

17  
2 ej°



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

DISEÑO DE FARMACOS, SINTESIS Y  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA.  
ANÁLISIS Y EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE  
PRODUCTOS OBTENIDOS DE *Parmelia flavention.*

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

MARIA GUADALUPE FUENTES HURTADO

ASESORES: M.C. STELLA REGINENSI RIVERA  
M.C. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO



V N A M

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



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

D. N. A. M.  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de  
 Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de Servicio Social: Diseño de Fármacos, síntesis y actividad biológica. Análisis y Evaluación Antimicrobiana de productos obtenidos de *Parmelia flaventior*.

que presenta la pasante: María Guadalupe Fuentes Hurtado.  
 con número de cuenta: 8857169-8 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga.

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

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de marzo de 1995

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez.  
 VOCAL O.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera.  
 SECRETARIO M. en C. Stella' Maria Reginensi Rivera.  
 1er. SUPLENTE M. en C. Susana E. Mendoza Elvira.  
 2do. SUPLENTE M. en C. Sofía González Gallardo.

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A DIOS

Por haberme permitido llegar a una de mis metas.

A mis padres : SOFIA y SALVADOR.

Por darme la vida, su tiempo, su ayuda, apoyo incondicional, su comprensión; por compartir conmigo triunfos, alegrías, derrotas y tristezas. Por que gracias a ustedes he podido realizar una de mis metas y logros.

Dios los bendiga.

A mi pequeño PEDRO IVAN

A este lindo y tierno ser que forma parte de mi vida y es mi motivo para seguir adelante. Gracias por los desvelos, por la alegría de tus sonrisas, por tu ternura y bella inocencia. Que Dios te bendiga.

TE AMO

A PEDRO ENRIQUE.

Gracias por tu comprensión, tu ayuda incondicional, tu amor, y compañía.

TE AMO.

A mis hermanos y mi prima.

FELIPE, PABLO, DIANA, MARTHA y CITLALLI.

Gracias por su compañía, cariño, ayuda, por su tiempo y espacio que compartimos. Los Quiero.

Con cariño a mis sobrinas LAURA ASTRID y SARA PAOLA

A mi abuela y tíos:

CLEOTILDE, SOCORRO, VICENTE y SECUNDINO.

Por sus consejos y ayuda. Gracias.

**A LLANETH, MARGARITA y MARIA ELENA.**

Comparto con ustedes uno de mis logros y objetivos que alguna vez nos propusimos al inicio de nuestra carrera. Gracias a Dios de que cuento con ustedes y con su valiosa amistad, por que a través del tiempo se ha enriquecido y fortalecido.

**A mis amigos y compañeros:**

**ANA LAURA, GABRIELA, LETICIA A. LETICIA N. QUETA, RAUL, ARTURO y ANTONIO R.**

Gracias por su gran y valiosa amistad y por tener la dicha de conocerlos.

Siempre contarán conmigo.

**Maestra STELLA**

Gracias por su invaluable ayuda, por su apoyo, consejos y su valiosa amistad.

**Maestra MARIA EUGENIA.**

Por su confianza en mí para la realización de este trabajo, por sus consejos y ayuda.  
Gracias.

**Maestro ENRIQUE.**

Por el tiempo que a mí dedico, por paciencia, consejos y apoyo continuo.  
Gracias.

**A todos los Profesores de la FES CUAUTITLAN**

Por su tiempo, enseñanzas y consejos.  
Gracias.

**Y a todos aquellos que de alguna manera intervinieron en la realización de este trabajo mi sincero agradecimiento.**

De manera muy especial se agradece también a la DGAPA por el apoyo brindado a este trabajo, realizado bajo el proyecto IN-300293 y por CRAY RESEARCH INC. PROYECT SC003195

## INDICE

- 1.- Resumen
- 2.- Introducción
- 3.- Generalidades
- 4.- Objetivos
  - 4.1. Objetivo General
  - 4-2. Objetivos Particulares
  - 4-3. Objetivo Académico
  - 4.4. Objetivo Social
- 5.- Cuadro Metodológico
  - 5.1. Estudio Químico Estudio Microbiológico
    - 5.2.1. Técnicas
      - 5.3.1.1. Prueba de Susceptibilidad por el método de dilución en agar
      - 5.3.1.2. Prueba de Susceptibilidad por el método de Bauer y Kirby
- 6.- Resultados, Evaluación y Análisis
  - 6.1. Estudio Químico
  - 6.2. Estudio Microbiológico
- 7.- Equipo, Material y Reactivos
- 8.- Conclusiones
- 9.- Calendarización
- 10.- Recomendaciones y Sugerencias
11. Apéndice 1
- 12.- Apéndice 2
- 13.- Bibliografía



## ANALISIS Y EVALUACION ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS OBTENIDOS DE *Parmelia flaventior*

### RESUMEN

Los líquenes son entidades formados por la asociación de algas y hongos. Estos sintetizan un gran número de metabolitos secundarios de tipo fenólico y alifático, algunos de ellos tienen propiedades antibióticas, interpretándose que las sustancias liquénicas fenólicas son responsables de la actividad antimicrobiana. De esta manera el objetivo de este trabajo, es presentar los resultados del aislamiento, caracterización química y actividad antimicrobiana de un producto natural aislado de *Parmelia flaventior*. El líquen se recolectó en la Sierra de Guadalupe, Las Cabañas, Tepozotlán Estado de México en enero de 1994, fue sometido a una extracción con acetona en tres ocasiones, las tres muestras se juntaron y se eliminó el solvente por destilación a presión reducida. El sólido obtenido fue purificado por columna en sílica gel, que a su vez se recrystalizó con acetona y se caracterizó por métodos espectroscópicos tradicionales como son Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, Infrarrojo, y Espectrometría de Masas. Una vez caracterizado el producto como *Acido Lecarónico* se procedió a realizar las pruebas de actividad biológica, como son el método de Difusión (Bauer-Kirby) y Dilución en caja (CMI). Los resultados para esta última técnica indican que la concentración de 128 µg/ml, fue efectiva para las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y 6538, *Streptococcus pyogenes* β hemolítico (B), *Bacillus subtilis* y *Vibrio cholerae* (Inaba); mostrando resistencia a todas las CMI estudiadas: *Escherichia coli* ATCC25922, *Vibrio cholerae* (Ogawa), y *Salmonella typhi*. En cuanto a la técnica de difusión en caja se encontró que las cepas Gram (+) presentaron mayor sensibilidad al *Acido Lecarónico* que las Gram (-), esto concuerda con la literatura de referencia.

## INTRODUCCIÓN

Los Productos Naturales son compuestos orgánicos que se clasifican como metabolitos secundarios y que se encuentran distribuidos en forma específica tanto en reino animal, vegetal y mineral.

Dentro del reino vegetal tenemos a los líquenes que son algas y hongos que se encuentran en simbiosis integrados fisiológicamente y obligatoriamente. Esta asociación es saprofita con la hifa micótica y algas de vida libre con una incrementada dependencia ecológica de el ficobionte autótrofo sobre el micobionte heterótrofo. Los líquenes constituyen un grupo biológico de "organismos" en el cual los hongos involucrados pertenecen a de varios *phylum* y estan representados por tres subdivisiones; *Ascomicetos*, *Basidiomicetos*, y *Deuteromicetos*. Las algas de los líquenes también pertenecen a cuatro subdivisiones que son: *Cyanofita*, *Chlorofita*, *Phaeofita*, y *Xantofita*.<sup>(12-15)</sup>

Los líquenes sintetizan un gran número de metabolitos secundarios fenólicos y alifáticos, siendo los más característicos los dépsidos, las depsídonas las cuales derivan de las *p*-depsídes y los derivados dibenzofuranos, incluyendo el ácido úsnico y el ácido picrolíquénico<sup>(19)</sup> Casi todos los compuestos son extracelulares cuyos cristales son insolubles en agua, y se encuentran depositados en la superficie de las hifas.<sup>(2-3)</sup>

Los productos intracelulares que sintetizan los líquenes estan en el margen de las paredes celulares y el protoplasma. Algunos de los productos son sintetizados por el hongo y otros por el alga. Los líquenes y otras plantas similares contienen aminoácidos esenciales,<sup>(4)</sup> como son; Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptófano y Valina. Otros aminoácidos reportados son la Alanina, el ácido  $\beta$  aminobutírico, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico, Arginina, Asparagina, Acido Aspártico, Acido Cisteico, Citrulina, Acido Glutámico, Glicina, Ornitina, Prolina, Sarcosina, Serina y

Tirosina, siendo el Acido Glutámico un producto predominantemente sintetizado por el alga.<sup>(5,6)</sup> Los Polisacáridos, monosacáridos y otros carbohidratos de bajo peso molecular solubles en agua o etanol son abundantes en líquenes y pueden constituir de 3-5% del peso seco de los tallos. Muchos son comunes en el reino vegetal como son el arbutol, fructosa, D-manitol, ribitol, sucrosa, y  $\alpha$ -trealosa, pero un gran número de éstos están restringidos a líquenes, como: el sipolitol, umbilicina, volemitol y varios glucanos. En trabajos con cultivos micobióticos sugieren que una gran cantidad de estos son sintetizados por los hongos.<sup>(7)</sup> Se han determinado carotenoides como son el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina y mutatoxantina, producidos algunos exclusivamente por el alga o por el hongo, su concentración en los tallos es de 1.5 a 24 g en peso seco. También un gran número de vitaminas, se han identificado en tallos de líquenes, aunque en concentraciones bajas en comparación con plantas altas, sin embargo se han reportado vitaminas como el ácido ascórbico, biotina y otras vitaminas del grupo B<sub>12</sub>, ergosterol, ácidos fólico y folínico, niacina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, riboflavina, tiamina, timidina y  $\alpha$ -tocaferol, casi todos presumiblemente sintetizados por las algas, ya que la porción fúngica es una fuente pobre de vitaminas.<sup>(4)</sup>

