



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación de la actividad antimicrobiana de nuevos compuestos derivados de benzimidazoles, hidrazidas, pirazol y piridazina, frente a *Escherichia coli*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

González Cruz Sol Yessenia

ASESORA

M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez

COASESORES

Dr. Guillermo Penieres Carrillo

Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2018



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
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
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 comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación de la actividad antimicrobiana de nuevos compuestos derivados de benzimidazoles, hidrazidas, pirazol y piridazina, frente a *Escherichia coli*.

Que presenta la pasante: **Sol Yessenia González Cruz**

Con número de cuenta: **310065810** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q. José Guadalupe García Estrada	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	Dr. Fernando Ortega Jiménez	

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi familia por haber estado conmigo durante todos estos años y no dejarme sola, en especial a mis padres, Crisanta y Adolfo, por el apoyo, amor y oportunidades que me dieron para seguir adelante, por animarme cada día a pesar de los problemas y porque es gracias a su esfuerzo que he llegado hasta aquí. A mis hermanas, Mónica y Monserrat, por escucharme y soportarme siempre. Los amo, familia.

A Rogelio, por haberme ayudado a encontrar la estabilidad que le faltaba a mi vida, por hacer de la carrera una etapa más amena y por hacerme sentir mejor con su cariño cada que sentía que todo iba mal. Gracias, porque crecimos juntos como compañeros, pero también como pareja.

A mis mejores amigas, Mara y Adriana, porque a pesar de la distancia siguen estando pendientes de mí, apoyándome, aconsejándome y seguimos creciendo juntas, las quiero.

A mis profesores, por ser quienes me compartieron los conocimientos necesarios para mi formación académica; gracias por sus enseñanzas, no solo académicas, sino también de vida.

A la M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su asesoría, por su paciencia y atención durante todo el proceso y por llegar a ser un ejemplo a seguir para mí.

Al Dr. José Guillermo Penieres Carrillo y al Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez, por haber estado pendiente de mí como mis coasesores, por resolver mis dudas y por hacerme sentir parte de su equipo de trabajo; así mismo al Dr. Ricardo Alfredo Luna Mora, por hacerme parte del proyecto.

A la M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez por su gran labor como docente y por la atención brindada durante mi estancia en la FES Cuautitlán, haber sido su alumna fue un gran honor y motivación.

Al resto del jurado de esta tesis, Q. José García Estrada, M. en C. Paola Edith Briseño Lugo y Dr. Fernando Ortega Jiménez, por brindarme su tiempo y atención en cada revisión realizada con el fin de mejorar este trabajo.

A la FES Cuautitlán y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de formar parte de su comunidad, por hacer de la escuela mi segundo hogar y por sus continuos esfuerzos para formar a los universitarios, es un verdadero orgullo ser una de ellos.

Investigación realizada gracias al apoyo a los siguientes programas:

- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**) de la **UNAM IN218515** “**Síntesis de derivados de triazidos de 9-13 miembros, empleando principios de química verde y evaluación de su actividad antimicrobiana**”.
- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**) de la **UNAM IT200915** “**Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelosis del conejo, el distemper canino y la otitis canina**”.
- Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación **PIAPI1618** “**Química Heterocíclica**” de la FES Cuautitlán.
- Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación **PIAPI1632** “**Desarrollo de productos sintéticos y prototipos farmacéuticos a base de propóleo para su aplicación en la salud animal**” de la FES Cuautitlán.

Área de trabajo para el desarrollo de la presente investigación:

- **Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica** de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, UNAM, bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. GENERALIDADES	12
2.1 <i>Escherichia coli</i>	12
2.1.1 Características morfológicas	13
2.1.2 Características bioquímicas	14
2.1.3 Infecciones entéricas causadas por <i>Escherichia coli</i>	17
2.1.3.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	17
2.1.3.2 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	19
2.1.3.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	20
2.1.3.4 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	21
2.1.3.5 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC/STEC)	23
2.1.3.6 <i>Escherichia coli</i> adherencia difusa (DAEC)	24
2.1.4 Infecciones extraintestinales causadas por <i>Escherichia coli</i>	27
2.1.5 Diagnóstico	28
2.2 Antimicrobianos	31
2.3 Resistencia bacteriana a los antimicrobianos	36
2.4 Métodos para determinar la actividad antimicrobiana	36
2.5 Introducción de nuevos compuestos antimicrobianos	37
2.5.1 Benzimidazoles, pirazoles y piridazinas	37
2.5.2 Hidrazidas	39
3. HIPÓTESIS	40
4. JUSTIFICACIÓN	41

5. OBJETIVOS	42
5.1 Objetivo general	42
5.2 Objetivos particulares	42
6. PARTE EXPERIMENTAL	43
6.1 Diseño experimental	43
6.2 Materiales y métodos	44
6.3 Preparación de los discos para los compuestos orgánicos y DMSO	44
6.4 Preparación de los medios de cultivo	49
6.5 Acondicionamiento de la cepa	50
6.6 Metodología: Difusión radial en disco	50
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
8. CONCLUSIONES	75
9. BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i> .	16
Tabla 2.	Características más importantes de los grupos de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea.	26
Tabla 3.	Secuencias de oligonucleótidos y sondas empleadas en el diagnóstico de <i>Escherichia coli</i> .	30
Tabla 4.	Principales grupos de antimicrobianos y representantes de éstos.	33
Tabla 5.	Compuestos orgánicos a evaluar para determinar su efecto antibacteriano	45
Tabla 6.	Resultados de los halos de inhibición producidos a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 con antibióticos del sistema de Multidiscos combinado BIORAD, aplicado como control positivo.	53

Tabla 7.	Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo A.	57
Tabla 8.	Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo B.	61
Tabla 9.	Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo C.	63
Tabla 10.	Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo D.	65
Tabla 11.	Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo E.	67
Tabla 12.	Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo G.	69

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con el Multidisco® <i>BIORAD</i> , como control positivo.	54
Gráfica 2.	Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo A y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.	58
Gráfica 3.	Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo B y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.	62
Gráfica 4.	Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo C y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.	64
Gráfica 5.	Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo D y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.	66
Gráfica 6.	Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo E y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.	68

Gráfica 7.	Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo G y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.	70
------------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Escherichia coli</i> teñida con la técnica de Gram y vista en el microscopio óptico con aumento 100x.	13
Figura 2.	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .	14
Figura 3.	Pruebas bioquímicas realizadas para <i>Escherichia coli</i> .	15
Figura 4.	Sitios de acción de los antimicrobianos.	32
Figura 5.	Estructura de: A)1, 3-Azoles y B)1, 2-Azoles.	37
Figura 6.	Estructura de: A) Benzo[d][1, 3] azoles, B) Benzo[d][1, 2] azoles y C) Benzo[c][1,2] azoles.	38
Figura 7.	Estructura de las diferentes diazinas.	39
Figura 8.	Estructura general de las hidrazidas.	39
Figura 9.	Diagrama del diseño experimental.	43
Figura 10.	Patrón de distribución de los discos en el medio de cultivo.	51
Figura 11.	Antibiograma realizado como control positivo.	52
Figura 12	Trimetoprim (TMP) – Sulfametoxazol (STX).	59
Figura 13	Estructura de Gentamicina.	71
Figura 14	Estructura de la vitamina B12.	73

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A/E:	Attaching/effacing (adherencia/destrucción)
AAF/I:	Aggregative adherence fimbria I (fimbria I de adherencia agregativa)
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
Aepec:	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena atípica
AK:	Amikacina
AM:	Ampicilina
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt:	Ácido ribonucleico de transferencia
ATCC:	American Type Culture Collection
BFP:	Bundle-forming pili (Pili con forma rizada)
CBM:	Concentración bactericida mínima
CF:	Cefalotina
CFA:	Colonization factor antigenic (factor de colonización antigénico)
CFs:	Colonization factors (factores de colonización)
CH:	Colitis hemorrágica
CID:	Coagulación intravascular diseminada
CIM:	Concentración inhibitoria mínima.
CL:	Cloranfenicol
CLSI:	Clinical & Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)
CRO:	Ceftriaxona
CTS:	Caldo Tripteína de Soja
DAEC:	Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> adherencia difusa)
DC:	Dicloxacilina
DEC:	Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> diarreigénico)
DHP:	Dihidropterina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
Dmtp:	Dimethyl triphosphate (Dimetil trifosfato)
E:	Eritromicina
EAEC:	Enteroadgregative <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa)
EAF:	EPEC adherence factor (Factor de adherencia de EPEC)

EHEC:	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica)
EIEC:	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva)
EMB Agar:	Eosin-Methyl blue (Agar Eosina-Azul de metileno)
ENX:	Enoxacina
EPEC:	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> enteropatógena)
ETEC :	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica)
ExPEC:	Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> extraintestinal)
GE:	Gentamicina
HeLa:	Henrietta Lacks; células de carcinoma cérvico-uterino
Hep-2:	Human invasión type 2; células de epitelio humano tipo 2
Ial:	Invasion-associated locus (fragmento del locus asociado a invasividad)
Ipa:	Invasion plasmid antigen (Antígeno invasión de invasión)
IVU:	Infección de vías urinarias
K/K:	Kalium/kalium (alcalino/alcalino)
KCN:	Cianuro de potasio
LIA:	Lysine Iron Agar (Agar Hierro Lisina)
LPS:	Lipopolisacáridos
LT:	Heat-labile toxin (Toxina termo lábil)
mg:	miligramo
ml:	mililitro
mm:	milímetros
NaCl:	Cloruro de sodio
NET:	Netilmicina
NMEC:	Neonatal meningitis <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> de la meningitis neonatal)
OMP:	Out membrane protein (Proteína de membrana externa)
ONPG:	Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopiranoside (Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido)
PABA:	Para aminobenzoic acid (ácido para aminobenzoico)
PCR:	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PE:	Penicilina
Pet:	Plasmid encoded toxin (Toxina codificada por plásmido)
PG:	Peptidoglucano
Pic:	Protein involved in colonization (Proteína involucrada en la colonización)
pInv:	Plasmid Invasion (Plásmido de invasión)
R:	Resistente

RAM:	Resistencia antimicrobiana
S:	Sensible
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
SIM:	Sulfide Indole Motility (Sulfuro Indol Motilidad)
SMAC:	Agar MacConkey con sorbitol
ST:	Heat-stable toxin (Toxina termo estable)
Stall:	Heat-stable toxin II (Toxina termo estable II)
STEC:	Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga)
STI:	Heat-stable toxin I (Toxina termo estable I)
STx:	Shiga toxin (Toxina Siga)
STX:	Sulfametoxazol
Stx1:	Shiga toxin 1 (Toxina Siga 1)
Stx2:	Shiga toxin 2 (Toxina Siga 2)
SUH:	Síndrome urémico hemolítico
SXT:	Trimetoprim-Sulfametoxazol
Tepec:	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena típica
TMP:	Trimetoprim
TSI Agar:	Triple Sugar Iron Agar (Agar hierro triple azúcar)
U:	Unidades
UPEC:	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> uropatógeno)
Vero:	de “ <i>verda reno</i> ” y “ <i>vero</i> ” que significan “riñón verde” y “verdad” respectivamente; células de riñón de mono verde
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
µg:	microgramo
µl:	microlitro

RESUMEN

En el presente trabajo se evalúan 67 nuevos compuestos derivados de benzimidazoles, hidrazidas, pirazol y piridazina, obtenidos mediante síntesis orgánica, para comprobar si alguno tiene actividad antibiótica efectiva contra *Escherichia coli*, lo cual se determinó a partir de antibiogramas mediante la técnica de difusión radial en disco.

Se utilizaron cultivos de *Escherichia coli* ATCC 8739 en placas de Mueller-Hinton, a partir de resiembras en agar nutritivo del cultivo proporcionado por el Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán, UNAM. Para la evaluación de los compuestos orgánicos, fue necesario disolver cada uno en DMSO y se impregnaron en discos estériles, asegurando una concentración de 40 mg por disco; sin embargo, algunos de los compuestos evaluados no pudieron disolverse a la misma concentración, por lo que fueron descartados en la experimentación. Los resultados obtenidos se compararon con los halos de inhibición obtenidos con antibióticos comerciales, especialmente con Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol, los cuales poseen una actividad antibacteriana mediana y alta, respectivamente, frente a *E. coli* ATCC 8733. Se encontró que de los 67 compuestos orgánicos, A7, C1 y C2, fueron los que presentaron el mejor efecto antibacteriano frente a *E. coli*, es decir, su actividad es comparable con la de Trimetoprim-Sulfametoxazol.

A pesar de haber trabajado todos los compuestos a una misma concentración y no experimentar con otras, se logró determinar cuáles resultaban más efectivos como antibióticos; partiendo de esto se analizaron las estructuras químicas de los compuestos orgánicos para proponer un mecanismo de acción, encontrando la posibilidad de que los tres compuestos de mayor utilidad están relacionados con la interrupción de la síntesis de Vitamina B12, ácido fólico o ambos metabolitos.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen un gran problema de salud pública en la mayoría de los países tanto desarrollados, como en desarrollo y son causa importante de morbimortalidad en infantes e incluso adultos, especialmente por los altos costos que implica para los sistemas de salud por su alta demanda de atenciones ambulatorias y hospitalizaciones.

Uno de los grupos más importantes causantes de enfermedades infecciosas es el de las bacterias. Las bacterias infecciosas se reproducen rápidamente dentro del cuerpo y muchas producen sustancias químicas llamadas toxinas, que pueden dañar los tejidos y así agravar las enfermedades.

Escherichia coli a pesar de ser considerada una bacteria de la microbiota normal del ser humano, ha demostrado tener cepas causantes de enfermedades infecciosas, tal es el caso de las diarreas agudas, infecciones de las vías urinarias, meningitis infecciosa, infecciones pulmonares, entre otras.

El tratamiento de un gran número de infecciones bacterianas radica en la administración de antimicrobianos, sin embargo la problemática por la aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos va en aumento, lo que dificulta a los sistemas de salud la atención a los pacientes; es por este motivo que surge la inquietud de, además de fomentar un uso adecuado de los antibióticos existentes en la población, buscar nuevas moléculas con propiedades antimicrobianas, las cuales posiblemente sean efectivas contra cepas multirresistentes.

2. GENERALIDADES

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, de la familia *Enterobacteriaceae*, pertenece a un grupo de bacterias presentes en el intestino del ser humano y animales¹, forma parte de la microbiota nativa intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño². Sin embargo, hay algunas cepas de *E. coli* productoras de toxinas, llamadas Verotoxinas o toxinas de tipo Shiga, que pueden causar cuadros gastrointestinales graves en el ser humano¹; las infecciones producidas por *E. coli* pueden estar limitadas a mucosas o bien, diseminarse. Algunos de los síndromes clínicos que pueden ser causados por cepas patogénicas son la infección de vías urinarias (IVU), sepsis, meningitis y enfermedad diarreica².

El genoma de esta bacteria consta de una sola cadena en espiral de ADN², sin embargo, sólo el 20% de éste, aproximadamente, es común para todas las cepas de *E. coli* conocidas, lo que hace que sea una bacteria con gran diversidad fenotípica y genética. A *E. coli* se le ha podido subdividir en serotipos, que están basados en los antígenos de superficie: antígeno O, un lipopolisacárido de membrana; antígeno H, flagelina y antígeno K, además de la presencia de cápsula, por ejemplo el O157:H7 clasifica a la cepa más virulenta³.

Las cepas de *E. coli* productoras de diarreas se clasifican en 6 categorías:

- *E. coli* enteropatógena (EPEC)
- *E. coli* enterohemorrágica o productora de toxina Shiga (EHEC O STEC, por sus siglas en inglés)
- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

- *E. coli* adherencia difusa (DAEC), la cual tiene sus variantes de adherencia localizada.

El serotipo O157:H7 es el prototipo de la categoría STEC al que se le atribuyen la mayoría de los grandes brotes⁴.

Por otro lado existen también cepas no patógenas de *E. coli*, las cuales son de gran importancia en la industria de la microbiología e ingeniería biológica moderna, debido a su fácil manipulación para la producción de proteínas recombinantes de uso humano mediante biotecnología³. Lo antes mencionado hace a *E. coli* una bacteria de gran importancia para el ser humano, ya que puede ser tanto beneficiosa, como perjudicial y estudiarla nos da un panorama más amplio para entender cómo controlarla o utilizarla.

2.1.1 Características morfológicas

Escherichia coli es una bacteria en forma de bacilo gram negativa, no es esporulada y es anaerobia facultativa. Mide aproximadamente 2.0 micrómetros (μm) de longitud y su diámetro es 0.25-1.0 μm (Figura 1). Estas cepas son móviles al tener flagelos, los cuales se encuentran en una conformación peritrica³. *E. coli* tiene la capacidad de formar fimbrias y pilis y muchas de sus cepas producen una pequeña microcápsula, otras pocas elaboran macrocápsula².

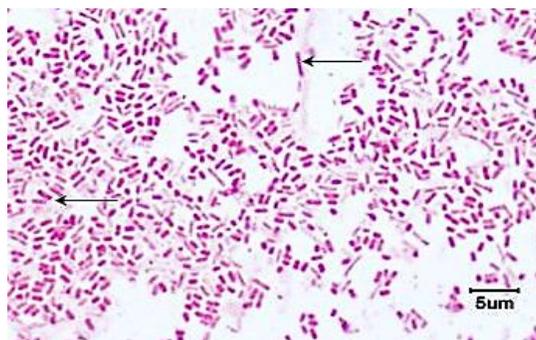


Figura 1. *Escherichia coli* teñida con la técnica de Gram y vista en el microscopio óptico con aumento 100x.⁵

2.1.2 Características bioquímicas

Los 37 °C son la temperatura óptima de crecimiento y multiplicación para *E. coli*, aunque existen muy pocas cepas de laboratorio que pueden crecer aún a temperaturas cercanas a los 49 °C. La multiplicación puede ser impulsada por la utilización de una gran cantidad de reacciones *redox* que implican la reducción de sustratos como el oxígeno, fumarato, N-óxido de trimetilamina y dimetilsulfóxido, además de oxidación de sustancias como ácido fórmico, ácido pirúvico, aminoácidos e hidrógeno³. Pueden crecer aún en medios con altas concentraciones de sales, por ejemplo en presencia de NaCl al 6%, ya que son más resistentes a estos compuestos que otras bacterias¹. En los diferentes medios en los que crecen mostrarán diferentes características coloniales dependiendo de la composición de estos; en la Figura 2 se ejemplifican dos de los medios más utilizados habitualmente.

