



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

Evaluación de la actividad antifúngica de nuevos compuestos derivados de benzimidazol, pirazol, piridazina e hidrazidas, enfrentados a *Candida albicans*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:  
**CLARA VERÓNICA OROZCO ALCÁNTARA**

**ASESORA:**  
M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez

**COASESORES:**  
Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez  
Dr. José Guillermo Penieres Carillo

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por dotarme de las habilidades, capacidades y destrezas necesarias para desenvolverme y crecer día con día, por poner en mi camino a las personas adecuadas, por darme fuerza, fe y calma en los momentos difíciles, por brindarme una nueva oportunidad cada día y permitirme seguir creciendo y preparándome.

A mi familia, con todo mi amor, admiración y respeto.

A mi padre, Francisco “Franzua”, primero que nada por demostrarme tu amor siempre, por proveerme todo lo necesario y por no permitir que nada me faltara, por confiar y creer en mí, por guiarme, por darme tu confianza, por todo tu apoyo y comprensión; no existen palabras que me alcen para agradecer todo tu esfuerzo, tus desvelos y arduo trabajo, por el momento, sólo puedo decirte que todo lo que soy ahora jamás hubiera podido ser posible sin ti, gracias por aconsejarme, por platicar conmigo en vez de regañarme, por preocuparte, por consentirme, por dejarme crecer y por siempre respetar y apoyar mis decisiones. Debes saber que, así como lo diste todo por verme realizada, cuando llegue el día, yo me esforzaré de la misma manera por apoyarlos en el camino, ahora es mi turno.

A mi madre, Eduarda, mi “mesha”, gracias por criarme, educarme y por compartir conmigo todo tu tiempo, gracias por tenerme paciencia, por decirme las cosas que están mal o que puedo mejorar, aunque me enoje, por confiar en mí, por apoyarme y por apapacharme y quererme siempre, gracias por todo tu esfuerzo, tu trabajo y por nunca permitir que algo nos faltara. Gracias por ser el ejemplo que necesitaba, por enseñarme a trabajar duro y nunca rendirme, por demostrarme que nunca es tarde para hacer lo que nos gusta y alcanzar nuestras metas, gracias por enseñarme a superar todas las adversidades y a valerme por mí misma; quiero que sepas que, aunque a veces nuestras peleas son muy recurrentes y parecen no tener fin, el amor y respeto que te tengo jamás cambiará. Sé que estas palabras no son, ni serán suficientes para agradecerte todo lo que has hecho por mí, sin embargo, son desde el fondo de mi corazón y con todo mi amor.

Es a ustedes, mis padres, a quienes les debo la vida y el ser la persona que soy, este logro es tan mío como de ustedes, lo logramos. Los amo.

A mis hermanos. A ti Oscar te doy gracias por cuidarme, apoyarme, aconsejarme y quererme a pesar de todo, gracias por siempre extenderme tu mano cuando la necesito, por acompañarme a lo largo de todas mis etapas y por cubrir mis travesuras; debes saber que no importa cuántas veces discutamos, yo siempre voy a estar para ti, para apoyarte. Deseo de todo corazón que encuentres tu camino y, que una vez estando ahí explotes todo tu potencial y seas la persona que estas destinada a ser, puesto que, no hay nada de lo que no seas capaz, espero que un día entiendas

que el enemigo más grande al que debemos enfrentarnos es a nosotros mismos, sé que cuando dejes de ser tu propio enemigo, tú y todo a tu alrededor florecerá; lucha, inténtalo, fracasa y vuelve a fracasar, pero por favor, no dejes de intentarlo, sé que lo vas a lograr, confío en ti.

David, mi cochinito, tú eres más que mi hermano menor, eres mi compañero, mi amigo y una de mis personas favoritas en el mundo, tengo que agradecerte el ser esa luz en mi vida, porque eres tú quien más de una vez me ha sacado una sonrisa en mis peores días, aún desde pequeño con tu gracia y forma de ser. Gracias porque a pesar de ser el más “tampiqueño” siempre te preocupas por mí y me cuidas como si fueras mi hermano mayor, debes saber que siempre voy a estar para ti, sin importar nada, siempre vas a poder contar conmigo, no debes tener miedo de nada, yo siempre estaré respaldándote, sé que llegarás muy lejos y que vas a lograr todo lo que te propongas, vas por muy buen camino, solo sigue esforzándote.

A ambos, les quiero dar un último gracias, por soportarme en mis peores días y por ser parte fundamental de los buenos, por compartir conmigo risas y bromas que siempre hacen de mis días algo más ameno, por ser mis camaradas y compañeros de vida, los amo.

A mi tita, Rosario, por siempre orar por mí, por tus palabras de aliento, tus consejos y tu paciencia, gracias por el apoyo y la compañía a lo largo de toda mi vida, pido a Dios que te permita estar muchos años más con nosotros y le agradezco por tenerte aún conmigo. Y aunque sé que Oscar es tu “consen”, no me cabe la menor duda de que me quieres de la misma manera que yo a ti. Gracias por todo, Abue.

A Omar, mi amoshito, gracias por acompañarme y apoyarme, por brindarme siempre tu amor y comprensión, gracias por el tiempo compartido y por siempre impulsarme a luchar y alcanzar mis metas, por quererme tal como soy, pero también por ayudarme a ser una mejor persona, gracias por darme ánimos en los momentos difíciles, por volverme parte de tu vida y por permitir que compartamos nuestro desarrollo, tanto personal como profesional. Gracias por ser mi amigo además de mi novio, por siempre tener tiempo de escucharme, por siempre buscar arreglar nuestras diferencias, por hacerme reír con tus ocurrencias, por consentirme y por brindarme tanto amor. Gracias por ser parte fundamental de días tan importantes para mí, pronto estaremos festejando tu titulación; sobra decirlo, pero cuenta conmigo, estaré para ti en cada momento, en cada logro y fracaso, somos un gran equipo. Te amo.

A Brenda “Mrlos”, mi chenequechene, a ti amiguita, tengo una lista interminable de cosas que agradecerte, has estado presente en mi vida, literalmente, desde que tengo memoria, son tantas las etapas y momentos que hemos vivido juntas, que lo único que puedo hacer es agradecerte por cada uno de ellos, gracias por tu apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, por siempre estar para escucharme, por compartir conmigo mis momentos felices, por festejar mis logros y por nunca dejarme sola en mis fracasos, eres mi mejor amiga, y sé que nuestros 25 años no son nada en

comparación del tiempo que nos queda por compartir, te amo y te admiro. Vamos por más, vamos por lo que siempre soñamos, siempre amix, nunca enemix jajaja, siempre juntas.

A Ita y a Osvaldo, no me alcanzan las palabras para agradecer todo lo que en tan poco tiempo han hecho por mí, gracias por abrirme las puertas, no solo de su empresa, sino de su vida, gracias por darme tantas oportunidades, por todo el apoyo y la confianza que han puesto en mí, gracias por extenderme una mano amiga siempre que la necesito, gracias por apoyar mi crecimiento profesional y por compartir conmigo todo su conocimiento y enseñanzas. Son un ejemplo a seguir y ahora sé, que puedo lograr todo lo que me proponga, siempre y cuando me rodee de las personas adecuadas, gracias por ser parte de mis logros personales y profesionales más recientes y más importantes, conocerlos, en especial a ti Ita, fue un parteaguas en mi vida, agradezco infinitamente a quien te cruzo en mi camino. Ambos cuentan con toda mi admiración, gratitud, cariño y apoyo.

A la familia que elegí, mis compañeros, amigos y ahora colegas.

A Dian y July Zagui, agradezco el día que se cruzaron en mi camino, desde ese entonces hemos sido “las manas” jaja, tengo mucho que agradecerles, pero voy a empezar agradeciendo su amistad, gracias por acompañarme a lo largo de este camino y por hacer que todo fuera más sencillo, siempre fuimos un gran equipo y sé que nos esperan muchas cosas buenas. Gracias por toda la confianza que me tuvieron, por permitirme ser parte de sus vidas y aún más, por permitirme seguir siendo parte de ellas. Sigamos juntas, aún a pesar de los rumbos que nuestras vidas puedan tomar, no dejemos que esta amistad se desgaste, yo siempre estaré para ustedes, soy muy afortunada de tenerlas, las quiero.

A Oli, mi manito, no cabe duda de que eras tú quien nos brindaba luz en los días oscuros, con tu gracia y carisma, con todas tus ocurrencias, gracias por eso, sin ti los días en la FESC no hubieran sido los mismos. De manera personal quiero darte las gracias por todo tu apoyo, por escucharme y por ser ese amigo incondicional que todos deberían tener la fortuna de conocer, yo la tuve. Sé que llegaras muy lejos y deseo de todo corazón que sigas siendo la persona que eres, eres único, en serio, no dejes que nada ni nadie apague esa chispa jamás; cuenta conmigo siempre. Órale pues, así le hacemos. Te quiero.

A Monse Mendoza (MM) y Jhony, a pesar de que a ustedes los conocí mucho tiempo después eso no impidió que se convirtieran en una parte importante de mi paso por la FESC, gracias por estar ahí, por todo el apoyo, gracias por ser parte de esto y de tantos momentos vividos, les deseo el mejor de los éxitos hoy y siempre. Los quiero.

Por último, a todos ustedes y al resto de mis amigos y colegas, incluyendo a Sonia, Yes, Almita, Jorge, Sarita e Itamar, les deseo una vida llena de éxitos, que todos sus sueños, metas y objetivos se cumplan, que en su camino se crucen solo personas que les sumen, que todo su entorno este

siempre lleno de bendiciones y cosas buenas. Amigos, los quiero y sepan que siempre pueden contar conmigo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura, formarme como profesionista y hacerme crecer en el ámbito científico y personal.

A mis profesores, por todo el esmero, la pasión y dedicación a la enseñanza, por todos los conocimientos transmitidos que me permiten desenvolverme como profesionista, por los consejos y enseñanzas no sólo a nivel profesional sino también personal.

A la M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez, por volverme parte de su equipo de trabajo, por el apoyo brindado, las palabras de aliento, la comprensión y la paciencia a lo largo del desarrollo de este trabajo y fuera del mismo, por compartir conmigo sus conocimientos, experiencia y tiempo, gracias.

Al Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez, por integrarme al gran equipo de trabajo del laboratorio 6, por la confianza, el apoyo, la enseñanza y por impulsar siempre en mí continuar hasta lograr mis objetivos, gracias.

Al Dr. José Guillermo Penieres Carrillo, por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo, por brindarme las bases para este trabajo, por el apoyo, la asesoría y la paciencia, gracias.

Al Dr. Ricardo Alfredo Luna Mora por compartir conmigo los frutos de su trabajo y esfuerzo, por permitirme evaluar la actividad biológica de sus compuestos y sentar las bases de este trabajo, por el apoyo, la asesoría y por compartir conmigo sus conocimientos y tiempo, gracias.

Al comité sinodal: Dr. René Miranda, Dr. Enrique Salas, M. en C. Betsabé Rodríguez, M. en C. Judith García y QFB. Leticia Cubillo, por sus observaciones, revisión cuidadosa y valiosas recomendaciones que indudablemente mejorarán este trabajo.

### **ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO EL APOYO DE:**

- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN218515 *“Síntesis de derivados de triazo-ciclos 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 PI-API-1618 *“Química Heterocíclica”* de la FES Cuautitlán.
- Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación PI-API-1632 *“Desarrollo de productos sintéticos y prototipos farmacéuticos a base de propóleo para su aplicación en la salud animal”* de la FES Cuautitlán.

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Este trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, UNAM, en el laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), a cargo del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	5
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN .....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	10
2.1 <i>Candida albicans</i> .....	10
2.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES .....	10
2.1.1.1 CRECIMIENTO.....	10
2.1.1.2 REPRODUCCIÓN .....	11
2.1.2 CANDIDIASIS .....	11
2.1.3 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	15
2.1.4 EPIDEMIOLOGÍA.....	15
2.1.4.1 VÍA DE ENTRADA .....	15
2.1.4.2 FACTORES PREDISPONENTES .....	15
2.1.5 PATOGENIA .....	16
2.1.5.1 FACTORES DE PATOGENICIDAD .....	17
2.1.6 FORMAS CLÍNICAS .....	18
2.1.7 DIAGNÓSTICO .....	20
2.1.7.1 TOMA DE MUESTRA .....	20
2.1.7.2 EXAMEN DIRECTO .....	22
2.1.7.3 CULTIVOS.....	22
2.1.7.4 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y PRUEBAS INMUNOLÓGICAS .....	24
2.1.8 TRATAMIENTO .....	26
2.2 ANTIFÚNGICOS .....	26
2.2.1 RETROSPECTIVA.....	26
2.2.2 CLASIFICACIÓN .....	27
2.2.3 GENERALIDADES DE LOS PRINCIPALES ANTIFÚNGICOS.....	31
2.2.4 ANTIFÚNGICOS DE USO TÓPICO .....	33
2.2.5 ANTIFÚNGICOS DE USO SISTÉMICO .....	33
2.3 RESISTENCIA ANTIFÚNGICA.....	33



2.3.1	RESISTENCIA ANTIFÚNGICA EN <i>Candida albicans</i> .....	34
2.3.1.1	MECANISMOS DE RESISTENCIA .....	34
2.4	MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA .....	36
2.4.1	GENERALIDADES .....	36
2.4.2	CLASIFICACIÓN .....	36
2.4.3	MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA .....	37
2.4.3.1	ANTECEDENTES .....	37
2.4.3.2	FUNDAMENTO Y METODOLOGÍA .....	37
2.5	BENZIMIDAZOLES, PIRAZOLES, PIRIDAZINAS E HIDRAZIDAS .....	38
2.5.1	BENZIMIDAZOLES.....	39
2.5.3	PIRIDAZINAS.....	42
2.5.4	HIDRAZIDAS .....	43
3.	JUSTIFICACIÓN .....	44
4.	OBJETIVOS.....	45
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	45
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
5.	HIPÓTESIS .....	45
6.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	46
6.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
6.2	COMPUESTOS ORGÁNICOS A EVALUAR, PREVIAMENTE SINTETIZADOS .....	47
6.3	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD, PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO E IMPREGNACIÓN DE DISCOS .....	51
6.4	ACONDICIONAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, SIEMBRA Y CRECIMIENTO DE LA CEPA <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 .....	51
6.5	PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO .....	52
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
8.	CONCLUSIONES.....	72
9.	PROSPECTIVAS DEL PROYECTO .....	73
10.	REFERENCIAS.....	74
11.	ANEXOS .....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Candida albicans</i> . Micrografía electrónica. (Naffes y James, 2011).....	10
<b>Figura 2.</b> Colonia de <i>Candida albicans</i> en medio cromogénico (Bonifaz, 2012). .....	11
<b>Figura 3.</b> Blastoconidios y pseudohifas (PAS, 100X) (Bonifaz, 2012). .....	11
<b>Figura 4.</b> Distribución de frecuencia de las especies de <i>Candida</i> que causan candidiasis superficial en México durante el período 2005-2015. a) Candidiasis oral b) Candidiasis genital c) Onicomicosis d) Candidiasis cutánea (Reyes, et al., 2017). .....	13
<b>Figura 5.</b> Distribución de frecuencia de las especies de <i>Candida</i> que causan candidiasis invasiva en México durante el período 2005-2015 (Reyes, et al., 2017).....	14
<b>Figura 6.</b> Patogenia de las infecciones por <i>Candida albicans</i> (Naffes y James, 2011).....	17
<b>Figura 7.</b> Algoritmo de diagnóstico del género <i>Candida</i> (Modificado de Bonifaz, 2012)...	20
<b>Figura 8.</b> Examen directo de candidiasis; KOH 40X (Bonifaz, 2012).....	22
<b>Figura 9.</b> <i>Candida albicans</i> , 40X (Brooks, et al., 2013).....	22
<b>Figura 10.</b> Cultivo de <i>Candida albicans</i> en <b>A)</b> Sabouraud y <b>B)</b> Biggy-Nickerson .....	23
<b>Figura 11.</b> Cultivo de <i>Candida</i> spp. en CHROM agar- <i>Candida</i> (Bonifaz, 2012).....	23
<b>Figura 12.</b> Tubo germinativo <i>Candida albicans</i> ; 1000X (Brooks, et al., 2013).....	24
<b>Figura 13.</b> Mecanismo de acción de los antifúngicos (Bonifaz, 2012). .....	29
<b>Figura 14.</b> Sitios donde actúan los principales antifúngicos (Naffes y James, 2011).....	30
<b>Figura 15.</b> Estandarización del inóculo (Cavaliere, 2005). .....	38
<b>Figura 16.</b> Ejemplo de lectura de halos de inhibición (Cavaliere, 2005). .....	38
<b>Figura 17.</b> Estructura del 1H-benzimidazol. ....	39
<b>Figura 18.</b> Estructura de benzo[d][1,3] azoles, benzo [d][1,2] azoles y benzo [c][1,2] azoles; la letra "Z" indica los posibles heteroátomos en las moléculas. (Modificada de Hector, 2014).....	40
<b>Figura 19.</b> Núcleo multifuncional del benzimidazol (Bansal y Silakari, 2012).....	41
<b>Figura 20.</b> Estructura de 1,3-azoles y 1,2-azoles; la letra "Z" indica los posibles heteroátomos en las moléculas (Hector, 2014). .....	42
<b>Figura 21.</b> Estructura de diazinas (Hector, 2014). .....	42
<b>Figura 22.</b> Estructura general de las hidrazidas. ....	43
<b>Figura 23.</b> Diagrama de flujo .....	46
<b>Figura 24.</b> Tinción gram <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 40X.....	54
<b>Figura 25.</b> Antibiograma miconazol (testigo positivo). .....	54

<b>Figura 26.</b> Antibiograma DMSO (testigo negativo). .....	54
<b>Figura 27. A)</b> Distribución de los discos en placa para las pruebas por triplicado (disco azul: testigo negativo), <b>B)</b> Distribución del disco en placa para las pruebas individuales..	56
<b>Figura 28. A)</b> Compuesto G4: sobreposición de halos, <b>B)</b> Compuesto G4: prueba de inhibición individual (diámetro de halo de inhibición marcado en color azul). .....	56
<b>Figura 29. A)</b> Compuesto D2, <b>B)</b> Compuesto D7, <b>C)</b> Compuesto D10. Diámetro de halos de inhibición señalados en color azul. ....	63
<b>Figura 30.</b> Compuesto F3 (sin halo de inhibición). .....	64
<b>Figura 31. A)</b> Compuesto G2, <b>B)</b> Compuesto G3, <b>C)</b> Compuesto G4, <b>D)</b> Compuesto G5, <b>E)</b> Compuesto G6 y <b>F)</b> Compuesto G7. Diámetro de halos de inhibición señalados en color azul. ....	66
<b>Figura 32.</b> Mecanismo de acción de los antifúngicos que actúan en la vía de síntesis del ergosterol. (Modificada de López, et al., 2016).....	69
<b>Figura 33.</b> Comparación de los componentes estructurales de: <b>A)</b> Miconazol, <b>B)</b> Compuesto D2, <b>C)</b> Compuestos D7 y <b>D)</b> Compuesto D10. ....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Variedades clínicas de candidiasis más comunes.....	18
<b>Tabla 1.</b> Variedades clínicas de candidiasis más comunes (continuación).....	19
<b>Tabla 2.</b> Obtención de muestras clínicas según el tipo de candidiasis. ....	20
<b>Tabla 2.</b> Obtención de muestras clínicas según el tipo de candidiasis (continuación). ....	21
<b>Tabla 2.</b> Obtención de muestras clínicas según el tipo de candidiasis (continuación). ....	22
<b>Tabla 3.</b> Zimograma y Auxonograma del género <i>Candida</i> . ....	25
<b>Tabla 4.</b> Clasificación y mecanismos de acción generales de los antifúngicos. ....	28
<b>Tabla 5.</b> Características, estructura química y mecanismo de acción de los principales antifúngicos de uso clínico. ....	31
<b>Tabla 5.</b> Características, estructura química y mecanismo de acción de los principales antifúngicos de uso clínico (continuación). ....	32
<b>Tabla 6.</b> Compuestos de estudio por grupo .....	47
<b>Tabla 7.</b> Compuestos orgánicos de estudio. ....	48
<b>Tabla 8.</b> Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo A.....	58
<b>Tabla 9.</b> Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo B.....	59
<b>Tabla 10.</b> Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo C.....	60
<b>Tabla 11.</b> Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo D.....	62
<b>Tabla 12.</b> Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo E.....	63
<b>Tabla 13.</b> Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo G. ....	65

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo A, con respecto al testigo positivo (miconazol). .....	58
<b>Gráfica 2.</b> Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo B, con respecto al testigo positivo (miconazol). .....	60
<b>Gráfica 3.</b> Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo C, con respecto al testigo positivo (miconazol). .....	61
<b>Gráfica 4.</b> Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo D, con respecto al testigo positivo (miconazol). .....	62
<b>Gráfica 5.</b> Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo E, con respecto al testigo positivo (miconazol). .....	64
<b>Gráfica 6.</b> Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo G, con respecto al testigo positivo (miconazol). .....	66

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>µg</b>	microgramos
<b>µm</b>	micrómetros
<b>µL</b>	microlitros
<b>ABC</b>	ATP Binding Cassette (Casete de Unión de ATP)
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
<b>CMB</b>	Concentración Mínima Bactericida
<b>CMF</b>	Concentración Mínima Fungicida
<b>CLSI</b>	Clinical & Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>DMSO</b>	Sulfóxido de dimetilo
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligando-enzima)
<b>g</b>	gramo
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus (Virus de Inmunodeficiencia Humana)
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
<b>mg</b>	miligramos
<b>MHA</b>	Mueller Hinton Agar
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>MFS</b>	Major Facilitators Superfamily (Superfamilia de Facilitadores Principales)
<b>PAS</b>	Peryodic Acid Schiff (Ácido Peryódico de Schiff)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>PDR</b>	Pleiotropic Drug Resistance (Resistencia Farmacológica Pleiotrópica)
<b>RAPD</b>	Random Amplification of Polymorphic DNA (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico)
<b>SAR</b>	Structure Activity Relationship (Relación Estructura Actividad)
<b>SDA</b>	Sabouraud Dextrosa Agar
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>SSF</b>	Solución Salina Fisiológica
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonia

## RESUMEN

En el presente trabajo fueron evaluados 67 nuevos compuestos derivados de benzimidazol, pirazol, piridazina e hidrazida, obtenidos mediante síntesis orgánica, para determinar si alguno presenta actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, esto se realizó con base en la metodología de difusión en disco (M44-A2), con algunas modificaciones de acuerdo a las condiciones y recursos de experimentación disponibles. Como microorganismo de prueba fue empleada la cepa *Candida albicans* ATCC 10231, ésta se cultivó en placas Mueller-Hinton adicionadas con 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno, a partir de resiembras en agar SDA de la cepa proporcionada por el Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, UNAM.

Para la evaluación de los compuestos orgánicos se emplearon discos de papel filtro impregnados de las soluciones de cada compuesto, asegurando una concentración de 4 mg/disco, sin embargo, algunos compuestos fueron insolubles (A2, A6, A8, B3, C6, C7, C10, E2 y E3), por tal motivo fueron descartados de la experimentación; de igual forma, en algunos compuestos se presentaron problemas en las lecturas de los resultados del diámetro de sus halos de inhibición por sobreposición de los mismos, derivado de ello, se prepararon nuevas soluciones asegurando una concentración de 0.04 mg/disco con la finalidad de verificar los resultados obtenidos.

Como testigos positivo y negativo se emplearon discos de miconazol marca Bio-Rad y discos impregnados de DMSO, respectivamente.

Al finalizar la recolección de los resultados, éstos fueron comparados con el testigo positivo y analizados con respecto a la actividad antifúngica reportada en el inserto de los discos de miconazol marca Bio-Rad (Sensible = 20 mm; Intermedia 20 – 10 mm; Resistente =10 mm) para *Candida albicans* y otros hongos levaduriformes. A raíz de éste análisis, se encontró que, de los compuestos derivados de benzimidazol, D2, D7 y D10, fueron los que presentaron mayor actividad antifúngica; por otro lado, de los compuestos del grupo G (derivados de pirazol, piridazina e hidrazida) los compuestos G2, G3, G4, G5, G6 y G7 fueron los que presentaron mayor actividad, siendo más efectivos que miconazol, presentando halos de inhibición de 46, 56, 57, 54, 57 y 57 mm, respectivamente.

