



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE ALGUNOS PRODUCTOS
DERIVADOS DEL ACIDO CARBAMICO COMO
AGENTES ANTIMICROBIANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SANDRA ISABEL BERNAL AYALA

ASESORES DE TESIS: DR. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO
O.F.B. ALBERTO NATAHLIEL SOTO GUEVARA
DRA. STELLA M. REGINENSI RIVERA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. MEX.

2000

279586



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

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

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Evaluación de algunos productos derivados del Acido Carbámico como
Agentes Antimicrobianos

que presenta la pasante: Sandra Isabel Bernal Ayala
con número de cuenta: 8907517-1 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Febrero de 1999.

PRESIDENTE	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Enrique Angeles Anguiano</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Andres Romero Rojas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	

DEDICATORIAS

A mis padres, por su apoyo y enseñanza, ya que me han dado la mejor herencia que pueden dar a un hijo.

A mi padre: Fausto Bernal Velasco. Por enseñarme a luchar por un ideal, por inculcarme y apoyarme en la realización de esta gran meta. Te dedicó este trabajo, así como tu nos has dedicado el tuyo.

A mi madre: María Ayala Arguello. Por ser mi fiel apoyo, por sus palabras de aliento y sus desvelos, por creer en mí desde el principio hasta el final.

*A Dios: Por darme el Don de la vida, por que siempre me acompaña, por que gracias a él tengo a mis padres y termine una carrera.
Por la estrella que me ilumina.*

AGRADECIMIENTOS

*A mis hermanos: Beatriz y Gerardo por el cariño
y confianza que siempre me han tenido.*

*A mis compañeros y amigos: Por que luchamos juntos
por un ideal e hicieron feliz y agradable mi
camino en esta etapa de mi vida.*

*En especial a Carlos Quezada, Rogelio Montoya
y Rocto Vasconcelos, que tuvieron palabras
de aliento cuando más lo necesitaba y me
ayudaron sincera y desinteresadamente.*

*A Ricardo Montes de Oca, por su ayuda y
palabras justo cuando más las necesitaba
(gracias por no dejarme sola).*

*A Blanca Calderón y Angélica Díaz: por
brindarme su amistad y tenerme paciencia.*

*A mis Maestros y Asesores: Por toda la enseñanza y
el tiempo dedicado para la realización de esta tesis.*

*A David: Por recorrer conmigo este trayecto
de mi vida y ser mi ilusión constante.*

*A Salvador Hernández, por su valioso apoyo en al
recta final de esta meta y sus consejos
para ser mejor cada día.*

*Adán Hernández, gracias por tu tiempo, por tu atención
y ayuda para terminar este proyecto, que esto sea un
aliciente para lograr tus ideales.*

*Gracias a todas aquellas personas que estuvieron cerca
de mí, dándome ánimos para vencer los
obstáculos y llegar al final.*

*Gracias por mantenerme siempre en alto y crearme
nuevas metas y emociones.*

INDICE

	PAGINA.
I Resumen	9
II Introducción	11
III Generalidades	14
3.1 Antimicrobianos	15
3.1.1 Pruebas de susceptibilidad	24
3.2 Carbamatos	28
IV Justificación	31
V Objetivos	33
VI Metodología	35
6.1 Diagramas de flujo	36
6.2 Parte Experimental	39
6.2.1 Pruebas de solubilidad de los fenil carbamatos de etilo	39
6.2.2 Pruebas de susceptibilidad de los fenil carbamatos de etilo por la técnica de difusión en caja	41
6.2.3 Técnica turbidimétrica de crecimiento	44
6.2.4 Determinación de la CMI utilizando la prueba de susceptibilidad por dilución en caldo	45

VII Resultados	46
7.1 Pruebas de solubilidad de los fenil carbamatos de etilo	47
7.2 Pruebas de susceptibilidad de los fenil carbamatos de etilo por la técnica de difusión en caja	48
7.3 Técnica turbidimétrica de crecimiento	50
7.4 Determinación de la CMI utilizando la prueba de susceptibilidad por dilución en caldo	62
VIII Discusión	64
IX Conclusiones	68
X Referencias	70

INDICE DE ABREVIATURAS

- ADN:** Acido desoxirribonucleico
- ATCC:** American type culture collection
- °C:** grados centígrados
- cm:** centímetros
- CMB:** Concentración mínima bactericida
- CMI:** Concentración mínima inhibitoria
- col.:** colaboradores
- DMSO:** Dimetil sulfóxido
- D.O.:** Densidad óptica
- E. coli:*** *Escherichia coli*
- FDA:** Food and Drug Administration
- hrs.:** horas
- µg:** microgramos
- min.:** minutos
- µl:** microlitros
- ml:** mililitros
- mm:** milímetros
- NCCLS:** National Comité for Clinical Laboratory Standard
- nm:** nanometros
- PBS:** solución buffer de fosfatos
- pH:** potencial iones hidrogeno
- R.** resistente
- r.p.m.:** revoluciones por minuto

S: susceptible

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

UFC: Unidades formadoras de colonia

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de síntesis de los fenil carbamatos de etilo.	29
Figura 2. Estructuras químicas de los fenil carbamatos de etilo.	30
Figura 3. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 10536 utilizando Carba metoxi-IV y acetona como disolvente	50
Figura 4. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 10536 utilizando Carba metoxi-IV y DMSO como disolvente.	53
Figura 5. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 10536 utilizando Carba C-II y acetona como disolvente.	56
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>E.coli</i> ATCC 10536 utilizando Carba C-II y DMSO como disolvente.	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferentes usos de derivados de carbamatos	28
Tabla 2. Cepas utilizadas para evaluar la susceptibilidad a los fenil carbamatos de etilo.	40
Tabla 3. Pruebas de solubilidad de los fenil carbamatos de etilo.	47
Tabla 4. Resultados que muestran la susceptibilidad de las bacterias a los fenil carbamatos de etilo con 500µg por sensidisco utilizando el método de Kirby-Bauer.	48
Tabla 5. Resultados que muestran la susceptibilidad de las bacterias a los fenil carbamatos de etilo con 2000µg por sensidisco utilizando el método de Kirby-Bauer.	49
Tabla 6. Resultados de la Cinética de crecimiento de la figura 3	51
Tabla 7. Análisis del área bajo la curva de la Cinética de la figura 3.	52
Tabla 8. Resultados de la Cinética de crecimiento de la figura 4.	54
Tabla 9. Análisis del área bajo la curva de la Cinética de la figura 4.	55
Tabla 10. Comparación de los disolventes utilizados sobre el efecto de la inhibición en las Cinéticas de crecimiento de <i>E. coli</i> con Carba metoxi IV.	55
Tabla 11. Resultados de la Cinética de crecimiento de la figura 5.	57
Tabla 12. Resultados de la Cinética de crecimiento de la figura 6.	59
Tabla 13. Análisis de área bajo la curva de la Cinética de la figura 6.	60
Tabla 14. Cuenta viable (UFC/ml) de <i>E. coli</i> ATCC 10536 en presencia de Carba metoxi IV, utilizando DMSO como disolvente.	61
Tabla 15. Cuenta viable (UFC/ml) de <i>E. coli</i> ATCC 10536 en presencia de Carba C-II, utilizando DMSO como disolvente.	61

Tabla 16. Determinación de CMI por medio de la técnica de dilución en tubo utilizando Carba metoxi-IV.	62
Tabla 17. Determinación de CMI por medio de la técnica de dilución en tubo utilizando Carba C-II.	63

I

RESUMEN.

RESUMEN

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Microbiología Industrial en la Unidad de Posgrado de la FES-Cuautitlán, UNAM. Con el fin de probar los fenil carbamatos de etilo como posibles antimicrobianos utilizando 18 cepas de interés clínico, algunas de ellas de colección.

Para lo cual se realizaron pruebas de sensibilidad utilizando sensidiscos previamente impregnados con el carbamato. Se determinó si había inhibición del crecimiento bacteriano, utilizando diferentes concentraciones del compuesto. Encontrándose que la mayoría de las cepas utilizadas mostraron sensibilidad a los fenil carbamatos de etilo, principalmente con Carba-OH.

Por otra parte, para determinar la CMI y CMB, se corrieron cinéticas de crecimiento con *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 10536. Utilizando Carba-C y Carba-metoxi, y se realizaron pruebas para determinar el disolvente más adecuado que interfiriera lo menos posible con la inhibición del crecimiento bacteriano y que a su vez los productos fueran solubilizados. Con lo cual logramos determinar las concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB)

Los resultados fueron corroborados realizando pruebas de susceptibilidad por dilución en caldo Müller-Hinton. Y se logró determinar el efecto bacteriostático de los fenil carbamatos de etilo.

II

INTRODUCCION.

INTRODUCCION.

La idea y aún el intento de usar sustancias derivadas de un microorganismo vivo para matar a otro son casi tan viejos como la ciencia misma de la microbiología. De hecho la aplicación de la terapéutica antibiótica, sin ser reconocida como tal, es mucho más antigua. ⁽¹¹⁾

Uno de los principales triunfos de la ciencia médica en el siglo XX ha sido la virtual erradicación de muchas enfermedades infecciosas por medio del uso de agentes quimioterapéuticos. Dos importantes descubrimientos revolucionaron el tratamiento de las enfermedades infecciosas. El primero fue en 1935, con el efecto curativo del pigmento rojo Prontosil en infecciones estreptocócicas, el cual fue el precursor de las sulfamidas; el segundo descubrimiento que inició la edad de oro de la antibioticoterapia fue el resumen publicado en 1940 sobre las propiedades de un extracto de cultivos de *Penicillium notatum*. Aunque la penicilina había sido descubierta en 1929 por Fleming, fue el grupo de Oxford el que demostró su inigualado poder. Y fue a partir del descubrimiento de la estreptomycin en 1944, hasta el presente, que la búsqueda de tales agentes ha sido un esfuerzo planificado y diseñado en forma científica. ^(11,40)

En la actualidad el buscar y mejorar los agentes antimicrobianos, sigue siendo un esfuerzo de grupos multidisciplinarios de investigadores que enfocan su atención en conocer cual es el ciclo vital de éstos, para de esta forma elaborar y diseñar fármacos que actúen de manera específica y eliminar así el problema de la resistencia de microorganismos hacia algunos antimicrobianos causada principalmente por su mal uso.

Por lo que en el presente trabajo se pretende evaluar la posible actividad antibacteriana en microorganismos patógenos, de los fenil carbamatos de etilo que son derivados del ácido carbámico sintetizados por el método ya descrito en la literatura.⁽³⁾

El uso como agente quimioterapéutico de estos productos sintéticos se puede determinar a través de diferentes metodologías que nos permitan revelar su posible uso para terapias clínicas.