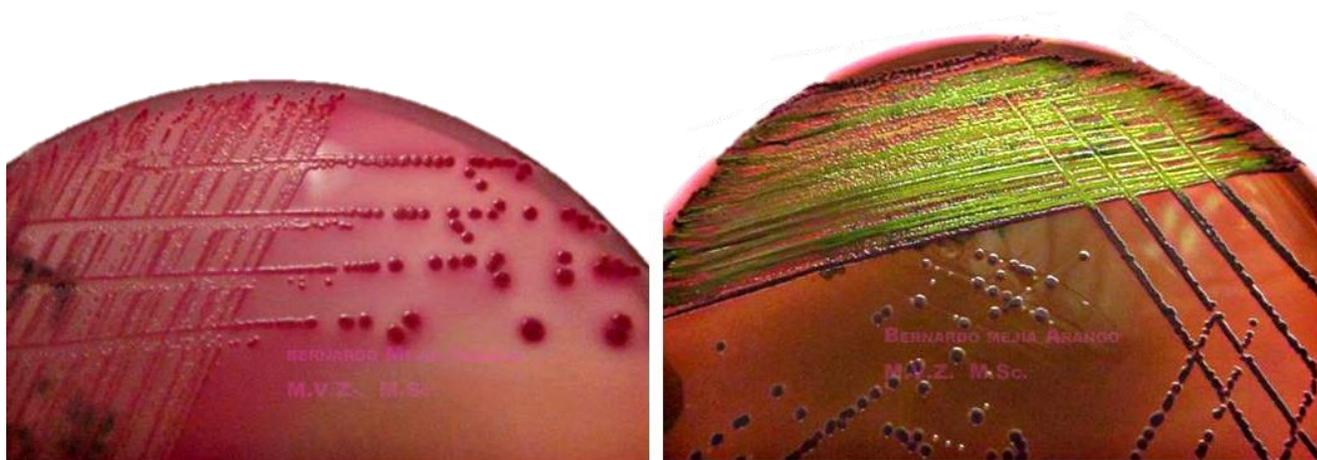


Figura 2. Crecimiento de *Escherichia coli*. Agar Mac Conkey (izquierda, colonias rosadas y circulares que indican lactosa positiva); Agar EMB (derecha, se observa su característico tono verde metálico)⁵.

En el ciclo de vida de *Escherichia coli*, hay una división de una célula en dos células hijas. Este proceso es conocido como fisión binaria. Bajo algunas circunstancias, si es que no se produce mutación, las células hijas son idénticas genéticamente a la célula madre y por lo tanto, hay “duplicación local” de la población de *E. coli*³.

E. coli es versátil, está adaptado a las características del hábitat y puede crecer en un medio con glucosa como única fuente orgánica. Puede crecer en presencia o ausencia de O_2 y bajo condiciones anaeróbicas puede proliferar por fermentación, produciendo una mezcla de ácidos y gas como productos finales. Puede también crecer por medio de una respiración anaeróbica ya que es capaz de utilizar NO_3 , NO_2 o fumarato como aceptores finales de electrones mediante procesos respiratorios de transporte de electrones⁷. Esta bacteria tiene información genética en los plásmidos que son responsables por la producción de toxinas y la resistencia a los antimicrobianos². Las principales características bioquímicas de esta bacteria se ejemplifican en la Figura 3 y se encuentran resumidas en la Tabla 1.

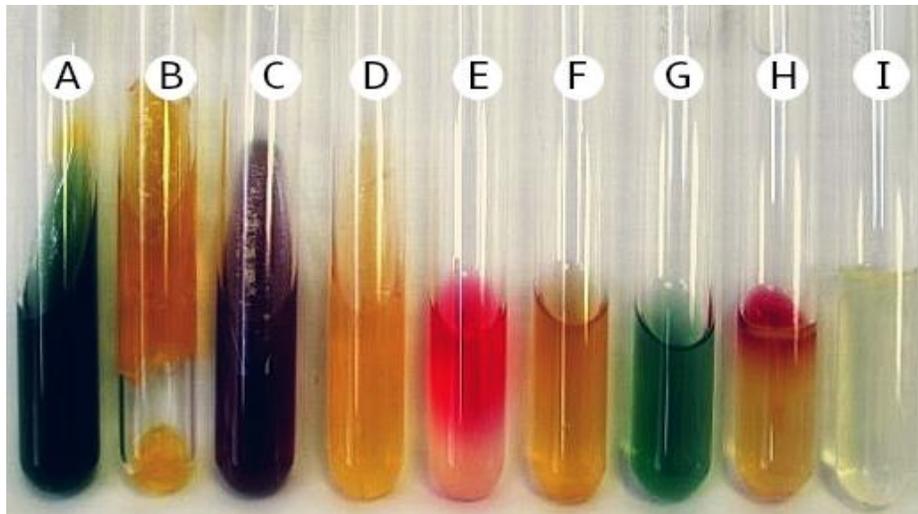


Figura 3. Pruebas bioquímicas realizadas para *Escherichia coli*. A) Citrato negativo; B) TSI ácido/ácido con gas, H_2S negativo; C) LIA K/K, Lisina positiva; D) Urea negativa; E) Rojo de Metilo positivo; F) Vogues Proskauer negativo; G) Malonato negativo, H) Indol positivo; I) Motilidad positiva⁸.

Tabla 1. Identificación bioquímica de *Escherichia coli* ⁹.

Prueba bioquímica	% positividad	Prueba bioquímica	% positividad	Prueba bioquímica	% positividad
Oxidasa	0	Hidrólisis de gelatina 22 °C	0	Fermentación de D-xilosa	95
Producción de indol	98	Crecimiento en KCN	3	Fermentación de trealosa	98
Rojo de metilo	99	Fermentación de lactosa	95	Fermentación de celobiosa	2
Voges-Proskauer	0	Fermentación de la sacarosa	50	Fermentación de eritritol	0
Citrato de Simmons	1	Fermentación de D-manitol	98	Hidrólisis de la esculina	35
H ₂ S (TSI)	1	Fermentación de D-sorbitol	94	Fermentación de melobiosa	75
Hidrólisis de urea	1	Fermentación de mucato	95	Fermentación de D-arabitol	5
Utilización de malonato	0	Fermentación de salicina	40	Fermentación de D-manosa	98
Acido de glucosa	100	Fermentación de adonitol	5	Fermentación de glicerol	75
Gas de glucosa	95	Fermentación de rafinosa	50	Nitrato a nitrito	100
Fenilalanina desaminasa	0	Fermentación de inositol	1	Tartrato de Jordán	95
Lisina descarboxilasa	90	Fermentación de L-arabinosa	99	Utilización de Acetato	90
Arginina dehidrolasa	17	Fermentación de dulcitol	60	Lipasa (aceite de maíz)	0
Ornitina descarboxilasa	65	Fermentación de L-ramnosa	80	Dnasa a 25 °C	0
Movilidad a 36 °C	95	Fermentación de maltosa	95	ONPG	95

2.1.3 Infecciones entéricas causadas por *Escherichia coli*

Se han descrito 8 categorías distintas (patotipos o patovares), los cuales están clasificados dentro de *E. coli* diarreigénico (DEC) o *E. coli* extraintestinal (ExPEC). Dos patotipos son extraintestinales, *E. coli* uropatogénico (UPEC) y *E. coli* de la meningitis neonatal (NMEC). Los otros 6 patotipos corresponden a los DEC⁷, los cuales fueron mencionados anteriormente: EPEC, STEC, EHEC, EIEC, EAEC y DAEC. La patogenia varía dependiendo del patotipo de *E. coli* que esté causando la infección, a continuación se describe brevemente lo que causa cada uno.

2.1.3.1 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Se utiliza el término *E. coli* enteropatógena (EPEC) para designar a cepas de *E. coli*, relacionadas epidemiológicamente con la diarrea infantil y diferenciarlas de las cepas de *E. coli* de la microbiota normal. En 1987, la Organización Mundial de la Salud definió como EPEC a cepas de *E. coli* pertenecientes a 12 grupos con diferente antígeno somático O:O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O158. En la actualidad, el patotipo EPEC se divide en EPEC típico (Tepec) y EPEC atípico (Aepec). Esta clasificación se basa en la presencia del factor de virulencia EAF (del inglés, *EPEC adherence factor*) presente en Tepec y ausente en Aepec^{7,10}.

Epidemiología. Estudios realizados en todo el mundo han demostrado que las cepas Tepec están fuertemente asociadas con diarrea en niños menores de un año de edad. La frecuencia de infección por Tepec disminuye con la edad; sin embargo, las cepas de Aepec se detectan con frecuencia en distintos grupos etarios, principalmente en pacientes adultos con VIH-SIDA. Se ha demostrado que cepas de Tepec son difícilmente encontradas en animales, mientras que con Aepec sucede lo contrario^{3,5,7}.

Patología. La infección por EPEC varía desde una portación subclínica a una infección fatal: puede inducir abundante diarrea secretora con moco pero sin sangre, con pérdidas importantes de líquidos y electrolitos en las heces. Se observan también vómitos y fiebre leve; puede conducir a una mala absorción de nutrientes dando lugar a la desnutrición. La presencia de la lesión característica en las células intestinales conocida como A/E (del inglés, attaching/effacing), de adherencia y borrado de las microvellosidades, parece estar asociada con la secreción de fluidos y el desarreglo del sistema de enzimas digestivas; morfológicamente se forma una estructura en forma de pedestal, rica en actina sobre la cual se adhieren las bacterias EPEC^{3,7}. La patogenia incluye tres pasos:

- a) adherencia de los microorganismos a los enterocitos,
- b) inducción de una señal de transducción en los enterocitos y,
- c) desarrollo de adherencia íntima con los enterocitos¹⁰.

Después de la infección por EPEC se ha observado edema, infiltración de neutrófilos y reducción de la actividad enzimática en la mucosa intestinal⁷.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento. La terapia de rehidratación oral es el tratamiento más eficaz, los niños con infección por EPEC que no responden a esta terapia, requieren hospitalización. La terapia con antibióticos sólo se recomienda para los casos más graves o en casos de diarrea persistente asociada con Aepc^{5, 7, 10}, utilizando principalmente aminoglucósidos, gentamicina, colimicina, neomicina, trimetoprim-sulfametoxazol y subsalicilato de bismuto².

2.1.3.2 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

E. coli enterotoxigénica, se asocia a casos de diarrea en adultos, considerándose como una causa importante de diarrea en el viajero adulto de los países desarrollados y en niños en los países en desarrollo⁷.

Epidemiología. ETEC se detecta con mayor frecuencia entre los viajeros que visitan América Latina y el Caribe en comparación con aquellos que viajan a África o Asia. La colonización y la diarrea asociada a ETEC disminuyen con las estadías prolongadas. Se estima que anualmente es responsable de 200 millones de casos de diarrea en todo el mundo con aproximadamente 150,000 muertes⁷. En México la mayor incidencia es en los meses de abril a julio. Se transmite normalmente a través de agua y alimentos y es más común en el verano; el reservorio principal es el humano².

Patogenia. La diarrea asociada a la infección por ETEC, de característica acuosa sin sangre ni moco, se presenta en forma profusa con un corto período de incubación (14 a 50 h)⁷, en el que se percibe distensión abdominal². Fiebre y vómitos se presentan con muy baja frecuencia. La diarrea puede ser leve, breve y autolimitarse o puede resultar severa como la observada en las infecciones graves por *V. cholerae*. Antes de producir diarrea, las cepas ETEC deben adherirse a las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado a través de una interacción mediada por adhesinas proteicas conocidas como factores de colonización (CFs)^{5, 7}, los cuales se encuentran en fimbrias de superficie de la bacteria (pilis) y le permiten evadir los mecanismos de defensa (peristalsis)^{2,10}. Luego de la colonización, produce una o dos enterotoxinas conocidas como LT y ST⁷.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento. El tratamiento de la enfermedad diarreica por ETEC consiste en la corrección y el mantenimiento de la hidratación. No se recomienda la terapia antimicrobiana en niños. Para el tratamiento de la diarrea del viajero, existen numerosos agentes antimicrobianos disponibles; la elección depende de la epidemiología de la región

visitada, los patrones de resistencia microbiana, el perfil de seguridad a los antimicrobianos, y las posibles interacciones esperadas. La rifaximina, las fluoroquinolonas y la azitromicina son los antimicrobianos que se utilizan con mayor frecuencia⁷, además de trimetoprim-sulfametoxazol, loperamida y subsalicilato de bismuto². Aunque no se recomienda de manera rutinaria, la profilaxis con antibióticos es muy eficaz en la prevención de la diarrea asociada a ETEC^{3, 7, 10}.

2.1.3.3 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

E. coli enteroinvasiva (EIEC) causa diarrea acuosa y disentería en los seres humanos. Las cepas de esta categoría, por sus características bioquímicas, genéticas y de virulencia, están muy relacionadas con *Shigella* spp⁷.

Epidemiología. Tanto para EIEC como para *Shigella*, los humanos infectados son considerados el principal reservorio. En estudios de brotes asociados a la infección por EIEC se observó que el patógeno suele ser transmitido por alimentos o agua contaminada, aunque la transmisión persona a persona también ha sido descrita⁷. EIEC afecta a todos los grupos de edad¹⁰. La enfermedad esporádica endémica se presenta en áreas con condiciones sanitarias y de higiene deficientes⁷, la enfermedad diarreica aguda es endémica en los países en desarrollo¹⁰. Los serogrupos O28ac, O29, O112ac, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159, O164 y O167 fueron descritos como los más frecuentes para EIEC⁷.

Patología. Clínicamente, la diarrea por EIEC, se presenta con elevada fiebre y disentería con sangre y pus. El extendido de materia fecal presenta abundantes leucocitos y a veces picocitos, característicos de una diarrea de tipo inflamatorio^{7, 10}. El período de incubación es de 10-18 h¹⁰. EIEC tiene la capacidad de invadir el epitelio del intestino grueso, multiplicándose en las células del enterocito, produciendo ulceración de la mucosa y muerte celular, por tanto,

destrucción de la mucosa intestinal. EIEC que presenta un plásmido *lpa* (del inglés, *invasión plasmid antiger*²¹) cuyos genes están involucrados en la invasión del epitelio intestinal y en la capacidad de diseminarse de célula a célula^{5, 10}.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento. Debe realizarse el tratamiento de sostén mediante la adecuada reposición de líquidos ante la presencia de deshidratación. El tratamiento específico con antibióticos está indicado únicamente en los casos de diarrea grave. La selección del antibiótico a utilizar se realizará según el perfil de sensibilidad de *E. coli* en el área⁷ y es muy importante antes de iniciarlo haber descartado la infección por *E. coli* enterohemorrágica¹⁰ algunos de los más indicados son trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacino¹².

2.1.3.4 *Escherichia coli* enteroagregativo (EAEC)

Escherichia coli enteroagregativo (EAEC) ha sido identificado en niños y adultos en países desarrollados⁷, presentando diarreas agudas¹⁰ y en vías de desarrollo⁷, presentando diarreas agudas y crónicas¹⁰, como así también en turistas que han visitado países en desarrollo. Además de complicaciones como deshidratación y muerte, EAEC puede causar diarrea persistente en sujetos infectados por VIH⁷.

Epidemiología. Las cepas EAEC han sido identificadas en la mayor parte del mundo. Los niños y adultos que viven en países en desarrollo, así como los viajeros que regresan desde esos países son susceptibles a la infección por EAEC (causando entre el 19% y 33% de los casos de diarrea del viajero). En América Latina, las cepas EAEC son aislamientos bacterianos comunes en niños con diarrea y han sido identificadas en Colombia, México, Guatemala, Brasil, Chile, Perú, Argentina, Ecuador y Jamaica². En esta categoría están descritos al menos 90 serotipos; O44, O86 y O126 son predominantes. Se ha encontrado que los animales infectados

con EAEC, no son reservorio de esta bacteria como los humanos, pero si son fuente de transmisión⁷.

Patología. El conocimiento sobre la patogénesis de EAEC es muy escaso. La localización de la infección en el tracto gastrointestinal no está bien definida. Los estudios realizados sobre muestras obtenidas por endoscopía intestinal muestran que EAEC se puede localizar en yeyuno, íleon y epitelio del colon. Además de las complicaciones agudas de la diarrea como la deshidratación, EAEC también puede causar diarreas persistentes que pueden dar lugar a desnutrición y retraso del crecimiento⁷; las cepas EAEC se adhieren a la mucosa intestinal y favorecen la producción de moco, atrapando a las bacterias en esta película mucosa^{2,3}, la cual tiene una apariencia de “pared de ladrillos apilados”⁷.

La adherencia de EAEC está mediada principalmente por una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I), aunque también se ha descrito la fimbria AAF/II¹³. Las cepas EAEC producen efectos citotóxicos como vesiculación de las microvellosidades, apertura ampliada de las criptas y el aumento de la extrusión celular del epitelio⁷.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento. Al igual que con todos los demás enteropatógenos, el apoyo principal para el tratamiento es la rehidratación, preferiblemente oral, seguida por la incorporación de los alimentos según su tolerancia. La decisión de usar terapia con antibióticos debe hacerse tomando en cuenta la edad de la persona, la región del mundo donde la infección fue adquirida y los patrones locales de sensibilidad a los antimicrobianos^{7,10}. El tratamiento antibiótico óptimo aún no ha sido determinado, ya que hay algunas cepas resistentes con alta prevalencia², otras cepas son sensibles a las fluoroquinolonas, a la azitromicina y a la rifaximina⁷.

