



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA QUE  
PRESENTAN BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA ANTE  
UNA SERIE DE 4-R-FENILCARBAMATOS DE METILO.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**BLANCA ESTELA CALDERON VARGAS**

ASESORES:

M. EN C. ALBERTO NATAHLIEL SOTO GUEVARA  
DR. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2002



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.



INSTITUTO NACIONAL  
SISTEMA DE  
EXAMENES

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Q. MA. DEL CARMEN GARCÍA MIJARES  
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 la TESIS:

"Estudio de la susceptibilidad antimicrobiana que presentan bacterias de importancia clínica ante una serie de 4-R-fenil carbamatos de metilo"

que presenta la pasante: Blanca Estela Calderón Vargas

con número de cuenta: 9912784-7 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

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

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI HAZAÑ HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 26 de Febrero de 2001

PRESIDENTE	<u>M. F. R. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Guisela Martínez Aguilar</u>	<u>7549</u>
SECRETARIO	<u>M. en C. Nathaniel Soto Guevara</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q. F. B. Rene Daniel Santos</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	<u>Químico Biólogo</u>

## DEDICATORIAS

*A MIS PADRES por su apoyo, dedicación y cariño.*

*A CARLOS gracias por todo lo que me has dado.*

*YADIRA eres lo más importante y preciado que tengo.*

*CLAUDIA gracias por escucharme y apoyarme.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A MIS ASESORES Y PROFESORES gracias por la paciencia y sus conocimientos.*

*A MIS COMPAÑEROS DE LA FESC por todos los momentos que pasamos juntos*

*ANGELICA DIAZ siempre te considere una de mis mejores amigas, pero ahora lo reitero. Gracias por tu amistad.*

*SANDRA BERNAL gracias por tu amistad y tu apoyo.*

## INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. GENERALIDADES	6
3.1. Carbamatos	6
3.1.1. Antecedentes	6
3.1.2. Aplicaciones y usos	7
3.2. Agentes antimicrobianos	10
3.2.1. Antecedentes	10
3.2.2. Mecanismos de acción	11
3.2.3. Resistencia a los agentes antimicrobianos	12
3.2.4. Indicaciones de los antimicrobianos	14
3.3. Actividad antimicrobiana "in vitro"	16
3.3.1. Antecedentes	16
3.3.2. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	17
4. HIPOTESIS	24
5. OBJETIVOS	25

5.1. Objetivo General	25
5.2. Objetivos Particulares	25
6. METODOLOGIA Y RESULTADOS	26
6.1. Diagrama de flujo	26
6.2. Carbamatos	27
6.3. Estudio Bacteriológico	29
6.3.1. Prueba de difusión con discos	31
6.3.2. Determinación de la CMI	35
6.3.3. Cinéticas de crecimiento	40
7. DISCUSION	51
8. CONCLUSIONES	57
9. REFERENCIAS	60
10. ANEXO	65

## INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Fig. 1. Estructura básica de los carbamatos	6
Fig. 2. Reacción general de la síntesis de los 4-R-fenilcarbamatos de metilo	27
Gráfica 1. Cinética de crecimiento de <i>Shigella spp.</i>	43
Gráfica 2. Cinética de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> ambiental ATCC 31221	46
Gráfica 3. Cinética de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> Inaba humana	49



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reportes de los usos y/o efectos de algunos carbamatos	8
Tabla 2. Clasificación de los 4-R-fenilcarbamatos de metilo.	27
Tabla 3. Propiedades físicas que se determinaron a los 4-R-fenilcarbamatos de metilo.	28
Tabla 4. Bacterias empleadas en el ensayo de susceptibilidad bacteriana ante los 4-R-fenilcarbamatos de metilo	30
Tabla 5. Resultados de los halos de inhibición (mm) en las bacterias probadas ante sensidiscos con 500 mcg de los productos.	33
Tabla 6. Resultados de los halos de inhibición (mm) de las bacterias probadas ante sensidiscos con 1000 mcg de los productos	34
Tabla 7. Resultados obtenidos de la CMI	37
Tabla 8. Resultados obtenidos de la CMB	38
Tabla 9. Resultados obtenidos de la CMI y la CMB en mcg/ml, para las bacterias seleccionadas ante diversas concentraciones del producto C4	39
Tabla 10. Resultados obtenidos (D.O) de la cinética de crecimiento de <i>Shigella spp.</i> ante diversas concentraciones del producto C4	42

Tabla 11. Resultados obtenidos del área bajo la curva de diferentes concentraciones del producto C4 ante <i>Shigella spp</i> .	44
Tabla 12. Cuentas viables (UFC/ml) de <i>Shigella spp.</i> en presencia del producto C4.	44
Tabla 13. Resultados obtenidos (D.O.) de la cinética de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> ambiental ATCC 31221 ante diversas concentraciones del producto C4	45
Tabla 14. Resultados obtenidos del área bajo la curva de diferentes concentraciones del producto C4 ante <i>Vibrio cholerae</i> ambiental ATCC 31221	47
Tabla 15. Cuentas viables (UFC/ml) de <i>Vibrio cholerae</i> ambiental ATCC 31221 en presencia del producto C4.	47
Tabla 16. Resultados obtenidos (D.O.) de la cinética de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> Inaba humana ante diversas concentraciones del producto C4.	48
Tabla 17. Resultados obtenidos del área bajo la curva de diferentes concentraciones del producto C4 ante <i>Vibrio cholerae</i> Inaba humana	50
Tabla 18. Cuentas viables (UFC/ml) de <i>Vibrio cholerae</i> Inaba humana en presencia del producto C4.	50

## ABREVIATURAS

Abs	abstract
aprox	aproximadamente
ATCC	American Type Cepas Colection
°C	grados centígrados
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
col.	colaboradores
CST	caldo soya tripticaseina
DMSO	dimetil sulfóxido
D. O.	densidad óptica
FDA	Food and Drug Administration
h	hora(s)
µg	microgramos
mg	miligramos
MH	Müller-Hinton
min.	minutos
µl	microlitros
ml	mililitros
mm	milímetros
NCCLS	National Comitte for Clinical Laboratory Standars
n/d	no determinado
nm	nanómetros
R	resistente
rpm	revoluciones por minuto
S	sensible
SNC	sistema nervioso central
SSF	solución salina fisiológica
UFC	unidades formadoras de colonia

## 1. RESUMEN

Esta tesis se llevo a cabo en la laboratorio de Microbiología Industrial (Microbiología 10) en la Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán, con el objetivo de determinar la posible actividad antimicrobiana que pudiesen presentar algunos derivados de los carbamatos (4-R-fenilcarbamatos de metilo), ante una serie de bacterias de importancia clínica Para lo cual se utilizaron pruebas de susceptibilidad microbiana

Se realizaron pruebas de difusión en agar con sensidiscos impregnados de los diferentes 4-R-fenilcarbamatos de metilo, determinandose si habia o no inhibición del crecimiento bacteriano, observando los halos que se formaron alrededor de los discos Así, determinamos que el producto que inhibió el crecimiento de más bacterias fue el C4, que es el que tiene el radical -OH

Por otro lado, se llevaron a cabo las pruebas de dilución en caldo y las cinéticas de crecimiento bacteriano con el producto C4 y con aquellas bacterias que resultaron más sensibles en la prueba de difusión en agar con sensidiscos

La prueba de dilución en caldo nos ayudó a determinar la CMI y la CMB del producto C4 con las bacterias que resultaron sensibles a la acción este (***V. cholerae*** ambiental ATCC 31221, ***V. cholerae*** Inaba humana y ***Shigella spp.***)

En cuanto a las cinéticas de crecimiento que se corrieron, se hizo un análisis de éstas y encontramos las concentraciones de C4 con efecto bacteriostático sobre las bacterias que se probaron (*V. cholerae* ambiental ATCC 31221, *V. cholerae* Inaba humana y *Shigella spp.*)

## 2. INTRODUCCION

Las infecciones son las enfermedades que, sin duda, han constituido uno de los principales azotes para la humanidad. El descubrimiento de las causas que originan las enfermedades infecciosas y el desarrollo de los métodos adecuados para su control se incluyen entre los logros más importantes de la ciencia médica (12) Entre estos métodos de control se encuentran el uso de diversos fármacos o principios activos.

En las civilizaciones más antiguas (como en las de China, India, Sudamérica, Mediterráneo, etc.), el hombre se enfrentó contra las enfermedades mediante el uso de plantas medicinales (47) Y al paso del tiempo se purificaron algunos principios activos naturales, y más tarde se estudiaron sus variaciones estructurales, (31) con lo que se desarrollaron métodos de síntesis de nuevos fármacos.

Los fármacos hoy en día son de origen natural (vegetal, animal o mineral) y un gran porcentaje son de origen sintético, algunos otros son semisintéticos, esto es, que se obtienen por modificación química de compuestos naturales (30) Por lo que, en los últimos años hay un gran interés en lo que se refiere al diseño de nuevos principios y al estudio de aquellas sustancias que puedan tener una aplicación terapéutica. Esto, se ha debido principalmente a que los

microorganismos han desarrollado mecanismos que los hacen resistentes a los agentes antimicrobianos (19); la causa principal de lo anterior es el uso indiscriminado que se les ha dado.

Como ya se mencionó, la mayoría de los medicamentos que se utilizan en la actualidad son de origen sintético, y por consecuencia muchos grupos de investigación están desarrollando diversos métodos de síntesis de productos químicos que tengan la posibilidad de ser una alternativa más en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas.

Se ha puesto gran atención a aquellas bacterias que se presentan con mayor frecuencia en las muestras clínicas de los laboratorios, estas son principalmente bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (3), las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran en agua, suelos, plantas y en el tubo digestivo de humanos y animales (25). Y también, muchas de éstas han desarrollado resistencia a los fármacos ya existentes

Los ensayos 'in vitro' para medir la actividad antimicrobiana determinan generalmente la sensibilidad de un microorganismo ante una cantidad conocida de un agente antimicrobiano (22)

Por lo tanto, la finalidad de esta tesis es determinar la actividad antimicrobiana que puedan presentar algunos derivados de los carbamatos, como lo son los 4-R-fenilcarbamatos de metilo sobre una serie de bacterias de importancia clínica (Gram negativas y Gram positivas), utilizando para ello pruebas de susceptibilidad ya normalizadas o establecidas, como las técnicas de difusión con discos y la macrodilución en tubos para determinar la CMI (27), (7) Así como la realización de cinéticas de crecimiento de bacterias susceptibles.

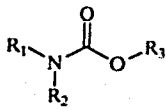


### 3. GENERALIDADES

#### 3.1. CARBAMATOS

##### 3.1.1. ANTECEDENTES

Los carbamatos también llamados uretanos, son compuestos orgánicos que tienen un grupo -NH<sub>2</sub>, NHR- ó -NR<sub>2</sub> unido a un grupo carbónilo de éster.(13). La estructura básica de los carbamatos es la siguiente (Fig.1)



R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, = H, Alquilo, arilo

Fig. 1 Estructura básica de los carbamatos.

El carbamato más simple es el ácido carbámico ( $R_1 = R_2 = R_3 = H$ ) (50). Al polimerizarse producen compuestos conocidos como poliuretanos, los cuales se han usado en diferentes áreas.

