



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y

Staphylococcus aureus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

LUISA PAOLA SANDÍN MERCADO

ASESORES:

DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS

DR. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MÉXICO

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos la: Tesis

Estudio de la actividad biológica de diarilsulfonas sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Que presenta la pasante: Luisa Paola Sandín Mercado

Con número de cuenta: 303038711 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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 ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de abril de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q. Ciro Ismael Salas Butrón</u>	
VOCAL	<u>Dr. Andrés Romero Rojas</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Alberto Ramírez Murcia</u>	
1er. SUPLENTE	<u>QFB. Leticia Cubillo Carrillo</u>	
2do. SUPLENTE	<u>QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez</u>	

NOTA: los suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/pm

No te rindas, por favor no cedas.
Aunque el frío quemé, aunque el
miedo muerda, aunque el sol se
esconda y se calle el viento, aún
hay fuego en tu alma, aún hay vida
en tus sueños.

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Gracias por darme la vida y permitirme llegar hasta este momento. Por todas las bendiciones recibidas, por darme fuerzas para seguir adelante y ser siempre la luz que guía mi camino.

A mi mamá Estela Sandín por ser el pilar de mi vida y por estar conmigo en todo momento. Por esas noches de desvelo junto a mí, tus esfuerzos y sacrificios para que pudiera terminar mi carrera. Gracias por tus consejos con los que has logrado infundirme valores y coraje para salir adelante, pero sobre todo por tu amor incondicional. Para ti este trabajo con amor, admiración y respeto. Mi triunfo es tuyo.

A mi abuelita Josefina (†). Por tus sabios consejos y la confianza que siempre tuviste en mí. Por los ánimos que me diste impulsándome a salir adelante. Donde quiera que estés, para ti este trabajo con todo mi cariño.

A mi familia. Para ustedes que siempre han estado conmigo desde niña. De quienes sólo he recibido comprensión y apoyo incondicionales. Este trabajo es el fruto de todos estos años de estar a mi lado. Para ustedes con cariño.

A cada una de las personas que Dios ha puesto en mi camino, que me han dado su afecto, amistad y apoyo incondicionales. No hay palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Para ustedes este trabajo. Dios los bendiga.

A la UNAM

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma mater desde mis inicios como preparatoriana y ahora en la licenciatura. Gracias por darme la oportunidad de forjarme en sus aulas. Es un honor y orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios. “Por mi raza hablará el espíritu”.

A la FES-C

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme cursar una carrera y darme las armas necesarias para mi desempeño profesional, lo que representa el compromiso de poner en alto su nombre y prestigio.

A mis asesores.

A los doctores Enrique Angeles y Andrés Romero, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Gracias por compartir conmigo sus conocimientos, sus consejos y sobre todo por la confianza que depositaron en mí. Sin su valioso apoyo este trabajo no se habría llevado a cabo. Gracias por todo.

A mis amigos Raúl, Jake, Armando y Laura, por estar conmigo en las buenas y en las malas durante toda la carrera. Gracias chicos.

A todos los del LQM. Mención especial para Gaby, Edgar y Moni, gracias por compartir conmigo sus conocimientos y las valiosas aportaciones que hicieron para este trabajo.

El presente trabajo se realizó en el los laboratorios de Química Medicinal y Biología Molecular en el edificio de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, bajo la dirección de los doctores Enrique Angeles Anguiano y Andrés Romero Rojas.



INDICE GENERAL

Contenido

I. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iv
II. ABREVIATURAS	vii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. GENERALIDADES	5
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
3.1.1 Morfología	5
3.1.2 Propiedades bioquímicas.....	6
3.1.3 Patogenia de la infección	7
3.1.4 Epidemiología	8
3.1.5 Diagnóstico	9
3.1.6 Tratamiento	9
3.2 <i>Escherichia coli</i>	10
3.2.1 Morfología	10
3.2.2 Propiedades bioquímicas.....	11
3.2.3 Patogenia de la infección	11
3.2.5 Epidemiología	13
3.2.4 Diagnóstico	14
3.2.6 Tratamiento	14
4. ANTIMICROBIANOS	15
4.1 Tipos de agentes antimicrobianos	15
4.2 Métodos para determinar la actividad antimicrobiana	16
4.2.1 Difusión en agar	17
4.2.2 Dilución en agar	17
4.2.3 Dilución en caldo	17
4.2.4 Epsilon test	18



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

4.2.5 Métodos automatizados.....	18
5. DIARILSULFONAS	19
5.1 Mecanismo de acción.....	19
5.2 Farmacocinética	20
5.3 Reacciones adversas.....	20
5.4 Interacciones	21
5.5 Determinación del PASS (Prediction Activity Substance Spectral)	23
6. JUSTIFICACIÓN	25
7. HIPÓTESIS.....	26
8. OBJETIVOS	27
8.1 Objetivo general.....	27
8.2 Objetivos particulares	27
9. MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	28
9.1 Material.....	28
9.2 Equipo	28
9.3 Reactivos.....	28
9.4 Derivados de Diarilsulfonas.....	29
9.5 Metodología	29
9.5.1 Síntesis de los compuestos LQM 801, LQM 802 y LQM 935A	31
9.5.2 Caracterización.....	35
9.6 Cepas.....	35
9.7 Pruebas de solubilidad	36
9.8 Nefelómetro de Mc Farland	36
9.9 Preparación de las diluciones.....	36
9.10 Preparación de las placas	38
9.11 Inoculación de las cepas.....	39
9.12 Preparación de un control	39
9.13 Interpretación	39
10. RESULTADOS.....	40



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

10.1 Síntesis de los compuestos LQM 802 y LQM 935A	40
10.2 Caracterización espectroscópica	40
10.2.1 Espectroscopía de infrarrojo (IR).....	40
10.2.2 Espectroscopía de masas (EM)	40
10.3 Análisis espectroscópico.....	41
10.4 Pruebas de identificación	42
10.5 Determinación de la MIC.....	43
11. DISCUSIÓN	50
11.1 Síntesis de los compuestos	50
11. 2 Determinación de la MIC.....	51
12. CONCLUSIONES	54
13. PERSPECTIVAS	55
14. ANEXO.....	56
ESPECTROS DE IR Y MASAS	56



I. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Familia <i>Micrococcaceae</i> (caracteres diferenciales).....	5
Tabla 2. Identificación bioquímica de <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Tabla 3. Principales factores de patogenicidad de <i>S. aureus</i>	7
Tabla 4. Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	11
Tabla 5. Factores de virulencia especializados que se asocian a <i>E. coli</i>	12
Tabla 6. Serotipos de <i>E. coli</i>	13
Tabla 7. Clasificación y tipos de antimicrobianos.....	16
Tabla 8. Ejemplos de sulfonas con actividad biológica.....	22
Tabla 9. PASS de los compuestos LQM 801, LQM 802 y LQM 935A.....	24
Tabla 10. Claves de identificación y estructura de las diarilsulfonas.....	30
Tabla 11. Solubilidad de diarilsulfonas.....	35
Tabla 12. Preparación de diluciones (método de dilución en agar).....	36
Tabla 13. Preparación de las diluciones (método de vertido en placa).....	36
Tabla 14. Puntos de fusión y rendimientos de los compuestos LQM 802 y LQM 935 ^a	38
Tabla 15. Carbonos de la estructura del LQM 935A.....	39
Tabla 16. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de <i>S. aureus</i>	40
Tabla 17. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de <i>E. coli</i>	40
Tabla 18. Resultados de la MIC del compuesto LQM 801 frente a <i>S. aureus</i>	41
Tabla 19. Resultados de la MIC del compuesto LQM 801 frente a <i>E. coli</i>	42
Tabla 20. Resultados de la MIC del compuesto LQM 802 frente a <i>S. aureus</i>	43
Tabla 21. Resultados de la MIC del compuesto LQM 802 frente a <i>E. coli</i>	44



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

Tabla 22. Resultados de la MIC del compuesto LQM 935A frente a <i>S. aureus</i>	45
Tabla 23. Resultados de la MIC del compuesto LQM 935A frente a <i>E. coli</i>	46
Figura 1. Tinción de Gram de <i>S. aureus</i>	6
Figura 2. Colonias de <i>S. aureus</i> en agar sangre.....	6
Figura 3. Esquema de <i>Escherichia coli</i>	10
Figura 4. Tinción de Gram de <i>E. coli</i>	10
Figura 5. Estructura antigénica de las enterobacterias.....	12
Figura 6. Ejemplos de antimicrobianos y sitio de acción en la célula procariota.....	15
Figura 7. Efectos de las sulfonas sobre la síntesis del ácido tetrahidrofólico.....	20
Figura 8. Síntesis del p-toluensulfonato de sodio.....	31
Figura 9. Diagrama de flujo para la síntesis del p-toluensulfonato de sodio.....	31
Figura 10. Síntesis de la 4-metilfenil-4-nitrofenilsulfona (LQM 801).....	32
Figura 11. Diagrama de flujo para la síntesis del LQM 801.....	32
Figura 12. Síntesis de la 4-[(4-metilfenil)sulfonil]anilina (LQM 802).....	33
Figura 13. Diagrama de flujo para la síntesis del LQM 802.....	34
Figura 14. Síntesis del {4-[(4-metilfenil)sulfonil]fenil} carbamato de etilo (LQM 935A)....	34
Figura 15. Diagrama de flujo para la síntesis del LQM 935A.....	35
Figura 16. Resultados del IMVIC realizado a las cepas de <i>E. coli</i>	43
Figura 17. Ejemplos de placas donde se muestra el crecimiento de <i>S. aureus</i> con el compuesto LQM 801.....	44
Figura 18. Ejemplos de las placas donde se observa crecimiento de <i>E. coli</i> con el compuesto LQM 801.....	45
Figura 19. Ejemplos de placas donde se observa la inhibición de <i>S. aureus</i> con el compuesto LQM 802.....	46



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

Figura 20. Ejemplos de placas donde se observa crecimiento e inhibición de *E. coli* con el compuesto LQM 802..... 47

Figura 21. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *S. aureus* con el compuesto LQM 935A..... 48

Figura 22. Ejemplos de las placas donde se observa el crecimiento de *E. coli* con el compuesto LQM 935A..... 49

Figura 23. Fotografía de la placa que se usó como referencia para la lectura de resultados..... 49



II. ABREVIATURAS

- Ac/ac	ácido/ácido
- Acet	acetona
- AcOEt	acetato de etilo
- ARG	arginina
- BHI	agar infusión cerebro-corazón
- CIT	citrato
- CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
- CO ₂	dióxido de carbono
- DMSO	dimetilsulfóxido
- <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
- EM	Espectroscopía de masas
- H ₂ O	agua
- H ₂ S	ácido sulfhídrico
- HCl	ácido clorhídrico
- IgG	Inmunoglobulina G
- IMViC	indol, rojo de metilo, VP, citrato
- IND	indol
- IR	infrarrojo
- ITU	infecciones de tracto urinario
- KIA	agar hierro kigler
- LIS	lisina
- M.o	microorganismo
- MH	agar Müeller-Hinton
- MRSA	<i>S. aureus</i> resistentes a meticilina
- MOV	movilidad
- MR	rojo de metilo
- NaOH	hidróxido de sodio
- NF	Nefelómetro de Mc Farland
- OMS	Organización Mundial de la Salud
- ONPG	o-nitrofenil-β _D -galactopiranosido
- ORN	ornitina
- Pa	probabilidad de ser activo
- PAD	fenilalanina desaminasa
- PASS	Prediction Activity Substance Spectral
- PMN	polimorfonucleares
- SS	Secretaría de Salud
- <i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
- SnCl ₂	cloruro de estaño II
- SSF	solución salina fisiológica
- URE	ureasa
- VP	Vogues Proskauer



1. RESUMEN

El presente trabajo tiene por objeto mostrar los resultados obtenidos para la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de las diarilsulfonas empleando cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de aislamientos clínicos mediante el método de dilución en agar, para determinar el grado de resistencia de las mismas frente a los nuevos compuestos, además de presentar los métodos de síntesis y purificación de los mismos y la caracterización del LQM 935A.

Para la síntesis de los compuestos a evaluar, en el caso del LQM 801 se usó la metodología reportada en el trabajo correspondiente (Torres Santiago, 2012). Para el LQM 802, también se tomó de referencia dicha cita, sin embargo, se hicieron cambios en la síntesis debido al bajo rendimiento en la reportada. En el caso del LQM 935A, se reporta el método de síntesis, purificación y la caracterización del compuesto por medio de IR y EM.

Para la experimentación se emplearon muestras de aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* escogiéndose al azar 5 cepas de cada microorganismo, las cuales se purificaron e hicieron pruebas de identificación. Para la determinación de la CMI, se utilizaron dos técnicas: dilución en agar con los compuestos LQM 801 y LQM 935A, y vertido en placa para el LQM 802; en ambos casos empleando agar BHI para propagar las cepas y Müller-Hinton para llevar a cabo las pruebas.

Los resultados arrojan que el compuesto LQM 802 fue el único que presentó actividad antibacteriana, teniendo una CMI de 256 µg/mL para todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y de 256 a 512 µg/mL para *Escherichia coli*.



2. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es un microorganismo de gran importancia médica y uno de los principales agentes patógenos para el humano. *S. aureus* forma parte de la familia *Micrococcaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre. Es un coco gram-positivo, inmóvil. No forma esporas y se encuentra agrupado en forma de racimos. Es un anaerobio facultativo. El microorganismo produce catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un pigmento típico amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas. (Bustos-Martínez, 2006)

S. aureus posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es una de las principales causas de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos además de septicemia.

La bacteria se encuentra generalmente en las fosas nasales y en ocasiones en la piel o en la ropa, y de estos sitios *S. aureus* puede transmitirse a otras regiones del cuerpo. Si la piel o mucosas se rompen por trauma o cirugía, *S. aureus* que es un patógeno oportunista, puede acceder al tejido cercano a la herida provocando daño local o enfermedades de amplio espectro.

En años recientes han reemergido las infecciones por *S. aureus*. Esto se debe en parte a que la bacteria se ha vuelto resistente a los antibióticos con los que normalmente se le combate como los beta-lactámicos, aunado a su diseminación en la población sana. (Kanafani, 2006)

- Resistencia antimicrobiana

En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes como los MRSA.

La introducción de la penicilina a principios de los años 40 como tratamiento en las infecciones causadas por *S. aureus* abatió de manera importante las enfermedades ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, un año después de su utilización ya se tenían cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

Los primeros aislamientos de *S. aureus* multirresistentes fueron detectados en 1957. A principios de los 60's los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles. Actualmente se reporta una resistencia a la penicilina del 80% -93% o más, en cepas de *S. aureus* aisladas de hospitales y de la comunidad.