2.1.3.5 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC/STEC)

El principal factor de virulencia de las cepas EHEC es la producción de potentes citotoxinas con efecto citopático sobre las células HeLa (células de carcinoma cérvico-uterino) y Vero (células de riñón de mono verde), reconocida como “Toxina tipo Siga” (STx)² o Verotoxina; las cepas EHEC capaces de producirla son llamadas *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC)¹³. STEC es considerada un patógeno emergente transmitido por alimentos, asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). *Escherichia coli* O157:H7 es el prototipo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico⁷.

Epidemiología. EHEC es uno de los patógenos más frecuentes en los casos de diarrea con sangre. El principal reservorio es el tracto digestivo del ganado vacuno y la carne contaminada. La transmisión más importante es por agua, alimentos o de persona a persona². En América Latina, las infecciones por STEC son endémicas y contribuyen a la carga del síndrome diarreico agudo en niños menores de 5 años de edad. Las enfermedades asociadas a STEC representan un grave problema de Salud Pública, por lo que la Organización Mundial de la Salud ha lanzado múltiples llamados sobre la importancia de promover y adoptar estrategias en la prevención y el control de las infecciones por este microorganismo⁴. Se ha demostrado que las niñas son más propensas a enfermar que los niños por STEC, además muestra una variación estacional, con aumento de casos en primavera y verano¹⁰.

Patología. Se asocia a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, el cuadro clínico de la CH¹³. En las infecciones por STEC, el período de incubación promedio es de 3 días (con un rango de 1-8 días). Los primeros 2 días se presenta diarrea sin sangre; la colitis hemorrágica se presenta a los 4 a 6 días. Aunque en la mayoría de los casos, la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente del 5 al 10% de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe un tratamiento específico, sino

de sostén⁷, este es caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática¹³. Entre los factores predictivos de evolución a SUH se incluyen: edades extremas, leucocitosis y tratamiento con agentes reductores de movilidad intestinal o antidiarreicos^{7,10}.

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, por lo que la citotoxina Stx es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC; se han encontrado las variantes Stx1 y Stx2 que son inmunológicamente diferentes. Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno A/E, y codifica una proteína de membrana externa (OMP), llamada intimina¹³, la cual es un factor potencial de adherencia, específicamente en colon².

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento. Hasta el presente no existe una terapia específica para las infecciones por STEC. Si bien, *E. coli* O157 es sensible a la mayoría de los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados, aún no se confirmó que la antibiótico-terapia aporte algún beneficio para el paciente⁷. Algunos autores describen que dicho tratamiento aumenta la producción de la toxina Shiga y, en algunos estudios en niños se ha visto que aumenta la incidencia de SHU¹⁰. Por ejemplo, trimetoprim-sulfametoxazol estimula la liberación de Stx *in vitro*. El tratamiento está basado en el control de las alteraciones fisiopatológicas^{7,10}. El empleo de la fosfomicina se ha asociado con la disminución del riesgo de presentar SUH².

2.1.3.6 *Escherichia coli* adherencia difusa (DAEC)

Estas cepas de *Escherichia coli* fueron clasificados en una categoría diferente a las cepas enteroagregativas debido a que en cultivos de células Hep-2 (células de epitelio humano tipo 2) las bacterias se observan difusas sobre la superficie, con poca agregación². Los serogrupos O predominantes son O75, O15 y O126¹⁰.

Epidemiología. El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años¹³. Se desconocen las razones por la predilección de la edad y los mecanismos de transmisión. Se ha reportado en pacientes hospitalizados en Francia, por lo que se supone un patógeno de importancia en los países desarrollados².

Patología. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos¹³, sin embargo, no se conoce una descripción clínica satisfactoria². Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa¹³, en algunos estudios se sugiere la posibilidad de que las bacterias DAEC provocan la acumulación de actina y por ende el daño o lesión, además de que promueven el desensamblaje de F-actina, villina y fimbrina, que son proteínas que desempeñan papeles clave en las microvellosidades¹⁴.

Sensibilidad a los antibióticos y tratamiento. El tratamiento consiste en la reposición de las pérdidas por un adecuado aporte con soluciones orales. No se ha evaluado la eficacia del tratamiento antibacteriano. El subsalicilato de bismuto reduce la duración de la diarrea y el número de deposiciones, no se recomienda el uso de rutina¹⁰.

A manera de resumen, en la Tabla 2 se muestran las principales características de los patotipos de *Escherichia coli* descritos con anterioridad.

Tabla 2. Características más importantes de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea¹⁵.

Grupo	Síntomas clínicos	Epidemiología	Serogrupos y serotipos más comunes		Factores de patogenicidad
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9 O15:H11 O20:H- O25:H-	O27:H7 O78:H12 O148:H28 O159:H20	ST y LT CFA
EHEC	SUH, CH, diarrea con o sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito	Niños y adultos que la adquieren, por comer carne cruda o mal cocida o beber agua contaminada	O157:H7 O26:H11 O103:H2 O113:H21	O119 O128 O145	Stx1 y Stx2 A/E Intimina Po157
EIEC	Diarrea con moco y sangre, o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico	Niños menores de seis meses	O28:H O112ac:H- O144:H- O152:H- O164:H- O167:H-		Invasividad Plásmido Ipa
EPEC	Diarrea aguda con moco, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años. Adultos infectado por VIH.	O55 O86 O142 O111:H- O127		A/E, BFP(Pilis/ fimbrias de adherencia) Plásmido EAF (codifica para BFP)
EAEC	Diarrea líquida con moco sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de dos años, adultos viajeros a países endémicos	O44:H18 O86 O126		Fimbria AAF1 y II Proteínas Pet (efecto citopático en Hep-2) y Pic (Proteasa)
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27		Fimbria F1845

LT= toxina termolábil
 ST= toxina termo estable
 CFA= factor de colonización antigénico
 BFP= pili con forma rizada

EAF= factor de adherencia de EPEC
 Stx= toxina Shiga
 Ipa= Antígeno plasmidico de invasión

2.1.4 Infecciones extraintestinales causadas por *Escherichia coli*

Infecciones urinarias. Si bien el sitio más importante de colonización normal de las enterobacterias es el tracto gastrointestinal, el sitio más común de infección es el tracto urinario. *E. coli* es la causa más frecuente de infección urinaria. Las cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC) tienen más probabilidades que las cepas fecales de generar fimbrias P que se unen a los receptores de glucolípidos en la superficie de las células hospederas, de encapsularse, de producir la toxina citolítica hemolisina y de tener múltiples sistemas de adquisición de hierro. Dada su alta incidencia y el empleo de antibióticos que suponen, las IVU por *E. coli* tienen gran relevancia socioeconómica y sobre la generación de resistencias antibióticas¹⁰.

Infecciones del sistema nervioso central. Los neonatos, durante su primer mes de vida están particularmente predispuestos a la meningitis bacteriana. *E. coli* y los estreptococos del grupo B son responsables de la mayoría de los casos. Las cepas aisladas de pacientes con meningitis neonatal tienen más probabilidades que las cepas fecales de producir la cápsula K1 que dota a la bacteria de mayor resistencia frente al suero y frente a la fagocitosis. En la población adulta la meningitis por *E. coli* se observa asociada a: a) inmunodepresión, b) edad superior a 60 años y c) manipulación quirúrgica previa^{10,13}.

Otras infecciones. *E. coli* es el patógeno causante de las tres cuartas partes de las bacteremias por gram negativas de la comunidad. Es posible que la característica distintiva de la bacteriemia por gram negativas sea la reacción sistémica a la endotoxina o a los LPS que a veces conducen a respuestas potencialmente fatales como el “*shock*”, la coagulación intravascular diseminada (CID) y el consumo de factores del complemento. También se han recuperado cepas de *E. coli* en casos de artritis séptica, endoftalmítis, tiroiditis supurada, abscesos intraabdominales, peritonitis bacteriana espontánea, abscesos hepáticos, abscesos

cerebrales, endocarditis, osteomielitis, prostatitis, sinusitis, tromboflebitis séptica y otras enfermedades^{10, 16}.

2.1.5 Diagnóstico

Para el aislamiento, la identificación y la caracterización de cepas de *E. coli* se aplican métodos tradicionales, métodos *in vivo* e *in vitro* y de biología molecular¹³.

El método tradicional es el aislamiento de la bacteria, tomada directamente de materia fecal o con hisopo rectal¹³, se recomienda: a) recolectar la materia fecal lo antes posible después del establecimiento de la diarrea; b) el paciente no debe estar con tratamiento antibiótico; c) recolectar la muestra después de suspender la antibiótico-terapia por no menos de 48 h⁷. Después se siembra en una placa de agar MacConkey u otro medio selectivo por estría cruzada; después se incuba a 37 °C durante 18- 24 h. Posteriormente se seleccionan de 5 a 10 colonias típicas de *E. coli* lactosa positivas (Lac+). En muestras provenientes de casos de diarrea con sangre se deben seleccionar también cepas lactosa negativa (Lac-), que pudieran ser EIEC. La identificación se hace mediante pruebas bioquímicas en tubo¹³, las cuales se mostraron anteriormente en la Tabla 1.

La demostración de la producción de las toxinas LT y Stx de *E. coli* se puede realizar por un modelo *in vitro* que permita observar el efecto citopático en cultivo de células Vero o HeLa. Para ello, se requiere sembrar la cepa pura aislada en medio de Craig e incubar 24 h a 37 °C, posteriormente por filtración se separan las bacterias del sobrenadante que contiene la toxina, y se adicionan 20 mL de este a cultivos celulares confluentes; la toxina y las células se dejan en contacto hasta observar la aparición de un efecto citotónico (células alargadas) en el caso de toxina LT o bien efecto citotóxico (células redondas y muertas) debido a la toxina Stx¹³.

Para la identificación de las cepas de *E. coli* por técnicas de biología molecular, se siembra la materia fecal en Agar MacConkey con sorbitol (SMAC) en forma directa y luego del enriquecimiento en: a) Caldo Tripteína de Soja (CTS a 37 °C por 6 h), b) CTS con Cefixima y c) CTS con Telurito de potasio (a 37 °C por 6 h). Luego de la incubación de las placas de agar MAC y SMAC a 37 °C por 18 h se realiza la observación de la morfología y de las características fenotípicas y se toma una muestra de colonias Lac+, Lac-, sorbitol+ y sorbitol- de cada placa para la extracción de ADN para la realización diferentes ensayos de PCR que se utilizan como técnicas de tamizaje para la identificación de las categorías de *Escherichia coli* diarreigénico⁷, se trata de una hibridación en fase líquida que se da entre el ADN blanco presente en la muestra y el iniciador, que es una secuencia conocida de un fragmento específico de un gen involucrado en la patogenicidad de cepas de *E. coli*¹³.

Otra técnica de biología molecular es el “*colony blot*”, un método de hibridación en fase sólida a partir de sondas, las cuales son fragmentos pequeños de ADN que contienen parte de los genes que codifican para algún factor de virulencia y pueden estar marcadas radiactivamente con ³²P o no radiactivamente con biotina o digoxigenina, es un ensayo muy sensible y específico¹³. En la Tabla 3 se muestran las sondas y secuencias de oligonucleótidos más utilizados en el diagnóstico por biología molecular de *Escherichia coli*.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos y sondas empleadas en el diagnóstico de *Escherichia coli*^{16,17}.

Grupo	Factor de virulencia	Secuencias de oligonucleótidos usadas en PCR*	Secuencias de oligonucleótidos usadas como sondas*
ETEC	STI	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGGCTTGACT CTTCAAAGAGAAAATTAC	GCTGTGAATTGTGTTGTAATCCGCTGTGAAC TTTGTTGTAATCC
	Stall	TTGTCTTTTTTCACCTTTCCACAAGCAGGATT ACAACACA	
	LT	GGCGACAGATTATACCGTGCCCGAATTCTGT TATATATGTC	GCGAGAGGAACACAAACCGG
EHEC	Stx1	TTTACGATAGACTTCTCGACCACATATAAATT ATTTGCTC	GATGATCTCAGTTGGGCGTTC
	Stx2	CCCAGTCACGACGTTGTATATACTATCGTGC GTTTCCA	TCTGAAACTGCTCCTGTGTA
EIEC	<i>ial</i>	CTGGATGGTATGGTGAGGGGAGGCCAACAA TTATTTCC	CCATCTATTAGAATACCTGTG
EPEC	EAF	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAATATGGGGAC CATGTATTATCA	TATGGGGACCATGTATTATCA
	BFP (Pilis/ fimbrias de adherencia)	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGCGCCGCTTTAT CCAACCTGGTA	GCTACGGTGTTAATATCTCTGGCG
EAEC	Plasmido codificador de Pet y Pic	CTGGCGAAAGACTGTATCATCAATGTATAGA AATCGCTGTT	

NOTA: Para el grupo DAEC aún no se ha descrito una sonda específica y sensible

* Las secuencias están escritas en la dirección 5' a 3'

LT= toxina termolábil
ST= toxina termo estable
BFP= pili con forma rizada

Stx= toxina shiga (Tipo 1 y tipo 2)
ial = fragmento del locus asociado a invasividad presente en plnv
EAF= factor de adherencia de EPEC

2.2 Antimicrobianos

Se definen como sustancias químicas que impiden el desarrollo o favorecen la muerte de un microorganismo. Pueden ser:

- Desinfectantes: eliminan la viabilidad microbiana y son aplicables sólo a sistemas inanimados.
- Antisépticos: reducen y controlan la presencia de gérmenes potencialmente patógenos. Aplicables sobre la piel y/o mucosas de humanos y animales.
- Antimicrobianos de uso clínico-terapéutico: capaces de reducir y controlar la presencia de gérmenes que han invadido los tejidos de un individuo¹⁸.

Los antimicrobianos de uso clínico pueden ser moléculas naturales (producidas por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintéticas o semisintéticas; se utiliza el término antibiótico para referirse al subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana. Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo¹⁹.

Hay una amplia diversidad de familias y grupos de antimicrobianos de interés clínico. Los mecanismos por los que los compuestos con actividad antibacteriana actúan dependen del sitio de acción²⁰.

Con excepción de la pared celular, casi la totalidad del resto de los blancos de acción de los antimicrobianos se encuentran también en células eucariotas. Las diferencias estructurales entre las bacterias y las células eucariotas hacen que la afinidad de los antimicrobianos de interés clínico por las dianas procariotas sea mucho mayor que hacia las eucariotas, disminuyendo así el riesgo de efectos adversos²⁰.

Según el espectro de acción los antibacterianos pueden clasificarse en: amplio, aquellos antibióticos que son activos sobre un gran número de especies y géneros diferentes o reducido, antibióticos solo activos sobre un grupo mínimo de especies¹⁹.

Desde el punto de vista molecular, los antimicrobianos de uso clínico ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos²⁰. Los principales grupos de antimicrobianos y sus mecanismos de acción se esquetizan en la Figura 4 y se resumen en la Tabla 4.

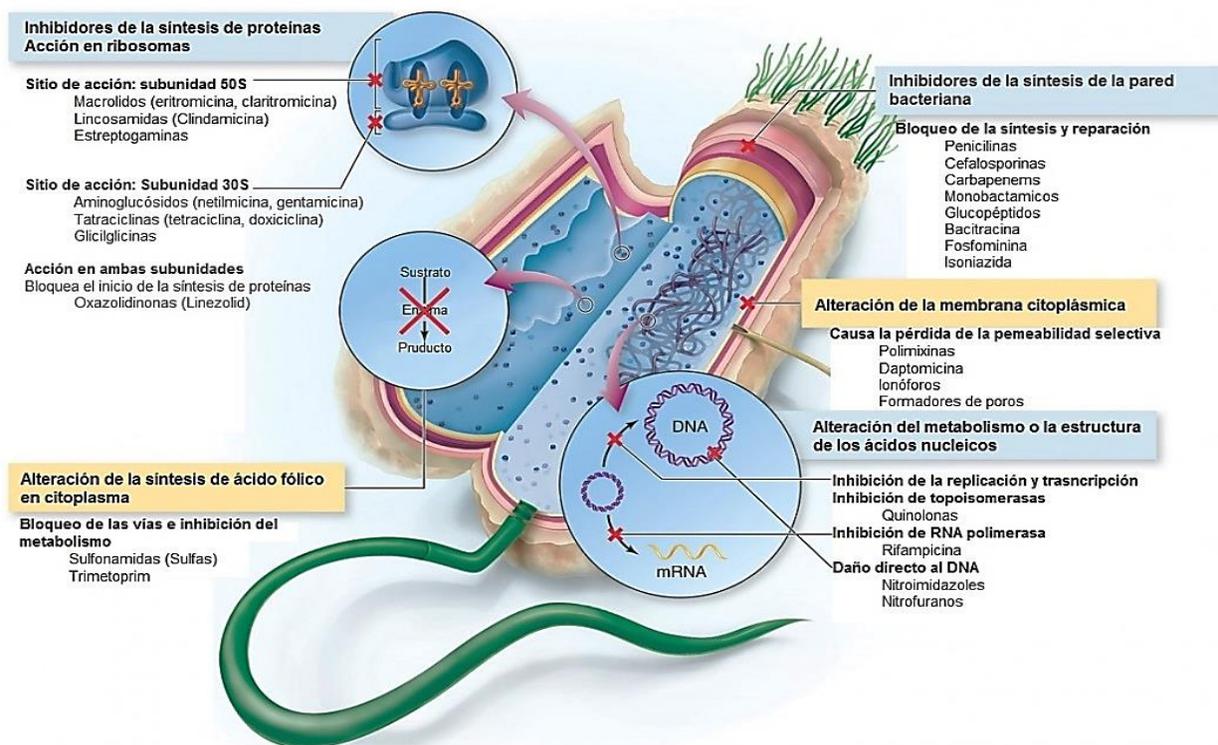


Figura 4. Sitios de acción de los antimicrobianos²¹.

