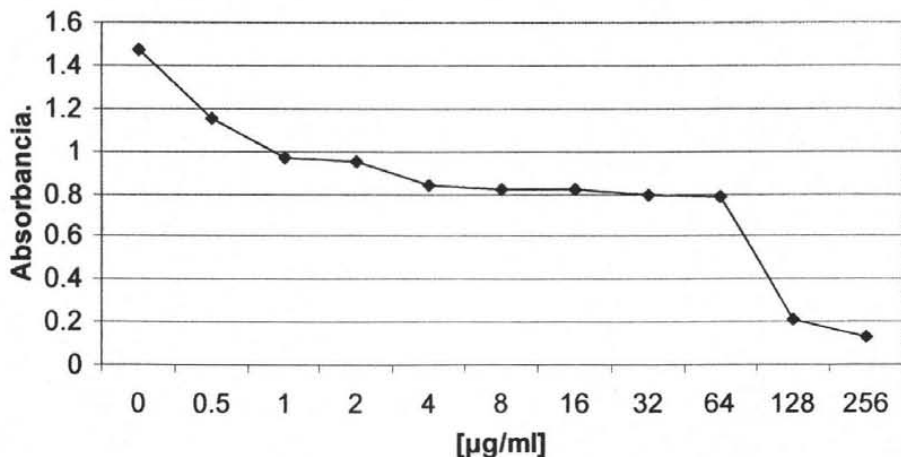
Gráfica # 6. Compuesto DHP-02IR para *Staphylococcus aureus* cowan 1.



TABLA # 11: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL  
COMPUESTO DHP - 03A *Staphylococcus aureus* cowan 1.

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.1334	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.1399	SC	SC	SC	SC
3	64	6	ST	0.1818	INC	INC	236	152
4	32	5	T	0.5259	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.6444	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.7020	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.7151	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.7353	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	0.7483	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	0.7843	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	0.7889	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

Gráfica # 7. Compuesto DHO-03A para *Staphylococcus aureus* cowan 1.

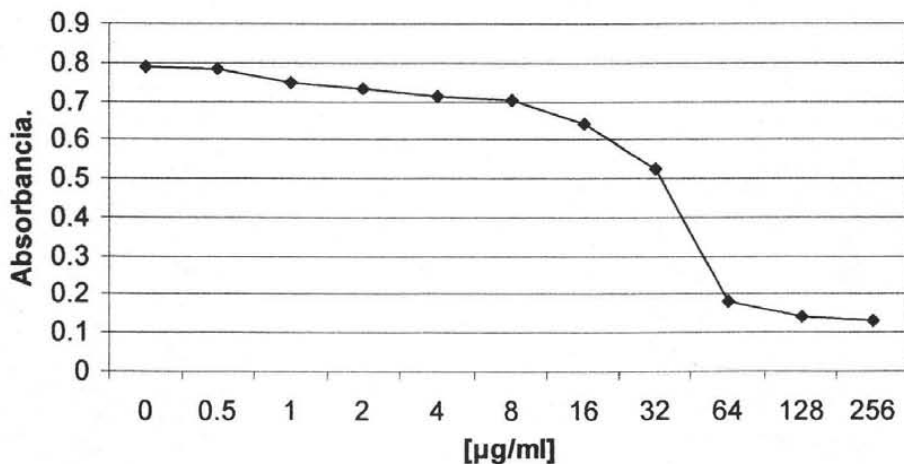


TABLA # 12: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP- 04BIR PARA *Staphylococcus aureus* cowan 1.

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.1132	INC	INC	35	30
2	128	7	ST	0.1132	INC	INC	96	37
3	64	6	ST	0.1132	INC	INC	INC	INC
4	32	5	T	0.6583	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.8456	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.8597	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.8725	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.9293	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.0297	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.0517	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.1835	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

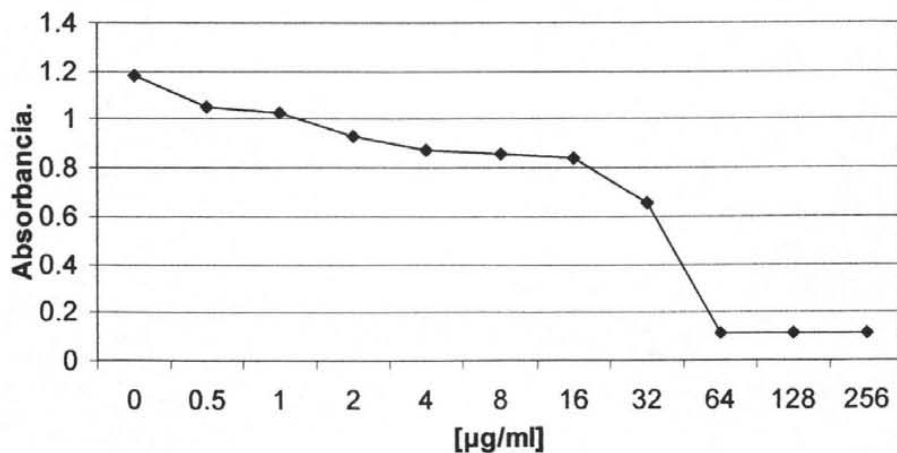
Gráfica # 8. Compuesto DHP-04BIR para *Staphylococcus aureus* cowan 1.



Tabla # 13: Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus* cowan 1.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
DHP-01A	11	4.2407	0.385518182	0.09280364		
DHP-02IR	11	9.006	0.818727273	0.137823196		
DHP-03A	11	6.0993	0.554481818	0.072257072		
DHP-04BIR	11	7.7699	0.706354545	0.162950285		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.16785189	3	0.389283963	3.342682609	0.028545251	2.838746127
Dentro de los grupos	4.658341922	40	0.116458548			
Total	5.826193812	43				
PRUEBA DE TUKEY PARA <i>Staphylococcus aureus</i> cowan.						
$w: q_{\alpha(p,v)} \frac{s}{\sqrt{n_i}} = 3.79 \frac{(0.3413)}{(\sqrt{11})} = 0.3900$						
Donde: p: # muestras = 4 s: $\sqrt{MSE} = \sqrt{0.1165} = 0.3413$ v = 40 n <sub>i</sub> = 11 q <sub>0.5(4,40)</sub> ≈ 3.79				DHP - 01A = 0.385518182 DHP - 03A = 0.554481818 DHP - 04BIR = 0.706354545 DHP - 02IR = 0.818727273		





En lo que respecta al método de sensidisco (Kirby-Bauer), grafica 14, solo observamos un halo de inhibición de 1 mm para cada uno de los compuestos y las concentraciones ensayadas. Para el método del cilindro en placa, tabla 15, no observamos halo de inhibición para ninguno de los compuestos utilizados ni para las concentraciones utilizadas.

**TABLA # 14: PRUEBA DEL SENSIDISCO  
PARA *Staphylococcus aureus* cowan 1.**

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [μ/ml]					
	500	400	300	200	100	50
DHP-O1A	7	7	7	7	7	7
DHP-02BIR	7	7	7	7	7	7
DHP-03A	7	7	7	7	7	7
DHP-O4BIR	7	7	7	7	7	7

Diámetro de los discos = 6 mm.

**TABLA # 15: PRUEBA DEL CILINDRO EN PLACA  
PARA *Staphylococcus aureus* cowan 1.**

CONCENTRACIÓN [ μ/ml]	ANTIBIÓTICO			
	DHP-01A	DHP-02IR	DHP-03A	DHP-04BIR
10	7	7	7	7
20	7	7	7	7
30	7	7	7	7
40	7	7	7	7
70	7	7	7	7
100	7	7	7	7

Diámetro del halo de inhibición en mm. Diámetro del cilindro = 7 mm.





#### 6.4 RESULTADOS PARA *Salmonella typhi*.

Para la bacteria *Salmonella typhi*, por el método turbidimétrico, las tablas 16, 17, 18 y 19, obtenemos las MICs que son de 64  $\mu\text{g/ml}$  para todos los compuestos. Del análisis de varianza, tabla 20, observamos que el valor crítico de F ( $F=2.8387$ ) es mayor que la razón de varianza ( $R.V.=0.5685$ ) obtenida de los datos experimentales observamos que no hay diferencia significativa en lo que corresponde a la actividad bactericida de los compuestos.

TABLA # 16: MÉTODO DE TURBIDIMETRÍA PARA EL COMPUESTO DHP- 01A PARA *Salmonella typhi*.

# TUBO	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	256	8	ST	0.1713	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.2059	INC	188	15	SC
3	64	6	ST	0.2059	INC	INC	200	41
4	32	5	T	0.7471	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	1.0904	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.2676	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.2939	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.3486	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.3776	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.3776	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.7306	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

Gráfica # 9. Compuesto DHP-01A para *Salmonella typhi*.