## GENERALIDADES

Las sustancias líquénicas tienen propiedades antibióticas, de tal modo que los líquenes pueden presentar resistencia a bacterias y hongos patógenos en la naturaleza.<sup>(8)</sup> Los líquenes han sido usados en medicina desde tiempos remotos por las antiguas civilizaciones China y Egipto. Varias especies de líquenes han sido reportadas por ser efectivas en el tratamiento de tos, úlceras, hemorragias y rabia. Es conocido desde el siglo pasado que extractos de líquenes tenían una fuerte actividad antibiótica, interpretándose que las sustancias líquénicas fenólicas eran responsables de la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Bacillus subtilis*.<sup>(1)</sup> Un ejemplo interesante es la inhibición de crecimiento de el virus del mosaico del Tabaco por varios extractos de líquenes y principalmente por los Ácidos Lecarónico, Psorómico y Usnico.<sup>(4)</sup>

Muchas de las sustancias extraídas de líquenes resultan ser antibióticos y son insolubles en agua, siendo utilizadas de esta manera para su uso terapéutico.<sup>(25)</sup> Los compuestos fenólicos son bactericidas o bacteriostáticos dependiendo de la concentración a la que se usen.<sup>(27)</sup> La biosíntesis de las sustancias de líquenes es seguida por tres rutas principales, donde Culberson ha discutido en detalle las posibles etapas, especialmente el mecanismo de *orto*-metilación. El mismo autor ha publicado un exhaustivo sumario químico de sustancias de líquenes, que bien pueden ser clasificadas en base a su ruta biosintética como se describe a continuación :<sup>(4)</sup>

1.- La ruta por el acetato-polimalonato donde se obtienen las típicas sustancias antraquinonas, depsidas, depsidonas y ácidos grasos.

2.- El ácido mevalónico que conduce a la formación de terpenoides y esteroides.

3.- El ácido Shikímico ruta por la cual se originan pigmentos amarillos.

## 1 Ruta Acetato-polimalonato

A) Acidos alifáticos y ésteres

B) Alcanos

C) Derivados Acidos fenólicos carboxílicos

1. Derivados monocíclicos

2. Diaryl, triaryl, y tetraaryl ésteres

(a). Derivados del Orcinol

(i) Para depsides, tridepsides, tetradepsides

(ii) Meta-depsides

(iii) Bencilésteres

(iv) Depsidones

(b) Derivados del  $\beta$ -Orcinol

(i) Para-depsides

(ii) Meta-depsides

(iii) Benzil ésteres

(iv) Depsidones

3. Diaryl ésteres, 5,5'-di-C1 sustituidos  $\beta$ -orcinol para-depsides

4. Dibenzofuranos

5. Acidos Usnicos y productos relacionados

6. Cromones

7. Xantonas

8. Antraquinonas

9. Naftoquinonas

## 2 Ruta del Acido Mevalónico

A) Esteroles

B) Diterpenos

C) Sesterpenos

D) Triterpenos

**3 Ruta del Acido Shikímico**

A) Terfenilquinonas

B) Derivados del Acido Pulvínico

I. Ruta Acetato- polimalonato

A) Acidos alifáticos y ésteres

Acido Acarónico

Acido Bourgeánico

Acido Caperático

Acido Liquesterfínico

Acido Nefrosterfínico

(+)-Acido Protoliquesterfínico

Acido Rangifórmico

Acido Roccélico

Acido Tetrahidroxiheneicosanico

B) Alcanos

n-Heptadecanos

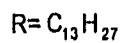
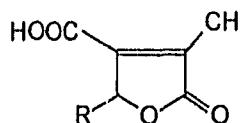
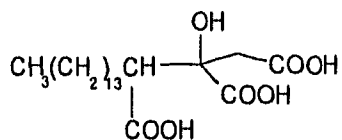
C20- C30 n Alcanos

C) Derivados Acido fenil carboxílicos

I. Derivados monocíclicos

Metil orselinato

Acido Orselínico



## 2. Diaryl, triaryl y tetraaryl ésteres

*para*-Depsides, tridepsides, tetradepsides

Acido Anziaico

Aftosin

Acido Artoniaico

Acido Diploschistesico

Acido Divaricático

Erytrin

Acido Evernóico

Acido Gloméico

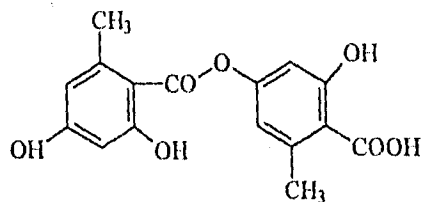
Acido Glomeliférico

Acido Gyrofórico

Acido Hiascico

Acido Imbricári

Acido Lecarónico



Acido Loxodélico

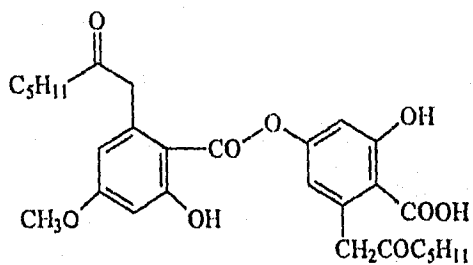
Acido 2'-O-Metilanziaic

Metilgíroforato

Acido 4'-O-Metilgírofórico

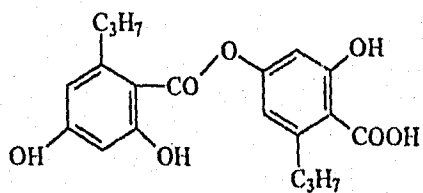
Acido 2-O-Metilperlatorico

Acido Microfilínico



Acido Miriquídico

Acido Nordivaricático



Acido Norobtusático

Acido Obtusático

Acido Olivetórico

Orcinyl Lecaronato



Acido Perlatólico  
Acido Planaíco  
Schaeroforino  
Tenuiorino  
Acido Umbilicárico

(ii) *meta*-Depsides

Acido Bonínico  
Acido Criptoclorofaéico  
Acido Homosekikaico  
Acido Merochlorofaéico  
Metil 3,5-diclorolecaronato  
Acido 2-O-Metilsekikaico  
Acido Paludósico

(iii) Depsidones

Acido Alectorónico  
Acido Colensoinico  
Acido  $\alpha$  Collatólico  
Diploicin  
Gangaleoidin  
Acido Grayánico  
Acido Livídico  
Acido Lobárico  
Acido Metoxycolensóinico  
Acido 2'-O-Metilfisódico  
Noriobaridona

Acido Fisódico

Acido Variolárico

(iv) Depsona

Acido Picrolíquénico

(b).-  $\beta$ -Orcinol

(i) *para*-Depsides

Atranorín

Acido Baeomycésico

Acido Barbático

Cloroatranorín

Acido 4-O-Dimetilbarbático

Acido Diffractáico

Acido 3- $\alpha$ -Hidroxybarbático

Acido Norobtusático

Acido Obtusático

Acido Squamático

(ii) *meta*-Depsides

Acido Decarboxytamnólico

Acido Hypotamnólico

Acido Tamnólico

(iii) Benzil ésteres

Acido Alectoríalico

Acido Barbatólico

(iv) Depsidones

Acido Conorstfctico

Acido Constfctico

Acido 4-O-Dimetilnotático

Acido Fumarprotocetrárico

Acido Galbínico

Acido Hipoprotocetrárico

Acido Hipostfctico

Acido Malonprotocetrárico

Acido 2-O-Metilpsororómico

Acido Norstfctico

Acido Notático

Pannarin

Acido Fisodálico

Acido Protocetrárico

Acido Psorómico

Acido Salazínico

Acido Stictico

Vicanlín

Acido Virénslico

(3).- Diaril ésteres, 5,5'-di-C1-substituidos  $\beta$ -orcínoles para depsides

Fenarctín

(4).-Dibenzofuranos

Acido Didímico

Acido Pannárico

Acido Porfirflico

## Strepsilin

Los dibenzofuranos son reactivos de color obtenidos también exclusivamente de lloques. Estos pueden ser considerados derivados de difenil y difenil eter. El ácido Didmico y el Strepsilin son característicos de Cladonia. Algunos de estos compuestos tienen actividad antibiótica.

### (5).- *Acidos Usnico y productos relacionados*

(+) - Acido Isoúsnico

(-) - Acido Isoúsnico

2-O-Metifloroacetofenone

Acido Placodiolico

(+) - Acido Usnico

(-) - Acido Usnico

El ácido Usnico es una sustancia amarilla , cuya aplicación comercial es la de ser un antibiótico.

### (6).- *Cromones*

Acido Leprárico

Roccellin

Sifulin

### (7).- *Xantonas*

Artotelin

Lliquexantona

Acido Tiofánico

### (8).- *Antraquinonas*

Emodin

Endocrocin

Fallacinal

Parietin  
Acido Parietnico  
Acido Secalónico A  
Skyrin rodofiscin  
Acido Solorinco  
Teloschistin Fallocinol  
Xantorin

Cerca de 40 antraquinonas se han aislado de líquenes. Todas ellas son pigmentos amarillos y anarajados rojizos, algunos se encuentran en hongos de vida libre.

(9).- Naftoquinonas

Acido Chiodectonico  
Haemoventosin  
Acido Rodocladónico

2 Ruta del Acido Mevalónico

A) Esteroles

Ergosterol  
 $\beta$ -Sitosterol

B) Diterpenoides

-- 16  $\alpha$ -Hidroxi kaurano

C) Sesterterpenoides

Acido Retigeránico

D) Triterpenoides

6  $\alpha$ -Acetoxi-7  $\alpha$ -,22dihydroxi hopan

Acido Leucotilico  
Leucotylin  
Acido Ursólico

Zeorin

Cerca de 60 diferentes triterpenoides pentacíclicos han sido identificados en líquenes.

### 3 Ruta del Acido Shikímico

#### A) Terfenilquinonas

Acido Polipórico

Acido Telefórico

#### B) Derivados del Acido Púlvínico

Calicin

Epanorin

Acido Lepránico

Acido Lepránico metil eter

Acido Pinástrico

Acido Púlvínico

Dilactone Púlvínico

Acido Rhizocárpico

Acido Vulpínico

## PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.

El término antibiótico se utiliza para designar a aquellas presentaciones que contienen cantidades significativas de sustancias químicas producidas por fermentación microbiana o por síntesis, las cuales en soluciones diluídas presentan la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos.