Tabla 4. Principales grupos de antimicrobianos y representantes de éstos²⁰.

Mecanismo de acción	Grupos		Antimicrobianos representativos
<p>Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.</p> <p>Los antibióticos de este grupo necesitan que la bacteria se halle en crecimiento activo, y que el medio en que se sea isotónico o hipotónico, lo que favorece el estallido celular cuando la pared celular se pierde o se desestructura. Suelen ser más activos sobre las bacterias gram positivas por su mayor riqueza en peptidoglucano. Pueden actuar en tres etapas:</p> <p>A) Etapa citoplásmica, donde se sintetizan los precursores del peptidoglucano;</p> <p>B) Transporte a través de la membrana citoplásmica, y</p> <p>C) Organización final de la estructura del peptidoglucano.</p>	<p>B-lactámicos (Actúan sobre etapa C)</p>	<p>Penicilinas</p>	<p>Naturales: penicilina G, penicilina V</p> <p>Resistentes a penicilinasas: cloxacilina, oxacilina, meticilina</p> <p>Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina</p> <p>Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina</p> <p>Ureidopenicilinas: piperacilina, mezlocilina</p>
		<p>Cefalosporinas</p>	<p>1.^a generación: cefazolina, cefalotina</p> <p>2.^a generación: cefuroxima, cefoxitina*, cefotetán*, cefaclor, cefamandol</p> <p>3.^a generación: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima</p> <p>4.^a generación: cefepima, cefpiroma</p>
		<p>Monobactámicos</p>	<p>Aztreonam</p>
		<p>Carbapenems</p>	<p>Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem</p>
	<p>Glucopéptidos (Actúan sobre etapa A y B)</p>	<p>Vancomicina, teicoplanina</p>	
	<p>Bacitracina (Actúa en la etapa B)</p>	<p>Bacitracina</p>	
	<p>Isoxazolidinonas (Actúa en la etapa A)</p>	<p>Cicloserina</p>	
	<p>Fosfonopéptidos (Actúa en la etapa A)</p>	<p>Fosfomicina</p>	

Tabla 4. Principales grupos de antimicrobianos y representantes de éstos²⁰ (Continuación).

Mecanismo de acción	Grupos	Antimicrobianos representativos
<p>Alteración de la membrana citoplásmica. Modifican la permeabilidad, y provocan la Salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Se comportan como bactericidas y pueden tener alta toxicidad sobre las células humanas.</p>	<p>Polimixinas (Aumento de la permeabilidad de la membrana)</p>	<p>Polimixina B, polimixina E (colistina)</p>
	<p>Lipopéptidos (Despolarización de la membrana, salida de iones potasio)</p>	<p>Daptomicina</p>
	<p>Ionóforos (Alteración del gradiente químico)</p>	<p>Tirocidinas</p>
	<p>Formadores poros (Perforación de la membrana)</p>	<p>Gramicidinas</p>
<p>Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos. Por lo general los antibióticos de este grupo no son particularmente selectivos en su acción y tienen cierta toxicidad para las células eucariotas. La mayoría de los antibióticos que actúan sobre el ADN son bactericidas rápidos y normalmente independientes del inoculo y de la fase de crecimiento bacteriano.</p>	<p>Quinolonas (Bloqueo de Topoisomerasa II)</p>	<p>1.^a generación: ácido nalidíxico, ácido pipemídico 2.^a generación: norfloxacin 3.^a generación: ciprofloxacino, levofloxacino 4.^a generación: moxifloxacino, gemifloxacino</p>
	<p>Rifamicinas (Bloqueo de ARN polimerasa subunidad β)</p>	<p>Rifampicina</p>
	<p>Nitroimidazoles (dañan el ADN por oxidación)</p>	<p>Metronidazol, ornidazol, tinidazol</p>
	<p>Nitrofuranos (Acción sobre ADN)</p>	<p>Nitrofurantoína, furazolidona</p>
<p>Inhibidores de β-lactamasas</p>		<p>Ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam</p>

Tabla 4. Principales grupos de antimicrobianos y representantes de éstos²⁰ (Continuación).

Mecanismo de acción	Grupos		Antimicrobianos representativos
<p>Inhibición de la síntesis proteica. Su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos (30S y 50S) y eucariotas (40S y 60S). En esta estructura diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los antimicrobianos. La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática, aunque los aminoglucósidos se comportan como bactericidas.</p>	Ácido fusídico (Inhibidores de la elongación)		Ácido fusídico
	Aminoglucósidos (Inhibidores del inicio de la síntesis proteica)		Gentamicina, tobramicina, ampicacina, netilmicina
	Anfenicoles (Inhibidores de la elongación)		Cloranfenicol, Tiamfenicol
	Estreptograminas (Inhibidores de la elongación)		Quinupristina-Dalfopristina
	Lincosamidas (Inhibidores de la elongación)		Clindamicina, lincomicina
	Macrólidos (Inhibidores de la elongación)		14 átomos carbono: eritromicina, claritromicina, roxitromicina 15 átomos carbono: azitromicina (azálidos) 16 átomos carbono: espiramicina, josamicina, midecamicina Cetólidos: telitromicina
	Mupirocina (Inhibe fase de activación)		Mupirocina
	Oxazolidinonas (Inhibidores del inicio de la síntesis proteica)		Linezolid
	Tetraciclinas (Inhibidores de la fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma)		Tetraciclina, doxiciclina, minociclina
Glicilciclinas (Inhibidores de la fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma)		Tigeciclina	
Quinolonas (Bloqueo de Topoisomerasa II)		1ª generación: ácido nalidíxico, ácido pipemídico	
Bloqueo de la síntesis del ácido fólico.	Sulfonamidas, Diaminopirimidinas	Trimetoprim sulfametoxazol	Cotrimoxazol

2.3 Resistencia bacteriana a los antimicrobianos

La resistencia antimicrobiana (RAM) se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a estas sustancias (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, por ejemplo). Los microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como multirresistentes. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas²².

2.4 Métodos para determinar la actividad antimicrobiana

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, en donde se obtiene un primer resultado como factor predictivo de la eficacia clínica²³. Estos métodos pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos.

- **Métodos cuantitativos** son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).
- **Métodos cualitativos** son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible (S) o resistente (R)¹⁹. El término sensible es muy usado como sinónimo de susceptible. Susceptible significa que un microorganismo es inhibido o muerto en las pruebas *in vitro* por una concentración del antibiótico, accesible en la sangre cuando ese mismo antibiótico se usa *in vivo*¹⁸.

2.5 Introducción de nuevos compuestos antimicrobianos

En las últimas dos décadas se ha observado un incrementado en la incidencia de infecciones, lo cual es debido fundamentalmente al aumento de personas con factores de riesgo para padecerlas y a su vez, a la aparición de cepas multirresistentes, como ya se ha mencionado. Esto ha llevado a la creación de nuevas formulaciones antimicrobianas, investigando otras líneas de compuestos, en este caso benzimidazoles, hidrazidas, pirazoles y piridazinas.

2.5.1 Benzimidazoles, pirazoles y piridazinas.

Uno de los grupos procedentes de los compuestos en estudio es el de los azoles; estos compuestos han sido utilizados principalmente como antifúngicos desde hace varias décadas. La mayoría de las rutas sintéticas están basadas en obtener primero un compuesto de tipo 1,4-dicarbonílico y su posterior ciclación en medio ácido²⁴. Los heterociclos aromáticos de cinco átomos con dos heteroátomos, de los cuales uno es un nitrógeno de tipo imina, se conocen con el nombre de 1,3-azoles y 1,2-azoles²⁴ (Figura 5). El anillo de los azoles se encuentra presente en compuestos de gran importancia biológica y práctica como histidina, histamina o vitamina B, entre otros²⁵.

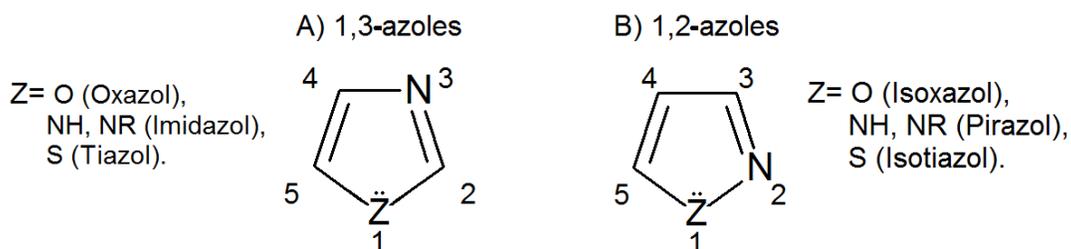


Figura 5. Estructura de: A)1, 3-Azoles y B)1, 2-Azoles; la letra “z” indica los posibles heteroátomos en la molécula²⁴.

Como se observa en la imagen anterior, el imidazol tiene dos heteroátomos nitrógeno en las posiciones 1 y 3 del anillo. La importancia de estos compuestos justifica la enorme variedad de

imidazoles sintéticos que se han preparado, encontrándose algunos como agentes antibacterianos o drogas radiosensibilizantes²⁵. A partir del imidazol parten otros compuestos, como los benzoazoles aromáticos, azoles fusionados a un benceno²⁴ (Figura 6).

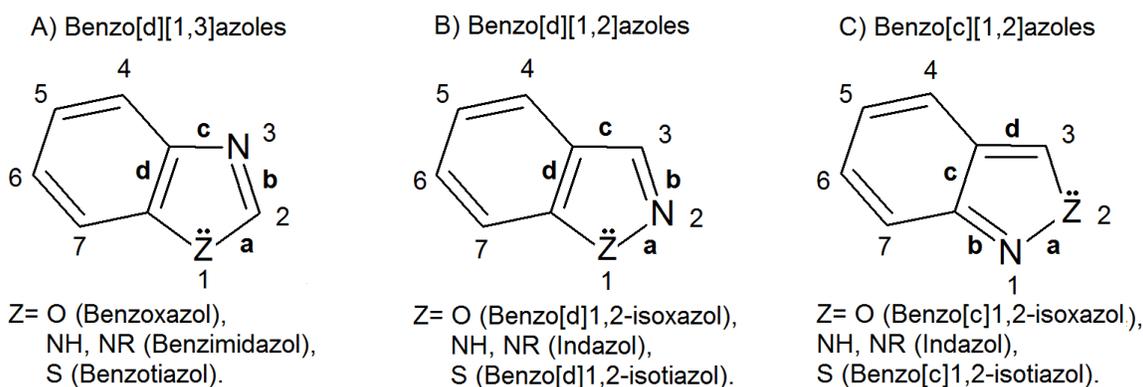


Figura 6. Estructura de: A) Benzo[d][1, 3] azoles, B) Benzo[d][1, 2] azoles y C) Benzo[c][1,2] azoles; la letra “z” indica los posibles heteroátomos en la molécula²⁴.

Específicamente, cuando en el benzoazol los dos heteroátomos son nitrógenos, se trata de un benzimidazol, tal como se observa en la imagen anterior. Estas moléculas han sido ampliamente utilizadas en agricultura y medicina veterinaria como fungicidas y drogas antihelmínticas, y su uso experimental en quimioterapia contra el cáncer, ha llevado a una investigación intensiva para dilucidar su modo de acción a detalle²⁶. Por otro lado, los heterociclos aromáticos de seis átomos con dos átomos de nitrógeno de tipo imina se conocen con el nombre de diazinas, siendo pirazinas cuando los nitrógenos están en las posiciones 1,4; pirimidina cuando están en las posiciones 1,3 y piridazina cuando están en las posiciones 1,2, tal como se muestra en la Figura 7. Uracilo, timina y citosina son las diazinas naturales más importantes y se encuentran formando parte de los ácidos nucleicos presentes en los seres vivos, además se pueden localizar en muchos fármacos como en el antibacteriano trimetoprim o el antimalárico pirimetamina²⁴⁷.

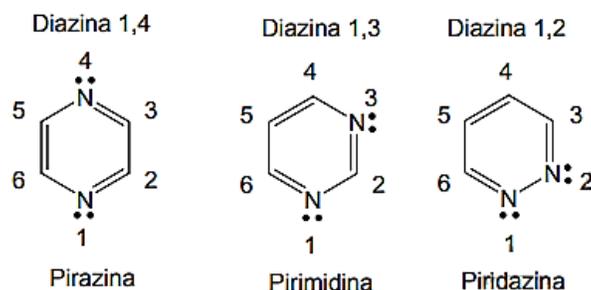


Figura 7. Estructura de las diferentes diazinas²⁴⁷.

2.5.2 Hidrazidas

Las hidrazidas en química orgánica son una clase de compuestos orgánicos que tienen en común un grupo funcional caracterizado por un enlace covalente de nitrógeno a nitrógeno con 4 sustituyentes, de los cuales al menos uno es un grupo acilo. Surgen principalmente por la pérdida de H₂O, H₂S, H₂Se o H₂Te a partir de un sustituyente ácido de un ácido y una hidrazina²⁵⁸. La estructura general para una hidrazida es ($R^1 = O$) $R^2-N-N-R^3R^4$, la cual se aprecia también en la Figura 8. Se ha informado que los derivados de las hidrazidas poseen actividades anticonvulsivantes, antioxidantes, antagonistas de hormonas, analgésicas, antiinflamatorias, antiplaquetarias, antipalúdicas, antimicobacterianas (como la isoniazida³⁰), antitumorales, vasodilatadoras, antivirales, antitripanosómicas²⁹⁹ y antiparkinsonianas (como la benserazida)³¹.

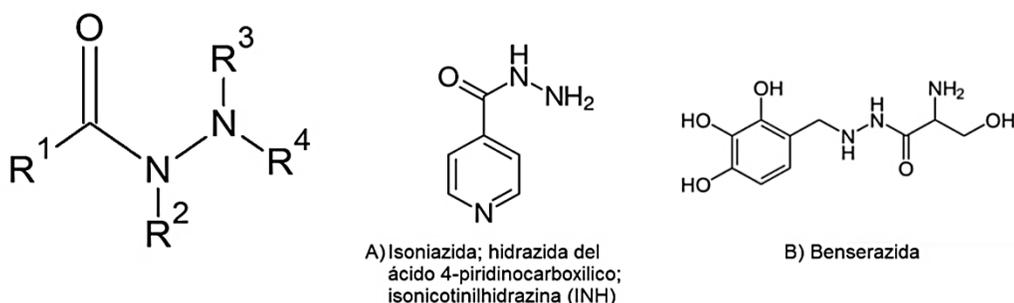


Figura 8. Estructura general de las hidrazidas²⁷; se muestra la estructura de la isoniazida

(A)³⁰ y la benserazida (B)³¹, dos fármacos muy reconocidos.

3. HIPÓTESIS

Se tiene conocimiento y evidencia de que algunos compuestos azólicos tienen efectos antimicrobianos, ya sea como antiparasitarios o antifúngicos, por lo tanto, si los nuevos compuestos sintetizados derivan de éstos, se pueden generar algunos que también ejerzan efecto como antibacterianos, lo cual podría solucionar la problemática generada por la continua aparición de bacterias multirresistentes a otros antibacterianos comerciales por su uso descontrolado.

4. JUSTIFICACIÓN

El uso incorrecto de los diferentes grupos de antibióticos ha generado el desarrollo de resistencia microbiana en los últimos años, por ello surge la necesidad de investigar el efecto antimicrobiano de nuevas moléculas orgánicas, como lo son los derivados de benzimidazoles, hidrazidas, un pirazol y una piridazina que se presentan en este trabajo y se evalúan frente a una bacteria resistente, como *Escherichia coli*, con el fin de determinar su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano y a partir del análisis de sus estructuras proponer un posible mecanismo mediante el cual actúan estos compuestos y resolver su utilidad en el ámbito clínico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de nuevos compuestos derivados de benzimidazoles, hidrazidas, pirazol y piridazina, frente a *Escherichia coli* utilizando el método de difusión radial en disco para realizar una comparación del efecto bacteriostático y/o bactericida con antibióticos comerciales.