Partiendo de esto, se analizaron las estructuras de dichos compuestos y con base en ello se propone un mecanismo de acción para los compuestos D2, D7 y D10, el cual sugiere que éstos actúan a nivel de la síntesis de ergosterol, al igual que los fármacos azólicos como el miconazol.

En cuanto a los compuestos del grupo G, no es posible sugerir un mecanismo ya que se requiere se profundice en las investigaciones, puesto que se carece de información bibliográfica.

Adicionalmente, se determinó que, al parecer existe una relación entre la actividad antifúngica y la presencia de sustituyentes electrodonadores (amino) y electroattractores (nitro) y, que a su vez, éstos se relacionan con la posición en la que se encuentran, siendo la posición *para* la que experimentalmente refleja un efecto más favorable.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las micosis son infecciones causadas por hongos que afectan a cualquier tejido, capaces de producir un cuadro clínico leve, moderado, grave o incluso mortal, que afectan a cualquier edad, sexo, condición socioeconómica y que comparten con las infecciones parasitarias, bacteriológicas y virales la misma importancia médica.

Dentro de las micosis, las especies de *Candida* representan más del 80% de todas las infecciones nosocomiales (Bonifaz, 2012).

*Candida albicans* es un hongo levaduriforme saprófito que forma parte de la flora normal microbiana causando infecciones que se cree son de origen endógeno. Las infecciones causadas por este microorganismo se denominan candidiasis o candidosis, las cuales pueden presentarse en diversas formas clínicas siendo superficiales (candidiasis oral, genital, cutánea y onicomicosis) o sistémicas (afección a otros órganos como pulmones e intestinos) (Brooks, et al., 2013; Reyes, et al., 2017).

En las últimas décadas se ha observado un incremento en el número de casos de candidiasis producidas por *Candida albicans* (agente etiológico más común), situación que se ve estrechamente relacionada con la existencia de factores predisponentes; es esta razón bajo la cual se dice que esta micosis es provocada por agentes oportunistas. (Reyes, et al., 2017).

Para tratar la candidiasis existen diversos fármacos antifúngicos, tales como naftifina, terbinafina, anfotericina B, nistatina, griseofulvina, equinocandinas y los más comúnmente usados azoles, entre los que se encuentran: miconazol, isoconazol, voriconazol, ketoconazol, itraconazol, entre otros. El uso de estos tratamientos, al igual que el número de casos de candidiasis, se ha visto incrementado y, aunque actualmente la gama de fármacos antifúngicos es amplia, la generación y aumento de cepas resistentes dificulta el tratamiento al restar efectividad y aumentar las tasas de fracaso terapéutico (Whalen, 2016; López, 2016).

El incremento en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos, guarda una estrecha relación con el uso inadecuado de los medicamentos, siendo éste el principal factor que contribuye a la generación de resistencia; es por este motivo que surge la inquietud de, además de fomentar un uso adecuado de los fármacos antifúngicos existentes, buscar nuevas moléculas con propiedades antifúngicas efectivas, que además ofrezcan ventajas sobre los tratamientos ya existentes (López, 2016).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 *Candida albicans*

El género *Candida* comprende más de 200 especies, pero sólo cerca de 50 tienen un interés médico y, de éstas, alrededor de ocho son las más frecuentes. Entre ellas sobresale *Candida albicans*, ya que su frecuencia de aislamiento abarca desde el 40 al 80% de los casos (Bonifaz, 2012).



**Figura 1.** *Candida albicans*. Micrografía electrónica. (Naffes y James, 2011).

#### 2.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

*Candida* spp., son levaduras que no producen pigmentos melánicos y, en cuanto a su forma física, ésta puede variar según la especie existiendo formas globosas, ovoideas, elípticas y cilíndricas, su reproducción es asexual o anamórfica mediante blastoconidios y la mayoría de las especies patógenas pueden formar pseudohifas e hifas verdaderas.

En general, las levaduras del género *Candida* se tiñen bien con azul de algodón, PAS y Wright, y aunque no se rigen por la tinción Gram, éstas son generalmente positivas, llegando a cambiar cuando las colonias envejecen (Linares, 2001).

##### 2.1.1.1 CRECIMIENTO

*Candida albicans* es un hongo levaduriforme saprófito, es parte de la flora normal microbiana endógena, razón que justifica la creencia de que las infecciones por este patógeno son de origen endógeno (Rippton, 2003).

Para su cultivo se utiliza principalmente agar dextrosa sabouraud (SDA), ésta crece en un tiempo promedio de 48 a 72 horas a 25°C y hasta en 24 horas a 37°C; su morfología colonial se caracteriza por la presencia de colonias cremosas, limitadas, planas, opacas, y en ocasiones rugosas o surcadas, de color blanco o blanco-amarillento (Godoy y Leila, 2001).

### 2.1.1.2 REPRODUCCIÓN

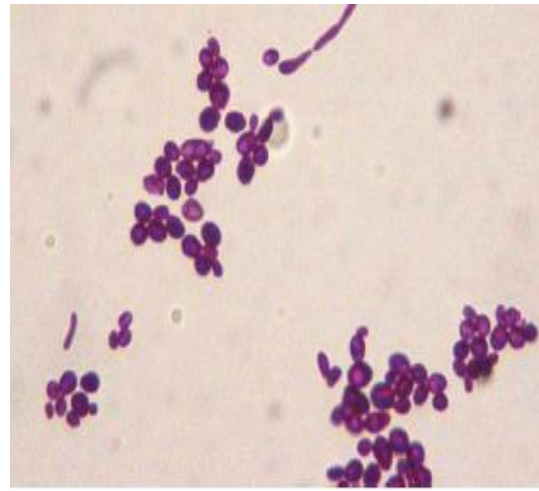
Todas las especies de *Candida* se reproducen por blastosporas (blastoconidios), dependiendo de cada una de ellas fluctúan entre 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, formando gemas de la mitad de su tamaño (Godoy y Leila, 2001).

La formación de pseudomicelio se puede observar en cultivos *in vitro*, bajo las condiciones de envejecimiento o al generar un ambiente bajo en carbohidratos; los ejemplos característicos son harina de maíz o de arroz más Tween 80 al 1%, esta prueba se realiza cuando se busca distinguir entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, las que desarrollan tubos germinativos o filamentos cortos entre 2-3.5 horas a 37°C.

La formación de clamidioconidios se hace a partir del pseudomicelio y solo dos especies lo generan, *Candida albicans* con estructuras terminales o intercalares de 10 y 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, y *Candida dubliniensis*, con estructuras múltiples o en racimos del mismo tamaño (Negroni, 2009).



**Figura 2.** Colonia de *Candida albicans* en medio cromogénico (Bonifaz, 2012).



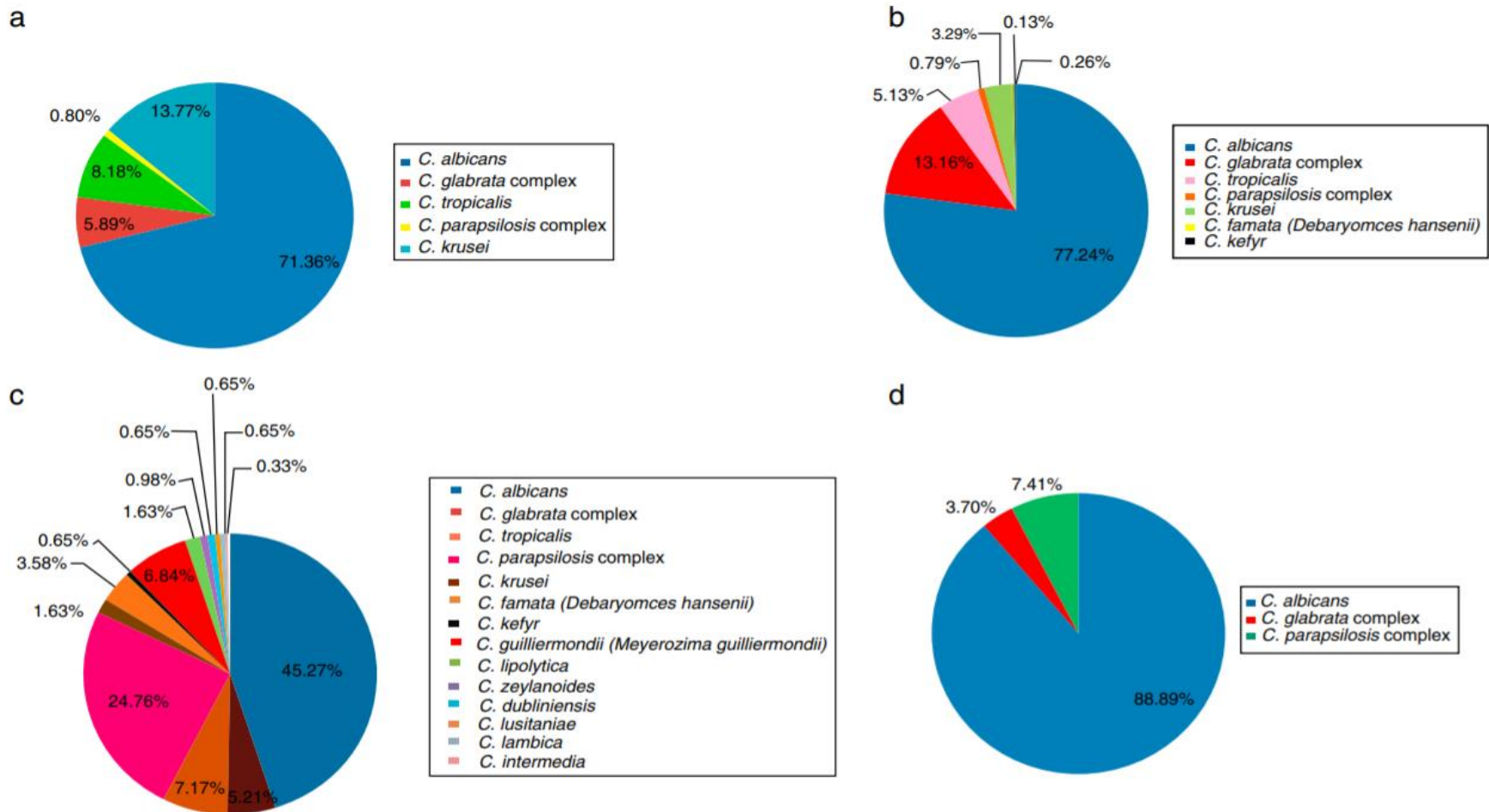
**Figura 3.** Blastoconidios y pseudohifas (PAS, 100X) (Bonifaz, 2012).

### 2.1.2 CANDIDIASIS

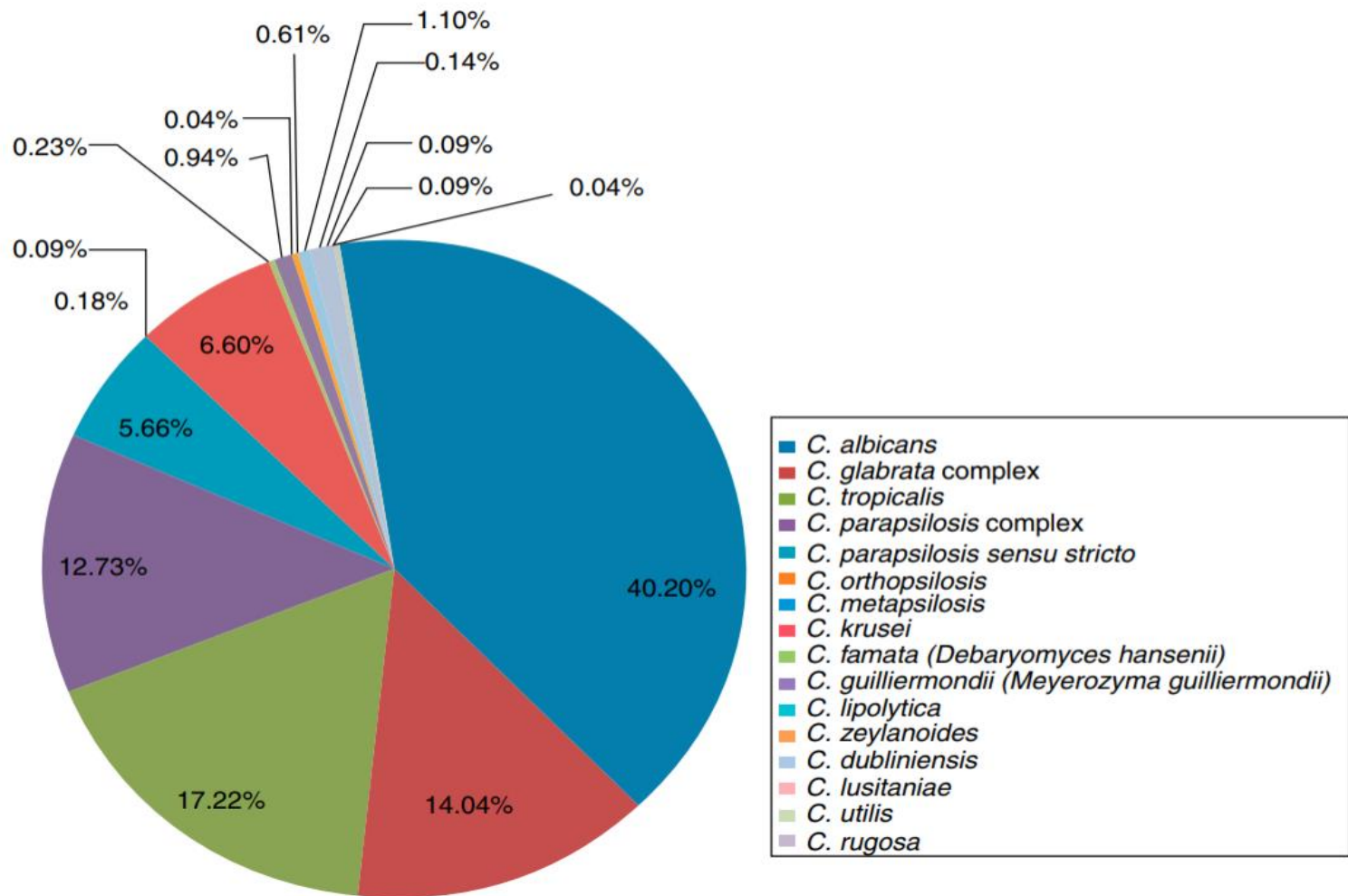
En los últimos 30 años, la incidencia de infecciones micóticas oportunistas ha aumentado de manera significativa y constante en todo el mundo. Estas micosis son causadas por hongos filamentosos y levaduras, principalmente *Aspergillus* y *Candida*, respectivamente, que son los agentes causales más frecuentes. Sin embargo, *Candida* es la principal causa de micosis en el mundo (Reyes, et al., 2017).

Las enfermedades causadas por este patógeno se conocen como candidiasis o candidosis y presentan una variedad de cuadros clínicos que pueden ser superficiales (candidiasis oral, genital, cutánea y onicomicosis) o sistémicos (afección a otros órganos como pulmones e intestinos) (Brooks, et al., 2013; Reyes, et al., 2017).

Si bien es cierto que las enfermedades por *Candida* se deben a diversas especies de la misma, *Candida albicans* ha sido y, continúa siendo considerada la especie predominante en las infecciones, aún a pesar de que en las últimas dos décadas ha existido una tendencia creciente de infecciones superficiales y profundas causadas por otras especies del género, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. lambica*, entre otras (Reyes, et al., 2017).



**Figura 4.** Distribución de frecuencia de las especies de *Candida* que causan candidiasis superficial en México durante el período 2005-2015.  
a) Candidiasis oral b) Candidiasis genital c) Onicomicosis d) Candidiasis cutánea (Reyes, et al., 2017).



**Figura 5.** Distribución de frecuencia de las especies de *Candida* que causan candidiasis invasiva en México durante el período 2005-2015 (Reyes, et al., 2017).

Las infecciones por *Candida* han sido nombradas de diferente manera a través del tiempo, ya sea basándose en su localización o inclusive en su ubicación geográfica; algunas de sus sinonimias son moniliasis, muguet, trush o algodoncillo y blastomicosis (Cardozo, Pardi y Perrone, 2003).

### **2.1.3 ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

La candidiasis es una de las enfermedades micóticas que se conocen desde la antigüedad, Hipócrates en su obra "*Epidemics*", describe que en niños recién nacidos y pacientes debilitados se presentan placas blanquecinas en la boca, a lo que denominó "estomatosis aftosa". En Francia fueron descritas diversas variedades clínicas por Verón y Berg en 1835, y no fue sino hasta 1844 que Bennett y Robin, aíslan el hongo y proponen de nueva cuenta que la enfermedad es propia de pacientes debilitados (Bonifaz, 2012).

### **2.1.4 EPIDEMIOLOGÍA**

La candidiasis es una enfermedad cosmopolita y también cuenta con un elevado número de incidencias. *Candida albicans*, es componente de la flora habitual del cuerpo, principalmente de mucosas; en el TGI se encuentran entre un 40 y 50%, mientras que en el tracto respiratorio superior, boca, laringe, faringe y tracto urinario su presencia es menor, sin embargo, el número puede incrementarse por múltiples factores (López y Aline, 2004).

#### **2.1.4.1 VÍA DE ENTRADA**

Como ya se mencionó con anterioridad, *Candida albicans* es parte integral de la flora normal del ser humano, por lo tanto, se considera que ésta causará enfermedades endógenas, favorecidas al existir algún desequilibrio y/o factor predisponente del paciente; sin embargo, hay ocasiones en que la candidiasis se adquiere en forma exógena, por ejemplo, mediante la introducción de grandes inóculos de levaduras a través de catéteres y de jeringas no estériles. En pacientes masculinos, la balanitis por *Candida* muchas veces es consecuencia de las relaciones sexuales, de manera que este tipo de candidiasis se considera exógena y adquirida por transmisión sexual (Bonifaz, 2012).

#### **2.1.4.2 FACTORES PREDISPONENTES**

Dentro de los factores predisponentes se enlistan como principales los siguientes:

- Daño en la integridad de la piel por heridas, abrasión por quemaduras térmicas o químicas y por presencia de catéteres vasculares.

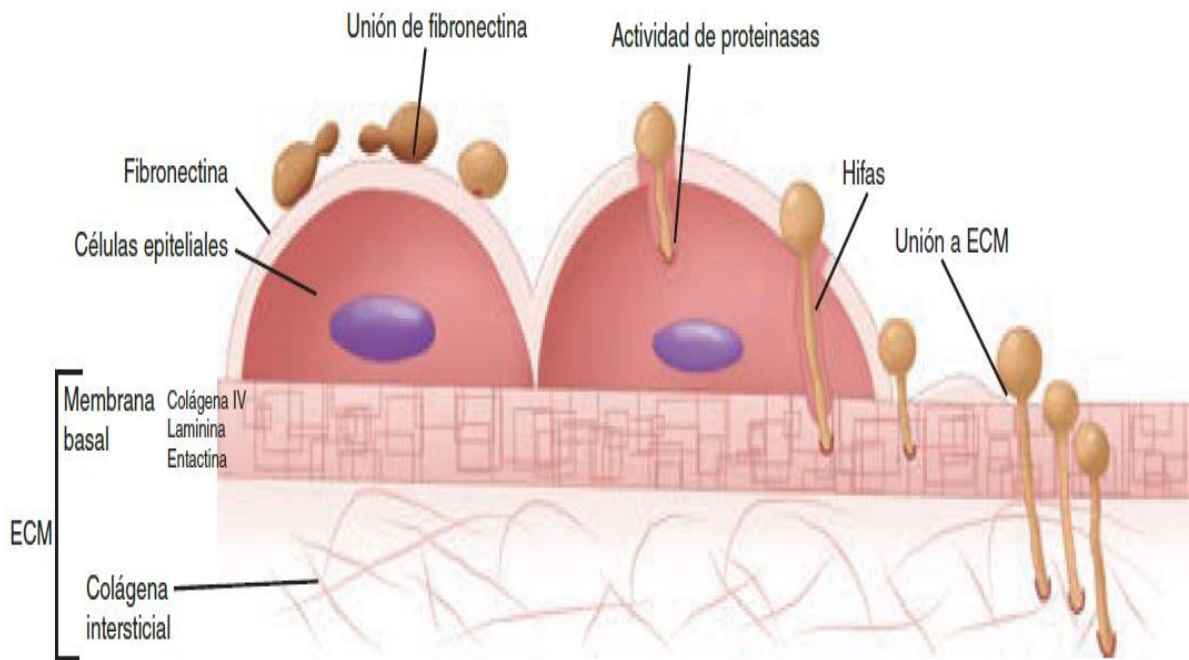
- Desbalance nutricional u hormonal provocado por diabetes, anticonceptivos orales, embarazo, malnutrición y uremia.
- Disminución del número de células fagocitarias como resultado de enfermedades granulomatosas crónicas y deficiencia de mieloperoxidasa.
- Alteración de la función fagocitaria causada por uremia, enfermedades virales y el uso de corticoides y agentes antimicrobianos como aminoglucósidos y sulfamidas (López y Aline, 2004).
- Se presenta en todas las edades, siendo común en lactantes por infección durante el parto (madre con candidiasis vulvovaginal en último trimestre).
- El padecimiento afecta ambos sexos por igual, sin embargo, la frecuencia de los casos genitales es mayor en la mujer por las condiciones anatómicas propias de la vagina.
- Cambios de pH.
- Por inmunodeficiencias, como leucemias, linfomas, infección por HIV, hipoparatiroidismo e hipoadrenocortisolismo, entre otras. (Bennett y Klich, 2003).

### 2.1.5 PATOGENIA

Los tres efectos patogénicos de los hongos que les confieren importancia médica son: micotoxicosis, enfermedades de hipersensibilidad y la colonización de los tejidos. En el caso de *Candida albicans*, se hace referencia a ésta última como la forma principal por la cual provoca su acción patógena en el ser humano y animales (Murray y Rosenthal, 2002).

La adherencia de *Candida albicans* es el primer paso en la invasión y colonización de los tejidos mucocutáneos, la cual es probablemente mediada por la interacción de las glucoproteínas de superficie de la levadura con la célula del hospedero (Sturtevant y Claderone, 1997). Luego se produce la aparición de tubos germinativos y pseudomicelio, los cuales penetran directamente en la célula epitelial. La adherencia continúa con la producción de enzimas hidrolíticas como proteasas, fosfatasas y fosfolipasas. Una vez dentro de la célula epitelial los hongos proliferan. Generalmente las especies de *Candida* que no se adhieren no son patógenas. (Johnson, 2003).





**Figura 6.** Patología de las infecciones por *Candida albicans* (Naffes y James, 2011).

### 2.1.5.1 FACTORES DE PATOGENICIDAD

En el desarrollo del padecimiento influyen una serie de factores que actúan de manera coordinada; los más importantes se enlistan y describen a continuación:

- a) **Adaptación a pH:** Capacidad de soportar cambios de pH, propiedad regida por dos genes (PHR1 y PHR2), ambos se activan o inactivan en diferentes condiciones, el primero se activa en pH neutro o ligeramente básico y se inactiva en medio ácido, activándose a su vez el segundo.
- b) **Adhesinas:** Sustancias que influyen en la adaptación o adhesión de *Candida albicans*, las más importantes son las manoproteínas mananas.
- c) **Enzimas:** Han sido reportadas como factores de virulencia, las más importantes son queratinasas, peptidasas, hemolisinas, proteasas y hialuronidasas. En forma específica: aspartilproteinasas secretoras, fosfolipasas y lipasas.
- d) **Transición morfológica:** Capacidad de cambiar morfológicamente de blastoconidio a pseudohifa e hifa, cambio estimulado por las condiciones ambientales y se considera uno de los factores de patogenicidad y virulencia más significativos.
- e) **Switching fenotípico:** Capacidad de hacer grandes cambios fenotípicos, como son diferencias en la macromorfología colonial y cambios en la antigenicidad, como aumento o disminución en la producción de enzimas y toxinas.

- f) **Formación de biopelículas o biofilms:** Propiedad que consiste en la formación de una biopelícula (comunidad de microorganismos adheridos a una superficie que permanecen unidos con fuerza por sustancias poliméricas), esta conformación le confiere gran capacidad defensiva, persistencia y mayor resistencia al ataque de los antibióticos y antimicóticos, este fenómeno ha sido estudiado en la mucosa oral y vaginal (Bonifaz, 2012).