La mayor parte de los carbamatos se han obtenido por síntesis química, aunque algunos se han obtenido de fuentes naturales (como las bleomicinas que se obtienen del actinomiceto *Streptomyces verticillus*) (44), por lo que en la actualidad varios grupos de investigación se encuentran desarrollando métodos de síntesis de nuevos productos químicos que tengan utilidad práctica

La síntesis de los carbamatos se puede realizar a partir de

- a) Isocianatos
- b) Aminas
- c) Nitrilos, nitrenos, nitroaromáticos y cuprolitiados.

### 3.1.2. APLICACIONES Y USOS

La aplicación que se les ha dado a los carbamatos está vinculada con diversas áreas, por lo que, algunos de los reportes y estudios que se han realizado respecto a ellos, se exponen en la siguiente tabla

Tabla 1. Reportes de los usos y/efectos de algunos carbamatos

EJEMPLO	USOS Y/O EFECTOS	REFERENCIAS
CARBARIL Y ALDICARB	Pesticidas Inhibidores de la colinesterasa en ratones Toxicidad en peces	33,15
DERIVADOS CARBAMATOS	Pesticidas Inhibidores de la colinesterasa en aves	48,41
DERIVADOS CARBAMATOS	Pesticidas e insecticidas	34,45,43,28,35
PIRIPROXIFENO	Pesticida	37
CARBOFURAN	Insecticida y nematocida Inhibidor de la colinesterasa	26, 21
DERIVADOS CARBAMATOS	Inhibidores de la colinesterasa en organismos acuáticos	14
METOMIL (TIODICARB) Y CARBARIL	Pesticidas Se han hallado en frutas y vegetales.	1
BENFUCARB, CARBOSULFAN, CARBOFURAN	Pesticidas	52
ALDICARB	Insecticida que se usa como rodenticida	29
TERBUCARB	Herbicida	51
TIOCARBAMATOS	Herbicidas Inhibidores de la aldehidodeshidrogenasa en raton	40
PROPARGYL	Fungicida (Interfiere con la división celular de <i>Botrytis cinerea</i> )	32
BENOMIL	Fungicida (interfiere con la mitosis) Tiene efectos	8

	de:neurotóxico, hepatóxico, teratogénico, mutagénico y carcinogénico en ratas, conejos y ovejas	
DERIVADOS CARBAMATOS 3-(1H-imidazol-4-1)propanol	Antagonistas de los receptores de la histamina	49
DERIVADOS CARBAMATOS	Antagonistas y agonistas de los receptores leucocitarios de los N-formilpéptidos	11
ALKIL CARBAMATOS	Aumentan la permeabilidad de las membranas biológicas	2
DERIVADOS CARBAMATOS	Inhibidores de la proteasa, la colinesterasa y la elastasa.	46
MEBENDAZOL (N-(5-Benzoil-2-benzimidazolil) carbamato de metilo.	Anthelmintico de amplio espectro	44
MEOLATO Carbamato de clofenceno	Usado para el tratamiento del mal de Parkinson	44
ETINIMATO Carbamato de 1-etinilciclohexano	Usado en medicamentos que deprimen el SNC en forma selectiva	6
DERIVADOS CARBAMATOS	Usados como preservativos de pinturas vinilicas, mostrando resistencia a <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> y <i>Alternaria</i> .	24
POLIURETANOS	Antimicrobianos, se encuentran en catéteres principalmente	10

### 3.2. AGENTES ANTIMICROBIANOS

#### 3.2.1. ANTECEDENTES

Los siglos XVIII y comienzos del XIX, pueden considerarse decisivos para el desarrollo de la Química; ya que, en ese período se sientan las bases del estudio de los principios activos de las plantas que muchas veces se utilizaron empíricamente desde tiempos remotos para el alivio de enfermedades. Los extractos de tales plantas presentaban limitaciones como escasa uniformidad, adulteraciones, dosificación variable, sustancias con distintos efectos y reacciones secundarias. (31)

Con el aislamiento y purificación de los principios activos se eliminaron muchos problemas, excepto la dependencia con la planta, lo que condujo a la síntesis química. Sin embargo, esto no siempre fue posible, por lo que surgiría así la modalidad de la variación estructural, que tiene vigencia actual. Resultando de esto, el descubrimiento de los más potentes y eficaces medicamentos.

Muchos de los agentes antimicrobianos utilizados hoy en día, tienen origen sintético o semisintético, y se pueden definir de dos formas, dependiendo de la acción que tengan (22)

a) **Bacteriostático:** Que tiene la capacidad de inhibir la multiplicación bacteriana; la cual se reanuda cuando es retirado el agente.

b) **Bactericida:** Tiene la propiedad de matar bacterias. Es irreversible, o sea que el organismo muerto no puede reproducirse aunque sea retirado del contacto con el agente.

### 3.2.2. MECANISMOS DE ACCION

Los agentes antimicrobianos pueden afectar de formas muy diversas a los microorganismos, pero se pueden generalizar de la siguiente forma (19),(22),(30)

a) **Compuestos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana.** Por ejemplo: las penicilinas, cefalosporinas, bacitracina y cicloserina actúan así

b) **Compuestos que actúan de modo indirecto en la membrana celular del microorganismo y que afectan su permeabilidad permitiendo la fuga de compuestos intracelulares.** Como la polimixina B, colistina, nistatina y anfotericina B.

c) **Inhibición de la síntesis proteica.** Algunos compuestos actúan sobre los ribosomas bloqueando la síntesis de proteínas (Cloranfenicol, tetraciclinas, estreptomicina y demás aminoglucósidos, rifampicina, lincomicina y eritromicina).

d) Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos. Un ejemplo es la griseofulvina.

e) Antagonismo químico. Cuando un agente químico interfiere en la reacción normal entre una enzima específica y su sustrato. Las sulfonamidas utilizan la enzima que normalmente actúa sobre el ácido *para*-aminobenzoico (metabolito esencial bacteriano) e impiden la metabolización de éste último con la consiguiente inhibición del crecimiento bacteriano.

Es probable que surjan nuevas categorías conforme se esclarezcan más mecanismos complejos, pero aún en la actualidad se desconoce el mecanismo exacto de acción de algunos agentes antimicrobianos.

### 3.2.3. RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Cuando menos el 30% de todos los pacientes hospitalizados en la actualidad recibe uno o más ciclos terapia con antimicrobianos y los compuestos de esta categoría han curado millones de infecciones que pudieron haber sido letales. Sin embargo, al mismo tiempo, tales compuestos son de los más erróneamente utilizados. El resultado de su amplia utilización ha sido la aparición de microorganismos patógenos resistentes a ellos y esto a su vez ha creado la necesidad cada vez mayor de contar con nuevos fármacos.

Para que un antimicrobiano sea eficaz debe llegar al sitio predeterminado blanco y unirse a él. Los microorganismos pueden ser resistentes porque:

- a) El fármaco no llegue a su objetivo
- b) El medicamento sea inactivado.
- c) Se altere el objetivo.

Algunas bacterias producen enzimas que están en la superficie celular o dentro de la célula y que inactivan el antimicrobiano. Otras tienen membranas impermeables que impiden la penetración del medicamento. Los antimicrobianos hidrófilos atraviesan la membrana exterior de los microorganismos por medio de conductos o canales acuosos compuestos por proteínas específicas (porinas), las bacterias con deficiencia de dichos conductos pueden ser resistentes a los antimicrobianos mencionados. Otras no poseen sistemas de transporte que se necesitan para la penetración del fármaco dentro de la bacteria. Muchos antimicrobianos son ácidos orgánicos y por ello su penetración puede depender del pH; además, factores como osmolalidad o cationes en el medio externo, pueden alterar la penetración. El transporte de algunos fármacos depende de energía y por ello no son activos en condiciones anaeróbicas.

Una vez que el fármaco ha llegado al sitio predeterminado debe ejercer un efecto nocivo para el microbio patógeno. La variación natural o los cambios



adquiridos en el "blanco" que impidan la acción o la unión del fármaco pueden culminar en resistencia.(19)

Tal resistencia puede ser adquirida (si el microorganismo está inactivo en su metabolismo o pierde la estructura de blanco específico para un agente) o genética (mutaciones) (22)

La resistencia bacteriana, es de fundamental importancia clínica, así el mejor método actualmente para prevenir el desarrollo de dicha resistencia es el de Ehrlich: actuar rápidamente con fármacos potentes que exterminen todos los microbios lo antes posible, preferentemente con una dosis y así no habrá tiempo de que se produzca y se manifieste alguna mutación (30)

### 3.2.4. INDICACIONES DE LOS ANTIMICROBIANOS

Respecto a las indicaciones de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades se han establecido dos parámetros (si el tiempo lo permite)

a) Usar el antimicrobiano que ha de destruir el microorganismo que produce la infección Por lo que se requiere un diagnóstico clínico y bacteriológico para que la terapéutica sea apropiada siendo necesaria muchas veces la determinación de la sensibilidad o susceptibilidad de los microorganismos a los

antimicrobianos, es decir, el antibiograma. Una vez realizado esto, se elegirá el antimicrobiano más potente, el de menor toxicidad, y si es posible, el más económico.

b) Asegurar el acceso del antimicrobiano al microorganismo infeccioso. No es lo mismo un estado septicémico donde las bacterias en sangre y tejidos blandos no ponen obstáculo a la llegada del fármaco, que la presencia de un absceso rodeado de una capa avascular que impide el acceso del fármaco.

Muchas veces un tratamiento aparentemente bien realizado puede fracasar debido a varias razones: resistencia bacteriana, microorganismos persistentes, defensas orgánicas defectuosas (diabetes, vejez), mala absorción del fármaco (vómito o diarrea), inactivación de la flora normal, o una mala absorción del antimicrobiano en los tejidos.

Uno de los peligros del uso indiscriminado de los antimicrobianos es la aparición de reacciones adversas: reacciones tóxicas por sobredosis (poco comunes), reacciones de sensibilización alérgica e infecciones sobreagregadas (que se desarrollan por la supresión de microorganismos sensibles y el crecimiento excesivo de los que son resistentes) **(30)**

### 3.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA "IN VITRO"

#### 3.3.1. ANTECEDENTES

El uso "*in vitro*" de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos son un intento para determinar el grado de actividad de agente antimicrobiano frente a un microorganismo infeccioso, proporcionando así una ayuda indispensable para decidir la quimioterapia correcta (ya sea que el patógeno no es predecible o que el proceso infeccioso no responde al tratamiento empírico), además de conocer la sensibilidad de patógenos nuevos, así como la actividad de nuevos preparados

El estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos es necesario porque el espectro de actividad de los preparados es limitado y las bacterias tienen la capacidad de desarrollar resistencia. (42)

Los primeros ensayos para cuantificar la potencia antibacteriana de una sustancia fueron realizados por Fleming en 1924, al evaluar el efecto de diferentes antisépticos y en 1929 estableció el principio de la prueba de susceptibilidad por difusión en agar al depositar al agente antibacteriano en un orificio cilíndrico hecho en el agar y midiendo su potencia según el diámetro del halo de inhibición del crecimiento del organismo (39) Luego en 1961, la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló la necesidad de regularizar los métodos empleados por los Laboratorios Clínicos para la determinación de la

susceptibilidad antimicrobiana (18), en los Estados Unidos la Food and Drug Administration (FDA) en 1971, escogió la prueba de susceptibilidad en discos de papel filtro descrita originalmente por Bauer y col. en 1966 (donde publicaron los criterios unificadores de esta prueba) (4) y la recomendó específicamente en 1972.

Debido a la importancia de obtener resultados confiables y reproducibles, existen en la actualidad metodologías que se aceptan como referencia (después de algunas modificaciones) y que son representadas por el NCCLS.