5.2 Objetivos particulares

- Identificación de la cepa bacteriana mediante la realización de pruebas bioquímicas primarias y secundarias.
- Realizar la evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos orgánicos utilizando el método de difusión radial en disco, previa identificación de la cepa bacteriana.
- Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos con los compuestos orgánicos analizados y compararlos con los resultados de los antibióticos control utilizados.
- Describir un posible mecanismo mediante el cual actúan los compuestos evaluados mediante el análisis de sus estructuras para determinar su utilidad en el ámbito clínico.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Diseño experimental

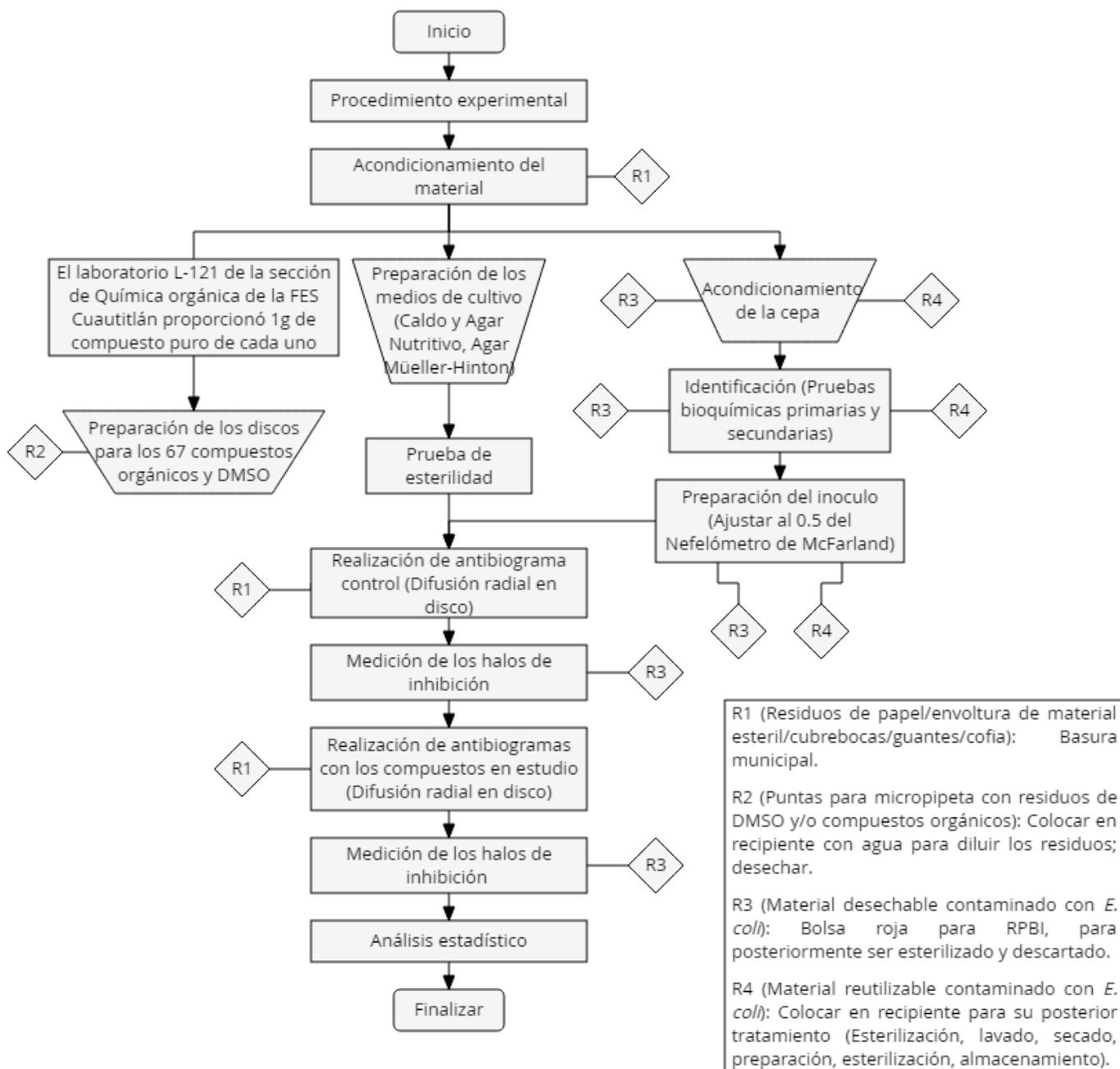


Figura 9. Diagrama del diseño experimental

6.2 Materiales y métodos

Antibióticos utilizados

- Control positivo. Multidisco® combinado *BIORAD* con 12 antibióticos:
 - Amikacina
 - Ampicilina
 - Cefalotina
 - Ceftriaxona
 - Cloranfenicol
 - Dicloxacilina
 - Enoxacina
 - Eritromicina
 - Gentamicina
 - Netilmicina
 - Penicilina
 - Trimetoprim-Sulfametoxazol

Medio de cultivo utilizado

- Caldo y Agar Nutritivo. BD® Dioxon. Esterilizado previamente en autoclave.
- Agar Mueller-Hinton. BD® Dioxon. Esterilizado previamente en autoclave.
- Agar EMB. BD® Dioxon. Esterilizado previamente en autoclave.

Reactivos

- Tinción de Gram: Cristal violeta al 3%, Lugol al 3%, Alcohol-Acetona 1:1, Safranina al 4%, Aceite de inmersión.
- Disolución de compuestos orgánicos puros y control negativo: Dimetilsulfóxido (DMSO).

Cepa utilizada

- *Escherichia coli* ATCC 8739

6.3 Preparación de los discos para los compuestos orgánicos y DMSO.

La síntesis de los 67 compuestos orgánicos fue realizada por la sección de Química Orgánica de la FES Cuautitlán, Campo 1, la cual proporcionó 1 g de cada uno de los compuestos puros para la realización del presente trabajo³². En la Tabla 5 se muestran los 67 compuestos a evaluar y su identificación.

Tabla 5. Compuestos orgánicos a evaluar para determinar su efecto antibacteriano.

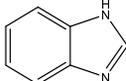
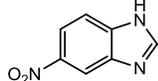
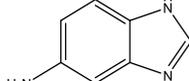
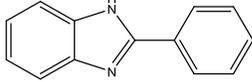
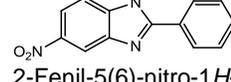
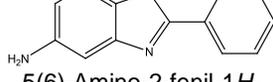
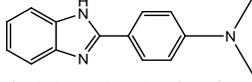
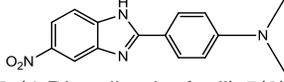
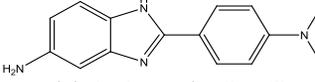
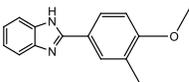
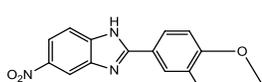
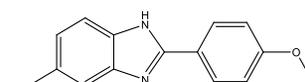
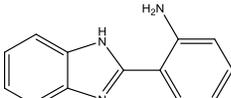
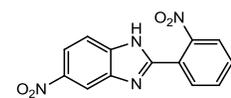
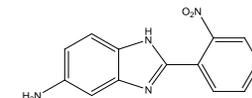
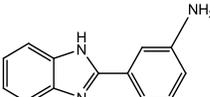
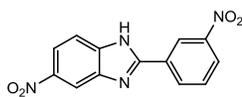
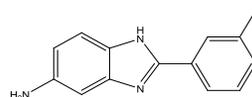
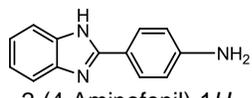
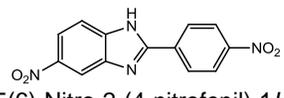
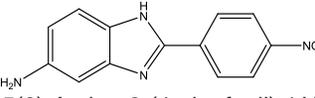
COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN	COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN	COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN
	A1		B1		C1
1H-Benzimidazol		5(6)-Nitro-1H-benzimidazol		5(6)-Amino-1H-benzimidazol	
	A2		B2		C2
2-Fenil-1H-benzimidazol		2-Fenil-5(6)-nitro-1H-benzimidazol		5(6)-Amino-2-fenil-1H-benzimidazol	
	A3		B3		C3
2-(4-Dimetilaminofenil)-1H-benzimidazol		2-(4-Dimetilaminofenil)-5(6)-nitro-1H-benzimidazol		5(6)-Amino-2-(4-dimetilaminofenil)-1H-benzimidazol	
	A4		B4		C4
2-(3,4-Dimetoxifenil)-1H-benzimidazol		2-(3,4-Dimetoxifenil)-5(6)-nitro-1H-benzimidazol		5(6)-Amino-2-(3,4-dimetoxifenil)-1H-benzimidazol	
	A5		B5		C5
2-(2-Aminofenil)-1H-benzimidazol		5(6)-Nitro-2-(2-nitrofenil)-1H-benzimidazol		5(6)-Amino-2-(2-nitrofenil)-1H-benzimidazol	
	A6		B6		C6
2-(3-Aminofenil)-1H-benzimidazol		5(6)-Nitro-2-(3-nitrofenil)-1H-benzimidazol		5(6)-Amino-2-(3-nitrofenil)-1H-benzimidazol	
	A7		B7		C7
2-(4-Aminofenil)-1H-benzimidazol		5(6)-Nitro-2-(4-nitrofenil)-1H-benzimidazol		5(6)-Amino-2-(4-nitrofenil)-1H-benzimidazol	

Tabla 5. Compuestos orgánicos a evaluar para determinar su efecto antibacteriano (Continuación).

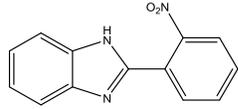
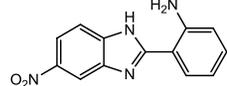
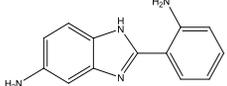
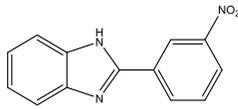
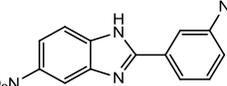
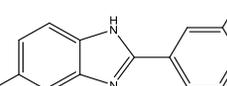
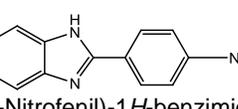
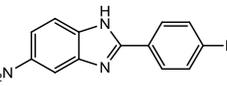
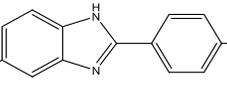
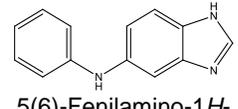
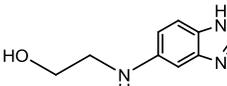
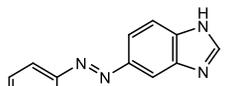
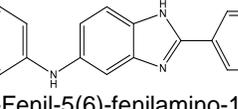
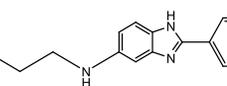
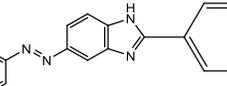
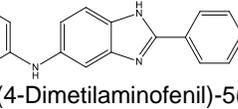
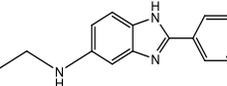
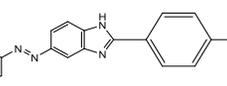
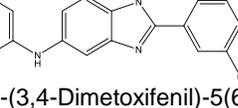
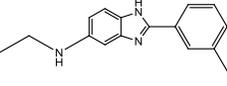
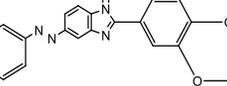
COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN	COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN	COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN
	A8		B8		C8
2-(2-Nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(2-Aminofenil)-5(6)-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Amino-2-(2-aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	A9		B9		C9
2-(3-Nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(3-Aminofenil)-5(6)-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Amino-2-(3-aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	A10		B10		C10
2-(4-Nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(4-Aminofenil)-5(6)-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Amino-2-(4-aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	D1		E1		F1
5(6)-Fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Fenilazo-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	D2		E2		F2
2-Fenil-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Etanolamino-2-fenil-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-Fenil 5(6)-fenilazo-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	D3		E3		F3
2-(4-Dimetilaminofenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(4-Dimetilaminofenil)-5(6)-etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(4-Dimetilaminofenil)-5(6)-fenilazo-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	D4		E4		F4
2-(3,4-Dimetoxifenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(3,4-Dimetoxifenil)-5(6)-etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(3,4-Dimetoxifenil)-5(6)-fenilazo-1 <i>H</i> -benzimidazol	

Tabla 5. Compuestos orgánicos a evaluar para determinar su efecto antibacteriano (Continuación).

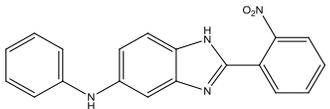
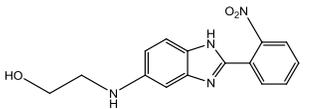
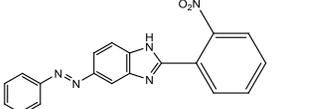
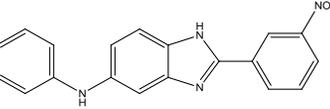
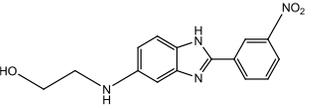
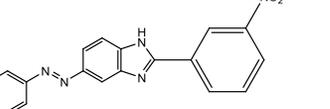
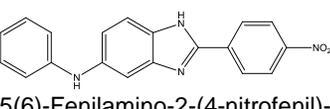
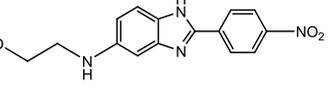
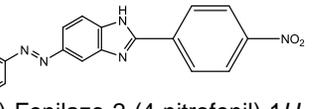
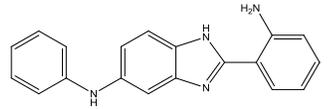
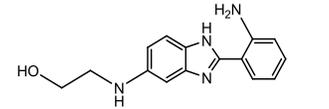
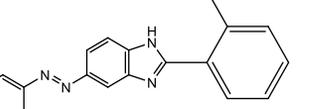
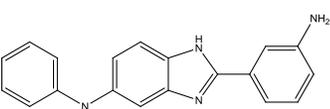
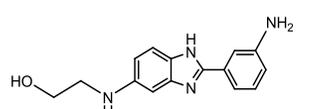
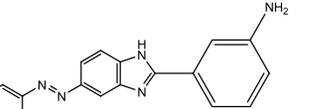
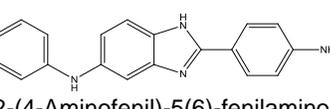
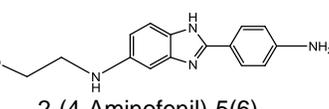
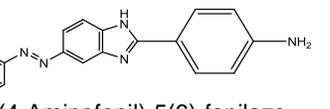
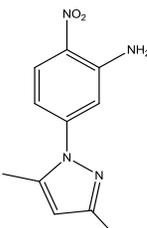
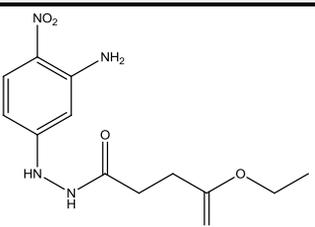
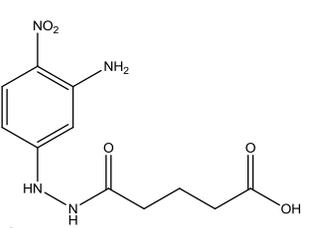
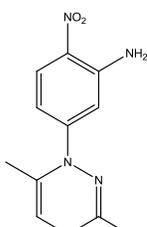
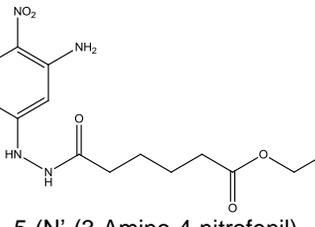
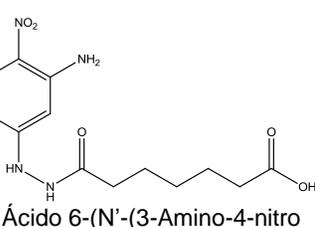
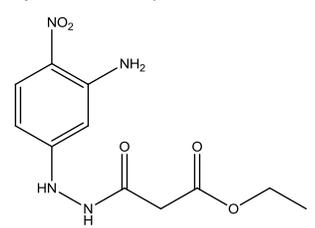
COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN	COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN	COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN
	D5		E5		F5
5(6)-Fenilamino-2-(2-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Etanolamino-2-(2-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Fenilazo-2-(2-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	D6		E6		F6
5(6)-Fenilamino-2-(3-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Etanolamino-2-(3-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Fenilazo-2-(3-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	D7		E7		F7
5(6)-Fenilamino-2-(4-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Etanolamino-2-(4-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol		5(6)-Fenilazo-2-(4-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	D8		E8		F8
2-(2-Aminofenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(2-Aminofenil)-5(6)-etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(2-Aminofenil)-5(6)-fenilazo-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	D9		E9		F9
2-(3-Aminofenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(3-Aminofenil)-5(6)-etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(3-Aminofenil)-5(6)-fenilazo-1 <i>H</i> -benzimidazol	
	D10		E10		F10
2-(4-Aminofenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(4-Aminofenil)-5(6)-etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol		2-(4-Aminofenil)-5(6)-fenilazo-1 <i>H</i> -benzimidazol	

Tabla 5. Compuestos orgánicos a evaluar para determinar su efecto antibacteriano (Continuación).

COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN	COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN	COMPUESTO	IDENTIFICACIÓN
 <p>5-(3,5-Dimetil-1H-pirazol-1-il)-2-nitroanilina</p>	G1	 <p>3-(N'-(3-Amino-4-nitrofenil) hidrazinocarbonilpropanoato de etilo</p>	G4	 <p>Ácido 4-(N'-(3-Amino-4-nitrofenil) hidrazinocarbonilbutanoico</p>	G6
 <p>5-(3,6-Dimetil-1,4-dihidropiridazin-1-il)2-nitroanilina</p>	G2	 <p>5-(N'-(3-Amino-4-nitrofenil) hidrazinocarbonil pentanoato de etilo</p>	G5	 <p>Ácido 6-(N'-(3-Amino-4-nitrofenil) hidrazinocarbonil-heptanoico</p>	G7
 <p>2-(N'-(3-Amino-4-nitrofenil) hidrazinocarbonil acetato de etilo</p>	G3				

1. Se realizaron los cálculos necesarios para obtener discos impregnados con 4 mg del compuesto orgánico a evaluar:

$$\frac{80 \text{ mg compuesto orgánico}}{200 \mu\text{L DMSO}} =$$

$$\frac{0.4 \text{ mg de compuesto orgánico}}{1 \mu\text{L DMSO}} \times 10 \mu\text{L de compuesto orgánico disuelto por disco} =$$

4 mg de compuesto orgánico por disco

2. Se realizó el pesaje de 80 mg de cada uno de los compuestos orgánicos en tubos Eppendorf estériles, empleando una balanza analítica y se le adicionaron 200 mL de DMSO.
3. Se colocaron los tubos Eppendorf, en el sonicador a 25 °C durante 30 minutos para facilitar la disolución de los mismos.
4. En una campana de flujo laminar, se realizó la impregnación de los discos, tomando 10 mL de compuesto orgánico disuelto con ayuda de una micropipeta y dispensando en el disco estéril. Se realizó por triplicado.
5. Se dejaron secar por 24 h en cajas Petri de vidrio debidamente identificados, en un sitio seco y a 25 °C (temperatura ambiente).
6. Se prepararon de la misma manera discos, con 10 mL de DMSO, con la finalidad de utilizarlos como control negativo (los controles positivos empleados corresponden al sistema de Multidiscos® combinado BIORAD).

6.4 Preparación de los medios de cultivo.

Se realizaron los cálculos pertinentes para preparar 68 cajas Petri de medio sólido Agar Mueller-Hinton y se siguieron los pasos indicados por el fabricante. Se prepararon también 1 caja Agar EMB, 1 caja Agar Nutritivo y 2 tubos de Caldo Nutritivo.

6.5 Acondicionamiento de la cepa.

A partir del cultivo inicial, se realizó tinción de Gram para observar la morfología de la bacteria. Se realizaron también pruebas bioquímicas como SIM, Voges Proskauer, Rojo de Metilo y Citrato que confirmaban la identificación de la cepa como *Escherichia coli* ATCC 8739. Además, se realizó resembrado por estría en dilución Americana en Agar EMB, incubando a 37 °C durante 24 h en la estufa bacteriológica; al observar el brillo metálico en las colonias se realizó una resiembra en Agar Nutritivo, en medio sólido como líquido y se incubó a 37 °C durante 24 h en la estufa bacteriológica y en la incubadora orbital, respectivamente.

6.6 Metodología (Difusión radial en disco).

1. Se preparó un inóculo bacteriano a partir del cultivo de *E. coli* ATCC 8739 en Caldo Nutritivo, con un aproximado de 1.5×10^8 /mL de microorganismos viables, ajustando la turbidez al 0.5 del Nefelómetro de McFarland y diluyendo con solución salina fisiológica esteril³³.
2. En la campana de flujo laminar, se realizó la siembra a partir del inóculo en placas de Agar Mueller-Hinton; se sumergió un aplicador de algodón estéril y se dispersó en la placa mediante sembrado masivo.
3. Se dejó secar la superficie del medio sembrado durante 5-20 minutos, manteniendo la caja con la tapa cerrada³³.
4. Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con pinzas estériles; con éstas, se presionaron suavemente los discos sobre el agar para asegurar un contacto uniforme³³.
5. Se colocaron tres discos del compuesto orgánico en estudio y uno más de DMSO, manteniendo un espacio uniforme entre discos para evitar que las zonas de inhibición quedaran interrumpidas y fueran debidamente apreciadas, tal como se muestra en la

Figura 10. Se utilizó una placa de medio sólido Agar Mueller-Hinton por compuesto orgánico.

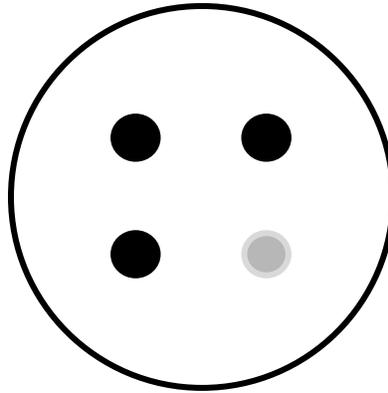


Figura 10. Patrón de distribución de los discos en el medio de cultivo. Los círculos oscuros representan los discos de compuesto orgánico en estudio; el círculo claro representa el control negativo (DMSO).

6. Se incubaron las cajas a 37 °C durante 24 h.
7. Se realizó la lectura de los halos de inhibición contra una superficie oscura bajo luz reflejada, esto midiendo el diámetro de los halos formados con ayuda de un Vernier, anotando los resultados en mm.
8. A partir de los resultados obtenidos se determinó el promedio de las medidas obtenidas para cada uno de los compuestos orgánicos.
9. Se realizó la interpretación de los resultados obtenidos en los diferentes antibiogramas y se compararon con los resultados obtenidos con los antibióticos utilizados como controles positivos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, en los últimos años se ha visto un incremento en los casos de infecciones causadas por microorganismos calificados como cepas multirresistentes, para los cuales resulta ineficaz un tratamiento con antibióticos comerciales y resulta necesario investigar otras moléculas que generen efecto antimicrobiano. En el presente estudio se evaluaron nuevos compuestos heterocíclicos derivados de benzimidazoles, hidrazidas, un pirazol y una piridazina con la finalidad de determinar sus posibles efectos antibacterianos. Para ello se decidió utilizar una cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 como microorganismo problema debido a que puede considerarse representativa del grupo de las bacterias gram negativas, las cuales son bacterias aún más resistentes que las gram positivas a los antibióticos de uso clínico, gracias a la estructura de su pared³⁴.

Para tener un punto de comparación entre el efecto producido por antibióticos de uso clínico y el efecto causado por los compuestos en estudio, se realizó un antibiograma con un sistema de Multidiscos® combinado BIORAD (Figura 11), sistema conformado por 12 antibióticos útiles en terapia contra bacterias gram negativas y gram positivas, incluyendo algunos de amplio espectro.

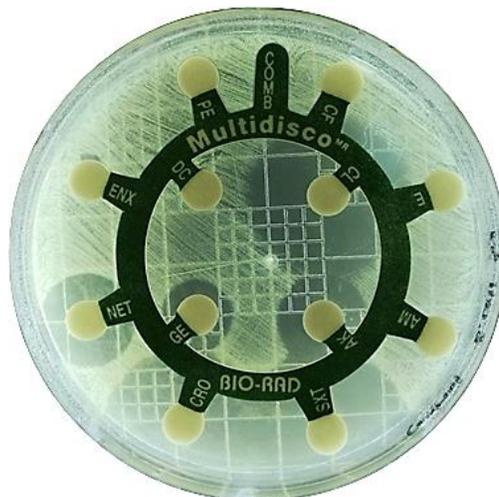


Figura 11. Antibiograma realizado como control positivo.

Los resultados obtenidos para los antibiogramas empleados se muestran a continuación en la Tabla 6.

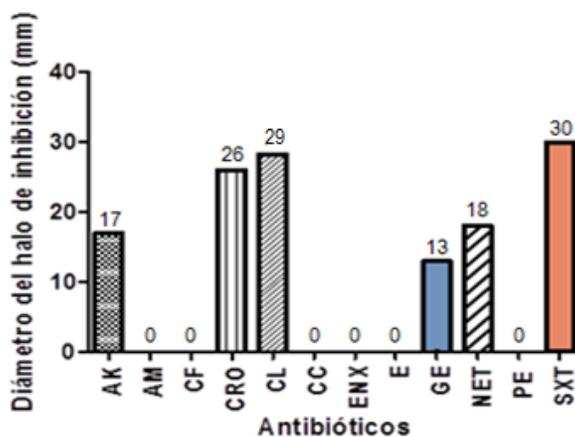
Tabla 6. Resultados de los halos de inhibición producidos a *Escherichia coli* ATCC 8739 con antibióticos del sistema de Multidiscos combinado BIORAD, aplicado como control positivo.

Antimicrobiano	Sensible (S) / Resistente (R)
Amikacina (AK) 30	S (17 mm)
Ampicilina (AM) 10 µg	R (Sin halo)
Cefalotina (CF) 30 µg	R (Sin halo)
Ceftriaxona (CRO) 30 µg	S (26 mm)
Cloranfenicol (CL) 30 µg	S (29 mm)
Dicloxacilina (DC) 1 µg	R (Sin halo)
Enoxacina (ENX) 10 µg	R (Sin halo)
Eritromicina € 15 µg	R (Sin halo)
Gentamicina (GE) 10 µg	R (13 mm)
Netilmicina (NET) 30 µg	S (18 mm)
Penicilina (PE) 10 U	R (Sin halo)
Trimetoprim-Sulfametoxazol(SXT) 25 µg	S (30 mm)

La figura 11 muestra la comparación visible de los halos de inhibición obtenidos con los diferentes antibióticos comerciales que conforman el Multidisco®, mientras que en la Tabla 6 se muestran los nombres y abreviaturas de los mismos, los cuales están clasificados como Sensibles o Resistentes con base en el tamaño en milímetros de los halos obtenidos. En el sistema se incluyen antimicrobianos que tienen acción sobre bacterias gram positivas (AM, CF, CL, DC, ENX, E, GE, PE, STX) y/o gram negativas (AK, AM, CF, CRO, CL, ENX, GE, NET, STX) ³⁵, este último grupo es el de mayor interés para el presente trabajo, ya que son el principal punto de comparación para los compuestos en estudio.

Los criterios para calificar a una bacteria como sensible o resistente en un antibiograma están basados en los manuales del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)^{366, 37}, en ellos se encuentran diferentes antimicrobianos, entre los cuales están los que componen el sistema de Multidiscos®.

Como se observa en la Tabla 6, los antibióticos que dieron mejores resultados fueron Trimetoprim-Sulfametoxazol, mientras que el que generó el halo menor fue Gentamicina, sin tomar en cuenta a los antibióticos que no lo produjeron; en la Gráfica 1 se observa la diferencia del tamaño de los halos. El CLSI indica que para considerar a *E. coli* sensible a GE el halo debe ser mayor a 15 mm, criterio que no se cumplió en el antibiograma control; se indica también que halos mayores a 16 mm al evaluar a SXT, significan que *E. coli* fue sensible a este antibiótico³⁸, criterio que se observó en el antibiograma control. Tanto Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT), como Gentamicina (GE), serán los antibióticos de mayor relevancia en la comparación de los efectos producidos por los compuestos a evaluar, debido al efecto provocado a *Escherichia coli* y la estructura que poseen.



Gráfica 1. Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con el Multidisco® BIORAD, como control positivo.

Para realizar la evaluación de los compuestos fue necesaria su disolución, como se ha mencionado en la parte experimental, estandarizando una misma concentración para todos. Se decidió utilizar como disolvente DMSO, puesto que se ha considerado como un disolvente universal para antibióticos³⁹, lo que aseguraría una mayor cantidad de compuestos disueltos, además de que se ha comprobado que su toxicidad es muy baja y por ello el principal uso que se le ha dado es como vehículo para administrar fármacos⁴⁰, su baja toxicidad se comprobó al ser utilizado como control negativo. Sin embargo, el DMSO posee características como bajo peso molecular, un fuerte enlazamiento molecular y un área de superficie limitada por impedimento estérico, entre otras, que impiden a ciertas moléculas ser solubles en él, tal como ocurrió con algunos compuestos orgánicos en la experimentación, a la concentración empleada y por ello no continuaron en estudio, puesto que no pudieron impregnarse en los discos, lo cual es fundamental para la experimentación, ya que tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el papel filtro absorbe agua y el antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco, formándose un gradiente de concentración²³.

La concentración empleada fue de 0.4 mg/ μ l de compuesto en DMSO, es una concentración alta en comparación a la contenida en el sistema de Multidiscos®, ya que los antibióticos que lo conforman están en microgramos, sin embargo, se decidió utilizarla para asegurar la visualización del efecto antibacteriano de por lo menos uno de los compuestos. A pesar de ello, fue útil para conocer si estos poseen actividad antimicrobiana y en caso de confirmarse tal interrogante, realizar estudios posteriores con diluciones a concentraciones más bajas para obtener los puntos críticos de sensibilidad de cada compuesto.

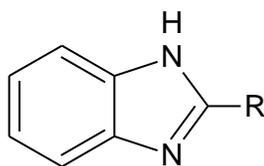
La evaluación de los compuestos en estudio se realizó mediante la técnica de Kirby Bauer. Las mediciones de los halos de inhibición generados por estos se realizaron por triplicado con ayuda de un Vernier y con ellas se obtuvo un promedio. Siguiendo la técnica mencionada, se

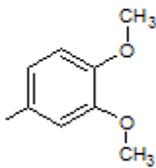
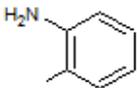
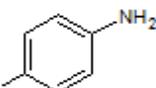
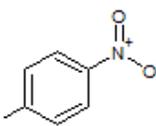
realizó la medición del diámetro de la zona incluyendo los 6 mm del disco sobre el respaldo de la caja de Petri sin remover la tapa. Las lecturas en las que se obtuvieron 6 mm indicaron que no hubo zona de inhibición³³. Los compuestos que no produjeron zona de inhibición tampoco fueron considerados en este estudio.

Al comenzar a analizar de manera general las estructuras de los heterociclos en estudio, a primera vista se observa que la mayor parte de los compuestos poseen bencenos, estos anillos debido a su baja polaridad⁴¹¹, se introducen más fácilmente a las células, por lo que los compuestos estudiados son moléculas que fácilmente pueden ingresar a las bacterias, aunando a esto los pequeños tamaños que poseen. En general, las estructuras de los compuestos analizados, son similares a las de otros antimicrobianos ya conocidos, lo que orienta a describir un posible mecanismo de acción general para los compuestos en experimentación. El poseer bencenos en la estructura no asegura efectividad para un antimicrobiano, sin embargo, contener electrones en movimiento en sus anillos, facilita la interacción con otros sustituyentes⁴¹¹ ya sea aquellos unidos al mismo anillo o los que conforman la estructura frente a la que van a actuar.

El primer grupo en estudio fue el A, el cual deriva del 1*H*-benzimidazol; a partir de este compuesto se sintetizaron otros adicionando un sustituyente fenilo en la posición 2 de la estructura y de la misma manera, se adicionaron otros sustituyentes al nuevo anillo fenílico en las posiciones *orto*, *meta* y *para*. Al evaluar estos compuestos, se obtuvieron resultados variables, encontrando que el de menor efecto fue el compuesto A4 y el de mayor efecto el A7, con 14 mm el primero y 30 mm el segundo, sin tomar en cuenta aquellos incapaces de inhibir el crecimiento bacteriano. Los resultados de este grupo se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo A.

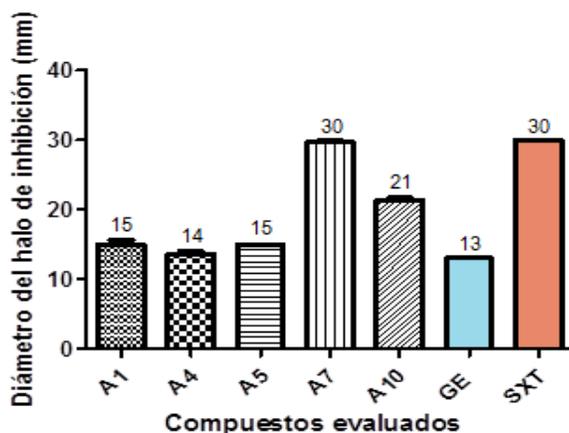


Identificación		Halo
A1	R= -H	15 mm
A4	R= 	14 mm
A5	R= 	15 mm
A7	R= 	30 mm
A10	R= 	21 mm

Se muestran los promedios de los halos obtenidos en los antibiogramas realizados. Los compuestos identificados como **A2**, **A6** y **A8** fueron insolubles en DMSO, por lo que no fueron probados. Los compuestos identificados como **A3** y **A9** no mostraron halo de inhibición en el antibiograma.

Como se muestra en la Gráfica 2, al comparar los efectos producidos por los compuestos del grupo A, se encontró una diferencia significativa entre el efecto producido por SXT, A1, A4, A5 y A10, sin embargo, estos cuatro compuestos mencionados provocaron un halo de inhibición mayor al producido por GE, por lo que podrían resultar de interés para el tratamiento contra otras bacterias menos resistentes que *E. coli*. El compuesto A7 fue el de mayor relevancia para

este grupo, ya que produjo un efecto similar a SXT, lo que implica que podría seguir en estudio para demostrar su eficacia y utilidad como antibiótico de uso clínico contra bacterias gram negativas.



Gráfica 2. Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo A y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

Al observar en la Tabla 7 la estructura base de los compuestos del grupo A podemos apreciar que el 1*H*-benzimidazol como tal, genera efecto antimicrobiano contra *E. coli*, el cual aumenta visiblemente al adicionar un sustituyente amino en la posición *para* del fenilo (Compuesto A7), obteniendo hasta cierto punto una estructura semejante al ácido *p*-aminobenzoico (PABA), molécula presente en la síntesis de ácido fólico en bacterias⁴². Se sabe que existen antibióticos comerciales que son inhibidores de la síntesis de ácido fólico, tal como SXT, por lo cual es necesario conocer el mecanismo de acción que poseen y a partir de ese punto, realizar una comparación con los nuevos compuestos en estudio que permita proponer un posible mecanismo de acción.

Trimetoprim-sulfametoxazol son dos antibióticos pertenecientes, por su mecanismo de acción, al grupo de los bloqueadores de la síntesis de factores metabólicos, en su caso del ácido fólico²⁰. Por una parte, Sulfametoxazol (STX) es considerado como un agente bacteriostático

que interfiere con la síntesis de ácido fólico en bacterias susceptibles⁴³. Al pertenecer a las sulfonamidas, inhibe la conversión enzimática de pteridina y ácido *p*-aminobenzoico (PABA) en ácido dihidropterico, ya que compite con PABA por la unión a la sintetasa de dihidrofolato, un intermediario de la síntesis del ácido tetrahidrofólico (Figura 12). Se requiere ácido tetrahidrofólico para la síntesis de purinas y Dtmp, por lo que la inhibición de su síntesis inhibe a su vez el crecimiento bacteriano⁴². Por otro lado, Trimetoprim (TMP) inhibe la dihidrofolato reductasa, la enzima que cataliza el último paso de la síntesis de ácido fólico bacteriano, su efecto es bacteriostático cuando actúa solo, pero en conjunto con sulfonamidas, su acción es bactericida⁴⁴ por lo tanto Trimetoprim y Sulfametoxazol actúan de forma sinérgica⁴³.

En resumen, STX y TMP ejercen un bloqueo secuencial en la biosíntesis del ácido fólico; STX actúa gracias a la similitud de su estructura con la de PABA⁴⁵, mientras que TMP es un análogo de la dihidropteridina⁴⁶ (Figura 12).

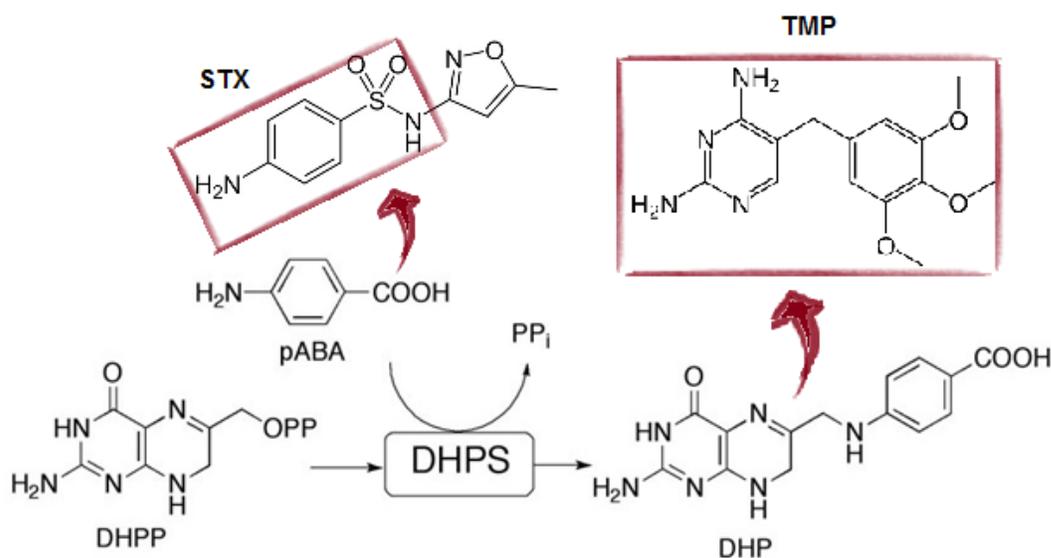


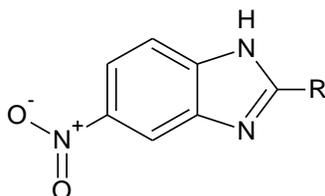
Figura 12. Trimetoprim (TMP) – Sulfametoxazol (STX), se señala con rojo la estructura similar a PABA que posee STX y así mismo se esquematiza la similitud entre la estructura de TMP y la dihidropterina (DHP).

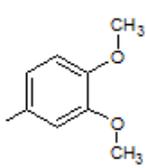
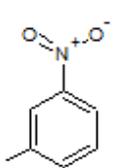
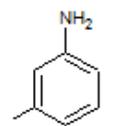
Considerando el mecanismo de acción descrito para STX y la estructura de A7, se sugiere que el efecto conseguido por el compuesto en estudio fue gracias a un mecanismo de acción similar a STX. De manera contraria a A7, el compuesto A4 disminuyó el efecto que tuvo A1 al adicionar sustituyentes en las posiciones *meta* y *para* en el fenilo, lo que indica que para éste compuesto los sustituyentes metoxi no generaron una buena respuesta.

El compuesto A5, quien tuvo un efecto menor a A7, también posee un sustituyente amino en el fenilo, sin embargo, está ubicado en la posición *orto* lo que indica que esta posición no favorece el efecto antimicrobiano del sustituyente amino. El compuesto A10 también posee un sustituyente en posición *para* en el fenilo, sin embargo, se trata de un grupo nitro lo que produce un efecto antimicrobiano menor al producido por el compuesto A7. Los efectos producidos por los sustituyentes amino y nitro serán explicados más adelante.

Los compuestos del grupo B surgen a partir del 5-nitro-1*H*-benzimidazol, que del mismo modo que el grupo anterior, son sintetizados al adicionar un sustituyente fenilo en la posición 2 de la estructura y de la misma manera, se adicionaron otros sustituyentes al nuevo anillo fenílico en las posiciones *orto*, *meta* y *para*; estas modificaciones a las estructuras iniciales de cada grupo se repiten para los grupos C, D, E y F también. Los resultados de los antibiogramas realizados para el grupo B se muestran a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo B.

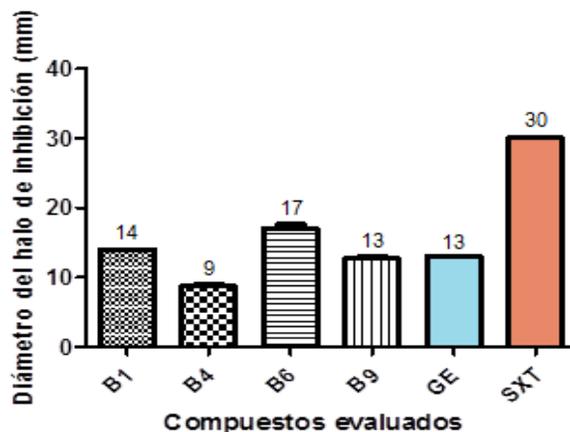


Identificación		Halo
B1	R= -H	14mm
B4	R= 	9 mm
B6	R= 	17 mm
B9	R= 	13 mm

Se muestran los promedios de los halos obtenidos en los antibiogramas realizados. El compuesto identificado como **B3** fue insoluble en DMSO, por lo que no fue probado. Los compuestos identificados como **B2**, **B5**, **B7**, **B8** y **B10** no mostraron halo de inhibición en el antibiograma.

El compuesto B4 produjo un halo mínimo, aún menor que el producido por GE, por lo que no se considera útil contra *E. coli* en esta experimentación; por otro lado los compuestos B1, B6 y B9 produjeron halos similares o mayores a GE, por lo que resultan de interés, especialmente B6, el

cual produjo el halo de mayor tamaño; sin embargo, ninguno produjo halos mayores al producido por SXT, tal como se muestra en la Gráfica 3.



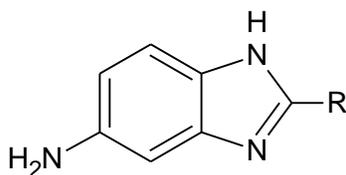
Gráfica 3. Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo B y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

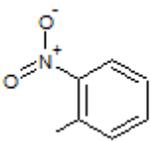
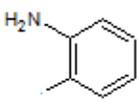
Al observar la Tabla 8 es evidente que la estructura inicial de este grupo (Compuesto B1) produjo por sí misma efecto antibacteriano contra *E. coli*, el cual es ligeramente menor al producido por A1, lo que significa que el sustituyente nitro colocado en el heterociclo, disminuye la actividad que tenía por sí solo el 1*H*-Benzimidazol. Al igual que en el grupo anterior, los sustituyentes metoxi del fenilo en B4 provocaron la disminución de efecto antibacteriano, mientras que el sustituyente nitro en posición *meta* del fenilo en B6 la aumentaron ligeramente; al colocar en la misma posición un sustituyente amino (Compuesto B9) se obtuvo un efecto menor.

En el grupo C que deriva del 5-amino-1*H*-benzimidazol, se encontraron dos compuestos de gran relevancia debido a su gran efecto antimicrobiano provocado contra *E. coli*, los resultados obtenidos para estos compuestos se muestran en la Tabla 9; si bien C1 produjo un halo menor al de SXT, los 29 mm de su halo muestran la eficacia que este podría tener tanto con *E. coli*,

como con otras bacterias gram negativas. C2 produjo un halo aún mayor al de SXT, lo que significa que su efecto antimicrobiano podría ser potencialmente alto.

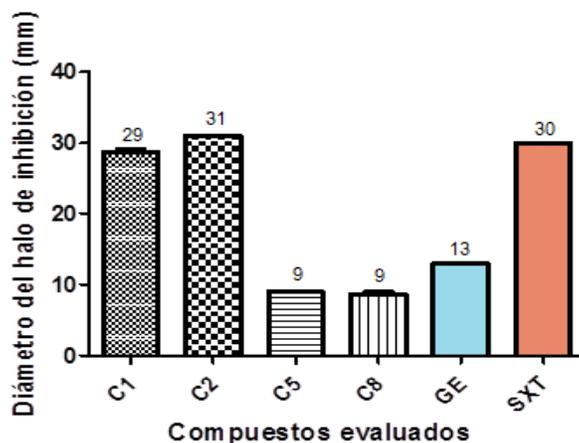
Tabla 9. Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo C.



Identificación		Halo
C1	R= -H	29mm
C2	R= 	31 mm
C5	R= 	9 mm
C8	R= 	9 mm

Se muestran los promedios de los halos obtenidos en los antibiogramas realizados. Los compuestos identificados como **C6**, **C7** y **C10** fueron insolubles en DMSO, por lo que no fueron probados. Los compuestos identificados como **C3**, **C4** y **C9** no mostraron halo de inhibición en el antibiograma.

A pesar de partir del mismo benzimidazol que C1 y C2, tanto C5, como C8, apenas produjeron halos de 9 mm, es decir, halos menores a GE por lo que no se consideran relevantes contra la bacteria en estudio u otras gram negativas. La diferencia significativa es evidente en la Gráfica 4.



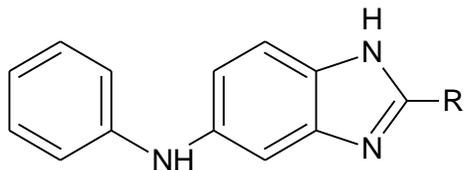
Gráfica 4. Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo C y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

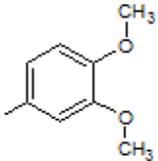
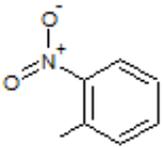
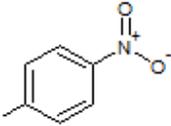
La estructura inicial de este grupo (Compuesto C1) es distinta al 1*H*-Benzimidazol debido a la adición de un sustituyente amino en el heterociclo, en la misma posición en que añadió el grupo nitro a B1. Es evidente que la adición del grupo amino fue más efectiva para conseguir un efecto antibacteriano similar al de SXT, el cual mejora al volver a adicionar un sustituyente fenilo en la posición 2 de la estructura, generando el compuesto C2, lo cual se da posiblemente porque adicionar otro benceno a la estructura disminuye la polaridad de la molécula y esta se introduce aún más fácilmente a las células⁴¹ que C1, como ya se había mencionado anteriormente. C5 y C8, por otro lado, poseen sustituyentes nitro y amino, respectivamente, en la posición *orto* del fenilo, los cuales muy probablemente por esta ubicación resultaron ineficientes para conferir a la molécula un mayor efecto antibacteriano.

El grupo D, que parte del 5-fenilamino-1*H*-benzimidazol, de manera general fue muy poco efectivo como antimicrobiano contra *E. coli*, ya que los halos que produjeron los compuestos que lo conforman fueron iguales o menores a los producidos por GE, tal como se observa en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los

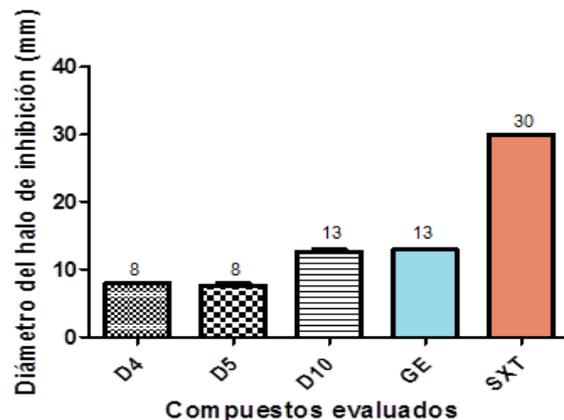
compuestos orgánicos del grupo D.



Identificación	Halo
<p>D4</p> <p>R= </p>	8 mm
<p>D5</p> <p>R= </p>	8 mm
<p>D10</p> <p>R= </p>	13 mm

Se muestran los promedios de los halos obtenidos en los antibiogramas realizados. El compuesto identificado como **D9** fue insoluble en DMSO, por lo que no fue probado. Los compuestos identificados como **D1**, **D2**, **D3**, **D6**, **D7** y **D8** no mostraron halo de inhibición en el antibiograma.

Debido al tamaño de los halos producidos por los compuestos D4 y D5, puede considerarse a *E. coli* como una bacteria resistente a estos compuestos, los cuales pueden ser ineficaces también con otras bacterias gram negativas y gram positivas. El compuesto D10, sin embargo, produjo un halo similar a GE, por lo que podría ser de interés como antimicrobiano para bacterias poco resistentes. En la Gráfica 5 se observa una gran diferencia entre la efectividad de SXT contra *E. coli* y los compuestos del grupo D contra la misma.

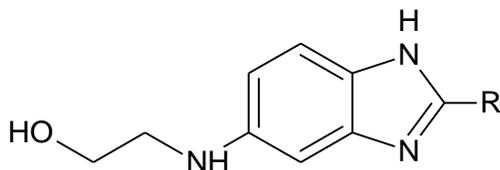


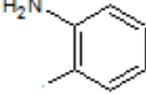
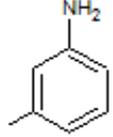
Gráfica 5. Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo D y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

Al observar las estructuras de los compuestos D4 y D5 se evidencia nuevamente que los sustituyente metoxi y nitro en posición *orto* del fenilo no dan un buen resultado, ya que generan un efecto antimicrobiano contra *E. coli* muy bajo; sin embargo, la estructura inicial por sí misma (Compuesto D1), tampoco generó halo de inhibición. En el caso de D10, a pesar de no haber tenido un efecto considerable contra *E. coli*, se comprobó que al adicionar un sustituyente amino en la posición *para* del fenilo, la efectividad de la molécula aumenta.

Al igual que el grupo D, los compuestos del grupo E, derivados del 5-etanolamino-1*H*-benzimidazol, fueron escasamente efectivos contra *E. coli*, esto puede constatarse al observar que fueron muy pocos los compuestos que tuvieron efecto antimicrobiano y que además son pequeños los halos obtenidos en su evaluación, los cuales se muestran en la Tabla 11.

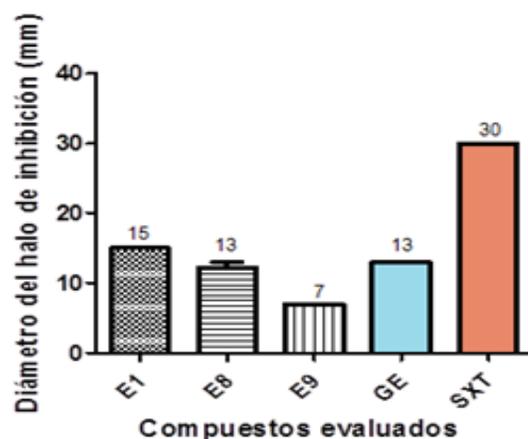
Tabla 11. Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo E.



Identificación		Halo
E1	R= -H	15 mm
E8	R= 	13 mm
E9	R= 	7 mm

Se muestran los promedios de los halos obtenidos en los antibiogramas realizados. Los compuestos identificados como **E2** y **E3** fueron insolubles en DMSO, por lo que no fueron probados. Los compuestos identificados como **E4**, **E5**, **E7** y **E10** no mostraron halo de inhibición en el antibiograma.

Observamos en la Gráfica 6 que E1 y E8 generaron halos similares a GE, los cuales a comparación del que produce SXT, son aún muy poco efectivos. Por otro lado E9, debido al tamaño de su halo, no representan interés como antimicrobiano.



Gráfica 6. Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo E y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

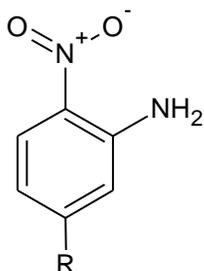
El compuesto E1, que posee la estructura inicial de este grupo, generó efecto antimicrobiano contra *E. coli* por sí mismo, sin embargo, se observó disminuido cuando al fenilo se le adicionaron sustituyentes amino en las posiciones *orto* y *meta*, obteniendo los compuestos E8 y E9 respectivamente, situación que ya se había visto anteriormente, por ejemplo, con los compuestos A5, B9 y C8.

Los compuestos del grupo F, los cuales se generaron a partir del 5-fenilazo-1*H*-benzimidazol, fueron completamente solubles en DMSO, sin embargo, ninguno presentó halo de inhibición, lo que los hace irrelevantes como antimicrobianos contra *E. coli*. Esto puede deberse principalmente a que el fenilazo como sustituyente en el 1*H*-benzimidazol, genera algún impedimento para que la molécula reaccione contra el microorganismo en estudio.

Los compuestos del grupo G, a diferencia de los demás grupos, no contienen algún benzimidazol en sus estructura. G1 también es de la familia de los azoles, ya que en su estructura se encuentra un pirazol; G2 es similar a G1, sin embargo, en su estructura en lugar de un azol encontramos una piridazina. Estos dos compuestos poseen en su estructura nitroanilina. G3, G4 y G5 son ésteres de ácidos carboxílicos y el resto de los compuestos del

grupo son ácidos carboxílicos; las estructuras que comparten los compuestos G3 al G7 son las hidrazidas. En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en la experimentación.

Tabla 12. Resultados obtenidos en los antibiogramas realizados para los compuestos orgánicos del grupo G.

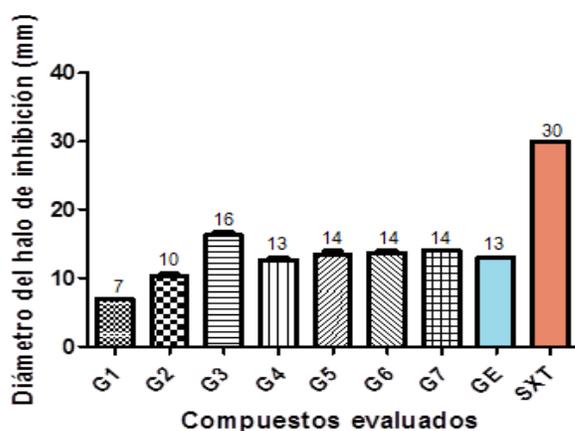


	Identificación	Halo
G1	 R=	7 mm
G2	 R=	10 mm
G3	 R=	16 mm
G4	 R=	13 mm
G5	 R=	14 mm
G6	 R=	14 mm
G7	 R=	14 mm

Se muestran los promedios de los halos obtenidos en los antibiogramas realizados. Todos

los compuestos del grupo fueron solubles en DMSO y mostraron halo de inhibición.

Como se observa en la Gráfica 7, los resultados obtenidos son similares o menores al obtenido con GE, ya que los halos producidos son pequeños y presentan diferencia significativa con el obtenido con SXT, lo que significa que tuvieron un efecto antimicrobiano bajo y podrían no ser de utilidad contra *E. coli* o algunas otras bacterias gram negativas.