La determinación de la potencia de un antibiótico, sólo puede realizarse a través de la medida del efecto que produce en la inhibición del desarrollo microbiano, este es un valor relativo al estándar de referencia empleado y puede ser expresado en unidades o microgramos. Para el análisis de antibióticos se utilizan principalmente métodos de susceptibilidad.<sup>(36)</sup>

A fines de la década de 1950 las determinaciones de susceptibilidad a los antimicrobianos en los laboratorios de microbiología de todo el mundo se enfrentaban a una problemática, por la falta de un método estándar aceptable. Los errores más comunes que afectaban el desarrollo metodológico se debían a que: las concentraciones de los discos variaban considerablemente, se empleaba una diversidad de medios, las técnicas de inoculación diferían de un laboratorio a otro, así como los tiempos de incubación, y los resultados eran interpretados mediante diversos métodos. Con el objeto de investigar este problema, se formó un comité de la Organización Mundial de la Salud cuyas deliberaciones proporcionaron los principios fundamentales que condujeron al desarrollo de las técnicas estándares de Anderson primero y más tarde por Bauer-Kirby.<sup>(20)</sup>

La prueba de susceptibilidad está indicada para cualquier organismo que contribuya a un proceso infeccioso que precise de quimioterapia. Estas pruebas de susceptibilidad son comúnmente utilizadas cuando se piensa que los organismos causales pertenecen a especies que son capaces de exhibir resistencia a los antimicrobianos, por ejemplo, *Staphylococcus* y las que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*.<sup>(33)</sup>

### **Prueba de Susceptibilidad por el Método de Anderson.**

Esta técnica permitió la estandarización de la metodología de investigación en el análisis microbiológico.

Los diversos pasos estandarizados que se han incorporado a la técnica de Bauer-Kirby fueron desarrollados primero por Anderson y se resumen a continuación:

- 1.- Estandarización de los discos con antibiótico. Se utiliza un sólo disco con antibiótico en concentración conocida.
- 2.- Estandarización del medio de cultivo. El medio basal es agar soya tripticaseína.
- 3.- Estandarización del inóculo para de una concentración de aproximadamente de  $10^8$  organismos.
- 4.- Estandarización del tiempo de incubación. El tiempo óptimo para la difusión del antibiótico en el agar y la reacción con los microorganismos en desarrollo es de 18 horas.
- 5.- Medida del diámetro de los halos de inhibición. Los diámetros de las zonas de inhibición desarrollados alrededor de cada disco se miden cuidadosamente con vernier o regla.<sup>(20)</sup>

### **Métodos de Difusión.**

Se considera el agar de Mueller-Hinton el mejor medio para las pruebas rutinarias de susceptibilidad, mostrando:

- (1) reproducibilidad de lote-a-lote, para los ensayos de susceptibilidad,
- (2) un crecimiento satisfactorio para la mayoría de los patógenos

### **Método alternativo de la capa de agar.**

El método alternativo de la capa de agar para la inoculación de las placas para la prueba de difusión en disco se utiliza con bacterias patógenas comunmente aisladas,



que crecen rápidamente, tales como *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>(33)</sup>

En la técnica de difusión un principio activo contenido en el extracto de una planta puede ser probado colocándolo en contacto con un medio inoculado y luego de la incubación, se mide diámetro del halo de inhibición. Se deben cuidar las condiciones de temperatura así como el tiempo de incubación del sistema inoculado, ya que se pueden obtener zonas de inhibición incrementadas o bien disminuidas.<sup>(35)</sup>

### **Método por perforación en el agar.**

Esta técnica de difusión permite probar suspensiones acuosas extraídas de plantas y es el más recomendado. En este método la presencia de partículas suspendidas existentes dentro de la muestra probada no interfiere con la difusión de la sustancia antimicrobiana dentro del agar. La ventaja de éste es utilizar pequeñas cantidades de muestra haciendo posible la prueba con cinco o seis compuestos por placa contra un mismo microorganismo.<sup>(35)</sup>

### **Método de Cilindro Placa.**

La determinación de la potencia de un antibiótico por este método, consiste en colocar en cajas petri estériles una capa de 21 ml de medio base de agar nutritivo sobre la cual se vierte una segunda capa de agar que contiene la suspensión de inóculo bacteriano preparado por la cosecha de un cultivo reciente y estandarizado a la cantidad de microorganismos que permita medir con exactitud (generalmente 25% de Transmitancia a 530 nm). Para lograr una adecuada difusión del antibiótico en la capa de agar es indispensable que esta sea homogénea.

El medio que contiene el inóculo debe de encontrarse a una temperatura no mayor de 45°C a fin de evitar la destrucción de los microorganismos adicionándose con rapidez para evitar que gelifique. Sobre el agar solidificado deben colocarse en círculo con un

radio de separación de 2.8 cm seis penicilindros de acero dentro de los cuales se adicionan volúmenes iguales de cada de las cinco diluciones del antibiótico estándar y de la solución problema en forma alternada, por triplicado.

Las cajas se tapan y se incuban a la temperatura óptima para el desarrollo de los microorganismos durante 16 a 18 hr., se retiran los penicilindros y se miden con exactitud los halos de inhibición con un vernier. Se traza una curva estándar en papel semilogarítmico colocando los valores de concentración del estándar sobre el eje de las ordenadas y en las abscisas la medida de los halos de inhibición en mm. La actividad de la muestra se obtiene por la extrapolación en la curva, multiplicando por el factor de dilución de la muestra.<sup>(36)</sup>

### **Métodos de Dilución.**

En los métodos de dilución, las muestras de antibióticos existentes son mezcladas convenientemente con el agar que previamente se inocularon con algún microorganismo de prueba, luego de la incubación, el crecimiento de los microorganismos puede ser determinado macroscópicamente por comparación turbidimétrica con un control. Usualmente una serie de diluciones de una muestra original en el medio de cultivo es realizada e inoculada con el microorganismo de prueba. La interpretación de los resultados se realiza en la máxima dilución que no presentó crecimiento del organismo de prueba. Estos métodos son los mejores para ensayar compuestos solubles en agua o lipofílicos y determinar su CMI, las cuales se pueden correr tanto en medio líquido como sólido. Sólo el método de dilución en agar sólido, es conveniente para probar extractos de plantas no estériles, porque organismos aerobios no o se desarrollan debajo del agar solidificado. Los extractos no polares, aceites esenciales, suspensiones de sólidos o emulsiones y sustancias antimicrobianas, que no difunden a través del medio de agar, pueden ser probados directamente por la incorporación de estos en el agar como si fueran soluciones

acuosas. En una misma dilución varios microorganismos pueden ser probados simultáneamente, lo cual hace que el método de dilución en agar sea muy rápido y económico.

Algunas investigaciones han utilizado la inoculación por punteado múltiple de los sistemas (vertedor Steers). Con este método pueden ser inoculados hasta 25 diferentes microorganismos en una placa con agar de diámetro de 9 cm.

Tomando en cuenta todas las propiedades mencionadas, el método de dilución parece ser el más conveniente método de rutina para probar complejas muestras tales como extractos de plantas. Este método es muy utilizado para guiar el aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de extractos de plantas.<sup>(35)</sup>

### **Turbidimetría :**

Es una prueba cuantitativa, la cual se utiliza para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un agente antimicrobiano que se requiere para inhibir un microorganismo. No está influenciada por el rango de crecimiento del microorganismo; también se recomienda no ser usada para pruebas directas del material clínico por la probabilidad de contaminación que existe.<sup>(34)</sup>

### **Prueba de susceptibilidad por dilución en caldo.**

Esta prueba consta de una serie de 10 tubos que contienen caldo nutritivo, a los que se les añade una cantidad de antibiótico, diluido seriadamente de 100 mg/ml a 0.4 mg/ml. La CMI se considera como la concentración de antibiótico contenida en el primer tubo de la serie que inhibe el desarrollo visible.<sup>(20)</sup>

### **Microtécnica de dilución en caldo.**

La microtécnica de dilución tiene el mismo principio que el método de dilución en caldo ya descrito anteriormente, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos se determina por una serie de microtubos o microhoyos moldeados en una placa plástica. Cada placa puede contener 80, 96 o más concavidades, según el número de hileras horizontales y verticales. Esto permite el estudio de 10 o más antibióticos diferentes, con cada uno de los cuales se pueden obtener desde 8 diluciones seriadas al doble.<sup>(20)</sup>

**Métodos Bioautográficos.** Bioautografía, como método para localizar actividad antibacteriana en un cromatograma, fue extendida su aplicación en la búsqueda de nuevos antibióticos a partir de microorganismos. Los problemas debidos a la difusión diferencial de los compuestos de un cromatograma a una placa de agar son simplificados y detectados por bioautografía en una cromatografía de capa. Este método, sin embargo, requiere más complejo equipo microbiológico, y en contraste con otros métodos, este es fácilmente afectado por la posible contaminación de bacterias presentes en el aire.<sup>(35)</sup>

### **Objetivo General**

Estudiar las posibilidades de uso como antimicrobianos de metabolitos secundarios obtenidos de líquenes.

### **Objetivos Particulares**

- 1.- Obtener los productos metabólicos del líquen mediante técnicas químicas, y lograr su identificación y caracterización por medio de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo y Espectrometría de Masas.
- 2.- Evaluar el efecto bactericida y/o bacteristático de los productos obtenidos del líquen contra algunas bacterias patógenas para humanos mediante el método de difusión en caja.
- 3.- Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del producto para las diferentes bacterias utilizadas en el estudio.

### **Objetivo Académico**

Investigación sobre la obtención de nuevos compuestos de origen natural con propiedades terapéuticas.

### **Objetivo Social**

La posible utilización de estos productos en la Industria Farmacéutica para su aplicación terapéutica en la clínica como agentes antimicrobianos, contribuyendo a la Medicina Tradicional.

## CUADRO METODOLÓGICO

### Estudio Químico

La pureza de los productos y el desarrollo de las reacciones se siguió por medio de cromatoplasmas de sílica gel (DC-Alufolien Kieselgel 60); utilizándose como reveladores sulfato cérico al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, vapores de yodo y luz ultra violeta.

Las cromatografías en columna se realizaron con gel de sílice de tamaño de partícula de 0.2-0.5 milímetros (35-70 mallas), utilizando como eluyente diferentes proporciones de *n*-hexano-acetato de etilo.

Los productos de reacción fueron caracterizados por métodos espectroscópicos comunes. Los espectros de masas (EM-IE) se determinaron en un espectrómetro Hewlett Packard 5985 -B a 70 eV., los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-H<sup>1</sup>) se registraron en un aparato Varian FT-80 a 200 MHz, los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están dados en partes por millón y los patrones de acoplamiento se indican como: s= señal simple y m= señal múltiple, los espectros de infrarrojo se adquirieron en un aparato Perkin Elmer 283 y Nicolet FT 55K.

El espécimen fue recolectado en La Sierra de Guadalupe, Las Cabañas, Tepoztlán Estado de México en enero de 1994 y clasificado botánicamente por Biol. Ma. de los Angeles Herrera, investigadora del Instituto de Biología de la UNAM, ( Voucher MEXU-EA).

El líquen fue sometido a extracción con acetona en tres ocasiones, las tres muestras se juntaron y de eliminó el disolvente por destilación a presión reducida, utilizando un rotavapor. El resultado de esta operación produjo un sólido que fue purificado por columna en sílica gel utilizando una mezcla de Hexano-Acetato de Etilo, obteniéndose un sólido blanco, que a su vez fue recristalizado de acetona ( 1% pf.180 °C ) y que caracterizado como *Acido Lecarónico*, por los métodos espectroscópicos tradicionales, con Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, Infrarrojo, y Espectrometría de Masas.<sup>(38)</sup>

## Estudio Microbiológico

A partir del producto obtenido y caracterizado como *Acido Lecarónico*, se realizaron pruebas de solubilidad del mismo en diferentes disolventes tanto orgánicos como inorgánicos, como son acetona, alcohol etílico, metílico, isopropílico y buffer de diferentes sales como son citratos, boratos, carbonatos, fosfatos. Lo anterior se realizó con la finalidad de encontrar un disolvente que permitiera la mejor solubilidad del producto en los discos de papel filtro, así como evitar en lo posible que éste dañara la estructura celular. El disolvente orgánico mas adecuado fue la acetona, así como un buffer de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} + \text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  a  $\text{pH} = 8.0$ , el cual disuelve en forma parcial al compuesto, permitiendo la formación de una suspensión.

Para la prueba de susceptibilidad de dilución en caja se realizó según la técnica descrita en Ericsson.<sup>(21,31)</sup>

El medio de elección para evaluar las pruebas de susceptibilidad en caja fue el agar Mueller-Hinton, al cual se le realizó control de calidad con diferentes cepas de ensayo y discos con Antibióticos comerciales, los resultados concordaron con los descritos por la OMS en el Manual de Medios de cultivo. Los halos de inhibición se compararon con los obtenidos con antibióticos comerciales como la Penicilina, Eritromicina, Tetraciclina, etc. (Merck pp 127)<sup>(28)</sup>

Para la identificación de las cepas bacterianas en estudio se realizaron las Pruebas Bioquímicas siguientes: Gram, Catalasa, Oxidasa, Oxidación/Fermentación, Citratos, Coagulasa, Indol, Rojo de Metilo, Motilidad, Nitratos, Fermentación de Glucosa y Manitol.<sup>(20,22 y 37)</sup>

## PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR.

### *Preparación de las diluciones.*

Diluciones logarítmicas ( log 2) o dobles se usan normalmente para determinar las CMI, las escalas de dilución deben incluir una concentración de 1 µg / ml o 1 UI / ml.

Para lo cual se parte de 20 mg del compuesto puro que son disueltos en 1 ml de acetona, una vez obtenida la solución se agregan 2 ml de buffer  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} + \text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  a pH= 8.0, obteniendo un volumen de 3 ml, los cuales son agregados a un tubo que contiene 7 ml de agua estéril y destilada, esta solución resultante es la base para realizar las diluciones logarítmicas para poder calcular las CIM de acuerdo a la técnica descrita en las citas (21 y 32). De esta manera se obtienen las concentraciones siguientes a evaluar:

128 µg / ml

64 µg / ml

32 µg / ml

16 µg / ml

Para bacterias aerobias y anaerobias facultativas de crecimiento rápido se favorece en el agar Mueller-Hinton( M-H). Para el trabajo de referencia se añade un volumen de cada dilución de antimicrobiano a cada nueve volúmenes de agar 1:10, se toman 0.5 ml de cada dilución los que son agregados a 4.5 ml de agar Mueller-Hinton estéril preparado en el momento y dejando enfriar a 40°C aproximadamente de manera que esta temperatura permita eliminar la acetona que aún este presente de de la dilución original, así como permitir vaciar en cajas Petri de 60 mm x 15 mm. y no desnaturalizar el producto a evaluar ( cada prueba se hace por triplicado).



### **Preparación del inóculo**

En esta etapa se cuenta con bacterias ATCC, perfectamente tipificadas, de las siguientes cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus faecalis* ATCC 29213, así como cepas obtenidas por aislamientos patológicos como son *Streptococcus pyogenes*  $\beta$ -hemolítico del grupo B, *Vibrio cholerae* serotipo O1 especies inaba y ogawa, y *Bacillus subtilis*.

Para la preparación del inóculo se toman 4 o 5 colonias pequeñas, representativas de los microorganismos a probar, se inoculan en 5 ml de caldo de soya tripticaseína incubando a 200 rpm a 37 °C de 2 a 3 horas, y se lee la concentración por Nefelometría por la técnica de MacFarlan, dando una concentración de  $5 \times 10^8$  UFC/ml para *Enterobacteriaceae*.

### **Inoculación del medio**

Una vez solidificadas las cajas, la superficie de agar que contienen las diluciones de antimicrobianos y la placa control se inoculan por punteado con una micropipeta sin extender, 1 a 2 ml, cada punto equivale  $10^4$  UFC, de 5 a 8 mm de diámetro. Haciendo de 5 a 6 inóculos en cada caja.<sup>(22)</sup>

### **Incubación**

Las placas de agar inoculadas se dejan enfriar hasta que las gotas de inóculo se absorban completamente y luego se incuban a 37° C durante 16 a 24 horas, e interpretándose posteriormente la CMI.<sup>(21)</sup>

## PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD POR EL MÉTODO DE BAUER Y KIRBY O DIFUSIÓN EN CAJA.

Nos basamos en la utilización de sensidiscos de papel con antibiótico, el cual se difunde en dirección lateral en la superficie del agar inoculado. Se seleccionó como medio de cultivo estándar el agar Mueller-Hinton.

El medio en la placa debe alcanzar un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antimicrobianos tienden a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición, un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo. Con un hisopo estéril se tocaron las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante y se sumerge el hisopo en 3 ml de caldo soya tripiticaselna. Se incubó el cultivo a 200 rpm a 37° C durante aproximadamente 2 a 3 horas, hasta que la turbidez del medio fue equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland con una concentración bacteriana de aproximadamente de  $1 \text{ ó } 2 \times 10^8$  UFC/ ml. Se inoculó con un hisopo la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton, tratando de mantener la tapa entreabierto cerca del mechero para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Se cubrió uniformemente toda la superficie de la placa, para lo cual se estrió con el hisopo por lo menos en tres direcciones, dando vuelta a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estria. Una vez seco el inóculo, se colocaron los discos con antibiótico sobre la superficie del agar.<sup>(31,32)</sup>

### **Discos**

La concentración de antibiótico en el disco debe ser suficientemente grande como para producir una difusión homogénea y fácilmente reproducible.

Los discos de papel filtro y con 0.6 cm de diámetro son impregnados con con 25µl de la solución stock, cuya concentración es de 1.786 µg / 25 µl. Entre cada aplicación del

compuesto se deja secar perfectamente cada disco. Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan a incubar a 37°C x 18 a 20 horas. Después de este lapso de incubación, aparecen las zonas de inhibición al rededor de los discos que contienen el antibiótico. Los diámetros de estas zonas se deben medir cuidadosamente por la parte posterior de la placa, utilizando una fuente de luz brillante, y con un vernier.

En cada caja se utilizó un disco control con acetona para evaluar si podría existir un efecto inhibitorio en el crecimiento de cada cepa.<sup>(20)</sup>

## RESULTADOS, EVALUACION Y ANALISIS

### Estudio Químico

#### ESPECTROSCOPIA

El espectro de absorción de Infrarrojo (espectro 1) muestra lo siguiente: ( $\nu_{\max}$  en  $\text{cm}^{-1}$ ) banda en 3500-2500 debida al enlace O-H tanto del alcohol, como al ácido carboxílico, banda en 3030  $\text{C}_{\text{sp}2}$  H, 2980  $\text{C}_{\text{sp}3}$  H, banda en 1625 debida al enlace carbonílico. El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (espectro 2) ( Deuterocloroformo, TMS como ref interna ), muestra en ppm una señal simple en 12.15 que integra para un protón y es asignada al H del ácido carboxílico, dos señales simples en 10.65 y 9.80 que integran para un H c/u asignadas a los OH fenólicos e, estas tres últimas señales desaparecen al intercambiar con  $\text{D}_2\text{O}$ , en 6.6 un grupo de señales que integran para 2H asignadas a lo H del anillo aromático B, señal simple en 6.3 que integra para 2H asignadas a los H del anillo aromático A y finalmente 2 señales simples 2.4 que integran para 6 H asignadas a los dos grupos metilo del compuesto. En RMN de Carbono 13, (espectro 3) observamos las señales asignadas al grupo carbonilo en 173 y 169, las señales de los carbonos de los anillos aromáticos se pueden agrupar entre 100 y 166 ppm y finalmente las señales debidas a los dos grupos metilo en 24 y 23 ppm. En espectrometría de masas  $m/z$  (espectro 4) [(% abundancia relativa)] por impacto electrónico podemos observar el ion molecular en 318, que corresponde al peso molecular de la muestra problema, así como al pico base en 122.<sup>(38)</sup>

Debido a estas características y al hecho que el punto de fusión corresponde al reportado en la literatura, se considera que está plenamente caracterizado el producto natural, por lo que se procedió a realizar las pruebas de actividad biológica del producto identificado como *Acido Lecarónico*.

### Estudio Microbiológico

Los resultados de las Pruebas Bioquímicas realizadas se detallan en la Tabla 4.

Para la prueba de susceptibilidad en disco se utilizaron 50mg del compuesto puro, ya que para dicha prueba se trabajaron cantidades menores (10,20 y 30mg) de compuesto no encontrándose los resultados de inhibición con éstas, por lo que se trabajó con 50mg encontrándose los resultados que se mencionan a continuación en la Tabla1 los resultados obtenidos se compararon con los reportados en las tablas (A,A1,A3 y A6) en el Anexo 2.

**TABLA 1** Resultados del Método de Difusión en Caja.

CEPA BACTERIANA	HALO DE INHIBICION (mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	27
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12
<i>Vibrio cholerae</i> (inaba)	15
<i>Vibrio cholerae</i> (ogawa)	13
<i>S. pyogenes</i> $\beta$ hemolítico (B)	26
<i>Streptococcus faecalis</i>	15
<i>Salmonella typhi</i>	0

Los mayores diámetros de inhibición se observaron en las bacterias Gram (+) mostrando mayor sensibilidad al *Acido Lecarónico*. Mientras que las bacterias Gram (-) presentaron diferentes grados de susceptibilidad, la mayor eficacia del producto natural como antibiótico fue en *E. coli* y las dos cepas de *Vibrio cholerae* O1, por otro lado la cepa de *Salmonella typhi* presentó resistencia al producto.<sup>(29,30)</sup>

En la Tabla 2 se muestran los resultados del método de dilución en caja, donde se observa la resistencia por *Salmonella typhi*, *E.coli* ATCC 25922 y *Vibrio cholerae* (ogawa) las diferentes concentraciones utilizadas para calcular la CMI, siendo para los demás casos probados la concentración de 128 ug /ml en la que presentan sensibilidad la mayoría de las cepas en estudio.

**TABLA 2** Resultados del Método de Dilución en Caja.

CEPA BACTERIANA	UFC/ml (inoculo)	Sensibilidad
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	$1 \times 10^8$	(+)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$5 \times 10^8$	(+)
<i>S. pyogenes</i> $\beta$ hemolítico (B)	$1 \times 10^8$	(+)
<i>Vibrio cholerae</i> (inaba)	$5 \times 10^6$	(+)
<i>Bacillus subtilis</i>	$1 \times 10^8$	(+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$2.4 \times 10^9$	(-)
<i>Vibrio cholerae</i> (ogawa)	$5 \times 10^8$	(-)
<i>Salmonella typhi</i>	$1 \times 10^8$	(-)

(-) = Resistente

(+) = Sensible a 128  $\mu$ g /ml

UFC= Unidad Formadora de Colonias

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Vibrio cholerae* serotipo 01 especie ogawa, en presencia del *Acido Lecarónico*, disminuyeron su cuenta viable (UFC/ ml) en las concentraciones probadas (hasta 512 $\mu$ g/ml), por lo tanto no se calculó las CMI en este trabajo, sugiriéndose en estudios posteriores evaluar concentraciones mayores en caja, así como las cinéticas de crecimiento en medio líquido en presencia del producto natural.

En la Tabla 3 se muestra que el *Acido Lecarónico* para el caso de *Vibrio cholerae* (*ogawa*), presenta un halo de inhibición superior al desarrollado por discos con Penicilina (10µg), y para *Vibrio cholerae* (*inaba*) el halo de inhibición es mayor al presentado por la Gentamicina (10µg), en tanto que para *E. Coli* ATCC 25922 el halo de inhibición es menor en comparación a todos los antibióticos probados. En *Bacillus subtilis* el halo de inhibición es muy cercano al presentado por la Tetraciclina, mientras que para el *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 el halo de inhibición fue para el *Acido Lecarónico* mayor al resto de los antibióticos probados. <sup>(29,30)</sup>

**TABLA 3** Comparación de halos de inhibición del *Acido Lecarónico* y diferentes antibióticos

Halos de inhibición mm.

Cepas bacterianas	Pe (10µg)	E (10µg)	Cl (10µg)	Ge (10µg)	Te (10µg)	Ak (10µg)	Λ. Lec.
<i>V. cholerae</i> ogawa	10	25	39	19	24	-	13
<i>V. cholerae</i> inaba	-	-	30	12	24	17	15
Staph. aureus ATCC 6538	-	20	18	15	18	18	27
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	14	20	20	20	-	12

Pe = Penicilina, E= Eritromicina, Cl= Cloranfenicol, Ge= Gentamicina, Te=Tetraciclina, Ak= Amikacina.

Los resultados indican que las bacterias Gram (+) presentan una mayor susceptibilidad al *Acido Lecarónico*, mientras que las bacterias Gram (-) muestran resistencia a este.

**Tabla 4**

**Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las diferentes cepas en estudio.** (20,22,37)

BACTERIAS	GRAM	CATALASA	OXIDASA	OXIDACION / FERMENTACION	CITRATOS	COAGULASA	INDOL	ROJO DE METILO	MOTILIDAD	NITRATOS	FERMETACION DE GLUCOSA	FERMETACION DE MANITOL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+	-	F	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+	-	F	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>St. faecalis</i>	+	-	-	F	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>St. pyogenes</i> b hemolitico gpo. B	+	-	-	F	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	F	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio cholerae</i> (inaba)	-	+	+	F	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio cholerae</i> (ogawa)	-	+	+	F	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	O	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	-	F	+	-	-	+	-	+	+	+

(+) = Positivo.

(-) = Negativo.

(O) = Oxidativa.

(F) = Fermentativa.



## Equipo, Material y Reactivos

Equipo	Marca comercial.
Autoclave	Presto
Balanza analítica	Sauter
Balanza granataria	Harvard trip OHAUS
Espectrofotómetro	Spectronic 20 Bausch Lomb
Agitador incubadora	New Brunswick Scientific
Estufa	Riossa

Material	Marca comercial
Agitador	Super-Mixer
Refrigerador	Kelvinator
Cajas petri 60 mm x 15 mm.	Pyrex, Kimax
Cajas petri 120mm x 30mm	Pyrex, Kimax
Matraces erlenmeyer de 250 ml.	Pyrex, Kimax
Matraces erlenmeyer de 500 ml.	Pyrex, Kimax
Pipetas graduadas de 1 y 5 ml.	Pyrex, Kimax
Tubos de ensaye	Pyrex
Probeta de 500 ml	Pyrex
Pinzas de disección	
Asa bacteriológica	
Mecheros Busner	
Papel filtro	Whatman
Micropipeta de 5 $\mu$ l	Tri-Continent Scientific.
Hisópos estériles	

Reactivos	Marca comercial
Agar Mueller- Hinton	Bioxon
Agar Nutritivo	Bioxon
Caldo soya tripticaseina	Bioxon
Acetona grado químico	Baker-Analyzed
NaHPO <sub>4</sub>	Baker-Analyzed
NaHCO <sub>3</sub>	Baker-Analyzed
Fenol al 7%	Baker-Analyzed
Alcohol etílico	Baker-Analyzed
Agua destilada	
Unidiscos de diferentes antibióticos ( Penicilina, Gentamicina, Eritromicina, Cloranfenicol, Tetraciclina y Amikacina. )	
Cepas bacterianas obtenidas tanto como de colección como por aislamientos patológicos residentes	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y 6538	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
<i>Vibrio cholerae</i> serotipo O1 especies ogawa e inaba	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i> β hemolítico (grupo B)	
<i>Streptococcus faecalis</i>	
<i>Salmonella typhi</i>	

## CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos son importantes y pueden ser utilizados como referencia del efecto del *Acido Lecarónico*, como sustancia antimicrobiana en diferentes cepas bacterianas.
- La concentración mínima inhibitoria en el 65% de los casos fue de 128  $\mu\text{g/ ml}$ , mientras que el resto de las cepas probadas mostraron resistencia hasta 512  $\mu\text{g/ ml}$ . Por lo anterior se sugiere que para trabajos futuros para calcular la Concentración Mínima Inhibitoria se parta de la concentración ya citada.
- Dado a los antecedentes citados del uso de líquenes como antibióticos y los resultados obtenidos en este trabajo de investigación muestra la posibilidad del líquen *Parmelia flaventior*, como tratamiento alternativo contra infecciones bacterianas y muy específicamente contra bacterias Gram (+) ya que estas resultan más sensibles al producto natural.

## CALENDARIZACION

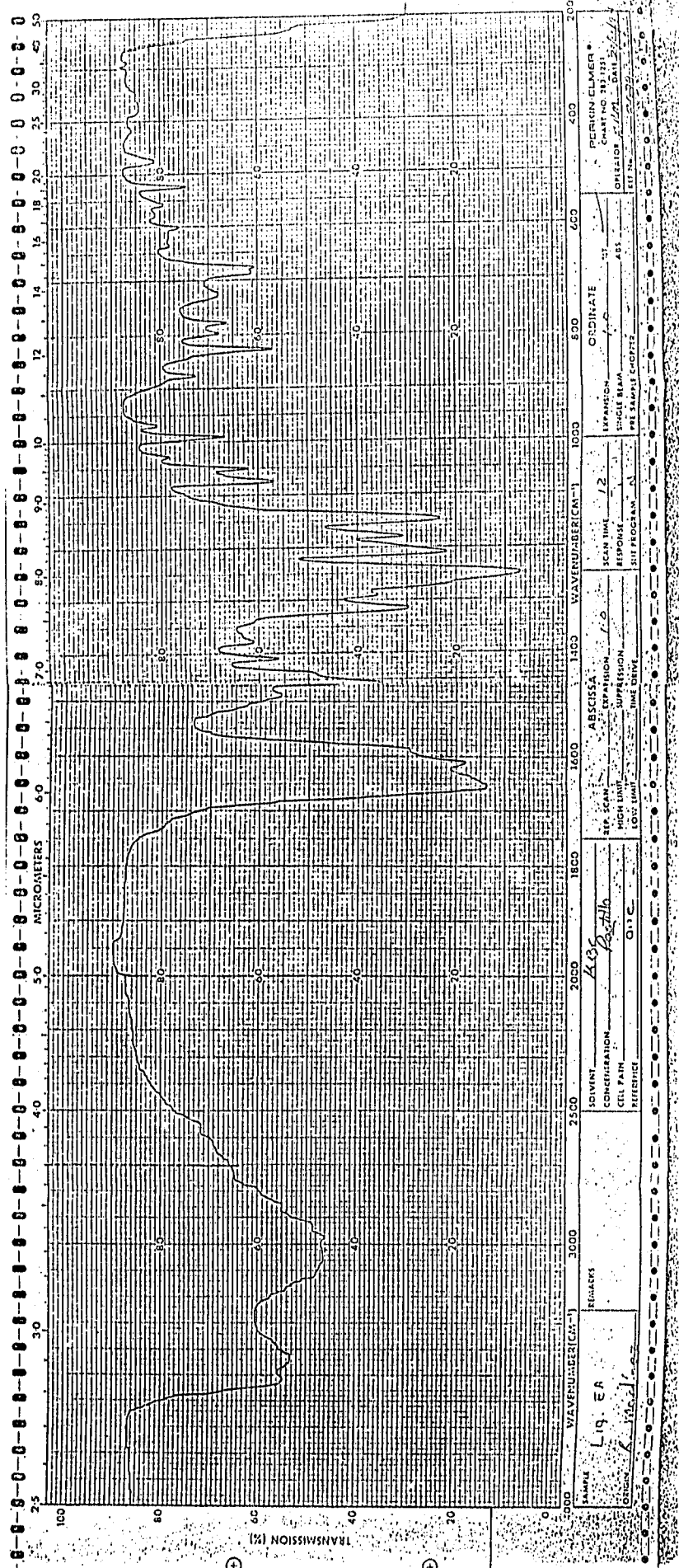
(1994)

ACTIVIDAD	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sep	Oct
Investigación hemerográfica	X							
Identificación del tiquen	X							
Purificación y extracción		X						
Estudios de solubilidad		X						
Obtención de cepas e identificación por pruebas bioquímicas			X	X				
Método de difusión a diferentes concentraciones				X	X	X		
Método de dilución					X	X	X	
Análisis de resultados							X	X

### ***Recomendaciones y sugerencias***

- En el Plan de Estudios de la carrera de Q.F.B. no existe una asignatura que cubra los conocimientos de Espectroscopía, por lo cual se sugiere que los alumnos que retomen el tema o alguno similar se capaciten en este tipo de cursos para la caracterización de sustancias de origen natural o sintético.
- Las cepas que se utilizaron en este trabajo son patógenas para humanos, por lo cual se recomienda probar el efecto del *Acido Lecarónico* en bacterias de interés veterinario
- Los estudios "in-vitro" indican la posibilidad del uso del *Acido Lecarónico* "in-vivo", lo cual será complementado en estudios posteriores con los resultados del efecto toxicológico en animales.

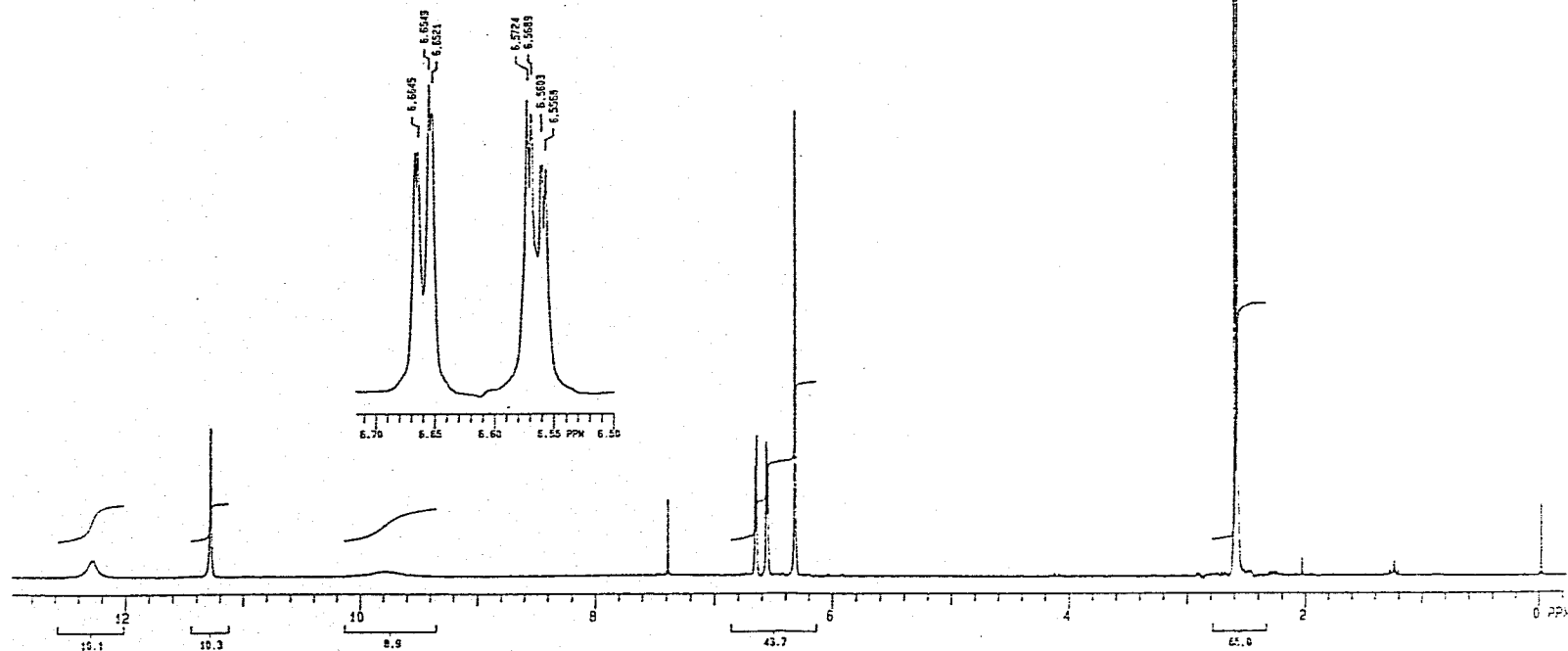
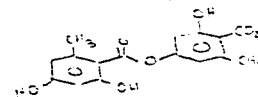
ANEXO I



PERCIN ELMER # CHART NO 381131 OPERATOR <i>W.M.</i> DATE <i>1/27</i> SET NO. <i>10</i>		ORDINATE EXPANSION _____ SINGLE BEAM _____ PRE SAMPLE CORRECT _____ ASS _____	
ABSORPTION SUPPRESSION _____ TIME DRIVE _____		SCAN TIME <i>12</i> RESPONSE _____ SHT PROGRAM _____	
WAVELENGTH (CM⁻¹) 1800 1600 1400 1200 1000 800 600 400 300		WAVELENGTH (CM⁻¹) 1800 1600 1400 1200 1000 800 600 400 300	
SOLVENT _____ CONCENTRATION _____ CELL PATH _____ REFERENCE _____		ABCISSA EXPANSION <i>1.5</i> SUPPRESSION _____ TIME DRIVE _____	
HIGH LIMIT _____ LOW LIMIT _____		WAVELENGTH (CM⁻¹) 2000 1800 1600 1400 1200 1000 800 600 400 300	
REMARKS LIQ. EA 100% 100%		WAVELENGTH (CM⁻¹) 3000 2500 2000 1800 1600 1400 1200 1000 800 600 400 300	

Espectro (1) de Infrarrojo.