### 3.3.2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Existen diversas técnicas para efectuar las pruebas de susceptibilidad:

#### A. Pruebas de dilución.

A.1. En agar

A.2. En medio líquido

#### B. Prueba de difusión en agar o sensidiscos.

#### C. Automatizadas

## A. Pruebas de dilución.

Las pruebas por dilución se usan para determinar la concentración mínima de un antimicrobiano necesaria para matar o inhibir un microorganismo. Estas pruebas derivan de las recomendaciones del International Collaborative Study o de las normas propuestas por el NCCLS (27)

La técnica de dilución está diseñada y estandarizada para el estudio de la sensibilidad de bacterias aerobias de crecimiento rápido, en medios no enriquecidos y que crecen bien en atmósfera ordinaria. Sobre todo se emplea para el estudio de la actividad de nuevos preparados (42)

### A.1. Dilución en agar.

En este método se incorporan distintas concentraciones del agente antimicrobiano (diluciones dobles en forma progresiva), en placas con agar (MH) para bacterias aerobias y anaerobias facultativas de crecimiento rápido. se usa una placa para cada dilución. El microorganismo en estudio se diluye (en CST) hasta obtener una suspensión con una turbidez igual a la del estándar 0.5 de Mac Farland, y se coloca una gota sin extender de esta suspensión sobre la superficie del medio sólido que ya contiene una concentración determinada del antimicrobiano que se prueba. Luego de la incubación, se determina la CMI que

representa la menor concentración de antimicrobiano capaz de producir inhibición total. (27),(3),(39)

Esta técnica tiene diversas ventajas. Se pueden probar varias cepas simultáneamente, tiene la capacidad de detectar contaminación microbiana y es reproducible. La única desventaja sería que, no puede determinarse la CMB.

#### A.2. Dilución en caldo

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por dilución en caldo han sido empleadas durante décadas y representan sólo una modificación menor del método de dilución en agar. sin embargo, algunas características son exclusivas de las pruebas de caldo. La prueba de susceptibilidad por dilución en caldo fue utilizada primero en tubos grandes, el cual se estandarizó hasta finales de 1977, y después se popularizó el procedimiento de dilución en caldo con volúmenes menores de 1 ml (27)

Este método proporciona un resultado cuantitativo de la concentración del agente antimicrobiano necesario para inhibir el desarrollo de un organismo dado. (3) Así mismo este método sirve para determinar la susceptibilidad "in vitro" de un microorganismo a un antibiótico (16)

En este método se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones al medio de factor 2 (1:2), en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El caldo más comúnmente usado para esta prueba es el de Mueller-Hinton (3). El último tubo no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento. Luego se prepara un inóculo ajustándolo a un estándar de turbidez (0.5 de Mc Farland). Añadir a cada tubo el inóculo ajustado e incubar (39), (27). Después del periodo de incubación se determina la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que se lee como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible del microorganismo (16),(27),(38). Si se desea se puede determinar la Concentración Bactericida o Letal Mínima (CMB), subcultivando a un medio sólido libre de antibióticos el contenido de los tubos en que no se observó crecimiento y después de un periodo adicional de incubación la CMB será la dilución más baja que haya impedido el desarrollo de colonias (39)

#### Prueba de difusión en agar.

Esta prueba también conocida como de difusión en disco o antibiograma, fue descrita inicialmente por Bauer y col. en 1966 (4) y es la más utilizada en la actualidad por los laboratorios de microbiología clínica (9)

Esta técnica se ha estandarizado principalmente para probar patógenos bacterianos comunes de crecimiento rápido como los miembros de la familia Enterobacteriaceae y *Staphylococcus aureus*, que muestran velocidades de crecimiento constantes si se prueban en condiciones de estandarización (27)

En este método se trata de ensayar la sensibilidad de una cepa haciéndola crecer en placas de agar Mueller-Hinton, este medio garantiza condiciones favorables de crecimiento, donde se depositan discos de papel filtro impregnados con una cantidad conocida del antimicrobiano a probar. Se siembra la superficie de la placa con una suspensión igualada al estándar 0.5 de Mc Farland de la bacteria problema en forma masiva utilizando un hisopo estéril. se deja secar la placa de 3 a 5 min, a continuación se colocan los discos lo bastante separados entre sí para impedir la superposición de las zonas de inhibición y después de 15 min. de aplicar los discos se incuba. Después de 16 a 18 hrs de incubación se examinan las placas, si la bacteria es sensible al antimicrobiano, aparecerá un halo de inhibición alrededor del disco el cual se mide con precisión de 1 mm (42)

(27) El diámetro de la zona de inhibición tiene una relación inversamente lineal con la CMI, ya que, a mayor zona de inhibición mayor será la susceptibilidad del organismo y, en consecuencia, la concentración necesaria del antimicrobiano para inhibir su crecimiento será menor (38), (39)

Se deben cuidar todas las condiciones en las que se lleve a cabo la técnica, de acuerdo a la estandarización ya que ello evitará fuentes comunes de



error entre las que están el uso de otro medio de cultivo, el almacenamiento inadecuado de los discos, inoculación inadecuada, retardo en los tiempos de inoculación e incubación, no leer cuidadosamente los límites de la zona de inhibición, etc (18), (39)

### C. AUTOMATIZADAS

La automatización en el laboratorio clínico se ha extendido a las pruebas de susceptibilidad. La selección de un sistema semiautomatizado depende entre otras cosas del número de muestras, el control de datos, las pruebas de sensibilidad, el costo del equipo y los reactivos, etc

De los sistemas disponibles actuales, dos el AUTOBAC y el AVANTAGE se basan en la dilución en disco y la monitorización fotométrica del crecimiento para proporcionar un resultado en aproximadamente 4 ó 5 h, las principales ventajas de estos sistemas son la flexibilidad en la selección de discos con antimicrobianos y la rapidez del análisis

El AUTOMICROBIC SYSTEM proporciona otro enfoque, porque los antimicrobianos están contenidos en receptáculos dentro de una tarjeta de plástico; este sistema consiste en un módulo de relleno-sellador, un incubador-lector, un módulo ordenador, una terminal de datos y una impresora pudiéndose

obtener resultados a las 4h., sin embargo, el tiempo medio de incubación para estudiar la sensibilidad antimicrobiana es aproximadamente de 7 h (5)

Varios equipos ya se han evaluado en estudios de colaboración y han revelado poseer alto grado de reproducibilidad. Ejemplo de estos son:

El SENSITRE, que determina la CMI de 11 antimicrobianos por microdilución. (17).

El MICROBIAL PROFILE SYSTEM, que contiene una bandeja de microdilución. (20).

El SCEPTOR SYSTEM, que es un sistema de microdilución que posee bandejas con antimicrobianos y que determina la CMI (23).

#### 4. HIPOTESIS:

Si se realizan pruebas de sensibilidad antimicrobiana ya normatizadas, utilizando bacterias de importancia clínica, entonces se podrá determinar que tipo de actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática), presentan algunos 4-R-fenilcarbamatos de metilo.

## 5. OBJETIVOS

### GENERAL:

Determinar la actividad antimicrobiana que presentan una serie de 4-R-fenilcarbamatos de metilo sobre bacterias de importancia clínica.

### PARTICULARES:

Determinar la actividad antimicrobiana de los 4-R-fenilcarbamatos de metilo en bacterias de interes clínico, utilizando la técnica de Kirby-Bauer o sensidiscos.

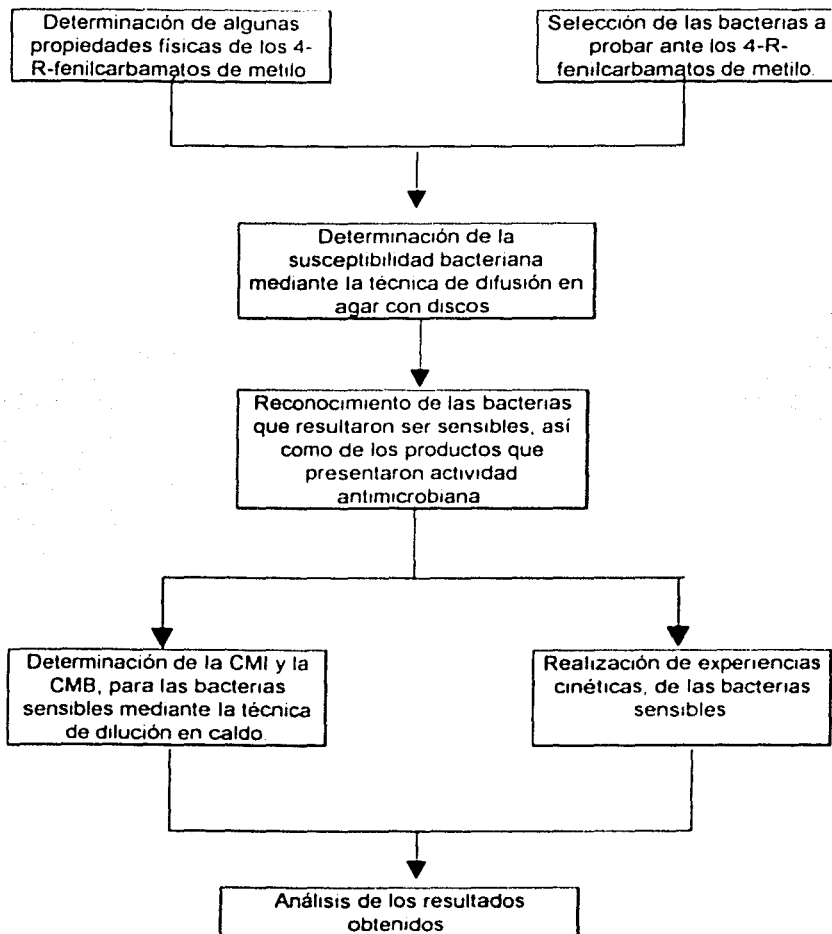
Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada uno de los 4-R-fenilcarbamatos de metilo en las bacterias sensibles

Realizar cinéticas de crecimiento con aquellas bacterias que resulten sensibles a los 4-R-fenilcarbamatos de metilo

Comparar los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad antimicrobiana para los diferentes 4- R-fenilcarbamatos de metilo en estudio

## 6. METODOLOGIA Y RESULTADOS.

### DIAGRAMA DE FLUJO



## 6.1. CARBAMATOS

Se probaron 5 diferentes 4-R-fenilcarbamatos de metilo. Estos compuestos fueron sintetizados en el Instituto de Química de la UNAM, y fueron proporcionados para el presente estudio por el laboratorio de Química Medicinal de la Unidad de Posgrado de la FESC. La reacción general de la síntesis de éstos se ilustra a continuación: (Fig 2)

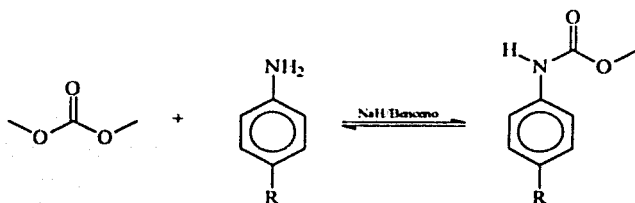


Fig. 2 Reacción general de la síntesis de los 4-R-fenilcarbamatos de metilo.