III

GENERALIDADES.

GENERALIDADES.

3.1. ANTIMICROBIANOS.

El período que sigue a la Segunda Guerra Mundial ha visto el establecimiento y el rapidísimo crecimiento de una gran industria nueva, la utilización de los microorganismos para la biosíntesis de agentes quimioterapéuticos, especialmente antibióticos y hormonas. Casi todas las enfermedades infecciosas producidas por bacterias, que antes de la era de los antibióticos resultaban causas importantes de muertes humanas, se ha sometido a control con el uso de estas drogas. En los países desarrollados las infecciones bacterianas son una causa de muerte menos frecuente que el suicidio o los accidentes de tránsito.⁽³⁵⁾

Durante varias décadas el control de las enfermedades se basó en el uso de antisueros y vacunas y fue en gran parte preventivo. Hasta que Paul Ehrlich inició una búsqueda empírica de productos químicos de síntesis con una toxicidad selectiva para los microorganismos patógenos. Acuñó la palabra quimioterapia para describir esta manera de abordar el control de la enfermedad infecciosa. Y en 1909 descubrió compuestos orgánicos sintéticos que contenían arsénico, efectivos contra la sífilis, pero con efectos secundarios.

El siguiente avance, también empírico, fue probando colorantes de anilina como antimicrobianos, encontrando la sustancia prontosil efectiva, aunque posteriormente se demostró que era un producto incoloro de su degradación, la sulfanilamida, que se formaba en el cuerpo del animal, la que posee la actividad antimicrobiana. D. D. Woods observó que la inhibición de crecimiento bacteriano por la sulfanilamida podía ser revertido por un análogo estructural, por lo que inició una serie de brillantes deducciones.⁽³⁵⁾

Su trabajo parecía ofrecer una manera racional de abordar la quimioterapia mediante la síntesis de análogos de metabolitos esenciales conocidos. En años sucesivos fueron sintetizados y ensayados miles de análogos estructurales de aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, pero se encontraron pocos de utilidad. El gran avance moderno de la quimioterapia procede del descubrimiento fortuito de que los microorganismos sintetizan y excretan compuestos que son selectivamente tóxicos para otros microorganismos. Estos compuestos denominados antibióticos, han revolucionado la medicina moderna.⁽³⁵⁾

El primer antibiótico quimioterapéuticamente efectivo fue descubierto por Alexander Fleming en 1929, quien observó la inhibición del crecimiento bacteriano en la proximidad de una colonia de hongo, razonó que el hongo excretaba al medio un producto químico que impedía el desarrollo bacteriano. Por lo que aisló al hongo que resultó ser del género *Penicillium*, y afirmó que los filtrados del cultivo contenían una sustancia antibacteriana que denominó penicilina. La cual resultó ser inestable y Fleming fue incapaz de purificarla.⁽⁴⁰⁾

Diez años más tarde, un grupo de científicos británicos encabezados por H. W. Florey y E. Chain reemprendieron el estudio de la penicilina, la cual sigue siendo uno de los agentes quimioterapéuticos más efectivos para el tratamiento de muchas infecciones bacterianas; principalmente a las causadas por Gram-positivas.

Un segundo antibiótico de importancia clínica fue la estreptomicina, que es efectiva tanto sobre las Gram-negativas como sobre *Mycobacterium tuberculosis*, descubierto por A. Schatz y S. Waksman. La estreptomicina fue el primer ejemplo fue un antibiótico de amplio espectro. Después se descubrió, las tetraciclinas.

Los antibióticos han resultado ser menos útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas: tales como la nistatina y la anfotericina B siendo considerablemente menos efectivos desde el punto de vista terapéutico que sus equivalentes antimicrobianos debido a que su toxicidad es menos selectiva. Todavía es necesario encontrar buenas sustancias antivirales. Desde 1945, han sido aislados y caracterizados miles de antibióticos producidos por hongos, actinomicetos, o bacterias unicelulares. Pero solo una pequeña fracción de éstos poseen valor terapéutico.⁽³⁵⁾

El término antibiótico se refiere a una sustancia producida por microorganismos tales como hongos (*Penicillium*), bacterias (*Bacillus*, *Streptomyces*, *Cephalosporium* y *Micromonosporas*), los cuales son utilizados para combatir enfermedades infecciosas. En tanto que los agentes quimioterapéuticos son antimicrobianos sintéticos. Los términos antibiótico, agente quimioterapéutico y antimicrobiano a menudo se emplean indistintamente para denotar fármacos naturales o sintéticos⁽¹⁸⁾.

Los antibióticos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, donde desempeñan un importante papel en la regulación de la población microbiana en el suelo, agua potable, aguas cloacales y abonos.⁽⁴⁰⁾

La toxicidad selectiva es una propiedad fundamental para un agente quimioterapéutico. Debe inhibir o destruir al patógeno sin dañar al huésped⁽⁴⁰⁾. Por lo que podemos decir de manera particular que un agente antimicrobiano ideal debe mostrar una toxicidad selectiva, es decir, a concentraciones toleradas por el huésped, obstaculiza algunos procesos metabólicos o de síntesis que solo existen en el organismo infectante y no en las células del huésped⁽¹³⁾.

En la actualidad el concepto de toxicidad selectiva verdadera se aplica a las penicilinas y a las cefalosporinas que solo actúan contra bacterias. No obstante muchos otros antimicrobianos muestran toxicidad selectiva suficiente como para que sean agentes efectivos quimioterapéuticos contra infecciones⁽¹³⁾.

El quimioterapéutico ideal es aquél que tiene un efecto bactericida más que bacteriostático. Los agentes bactericidas dan muerte a los microorganismos contra los cuales se emplean, mientras que los agentes bacteriostáticos ejercen solamente un efecto inhibitor en su crecimiento⁽⁴⁰⁾. Es decir, es preferible un agente que destruya con rapidez a los microorganismos, en lugar de un agente que solo inhiba el crecimiento en forma reversible. La eficacia de los fármacos antimicrobianos depende del grado de sensibilidad de los microorganismos blanco. Cada agente es efectivo contra un espectro definido de microorganismo.⁽³⁴⁾

El quimioterapéutico ideal es aquel para el cual los microorganismos susceptibles no se vuelvan genética o fenotípicamente resistentes.⁽⁵⁾ No debe ser alergénico, su administración no será prolongada y a grandes dosis no debe provocar efectos colaterales adversos. Es deseable que el antibiótico sea hidrosoluble y estable, y que los niveles bactericidas en el organismo además de poder ser alcanzados con rapidez puedan ser mantenidos durante períodos prolongados.⁽⁴⁰⁾

Los agentes quimioterapéuticos tienen un mecanismo de acción que interfiere a nivel de una diversidad de sitios vulnerables en la célula. Interfieren con:

1) la síntesis de la pared celular, 2) la función de la membrana, 3) la síntesis proteica, 4) metabolismo de ácidos nucleicos, y 5) el metabolismo intermedio.⁽⁴⁰⁾

Dentro de límites amplios, las bacterias se dividen en grandes grupos en cuanto a la susceptibilidad a los antibióticos. Las bacterias gram-positivas, posiblemente porque carecen de una membrana externa, son más permeables a muchos de los antibióticos clásicos y en general son más susceptibles que las gram-negativas. Por ejemplo, los estreptococos y los neumococos suelen ser casi mil veces más susceptibles a la penicilina G que la *E. coli*. En su mayoría depende de la presencia de cepas resistentes a los antibióticos en un medio ambiente en particular.⁽³⁴⁾

La importancia de la resistencia a los fármacos antimicrobianos está ilustrada por las catastróficas "epidemias" de resistencia al cloranfenicol que ocurrieron en México a fines de la década de 1960 y comienzos de 1970 con la disentería por *Shigella* y luego con las infecciones por *Salmonellas*. En la epidemia inicial no se reconoció que el motivo por el cual los pacientes no respondían al cloranfenicol era que las bacterias se habían vuelto resistentes. Es importante que sea monitoreada a nivel nacional y local y que el personal médico cuente con la información.⁽³⁴⁾

El estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma) es necesario porque el espectro de actividad de los preparados es limitado y las bacterias tienen capacidad para desarrollar resistencia⁽³²⁾. Los métodos utilizados permiten el estudio directo de la sensibilidad o detectar la pérdida de la misma, frente a antibióticos selectos en bacterias aisladas en procesos patológicos.⁽³³⁾

La capacidad de muchos microorganismos para desarrollar resistencia frente a las drogas quimioterapéuticas^(22, 10) ofrece una seria amenaza para su futura utilidad; por lo que se debe abandonar la noción de que afectan solo a los microorganismos contra los cuales están dirigidos.

Hay dos mecanismos principales por los cuales puede surgir una mayor resistencia a antibióticos y otras drogas usadas en la práctica clínica: 1) por mutación (cromosómica) y 2) por intercambio genético.⁽⁴⁰⁾

Varias consideraciones intervienen en la selección del mejor antimicrobiano para tratar una infección. Estas incluyen: 1) conocimiento de la susceptibilidad inherente *in vitro* del organismo infectante a los antimicrobianos apropiados; 2) relación de la susceptibilidad de la cepa con la de otros miembros de la misma especie; 3) propiedades farmacológicas, incluso toxicidad, unión de proteínas, distribución, adsorción y excreción; 4) experiencia clínica previa de eficacia en el tratamiento de infecciones debidas a la misma especie; 5) naturaleza del proceso patológico subyacente, su historia natural y su influencia sobre la quimioterapia, y 6) el estado de inmunidad del huésped.⁽³⁵⁾

El fin de un estudio de sensibilidad *in vitro* consiste en determinar el grado de actividad de un fármaco antimicrobiano frente a una bacteria. La determinación cuantitativa de la concentración inhibitoria mínima (CMI) tiene valor, por ejemplo, si *E. coli* se inhibe con 64 µg/ml de ampicilina significa que, a esta concentración, la bacteria es sensible porque el fármaco es activo, ya que es capaz de inhibir su crecimiento. Las concentraciones que según estos criterios limitan las categorías de sensible y resistente se conocen como concentraciones críticas (break points).⁽³³⁾

El parámetro que nos indica la concentración bacteriostática pero no la concentración bactericida es la concentración mínima inhibitoria (CMI). En general ambas concentraciones no son iguales; la mayoría de los agentes que son bactericidas son bacteriostáticos en concentraciones más bajas.