Gráfica 7. Comparación de la medida de los halos obtenidos en el antibiograma realizado con los compuestos del grupo G y los controles Gentamicina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

Este grupo posee estructuras variadas, sin embargo, coinciden en que a diferencia de los otros seis grupos, no se componen de heterociclos, pero poseen en su estructura por lo menos un benceno trisustituido. En este grupo, el pirazol fue el que generó el menor efecto antibacteriano contra *E. coli*, seguido por la piridazina (G1 y G2, respectivamente); en cambio las hidrazidas generaron un efecto similar entre sí, lo cual se esperaba debido a que sus estructuras sólo se diferencian por el tamaño de sus cadenas y porque algunos son ésteres (G3, G4 y G5), mientras que otros son ácidos carboxílicos (G6 y G7). G3 fue el compuesto que generó el halo de inhibición más grande del grupo, posiblemente debido al tamaño de su estructura.

Al igual que el grupo G, Gentamicina es una molécula que no se compone de heterociclos, por lo que comprender su mecanismo de acción es de interés en la comparación del efecto obtenido para ambos. Gentamicina es un aminoglucósido que posee un mecanismo de acción en el cual interrumpe la lectura del ARNt, debido a su unión irreversible con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano^{20, 47}, específicamente GE se une a nucleótidos del ARNr 16S, lo que interfiere con el sitio de decodificación, ubicado en las proximidades del nucleótido 1400⁴⁷, hasta el 1500⁴⁸⁸ y genera péptidos no funcionales; la parte de la estructura de GE que genera la mayor interacción con el RNAr 16S es la unidad 2-desoxiestreptamina 4,6 disustituida⁴⁸⁸, debido a sus radicales amino y la conformación estérica que presentan frente al resto de la estructura⁴⁹⁹, tal como se observa en la Figura 13.

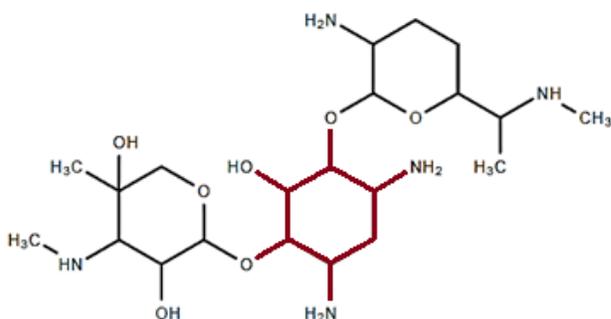


Figura 13. Estructura de Gentamicina, se señala con rojo la unidad 2-desoxiestreptamina 4,6 disustituida de la estructura.

De manera estructural en los 67 compuestos evaluados es evidente la presencia de grupos amino, ya sea formando parte de la estructura principal o como sustituyentes. A7, C1 y C2 fueron los compuestos que presentaron la mayor efectividad como antimicrobianos, estructuralmente poseen sustituyentes amino sin impedimento estérico para su reacción, lo que puede haber influido en el efecto producido a *E. coli*, sin embargo no se podría asegurar que fue un mecanismo de acción similar al de GE por el cual actuaron, ya que otros compuestos que produjeron halos menores también poseen sustituyentes amino.

El poseer bencenos en las estructuras de los compuestos en estudio facilita la interacción con otros sustituyentes⁴¹¹. Cuando el sustituyente se encuentra unido al anillo bencénico, si se trata de grupos amino o nitro en posición para, se obtienen resultados más efectivos como antimicrobianos, ya que a pesar de las diferencias de sus cargas, el grupo nitro genera un fuerte efecto atrayente de electrones, por lo tanto los deslocaliza; mientras que el grupo amino, gracias al nitrógeno que posee, contribuye afinidad a las enzimas sobre las que actúa y además tiene capacidad de reaccionar con grupos carbonilo⁵⁰.

Específicamente para el caso de los derivados de benzimidazoles, su mecanismo de acción está basado en la funcionalidad de su estructura, gracias al sistema de anillo que posee como núcleo. Se debe tomar en cuenta que de los benzimidazoles se conoce su acción antihelmíntica, la cual llevan a cabo mediante la inhibición de tubulina⁵¹ y su acción fungicida, que se da por la interrupción de la síntesis del DNA y RNA fúngico, dando como efecto secundario el bloqueo de la división nuclear y celular²⁶. Lo anterior orienta en la descripción del posible mecanismo de acción de las moléculas en estudio; la estructura de algunos compuestos en estudio son hasta cierto punto similares a la estructura de PABA, ya que poseen un benceno que tiene como sustituyente a un grupo amino, libre de impedimento estérico, sugiriendo la interrupción de la biosíntesis del ácido fólico y por otro lado, se encuentra al anillo del benzimidazol formando parte de la vitamina B12 (específicamente como dimetilbenzimidazol)⁵¹ (Figura 14), del cual las moléculas en estudio podrían ser análogos e inhibir también la biosíntesis de la vitamina B12. Si lo anterior es cierto, se explica porque los compuestos A7, C1 y C2, quienes poseen ambas características, fueron más eficaces contra *E. coli*, comparándolos con B6 y A10, quienes sólo poseen la segunda, ya que los sustituyentes que poseen no son aminas, sino grupos nitro. Además de la efectividad mostrada, si su mecanismo de acción es como se describe, el daño producido sería sólo sobre bacterias,

puesto que ellas sintetizan la vitamina B12 y el ácido fólico, los humanos y animales las obtenemos de la dieta, disminuyendo así efectos adversos.

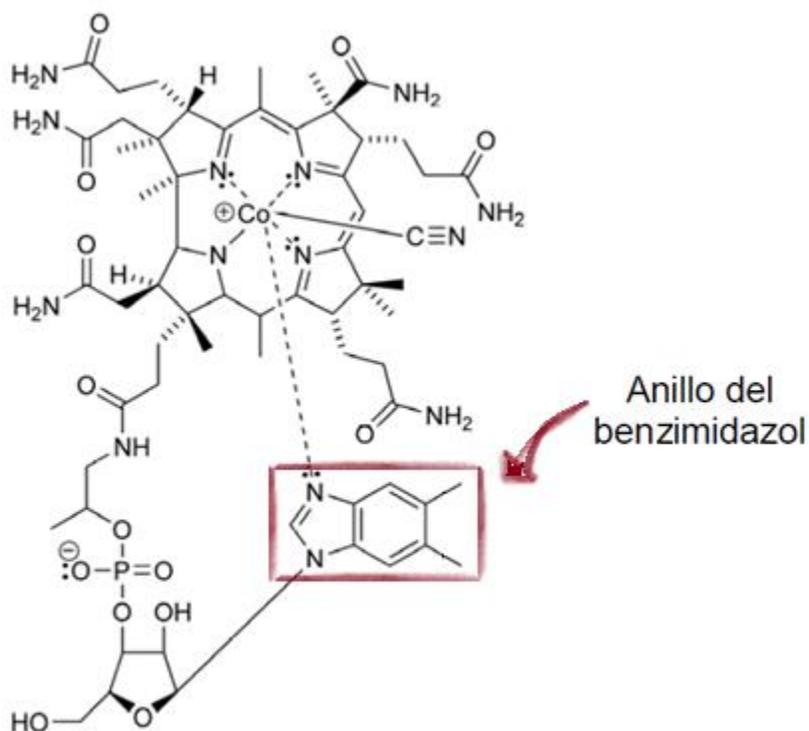


Figura 14. Estructura de la vitamina B12. En esta molécula el anillo del benzimidazol está presente en forma de dimetilbenzimidazol; este grupo se encuentra ligado covalentemente por uno de sus átomos de nitrógeno al carbono del pentacarbhidrato y de manera coordinada con el cobalto⁵¹.

En cuanto a los compuestos del grupo G, los cuales no derivan de los benzimidazoles, G3 fue el que tuvo la actividad antimicrobiana más eficaz ante *E. coli*, pero es aún muy baja en comparación con los compuestos que presentaron la mayor eficacia, tales son el A7, A10, B6, C1 y C2. G3, G4, G5, G6 y G7 tuvieron en realidad actividad antimicrobiana similar, lo que se refleja en el tamaño de sus halos, la cual principalmente podría deberse a la funcionalidad de sus tres grupos amino y la de su grupo nitro, ambas descritas con anterioridad. Si se comparan

estos cinco compuestos con G1 y G2, los cuales sólo poseen un grupo amino funcional y un grupo nitro, se observa que hay diferencia entre la actividad antimicrobiana que presentan.

Como se mencionó anteriormente, el calificar a una bacteria como sensible o resistente depende de los criterios señalados en la literatura para cada antimicrobiano; en este estudio, puesto que los compuestos probados se consideran nuevos, no existen tales señalamientos y es por ello que de acuerdo a lo anteriormente descrito para GE y SXT, que son los controles experimentales, los compuestos que produjeron halos de inhibición mayores a 15 mm fueron los que se consideraron relevantes para continuar con su análisis, es decir, los compuestos A7, A10, B6, C1, C2, y G3. Entre lo que se espera determinar en un futuro se encuentran las dosis efectivas y la toxicidad de los compuestos evaluados, ya que esto es de utilidad para determinar su posible uso en el ámbito clínico, ya sea humano o veterinario.

8. CONCLUSIONES

Se logró identificar y comprobar mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias que, en efecto, la bacteria con la que se llevó a cabo la experimentación fue *Escherichia coli*, de la cual la cepa empleada fue la ATCC 8739. Esto fue de suma importancia debido a que contribuyó en la estandarización del diseño experimental.

Los compuestos evaluados en el presente estudio fueron en su mayoría derivados de benzimidazoles, de los cuáles se pudieron determinar cómo los más efectivos a A7, C1 y C2, con halos de inhibición de 30, 29 y 31 mm respectivamente, y se propuso que su mecanismo de acción puede estar relacionado con la inhibición de la biosíntesis de vitamina B12 y ácido fólico gracias a la estructura que poseen, como es el caso de SXT; en comparación con los tres compuestos anteriores, tanto B6 y A10, con 17 y 21 mm de halo respectivamente, se encontraron menos efectivos contra *Escherichia coli*, para los cuales el posible mecanismo de acción propuesto se basa sólo en la inhibición de la biosíntesis del ácido fólico. De los 6 compuestos calificados como los más sobresalientes, el compuesto G3 fue quién presentó menor actividad, lo que se cree que es debido a que no deriva del benzimidazol y su efecto es comparable con GE.

Finalmente se encontró que debido a los posibles mecanismos de acción que poseen, pueden ser de utilidad en el ámbito clínico, sin embargo, esto debe comprobarse con ensayos de toxicidad en un futuro.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ccencho, K. (2017). *Presencia de coliformes, E. coli y Staphylococcus aureus en huevo cocido de codorniz (Coturnix coturnix) y la relación con las condiciones sanitaria de puestos de venta ambulatoria de los mercados del distrito de Santa Anita*. (Tesis de pregrado) Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Perú.
2. Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. México: Médica Panamericana.
3. Kamran, M., Samreen, Z., Xiu, J., Taj, I., Hassani, M. y Yunlin, W. (2014). *Escherichia coli* as a model organism. *International Journal of Engineering Research and Science & Technology*, 3(2), 1-8.
4. Águila, A., Bernedo, R., Llop, A., Ramírez, M., Bravo, L., Fernández, A. y Ledo, Y. (2007). Estudio de marcadores fenotípicos y de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* entéricas. *Revista cubana de Medicina Tropical*, 59(2), 102-107.
5. Kaiser, E. (2017). *Escherichia coli*. Maryland: College of Baltimore. Recuperado de <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab1/gnrod.html>
6. [Fotografía de Mejía, B.] (Colombia, 2012) *Colibacilosis aviar. Una enfermedad compleja. Parte I: la bacteria*. Recuperado de http://patologiaaviarmiagnostico.blogspot.com/2012/01/colibacolibac-aviar-una-enfermedad_31.html
7. Lopardo, H., Predari, S. y Vay, C. (2016). *Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: enterobacterias*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología.
8. [Fotografía de Méndez, L.] (2009). *Enterobacterias, Klebsiella, Salmonella, Serratia*. Recuperado de <https://es.slideshare.net/luzmerymd3/enterobacterias-klebsiella-salmonella-serratia>
9. Farmer, J. (1995). Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En Murray, P. y Jo Baron, E. (6° ed.), *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology.
10. Puerta, A. y Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426-3431
11. Prats, G. (2006) *Microbiología clínica*. Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana.
12. Montoro, M. y García, J. (2013). *Gastroenterología y patología* (2° ed.) España: Jarpvo.
13. Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Revista de Salud Pública de México*, 44, 464-475.

14. Riveros, M. (2011). Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 21-28.
15. Eslava, C., Mateo, J. y Cravioto, A. (1994). Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En Giono, S., Escobar, A. y Valdespino, J., *Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales*. México: Secretaria de Salud.
16. Nataro, J. & Kaper, J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Revista Clínica de Microbiología*, 11, 142-201.
17. Rademaker, C., Wolfhagen, M., Jansze, M., Oteman, M., Fluit, A., Glerum, J. y Verhoef, J. (1992). Digoxigenin labelled DNA probes for rapid detection of enterotoxigenic and Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* in faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 15(2), 121-127.
18. Universidad Nacional del Nordeste. (2007). *Antibióticos y Antimicrobianos*. Argentina: Facultad de Agroindustrias. Recuperado de <https://www.agrovetmarket.com>
19. Pírez, M. y Mota, M. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (2° ed). Uruguay: Universidad de la República, Oficina del libro FEFMUR.
20. Calvo, J. y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Microbiología Clínica*, 27, 44-52.
21. Forstmeier, K. (2015). *Antibiotic Mechanisms*. Pensilvania: The Pennsylvania State University. Recuperado de https://online.science.psu.edu/micrb106_wd/node/6053
22. Organización Mundial de la Salud (2017). *Resistencia a los antimicrobianos*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
23. Picazo, J. (2000). *Procedimientos en microbiología clínica*. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
24. Hector, G. (2014). *Azoles*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de <http://depa.fquim.unam.mx>
25. Barthelemy, C., Cornago, P. y Esteban, S. (2015) *Química heterocíclica*. España: UNED
26. Leen, C. (1986). Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and Biological impact. *Phytopathol*, 24, 43-65.
27. Hector, G. (2014). *Diazinas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de <http://depa.fquim.unam.mx>
28. Bünzli, U. (2007). *Systematic Nomenclature of Organic, Organometallic and Coordination Chemistry*. India: EPFL Press.

29. ALFA AESAR (2018). *Hydrazide*. Massachusetts: Thermo Fisher Científico. Recuperado de <https://www.alfa.com/es/hydrazide/>
30. Gennaro, R. (2003). *Remington Farmacia*. (20° ed.) Buenos Aires: Médica Panamericana.
31. Malgor, L. y Valsecia, M. (2013) *Farmacología de las drogas antiparkinsonianas*. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste. Recuperado de: https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/5_parkins.pdf
32. Luna, R. (2013). *Síntesis de nuevos derivados de benzimidazolil-diindolilmetanos y evaluación de su actividad antifúngica*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
33. Bernal, M. y Guzmán, M. (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica*, 4(4), 112-121.
34. Brooks, G. (2010). *Jawetz, Melnick, & Adelberg. Microbiología Médica* (25° ed.) México: Mc Graw-Hill
35. BIORAD (2011). *Multidiscos® II*. México: BIORAD. Recuperado de <http://sdpmexico.com.mx/files/MULTIDISCOS.pdf>
36. Cavalieri, S. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Washington, D.C: American Society for Microbiology.
37. Herrera, M. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional para Niños*, 34.
38. Téllez, E. (2016). *Halos de Inhibición CLSI* Chile: EMARIN SDA
39. Kerns, E. (2008). *Drug-like properties. Concepts, structure, designs and methods: from ADME to toxicity optimization*. USA: Elsevier.
40. Gaspar, M. (2011). Efectividad de un protocolo de tratamiento tópico con dimetilsulfóxido al 50% en el síndrome de dolor regional complejo tipo 1. *Farmacia Hospitalaria*, 36(5), 385-391.
41. Botello, A. (2005). *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (2° ed.) México: Universidad Autónoma de Campeche.
42. DRUGBANK (2005). *Sulfamethoxazole* Canada: Canadian Institutes of Health Research. Recuperado de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01015>
43. Reynolds, J.E.F. (1993). *Martindale: The extra pharmacopoeia* (30° ed.) Londres: The Pharmaceutical Press.
44. Kester, M., Dowhower, K. y Vrana, K. (2012). *Elsevier's Integrated Review Pharmacology* (2° ed.) Filadelfia: Elsevier Saunders.
45. Lundstrom, T. y Sobel, J. (1995). Vancomycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Rifampin. *Reviews of Infectious Diseases*, 9(3), 747-764.

46. Vives, E., Ventriglia, M. y Rothlin, R. (2004). *Quimioterapicos inhibidores de la síntesis de ácido tetrahidrofólico*. Farmacomedia. Recuperado de <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/quimioterapicos-inhibidores-de-la-sintesis-de-acido-tetrahidrofólico.pdf>
47. DRUGBANK (2005). *Gentamicin*. Canada: Canadian Institutes of Health Research. Recuperado de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00798>
48. Latorre, M. (2008). *Obtención y caracterización bioquímica de una enzima de resistencia a antibióticos aminoglicósidos: 6-adeniltransferasa de Bacillus subtilis*. (Tesis de pregrado) Universidad Complutense de Madrid, España.
49. Hilal-dandan, R. y Brunton, L. (2015). *Goodman & Gilman. Manual de farmacología y terapéutica* (2° ed.) New York: McGraw-Hill Interamericana
50. Korolkovas, A. y Burckhalter, J. (1983). *Compendio esencial de química farmacéutica*. España: Reverté.
51. Márquez, A. (2008) *Actividad antihelmíntica de derivados del benzimidazol sobre Hymenolepis nana y Toxocara canis*. México: Instituto Politécnico Nacional.