Los compuestos se clasificaron con las siguientes letras:

Tabla 2 Clasificación de los 4-R-fenilcarbamatos de metilo que se evaluaron

COMPUESTO	SUSTITUYENTE (R)	NOMBRE
C1	-H	fenilcarbamato de metilo
C2	3,4 -Cl	3,4-diclorofenilcarbamato de metilo
C3	-NO <sub>2</sub>	4-nitrofenilcarbamato de metilo
C4	-OH	4-hidroxifenilcarbamato de metilo
C5	-Cl	4-clorofenilcarbamato de metilo

El primer paso que se realizó fue determinar las propiedades físicas de estos compuestos, como el color, apariencia y solubilidad.

#### Apariencia

Se observó la apariencia y color que presentaron los diferentes 4-R-fenilcarbamatos de metilo en estudio.

#### Solubilidad

Se colocaron cada uno de los 4-R-fenilcarbamatos de metilo en diferentes tubos de ensayo y se les agregó cada uno de los solventes, los cuales fueron agua, cloroformo, acetona y DMSO. Observando la solubilidad de cada uno de ellos.

Tabla 3. Propiedades físicas que se determinaron a los 4-R-fenilcarbamatos de metilo

COMPUESTO	APARIENCIA	SOLUBILIDAD
C1	Cristales pequeños de color beige, brillantes	Acetona, cloroformo y DMSO
C2	Granos pequeños de color blanco opacos	Cloroformo y DMSO
C3	Cristales amorfos de color verde olivo	Acetona, cloroformo y DMSO
C4	Cristales pequeños, blancos brillantes	Acetona, cloroformo y DMSO
C5	Granos con apariencia de algodón color blancos	Acetona, cloroformo y DMSO

## 6.2. ESTUDIO BACTERIOLÓGICO

Consistió en determinar la susceptibilidad de las cepas bacterianas de la Tabla 4, frente a los 4-R-fenilcarbamatos de metilo, empleando para tal efecto la técnica de sensidiscos ó Kirby-Bauer, determinando con esto las CMI y la CMB, así como también se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento con las bacterias que resultaron más sensibles.

Todas las cepas utilizadas fueron donadas por el laboratorio de Microbiología Industrial (Microbiología 10) de la Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán. Las cuales se observan en la siguiente tabla



Tabla 4. Bacterias empleadas en el ensayo de susceptibilidad bacteriana ante los 4-R-fenilcarbamatos de metilo.

BACTERIA	ATCC
<i>Shigella spp.</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027
<i>Salmonella typhi</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	11778
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4817
<i>Streptococcus faecalis</i>	10741
<i>Micrococcus luteus</i>	9341
<i>Salmonella spp</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Serratia mercrescens</i>	
<i>Vibrio cholerae ambiental</i>	31221
<i>Vibrio cholerae Inaba humana</i>	4661
<i>Vibrio parahaemolytico</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	CDC-10
<i>Escherichia coli</i>	10536
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	15442

## 6.2.1. PRUEBA DE DIFUSION CON DISCOS

### Preparación de los discos

En esta prueba, inicialmente se pesaron 500 y 1000  $\mu\text{g}$  de cada producto y se disolvieron en 100  $\mu\text{l}$  de disolvente (acetona para C1, C3, C4 y C5, y cloroformo para C2). posteriormente se impregnaron discos de papel filtro (Watman no 1) de 0.6 cm de diámetro con estas disoluciones con ayuda de una micropipeta, en condiciones de esterilidad. Se utilizaron dos controles, uno de acetona y otro de cloroformo. Y se dejaron secar perfectamente.

### Medio de cultivo

El medio empleado para esta prueba fue el agar Mueller-Hinton, el cual se sirvió en cajas Petri de 100mm (25 ml aprox.) y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Antes de usar las cajas con el medio, se incubaron a 35°C por 24 hrs. para eliminar aquellas que se hubieran contaminado.

### Preparación del inóculo

Con una asa se tomaron 5 colonias aisladas de la bacteria a probar, la cual provenía de un cultivo joven de 18-24 hrs. de crecimiento en agar MH y se inocularon en 5 ml de CST. Se incubaron a 35°C con agitación (200 rpm) hasta que apareció una leve turbiedad, lo que ocurrió entre 2 a 5 hrs. dependiendo de la bacteria; se ajustó la turbidez tomando como referencia el tubo 0.5 de la escala de McFarland. Este ajuste se realizó por comparación visual, agitando los tubos.

antes y durante el proceso con ayuda de un Vórtex y se utilizó un fondo blanco con una línea negra contrastante.

Las placas de agar se sembraron utilizando hisopos de madera con punta de algodón estériles, los que se sumergen en la suspensión estandarizada, quitando el exceso al presionar y girar el hisopo contra la pared del tubo por encima del nivel del caldo. Se estrió el medio en tres direcciones sobre toda la superficie del agar y por el borde del agar. Dejando secar el inóculo (3-5 min.) antes de colocar los discos.

#### Colocación de los discos

Se colocaron los discos que ya se habían impregnado con los productos sobre las placas inoculadas con pinzas esterilizadas. Estos se presionaron suavemente sobre el agar, para asegurar un contacto completo con la superficie. Luego se incubaron las placas a 37°C

#### Lectura e interpretación

A las 18-20 hrs de incubación se midieron los halos de inhibición con un Vernier, tomando como sensibles aquellas bacterias en las que hubo una completa inhibición del crecimiento alrededor del disco, determinándose así el diámetro del halo de inhibición

## Resultados obtenidos

Tabla 5. Resultados de los halos de inhibición (mm) en las bacterias probadas ante  
sensidiscos con 500 µg de los productos (4-R-fenilcarbamatos de metilo)

BACTERIA PROBADA	ATCC	C1	C2	C3	C4	C5
<i>Shigella spp.</i>		R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>		R	R	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	25922	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	R	R	R	R	R
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027	R	R	R	R	R
<i>Salmonella typhi</i>		R	R	R	S (6 3)	R
<i>Bacillus cereus</i>	11778	R	R	R	S (7 8)	R
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4817	R	R	R	R	R
<i>Streptococcus faecalis</i>	10741	R	R	R	R	R
<i>Micrococcus luteus</i>	9341	R	R	R	S (7 5)	R
<i>Salmonella spp</i>		R	R	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		R	R	R	R	R
<i>Salmonella typhimurium</i>	CDC-10	R	R	R	S (8 2)	R
<i>Escherichia coli</i>	10536	R	S (8 6)	R	S (8 7)	S (8 3)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	15442	R	R	R	R	R

R= Resistente Crecimiento alrededor del disco

S= Sensible Inhibición del crecimiento alrededor del disco.

Tabla 6 Resultados de los halos de inhibición (mm) de las bacterias probadas ante sensibiliscos con 1000 µg de los productos (4-R-fenilcarbamatos de metilo)

BACTERIA PROBADA	ATCC	C1	C2	C3	C4	C5
<i>Shigella spp.</i>		R	R	R	S (14.1)	R
<i>Staphylococcus aureus</i>		R	R	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	25922	S(10.5)	R	R	S (9.9)	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	R	R	R	R	R
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027	R	R	R	R	R
<i>Salmonella typhi</i>		R	R	R	S (8.7)	R
<i>Bacillus cereus</i>	11778	R	R	R	S (7.9)	R
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4817	S(10.2)	R	R	S (9.5)	R
<i>Streptococcus faecalis</i>	10741	R	R	R	R	R
<i>Micrococcus luteus</i>	9341	R	R	R	S (8.0)	R
<i>Salmonella spp</i>		R	R	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>		R	R	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		R	R	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>		R	R	R	S (7.4)	R
<i>Vibrio cholerae ambiental</i>	31221	R	S (9.5)	R	S(11.5)	S (9.5)
<i>V.cholerae Inaba humana</i>		R	S (8.2)	R	S(11.9)	S (8.8)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4661	R	R	R	S (8.3)	R
<i>Salmonella typhimurium</i>	CDC10	S (7.4)	R	R	S (8.7)	R
<i>Escherichia coli</i>	10536	S (9.0)	S (8.7)	R	S (9.3)	S (8.8)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	15442	R	R	R	R	R

R= Resistente Crecimiento alrededor del disco

S= Sensible Inhibición del crecimiento alrededor del disco

## 6.2.2. DETERMINACION DE LA CMI

Esta prueba se realizó a las bacterias que presentaron los halos de inhibición más grandes en la prueba de difusión con discos. Las bacterias que se eligieron fueron *Shigella spp*, *E. coli* ATCC 25922, *E.coli* ATCC 10536, *V. cholerae ambiental* ATCC 31221 y *V.cholerae Inaba humana*.

### Preparación de diluciones

Se pesaron 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mg del producto C4 que fue el compuesto que dió mejores resultados en la prueba de difusión con discos.

Se preparó la solución antimicrobiana disolviendo el producto C4 en 0.5 ml de DMSO y luego diluyéndolo en tubos que contenían 9 ml de caldo MH a las concentraciones finales deseadas, las cuales fueron 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400  $\mu\text{g/ml}$  de C4. El último tubo no recibió el producto solo el disolvente porque sirvió de control de crecimiento.

### Inoculación de los tubos

Se preparó un inóculo en un matraz Erlenmeyer de la bacteria a probar en caldo MH (la cual provenía de un cultivo de 24 hrs en agar MH), que se incubó a 37°C con agitación 200 rpm (Incubator Shaker), hasta que se ajustó al estándar

de turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland para obtener unas  $10^7$  UFC/ml. Esto se comprobó sembrando 0.1 ml de una dilución en SSF de  $10^{-5}$  del inoculo, en agar MH, contándose así 10 UFC en la placa

Después se añadieron 0.5 ml de este inoculo a cada tubo, que ya contenían el caldo MH y el producto C4, para tener finalmente un volumen total del tubo que fue de 10 ml. Se incubaron los tubos a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 hrs.

#### Interpretación de los resultados

La menor concentración de antimicrobiano que mostró la inhibición completa del desarrollo visible representa la CMI

Para determinar la CMB, se sembró en agar MH 0.1 ml de los tubos que ya se habían observado en la CMI y se incubaron las cajas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante otras 18-24 hrs. Así la CMB fue la dilución más baja que impidió el desarrollo de colonias en las cajas sembradas

## Resultados obtenidos

## CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

Tabla 7. Resultados preliminares para obtener la CMI

TUBO	BACTERIA				
Producto C4 ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Shigella</i> <i>spp.</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>V. cholerae</i> <i>ambiental</i> ATCC31221	<i>V. cholerae</i> <i>Inaba hum.</i>
0	Turbio	Turbio	Turbio	Turbio	Turbio
50	Turbio	Turbio	Turbio	Turbio	Turbio
100	Turbio	Turbio	Turbio	Turbio	Turbio
150	Turbio	Turbio	Turbio	Claro	Turbio
200	Turbio	Turbio	Turbio	Claro	Turbio
250	Turbio	Turbio	Turbio	Claro	Turbio
300	Claro	Turbio	Turbio	Claro	Turbio
350	Claro	Turbio	Turbio	Claro	Claro
400	Claro	Turbio	Turbio	Claro	Claro

Para la CMI, se hizo la interpretación de turbio o claro mediante la observación visual del desarrollo que pudiera observarse en el tubo. Indicando que turbio es igual a crecimiento y claro a inhibición de la bacteria.



## CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA

Tabla 8. Resultados preliminares para obtener la CMB

TUBO	BACTERIA				
Producto C4 ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Shigella</i> <i>spp.</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> ATCC 10536	<i>V. cholerae</i> <i>ambiental</i> ATCC31221	<i>V. cholerae</i> <i>Inaba hum.</i>
0	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
50	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
100	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
150	Incontables	Incontables	Incontables	27 UFC	Incontables
200	Incontables	Incontables	Incontables	0 UFC	Incontables
250	Incontables	Incontables	Incontables	0 UFC	Incontables
300	3 UFC	Incontables	Incontables	0 UFC	Incontables
350	0 UFC	Incontables	Incontables	0 UFC	0 UFC
400	0 UFC	Incontables	Incontables	0 UFC	0 UFC

Las UFC señaladas en la tabla 8 son las que se contaron directamente de la caja, las cuales se obtuvieron al realizar la cuenta viable

A continuación se muestran los resultados obtenidos con las bacterias que se seleccionaron para esta prueba

Tabla 9. Resultados obtenidos de CMI y CBM en  $\mu\text{g/ml}$ , para las bacterias seleccionadas ante diversas concentraciones del producto C4

BACTERIA	ATCC	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMB ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Shigella spp.</i>		300	350
<i>Escherichia coli</i>	25922	n/d	n/d
<i>Escherichia coli</i>	10536	n/d	n/d
<i>Vibrio cholerae ambiental</i>	31221	150	200
<i>Vibrio cholerae Inaba humana</i>		350	350

n/d = no se determinó.

La razón por la que no se determinó la CMI y la CMB de las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 10536, fue porque resultaron resistentes a las concentraciones del carbamato C4 probadas, y no se aumentó la concentración de éste a más de 400  $\mu\text{g/ml}$  porque el producto se precipitaba

### 6.2.3. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

#### Bacterias y compuesto empleados

Se realizaron cinéticas de crecimiento por triplicado con las bacterias *Vibrio cholerae* ambiental, *Vibrio cholerae* Inaba humana y *Shigella spp.* y con el producto C4, tomando como base las experiencias realizadas en otros trabajos de laboratorio ( Bernal Ayala) y por Pappano y col (36)

#### Preparación del inóculo

En 2 matraces Erlenmeyer (de 250 ml), que contenían 100 ml de caldo MH ajustado a un pH de 7 con buffer de fosfatos (esterilizados), se les inoculó la bacteria a probar tomando varias colonias (la bacteria tenía 24 hrs de crecimiento en agar MH). Se incubaron estos dos matraces a 37°C con agitación orbital a 200 rpm (Incubator Shaker), hasta que alcanzaron la turbidez de 0.5 de la escala de Mc Farland (0.08-0.1 de D.O a una  $\lambda=625$  nm), lo cual requirió entre 2 y 5 hrs dependiendo del microorganismo

#### Técnica turbidimétrica

Se prepararon 7 matraces Erlenmeyer (de 250 ml) con 125ml de caldo MH a un pH 7.0. Cada uno se inoculó con 3 ml de la suspensión bacteriana ajustada a

0.5 de la escala de Mc Farland y también se les agregaron las diferentes concentraciones del producto C4 que se disolvió en 2 ml de DMSO estéril. Se corrieron 2 controles, uno que contenía el inóculo y DMSO y otro que contenía solo el inóculo.

Los matraces Erlenmeyer tenían un volumen total de 130 ml al iniciar la cinética de crecimiento y durante ésta, la agitación y temperatura fueron constantes (200 rpm y 37°C). El desarrollo microbiano se siguió turbidimétricamente tomando muestras de cada matraz (3 ml) cada 20 min y leyendo la D O a una longitud de onda de 625 nm con ayuda de un espectrofotómetro. La toma de las muestras se realizó en condiciones asépticas con pipetas esterilizadas.

#### Cuentas viables

Finalmente se realizaron cuentas viables durante las cinéticas a diferentes tiempos, para determinar si las lecturas correspondían al desarrollo de la bacteria.

Esto se realizó tomando 1 ml de cada matraz y diluyéndolo en agua estéril (se hicieron diluciones de hasta  $10^{-4}$ ) sembrando en agar MH de forma masiva, con hisopos de madera con punta de algodón, e incubando a 37°C durante 24 hrs.

## Resultados de las cinéticas de crecimiento

CONTROL 1= Medio de cultivo + bacteria

CONTROL 2= Medio de cultivo + bacteria + dimetilsulfóxido (DMSO)

\* = Concentración de C4 + medio de cultivo + bacteria

Tabla 10 Resultados obtenidos (D O ), de la cinética de crecimiento de *Shigella spp.* ante diversas concentraciones del producto C4

MINUTOS	CONTROL 1	CONTROL 2	*76.99 µg/ml	*153.84 µg/ml	*230.76 µg/ml	*307.69 µg/ml	*384.61 µg/ml
0	0 018	0 015	0 018	0 021	0 024	0 025	0 020
20	0 019	0 023	0 022	0 023	0 017	0 019	0 023
40	0 022	0 010	0 021	0 010	0 020	0 010	0 020
60	0 023	0 035	0 024	0 035	0 024	0 035	0 030
80	0 034	0 024	0 033	0 022	0 033	0 022	0 031
100	0 048	0 052	0 039	0 046	0 033	0 040	0 033
120	0 061	0 065	0 057	0 061	0 052	0 058	0 042
140	0 111	0 109	0 091	0 091	0 082	0 088	0 067
160	0 152	0 139	0 122	0 122	0 113	0 102	0 094
180	0 227	0 185	0 170	0 142	0 144	0 130	0 116
200	0 275	0 237	0 200	0 180	0 162	0 164	0 132
220	0 378	0 316	0 264	0 228	0 204	0 204	0 165
240	0 468	0 408	0 351	0 280	0 256	0 237	0 204
280	0 510	0 462	0 404	0 337	0 291	0 275	0 218

La curva correspondiente a estos datos se puede observar en la gráfica 1.

a estas curvas se les determinó el área bajo la curva obteniéndose los sig resultados

Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *Shigella* spp.

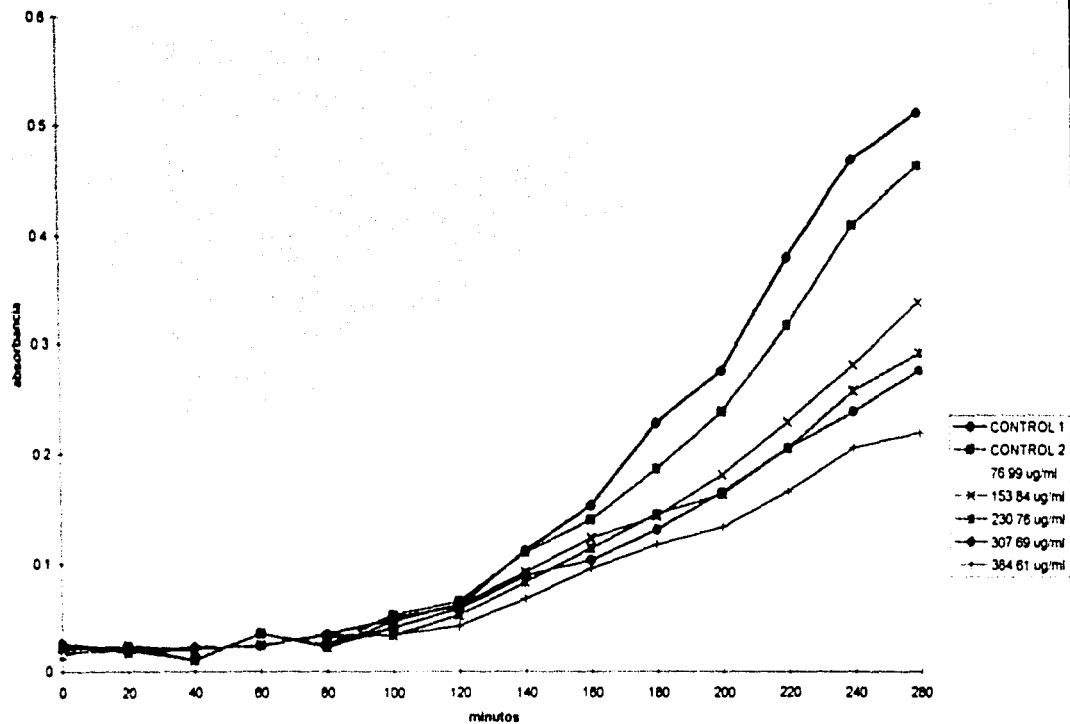


Tabla 11. Resultados obtenidos del area bajo la curva a diferentes concentraciones del producto C4 , ante *Shigella spp.*

MATRAZ	CONCENTRACION ( $\mu\text{g/ml}$ )	AREA BAJO LA CURVA	% CELULAS VIVAS	% CELULAS MUERTAS
CONTROL 1	0	51 42	100	0
CONTROL 2	0	45 53	88 54	11 46
10 mg	76 99	39 65	77 11	22 89
20 mg	153 84	34 55	67 19	32.81
30 mg	230 76	31 42	61 10	38.90
40 mg	307 69	30 30	58 92	41.03
50 mg	384 61	25 74	50 05	49 95

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las cuentas viables:

Tabla 12. Cuenta viables (UFC/ml) de *Shigella spp.* en presencia del producto C4

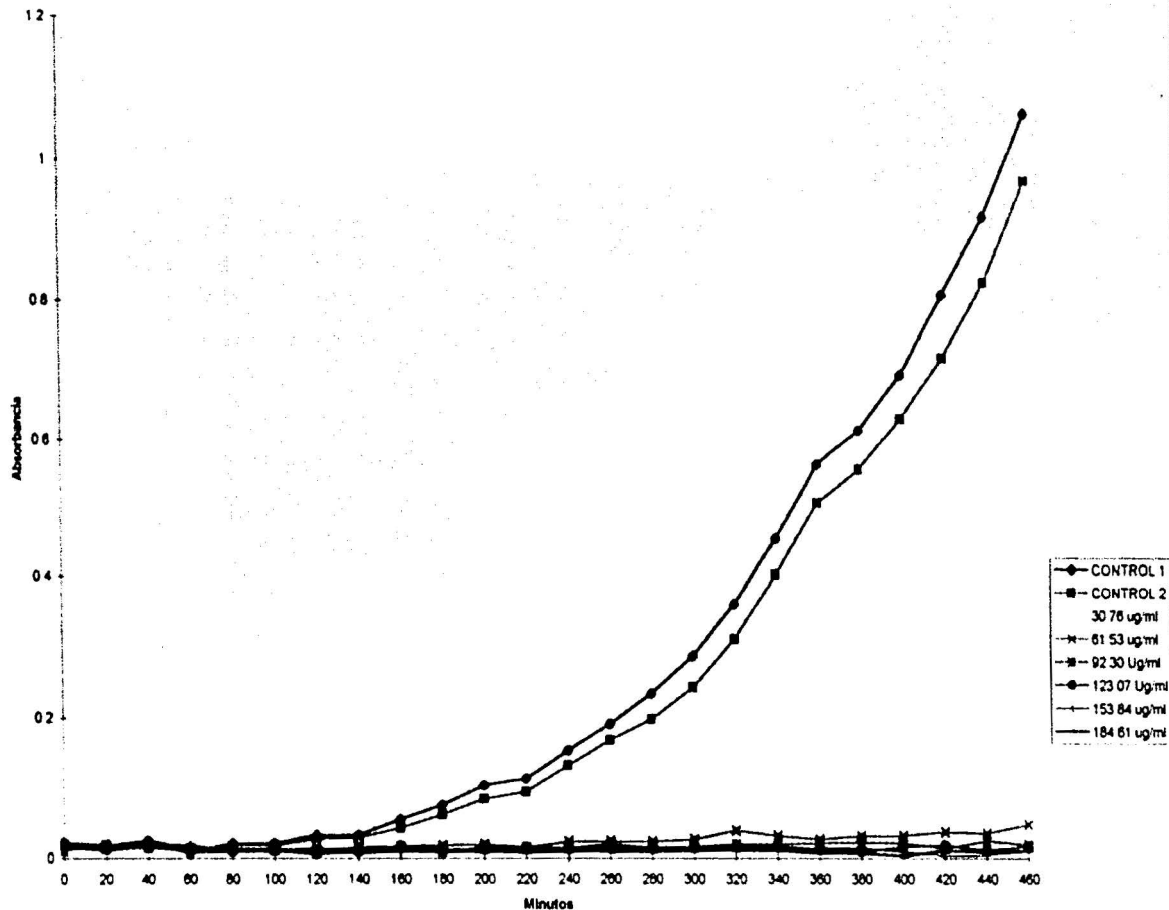
MATRAZ	0 MINUTOS	280 MINUTOS
10 mg	$2 \times 10^*$	Incontables
20 mg	$1.8 \times 10^*$	Incontables
30 mg	$2.5 \times 10^*$	Incontables
40 mg	$1.7 \times 10^*$	Incontables
50 mg	$2 \times 10^*$	Incontables

Tabla 13 Resultados obtenidos (D.O.) de la cinética de crecimiento de *Vibrio cholerae* ambiental ATCC 31221 ante diversas concentraciones del producto C4.