La CMI de un antibiótico para una determinada bacteria es la cantidad del mismo suficiente para inhibir su multiplicación. Su determinación es decisiva para la utilización de antibióticos. Para los preparados con acción bactericida puede estudiarse el parámetro de acción, la concentración bactericida mínima CMB.⁽³⁴⁾

La concentración bactericida mínima (CBM) se determina por medio del subcultivo de los tubos que no tienen un desarrollo visible en medios sin antibióticos (lo cual permite la multiplicación de bacterias cuyo crecimiento había sido inhibido pero que todavía están vivas). Esta técnica lleva tiempo y presenta algunos problemas. Sin embargo, puede proporcionar información importante porque los fármacos bactericidas y bacteriostáticos no siempre son igualmente efectivos.⁽³⁴⁾

Dentro de las pruebas de susceptibilidad se encuentran las de difusión y las de dilución. Las pruebas por dilución se usan para determinar la concentración mínima de un antimicrobiano necesaria para inhibir o matar un microorganismo. Diluciones seriadas del antimicrobiano se inoculan con el microorganismo y se incuban. La concentración inhibitoria mínima (CMI) es la menor concentración sin crecimiento visible. Los términos caldo (tubo) y agar (placa) se añaden al nombre de prueba de o por dilución para indicar pruebas en medios líquidos y en agar, respectivamente. Las pruebas de susceptibilidad por dilución en caldo han sido empleadas durante décadas y representan una modificación del método de dilución en agar.⁽¹⁸⁾

La técnica de dilución está diseñada y estandarizada para el estudio de sensibilidad de bacterias aerobias de crecimiento rápido (estafilococos, pseudomonas, acinetobacter y algunos estreptococos.) en medios no enriquecidos y que crecen bien en atmósfera ordinaria.⁽³³⁾

Los resultados obtenidos de estas pruebas pueden estar bajo la influencia de los reactivos y condiciones de las pruebas, estas variables pueden ser: densidad del inóculo, el tiempo y la temperatura de incubación, el pH, la atmósfera y la estabilidad de los antimicrobianos pueden influir en los puntos finales obtenidos.⁽¹⁸⁾

Los antimicrobianos se aplican comúnmente a las placas de prueba en forma de discos secos de papel filtro. Cuando un disco se aplica a la superficie inoculada del medio de prueba, varios hechos suceden simultáneamente. Primero, los discos secos absorben agua del agar, disolviendo así la droga. El antimicrobiano puede entonces migrar a través del medio de agar adyacente, obedeciendo a las leyes físicas que rigen la difusión de moléculas a través de un agar.

El resultado final es un gradiente que cambia gradualmente de concentraciones de droga en el agar que rodea a cada disco. Al progresar la difusión del antimicrobiano también se produce multiplicación microbiana. Después de una demora inicial se instala una fase de crecimiento logarítmico. En ese momento la multiplicación bacteriana es más rápida que la difusión de la droga y las bacterias no inhibidas por el antimicrobiano continúan multiplicándose hasta que puede visualizarse una capa de crecimiento. No aparece ningún crecimiento en el área donde la droga está presente en concentraciones inhibitorias; cuanto más susceptible el microorganismo probado, mayor la zona de inhibición. La posición del borde de esta última para la mayoría de los antimicrobianos y microorganismos se determina durante las primeras horas de inhibición (fase de demora más 2 o 3 generaciones).

(18)

Es evidente que los microorganismos con tiempos de crecimiento prolongados aparecerán más susceptibles a cada antimicrobiano porque las drogas tienen más tiempo para difundirse antes de determinarse la posición de la zona.

El tamaño de la zona de inhibición también depende de la velocidad de difusión de las drogas a través del agar; las cuales difunden a diferentes velocidades. Sin embargo, el diámetro de la zona de inhibición es indirectamente proporcional a la concentración inhibidora mínima (CMI), medida por un procedimiento de dilución.

Normas de interpretación.

Este procedimiento, como se emplea normalmente, es esencialmente una prueba cualitativa que ubica a los microorganismos como a continuación se describe:

En las normas de interpretación de zonas se establece la clasificación de resistentes o susceptibles (sensibles) generalmente, aunque en algunos casos se da una categoría más amplia, la de moderadamente susceptible que es una dosis máxima segura de la droga para un tratamiento exitoso y que no es igual a la categoría de intermedia.⁽¹⁸⁾

Lectura e interpretación.

Los diámetros de zonas para antimicrobianos individuales se traducen a las categorías de susceptibles, intermedios o resistentes con referencia a una tabla interpretativa. Las categorías resistentes y susceptibles para casi todas las drogas se crearon para aplicarlas a infecciones sistémicas y sistemas de dosis apropiados. Donde es aplicable, se ha identificado la categoría de moderadamente susceptible para separar las cepas susceptibles factibles de requerir la máxima dosis inocua de las que son factibles de responder a una dosis reducida.⁽¹⁸⁾

3.1.1 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

El estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma) es necesario porque el espectro de actividad de los preparados es limitado y las bacterias tienen capacidad para desarrollar resistencia. Los métodos utilizados con este fin permiten el estudio directo de la sensibilidad o detectar la pérdida de la misma, frente a antibióticos de elección en bacterias aisladas en procesos patológicos.⁽³³⁾

MÉTODOS DE DIFUSIÓN.

Se considera el agar de Müller-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 de difusión en agar(Anderson y Kirby-Bauer).

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

Los diversos pasos de estandarización que se han incorporado a la técnica de Kirby-Bauer 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 Müller-Hinton y ha sido sustituido por agar soya tripticaseína.
3. Estandarización del inóculo para tener una concentración aproximadamente de 10^8 UFC/ml.

4. Estandarización del tiempo y temperatura de incubación El tiempo óptimo para la difusión del antibiótico en el agar y la reacción con los microorganismos en desarrollo es de 18hrs.

5. Medida del diámetro de los halos de inhibición. Los diámetros de las zonas de inhibición desarrollados alrededor de cada disco se miden con vernier o regla.⁽¹⁷⁾

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 21ml de agar 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 530nm). 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 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 gelificado deben colocarse en círculo con un radio de separación de 2.8cm 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 18hrs., 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.⁽¹⁷⁾

MÉTODOS DE DILUCION.

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.

Prueba de susceptibilidad por dilución en caldo.

Determina la mínima cantidad de antibiótico necesaria para inhibir un organismo prueba (CMI). Esta prueba consta de una serie de 10 tubos que contienen caldo nutritivo, a los que se les añade una cantidad de antibiótico, diluido seriamente de 100 mg/mal a 0.4 mg/mal. La CMI se considera como la concentración de antibiótico contenida en el primer tubo de la serie que inhibe el desarrollo visiblemente.⁽¹⁷⁾

Microtécnica de dilución en caldo.

La microtécnica de dilución tiene el mismo principio que el método de dilución en caldo ya descrito, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos se determina utilizando una placa de o micropozos de material plástico. 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 puede obtener desde 8 diluciones seriadas al doble.

Replicador de Steers.

Las sustancias que no difunden a través del medio de agar, pueden ser probadas directamente por la incorporación de estas 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 (veterdor Steers). Con este método pueden ser inoculados hasta 25 microorganismos en una placa con agar de diámetro de 9 cm.

En una siembra de aluminio que contiene de 32 a 36 concavidades, cada una constituye un receptáculo dentro del cual se puede colocar diferentes suspensiones bacterianas, se hace bajar una cabeza móvil de inoculación tomando muestras de cada suspensión, se retira la placa y se coloca una placa de agar con antibiótico la cual va ser inoculada. Se incuban a 35°C durante 18hrs.

Los microorganismos resistentes producen colonias circulares, mientras que los sensibles no producen el botón de desarrollo. Los resultados se pueden interpretar como valores de CMI en $\mu\text{g/ml}$.⁽¹⁷⁾

3.2 GENERALIDADES DE CARBAMATOS

En la actualidad se les han encontrado diversos usos a los carbamatos entre los que se encuentran: pesticidas (herbicidas e insecticidas) ⁽³⁶⁾. Además se les conoce como inhibidores de la acetilcolinesterasa ⁽¹⁶⁾, y de tener algunos usos en la clínica entre estos como relajante muscular ⁽⁷⁾

Tabla 1. Diferentes usos de derivados de carbamatos ^(27, 30, 21, 15, 6, 38, 1, 57, 31, 8, 12, 23)

AREA.	OBSERVACIONES.
Agronomía	Pesticida (insecticida, herbicida).
Investigación	Inhibe proteasa, colinesterasa, elastasa.
Medicina	Antimicrobiano, anestésico local, anticonvulsivante, antiulceroso, anticarcinógeno. Compuestos hemocompatibles, hemoaglutinante, sustituto de piel temporal, piel sintética, protector de piel, antitrombogénico, injertos arteriales, aparatos ortopédicos, corazón artificial, absorbente.
Cosmetología	Deodorizante.
Industria	Preservativo. Tuberías, líquidos, gases, sólidos, almacenadores, industrial, colchones, salas, zapatos.
Navegación	Recubrimiento de barcos, elemento de flotación, veleros, boyas
Seguridad	Empaque, cuerdas, recubrir objetos frágiles.
Automotriz	Accesorios, pintura, cristales de seguridad.
Textil	Hilos y telas.
Veterinaria	Insecticida
Ind.cementera	Mezcla para bloque, pegamento para loseta vinilica.

El carbamato más simple, es el ácido carbámico.⁽²⁷⁾ Los carbamatos al polimerizarse producen compuestos conocidos como poliuretanos, estos son ampliamente usados en diferentes áreas (tabla 1)

Para este trabajo se utilizaron los compuestos de síntesis 4 sustituidos fenilcarbamatos de etilo a partir de las aminas correspondientes, 4-cloroanilina, 4-bromoanilina, 4-metoxianilina, 4-nitroanilina, 4-dimetil amino, y 4-acetilnilina respectivamente, las cuales reaccionan con carbonato de dietilo e hidruro sódico (fig. 1) conforme a la metodología en *Synthetic Communications* de 1994.

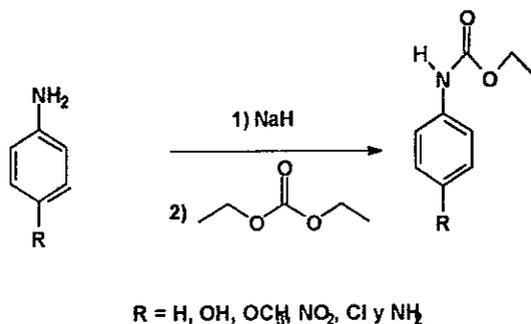
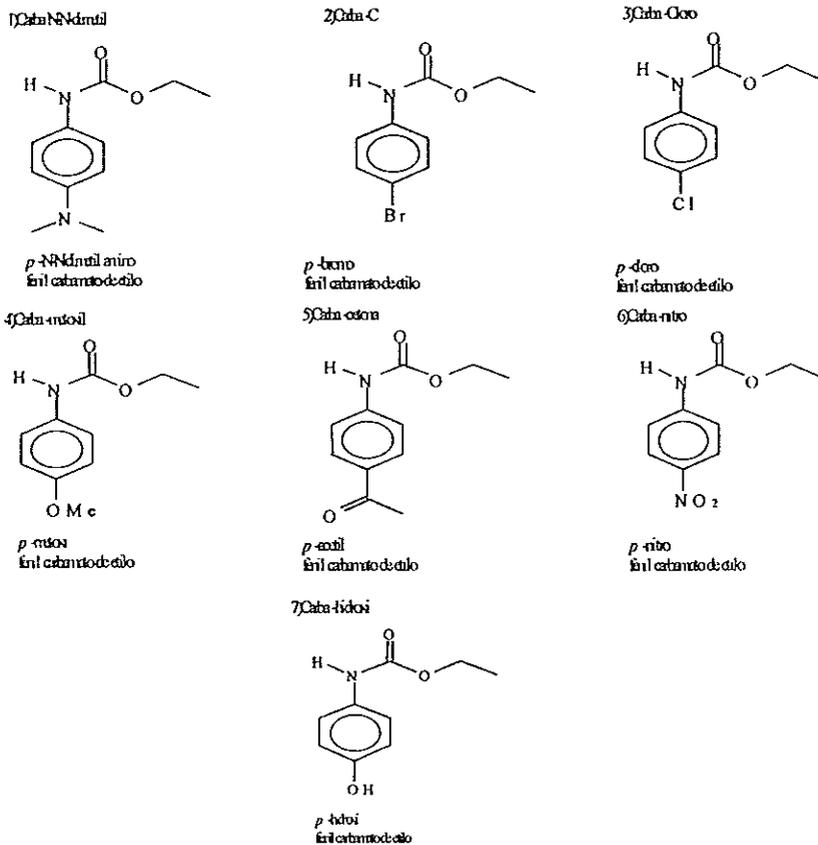


Figura 1. Reacción de Síntesis de los fenil carbamatos de etilo.

Estos compuestos son derivados del ácido carbámico, los cuales pertenecen a los fenil carbamatos de etilo.

Figura 2. Estructuras químicas de los fenil carbamatos de etilo.



En la figura 2 se muestran las estructuras químicas de los productos utilizados en el desarrollo de este proyecto

IV

JUSTIFICACION

JUSTIFICACION

En la actualidad existen un gran número de antimicrobianos que por su consumo inadecuado ha originado que ciertos microorganismos se vuelvan resistentes a ellos. Por lo que surge la necesidad de la síntesis y la evaluación de nuevos compuestos químicos con actividad antimicrobiana. Para lo cual se evaluará a los fenil carbamatos de etilo como posibles agentes antibacterianos.

V

OBJETIVOS.

Objetivo General:

Evaluar algunos productos derivados del ácido carbámico como agentes antimicrobianos.

Objetivos particulares:

1-Determinar la actividad antibacteriana de los fenil carbamatos de etilo utilizando el método de difusión en caja (Kirby-Bauer) y el método de dilución en tubo.

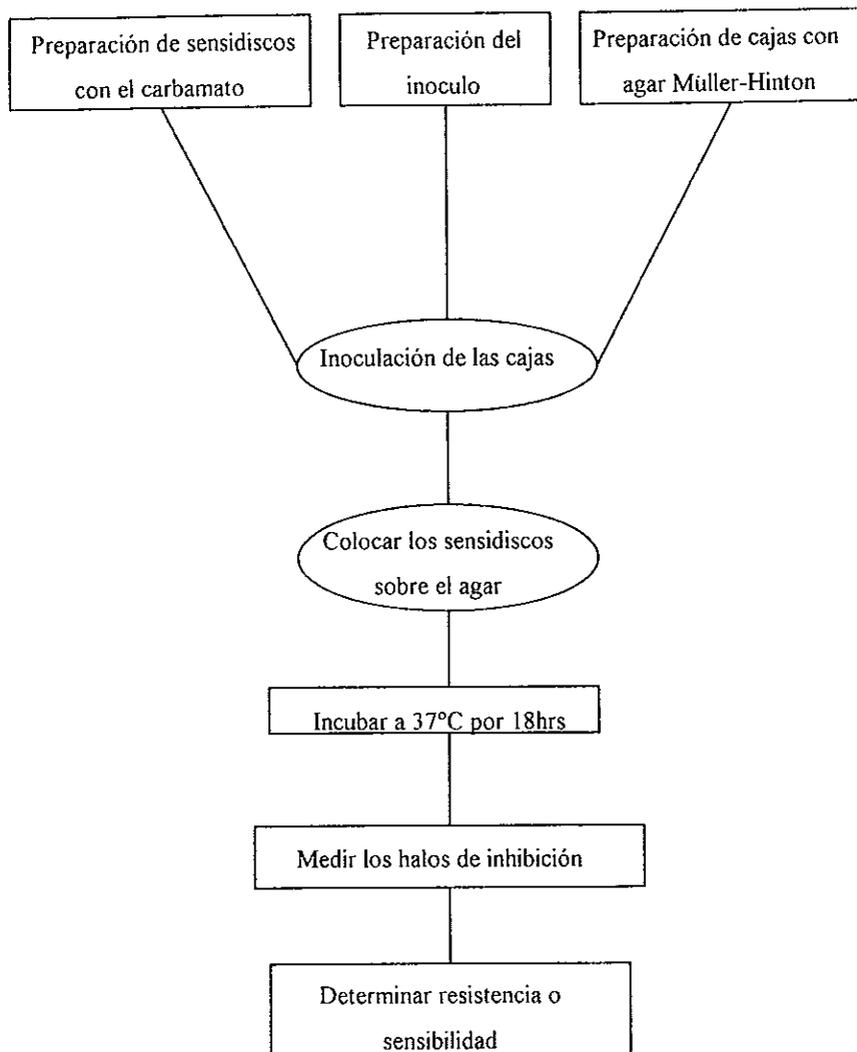
2-Evaluar por técnica turbidimétrica la sensibilidad de los fenil carbamatos de etilo y calcular la Concentración Mínima Bactericida y la Concentración Mínima Inhibitoria, al comparar las pruebas rutinarias con metodología como el calculo de % de células vivas y muertas en el área debajo de la curva en cada cinética.

VI

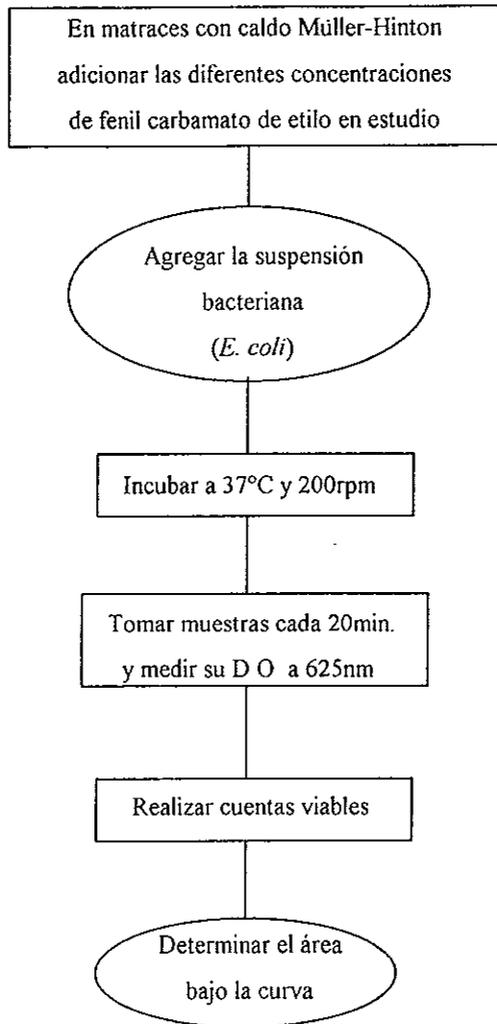
METODOLOGIA.

6.1 DIAGRAMA DE FLUJO

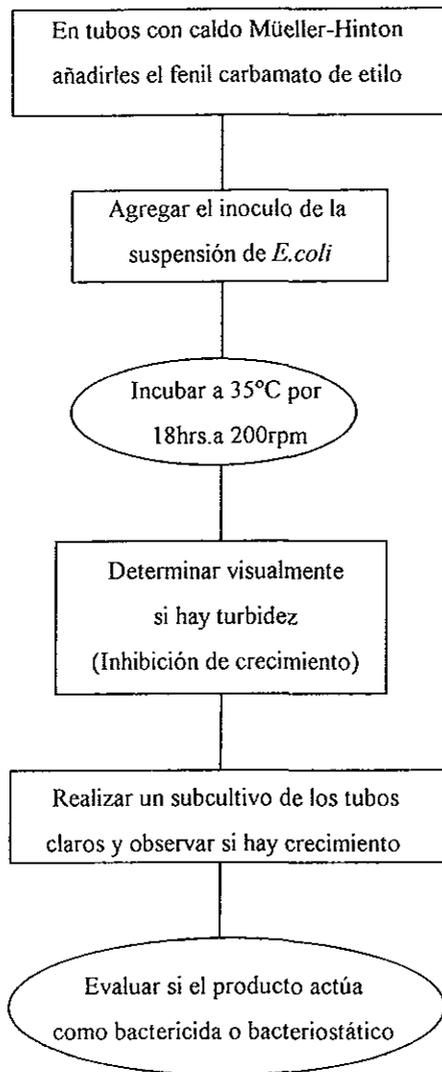
Pruebas de susceptibilidad de los fenil carbamatos de etilo por el método de difusión en caja.



Técnica turbidimétrica de crecimiento.



Técnica de dilución en tubo.



6.2 PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental se realizó en el laboratorio de Microbiología Industrial en la Unidad de Posgrado de la FES-Cuautitlán, UNAM.

6.2.1 Pruebas de solubilidad de los fenil carbamatos de etilo.

De cada uno de los fenil carbamatos de etilo que se mencionan a continuación: Carba N-N-dimetil, Carba-C, Carba-Cl, Carba-metoxi, Carba-acetona, Carba-Nitro y Carba-OH, se realizaron pruebas de solubilidad cualitativas, tomando para ello una pequeña muestra de cada uno de estos.

Posteriormente se le agregó a cada tubo 0.5ml de uno de los siguientes disolventes: agua, acetona y dimetilsulfoxido (DMSO), se repitió la prueba para todos los productos, con los tres disolventes, para determinar cual de éstos, era el más adecuado para solubilizar el producto y a su vez facilitar la preparación de los sensidiscos.

Los microorganismos que se utilizaron se encuentran en el cepario del laboratorio de Microbiología Industrial en la unidad de Posgrado y son las siguientes:

Tabla 2. Cepas utilizadas para evaluar la susceptibilidad a los fenil carbamatos de etilo.

CEPAS DE ORIGEN CLINICO (DONADAS POR EL LAB (DE MIROBIOLOGIA INDUSTRIAL)	CEPAS DE COLECCIÓN DE TIPO AMERICANO
Bacterias Gram negativas:	Bacterias Gram negativas:
- <i>Vibrio cholerae</i> 01 <i>Ogawa humana</i>	- <i>E. coli</i> ATCC 25922
- <i>Vibrio cholerae</i> 001 <i>ambiental</i>	- <i>E.Coli</i> ATCC 10536
- <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Bacterias Gram positivas:
- <i>Vibrio cholerae</i> 01 <i>Inaba humana</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
- <i>Vibrio cholerae</i> <i>Inaba</i>	- <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
- <i>Salmonella typhi</i>	- <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341
- <i>Citrobacter</i> spp	
- <i>Enterobacter aerogenes</i>	
- <i>Proteus mirabilis</i>	
- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
- <i>Serratia marcescens</i>	
- <i>Shigella</i> spp	
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

6.2.2 Prueba de susceptibilidad de los fenil carbamatos de etilo por el método de difusión en caja.

El procedimiento más usado, es el método de difusión con discos, aunque casi el 50% de los laboratorios clínicos realiza actualmente pruebas de dilución como procedimiento suplementario o método de rutina. El método de difusión ha sido aceptado por la Food and Drug Administration (FDA) y aceptado como estándar por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). La metodología desarrollada para esta prueba fue de acuerdo a la descrita en el NCCLS Documento M2-A5 (1993) y se evaluó por triplicado en 18 cepas. Siendo una ligera modificación de la descrita por Bauer y col.²⁵⁾

A) Preparación de sensidiscos.

Se cortaron los sensidiscos de papel filtro (Watman N°1), de un tamaño aproximado de 5-6mm de diámetro, se esterilizaron por autoclave y posteriormente se impregnaron con cada uno de los productos previamente solubilizados en acetona que fue el disolvente elegido en la prueba anterior, ya que esta es altamente volátil y favorece la preparación de los discos; esto se realizó utilizando una micropipeta de 5µl. Cada uno de los productos se pesaron por triplicado, las cantidades de 500, 1000 hasta 2000µg en tubos de ensaye pequeños estériles.

B) Preparación del inóculo para la prueba de difusión en caja

Tubos con tapón de rosca con 4 a 5 ml de medio de caldo soya tripticaseína, estéril se inocularon con cada una de las cepas a probar, tomando con una asa bacteriológica de cuatro a cinco colonias aisladas del mismo tipo morfológico. Se incubaron a 37°C, a 200r.p.m. hasta obtener una turbidez visualmente comparable al del estándar del tubo 0.5 del Nefelómetro de Mc. Farland; lo cual se realizó con cada una de las cepas.

El tubo de Mc Farland se preparó de la siguiente manera:

Agregar 9.95ml de H₂SO₄ 1% y 0.05ml de BaCl 1% en un tubo de ensaye con tapón de rosca, agitar perfectamente (debe tener una D.O. de 0.08 a 0.10 a 625nm = 1x10⁸UFC/ml).

Inicialmente se utilizó Caldo soya tripticaseína, para estandarizar la técnica pero posteriormente se utilizó Caldo Müller-Hinton como medio de cultivo.

C) Inoculación de Placas.

El medio de agar Müller-Hinton fue inoculado sumergiendo un hisopo de algodón estéril en la suspensión estandarizada y el exceso de caldo se elimina presionando y rotando el hisopo firmemente contra el interior del tubo por encima del nivel del líquido.

Se pasó el hisopo en franjas uniformes en tres direcciones sobre toda la superficie de la placa de agar para obtener un inóculo uniforme, se deja secar la placa de 3 a 5 min, pero no más de 15 min, antes de aplicar los discos; los cuales ya se impregnaron con las diferentes concentraciones (500, 1000 y 2000 µg) de cada uno de los siete fenil carbamatos de etilo a probar. Además de un control con acetona

A los 15 min después de inocular las placas, se aplican discos impregnados de las sustancias antimicrobianos a probar, en la superficie de las placas inoculadas manualmente, con pinzas estériles, presionando suavemente; los discos deben quedar lo bastante separados entre sí (2.8cm) para impedir la superposición de halos de inhibición. A los 15 min. de aplicar los discos las placas se invierten y se incubaron a 37°C por 24 hrs.

Después de 16 a 18 horas de incubación las placas se examinan y los diámetros de las zonas de inhibición total se miden con precisión de 1 mm con vernier.

Se determinó la resistencia o la sensibilidad de cada uno de los productos con las distintas cepas, observando formación de halos de inhibición de crecimiento alrededor del sensidisco.

El método de difusión con discos se han estandarizado con agar de Müller-Hinton. El pH de cada lote de agar de Müller-Hinton debe ser de 7.2 a 7.4.

6.2.3 Técnica Turbidimétrica de crecimiento.

El estudio del efecto bacteriostático y bactericida se determinó mediante cinéticas de crecimiento para la cepa *Escherichia coli* ATCC 10536, se evaluó el efecto de los derivados IV (Carba-metoxi) y II (Carba-C) (disolviendo en 2 ml de acetona o DMSO).

Las cinéticas se realizaron en matraces de 500 ml con 150 ml de caldo nutritivo en solución buffer PBS y posteriormente con caldo Müller-Hinton, a cada matraz se le adicionó el producto a diferentes concentraciones (previamente solubilizado en acetona o DMSO) y se inoculó con 3 ml de una suspensión bacteriana con una turbidez igual a la del tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland, homogenizándose e incubándose a 37°C y 200 r.p.m.

El estudio del efecto bactericida y bacteriostático se realizó al tomar muestras cada 20 minutos y al determinar el área debajo de las curvas obtenidas a 625 nm de absorbancia y por cuentas viables (UFC/ml) (según el método de Miler Mishra). Y se estableció la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los dos derivados del ácido carbámico en la cepa *E.coli* ATCC 10536.

6.2.4 Determinación de la CMI utilizando la prueba de susceptibilidad por dilución en caldo.

Determinación de CMI. En tubos de ensaye con 9ml. de caldo Müller-Hinton, se añadió por separado los fenil carbamatos de etilo previamente solubilizados en 0.5ml de DMSO, a distintas concentraciones crecientes (tomadas de las Cinéticas de crecimiento para cada carbamato), y 0.5ml. de inóculo de una suspensión calibrada del microorganismo en estudio fue adicionada. Posteriormente se incubó a 35°C, por 18hrs. a 200 r.p.m., una vez finalizado este tiempo los tubos son examinados visualmente y se determina si hay crecimiento bacteriano. La CMI se determina en el primer tubo donde exista ausencia de turbidez, o inhibición del crecimiento bacteriano.

Para confirmar la ausencia de bacterias se realizó un subcultivo de los tubos visualmente claros, para observar si hay crecimiento de la bacteria y con ello evaluar el producto como bactericida o bacteriostático

El método más cuantitativo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana es una de las pruebas de dilución propuesta por la NCCLS, ya que estas dan resultados cuantitativos directos, no están bajo la influencia de la velocidad de crecimiento del microorganismo, y evitan algunas complejidades de las propiedades de difusión de los antimicrobianos, aunque no tienen la flexibilidad de estas. La información cuantitativa puede ser necesaria cuando se requiere una supervisión estrecha de las dosis de drogas y los niveles séricos, o cuando las pruebas de disco tienen resultados inaplicables.

VII

RESULTADOS

RESULTADOS.

7.1 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LOS FENIL CARBAMATOS DE ETILO.

Tabla 3. Se muestran las pruebas de solubilidad de los fenil carbamatos de etilo utilizados en este proyecto.

DISOLVENTE PRODUCTO	AGUA	ACETONA	DMSO
I Carba N-N-dimetil	-	+	++
II Carba-C	-	+	++
III Carba-cloro	-	+	++
IV Carba-metoxi	-	+	++
V Carba-acetona	-	+	++
VI Carba-nitro	-	+	++
VII Carba-OH	-	+	++

En la tabla 3 se observan los resultados de las pruebas de solubilidad para los siete productos a evaluar, utilizando como disolventes agua, acetona y DMSO. Donde (-) =insoluble, (+) =soluble y (++) = muy soluble.

7.2 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE LOS FENIL CARBAMATOS DE ETILO, POR LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN CAJA.

Tabla 4. Resultados que muestran la susceptibilidad de las bacterias con los fenil carbamatos de etilo con 500µg por sensidisco utilizando el método de Kirby-Bauer.

BACTERIA	I	II	III	IV	V	VI	VII
	Carbamato Dimentil	Carbamato Cloro	Carbamato Cloro	Carbamato Metil	Carbamato Cloro	Carbamato Cloro	Carbamato Cloro
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	R	R	R	R	R	R
<i>E. Coli</i> ATCC 10536	R	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella typhi</i>	R	R	R	R	R	R	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	R	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	R

NOTA: Sensidiscos con 500µg de cada carbamato. Resistente se representa como R.

En la tabla 4 se observan las pruebas de susceptibilidad realizadas a los fenil carbamatos de etilo utilizando sensidiscos de 500µg y algunas bacterias de interés clínico.

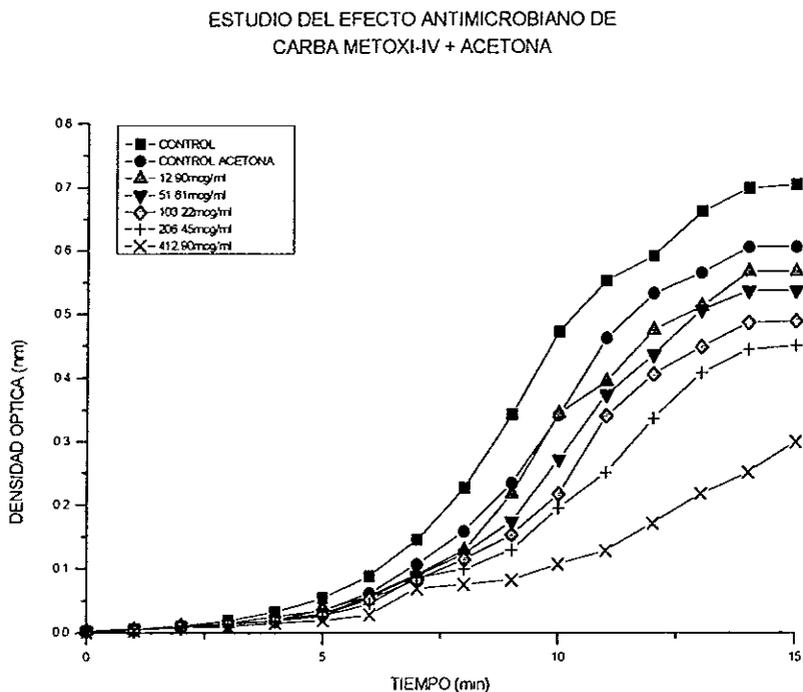
Tabla 5. Resultados que muestran la susceptibilidad de las bacterias con los fenil carbamatos de etilo con 2000µg por sensidisco utilizando el método Kirby-Bauer.

GENERO	II Carbamato N-Dimetilo	III Carbamato	IV Carbamato Cloruro	V Carbamato metilo	VI Carbamato acetilato	VII Carbamato nitrilo	VIII Carbamato OH
<i>Vibrio cholerae</i> 01 Ogawa humana	R	0.79	0.94	0.73	R	R	0.73
<i>Vibrio cholerae</i> 001 ambiental	R	0.74	0.73	R	R	R	0.91
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	R	0.85	0.97	0.95	R	R	1.05
<i>Vibrio cholerae</i> 01 Inaba humana	R	1.17	1.28	1.07	R	R	0.83
<i>Vibrio cholerae</i> Inaba	R	0.60	R	0.88	R	R	1.14
<i>Salmonella typhi</i>	R	0.69	0.71	R	R	R	0.93
<i>Citrobacter</i> spp	R	R	R	R	R	R	0.87
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	R	R	R	1.03
<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	0.79
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	0.71	R	0.84	R	R	1.25
<i>Serratia Marcensens</i>	R	0.72	R	R	R	R	1.35
<i>Shigella</i> spp	R	R	R	R	R	R	1.19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	0.83
<i>E. coli</i> ATCC 25922	R	0.62	0.71	R	R	R	1.22
<i>E. coli</i> ATCC 10536	R	0.66	0.77	0.90	R	R	0.99
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	0.84	0.67	0.54	R	R	R
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	R	0.69	0.73	R	R	R	R
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	R	0.73	0.94	0.61	R	R	0.64

Se muestran los resultados de los halos de inhibición en cm. Donde R=resistente.

7.3 TÉCNICA TURBIDIMÉTRICA DE CRECIMIENTO.

Figura 3. Cinética de crecimiento de *E.coli* ATCC 10536 utilizando Carba metoxi-IV y acetona como disolvente.



En la figura 3 se muestra la curva obtenida de la lectura de las D.O. graficadas contra tiempo. De la Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC utilizando diferentes concentraciones de Carba metoxi-IV en presencia de acetona como disolvente.

Tabla 6. Resultados de la Cinética de crecimiento de la figura 3.

T(min)	Control	Acetona	12.90	51.61	103.22	206.45	412.90
20	0.003	0.002	0.003	0.002	0.002	0.001	0.001
40	0.006	0.006	0.005	0.005	0.005	0.006	0.003
60	0.001	0.008	0.011	0.009	0.009	0.008	0.008
80	0.019	0.016	0.015	0.014	0.014	0.013	0.010
100	0.032	0.025	0.02	0.02	0.019	0.018	0.015
120	0.054	0.035	0.035	0.03	0.027	0.026	0.019
140	0.088	0.061	0.057	0.055	0.052	0.044	0.028
160	0.145	0.106	0.091	0.088	0.082	0.086	0.067
180	0.227	0.158	0.128	0.123	0.114	0.099	0.075
200	0.343	0.235	0.218	0.174	0.153	0.129	0.082
220	0.472	0.342	0.345	0.273	0.218	0.195	0.107
240	0.552	0.462	0.394	0.374	0.341	0.251	0.128
260	0.592	0.532	0.474	0.436	0.406	0.337	0.171
280	0.662	0.564	0.512	0.506	0.448	0.408	0.218
300	0.698	0.606	0.566	0.536	0.486	0.444	0.252
320	0.704	0.606	0.566	0.536	0.488	0.450	0.300

En la tabla 6 se registran los resultados de la Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 con Carba metoxi-IV utilizando como disolvente acetona. Se registran las densidades ópticas obtenidas las cuales corroboran las curvas de crecimiento de dicha cinética

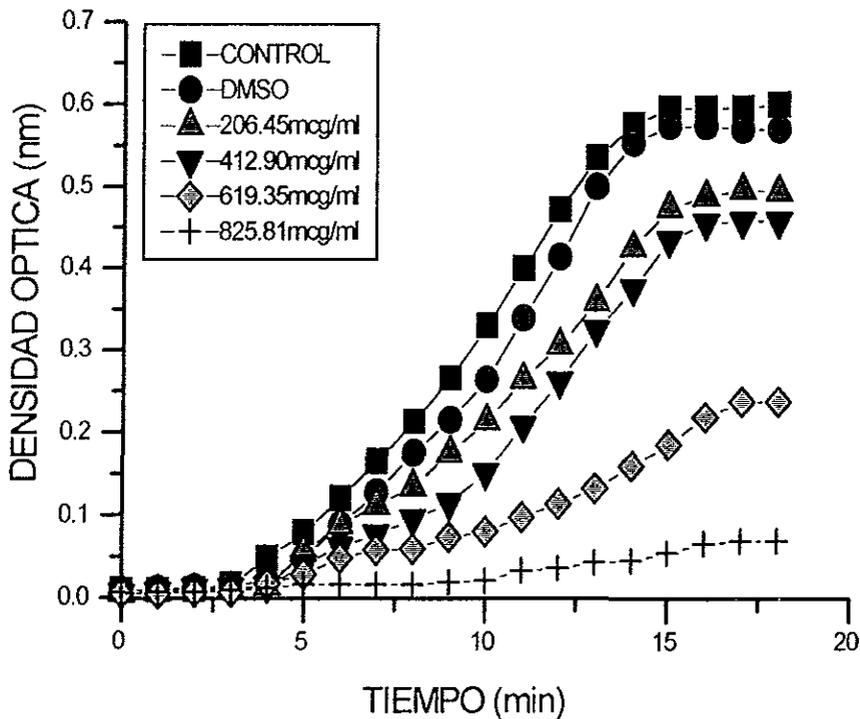
Tabla 7 Análisis del área bajo la curva de la Cinética de la figura 3.

Carba metoxi- IV + acetona	Area bajo la curva	% de muestra (células muertas)
Control	4.285	0
Control + acetona	3.469	19.04
12.90µg	3.110	27.34
51.61µg	2.911	32.05
103.22µg	2.602	39.28
206.45µg	2.260	47.25
412.90µg	1.360	68.25

El análisis del área bajo la curva de las Cinéticas de crecimiento para *E. coli* ATCC 10536 con las diferentes concentraciones de los fenil carbamatos de etilo, se obtuvo a partir del programa Origin. En la tabla anterior se estudia el área bajo la curva para la cinética con Carba metoxi-IV utilizando acetona como disolvente.

Figura 4. Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 utilizando Carba metoxi-IV y DMSO como disolvente.

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO CARBA METOXI-IV + DMSO



En la figura 4 se observa la curva de crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 con diferentes concentraciones de Carba-metoxi IV utilizando como disolvente al DMSO. Se muestra la curva obtenida de las lecturas de las D.O. graficadas contra tiempo

Tabla 8. Resultados de la Cinética de crecimiento de la figura 4.

T(min)	Control	DMSO	206.45	412.9	619.35	825.8
20	0.010	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006
40	0.010	0.012	0.008	0.008	0.006	0.008
60	0.011	0.014	0.010	0.012	0.008	0.008
80	0.017	0.015	0.012	0.013	0.008	0.010
100	0.049	0.023	0.015	0.015	0.018	0.013
120	0.080	0.049	0.056	0.041	0.029	0.017
140	0.121	0.089	0.089	0.062	0.049	0.017
160	0.166	0.128	0.113	0.078	0.059	0.017
180	0.214	0.176	0.135	0.096	0.060	0.017
200	0.267	0.216	0.175	0.115	0.074	0.020
220	0.331	0.265	0.215	0.151	0.081	0.022
240	0.400	0.340	0.265	0.209	0.098	0.034
260	0.472	0.414	0.307	0.263	0.114	0.037
280	0.536	0.500	0.360	0.326	0.133	0.044
300	0.576	0.554	0.426	0.376	0.160	0.046
320	0.596	0.574	0.474	0.435	0.186	0.055
340	0.596	0.574	0.488	0.456	0.220	0.067
360	0.596	0.570	0.496	0.458	0.239	0.070
380	0.600	0.570	0.494	0.458	0.239	0.070

En la tabla 8 se muestran las densidades ópticas del estudio de *E. coli* con Carba metoxi-IV utilizando DMSO como disolvente.

Tabla 9. Análisis del área bajo la curva de la Cinética de la figura 4.

Carba metoxi-IV +DMSO	Area bajo la curva	% de muestra (células muertas)
Control	5.334	0
Control + DMSO	4.802	10
206.45µg/ml	3.894	27
412.90µg/ml	3.345	37.28
619.35µg/ml	1.664	68.8
825.80µg/ml	0.540	89.8

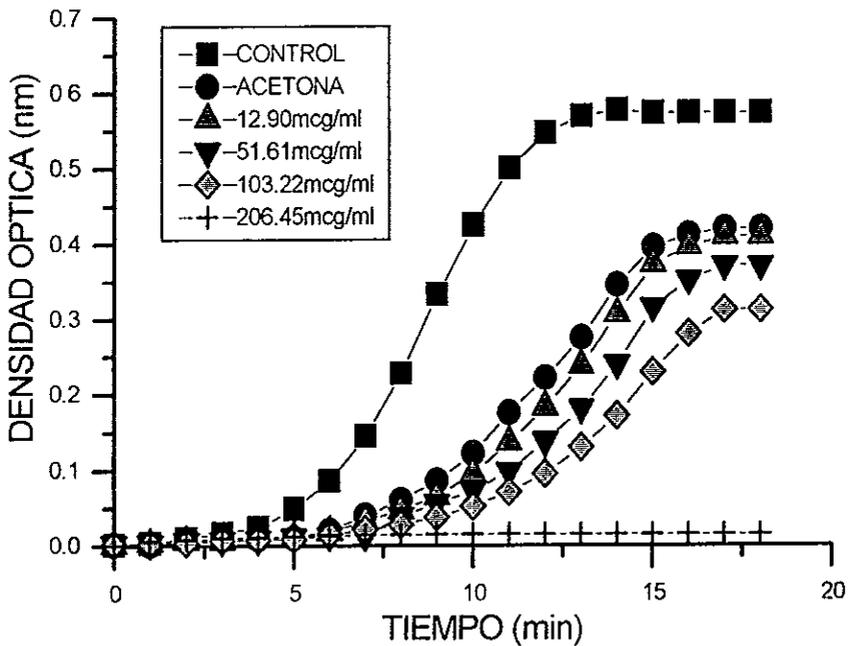
Análisis de la Cinética de crecimiento de *E.coli* ATCC 10536 utilizando diferentes concentraciones de Carba-metoxi por medio del área bajo la curva y del porcentaje de células muertas obtenidas para cada concentración del producto.

TABLA 10. Comparación de los disolventes utilizados sobre el efecto de inhibición en la Cinéticas de crecimiento de *E. coli* con Carba-metoxi.

% DE DISMINUCIÓN DEL AREA BAJO LA CURVA	
DMSO	ACETONA
↓10%	↓19.04%

Figura 5. Cinética de Crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 utilizando Carba C-II a diferentes concentraciones, y acetona como disolvente.

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO CARBA C-II + ACETONA



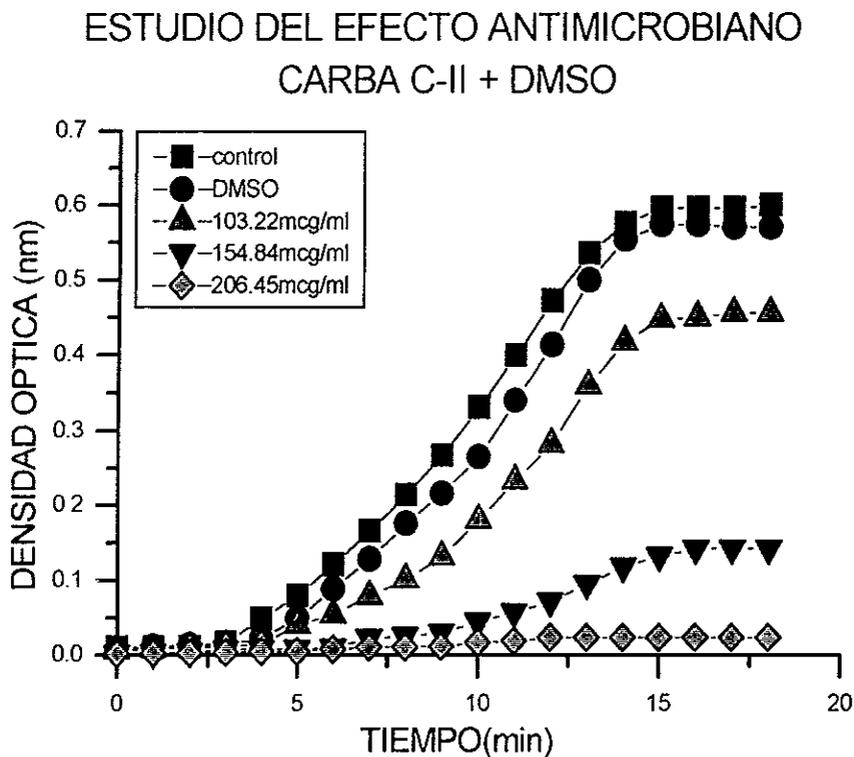
En la figura 5 se evalúa el área bajo la curva de la Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 10536, en presencia de Carba-C II a diferentes concentraciones utilizando acetona como disolvente. Se observa la curva obtenida de la lectura de las D.O. graficadas contra tiempo.

Tabla 11. Resultados de la Cinética de crecimiento de la figura 5.

T(min)	Control	Acetona	12.90	51.61	103.22	206.45
20	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.001
40	0.003	0.001	0.003	0.003	0.003	0.006
60	0.010	0.007	0.006	0.006	0.004	0.008
80	0.017	0.008	0.006	0.007	0.007	0.010
100	0.024	0.009	0.010	0.008	0.008	0.011
120	0.049	0.010	0.012	0.011	0.009	0.012
140	0.086	0.020	0.018	0.013	0.015	0.013
160	0.145	0.040	0.033	0.026	0.021	0.014
180	0.227	0.060	0.047	0.039	0.028	0.014
200	0.333	0.086	0.065	0.056	0.038	0.015
220	0.425	0.122	0.095	0.073	0.052	0.015
240	0.500	0.175	0.136	0.098	0.071	0.015
260	0.546	0.221	0.182	0.138	0.095	0.015
280	0.568	0.275	0.237	0.180	0.130	0.015
300	0.576	0.345	0.306	0.239	0.171	0.015
320	0.572	0.396	0.373	0.315	0.229	0.015
340	0.572	0.412	0.396	0.352	0.280	0.015
360	0.572	0.420	0.410	0.371	0.312	0.015
380	0.572	0.420	0.410	0.371	0.312	0.015

En la tabla 11 se observan las densidades ópticas del estudio de *E. coli* ATCC 10536 con Carba C-II utilizando como disolvente acetona.

Figura 6. Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 utilizando Carba C-II y DMSO como disolvente.



En la figura 6 se evaluó la Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 con el Carba C-II a diferentes concentraciones en presencia de DMSO como disolvente, se muestra la curva obtenida de las D.O. y graficadas contra tiempo.

Tabla 12. Resultados de la Cinética de crecimiento de la figura 6.

T(min)	Control	DMSO	103.22	154.84	206.45
20	0.010	0.008	0.006	0.002	0.002
40	0.010	0.012	0.008	0.003	0.003
60	0.011	0.014	0.010	0.004	0.003
80	0.017	0.015	0.012	0.007	0.004
100	0.049	0.023	0.015	0.008	0.005
120	0.080	0.049	0.040	0.009	0.005
140	0.121	0.089	0.054	0.010	0.008
160	0.166	0.128	0.079	0.023	0.011
180	0.214	0.176	0.101	0.026	0.011
200	0.267	0.216	0.131	0.030	0.012
220	0.331	0.265	0.180	0.045	0.017
240	0.400	0.340	0.233	0.057	0.019
260	0.472	0.414	0.282	0.072	0.024
280	0.536	0.500	0.360	0.095	0.024
300	0.576	0.554	0.418	0.118	0.024
320	0.596	.0574	0.448	0.133	0.024
340	0.596	0.574	0.450	0.142	0.024
360	0.596	0.570	0.456	0.142	0.024
380	0.600	0.570	0.456	0.142	0.024

En la tabla 12 se muestran los datos obtenidos del estudio de *E. coli* con Carba C-II utilizando DMSO como disolvente, registrados en densidades ópticas.

TABLA 13. Análisis del área bajo la curva de la cinética de la figura 6.

Carba C -II+DMSO	Area bajo la curva	% de muestra (células muertas)
Control	5.334	0
Control + DMSO	4.802	10
103.22µg/ml	3.508	34.24
154.84µg/ml	0.996	81.33
206.45µg/ml	0.255	95.22

Area bajo la curva de la cinética de *E. coli* ATCC 10536 con Carba C-II utilizando DMSO como disolvente.

Resultados obtenidos a partir de las Cinéticas de crecimiento a diferentes concentraciones tomando muestras a los 120, 240 y 360 minutos para determinar el rango de la CMI.

TABLA 14. Cuenta viable (UFC / ml) de *E. coli* ATCC 10536 en presencia de Carba metoxi-IV utilizando DMSO como disolvente.

Control	Control + DMSO	206.45 µg/ml **	412.90 µg/ml **	619.35 µg/ml **	825.80 µg/ml **	MINUTOS
8 x 10 ⁵	71 x 10 ⁵	70 x 10 ⁵	48 x 10 ⁵	40 x 10 ⁵	14 x 10 ⁵	120
35 x 10 ⁶	50 x 10 ⁶	41 x 10 ⁶	34 x 10 ⁶	28 x 10 ⁶	92 x 10 ⁵	240
57 x 10 ⁶	54 x 10 ⁶	46 x 10 ⁶	45 x 10 ⁶	32 x 10 ⁶	0	360

TABLA 15. Cuenta viable (UFC / ml) de *E. coli* ATCC 10536 en presencia de Carba C-II utilizando DMSO como disolvente.

Control	Control + DMSO	103.22 µg/ml **	154.84 µg/ml **	206.45 µg/ml **	MINUTOS
80 x 10 ⁵	71 x 10 ⁵	41 x 10 ⁵	13 x 10 ⁵	8 x 10 ⁵	120
35 x 10 ⁶	50 x 10 ⁶	36 x 10 ⁶	60 x 10 ⁵	13 x 10 ⁵	240
57 x 10 ⁶	54 x 10 ⁶	40 x 10 ⁶	63 x 10 ⁵	0	360

Control = medio de cultivo + bacteria

Control + DMSO = medio de cultivo + bacteria + dimetil sulfóxido

**** Las concentraciones + medio de cultivo + bacteria.**

7.4 DETERMINACIÓN DE LA CMI UTILIZANDO LA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD POR DILUCION EN CALDO

Tabla 16. Determinación de CMI por medio de la técnica de dilución en tubo, utilizando Carba metoxi-IV.

Carba metoxi-IV (mg/ml)	Turbidez	Crecimiento en placa (UFC)
1) Control	Turbio	Incontables
2) 0.62	Turbio	210
3) 0.65	No turbio	230
4) 0.68	No turbio	190
5) 0.71	No turbio	190
6) 0.74	No turbio	200
7) 0.77	No turbio	170
8) 0.80	No turbio	120
9) 0.83	No turbio	80

Concentraciones obtenidas a partir de las Cinéticas de crecimiento.

Tabla 17. Determinación de la CMI por medio de la técnica de dilución en tubo, utilizando Carba C-II.

Carba C-II (mg/ml)	Turbidez	Crecimiento en placa (UFC)
1) Control	Turbio	310
2) 0.15	No turbio	250
3) 0.16	No turbio	230
4) 0.17	No turbio	180
5) 0.18	No turbio	150
6) 0.19	No turbio	120
7) 0.20	No turbio	80
8) 0.21	No turbio	50

Concentraciones obtenidas a partir de las Cinéticas de crecimiento.

VIII

DISCUSSION

DISCUSION

Debido al incremento de cepas microbianas a presentar resistencia a ciertos agentes antimicrobianos.⁽⁵⁾ el presente trabajo se realizó con el fin de evaluar, los fenil carbamatos de etilo como agentes antimicrobianos.

Los fenil carbamatos de etilo evaluados son compuestos aromáticos sintetizados por el grupo de Angeles, A.E., et al. (3), los cuales presentaron solubilidad en acetona y dimetilsulfóxido (DMSO) (Tabla 2). La solubilidad de estos compuestos presentada con los disolventes mencionados, permitió encontrar al disolvente que facilitará la preparación de los sensidiscos utilizados en la técnica de difusión en caja.

Con las pruebas de susceptibilidad realizadas a los siete fenil carbamatos de etilo, las cepas utilizadas presentaron resistencia cuando la cantidad utilizada de los productos fue de 500µg (Tabla 3), no obstante al utilizar una cantidad de 2000µg, los productos Carba-C (II), Carba-Cl (III), Carba-metoxi (IV) y Carba-OH (VII), mostraron actividad antimicrobiana (Tabla 4). Las pruebas de susceptibilidad realizadas mostraron que son pruebas dependientes de la concentración de los fenil carbamatos de etilo.

La actividad antimicrobiana del producto VII se manifesto en un 89% de las cepas utilizadas además de presentar los mejores halos de inhibición con respecto al resto de los productos evaluados en esta prueba. Los productos II, III y IV, mostraron una actividad del 72, 56 y 45% respectivamente.

Por otro lado se realizaron cinéticas de crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 utilizando Carba-C (II) y Carba-metoxi (IV) para determinar inhibición en el crecimiento.

El producto Carba-metoxi (IV) presentó inhibición en el crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 dependiente de la concentración, utilizando a la acetona y DMSO como disolventes (Figura 3 y 4 respectivamente).

En adición se observa que durante la fase lag de crecimiento bacteriano no muestra una diferencia significativa en el crecimiento empleando diferentes concentraciones de los fenil carbamatos de etilo con respecto al control. Sin embargo a partir de la mitad de la fase log (~160 min.), se muestra que la diferencia entre estas cinéticas es más notable (Figura 3 y 4).

El estudio del área bajo la curva puede establecer de manera cuantitativa que este producto ofrece una mayor inhibición cuando el disolvente utilizado es acetona (Tabla 8 y 10), esto demuestra que la acetona tiene efecto sobre el crecimiento de *E. coli* siendo del 19.04 %, con respecto a un 10% de DMSO (Tabla 2). Asimismo el producto Carba-C (II) presentó una inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 dependiente de la concentración y del disolvente empleado (Figura 5 y 6).

Con el fin de determinar la CMI de los productos Carba-C (II) y Carba-metoxi (IV), se realizaron cuentas viables a partir de las cinéticas de crecimiento de *E. coli*, utilizando DMSO como disolvente.

Obteniéndose para Carba-metoxi (IV) el rango de 619.35 μ g/ml - 825 81 μ g/ml (Tabla 13) y para Carba-C (II) 150 μ g/ml - 206.45 μ g/ml (Tabla 14).

Para realizar las pruebas de dilución en tubo se tomaron los rangos de concentración de cada carbamato obtenidos anteriormente.

Las CMI del producto (II) y (IV) fueron 150 μ g/ml y 650 μ g/ml (Tabla 15 y 16).

IX

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los siete fenil carbamatos de etilo.

Se determinó que los productos Carba-C, Carba-Cl, Carba-metoxi y Carba-OH, presentan actividad antibacteriana con la mayoría de las cepas utilizadas, evaluadas por el método de difusión en caja (Kirby-Bauer).

Por medio de técnicas turbidimétricas se logró determinar para Carba-C (II) y Carba-metoxi (IV), disueltos en DMSO, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 150 μ g/ml y 650 μ g/ml respectivamente para *E.coli* ATCC 10536.

X

REFERENCIAS.

REFERENCIAS.

- 1 Alexander, J. 1996 Investigation of (Oxodioxolenyl) methyl carbamates as nonchiral bioreversible prodrug moieties for chiral amines. *J-Med-Chem* 19; **39** (2): 480-6
- 2 Stretwieser, A Jr. (1985). *Química Orgánica*, Edit. Iberoamericana. México.
- 3 Ángeles, A E., Santillán, A , Martínez, Y., Ramírez, A., Moreno, E., Salmón, M y Martínez, R. (1994). A simple method for the synthesis of carbamates *Synthetic Communications*. (**24 17**), 2441-2447.
- 4 Bevan, J. A. (1982). *Fundamentos de Farmacología*. **2a ed.** Edit.Harla, México. 826pp.
5. Chen, Mei, Y. and Livermore, D. (1995) Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J. Medical Microbiol.* **43**, 300-309.
6. Comley, JC. (1995). Antipneumocystis activity of 17C91, a prodrug of atovaquone. *Antimicrob-Agents-Chemother.* **39**(10): 2217-9
7. Craig, Ch R. (1985). *Farmacología Médica*. Edit. Interamericana, México, 1082pp.
- 8 Dailey, JW.(1995).Anticonvulsant properties of D-20443 in genetically epilepsy-prone rats: prediction clinical response. *Neurosci-Lett.* **195**(2):77-80.
- 9 Fessenden. (1983). *Química Orgánica*. Edit. Iberoamericana Argentina. p.651
- 10 AMYES and C. G. GEMMELL (1997). Edited by Antibiotic Resistance. *J. Medical Microbiol.* **46**. 436-470.
- 11 Goodman, L.(1978) *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, **4a ed.** Edit. Interamericana, México. 1412pp

12. Gregan, F. (1995). Synthesis of esters of aliphatic and aromatic carbamic acids. A comparative study of properties and local anesthetic activity of these compounds *Boll-Chim-Farm.* **134**(8): 454-8
13. Jawetz, E. (1983). *Microbiol. Médica.* Edit. El Manual Moderno. Méx. 584pp.
14. Johnson, Louise B., et al. (1994) Gentamicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* encoded by genes of veterinary origin. *J. Medical Microbiol.* **40**, 221-226.
15. Kamigiri, K., (1996). Kalimantacins A, B and C, novel antibiotics from *Alcaligenes* sp. YL-02632S.I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot-Tokyo.* **49** (2): 136-9.
16. Katzung, B. (1984). *Farmacología Básica y Clínica.* Edit. El Manual Moderno. México 866pp.
17. Koneman, E. (1989). *Diagnostico Microbilológico.* Edit. Médica Panamericana. México, 534pp.
18. Lennette, E. (1987). *Manual of Clinical Microbiology.* **4a ed.** Edit. American Society for Microbiology. Washington. 1408pp.
19. Mac Faddin. (1990). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* Edit. Médica Panamericana. México, D.F. pp 301.
20. Guadalupe Fuentes, H. (1996). *Diseño de Fármacos, síntesis y actividad biológica.* Análisis y Evaluación Antimicrobiana de productos obtenidos de *Parmelia flaventior.* FES-Cuautitlán UNAM. 44pp.
21. Marin, A (1992) Synthesis and anthelmintic activity of carbamates derived from imidazo thiazole and imidazo thiazole. *Farmacología*; **47**: 63-75.
22. *Medical Microbiol.* (1994), Editorial. Chromosomally-mediated antibiotic resistance and virulence. **40** 305-306.

23. Mitani. (1995). Biological properties of fungitoxic propargyl N-(6-ethyl-5-iodo-2-pyridyl) carbamate. *J. Pestic. -SCI.,-JAPAN.* **20**, 153-160.
24. Mlynarcik, D (1991). Effect of piperidinoethylesters on n-alkoxyphenylcarbamic acids on bacterial cells. *Cesk-Farm*; **40**:25-28.
25. NCCLS. (1993). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Fifth Edition. Approved Standard. Document M2-45, **13** No.24.
26. NCCLS. (1994) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. Document M-100-55 **14** No.16.
27. Odilón, A. S. (1993) *Síntesis de Carbamatos a partir de aminas aromáticas*. FES-Cuautitlán UNAM. 59pp
28. Poppano N. B., S. E. Blanco, N. D. Debattista y F. H. Ferretti (1987). Cinética microbiana: experiencias con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y drogas bacteriostáticas. *Rev. Lat. Microbiol.* **29**, 4:367-3
29. Racanska, E. (1990) Pharmacological evaluation of new alkylesters of 4-((2-hydroxy-3-alkylamino) propoxi) phenylcarbamic acids with beta- adrenergic properties. *Pharmazie*, **45**:851-853.
30. Racanska, E. (1990). Effect of carbamate local anesthetics on artificial lipid membranes. *Pharmazie*; **45**: 684-685.
31. Rodrigues, RR. (1995). Chelating agent inhibition of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. *J. Inorg. Biochem.* **60** (4): 277-88.
32. Rossney, D.C. Coleman. (1994) Antibigram-resistogram typing scheme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Medical Microbiol.* **41**, 430-440.
33. Roy y M Tirado *Métodos para el estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos*. Instituto Municipal de Investigación Médica (Barcelona) y Microbiología Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. 9pp.

34. Schaechter, Medoff, et. al. (1994). Mecanismos de las enfermedades infecciosas. **2a** Ed. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 1000pp.
35. Stanier, R. Y. (1986). *Microbiología*. Ediciones REPLA, México, D.F. 836pp.
36. Stanley, E. M. (1991). *Toxicological Chemistry*. **4a ed.** Edit. Lewis Publishers, Inc. United States of América. 318pp.
37. Stehrer, Schmid, P. (1995) Genotoxic evaluation of three heterocyclic N-methylcarbamate pesticides using the mouse bone marrow micronucleus assay and the *Saccharomyces cerevisiae* strains D7 and D61 *Mutat-Res.* **345** (3-4): 111-25.
38. Tanaka, H. (1996). Effects of carbamate insecticides in a rat medium-term bioassay for hepatocarcinogens. *J. Toxicol Environ Health.* **5**; 47 (5): 493-8.
39. Tetz and Larisa L. Norman. (1994). Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents on virulence factors of *Shigella flexneri* 2a and *Escherichia coli* 0124.V.V. *J. Medical Microbiol.* **41** 279-281.
40. Zinsser. (1989). *Microbiología*. **18a**. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1454pp.