### 2.1.6 FORMAS CLÍNICAS

Siendo una de las infecciones más frecuentes y polimórficas que atacan al ser humano, su nivel de profundidad o sistematización no depende tanto del factor etiológico en sí, sino del factor predisponente con el que se asocie (Negróni, 2009). En la tabla 1 se muestran las variedades clínicas que se pueden presentar por candidiasis y algunos de los signos y síntomas que se presentan en los mismos.

**Tabla 1.** Variedades clínicas de candidiasis más comunes.

Candidiasis	Tipo clínico	Más frecuentes	Cuadro clínico
	Oral Genital (vaginitis o balanitis)	Genital	Caracterizado por una leucorrea blanca espumosa, grumosa, de aspecto viscoso muy pruriginoso que cubre la pared de la vagina y el endocervix; la mucosa de la zona se encuentra eritematosa.
<b>Mucocutánea</b>	Mucocutánea crónica Gastrointestinal Bronquial / pulmonar.	Oral	Presencia de placas pseudomembranosas blanquecinas cremosas que puede recubrir la lengua, mucosa oral y en ocasiones afecta la comisura labial. La esofagitis por lo general proviene de la candidiasis oral.

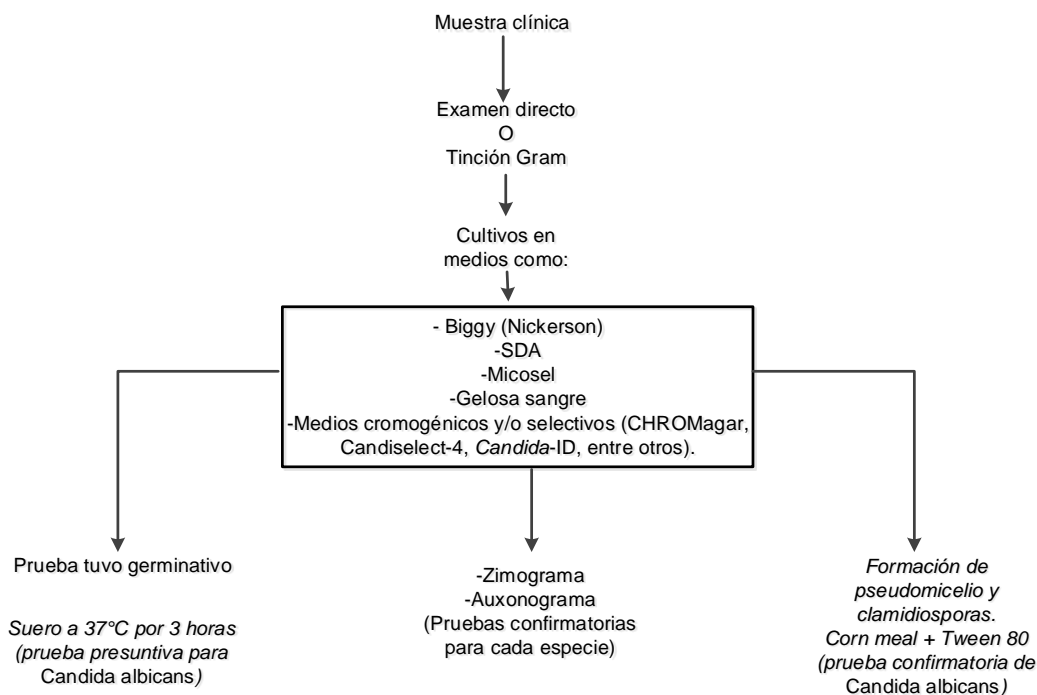
**Tabla 1.** Variedades clínicas de candidiasis más comunes (continuación).

<b>Candidiasis</b>	<b>Tipo clínico</b>	<b>Más frecuentes</b>	<b>Cuadro clínico</b>
<b>Cutánea</b>	Intertrigos	Intertrigo	Las lesiones se caracterizan por formar placas erimatoescamosas con bordes bien definidos, son de aspecto húmedo y en ocasiones aparecen escamas o costras. Los síntomas son prurito y ardor.
	Onicomicosis (perionixis, onicólisis y onixis)		
	Del área del pañal	Onicomicosis	Es la lesión en la uña y en el reborde de la misma (paroniquia). La uña incrementa de grosor, se opaca y oscurece y en ocasiones pueden llegar a presentarse estrías. En el reborde de la uña hay inflamación, edema, dolor y supuración.
	Pustulosis Granulomatosa Cutánea congénita	Granulomatosa	Lesiones verrugosas, vegetantes que pueden ulcerarse, abarcan todo el cuerpo y las mucosas; en la piel se presentan como lesiones granulomatosas.
<b>Sistémica</b>	Tracto urinario	Urinaria	Puede afectar el riñón, dando cabida a manifestaciones de pielonefritis; también puede localizarse en la vejiga y en la uretra causando poloquiuria, dolor vesicular y manifestaciones de uretritis.
	Meningitis		
	Endocarditis		
	Candidemia (fungemia)	Sistémica profunda	Debe de existir, por lo general, invasión sanguínea (septicemia). Entre éstas tenemos la candidiasis broncopulmonar, la endocarditis y la meningoencefalitis.

(Bonifaz, 2012; López y Aline, 2004; Rex, Welsh y Sobel, 2000; Sánchez, Ortiz y Villar, 2005; Senet y Oleastro, 1997; Rueda, 2002).

## 2.1.7 DIAGNÓSTICO

De manera general, el algoritmo de diagnóstico y tipificación para el género *Candida* se basa en la aplicación de pruebas fisiológicas y morfológicas, tal como se muestra en la figura 7.



**Figura 7.** Algoritmo de diagnóstico del género *Candida* (Modificado de Bonifaz, 2012).

### 2.1.7.1 TOMA DE MUESTRA

La candidiasis puede aparecer en diversas partes del cuerpo, por tal motivo las muestras serán muy variables, ya que éstas dependerán de la zona corporal en la que se presente, de igual manera, la toma de muestra dependerá del tipo de candidiasis que se presente; a continuación, se muestran breves descripciones de las principales.

**Tabla 2.** Obtención de muestras clínicas según el tipo de candidiasis.

Muestra	Obtención
Escamas de piel	Para su obtención se efectúa un raspado suave de los bordes de las lesiones con ayuda de dos portaobjetos limpios o estériles, o con una hoja de bisturí de forma tangencial hasta obtener las escamas.

**Tabla 2.** Obtención de muestras clínicas según el tipo de candidiasis (continuación).

<b>Muestra</b>	<b>Obtención</b>
<b>Mucosas</b>	El primer paso es la selección del área de la mucosa afectada, posteriormente se procede a realizar un raspado con asa micológica, cureta o cucharillas estériles, esto permite obtener el material de boca, faringe, mucosa nasal y oftálmica, genitales, vulva, pene y área perianal. La muestra obtenida se divide en dos, una será destinado para examen directo y/o tinciones, mientras que la otra se destina a los cultivos.
<b>Espuito</b>	Se recomienda que el paciente expectore en un recipiente estéril y se prefiere muestra obtenida por la mañana, en ayuno y sin ningún tipo de lavado oral previo. Si la muestra es escasa, debe procesarse dentro de las primeras dos horas a partir de que ha sido obtenida, ya que, de lo contrario se corre el riesgo de contaminación abundante por la proliferación de otros microorganismos presentes (contaminación por arrastre) en la muestra.
<b>Lavado bronqueoalveolar (LBA) y cepillado bronqueoalveolar (CBA)</b>	Es la muestra que más se recomienda cuando existen micosis pulmonares.
<b>LCR, Líquido sinovial y líquido pleural</b>	El volumen requerido es de por lo menos 0.5 ml, la muestra debe ser procesada el mismo día y de preferencia dentro del rango de las dos primeras horas.
<b>Exudados</b>	La muestra debe ser recolectada con asa micológica estéril o cucharillas, en el caso en el que sean abundantes se pueden recurrir a aspiración con una jeringa estéril desechable; en el caso de abscesos o nódulos, se debe realizar asepsia y antisepsia de la superficie de la lesión con torunda impregnada con etanol o isopropanol, posteriormente se levantan las costras (si es que las hay) y se colecta el material; el procesamiento puede ser de inmediato o bien transportarlo en la misma jeringa o en un tubo con SSF estéril o algún medio de transporte.

**Tabla 2.** Obtención de muestras clínicas según el tipo de candidiasis (continuación).

Muestra	Obtención
Orina	La recolección debe realizarse por punción suprapúbica, previa asepsia y antisepsia de la piel, o de los catéteres urinarios con jeringas estériles, al igual que los fluidos anteriores, la muestra debe procesarse el mismo día, de preferencia en el transcurso de las dos primeras horas.
Sangre	La recolección debe considerar el uso de anticoagulantes para obtener muestras útiles.

(Bonifaz, 2012).

### 2.1.7.2 EXAMEN DIRECTO

El material obtenido se coloca entre portaobjetos y cubreobjetos con un aclarante, de preferencia hidróxido de potasio (KOH) de 10 a 20%. También pueden realizarse tinciones, entre ellas, Gram, Wright, Giemsa, PAS e incluso la tinción de Papanicolau.

Al microscopio se observan grandes cúmulos de blastoconidios de aproximadamente 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y pseudohifas cortas o largas hifas.



**Figura 8.** Examen directo de candidiasis; KOH 40X (Bonifaz, 2012).



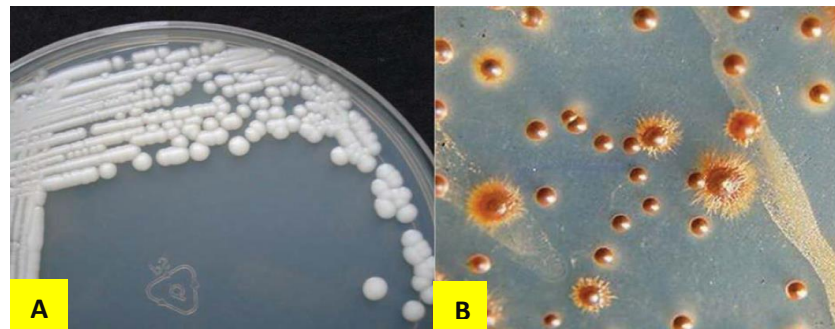
**Figura 9.** *Candida albicans*, 40X (Brooks, et al., 2013).

### 2.1.7.3 CULTIVOS

Algunos de los cultivos habituales son Sabouraud agar, Gelosa sangre, infusión de cerebro, corazón y extracto de levadura.

Las características de las colonias en la mayor parte de medios son similares, crecen en un lapso de 2 a 3 días a 28 o 37 °C, dando colonias blanquecinas, lisas (en ocasiones rugosas), húmedas, limitadas, opacas y en algún momento se observan pseudomicelio y micelio dentro del agar.

Hay medios de cultivo selectivos para el género *Candida*, como el Biggy-Nickerson, que contiene gran cantidad de citratos que eliminan la flora bacteriana, así como sulfitos que son reducidos a sulfuros, de esta manera las colonias se ven de color café claro u oscuro, lo que las hace distinguibles de otros hongos levaduriformes y se considera un excelente medio de primo-aislamiento.



**Figura 10.** Cultivo de *Candida albicans* en **A)** Sabouraud y **B)** Biggy-Nickerson (Bonifaz, 2012).

En la actualidad ha surgido una serie de medios de cultivo cromogénicos que permiten hacer una identificación desde los primeros aislamientos; por ejemplo, CHROM agar-*Candida* hecho a base de sales cromógenas y enzimas, que permiten el desarrollo de las especies más comunes de *Candida*, mediante la formación de colonias coloridas, perfectamente diferenciadas: *Candida albicans* (verde claro); *Candida dubliniensis* (verde oscuro); *Candida tropicalis* (azul grisáceo); *Candida krusei* (rosa pálido); *Candida glabrata* (rosa intenso); *Candida* spp. (blanco-crema). Este medio tiene una alta especificidad, por arriba de 90%.



**Figura 11.** Cultivo de *Candida* spp. en CHROM agar-*Candida* (Bonifaz, 2012).

Otros medios con características y resultados similares al anterior son la nueva serie de medios que actualmente se pueden encontrar: Candiselect-4 y *Candida*-ID, los cuales también permiten la identificación primaria de las especies más importantes de *Candida*.

#### 2.1.7.4 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

*Candida albicans* tiene la característica de formar esporas de pared gruesa, denominadas clamidosporas, principalmente cuando se cultiva en un medio especial como agar harina de maíz (Mackenzie, 2004).

Las clamidosporas se observan terminales o intercalares y poseen un diámetro de entre 10 y 12  $\mu\text{m}$ , con una doble capa bien formada. Esta particularidad es considerada una de las características morfológicas más importantes de identificación, al igual que la formación de tubos germinales, siendo éstos últimos la base fundamental de la prueba que lleva por nombre “tubo germinativo” (Bonifaz, 2012).

**Prueba del tubo germinativo:** Este es un método aceptado, económico y rápido para la identificación de levaduras en un tiempo de tres horas (Bikandi y Millan, 1998).

Los tubos germinales se observan como extensiones de las células levaduriformes, similares a hifas, por ello reciben el nombre de pseudohifas, las cuales se producen por lo general por un estrechamiento en el punto de origen de la célula (Forbes, Sahn y Weissfeld, 2002).



**Figura 12.** Tubo germinativo *Candida albicans*; 1000X (Brooks, et al., 2013).

**Pruebas bioquímicas:** Se basan en la fermentación y utilización de carbohidratos. Existe un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies de *Candida*.



**Zimograma:** Prueba de fermentación de los carbohidratos la cual se realiza en un medio de cultivo líquido con concentraciones de carbohidratos del 1 al 5%, adicionado con indicador de pH rojo de fenol o púrpura de bromocresol, la lectura se realiza mediante la observación del virre, así como de la producción de gas (Bonifaz, 2012).

**Auxonograma:** Prueba de utilización de carbohidratos, la cual se realiza en un medio de cultivo sólido a base de peptona, carente de carbohidratos, los cuales se agregan en sensidiscos impregnados con una solución del 1 al 2%; el crecimiento de la colonia alrededor del carbohidrato indica una lectura positiva (Bonifaz, 2012).

Los resultados de estas pruebas para diferentes especies del género *Candida* se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Zimograma y Auxonograma del género *Candida*.

Especie	Zimograma						Auxonograma					
	Glucosa	Galactosa	Manosa	Sacarosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Manosa	Sacarosa	Lactosa	Rafinosa
<i>C. albicans</i>	+	+	+	V	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	V	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>C. famata</i>	V	-	-	-	-	V	+	+	+	+	V	+
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	V	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-

\*V: Variable

(Bonifaz, 2012).

Otras de las pruebas que se pueden llevar a cabo son las inmunológicas, dentro de las cuales se encuentran:

**Intradermorreacción:** La intradermorreacción a la candidina, es una de las pruebas inmunológicas empleadas en el diagnóstico de diversas especies de *Candida*, existen las pruebas monovalente la cual es exclusiva para *Candida albicans* y polivalente que se aplica para diversas especies de *Candida*, sin embargo, esta prueba cuenta con una gran

desventaja, ya que, es positiva en todo tipo de personas, se sabe que entre un 30 a 40% de la población general, por ello se ve disminuida su ayuda en el diagnóstico. Debido a esta desventaja en la actualidad es empleada para valorar la hipersensibilidad tardía, se lee positiva a las 48 horas si existen 5 mm de induración y eritema.

**Serología:** Dentro de esta rama las técnicas más usadas son la precipitación, fijación de complemento, e inmunofluorescencia directa o indirecta.

Actualmente PCR y RAPD son las técnicas más útiles para la identificación de las diversas especies de *Candida*, esto se debe a que ambas pruebas son de alta sensibilidad y especificidad (mayor a 90%).

**Determinación de mananos:** Esta determinación se realiza a través del método ELISA, actualmente existe un kit comercial llamada Platelia-*Candida* Ag, la cual detecta los mananos en sangre, a pesar de que esta prueba resulta innovadora y cómoda es una prueba de baja sensibilidad con un rango de entre el 40 y 70% (Bonifaz, 2012).

### 2.1.8 TRATAMIENTO

La elección del tratamiento dependerá del tipo de candidiasis que se presente, así como del factor predisponente con el que se asocia, con base a estas consideraciones se pueden tener tratamientos sencillos, tópicos y de corta duración o, por el contrario, se pueden encontrar tratamientos sistémicos y de larga duración.

## 2.2 ANTIFÚNGICOS

Los antifúngicos son una serie de fármacos que tienen diversas acciones frente a los hongos productores de micosis superficiales, subcutáneas y profundas, tanto patógenos primarios como oportunistas (Morejón, 2014).

### 2.2.1 RETROSPECTIVA

La terapia contra los hongos ha estado presente desde que se tiene conciencia de las micosis, algunos tratamientos han perdurado a través del tiempo, por su efectividad, escasos efectos colaterales y bajo costo (Carillo, Brió, y Quidós, 2001).

En la actualidad, la gama de fármacos antifúngicos es muy amplia, en el mercado es posible encontrar algunos que a pesar del tiempo continúan siendo eficaces y de fácil aplicación, resultando útiles en determinadas enfermedades causadas por diversos hongos (Whalen, 2016).

Por otro lado, también es importante considerar las actualizaciones o nuevos tratamientos propuestos; en los últimos años, la gama de fármacos antimicóticos ha sido reforzada con nuevos azoles llamados de segunda generación (voriconazol, posaconazol y ravuconazol) los cuales vinieron a reforzar a los ya existentes (fluconazol, itraconazol y ketoconazol), a éstos se suman, además, la aparición de las equinocandinas (capsosungina, micafungina, anidulafungina), que han transformado la terapéutica, el pronóstico y la evaluación de los pacientes con micosis graves (Morejón, 2014).

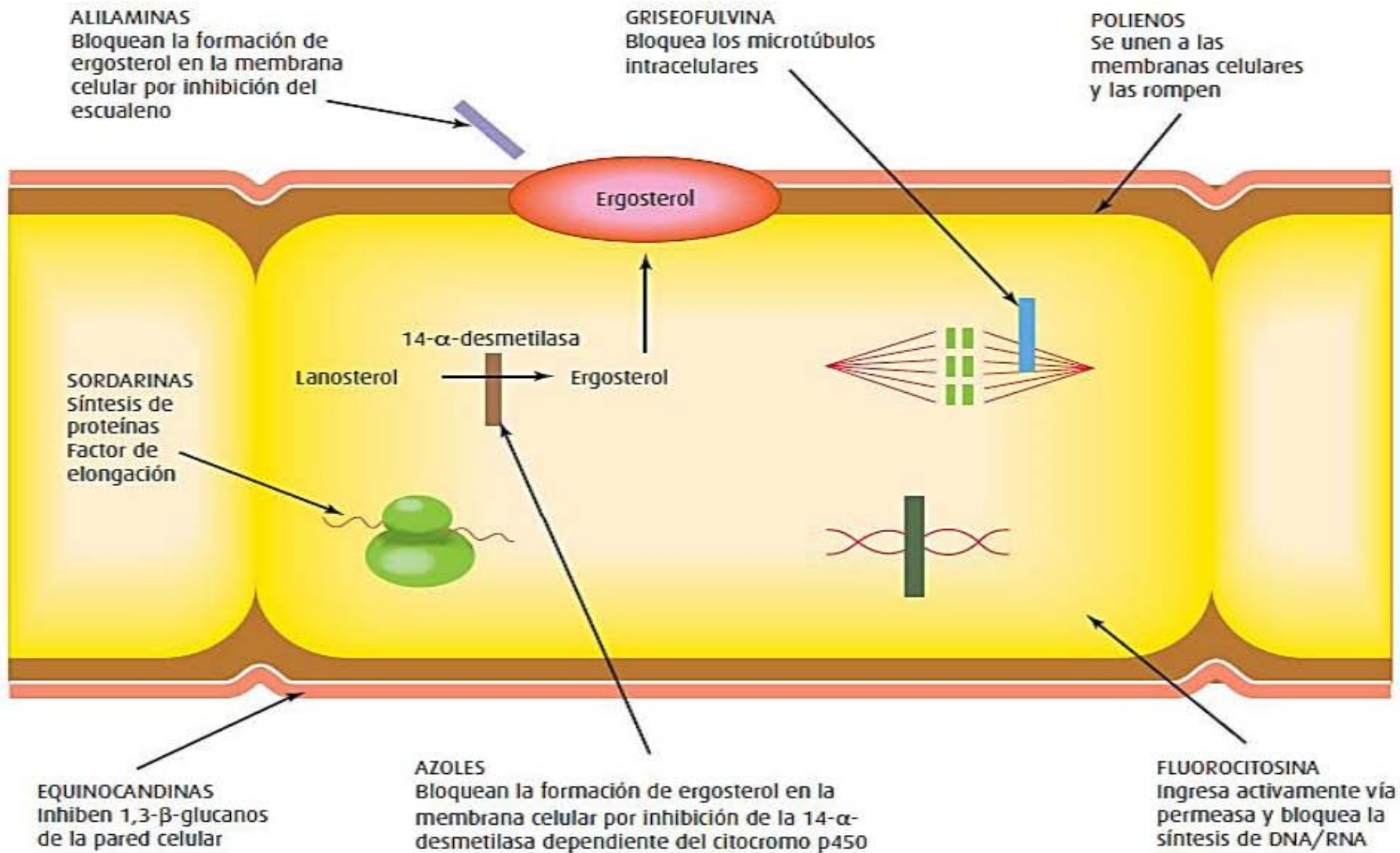
### **2.2.2 CLASIFICACIÓN**

Los antifúngicos se pueden clasificar de acuerdo a sus diferentes características, éstas pueden ser: mecanismo de acción, composición química, espectro y tipo de acción, tipo de micosis contra la que actúan, entre otras, la clasificación con base a su mecanismo de acción general se muestra en la tabla 4 en la cual se resume la información y en las figuras 13 y 14 se esquematizan los sitios de acción de algunos antifúngicos; por otro lado, en la tabla 5 se describen más a fondo los mecanismos de acción de los antifúngicos de uso frecuente.

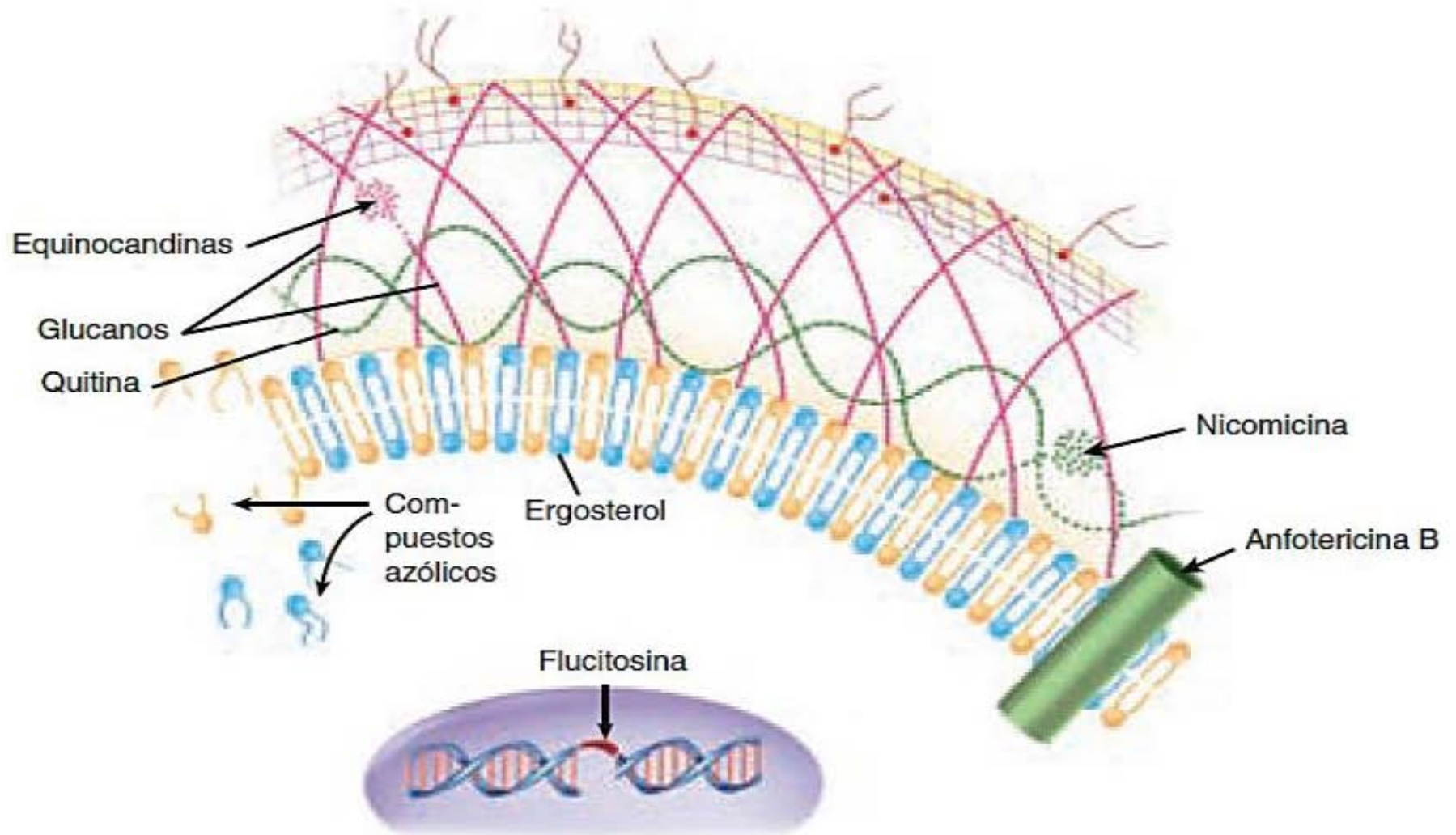
**Tabla 4.** Clasificación y mecanismos de acción generales de los antifúngicos.