Debido a la resistencia a la penicilina de las cepas de *S. aureus*, a finales de los años 50 se introdujeron cefalosporinas estables a penicilinasas y penicilinas semisintéticas. Entre éstas estuvo la meticilina, como antibiótico de elección en el tratamiento de *S. aureus*. Este fármaco fue introducida en Europa en 1959 y un año después se detectó la primera cepa *S. aureus* meticilina resistente (“methicillin resistant *S. aureus*”, MRSA). (Kanafani, 2006)(Velázquez-Meza y. c., 2005)

El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (National Nosocomial Infectious Surveillance System, NNIS) de EUA determinó que en pacientes hospitalizados la prevalencia de cepas MRSA se incrementó del 4% en 1980 a 31.9% en 1996. En 2001 se tenía un 55% de prevalencia y para el 2004, llegó al 60.7%. En algunos hospitales se han reportado incidencias hasta del 80%. (Velázquez-Meza y. c., 2005)

En México existe un número limitado de estudios sobre la prevalencia de cepas MRSA. Se estima que ha cambiado del 7% al 30%. En 1993, en el Hospital General de León, Guanajuato, se identificó una resistencia a la meticilina del 24%. Sin embargo, un estudio realizado en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, Siglo XXI-IMSS, se encontró que la frecuencia de cepas MRSA varió del 17% al 23% de 1997 a 2001. En 2002 bajó al 4% y en 2003 se tenía un 0%. Ésta disminución se debió probablemente a la implementación de un comité de control de infecciones en el hospital. (Velázquez-Meza, 2004)

Escherichia coli

Perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* es quizá el procarionta más estudiado por el humano. Es una enterobacteria móvil fermentadora de lactosa y glucosa, con producción de gas y ácidos diversos; su IMViC es (++)-. (Koneman, 2008)

Forman la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo, y se eliminan por las heces. Pueden intervenir en procesos patológicos como patógenos verdaderos en la producción de cuadros intestinales con diarrea o como oportunistas en infecciones extraintestinales diversas, cuando se presentan factores predisponentes: 1) Es una de las causas más frecuentes de infecciones urinarias (cistitis, pielonefritis y bacteriurias asintomáticas); 2) También interviene en infecciones biliares (colecistitis), peritoneales (peritonitis, abscesos abdominales) y meníngeas (meningitis); 3) Produce infecciones de las heridas (abscesos) y mucosas (otitis, sinusitis); 4) Causa procesos generalizados, bacteremias y sepsis. (Pumarola, 1996)



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

La Organización Mundial de la Salud ha considerado la emergencia y diseminación de la resistencia antimicrobiana como un problema prioritario.^(Chan, 2012) Por ello desde septiembre de 2001 se instituyó una medida global para la contención de la resistencia antimicrobiana, que incluye como medida fundamental la vigilancia de la sensibilidad antimicrobiana.

La morbilidad por infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad es alta, y el uropatógeno más frecuente es *Escherichia coli*; el tratamiento inicial de esta enfermedad generalmente es empírico. El aumento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos limita la administración de antibióticos baratos y de espectro limitado, lo que afecta el costo y el acceso a la atención.^(Comejo-Juárez, 2007)

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1920, su disponibilidad para el uso clínico en la década de los 40's y la introducción de las sulfonamidas en los 50's, muchos nuevos antimicrobianos aparecen todos los años para su uso clínico. Mientras que este gran número de antibióticos permiten una gran flexibilidad al médico en el uso de estos fármacos, también exige un mayor conocimiento y experiencia para su uso adecuado.^{(López, 2007)(Ávila Carrillo)}

Por lo anterior, el tratamiento con antibióticos ha jugado un papel muy importante en el manejo de las enfermedades infecciosas en el siglo XXI. Las enfermedades de carácter bacteriano representan un grave problema de salud en todos los países, por ello la necesidad de generar nuevos antibióticos que permitan el control de enfermedades de este tipo y que produzca la menor resistencia de las bacterias frente a estos, y al mismo tiempo, ofrecer alternativas de tratamiento para las personas hipersensibles a los fármacos existentes en el mercado.

En vista de lo anterior, el Laboratorio de Química Medicinal y de Biología Molecular, a cargo de los doctores Enrique Angeles Anguiano y Andrés Romero Rojas respectivamente, se han dado a la tarea de sintetizar y probar nuevos compuestos con miras a ser utilizados como nuevos fármacos y así ofrecer alternativas de tratamiento más efectivos y al menor costo posible.



3. GENERALIDADES

3.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es uno de los gérmenes causantes de infecciones graves. El cultivo de líquidos y secreciones corporales permite el aislamiento de esta especie de importancia clínica humana dentro del género.

S. aureus coagula el plasma descalcificado debido a la producción de la enzima estafilocagulasa, que actúa como un agente activo en la coagulación capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina. Existe una correlación positiva entre la presencia de la enzima y la virulencia de patógeno en humanos. La enzima se encuentra en dos formas:

- Coagulasa libre: proteína extracelular presente en los filtrados de cultivos; reacciona con el factor reactivo de la coagulasa (FRC) presente en el plasma, para formar estafilotrombina, actúa indirectamente en la conversión de fibrinógeno en fibrina.
- Coagulasa ligada: o factor de aglutinación no está presente en filtrado de cultivos. Convierte el fibrinógeno en fibrina insoluble de forma directa.

La función de la coagulasa *in vivo* no ha sido todavía aclarada, aunque está bien esclarecido que esta enzima está implicada en el desarrollo de los abscesos mediante la formación de una capa de fibrina alrededor de la lesión, lo que impide la fagocitosis del patógeno. (Hernández Betancourt, 2010)

Tabla 1. Familia Micrococcaceae (caracteres diferenciales)^(Pumarola, 1996)

Caracteres	<i>G. Staphylococcus</i>	<i>G. Micrococcus</i>
Cocos gram +, catalasa +	+	+
Agrupación en racimo	+	+
Agrupación en tétradas	-	+/-
Crecimiento en anaerobiosis	+	-
Fermentación de la glucosa	+	-

3.1.1 Morfología

Es un coco grampositivo de 0.5-1µm de diámetro, inmóvil, no forma esporas y se encuentra en forma de racimos. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un pigmento típico amarillo dorado debido a la presencia de carotenoides. (Bustos-Martínez, 2006)



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

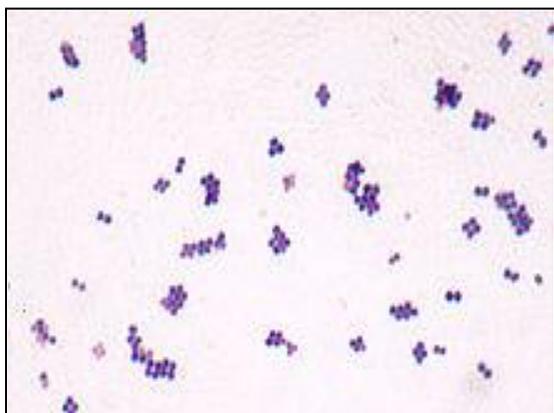


Figura 1. Tinción de Gram de *S. aureus*.



Figura 2. Colonias de *S. aureus* en agar sangre.

3.1.2 Propiedades bioquímicas

Staphylococcus aureus es un coco grampositivo, anaerobio facultativo, de la familia *Micrococcaceae*, género *Staphylococcus*, cuyas principales características bioquímicas se indican en la siguiente tabla:

Tabla 2. Identificación bioquímica de *Staphylococcus aureus*. (Koneman, 2008)(Pumarola, 1996)

Caracteres	<i>S. aureus</i>
Gram	Cocos grampositivos agrupados en racimos
Catalasa	+
Oxidasa	-
Motilidad	-
O/F	OF
Coagulasa	+
Fermentación manitol	+
Ureasa	-
Toxina α	+
ADNasas termoestables	+
Proteína A	+
Sensibilidad a la novobiocina	+



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

3.1.3 Patogenia de la infección

S. aureus es la especie más virulenta de su género y la que mayor número de padecimientos infecciosos ocasiona al humano. Prácticamente no existen tejidos humanos exentos de ser infectados por los estafilococos dorados, en los cuales se han detectado numerosos factores de patogenidad:^(Facultad de Química-UNAM)

Tabla 3. Principales factores de patogenidad de *S. aureus*.

Factor	Efecto biológico
Formación de cápsula	Evitar la fagocitosis por los leucocitos PMN.
Proteína A	Al unirse a la región Fc de la IgG, interfiere en la opsonización y la ingestión de los m.o por los leucocitos PMN, activa al complemento y estimula reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato y retardado. La proteína A es inmunogénica.
Constituyentes de la pared celular	La pared celular de <i>S. aureus</i> contiene péptidoglucanos y ácidos teicóicos que participan en la adherencia específica de las bacterias grampositivas a las superficies mucosas. Los péptidoglucanos y ácidos teicóicos tienen la capacidad de activar el complemento, inhibir la quimiotáxis de las células inflamatorias y de estimular la producción de anticuerpos.
Enzimas:	
- Catalasa:	Inactiva el peróxido de hidrógeno y los radicales libres tóxicos formados dentro de las células fagocíticas después de la ingestión del m.o.
- Coagulasa	Recubre las células bacterianas con fibrina y tornarlas resistentes a la opsonización y la fagocitosis.
- Fibrinolisin	Degradan coágulos de fibrina y permite la diseminación de la infección a los tejidos contiguos.
- Hialuronidasa	Hidroliza la matriz intercelular de mucopolisacáridos en los tejidos.
- Lipasas	Contribuyen a la diseminación
- β -lactamasas	Hay por lo menos 3 tipos. Pueden ser inducibles o constitutivas y hacen que estos m.o sean resistentes a penicilina, ampicilina, eritromicina y tetraciclina.
Hemolisinas	
- Hemolisina α	Tiene efectos letales sobre PMN y lisa eritrocitos. La toxina es dermoncrótica y neurotóxica. Esta toxina es responsable del halo



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

	de eritrocitos hemolisados en agar sangre.
- Hemolisina β	Es una esfingomielinasa que tiene actividad contra una variedad de células.
- τ -hemolisina y δ -hemolisina	Producen lisis celular. La δ -hemolisina actúa como surfactante y es capaz de activar a la adenilatociclasa, lo que resulta en la producción de AMP cíclico (mecanismo de acción similar al de la toxina colérica).
Toxinas	
- Leucocidina	Exotoxina que ejerce un efecto tóxico directo sobre la membrana de los PMN, provocando desgranulación del citoplasma, edema celular y lisis.
- Exfoliatinas o toxinas epidermolíticas.	Consisten en dos proteínas: ET-A y ET-B. Estas proteínas poseen actividad proteolítica y disuelven la matriz mucopolisacárida de la epidermis, lo que da como resultado la separación intraepitelial de las uniones celulares del estrato granuloso.
- Enterotoxinas A a E	Responsables de las características clínicas de la intoxicación alimentaria estafilocócica.

3.1.4 Epidemiología

En años recientes las infecciones por *S. aureus* han reemergido debido a que la bacteria se ha vuelto resistente a los antibióticos con los que normalmente se le combate. (Velázquez-Meza y. c., 2005)

Desde hace muchos años se han reportado brotes epidémicos de *S. aureus* por todo el mundo en lugares como hospitales, centros de atención y clínicas y, en años recientes, en la comunidad. Actualmente se dividen en infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad. (Bustos-Martínez, 2006)(Kanafani, 2006)

S. aureus puede producir una variedad de procesos infecciosos que van desde infecciones cutáneas relativamente benignas hasta enfermedades sistémicas potencialmente fatales. Las infecciones cutáneas incluyen foliculitis simple, impétigo, furúnculos y carbuncos.

Dentro de las enfermedades sistémicas se encuentra la bacteremia, que puede dar origen a endocarditis, osteomielitis, pioartritis, y la formación de abscesos metastáticos, particularmente en piel, tejido subcutáneo, pulmones, hígado, riñones y cerebro. La meningitis estafilocócica aparece en pacientes con anormalidades del sistema nervioso central relacionadas con traumatismos, cirugía, tumores malignos e hidrocefalia. También es un microorganismo asociado



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

con peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria continua. Las toxinas estafilocócicas también son responsables de la necrosis epidérmica tóxica (síndrome estafilocócico de la piel escaldada) y del síndrome del shock tóxico. El síndrome del shock tóxico es una enfermedad multisistémica caracterizada por fiebre, hipotensión, vértigo ortostático, eritrodermia y vómitos, diarrea, insuficiencia renal, cefaleas, escalofríos, faringitis y conjuntivitis. (Koneman, 2008)

Los factores que pueden predisponer a un individuo a infecciones graves por *S. aureus* incluyen los siguientes:

- Defectos quimiotácticos de los leucocitos, sean congénitos (p. ej., síndrome de Down, síndrome de Job) o adquiridos (diabetes mellitus, artritis reumatoide).
- Defectos de la opsonización por anticuerpos (hipogammaglobulinemia).
- Defectos en la destrucción intracelular de las bacterias después de la fagocitosis (enfermedad granulomatosa crónica).
- Lesiones cutáneas (quemaduras, incisiones quirúrgicas, eccema).
- Presencia de cuerpos extraños (suturas, catéteres, prótesis).
- Infecciones por otros agentes, particularmente virus.
- Enfermedades crónicas de base, como tumores malignos, alcoholismo, cardiopatías.
- Administración profiláctica o terapéutica de agentes antimicrobianos. (Koneman, 2008)

3.1.5 Diagnóstico

- Identificación mediante medios de cultivo (agar sales manitol)
- Prueba de coagulasa.
- Aglutinación en látex.
- Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)
- Identificación mediante sistemas microestandarizados (API staph) (Hernández Betancourt, 2010)

3.1.6 Tratamiento

- Aminoglucósidos
- Cefalosporinas
- Oxacilina



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

3.2 *Escherichia coli*

E. coli es la especie bacteriana más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran todos los tejidos humanos y sistemas de órganos. *E. coli* es uno de los organismos comunes involucrados en sepsis gramnegativa y en shock inducido por endotoxinas. En los hospitales de segundo nivel representa un problema de salud importante, pues es causa de morbilidad y mortalidad. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, algunos tipos causan diarrea, infecciones del tracto urinario (ITU), enfermedades respiratorias y otras enfermedades. Las infecciones de las heridas, neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y las meningitis en los neonatos son otras formas comunes de infección causada por *E. coli*.^(Koneman, 2008) (Martínez Herrera, 2008)(Centers for Disease Control and Prevention)

3.2.1 Morfología

Es un bacilo gram-negativo cuyo tamaño varía de 0.5 a 2 μm de ancho y de 2 a 4 μm de largo. Es un microorganismo que se mueve por acción de flagelos que se distribuyen en todo el cuerpo de la bacteria (perítricos).^(Eslava Campos)

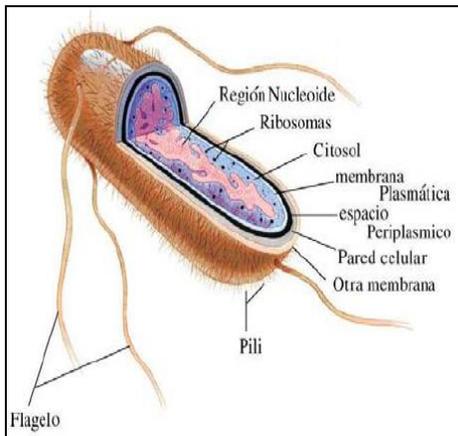


Figura 3. Esquema de *Escherichia coli*.



Figura 4. Tinción de Gram de *E. coli*.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

3.2.2 Propiedades bioquímicas

Integrante de la familia *Enterobacteriaceae* y de la tribu *Escherichiae*, el género *Escherichia* incluye 7 especies de las cuales *E. coli* es la mejor conocida. (Eslava Campos) Es un anaerobio facultativo cuyas principales características bioquímicas se indican en la siguiente tabla:

Tabla 4. Identificación bioquímica de *Escherichia coli*

Prueba bioquímica	Resultado
Oxidasa	-
KIA	ac/ac
CO ₂	+
H ₂ S	-
MR	+
VP	-
IND	+
CIT	-
PAD	-
URE	-
MOV a 36°C	+
LIS	+
ARG	-/+
ORN	+/-
ONPG	+

(+, 90% o más de cepas positivas; -, 90% o más de cepas negativas; +/-, 50%-90% de cepas positivas; -/+, 50%-90% de cepas negativas). (Koneman, 2008) (Baikón Lira, 2003)

3.2.3 Patogenia de la infección

Es debida a la acción de factores de virulencia y toxinas. Además de los factores generales que tienen los miembros de la familia de las enterobacterias, las cepas de *E. coli* responsables de ITU y las gastroenteritis poseen factores de virulencia especializados, como se muestra en la figura 5.



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

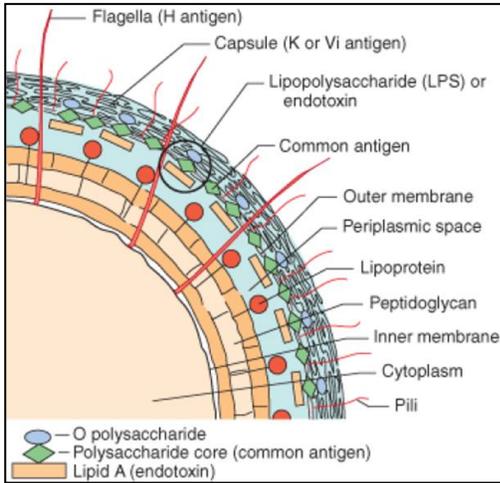


Figura 5. Estructura antigénica de las enterobacterias.

Tabla 5. Factores de virulencia especializados que se asocian a *E. coli*. (Madigan, 2000)(Murray, 2002)

ADHESINAS	TOXINAS
<ul style="list-style-type: none"> - Antígenos de Factor de colonización CFA/I, CFA/II y CFA/III. - Fimbrias de adherencia agregativa AAF/I y AAF/II. - Proteínas formadoras de haces (Bfp). - Intimina - Pili P - Proteína Ipa - Fimbrias Dr 	<ul style="list-style-type: none"> - Toxinas termoestables STa y STb - Toxinas Shiga STX-1 y STX-2 - Hemolisina H1 y HA - Toxinas termolábiles LT-I y LT-II - Citotoxinas - Endotoxinas
INVASINAS	MOTILIDAD Y QUIMIOTAXIS
<ul style="list-style-type: none"> - Hemolisinas - Invasión intracelular por Shigella-like 	<ul style="list-style-type: none"> - Flagelos
ATRIBUCIONES GENÉTICAS	PROPIEDADES DE SUPERFICIE ANTIFAGOCITOSIS
<ul style="list-style-type: none"> - Transmisión de plásmidos - Factor R y plásmidos de resistencia a fármacos - Toxinas y otros plásmidos de virulencia 	<ul style="list-style-type: none"> - Antígeno O (somático, estable al calor) - Antígeno H (flagelar, lábil al calor) - Antígeno K (capsular, polisacárido lábil al calor) - LPS



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

3.2.5 Epidemiología

E. coli está presente en el tracto gastrointestinal, y es causa frecuente de sepsis, meningitis neonatal, ITU y gastroenteritis. Esta última se da por cinco mecanismos diferentes que provocan cinco síndromes clínicos distintos. (Koneman, 2008)

Tabla 6. Serotipos de *E. coli*. (Koneman, 2008)

TERMINO	ABREVIATURA	FENOTIPO PATOGENICO	SIGNOS Y SÍNTOMAS
<i>E. coli</i> enterotoxigena	ETEC	Elaboración de toxinas secretorias (LT, ST) que no dañan el epitelio mucoso.	“Diarrea del viajero”. El síntoma predominante es una diarrea acuosa profusa; acompañada de contracciones abdominales leves. Puede ocurrir deshidratación y vómitos.
<i>E. coli</i> enteropatógena	EPEC	Se adhieren a las células epiteliales en microcolonias localizadas y causan lesiones de adhesión y borrado.	Usualmente ocurre en infantes. Se caracteriza por fiebre de bajo grado, malestar, vómitos y diarrea, con una cantidad prominente de moco pero sin sangre.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	EIEC	Invaden células epiteliales	Disentería; fiebre y colitis. Los síntomas son urgencia y tenesmo; moco con sangre y leucorrea.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	EHEC	Elaboración de citotoxias (SLT).	Diarrea sanguinolenta con leucocitos. A menudo sin fiebre y con dolor abdominal. Puede desarrollar el síndrome urémico hemolítico.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

<i>E. coli</i> enteroagregativa	EaggEC	Se adhieren a las células epiteliales en un patrón similar a pila de ladrillos.	Diarrea acuosa, vómito, deshidratación y con menor frecuencia dolor abdominal.
------------------------------------	--------	---	--

3.2.4 Diagnóstico

- Identificación mediante medios de cultivo (agar Mc Conkey (MC), eosina azul de metileno (EMB), verde brillante (VB), sulfito-bismuto (SB))
- Serología
- Ensayos inmuno-enzimáticos (RIA, ELISA)
- Aglutinación en látex.
- Identificación mediante sistemas microestandarizados (API 20E)

3.2.6 Tratamiento

- Cefalosporinas
- Aminoglucósidos
- Quinolonas
- Nitrofurantoína



4. ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos son sustancias naturales, sintéticas o semisintéticas, que inhiben a concentraciones bajas el crecimiento de bacterias, hongos o virus. El abuso de los mismos ha generado que los microorganismos se adapten y desarrollen mecanismos de resistencia contra los antibióticos.

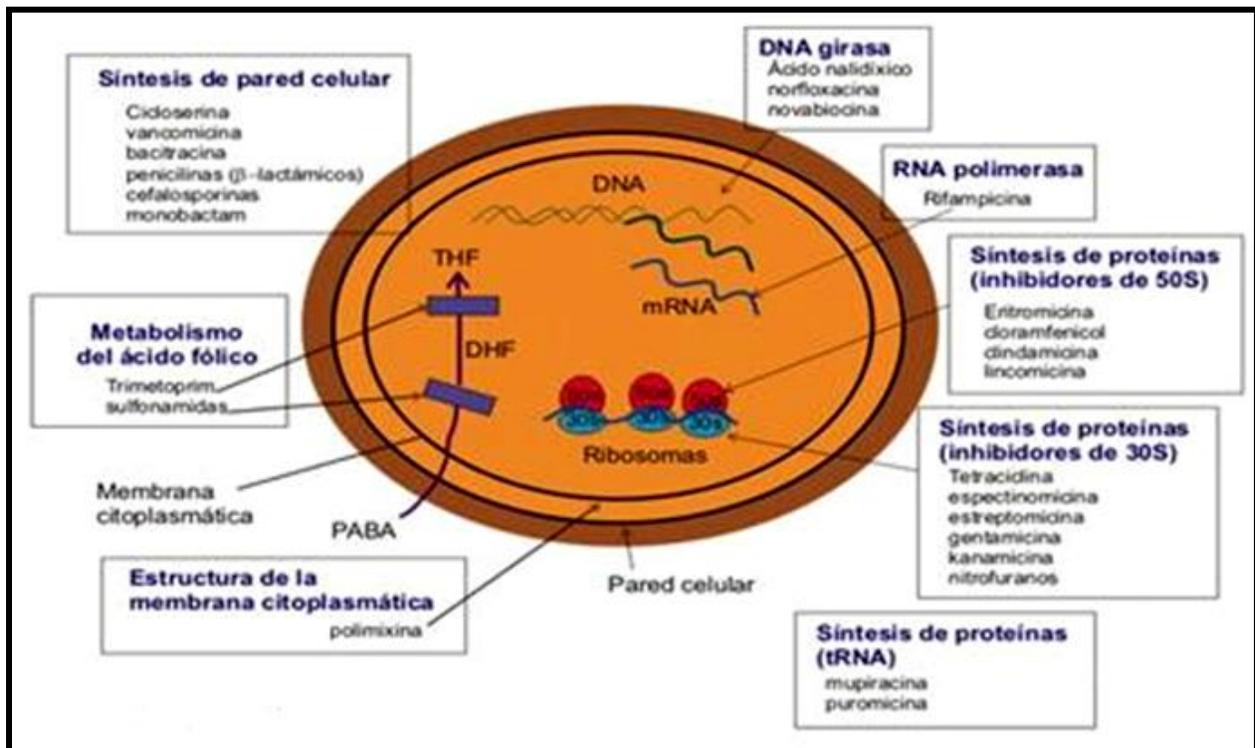


Figura 6. Ejemplos de antimicrobianos y sitio de acción en la célula procariota. (Madigan, 2000)

4.1 Tipos de agentes antimicrobianos

Existen varios métodos de clasificación para los antimicrobianos o también conocidos como antibacterianos, el más usado es el de su estructura molecular. En la siguiente tabla se mencionan los criterios de clasificación:



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

Tabla 7. Clasificación y tipos de antimicrobianos.

ORIGEN	NATURALES: Se obtienen a partir de microorganismos (hongos, bacterias, etc.) SINTÉTICOS: Se obtienen totalmente por síntesis química. SEMISINTÉTICOS: Se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos.
TIPO DE ACCIÓN	BACTERIOSTÁTICOS: La misma 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 hospedero. BACTERICIDA: Su acción es letal sobre los microorganismos.
ESPECTRO DE ACTIVIDAD	AMPLIO: Actúan sobre un gran número de especies microbianas (ejemplo: penicilina). INTERMEDIO: Actúan sobre un número limitado de m.o. (ejemplo: macrólidos). REDUCIDO: Actúan sobre un pequeño número de especies microbianas (ejemplo: polimixina).
MECANISMO DE ACCIÓN	INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR (penicilinas, cefalosporinas, cicloserina) INHIBIDORES DE LA MEMBRANA CELULAR (polimixinas) INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS PROTÉICA (estreptomicina, sulfonamidas, sulfonas) INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE DNA Y RNA (ácido nalidíxico, sulfonamidas, sulfonas, nitrofuranos)

4.2 Métodos para determinar la actividad antimicrobiana

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

La información que proporciona el antibiograma tiene una gran repercusión clínica y epidemiológica ya que, por una parte, condiciona y guía la elección del tratamiento antimicrobiano ante un proceso de naturaleza infecciosa, y por otra puede utilizarse como estrategia para evitar el uso de determinados antimicrobianos de espectro excesivamente amplio en determinados casos o favorecer el uso de otros con un adecuado perfil de actividad e impacto ecológico. Por tanto es una herramienta de gran importancia en las estrategias organizativas de apoyo a la mejor utilización de antibióticos (*antibiotic stewardship*). (Alós, 2010)

4.2.1 Difusión en agar

También conocido como antibiograma disco-placa o método de Kirby-Bauer es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Consiste en depositar, en la superficie de agar MH de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. El disco absorbe agua y el antibiótico difunde al agar radialmente a través del espesor del agar a partir del disco, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir el crecimiento del microorganismo en estudio, El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de susceptible (S), intermedio (I) o resistente (R), de acuerdo a las tablas publicadas en la CLSI. Si las recomendaciones para realizar este método son fielmente seguidas las categorías se correlacionan bien con los resultados de otros métodos, como el de dilución en caldo o dilución en agar. (García Rodríguez)

4.2.2 Dilución en agar

En éste método se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar MH. 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 con asa calibrada una vez que haya solidificado el medio de cultivo de 18-24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Después de la incubación, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la Concentración Mínima Inhibitoria para el antibiótico. (García Rodríguez)

4.2.3 Dilución en caldo

En este caso, tubos (macrodilución) o microplacas con fondo de “U” (microdilución), contienen concentraciones crecientes del antibiótico a evaluar. El microorganismo es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la microplaca y la MIC es determinada después de la



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

incubación, de la misma forma descrita anteriormente para el método de dilución en agar. (García Rodríguez)

4.2.4 Epsilon test

El principio de éste método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test 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. Una vez inoculado la placa de agar MH 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 éste 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. (García Rodríguez)

4.2.5 Métodos automatizados

Existen varios sistemas que ofrecen diferentes niveles de automatización para el estudio de susceptibilidad. Utilizan una medición turbidimétrica o fluorométrica para detectar crecimiento bacteriano en un medio líquido. La mayoría de ellos, emplea el método de microdilución y periodos de incubación menores que los habituales. Estos métodos son bastante confiables para el estudio de enterobacterias y otros gérmenes de crecimiento rápido, pero generalmente no son los adecuados para los de crecimiento lento o con requerimientos especiales. (García Rodríguez)



5. DIARILSULFONAS

Las diarilsulfonas son de gran uso en síntesis orgánica en la industria. Son estructuras comunes, en compuestos utilizados en diferentes campos como la farmacéutica, agroquímicos y la ciencia de polímeros. En particular, su inminente actividad en química medicinal y sus bioactividades únicas han atraído considerable atención hacia su síntesis. (Parvank, 2010)

Son fármacos importantes en el tratamiento de diversas enfermedades como la malaria, leishmaniasis e infecciones en pacientes con padecimientos como lupus eritematoso sistémico. También poseen actividad antibacterial, antifúngica y antitumoral; en años recientes, se ha encontrado actividad antirretroviral. (Mehdi Khodaei, 2010)

5.1 Mecanismo de acción

Se ha detectado que las sulfonas entran en el grupo de antibióticos que inhiben la síntesis de cofactores metabólicos, específicamente, intervienen en la vía del ácido fólico. El ácido fólico deriva del ácido p-aminobenzóico (PABA), del glutamato y de la unidad pteridínica. En su forma reducida es una coenzima esencial para el transporte de los compuestos de un carbono en la síntesis de purinas, de la timidina y de algunos aminoácidos y, por consiguiente e indirectamente, de la síntesis de los ácidos nucleicos y de proteínas. Las sulfonas son análogos estructurales del PABA e interaccionan con la enzima Dihidropteroil sintetasa, a la que inhiben competitivamente. La toxicidad selectiva antibacteriana es debida a que inhiben pasos metabólicos inexistentes en el huésped. (Mallén Ramírez, 2001)



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

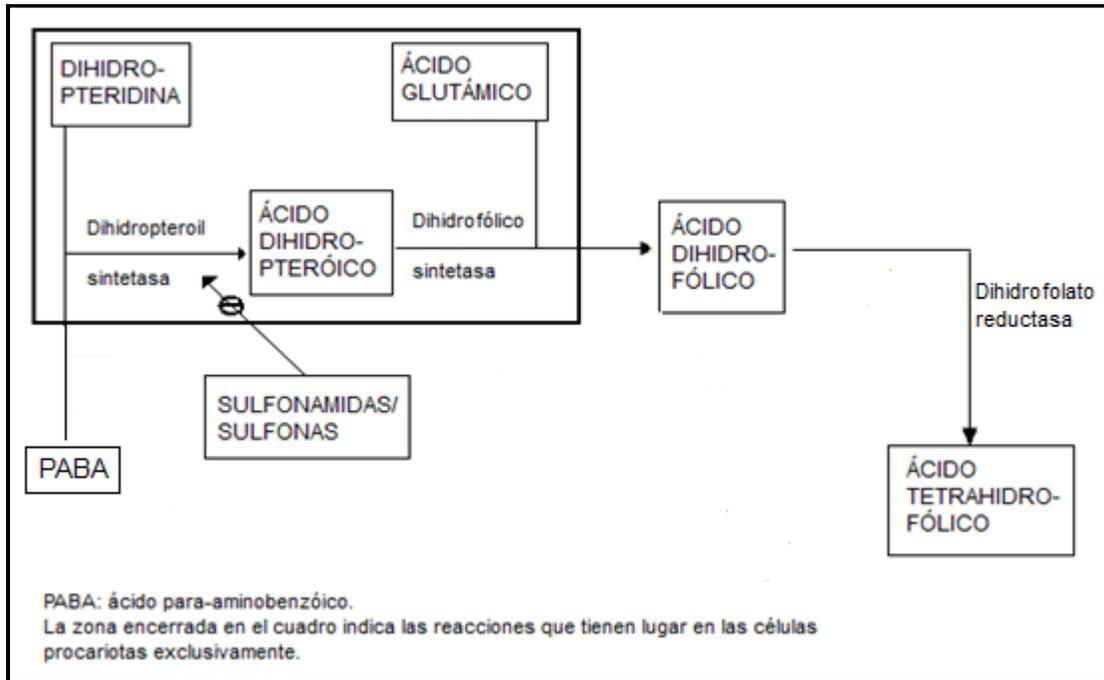


Figura 7. Efectos de las sulfonas sobre la síntesis del ácido tetrahidrofólico

5.2 Farmacocinética

Las sulfonas se absorben de forma rápida y completa, con una biodisponibilidad oral hasta del 93%, logran un pico plasmático entre las 2 y 8 hrs. Su unión a proteínas es del 70% y está presente en casi todos los tejidos (es retenida en piel, músculo, hígado y riñones). Se elimina por bilis pero hace circuito enterohepático, se acetila en hígado y se excreta por orina. Su vida media es de 20 a 30 hrs.

5.3 Reacciones adversas

Hematológicas

- Anemia hemolítica: se da con dosis mayores a 200 mg/día o en pacientes con déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- Metahemoglobinemia.
- Anemia aplásica.

Gastrointestinales

- Anorexia, náuseas y vómitos.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

Renales

- Necrosis tubular aguda.
- Albuminuria.

Hepatotoxicidad

- Ictericia

Dermatológicas

- Prurito, erupciones cutáneas y fotosensibilidad.
- Dermatitis exfoliativa
- Eritema multiforme

Casos aislados de cefalea, nerviosismo, insomnio, psicosis, visión borrosa, parestesia, neuropatía periférica reversible, mialgias, artralgias, pancreatitis, hematuria.

5.4 Interacciones

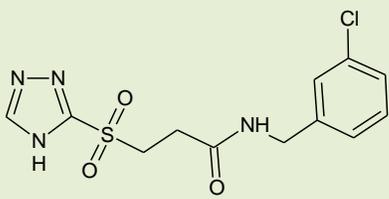
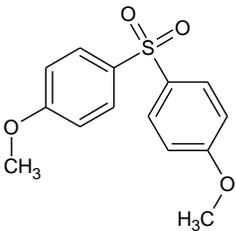
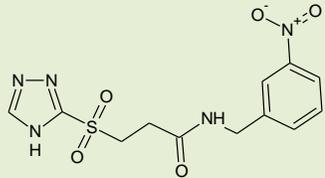
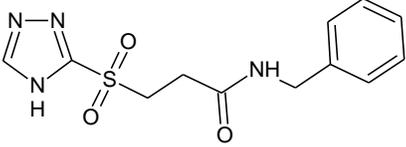
- Se potencia el efecto supresor de la médula ósea con otros fármacos (clozapina, antineoplásicos, interferones, zidovudina).
- El probenecid disminuye la excreción renal y aumenta la toxicidad.
- La rifampicina aumenta el metabolismo, disminuyendo su eficacia.
- Los anestésicos locales, esteres del PABA (por ejemplo la procaína) liberan PABA, que puede antagonizar el efecto antibacteriano. Deben evitarse estos anestésicos en pacientes tratados con sulfonas. (Mallén Ramírez, 2001)

En la tabla 8 se muestran algunos ejemplos de sulfonas con actividad biológica.



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

Tabla 8. Ejemplos de sulfonas con actividad biológica. (Manikrao, 2012)

Estructura	Actividad biológica
<p data-bbox="186 478 706 546">N-(3-clorobencil)-3-(4H-1,2,4-triazol-3-sulfonil)propanamida</p>  <p>The structure shows a 4H-1,2,4-triazole ring connected via its 3-position to a sulfur atom. This sulfur atom is part of a sulfonamide group (-SO₂-) which is further connected to a propanamide chain (-CH₂-CH₂-C(=O)-NH-). The nitrogen of the amide group is attached to a benzyl ring that has a chlorine atom at the 3-position.</p>	<p data-bbox="820 514 1015 577">Antibacteriano Antifúngico</p>
<p data-bbox="186 787 527 819">Bis(4-metoxifenil)sulfona</p>  <p>The structure shows a central sulfur atom double-bonded to two oxygen atoms. Each sulfur atom is also single-bonded to two phenyl rings. Each phenyl ring has a methoxy group (-OCH₃) at the para position relative to the sulfur atom.</p>	<p data-bbox="820 819 1185 924">Leishmaniasis Malaria Lupus eritematoso sistémico</p>
<p data-bbox="186 1123 706 1190">N-(3-nitrobenzil)-3-(4H-1,2,4-triazol-3-sulfonil)propanamida</p>  <p>The structure is similar to the first one, but the benzyl ring has a nitro group (-NO₂) at the 3-position instead of a chlorine atom.</p>	<p data-bbox="820 1155 1015 1218">Antibacteriano Antifúngico</p>
<p data-bbox="186 1444 592 1512">N-bencil-3-(4H-1,2,4-triazol-3-sulfonil)propanamida</p>  <p>The structure is similar to the first one, but the benzyl ring is unsubstituted.</p>	<p data-bbox="820 1480 1015 1543">Antibacteriano Antifúngico</p>



5.5 Determinación del PASS (Prediction Activity Substance Spectral)

El espectro de actividad biológica de un compuesto químico (PASS por sus siglas en inglés), es el conjunto de diferentes tipos de actividad biológica que reflejan los resultados de la interacción del compuesto con diversas entidades biológicas. La actividad biológica se determina cualitativamente, lo que sugiere que el espectro de actividad biológica representa la propiedad intrínseca de una sustancia que solo depende de su estructura y características físico-químicas. Aunque esto puede ser una generalización, ya que se prevé la posibilidad de combinar información de muchas fuentes diferentes en el conjunto de la formación misma, lo cual resulta necesario porque no hay una publicación en particular que recopile de forma exhaustiva todas las diversas facetas de la acción biológica de un compuesto.

PASS es un software diseñado como una herramienta para evaluar el potencial biológico general de una molécula orgánica; proporciona predicciones simultáneas de muchos tipos de actividad biológica sobre la base de la estructura de los compuestos orgánicos. Así, PASS puede ser utilizada para estimar los perfiles de actividad biológica de las moléculas virtuales, antes de su síntesis química y los ensayos biológicos.

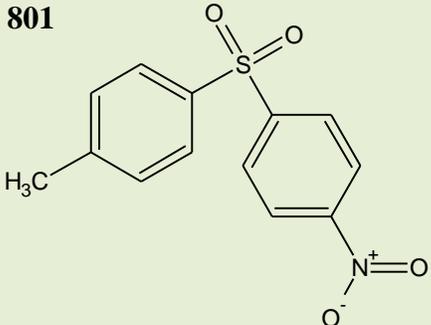
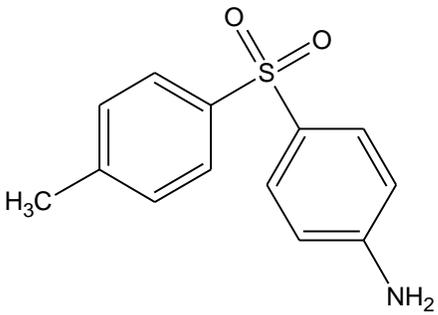
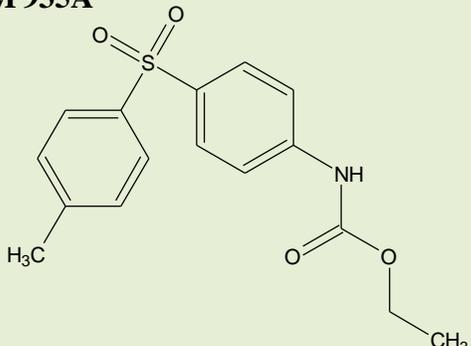
Pa (probabilidad de “ser activo”) estima la probabilidad de que el compuesto en estudio sea activo (que se asemeje a las estructuras de las moléculas que pertenecen a un conjunto de “activos” en la formación del PASS establecido).

PASS estima los perfiles probables de actividad biológica de los compuestos en estudio en función de su fórmula estructural. Se presenta en formato MOLfile o Sdfile. La lista general de actividades biológicas previsibles se compone de más de 4,000 términos, incluyendo farmacoterapia, mecanismos bioquímicos, toxicidad, etc. La predicción del PASS se base en la base de conocimientos sobre las reacciones estructura-actividad para más de 260,000 compuestos con actividad biológica conocida. El promedio de la exactitud generada es del 95%. (Prediction of Activity Spectra for Substances, 2012)



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

Tabla 9. PASS de los compuestos LQM 801, LQM 802 y LQM 935A.

MOLECULA	PREDICCIÓN DE ACTIVIDAD
LQM 801 	Pa 0.890 Antiprotozario(<i>Toxoplasma</i>) 0.715 Antimicobacteriano 0.652 Antileproso 0.627 Antiprotozario
LQM 802 	0.941 Antiprotozario (<i>Toxoplasma</i>) 0.803 Agonista de interleucina 0.737 Antileproso 0.725 Antimycobacteriano 0.694 Inhibidor de la síntesis de dihidropteroato sintetasa
LQM 935A 	0.811 Antiprotozario (<i>Toxoplasma</i>) 0.579 Antihelmintico (nematodos) 0.577 Antimicobacteriano 0.548 Antileproso 0.518 Inhibidor de la síntesis de dihidropteroato sintetasa



6. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (o farmacorresistencia), es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de verse afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Los microorganismos resistentes son inmunes a los efectos de los antimicrobianos, como los antibióticos, de modo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas. La resistencia bacteriana es uno de los retos clínicos más grandes que hoy prevalecen porque va limitando la prescripción de antibióticos que hasta hace poco eran eficaces. (Resistencia a los antimicrobianos, 2011)(Ortíz Ibarra, 2009)

Por lo anterior, el presente trabajo busca demostrar la actividad biológica de tres nuevas diarilsulfonas sobre cepas de aislamiento clínico que han estado en contacto con múltiples antimicrobianos y aún conservan sus factores de patogenicidad, y así encontrar la concentración mínima inhibitoria a la cual tienen sensibilidad.

Con esta evaluación se aspira a contribuir a los estudios preclínicos por los cuales atraviesa todo principio activo antes de ser comercializado, comprobar la predicción de la actividad biológica que arroja el programa PASS para cada compuesto a evaluar y si esta resulta positiva, poder proponer una mejor alternativa de tratamiento frente a microorganismos que presentan resistencia a los medicamentos ya existentes en el mercado.

Cabe mencionar que de acuerdo al PASS, las diarilsulfonas a evaluar presentan un amplio espectro de actividad biológica. Con este trabajo se pretende dar el primer paso para comprobar su actividad y que sea el inicio de futuras investigaciones.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

7. HIPÓTESIS

Si se inoculan cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en cajas con medio de cultivo que contenga a las diarilsulfonas a diferentes concentraciones, entonces se podrá observar si los compuestos inhiben el crecimiento bacteriano y determinar la MIC de cada uno.



8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

- Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de las diarilsulfonas empleando cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de aislamientos clínicos mediante el método de dilución en agar para determinar el grado de resistencia de las mismas frente a los nuevos compuestos.

8.2 Objetivos particulares

- Sintetizar y purificar los compuestos LQM 801, LQM 802 y LQM 935^a.
- Determinar el grado de solubilidad de los compuestos en agua y/o dimetil-sulfóxido (DMSO)
- Realizar pruebas de identificación a las cepas de *S. aureus* y *E. coli*.
- Determinar la posible actividad inhibitoria (MIC) de los compuestos LQM's.
- Realizar la caracterización del compuesto LQM 935^a mediante espectroscopía de IR y EM.



9. MATERIAL Y METODOLOGÍA

9.1 Material.

- Cajas petri de plástico 75x100 mm.
- Asa bacteriológica metálica calibrada de 1 μ L.
- 1 micropipeta de 1mL.
- Pipeta graduada de 10mL estéril.
- Puntas para micropipeta estériles.
- Tubos ependorff de 2mL estériles.
- Matraz kitasato de 125, 250 y 500 mL.
- Embudo buchner.

9.2 Equipo

- Autoclave PRESTO
- Incubadora MAPSA
- Campana de flujo laminar
- Microscopio óptico OLIMPUS modelo CHS
- Rotavapor BUCHI
- Lámpara de infrarrojo
- Lámpara de luz UV
- Mel-Temp II
- Espectrómetro de infrarrojo NICOLET Is10 Spectrometer Thermo Scientific

9.3 Reactivos

- Agar BHI BIOXON
- Agar MH DIBICO
- Medio de citratos de Simmons BIOXON
- Medio de MR-VP DIBICO
- Medio de nitratos DIBICO
- Medio de KIA BIOXON
- Medio SIM BIOXON
- DMSO estéril
- Cloruro de bario 0.048 M
- Ácido sulfúrico 1.17 %
- Ácido sulfanílico
- Rojo de metilo
- KOH al 40%
- α -naftol
- Znc.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

- SSF
- Agua destilada estéril
- Etanol al 70%
- Acetona
- Acetato del etilo
- Hexano
- Carbón activado
- Tierra de diatomeas
- Placas de sílice de revelado en UV
- Sulfato de sodio anhidro
- Cloruro de estaño II
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio.
- Bicarbonato de sodio
- Sulfito de sodio
- Cloruro de p-toluensulfonyl

9.4 Derivados de Diarilsulfonas

Estos compuestos fueron sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal:

- LQM 801
- LQM 802
- LQM 935A

9.5 Metodología

Diarilsulfonas

A continuación se presentan las estructuras de los compuestos que se usaron en el presente trabajo con sus respectivas claves de identificación:



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

Tabla 10. Claves de identificación y estructura de las diarilsulfonas.

CLAVE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA QUIMICA
LQM 801	<chem>Cc1ccc(cc1)S(=O)(=O)c2ccc(N)cc2</chem>
LQM 802	<chem>Cc1ccc(cc1)S(=O)(=O)c2ccc(N)cc2</chem>
LQM 935A	<chem>Cc1ccc(cc1)S(=O)(=O)c2ccc(NC(=O)OCC)cc2</chem>



9.5.1 Síntesis de los compuestos LQM 801, LQM 802 y LQM 935A.

Se inicia con la preparación de la materia prima (p-Toluensulfinato de sodio), que se utilizará para la síntesis de la 4-metilfenil-4-nitrofenilsulfona a la cual se le realizará una reducción del grupo nitro para obtener la 4-aminobencen-p-toluensulfona. Finalmente, de este compuesto se sustituirá un hidrógeno del grupo amino para formar el {4-[(4-metilfenil)sulfonyl]fenil} carbamato de etilo.

- Síntesis del p-toluensulfinato de sodio

En la figura 8 se muestra la reacción general de la síntesis del p-toluensulfinato de sodio.

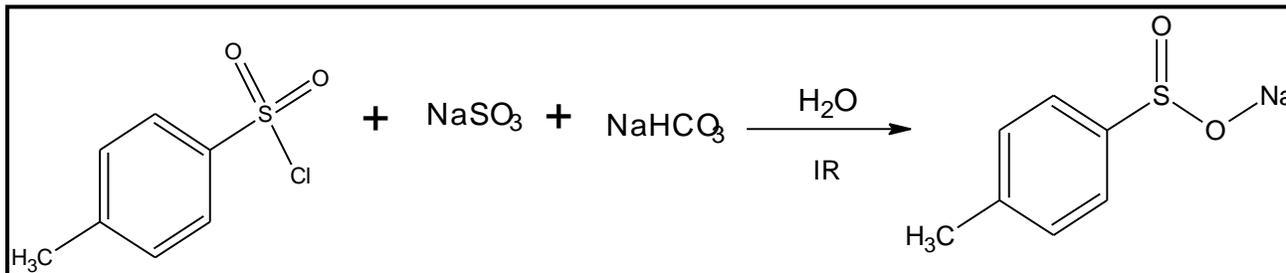


Figura 8. Síntesis del p-toluensulfinato de sodio.

Se pesaron cantidades estequiométricas 1:2:2 de las materias primas. Considerando 100g de producto, se pesaron 117g de cloruro de p-Toluensulfonil, 156.4g de sulfito de sodio, 97.3g de bicarbonato de sodio y se agregaron 200mL de agua. La mezcla de reacción se llevó a una temperatura de 100°C y se mantuvo en reflujo radiada con luz infrarroja.

Al cabo de 1 hora, se verifica que la reacción ha terminado mediante cromatografía en capa fina en un sistema de hexano-acetato de etilo en proporción 80:20 y se reveló en luz UV. Se deposita en cajas petri, las cuales se quedarán aproximadamente 24 hrs en el horno para quitar el exceso de agua, que es el disolvente que se empleó en dicha reacción. Para purificar, lavar con acetona; se obtiene un sólido blanco.



Figura 9. Diagrama de flujo para la síntesis del p-toluensulfinato de sodio.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

- Síntesis del LQM 801 (4-metilfenil-4-nitrofenilsulfona)

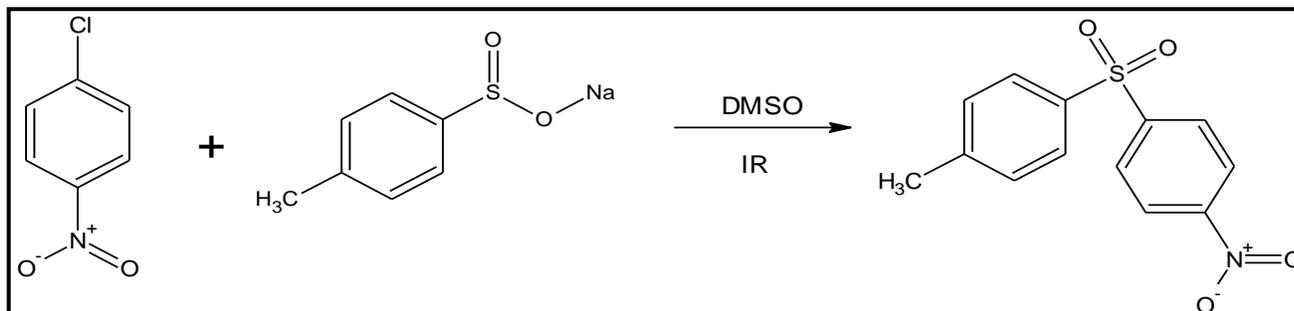


Figura 10. Síntesis de la 4-metilfenil-4-nitrofenilsulfona (LQM 801)

La figura 10 muestra la reacción de la síntesis del LQM 801, para la cual se pesaron cantidades estequiométricas 5:1 de la materia prima. Considerando 15g de producto, se pesaron 58.8g de p-toluensulfonato de sodio, 10.5g de 1-cloro-4-nitrobenzono y se disolvieron en 15mL de DMSO. La mezcla de reacción se coloca a reflujo utilizando luz infrarroja como fuente de energía a 200°C. Transcurridas 2 horas se detecta que la reacción ha terminado por medio de cromatografía en capa fina en un sistema 80:20 hexano-acetato y se reveló con luz UV.

Purificación:

Una vez terminada la reacción se deja enfriar, se adiciona agua destilada fría al matraz y se filtra en un embudo buchner para quitar el exceso de sal. El sólido filtrado es el compuesto. Este se disuelve en acetona y se lava con carbón activado. Este procedimiento se repite 2 o 3 veces hasta obtener un líquido amarillo paja; llevar a sequedad. La recristalización se realiza con una mezcla de acetato-acetona; para verificar la pureza del compuesto se realiza una cromatografía en capa fina en un sistema 80:20 hexano-acetato y se revela en luz UV.

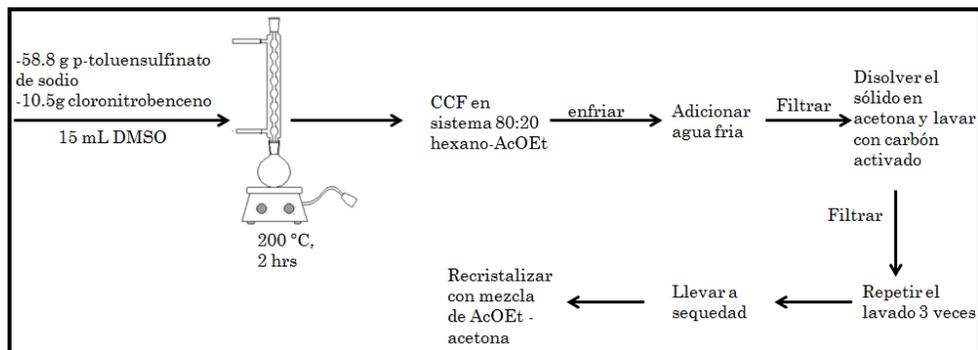


Figura 11. Diagrama de flujo para la síntesis del LQM 801.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

- LQM 802 (4-[(4-metilfenil)sulfonyl]anilina)

La figura 12 muestra la reducción del grupo nitro del LQM 801 para formar el LQM 802.

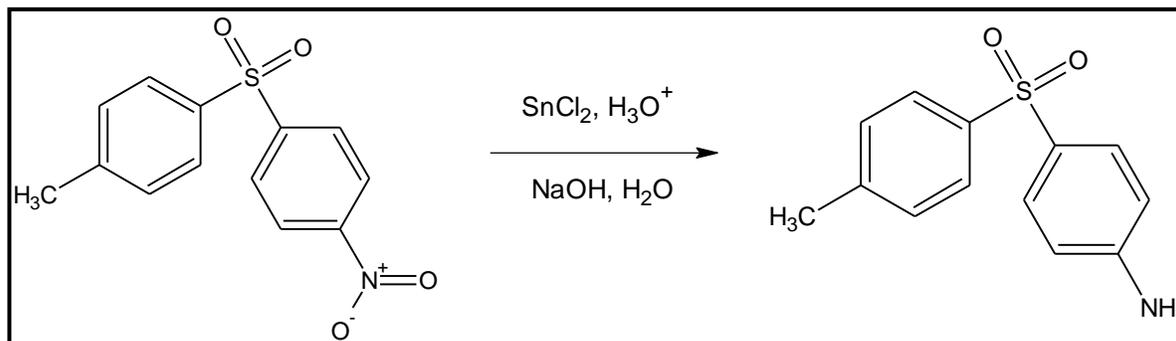


Figura 12. Síntesis de la 4-[(4-metilfenil)sulfonyl]anilina (LQM 802)

Se pesaron cantidades estequiométricas 1:2:4 de las materias primas. Considerando 15g de producto, en un matraz bola de 1L se colocan 10g del compuesto LQM 801, 30g de SnCl_2 y 40mL de HCl concentrado. La mezcla de reacción se calienta a reflujo y se mantiene en agitación de 20-30min. Transcurrido el tiempo, se hace una cromatografía en capa fina que se corre en sistema 60:40 hexano-acetona y se revela en luz UV para verificar que ya no hay materia prima.

La mezcla de reacción se neutraliza con una solución saturada de NaOH hasta llegar a un pH de entre 6 y 7. Una vez alcanzado el pH, se forma una pasta amarilla. Se añade aproximadamente el mismo volumen de la pasta de acetato de etilo, agitar vigorosamente 3 veces y filtrar solo el acetato en tierra de diatomeas. Volver a añadir acetato a la pasta y repetir el procedimiento 3 o 4 veces (el filtrado obtenido es de color amarillo claro). Juntar todas las fracciones.

Por último, volver a añadir AcOEt y filtrar todo sobre tierra de diatomeas. Enjuagar con AcOEt. Realizar 3-4 extracciones con AcOEt y correr una cromatografía en capa fina en sistema 60:40 hexano-acetona para verificar que ya no hay compuesto en la fase acuosa. Poner en un matraz bola las fases orgánicas y el filtrado del paso anterior para llevarlo a sequedad. Recristalizar en acetato.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

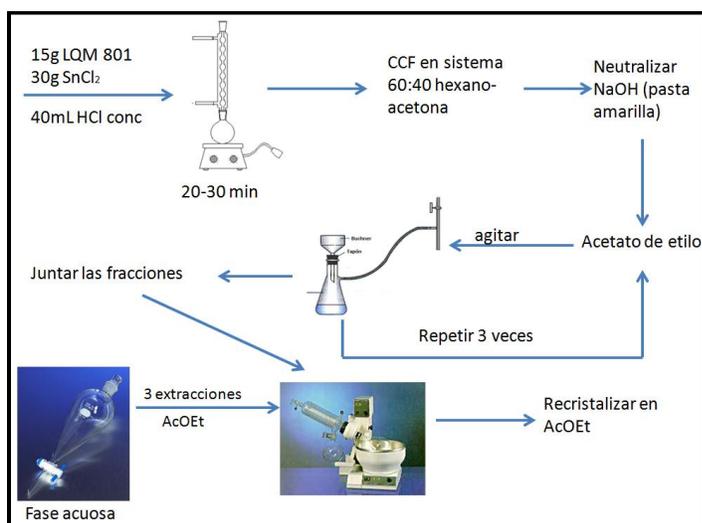


Figura 13. Diagrama de flujo para la síntesis del LQM 802.

- LQM 935A ({4-[(4-metilfenil)sulfonyl]fenil} carbamato de etilo)

En la figura 14 se representa la reacción de sustitución para obtener el LQM 935A a partir del LQM 802.

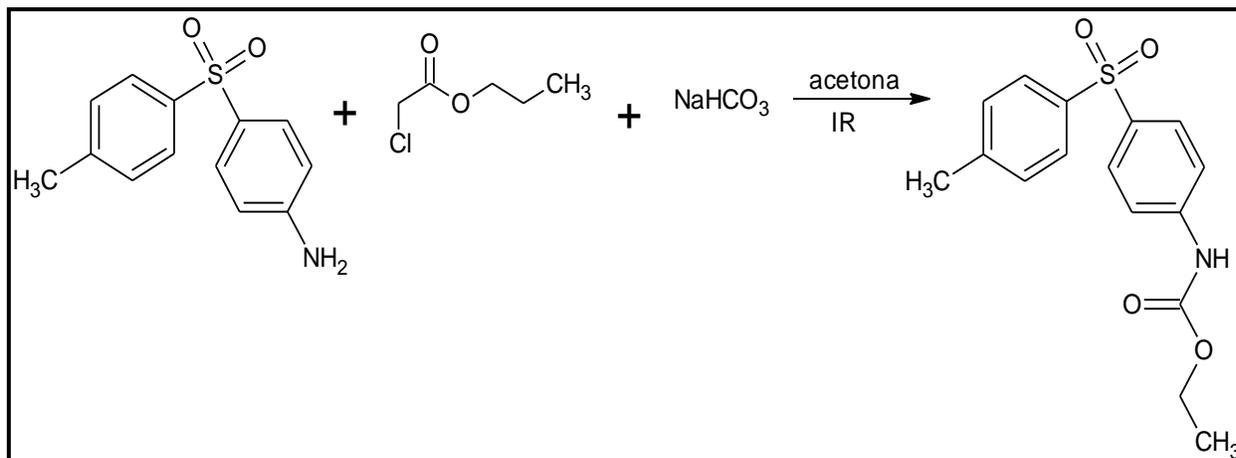


Figura 14. Síntesis del {4-[(4-metilfenil)sulfonyl]fenil} carbamato de etilo (LQM 935A).

Considerando 1g de producto, en un matraz bola de 100mL agregar 0.7744g del LQM 802, 0.6042mL de cloruro de etilcarbamoilato, 0.2630g de bicarbonato de sodio y 4 ml acetona. La mezcla de reacción se pone a reflujo irradiada con luz infrarroja durante 1 hora y media. Realizar cromatografía en capa fina en sistema 60:40 hexano-acetato para verificar que la reacción ha



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

terminado. Lavar con carbón activado 2 o 3 veces. Reducir el volumen de acetona y filtrar los cristales que aparecen. El filtrado es un sólido blanco que al correr cromatografía en capa fina y revelarla en luz UV, se observa que el compuesto está puro.

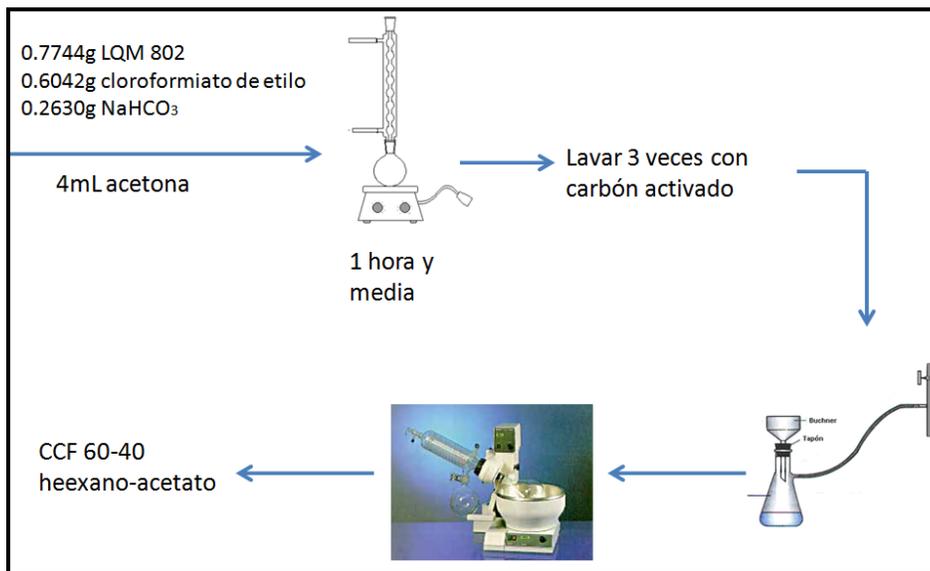


Figura 15. Diagrama de flujo para la síntesis del LQM 935A.

9.5.2 Caracterización

Los detalles de la caracterización de los compuestos LQM 801 y LQM 802, está referida en la cita 18. En este trabajo se caracterizó el LQM 935A, del cual se determinó el punto de fusión y se obtuvieron los espectros de infrarrojo y masas.

9.6 Cepas

- Las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* son muestras de aislamiento clínico proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Gustavo Guerrero de la SS, ubicado en la delegación Venustiano Carranza en el Distrito Federal.
- Se escogieron al azar 5 cepas de cada microorganismo para trabajar.
- Las muestras no deberán tener más de dos pases de aislamiento con el fin de que no se pierdan los factores de virulencia del microorganismo.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

- Para cada cepa se corrieron pruebas bioquímicas primarias (Gram, catalasa y oxidasa), secundarias (IMViC para *E. coli*) y especiales (prueba de coagulasa para las cepas de *S. aureus*). Una vez identificadas, se siembran por dilución en agar BHI de 18-24 hrs a 37°C.

9.7 Pruebas de solubilidad

Pruebas realizadas cualitativamente, demuestran que los mejores disolventes para los tres compuestos son el DMSO y la acetona; estos resultados se obtuvieron utilizando los disolventes concentrados, ya que en presencia de agua, el LQM 802 precipita.

Tabla 11. Solubilidad de diarilsulfonas

DISOLVENTE	COMPUESTO		
	LQM 801	LQM 802	LQM 935A
Agua	-	-	-
Acetona	+++	+++	+++
DMSO	++	+++	+++

9.8 Nefelómetro de Mc Farland

Se agregó 0.05mL de $BaCl_2$ 0.048M (1.17% p/v $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) a 9.95mL de H_2SO_4 0.18M (1% v/v) con constante agitación. Se colocó en un tubo con tapa rosca, se selló herméticamente para prevenir la pérdida por evaporación. Se almacenó protegido de la luz a temperatura ambiente. Se deberá agitar vigorosamente antes de su uso. El tubo puede almacenarse por seis meses; después de ese tiempo debe ser desechado.

9.9 Preparación de las diluciones

Existen diversas pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se eligió utilizar las pruebas de dilución en agar debido al bajo costo del material y a la ventaja de poder probar varias cepas en una misma placa; y el vertido en placa porque se observó que el compuesto LQM 802 precipitaba en presencia de agua y no había el contacto entre el compuesto y la bacteria. Ambas pruebas nos ayudan a dar un resultado cuantitativo con respecto a la concentración mínima inhibitoria casi del mismo modo que la del método de dilución en caldo.



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

Para cada compuesto se prepararon 50mL de una solución stock de una concentración de 10,240µg/mL según la Norma M7-A7 de la CLSI, con esta solución se procedió a realizar cada dilución problema, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 12. Esquema empleado para la preparación de las diluciones de acuerdo a la Norma M7-A7 (método de dilución en agar) ^(Wikler, 2006)

Concentración antimicrobiana (mg/L) en la solución stock	Volumen de la solución stock (mL)	Volumen de DMSO estéril (mL)	Concentración antimicrobiana obtenida (mg/L)	Concentración final en el medio después de adicionar 19mL de agar MH (µg/mL)
10 240	1	0	10 240	512
10 240	2.5	2.5	5 120	256
10 240	1	3	2 560	128
2 560	2.5	2.5	1 280	64
2 560	1	3	640	32
2 560	1	7	320	16
320	2.5	2.5	160	8
320	1	3	80	4
320	1	7	40	2
40	2.5	2.5	20	1
40	1	3	10	0.5
40	1	7	5	0.25

A la tabla anterior, se le hizo una modificación para el método de vertido en placa:



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

Tabla 13. Modificación a la tabla 12 empleada para la preparación de las diluciones (método de vertido en placa)

Concentración antimicrobiana (mg/L) en la solución stock	Volumen de la solución stock (mL)	Volumen de DMSO estéril (mL)	Concentración antimicrobiana obtenida (mg/L)	Volumen de la dilución depositado en la caja (mL)	Volumen agregado de la suspensión bacteriana (mL)	Concentración final en el medio después de adicionar 9mL de agar MH ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
10 240	1	0	10 240	0.5	0.5	512
10 240	2.5	2.5	5 120	0.5	0.5	256
10 240	1	3	2 560	0.5	0.5	128
2 560	2.5	2.5	1 280	0.5	0.5	64
2 560	1	3	640	0.5	0.5	32
2 560	1	7	320	0.5	0.5	16
320	2.5	2.5	160	0.5	0.5	8
320	1	3	80	0.5	0.5	4
320	1	7	40	0.5	0.5	2
40	2.5	2.5	20	0.5	0.5	1
40	1	3	10	0.5	0.5	0.5
40	1	7	5	0.5	0.5	0.25

9.10 Preparación de las placas

- Dilución en agar

A cada caja petri se le añadió 1mL de la dilución del compuesto más 19 mL de agar Mueller-Hinton; las placas se homogeneizaron con movimientos rotatorios. Se dejaron gelificar y se mantuvieron en prueba de esterilidad 24 horas a 37°C. Se refrigeraron hasta su uso dentro de los 2 días posteriores a su preparación.

- Vertido en placa

A cada caja petri se le añadió 0.5 mL de la dilución del compuesto, 0.5 mL de la suspensión bacteriana igualada al 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland y 9 mL de agar Mueller-Hinton; las placas se homogeneizaron con movimientos rotatorios. Se dejaron gelificar y se incubaron a 37°C durante 24 horas.



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

9.11 Inoculación de las cepas

Se preparó una suspensión de cada una de las cepas con SSF estéril ajustada visualmente con el tubo 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland. De ésta suspensión se tomó 1 μ L con asa calibrada y se sembró por dilución para la técnica de dilución en agar; para el vertido en placa se tomó 0.5 mL con micropipeta de 1 mL y se depositó en cada caja.

9.12 Preparación de un control

Se preparó una placa como control, a esta placa se le agregó 19 mL de agar Müller-Hinton y se le adicionó 1 mL de DMSO concentrado estéril, para descartar la inhibición del crecimiento bacteriano por el DMSO.

Se preparó una segunda placa como control para la técnica de vertido en placa; a ésta se le agregó 0.5 mL de la solución stock, 0.5 mL de DMSO concentrado estéril y 9 mL de agar Müller-Hinton. Esta placa, además de permitir descartar la inhibición del crecimiento bacteriano por el DMSO, también nos sirve para diferir entre el compuesto precipitado y el crecimiento de las colonias.

9.13 Interpretación

La interpretación se realizó observando si hay crecimiento o no de las cepas en la superficie del medio y/o entre el agar (para dilución en agar y vertido en placa respectivamente), marcando con una R el crecimiento que denota resistencia y una S si no existe crecimiento, denotando sensibilidad.



10. RESULTADOS

10.1 Síntesis de los compuestos LQM 802 y LQM 935A.

A continuación, en la tabla 13 se muestran los resultados de punto de fusión de los compuestos LQM 802 y LQM 935A, así como el porcentaje de rendimiento de las reacciones.

Tabla 14. Puntos de fusión y rendimientos de los compuestos LQM 802 y LQM 935A

COMPUESTO	PUNTO DE FUSION REPORTADO (°C)	PUNTO DE FUSION EXPERIMENTAL (°C)	RENDIMIENTO REPORTADO (%)	RENDIMIENTO EXPERIMENTAL (%)
LQM 802	177-178	176	49	69.48
LQM 935A	NA	190	70-80	70.51

10.2 Caracterización espectroscópica

El compuesto fue caracterizado por técnicas de espectroscopía de infrarrojo (IR) y de masas (EM).

10.2.1 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

El espectro de infrarrojo se realizó en fase sólida en un equipo NICOLET iS10 Spectrometer Thermo Scientific adaptado con un accesorio Smart Orbit Thermo Scientific.

10.2.2 Espectroscopía de masas (EM)

El espectro de masas se realizó en un espectrómetro JEOL GCmate, utilizando la técnica de impacto electrónico (IE).



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus*

10.3 Análisis espectroscópico

LQM 935A

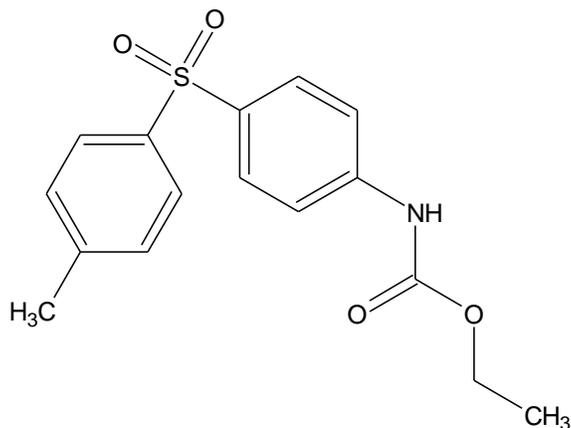


Tabla 15. Carbonos de la estructura del LQM 935A.

Técnica	Observaciones
IR 3320.44 cm^{-1} 2979.37 cm^{-1} 2100-1750 cm^{-1} 1736.85 cm^{-1} 1531.97 cm^{-1}	Enlace NH Enlace $\text{Csp}^3\text{-H}$ Aromáticos Enlace C=O Enlace C=C
EM $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$ 319.0878 m/z 9.0	Fórmula condensada Masa calculada Número de insaturaciones



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

10.4 Pruebas de identificación

En la siguiente tabla, se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas que se corrieron para las cepas de *Staphylococcus aureus*:

Tabla 16. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de *S. aureus*.

Prueba	Resultado
Gram	Cocos gram-positivos agrupados en racimos
Catalasa	(+)
Oxidasa	(-)
Coagulasa	(+)

A continuación se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de identificación realizadas a las cepas de *Escherichia coli*:

Tabla 17. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de *E. coli*.

Prueba	Resultado
Gram	Bacilos gram-negativos aislados
Catalasa	(+)
Oxidasa	(-)
MR	(+)
VP	(-)
Citrato	(-)
KIA	ac/ac con producción de CO ₂
Indol	(+)
Motilidad	(+)
Producción de H ₂ S	(-)



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

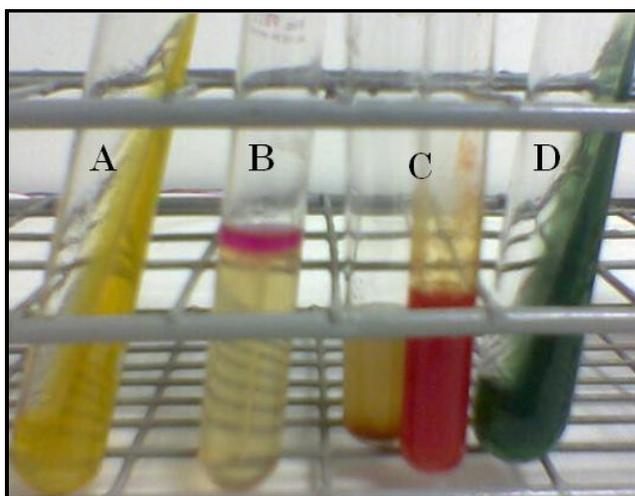


Figura 16. Resultados del IMViC realizado a las cepas de *E. coli*. (A: KIA; B: SIM; C: MR-VP; D: citratos)

10.5 Determinación de la MIC

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos para el compuesto LQM 801 frente a las cepas de:

- *Staphylococcus aureus*

Tabla 18. Resultados de la MIC del compuesto LQM 801 frente a *S. aureus*.

CEPA	CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/mL}$)											
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Y16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
83	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: resistente

S: sensible



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

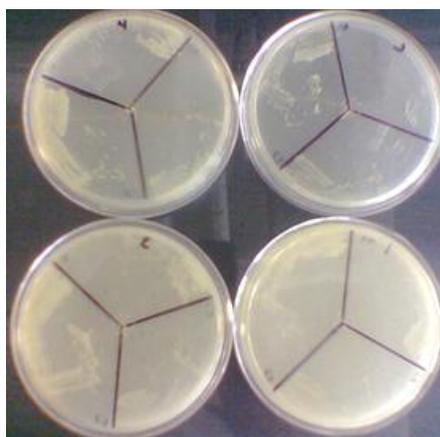
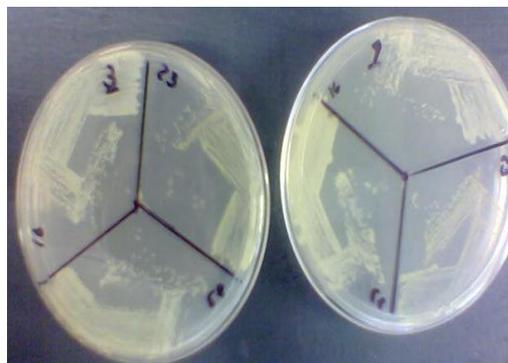


Figura 17. Ejemplos de placas donde se muestra el crecimiento de *S. aureus* con el compuesto LQM 801.

- *Escherichia coli*

Tabla 19. Resultados de la MIC del compuesto LQM 801 frente a *E. coli*.

CEPA	CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/mL}$)											
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
474	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6641	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6678	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6713	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7294	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: resistente

S: sensible



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y Staphylococcus aureus**

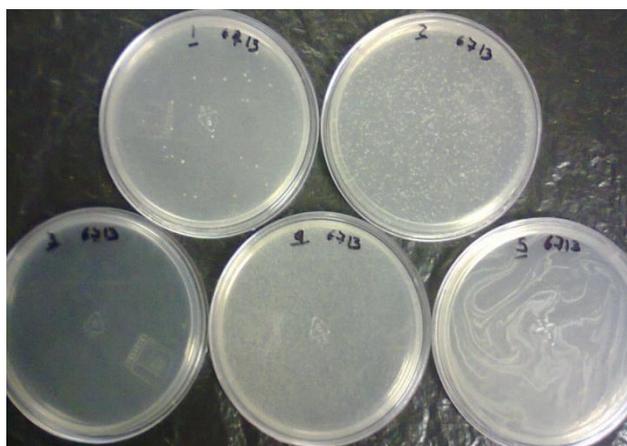
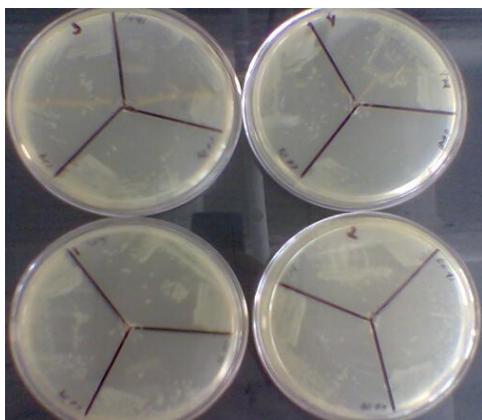


Figura 18. Ejemplos de las placas donde se observa crecimiento de *E. coli* con el compuesto LQM 801.

A continuación se muestran los resultados con el compuesto LQM 802, para las cepas de:

- *Staphylococcus aureus*

Tabla 20. Resultados de la MIC del compuesto LQM 802 frente a *S. aureus*.

CEPA	CONCENTRACIONES ($\mu\text{g}/\text{mL}$)											
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Y16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
83	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
1Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

R: resistente

S: sensible



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

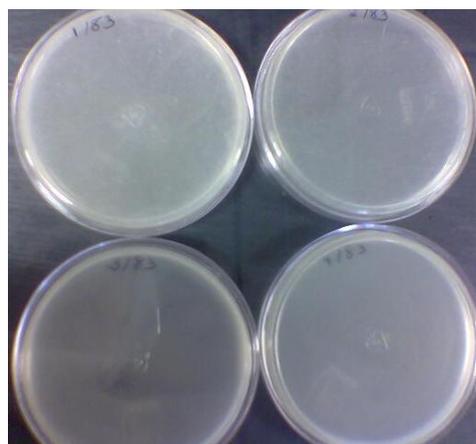
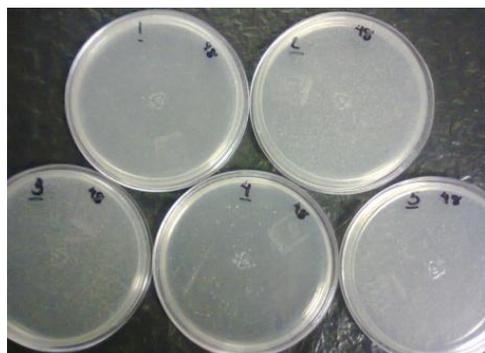


Figura 19. Ejemplos de placas donde se observa la inhibición de *S. aureus* con el compuesto LQM 802.

- *Escherichia coli*

Tabla 21. Resultados de la MIC del compuesto LQM 802 frente a *E. coli*.

CEPA	CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/mL}$)											
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
474	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6641	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
6678	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
6713	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
7294	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S

R: resistente

S: sensible



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

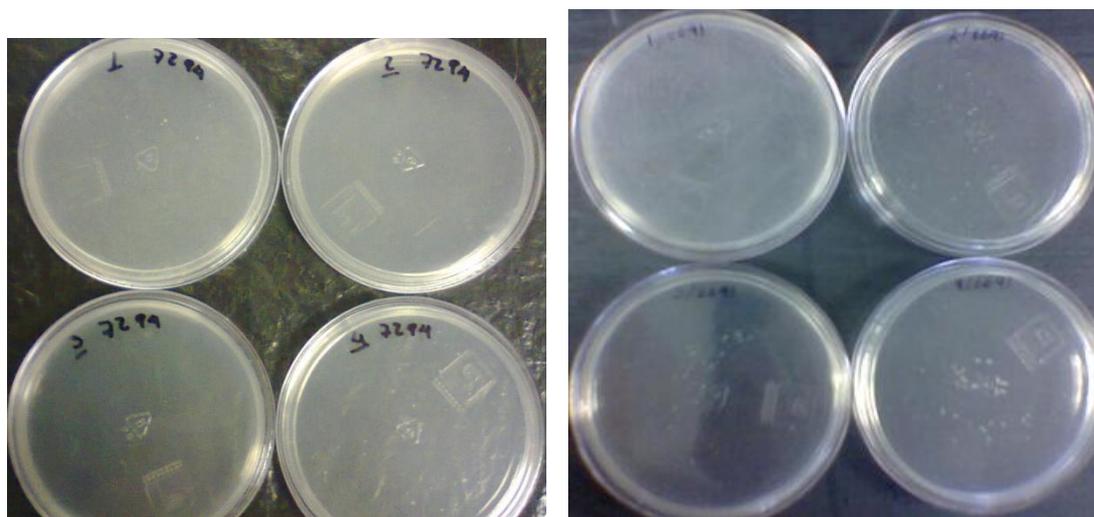


Figura 20. Ejemplos de placas donde se observa crecimiento e inhibición de *E. coli* con el compuesto LQM 802.

En las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos para el compuesto LQM 935A frente a las cepas de:

- *Staphylococcus aureus*

Tabla 22. Resultados de la MIC del compuesto LQM 935A frente a *S. aureus*

CEPA	CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/mL}$)											
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Y16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
83	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1Y	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: resistente

S: sensible



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

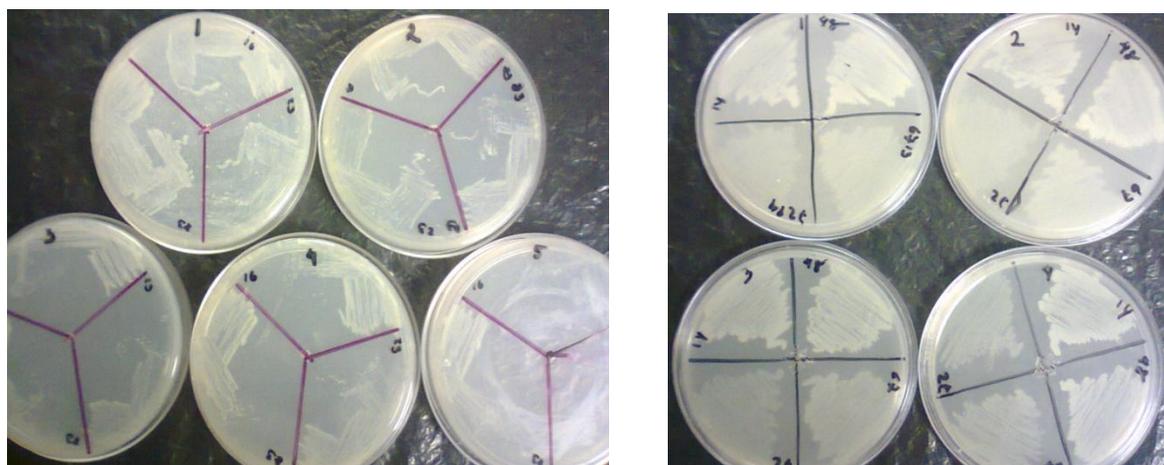


Figura 21. Ejemplos de placas donde se observa el crecimiento de *S. aureus* con el compuesto LQM 935A.

- *Escherichia coli*

Tabla 23. Resultados de la MIC del compuesto LQM 935A frente a *E. coli*.

CEPA	CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/mL}$)											
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
474	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6641	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6678	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6713	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7294	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: resistente

S: sensible



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

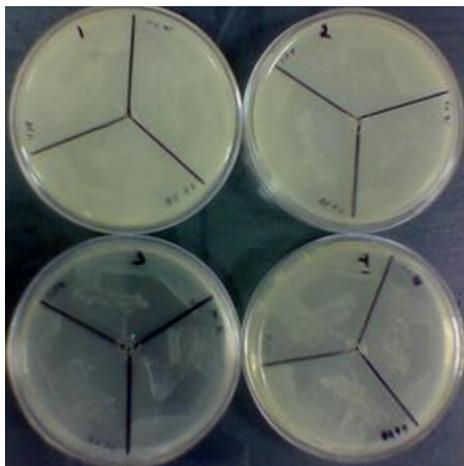


Figura 22. Ejemplos de las placas donde se observa el crecimiento de *E. coli* con el compuesto LQM 935A.

Para evitar en lo posible confundir los cristales del compuesto con el crecimiento bacteriano, se corrió un blanco, donde se adicionaron 0.5 mL de DMSO estéril, 0.5 mL del stock y 9 mL de agar MH. A continuación se muestra la fotografía de la placa que se tomó como referencia para la lectura de las placas realizadas por la técnica de vertido en placa.

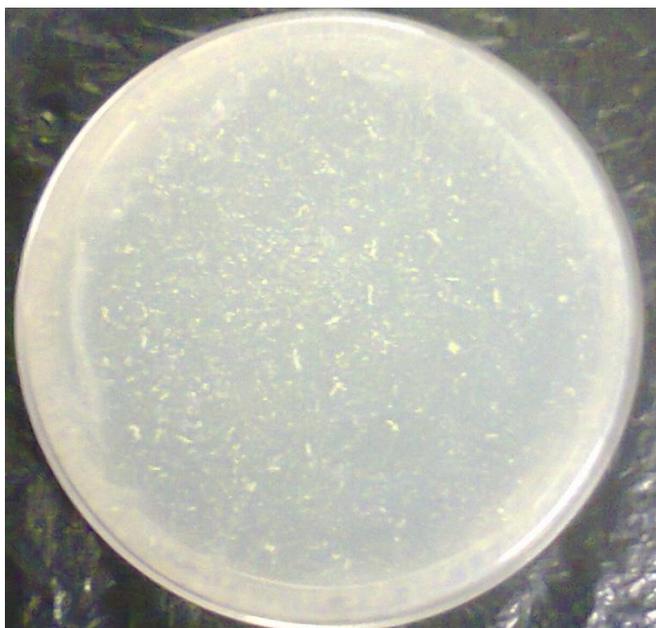


Figura 23. Fotografía de la placa que se usó como referencia para la lectura de resultados.



11. DISCUSIÓN

11.1 Síntesis de los compuestos

- Síntesis del p-toluensulfinato de sodio

La síntesis se llevó a cabo empleando un método reportado en la literatura^(Yao B., 2008), cambiando la fuente de energía por radiación infrarroja. El tiempo de reacción reportado es de 4 hrs en calentamiento normal; para este caso, el tiempo fue de 1 hr con rendimientos iguales a los reportados. Por lo que se recomienda el uso de IR como fuente de energía, ya que los tiempos se reducen y los rendimientos son similares.

- Síntesis del LQM 801 (4-metilfenil-4-nitrofenil sulfona)

De acuerdo a la bibliografía, la síntesis de diarilsulfonas implica el uso de agentes oxidantes muy agresivos de difícil manejo y catalizadores organometálicos cuya síntesis y purificación resultan complicadas, además de que las reacciones se llevan a cabo en varios pasos. Sin embargo, en este caso, la obtención del LQM 801 se realiza en un solo paso por sustitución nucleofílica aromática, utilizando DMSO como disolvente e IR como fuente de energía.

Por lo anterior, se puede considerar una técnica de síntesis sencilla, con reactivos y equipo de fácil manejo, además de rápida en comparación con los tiempos reportados.

El uso de luz infrarroja como fuente de energía, pretende ser una variante eficaz en la síntesis de diarilsulfonas, ya que acorta los tiempos de reacción que en su mayoría son altos.

- Síntesis del LQM 802 (4-[(4-metilfenil)sulfonyl]anilina)

La síntesis del LQM 802 se realizó a partir de la reducción del grupo nitro de la 4-metilfenil-4-nitrofenil sulfona, empleando cloruro de estaño II como agente reductor. Esta técnica es una modificación a la reportada por Santiago Torres Gabriela (cita 29), que consistió en lavar los óxidos desde el matraz de reacción con acetato de etilo, con lo cual se obtuvo un mayor rendimiento.

Como se observa en la tabla 14, los puntos de fusión reportados, comparados con los obtenidos experimentalmente, se encuentran en un rango similar, por lo que se puede decir que los compuestos sintetizados son los esperados.



11. 2 Determinación de la MIC

De acuerdo con el Centro para el Control de Enfermedades Europeo (ECDC), la resistencia a los antimicrobianos es posiblemente la mayor amenaza que enfrenta el mundo en el área de enfermedades infecciosas. La resistencia a los antimicrobianos es una consecuencia natural de la exposición a éstos y no es un fenómeno nuevo. Incluso utilizando los antimicrobianos apropiados, las tasas de aparición de resistencias pueden incrementarse. ^(World Health Organization, 2010)

Las sulfonas, sulfonamidas y aminosulfonas son bien conocidas por su importancia en la quimioterapia. Las sulfonamidas y sulfonas se han utilizado en el tratamiento de la lepra, malaria y toxoplasmosis. Recientemente se ha demostrado que las aril y diarilsulfonas inhiben la transcriptasa reversa del VIH tipo I. ^(Jain S., 2011)

El objetivo de este trabajo fue determinar si los compuestos empleados presentan actividad biológica de acuerdo al PASS, por lo que se eligieron estas dos especies bacterianas como representantes de las gram-positivo (*S. aureus*) y gram-negativo (*E. coli*), aunado a que son las que con frecuencia presentan mayor resistencia a los antibióticos disponibles en el mercado. Cada prueba se realizó por triplicado para observar reproducibilidad en el método.

Las cepas empleadas para la presente investigación son de aislamiento clínico; para el caso de *E. coli*, provienen de muestras de orina (que son consideradas patógenas), y las de *S. aureus*, proceden de exudados faríngeos de pacientes que cursan por la fase aguda de la enfermedad.

Se decidió emplear cepas de campo y no de referencia porque las primeras son obtenidas directamente del hospedero, donde mantienen intactos sus factores de patogenicidad; a diferencia de las ATCC, que si bien son cepas estandarizadas, proceden de una serie de pases, lo que ocasiona que las bacterias vayan perdiendo dichos factores.

De acuerdo a los resultados reportados en las tablas 16 y 17 de las pruebas de identificación realizadas a cada cepa de las dos especies bacterianas usadas en el presente trabajo, se corroboró que se trata de cepas puras de *S. aureus* y *E. coli*.

Como se puede observar en las tablas 18-23, de los tres compuestos empleados, solo el LQM 802 presenta actividad bactericida contra ambos géneros. En el caso de *Staphylococcus aureus* (tabla 20), la MIC, aunque relativamente alta (256 µg/ml), es la misma para las 5 cepas; no así en el caso de *Escherichia coli*, que de acuerdo a la tabla 21, en 3 cepas la MIC es de 512 µg/ml, en una de 256 µg/ml y una más presenta resistencia. Por lo anterior, se pueden inferir dos cosas: la primera es que este compuesto solo es activo contra bacterias gram (+); o la segunda,



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

que aunque tenga actividad contra bacterias gram (-), las cepas de *E. coli* contengan mecanismos de resistencia contra las sulfonas.

Esta disminución de la actividad puede deberse a la supresión de sustituyentes cloro en posiciones *meta* y *para*-, da como resultado una modificación en la actividad: esta se ve disminuida e incluso el compuesto se vuelve inactivo, lo que demuestra una estrecha relación estructura química-actividad biológica en esta posición.^(Vasan, 2011) Por lo que una prospectiva al presente trabajo es modificar los sustituyentes de éstas diarilsulfonas para tratar de incrementar la actividad bactericida de los compuestos.

La resistencia antibiótica es un problema emergente a nivel mundial presente en diversas bacterias. Este aumento de resistencia antibiótica se debe a la adquisición de diferentes mecanismos de resistencia mediante mutaciones a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes. Una alternativa para evitar este problema, sería identificar los mecanismos de resistencia implicados como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud, ya que permitiría optimizar la vigilancia de resistencia y las políticas de control y uso de antibióticos.^(Mosquito, 2011)

La actividad de un agente antimicrobiano frente a una bacteria depende principalmente de su capacidad para atravesar la pared bacteriana, paso necesario para acceder a su punto de acción. Dicha actividad está en relación con su naturaleza fisicoquímica y con la estructura de la barrera que ha de franquear.

La pared celular de las bacterias grampositivas es más permeable a los antibióticos que las de las gramnegativas, lo que puede ser otra explicación a los resultados obtenidos. La diferencia esencial entre la pared de las bacterias grampositivas y las gramnegativas radica en la presencia de estas últimas, de una membrana externa que contiene lipopolisacáridos de ácidos grasos saturados. Para el paso de nutrientes, la membrana externa dispone de canales hidrofílicos constituidos por polímeros de unas proteínas llamadas porinas. Los antibióticos de bajo peso molecular y de naturaleza hidrofílica utilizan estos canales para llegar al espacio periplásmico, mientras que las hidrofóbicas lo hacen previa disolución en la membrana.

La membrana externa constituye una barrera natural a la libre difusión de antibióticos al interior de la bacteria. La membrana citoplásmica apenas ofrece resistencia al paso de los antibióticos de menor peso molecular, con independencia de la hidrofobicidad de la molécula, sin embargo resulta particularmente más difícil el paso para las moléculas hidrofóbicas.^(Mallén Ramírez, 2001)

Debido a lo anterior, se puede deducir que los compuestos empleados no son activos contra bacterias gramnegativas, ya que todos presentan carácter hidrófobo, lo que interfiere en su



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

penetración y difusión en la bacteria. A diferencia del LQM 801 y LQM 935A, el LQM 802 es el único compuesto que tiene un grupo amino en posición *para-*, al cual también se le ha atribuido una estrecha relación en esta posición con la actividad biológica.

Considerando que la MIC de los antibióticos disponibles en el mercado va desde 0.006 $\mu\text{g/mL}$ (cefalosporinas), los resultados obtenidos no son los ideales, aunque el objetivo de este estudio es observar si los compuestos son o no activos, y con base a los resultados, poder implementar cambios a la técnica de síntesis para realizar modificaciones en los sustituyentes de la molécula base, con el fin de incrementar la actividad de las sustancias en estudio.

Para poder confirmar que el LQM 802 presenta actividad antibacteriana y determinar su espectro de acción, el siguiente paso será probarlo con otros géneros bacterianos, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, que de acuerdo al PASS obtenido y a las referencias, tiene altas posibilidades de ser activo, al igual que el LQM 801 y LQM 935A.

Debido a que el LQM 802 precipita en presencia de agua, y después de probar diferentes técnicas como difusión en disco y la propia dilución en agar, se toma la decisión de realizar el vertido en placa, debido a que en ésta técnica se garantiza el contacto entre el compuesto y la suspensión bacteriana, no así en la dilución en agar, ya que se observó que el compuesto quedaba en el fondo de la placa y por tanto nunca se daba el contacto con el microorganismo.



12. CONCLUSIONES

- Se logró la síntesis y purificación de los compuestos LQM 801, LQM 802 y LQM 935A, así como la caracterización de éste último por técnicas físicas y espectroscópicas (IR y EM).
- Se logró mejorar el rendimiento del LQM 802.
- Se determinó cualitativamente la solubilidad de los compuestos en agua, acetona y DMSO.
- Se realizaron pruebas de identificación a las muestras de *S. aureus* y *E. coli*.
- Se evaluó la actividad *in vitro* de 3 diarilsulfonas frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus* por el método de dilución en agar y vertido en placa.
- El LQM 802 es el único compuesto que presenta actividad bactericida principalmente contra *Staphylococcus aureus*, arrojando una MIC de 256 µg/ml.
- Se deben realizar cambios en los sustituyentes de las diarilsulfonas en cuestión con el fin de aumentar su capacidad antibacteriana.



13. PERSPECTIVAS

Aún queda un largo camino por recorrer para las nuevas diarilsulfonas empleadas en este trabajo, como proponer modificaciones a los sustituyentes para tratar de incrementar la actividad, y probarlos con otros géneros como el *Mycobacterium*, donde de acuerdo al PASS, tienen altas posibilidades de ser eficaces.



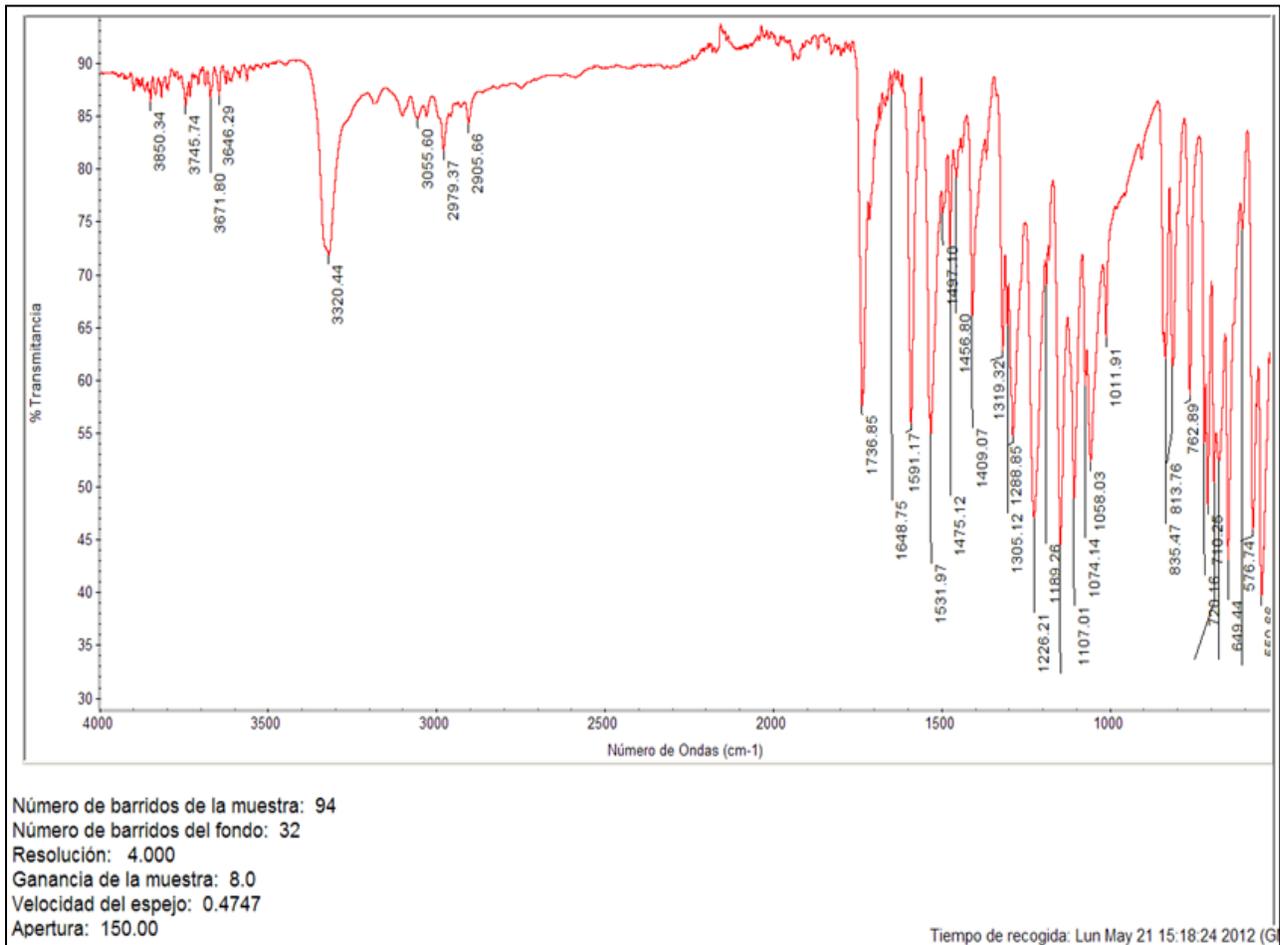
14. ANEXO

ESPECTROS DE IR Y MASAS



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

Espectro de IR del LQM 935A





ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus*

Espectro de masas del LQM 935A

File: GZV_LQM935-A_I Date Run: 05-22-2012 (Time Run: 16:23:13)

Sample: GZV_LQM935-A_I

Instrument: JEOL GCmate

Inlet: Direct Probe

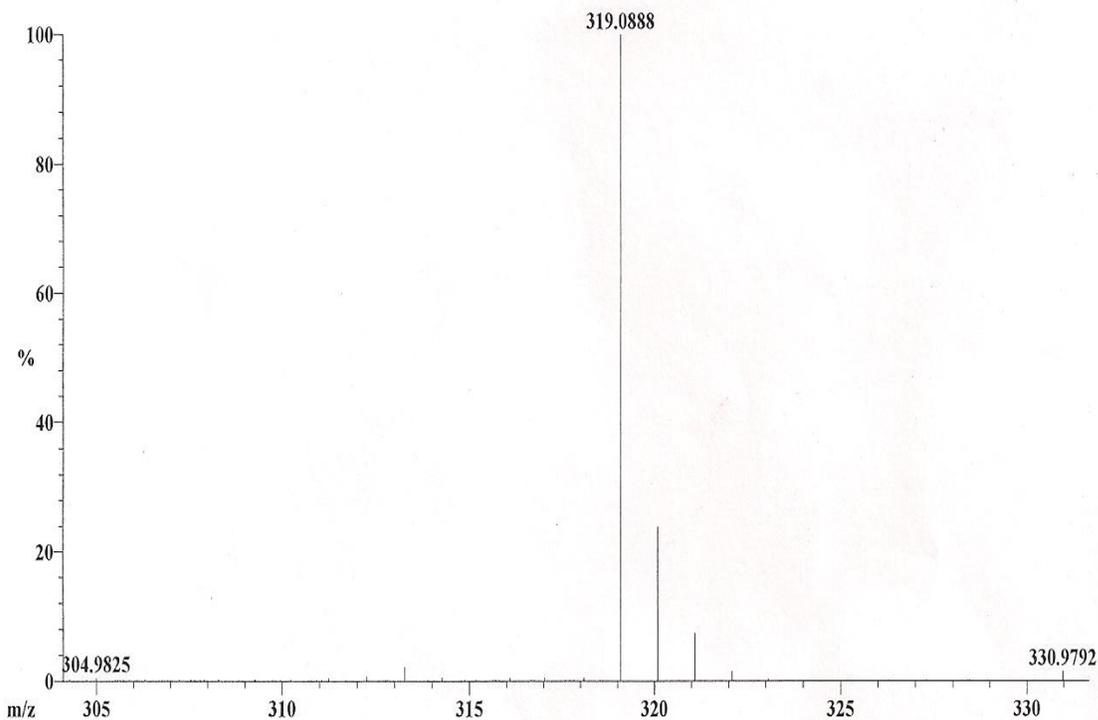
Ionization mode: EI+

Scan: 48

R.T.: .56

Base: m/z 319; 48.6%FS TIC: 7740928

#Ions: 674



Selected Isotopes : C₀₋₁₆H₀₋₁₇N₀₋₁O₀₋₄S₀₋₁

Error Limit : 50 ppm

Unsaturation Limits : 0 to 50

<u>Measured</u> <u>Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated</u> <u>Mass</u>	<u>Error</u>	<u>Unsaturation</u>
319.0888	100.0%	C ₁₆ H ₁₇ N O ₄ S	319.0878	3.1	9.0



BIBLIOGRAFÍA

1. Alós, J.-I. y. (2010). Qué antibióticos debemos informar en el antibiograma y cómo?
2. Ávila Carrillo, A. L. (s.f.). *Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM*. Recuperado el 26 de mayo de 2010, de <http://odontologia.iztacala.unam.mx/20coloquio/CARTELES/1304%20Cartel.htm>
3. Bailón Lira, L. e. (2003). *Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias*. México, D.F.: FES-Zaragoza-UNAM.
4. Bustos-Martínez, J. A. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica*.
5. *Centers for Disease Control and Prevention*. (s.f.). Recuperado el 08 de junio de 2012, de <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html/>
6. Chan, M. (14 de March de 2012). *Antimicrobial resistance in the European Union and the world*. Recuperado el 29 de Abril de 2012, de The EU's contributions to the solutions of the global antimicrobial resistance problem Keynote address at the conference on Combating antimicrobial resistance: time for action: www.who.int/dg/speeches/2012/amr_20120314/es/index.html
7. Cornejo-Juárez, P. y. (2007). Patrones de resistencia bacteriana en urocultivos en un hospital oncológico. *Salud Pública de México*.
8. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. (2000). *European Committee for antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.
9. Eslava Campos, C. y. (s.f.). *Departamento de Salud Pública*. Recuperado el 08 de junio de 2012, de Facultad de Medicina-UNAM: http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/ourprofs/ecoli_divergente.htm
10. *Facultad de Química-UNAM*. (s.f.). Recuperado el 26 de mayo de 2012, de <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/APUN-Staphylococcus.pdf>



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

11. García Rodríguez, J. A. (s.f.). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Recuperado el 16 de mayo de 2012, de Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap11.htm>
12. Hernández Betancourt, O. y. (2010). *Staphylococcus aureus* y su identificación en los laboratorios. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*.
13. Jain S., e. a. (2011). Synthesis of some heteroryl sulfones derived from carbazole and azacarbazole derivatives and their biological evaluation. *III*(6).
14. Kanafani, F. (2006). *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Clinical Microbiology and Infection*.
15. Koneman, E. W. (2008). *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas a color*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
16. López, M. N. (2007). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de compuestos derivados del ácido carbámico sobre cepas de *Escherichia coli*. Cuautitlán Izcalli, Edo. Mex., México
17. Madigan, M. e. (2000). *Brock. Microbiología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Prentice Hall.
18. Mallén Ramírez, M. d. (2001). Resistencias a nuevos antimicrobianos en patrones sépticos. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
19. Manikrao, A. a. (2012). Rapid, economical and green solid oxidation of sulfides to sulfones and their antimicrobial evaluation. *Der Pharme Chemica*.
20. Martínez Herrera, E. y. (2008). Frecuencia de aislamientos microbiológicos en hemocultivos de pacientes internados en un hospital de segundo nivel de la ciudad de México. *24*(5).
21. Mehdi Khodaei, M. (2010). Synthesis of Symmetric Diaryl Sulfones with Dimethyl Sulfate. (39).
22. Mosquito, S. e. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. . *IV*(28).
23. Murray, P. R. (2002). *Microbiología Médica*. Valencia: Elsevier.



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIARILSULFONAS SOBRE CEPAS DE
Escherichia coli Y *Staphylococcus aureus***

24. Ortíz Ibarra, F. y. (2009). El reto de la resistencia bacteriana en México: los beneficios de contar con una nueva alternativa de manejo antimicrobiano eficaz. 25(5).
25. Parvank, K. (2010). Polystyrene supported AL (OTf)₃: A stable, efficient, selective and reusable catalyst for sulfonylation of arenes with sulfonic acids. (39).
26. *Prediction of Activity Spectra for Substances*. (06 de junio de 2012). Obtenido de <http://genexplain.com/pass>
27. Pumarola, A. e. (1996). *Microbiología y Parasitología Médica*. México: Salvat.
28. *Resistencia a los antimicrobianos*. (16 de marzo de 2011). (WHO) Recuperado el 06 de julio de 2012, de www.who.int/features/qa/75/es/index.html
29. Torres Santiago, G. (2012). Síntesis de diarilsulfonas como posibles inhibidores no nucleosidos de la transcriptasa reversa del VIH tipo I. Cuautitlán Izcalli, Edo. Méx., México.
30. Vasan, M. e. (2011). Inhibitors of the Salicylate Synthase (MbtI) from *Mycobacterium tuberculosis* Discovered by High-Throughput Screening. V(12).
31. Velázquez-Meza. (2004). Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City a 7 year period (1997 to 2003): Clonal evolution and impact of infection control. *Journal Clinical Microbiology*.
32. Velázquez-Meza, y. c. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública de México*.
33. Wikler, M. e. (2006). Métodos de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos NOM-M7-A7. *Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos CLSI*.
34. *World Health Organization*. (2010). Recuperado el 20 de junio de 2012, de Regional Strategy on Prevention and Containment of Antimicrobial Resistance 2010-2015: <http://www.searo.who.int>
35. Yao B., Z. Y. (2008). Sulfonylation of arenes with sulfonamides. 49.