D<sup>o</sup>. R. MARTINEZ. LTR.EA. ASC  
U.N.A.M. INSTITUTO DE QUIMICA



Espectro (2) Resonancia Magnetica Nuclear de H<sup>1</sup>

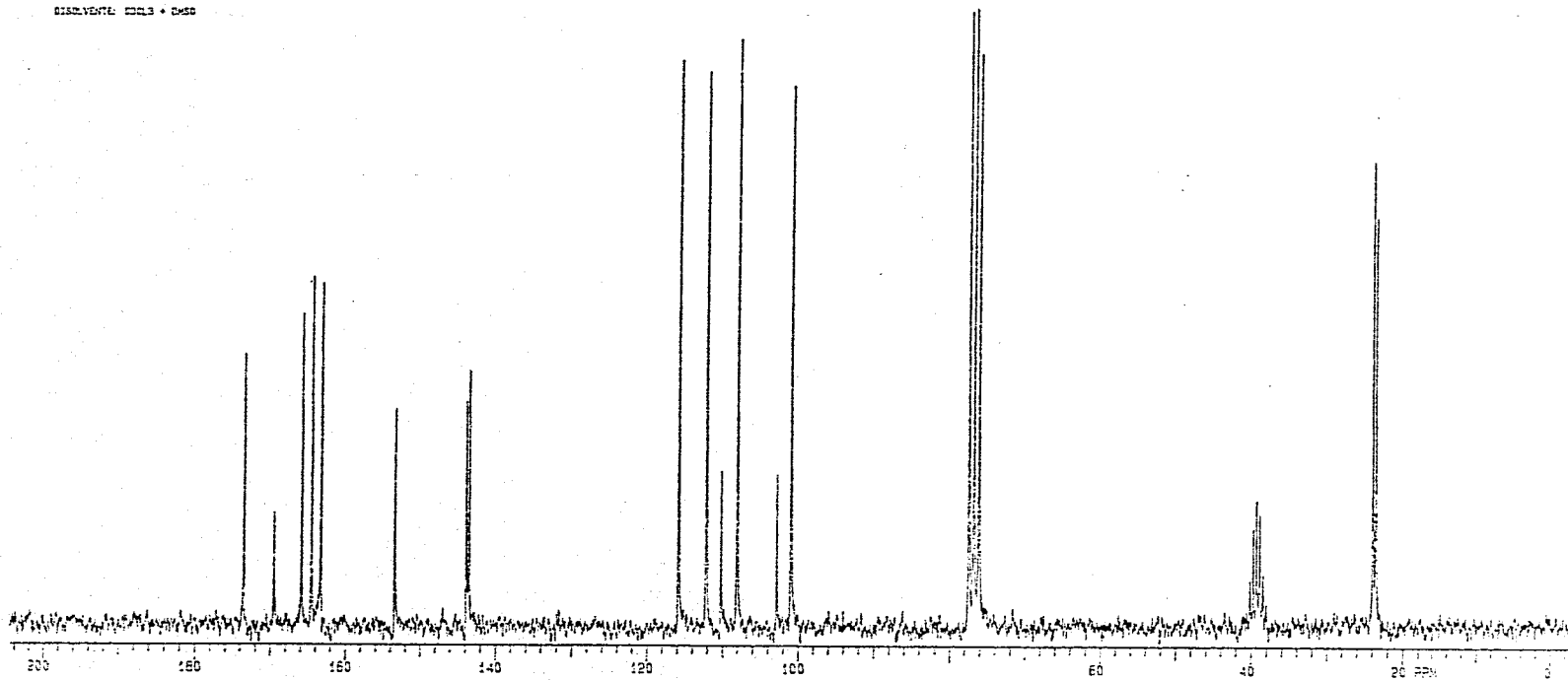
100%



DR. R. MARTINEZ, LJO. EA. 480

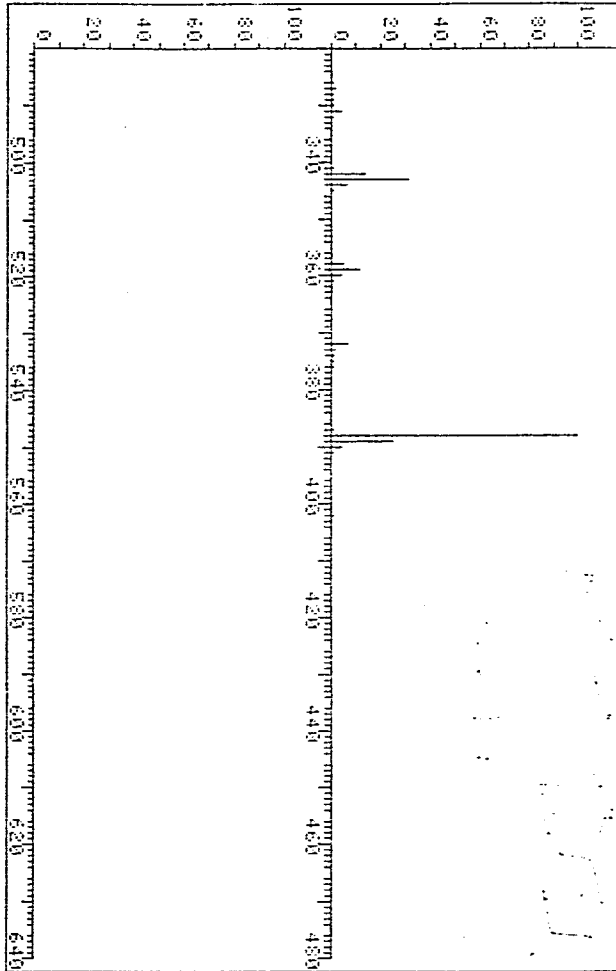
U.N.A.M. INSTITUTO DE QUIMICA

DISOLVENTE: CDCl<sub>3</sub> + DMSO

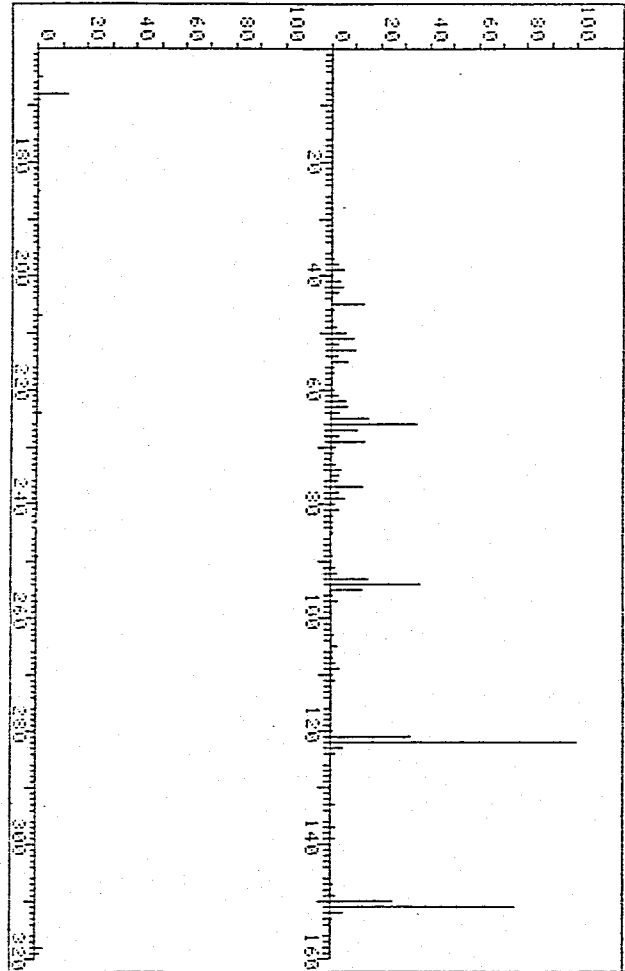


Espectro (3) Resonancia Mágnetica Nuclear de C<sup>13</sup>

FEN 3039 SPECTRUM 32 RETENTION TIME 2.2  
 LRGEST 4: 389.1, 100.0 296.1, 82.2 214.0, 69.2 207.0, 56.9  
 LHST 4: 389.0, 24.7 300.0, 4.2 291.0, 1.5 402.2, 1.3  
 PAGE 2 V = 11.00

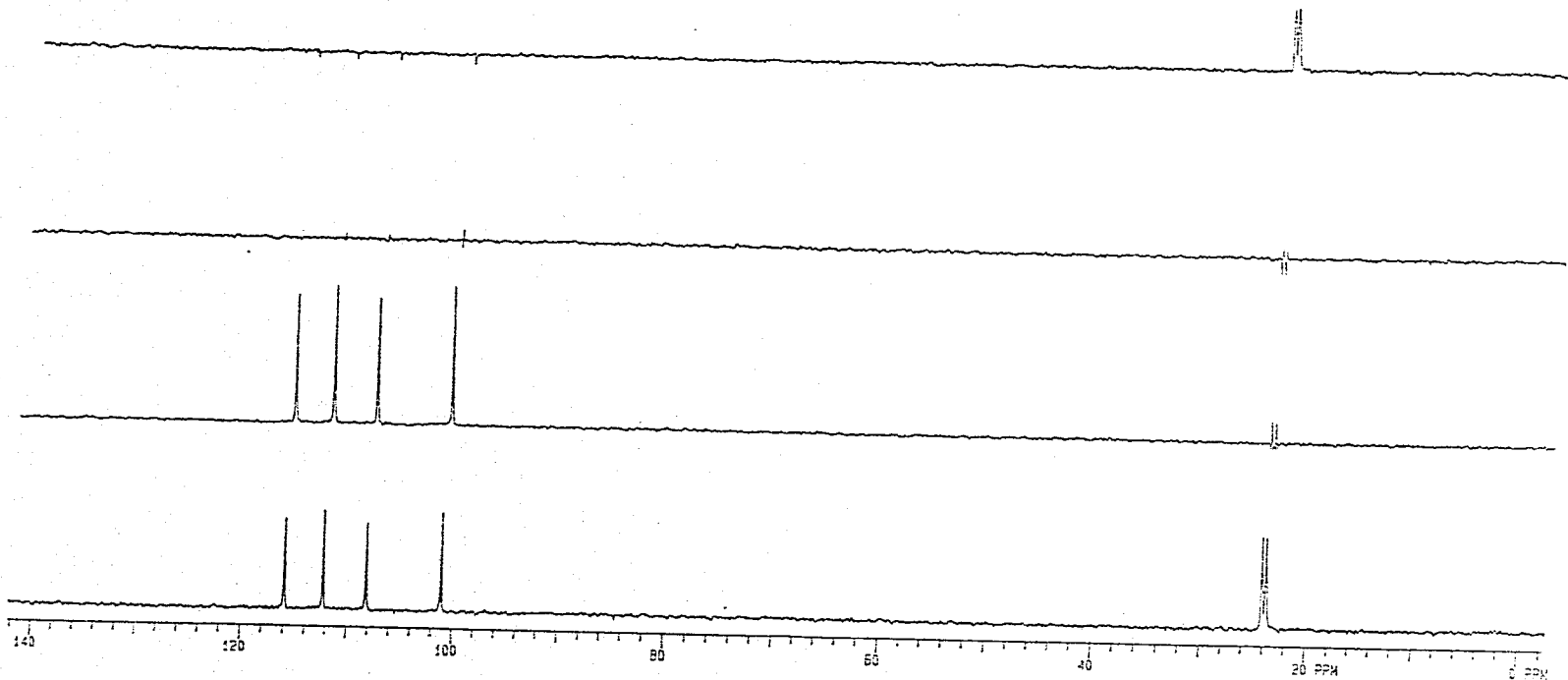


FEN 3040 SPECTRUM 10 RETENTION TIME 1.8  
 LRGEST 4: 122.0, 100.0 151.0, 74.7 94.1, 36.5 66.1, 35.0  
 LHST 4: 255.1, .9 257.1, .7 318.1, 3.4 319.0, 1.2  
 PAGE 1 V = 1.00



Espectrometría de Masas (4)

DR. R. MARTINEZ, S.R.L. S.A. ASD  
S.N.A.M. INSTITUTO DE QUIMICA



Espectro (5) APT de  $\text{C}^{13}$

**ANEXO 2**

Tabla A1 Zona interpretativa de diámetro estandar para *Streptococcus*

Agente Antimicrobiano	Contenido de disco	Halos de inhibición en (mm)			Susceptible
		Resistente	Intermedio	Susceptibilidad moderada	
Ampicilina	10 (µg)	< 21		22 - 29	≥ 30
Cefotaxime	30 (µg)	≤ 14		15 - 22	≥ 23
Cefalotina	30 (µg)	≤ 14		15 - 17	≥ 18
Cloramfenicol	30 (µg)	≤ 12	13 - 17		≥ 18
Clindamicina	2 (µg)	≤ 14	15 - 20		≥ 18
Eritronicina	15 (µg)	≤ 13	14 - 30		≥ 21
Oloxacina	5 (µg)	≤ 12		13 - 15	≥ 16
Penicilina G	10 U	≤ 19		20 - 27	≥ 18
Tetraciclina	30 (µg)	≤ 14	15 - 18		≥ 19
Vancomicina	30 (µg)	≤ 9	10 - 11		≥ 12

Tabla A3 CMI estándar Interpretativa para miembros de la familia *Enterobacteraceae* y rangos para *Escherichia coli* ATCC 25922.

Agente Antimicrobiano	Susceptible	CMI (µg / ml)			<i>E. coli</i> ATCC 25922
		Susceptibilidad moderada	Intermedia	Resistente	
Amikacina	≤ 16		32	≥ 64	0.5 - 4
Amoxicilina	≤ 8/4	16 / 8		≥ 32 / 16	2 / 1 - 8 / 4
Ampicilina	≤ 8	16		≥ 32	2 - 8
Cefuroxime	≤ 4	8 - 16		≥ 32	2 - 8
Cefalotin	≤ 8	16		≥ 32	4 - 16
Cloramfenicol	≤ 8		16	≥ 32	2 - 8
Gentamicina	≤ 4		8	≥ 16	0.25 - 1
Kanamicina	≤ 16		32	≥ 64	1 - 4
Netilmicina	≤ 8		16	≥ 32	≤ 0.5 - 1
Piperacilina	≤ 16	32 - 64		≥ 128	1 - 4
Tetraciclina	≤ 4		8	≥ 16	1 - 4
Trimetoprima - sulfametoxazol	≤ 2			≥ 4	≤ 0.5 - 1

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla A6 CIM estándar interpretativa para *staphylococci* y rangos para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Agente	CIM ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )			Resistente	S. aureus ATCC 29213
	Susceptible	Susceptibilidad moderada	Intermedia		
Antimicrobiano					
Amoxicilín	$\leq 4 / 2$			$\geq 8 / 4$	
Ampicilina	$\leq 0.25$			$\geq 0.5$	0.25 - 1
Cefazolin	$\leq 8$	16		$\geq 32$	0.25 - 1
Cefotaxime	$\leq 8$	16 - 32		$\geq 64$	1 - 4
Cefalotín	$\leq 8$	16		$\geq 32$	0.1 - 0.5
Cloramfenicol	$\leq 8$		16	$\geq 32$	2 - 8
Ciprofloxacina	$\leq 1$	2		$\geq 4$	0.1 - 0.5
Clindamicina	$\leq 0.5$		1 - 2	$\geq 4$	0.01 - 0.25
Eritromicina	$\leq 0.5$		1 - 4	$\geq 8$	0.12 - 0.5
Gentamicina	$\leq 4$		8	$\geq 16$	0.12 - 1
Meticilina	$\leq 8$			$\geq 16$	0.5 - 2
Ofloxacina	$\leq 2$	4		$\geq 8$	0.12 - 1
Oxacilina	$\leq 2$			$\geq 4$	0.12 - 5
Penicilina G	$\leq 0.12$			$\geq 0.25$	0.25 - 1
Rifampicina	$\leq 1$		2	$\geq 4$	0.008 - 0.06
Tetraciclina	$\leq 4$		8	$\geq 16$	0.25 - 1
Trimetoprim - sulfametoxazol	$\leq 2 / 38$			$\geq 4 / 76$	$\leq 0.5 / 9.5$
Vancomicina	$\leq 4$		8 - 16	$\geq 32$	0.5 - 2

Referencias:

- 1.- NCCLS. 1986 Evaluation Production Lots of Dehydrated Mueller-Hinton Agar. Proposed standard M 6- P. NCCLS, Villanova, Pa.
- 2.- NCCLS. 1990. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 2nd ed. Approved standard M7 -A2. NCCLS, Villanova, Pa.
- 3.- NCCLS. 1991. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Third Informational supplement. M100 -S3. NCCLS, Villanova, Pa.

## REFERENCIAS

- 1.- Uso potencial de líquenes como fuente de antibióticos. Julio 1993 II Reunión de la Red Mexicana de Productos Naturales de uso Medicinal. Querétaro, Qro. CONACYT. pag. 28
- 2.- CULBERSON, C.F. 1969 Chemical and Botanical Guide to Lichen Products, 628 pp. The University of North Carolina Press Chapel Hill.
- 3.- HUNECK, S. 1974 Nature of Lichen substances. In The Lichens Ahmadjian, V. and Hale, M.E. eds. pp 495-522 Academic Press, New York.
- 4.- CULBERSON, C. F., Culberson, W. L., and Johnson A. 1977 Second Supplement to Chemical and Botanical Guide to lichen Products . 400 pp. The American Bryological and Lichenological Society.
- 5.- BADHE, P. D. and Patwardhan, P. G, 1974 Free aminoacid pools in *Cladonia pyxidata* and *Peltigera* sp. The Bryologist, 77, 77-78.
- 6.- SOLBERG, Y. 1979 Studies on the chemistry of lichens. XIX. New amino compounds from *Anaptychia fusca* and several *Stereocaulon*. Zeitschrift für Naturforschung, 34, 493-7
- 7.- TAKAHASHI, K. Takeda, T. and Shibata. S. 1979 Polysaccharides of lichen symbionts. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 27, 238-41

- 8.- LAWREY, J.D. 1980 Correlations between lichen secondary chemistry and grazing activity by *Pallifera varia*. *The Bryologist*, 83, 328-34
- 9.- HALE, M. E. 1974 *The Biology of lichens*, second edition, 181 pp. Edward Arnold, London.
- 10.- SCOTT, G. D., 1973 In *The Lichens*, Ahmadjian, V. and Hale. M. E. Eds., Academic Press, New York., pp.581
- 11.- AHMADJIAN, V. 1967 *The Lichen Symbiosis*, Blaisdell, Waltham, Mass.
- 12.- HALE, M. E., 1974 *The Biology of Lichens*, 2nd. ed., Edward Arnold, London.
- 13.- SMITH, D.C., 1962 *Biol. Rev.*, 37, 537.
- 14.- SMITH, D. C., 1976 In *Lichenology; Progress and Problems*, Brown, D., Hawksworth, D., and Bailey, R., Eds., Academic Press, London. p. 497.
- 15.- AHMADJIAN, V, and Hale, M. E. Eds. 1973 *The Lichens*, Academic Press, New York.
- 16.- CULBERSON, Chicta F. 1979 *Chemical and Botanical Guide to lichen Products*. The University of North Carolina Press Reprin by Otto Koenigstein, Germany. pp. 25-33
- 17.- BROWN, D.H. Hawksworth, D.L., Bailey, R.H., Hale, M.E. 1976 *Lichenology Progress and problems*. Academic Press. London, England.



- 18.- NEARING, G. G. 1962 The lichen book. Hand book of the lichens of Norytheastern United States, Edit. Eric Lundberg. Ashton, Maryland. page. 3-27
- 19.- UGARTE, Raul, W.Quilhot. 1987 Actividad Antimicrobiana In-Vitro del Acido Epiforelico. Acta Farm. Bonaerense 6 2 ,. 65-69
- 20.- KONEMAN, E.W., S.D. Allen., V.R. Dawell y H.M. Sommers. 1989 Pruebas de susceptibilidad a los Antimicrobianos. Edit. Panamericana, pag. 380-402
- 21.-..ERICSSON,H.M. and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an International. Collaborative Study. Acta Pathol Microbiol. Scand. B. Suppl. 217
- 22.- LENNETE., Edwin.H., Balows,A., W. Hausler., Truant, J.P. 1980 Manual of Clinical Microbiology. American Society For Microbiology., pag. 453-458.
- 23.- FREEMAN,Bob.A. 1984 Tratado de Microbiologia de Burrows. 21a edición. Edit. Interamericana. México cap. 5 pag. 126-128.
- 24.- FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 1988 5a Edición. pág. 72 - 80.
- 25.- CRC 1988 Hand books of lichenology volumens I y III. Edit. Margalith Galum, Ph D. CRC Press, INC Boca Raton Florida pag.189-191, 93-105.
- 26.- DULBECCO, R. Davis. B.D. 1983 Tratado de Microbiología. 2a. edicion Edit. Salvat Barcelona, España. pag. 1485-1486.

36.- DEY, P.M and Harbone J.B. 1991. Methods in Plant Biochemistry. Series editors. Vol 6 Assays Per Bioctivity. Edited by K. Hostettmann. Institute of Pharmacognosy and Phytochemistry. University of Lausanne, Swtzerland. pp. 47-57.

37.- MAC FADDIN Jean. F. 1990 Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de importancia Clínica. De. Médica Panamericana. 1a.Reimpresión México. D.F. pág. 27-60, 104-110, 126-129, 134-148, 154-159, 161-166.

38.-.SILVERSTEIN, Robert. M. 1974 Spectrometric Identification of Organic Compounds. Third edition. John Wiley & Sons, Inc.New York, U.S.A..