<b>Grupo de antifúngicos</b>	<b>Antifúngicos</b>	<b>Mecanismo de acción general</b>
<b>Antibióticos</b>	Polienos Sistémicos: anfotericina B	Desestabilizadores de membrana fúngica (derivados poliénicos)
	Polienos tópicos: nistatina y natamicina	
	No polienos: griseofulvina	Inhibidores de la mitosis fúngica
<b>Azoles</b>	Imidazoles: miconazol y ketoconazol	Inhibidores de la síntesis del ergosterol (membrana fúngica)
	Triazoles: itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol	
	Azoles tópicos: bifonazol, butoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, flutrimazol, omoconazol, oxiconazol, sulconazol, tioconazol, terconazol	
<b>Pirimidinas fluoradas</b>	Flucitosina	Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos
<b>Equinocandinas</b>	Capsfungina, micafungina y anidulafungina	Inhibidores de la síntesis de pared celular fúngica
<b>Alilaminas</b>	Terbinafina y naftifina	Inhibidores de la síntesis del ergosterol (membrana fúngica)
<b>Otros</b>	Sordarinas y oxaboroles	Inhibidores de la síntesis de proteínas

(Bonifaz, 2012; Velázquez, 2008).



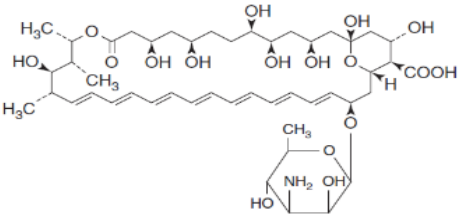
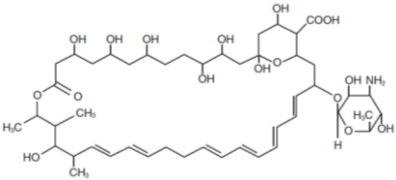
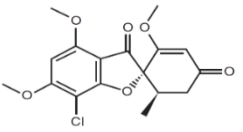

**Figura 13.** Mecanismo de acción de los antifúngicos (Bonifaz, 2012).



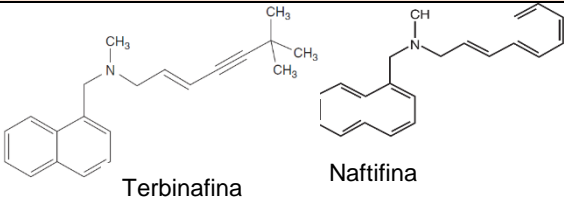
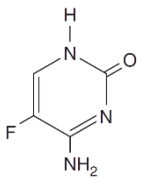
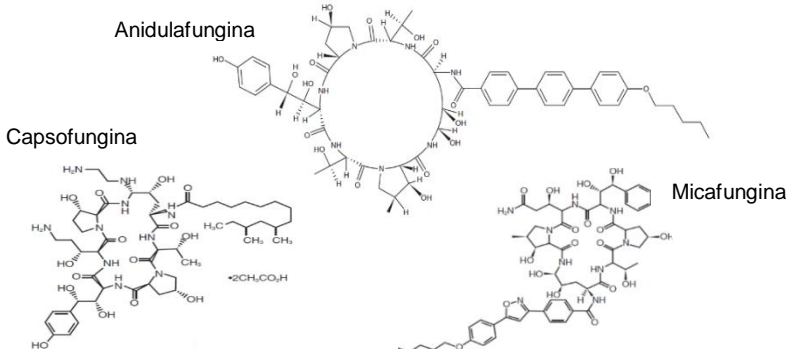
**Figura 14.** Sitios donde actúan los principales antifúngicos (Naffes y James, 2011).

### 2.2.3 GENERALIDADES DE LOS PRINCIPALES ANTIFÚNGICOS

**Tabla 5.** Características, estructura química y mecanismo de acción de los principales antifúngicos de uso clínico.

Antifúngico	Estructura química	Mecanismo de acción
Anfotericina B	<p>Aislada del actinomiceto <i>Streptomyces nodosus</i>, es un macrólido heptaeno con una molécula de nicosamida en un extremo y siete grupos hidroxilo en el otro.</p> 	<p>Ejerce su actividad mediante la creación de poros en la membrana plasmática del hongo, lo cual altera su función. Se une al ergosterol presente en la membrana y el centro hidrófilo forma un conducto transmembrana, que interfiere en la permeabilidad y función de barrera osmótica.</p>
Nistatina	<p>Antibiótico macrólido poliénico para uso tópico producido por <i>Streptomyces noursei</i>, es un macrólido poliénico del tipo tetraeno con una nicosamida.</p> 	<p>Su mecanismo de acción es similar al de anfotericina B, es decir, al igual que ésta actúa sobre la membrana plasmática del hongo, creando poros mediante la unión al ergosterol; éste puede ser fungistático o fungicida dependiendo de la concentración.</p>
Griseofulvina	<p>Antibiótico producido por <i>Penicillium griseofulvum</i>, es un derivado benzofurano.</p> 	<p>Inhibe la mitosis actuando sobre los microtúbulos del huso mitótico. Es fungistático y presenta afinidad por las células productoras de queratina.</p>
Imidazoles y triazoles	<p>Se caracterizan por poseer un anillo imidazólico que contiene 2 (imidazoles) o 3 (triazoles) nitrógenos.</p> 	<p>Los azoles actúan inhibiendo la enzima 14<math>\alpha</math>-desmetilasa, al formar un complejo del azol con una parte del citocromo P450 del hongo. El bloqueo de esta enzima impide la conversión de lanosterol en ergosterol.</p>

**Tabla 5.** Características, estructura química y mecanismo de acción de los principales antifúngicos de uso clínico (continuación).

Antifúngico	Estructura química	Mecanismo de acción
<p>Terbinafina y naftifina</p>	<p>Ambas estructuras pertenecen a la familia de las alilaminas</p>  <p style="text-align: center;">Terbinafina                      Naftifina</p>	<p>Inhiben la síntesis del ergosterol actuando sobre la enzima escualeno-epoxidasa.</p>
<p>Flucitosina</p>	<p>La flucitosina (5-fluorocitosina), es un antifúngico sintético; análogo fluorado de un constituyente del cuerpo normal, la citosina. Su estructura corresponde a una base pirimidínica fluorada.</p> 	<p>Impide la síntesis de DNA del hongo. Para producir este efecto, la flucitosina sufre una desaminación (enzima fúngica citosina deaminasa) y se transforma en 5-fluorouracilo, un inhibidor no competitivo de la timidilato-sintetasa que interfiere en la síntesis de DNA.</p>
<p>Capsfungina, micafungina y anidulafungina</p>	<p>Son compuestos lipopeptídicos cíclicos semisintéticos con una cadena lateral <i>N</i>-acil o <i>N</i>-aril alifática, que les otorga un espectro de acción amplio. La capsfungina, micafungina y anidulafungina se obtienen a partir de <i>Glarea lozoyensi</i>, <i>Coleophoma empetri</i> y <i>Aspergillus nidulans</i>, respectivamente.</p>  <p style="text-align: center;">Capsfungina                      Anidulafungina                      Micafungina</p>	<p>Los tres fármacos comparten mecanismo de acción, el cual consiste en la inhibición de la síntesis de la 1,3-β-D- glucano sintetasa, principal componente de la pared fúngica de las especies de <i>Candida</i> y otros hongos.</p>

(Bonifaz, 2012; Velázquez, 2008; Brooks, et al., 2013).



#### **2.2.4 ANTIFÚNGICOS DE USO TÓPICO**

Dentro de estas categorías encontramos a las soluciones ácidas, soluciones básicas (soluciones saturadas de bicarbonato de sodio), en este caso ambas soluciones son de mecanismo de acción sencillo, ya que su único objetivo es el de corregir los cambios de pH que pueden favorecer al crecimiento.

Dentro de los tratamientos tópicos se encuentran algunos fármacos antifúngicos como la nistatina y los imidazoles siendo los más empleados el biconazol, clotrimazol, econazol, isoconazol, ketoconazol, por mencionar algunos; otros de los fármacos prescritos para el tratamiento contra *Candida* son la terbifabina tópica, el tolclato, la ciclopiroxolamina y la amorolfina.

El tiempo promedio de tratamiento dependerá, como ya se mencionó, del tipo de micosis y del factor predisponente, pero por lo regular oscila entre 10 y 20 días, con una o dos aplicaciones por día, dependiendo del fármaco (Brooks, et al., 2013).

#### **2.2.5 ANTIFÚNGICOS DE USO SISTÉMICO**

Para el caso de los tratamientos de tipo sistémico, granulomatosos o aquellos en los que la micosis no sede con tratamientos tópicos, se recomienda el uso de fármacos azólicos, dentro de los cuales se encuentran el ketoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol y ravuconazol, éstos son la terapia de elección, ya que se pueden emplear en caso muy extensos y crónicos.

Existen otros fármacos que solo se emplean en casos de micosis profundas y sistémicas, una vez que se ha demostrado la ineficacia de los azoles sistémicos mencionados anteriormente; dentro de estos fármacos se encuentra la anfotericina B (administrada en tratamiento concomitante con derivados azólicos); capsosungina (equinocandina) derivada de la neumocandina B; micafungina (IV) el cual es considerado uno de los mejores antimicóticos sistémicos para neonatos y niños, anidulafungina (IV), medicamento solo recomendado para adultos (Rex, Welsh y Sobel, 2000).

Cabe mencionar que sin importar el tratamiento por el cual se opte, es muy importante para lograr el éxito el poder erradicar o corregir los factores predisponentes que sean identificados, sean intrínsecos o extrínsecos (Bonifaz, 2012).

### **2.3 RESISTENCIA ANTIFÚNGICA**

Dentro de los fármacos existen algunos que son de uso común, es decir, son la primera línea de defensa en los tratamientos de enfermedades antifúngicas. Dentro de los más

utilizados se encuentran los azoles, que actúan en su mayoría, sobre el ergosterol (componente sumamente importante de la membrana fúngica); es un lípido de la familia de los esteroides que actúa dándole fluidez, simetría e integridad al hongo, además de contribuir en funciones propias de muchas enzimas como la quitin sintetasa, que es importante para el crecimiento y división de la propia célula.

Al ser los compuestos azólicos o azoles los más empleados, se puede decir que existe mayor disponibilidad y el uso se vuelve generalizado, lo que a su vez genera que exista mayor probabilidad de uso inadecuado; estos tres factores son considerados fuertes contribuyentes de la generación de resistencia a los antifúngicos (López, et al., 2016).

Está claro que ningún agente antifúngico está exento del desarrollo de resistencia, por lo que es esencial desarrollar estudios de nuevas moléculas.

### **2.3.1 RESISTENCIA ANTIFÚNGICA EN *Candida albicans***

Las infecciones por levaduras del género *Candida* son cada vez más prevalentes y comunes, principalmente en grupos de pacientes con mayor riesgo (presencia de factores predisponentes); por tal motivo, la resistencia a antifúngicos representa un reto terapéutico que deja un menor número de posibilidades para el tratamiento de estas infecciones (Gómez, 2010).

La resistencia es un cambio de sensibilidad o susceptibilidad al antifúngico; los mecanismos de resistencia antifúngica se clasifican en dos categorías, resistencia microbiológica y resistencia clínica; la primera se define como el crecimiento del microorganismo a dosis normales del antifúngico (puede ser inhibido a concentraciones más altas); por otro lado, la resistencia clínica se define como el crecimiento del microorganismo a pesar de la administración de un agente antifúngico (Pfaller, 2012).

En México se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos (Manzano, et al., 2008).

#### **2.3.1.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA**

Con respecto a *Candida albicans*, se ha documentado que presenta resistencia intrínseca a varios agentes antifúngicos, particularmente azoles y polienos, aunque los mecanismos moleculares implicados en la resistencia antifúngica siguen siendo poco conocidos, se considera que su capacidad de adhesión (formación biopelículas) actúa también como un importante mecanismo de resistencia antifúngica, ya que existen estudios en los que se

reportan una mayor resistencia de células en biopelículas en comparación con las que crecen en suspensión (López, et al., 2016; Guango, 2008; Dhale, et al., 2014).

De manera general, se describen tres posibles mecanismos en la génesis de la resistencia: el primero es la modificación de la enzima blanco; el segundo, la incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas del antifúngico en el sitio de acción por la presencia de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo, y por último, la inactivación del antifúngico por modificación del mismo (Quidós, 2015).

Para el caso particular de *Candida albicans*, se han descrito dos mecanismos mediante los cuales es capaz de generar resistencia:

- a) Mutaciones en los genes que codifican para la síntesis de ergosterol de la membrana plasmática, dicho en otras palabras, se generan mutaciones moleculares de la enzima diana del antifúngico. En las especies de *Candida* y en muchos otros hongos, el gen ERG11 se encarga de la síntesis de la Erg11p o la enzima 14 $\alpha$ -desmetilasa indispensable para la síntesis del ergosterol. La resistencia a los azoles se ha descrito en aislamientos clínicos en los que se demuestra una disminución de la expresión de dicha enzima o la presencia de mutaciones específicas que la afectan en su estructura o función, y puede ser inducida por regulación negativa de su síntesis tras la exposición prolongada al antifúngico. Otras enzimas involucradas en la síntesis del ergolesterol pueden también ser responsables de este fenómeno (Gómez, 2010; López, et al., 2016).
- b) Sobreexpresión de genes que codifican para bombas de expulsión de fármacos fuera del microorganismo, es decir, formación de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo del antifúngico fuera de la célula. En relación con el sistema de transporte activo a través de bombas y con base en modelos experimentales, se ha logrado determinar la presencia de un conjunto de genes denominados factores de resistencia múltiple o pleiotrópica a fármacos (PDR: Pleiotropic Drug Resistance) dado que confieren resistencia a múltiples medicamentos sin ninguna semejanza estructural definida. El primero de ellos definido en *Candida* spp. fue MDR1, el cual codifica una proteína MDR1p que pertenece a una superfamilia de proteínas transportadoras transmembranales con 6 dominios, (MSF: Major Facilitators Superfamily), ésta es transportadora de solutos hacia distintos lados de la membrana plasmática de la célula fúngica. Se ha demostrado en ratones que la sobreproducción de esta proteína confiere resistencia (Fuentes, et al., 2014).

Otros de los genes caracterizados se denominan CDR1 y CDR2 que codifican una proteína transportadora del tipo ABC (ATP Binding Cassette), también de tipo multifuncional para una variedad de compuestos (Gómez, 2010).

## 2.4 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA

### 2.4.1 GENERALIDADES

A medida que la industria farmacéutica fue introduciendo en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de los antifúngicos anteriores con los nuevos y de esta manera detectar las posibles resistencias.

Motivado por esta nueva realidad, el “Clinical Laboratory Standrads Institute” (CLSI), realizó, en 1985, una encuesta en diferentes laboratorios para conocer qué pruebas de sensibilidad antifúngica realizaban habitualmente y cómo las realizaban. Esta encuesta mostró que las metodologías eran muy variadas y que la diferencia entre los resultados de los distintitos laboratorios era inaceptable. Como consecuencia de esta realidad, el CLSI creó un subcomité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos (Cantón, Martín y Espinel, 2007).

Por otro lado, el conocimiento de la sensibilidad a los antifúngicos, del microorganismo causante de una determinada enfermedad, no es solo importante para hacer la selección inicial del agente terapéutico correspondiente, sino que, además, en aquellos casos en los cuales el paciente presente intolerancia a determinado fármaco, permite seleccionar el más adecuado para este paciente en particular.

### 2.4.2 CLASIFICACIÓN

Estos métodos pueden clasificarse en cuantitativos y cualitativos.

- a) **Cuantitativos:** Son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la mínima concentración de agente antifúngico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo microbiano previamente estandarizado y la concentración mínima fungicida (CMF), la cual se define como la mínima concentración de un antifúngico que en un periodo de tiempo predeterminado es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población microbiana previamente estandarizada. La determinación de la CMI puede

realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test (marca comercial).

- b) Cualitativos:** Métodos cualitativos son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. El antibiograma (método de difusión en disco) es uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria (Taroco, Seija y Vignoli, 2002).

### 2.4.3 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA

Los antibiogramas son métodos *in vitro* que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antifúngicos (en este caso), bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas.

#### 2.4.3.1 ANTECEDENTES

La utilidad de los métodos de sensibilidad basados en la difusión del antifúngico a partir de discos o tabletas ha estado limitada por los problemas de difusión en agar de los mismos y por su falta de correlación con la clínica, sin embargo, se ha encontrado correlación con fluconazol y voriconazol entre los halos de inhibición de discos y las CMI. En 2003, el CLSI estandarizó el método de difusión-disco (documento M44-P) y en 2004 publicó el documento definitivo (M44-A2) para *Candida* spp. con fluconazol y voriconazol (Cantón, Martín y Espinel, 2007).

#### 2.4.3.2 FUNDAMENTO Y METODOLOGÍA

Este método se basa en el estudio de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido.

Los pasos a seguir son:

- a) Medio de cultivo:** El agar debe ser Mueller Hinton (MHA) y pueden ser suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/ml de azul de metileno. La adición de glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición.
- i.** Preparar el medio de MHA siguiendo las indicaciones del fabricante.
- ii.** Esterilizar en autoclave.
- iii.** Dejar enfriar el medio a 45-50°C y llenar las placas.
- iv.** Dejar enfriar y permitir que gelifiquen.
- v.** Incubar a 35 - 37 °C durante 24 horas (prueba de esterilidad).

- vi. Una vez concluida la prueba de esterilidad guardar los medios de cultivo en refrigerador.

Una vez preparadas las placas, se pueden almacenar durante 7 días.

- b) **Preparación del inóculo:** Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias  $\geq 1$  mm y de 24 – 48 horas de crecimiento en placa SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina estéril. Se agita bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 625 nm), se ajusta a una densidad óptica de 0.5 en la escala de McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de  $1 \times 10^8 - 5 \times 10^8$  UFC/ml.
- c) **Inoculación de las placas:** En este paso se considera además la colocación de los discos (sensidiscos) del compuesto antifúngico a probar; se debe:
  - i. Sumergir una torunda de algodón (hisopo) en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland.
  - ii. Retirar el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.
  - iii. Sembrar la placa de manera uniforme.
  - iv. Dejar secar de 3 – 5 min. dejando la placa entreabierta.
  - v. Aplicar los discos.
- d) **Incubación:** Incubar a 35 – 37 °C durante 20-24 horas para *Candida* spp. Si no hay suficiente crecimiento reincubar y leer a las 48 horas.
- e) **Lectura:** Medir el halo de inhibición donde se produce una reducción importante de crecimiento. La presencia de microcolonias en el borde del halo de inhibición o de colonias grandes en el interior del halo deben ser ignoradas (Cantón, Martín y Espinel, 2007).



**Figura 15.** Estandarización del inóculo (Cavalieri, 2005).



**Figura 16.** Ejemplo de lectura de halos de inhibición (Cavalieri, 2005).

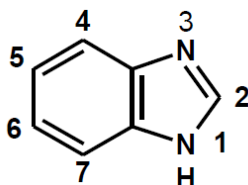
## 2.5 BENZIMIDAZOLES, PIRAZOLES, PIRIDAZINAS E HIDRAZIDAS

Los compuestos que fueron analizados en el presente trabajo provienen de: benzimidazol, pirazol, piridazina y de hidrazida, por tal motivo resulta importante y es clave se describan algunas de las características importantes de estos compuestos.

### 2.5.1 BENZIMIDAZOLES

El núcleo del benzimidazol es un importante farmacóforo y una estructura privilegiada en la química farmacéutica y reconocido en investigación médica como un heterociclo versátil, debido a que presenta una combinación única de excelentes características químicas y biológicas (Ramanpreet, et al., 2011).

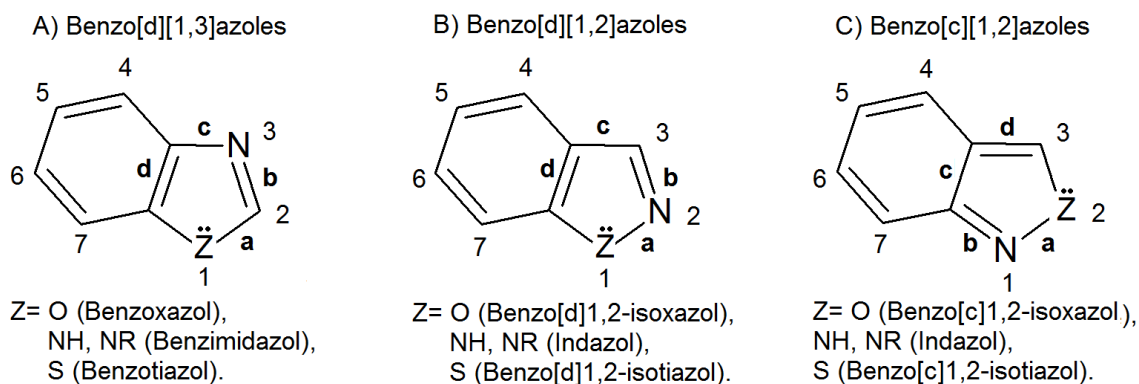
Al referirnos a un benzimidazol, nos referimos a un heterociclo aromático que contiene un anillo de benceno fusionado con un anillo de imidazol.



**Figura 17.** Estructura del *1H*-benzimidazol.

Químicamente es una molécula estable que puede sufrir reacciones electrofílicas, nucleofílicas y ciclocondensaciones. La versatilidad de las manipulaciones químicas en los benzimidazoles, en conjunto con su potencialidad para producir compuestos con un amplio espectro de actividad, ha permitido llevar a cabo una serie de estudios a profundidad, en cuanto a la relación estructura-actividad (SAR) en este heterociclo (Ramanpreet, et al., 2011).

El núcleo de benzimidazol tiene siete posiciones que pueden estar sustituidas con una gran variedad de entidades químicas, pero la mayoría de las formas biológicamente activas tienen grupos funcionales en las posiciones 1, 2 y 5 (6). En consecuencia, los compuestos pueden ser derivados mono, di o tri sustituidos (Bansal y Silakari, 2012).