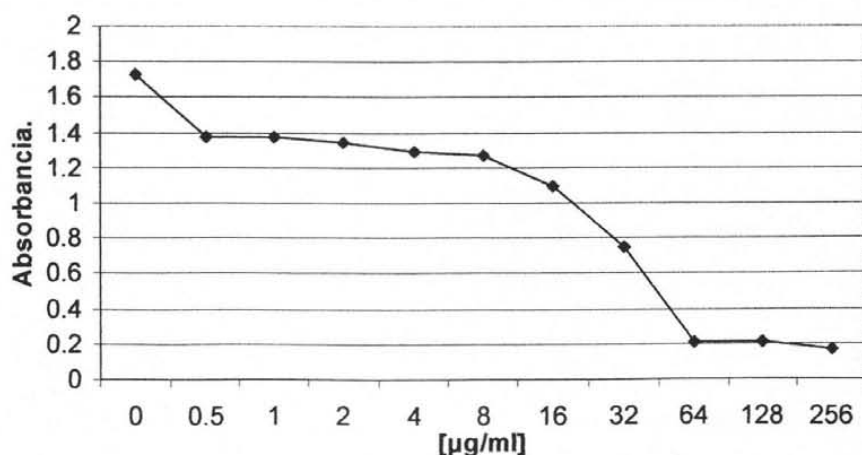


TABLA # 17: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP-02IR PARA *Salmonella typhi*

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.0721	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.0817	INC	30	19	SC
3	64	6	ST	0.1393	INC	INC	INC	INC
4	32	5	T	0.7399	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	1.0985	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.2629	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.2629	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.3731	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.3750	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.4088	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.7314	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

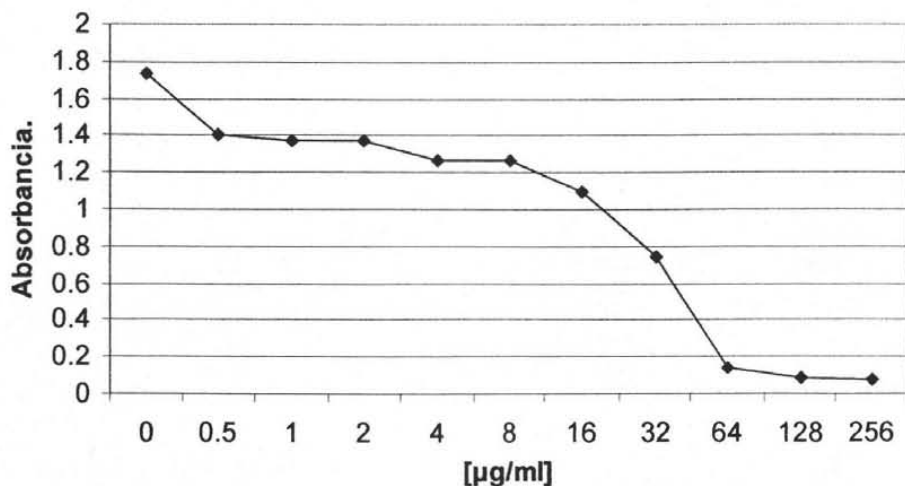
Gráfica # 10. Compuesyo DHP-02IR para *Salmonella typhi*.

TABLA # 18: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP- 03A PARA *Salmonella typhi*

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.1413	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.1548	86	3	1	SC
3	64	6	ST	0.1602	INC	INC	INC	INC
4	32	5	T	0.4974	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.8714	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.1892	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.1995	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.2237	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.2366	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.2698	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.7330	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

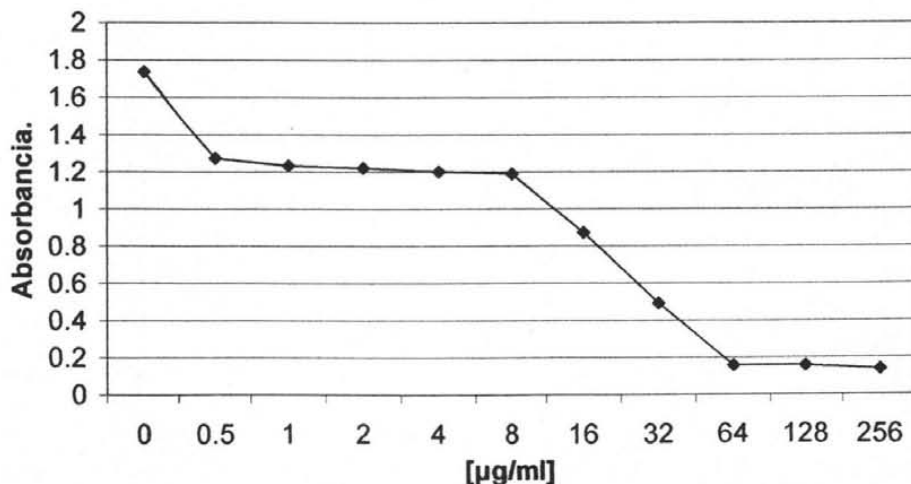
Gráfica # 11. Compuesto DHP-03A para *Salmonella typhi*.

TABLA # 19: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP - 04BIR PARA *Salmonella typhi*.

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.0036	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.0587	49	14	SC	SC
3	64	6	ST	0.0587	INC	INC	INC	INC
4	32	5	T	0.3521	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.7161	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.8571	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.8929	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.9385	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	0.9462	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.1369	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.7319	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

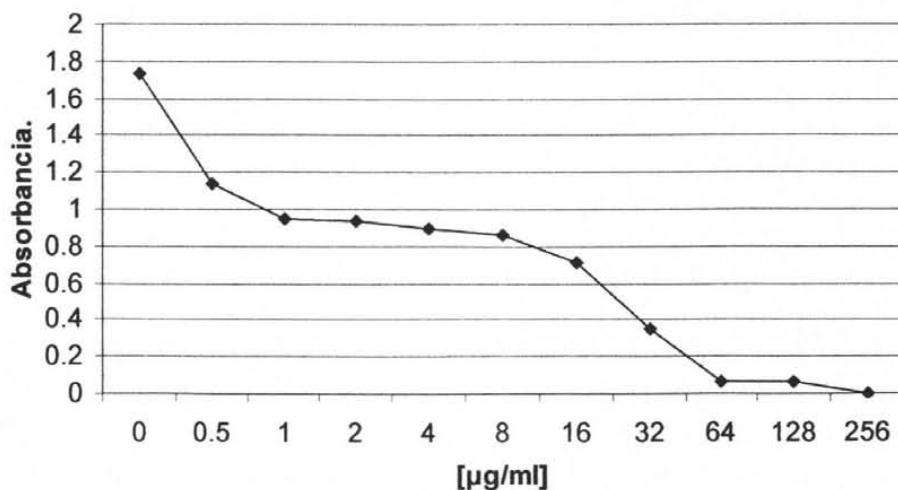
Gráfica # 12. Compuesto DHP-04BIR para *Salmonella typhi*.

Tabla # 20: Análisis de varianza para *Salmonella typhi*.

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
DHP-01A	11	10.57566	0.961423636	0.303124953
DHP-02IR	11	10.5456	0.958690909	0.362378603
DHP-03A	11	9.6769	0.879718182	0.30586918
DHP-04BIR	11	7.5927	0.690245455	0.282513803

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.534656165	3	0.178218722	0.568532211	0.638975389	2.838746127
Dentro de los grupos	12.53886539	40	0.313471635			
Total	13.07352155	43				





En el método del sensidisco, tabla 21, podemos observar que para los compuestos DHP-01A y DHP-04BIR solo tenemos un halo de inhibición de 1 mm, mientras que para el compuesto DHP-03A tenemos halos de inhibición de 1 mm para una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  y de 2 mm para 100 a 500  $\mu\text{g/ml}$ . Para el método del cilindro en placa, tabla 22, no observamos la presencia de halos de inhibición para cada uno de los compuestos utilizados y de las concentraciones empleadas.

**TABLA # 21: PRUEBA DEL SENSIDISCO  
PARA *Salmonella typhi*.**

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	500	400	300	200	100	50
DHP-01A	7	7	7	7	7	7
DHP-02BIR	8	8	8	8	8	8
DHP-03A	8	8	8	8	8	7
DHP-04BIR	7	7	7	7	7	7

Diámetro de los discos = 6 mm.

**TABLA # 22: PRUEBA DEL CILINDRO EN PLACA  
PARA *Salmonella typhi*.**

CONCENTRACIÓN [ $\mu\text{g/ml}$ ]	ANTIBIÓTICO			
	DHP-01A	DHP-02IR	DHP-03A	DHP-04BIR
10	7	7	7	7
20	7	7	7	7
30	7	7	7	7
40	7	7	7	7
70	7	7	7	7
100	7	7	7	7

Diámetro del halo de inhibición en mm. Diámetro del cilindro = 7 mm.







## 6.5 RESULTADOS PARA *Escherichia coli*.

Para *Escherichia coli* por el método turbidimétrico, tablas 23, 24, 25 y 26, observamos que las MICs son de 64  $\mu\text{g/ml}$  para los cuatro compuestos. De la tabla 27 obtenemos el análisis de varianza y observamos que el valor crítico para F ( $F = 2.8387$ ) es menor que la razón de varianza ( $R.V.=3.5232$ ) obtenida de los datos experimentales, ello nos indica una variación en las medias de los datos que sugiere variación en la actividad bactericida de los cuatro compuestos. La prueba de Tukey nos muestra que existe similitud entre los compuestos y los divide en dos grupos, el primer grupo es DHP-02IR, DHP-01A y DHP-03A; el segundo grupo es DHP-01A, DHP-03A y DHP-04BIR, donde no existe diferencia significativa en cada uno de los grupos.

TABLA # 23: MÉTODO DE TURBIDIMETRÍA PARA EL COMPUESTO DHP- 01 A PARA *Escherichia coli*.

# TUBO	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[log <sub>2</sub> ]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.0543	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.2189	SC	SC	SC	SC
3	64	6	ST	0.2189	INC	INC	INC	INC
4	32	5	T	0.5734	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.7366	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.8576	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.9050	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.9506	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	0.9536	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.0900	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.1139	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

Gráfica # 13. Compuesto DHP-01A para *Escherichia coli*.

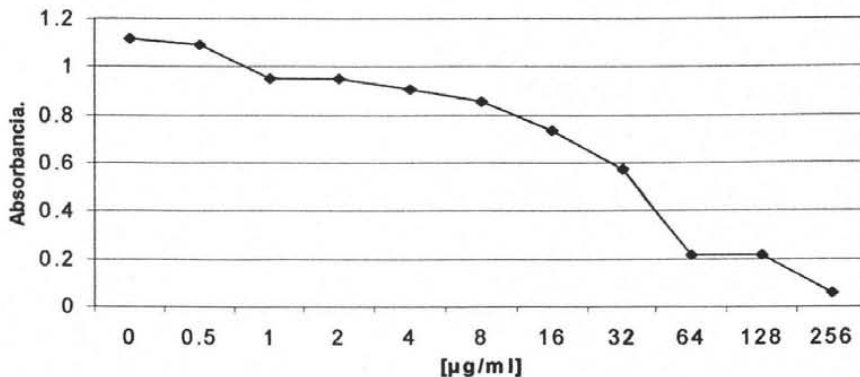


TABLA # 24: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL  
COMPUESTO DHP - 02IR para *Escherichia coli*.

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.0544	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.1130	SC	SC	SC	SC
3	64	6	ST	0.2043	INC	INC	INC	15
4	32	5	T	0.2217	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.2510	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.2843	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.2857	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.2959	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	0.3236	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	0.3236	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	0.8526	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

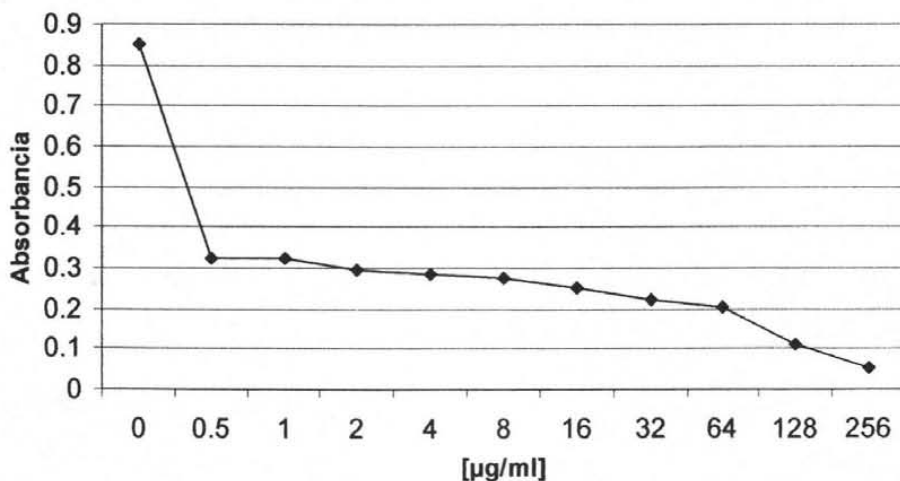
Gráfica # 14. Compuesto DHP-02IR para *Escherichia coli*.

TABLA # 25: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP- 03A para *Escherichia coli*.

# TUBO	[µg/ml]	[log <sub>2</sub> ]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.1029	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.1176	SC	SC	SC	SC
3	64	6	ST	0.2051	SC	SC	SC	SC
4	32	5	T	0.5502	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.8315	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.8658	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.8658	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.9740	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.0305	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.0578	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.1104	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

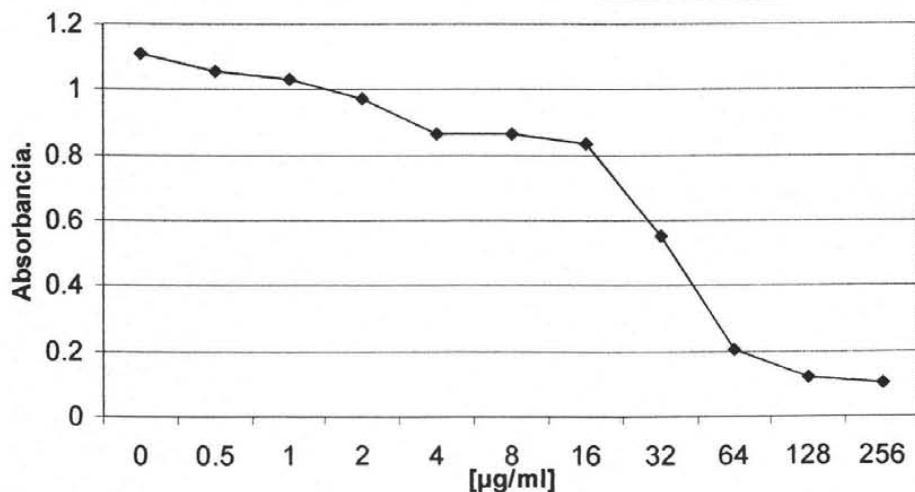
Gráfica # 15. Compuesto DHP-03A para *Escherichia coli*.

TABLA # 26: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL  
COMPUESTO DHP- 04BIR para *Escherichia coli*.

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.1238	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.1238	SC	SC	SC	SC
3	64	6	ST	0.1238	SC	SC	SC	SC
4	32	5	T	0.5055	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.8436	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	0.9321	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	0.9321	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	0.9321	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.0861	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.0861	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.1145	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

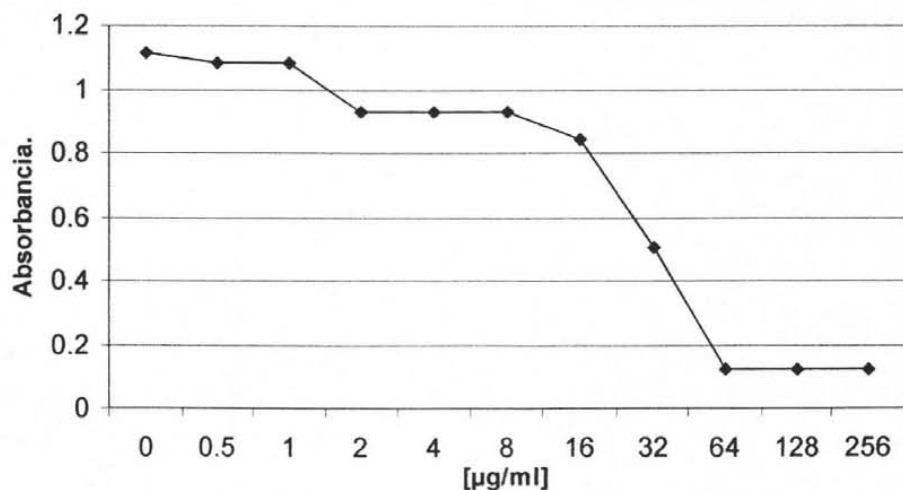
Grafica # 16. Compuesto DHP-04BIR para *Escherichia coli*.

Tabla # 27: Análisis de varianza para *Escherichia coli*.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
DHP-01A	11	7.6758	0.6978	0.141605868		
DHP-02IR	11	3.3101	0.300918182	0.042705794		
DHP-03A	11	7.7116	0.701054545	0.151609877		
DHP-04BIR	11	7.8035	0.709409091	0.168506459		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.332936746	3	0.444312249	3.523295703	0.023407896	2.838746127
Dentro de los grupos	5.044279973	40	0.126106999			
Total	6.377216719	43				
PRUEBA DE TUKEY PARA <i>Escherichia coli</i> .						
$w: q_{\alpha(p,v)} \frac{s}{\sqrt{n_i}} = 3.79 \frac{(0.3551)}{(\sqrt{11})} = 0.40580$						
Donde: p: # muestras = 4 s: $\sqrt{MSE} = \sqrt{0.1261} = 0.3551$ v = 40 n <sub>i</sub> = 11 q <sub>0.5(4, 40)</sub> ≈ 3.79				DHP - 01A = 0.385518182 DHP - 03A = 0.554481818 DHP - 04BIR = 0.706354545 DHP - 02IR = 0.818727273		





En el método del sensidisco, tabla 28, se observa que la bacteria no presenta inhibición del crecimiento para los compuestos DHP-01A, DHP-03A y DHP-04BIR, para el compuesto DHP-02IR solo observamos inhibición del crecimiento en un halo de 1 mm. Para el método del cilindro en placa, tabla 29, solo observamos halos de inhibición de 1 - 4 mm.

TABLA # 28: PRUEBA DEL SENSIDISCO  
PARA *Escherichia coli*.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [ $\mu$ /ml]					
	500	400	300	200	100	50
DHP-01A	6	6	6	6	6	6
DHP-02BIR	8	7	7	7	7	6
DHP-03A	6	6	6	6	6	6
DHP-04BIR	6	6	6	6	6	6

Diámetro de los discos = 6 mm.

TABLA # 29: PRUEBA DEL CILINDRO  
EN PLACA PARA *Escherichia coli*.

CONCENTRACIÓN [ $\mu$ /ml]	ANTIBIÓTICO			
	DHP-01A	DHP-02IR	DHP-03A	DHP-04BIR
10	7	9	8	7
20	7	9	8	8
30	8	10	9	8
40	8	10	9	9
70	8	11	9	9
100	8	11	9	9

Diámetro del halo de inhibición en mm. Diámetro del cilindro = 7 mm.





## 6.6 RESULTADOS PARA *Pasteurella multocida* serógrupo A.

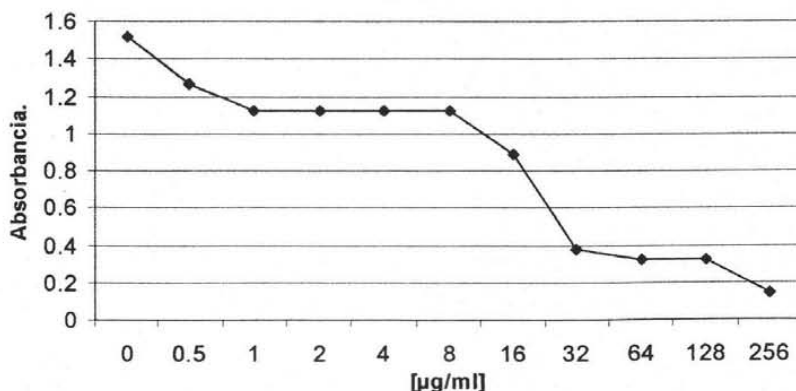
Para la bacteria *Pasteurella multocida* serógrupo A, para el método turbidimétrico, tablas 30, 31, 32 y 33, las MICs son de 128  $\mu\text{g/ml}$  para los compuestos DHP-01A, DHP-02IR y DHP-03A, y de 64  $\mu\text{g/ml}$  para el compuesto DHP-04BIR. La tabla 34 del análisis de varianza nos muestra que no hay diferencia significativa entre la actividad bactericida de los compuestos ya que el valor crítico de F ( $F = 2.8387$ ) es mayor al valor de la razón de varianza que es de R.V. = 0.8942).

TABLA # 30: MÉTODO DE TURBIDIMETRÍA PARA EL COMPUESTO DHP- 01 A para *Pasteurella multocida* serógrupo A.

# TUBO	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	256	8	ST	0.1432	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.3245	26	5	2	SC
3	64	6	T	0.3245	300	9	6	SC
4	32	5	T	0.3735	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.8885	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.1201	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.1223	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.1223	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.1223	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.2693	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.5194	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

Gráfica # 17. Compuesto DHP-01A para *Pasteurella multocida* serógrupo A.





**TABLA # 31: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL  
COMPUESTO DHP- 02IR para *Pasteurella multocida* serógrupo A.**

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.4944	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.5420	16	SC	SC	SC
3	64	6	T	0.6253	27	10	2	SC
4	32	5	T	0.6253	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.8426	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.2810	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.3004	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.3005	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.3020	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.3773	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.5205	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

**Gráfica # 18. Compuesto DHP-02IR para *Pasteurella multocida*  
serógrupo A.**

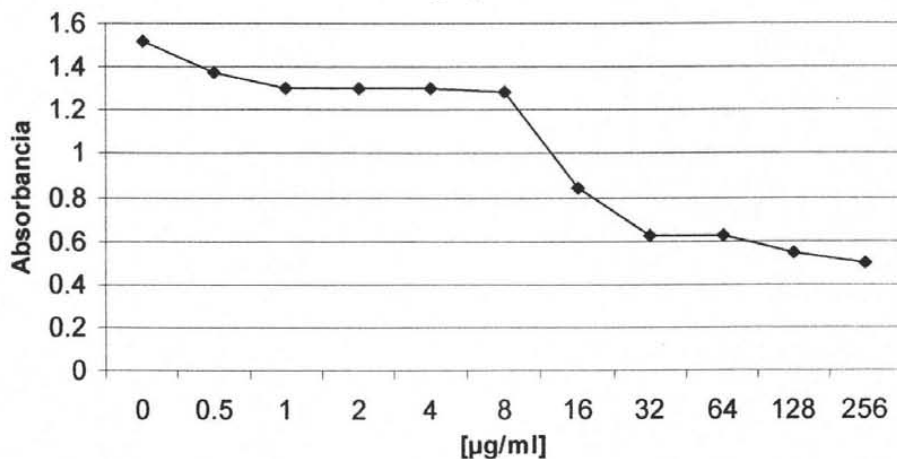




TABLA # 32: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL  
COMPUESTO DHP - 03A para *Pasteurella multocida* serógrupo A.

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.4724	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.5851	SC	SC	SC	SC
3	64	6	T	0.8389	SC	SC	SC	SC
4	32	5	T	1.0392	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	1.1773	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.1957	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.2992	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.3144	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.3253	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.3639	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.5483	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

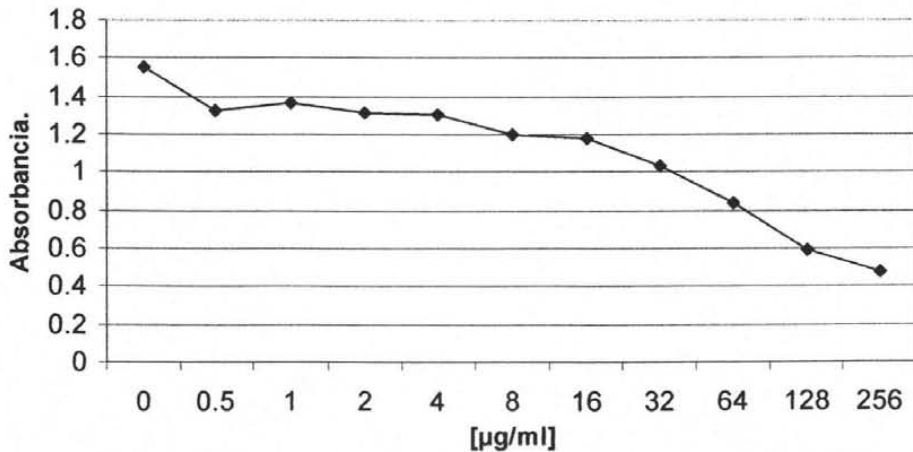
Gráfica # 19. Compuesto DHP-03A para *Pasteurella multocida*  
serógrupo A.

TABLA # 33: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL  
COMPUESTO DHP- 04BIR para *Pasteurella multocida* serógrupo A.

# TUBO	[µg/ml]	[log <sub>2</sub> ]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.0561	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.1106	26	1	SC	SC
3	64	6	ST	0.1282	37	2	SC	SC
4	32	5	T	0.1282	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	0.4931	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.0618	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.2422	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.3542	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.4322	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.4322	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.6435	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

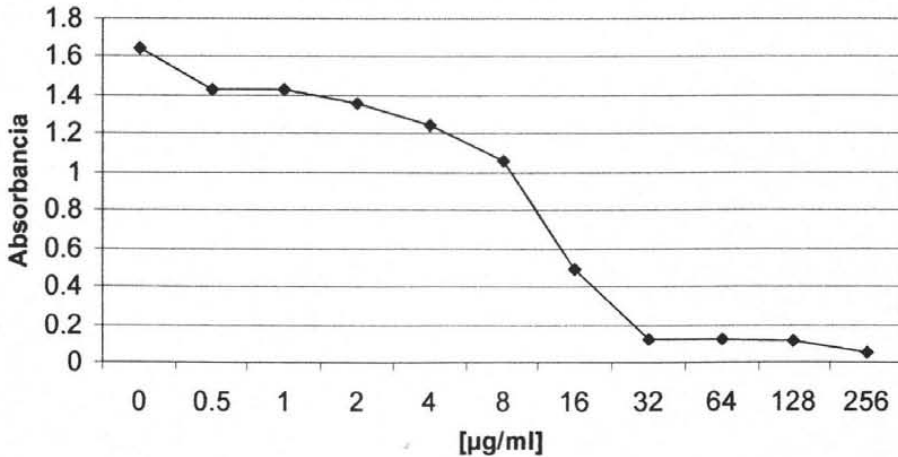
Gráfica # 20. Compuesto DHP-04BIR para *Pasteurella multocida* serógrupo A.

Tabla # 34: Análisis de varianza para *Pasteurella multocida* serogrupo A

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
DHP-01A	11	9.3299	0.848172727	0.219966924		
DHP-02IR	11	11.2113	1.019209091	0.153089237		
DHP-03A	11	12.1597	1.105427273	0.115270758		
DHP-O4BIR	11	9.0823	0.825663636	0.410029647		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.602528047	3	0.200842682	0.89426711	0.452495367	2.838746127
Dentro de los grupos	8.983565658	40	0.224539141			
Total	9.586093705	43				





En el método del sensidisco, tabla 35, podemos ver que para los compuestos DHP-01A y DHP-03A presentan halos de inhibición 1 mm y para los compuestos DHP-02IR y DHP-04BIR no presentan halos de inhibición. En los que respecta al método del cilindro en placa, tabla 36, los resultados son que para todos los compuestos no hay halos de inhibición del crecimiento.

**TABLA # 35: PRUEBA DEL SENSIDISCO PARA  
*Pasteurella multocida* serógrupo A.**

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [ $\mu$ /ml]					
	500	400	300	200	100	50
DHP-01A	7	7	7	7	7	7
DHP-02BIR	6	6	6	6	6	6
DHP-03A	7	7	7	7	7	7
DHP-04BIR	6	6	6	6	6	6

Diámetro de los discos = 6 mm.

**TABLA # 36: PRUEBA DEL CILINDRO EN PLACA  
PARA *Pasteurella multocida* serógrupo A.**

CONCENTRACIÓN [ $\mu$ /ml]	ANTIBIÓTICO			
	DHP-01A	DHP-02IR	DHP-03A	DHP-04BIR
10	7	7	7	7
20	7	7	7	7
30	7	7	7	7
40	7	7	7	7
70	7	7	7	7
100	7	7	7	7

Diámetro del halo de inhibición en mm. Diámetro del cilindro = 7 mm.



6.7 RESULTADOS PARA *Pasteurella multocida* serógrupo D.

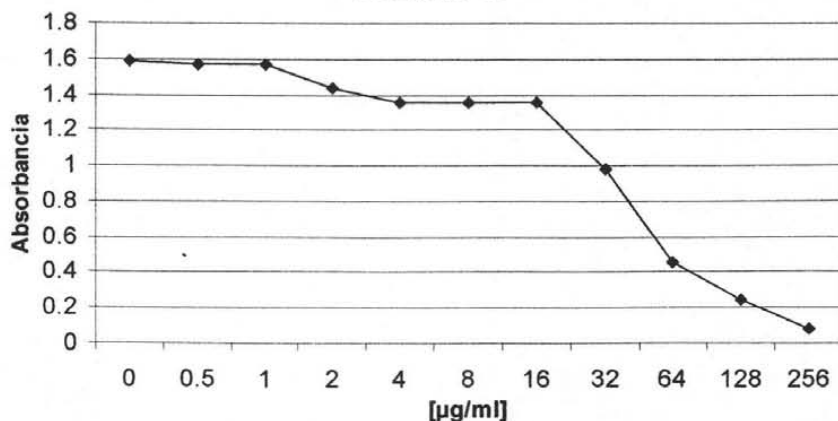
La bacteria *Pasteurella multocida* serógrupo D, para el método turbidimétrico, tablas 37, 38, 39 y 40, los resultados para las MICs son los siguientes 64  $\mu\text{g/ml}$  para los compuestos DHP-01A, DHP-03A y DHP-04BIR y de 128  $\mu\text{g/ml}$  para el compuesto DHP-02IR. El análisis de varianza, tabla 41, no muestra diferencia significativa con respecto a los compuestos utilizados debido a que el valor crítico de F ( $F=2.8387$ ) es mayor a valor de la razón de varianza ( $R.V.=0.09939$ ) obtenida de los resultados experimentales.

TABLA # 37: MÉTODO DE TURBIDIMETRÍA PARA EL COMPUESTO DHP- 01 A para *Pasteurella multocida* serógrupo D.

# TUBO	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	256	8	ST	0.0850	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.2457	19	1	SC	SC
3	64	6	ST	0.4583	INC	INC	INC	INC
4	32	5	T	0.9825	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	1.3529	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.3529	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.3529	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.4332	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.5639	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.5639	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.5885	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

Gráfica # 21. Compuesto DHP-01A para *Pasteurella multocida* serógrupo D.





**TABLA # 38: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP- 02IR para *Pasteurella multocida* serógrupo D.**

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.2819	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.2819	62	6	SC	SC
3	64	6	T	1.0008	INC	INC	INC	INC
4	32	5	T	1.1395	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	1.2222	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.2222	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.2533	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.2836	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.3799	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.4807	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.6767	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

**Gráfica # 22. Compuesto DHP-02IR para *Pasteurella multocida* serógrupo D.**

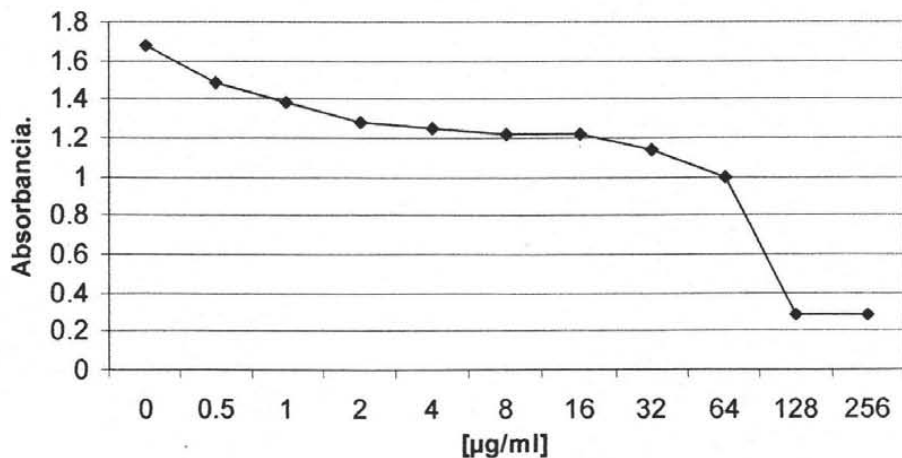


TABLA # 39: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP- 03A para *Pasteurella multocida* serógrupo D.

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.7072	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.9241	SC	SC	SC	SC
3	64	6	ST	0.9269	INC	INC	INC	164
4	32	5	T	1.0159	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	1.1160	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.2268	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.2657	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.3030	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.3894	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.4906	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.6251	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

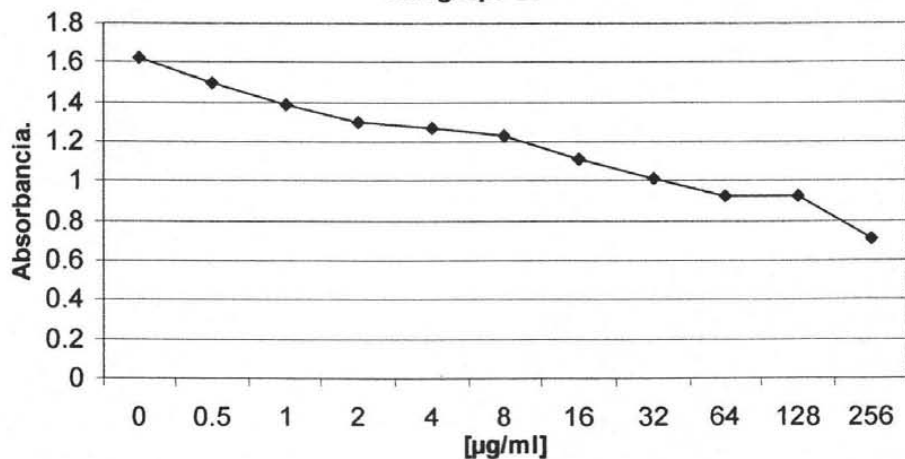
Gráfica # 23. Compuesto DHP-03A para *Pasteurella multocida* serógrupo D.

TABLA # 40: MÉTODO DE TURBIDIMETRIA PARA EL COMPUESTO DHP- 04BIR para *Pasteurella multocida* serógrupo D.

# TUBO	[µg/ml]	[log2]	ST/T	ABSORBANCIA	UFC			
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	256	8	ST	0.0528	SC	SC	SC	SC
2	128	7	ST	0.0856	21	SC	SC	SC
3	64	6	ST	0.7504	INC	INC	INC	INC
4	32	5	T	0.9556	INC	INC	INC	INC
5	16	4	T	1.2632	INC	INC	INC	INC
6	8	3	T	1.2632	INC	INC	INC	INC
7	4	2	T	1.2632	INC	INC	INC	INC
8	2	1	T	1.2632	INC	INC	INC	INC
9	1	0	T	1.3461	INC	INC	INC	INC
10	0.5	-1	T	1.4430	INC	INC	INC	INC
11 C. C.			T	1.6430	INC	INC	INC	INC
12 C. E.			ST					

Clave: ST: sin turbidez, T: turbidez, SC: sin crecimiento, INC: incontables, C.C.: control de crecimiento, C.E.: control de esterilidad.

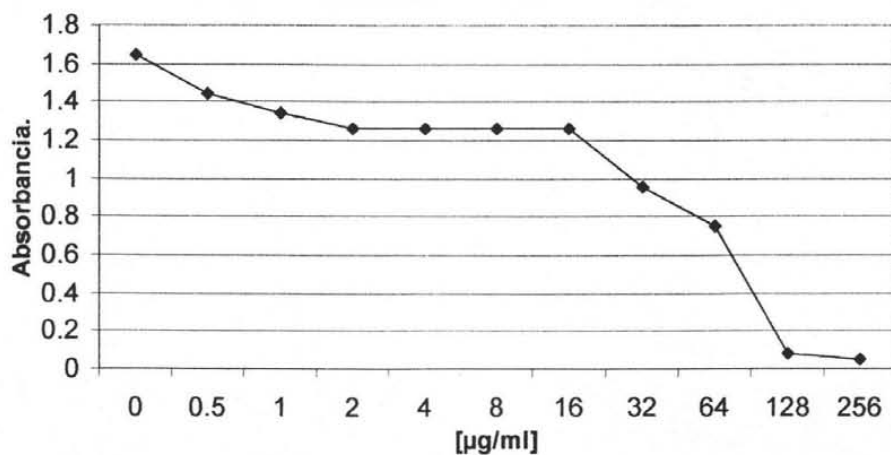
Gráfica # 24. Compuesto DHP-04BIR para *Pasteurella multocida* serógrupo D.



Tabla # 41: Análisis de varianza para *Pasteurella multocida* serógrupo D.

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
DHP-01A	11	11.9497	1.086336364	0.320767913
DHP-02IR	11	12.2227	1.111154545	0.199154237
DHP-03A	11	12.9907	1.180972727	0.074719712
DHP-04BIR	11	11.8793	1.079936364	0.352367885

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.07059372	3	0.02353124	0.099391754	0.959888819	2.838746127
Dentro de los grupos	9.47009746	40	0.236752437			
Total	9.54069118	43				





En lo que respecta al método del sensidisco, tabla 42, podemos observar que los compuestos DHP-01A, DHP-03A y DHP-04BIR presentan halos de inhibición de tan solo 1 mm y el compuesto DHP-02IR no presenta halos de inhibición. Para el método del cilindro en placa, tabla 43, no observamos la presencia de halos de inhibición para los compuestos utilizados y para las concentraciones empleadas.

**TABLA # 42: PRUEBA DEL SENSIDISCO  
PARA *Pasteurella multocida* serógrupo D.**

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [ $\mu$ /ml]					
	500	400	300	200	100	50
DHP-01A	7	7	7	7	7	7
DHP-02BIR	6	6	6	6	6	6
DHP-03A	7	7	7	7	7	7
DHP-04BIR	7	7	6	6	6	6

Diámetro de los discos = 6 mm.

**TABLA # 43: PRUEBA DEL CILINDRO EN PLACA  
PARA *Pasteurella multocida* serógrupo D.**

CONCENTRACIÓN [ $\mu$ /ml]	ANTIBIÓTICO			
	DHP-01A	DHP-02IR	DHP-03A	DHP-04BIR
10	7	7	7	7
20	7	7	7	7
30	7	7	7	7
40	7	7	7	7
70	7	7	7	7
100	7	7	7	7

Diámetro del halo de inhibición en mm. Diámetro del cilindro = 7 mm.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA





## 7. DISCUSIÓN.

En años pasados ante el incremento de la resistencia a los antimicrobianos, se retoma la iniciativa sobre la búsqueda de nuevas moléculas que sirvieran como antibacteriales, realizando trabajos de investigación con respecto a la modificación de compuestos ya existentes y síntesis de nuevas moléculas con probable actividad biológica.<sup>48</sup>

Las moléculas sintetizadas por la sección de Química Orgánica de la FES-Cuautitlan, campo 1, son del grupo de las dihidropiridinas que si bien hasta donde se investigo no hay reportes de estudios sobre su posible actividad antimicrobiana, se vienen usando como agentes contra la angina de pecho, hipertensión arterial y como vasodilatador cerebral.

Estos compuestos poseen grupos nitro y cloro. Hay reportes de la modificación en distintos tipos de moléculas de los grupos funcionales que favorecen la actividad antimicrobiana aumentándola o disminuyéndola.<sup>48</sup>

Las cepas utilizadas en el presente estudio fueron cepas bacterianas aisladas de enfermedades infecciosas de los cerdos (pulmón, ganglios linfáticos y diarreas), cabe señalar que estas bacterias no solo afectan a los animales también afectan al ser humano.

Para un nuevo antimicrobiano, se evalúa en primer lugar la actividad *in vitro* como antimicrobiano en cepas patógenas y después si los resultados son favorables se procede a una evaluación *in vivo*.<sup>27</sup>

El bajo resultado que se obtuvo en los métodos de sensidisco y del cilindro en placa se debe a la solubilidad que presentan los cuatro compuestos, ya que no son solubles en agua y en cada uno de los métodos antes mencionados se utilizan placas de agar a base de agua, por lo que no existe una adecuada difusión de los compuestos a través del agar, puesto que el principio del método de sensidisco dice que una vez depositado el disco en la superficie del agar, este absorbe agua y el antibiótico difunde a través del agar formándose un gradiente de concentración, trascurridas 18 a 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados de una zona de inhibición.<sup>51</sup>

Por lo tanto los compuestos insolubles en agua no presentaran una difusión adecuada. Caso igual se presenta en el método de cilindro en placa, ya que aunque se utilizan cilindros de metal colocados en la superficie del agar y llenos de la solución del compuesto probado, este es insoluble en agua y no difundirá o lo hará muy pobremente a través del agar.

Mas sin embargo en el método de macrodilución en caldo no observamos este fenómeno puesto que el medio de cultivo es un líquido y la solución de los compuestos estudiados se prepara con el disolvente en el cual los compuestos son solubles, (dimetilsulfóxido con unas gotas de etanol), del mismo modo el dimetilsulfóxido es miscible en agua, por lo tanto un medio líquido quizás sea mas conveniente para determinar la actividad antimicrobiana de un compuesto insoluble en agua.





Se sugiere utilizar métodos diferentes de susceptibilidad a los antimicrobianos para evaluar nuevos compuestos *in vitro* y para poderse dar cuenta de la actividad y características de difusión de los compuestos a ensayar, poder observar otros tipos de características.<sup>48</sup>

Estos métodos han ido evolucionando desde que por primera vez se describió el método de sensidisco por Kirby, Bauer y colaboradores en 1966, diversos grupos (BSAC, CA-SFM, DIN, NWGA, NCCLS, SEIMC, SRGA) en el mundo han descrito los métodos mas utilizados, difiriendo tan solo en pocos puntos como el medio utilizado mas algunos otros factores que influyen en el método utilizado.<sup>27,42</sup>

La determinación de la concentración mínima inhibitoria se realiza de acuerdo a los métodos descritos que dicen que esta es la concentración mas débil capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 a 24 horas de incubación,<sup>2 y</sup> para los compuestos estudiados son de 32 µg/ml para el compuesto DHP-01A para *Bacillus spp.* 64 µg/ml para, DHP-02IR y DHP-04BIR para *Bacillus sp.*; DHP-03A y DHP-04BIR para *Staphylococcus aureus* cowan 1; todos los compuestos para *Salmonella typhi* y para *Escherichia coli*; DHP-04BIR para *Pasteurella multocida* serógrupo A; DHP-01A, DHP-03A y DHP-04BIR para *Pasteurella multocida* serógrupo D. 128 µg/ml para DHP-01A, DHP-02IR y DHP-03A *Pasteurella multocida* serótipo A y DHP-02IR para *Pasteurella multocida* serógrupo D. 256 µg/ml para DHP-01A y DHP-02IR para *Staphylococcus aureus* cowan 1. El compuesto DHP-03A no muestra inhibición del crecimiento bacteriano para *Bacillus spp.*

El método de macrodilución en caldo tiene algunas ventajas, en primer lugar el medio es líquido, pero la densidad del inóculo es muy importante debido a que si el inóculo es demasiado denso las bacterias empezaran a reproducirse y el valor de la concentración mínima inhibitoria aumentará, otros factores son igual de importantes en la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos como son la cantidad del inóculo, la profundidad del agar en los métodos de difusión, el pH del medio utilizado (un pH ácido hace perder la potencia a los aminoglucósidos y aumenta la actividad de las penicilinas, un pH alcalino ocasiona los efectos opuestos), la composición del medio (si contiene altos niveles de timidina se dará falsa resistencia a las sulfas y al trimetoprim), el contenido de cationes (una variación de estos afecta a los halos de inhibición de aminoglucósidos y tetraciclinas, un excesivo contenido produce halos de falsa resistencia y un bajo contenido de ellos produce falsa susceptibilidad).<sup>13</sup>

La precisión del método de macrodilución en caldo es de más o menos, una o dos concentraciones, las ventajas de este método incluyen que se puede obtener un resultado cuantitativo. La principal desventaja es que es un método tedioso por la cantidad de material que se utiliza, el espacio requerido para cada prueba y la posibilidad de errores en la preparación de las concentraciones del antibiótico.<sup>30</sup> Gracias a este método es que podemos obtener las MICs de los compuestos que se ensayaron, así podemos ver que el compuesto mas efectivo, el que inhibió el crecimiento de casi todas las cepas bacterianas es DHP-04BIR, ya que su concentración fue de 64 µg/ml para la MIC en todas las cepas bacterianas.





En el método de cilindro en placa no observamos la presencia de halos de inhibición, pero esto se debe posiblemente a que el compuesto no es soluble en agua y no hay una adecuada difusión de los compuestos en el agar, caso contrario al método de sensidisco que presenta para *Bacillus pp.* y *Staphylococcus aureus* cowan 1, halos de 7 mm de diámetro tan solo 1 mm mas que el diámetro del disco, para *Salmonella typhi* observamos que los diámetros van de 7 a 8 mm lo que corresponde a 1-2 mm mas del diámetro del disco y para las demás cepas bacterianas solo observamos diámetros de 6 a 7 mm, lo que correspondería a 1 mm del halo de inhibición, de esta forma podemos apreciar que la inhibición como ya habíamos mencionado es muy pequeña y tal vez se deba las propiedades de solubilidad que presentan los cuatro compuestos, lo que no permite una adecuada difusión a través del agar.

El método de disco difusión o sensidisco es un método estandarizado y reproducible, es una prueba simple que no requiere de equipo especial, provee categorías de resultados fácilmente interpretables por la mayoría de los profesionales de la salud en las clínicas, es el mas flexible de las pruebas disponibles. De igual modo es el más barato de todos los métodos de susceptibilidad. Las desventajas del método del sensidisco son el hecho de que no es mecanizado o automatizado y que microorganismos fastidiosos pueden no ser adecuadamente probados por este método. De cualquier modo el método del disco difusión puede ser modificado para probar algunas bacterias fastidiosas.<sup>30</sup>

Una característica que es posible que influya en los resultados, es el hecho de que los compuestos no se encuentren enteramente puros, lo que ocasionaría que presentaran baja potencia y no se alcanzara una adecuada concentración para inhibir el crecimiento bacteriano.

En las gráficas que acompañan al método de macrodilución en caldo podemos observar que la mayoría de estas se comportan como curvas sigmoideas que corresponderían al tipo de gráficas del crecimiento bacteriano mientras que unas pocas siguen un comportamiento uniforme, en la mayoría observamos que a concentraciones de 256  $\mu\text{g/ml}$  la absorbancia disminuye a casi la mitad de la que corresponde a la absorbancia del tubo control siendo esta en el mayor de los casos del mas del doble, con esto confirmamos el hecho de que la absorbancia corresponde a la presencia de las bacterias que son las que dan la densidad óptica en las lecturas, siendo menor donde se encuentra la mínima cantidad de bacterias que han sido inhibidas por el compuesto ensayado, dicho de otro modo la densidad óptica (absorbancia) es menor donde la concentración del compuesto es mayor) en el método de macrodilución en caldo y mayor donde el compuesto presenta menor concentración ya que permite el libre crecimiento de las bacterias; mas sin embargo el hecho de que no se observe a simple vista crecimiento bacteriano no significa que no estén presentes las células bacterianas como podemos observar en el crecimiento de las unidades formadoras de colonia al realizar el recuento de las mismas en los tubos que no presentaron crecimiento visible alguno, esto se debe a que los antibióticos pueden ser bactericidas -esto es que el antibiótico pueda en realidad matar las bacterias inhibiendo por completo el crecimiento bacteriano-, o que se trate de antibióticos que sean bacteriostáticos o sea que, solo inhiban reversiblemente el crecimiento de las bacterias y que no las maten y recuperen el crecimiento una vez que el antibiótico ha sido retirado.





No se utilizó ningún antibiótico de referencia debido a que no se encontró una molécula con actividad antimicrobiana parecida a los compuestos que se utilizaron.<sup>39</sup>

Por tal motivo se recomienda que se investigue más acerca de estos compuestos como posibles antimicrobianos, pues es posible que no solo presenten actividad biológica contra las bacterias, sino que lleguen a presentar actividad contra hongos, o tal vez contra virus.

De igual forma se sugiere que se investigue sobre su actividad *in vivo*, para de esta forma poder determinar si presenta toxicidad a nivel orgánico o a nivel celular, sus mecanismos de biotransformación, biodisponibilidad, en general su farmacocinética y su farmacodinamia.

El hecho de que la familia a la que pertenecen los compuestos probados (dihidropiridinas) presenten actividad contra la hipertensión arterial, como vasodilatador cerebral y contra la angina de pecho, no quiere decir que estos presenten las mismas características puesto que estos compuestos presentan grupos funcionales como el grupo nitro, el cloro, etc., y los compuestos probados presentan el grupo aldehído (-CHO) y como se mencionó antes un cambio en los grupos funcionales cambian las propiedades biológicas de algunas moléculas.

El uso indiscriminado de los antibióticos en veterinaria trae como consecuencia que se produzcan bacterias resistentes a los antimicrobianos, por lo tanto surge la necesidad de que se investiguen nuevos compuestos con posible actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas que afectan a los animales.<sup>1</sup> La interacción que existe entre los animales y los humanos, y viceversa, se propicia la transferencia de factores de resistencia lo que da como resultado un difícil control de las enfermedades que padecen los animales como los humanos, esto sin olvidar el uso masivo e indiscriminado de los antibióticos lo que favorece como resultado la resistencia a los antimicrobianos.<sup>48</sup>





## 8. CONCLUSIONES.

Los compuestos DHP-01A, DHP-02IR, DHP-03A, y DHP-04BIR, mostraron inhibición del crecimiento con las cepas bacterianas utilizadas únicamente por el método de macrodilución en caldo.

El método del cilindro en placa no mostró inhibición del crecimiento con las cepas bacterianas utilizadas para los cuatro compuestos.

El compuesto más efectivo y que presentó mejor inhibición es el DHP-04BIR y las bacterias que se inhibieron mejor fueron *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. Seguimiento del compuesto DHP-03A, DHP-01A y DHP-04BIR.

Ninguna referencia bibliográfica a la fecha ha indicado que las dihidropiridinas muestren actividad antimicrobiana

Es necesario continuar con los estudios pertinentes para la determinación de la actividad antimicrobiana de los compuestos estudiados y se tengan resultados de estos métodos con otro tipo de cepas y con otros microorganismos como lo serian los virus y los hongos patógenos.





## 9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aguilera Fuentes (J.L.), Ciprian Carrasco (A), Cruz Sánchez (T), Lara Puente (J.H.), Mendoza Elvira (S.E.), editores. (1996). **Memorias del XXXI congreso nacional de la asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos A. C.** p. 66.
2. Andrews (J.M.) **Determination of minimum inhibitory concentrations.** Journal of antimicrobial chemotherapy. 2001; 48(s.1): 5-16.
3. Andrews (J.M.) for the BSAC working party on susceptibility testing. **BSAC standardized disc susceptibility testing method.** Journal of antimicrobial chemotherapy. 2001; 48(s.1): 43-57.
4. Andrzejewska (M), Yopez-Mulia (I), Tapia (A), Cedillo-Rivera (R), Laudy Agnieszka (E), Starosciak Bohdan (J), Kazimierczuk (Z). **Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of s-substituted 4, 6-dibromo- and 4, 6-dichloro-2-mercaptobenzimidazoles.** European journal of pharmaceutical sciences. 2004; 21(2-3): 323-329.
5. Bhavnani Sujata (M), Ballow (C.H). **New agents for gram-positive bacteria.** Current opinion in microbiology. 2000; 3: 528-534.
6. Bianchi (D.A.), Sutich (e.g.), Kaufman (T.S.) **Synthesis and antibiotic activity of the tricyclic furo [3, 2-cl] isochromen-2-trione unit of the pyranonaphthoquinones.** Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2004; 14: 757-760.
7. Bong Kim (Y), Hae Kim (Y), Young Park (J), Kie Kim (S). **Synthesis and biological activity of new quinoxaline antibiotics of echinomycin analogues.** Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2004; 14: 541-544.
8. Branson (E). **Clinical relevance of minimum inhibitory concentrations (MICs).** Aquaculture. 2001; 196: 289-296.
9. Bremner (J.B.), Coates (J.A.), Keller (P.A.), Pyne (S.G.), Witchard (H.M.), **Synthesis of carbazole-linked cyclic and acyclic peptoids with antibacterial activity.** Tetrahedron. 2003; 59: 8741-8755.
10. Carbajal Barrera (D.J.). **Resistencia bacteriana: producción de  $\beta$ -lactámicas.** Revista clon. 2003; 2: 25-29.
11. Chopra (I), Roberts (M). **Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance.** Microbiology and molecular biology reviews. 2001; 65(2): 232-360.
12. Christofilogiannis (P). **Current inoculation methods in MIC determination.** Aquaculture. 2001; 196: 297-302.
13. Cona T (E). **Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar.** Revista chilena de infectología. 2002; 19(s.2): 77-81.
14. Crespo (M<sup>a</sup>.P.). **Lectura del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina.** Colombia médica. 2002; 33(4): 179-193.
15. Davies (J). **Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes.** Science. 1994; 264: 375-381.
16. Departamento de biología molecular. **Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana.** Salud pública de México. 1994; 36(4): 428-438.
17. Du Toit (E.A.), Rautenbach (M). **A sensitive standardized micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity.** Journal of microbiological methods. 2000; 42: 159-165.
18. EUCAST definitive document e. def. 1.2 may 2000. **Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents.** Clin. Microbiol. Infect. 2000; 6(9): 503-508.







19. EUCAST definitive document e. def. 3.1 June 2000. **Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs).** Clin. Microbiol. Infect. 2000; 6(9): 509-515.
20. EUCAST definitive document e. def. 2.1 august 2000. **Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints.** Clin. Microbiol. Infect. 2000; 6(10): 570-572.
21. Felmingham (D), Brown (D.F.J.) **Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing.** Journal of antimicrobial chemotherapy. 2001; 48(s1): 81-85.
22. Fernández Andréu (C.M), González Miranda (M), Illnait Zaragoza (M.T.), Martínez Machin (G). **Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina b en levaduras de interés médico.** Revista cubana de medicina tropical. 1998; 50(1): 48-53.
23. Flores Castellanos (E.P.). **Efecto sinérgico entre antibióticos comúnmente utilizados en el control y tratamiento de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP)**. (1997). Tesis de maestría en microbiología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, campo 1.
24. Girmenia (C), Pizzarelli (G), D'Antonio (D), Critini (F), Martino (P). **In vitro susceptibility testing of Geotrichum capitatum: comparison of the e-test, disk diffusion, and sensititre colorimetric methods with the NCCLS m-27-a2 broth microdilution reference method.** Antimicrobial methods and chemotherapy. 2003; 47(12): 3985-3988.
25. Gould (I.M.). **A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance.** Journal of antimicrobial chemotherapy. 1999; 43: 549-465.
26. Goodman & Gilman. **Las bases farmacológicas de la terapéutica.** (1996). 9ª. Edición. Vol. II. McGraw-Hill interamericana. México. p. 864-865.
27. Hernández Morales (O.E.). **"Determinación de la concentración mínima inhibitoria de tres quinolonas para Actinobacillus pleuropneumoniae (serotipo 1, 3, 5 y 7).** Tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. México. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, campo 1.
28. Instituto nacional de salud. (2002). **Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.** Ministerio de salud del Perú. Instituto nacional de salud. Lima, Perú. p. 13-20, 60-64.
29. Joklik Wolfgang (K), Willett (H.P.), Amos D. (B), Wilfert (C.M.). (1998). **Zinsser microbiología.** 20ª edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 220-258.
30. Jorgensen (J.H.), Ferrero (M.J.). **Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices.** Clinical infectious diseases. 1998; 26: 073-980.
31. Ahlmeier (G), J. Brown (D.F.), Goldstein (F.W.), Macgowan Alasdair (P), Mounton (J.W.), Österlund (a), Rodloff (A), Steinbakk (M), Urbaskova (P), Vatopoulos Alkiviadis. **European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria.** Journal of antimicrobial chemotherapy. 2003; 52: 145-148.
32. King (A), J. Brown (D.F.). **Quality assurance of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion.** Journal of antimicrobial chemotherapy. 2001; 48(s1): 71-76.
33. Kehrenberg (C), Thu Tham (N.T.), Schwarz (S). **New plasmid-borne antibiotic resistance gene cluster in Pasteurella multocida.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003; 47(9): 2978-2980.
34. Kehrenberg (C.), Werckenthin Christiane., Schwarz (S). **tn5706, a transposon-like element from Pasteurella multocida mediating tetracycline resistance.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 1998; 42(8): 2116-2118.
35. Koneman (E.W.), Allen (S.D.), Janda (W.M.), Schreckenberger (P.C.), Winn Washington (C), (2003). **Diagnostico microbiológico: texto y atlas color.** 5ª edición. editorial médica panamericana. Buenos Aires Argentina, p. 1281-1283, 1286-1287. 1334-1335.
36. **La resistencia a antimicrobianos en las americas.** Revista medica dominicana. 2000; 61(1): 78-80.





37. Livermore (D.M.), Win Stanley (T.G.), Shannon (K.P). **Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes.** Journal of antimicrobial chemotherapy. 2001; 48(s1): 87-102.
38. Lennette (E.H). (1993). **Manual de microbiología clínica.** 4ª edición. editorial médica panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 1190-1199, 1200-1204, 1209, 1213-1223, 1239-1248, 1263-1264.
39. Liu (H), Du (y), Yang (J), Zhu (H). **Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betaine derivative complex.** Carbohydrate polymers. 2004; 55(3): 291-297.
40. MacFaddin (J.F.). (2003). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** 3ª edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires, Argentina.
41. Malgor (L.A.), Valsecia (M.E.). **Farmacología médica.** vol. 3. Facultad de medicina. Universidad nacional del nordeste. Republica de Argentina. p. 1-4. <http://www.biologia.edu.ar/farmacologia/index.htm>
42. McGowan (A.P.), Wise (R). **Establishing MIC breakpoints and the interpretation of in vitro susceptibility tests.** Journal of antimicrobial chemotherapy. 2001; 48(s.1): 17-28.
43. McAtee (J.J.), Castle (S.L.), Jin (Q), Boger (D.L.). **Synthesis and evaluation of vancomycin and vancomycin aglycon analogues that bear modifications in the residue 3 asparagine.** Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2002; 12: 1319-1322.
44. Monroe (S), Polk (R). **Antimicrobial use and bacterial resistance.** Current opinion in microbiology. 2000; 3: 496-501.
45. Moredo (F.A.), Landoni (M.F.), Perfumo (C.J.), **Concentración mínima inhibitoria de timilcosina y eritromicina frente a cepas de actinobacillus pleuropneumoniae aisladas en la república argentina.** Analecta veterinaria. 2001; 21(2): 6-11.
46. Murray (P.R.), Rosenthal (K.S.), Kobayashi (G.S.), Pfaller (M.A.). (2002). **Microbiología medica.** 4ta edición. mosby. Elsevier imprint. España. P.182-190.
47. Nomiya (K), Yoshizawa (A), Tsukagoshi (K), Chikaraishi Kasuga (N), Hirakawa (S), Watanabe (J). **Synthesis and structural characterization of silver (I), aluminum (III), and cobalt (II) complexes with 4-isopropyltropolone (hinokitiol) showing noteworthy biological activities. Action of silver (I)-oxygen bonding complexes on the antimicrobial activities.** Journal of inorganic biochemistry. 2004; 98: 46-60.
48. Oliva Martínez (D). **"Evaluación de un compuesto como posible antimicrobiano obtenido por síntesis orgánica".** (2003). Tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. México. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, campo 1.
49. Pharmacopeial convention inc. **USP 24, NF 19, the United States pharmacopeia. The national formulary.** Official from January 1, 2000. National publishing. Philadelphia, pa. p. 1823-1829.
50. Phuong (T), Khac-Minh (T), Van Ha (N.T.), Ngoc Phuong (h.T). **Synthesis and antifungal activities of phenylenedithiouras.** Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2004; 14: 653-656.
51. Picazo (J.J.) editor. **Procedimientos en microbiología clínica: métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos 2000.** Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Online: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap11.htm>
52. Picazo (J.J.) editor. **Procedimientos en microbiología clínica: métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.** Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Online: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap12.htm>
53. Putman (M), van Veen (H.W.), Konings (W.N.). **Molecular properties of bacterial multidrug transporters.** Microbiology and molecular biology reviews. 2000; 64(4): 672-693.
54. Roberts (M.C.). **Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamides-streptogramin resistance in anaerobes.** Anaerobe. 2003; 9: 63-69.





55. Spratt (B.G.). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science. 1994; 264: 388-393.
56. Triantafilo V. (V). Evaluación e indicación de las técnicas de difusión-dilución (epsilometría). Revista chilena de infectología. 2002; 19(s.2): 85-87.
57. Valardo (P.E.). Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2002; 50: 1-4.
58. Wagner (B.A.), Salman (M.D.), Dargatz (D.A.), Morley (P.S.), Wittum (T.E.), Keefe (T.J.), Factor analysis of minimum-inhibitory concentrations for Escherichia coli isolated from feedlot cattle to model relationships among antimicrobial-resistance outcomes. Preventive veterinary medicine. 2003; 57: 127-139.
59. Walsh (C). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. 2000; 406: 775-781.
60. Wexlwe (H.M.), Molitores (E). Susceptibility testing of anaerobes: old problems, new options? Clinical infectious diseases. 1997; 25(suppl 2): s275-s278.
61. Wheat (P.F.). History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2001; 48(s.1): 1-4.
62. World health organization. Enfermedades emergentes y otras transmitibles: resistencia a los antimicrobianos. 51ª asamblea mundial de la salud. A51/9. 10 de marzo de 1998.
63. World health organization. Boletín de medicamentos esenciales. 2000. Nº 28 y 29. p. 10.
64. Yates (R.R.) New intervention strategies for reducing antibiotic resistance. CHEST. 1999; 115(3) supl: 24s-27s.