MINUTOS	CONTROL 1	CONTROL 2	*30.76 µg/ml	*61.53 µg/ml	*92.30 µg/ml	*123.07 µg/ml	*153.84 µg/ml	*184.61 µg/ml
0	0.019	0.013	0.015	0.017	0.010	0.020	0.011	0.017
20	0.016	0.012	0.015	0.017	0.015	0.017	0.013	0.010
40	0.023	0.014	0.017	0.019	0.016	0.019	0.018	0.019
60	0.012	0.010	0.016	0.013	0.013	0.007	0.017	0.013
80	0.019	0.015	0.016	0.012	0.012	0.009	0.008	0.010
100	0.019	0.017	0.015	0.011	0.012	0.010	0.010	0.009
120	0.030	0.025	0.015	0.008	0.011	0.005	0.010	0.012
140	0.031	0.027	0.018	0.014	0.013	0.009	0.010	0.007
160	0.053	0.041	0.018	0.015	0.015	0.016	0.008	0.011
180	0.074	0.060	0.020	0.017	0.009	0.011	0.008	0.009
200	0.102	0.083	0.024	0.018	0.013	0.012	0.009	0.010
220	0.112	0.093	0.027	0.014	0.012	0.014	0.007	0.009
240	0.153	0.131	0.029	0.022	0.013	0.013	0.009	0.010
260	0.190	0.167	0.030	0.023	0.018	0.013	0.010	0.009
280	0.233	0.197	0.032	0.022	0.014	0.014	0.011	0.009
300	0.286	0.242	0.034	0.025	0.015	0.015	0.012	0.011
320	0.360	0.310	0.040	0.037	0.019	0.016	0.010	0.011
340	0.454	0.402	0.043	0.030	0.019	0.016	0.010	0.011
360	0.560	0.506	0.050	0.026	0.021	0.012	0.014	0.007
380	0.610	0.553	0.048	0.030	0.022	0.009	0.014	0.007
400	0.690	0.627	0.066	0.031	0.021	0.016	0.009	0.003
420	0.804	0.714	0.071	0.036	0.014	0.018	0.003	0.011
440	0.915	0.821	0.072	0.034	0.024	0.011	0.004	0.009
460	1.060	0.966	0.077	0.046	0.019	0.017	0.010	0.011



Gráfica 2. Cinética de crecimiento de *Vibrio cholerae* ambiental ATCC 31221



La curva correspondiente a estos datos se puede observar en la gráfica 2. a estas curvas se les determinó el área bajo la curva obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 14 Resultados obtenidos del área bajo la curva a diferentes concentraciones del producto C4, ante *Vibrio cholerae* ambiental ATCC31221

MATRAZ	CONCENTRACION ( $\mu\text{g/ml}$ )	AREA BAJO LA CURVA	% CELULAS VIVAS	% CELULAS MUERTAS
CONTROL 1	0	125 71	100	0
CONTROL 2	0	111 13	88 40	11 60
4 mg	30 76	15 24	12 12	87 88
8 mg	61 53	10 11	8 04	91 96
12 mg	92 30	7 11	5 65	94 35
16 mg	123 07	6 01	4 78	95 22
20 mg	153 84	4 69	3 73	96 27
24 mg	184 61	4 62	3 67	96 33

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las cuentas viables:

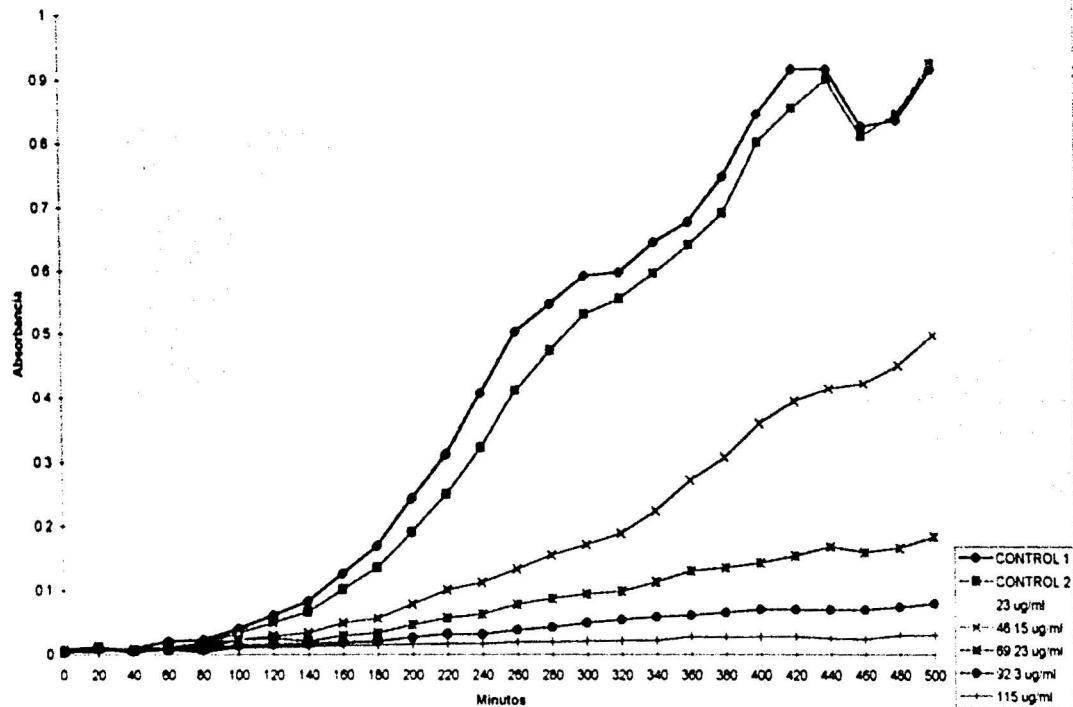
Tabla 15 Cuenta viables (UFC/ml) de *Vibrio cholerae* ambiental ATCC 31221 en presencia del producto C4

MATRAZ	0 MINUTOS	340 MINUTOS	460 MINUTOS
4 mg	$3 0 \times 10^*$	$2 3 \times 10^*$	Incontables
8 mg	$3 9 \times 10^*$	$6 2 \times 10^*$	$6 6 \times 10^*$
12 mg	$3 0 \times 10^*$	$1 4 \times 10^*$	$2 2 \times 10^*$
16 mg	$3 2 \times 10^*$	$4 7 \times 10^*$	$1 39 \times 10^*$
20 mg	$4 7 \times 10^*$	$7 5 \times 10^*$	$3 1 \times 10^*$
24 mg	$4 2 \times 10^*$	$6 8 \times 10^*$	$9 0 \times 10^*$

Tabla 16 Resultados obtenidos (D O ), de la cinética de crecimiento de *Vibrio cholerae* Inaba humana ante diversas concentraciones del producto C4

MINUTOS	CONTROL 1	CONTROL 2	*23.07 µg/ml	*46.15 µg/ml	*69.23 µg/ml	*92.30 µg/ml	*115.38 µg/ml
0	0 005	0 002	0 007	0 005	0 007	0 003	0 008
20	0 005	0 011	0 006	0 010	0 012	0 009	0 007
40	0 009	0 007	0 011	0 007	0 005	0 004	0 003
60	0 020	0 010	0 008	0 010	0 010	0 006	0 006
80	0 022	0 017	0 014	0 015	0 010	0 008	0 003
100	0 040	0 033	0 029	0 022	0 023	0 013	0 010
120	0 061	0 050	0 038	0 028	0 025	0 015	0 010
140	0 083	0 066	0 048	0 033	0 020	0 016	0 011
160	0 125	0 101	0 082	0 049	0 029	0 019	0 013
180	0 169	0 135	0 095	0 056	0 033	0 020	0 014
200	0 242	0 190	0 127	0 078	0 046	0 026	0 015
220	0 312	0 249	0 153	0 100	0 057	0 032	0 016
240	0 406	0 322	0 180	0 111	0 063	0 031	0 016
260	0 502	0 410	0 232	0 132	0 078	0 038	0 019
280	0 546	0 472	0 293	0 154	0 087	0 042	0 019
300	0 590	0 530	0 361	0 171	0 094	0 049	0 020
320	0 596	0 554	0 426	0 188	0 098	0 054	0 021
340	0 644	0 594	0 506	0 222	0 112	0 058	0 021
360	0 676	0 640	0 532	0 270	0 129	0 061	0 027
380	0 748	0 690	0 586	0 306	0 134	0 065	0 026
400	0 845	0 800	0 650	0 359	0 142	0 070	0 027
420	0 915	0 855	0 676	0 392	0 153	0 070	0 027
440	0 915	0 900	0 714	0 412	0 167	0 069	0 024
460	0 825	0 810	0 674	0 420	0 158	0 069	0 023
480	0 835	0 845	0 702	0 450	0 165	0 073	0 029
500	0 915	0 925	0 778	0 496	0 183	0 079	0 030

Gráfica 3. Cinética de crecimiento de *Vibrio cholerae* inaba humana



La curva correspondiente a estos datos se puede observar en la gráfica 3. a estas curvas se les determinó el área bajo la curva obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 17 Resultados obtenidos del área bajo la curva a diferentes concentraciones del producto C4, ante *Vibrio cholerae*, Inaba humana

MATRAZ	CONCENTRACION ( $\mu\text{g/ml}$ )	AREA BAJO LA CURVA	% CELULAS VIVAS	% CELULAS MUERTAS
CONTROL 1	0	211 82	100	0
CONTROL 2	0	195 09	92 10	7 90
3 mg	23 07	150 71	71 15	28 85
6 mg	46 15	84 91	40 08	59 92
9 mg	69 23	38 90	18 36	81.64
12 mg	92 30	19 16	9 04	90 96
15 mg	115 38	8 52	4 02	95.98

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las cuentas viables:

Tabla 18. Cuenta viables (UFC/ml) de *Vibrio cholerae* Inaba humana en presencia del producto C4

ATRAZ	100 MINUTOS	200 MINUTOS	360 MINUTOS	480 MINUTOS
3 mg	$6.2 \times 10^*$	$4.7 \times 10^*$	Incontables	Incontables
6 mg	$7.0 \times 10^*$	$3.3 \times 10^*$	Incontables	$1.7 \times 10^*$
9 mg	$4.6 \times 10^*$	$2.8 \times 10^*$	Incontables	$1.2 \times 10^*$
12 mg	$3.6 \times 10^*$	$8.7 \times 10^*$	$4.6 \times 10^*$	$1.1 \times 10^*$
15 mg	$2.3 \times 10^*$	$2.1 \times 10^*$	$2.3 \times 10^*$	$2.0 \times 10^*$

## 7. DISCUSION

Dado que en el presente trabajo de tesis se conjuntan diversas técnicas de estudio, la discusión se presenta por partes, para finalmente correlacionar todos los resultados obtenidos.