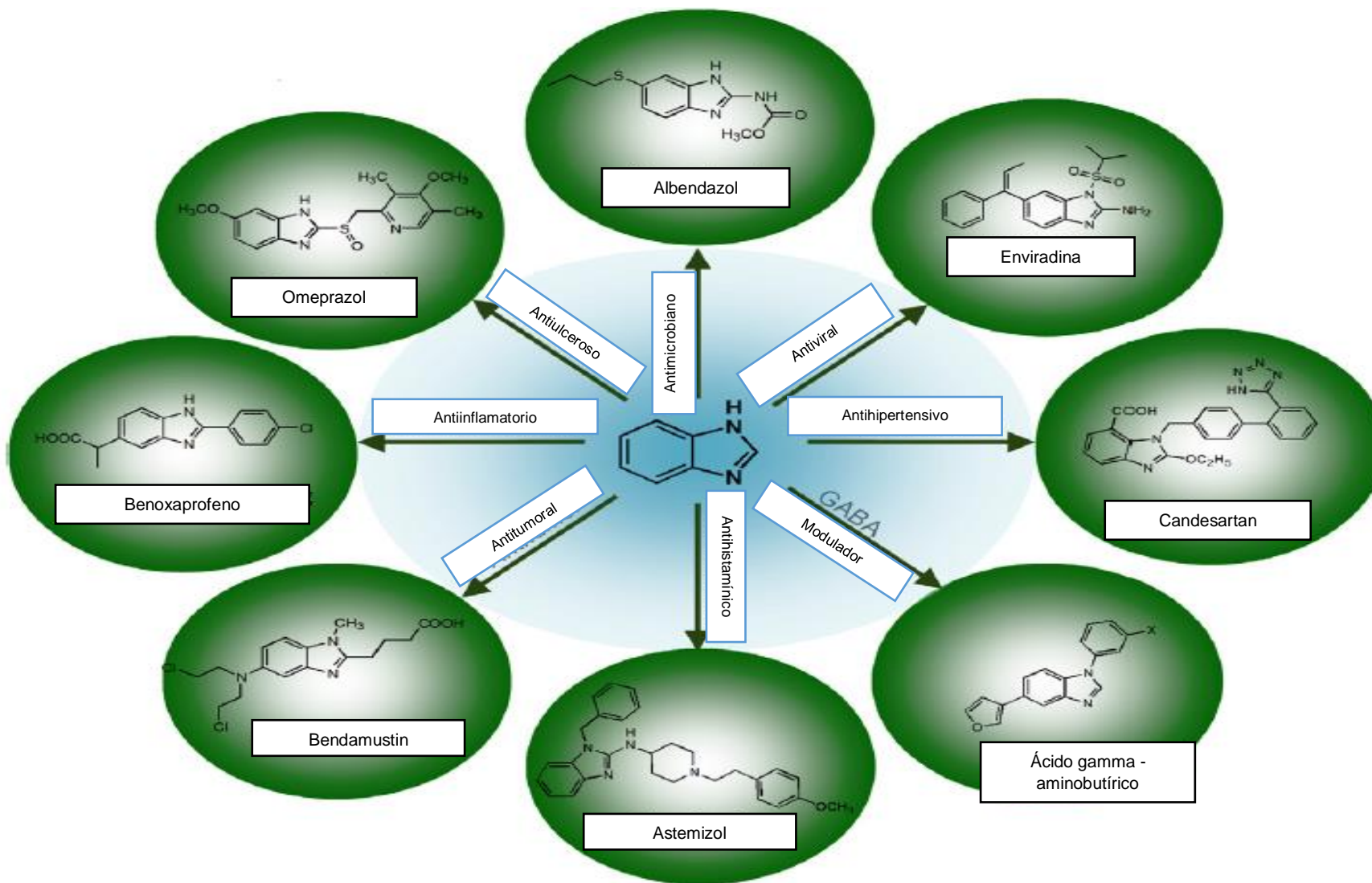


**Figura 18.** Estructura de benzo[d][1,3] azoles, benzo [d][1,2] azoles y benzo [c][1,2] azoles; la letra "Z" indica los posibles heteroátomos en las moléculas. (Modificada de Hector, 2014).

Los derivados de benzimidazol gozan de una extensa gama de actividades biológicas y esto se debe principalmente a que estos son base estructural de nucleótidos de origen natural, lo que les permite interactuar fácilmente con los biopolímeros de los sistemas vivos.

Dentro de las numerosas actividades y funciones biológicas que han sido descritas para benzimidazoles, se encuentran que actúan como antihipertensivos, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios, antidiabéticos, anticancerígenos, antioxidante, antivirales, psicoactivos, entre otros, sin embargo, aun con todas estas actividades, el mundo de la farmacéutica y de la medicina, así como las necesidades humanas que van surgiendo, generarán que siempre exista una necesidad de nuevos agentes quimioterapéuticos para superar problemas de resistencia, respuesta al tratamiento por los pacientes y efectividad, entre otros (Sharma, et al., 2009; Ramanpreet, et al., 2011; Bansal y Silakari, 2012).

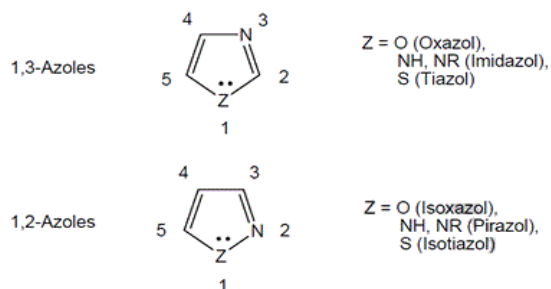




**Figura 19.** Núcleo multifuncional del benzimidazol (Bansal y Silakari, 2012).

## 2.5.2 PIRAZOLES

Los heterociclos 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-azoles.

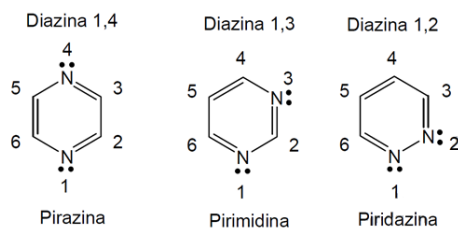


**Figura 20.** Estructura de 1,3-azoles y 1,2-azoles; la letra "Z" indica los posibles heteroátomos en las moléculas (Hector, 2014).

El anillo de los azoles se encuentra presente en diversos compuestos de gran importancia biológica como lo son la histidina, histamina y la vitamina B, por mencionar algunos. El pirazol es un heterociclo pentagonal con dos átomos de nitrógeno, cuenta con propiedades de base débil y posee aromaticidad. Al número de derivados más importantes de este heterociclo pertenecen al medio antipirético, antiinflamatorios y analgésico (antipirina) (Potapov y Tatarinchik, 1999; Barthelemy, 2015).

## 2.5.3 PIRIDAZINAS

Los heterociclos aromáticos de seis átomos, con dos átomos de nitrógeno de tipo imina se conocen con el nombre de diazinas y dentro de este grupo se encuentran tres moléculas, las cuales son nombradas de acuerdo a la posición en la que se encuentren los átomos de nitrógeno; en este sentido, tenemos a la pirazina con los átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 4, en segundo lugar a la pirimidina con los átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 3 y, por último, a la piridazina en la cual los átomos de nitrógeno se encuentran en las posiciones 1 y 2.



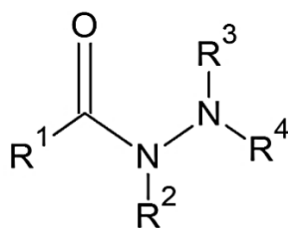
**Figura 21.** Estructura de diazinas (Hector, 2014).

También existen otras moléculas que son compuestas, tales como las benzodiazinas aromáticas (diazinas fusionadas con benceno); pteridinas (pirazinas fusionadas a un anillo pirimidina); y las purinas (pirimidina fusionadas a un anillo imidazol). Uno de los puntos que cabe mencionar es la diversa variedad de derivados de estos compuestos y en dónde podemos encontrarlos. Algunos ejemplos de derivados de interés biológico son: riboflavina, la cual es una vitamina y cofactor enzimático, la timina, citosina y uracilo que son ácidos nucleicos; por otro lado, también existen ejemplos de importancia en el área farmacéutica como los son tiazin (nematocida, insecticida), sulfadiazina (antibacterial), aminometradina (diurético), adoxudina (antiviral para herpes simple), cadralazina (antihipertensivo), entre otros (Hector, 2014).

#### 2.5.4 HIDRAZIDAS

Las hidrazidas orgánicas tienen el grupo funcional caracterizado por un enlace covalente de nitrógeno a nitrógeno con cuatro sustituyentes siendo al menos uno de ellos un grupo acilo. La estructura general para una hidrazida es ( $R^1 = O$ )  $R^2-N-N-R^3R^4$ . Se ha informado que los derivados de hidrazidas poseen actividades anticonvulsivantes, antioxidantes, antagonistas de hormonas, analgésicas, antiinflamatorias, antiplaquetarias, antipalúdicas, antimicrobianas, antimicobacterianas, antitumorales, vasodilatadoras, antivirales y antitripanosómicas y antiparkinsonianas.

Los compuestos de hidrazida se usan como materiales de partida clave en la preparación de varios compuestos heterocíclicos. Las hidrazidas son intermediarios importantes en la síntesis orgánica, particularmente en la fabricación de productos farmacéuticos y agroquímicos, además se usan como bloques de construcción en la síntesis de diazoles y triazoles (ALFA AESAR, 2018).



**Figura 22.** Estructura general de las hidrazidas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se ha reportado un incremento considerable en la incidencia de micosis, siendo *Candida albicans* uno de los agentes etiológicos más representativos, apareciendo en los aislamientos hasta en un 80% de los casos; como se sabe, esta levadura es parte de la flora normal del humano; por tal motivo, el hecho de que las micosis, tanto superficiales como profundas, se encuentren en aumento, se relaciona de manera directa con la presencia de factores predisponentes.

Este incremento y el papel cada vez más importante de *Candida albicans* en la patología humana, conllevan a un aumento en el uso de los fármacos antifúngicos, lo que a su vez, se ha visto relacionado con el desarrollo de mecanismos de resistencia; son estos factores los que impulsan la necesidad del estudio y desarrollo de nuevas moléculas eficaces contra los diversos hongos y que además aporten nuevas ventajas, como dosis efectivas bajas, disminución de efectos secundarios, tratamientos de corta duración y apoyo en la disminución y/o eliminación de resistencia farmacológica.

Con base en lo anterior, es que se propone el estudio de la actividad antifúngica de nuevos compuestos derivados o con estructuras similares a los ya existentes, de los cuales ya se ha demostrado efectividad.

El propósito del presente trabajo es evaluar si compuestos orgánicos derivados de benzimidazoles, pirazoles, piridazinas e hidrazidas pueden ser una alternativa viable de tratamiento antifúngico, específicamente contra *Candida albicans*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica de nuevos compuestos derivados de benzimidazol, pirazol, piridazina e hidrazida sobre *Candida albicans*, mediante la prueba de difusión en placa (antibiograma), para establecer las bases de estudios de nuevas alternativas de tratamiento contra las micosis causadas por este agente etiológico.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos orgánicos de estudio, mediante la utilización del método de difusión en disco.
- Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos con los compuestos orgánicos analizados y compararlos con los resultados del testigo positivo.
- Realizar una comparación de la actividad antifúngica entre los grupos de los compuestos analizados con base a su estructura química.
- 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.

## 5. HIPÓTESIS

Se propone que todos los compuestos evaluados mediante la prueba de difusión en disco presentarán actividad antifúngica contra *Candida albicans*, de éstos, los compuestos derivados de benzimidazol y pirazol presentarán mayor actividad antifúngica en comparación con los derivados de piridazina e hidrazida.

## 6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

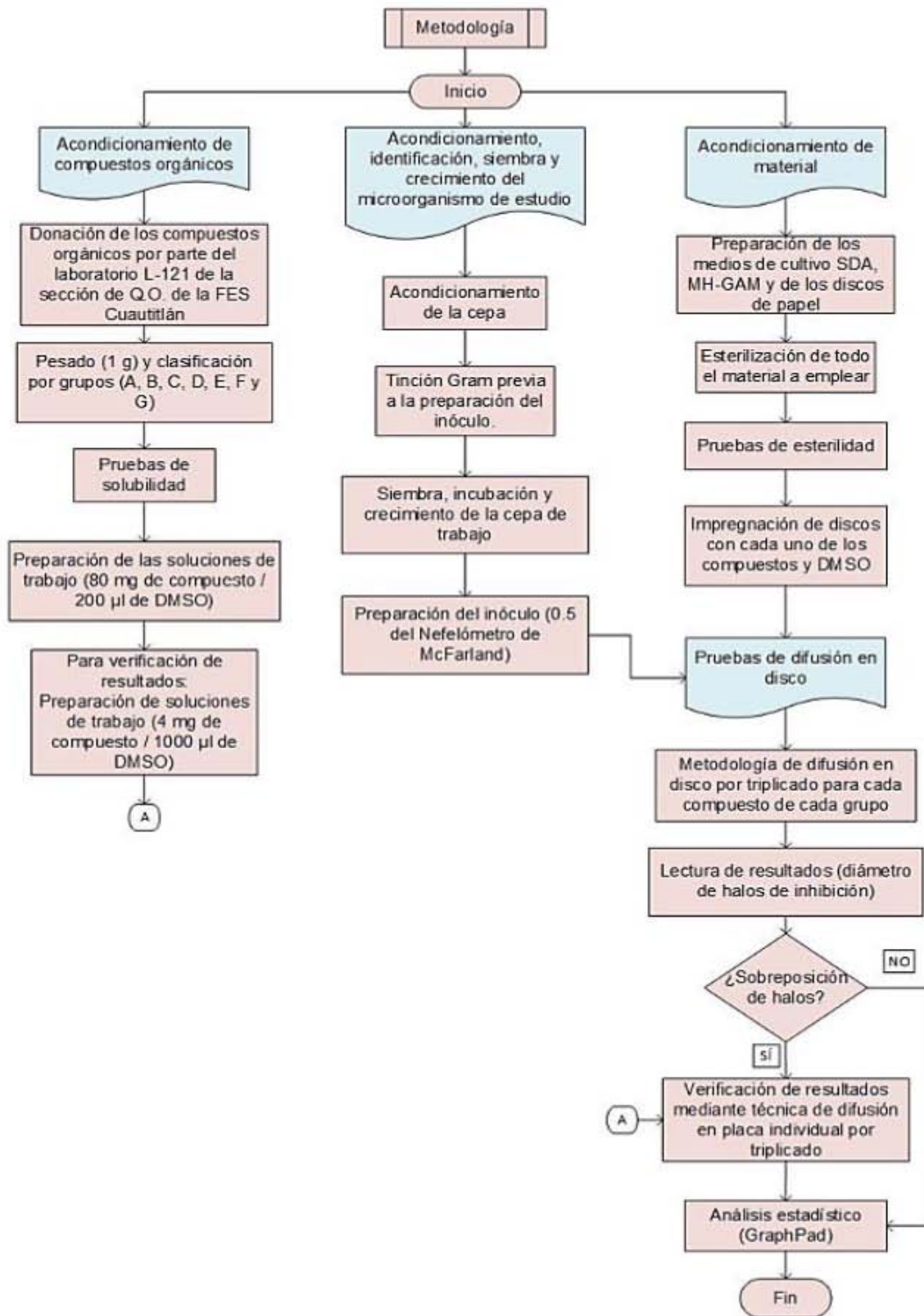


Figura 23. Diagrama de flujo

## 6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

- Antifúngico empleado testigo: Sensidisco de miconazol [50 µg/disco] Bio-Rad.
- Medios de cultivo utilizados:
  - Medio líquido y sólido SDA BD BIOXON-Becton Dickinson (previamente esterilizado en autoclave).
  - Agar Mueller-Hinton BD BIOXON-Becton Dickinson, adicionado con 2% glucosa y 0.5 µg/ml azul de metileno (previamente esterilizado 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 testigo negativo: sulfóxido de dimetilo (DMSO).
- Microorganismo
  - *Candida albicans* ATCC 10231

## 6.2 COMPUESTOS ORGÁNICOS A EVALUAR, PREVIAMENTE SINTETIZADOS

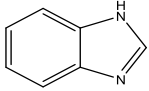
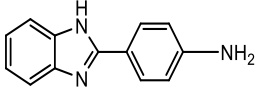
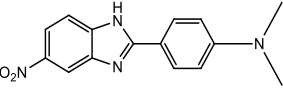
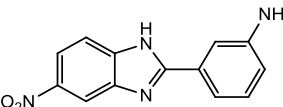
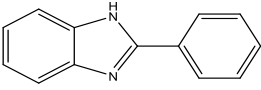
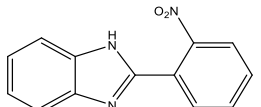
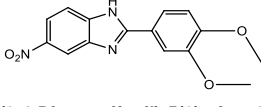
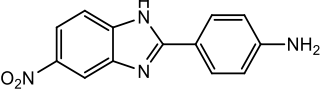
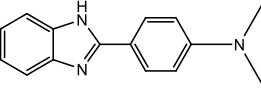
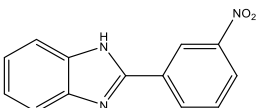
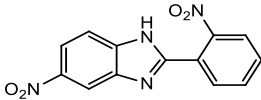
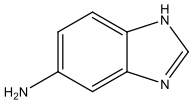
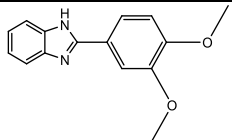
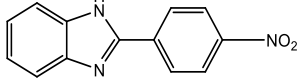
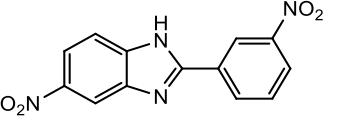
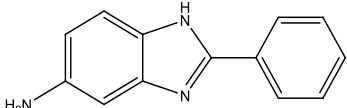
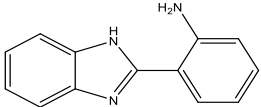
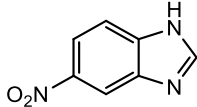
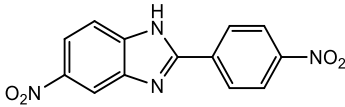
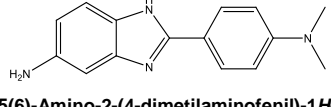
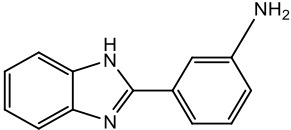
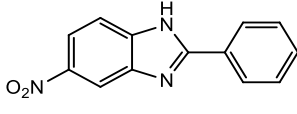
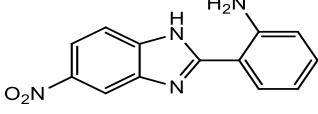
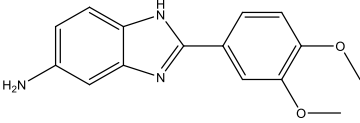
La síntesis de los compuestos orgánicos se llevó a cabo por el laboratorio L-121 de la sección de Química Orgánica de la FES Cuautitlán, Campo 1 (Luna, 2013). Se proporcionaron un total de 67 compuestos (1 g de cada uno), para fines de experimentación estos fueron clasificados en grupos de acuerdo con sus estructuras, obteniéndose un total de siete grupos, de los cuales, seis se conformaban por diez compuestos y uno más por siete, tal como se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6.** Compuestos de estudio por grupo

Grupo	Compuesto									
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7			

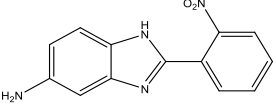
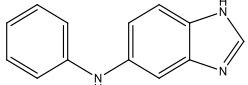
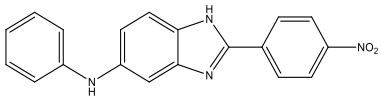
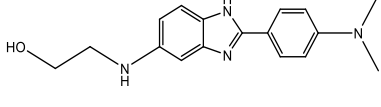
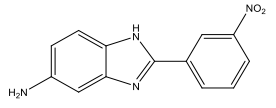
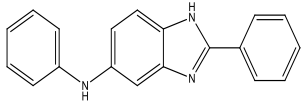
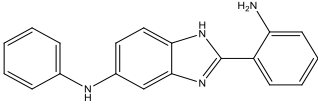
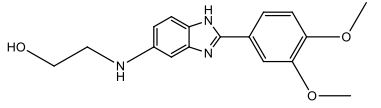
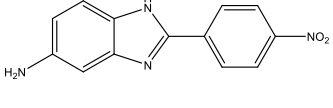
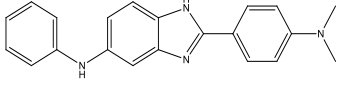
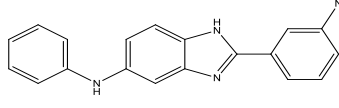
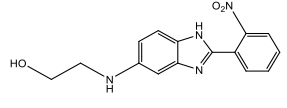
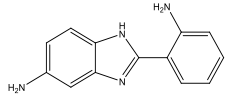
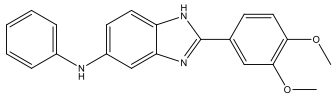
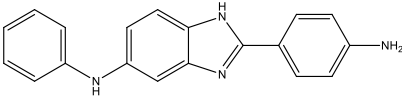
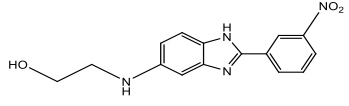
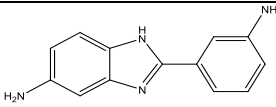
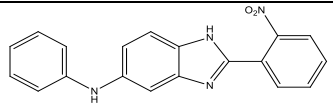
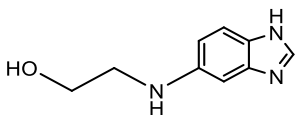
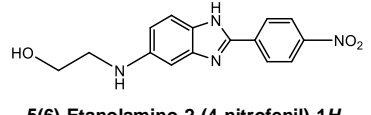
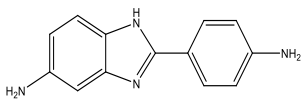
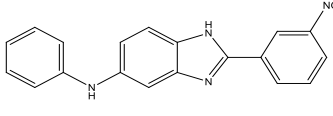
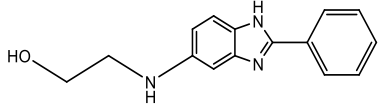
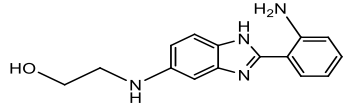
En la tabla 7 se muestran los ID de los 67 compuestos (identificación para fines experimentales), así como sus estructuras y denominación (IUPAC).

Tabla 7. Compuestos orgánicos de estudio.

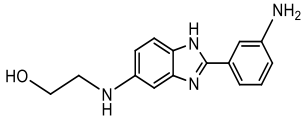
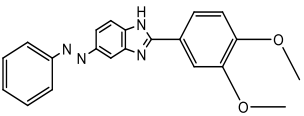
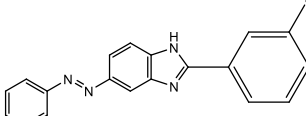
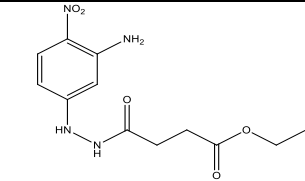
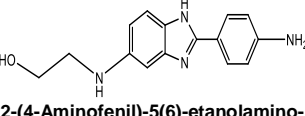
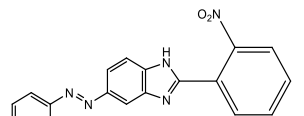
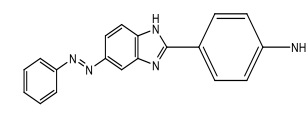
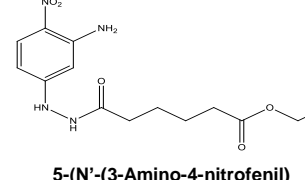
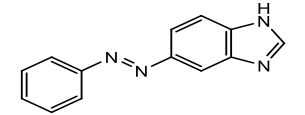
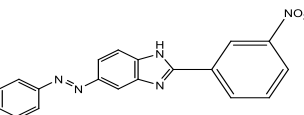
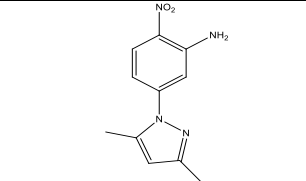
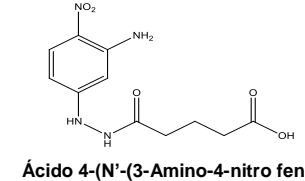
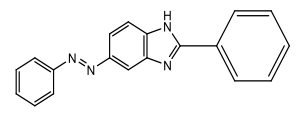
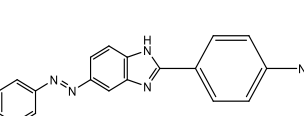
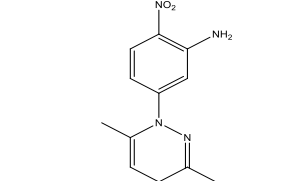
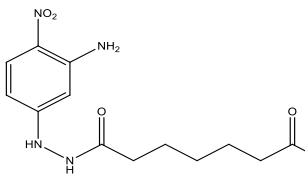
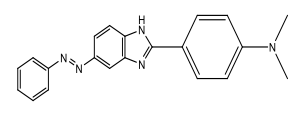
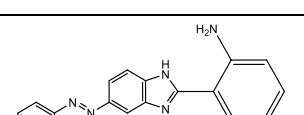
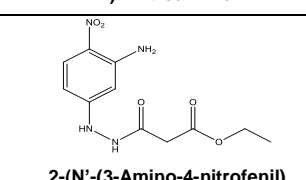
ID	Compuesto	ID	Compuesto	ID	Compuesto	ID	Compuesto
A1	 1 <i>H</i> -Benzimidazol	A7	 2-(4-Aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	B3	 2-(4-Dimetilaminofenil)-5(6)-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol	B9	 2-(3-Aminofenil)-5(6)-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol
A2	 2-Fenil-1 <i>H</i> -benzimidazol	A8	 2-(2-Nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	B4	 2-(3,4-Dimetoxifenil)-5(6)-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol	B10	 2-(4-Aminofenil)-5(6)-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol
A3	 2-(4-Dimetilaminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	A9	 2-(3-Nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	B5	 5(6)-Nitro-2-(2-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	C1	 5(6)-Amino-1 <i>H</i> -benzimidazol
A4	 2-(3,4-Dimetoxifenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	A10	 2-(4-Nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	B6	 5(6)-Nitro-2-(3-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	C2	 5(6)-Amino-2-fenil-1 <i>H</i> -benzimidazol
A5	 2-(2-Aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	B1	 5(6)-Nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol	B7	 5(6)-Nitro-2-(4-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	C3	 5(6)-Amino-2-(4-dimetilaminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol
A6	 2-(3-Aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	B2	 2-Fenil-5(6)-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol	B8	 2-(2-Aminofenil)-5(6)-nitro-1 <i>H</i> -benzimidazol	C4	 5(6)-Amino-2-(3,4-dimetoxifenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol



**Tabla 7:** Compuestos orgánicos de estudio (continuación).

ID	Compuesto	ID	Compuesto	ID	Compuesto	ID	Compuesto
C5	 5(6)-Amino-2-(2-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	D1	 5(6)-Fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol	D7	 5(6)-Fenilamino-2-(4-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	E3	 2-(4-Dimetilaminofenil)-5(6)-etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol
C6	 5(6)-Amino-2-(3-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	D2	 2-Fenil-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol	D8	 2-(2-Aminofenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol	E4	 2-(3,4-Dimetoxifenil)-5(6)-etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol
C7	 5(6)-Amino-2-(4-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	D3	 2-(4-Dimetilaminofenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol	D9	 2-(3-Aminofenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol	E5	 5(6)-Etanolamino-2-(2-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol
C8	 5(6)-Amino-2-(2-aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	D4	 2-(3,4-Dimetoxifenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol	D10	 2-(4-Aminofenil)-5(6)-fenilamino-1 <i>H</i> -benzimidazol	E6	 5(6)-Etanolamino-2-(3-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol
C9	 5(6)-Amino-2-(3-aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	D5	 5(6)-Fenilamino-2-(2-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	E1	 5(6)-Etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol	E7	 5(6)-Etanolamino-2-(4-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol
C10	 5(6)-Amino-2-(4-aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	D6	 5(6)-Fenilamino-2-(3-nitrofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol	E2	 5(6)-Etanolamino-2-fenil-1 <i>H</i> -benzimidazol	E8	 2-(2-Aminofenil)-5(6)-etanolamino-1 <i>H</i> -benzimidazol

**Tabla 7:** Compuestos orgánicos de estudio (continuación).

ID	Compuesto	ID	Compuesto	ID	Compuesto	ID	Compuesto
E9	 2-(3-Aminofenil)-5(6)-etanolamino-1H-benzimidazol	F4	 2-(3,4-Dimetoxifenil)-5(6)-fenilazo-1H-benzimidazol	F9	 2-(3-Aminofenil)-5(6)-fenilazo-1H-benzimidazol	G4	 3-(N'-(3-Amino-4-nitrofenil) hidrazinocarbonilpropanoato de etilo
E10	 2-(4-Aminofenil)-5(6)-etanolamino-1H-benzimidazol	F5	 5(6)-Fenilazo-2-(2-nitrofenil)-1H-benzimidazol	F10	 2-(4-Aminofenil)-5(6)-fenilazo-1H-benzimidazol	G5	 5-(N'-(3-Amino-4-nitrofenil) hidrazinocarbonil pentanoato de etilo
F1	 5(6)-Fenilazo-1H-benzimidazol	F6	 5(6)-Fenilazo-2-(3-nitrofenil)-1H-benzimidazol	G1	 5-(3,5-Dimetil-1H-pirazol-1-il)-2-nitroanilina	G6	 Ácido 4-(N'-(3-Amino-4-nitro fenil) hidrazinocarbonilbutanoico
F2	 2-Fenil-5(6)-fenilazo-1H-benzimidazol	F7	 5(6)-Fenilazo-2-(4-nitrofenil)-1H-benzimidazol	G2	 5-(3,6-Dimetil-1,4-dihidro piridazin-1-il)2-nitroanilina	G7	 Ácido 6-(N'-(3-Amino-4-nitro fenil) hidrazinocarbonil-heptanoico
F3	 2-(4-Dimetilaminofenil)-5(6)-fenilazo-1H-benzimidazol	F8	 2-(2-Aminofenil)-5(6)-fenilazo-1H-benzimidazol	G3	 2-(N'-(3-Amino-4-nitrofenil) hidrazinocarbonil acetato de etilo		

### **6.3 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD, PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO E IMPREGNACIÓN DE DISCOS**

Por recomendación del laboratorio L-121 de la sección de Química Orgánica de la FES Cuautitlán, Campo 1, se realizaron pruebas de solubilidad para cada uno de los grupos de los compuestos, empleando éter y sulfóxido de dimetilo (DMSO) como disolventes de prueba y un agitador eléctrico marca Vortex-Genie 2. Las pruebas de solubilidad tuvieron dos variantes, se llevaron a cabo con 160 y 80 mg de compuesto en 100  $\mu$ L y 200  $\mu$ L, respectivamente, con base en ello y mediante cálculos, se determinó que la cantidad requerida de cada compuesto era de 80 mg disuelta en 200  $\mu$ L de DMSO (elegido con base en los resultados de la pruebas y de acuerdo a los datos reportados en la bibliografía); como resultado adicional se determinó que los compuestos A2, A6, A8, B3, C6, C7, C10, D9, E2 y E3 fueron insolubles en ambos disolventes de prueba.

Las disoluciones fueron preparadas empleando 80 mg de cada compuesto pesados en balanza analítica disueltos en 200  $\mu$ L de DMSO marca Fermont al 99.9% medidos con micropipeta de 200  $\mu$ L marca Science Med; estas soluciones fueron empleadas para impregnar los discos estériles con 10  $\mu$ L de las mismas, obteniéndose una concentración de 4 mg/disco; de cada solución fueron impregnados 3 discos para realizar las pruebas por triplicado, los discos de testigo negativo fueron impregnados con DMSO (previamente probado frente a *Candida albicans*), posterior a la impregnación los discos se dejaron secar 24 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se prepararon las soluciones con 4 mg de los compuestos D2, D7, D10, G2, G3, G4, G5, G6 y G7, pesados en balanza analítica disueltos en 1000  $\mu$ L de DMSO marca Fermont al 99.9% medidos con micropipeta de 1000  $\mu$ L marca Science Med, estas soluciones fueron empleadas en las pruebas de difusión en disco para la verificación de resultados de los compuestos que presentaron sobreposición de los halos de inhibición, trabajándose con una concentración de 0.04 mg/disco.

### **6.4 ACONDICIONAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, SIEMBRA Y CRECIMIENTO DE LA CEPA *Candida albicans* ATCC 10231**

Se realizó el acondicionamiento de la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 (previamente activada e identificada) obtenida del cepario del Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica, de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4; la siembra fue mediante la técnica de inóculo pesado en medio de cultivo líquido caldo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) marca

BIOXON-Becton Dickinson con crecimiento a incubación durante 48 horas a  $37 \pm 2$  °C en agitación. Una vez concluido el tiempo de incubación, se realizó tinción Gram, la cual se observó con ayuda de microscopio óptico a 40 y 100x; esto con el objetivo de asegurar la ausencia de contaminantes y verificar la identificación previa realizada por “Laboratorios Biomédicos” (Anexo 1). Una vez confirmada la cepa de trabajo correspondiente a *Candida albicans*, se procedió a sembrar en placas de cultivo sólido Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) marca BIOXON-Becton Dickinson (previamente esterilizado), éstas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C.

## 6.5 PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO

Para evaluar la actividad antifúngica de los compuestos orgánicos sintetizados, fue empleada la metodología de difusión en disco a partir de discos de papel whatman de 6 mm de diámetro, previamente esterilizados en autoclave e impregnados con las soluciones correspondientes de cada uno de los compuestos de estudio; la concentración de trabajo para las pruebas por triplicado de todos los compuestos fue de 4 mg/disco y para la verificación de los resultados de los compuestos D2, D7, D10, G2, G3, G4, G5, G6 y G7 de manera individual por triplicado fue de 0.04 mg/disco.

Previamente, fueron resuspendidas células fúngicas de la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 (de 24 horas de crecimiento en SDA) en tubos que contenían 5 mL de solución salina fisiológica (SSF) NaCl al 0.9% (previamente esterilizada), para ajustar la densidad del inóculo de acuerdo al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland (aproximadamente  $1 - 5 \times 10^8$  células/mL), se realizó la lectura de la turbidez por espectrofotometría a una longitud de onda de 625, obteniéndose una absorbancia de 0.092. (NOM-003-SAG/GAN-2017).

En la suspensión de células fúngicas ya estandarizada, se sumergieron hisopos estériles, eliminando el exceso de líquido en las paredes del tubo, posteriormente se realizó sembrado masivo sobre toda la superficie de la placa con Agar Mueller–Hinton marca BD BIOXON-Becton Dickinson adicionado con glucosa al 2% y 0.5 µg/mL de azul de metileno.

En cada caja previamente sembrada con la cepa *Candida albicans* ATCC 10231, se colocaron 4 discos de papel filtro impregnados, tres de ellos impregnados con 10 µL del compuesto correspondiente y un disco como testigo negativo impregnado con DMSO, en el caso de la verificación de resultados, solo se colocó en el centro de las cajas

previamente sembradas un disco impregnando con el compuesto correspondiente. Como testigo positivo se utilizó un sensidisco de miconazol [50 µg/disco] marca Bio-Rad.

Las cajas fueron incubadas a 37 °C por 48 horas. Concluido el tiempo de incubación, los diámetros de los halos de inhibición presentes fueron medidos con vernier.

Por último, para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa estadístico GraphPad.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Retomando un poco la información mencionada anteriormente, recordemos que, en los últimos 30 años, la incidencia de infecciones micóticas (micosis) oportunistas ha aumentado de manera significativa y constante en todo el mundo, siendo *Candida* el principal agente etiológico y a su vez *Candida albicans* la especie predominante en dichas infecciones (Reyes, et al., 2017), viéndose mayormente afectado el grupo de pacientes con presencia de factores predisponentes. Debido a estas circunstancias, se genera a su vez un aumento en el uso de tratamientos antifúngicos, convirtiéndose muchas veces en un uso indiscriminado y poco controlado, siendo esto último una de las principales causas de generación de cepas resistentes (López, et al., 2016).

Al hablar de generación de resistencia por parte del microorganismo, en el caso de los hongos, se habla de un cambio en la sensibilidad o susceptibilidad al antifúngico, lo que, visto de otra manera, es la pérdida de la eficacia del tratamiento antifúngico, por tal motivo, la resistencia a antifúngicos representa un reto terapéutico que deja un menor número de posibilidades para el tratamiento de estas enfermedades (Gómez, 2010).

Con base en lo anterior, es que resulta necesario investigar otras moléculas que puedan ser empleadas para el tratamiento de enfermedades fúngicas, razón que impulsa el presente trabajo, en el cual fueron evaluados 67 nuevos compuestos heterocíclicos de los cuales 60 son derivados de benzimidazol, uno de pirazol, uno de piridazina y cinco de hidrazida, con el propósito de determinar sus posibles efectos antifúngicos. Para tal fin se decidió utilizar como microorganismo de estudio a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 (figura 24), ya que, de acuerdo a lo reportado, es el agente etiológico de candidiasis más común, apareciendo en los aislamientos desde un 40 hasta un 88.9 % de los casos (Reyes, et al., 2017).

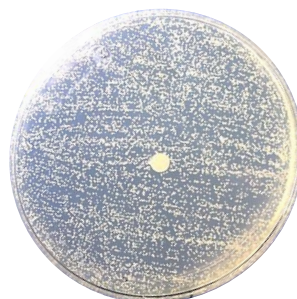


**Figura 24.** Tinción gram  
*Candida albicans* ATCC 10231  
40X.

Para tener un punto de referencia de la actividad antifúngica que los nuevos compuestos pudieran generar, se realizaron dos antibiogramas correspondientes a los testigos positivo y negativo; el primero se realizó empleando un sensidisco marca Bio-Rad de miconazol [50 µg/disco] obteniéndose un halo de inhibición de 35 mm, mientras que el segundo se realizó empleando un disco impregnado de DMSO en el cual no se presentó inhibición, estos resultados se esquematizan en las figuras 25 y 26, respectivamente.



**Figura 25.** Antibiograma miconazol  
(testigo positivo).



**Figura 26.** Antibiograma DMSO (testigo negativo).

Los criterios de clasificación para determinar si un microorganismo fúngico es sensible, sensible dosis dependiente o resistente, están basados en los manuales del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), en los cuales se reportan los puntos de corte de diámetro de los halos de inhibición de algunos agentes antifúngicos como lo son fluconazol, voriconazol y capsosfungina; cabe señalar que los dos primeros pertenecen al grupo de los azoles al igual que miconazol. El CLSI indica que para considerar a *Candida* spp. sensible a fluconazol y voriconazol deben presentarse diámetros de halos de inhibición  $\geq 19$  mm y  $\geq 17$  mm, respectivamente (Cantón, Martín y Espinel, 2007); un aspecto más a considerar, es que tanto el fluconazol como el voriconazol pertenecen al subgrupo de triazoles, mientras que miconazol pertenece al subgrupo de los imidazoles, al no encontrar datos reportados de sensibilidad a miconazol, se tomaron como referencia los reportados en el inserto de los sensidisco del testigo positivo, los cuales indican sensibilidad cuando el diámetro de los halos de inhibición es igual a 20 mm. Ahora bien,

como se mencionó anteriormente el resultado del testigo positivo fue de 35 mm, motivo por el cual se dice que existe sensibilidad.

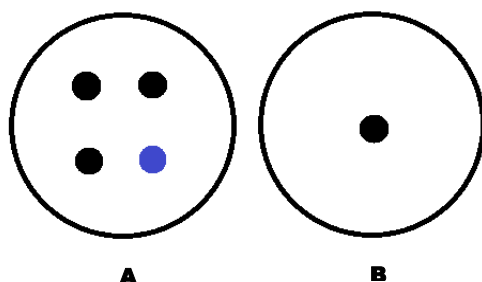
Uno de los pasos previos, además necesario para poder llevar a cabo la evaluación, fue la disolución de los compuestos de prueba. Como se menciona en la parte experimental, fueron realizadas pruebas de solubilidad con los solventes éter y sulfóxido de dimetilo (DMSO), los resultados de estas pruebas arrojaron que el mejor solvente era DMSO al presentar solubilidad en 57 compuestos de los 67 totales, este resultado coincide con lo reportado en la literatura, en la cual encontramos que el DMSO es considerado disolvente ideal, además es el recomendado por el CLSI en el estudio de moléculas insolubles en agua, motivo que lo convierte en el solvente de elección en los ensayos biológicos, sin embargo, este motivo no es el único, ya que además posee una baja toxicidad, lo cual justificaría la ausencia de actividad antifúngica, permitiéndole además ser empleado como testigo negativo (Kerns, 2008).

A pesar de que DMSO es considerado un disolvente ideal, existen casos en los que los compuestos son insolubles, tal como lo fue en la experimentación, en la que se encontraron nueve compuestos insolubles (A2, A6, A8, B3, C6, C7, C10, E2 y E3), lo que de acuerdo a la literatura, se debe a que la solubilidad del DMSO puede verse limitada bajo ciertas circunstancias, como lo son casos en donde los compuestos posean un elevado peso molecular, una red cristalina rígida e hidrófila, un fuerte enlazamiento molecular y un área de superficie de contacto limitada o un gran número de enlaces (impedimento estérico) (Kerns, 2008).

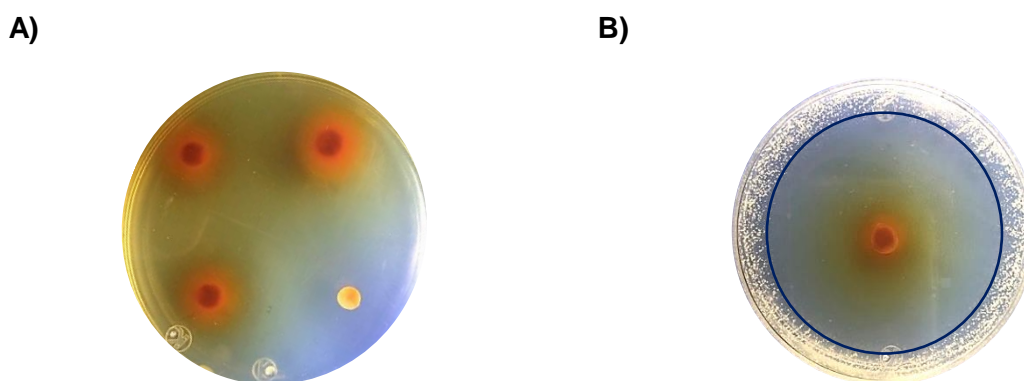
Para la metodología empleada, era de suma importancia la disolución de los compuestos, ya que en la prueba de difusión se emplearon discos impregnados de las soluciones de cada uno de los compuestos de prueba, esto con base en el fundamento de la técnica, el cual dicta que el antibiograma disco-placa consiste en depositar en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel impregnados con los diferentes compuestos de prueba y que, tan pronto el disco impregnado se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el papel filtro absorbe agua del medio y es así como los compuestos difunden a través del espesor del agar de manera radial, formándose un gradiente de concentración (Picazo, 2000); de tal modo, los compuestos que no presentaron solubilidad se descartaron al no cubrir las características necesarias para la experimentación.

Las concentraciones de trabajo fueron 0.4 mg/ $\mu$ L (4 mg/disco) y 0.004 mg/ $\mu$ L (0.04 mg/disco); con respecto a la primer concentración podemos decir que es elevada si la

comparamos con lo contenido en el sensidisco de miconazol (testigo positivo), sin embargo, la decisión de trabajar con ésta, se tomó con el propósito de favorecer y facilitar la visualización del efecto antifúngico que pudiese presentarse, bajo la reserva de que en caso de no observarse lo esperado ésta se podría modificar, aumentando o disminuyendo según se requiriera, tal como sucedió en la experimentación, en donde se presentaron problemas de lectura de los resultados de algunos de los compuestos, debido a la presencia de halos de inhibición con sobreposición, motivo que derivó en la disminución de la concentración (0.004 mg/µl equivalente a 0.04 mg/disco) y en la verificación de los resultados de los compuestos que mostraron impedimentos en la lectura, como fue el caso de D2, D7, D10, G2, G3, G4, G5, G6 y G7, mediante la repetición de las pruebas, pero ahora de manera individual, tal como se muestra en las figuras 27 y 28; esta práctica nos permite identificar a los compuestos que pudieran ser considerados de mayor relevancia, abriendo camino a estudios posteriores más puntuales y específicos.



**Figura 27. A)** Distribución de los discos en placa para las pruebas por triplicado (disco azul: testigo negativo), **B)** Distribución del disco en placa para las pruebas individuales.



**Figura 28. A)** Compuesto G4: sobreposición de halos, **B)** Compuesto G4: prueba de inhibición individual (diámetro de halo de inhibición marcado en color azul).

Tal como se mencionó en la metodología experimental, la técnica empleada para la determinación de la actividad antifúngica de los compuestos fue la difusión en disco, esta



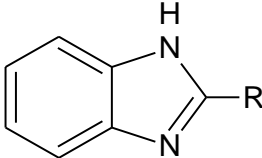
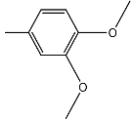
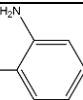
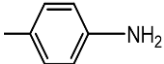
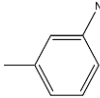
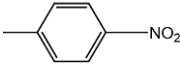
metodología involucra la determinación del diámetro de los halos de inhibición incluyendo los 6 mm del disco sobre el respaldo de la caja petri sin remover la tapa, lo cual se realizó por triplicado con ayuda de un Vernier, obteniéndose un promedio de cada compuesto; los compuestos que no presentaron halo de inhibición (ausencia de actividad antifúngica contra *C. albicans*), tal como lo fueron A3, B5, B6, B7, B10, C4, C5, C9, D1, D3, D4, D6, D8, E4, E5, E6, E9 y todos los compuestos del grupo F, fueron descartados del estudio.

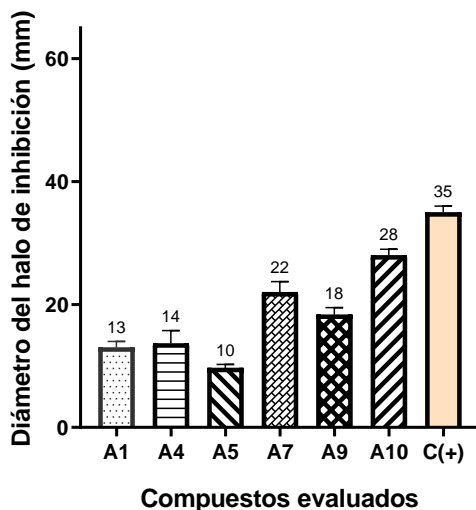
Al analizar de manera general las estructuras de los compuestos heterocíclicos en estudio, a simple vista podemos observar que la mayor parte de éstos poseen anillos bencénicos, estos anillos tienen como característica una baja polaridad, lo cual les permite introducirse con gran facilidad a las células, razón que pudiera favorecer la entrada de los compuestos de estudio a las células fúngicas, aunque es importante resaltar que el hecho de poseer una baja polaridad no asegura efectividad, sin embargo, ésta puede verse favorecida al contener electrones en movimiento en sus anillos, los cuales permiten la interacción con otros sustituyentes, ya sean aquellos unidos al mismo anillo o aquellos presentes en la estructura frente a la que van a actuar (Botello, 2005).

El montaje de las pruebas de evaluación de los compuestos se llevó a cabo en el orden en el que fueron clasificados, de tal manera que el primer grupo evaluado fue el A.

Los compuestos de este grupo derivan del 1*H*-benzimidazol (A1) con un sustituyente fenilo en la posición 2 de la estructura y de la misma manera, con otros sustituyentes en el 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 A5 y el de mayor efecto el A10, con 10 mm y 28 mm, respectivamente. Estos resultados se muestran en la tabla 8 y, en la gráfica 1, podemos observar la comparación de la actividad antifúngica producida por los compuestos pertenecientes a este grupo con respecto a la actividad producida por miconazol; con base en esto, encontramos que el compuesto A10 es el de mayor relevancia, ya que produjo un efecto muy cercano al producido por miconazol, lo que implica que podría seguir en estudio para demostrar su eficacia y utilidad como antifúngico de uso clínico.

**Tabla 8.** Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo A.

Estructura base grupo A	ID	Halo de inhibición (mm)	Sustituyente (R)
	A1	13 ± 0.7	-H
	A4	14 ± 0.7	
	A5	10 ± 0.7	
	A7	22 ± 0.9	
	A9	18 ± 0.8	
	A10	28 ± 0.7	
	Testigo positivo Miconazol: 35 ± 0.8 mm		Testigo negativo DMSO: 0 ± 0.0



**Gráfica 1.** Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo A, con respecto al testigo positivo (miconazol).

Al observar la tabla 8 encontramos que la estructura base de los compuestos, la cual corresponde al 1*H*-benzimidazol (A1), genera por sí misma efecto antifúngico contra *C. albicans*, el cual aumenta visiblemente al adicionar un sustituyente nitro en la posición *para* del fenilo (A10). Esta actividad se ve disminuida cuando el grupo amino para A5 en posición *orto* se ve comprometida con el nitrógeno en posición 1(3) para formar puentes de hidrógeno, lo que produce menor disponibilidad de su par de electrones para formar

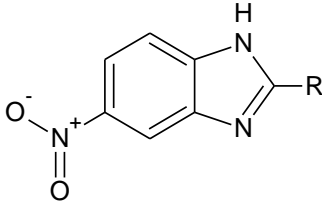
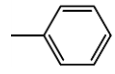
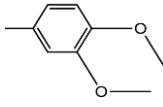
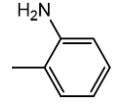
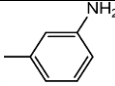
estructuras resonantes, sin embargo, cuando el grupo nitro presenta en la posición *meta* en el anillo de la posición 2 (A9) la actividad antifúngica aumenta notablemente.

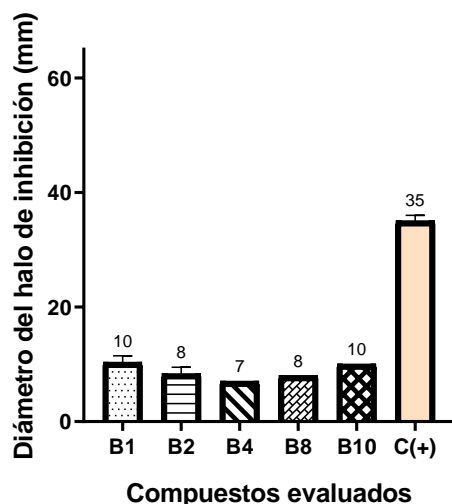
En el caso de los compuestos A4 y A7, encontramos que A4 generó menor respuesta que A10, teniendo la característica de poseer dos sustituyentes metoxi en el anillo fenilo en las posiciones 3 y 4, lo cual indica que dichos sustituyentes no favorecen la actividad antifúngica; A7 posee un sustituyente amino en la posición *para* del fenilo favoreciendo la actividad. De manera general, se observa que el anillo fenilo con un grupo electrodonador (amino) o electroattractor (nitro) en posición *para* incrementa la actividad, mientras que grupos en otra posición no la favorecen.

El siguiente grupo evaluado fue el B; los compuestos de este grupo son derivados del 5(6)-nitro-1*H*-benzimidazol, con o sin un sustituyente fenilo en la posición 2, el cual presenta a su vez, un sustituyente en la posición *orto*, *meta* o *para*, tal como se muestra en la tabla 9. Estas modificaciones a las estructuras base mediante adiciones se repiten para los grupos C, D, E y F.

Los compuestos B1, B2, B4, B8 y B9 no presentan ningún grupo en posición *para* exclusivamente (consultar tabla 9), lo que puede ser indicativo de que un sustituyente en esta posición es importante para una buena actividad antifúngica y, qué esta actividad no se ve favorecida con la presencia del grupo nitro en la posición 5(6).

**Tabla 9.** Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo B.

Estructura base grupo B	ID	Halo de inhibición (mm)	Sustituyente (R)
	B1	10 ± 0.8	-H
	B2	8 ± 0.7	
	B4	7 ± 0.0	
	B8	8 ± 0.0	
	B9	10 ± 0.0	
Testigo positivo Miconazol: 35 ± 0.8 mm		Testigo negativo DMSO: 0 ± 0.0	



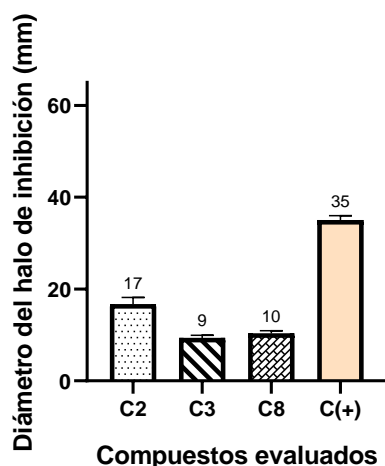
**Gráfica 2.** Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo B, con respecto al testigo positivo (miconazol).

En la gráfica 2 encontramos que, ninguno de los compuestos de este grupo presentó una actividad considerable en comparación con miconazol; esta respuesta podría limitar el interés en los mismos, ya que los resultados los descartan como una buena opción de tratamiento contra *C. albicans*.

Los compuestos del grupo C derivan del 5(6)-amino-1*H*-benzimidazol, en este grupo, al igual que en el grupo anterior, no fueron encontrados compuestos con actividad antifúngica relevante, ya que ninguno tuvo un efecto similar a miconazol (gráfica 3), por otro lado, el compuesto C2 presentó mayor actividad antifúngica en comparación con C3 y C8, estos resultados se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo C.

Estructura base grupo C	ID	Halo de inhibición (mm)	Sustituyente (R)
	C2	17 ± 0.8	
	C3	9 ± 0.4	
	C8	11 ± 0.5	
Testigo positivo Miconazol: 35 ± 0.8 mm		Testigo negativo DMSO: 0 ± 0.0	

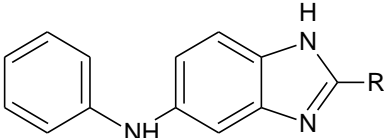
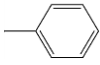
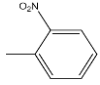
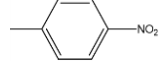
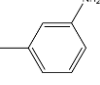
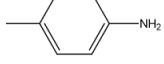


**Gráfica 3.** Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo C, con respecto al testigo positivo (miconazol).

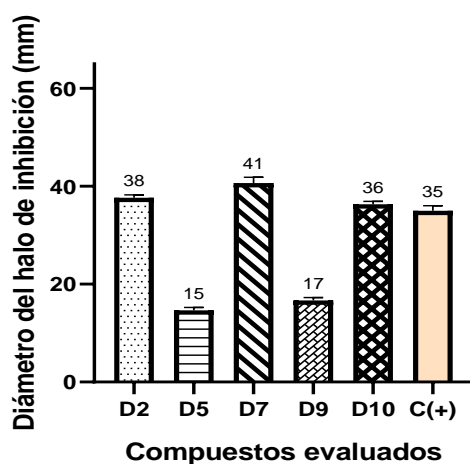
Los compuestos de la serie C, presentan un grupo amino en la posición 5(6) del heterociclo, a diferencia del grupo B, que presentaba un grupo nitro, este cambio, no derivó en una diferencia importante en la actividad antifúngica, a excepción de C3, que presenta un grupo electrodonador (dimetilamino) en *para*, de tal modo que, su baja actividad puede atribuirse a un efecto estérico de dicho grupo.

En la tabla 11 encontramos los resultados obtenidos para los compuestos del grupo D. Estos compuestos corresponden al 5-fenilamino-1*H*-benzimidazol. De manera general, este grupo presentó muy buena actividad, ya que de los 5 compuestos en los que se observó actividad antifúngica contra *C. albicans*, 3 presentan actividad mayor a la producida por miconazol.

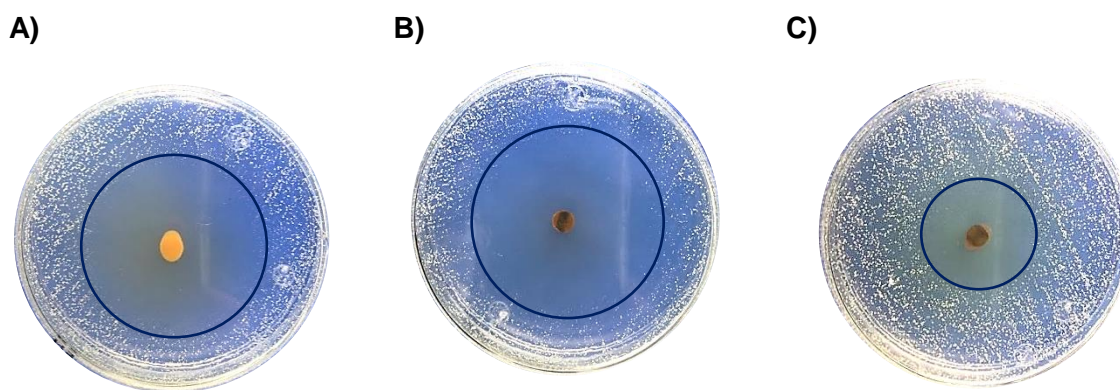
**Tabla 11.** Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo D.

Estructura base grupo D	ID	Halo de inhibición (mm)	Sustituyente (R)
	D2	38 ± 0.5	
	D5	15 ± 0.7	
	D7	41 ± 0.7	
	D9	17 ± 0.7	
	D10	36 ± 0.8	
Testigo positivo Miconazol: 35 ± 0.8 mm		Testigo negativo DMSO: 0 ± 0.0	

Como se muestra en la gráfica 4, los compuestos D2, D7 y D10 (figura 29) presentaron una actividad antifúngica muy considerable con halos de 38 mm, 41 mm y 36 mm, respectivamente, lo cual los convierte en compuestos relevantes y de interés para investigaciones futuras sobre el tratamiento de *C. albicans*; de manera general, este grupo presenta un incremento en la actividad antifúngica en comparación con los grupos anteriores, lo cual nos indica que la adición del grupo fenilamino en la posición 5 del heterociclo incrementa la actividad antifúngica; para este grupo se propone la protonación del fenilo en posición *orto* y *para*, favoreciendo a través de estructuras resonantes el carácter ácido del compuesto, generando un factor que no favorece el desarrollo de *C. albicans*.



**Gráfica 4.** Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo D, con respecto al testigo positivo (miconazol).

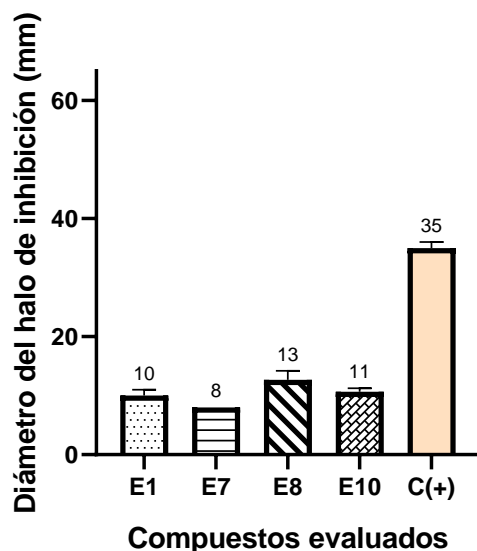


**Figura 29. A)** Compuesto D2, **B)** Compuesto D7, **C)** Compuesto D10. Diámetro de halos de inhibición señalados en color azul.

De manera similar a los grupos B y C, los compuestos del grupo E derivados del 5(6)-etanolamino-1*H*-benzimidazol, fueron escasamente efectivos contra *C. albicans*, esto puede constatarse al observar el diámetro de los halos de inhibición, siendo de 13 mm el halo más grande y de 8 mm el más pequeño, tal como se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12.** Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo E.

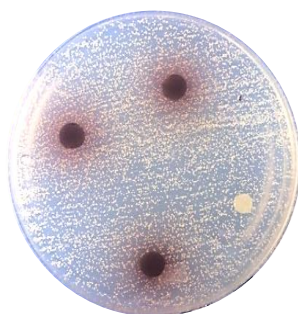
Estructura base grupo E	ID	Halo de inhibición (mm)	Sustituyente (R)
	E1	10 ± 0.7	-H
	E7	8 ± 0.5	
	E8	13 ± 0.9	
	E10	11 ± 0.6	
Testigo positivo Miconazol: 35 ± 0.8 mm		Testigo negativo DMSO: 0 ± 0.0	



**Gráfica 5.** Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo E, con respecto al testigo positivo (miconazol).

También, podemos observar en la gráfica 5, que todos los compuestos presentaron una actividad antifúngica muy por debajo del testigo positivo, evidenciando así su inefectividad. Por otro lado, al analizar los compuestos de manera estructural, se haya que el compuesto E1, tubo actividad antifúngica contra *C. albicans* por sí mismo, es decir, sin poseer sustituyentes, esta actividad se ve ligeramente disminuida al presentarse un grupo nitro en la posición *para* del fenilo (E7); caso contrario se presenta al encontrarse un grupo amino en las posiciones *orto* y *para* (E8 y E10, respectivamente), presentándose un ligero aumento en la actividad antifúngica.

El penúltimo grupo evaluado fue el F; los compuestos de este grupo derivan del 5-fenilazo-1*H*-benzimidazol. Esta serie de compuestos fue irrelevante, puesto que no se presentó actividad antifúngica en ningún caso, ejemplo de ello se muestra en la figura 30.



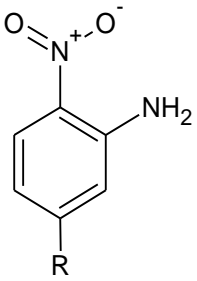
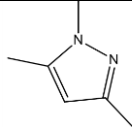
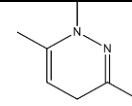
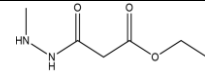
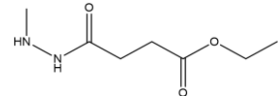
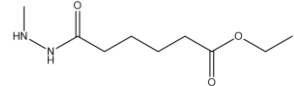
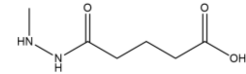
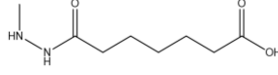
**Figura 30.** Compuesto F3 (sin halo de inhibición).



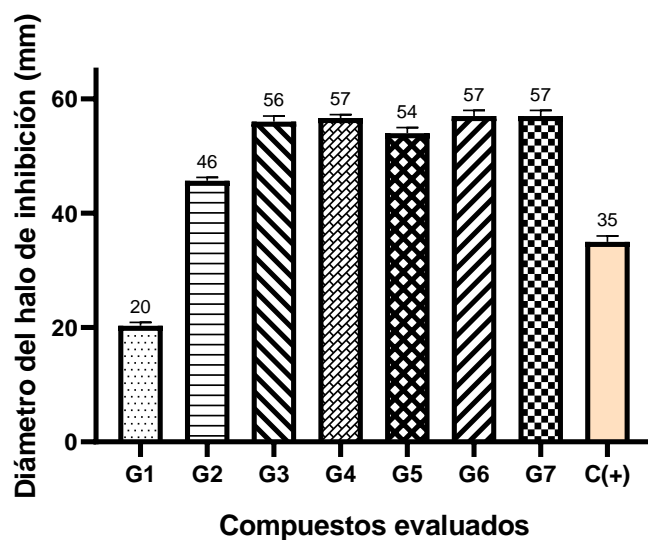
El último grupo de compuestos evaluado fue el G, con respecto a éste, podemos observar en la tabla 13, que, a diferencia de los demás grupos, éste no contiene al grupo benzimidazol en sus estructuras; también se observa que, los compuestos G1 y G2 son similares, sin embargo, en el primero encontramos un azol (pirazol) y en el segundo encontramos una piridazina, pero, ambos poseen en su estructura una nitroanilina.

Es importante señalar que, las estructuras que comparten los compuestos del G3 al G7 son hidrazidas.

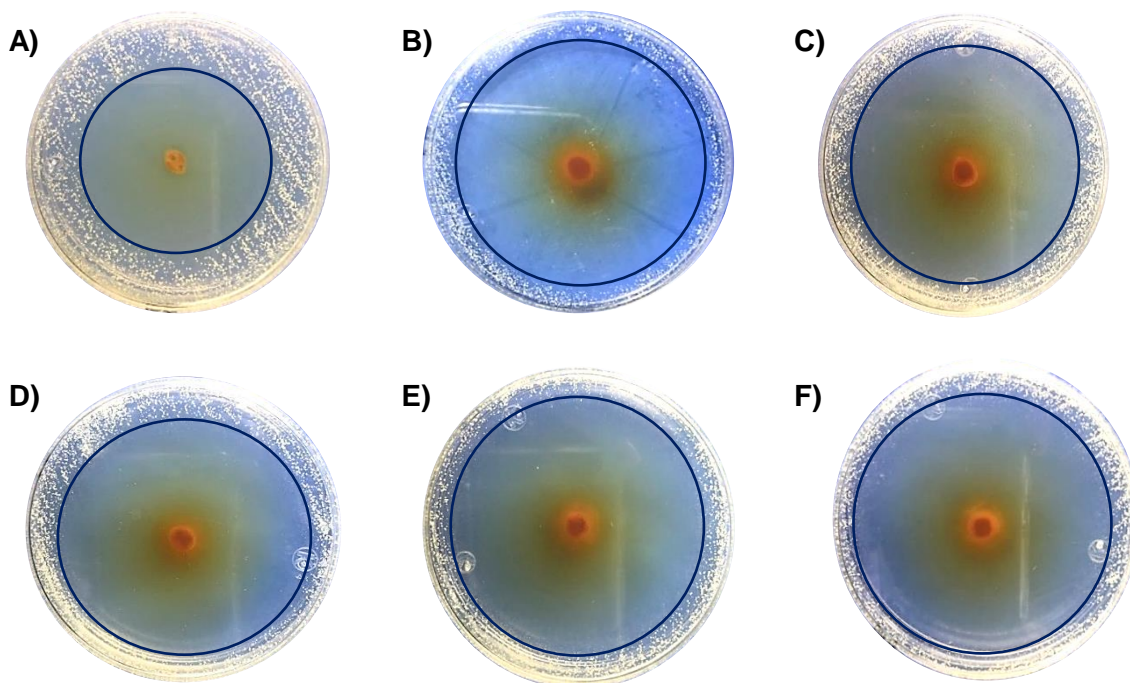
**Tabla 13.** Estructura base, diámetro de los halos de inhibición (mm) y sustituyentes presentes en los compuestos del grupo G.

Estructura base grupo G	ID	Halo de inhibición (mm)	Sustituyente (R)
	G1	20 ± 0.5	
	G2	46 ± 0.5	
	G3	56 ± 0.5	
	G4	57 ± 0.0	
	G5	54 ± 0.5	
	G6	57 ± 0.5	
	G7	57 ± 0.0	
Testigo positivo Miconazol: 35 ± 0.8 mm		Testigo negativo DMSO: 0 ± 0.0	

Por otro lado, si observamos la gráfica 6, a simple vista podemos percibir que la actividad antifúngica del grupo en general es buena, siendo en la mayoría de los casos superior al testigo positivo (figura 31), lo cual genera gran interés, ya que son moléculas prometedoras con respecto a su utilidad contra *C. albicans*, y quizá contra algunos otros hongos.



**Gráfica 6.** Comparación del promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) de los compuestos del grupo G, con respecto al testigo positivo (miconazol).



**Figura 31.** A) Compuesto G2, B) Compuesto G3, C) Compuesto G4, D) Compuesto G5, E) Compuesto G6 y F) Compuesto G7. Diámetro de halos de inhibición señalados en color azul.

A pesar de que en este grupo encontramos estructuras variadas, se haya una característica importante en comparación con los otros 6 grupos, ya que los compuestos

del grupo G, con excepción de G1 y G2, no se componen de heterociclos, pero poseen en su estructura al menos un benceno trisustituido. En la gráfica 6 podemos observar que el compuesto que contiene al pirazol fue el que generó la menor actividad antifúngica, seguido por el compuesto que contiene a la piridazina (G1 y G2, respectivamente); en cambio los compuestos que presentan en su estructura una hidrazida, generaron actividad similar entre sí y por encima del testigo positivo, la similitud entre la actividad de éstos, es de alguna manera algo que se podía esperar, debido a que sus estructuras solo 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).

Tal como se había mencionado anteriormente, es importante considerar las implicaciones que se generan al estar presentes los grupos amino y nitro en los compuestos, ya que de manera estructural es evidente su presencia, ya sea formando parte de la estructura principal o como sustituyentes.

Al analizar de manera general los resultados de todos los compuestos, encontramos que dentro de los derivados de benzimidazol, los compuestos D2, D7 y D10 fueron los que sobresalieron al generar halos de inhibición de 38 mm, 41 mm y 33 mm, respectivamente. Con respecto al compuesto D2, al analizar su estructura podemos ver que posee 3 anillos bencénicos y tal como se ha descrito anteriormente esta característica parece favorecer la actividad antifúngica, puesto que el poseer bencenos en su estructura facilita la interacción con otros sustituyentes (Botello, 2005).

Por otro lado, cuando existen sustituyentes enlazados al anillo benceno, tales como grupos amino o nitro, específicamente en la posición *para*, se genera mayor actividad antifúngica, tal como es el caso de los compuestos D7 y D10, los cuales poseen a los sustituyentes nitro y amino, respectivamente. Este efecto puede deberse al hecho de que a pesar de las diferencias de cargas de los sustituyentes, el grupo nitro tiene la capacidad de generar un fuerte efecto atrayente de electrones, provocando la deslocalización de los mismos, mientras que el grupo amino, al poseer un nitrógeno cuenta con las capacidades de contribuir afinidad a las enzimas sobre las que actúa y de reaccionar con grupos carbonilo (Korokolvas y Burckhalter, 1983); el efecto generado a partir de la atracción de electrones coincide con los resultados reportados por Sharma, et al., 2009, los cuales indican que la presencia de un grupo atrayente de electrones en el anillo benceno favorece la actividad antifúngica.

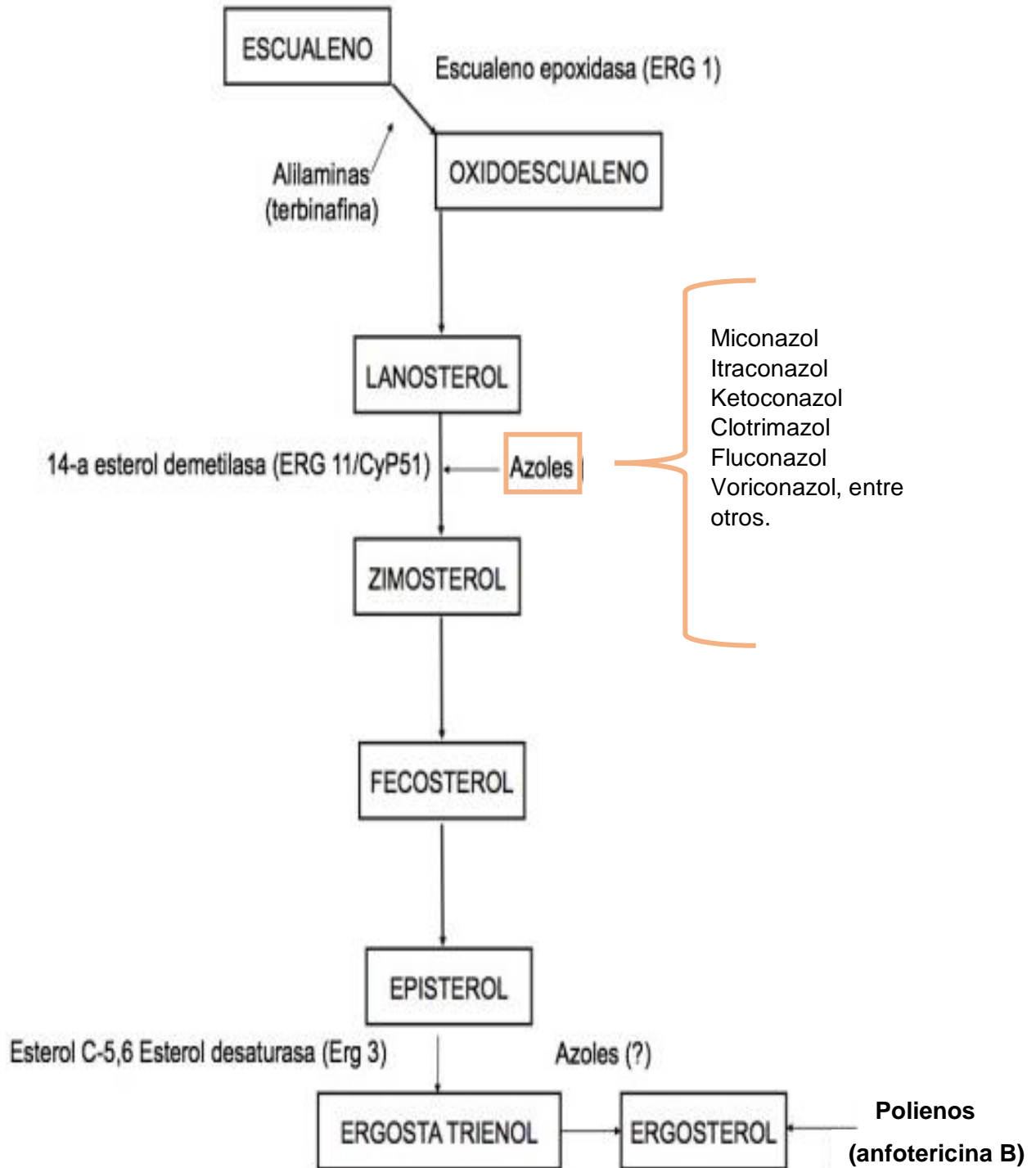
A pesar de la presencia de estas características, es importante no perder de vista el origen de los compuestos evaluados, recordemos que la mayoría son derivados de

benzimidazol y, es esta la razón por la cual se esperaba existiera actividad antifúngica, puesto que el sistema de anillo que poseen como núcleo, ha sido objeto de estudio en diversas ocasiones, siendo estos estudios los que han permitido determinar que los benzimidazoles son isómeros estructurales de nucleótidos naturales, lo que les permite interactuar fácilmente con los biopolímeros de los sistemas vivos, además se ha comprobado su funcionalidad y efectividad como antihipertensivo, antifúngico, antioxidante, antiviral e inhibidor de topoisomerasas, entre otras. (Sharma, et al., 2009).