### PROPIEDADES DE LOS PRODUCTOS

Las propiedades que se evaluaron con los diferentes 4-R-fenilcarbamatos de metilo, nos sirvieron para diferenciar los productos y para determinar el tipo de disolvente que se usaría en las pruebas del estudio bacteriológico. El cual resultó ser el DMSO con el que los productos presentaron una mejor solubilidad.

### PRUEBA DE DIFUSION CON DISCOS

Inicialmente se realizó una prueba preliminar, que fue la de la técnica de difusión con discos, con el objeto de determinar cuales bacterias eran sensibles ante los diferentes 4-R-fenilcarbamatos de metilo así como identificar los productos que presentarían actividad antimicrobiana. Por esta razón primero se probó con 500  $\mu\text{g}/\text{disco}$ , pero como no se obtuvieron muy buenos resultados, entonces se aumentó la concentración a 1000  $\mu\text{g}/\text{disco}$ . Los resultados obtenidos en esta prueba indican que

El producto C1 (fenilcarbamato de metilo), inhibió el crecimiento de 4 bacterias, siendo los mayores halos de inhibición para *E. coli* ATCC 25922 (10.5 mm) y *B. bronchiseptica* ATCC 4817 (10.2 mm)

El producto C2 (diclorofenilcarbamato de metilo), inhibió el crecimiento de 3 bacterias y el mayor halo de inhibición correspondió a *V. cholerae* ambiental ATCC 31221 (9.5 mm).

El producto C3 (4-nitrofenilcarbamato de metilo), no presentó actividad antimicrobiana en ninguna de las bacterias probadas

El producto C4 (4-hidroxifenilcarbamato de metilo), inhibió el crecimiento de 12 bacterias detectándose los mayores halos de inhibición con *Shigella spp.* (14.1 mm), *V. cholerae* ambiental ATCC 31221 (11.5 mm) y *V. cholerae* Inaba humana (11.9 mm)

El producto C5 (4-clorofenilcarbamato de metilo), inhibió el crecimiento de 3 bacterias presentando el mayor halo de inhibición con *V. cholerae* ambiental ATCC 31221 (9.5 mm)

Al observar los resultados, se determinó que el producto con mayor actividad antimicrobiana fue el C4, el cual se utilizaría para los siguientes estudios (CMI y cinéticas microbianas) y las bacterias a probar serían las que presentaron los mayores halos de inhibición con dicho producto (*Shigella spp.*, *V. cholerae* ambiental ATCC 31221 y *V. cholerae* Inaba humana)

## DETERMINACION DE LA CMI

En los resultados obtenidos de la CMI y la CMB vemos que, no se determinó para *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 10536 y esto se debió a que ya no aumentó la concentración del producto, porque éste se precipita a más de 400 µg/ml, lo cual impediría que estuviera distribuido uniformemente y que además no se observara con claridad si había o no turbidez en los tubos

En cuanto a los resultados obtenidos de la CMI para las demás bacterias, vemos que la más sensible o con una menor CMI fue *V. cholerae* ambiental ATCC 31221 (150 µg/ml), siendo más resistentes o que requirieron una mayor cantidad de producto, *V. cholerae* Inaba humana (350 µg/ml) y *Shigella spp.* (300 µg/ml). Los resultados de la CMB, nos indican que la bacteria que requirió menos producto fue *V. cholerae* ambiental ATCC 31221 (200 µg/ml), y que, *V. cholerae* Inaba humana y *Shigella spp.* requirieron ambas de 350 µg/ml de C4.

Por otro lado en la literatura se menciona que el inverso del diámetro de inhibición corresponde a la CMI, sin embargo, en el estudio que se llevó a cabo está hipótesis no se cumple en su totalidad, y esto podría deberse a que el producto C4 no es soluble en agua y por lo tanto no difunde en el agar tan fácilmente, siendo esto un factor determinante del tamaño del halo de inhibición y tal vez una limitante



Conjuntando los resultados de la prueba de difusión con discos y la de dilución en caldo (CMI), observamos que *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 10536 resultaron resistentes a las concentraciones probadas en la determinación de la CMI, y esto, coincide a su vez con el hecho de que en la prueba de difusión con discos (1000 µg/ml) sus halos de inhibición son menores a 10 mm, en cambio, para las otras bacterias a las que si se les determinó la CMI y que fueron *Shigella spp.*, *V. cholerae* ambiental ATCC 31221 y *V. cholerae* Inaba humana, presentaron halos de inhibición mayores a 10 mm, por lo tanto se podría considerar que las bacterias que presentan halos mayores a 10 mm sean realmente sensibles al producto C4.

## CINETICAS DE CRECIMIENTO

La cinéticas de crecimiento realizadas en el presente estudio, nos ayudan a determinar tanto las curvas de crecimiento de las bacterias, así como el efecto que posee el producto C4 en éstas, por medio de la lectura de la densidad óptica (absorbancia). Los resultados obtenidos en las diferentes cinéticas de crecimiento se analizarán por separado, según la bacteria probada

En la cinética de crecimiento de *Shigella spp.*, vemos que los resultados de la gráfica nos muestran que al aumentar la concentración del producto, el crecimiento es menor, lo cual corresponde a las áreas bajo las curvas y al porcentaje de células vivas, hay que tomar en cuenta que el DMSO también

inhibe a la bacteria, aunque en un porcentaje bajo (11.46%) Al leer la cuenta viable, vemos que al iniciar la cinética (al minuto 0), todos los matraces con las diferentes concentraciones de C4 poseían entre  $1.7-2.5 \times 10^6$  UFC/ml. pero al final de la cinética (260 min.) las colonias son incontables en todas las concentraciones del producto, lo que nos indica que la bacteria sigue desarrollándose, aunque a diferentes velocidades, dependiendo de la concentración del producto. En ésta cinética, no se aumentó la concentración del producto C4, porque precipita a concentraciones mayores de 400  $\mu\text{g/ml}$  y esto afectaría las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro dando resultados poco confiables.

La cinética de crecimiento de *V. cholerae* ambiental ATCC 31221, nos indica que al aumentar la concentración del producto C4, hay un menor desarrollo de la bacteria, y esto lo podemos observar en las lecturas de absorbancia y en las áreas bajo la curva. En este caso, al determinar los porcentajes de células vivas y muertas, según el área bajo la curva, vemos que el DMSO afecta a la bacteria en un 11.6% durante toda la cinética, sin embargo, el producto C4 sí disminuye drásticamente el crecimiento de la bacteria desde la concentración más baja y esto lo observamos en los porcentajes de células que se determinaron. La cuenta viable nos indica que al iniciar la cinética (0 minutos) todos los matraces con las diferentes concentraciones tenían entre  $3-5 \times 10^6$  UFC/ml. durante la cinética en todos los matraces con producto C4 la cepa sigue desarrollándose a velocidades diferentes, dependiendo de la concentración, pero al final de la cinética (460 min.)

sólo con 184.61  $\mu\text{g/ml}$ , la bacteria se mantuvo y no se desarrolló, ya que no aumentó su crecimiento a diferencia de las demás concentraciones

En la cinética de crecimiento de *V. cholerae* Inaba humana, la gráfica nos indica que si aumentamos la concentración del producto C4 el desarrollo es menor y las lecturas de absorbancia van aumentando lentamente y esto lo verificamos con las áreas bajo la curva, en las cuales los porcentajes de células vivas y muertas nos muestran que al aumentar la concentración de C4 va disminuyendo el crecimiento de la bacteria, en este caso el DMSO sólo afectó en un 7.9% a la bacteria. En la cuenta viable, vemos que a los 100 min , todas las concentraciones tienen entre  $2.3\text{-}7 \times 10^6$  UFC/ml, y que al final de la cinética, en todas las concentraciones el desarrollo de la bacteria aumentó, excepto en la concentración de 115.38  $\mu\text{g/ml}$ , ya que, al terminar ésta cinética (480 min ) se tuvieron  $2.0 \times 10^5$  UFC/ml. Esto nos indica que con 115 38  $\mu\text{g/ml}$  hay una inhibición en el crecimiento de la bacteria

## 8. CONCLUSIONES

Se determinó el espectro antimicrobiano de los diferentes 4-R-fenilcarbamatos de metilo, comprobando su actividad sobre 20 bacterias de importancia clínica.

En la prueba de difusión en agar con discos, se observó que los productos C1, C2, C4 y C5 presentaron algún tipo de actividad antimicrobiana sobre las bacterias probadas. A diferencia del producto C3 que no presentó ninguna actividad antimicrobiana.

En la prueba de difusión en agar con discos el producto C4 presentó actividad antimicrobiana sobre 12 bacterias, destacando su importancia y sugiriendo que dicho compuesto se podría considerar como un agente antibacteriano.

Se estableció la CMI y la CMB para el producto C4, con las bacterias que resultaron sensibles a la acción de éste (*V. cholerae* ambiental ATCC 31221, *V. cholerae* Inaba humana y *Shigella spp.*), en la prueba de difusión con discos.

Se determinó que para el producto C4, los halos de inhibición mayores a 10 mm (difusión con sensidiscos de 1000 µg) sugieren que la bacteria realmente

es sensible, ya que, se logró establecer la CMI y la CMB con las bacterias que presentaron éstos halos de inhibición.

El producto C4, se podría considerar un antibacteriano de espectro reducido, ya que, los halos de inhibición más grandes los presentaron bacterias Gram -.

Con la realización de las cinéticas de crecimiento, con la ayuda de las gráficas y con las cuentas viables, se determinó la concentración a la cual el producto tenía un efecto bacteriostático sobre las bacterias que resultaron ser sensibles en la prueba de difusión con discos (*V. cholerae* ambiental ATCC 31221, *V. cholerae* Inaba humana y *Shigella spp.*)

Los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, identificaron al género *Vibrio* como uno de los más sensibles a los diferentes 4-R-fenilcarbamatos de metilo

Al comparar la estructura de los 5 productos, observamos que la única diferencia entre ellos son los grupos funcionales, los que podrían ser los responsables de la actividad antimicrobiana. Así vemos que C4 (4-OH), fue el que presentó mayor actividad antibacteriana, por lo que se propone aumentar el número de sustituyentes con el grupo funcional OH para estudios posteriores

Además se podría seguir trabajando con el producto C4 a futuro en lo que se refiere a la aplicación que se le daría sobre el género *Vibrio*.