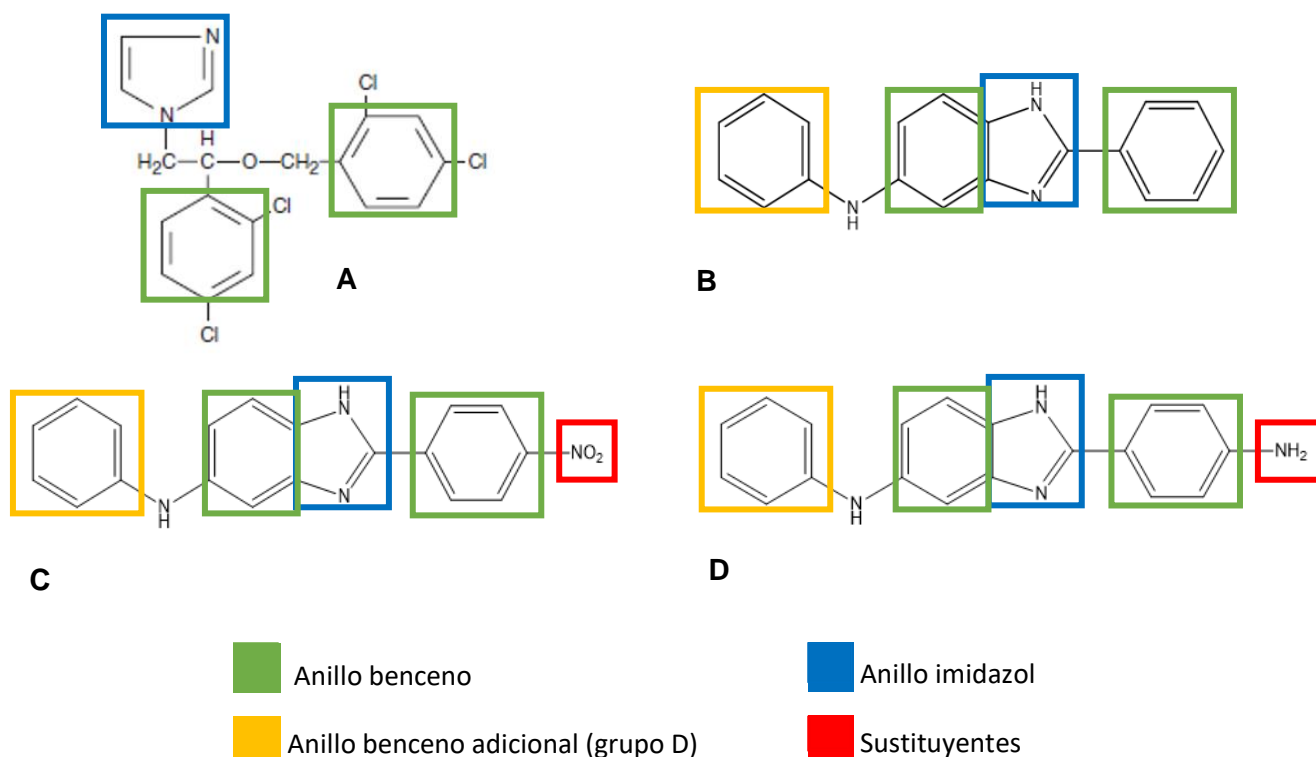
Con respecto al mecanismo de acción de estos compuestos, podemos proponer alguno con base en su estructura, atribuyendo la actividad al anillo que poseen, sugiriendo éste pudiera ser similar al de miconazol. Dentro de la familia de fármacos antifúngicos, el grupo de los azoles y específicamente los derivados imidazólicos, suelen ser los más utilizados; el miconazol se encuentra clasificado dentro de los imidazoles, los cuales poseen dos nitrógenos en el anillo imidazólico, de tal manera que, si nos apegamos a esta característica los compuestos de estudio derivados de benzimidazol podrían clasificarse en el mismo grupo, por tal motivo, al compartir características estructurales, suponemos que el mecanismo de acción es similar.

El mecanismo de acción del miconazol y del grupo de los azoles en general, consiste en el efecto que tienen éstos sobre un componente importante de la membrana del hongo, el ergosterol, el cual es un lípido de la familia de los esteroides que actúa proporcionando fluidez, simetría e integridad; además de contribuir en funciones propias de muchas enzimas, como la quitinsintetasa, la cual es importante para el crecimiento y división de la propia célula. Los derivados imidazólicos inhiben las enzimas oxidativas asociadas al citocromo P450 [CYP 3A4 y CYP 2C9] (lanosterol 14- $\alpha$  desmetilasa), bloqueando la conversión de lanosterol en ergosterol, lo que produce una alteración en la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas, también promueven la acumulación de peróxido de hidrógeno capaz de lesionar la estructura de los organelos intracelulares (López, et al. 2016).

Si el mecanismo de acción propuesto es cierto, la actividad antifúngica en los compuestos D2, D7 y D10 podría deberse a la presencia de un tercer anillo bencénico como facilitador (D2), más la presencia de sustituyentes atrayentes de electrones como el grupo nitro (D7) o sustituyentes que potencialicen la afinidad y faciliten la unión a carbonilos como el grupo amino (D10).



**Figura 32.** Mecanismo de acción de los antifúngicos que actúan en la vía de síntesis del ergolesterol. (Modificada de López, et al., 2016).



**Figura 33.** Comparación de los componentes estructurales de: **A)** Miconazol, **B)** Compuesto D2, **C)** Compuestos D7 y **D)** Compuesto D10.

En cuanto a los compuestos del grupo G, los cuales no derivan de benzimidazol, encontramos que a excepción de G1, todos presentan muy buena actividad antifúngica, inclusive mayor que miconazol; esta actividad fue similar en los compuestos G3, G4, G5, G6 y G7, la cual puede deberse a la principal característica de los ácidos carboxílicos, su acidez, se puede suponer que existió una disociación, lo cual generó carboxilato ( $RCOO^-$ ); los sustituyentes electronegativos presentes en la molécula como el grupo nitro, aumentan la fuerza del ácido a través de su efecto inductivo electroattractor, este efecto inductivo puede ser mayor si están presentes uno o más grupos electroattractores, los cuales se cree se formaron a través de las estructuras resonantes, generándose a la par, la liberación de protones al medio de los grupos electrodonadores (amino) presentes en la molécula, dando como resultado, un medio de crecimiento con condiciones de pH poco óptimas para el desarrollo de *C. albicans*.

Con respecto a este grupo, es difícil vislumbrar un posible mecanismo de acción en relación con sus estructuras, ya que, como se mencionó con anterioridad, todos los compuestos evaluados son considerados nuevos y estos compuestos, a diferencia de los derivados de benzimidazol, no han sido estudiados de manera específica y minuciosa, por

ende la información específica reportada sobre la actividad antifúngica es nula. Sin embargo, al haberse obtenido tan buenos resultados (incluyendo los compuestos D2, D7 y D10 derivados de benzimidazol) es importante resaltar la necesidad de continuar con estudios futuros que busquen obtener información que oriente a la determinación de dosis efectivas, valores y rangos de citotoxicidad, así como la descripción de mecanismos de acción, con la finalidad de determinar la posible introducción de nuevos compuestos de uso clínico.

## 8. CONCLUSIONES

Los compuestos evaluados en el presente estudio fueron en su mayoría derivados del benzimidazol, de los cuales se pudieron determinar cómo los más efectivos a D2, D7 y D10, con halos de inhibición de 38 mm, 41 mm y 36 mm, respectivamente. Con base en esto, se propuso que el mecanismo de acción que pudieran llevar a cabo se encuentra relacionado con su efecto sobre el ergosterol, mediante la inhibición de las enzimas oxidativas lanosterol 14- $\alpha$  desmetilasa, bloqueando así la conversión de lanosterol en ergosterol, lo que produce una alteración en la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas, generando la pérdida de moléculas importantes y/o la acumulación de sustancias tóxicas.

En el caso de los compuestos del grupo G que presentaron muy buena actividad antifúngica, no fue posible proponer un mecanismo de acción, debido a que se carece de reportes y estudios bibliográficos que orienten al mismo.

Se analizaron las estructuras de los compuestos lo que permitió identificar ciertos comportamientos consistentes, como el hecho de presentarse mayor actividad antifúngica al encontrarse sustituyentes electrodonadores (amino) y electroattractores (nitro) en la molécula, en la posición *para*, principalmente. Al realizar la comparación entre grupos de compuestos se identificó que el grupo D es el más sobresaliente dentro de los compuestos derivados del benzimidazol, mientras que del grupo G, los compuestos más sobresalientes son derivados de ésteres de ácidos carboxílicos y de, ácidos carboxílicos.

Finalmente, se determinó que, con base en los resultados favorables que se presentaron, debe considerarse la posibilidad de que estos compuestos sean útiles en el ámbito clínico, sin embargo, esto debe comprobarse y determinarse a través de la realización de ensayos enfocados al descubrimiento y esclarecimiento de toxicidad, citotoxicidad, mecanismos de acción y en general, de todos los procesos farmacológicos involucrados.



## 9. PROSPECTIVAS DEL PROYECTO

Los resultados de este trabajo desatacan la necesidad de profundizar los estudios, no sólo para adelantarse a los cambios evolutivos de este importante patógeno oportunista, sino también, para buscar una solución efectiva frente a la generación de resistencia a los antifúngicos de uso terapéutico.

Se sugiere realizar:

- La determinación de CMI y CMF
- Ensayos para la determinación de sensibilidad a diferentes concentraciones con cepas de aislamiento clínico, testigos negativos y positivos y, cepas de referencia para control de calidad.
- Ensayos de toxicidad y citotoxicidad.

Y en caso de obtenerse buenos resultados de las pruebas anteriores continuar con:

Ensayos de microscopía electrónica y farmacología para profundizar y orientar acerca de un mecanismo de acción, farmacocinética y farmacodinamia.

## 10. REFERENCIAS

1. ALFA AESAR (2018) "Hydrazide" [online] Thermo Fisher Scientific. Consultado el 22 de Junio del 2018 en: <https://www.alfa.com/es/hydrazide/>
2. Arian, S. (2007). Estado actual de los métodos de prueba de susceptibilidad antifúngica. *Micología médica*. 45(7), 569-587.
3. Bansal, Y. y Silakari, O. (2012). The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20, 6209-6213.
4. Barthelemy, C., Cornago, P. y Esteban, S. (2015). *Química heterocíclica*. España: UNED.
5. Bennett, J. y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3). 497-500.
6. Bikandi, J. y Millan, R. (1998). Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes during experimental infections by different *Candida* species. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5. 369-374.
7. Bonifaz, A. (2012). *Micología médica básica*. 4ª Ed. México: McGraw-Hill.
8. Botello, A. (2005). *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (2º ed.) México: Universidad Autónoma de Campeche.
9. Brooks, G., Carroll, K., Butel, J. et al. (2013). *Medical Microbiology*. 26ª Ed. Europa; McGraw-Hill.
10. Cantón, E., Martín, E. y Espinel, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3 y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*. 11-16.
11. Cardozo, E., Pardi, G. y Perrone, M. (2003). Detección de *Candida albicans* en pacientes con Estomatitis sub-protésica, medicados con anfotericina tópica. *Acta Odontológica Venezolana*. 41(3). 188-194.
12. Carillo, A., Brió, S. & Quidós, G. (2001). Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 18. 2-6.
13. Cavalieri, S., Harbeck, R., McCarter, Y. et al. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. Washington: Editora Coordinadora.
14. Dhale, R., Ghorpade, M., Dharmadhikari, C. (2014). Comparison of various methods used detect biofilm production of *Candida* species. *J Clin Diagn Res*. 8(11). 18-20.
15. Forbes, B., Sahm, D. y Weissfeld, A. (2002). *Diagnóstico microbiológico*. 11ª Ed. Philadelphia: Medica Panamericana.

16. Fuentes, M., Hermosilla, G., Alburquenque, C. et al. (2014). Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. *Rev Chilena Infectol.* 31(5). 511-514.
17. Godoy, P. y Leila, P. (2001). Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico albicans ID. *Revista Iberoamericana de Micología.* 18. 197-200.
18. Gómez, C. (2010). Resistencia de levaduras del género *Candida* a fluconazol. Asociación colombiana de infectología, *Revista Infectio.* 14(2). 1-5.
19. Guango, M., Santander, G. y Villamarín, N. (2008). Micosis invasiva. *Medwave.* 8(11). 609-614.
20. Hector, G. (2014) "Azoles" [PDF] Universidad Nacional Autónoma de México Consultado el 23 de Junio del 2018 en: <http://depa.fquim.unam.mx>.
21. Hector, G. (2014) "Diazinas" [PDF] Universidad Nacional Autónoma de México Consultado el 23 de Junio del 2018 en: <http://depa.fquim.unam.mx>.
22. Johnson, A. (2003). The biology of mating in *Candida albicans*. *Nature Reviews Microbiology.* 1. 106-116.
23. Kerns, E. (2008). *Drug-like properties. Concepts, structure, designs and methods: from ADME to toxicity optimization.* USA: Elsevier.
24. Korolkovas, A. y Burckhalter, J. (1983). *Compendio esencial de química farmacéutica.* España: Reverté.
25. Linares, M. (2001). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología.* 11. 1-17.
26. López, K., Dzul, K., Lugo, C. et al. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomed.* 27. 127-136.
27. López, M. y Aline, T. (2004). Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringa; Paraná, Brazil. *Revista Iberoamericana de Micología.* 21. 202-208.
28. 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.
29. Mackenzie, D.W.R. (2004): Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol*, vol. (15). 563-565.
30. Manzano, P., Mendez, L., Hernández, F., et al. (2008). La resistencia a los antifúngicos. un problema emergente en México. *Gac Med Mex.* 144(1). 23-26.
31. McMurry, J. (2012). *Química Orgánica.* 8ª Ed. México: Cengage Learning.
32. Morejón, M. (2014). Indicación de nuevo antimicóticos en pacientes con candidiasis invasiva. *Medisan.* 18 (9). 1-4.

33. Murray, P. y Rosenthal, K. (2002). *Medical Microbiology*. 4ª Ed. St. Louis: Mosby.
34. Naffes, A. y James, J. (2011). *Microbiología médica*. 5ª Ed. New York: McGraw-Hill.
35. Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. 2ª Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.
36. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. Consultada en: <https://www.dof.gob.mx/>
37. Pfaller, M. (2012). Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med*. 125(1). 1-13.
38. Picazo, J. (2000). *Procedimientos en microbiología clínica*. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
39. Potapov, V. y Tatarinchik, S. (1999). *Química Orgánica*. 3ª Ed. Rusia: Mir. Moscú.
40. Quidós, G. (2015). *Micología clínica*. Barcelona, España: Elsevier.
41. Ramanpreet, W, Hedaitullah, M., Syeda-Farha, N., et al. (2011). Benzimidazole derivatives an overview. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. 1(3). 565-574.
42. Rex, J. Welsh, T. y Sobel, J. (2000). Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*. 30. 524-600.
43. Reyes, M., Duarte, E., et al., (2017). Current status of the etiology of candidiasis in México. *Revista Iberoamericana de Micología*. (1), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2017.05.001>.
44. Rippton, J. (2003). *Micología médica: hongos y actinomicetos patógenos*. 3ª Ed. México: McGraw-Hill.
45. Rueda, R. (2002). Micosis superficiales y dermatomicosis. *Colombia Médica*. 33. 10-16.
46. Sánchez, L., Ortiz, N. y Villar, M. (2005). Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing of infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Revista Iberoamericana de Micología*. 22. 83-92.
47. Senet, J. y Oleastro, M.(1997). Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 14. 6-13.
48. Sharma, D., Narasimhan, B., Kumar, P. et al. (2009). Synthesis, antimicrobial and antiviral substituted benzimidazoles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 24(5). 1161-1163.
49. Sturtevant, J. y Claderone, R. (1997). *Candida albicans* adhesions: Biochemical aspects and virulence. *Revista Iberoamericana de Micología*. 14. 90-97.

50. Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (2002). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de bacteriología y virología médica*.
51. Velázquez, B. (2008). *Farmacología básica y clínica*. 18ª Ed. Buenos Aires, Madrid: Médica Panamericana.
52. Whale, K. (2016). *Farmacología*. 6ª Ed. España: WoltersKluwer.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Resultados de identificación por laboratorio "Bio Médicos".



LABORATORIOS BIOMEDICOS

Informe de examen

Editado 03-oct-2016 06:59 CDT

Editado por: Laboratorio

Nombre del paciente:

Nº paciente:

Examen: 1-1

Tipo de tarjeta: YST Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Tipo de tarjeta: AST-YS07 Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Bionúmero: 6502546065327771

<b>Comentarios:</b>	

<b>Información de identificación</b>	<b>Tarjeta:</b> YST	<b>Nº de lote:</b> 243369820	<b>Fecha caduc.:</b> 28-ene-2017 12:00 CST
	<b>Finalizado:</b> 02-oct-2016 14:49 CDT	<b>Estado:</b> Final	<b>Tiempo de análisis:</b> 18.25 horas
<b>Organismo seleccionado</b>	99% Probabilidad <b>Candida albicans</b>		<b>Nivel de confianza:</b> Identificación excelente
<b>Organismo SRF</b>	Bionúmero: 6502546065327771		
<b>Organismos de análisis y pruebas a separar:</b>			
<b>Mensajes análisis:</b>			
<b>Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)</b>			

<b>Información de sensibilidad</b>	<b>Tarjeta:</b> AST-YS07	<b>Nº de lote:</b> 287389420	<b>Fecha caduc.:</b> 12-ago-2017 13:00 CDT		
	<b>Finalizado:</b> 02-oct-2016 10:04 CDT	<b>Estado:</b> Final	<b>Tiempo de análisis:</b> 13.50 horas		
<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>
Fluconazol	<= 1	S	Micafungina	<= 0,06	S
Voriconazol	<= 0,12	S	Anfotericina B	0.5	S
Caspofungina	<= 0,25	S	Flucitosina	<= 1	S

\*= Antibiótico deducido \*\*= AES modificad \*\*= Usuario modificado

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 07.01

Guía de interpretación de CMI: Copia de Global CLSI-based2.1

Guía de interpretación terapéutica: Copia de NATURAL

RESISTANCE

Nombre de juego de parámetros de AES: Copia de Global CLSI-based-Natural Resistance 2015

Última modificación de

Tel. 01 800 7153510 . www.biomedicos.com.mx, info@biomedicos.com.mx

parámetros de AES: 25-ago-2016 10:41 CDT

Página 1 de 2

Nombre del paciente:  
 Examen: 1-1

N° paciente:

Tipo de tarjeta: YST Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)  
 Tipo de tarjeta: AST-Y507 Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Bionúmero: 6502546085327771

<b>Conclusiones de AES:</b>		Última modificación: 25-ago-2016 10:41 CDT	<b>Juego de parámetros:</b> Copia de Global CLSI-based-Natural Resistance 2015
<b>Nivel de confianza:</b>	No ha realizado el análisis		

## **Anexo 2. Preparación de disoluciones de cada compuesto orgánico en estudio.**

- Pesar 80 mg de cada uno de los compuestos en balanza analítica.
- Colocar los 80 mg de compuesto en tubos ependorf, es importante rotular cada uno.
- Con ayuda de una micropipeta y de puntas estériles, adicionar a cada tubo ependorf 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO).
- Someter cada uno de los tubos a agitación con ayuda del vortex, buscando disolver lo mayormente posible.
- En caso de no presentarse una disolución adecuada, colocar los tubos en el sonicador a una temperatura de 30°C.
- Resguardar las soluciones.

## **Anexo 3. Preparación de discos de papel whatman.**

- Cortar discos de papel whatman No 5 de 6 mm de diámetro.
- Colocar los discos en un recipiente de tapón de rosca y cerrar.
- Una vez sellados están listos para ser esterilizados en autoclave.

## **Anexo 4. Preparación de medios cultivo para resiembra, materiales y equipos.**

- El medio de cultivo caldo Dextrosa Sabouraud, será preparado siguiendo las indicaciones del fabricante.
- Adicionar a tubos de vidrio con tapa de rosca 10 ml de SSF. Se deben preparar los tubos según se consideren son necesarios. Dejar la tapa de rosca entre abierta para proceder a esterilizar en autoclave.
- Envolver las cajas de puntas que sean necesarias con papel periódico, una vez selladas están listas para ser esterilizadas en autoclave.
- Una vez listo todo el material incluyendo los discos de papel whatman mencionados en el punto anterior introducirlo en la autoclave y ejecutar el proceso de esterilización durante 15 minutos a 121 lb de presión.
- Posterior a la esterilización se deben someter a pruebas de esterilidad los medios de cultivo y la SSF, el resto del material debe resguardarse en un área que impida su contaminación.

## **Anexo 5. Preparación de placas MHA adicionada GAM.**

- Preparar el medio de cultivo siguiendo las indicaciones del fabricante.
- Seguir la metodología M4-A2 para la adición del 2% de glucosa y 5 µg/ml de azul de metileno.



- Esterilizar las placas obtenidas.
- Dejar enfriar las cajas.
- Someter a prueba de esterilidad incubando por 24 horas a 37°C.
- En caso de no emplearse el día posterior a su preparación mantenerlas en refrigeración a 4°C selladas con papel parafilm.

#### **Anexo 6. Impregnación de los discos de papel whatman previamente esterilizados.**

- Trabajar en campana de flujo.
- Colocar en cajas petri de vidrio (previamente esterilizadas) discos de papel whatman muy bien distribuidos, la cantidad de discos debe cubrir la realización de las pruebas por triplicado.
- Con ayuda de una micropipeta, colocar 10 µl de cada una de las soluciones de los compuestos a cada disco, cuidando colocarlo justo en el centro.
- Una vez impregnados los discos correspondientes con cada uno de los compuestos de prueba, sellar las cajas petri y dejar secar.
- Preparar los discos correspondientes al testigo negativo, impregnándolos con DMSO. Sellar las cajas petri y dejar secar.
- Una vez secos los discos, éstos están listos para su uso.

#### **Anexo 7. Montaje de la prueba de Difusión en placa.**

- Preparación de la suspensión de microorganismos:
- Tomar una asada de las colonias sembradas del microorganismo y sumergirla en 5 ml de caldo SDA.
- Realizar los movimientos giratorios (técnica de inóculo pesado).
- Incubar el tubo en agitación a 37°C por 48 horas.
- Ajustar la densidad del inóculo de acuerdo con el tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland con SSF, en espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm.
- Inoculación del microorganismo:
- A partir del inóculo con una concentración de  $1 - 5 \times 10^8$  UFC/ml, realizar con un hisopo estéril un sembrado masivo sobre las placas de agar MH.
- Con ayuda de una aguja estéril, colocar los sensidiscos impregnados de la muestra de los compuestos (3 por compuesto + un testigo negativo). Procurar dejar a menos 1.5 cm de distancia entre cada sensidisco y el borde de la caja.
- Permitir que el sensidisco se adhiera a la placa de agar, teniendo precaución de evitar desplazamientos de los discos.
- Incubar a 37°C por 48 horas, realizando una revisión breve a las 24 horas.

- Posterior a la incubación con ayuda de un Vernier, medir el diámetro de los halos de inhibición.
- La presencia de un halo de inhibición es indicativa de actividad antifúngica y se reportará el diámetro de los halos de inhibición en mm.
- La ausencia de halo de inhibición indicará que no existe actividad antifúngica.
- Manejo de residuos: Inactivar las cepas, posteriormente desecharlas en bolsa roja e incinerarlas. Una vez empleado el material que haya estado en contacto con el microorganismo será necesario eliminarlo en un contenedor especial para su posterior inactivación, esterilización o incinerado, según los recursos del laboratorio.