## 9. REFERENCIAS

1. AKIYAMA, Y., Takeda, N.; Adachi, K. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* (1995) **36**, 42-49.
2. ALEXANDER, J.; Cargill, R.; Michelson, S.R.; Schwam, H. *J. Med. Chem.* (1988) **31**, 318-322
3. BAILEY, Scott. Diagnóstico Microbiológico. 7ª de. Edit. Médica Panamericana, Argentina, 1989 pp 191-210
4. BAUER, A W.; Kirby, W M M.; Sherris, J C.; Turck, M. *The Am. J. Clin. Path.* USA (1966) **45**, 493-496
5. BERNARD, H. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio 9ª de. Edit. Ediciones Científicas y Médicas, México, 1994. pp 1319-1320
6. CORRETA, S. Recopilación y estudio químico toxicológico de los insecticidas. Tesis 1979. Facultad de Química UNAM
7. COLLINS, C.H. Métodos Microbiológicos 1ª de Edit Acribia, España, 1989. pp 195-200
8. DALVI, R.R.; Whittiker, M.B. *J. Environ. Biol* (1995) **16**, 333-338
9. D'AMATO, R.; Hochstein, L. *J. Clin. Microbiol* (1982) **15**, 282-285
10. DEAN, L.; Stuopar J. *Chem. Abst.* 107,64897h (1987) *U S Appl* (1984) **109**, 25

11. DERIAN, C.K.; Solomon, H.F.; Higgins, J.D.; Beblavy, M.J. *Biochemistry* (1996) **35**, 1265-1269.
12. DAVIS, BERNARD et al. Tratado de Microbiología 2ª de Edit. Salvat, España, 1983. p.7
13. FESSEDEN and Feeseden. Química Orgánica 2ª de Edit. Iberoamericana, México, 1983. pp. 652-653
14. FLAMMARION, P.; Migeon, B.; Garric, J. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (1996) **56**, 440-445.
15. GALLO, D.; Merendino, A.; Keizer, J.; Vittozi, L. *Environmental Toxicology.* (1995) **171**, 131-136.
16. GAVAN, T. and Town, M. *Am. J. Clin. Pathol.* (1970) **53**, 880-885
17. GAVAN, T.; Jones, R.; Barry, A. *Antimicrob Agents Chemother.* (1980) **17**, 464-469
18. GIONO C. Silvia. *Infectología* (1983) **7**, 325-352
19. GODMAN and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 9ª ed. Edit. McGraw-Hill Interamericana, México. 1996. pp. 1095-1098
20. HUGH, G.; Jones, R.; Barry, A. *J. Clin. Microbiol.* (1983) **17**, 436-444
21. HUNT, K.A.; Hooper, M.J.; Littrell, E. E. *J. Wildl. Dis.* (1995) **31**, 186-192.



22. JAWETZ, Ernest et al. Manual de Microbiología Médica 9ª de Edit. El Manual Moderno, México, 1981. pp 80-120
23. JONES, R.; Thornsberry, C., Barry, A., Gavan, T. *J. Clin Microbiol.* (1981) 13, 184-194
24. KIYOSHI. *Chem. Abs.* 105, 166884. (1986). *Appl.* (1984) 217, 97.
25. KONEMAN, Elmer. et al. Diagnóstico Microbiológico 3ª de Edit. Médica Panamericana, México, 1992 p 203
26. LALAH, J.O.; Wandiga, S.O., Dauterman, W.C. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (1996) 56, 37-41.
27. LENETTE, Edwin. et al. Manual de Microbiología Clínica 4ª ed. Edit. Médica Panamericana, Argentina, 1987. pp 1191-1223
28. LEONG, E.C.W.; Ho, S.H. *Insect. Sci. Appl.* (1994) 15, 343-349
29. LIMA, J.S.; Reis, C.A.G. *Proceedings of the 5th world congress for the world federation of associations of clinical toxicology centers and poison control centers* (1995) 33, 687-690
30. LITTER, Manuel Compendio de Farmacología 3ª de Edit. El Ateneo, Argentina, 1986 p 5, 574-576
31. MADROÑERO, P. Química Médica 1ª de Edit. Alhambra, España, 1980 pp 179-181

32. MITANI, S.; Nakano, K.; Matsuo, N.; Komyoji, T. *J. Pestic. Sci.* (1995) **20**, 153-160.
33. MOSER, V.C. *Neurotoxicol. Teratol.* (1995) **17**, 617-625.
34. MOSS, J.I. and Scott, J.G. *J. Econ. Entomol.* (1996) **89**, 51-55.
35. PADILLA, S. *Toxicology.* (1995) **102**, 215-220.
36. PAPPANO, N.B.; Blanco, S.E.; Debatista, N.B.; Ferreti, F.H. *Rev. Lat. Microbiol.* (1987) **29**, 367-373
37. PELEG, B.A. and Bar-Zakay Y. *J. Entomol.* (1995) **29**, 261-264.
38. PETERSDORF, R. and Jhon Sherris. *Am. J. Medicine.* (1965) **39**, 766-778
39. PICHARDO R., Efrén A. *Infectología.* (1982) **3**, 215-222
40. QUISTAD, G.B.; Sparks, S.E.; Casida, J.E. *Life Sci* (1994) **55**, 1537-1544.
41. RAINWATER, T.R.; Leopold, V.A.; Hooper, M.J.; Kendall, R.J. *Environ Toxicol. Chem.* (1995) **14**, 2155-2161.
42. ROY, C. y Tirado, M. *Patología Infecciosa* Instituto Municipal de Investigación Médica (Barcelona) y Microbiología-Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona pp 1-9
43. SAADEH, A.M.; Al-Ali, M.K.; Farsakh, N.A.; Ghani, M.A. *J. Toxicol* (1996) **34**, 45-51.

44. SANTILLAN, O. Odilón. "Síntesis de carbamatos a partir de aminas aromáticas". Tesis Q.F.B. UNAM-FESC. 1993. pp. 1-13
45. SCHARF, M.E.; Hemingway, J.; Reid, B.L.; Small, G.J.; Bennett, G.W. *J. Econ. Entomol.* (1996) **89**, 322-331.
46. SHINOGLI, M.; Agha, B.J.; Tsuji, K.; Digenis, G. *J. Pharm. Sci.* (1985) **74**, 482-485
47. SILVERMAN, Richard. The Organic Chemistry of Drug and Design and Drug Action. 1ª de. Edit. Academic Press, USA, 1992. p.1
48. SMITH, M.R., Thomas, N.J.; Hulse, C. *J. Wild Dis* (1995) **31**, 263-267.
49. STARK, h.; Purand, K.; Ligneau, X.; Rouleau, A.; Arrang, J.M. *J. Med. Chem.* (1996) **39**, 159-1163.
50. STRETWIESER, A. Química Orgánica Edit. Iberoamericana, México, 1985
51. SUZUKI, T.; Yaguchi, K.; Nakagawa, Y.; Suga, T. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (1995) **54**, 737-744
52. TONOGA, Y.; Nakamura, Y.; Tsumura, Y.; Shibata, T.; Kimura, M.; Oota, M.; Hirahara, Y.; Miyata, M.; Narita, M.; Sekiguchi, Y.; Itoyama, T.; Koiguchi, S.; Hasegawa, M.; Miyoshi, T.; Kamakura, K. *J. Foods Hyg. Soc. Japan* (1995) **36**, 506-524.

## 10.ANEXO

### PREPARACION DE SOLUCIONES

#### Solución Salina Fisiológica al 0.9%

Se disuelven 9g de Cloruro de Sodio en agua destilada, aforando a 1 litro.

#### Solución buffer de fosfatos (PBS) pH=7

Se disuelven 28.8g de fosfato dibásico de sodio y 11.45 g de fosfato monobásico de potasio, en agua destilada, aforando a un litro.

## PRUEBAS BIOQUIMICAS

Antes de comenzar con los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, se realizaron algunas pruebas bioquímicas a las bacterias en estudio y luego se sembraron en agares selectivos para corroborar que eran los microorganismos identificados

### PRUEBAS PRIMARIAS

BACTERIA	ATCC	GRAM	CATALASA	OXIDASA	OF
<i>Shigella</i>		-	+	-	F
<i>Staphylococcus aureus</i>		+	+	-	F
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	+	-	F
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	+	-	F
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027	-	+	+	O
<i>Salmonella typhosa</i>		-	+	-	F
<i>Bacillus cereus</i>	11778	+	+		F
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4817	-	+	+	O
<i>Streptococcus faecalis</i>	10741	+	-	-	F
<i>Micrococcus luteus</i>	9341	+	+	+	O
<i>Salmonella spp</i>		-	+	-	F
<i>Proteus mirabilis</i>		-		-	F
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		-	+	-	F
<i>Serratia mercens</i>		-		-	F
<i>Vibrio cholerae ambiental</i>	31221	-	+	+	F
<i>Vibrio cholerae lnaba</i>	4661	-	+	+	F
<i>Vibrio parahaemolytic</i>		-	+	+	F
<i>Salmonella typhimurium</i>	CDC-10	-	+	-	F
<i>Escherichia coli</i>	10536	-	+	-	F
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	15442	-	+	+	O

## ENTEROBACTERIAS

BACTERIA	ATCC	I	M	V	C	TSI	LIA	UREA	H2S	LAC
<i>Shigella spp.</i>		-	+	-	-	alk/ác	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	25922	+	+	-	-	ác/ác	+	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	10536	+	+	-	-	ác/ác	+	-	-	+
<i>Salmonella typhi</i>		-	+	-	-	alk/ác	+	-	+	-
<i>S. typhimurium</i>	cdc-10	-	+	-	+	alk/ác	+	-	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>		-	+	-	+	ác/ác		+	+	-
<i>K. pneumoniae</i>		-	-	+	+		+	+	-	+

## CRECIMIENTO EN AGARES

BACTERIA	AGAR	CRECIMIENTO
<i>Shigella</i>	SS (Shigella-Salmonella)	Colonias incoloras
<i>Staphylococcus aureus</i>	SM (Sales Manitol)	Colonias y halo amarillos
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	MC (MaConkey)	Colonias rosas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	EMB (Eosina-azul de metileno)	Colonias verdes negruzcas con brillo metálico
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	SM	Colonias y halo amarillos
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9027	FLO	Colonias amarillas verdosas

<i>Salmonella typhi</i>	SS	Colonias con centro negro y vire del medio a amarillo
<i>Salmonella typhi</i>	SB (Sulfito bismuto)	Colonias verdes con centro negro
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4817	MH	Colonias blancas
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4817	MC	Colonias rosas
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10741	Agar para estreptococos	Colonias blancas puntiformes
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	MH	Colonias puntiformes amarillas
<i>Salmonella spp</i>	SS	Colonias y medio amarillos con centro negro
<i>Proteus mirabilis</i>	MH	Lechosa y producción de swarming
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EMB	Colonias rosas con centro oscuro
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HEKTOEN	Colonias anaranjadas
<i>Vibrio cholerae ambiental</i> ATCC 31221	TCBS	Colonias amarillas
<i>V.cholerae Inaba humana</i> ATCC 4661	TCBS	Colonias amarillas
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	TCBS	Colonias verdes
<i>Salmonella typhimurium</i> CDC-010	SB	Colonias verdes con centro negro
<i>Salmonella typhimurium</i>	SS	Colonias con centro

<b>CDC-010</b>		negro y medio amarillo
<b><i>Escherichia coli</i></b> <b>ATCC 10536</b>	MC	Colonias rosas
<b><i>Escherichia coli</i></b> <b>ATCC 10536</b>	EMB	Colonias verdes negruzcas con brillo metálico
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b> <b>ATCC 15442</b>	FLO	Colonias amarillas verdosas

**ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA**