



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**“EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE 15  
DERIVADOS E INTERMEDIARIOS DE QUINOXALIN-2[1H]-  
ONAS”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA  
**GEORGINA LUJÁN OLIVARES**

DIRECTORA  
M.C. LESLIE SUSANA ARCILA LOZANO

CO-DIRECTORA  
DRA. NORMA FRANCENIA SANTOS SÁNCHEZ

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA., JUNIO 2010

## Dedicatorias

A Dios por todas las bendiciones en mi vida.

A mi abuela Blanca Estela Suarez Herrera †, en su memoria.

A mis padres por todo su amor así como por ser mi ejemplo de trabajo y éxito.

A mi hermana y mis hermanos por estar siempre conmigo.

A Miguel por ser parte esencial en mi vida.

Y al resto de mi familia porque son base importante de mi existir.

Los quiero mucho.

## Agradecimientos

Agradezco a Dios por una bendición más.

Agradezco a mis padres y al resto de mi familia por la confianza puesta en este y todos los proyectos realizados en mi vida.

Agradezco a la M.C. Leslie S. Arcila Lozano por el apoyo dado en este trabajo.

A la Dra. Norma F. Santos Sánchez por la orientación, paciencia y apoyo, muchas gracias.

A la M.C. Norma E. Alamilla López por su apoyo en la realización de los estudios de ANOVA.

A mis Sinodales las M.C. Paula C. Guadarrama Mendoza, Dra. Norma F. Santos Sánchez y M.C. Luz H. Villalobos Delgado por las correcciones realizadas a este trabajo.

Al Dr. Raúl Salas Coronado por sus consejos y conocimientos dados en seminario de tesis.

Al M.C. Vania S. Robles Gonzáles por su apoyo en mi estancia en los laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas.

A Sarita porque sin ella el trámite de este trabajo no hubiera sido de la misma forma.

A los profesores y técnicos que fueron parte de mi formación académica.

A mis compañeros de clase porque sin ellos la escuela no hubiera sido igual.

A mis amigos y amigas por su entusiasmo, amistad, apoyo y cariño.

A los alumnos que me dieron su amistad, energía y cariño en la realización de este trabajo.

¡A todos muchas gracias!

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas del  
Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca

Parte de este trabajo se presentó en el 42° Congreso Mexicano de Química, en el  
Concurso Nacional de Carteles Estudiantiles llevado a cabo en la ciudad de Guadalajara,  
Jalisco del 22 al 26 de septiembre del 2007

## RESUMEN

La resistencia creciente desarrollada por algunos microorganismos patógenos a los antimicrobianos actuales hace necesaria la evaluación antimicrobiana de nuevos compuestos que la contrarresten. El esqueleto quinoxalin-2-ona tiene propiedades biológicas importantes, tales como antiviral, antimicrobiana y anticancerígena. En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de 15 derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-onas contra tres cepas microbianas patógenas para el hombre, las bacterias *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; así como la levadura *Candida albicans* ATCC 14053. La actividad antimicrobiana se determinó a través de los métodos de difusión en disco y macro dilución en caldo. Los compuestos 3-carboximetil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona, **1a**, 1-bencil-3-carboximetil-4-tosil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona bencil éster, **1f** y el ácido (Z)-3-(2-aminofenilcarbamoil)propenoico, **2a**, presentaron actividad antimicrobiana contra *S. epidermidis*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) = 64 µg/µL para los tres compuestos y una concentración mínima bactericida (CMB) = 128 µg/µL para **1a** y **2a**. El ácido **2a** también presentó actividad contra *E. coli*, CMI = 32 µg/µL, CMB = 64 µg/µL. El análisis estadístico de los resultados indica que para **1a** y **2a** existe diferencia significativa en la mayoría de las concentraciones empleadas ( $P < 0.05$ ). El análisis estadístico ANOVA de dos vías indicó que los experimentos por el método de difusión en disco fueron confiables y reproducibles ( $P > 0.05$ ). Los resultados obtenidos son el promedio de nueve mediciones de experimentos reproducibles.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
Lista de abreviaturas	xiv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Hipótesis	4
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos particulares	4
1.3 Justificación	5
<b>2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS</b>	<b>7</b>
2.1 Microorganismos empleados en las pruebas antimicrobianas	7
2.1.1 Características generales de <i>Escherichia coli</i>	9
2.1.2 Características generales de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	11
2.1.3 Características generales de <i>Candida albicans</i>	12
2.2 Crecimiento celular microbiano	14
2.3 Métodos para determinación antimicrobiana	19
2.3.1 Método de difusión en agar en disco	19
2.3.2 Método de macro dilución en caldo	23
2.4 Derivados de quinoxalinonas con actividad antimicrobiana	25
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>30</b>
3.1 Equipos, materiales y reactivos	30
3.2 Microorganismos usados	31
3.3 Quinoxalin-2[1H]-onas e intermediarios	31

3.4 Ensayo antimicrobiano	32
3.4.1 Preservación de cepas microbianas	32
3.4.2 Determinación de la fase exponencial de la población microbiana	33
3.4.3 Preparación de discos para la metodología por difusión	36
3.4.4 Elección del control positivo	37
3.4.5 Determinación antimicrobiana de las 15 quinoxalin-2[1 <i>H</i> ]-onas e intermediarios por el método de difusión en disco	39
3.4.6 Actividad antimicrobiana por el método de macro dilución en caldo de <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b>	43
3.4.7 Análisis estadístico del método de difusión en disco	46
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>48</b>
4.1 Fase logarítmica de las curvas de crecimiento poblacional	48
4.2 Elección del control positivo	54
4.3 Determinación antimicrobiana de las 15 quinoxalin-2[1 <i>H</i> ]-nonas e intermediarios	58
4.4 Método de macro dilución en caldo de los compuestos <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b>	71
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	<b>82</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>83</b>
<b>8. APÉNDICE</b>	<b>90</b>

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1.</b>	Derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-ona evaluados como antimicrobianos en el presente trabajo.	3
<b>Figura 2.</b>	Colonias de <i>E. coli</i> en agar Mc Conkey (AMC).	10
<b>Figura 3.</b>	Colonias de <i>S. epidermidis</i> en agar Estafilococos no. 110 (AE110).	11
<b>Figura 4.</b>	Colonias de <i>C. albicans</i> en agar dextrosa Saboraud 2% (ADS).	13
<b>Figura 5.</b>	Fases de crecimiento microbiano en un sistema discontinuo o cerrado.	16
<b>Figura 6.</b>	Inóculo a) menos aceptable; b) ideal y c) máximo aceptable de colonias en la prueba de susceptibilidad en placa (Andrews, 2006).	20
<b>Figura 7.</b>	Lectura de zonas de inhibición presentes en un halo (Andrews, 2006).	21
<b>Figura 8.</b>	Cepas microbianas en tubos criogénicos.	32
<b>Figura 9.</b>	Diagrama de flujo de la fase log del crecimiento microbiano poblacional <i>E. coli</i> ATCC 35218, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 y <i>C. albicans</i> ATCC 14053.	35
<b>Figura 10.</b>	Multidiscos combinados BIO-RAD®.	38
<b>Figura 11.</b>	Medición de halos de inhibición de <b>2a</b> con vernier digital.	40
<b>Figura 12.</b>	Diagrama de flujo de la determinación antimicrobiana general por el método de difusión en disco de <i>E. coli</i> ATCC 35218, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 y <i>C. albicans</i> ATCC 14053.	42
<b>Figura 13.</b>	Diagrama de flujo del método de macro dilución en caldo.	45
<b>Figura 14.</b>	Fase exponencial de <i>E. coli</i> ATCC 35218, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, <i>C. albicans</i> ATCC 14053, absorbancia, tiempo y UFC/mL durante la cinética de crecimiento.	49
<b>Figura 15.</b>	Halos de inhibición de 12 antibióticos comerciales contra a) <i>E. coli</i> ATCC 35218; b) <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	57

<b>Figura 16.</b>	Halos de inhibición de algunos de los compuestos estudiados contra a) <i>E. coli</i> ATCC 35218; b) <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	59
<b>Figura 17.</b>	Comparación del efecto antibacteriano (halos de inhibición) del compuesto <b>2a</b> contra <i>E. coli</i> ATCC 35218 y <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	65
<b>Figura 18.</b>	Comparación del efecto antibacteriano (halos de inhibición) de los compuestos <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	66
<b>Figura 19.</b>	Halos de inhibición de a) <b>2a</b> contra <i>E. coli</i> ATCC 35218; b) <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 en concentraciones de 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 1300 y 1500 µg.	71
<b>Figura 20</b>	Punto de corte (flecha) entre las concentraciones 32 y 64 µg/µL del antibacteriano <b>2a</b> contra <i>E. coli</i> ATCC 35218.	73
<b>Figura 21.</b>	a) Punto de corte entre 64 µg/µL (CMI) y 128 µg/µL (CMB) del antibacteriano <b>1a</b> ; b) CMI (flecha) de 64 µg/µL del antibacteriano <b>1f</b> ; c) Punto de corte (flecha) entre 64 µg/µL (CMI) y 128 µg/µL (CMB) del antibacteriano <b>2a</b> contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	74
<b>Figura 22.</b>	Porcentaje de inhibición de las tres quinoxalinonas <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> contra los microorganismos tipificados.	77
<b>Figura 23.</b>	Gráfica de probabilidad normal de los residuales del compuesto <b>1a</b> contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	92
<b>Figura 24.</b>	Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del compuesto <b>1a</b> contra el microorganismo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	92
<b>Figura 25.</b>	Gráfica de probabilidad normal de los residuales del compuesto <b>1f</b> contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	93
<b>Figura 26.</b>	Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del compuesto <b>1f</b> contra el microorganismo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	94
<b>Figura 27.</b>	Gráfica de probabilidad normal de los residuales del compuesto <b>2a</b> contra <i>E. coli</i> ATCC 35218.	95
<b>Figura 28.</b>	Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del compuesto <b>2a</b> contra el microorganismo <i>E. coli</i> ATCC 35218.	95

<b>Figura 29.</b>	Gráfica de probabilidad normal de los residuales del compuesto <b>2a</b> contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	96
<b>Figura 30.</b>	Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del compuesto <b>2a</b> contra el microorganismo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	97
<b>Figura 31.</b>	Gráfica de probabilidad normal de los residuales del compuesto <b>2a</b> contra <i>E. coli</i> ATCC 35218 y <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	98
<b>Figura 32.</b>	Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del compuesto <b>2a</b> contra el microorganismo <i>E. coli</i> ATCC 35218 y <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	99
<b>Figura 33.</b>	Gráfica de probabilidad normal de los residuales de los compuestos <b>1a, 1f y 2a</b> contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	100
<b>Figura 34.</b>	Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del efecto antibacteriano (halo de inhibición) frente a los compuestos <b>1a, 1f y 2a</b> a diferentes concentraciones contra el microorganismo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	101

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), µg/mL, de quinoxalinonas determinada por el método de dilución.	26
<b>Tabla 2.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), µg/mL, y halo de inhibición (mm) de quinoxalinonas determinadas por el método de difusión en pozos.	27
<b>Tabla 3.</b> Absorbancia y UFC/mL durante el monitoreo de la fase exponencial de las bacterias <i>E. coli</i> ATCC 35218, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 y la levadura <i>C. albicans</i> ATCC 14053.	51
<b>Tabla 4.</b> Tiempo de incubación, absorbancia, UFC/mL e inóculo empleados en los ensayos antimicrobianos donde los microorganismos están a la mitad de la fase exponencial.	52
<b>Tabla 5.</b> Diámetro de halos de inhibición (mm) de los antibióticos en los multidiscos combinados contra las cepas <i>E. coli</i> ATCC 35218 y <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	55
<b>Tabla 6.</b> Diámetro de los halos de inhibición (mm) causados por las diferentes concentraciones de nistatina contra <i>C. albicans</i> ATCC 14053.	58
<b>Tabla 7.</b> Halos de inhibición (mm) del crecimiento microbiano apreciables provocado por <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> a un contenido de 1000 µg.	61
<b>Tabla 8.</b> Diámetro de los halos de inhibición (mm) de <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 y de <b>2a</b> contra <i>E. coli</i> ATCC 35218.	63
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la prueba de Duncan para <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	68
<b>Tabla 10.</b> Recuento en placa (UFC/mL) de los microorganismos tipificados para determinar la CMI y CMB de <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> .	72
<b>Tabla 11.</b> CMI, CMB y % de inhibición de los compuesto de <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> contra las cepas <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	

ATCC 12228.	75
<b>Tabla 12.</b> Diámetros de halos de inhibición (mm) de antibióticos BIO-RAD®.	90
<b>Tabla 13.</b> ANOVA de dos vías: Halo (mm) frente experimento, concentración del compuesto <b>1a</b> contra el microorganismo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	91
<b>Tabla 14.</b> ANOVA de dos vías: Halo (mm) frente experimento, concentración del compuesto <b>1f</b> contra el microorganismo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	93
<b>Tabla 15.</b> ANOVA de dos vías: Halo (mm) frente experimento, concentración del compuesto <b>2a</b> contra el microorganismo <i>E. coli</i> ATCC 35218.	94
<b>Tabla 16.</b> ANOVA de dos vías: Halo (mm) frente experimento, concentración del compuesto <b>2a</b> contra el microorganismo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	96
<b>Tabla 17.</b> ANOVA mixto: Halo (mm) frente concentraciones del compuesto <b>2a</b> contra los microorganismos <i>E. coli</i> ATCC 35218 y <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	97
<b>Tabla 18.</b> Factores considerados para el análisis estadístico ANOVA mixto del compuesto <b>2a</b> contra los microorganismos <i>E. coli</i> ATCC 35218 y <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	98
<b>Tabla 19.</b> ANOVA mixto: Halo (mm) frente a los compuestos <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> a diferentes concentraciones contra el microorganismo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	99
<b>Tabla 20.</b> Factores considerados para el análisis estadístico ANOVA mixto de los compuestos <b>1a</b> , <b>1f</b> y <b>2a</b> contra el microorganismo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	100

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADS	Agar dextrosa Saboraud 2%
AE110	Agar para Estafilococos No. 110
AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	Colección de Cultivos Tipo Americano
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMH	Caldo Mueller Hinton
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
ETA	Enfermedad Transmitida por Alimentos
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
G (-)	<i>Gram</i> negativa
G (+)	<i>Gram</i> positiva
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
NCCLS	Comité Nacional para las Normas de Laboratorio Clínico
OMS	Organización Mundial de la Salud
R-Sq	R cuadrada
S	Desviación estándar
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

# 1. INTRODUCCIÓN

Tanto en la línea de producción de alimentos como en el tratamiento de enfermedades infecciosas los antimicrobianos juegan un papel importante. Las infecciones transmitidas por los alimentos derivan de la ingestión de un patógeno, seguida del crecimiento del mismo por invasión de los tejidos, liberación de toxinas, o ambos. Generalmente las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son debidas a prácticas higiénicas deficientes (Prescott *et al.*, 2004), además los animales de crianza que son dispuestos para consumo humano también pueden ser la vía de transmisión de microorganismos infecciosos. Lo anterior ocurre al utilizar antimicrobianos como promotores de crecimiento y para profilaxis antibacteriana en bajas concentraciones, donde el empleo constante de estos medicamentos genera resistencia en los microorganismos (Alexander *et al.*, 2008).

En la actualidad la conservación de alimentos y el tratamiento de enfermedades tanto humanas como de animales, a pesar de la diversidad de antibióticos disponibles, no son logrados siempre de forma total. Adicionalmente la existencia de microorganismos con la capacidad de desarrollar resistencia a estos compuestos, a través de sus diversos mecanismos biológicos, hace necesario el uso de nuevos antimicrobianos (Edurne y Oteo, 2006; Lee, 2008; Trucco *et al.*, 2002).

Los antimicrobianos nuevos son estudiados cuidadosamente en el laboratorio con ensayos repetidos; a los cuales se les determinan en qué medida son peligrosos y su

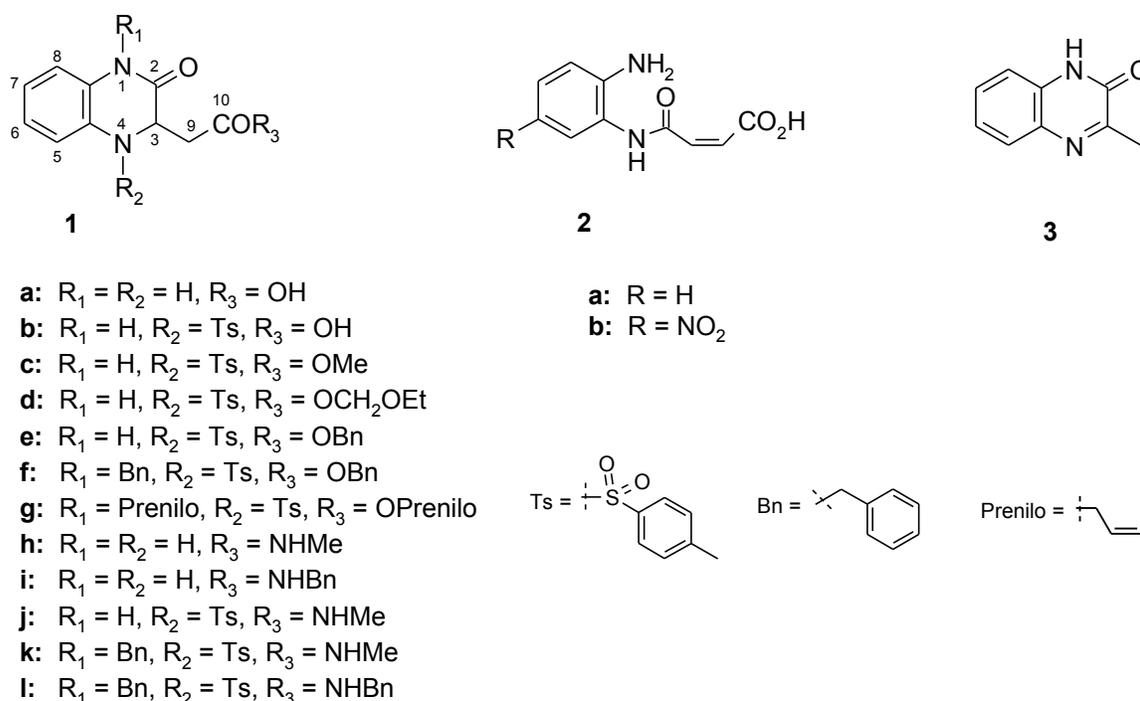
eficiencia antimicrobiana frente a patógenos específicos (García, 2003; Prescott *et al.*, 2004).

El método de dilución en caldo y el de difusión en agar, son dos de las técnicas más empleadas para análisis microbiológico que permiten determinar la sensibilidad antibacteriana y antimicótica de manera rápida, confiable y a bajo costo. Son métodos recomendados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) y el Comité Nacional para las Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS, por sus siglas en inglés) (Cona, 2002; Liébana, 1997; Trucco *et al.*, 2002). Estos dos métodos fueron empleados en el presente trabajo, el de difusión en disco permitió estimar la sensibilidad antimicrobiana a los compuestos estudiados y obtener el intervalo de concentraciones donde se puede hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). La CMI es la menor concentración de un antimicrobiano para inhibir a una cepa microbiana y la CMB es la menor concentración de un antimicrobiano capaz de matar a un microorganismo.

Tanto la CMI como la CMB se determinan a través del método de macro dilución en caldo, este procedimiento permitió determinar las concentraciones en las que el antimicrobiano muestra su efecto mayor. Este último método es el más utilizado en ensayos de laboratorio y resulta importante porque permite conocer la CMI ó CMB a concentraciones altas de un compuesto (García *et al.*, apartado 11, 2000).

Ambos métodos se han reportado también en la literatura científica, como los empleados en los estudios microbiológicos realizados a análogos de quinoxalin-2[1H]-ona. Las quinoxalinonas son compuestos heterocíclicos que han demostrado un espectro amplio en la inhibición de microorganismos *Gram* negativos, *G* (-), *Gram* positivos *G* (+) y hongos (Ali *et al.*, 2000; Carta *et al.*, 2003; Obafemi y Akinpelu, 2005; Sanna *et al.*, 1998; Sanna *et al.*, 1999, a; Sanna *et al.*, 1999, b).

La síntesis de compuestos orgánicos derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-ona (Santos-Sánchez *et al.*, 2008), Figura 1, despertó el interés de su determinación antimicrobiana por su analogía estructural con los descritos en la literatura. Las determinaciones antimicrobianas se realizaron frente a las bacterias *Escherichia coli* ATCC 35218, G (-), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, G (+), y la levadura *Candida albicans* ATCC 14053, agentes etiológicos de enfermedades infecciosas. Las concentraciones empleadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco, fueron de 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 1300 y 1500  $\mu\text{g}$ . A los resultados obtenidos se les realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías, la prueba de DUNCAN y un ANOVA mixto. En el método de dilución en caldo se probaron concentraciones en múltiplos de 8 hasta 512  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .



**Figura 1.** Derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-ona evaluados como antimicrobianos en el presente trabajo.

## 1.1 Hipótesis

Las diferentes investigaciones a los análogos de las quinoxalinonas han demostrado tener una actividad antimicrobiana de alta a baja contra patógenos importantes. Lo anterior sugiere que los derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-ona, Figura 1, presenten actividad antimicrobiana contra cepas patógenas como la bacteria Gram positiva *Escherichia coli* ATCC 35218, Gram negativa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y la levadura *Candida albicans* ATCC 14053.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana de 15 compuestos orgánicos derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-ona (**1a-l**, **2a-b**, **3**) sobre *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Candida albicans* ATCC 14053, por los métodos de difusión en disco y macro dilución en caldo.

### 1.2.2 Objetivos Particulares

- Determinar la absorbancia en la fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada cepa microbiana a evaluar para obtener células viables.
- Evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de la bacteria G (-) *Escherichia coli* ATCC 35218, la bacteria G (+) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y la levadura *Candida albicans* ATCC 14053 a los compuestos orgánicos quinoxalin-2[1H]-ona a través del método de difusión en disco.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los compuestos orgánicos quinoxalin-2[1H]-onas que

muestren actividad antimicrobiana en la bacteria *E. coli* ATCC 35218, *S. epidermidis* ATCC 12228 y la levadura *C. albicans* ATCC 14053 por el método de macro dilución en caldo.

### 1.3 Justificación

Los compuestos orgánicos derivados e intermediarios de la quinoxalin-2[1H]-ona que fueron evaluados como antimicrobianos en el presente trabajo, Figura 1, guardan una relación estructural con moléculas que han presentado actividad biológica contra microorganismos patógenos (Ali *et al.*, 2000; Carta *et al.*, 2003; Obafemi y Akinpelu, 2005; Sanna *et al.*, 1998; Sanna *et al.*, 1999, a; Sanna *et al.*, 1999, b). Estos microorganismos son generadores de enfermedades infecciosas en el hombre y contaminan algunos alimentos por contacto con aguas de riego mal tratadas, ejemplos de ellas son las bacterias *Gram* positivas, *Gram* negativas y las levaduras.

Esta evaluación antimicrobiana es importante dado que el uso inadecuado de la mayoría de los antibióticos y antifúngicos contra estos microorganismos ha propiciado resistencia. Lo cual origina células microbianas mutantes tolerantes a compuestos antimicrobianos tanto sintéticos como naturales (Drlica, 2003; Torres, 2005).

La síntesis orgánica de 15 compuestos derivados e intermediarios de la quinoxalin-2[1H]-ona, (Santos-Sánchez *et al.*, 2008) al ser análogos de compuestos con probada actividad antimicrobiana descrita en la literatura motivó un estudio para el conocimiento de su naturaleza antimicrobiana.

Hasta ahora no existía un estudio en el que se reportara la actividad antimicrobiana de éstas moléculas, consecuentemente el presente trabajo se enfocó en la determinación de la sensibilidad antimicrobiana a través del método de difusión en disco. También se cuantificó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima

Bactericida (CMB) a través del método de macro dilución en caldo contra las bacterias *G* (-) *Escherichia coli* ATCC 35218, *G* (+) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y la levadura *Candida albicans* ATCC 14053.

El análisis antimicrobiano de los 15 derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-ona constituye una base de conocimiento para futuros estudios que generen un aprovechamiento en la quimioterapia antimicrobiana.

## 2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

En la presente sección se da un panorama de las características generales de los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans*, usados en este trabajo. De su presencia en alimentos, su patogenicidad y su resistencia. Se menciona de manera general su ciclo de vida microbiano y la importancia de su fase exponencial en determinaciones antimicrobianas de compuestos *in vitro*. Posteriormente, se comentan las ventajas y limitaciones de los métodos de difusión en disco y macro dilución en caldo, que son las dos técnicas más empleadas en ensayos con células microbianas. Asimismo, se da la información cualitativa y cuantitativa obtenida de estos métodos. Finalmente, se presentan los análogos descritos en la literatura derivados de quinoxalinona con actividad antimicrobiana relacionados estructuralmente con los estudiados en este trabajo.

### 2.1 Microorganismos empleados en las pruebas antimicrobianas

Las cepas microbianas obtenidas de casos clínicos o de un ambiente general son empleadas rutinariamente en la determinación de antimicrobianos. Habitualmente el uso de microorganismos aislados de enfermos en determinación antimicrobiana se realiza para la elección del antimicrobiano más adecuado en el tratamiento de enfermedades (Daza, 1998). Esto permite observar la resistencia de los microorganismos causantes de enfermedades a antimicrobianos de uso común. Los microorganismos aislados son

identificados o tipificados para saber la subdivisión de la especie microbiana. Las subdivisiones son de interés en el ámbito epidemiológico y patológico, para conocimiento del origen común o al azar de un brote de la misma especie (Liébana, 1997). La cepas tipo suelen mantenerse en cultivos puros y están mejor caracterizadas que otras cepas (Prescott *et al.*, 2004). Así la tipificación de una cepa permite una determinación específica del microorganismo que es inhibido o muerto por los nuevos antimicrobianos. Las bacterias *Gram* positivas, *Gram* negativas así como los hongos y levaduras son generalmente los más utilizados en la determinación de nuevos antimicrobianos.

Las bacterias y las levaduras son dos microorganismos que se diferencian entre sí por sus características morfológicas y por su estructura celular. Las bacterias *G* (-) *Escherichia coli* y *G* (+) *Staphylococcus epidermidis* son células procariotas y la levadura *Candida albicans* es una célula eucariota.

Las células eucariotas se distinguen de las bacterias por su tamaño pues son mucho más grandes que las procariotas además contienen sistemas membranosos intraplasmáticos así como más organelos (Madigan *et al.*, 2004). Todas estas características pueden verse modificadas a nivel fisiológico y bioquímicos en un ambiente diferente a su medio óptimo, con la finalidad de adaptarse al nuevo medio.

Esta capacidad de adaptación se consigue por la generación de mutantes, que se logra a través de la información que pasa por los genes de las células microbianas (García, 2003). Así también la exposición a los antibióticos en concentraciones bajas hace que aquellas pocas bacterias que adquirieron la resistencia se desarrollen preferentemente que aquellas que no la adquirieron (Silva, 2006).

En general los microorganismos *E. coli*, *S. epidermidis* y *C. albicans* han adquirido un nivel de resistencia tanto a antibióticos como antimicóticos estudiados y empleados en el tratamiento de enfermedades patógenas para el hombre. Esto se puede deber a la elaboración de sustancias antagónicas del antimicrobiano y aún más importante a un

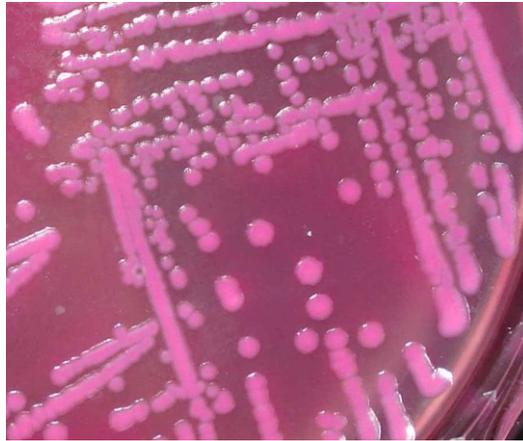
proceso de selección natural de las cepas que surgen de una especie originalmente susceptible volviéndose permanentemente resistente (Kenneth y Williams, 1986; Martínez y Baquero, 2002; Poole, 2002).

La sobrevivencia de estas células microbianas les permite presentarse en alimentos ocasionando enfermedades. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son de las principales causas de enfermedad entre la población mundial (Borbolla *et al.*, 2004). La sobrevivencia de los microorganismos puede permitir también tener una mayor patogenicidad para el hombre y disminuir la capacidad bacteriostática o bactericida de los compuestos que las contrarresten. Estas características se mencionan a continuación.

### 2.1.1 Características generales de *Escherichia coli*

Uno de los microorganismos pertenecientes a las células procariotas es la bacteria *E. coli*, la cual es un bacilo alargado, no formador de esporas, capaz de fermentar lactosa y glucosa. Este microorganismo G (-), en medio agar Mc Conkey (AMC), forma colonias esféricas de color rosa, de consistencia mucosa, lisas y blandas, con un pequeño borde al centro, Figura 2.

La bacteria *E. coli* forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, a los miembros de esta familia se nombran enterobacterias o bacterias entéricas. Estos miembros son tan comunes, frecuentes e importantes que probablemente sean las bacterias más estudiadas en la mayoría de los laboratorios. Es *E. coli* el género y la especie de experimentación elegido por muchos microbiólogos así como la mejor estudiada (Prescott *et al.*, 2004). *E. coli* es una de las bacterias más empleadas en determinaciones antimicrobianas, como control de calidad en pruebas de susceptibilidad y de mayor presencia en aislados de infecciones (Andreu *et al.*, 2005; Famiglietti *et al.*, 2005; Trucco *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Colonias de *E. coli* en agar Mc Conkey (AMC).

*E. coli* forma parte de la flora normal bacteriana de los intestinos del humano y de algunos animales, por lo tanto es considerado un patógeno alimenticio importante al causar enfermedades fatales de origen humano y animal (Chart, 1998; Marzocca *et al.*, 2006). *E. coli* tiene una capacidad considerable para desarrollar resistencia a los antibióticos (Edurne y Oteo, 2006). Es indicador de contaminación fecal en agua y en los alimentos, relacionándose con la aparición de síntomas o enfermedades gastrointestinales (Ishii *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2004; White *et al.*, 2010).

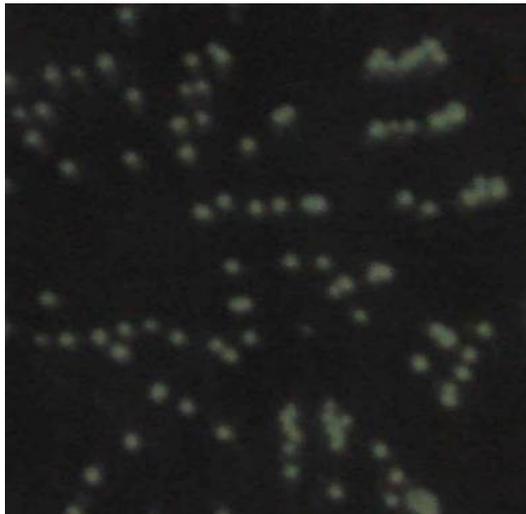
El ganado es generalmente considerado el mayor reservorio para *E. coli* así como los vegetales por ser cultivados con agua de lluvia, la cual precipita arrastrando e infectando con estiércol los pozos de la comunidad agrícola y subsecuentemente al ser utilizada esta agua contamina el terreno y por consecuencia los vegetales (Acevedo *et al.*, 2001; Ibekwe y Grieve, 2003).

La disminución o eliminación del crecimiento y desarrollo de *E. coli* es de suma importancia debido al riesgo que implica para la salud humana. Por ello la posibilidad de

evaluar un antibacteriano contra este microorganismo resultó de interés para su estudio en esta tesis.

### 2.1.2 Características generales de *Staphylococcus epidermidis*

La bacteria *S. epidermidis* es otro microorganismo perteneciente a las células procariontas. Es una bacteria G (+), de forma esférica que tiende a agruparse en forma de racimos de uva. En medio agar Estafilococos no. 110 (AE110) forma colonias redondas, lisas, de tamaño pequeño, cremosas, blandas, pastosas, de bordes uniformes y con centro elevado, Figura 3.



**Figura 3.** Colonias de *S. epidermidis* en agar Estafilococos no. 110 (AE110).

*S. epidermidis* forma parte de la familia *Staphylococcaceae*, los miembros de esta familia son del género *Staphylococcus* y son responsables de muchas enfermedades humanas y alimenticias (Prescott *et al.*, 2004). Es un microorganismo que se ha aislado

clínicamente y se emplea como control en y para determinaciones antimicrobianas (Estrada *et al.*, 2005; Michelim *et al.*, 2005; Monzón *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2001).

La especie *S. epidermidis* es un componente importante de la flora microbiana normal humana en la piel y mucosas (Sellman *et al.*, 2005). Es el segundo, después de *Staphylococcus aureus*, de los dos principales microorganismos patógenos oportunistas de este género (Gill *et al.*, 2005).

Existen intoxicaciones alimentarias con estafilococos producidas por la deficiencia en la refrigeración de los alimentos responsables, así como por la manipulación de los mismos por personal que es portador de estafilococos o con una herida cutánea estafilocócica abierta (Liébana, 1997; Valdiviezo *et al.*, 2006; White *et al.*, 2010) haciéndola una bacteria G (+) patógena importante. Es también un microorganismo encontrado en infecciones intramamarias en animales sobre todo en vacas, cuando estas infecciones no son detectadas afectan la calidad de la leche producida (Boscán *et al.*, 2009) y por lo tanto de los productos derivados elaborados lo que ha ocasionado su aislamiento en quesos (Lemus *et al.*, 2008).

*S. epidermidis* es considerado un microorganismo patógeno importante y su resistencia a antibióticos ha aumentado, incluso está considerado como un microorganismo más resistente que *S. aureus* (Nodarse, 2001).

Por lo anterior la posibilidad de encontrar un antimicrobiano contra esta bacteria resultó de interés para su estudio en esta tesis.

### **2.1.3 Características generales de *Candida albicans***

*C. albicans*, es una célula eucariota, hongo dimorfo con largas pseudohifas, hifas y células gemantes subesféricas. *C. albicans* en el medio agar dextrosa Saboraud 2%

(ADS) forma colonias ovas, esféricas casi cilíndricas, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, Figura 4.



**Figura 4.** Colonias de *C. albicans* en agar dextrosa Saboraud 2% (ADS).

La levadura *C. albicans* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*. El género *Candida* sobresale por su presencia en infecciones. De las especies pertenecientes a este género es *C. albicans* la más importante de las diez responsables de infecciones en el hombre (Silva *et al.*, 2002). Se emplea también como indicador de contaminación en alimentos y equipos preparados inadecuadamente (Borbolla *et al.*, 2004; Curtis *et al.*, 2000; White *et al.*, 2010). Es una de las levaduras más empleadas en determinaciones antimicrobianas (Carta *et al.*, 2003; Obafemi y Akinpelu, 2005; Sanna *et al.*, 1998, 1999, a).

*C. albicans* está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura de crecimiento es entre 25 y 37°C. Los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital, son los reservorios más importantes en los seres humanos. No

sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad y se ha aislado de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa. La célula eucariota *C. albicans* es también una especie que tiene un conjunto de atributos que le da una habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del huésped, de producir resistencia al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade (Berkhout, 2002; Rex *et al.*, 1995).

Por lo anterior la posibilidad de encontrar un antimicótico contra esta levadura resultó de interés para su estudio en esta tesis.

### 2.2 Crecimiento celular microbiano

Los microorganismos, al igual que cualquier célula viva, tienen un ciclo de vida y llevan a cabo un crecimiento celular. El crecimiento de las células no es más que un incremento ordenado de todos los componentes de un microorganismo (Brooks *et al.*, 1999).

El crecimiento de microorganismos en un cultivo se realiza a través de la división o reproducción de cada célula por medio de su segmentación para formar dos nuevas, este proceso se denomina fisión binaria. La fisión binaria inicia con la duplicación por la elongación hasta casi el doble de la longitud de la célula, enseguida se forma un septo (tabique) y por último las dos células nuevas se separan, gracias a este septo, que termina el proceso de duplicación. En las mejores condiciones por ejemplo *Escherichia coli* completa este ciclo en 20 minutos (Madigan *et al.*, 2004). La duplicación o ciclo de crecimiento en cada célula es variable, incluso puede ser más rápido aunque la mayoría lo hace lentamente.

En el monitoreo del crecimiento de las células eucariotas como las levaduras y hongos, la velocidad de crecimiento de cada especie determinará el tiempo de incubación

(Liébana, 1997). Las levaduras comúnmente se reproducen con la formación de yemas por gemación y división transversal, cada yema que se separa genera una nueva levadura, y algunas se agrupan para formar colonias (Prescott *et al.*, 2004).

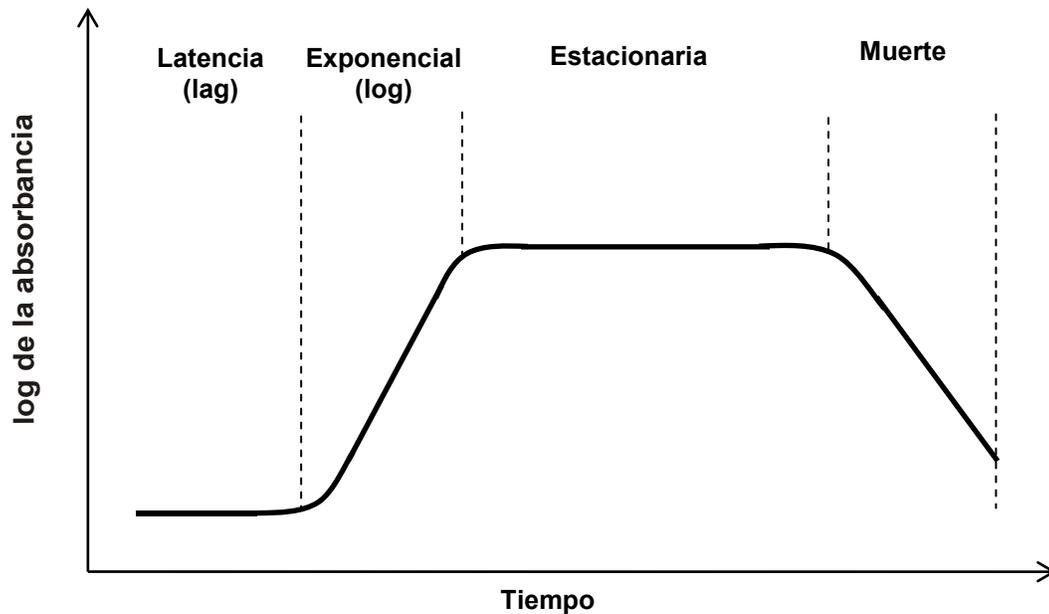
Las células al crecer y reproducirse en un medio líquido generan cierta turbidez que permite medir su desarrollo microbiano a través del tiempo con un espectrofotómetro, el cual mide la cantidad de luz emergente no dispersada por las células. Así el desarrollo de las cepas microbianas puede ser monitoreado con ayuda de métodos espectrofotométricos, resiembras y observaciones al microscopio. Sin embargo para realizar esto se necesita tener una curva estándar ya que las unidades de densidad óptica son proporcionales al número de células solo dentro de ciertos límites (Brooks *et al.*, 1999; Prescott *et al.*, 2004).

La curva estándar puede lograrse microscópicamente o con un recuento de células viables o a través de peso seco para así obtener una estimación de ambos parámetros a partir de una simple lectura en el espectrofotómetro (Madigan *et al.*, 2004). El desarrollo celular se grafica semilogárfmicamente y de esta manera se puede observar el ciclo de vida.

Las observaciones y los monitoreos realizados de las cepas microbianas han permitido saber que una parte importante del desarrollo de los microorganismos depende de la disponibilidad y cantidad de nutrimentos. Los microorganismos compiten entre ellos por los nutrientes para poder desarrollarse y reproducirse. Cuando se tienen todas las condiciones adecuadas para que un microorganismo en específico se desarrolle, este se multiplicará de tal forma que permitirá observar las fases que forman su ciclo de vida hasta su muerte (Prescott *et al.*, 2004).

*Fases de crecimiento celular microbiano.* Las diferentes etapas que se presentan durante el desarrollo de los microorganismos son nombradas como la fase de latencia

(lag), la fase exponencial (log), la fase estacionaria y la fase de muerte. El comportamiento de los microorganismos en etapas lo podemos apreciar en la Figura 5.



**Figura 5.** Fases de crecimiento microbiano en un sistema discontinuo o cerrado.

Prescott y colaboradores (2004) hacen una descripción de cada una de las fases. La fase de latencia (lag) es aquella en la que al colocar un microorganismo en un medio de cultivo fresco, no se produce un aumento inmediato del número de células o de masa. Sin embargo, este es un proceso activo ya que la célula se encuentra sintetizando nuevos componentes equipándose de nuevo, replicando su ADN, comenzando a incrementar su masa y finalmente dividiéndose. La fase de latencia tiene una duración variable según el estado del microorganismo y la naturaleza del medio. Cuando se transfiere un cultivo en

fase de crecimiento exponencial a un medio nuevo de la misma composición, la fase de latencia se acorta o no se produce.

La fase exponencial o log es la más importante en cuanto a la determinación antimicrobiana se refiere ya que es la utilizada en estudios bioquímicos y fisiológicos debido a que durante esta fase, la población es más uniforme, química y fisiológicamente. Los microorganismos en esta fase se dividen y crecen hasta el nivel máximo posible dependiendo de su potencial genético, del tipo de medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento. El crecimiento microbiano en esta fase es constante porque las células se duplican en número a intervalos regulares, lo que ocasiona una curva con aumento suave y no con saltos discretos.

Una fase anterior y posterior a la fase exponencial resultaría inapropiada en estudios bioquímicos y fisiológicos debido a que en la fase anterior, llamada de latencia, el microorganismo se encuentra en adaptación al nuevo medio de cultivo así como sintetizando nuevos componentes por lo que el aumento de número de células normalmente no se produce. Mientras que en la fase posterior (estacionaria) las células microbianas llegan a tener un estrés nutricional que las hacen mucho más resistentes al daño por diferentes mecanismos de factores como compuestos químicos tóxicos al producir proteínas que se unen y protegen a la célula microbiana. Esta fase no puede ser empleada en análisis microbiológicos debido a que si una célula entra en un estrés nutricional se vuelve más resistente al daño por diferentes mecanismos y en algunos casos se tornan más virulentos. (Prescott *et al.*, 2004).

La fase estacionaria se da a lugar cuando el crecimiento de la población cesa y la curva se hace horizontal (Figura 5). En esta fase el número total de microorganismos permanece constante debido a que han alcanzado un equilibrio entre la división y la muerte o porque la población deja de dividirse, aunque siga metabólicamente activa. Las células microbianas pueden entrar en fase estacionaria por diferentes causas, por la

limitación de los nutrientes, por acumulación de residuos tóxicos o por alcanzar un cierto nivel crítico poblacional, estos factores pueden actuar conjuntamente.

La fase de muerte tiene un comportamiento en las células que se muestra como una disminución del número viable de éstas. Aquí las células mueren en cantidad constante siendo normalmente una disminución logarítmica similar pero inversa a la fase exponencial. En esta fase las células mueren, es decir que pierden toda capacidad de multiplicarse. La supervivencia prolongada de algunas células resistentes ocasiona en un punto de la curva la disminución de la velocidad de mortalidad.

El crecimiento microbiano y su monitoreo es de suma importancia para estudios en la inactivación de células microbianas, específicamente patógenas, ya que este crecimiento no es precisamente el aumento de tamaño de una célula empleada en estudios de bioquímica o nutrición microbiana si no un aumento en el desarrollo de la biomasa celular y concentración celular importante para estudios de genética microbiana o de inactivación de las células (Brooks *et al.*, 1999).

La determinación de la fase exponencial en este trabajo se realizó en un sistema cerrado o discontinuo. El sistema cerrado o discontinuo se entiende como aquél en que no se añade más cantidad de medio que la inicial es decir, que no se renuevan los aportes de nutrientes ni se eliminan los residuos, a diferencia del sistema continuo en el cual constantemente se suministran nutrientes y se realiza la eliminación de residuos.

La desventaja de los medios continuos de los discontinuos es que en los continuos el nutriente esencial o limitante al ser adicionado de forma no constante puede ocasionar la variación también tanto del crecimiento como de la densidad final de las células, ya que estos dos dependen de la concentración de dicho nutriente. Si la velocidad de incorporación del nutriente varía también variará el crecimiento celular (Prescott *et al.*, 2004). Estos factores en análisis antimicrobianos pueden causar errores en la determinación de la capacidad antimicrobiana a causa de la variación del crecimiento en

la fase exponencial. En cambio el medio discontinuo mantiene constantes estos parámetros disminuyendo los posibles cambios o variaciones de crecimiento.

Debido a todo lo descrito anteriormente la fase exponencial o fase log es la de uso en la determinación antimicrobiana de nuevos agentes antibacterianos y antimicóticos por diferentes métodos (Prescott *et al.*, 2004).

### **2.3 Métodos para determinación antimicrobiana**

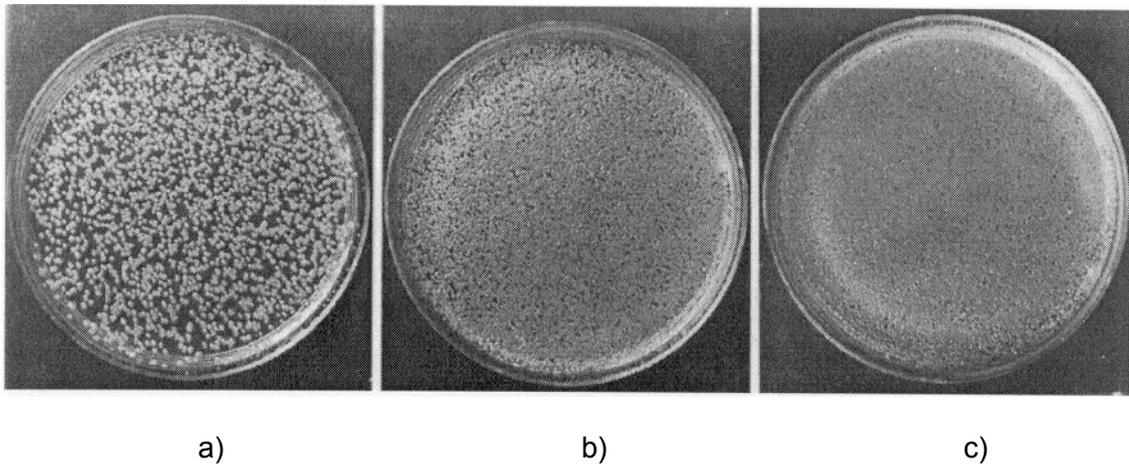
La determinación preliminar de la actividad antimicrobiana se realiza a través de los métodos *in vitro*. Dentro de estos métodos se encuentra el de difusión en disco y dilución en caldo, los cuales son empleados como procedimientos en microbiología clínica. Son recomendados por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas (García *et al.*, Apartado 11, 2000), así como también por la FDA y aceptados como estándar por el NCCLS como pruebas adecuadas para estudiar la sensibilidad de los microorganismos, al ser técnicas sencillas y flexibles (Cona, 2002; Liébana, 1997). A través de estos métodos generales de análisis el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) realiza la valoración microbiológica de antibióticos (IMSS, 2001). Por lo anterior en el actual trabajo se utilizaron estos dos métodos y se describen a continuación.

#### **2.3.1 Método de difusión de agar en disco**

El método de difusión de agar en disco se basa en la difusión del antibiótico desde un punto de aplicación a través de una superficie de agar inoculado con el microorganismo de prueba. La difusión origina zonas de inhibición del microorganismo cuyo tamaño (diámetro) está en relación con la concentración del antibiótico.

La concentración es un factor que determina la efectividad del antimicrobiano así como el tiempo de contacto, esto es porque de ellos depende la disminución o eliminación de la acumulación de los patógenos que son causantes de enfermedades (Atlas, 1988; Prescott *et al.*, 2004).

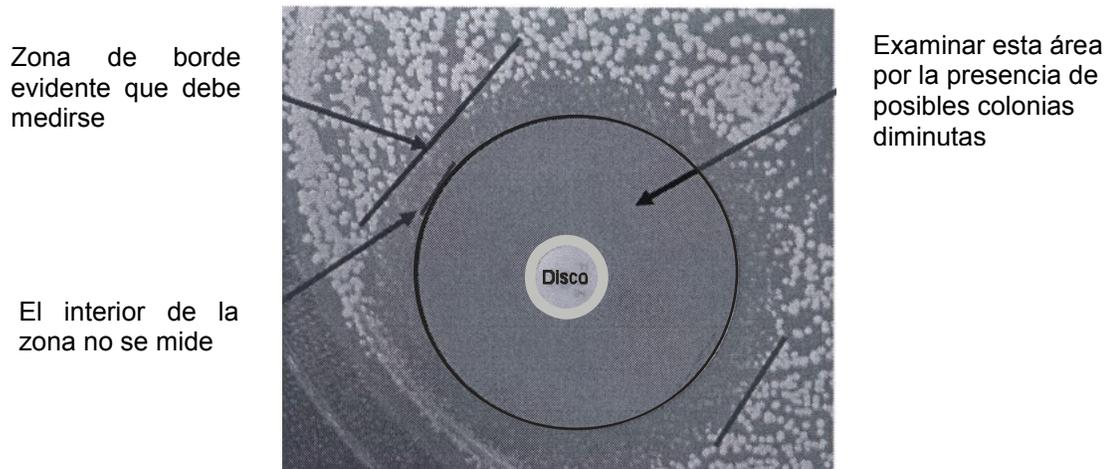
El efecto de la concentración del compuesto a prueba está basado en la cantidad de inóculo presente del microorganismo. En la Figura 6, se observa el inóculo ideal con densidad aceptable para el crecimiento de las colonias en la prueba de susceptibilidad en placa.



**Figura 6.** Inóculo a) menos aceptable; b) ideal y c) máximo aceptable de colonias en la prueba de susceptibilidad en placa (Andrews, 2006).

La cantidad de inóculo del microorganismo influye también en la formación del halo y su apreciación como resultado de la prueba. El diámetro de la zona de inhibición indica la capacidad de matar o inhibir y se miden los milímetros más cercanos de los bordes de la zona sin crecimiento microbiano establecido por el ojo humano. La medición se puede

realizar con una regla, un vernier digital o a través de una zona de lectura automática de forma rápida y sencilla (Andrews, 2006), Figura 7.



**Figura 7.** Lectura de zonas de inhibición presentes en un halo (Andrews, 2006).

La quimiotaxis negativa realizada por las bacterias en el medio permite observar de manera clara el hecho de si existe o no inhibición por el desarrollo de un halo. Es importante mencionar que si se llega a apreciar dentro de los bordes de la zona de inhibición formaciones de colonias, líneas o películas se debe determinar si esto es debido al desplazamiento del antimicrobiano o es una colonia diferente a la estudiada. La formación de una colonia diferente dentro de la zona de inhibición, condiciona a que esta debe ser resembrada para su identificación y de ser necesario repetir la prueba de susceptibilidad pues es señal de contaminación.

El método de difusión en disco tiene diferentes ventajas en comparación con otros métodos existentes, como por ejemplo el método de Epsilon y el método de difusión en pozos. Entre las ventajas tenemos el tiempo menor de elaboración, el costo menor de

material y reactivos así como la mayor facilidad en la manipulación de la muestra durante la prueba. Es un método que se considera más cualitativo que cuantitativo pues permite visualizar el efecto de los compuestos a prueba. Así también acerca o reduce las concentraciones en la que se puede localizar la concentración mínima específica a la cual se obtiene la mayor disminución o muerte del microorganismo (García *et al.*, apartado 11, 2000).

En ciertos casos que se puede cuantificar la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la concentración más baja de fármaco que inhibe la proliferación del microorganismo (Levinson y Jawest, 1992; García, apartado 12, 2000), se realiza contrastando previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. Se lleva a cabo con cientos de bacterias para minimizar errores. Se grafican los halos de inhibición frente a las CMI y se hace una recta de concordancia, así para determinar la CMI de una cepa los diámetros de los halos de inhibición se extrapolan en la gráfica (García *et al.*, apartado 11, 2000).

Puede realizarse un resembrado en placa de la zona del halo en donde no se observan unidades formadoras de colonias (UFC). Aunque este procedimiento se hace difícil pues implica una mayor habilidad en la toma de muestra de las colonias existentes o no dentro del halo, considerando que el tamaño del halo puede resultar pequeño. Si la toma de muestra es incorrecta el resembrado arrojará resultados erróneos y por lo tanto no se podrá determinar correctamente las concentraciones con efecto inhibitorio o de muerte. Así también se debe de asegurar que es la colonia original sembrada y no una colonia distinta debido a contaminación. Finalmente, después del resembrado, si existe crecimiento en la placa es un actividad inhibitoria si no existe crecimiento es bactericida. Por lo anterior es que se considera un método en su mayoría cualitativo.

El método de difusión en placa es aplicable tanto para bacterias como para levaduras y hongos, sin embargo el medio de cultivo y el tiempo de incubación será distinto para cada especie como es de esperarse (Liébana, 1997).

Un método que sí permite cuantificar la actividad antimicrobiana de manera tanto sencilla como rápida y dar la CMI y CMB es el de dilución en caldo. La CMB es la concentración a la que se lisa un microorganismo más que inhibirlo, reduciendo el 99.9% de las colonias (García *et al.*, apartado 12, 2000; Levinson y Jawest, 1992).

### **2.3.2 Método de macro dilución en caldo**

El método de macro dilución en caldo es una técnica considerada cuantitativa que se basa en la turbidez que presenta el medio de cultivo provocado por el crecimiento celular. Esto se evalúa ópticamente y se seleccionan los tubos con menor turbidez para obtener la CMI ó CMB del antimicrobiano. Este método es cuantitativo en comparación con el método de difusión porque permite conocer la CMI y CMB a través del resembrado. Es decir, aunque exista turbidez en los tubos de prueba, este puede ser generado por el compuesto y no por el crecimiento microbiano. Es cuantificable porque a través del recuento en placa que se realiza para comprobar y medir el efecto proporcionado por una concentración específica del antibiótico, indica la CMI o la CMB.

Tanto el método de macro dilución en caldo como el turbidimétrico se realizan en un medio de cultivo líquido inoculado con el microorganismo de prueba al que se le adicionan concentraciones crecientes del antibiótico. Después del periodo de incubación, se observa o se mide la turbidez producida por el crecimiento microbiano logrado, el cual dependerá de la concentración y efecto del antibiótico (IMSS, 2001).

La técnica de macro dilución en el área de la investigación es una prueba metodológica recomendada para evaluar nuevos o antimicrobianos comunes frente a patógenos conocidos determinando así su capacidad y poder bactericida.

El método de dilución es un método simple y eficaz sin embargo, al igual que el de difusión, puede presentar efectos llamados paradójico, de tolerancia y de perseverancia. El fenómeno paradójico, o de Eagle, consiste en la presencia de un mayor número de bacterias supervivientes a concentraciones superiores a la CMB. La tolerancia es la disminución o desaparición de la capacidad de matar de un antibiótico bactericida en un determinado aislamiento o especie. Y la persistencia refleja el hecho de que una pequeña población resiste a la acción bactericida, esta cuantía suele ser menor al 0.1% así la CMB es la muerte en 99.9% del inóculo (García *et al.*, apartado 12, 2000).

Los métodos de difusión en disco y macro dilución en caldo se complementan ya que se necesita conocer el intervalo de concentraciones de los compuestos en estudio en el que son activos, y a que concentración mínima determinada tienen un efecto inhibitorio o bactericida.

En particular, en la determinación antimicótica aplicando uno y otro método se pueden obtener las CMB y CMI. Para realizar esto se debe de seleccionar adecuadamente el medio de cultivo, el tamaño de inóculo y el tiempo de incubación para cada especie. El uso de estos métodos, para la determinación antimicótica de la levadura aquí estudiada, es correcto ya que otros métodos han dado divergencias en los resultados y en su correlación entre ellos. Sin embargo cuidando estos factores con las técnicas de dilución en caldo, dilución en agar y difusión en discos se tienen resultados confiables que hacen que sean técnicas más empleadas en la práctica (Liébana, 1997; Torres, 2005).

Los métodos de difusión en disco y dilución en caldo descritos anteriormente se emplearon en la determinación antimicrobiana de 15 compuestos derivados e intermediarios de quinoxalinonas.

## 2.4 Derivados de quinoxalinonas con actividad antimicrobiana

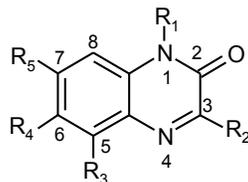
Los compuestos sintéticos que son derivados de quinoxalinonas constituyen una clase importante de antimicrobianos farmacéuticos y agrícolas. Estos son usados con una finalidad microbiológica importante en tejidos de algodón así también actuando como herbicidas, fungicidas, antagonistas, antibióticos, entre otros (Obafemi y Akinpelu, 2005).

Se han publicado algunos estudios referentes al comportamiento antimicrobiano de quinoxalinonas (Carta *et al.*, 2003; Sanna *et al.*, 1998; Sanna *et al.*, 1999, a y b). Sin embargo existen otros derivados que en la actualidad se están sintetizando y no cuentan con el estudio correspondiente a su capacidad de inhibir o matar microorganismos *Gram* negativos, positivos y levaduras.

Los 15 derivados de quinoxalin-2[1H]-onas, Figura 1, objetos de este estudio, resultan de interés pues análogos a ellos han mostrado actividad tanto antibacteriana como antifúngica, anticancerígena, antiinflamatoria y antidepresiva (Ali *et al.*, 2000). La actividad antimicrobiana de estos análogos ha sido descrita como baja a alta en bacterias *Gram* positivas, *Gram* negativas y levaduras. Los resultados de evaluaciones antimicrobianas descritas en la literatura se muestran en las Tabla 1 y 2.

En la Tabla 1 se observa la actividad antimicrobiana de una serie de dihidroquinoxalinonas descrita por grupos de investigadores europeos. Estas dihidroquinoxalinonas en su mayoría presentan de una moderada a baja o nula actividad antibacterial y antimicótica, CMI 125 a  $\geq 500$   $\mu\text{g/mL}$  (Carta *et al.*, 2003; Sanna *et al.*, 1998, 1999, a, 1999, b).

En relación a la actividad antimicrobiana contra *E. coli*, se puede observar que más de la mitad de las dihidroquinoxalinonas estudiadas mostraron CMIs desde 125 a  $\geq 500$   $\mu\text{g/mL}$ , mientras que siete de ellas fueron inactivas (Carta *et al.*, 2003; Sanna *et al.*, 1998, 1999, b).

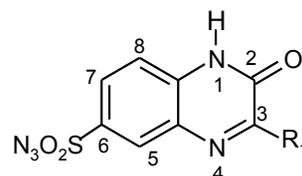
**Tabla 1.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), µg/mL, de quinoxalinas determinadas por el método de dilución.

Compuesto	Sustituyentes	Microorganismos					Referencia
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida spp.</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	
<b>4</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>5</sub> = H, R <sub>2</sub> = CO <sub>2</sub> Et, R <sub>4</sub> = CF <sub>3</sub>	125	250	N	N.D.	N.D.	
<b>5</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = CO <sub>2</sub> Et, R <sub>5</sub> = CF <sub>3</sub>	125	≥ 500	N	N.D.	N.D.	
<b>6</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = CO <sub>2</sub> Et, R <sub>5</sub> = CH <sub>3</sub>	≥ 500	≥ 500	250	N.D.	N.D.	Sanna <i>et al.</i> , 1998
<b>7</b>	R <sub>1</sub> = Et, R <sub>2</sub> = CO <sub>2</sub> H, R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = H	≥ 500	≥ 500	N	N.D.	N.D.	
<b>8</b>	R <sub>1</sub> = Et, R <sub>2</sub> = CO <sub>2</sub> H, R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>5</sub> = CF <sub>3</sub>	≥ 500	≥ 500	N	N.D.	N.D.	
<b>9</b>	R <sub>1</sub> = Et, R <sub>2</sub> = CO <sub>2</sub> H, R <sub>3</sub> = R <sub>5</sub> = H, R <sub>4</sub> = CF <sub>3</sub>	≥ 500	≥ 500	N	N.D.	N.D.	
<b>10</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>5</sub> = H, R <sub>2</sub> = Et, R <sub>4</sub> = CF <sub>3</sub>	≥ 500	≥ 500	N.D.	N	N.D.	Sanna <i>et al.</i> , 1999, a
<b>11</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>5</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Et, R <sub>4</sub> = CF <sub>3</sub>	≥ 500	≥ 500	N.D.	N	N.D.	
<b>12</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Et, R <sub>5</sub> = CF <sub>3</sub>	≥ 500	≥ 500	N.D.	N	N.D.	
<b>13</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> Br, R <sub>5</sub> = NO <sub>2</sub>	125	250-500	N.D.	62.5	8	
<b>14</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>5</sub> = CF <sub>3</sub>	N	N	N.D.	15.6	8	
<b>15</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>5</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = CF <sub>3</sub>	N	250-500	N.D.	N	N	
<b>16</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> Br, R <sub>5</sub> = CF <sub>3</sub>	N	62	N.D.	62.5	>125	Sanna <i>et al.</i> , 1999, b
<b>17</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>5</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> Br, R <sub>4</sub> = CF <sub>3</sub>	N	31.2	N.D.	15.6	31.2	
<b>18</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> Br, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = F	N	125	N.D.	62.5	31.2	
<b>19</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>2</sub> = CF <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = F	N	250-500	N.D.	N	N	
<b>20</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>5</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = CF <sub>3</sub>	N	250-500	N.D.	125	8	
<b>21</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> Br, R <sub>3</sub> = Cl, R <sub>5</sub> = CF <sub>3</sub>	125-500	125-500	N.D.	≥250	N.D.	
<b>22</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = Et, R <sub>3</sub> = Cl, R <sub>5</sub> = CF <sub>3</sub>	125-500	125-500	N.D.	≥250	N.D.	Carta <i>et al.</i> , 2003
<b>23</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>5</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = Cl, R <sub>4</sub> = CF <sub>3</sub>	125-500	125-500	N.D.	≥250	N.D.	
<b>24</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>2</sub> = CO <sub>2</sub> Et, R <sub>3</sub> = Cl, R <sub>5</sub> = CF <sub>3</sub>	125-500	125-500	N.D.	≥250	N.D.	

N = Negativo

N.D. = No determinado

**Tabla 2.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), µg/mL, y halo de inhibición (mm) de quinoxalinonas determinadas por el método de difusión en pozos.



Compuesto	Sustituyente	Microorganismos								Referencia
		<i>Escherichia coli</i> NCIB 86		<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 418		<i>Staphylococcus aureus</i> NCIB 8588		<i>Candida albicans</i>		
		Halo de inhibición, a 2 mg/mL	CMI	Halo de inhibición, a 2 mg/mL	CMI	Halo de inhibición, a 2 mg/mL	CMI	Halo de inhibición, a 2 mg/mL	CMI	
<b>25</b>	R <sub>1</sub> = H	17	250	15	31.3	27	1000	26	N.E.	Obafemi y
<b>26</b>	R <sub>1</sub> = OH	32	62.5	30	31.3	21	15.6	25	N.E.	Akinpelu, 2005

N.E. = No especificada

Sin embargo, en la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* se observó que prácticamente todas las dihidroquinoxalinonas inhiben su crecimiento, con excepción de un isómero evaluado (**14**). Las CMI's contra *S. aureus* está entre 125 y  $\geq 500$   $\mu\text{g/mL}$ , y de manera general resaltan dos compuestos halogenados **16** y **17** que presentan una actividad antibacteriana alta, CMI de 62 y 31.2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Sanna *et al.*, b, 1999).

Con respecto a la actividad antimicótica de quinoxalinonas, el grupo de Sanna *et al.*, (1999, b), encontró que las CMI's contra *C. albicans* fueron más pequeñas que las correspondientes para las bacterias antes mencionadas. Estas concentraciones se encuentran en el intervalo de 8 a 125  $\mu\text{g/mL}$ . Los compuestos estudiados se caracterizan por poseer átomos de Br y F, tanto en el aromático como en C-2, Tabla 1. El patrón de sustitución de estos halógenos parece no tener influencia en la actividad antimicrobiana evaluada. Posteriormente en el 2003, Carta *et al.*, estudiaron dihidroquinoxalinonas también halogenadas con Br y F, pero adicionalmente estas moléculas contenían en C-5 un átomo de Cl.

Las CMI's determinadas, 125-500  $\mu\text{g/mL}$ , sugieren que la presencia del Cl en C-5 indujo una disminución de la capacidad de inhibición contra *C. albicans*. El resto de los compuestos estudiados mostró CMI's  $\geq 250$   $\mu\text{g/mL}$ . Todos los estudios antes mencionados fueron realizados por el método de dilución en caldo.

El único reporte a la fecha de la actividad antimicrobiana de quinoxalinonas por el método de difusión en pozos es el descrito por Obafemi y Akinpelu en 2005, Tabla 2. El estudio involucró las cepas *E.coli* NCIB 86, *K. pneumoniae* NCIB 418, *S. aureus* NCIB 8588 y *C. albicans* con dos quinoxalinonas; **25** y **26**. Los resultados muestran que los heterociclos tienen una actividad alta, la cual es debido a la alta reactividad principalmente del grupo  $\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  en C-6.

Las determinaciones de los halos de inhibición, en mm, se realizaron a 2 mg/mL del heterociclo correspondiente, se observó que existe una mayor sensibilidad sobre los microorganismos *G* (-), al compuesto **26** ( $R_1 = OH$ ). Para el caso de los halos de inhibición correspondientes de *E. coli* NCIB 86 y *K. pneumoniae* NCIB 418 los valores de **26** son prácticamente dos veces que los que genera el derivado no hidroxilado **25**, Tabla 2.

Las CMI's encontradas por Obafemi y Akinpelu para tres de los microorganismos antes mencionados están entre 250 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  para **25** ( $R_1 = H$ ). En cambio, en el derivado **26** ( $R_1 = OH$ ), las CMI's se encuentran en un intervalo de 15.6 a 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . Esto nos indica que la quinoxalinona hidroxilada es más tóxica al tener la CMI menor.

En el presente trabajo, así como los mencionados en las Tablas 1 y 2, en la determinación antimicrobiana de quinoxalinonas se empleó una bacteria *Gram* negativa *Escherichia coli* ATCC 35218, una *Gram* positivas *S. epidermidis* ATCC 12228 y la levadura *Candida albicans* ATCC 14053. La actividad antimicrobiana *in vitro* de las 12 tetrahydroquinoxalinonas (**1a-l**), los dos intermediarios de quinoxalinonas (**2a**, **2b**) y la dihydroquinoxalin-2-ona (**3**), Figura 1, se determinó por los métodos de difusión en disco y macro dilución en caldo.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Equipo, materiales y reactivos

Autoclave All-American 25X-1, campana de flujo laminar Labconco Lac-36125-00, cuenta colonias Solbat Q-20 y lápiz marcador de colonias digital Bel-Art F37862, estufa bacteriológica Ríos Rocha modelo H-33, espectrofotómetro UV/vis Perkin Elmer Lambda 35, microscopio electrónico trinocular Karl Zeiss Axioskop 20, refrigerador Acros ART14JKX, congelador General Electric FUM 17DRBRWH.

Agujas entomológicas, asa de cultivo de punta redonda y punta recta, base de unicel, cajas Petri de 9 x 1 cm Kimax, matraces Erlenmeyer de 250 mL Pirex, micropipeta 10 a 100  $\mu$ L High Tech VE 100/10-100, micropipeta 100 a 1000  $\mu$ L High Tech VE 1000/100-1000, micropipeta 20-200  $\mu$ L High Tech VE 200/ 20-200, papel filtro Whatman 42, perforadora de 6 mm, tenazas, pipetas serológicas 10 mL Kimax, tubos de ensaye con tapón de rosca 13 x 100 mm y 15 x 125 mm Pyrex, varilla de vidrio, vernier digital General (precisión 0.1 mm), celdas de metacrilato para espectrofotómetro de 1 x 1 cm Aldrich.

Multidiscos combinados Bio-Rad: Amikacina (30  $\mu$ g), ampicilina (10  $\mu$ g), cefalotina (30  $\mu$ g), ceftriaxona (30  $\mu$ g), cloranfenicol (30  $\mu$ g), dicloxacilina (1  $\mu$ g), enoxacina (10  $\mu$ g), eritromicina (15  $\mu$ g), gentamicina (10  $\mu$ g), netilmicina (30  $\mu$ g), penicilina (10 u), trimetroprimulfametoxazol (25 u). Nistatina Sigma. Agua inyectable Pisa, glicerol 99.5% Analytyca, etanol 99.5% Omnicem.

**Medios de cultivos.** Agar Dextrosa Sabouraud 2% (ADS) Bioxon, agar para Estafilococos No. 110 (AE110), agar Mc Conkey (AMC), agar Mueller Hinton (AMH), caldo E. coli, caldo Mueller Hinton (CMH), caldo nutritivo, todos marca Dibico.

#### 3.2 Microorganismos usados

Las tres cepas microbianas patógenas tipificadas empleadas, la bacteria *Gram* negativa *Escherichia coli* ATCC 35218, la bacteria *Gram* positiva *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, y la levadura *Candida albicans* ATCC 14053 marca DIBICO, fueron obtenidas de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC, por sus siglas en inglés) en forma liofilizada. Inicialmente las cepas liofilizadas se hicieron crecer en 9 mL de caldo E. coli para *E. coli* ATCC 35218, caldo nutritivo para *S. epidermidis* ATCC 12228 y la levadura *C. albicans* ATCC 14053 y de ahí fueron sembradas en AMC, AE110 y ADS, respectivamente, para su aislamiento.

#### 3.3 Quinoxalin-2[1H]-onas e intermediarios

El equipo de investigación de la Dra. Santos-Sánchez de nuestra universidad aportó los compuestos quinoxalin-2[1H]-onas para su evaluación antimicrobiana, Figura 1. Todas las moléculas fueron totalmente caracterizadas espectroscópica- y espectrométricamente. La pureza de todos los compuestos fue mayor al 99% (Santos-Sánchez *et al.*, 2008).

### 3.4 Ensayo antimicrobiano

#### 3.4.1 Preservación de cepas microbianas

Las cepas microbianas se hicieron crecer por separado en 50 mL de caldo E. coli para *E. coli* ATCC 35218, caldo nutritivo para *S. epidermidis* ATCC 12228 y la levadura *C. albicans* ATCC 14053. De estos cultivos microbianos se tomó una alícuota con asa de inoculación de punta recta para tubo inclinado y otra con asa de punta redonda para placa por estría cruzada. Ambas siembras se realizaron en AMC para *E. coli* ATCC 35218, AE110 para *S. epidermidis* ATCC 12228, y ADS para la levadura *C. albicans* ATCC 14053. Los tubos inclinados y las placas se incubaron a 37°C para las bacterias y 28°C para la levadura obteniéndose así cepas viables para conservarse a 4°C. Las temperaturas de incubación se mantuvieron constantes para todos los experimentos en toda la metodología.

Las placas por estría cruzada de cada cepa fueron resembradas cada tres semanas para la realización de las curvas de crecimiento y para la determinación antimicrobiana tanto por el método de difusión en disco como por el método de macrodilución en caldo. Adicionalmente, de las placas se tomaron cuatro asadas de las colonias de cada cepa microbiana y se colocaron en viales criogénicos con un volumen de 800 µL de glicerol estéril al 20% y se conservaron a -20°C, Figura 8.



**Figura 8.** Cepas microbianas en tubos criogénicos.

### 3.4.2 Determinación de la fase exponencial de la población microbiana

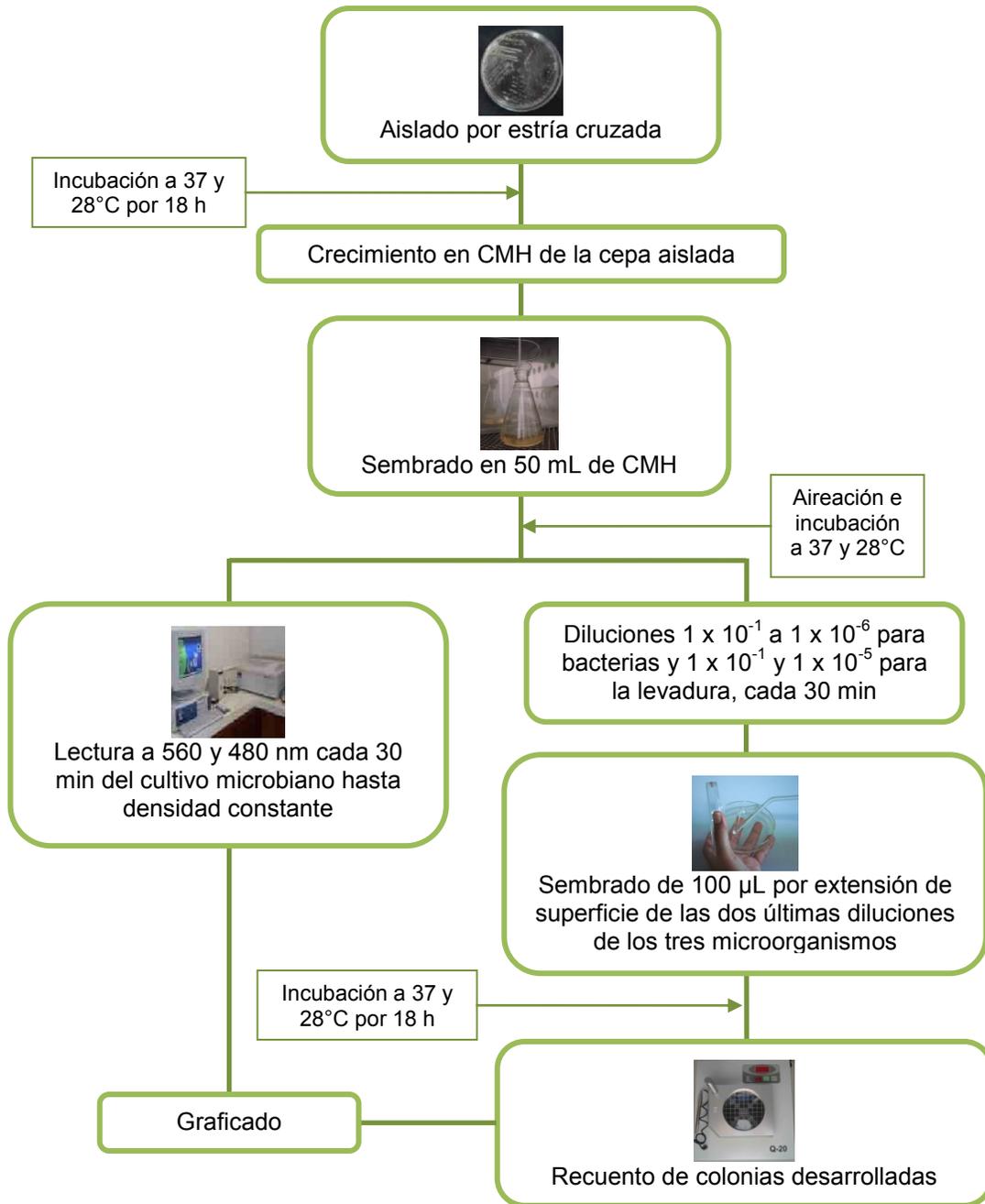
El crecimiento de la población microbiana de cada una de las cepas se analizó a través de las curvas de crecimiento poblacional en un cultivo discontinuo. Estas curvas permitieron representar el crecimiento de cada uno de los tres microorganismos en la fase exponencial, al graficar la absorbancia frente al tiempo de incubación. Ambos datos se correlacionaron con el de número de células viables obtenido en cada intervalo de tiempo.

La fase exponencial de las cepas microbianas se determinó de colonias aisladas por estría cruzada en placas con los medios AMC, AE110 y ADS. De cada placa se tomó una colonia y se inoculó por asada en un tubo de ensaye con 9 mL de CMH, que se incubó a 37°C (bacterias) y 28°C (levadura) por 18 h. Pasado el tiempo de incubación del tubo de ensaye se tomó una alícuota de 4 mL y se inoculó en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de CMH.

Del cultivo microbiano anterior se tomó una alícuota de 4.5 mL cada 30 minutos y se depositó en una celda para leer su densidad óptica en un espectrofotómetro a 560 nm para las bacterias y 480 nm para la levadura. Se tomó también 1 mL y se diluyó en un tubo de ensaye con 9 mL de CMH y de este tubo se tomó 1 mL para que se diluyera en otros 9 mL de CMH y así sucesivamente hasta obtener diluciones de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-6}$  para las bacterias y  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-5}$  para la levadura, de las cuales se sembraron las dos últimas. De las diluciones ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-6}$ , bacterias;  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-5}$ , levadura) se tomaron 100  $\mu$ L, de cada una con micropipeta empleando puntas estériles, que se inocularon por extensión de superficie en cajas petri con AMH. El inóculo microbiano se distribuyó con una varilla de vidrio con movimientos circulares para que la distribución fuera homogénea. De tal forma que los resultados fueran fiables tanto en el recuento de las diluciones como la técnica de sembrado y evitar las agrupaciones de las células, permitiendo el número de colonias correcto por placa (entre 30 y 300 UFC) (Prescott *et al.*, 2004). Las placas se incubaron por 18 h, realizándose por triplicado.

El monitoreo espectroscópico del crecimiento poblacional se llevó a cabo hasta que la densidad óptica fuera constante. El conteo de colonias de las placas inoculadas se realizó a las 18 h de incubación. Las placas con número de colonias menor a 30 o mayor a 300 se descartaron para que fueran confiables estadísticamente (Arcila, 1999; Prescott *et al.*, 2004). El diagrama de flujo de la metodología para la obtención de la fase log se muestra en la Figura 9.

Con los datos de absorbancia, tiempo y UFC/mL, se realizó una gráfica en papel semilogarítmico en donde el eje de las abscisas corresponde a los intervalos de tiempo de la toma de muestras del cultivo microbiano en crecimiento. El eje de las ordenadas corresponde al logaritmo de la absorbancia del cultivo microbiano a ese lapso de tiempo. Ambos ejes se relacionaron contra el número de células formadoras de colonias presentes en cada intervalo de tiempo. Este número de células viables se realizó multiplicando el factor de dilución por el número de colonias obtenidas en el recuento para obtener las UFC/mL. Los ensayos para determinar la fase exponencial para cada microorganismo se realizaron por duplicado.



**Figura 9.** Diagrama de flujo de la fase log del crecimiento microbiano poblacional de *E.coli* ATCC 35218, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *C. albicans* ATCC 14053.

### 3.4.3 Preparación de discos para la metodología por difusión

Al papel filtro Whatman 42 se le realizó lavados con hexano y cloroformo para eliminar impurezas, una vez seco se obtuvieron los discos con una perforadora de un diámetro de 6 mm, y se esterilizaron. Los discos estériles se colocaron sobre soportes metálicos (agujas entomológicas previamente estériles) fijados en una base de unicel cubierta de papel aluminio.

Para la elección de la concentración del antifúngico a emplear como control positivo se le adicionó a cada disco, con una micropipeta con puntas estériles, una de las cinco concentraciones de la nistatina disuelta en agua inyectable (2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y se dejaron secar.

Para la determinación antimicrobiana general de los 15 derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-ona se le adicionó a cada disco las disoluciones de los compuestos objetos de estudio. Los compuestos orgánicos fueron disueltos en etanol y debido a que 20  $\mu\text{L}$  fue la capacidad máxima de absorción del disco, en repetidas ocasiones se le adicionó a cada disco, con una micropipeta, 20  $\mu\text{L}$  del compuesto. Esto hasta alcanzar un contenido 1000  $\mu\text{g}$  del compuesto en el disco (esta cantidad de compuesto se encontraba disuelta en 50  $\mu\text{L}$  de etanol), posterior a esto se dejaron secar. Cabe mencionar que los compuestos fueron probados inicialmente a 500  $\mu\text{g}$  (500 $\mu\text{g}$  de compuesto disuelto en 50  $\mu\text{L}$  etanol, que se dejó evaporar) pero los halos de inhibición resultaron poco apreciables y en algunos casos no existieron, por lo que la concentración se aumentó a 1000  $\mu\text{g}$  para observar mejor el efecto de los compuestos hacia los microorganismos.

Los compuestos que presentaron actividad antimicrobiana apreciable a 1000  $\mu\text{g}$  (**1a**, **1f** y **2a**) se les realizó nuevamente el ensayo antimicrobiano por el método de difusión en disco a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 1300 y 1500  $\mu\text{g}$  con la finalidad de tener un mayor conocimiento de su actividad antibacteriana y con ello

acercarse a la CMI y CMB. Para lograr lo anterior, se realizaron diluciones de los compuestos orgánicos en etanol y a cada disco se le adicionó en repetidas ocasiones 20  $\mu$ L de los compuestos derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-ona disueltos hasta alcanzar el contenido correspondiente en cada disco, posteriormente se dejaron secar.

La preparación de todos los discos se realizó en la campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad.

#### 3.4.4 Elección del control positivo

*Determinación del antibiótico.* La elección del antibiótico como control positivo se realizó a través del empleo de los multidiscos combinados (*Gram* negativos y *Gram* positivos) que son 12 discos con antimicrobianos diferentes (amikacina, ampicilina, cafalotina, ceftriaxona, cloranfenicol, dicloxacilina, enoxacina, eritromicina, gentamicina, netilmicina, penicilina, trimetoprim sulfametoxazol), localizados alrededor y al centro de un anillo Figura 10. Estos multidiscos son utilizados como agentes de diagnóstico para el estudio de la sensibilidad bacteriana *in vitro*. Los multidiscos combinados muestran la susceptibilidad de la cepa bacteriana en estudio debido a que están diseñados para probarse por el método de difusión en disco de papel filtro de Kirby-Bauer, con las modificaciones recomendadas por la FDA y el NCCLS.



**Figura 10.** Multidiscos combinados BIO-RAD®.

Para determinar el antibiótico a emplear, los multidiscos combinados se colocaron sobre la capa de agar inoculada con el microorganismo correspondiente y se presionaron ligeramente con pinzas estériles para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Las cajas se incubaron invertidas a 37°C por 18 h. Al término del tiempo de incubación se midieron los diámetros de las zonas de inhibición por la parte posterior de la placa con un Vernier digital, utilizando una fuente de luz brillante.

*Determinación de la concentración del antifúngico.* Los discos con las diferentes concentraciones de nistatina, se colocaron sobre la capa de agar previamente inoculada con la levadura a 15 mm del borde de la placa y 20 mm entre cada uno, se presionaron ligeramente con pinzas estériles para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Las cajas se incubaron invertidas a 28°C por 18 h. Al término del tiempo de incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición por la parte posterior de la caja Petri con un vernier digital, utilizando una fuente de luz brillante.

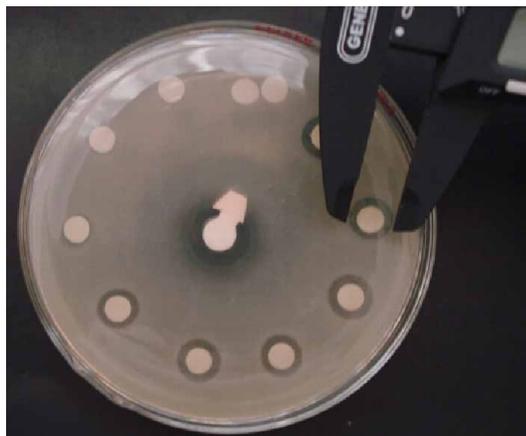
### 3.4.5 Determinación antimicrobiana de las 15 quinoxalin-2[1H]-onas e intermediarios por el método de difusión en disco

Las colonias microbianas se aislaron directamente por estría cruzada en los medios AMC, AE110 y ADS, se incubaron a 37°C en bacterias y 28°C en levadura por 24 h. Una vez terminada la incubación se tomó una colonia y se inoculó en un tubo de ensaye que contenía 9 mL de CMH tanto para bacterias como para la levadura incubándose a las temperaturas correspondientes por 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó una alícuota de 4 mL de la suspensión bacteriana del tubo de ensaye y se vertió en un matraz conteniendo 50 mL de CMH, mismo que se incubó a 37 y 28°C hasta obtener una densidad óptica correspondiente a la mitad de la fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada cepa microbiana.

Una vez alcanzada la absorbancia se tomó una alícuota que correspondiera a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para las bacterias y  $1 \times 10^8$  UFC/mL para la levadura (Sanna *et al.*, 1999; Carta *et al.*, 2003). La alícuota se colocó en tubos de ensaye que contenían 5 mL de Müeller Hinton semisólido y enseguida este contenido fue vertido homogéneamente en las cajas Petri con la capa base de 15 mL de AMH gelificado para formar la capa de siembra, es decir, la capa de agar inoculada con el microorganismo.

Inmediatamente se depositaron los discos con el apoyo de las pinzas estériles, presionándolos ligeramente para asegurar un contacto completo con la superficie del agar y evitar formación de espacios entre el disco y el agar. Se colocaron ocho discos en cada caja, de los cuales cinco contenían 1000 µg de los diferentes compuestos, los tres restantes son el blanco (disco sin etanol ni compuesto), el control negativo (disco con etanol solamente) y el control positivo (disco con gentamicina o nistatina). Para evitar la sobreposición de las zonas de inhibición, la distribución de los discos se realizó en un límite no menor de 15 mm en relación con el borde de la placa y 20 mm entre cada uno (García *et al.*, apartado 11 y 12, 2000).

Las cajas se incubaron a 37°C y 28°C por 18 h en forma invertida. Al terminar la incubación un halo de inhibición representó una prueba positiva de la actividad antimicrobiana del compuesto. Los diámetros de las zonas de inhibición se midieron por la parte posterior de la placa con un Vernier digital, utilizando una fuente de luz brillante, Figura 11.



**Figura 11.** Medición de halos de inhibición de **2a** con vernier digital.

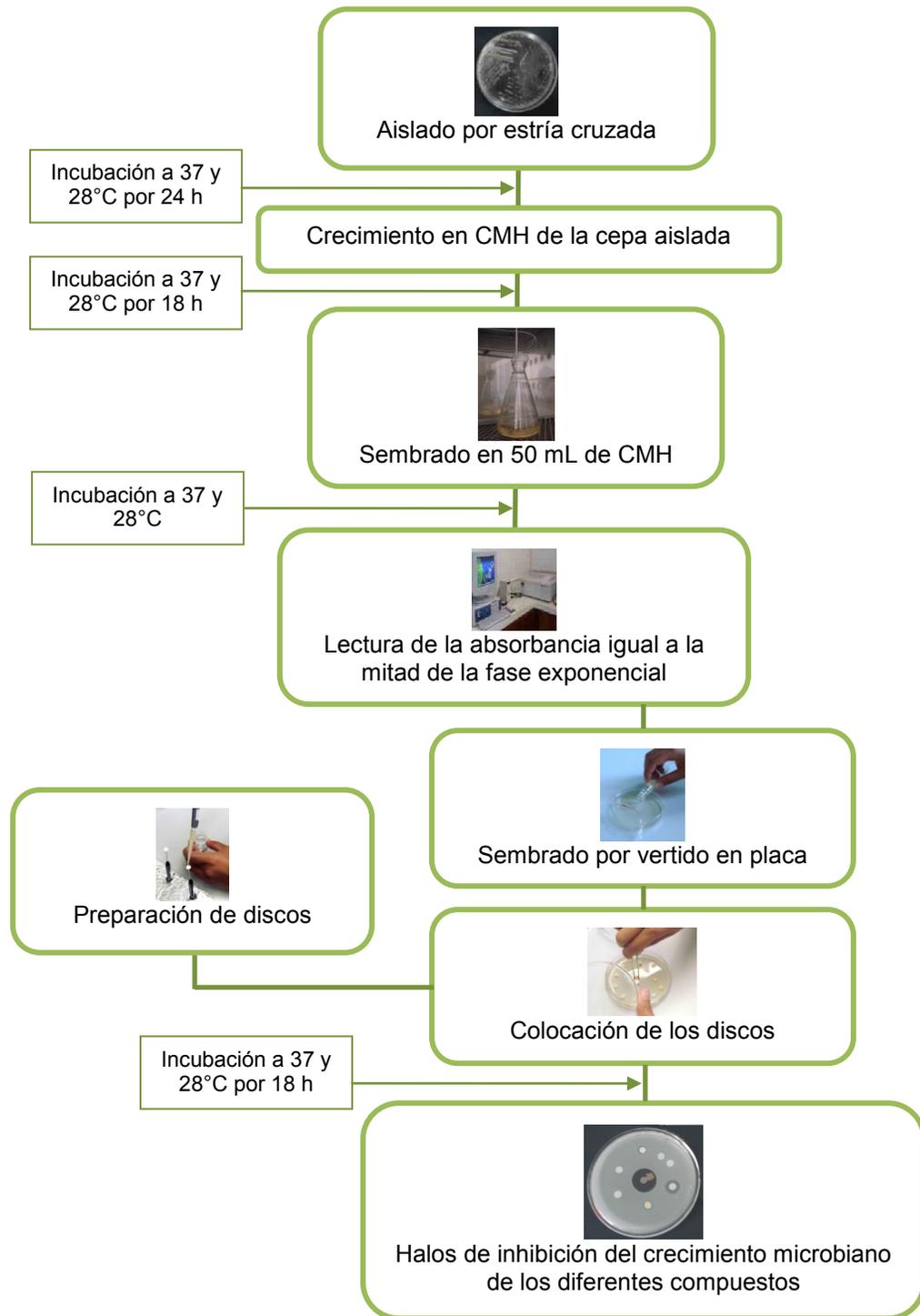
*Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco de 1a, 1f y 2a.* Los compuestos que resultaron con actividad microbiana positiva se probaron en un intervalo de concentraciones para observar la sensibilidad de los microorganismos a estos compuestos.

Se colocaron once discos en cada caja de los cuales nueve contuvieron las diferentes concentraciones de los compuestos (50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 1300 y 1500 µg), los restantes tres son el blanco (sin etanol ni compuesto), el control negativo (con 20 µL de etanol solamente) y el control positivo (con 10 µg de gentamicina). Los

discos depositados se presionaron con el apoyo de las pinzas estériles sobre la capa siembra.

Para evitar la sobreposición de las zonas de inhibición, los discos se colocaron en un límite no menor de 15 mm en relación con el borde de la placa y entre cada uno, esto se realizó por triplicado.

Las cajas se incubaron a 37 y 28°C por 18 h en forma invertida. Al terminar la incubación se analizaron los resultados obtenidos de los diámetros de las zonas de inhibición presentados por las concentraciones de los compuestos, que se midieron por la parte posterior de la placa con un Vernier digital, utilizando una fuente de luz brillante. Los experimentos se realizaron al doble. El diagrama de flujo de toda esta metodología se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Diagrama de flujo de la determinación antimicrobiana general por el método de difusión en disco de *E.coli* ATCC 35218 *S. epidermidis* ATCC 12228 y *C. albicans* ATCC 14053.

### 3.4.6 Actividad antimicrobiana por el método de macro dilución en caldo de 1a, 1f y 2a.

*Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida.* El aislamiento de colonias de cada cepa microbiana se realizó por estría cruzada. Se tomó una colonia y se colocó en 9 mL de CMH que se incubó por 18 h. Posterior al periodo de incubación se obtuvo la suspensión bacteriana de la cual se tomaron 4 mL y se vertieron en un matraz con 50 mL de CMH, mismo que se incubó a 37°C hasta la densidad óptica que corresponde a la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento de cada microorganismo.

Alcanzada la absorbancia se tomaron alícuotas que correspondieran a  $1 \times 10^6$  UFC/mL y se colocaron en una serie de tubos de ensaye que contenían 1 mL de CMH cada uno. A cada tubo se le agregó una de las concentraciones de los compuestos **1a**, **1f** y **2a** de 2, 4, 8, 16, 32 y 64  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en el caso de *E. coli*, y 16, 32, 64, 128, 256 y 512  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para *S. epidermidis*. No se realizó la prueba de macrodilución en caldo para *C. albicans* puesto que en la determinación antimicrobiana general, no hubo halos de inhibición apreciables provocados por los derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-onas en el crecimiento de la levadura.

Los controles para las bacterias fueron, el control negativo utilizando únicamente el inóculo de microorganismos en CMH, y el control positivo que contenía el inóculo bacteriano con 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  gentamicina disuelta en agua. El blanco consistió en CMH solamente. Para determinar si el etanol empleado para la preparación de las concentraciones de los compuestos ejercía efecto sobre la viabilidad de los microorganismos se colocó en otro tubo el inóculo de microorganismo con 50  $\mu\text{L}$  de disolvente y se incubó junto con todos los tubos. Al término del periodo de incubación a 37°C por 18 h se evaluó la turbidez de los tubos de manera óptica. Los dos tubos anteriores cercanos al punto de corte, que es en donde se observa una prominente

reducción del crecimiento microbiano, debido a la disminución de la turbidez se les realizaron diluciones  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-5}$ , de las cuales se sembraron 10  $\mu$ L por extensión de superficie sobre AMC ó AE110 contenida en una caja Petri según cada cepa microbiana.

El control negativo y los tubos posteriores al punto de corte o cambio visual de turbidez apreciable se sembraron de forma directa tomando 10  $\mu$ L del tubo. Las placas se incubaron de manera invertida a 37°C por 24 h. Al término de la incubación se realizó el recuento de colonias bacterianas para determinar CMI y la CMB. La CMI fue la menor concentración de compuesto donde se obtuvo la menor turbidez en los tubos y el menor crecimiento microbiano (UFC/mL) en el recuento de placas. La CMB fue la concentración de compuesto en donde no hubo turbidez debido al crecimiento microbiano en los tubos y en la caja en la que no exhibió crecimiento microbiano (UFC/mL) a pesar del sembrado directo durante la determinación de la CMI. Los porcentajes de inhibición de los compuestos **1a**, **1f** y **2a** contra *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 35218 se calcularon con las UFC/mL de cada concentración exponencial antes de la CMB considerándose las UFC/mL del control negativo como el 100% de crecimiento microbiano. Como referencia a la actividad antimicrobiana se utilizó gentamicina como antibiótico y nistatina como antifúngico para los controles positivos. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces. El diagrama de flujo de esta metodología se muestra en la Figura 13.

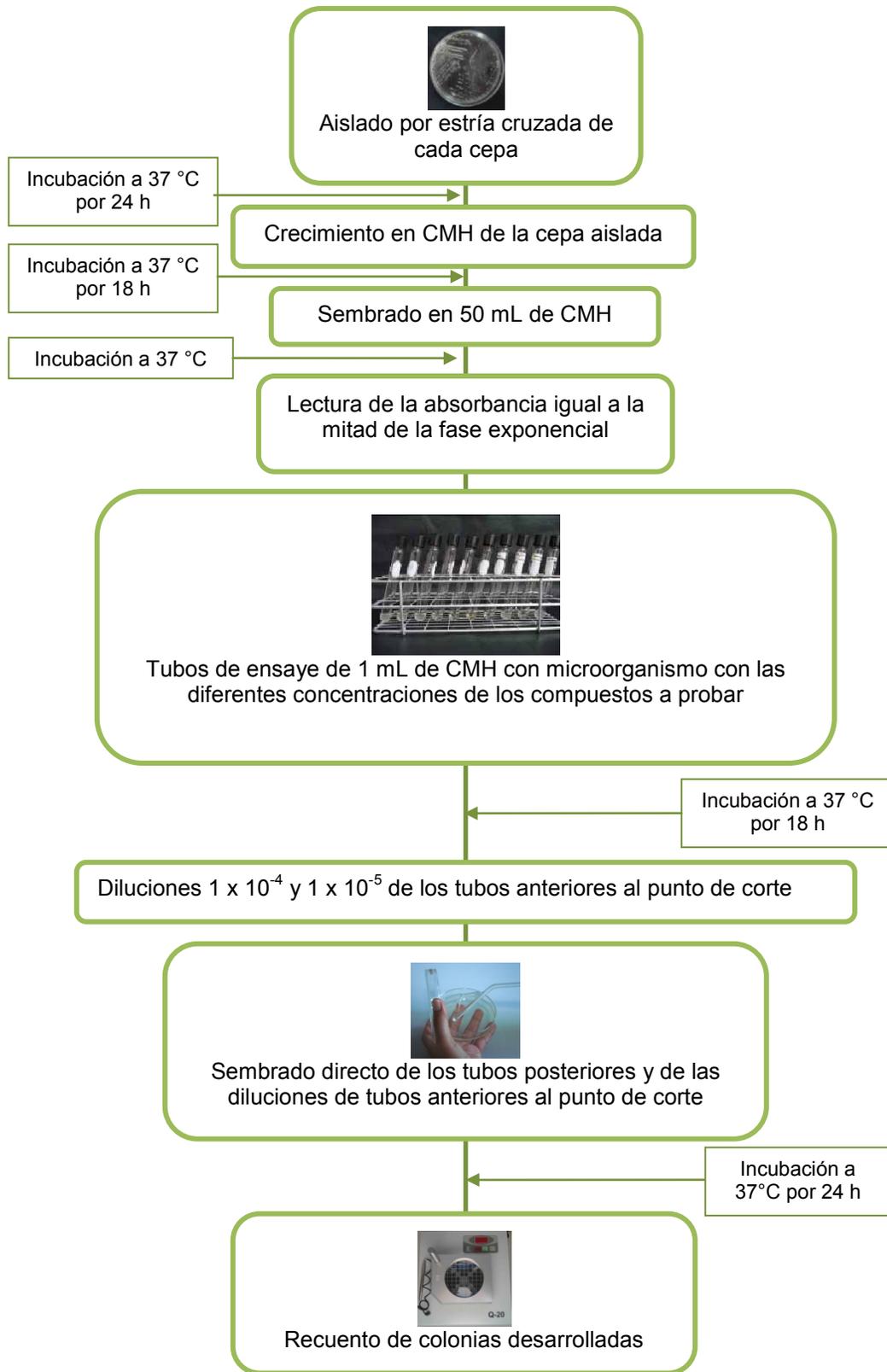


Figura 13. Diagrama de flujo del método de macro dilución en caldo.

### 3.4.7 Análisis estadístico del método de difusión en disco

Para realizar el análisis de los compuestos por separado **1a**, **1f** y **2a** contra la cepa correspondiente inhibida, *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228, se estableció un diseño de tratamientos en donde se tuvo dos factores, el experimento realizado y la concentración de cada compuesto en el disco. El factor experimento está formado por tres niveles que son los tres diferentes días en que se realizaron las repeticiones con sus tres replicas cada una. El factor concentración está formado por nueve niveles que son las concentraciones crecientes de los compuestos. La variable de respuesta es el diámetro del halo de inhibición generado. Los resultados obtenidos fueron el promedio de nueve mediciones  $\pm$  desviación estándar. A los halos obtenidos por el método de difusión se les aplicó un análisis estadístico ANOVA simple de dos vías, para comprobar su reproducibilidad y si existe diferencia o no entre las concentraciones en un mismo compuesto. Así también se realizó una prueba de Duncan para saber entre que concentraciones existe diferencia significativa o no en cada compuesto (Montgomery, 2004).

En el caso del compuesto **2a** contra *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228, se tiene un diseño de tratamientos de dos factores, la concentración del compuesto en el disco y el microorganismo inhibido. El factor concentración es fijo y tiene nueve niveles que son las nueve concentraciones crecientes empleadas del compuesto. El factor microorganismo es aleatorio y tiene dos niveles que son los dos microorganismos inhibidos (*E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228). La variable de respuesta son los diámetros de inhibición causado por los compuestos a los microorganismos. El análisis estadístico realizado fue un ANOVA factorial mixto para determinar la diferencia existente o no del efecto antimicrobiano del compuesto hacia los microorganismos.

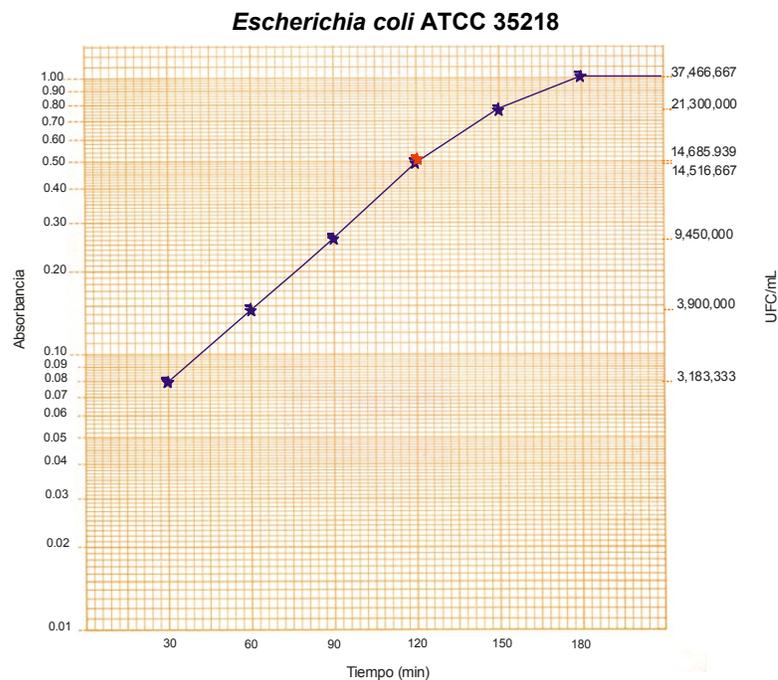
En los compuestos **1a**, **1f** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228 se tiene un diseño de tratamientos también con dos factores, el factor fijo concentración y el factor aleatorio compuesto, en los cuales el factor concentración tiene cuatro niveles (800, 1000, 1300 y 1500 µg) que son las concentraciones donde hubo inhibición apreciable. Para el factor compuesto fueron tres niveles que son los tres compuestos con actividad antibacteriana (**1a**, **1f** y **2a**). La variable de respuesta es el diámetro de los halos de inhibición causados por cada compuesto en la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA factorial mixto a los compuestos **1a**, **1f** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228 para conocer si existe diferencia significativa o no en el efecto que causa cada compuesto contra esta cepa. Se realizó también una prueba de Duncan para estos tres compuestos con la finalidad de conocer entre que par de concentraciones existía diferencia significativa o no para cada par de compuestos a una misma concentración.

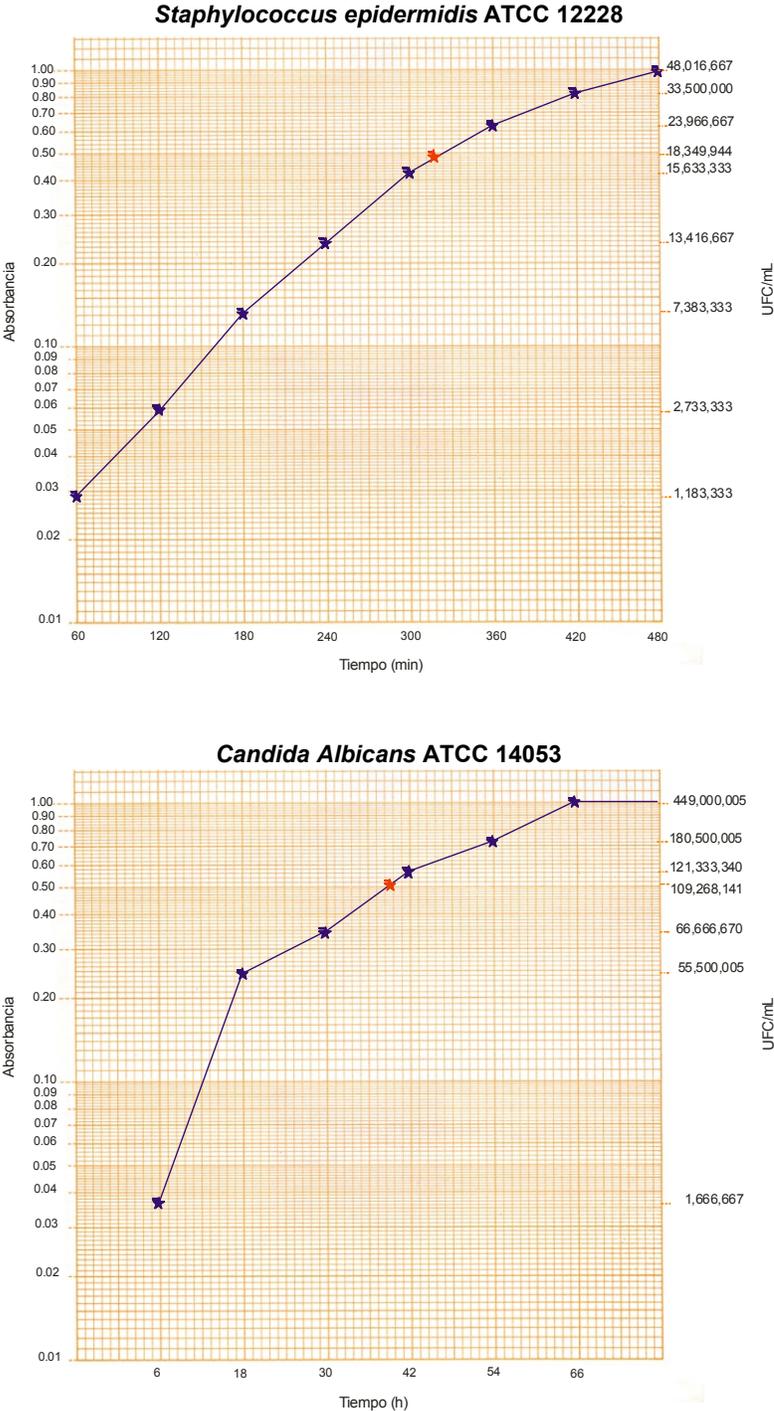
El análisis estadístico ANOVA simple de dos vías y los dos análisis estadísticos ANOVA factorial mixto se realizaron con el programa Minitab 15 English statistical software.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Fase logarítmica de las curvas de crecimiento poblacional

El aumento de la concentración celular durante un periodo de tiempo, además del monitoreo por medios fotoeléctricos y por el recuento de placa permitió establecer la fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada una de las cepas microbianas empleadas. La fase exponencial se representó graficando la absorbancia y el logaritmo del número de células viables frente al tiempo. La fase exponencial de *E. coli* ATCC 35218, *S. epidermidis* ATCC 12228 y de *C. albicans* ATCC 14053 se muestra en la Figura 14.





\* La estrella en color rojo indica la absorbancia y el tiempo empleados en las determinaciones antimicrobianas

**Figura 14.** Fase exponencial de *E. coli* ATCC 35218, *S. epidermidis* ATCC 12228, *C. albicans* ATCC 14053, absorbancia, tiempo y UFC/mL durante la cinética de crecimiento.

En la Tabla 3 se observa la absorbancia y el conteo en placa que se realizó en el monitoreo de la fase exponencial. El recuento en placa se llevó a cabo para determinar el número de las células viables existentes a cada absorbancia medida en el espectrofotómetro. Ya que esta turbidez también puede ser generada por algunas células que no se encuentran en un estado fisiológico adecuado evitando que la absorbancia del cultivo cambie.

Determinar el número de células viables durante la fase logarítmica es importante ya que fue la cantidad de células vivas inoculadas para la determinación antimicrobiana de los compuestos sintéticos. En esta fase las células microbianas no se encuentran en un estado de adaptación al nuevo medio de cultivo o en un estado de latencia, ni con agotamiento de nutrientes o exceso de residuos tóxicos auto producidos. Con lo anterior se asegura que el estado fisiológico de la célula microbiana no es lo que causa su inactivación originando su muerte celular. También se evitan interferencias para una observación adecuada del efecto antimicrobiano de los compuestos en estudio (Prescott *et al.*, 2004).

**Tabla 3.** Absorbancia y UFC/mL durante el monitoreo de la fase exponencial de las bacterias *E. coli* ATCC 35218, *S. epidermidis* ATCC 12228 y la levadura *C. albicans* ATCC 14053.

Microorganismo								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218			<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228			<i>Candida albicans</i> ATCC 14053		
Tiempo (min)	Absorbancia	UFC/mL	Tiempo (min)	Absorbancia	UFC/mL	Tiempo (h)	Absorbancia	UFC/mL
0	0.0	0	0	0.0	0	0	0.0	0
30	0.0792 ± 0.003	3,183,333 ± 2,344,793	60	0.0284 ± 0.024	1,183,333 ± 226,691	6	0.0365 ± 0.004	1,666,667 ± 2,357,023
60	0.1465 ± 0.022	3,900,000 ± 1,395,230	120	0.0580 ± 0.019	2,733,333 ± 1,409,097	18	0.2449 ± 0.048	55,500,005 ± 21,108,845
90	0.2612 ± 0.024	9,450,000 ± 2,144,567	180	0.1335 ± 0.014	7,383,333 ± 3,827,387	30	0.3445 ± 0.037	66,666,670 ± 23,767,391
120	0.4939 ± 0.052	14,516,667 ± 917,272	240	0.2388 ± 0.034	13,416,667 ± 4,410,751	<b>39.3</b>	<b>0.5214</b>	<b>109,268,141</b>
<b>120.7</b>	<b>0.5007</b>	<b>14,685,939</b>	300	0.4277 ± 0.019	15,633,333 ± 1,831,817	42	0.5715 ± 0.038	121,333,340 ± 61,258,106
150	0.7664 ± 0.042	21,300,000 ± 6,238,055	<b>319.6</b>	<b>0.4958</b>	<b>18,349,944</b>	54	0.7274 ± 0.021	180,500,005 ± 50,750,205
180	1.0014 ± 0.011	37,466,667 ± 3,122,855	360	0.6366 ± 0.019	23,966,667 ± 4,536,763	66	1.0428 ± 0.035	449,000,005 ± 90,099,944
240	F.E.	F.E.	420	0.8318 ± 0.0004	33,500,000 ± 3,257,299	F.E.	F.E.	F.E.
300	F.E.	F.E.	480	0.9915 ± 0.008	48,016,667 ± 6,515,729	F.E.	F.E.	F.E.

F.E. = Fase estacionaria

Las letras en negrita indican el tiempo, absorbancia y UFC/mL, calculados por interpolación a la mitad de la fase exponencial utilizada en los ensayos antimicrobianos

Las absorbancias y las UFC/mL son la media de 6 mediciones y conteos, respectivamente, ± desviación estándar

Las absorbancias experimentales y el tiempo de incubación teórico correspondientes a la mitad de la fase log, permitieron realizar cálculos por interpolación con base en los resultados obtenidos del monitoreo de esta fase exponencial, Tabla 3. Esto con la finalidad de obtener las UFC/mL correspondientes a la absorbancia experimental aproximadamente a 0.5 y con ello calcular la alícuota para tener  $1 \times 10^6$  UFC/mL para las bacterias y  $1 \times 10^8$  UFC/mL para la levadura, Tabla 4.

**Tabla 4.** Tiempo de incubación, absorbancia, UFC/mL e inóculo empleados en los ensayos antimicrobianos donde los microorganismos están a la mitad de la fase exponencial.

Microorganismo	Tiempo (h)	Absorbancia*	UFC/mL	Inóculo** (μL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	2.0	0.5403 ± 0.016	15,671,700	63.8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	5.4	0.5099 ± 0.007	18,914,409	52.9
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	35.0	0.5396 ± 0.013	113,663,149	879.8

\* La absorbancia es la obtenida experimentalmente en las determinaciones antimicrobianas, 560 nm para bacterias y 480 nm para la levadura, es también la media de 3 mediciones ± desviación estándar.

\*\* El inóculo está calculado para llegar a una densidad de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para las bacterias y  $1 \times 10^8$  UFC/mL para la levadura

Este crecimiento se llevó a cabo en un sistema cerrado o cultivo discontinuo que permitió mantener la fase exponencial de las células microbianas por un periodo de tiempo corto. Prescott *et al.* (2004) mencionan que en un sistema cerrado la presencia de un aporte adecuado de nutrientes el crecimiento exponencial dura solamente unas pocas generaciones y el cultivo alcanza pronto la fase estacionaria. Así se obtuvo una fase logarítmica con tiempos más cortos de duplicación microbiana necesarios para la determinación en este estudio.

En la Tabla 4 se muestra el tiempo de incubación y el inóculo de cada cepa que asegura que el microorganismo se encuentra en la mitad de la fase exponencial, y que se empleó en todo el procedimiento de la metodología de difusión en disco así como en macro dilución en caldo. Así también se observan las UFC/mL de las absorbancias experimentales alcanzadas con el tiempo de incubación calculado con la cinética de crecimiento microbiano.

La absorbancia y el inóculo varían para cada cepa microbiana ya que cambian notablemente según la especie del microorganismo y las condiciones *in vitro* mantenidas.

De la Tabla 4, se puede observar que para alcanzar la mitad de la fase exponencial necesaria para la inoculación en las bacterias, *S. epidermidis* ATCC 12228 (5 h) requirió un mayor tiempo de incubación que *E. coli* ATCC 35218 (2 h). La diferencia más notable es con la levadura, la cual necesita hasta 35 h para llegar a una absorbancia aproximadamente de 0.5 de la fase exponencial. Los puntos medios de la fase log de cada cepa se pueden observar en la Figura 14.

Los tiempos de incubación para cada microorganismo en gran medida se deben a que el valor numérico de la constante de velocidad del crecimiento está influenciado por factores genéticos y ambientales, es decir la velocidad actual de crecimiento de cualquier microorganismo depende de las condiciones ambientales, pero su límite superior está determinado genéticamente. Así también las células procariotas (bacterias) crecen más rápido en comparación con las células eucariotas (levadura) (Prescott *et al.*, 2004; Stanier *et al.*, 1981).

La absorbancia aproximadamente de 0.5 representa el punto medio de la fase exponencial y se utilizó para los ensayos de actividad antimicrobiana. Esta absorbancia se considera la más adecuada en el crecimiento de los microorganismos porque es cuando la cepa se encuentra en un intervalo favorable de desarrollo y la concentración de la población permite calcular el inóculo necesario para obtener  $1 \times 10^6$  UFC/mL para las

bacterias y  $1 \times 10^8$  UFC/mL para la levadura. Este punto se localiza lo suficientemente alejado de la fase de latencia y de la fase estacionaria, y evita que se presenten interferencias, como un estado de adaptación al medio o exceso de residuos tóxicos que inhibirán al microorganismo interpretándose como un efecto antimicrobiano de los compuestos en estudio (Barry y Brown, 1996; Sanna *et al.*, 1998).

#### 4.2 Elección del control positivo

*Antibiótico.* Los multidiscos combinados se emplearon para determinar la sensibilidad de las cepas *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228 mediante una prueba antibiótica (BIORAD®). Estos antibióticos son utilizados desde hace algunos años y cuya utilidad permanece vigente (penicilina, ampicilina, gentamicina). Algunos son considerados como antimicrobianos de reciente introducción en nuestro medio (ceftriaxona, enoxacina y netilmicina). En la Tabla 5 se muestran los resultados de los ensayos de susceptibilidad bacteriana *in vitro*.

Estos resultados permitieron establecer un patrón de sensibilidad de las cepas ensayadas en este estudio. Los halos de inhibición obtenidos de la prueba antibiótica permitieron clasificar a las cepas bacterianas en función del diámetro de los halos reportados en la tabla de susceptibilidad de BIO-RAD® (Apéndice A). Las cepas bacterianas fueron clasificadas como sensibles, intermediarias y resistentes. Con base en los resultados y la clasificación de los antibióticos se estableció el control positivo para los ensayos antimicrobianos. El control positivo debió presentar un halo de inhibición de tamaño adecuado para la determinación de los compuestos en estudio ya que con ello se evitó la sobre posición de los halos realizándose una lectura correcta de los diámetros.

**Tabla 5.** Diámetro de halos de inhibición (mm) de los antibióticos en los multidiscos combinados contra las cepas *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228.

Antibiótico	Concentración (µg)	Microorganismo			
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	
Amikacina	30	17.7 ± 0.5	S	18.3 ± 0.5	S
Ampicilina	10	0.0	N	10.3 ± 0.5	R
Cefalotina	30	12.0 ± 1.6	R	25.0 ± 0.8	S
Ceftriaxona	30	23.7 ± 1.8	S	23.0 ± 0.8	R
Cloranfenicol	30	8.7 ± 0.5	R	15.0 ± 0.0	I
Dicloxacilina	1	9.0 ± 0.8	S	14.7 ± 0.5	S
Enoxacina	10	23.3 ± 0.5	S	20.3 ± 0.5	S
Eritromicina	15	0.0	N	15.0 ± 0.8	I
<b>Gentamicina</b>	<b>10</b>	<b>17.7 ± 0.5</b>	<b>S</b>	<b>17.7 ± 0.5</b>	<b>S</b>
Netilmicina	30	18.7 ± 0.5	S	20.0 ± 0.0	S
Penicilina	10u	0.0	N	9.3 ± 0.5	R
Trimetoprim-sulfametoxazol	25u	22.3 ± 0.5	S	21.0 ± 0.8	S

R = Resistente; I = Intermediario; S = Sensible; N = Negativo

Los diámetros de inhibición son la media de 9 mediciones ± desviación estándar

El antibiótico gentamicina elegido como control positivo se muestra en negritas

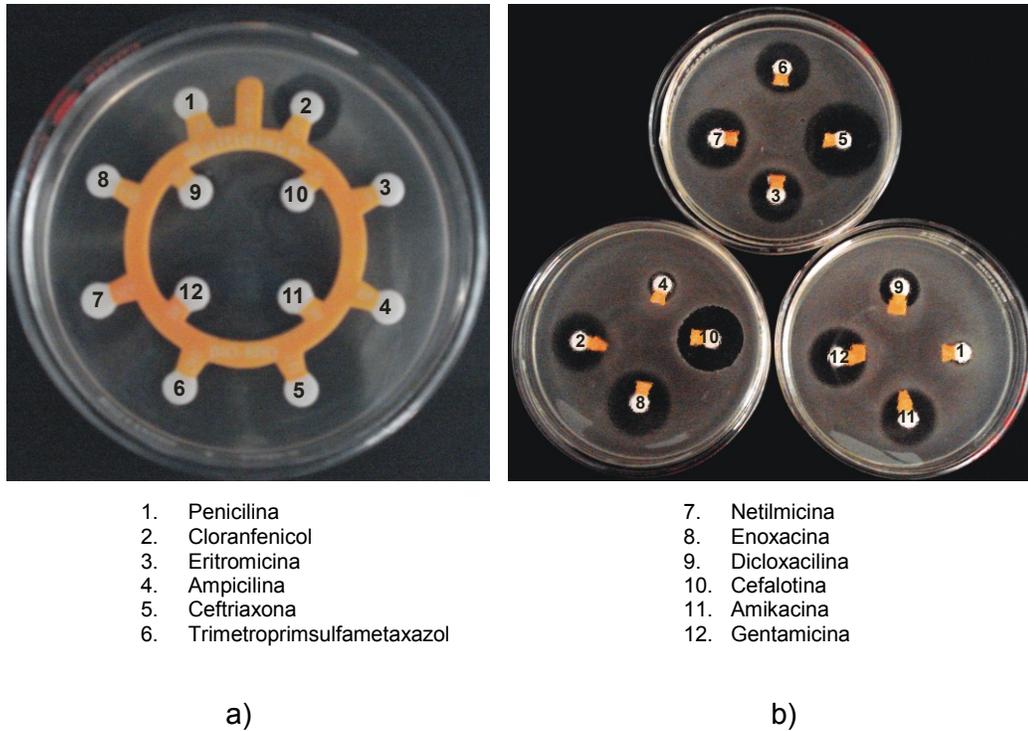
El antibiótico elegido fue la gentamicina (control positivo) el cual se muestra en negritas en la Tabla 5 así como la clasificación de la susceptibilidad de las cepas G (+) y G (-) contra los doce compuestos antibacterianos. La gentamicina se empleó para toda la metodología de difusión en disco y macro dilución en caldo y permitió asegurar cualitativamente el desarrollo de la metodología puesto que produce en las bacterias una quimiotaxis bacteriana negativa.

La gentamicina induce la formación de halos de inhibición de 17.7 ± 0.5 mm para ambas cepas bacterianas clasificadas como sensibles a una concentración mínima 10 µg. La gentamicina es un agente bactericida considerado como un antibiótico de primera

elección solo o en combinación con otros fármacos contra microorganismos patógenos. Es un antibiótico alternativo que se utiliza en las infecciones graves causadas por bacterias *Gram* negativas como *Escherichia coli* ATCC 35218 que no son susceptibles a otros fármacos (Prescott *et al.*, 2004). Es también un antimicrobiano de primera elección en el tratamiento de agentes etiológicos resistentes como son los estafilococos a la penicilina semisintética meticilina (Brooks *et al.*, 1999). En esta investigación se pudo apreciar esta resistencia en la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 empleada en este estudio, la cual se clasificó como resistente para la penicilina con un halo de  $9.3 \pm 0.5$  mm, Tabla 5.

Existen otros antibióticos como la amikacina, derivado sintético de la kanamicina, a la cual las cepas empleadas también resultaron sensibles (Figura 15) pero se necesita una concentración mayor (30  $\mu$ g) en comparación con la gentamicina (10  $\mu$ g) para causar sensibilidad en las cepas (Tabla 5) ya que la resistencia bacteriana debida a la impermeabilidad a la amikacina va en aumento lentamente (Brooks *et al.*, 1999).

Otro antibiótico es la enoxacina la cual produjo halos mayores a los de la gentamicina pero que de ser utilizada como control positivo puede causar una extrapolación con los diámetros de los compuestos en estudio ya que tienen un halo de inhibición de  $23.3 \pm 0.5$  mm para *E. coli* ATCC 35218 y  $20.3 \pm 0.5$  mm para *S. epidermidis* ATCC 12228 en comparación con la gentamicina que causa un halo de inhibición del mismo diámetro para ambas cepas ( $17.7 \pm 0.5$  mm) que permite dejar espacios entre los discos con compuesto y realizar una medición correcta de los halos.



**Figura 15.** Halos de inhibición de 12 antibióticos comerciales contra a) *E. coli* ATCC 35218; b) *S. epidermidis* ATCC 12228.

**Antifúngico.** En el caso de la levadura *C. albicans* ATCC 14053, el control positivo elegido fue el antifúngico nistatina. Este antimicótico permitió observar una quimiotaxis negativa a diferentes concentraciones y con ello determinar la concentración a la cual se tiene un diámetro adecuado para emplearse en la determinación antimicrobiana de los 15 derivados e intermediarios de quinoxlin-2[1H]-onas.

La concentración de nistatina elegida para el control positivo fue 10 µg/µL con un halo de inhibición de 10.7 ± 0.5 mm. Los diámetros de los halos de inhibición en mm y la concentración elegida (negrita) para la determinación de la actividad antimicótica se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Diámetro de los halos de inhibición (mm) causados por las diferentes concentraciones de nistatina contra *C. albicans* ATCC 14053.

<b>Nistatina (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Halo de inhibición (mm)</b>
2	0
4	6.8 $\pm$ 0.2
6	9.7 $\pm$ 0.5
8	10.2 $\pm$ 0.2
<b>10</b>	<b>10.7 <math>\pm</math> 0.5</b>

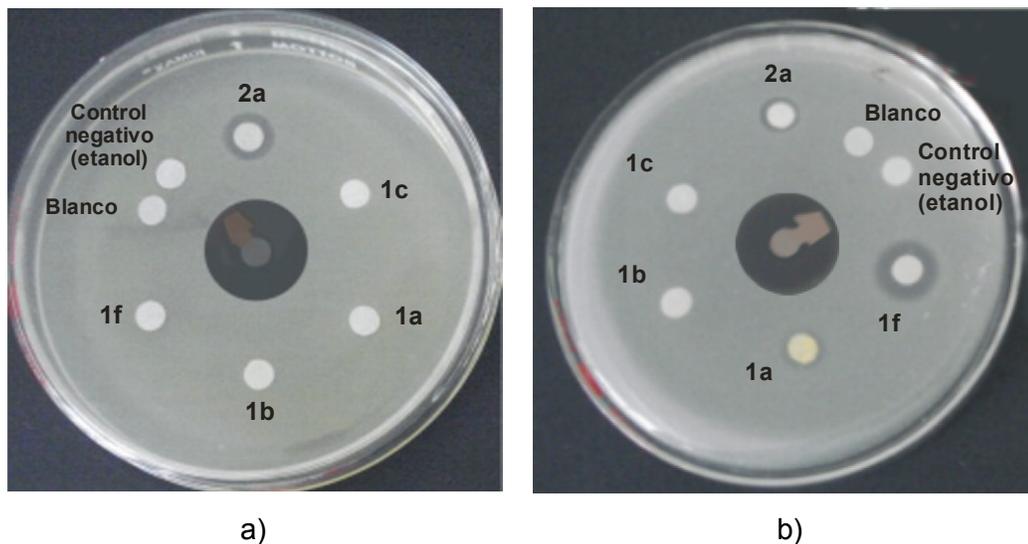
Los diámetros obtenidos son la media de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar  
 La concentración elegida como control positivo se muestra en negritas

La nistatina es un compuesto polienólico que forma parte de los fármacos antifúngicos más importantes junto con los imidazoles (fluconazol, ketoconazol, miconazol), las pirimidinas (5-fluorocitosina) y otros como yoduro de potasio, amorolfina, naftina y ciclopiroxolamina, por mencionar algunos. La actividad antimicrobiana del polieno nistatina es muy intensa contra las levaduras y hongos dentro de los que se encuentran *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Botrytis* (Liébana, 1997). Por esto y todo lo anterior radica la importancia de su uso para este estudio.

### **4.3 Determinación antimicrobiana de las 15 quinoxalin-2[1H]-onas e intermediarios**

La actividad antimicrobiana de los 15 derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1H]-onas se determinó por el método de difusión en disco, Figura 16. Esta es una técnica de susceptibilidad *in vitro*, que permite de manera semicuantitativa o cualitativa establecer el grado de susceptibilidad del microorganismo (sensible o resistente). Y de

manera cuantitativa puede determinarse la CMI pero esto se realiza con cepas de CMI conocidas, que han estado previamente ensayadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (García *et al.*, apartado 11, 2000), es por esto que este método se eligió para apreciar la actividad antimicrobiana de los compuestos a ensayar, Figura 16.



**Figura 16.** Halos de inhibición de algunos de los compuestos estudiados contra a) *E. coli* ATCC 35218; b) *S. epidermidis* ATCC 12228.

El método de difusión en disco se realizó con un contenido en disco de 1000  $\mu\text{g}$  directo de cada compuesto, pues los 50  $\mu\text{L}$  de etanol empleados para disolver cada uno de los derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1*H*]-onas se evaporaron totalmente. El punto de ebullición del etanol es de 78.4°C (1 atm) lo cual lo hace volátil a temperatura ambiente.

Para asegurar que aún quedando residuos de etanol en el disco con compuesto este no causa un efecto de inhibición considerable sobre la cepa, se colocó un disco

como control negativo con 50  $\mu$ L de etanol solamente, en ningún caso provocó un halo de inhibición apreciable, Figura 16.

La cantidad utilizada para los derivados e intermediarios (1000  $\mu$ g) es una de las más altas generalmente empleadas en la determinación de algunos posibles antimicrobianos (Obafemi y Akinpelu, 2005). Con este contenido en disco si el compuesto no genera una inhibición o la muerte de las células microbianas, a cantidades más bajas se consideró que no causarían efecto antimicrobiano posible. Sólo los compuestos que mostraron halos de inhibición se tomaron como antimicrobianos positivos.

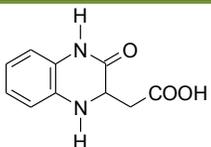
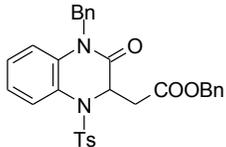
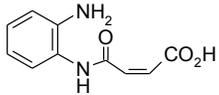
Los compuestos probados manifestaron una actividad antimicrobiana mínima, **1a** y **1f** son dos de los tres compuestos que generaron diámetros de halos de inhibición contra *S. epidermidis* ATCC 12228, ambos compuestos resultaron selectivos para esta cepa. El compuesto **2a** mostró actividad tanto contra *E. coli* ATCC 35218 como contra *S. epidermidis* ATCC 12228. Para *C. albicans* ATCC 14053 no hubo inhibición apreciable en el crecimiento microbiano por los compuestos estudiados, Tabla 7. En la literatura según Sanna *et al.* (1998) dihidroquinoxalinonas análogos de estos compuestos probados en el presente trabajo también muestran inactividad antifúngica contra *C. albicans*. Esto se puede deber a que al existir diferencias entre las células microbianas eucariotas y procariotas el antimicrobiano puede discriminar entre ellas, atacando a una y no afectando a otra.

En la Tabla 7 se observó que los compuestos **1a**, **1f** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228 mostraron un halo de inhibición de 7.0, 8.0 y 6.5 mm, respectivamente. También **2a** mostró un halo contra *E. coli* ATCC 35218 con un diámetro de 10 mm.

Como era de esperarse la gentamicina y la nistatina empleadas como controles positivos en los ensayos mostraron halos semejantes a los obtenidos en el apartado 4.2. El antibiótico gentamicina provocó un halo de inhibición de  $17.5 \pm 0.05$  mm contra *E. coli*

ATCC 35218 y uno de  $17.2 \pm 0.05$  mm contra *S. epidermidis* ATCC 12228. El antifúngico nistatina mostró un halo de inhibición de  $10.35 \pm 0.05$  contra *C. albicans* ATCC 14053.

**Tabla 7.** Halos de inhibición (mm) del crecimiento microbiano apreciables provocados por **1a**, **1f** y **2a** a un contenido de 1000  $\mu\text{g}$ .

Compuesto	Microorganismo		
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053
 <b>1a</b>	R	7.0	R
 <b>1f</b>	R	8.0	R
 <b>2a</b>	10	6.5	R

R = Resistente

El resto de los compuestos (**1b-e**, **1g-l**, **2b** y **3**) no tuvieron actividad antimicrobiana apreciable

Cabe señalar que en esta prueba general sólo se realizó una réplica puesto que es un ensayo preliminar, y el objetivo de este era sólo el observar así como determinar los compuestos que presentaran actividad antimicrobiana sobre dos bacterias y una levadura. Con base en estos resultados posteriormente se realizaron ensayos en los que los compuestos sintéticos con actividad antimicrobiana se probaron en un intervalo creciente de concentraciones obteniendo el conocimiento de la sensibilidad antimicrobiana que causan contra las dos bacterias y la levadura. Los halos de inhibición de los tres

compuestos (**1a**, **1f** y **2a**) que resultaron con actividad antimicrobiana positiva se aprecian en la Figura 16.

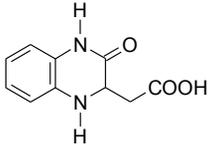
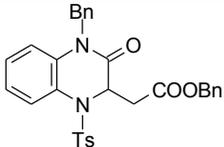
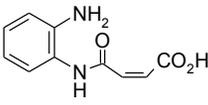
Este método resultó tanto económico como práctico y permitió determinar la actividad antimicrobiana de los compuestos estudiados de una manera semicuantitativa. Los tres compuestos **1a**, **1f** y **2a** que presentaron actividad antimicrobiana fueron elegidos para ser probados en cantidades crecientes de 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 1300 y 1500 µg por el método de difusión en disco. Esto con el objetivo de establecer las cantidades mínimas y máximas de actividad antimicrobiana en las que causan una inhibición en los microorganismos empleados en este estudio.

*Método de difusión en disco de los compuestos 1a, 1f y 2a con actividad antimicrobiana.* Los compuestos **1a**, **1f** y **2a** en concentraciones de 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 1300 y 1500 µg presentaron actividad antimicrobiana mínima contra cada cepa correspondiente, Tabla 8.

En la Tabla 8 se observa que los compuestos **1a** y **1f** no se evaluaron contra *E. coli* ATCC 35218 ya que en el primer ensayo antimicrobiano a una concentración de 1000 µg resultaron inactivos. Sin embargo el compuesto **2a** sí presenta actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 35218 así como contra *S. epidermidis* ATCC 12228. Los compuestos **1a** y **1f** también tienen actividad sobre *S. epidermidis* ATCC 12228.

El compuesto **2a** contra *E. coli* ATCC 35218 tuvo actividad antimicrobiana en concentraciones de 200 a 1500 µg. En *S. epidermidis* ATCC 12228 los compuestos **1a** y **2a** presentan actividad antibacteriana en concentraciones de 800 a 1500 µg, **1f**, de 1000 a 1500 µg.

**Tabla 8.** Diámetro de los halos de inhibición (mm) de **1a**, **1f** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228 y de **2a** contra *E. coli* ATCC 35218.

Compuesto	Concentración (µg)	Microorganismo	
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
 <b>1a</b>	50 a 500	N.D.	R
	800	N.D.	6.4 ± 0.3 <sup>a</sup>
	1000	N.D.	7.2 ± 0.3 <sup>b</sup>
	1300	N.D.	7.4 ± 0.3 <sup>b,c</sup>
	1500	N.D.	7.7 ± 0.3 <sup>c</sup>
 <b>1f</b>	50 a 800	N.D.	R
	1000	N.D.	7.8 ± 0.7 <sup>d</sup>
	1300	N.D.	8.3 ± 0.9 <sup>d</sup>
	1500	N.D.	8.5 ± 0.5 <sup>d</sup>
 <b>2a</b>	50	R	R
	100	R	R
	200	7.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	R
	300	8.7 ± 0.9 <sup>b,c</sup>	R
	500	9.1 ± 0.5 <sup>c</sup>	R
	800	9.4 ± 0.4 <sup>c,d</sup>	6.5 ± 0.2 <sup>e</sup>
	1000	9.8 ± 0.3 <sup>d</sup>	6.9 ± 0.3 <sup>f</sup>
	1300	10.2 ± 0.2 <sup>e</sup>	7.2 ± 0.4 <sup>f</sup>
1500	10.3 ± 0.2 <sup>e</sup>	7.9 ± 0.2 <sup>g</sup>	

R = Resistente (sin halo de inhibición)

N.D. = No determinado

El control positivo fue gentamicina (10 µg), el diámetro del halo (mm) contra *E. coli* ATCC 35218 para **2a** fue de 17.7 ± 0.9. Contra *S. epidermidis* ATCC 12228 para **1a** fue de 17.3 ± 0.2, para **1f** fue de 17.4 ± 0.2 y **2a** fue 17.4 ± 0.5

Los diámetros son el resultado de 9 mediciones ± desviación estándar

En la misma columna las literales iguales indican que no hay diferencia significativa, mediante la prueba de Duncan, ( $P > 0.05$ ).

El ácido **2a** fue el único antimicrobiano que causó una quimiotaxis negativa a la bacteria *Gram* negativa *E. coli* ATCC 35218 con diámetros de 7.5 ± 0.3 mm a 10.3 ± 0.2 mm en concentraciones de 200 a 1500 µg, observándose que el halo de inhibición se va

incrementado drásticamente en las concentraciones 200, 300 y 500 µg. Cabe señalar que a partir de 1000 µg el efecto inhibitorio de **2a** es básicamente el mismo contra *E. coli* ATCC 35218. Aunque se observa que tiene un mayor efecto en la bacteria *G* (-) que en la bacteria *G* (+), referente a los halos de inhibición. Asimismo se observó que entre las concentraciones empleadas del compuesto **2a** contra *E. coli* ATCC 35218 existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) excepto entre los pares 300 a 800 µg, 800-1000 µg y 1300-1500 µg ( $P > 0.05$ ), Tabla 8.

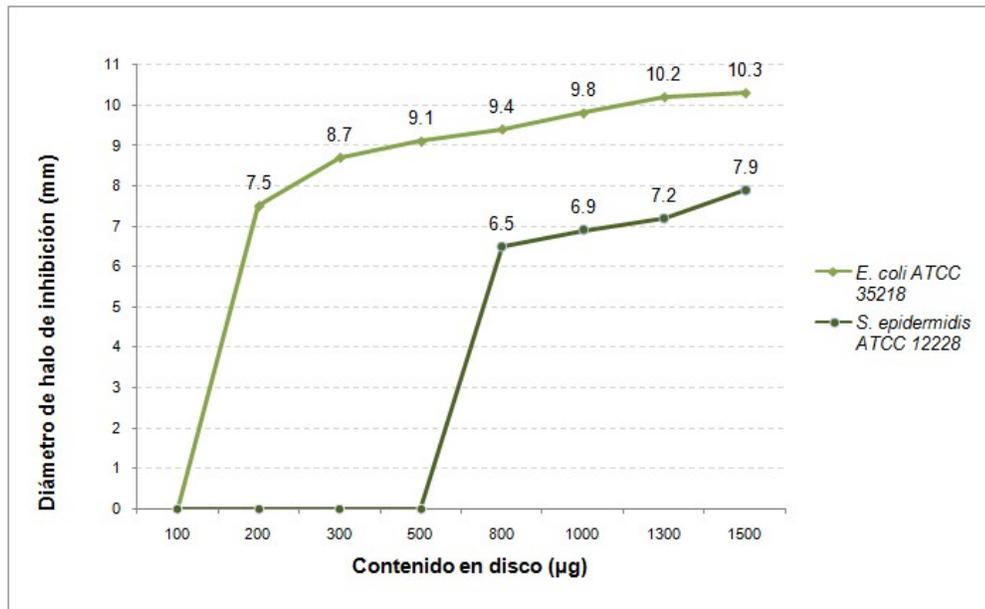
Contra *S. epidermidis* ATCC 12228 el compuesto **2a** generó halos de inhibición más pequeños que contra *E. coli* ATCC 35218, de  $6.5 \pm 0.2$  mm a  $7.9 \pm 0.2$  mm en concentraciones de 800 a 1500 µg. Así también presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones empleadas de este compuesto, excepto en el par 1000-1300 µg ( $P > 0.05$ ), Tabla 8. Con lo anterior se observa que en la mayoría de las concentraciones de **2a** contra las bacterias *G* (-) y *G* (+) el incremento de la concentración del compuesto hace que el diámetro del halo de inhibición también aumente.

La comparación de los halos de inhibición causados por el efecto de **2a** sobre ambas cepas, *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228, se observa en la Figura 17.

En la Figura 17, se muestra que el compuesto **2a** generó halos de inhibición mayores,  $7.5 \pm 0.3$  mm a  $10.3 \pm 0.2$ , a concentraciones de 200 a 1500 µg en *E. coli* ATCC 35218 que sobre *S. epidermidis* ATCC 12228. Así también que el compuesto **2a** a una concentración de 300 µg causa un halo de inhibición mayor ( $8.7 \pm 0.87$  mm) contra *E. coli* ATCC 35218 que a una concentración máxima de 1500 µg ( $7.9 \pm 0.16$  mm) contra *S. epidermidis* ATCC 12228.

Al causar el compuesto **2a** inhibición en dos cepas supone el hecho de que si se probara con un número mayor de microorganismos y resultara con actividad

antimicrobiana se podría decir que es un antimicrobiano de amplio espectro (Prescott *et al.*, 2004).

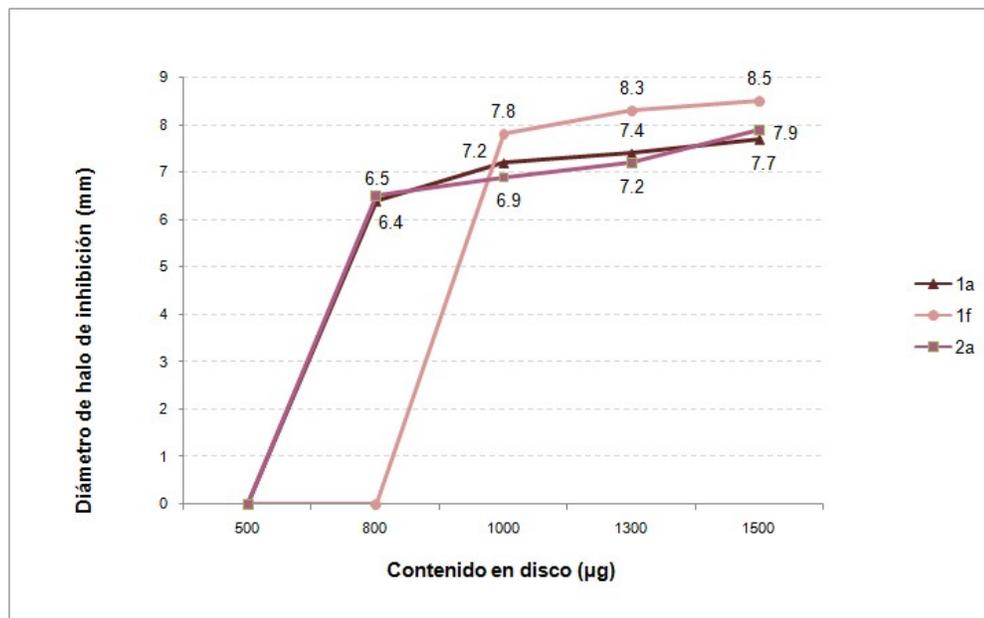


**Figura 17.** Comparación del efecto antibacteriano (halos de inhibición) del compuesto **2a** contra *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228.

Por otra parte la existencia de diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) del efecto causado por el antibacteriano **2a** en cada cantidad empleada y para cada microorganismo (*E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228), indicó que a un mismo contenido o concentración del compuesto **2a** contra ambas cepas, el efecto fue distinto. De la misma forma diferentes cantidades de compuesto **2a** contra ambas cepas mostró una inhibición distinta.

En el caso del compuesto **1a** contra la bacteria *G (+)* *S. epidermidis* ATCC 12228, mostró diámetros de halos de inhibición de  $6.4 \pm 0.3$  a  $7.7 \pm 0.3$  mm en concentraciones de 800 a 1500 µg y **1f** de  $7.8 \pm 0.7$  a  $8.5 \pm 0.5$  mm en concentraciones de 1000 a 1500 µg,

Figura 18. Se observa también en la misma figura que el diámetro de inhibición generado por los compuestos es directamente proporcional a la cantidad de antimicrobiano empleado es decir que al aumentar la cantidad del compuesto el halo también aumenta y viceversa.



**Figura 18.** Comparación del efecto antibacteriano (halos de inhibición) de los compuestos **1a**, **1f** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228.

En relación a los diámetros de los halos que presenta **1f** podemos decir que parece tener una mayor inhibición que **1a** y **2a** sobre *S. epidermidis* ATCC 12228. Ya que los halos de inhibición del compuesto **1f** con un contenido en disco de 1000 µg son de un diámetro aproximado a los que generan **2a** y **1a** a una concentración de 1500 µg, Figura 18.

Sin embargo, aunque **1f** provoca un mayor diámetro en sus halos de inhibición presentó crecimiento microbiano mínimo dentro de ellos a diferencia de **1a** y **2a** que no

presentaron. Cabe señalar también que **2a** es generador del heterociclo **1a** y debido a que ambos presentan actividad antimicrobiana contra *S. epidermidis* ATCC 12228 es razonable el hecho de que ambas quinoxalinonas generen halos de inhibición en un rango de concentraciones iguales de 800, 1000, 1300 y 1500 µg, Figura 18.

Para el compuesto **1a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228 existió diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones empleadas, no así para **1f**, lo cual concuerda con el hecho de que el microorganismo sea más resistente al compuesto **1f** al presentar crecimiento bacteriano en el interior de sus halos. Lo anterior hace sugerir que la CMB de **1f** debe ser mayor que de **1a** y **2a**. En el compuesto **1a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228 los pares de concentraciones que no presentaron diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) fueron entre 1000 y 1300 µg, y entre 1300 y 1500 µg, Tabla 8. Para **1f** las concentraciones generadoras de quimiotaxis negativa en estos ensayos, no presentaron diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) por lo tanto el empleo de cualquiera de las concentraciones causarían el mismo efecto. Esta característica se puede explicar en parte nuevamente, porque la quinoxalinona **1f** aunque genera halo de inhibición, en el interior del diámetro hay crecimiento bacteriano incipiente, lo que la vuelve bacteriostática y no bactericida. También este resultado sugiere que **1f** no causa un daño importante contra *S. epidermidis* ATCC 12228 aunque la concentración aumente. Esto indica que la concentración de **2a** causa un efecto más apreciable sobre la bacteria que **1a** y **1f**.

Los compuestos **1a** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228, estadísticamente e individualmente indican que el factor “cantidad o concentración” explica respectivamente cerca del 86.99% y 88.43% de la variabilidad de los halos de inhibición mostrados. Por lo tanto los halos de inhibición obtenidos en las pruebas realizadas se deben exclusivamente al factor “cantidad o concentración” y no a otro factor externo o interno experimental. Sin embargo, para **1f** la variabilidad estadística de la respuesta es debida a sólo el 34.41% por la concentración, y el resto puede ser ocasionada por la resistencia mostrada por el

microorganismo al compuesto. Para **2a** contra *E. coli* ATCC 35218, el análisis estadístico indicó que el 85.00% de la variabilidad de los diámetros de los halos se explica por la cantidad del antibacteriano, con lo que se descarta algún otro factor experimental. En todos los casos no existió diferencia significativa ( $P>0.05$ ) entre los experimentos realizados en cada prueba antimicrobiana ensayada, con lo que se obtuvieron experimentos reproducibles y confiables.

En el caso de los compuestos **1a**, **1f** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228 existió diferencia significativa ( $P<0.05$ ) entre las concentraciones empleadas, Tabla 9, por lo tanto el uso de uno u otro compuesto a una concentración determinada contra *S. epidermidis* ATCC 12228 generará halos de inhibición diferentes. Esta diferencia significativa ( $P<0.05$ ) se observa a 800, 1000 y 1500  $\mu\text{g}$  entre **1a** y **2a** en comparación con **1f**. Esto concuerda con el hecho de que **1f** presenta halos de inhibición con diámetros mayores que **1a** y **2a**, Figura 18.

**Tabla 9.** Resultados de la prueba de Duncan para **1a**, **1f** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC12228.

Concentración ( $\mu\text{g}$ )	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228		
	<b>1a</b>	<b>1f</b>	<b>2a</b>
50-500	R	R	R
800	6.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	R	6.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
1000	7.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	7.8 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	6.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
1300	7.4 $\pm$ 0.3 <sup>d</sup>	8.3 $\pm$ 0.9 <sup>d</sup>	7.2 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>
1500	7.7 $\pm$ 0.3 <sup>e</sup>	8.5 $\pm$ 0.5 <sup>f</sup>	7.9 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>

R = Resistente (sin halo de inhibición)

Los diámetros son el resultado de 9 mediciones  $\pm$  desviación estándar

En la misma fila las literales iguales indican que no hay diferencia significativa, mediante la prueba de Duncan, ( $P>0.05$ ).

Entre **1a** y **2a** no existió diferencia entre las concentraciones ( $P>0.05$ ) y esto es lógico al observar un mismo comportamiento y halos de inhibición semejantes por ambos compuestos, Figura 18. Así también por el hecho ya mencionado que **2a** genera a **1a** durante la síntesis de los derivados de quinoxalinonas.

Todos los cuadros del análisis estadístico (ANOVA) así como las figuras (gráficas) de los residuales contra los valores ajustados de todas las pruebas antimicrobianas realizadas se pueden observar en el Apéndice B.

Los heterociclos **1f** y **1a** resultaron ser antimicrobianos selectivos para la cepa *Gram* positiva *S. epidermidis* ATCC 12228 pues solo causan efecto, como se observó, en una de las tres cepas probadas.

Esta inhibición es también debido a la combinación de los sustituyentes en los compuestos ya que el antibacteriano **1f** que tiene en el C-10 como en el N-1 un bencilo y en el N-4 un tosilo, generó una susceptibilidad antimicrobiana sobre *S. epidermidis* ATCC 12228 a diferencia de **1g** que a pesar de ser un éster, la combinación de los sustituyentes, en el C-10 y N-1 tiene un prenilo y en N-4 un tosilo, no le proporcionan una capacidad inhibitoria en el crecimiento de la cepa.

Los compuestos **1h** - **1l** contienen un grupo amida en C-10. En el antimicrobiano **1f** comparado con **1j** tienen todos los sustituyentes iguales excepto en el C-10, en el que **1f** tiene un éster y **1j**, un grupo amida, siendo esto suficiente para que en el primer compuesto tenga actividad inhibitoria y en el segundo no. Las amidas tienen en su estructura un nitrógeno y los ésteres oxígeno lo cual sugiere que la electronegatividad más alta del oxígeno pueda ser un factor determinante. Así **1f** puede tener mayor oportunidad de ser receptor en la célula microbiana para entonces causar un daño en ella y lograr una inhibición o letalidad de dicha cepa. Esto se debe a que en ciertas condiciones especialmente en sistemas biológicos tanto el comportamiento químico de

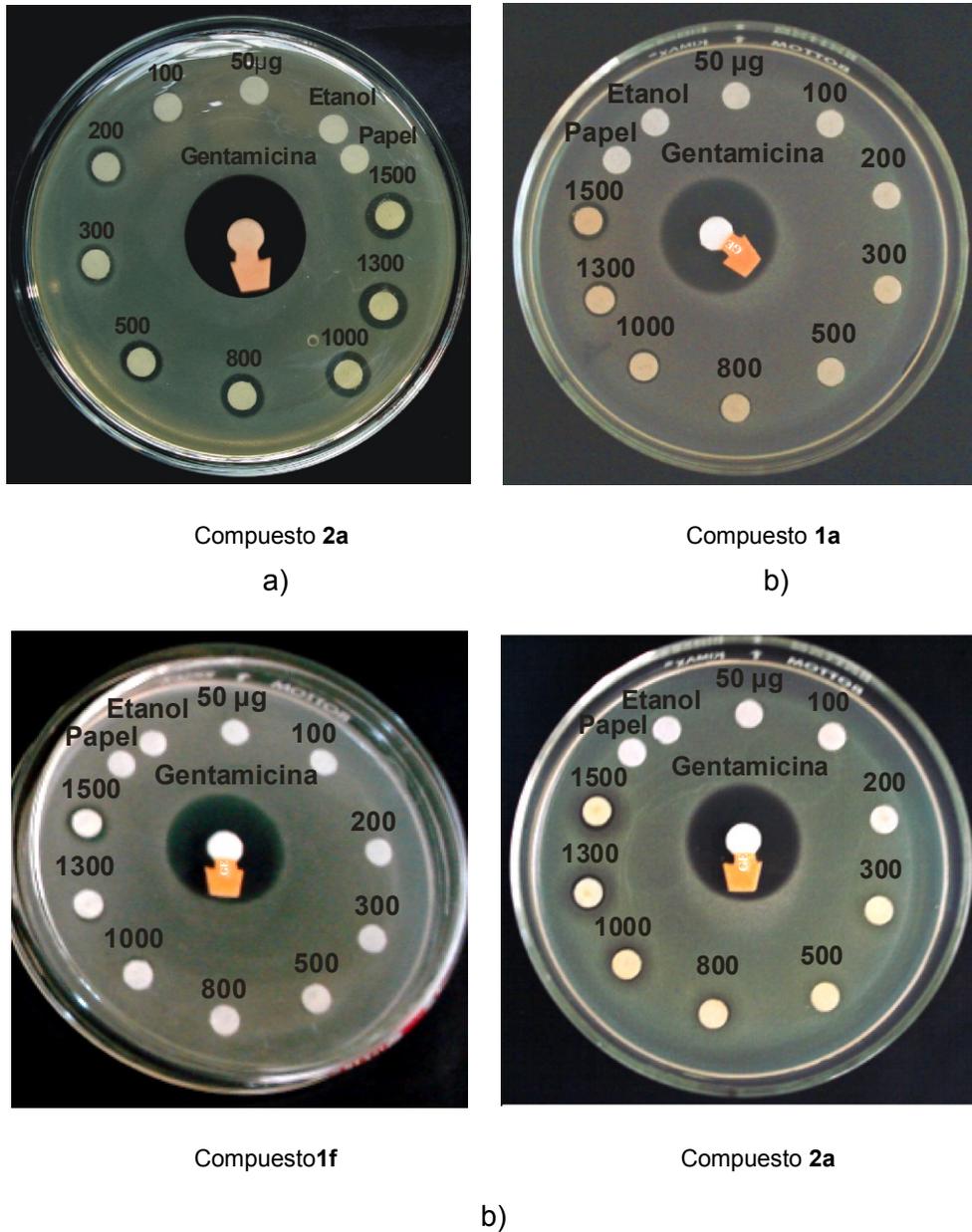
isómeros geométricos puede ser muy diferente así como de los compuestos con sustituyentes y/o posición diferente (Morrison y Boyd, 1998).

El ácido **2a** mostró actividad antimicrobiana sin embargo el análogo **2b** con un grupo nitro en el C-8, no mostró alguna actividad antibacteriana. Con lo que se puede decir que basta cambiar uno de los sustituyentes para que sea un compuesto activo o inactivo.

Análogos a todos los compuestos mencionados también presentaron halos de inhibición en contra de bacterias *Gram* positivas y *Gram* negativas (Obafemi y Akinpelu, 2005).

En estos ensayos antimicrobianos nuevamente el antibiótico gentamicina empleado como control positivo mostró halos de inhibición semejantes a los del apartado 4.2. En cada replica realizada presentó un diámetro de  $17.3 \pm 0.2$  mm al probar el compuesto **1a** y  $17.4 \pm 0.2$  mm al probar el compuesto **1f** ambos contra *S. epidermidis* ATCC 12228. Para el compuesto **2a** mostró un halo con diámetro de  $17.7 \pm 0.9$  mm para *E. coli* ATCC 35218 y  $17.4 \pm 0.5$  mm para *S. epidermidis* ATCC 12228. Este control positivo permitió comparar de manera visual la inhibición antimicrobiana causada por los tres compuestos derivados e intermediario de quinoxalin-2[1H]-onas así como el hecho de descartar que existiera un agente intrínseco (como el estado fisiológico de la célula) o extrínseco (como la cantidad de inóculo) que afectara la actividad antimicrobiana de los compuestos ensayados (Andrews, 2006; Prescott *et al.*, 2004).

Los resultados del ensayo en placa de *S. epidermidis* ATCC 12228 y *E. coli* ATCC 35218 anteriormente discutidos se observan en la Figura 19.



**Figura 19.** Halos de inhibición de a) **2a** contra *E. coli* ATCC 35218; b) **1a**, **1f** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228 en concentraciones de 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 1300 y 1500 µg.

#### 4.4 Método de macro dilución en caldo de los compuestos 1a, 1f y 2a

El método de macro dilución, aplicado a los tres compuestos con actividad antimicrobiana (**1a**, **1f** y **2a**) en contra de la cepa *Gram* negativa y *Gram* positiva, resultó

con puntos de corte, es decir con puntos de interrupción del crecimiento microbiano, en tres de los cuatro ensayos antibacterianos, Tabla 10. Los ensayos con punto de corte son, el del compuesto **1a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228 y el de **2a** tanto contra *E. coli* ATCC 35218 como contra *S. epidermidis* ATCC 12228. Este método se realizó dos veces por triplicado.

**Tabla 10.** Recuento en placa (UFC/mL) de los microorganismos tipificados para determinar las CMI y CMB de **1a**, **1f** y **2a**.

Concentración en µg/µL	Compuesto			
	1a	1f	2a	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
8	N.D	N.D.	320,000 ± 107,238	N.D.
16	186,670 ± 71,102	425,000 ± 54,083	263,330 ± 148,174	385,000 ± 48,905
32	161,667 ± 21,148	515,000 ± 46, 815	<b>1,666 ± 3,727</b>	328,330 ± 58,996
64	<b>44,833 ± 11,067</b>	<b>93,000 ± 1,291</b>	<b>0</b>	<b>3,500 ± 3,095</b>
128	<b>0</b>	Incontable	0	<b>0</b>
256	0	Incontable	0	0
512	0	Incontable	N.D.	0
Control	230,000 ± 47,258	843,333 ± 134,742	403,333 ± 153,695	395,000 ± 55,902

N.D. = No determinado

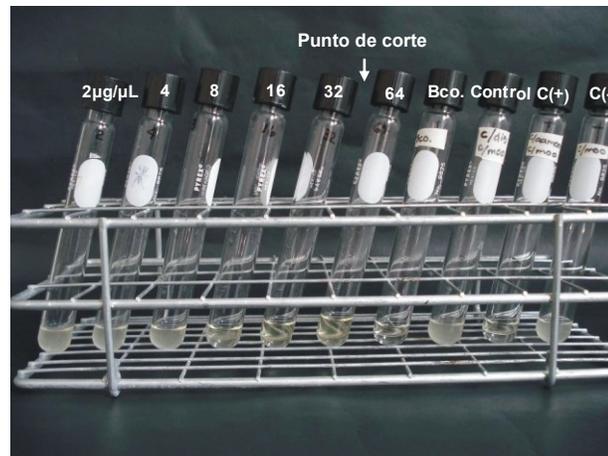
El punto de corte se localiza entre las dos concentraciones en la que una aún tiene presencia de UFC/mL y la otra ninguna presencia de UFC/mL, ambas en negritas

Las UFC/mL son la media de 6 conteos ± desviación estándar

En la Tabla 10 se observa que el punto de corte del compuesto **2a** contra *E. coli* ATCC 35218 se localiza entre las concentraciones 32 y 64 µg/µL ya que en 32 µg/µL existe aún crecimiento de colonias bacterianas. En 64 µg/µL como en las dos

concentraciones siguientes no hubo crecimiento microbiano después de 24 y 48 h de incubación.

La observación del punto de corte se aprecia en la Figura 20 con la interrupción de la turbidez presentada en los tubos por el crecimiento microbiano. El tubo de concentración 64  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  presenta una turbidez pero es debida al compuesto no al crecimiento propio de la cepa. Esta disminución apreciable de turbidez indica que la concentración mínima inhibitoria (CMI) es 32  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y la concentración mínima bactericida (CMB) es 64  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . En este ensayo el control con microorganismo y sin compuesto mostró una media de 403,333 UFC/mL.

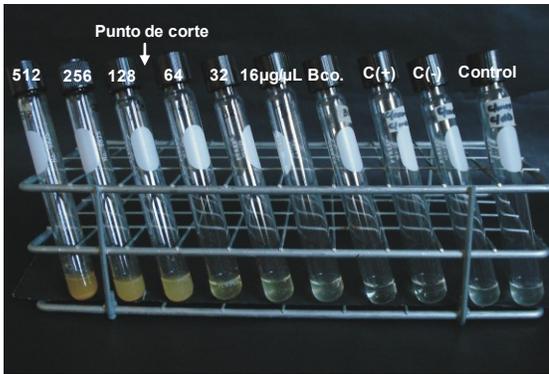


- Bco. = Tubo sin microorganismo, sin antimicrobiano y sin compuesto **2a**  
 C(+) = Tubo con antimicrobiano (gentamicina) y microorganismo (*E. coli* ATCC 35218)  
 C(-) = Tubo con microorganismo únicamente  
 Control = Tubo con microorganismo y disolvente (etanol)

**Figura 20.** Punto de corte (flecha) entre las concentraciones 32 y 64  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  del antibacteriano **2a** contra *E. coli* ATCC 35218.

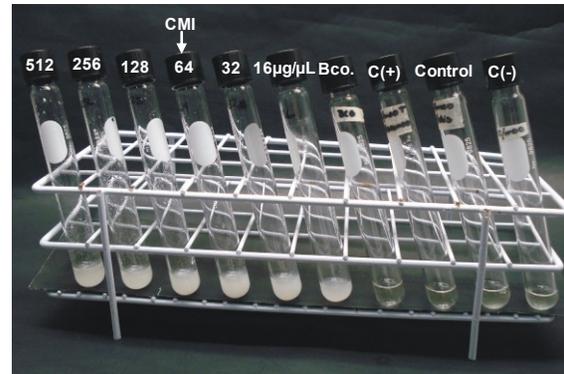
En la Tabla 10 se muestran los recuentos en placa de *S. epidermidis* ATCC 12228 frente a las concentraciones probadas de los antimicrobianos **1a**, **1f** y **2a**. Así también en

la Figura 21 se puede apreciar el punto de corte del compuesto **2a** y **1a** entre las concentraciones 64 y 128  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  que nos permitió determinar la CMI y la CMB respectivamente para ambos compuestos.



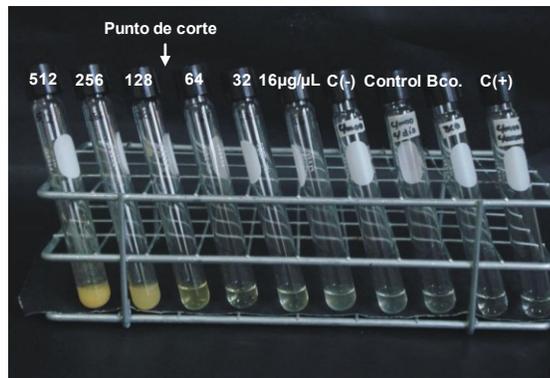
Bco. = Tubo sin microorganismo, sin antimicrobiano y sin compuesto **1a**

a)



Bco. = Tubo sin microorganismo, sin antimicrobiano y sin compuesto **1f**

b)



Bco. = Tubo sin microorganismo, sin antimicrobiano y sin compuesto **2a**

c)

C(+) = Tubo con gentamicina y microorganismo (*S. epidermidis* ATCC 12228)  
 C(-) = Tubo con microorganismo únicamente  
 Control = Tubo con microorganismo y disolvente (etanol)

**Figura 21.** a) Punto de corte entre 64  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (CMI) y 128  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (CMB) del antibacteriano **1a**; b) CMI (flecha) de 64  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  del antibacteriano **1f**; c) Punto de corte (flecha) entre 64  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (CMI) y 128  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (CMB) del antibacteriano **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228.

Para el compuesto **1f** la turbidez en el tubo va en decremento pero no de manera apreciable para observar la disminución del crecimiento bacteriano y diferenciarla de la turbidez que se debe al antibacteriano. En estos experimentos la media del control para los tres compuestos probados contra *S. epidermidis* fue de 489,444 UFC/mL en el cual se observa un crecimiento óptimo y adecuado al no existir compuesto inhibitorio.

Se puede observar en la Tabla 11 y Figura 21 que el compuesto **2a** y **1a** tienen una concentración mínima bactericida (CMB) de 128 µg/µL a diferencia del antimicrobiano **1f** que muestra colonias desarrolladas de manera incontable a esa misma concentración (Tabla 10) y por lo tanto no se pudo establecer una CMB, solo muestra una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 64 µg/µL, Tabla 11.

**Tabla 11.** CMI, CMB y % de inhibición de los compuestos **1a**, **1f** y **2a** contra las cepas *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

	Compuesto			
	1a	1f	2a	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
<b>CMI (µg/µL)</b>	64	64	32	64
<b>% de inhibición*</b>	80.51	88.97	99.30	99.11
<b>CMB</b>	128	N.P.	64	128
<b>% bactericida**</b>	100	N.P.	100	100

\*Este porcentaje de inhibición corresponde a la CMI de cada microorganismo

\*\*Este porcentaje corresponde a la CMB de cada microorganismo

La CMB se consideró como a aquella en la que el compuesto mata o inhibe el 99.9% de las UFC/mL del microorganismo

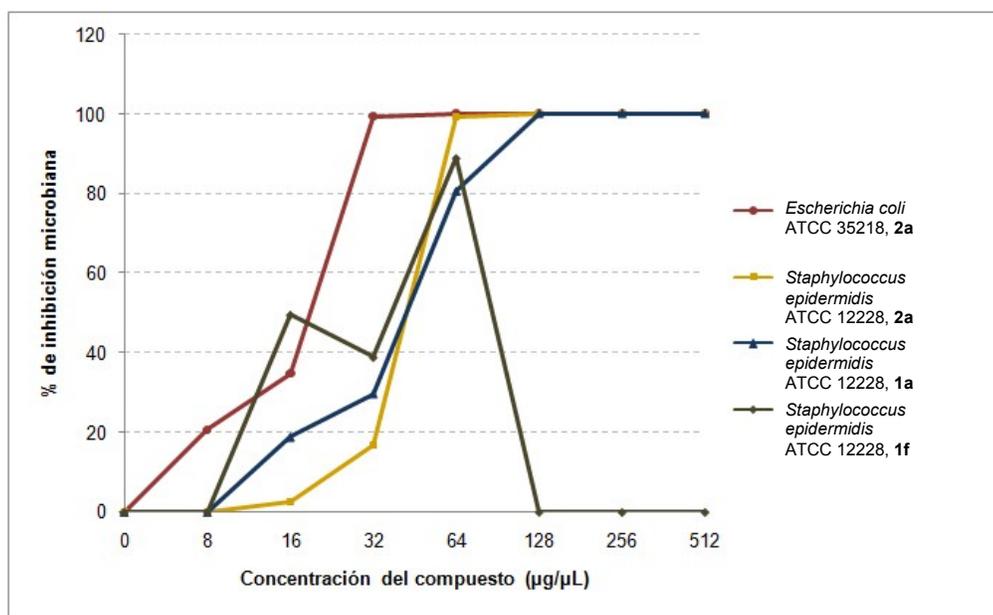
N.P. = No presentó

A pesar de que en el método de difusión el compuesto **1f** presentó los halos de inhibición más grandes contra *S. epidermidis* ATCC 12228 este tiene una CMI de 64 µg/µL igual que los compuestos **1a** y **2a** y no presentó CMB. Esto era de esperarse al contener en sus halos de inhibición crecimiento microbiano, lo que nos indicaba y confirmamos con este método que es un compuesto bacteriostático y no bactericida.

En los ensayos antimicrobianos se observó que el compuesto **2a** tiene un punto de corte para la cepa *E. coli* ATCC 35218 y otro para *S. epidermidis* ATCC 12228. Estos puntos de corte generaron una CMI de 32 µg/µL para la primera cepa y de 64 µg/µL para la segunda, Tabla 10 y 11. Con lo que se corroboran los resultado del método de difusión, el compuesto **2a** causa una mayor sensibilidad y toxicidad en la cepa *E. coli* ATCC 35218 que en la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228.

Este efecto se observa mejor al graficar los porcentajes de inhibición de los tres compuestos generados en la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 y *E. coli* ATCC 35218 a las diferentes concentraciones del compuesto, Figura 22. Podemos apreciar que el compuesto **2a** en *E. coli* ATCC 35218 tiene una CMB más baja que en *S. epidermidis* ATCC 12228, la diferencia es una concentración.

El compuesto **1f** presenta mayor inhibición contra *S. epidermidis* ATCC 12228 que **1a**, ya que **1f** causa la inhibición en 88.97% del crecimiento de *S. epidermidis* ATCC 12228 a una CMI de 64 µg/µL. El compuesto **1a** a la misma concentración causa el 80.51% de inhibición del crecimiento de la cepa. No así en el caso de **2a** que muestra a 64 µg/µL una inhibición casi del 99.11% de *S. epidermidis* ATCC 12228, Tabla 11.



**Figura 22.** Porcentaje de inhibición de las tres quinoxalinonas **1a**, **1f** y **2a** contra los microorganismos tipificados.

Se puede observar que en la concentración de 16 µg/µL del compuesto **1f** tiene un comportamiento más inhibitorio contra *S. epidermidis* ATCC 12228 que los compuestos **1a** y **2a**. En esta concentración **1f** muestra una inhibición aproximadamente del 50% en comparación con **1a** que tiene casi el 20% y **2a** que tiene el 3% aproximadamente. Paradójicamente el porcentaje de inhibición desciende semejante a los compuestos **1a** y **2a** en la siguiente concentración (32 µg/µL). Esto se puede atribuir a un efecto de tolerancia por la disminución o desaparición de su capacidad de matar a la cepa bacteriana. Este hecho ha sido comprobado en infecciones estafilocócicas que no responden al tratamiento con un antibiótico sino que hace necesario el asociarlo con otro (García *et al.*, 2000). Sin embargo en la concentración 64 µg/µL aumenta nuevamente el porcentaje de inhibición del compuesto **1f** semejante a la de los otros dos compuestos con lo que nos indica que la concentración 32 µg/µL es la CMI. Ya que en las siguientes tres concentraciones **1f** pierde su poder inhibitorio y las células microbianas crecen a pesar de

su presencia de manera incontable. Con lo cual este compuesto no muestra una CMB contra la cepa *S. epidermidis*. Este comportamiento es llamado el fenómeno paradójico o de Eagle el cual consiste, como se vio en este compuesto, en la presencia de un mayor número de bacterias debido a que son supervivientes a concentraciones superiores a la CMB. Este fenómeno aparece también cuando la CMI y la CMB no están próximas o difieren en más de dos diluciones (García *et al.*, 2000).

El sembrado se realizó de forma directa en las concentraciones 128 a 512  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para todos los compuestos y se dejaron 12, 24 y 48 h de incubación. Esto con la finalidad de observar que no hubiera crecimiento de alguna cepa sobreviviente.

Estudios realizados a análogos de estos derivados de quinoxalinonas con actividad antimicrobiana han resultado con inhibición del crecimiento microbiano en CMI de 0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Sanna *et al.*, 1998).

Las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas en estos estudios en su totalidad son arriba de 0.500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y solo tres compuestos tienen CMI menor a 0.500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Sin embargo de estos compuestos uno tuvo actividad antibacteriana contra *E. coli* con CMI de 0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , *S. aureus* con CMI de 0.250 a 0.500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y antifúngica contra *C. albicans* con CMI de 0.008 a 0.0625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , siendo un antimicrobiano de amplio espectro, el resto solo posee actividad antibacteriana contra la bacteria *Gram* positiva (Sanna *et al.*, a, 1999).

Los antimicrobianos de quinoxalinonas mencionados en el párrafo anterior generalmente tienen en su estructura un grupo  $\text{CF}_3$  y  $\text{NO}_2$ , los cuales deben proporcionarles cierta actividad antimicrobiana ya que con el solo hecho de cambiar el grupo de posición en la estructura de la molécula causa cambios en la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano y por ende resultan ser más tóxicos para una célula microbiana que para otra.

Existen algunos otros derivados que se muestran con CMI de 0.0156  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  hasta 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para las todas las cepas probadas (Obafemi y Akinpelu, 2005). Los cuales tienen un grupo  $\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  en su estructura el que confiere actividad antimicrobiana, la cual es mayor en la posición en la estructura del sustituyente OH que en H en la molécula. El cambio del sustituyente causa un cambio importante en la actividad antimicrobiana al colocar uno u otro grupo en su estructura.

Los derivados e intermediarios de quinoxalinonas (**1a**, **1f** y **2a**) estudiados en este trabajo mostraron CMI y CMB altas en comparación con los antimicrobianos mencionados. Sin embargo dicha diferencia entre los análogos y estos antimicrobianos en la magnitud del daño a las células microbianas es la posición y existencia de un grupo  $\text{CF}_3$  ó  $\text{NO}_2$  con mayor electronegatividad. Prescott *et al.* (2004) mencionan que esta electronegatividad puede causar una posible lisis, una inhibición en las funciones de la membrana celular o en la síntesis de ácido nucleico así como de proteínas en dicha célula.

Sin embargo en este estudio se puede decir que los compuestos **1a**, **1f** y **2a** probablemente inhiban la síntesis de la pared celular de las bacterias empleadas ya que se sabe por la literatura que los compuestos que inhiben esta parte de la célula resultan ser selectivos contra células procariota, no atacando a las eucariotas. Prescott *et al.* (2004) explican lo anterior al mencionar que las células bacterianas poseen una estructura exclusiva en su pared celular que no se encuentra en las eucariotas. Y los compuestos selectivos interfieren en la acción del portador lipídico que transporta precursores de la pared o inhiben las enzimas de transpeptidación que participan en los enlaces entre las cadenas polisacáridas del peptidoglucano o así también pueden activar las enzimas líticas de dicha pared celular presente en las células procariotas.

Aun así la actividad antimicrobiana de estos compuestos puede verse incrementada con la presencia de halógenos en su estructura. Ya que los compuestos halogenados

antimicrobianos análogos a los compuestos **1a**, **1f** y **2a** ensayados por Sanna *et al.*, (1998; 1999 a, b) así como Carta *et al.*, (2003) a pesar de utilizar concentraciones altas para inhibir microorganismos patógenos son bajas en comparación de los derivados antimicrobianos aquí estudiados. Sin embargo estos solo muestran CMI y no CMB.

Los antimicrobianos obtenidos en este estudio (**2a** y **1a**) presentaron CMB para *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228 además de mostrar una CMI. Lo cual indica en comparación con los otros derivados que pueden matar a las células microbianas y no solo detener su crecimiento. Sin embargo por la magnitud de la concentración hace necesario de toxicidad para saber si causa algún daño.

Existen otros derivados de quinoxalinonas que muestran actividad antiviral (Patel *et al.*, 2000) con lo que sería de interés el estudio antiviral de los compuestos evaluados en este trabajo.

## 5. CONCLUSIONES

- El compuesto **2a** fue el más tóxico ya que inhibió tanto a *E. coli* ATCC 35218 (CMI de 32 µg/µL y CMB de 64 µg/µL) como a *S. epidermidis* ATCC 12228 (CMI de 64 µg/µL y CMB de 128 µg/µL).
- Los compuestos **1a** (CMI de 64 µg/µL, CMB de 128 µg/µL) y **1f** (CMI de 64 µg/µL) fueron selectivos al inhibir únicamente a *S. epidermidis* ATCC 12228.
- No hubo actividad antimicrobiana apreciable de los 15 compuestos evaluados contra *C. albicans* ATCC 14053.
- La fase exponencial permitió calcular tiempo, absorbancia y alícuota para tener  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  UFC/mL en bacterias y en la levadura, respectivamente, para la determinación antimicrobiana.
- El análisis estadístico ANOVA de dos vías indicó que los experimentos por el método de difusión en disco fueron confiables y reproducibles ( $P > 0.05$ ).
- La efectividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 35218 por **2a** y *S. epidermidis* ATCC 12228 por **1a** y **2a** es debida estadísticamente por la concentración ( $P < 0.05$ ). La actividad antibacteriana contra *S. epidermidis* ATCC 12228 de **1f** se debe en parte ( $P > 0.05$ ) estadísticamente a la concentración y posiblemente a la resistencia mostrada por este microorganismo al compuesto.

## 6. PERSPECTIVAS

- Evaluar la actividad antimicrobiana de los 15 derivados e intermediarios de quinoxalin-2[1*H*]-ona con un número mayor de bacterias *Gram* (+), *Gram* (-) y levaduras, y con ello determinar el espectro de acción antimicrobiano.
- Realizar curvas de letalidad de las quinoxalin-2[1*H*]-onas con actividad antimicrobiana para el conocimiento de la rapidez del efecto inhibitorio o bactericida
- Determinar la actividad antimicrobiana de quinoxalinonas halogenadas dado que la presencia de halógenos potencian su actividad inhibitoria y bactericida.

## 7. REFERENCIAS

- Acevedo L., Mendoza C., Oyón R. **2001**. *Coliformes totales y fecales y algunas enterobacterias, Staphylococcus sp. y hongos en ensaladas para perros calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 51, 4, 336-370.
- Alexander T.W., Yanke L.J., Topp E., Olson E.M., Read R.R., Morck D.W., McAllister T.A. **2008**. *Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant Escherichia coli bacteria in feedlot cattle*. Applied and Environmental Microbiology. 74, 14, 4405-4416.
- Ali M.M., Ismal M.M.F., El-Gaby M.S.A., Zahran M.A., Ammar Y.A. **2000**. *Synthesis and antimicrobial activities of some novel quinoxalinone derivatives*. Molecules. 5, 864-873.
- Andreu A., Alós J.I., Gobernado M., Marco F., de la Rosa M., García-Rodríguez J.A., Grupo cooperativo español para el Estudio de la Sensibilidad Antimicrobiana de los patógenos Urinarios. **2005**. *Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 23, 1, 4-9.
- Andrews J.M. **2006**. *BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 5)*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1-19.
- Arcila L.S. **1999**. *Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos polares de la parte aérea de Rhoeo discolor*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Atlas M.R. **1988**. *Microbiology Fundamentals and Applications*. Segunda edición. Mc. Millan Publishing Company.

- Barry A.L. y Brown S.D. **1996**. *Fluconazol disk diffusion procedure for determining susceptibility of Candida species*. Journal of Clinical Microbiology. **34**, 9, 2154 - 2157.
- Berkhout R. **2002**. *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología. 25-26.
- Borbolla S.M.E., Vidal P.M.R., Piña G.O.E., Ramírez M.I., Vidal V.J.J. 2004. *Contaminación de los alimentos por Vibrio cholera, coliformes fecales, salmonella, hongos, levaduras y Staphylococcus aureus en Tabasco durante 2003*. Salud en Tabasco. **10**, 1-2, 221-232.
- Boscán O.J., Villarroel N.R., Oviedo B.A., Villalobos S.A., Pino R.D., García B.D., Hernández G.L., Pérez B.M. **2009**. *Bacterias patógenas potenciales al inicio del periodo seco de vacas doble propósito con mastitis subclínicas*. Revista científica, FCV-LUZ. **XIX**, 3, 277-283
- Brooks, Batel, Morse. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. **1999**. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México. Pág. 57-67, 179-216.
- Carta A., Loriga M., Zanetti S., Sechi L.A. **2003**. *Quinoxalin-2-ones. Part 5. Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-alkyl-, 3-halomethyl- and 3-carboxyethylquinoxaline-2-ones variously substituted on the benzo-moiety*. IL Farmaco, **58**, 1251-1255.
- Chart H. **1998**. *Toxigenic Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, **84**, 77S-86S.
- Cona T.E. **2002**. *Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar*. Revista Chilena de Infectología. **19**, 2, 77-81.
- Curtis M.L., Franceschi O., De Castro N. **2000**. *Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. **50**, 2, 177-182.

- Daza P.R.M. **1998**. *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria*. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 22, 3, 57-67.
- Drlica K. **2003**. *The mutant selection window and antimicrobial resistance*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 52, 11-17.
- Edurne L., Oteo J. **2006**. *Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España*. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 30, 10-19.
- Estrada H., Gamboa M.M., Chaves C., Arias M.L. **2005**. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Listeria monocytogenes y Aspergillus niger. Evaluación de su carga microbiológica*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 55, 2, 167-171.
- Famiglietti A., Quinteros M., Vázquez M., Marín M., Nicola F., Radice M., Galas M., Pasterán F., Bantar C., Casellas J.M., Kovensky Pupko J., Couto E., Goldberg M., Lopardo H., Gutkind G., Soloaga R. **2005**. *Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae*. Revista Argentina de Microbiología. 37, 57-66.
- García C.P. **2003**. *Resistencia bacteriana en Chile, Bacterial resistance to antimicrobial agents*. Revista Chilena de Infectología. 1, S11-S23.
- García R.A., Cantón R., García S.J.E., Gómez-Lus M.L., Martínez M.L., Rodríguez-Avial C., Vila J. **2000**. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Apartado 11 y 12. Primera edición. SEIMC. España.
- Gill R.S., Foust D.E., Archer L.G., Mongodin F.E., DeBoy T.R., Ravel J., Paulsen T.I., Kolonay F.J., Brinkac L., Beanan M., Dodson J.R., Daugherty C.S., Madupu R., Angiuoli V.S., Durkin S.A., Haft H.D., Vamathevan J., Khouri H., Utterback T., Lee C., Dimitrov G., Jiang L., Qin H., Weidman J., Tran K., Kang k., Hance R.I., Nelson E.K.,

- Fraser M.C. **2005**. *Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain*. Journal of Bacteriology, 187, 2426-2438.
- Ibekwe A.M., Grieve C.M. **2003**. *Detection and quantification de Escherichia coli O157:H7 in environmental samples by real-time PCR*. Journal of Applied Microbiology, 94, 421-431.
- IMSS. **2001**. Valoración microbiológica de antibióticos. *Métodos generales de análisis*. 1-25.
- Ishii S., Ksoll B.W., Hicks E.R., Sadowsky J.M. **2006**. *Presence and growth of naturalized Escherichia coli in temperate soils from lake superior watersheds*. Applied and Environmental Microbiology, 72, 612-621.
- Kenneth B., Williams Robert. **1986**. Microbiología. Novena reimpresión. Editorial Publicaciones Cultural S.A. de C.V. México. Pág. 329-341.
- Lee C. **2008**. *Therapeutic challenges in the era of antibiotic resistance*. International Journal of Antimicrobial Agents. 32, 54. S197-S199.
- Lemus E.D., Maniscalchi B.M.T., Hassoun M., Vizcaya H. **2008**. *Estafilococos oxacilino resistentes en queso blanco fabricado en el estado Anzoátegui, Venezuela*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 28, 1, 1312-2556.
- Levinson E.W., Jawetz E. **1992**. Microbiología Inmunológica. Editorial El manual moderno S.A. de C.V. México. Pág. 65-81.
- Liébana U.J. **1997**. Microbiología Oral. Editorial Mc Graw- Hill. México. Pág. 64-87, 195-199, 210-217.
- Madigan T.M., Marticko M.J., Parcker J. **2004**. Biología de los Microorganismos. Décima edición. Editorial Prentice Hall. México. Pág. 21-27, 38-43, 55-81, 701-704, 927-929.

- Martínez J.L., Baquero F. **2002**. *Interactions among strategies associated with bacterial infection: Pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance*. *Clinical Microbiology Reviews*. 15, 4, 647-679.
- Marzocca M.A., Marucci P.L., Sica M.G., Álvarez E.E. **2006**. *Detección de Escherichia coli O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas*. *Revista Argentina de Microbiología*. 38, 1, 38-40.
- Michelim L., Lahude M., Araújo P.R., Giovanaz D.S.H., Müller G., Delamare A.P.L., Pinto da Costa S.O., Echeverrigaray S. **2005**. *Pathogenic factors and antimicrobial resistance of Staphylococcus epidermidis associated with nosocomial infections occurring in intensive care units*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36, 1, 1517.
- Monzón M., Oteiza C., Leiva J., Amorena B. **2001**. *Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48, 793-801
- Morrison T.R., Boyd N.R. **1998**. *Química Orgánica*. Editorial Addison Wesley Longman de México S.A. de C.V. México. Pág. 251-254.
- Nodarse H.R. **2001**. *Estafilococos multirresistentes: uso del disco oxacillín como marcador de resistencia a antibióticos*. *Revista Cubana Médico Militar*. 30, 1, 7-10.
- Obafemi A.C., Akinpelu D.A. **2005**. *Synthesis and antimicrobial activity of some 2(1H)-quinoxalinone-6-sulfonyl derivates*. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*. 180, 1795-1807.
- Patel M., McHugh R.J., Cordova C.B., Klabe R.M., Erickson-Viitanen S., Trainor G.L., Rodgers J.D. **2000**. *Synthesis and evaluation of quinoxalinones as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10, 1729-1731.
- Pelczar J.M., Jr. Reid. R.D. **1982**. *Microbiología*. Editorial McGraw-Hill. México. Pág. 408-432.

- Poole K. **2002**. *Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance*. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement. 92, 55S–64S
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. **2004**. Microbiología. Quinta edición. Editorial Mc Graw-Hill. España. Pág. 119-144, 459-460, 546-548, 596-613, 870-891, 1044-1074.
- Rex J.H., Rinaldi M.G., Pfaller M.A. **1995**. *Resistance of Candida Species to Fluconazole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39, 1, 1-8.
- Rojas H.N.M, Fernández L.N., Espino H.M.H., Fernández F.M.A. **2001**. *Patrones de drogorresistencia de cepas de Staphylococcus aureus de origen clínico humano*. Revista Cubana de Medicina Tropical. 53, 1-8.
- Sanna P., Carta A., Loriga M., Zanetti S., Sechi L. **1998**. *Synthesis of substituted 2-ethoxycarbonyl- and 2-carboxyquinoxalin-3-ones for evaluation of antimicrobial and anticancer activity*. IL Farmaco, 53, 455-461.
- Sanna P., Carta A., Loriga M., Zanetti S., Sechi L. **1999**. a. *Synthesis of 3,6,7-substituted-quinoxalin-2-ones for evaluation of antimicrobial and anticancer activity*. Part 2. IL Farmaco, 54, 161-168.
- Sanna P., Carta A., Loriga M., Zanetti S., Sechi L. **1999**. b. *Preparation and biological evaluation of 6/7-trifluoromethyl(nitro)-, 6,7-difluoro-3-alkyl(aryl)-substituted-quinoxalin-2-ones*. Part 3. IL Farmaco, 54, 169-177.
- Santos-Sánchez N.F., Salas-Coronado R., Peralta-Colorado R., Peña-Hueso A., Sánchez-Ruiz S.A., Flores-Parra A. **2008**. *Novel synthesis of 1-alkyl-4-tosyl-3-carboxymethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ones*. Arkivoc, 5, 187-199.
- Sellman R.B., Howell P.A., Kelly-Boyd C., Baker M.S. **2005**. *Identification of immunogenic and serum binding proteins of Staphylococcus epidermidis*. Infection and Immunity, 73, 6591-6600.

- Silva S.J. **2006**. *Resistencia a antibióticos*. Revista Latinoamericana de Microbiología, ALAM, 48, 2, 105-112.
- Silva V.V., Díaz J.M.C., Febré N., Red de Diagnóstico en Micología Médica. **2002**. *Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos*. Revista Chilena de Infectología. 19, 2, 149-156.
- Stanier R.Y., Doudoroff M., Adelberg E.A. **1981**. Microbiología. Capítulo 9. *Crecimiento microbiano*. Editorial Aguilar S. A. España. Pág. 318-346.
- Torres A.N. **2005**. *Métodos para la detección de resistencia a los antimicóticos*. Infect., out/dez. 9, 4, 188-243. ISSN 0123-9392. Marzo 2010.  
[http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922005000400005&Ing=pt&nrm=iso](http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922005000400005&Ing=pt&nrm=iso)
- Trucco A.O., Prado J.V., Durán T.M.C., Grupo Pronares. **2002**. *Red de vigilancia de resistencia antimicrobiana PRONARES. Informe primer semestre 2001*. Revista Chilena de Infectología. 19, 2, 140-148.
- Valdiviezo L.N., Villalobos B.L.B., Martínez N.R. **2006**. *Evaluación microbiológica en manipuladores de alimentos de tres comedores públicos en Cumana-Venezuela*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 26, 2, 95-100.
- White A.S., Godard R.D., Belling C., Kasza V., Beach R.L. **2010**. *Beverages obtained from soda fountain machines in the U.S. contain microorganisms, including coliform bacteria*. International Journal of Food Microbiology. 137, 1, 61-66.

## 8. APÉNDICE

### APÉNDICE A

**Tabla 12.** Diámetros de halos de inhibición (mm) de antibióticos BIO-RAD®.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>MS</b>	<b>S</b>
Amikacina	30 µg	≤14	15-16		≥17
Ampicilina	10 µg				
<i>Enterobacteriaceae</i>		≤11	12-13		≥14
<i>Staphylococcus spp</i>		≤28			≥29
<i>Enterococos</i>		≤16		≥17	
Otros <i>Streptococos</i>		≤21		22-29	≥30
Cefalotina	30 µg	≤14	15-17		≥18
Ceftriaxona	30 µg	≤13		14-20	≥21
Cloranfenicol	30 µg	≤12	13-17		≥18
Dicloxacilina	1 µg				
<i>Staphylococcus spp</i>		≤10	11-12		≥13
Enoxacina	10 µg	≤14	15-17		≥18
Eritromicina	15 µg	≤13	14-17		≥18
Gentamicina	10 µg	≤12	13-14		≥15
Netilmicina	30 µg	≤12	13-14		≥15
Penicilina	10 U				
<i>Staphylococcus spp</i>		≤28			≥29
<i>N. gonorrhoeae</i>		≤19			≥20
<i>Enterococos</i>		≤14		≥15	
Otros <i>estreptococos</i>		≤19	10-27		≥28
Trimetroprim-sulfametoxazol	25 µg	≤10	11-15		≥16

R = Resistente; I = Intermedio; MS = Moderadamente sensible; S = Sensible

## APÉNDICE B

**Tabla 13.** ANOVA de dos vías: Halo (mm) frente experimento, concentración del compuesto **1a** contra el microorganismo *S. epidermidis* ATCC 12228.

<b>Efecto</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Media de cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Experimento	2	0.1689	0.08444	1.49	0.245
Concentración	3	7.9133	2.63778	46.55	0.000
Error	24	1.3600	0.05667		
Total	35	10.4556			

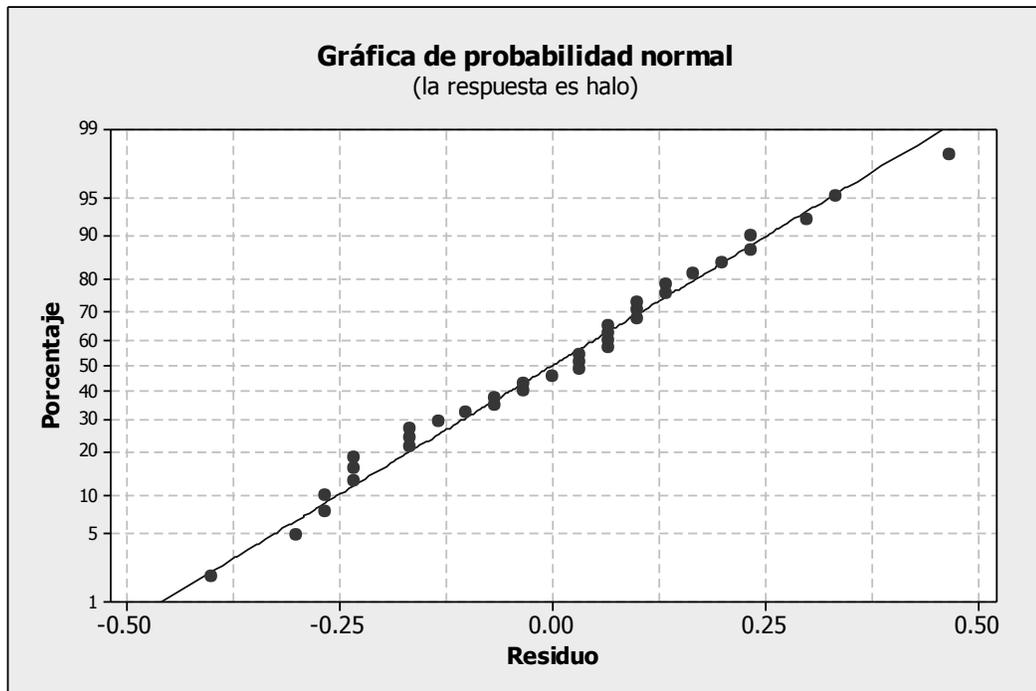
P>0.05 = No existe diferencia significativa

P<0.05 = Existe diferencia significativa

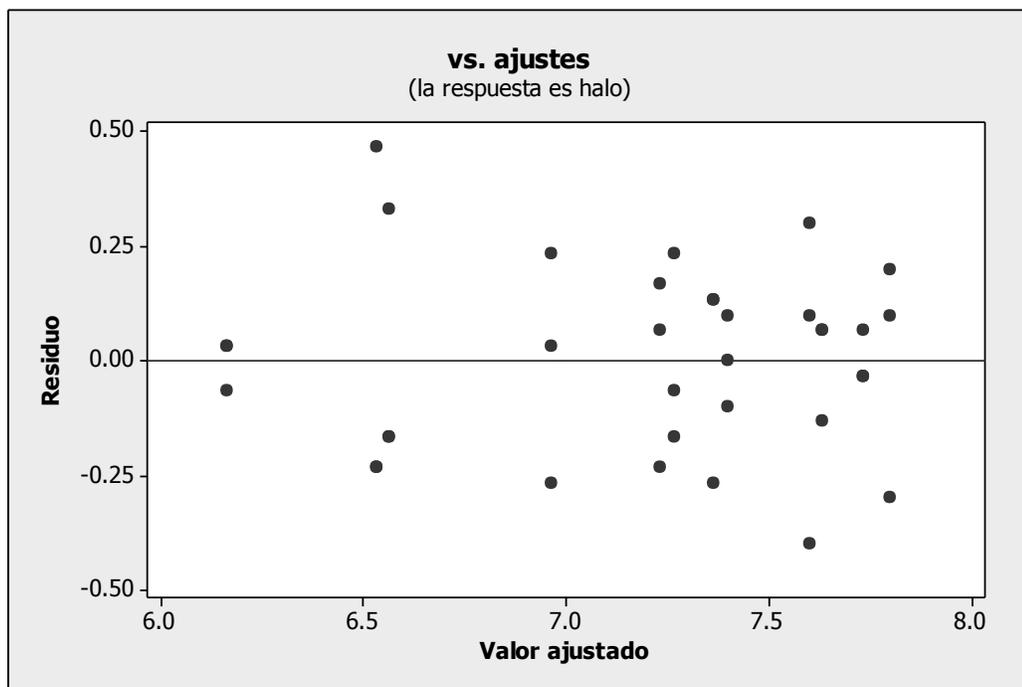
S = 0.2380

R-Sq = 86.99%

Con la finalidad de representar las variaciones de los diámetros de halos de inhibición obtenidos del método de difusión en disco, se graficó la probabilidad normal de los residuales, Figuras 23, 25, 27, 29, 31 y 33. Se puede apreciar que los datos tienen un comportamiento semejante a una recta, es decir están lo más cerca posible a los valores estimados existiendo la menor dispersión en los resultados. Y por lo tanto el modelo empleado en este análisis es adecuado.



**Figura 23.** Gráfica de probabilidad normal de los residuales del compuesto **1a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228.



**Figura 24.** Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del compuesto **1a** contra el microorganismo *S. epidermidis* ATCC12228.

**Tabla 14.** ANOVA de dos vías: Halo (mm) frente experimento, concentración del compuesto **1f** contra el microorganismo *S. epidermidis* ATCC 12228.

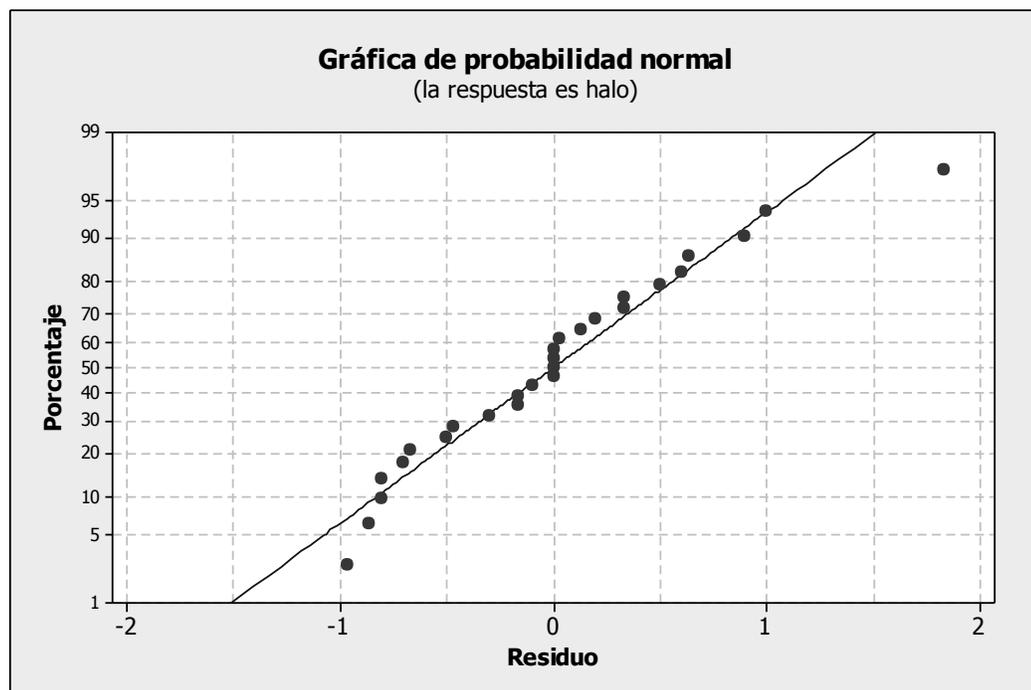
Efecto	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Experimento	2	1.3430	0.67148	1.10	0.354
Concentración	2	2.1830	1.09148	1.79	0.196
Error	18	10.9867	0.61037		
Total	26	16.7496			

$P > 0.05$  = No existe diferencia significativa

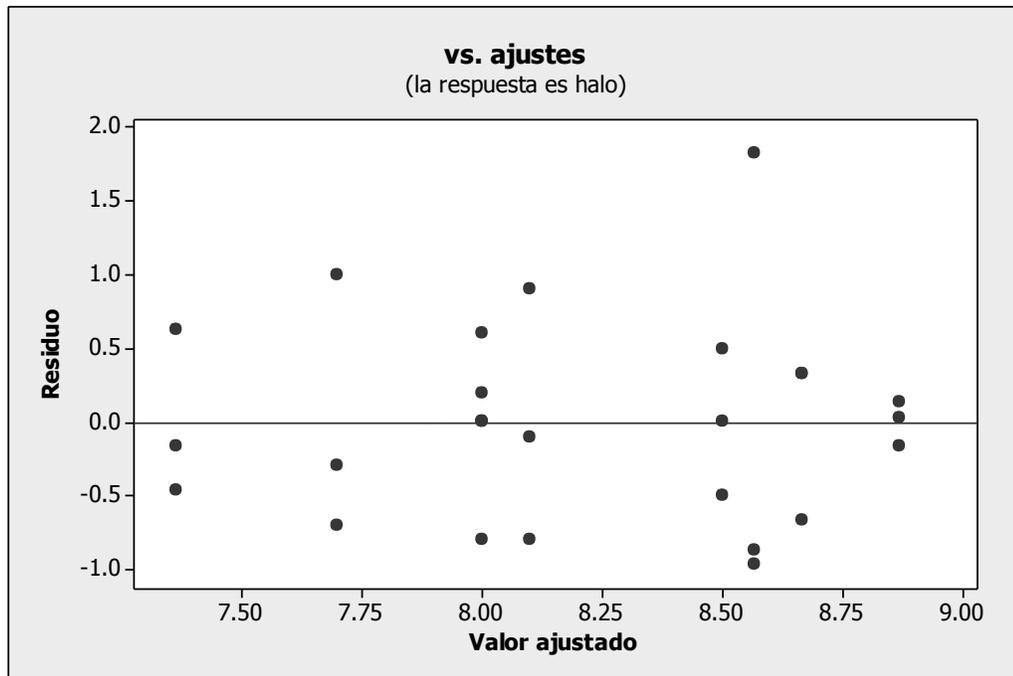
$P < 0.05$  = Existe diferencia significativa

$S = 0.7813$

$R\text{-Sq} = 34.41\%$



**Figura 25.** Gráfica de probabilidad normal de los residuales del compuesto **1f** contra *S. epidermidis* ATCC 12228.



**Figura 26.** Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del compuesto **1f** contra el microorganismo *S. epidermidis* ATCC 12228.

**Tabla 15.** ANOVA de dos vías: Halo (mm) frente experimento, concentración del compuesto **2a** contra el microorganismo *E. coli* ATCC 35218.

Efecto	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Experimento	2	1.2213	0.61063	2.79	0.073
Concentración	6	49.5375	8.25624	37.77	0.000
Error	42	9.1800	0.21857		
Total	62	61.2108			

P>0.05 = No existe diferencia significativa

P<0.05 = Existe diferencia significativa

S = 0.4675

R-Sq = 85.00%

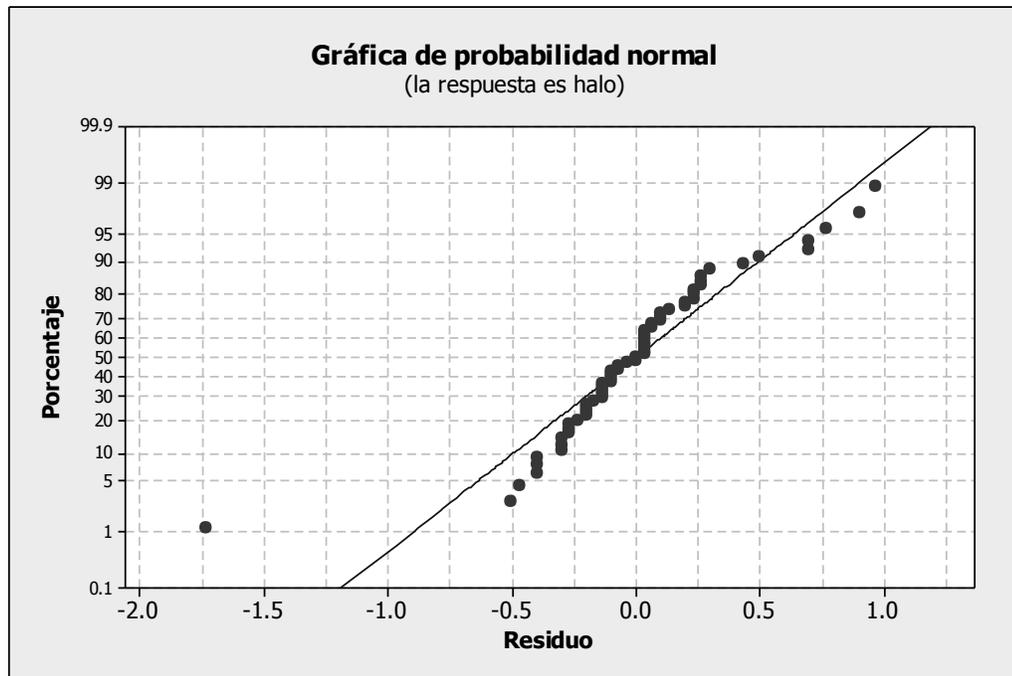


Figura 27. Gráfica de probabilidad normal de los residuos del compuesto **2a** contra *E. coli* ATCC 35218.

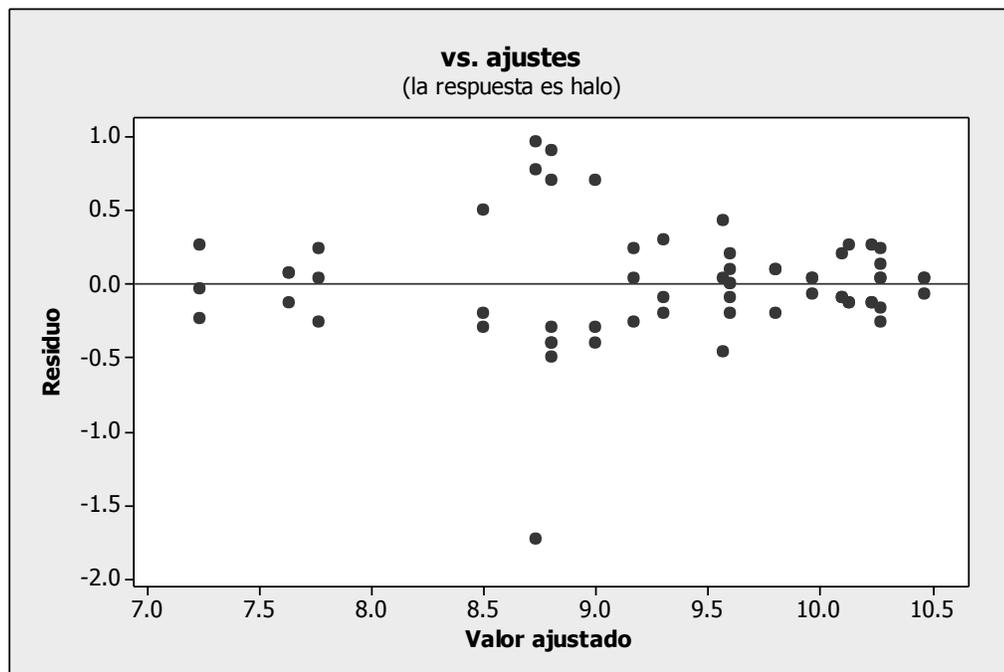


Figura 28. Gráfica de los residuos contra los valores ajustados del compuesto **2a** contra el microorganismo *E. coli* ATCC 35218.

**Tabla 16.** ANOVA de dos vías: Halo (mm) frente experimento, concentración del compuesto **2a** contra el microorganismo *S. epidermidis* ATCC 12228.

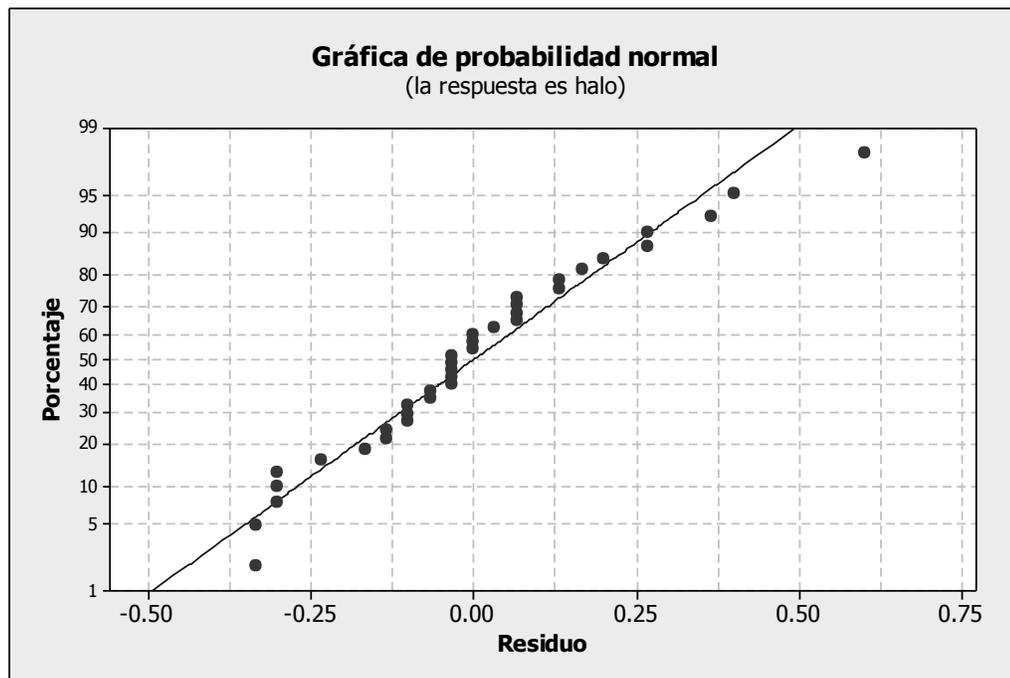
Efecto	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Experimento	2	0.1089	0.5444	0.83	0.448
Concentración	3	11.5275	3.84250	58.61	0.000
Error	24	1.5733	0.06556		
Total	35	13.6031			

$P > 0.05$  = No existe diferencia significativa

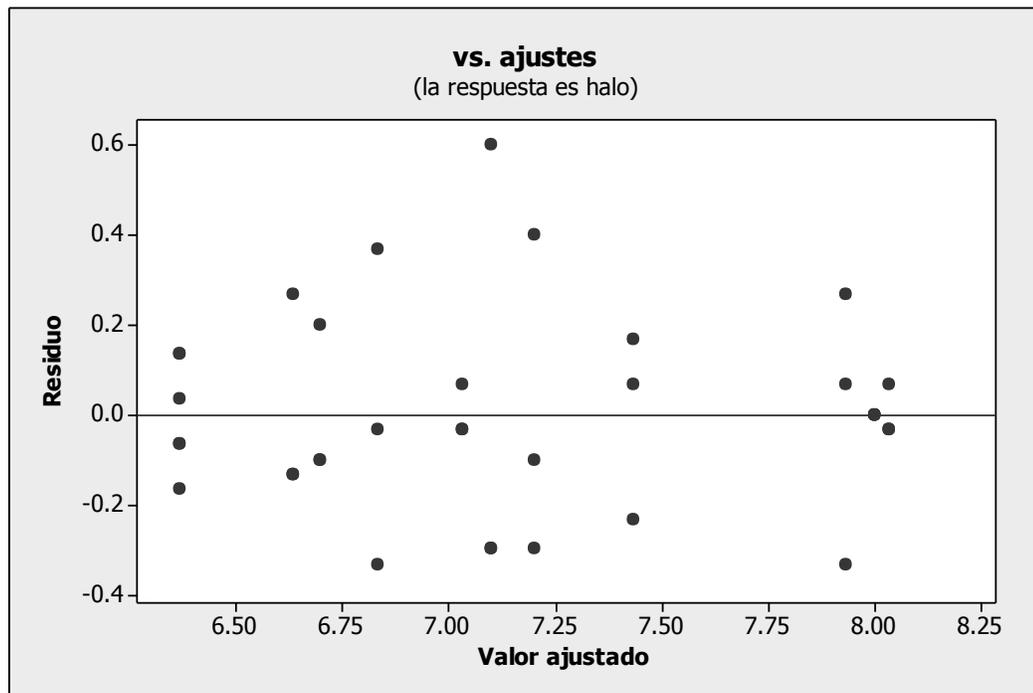
$P < 0.05$  = Existe diferencia significativa

S = 0.2560

R-Sq = 88.43%



**Figura 29.** Gráfica de probabilidad normal de los residuos del compuesto **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228.



**Figura 30** Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del compuesto **2a** contra el microorganismo *S. epidermidis* ATCC 12228.

**Tabla 17.** ANOVA mixto: Halo (mm) frente concentraciones del compuesto **2a** contra los microorganismos *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228.

Efecto	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Concentración	8	1842.26	230.28	76.53	0.000
Microorganismo	1	663.69	663.69	220.58	0.000
Error	152	457.35	3.01		
Total	161	2963.31			

P>0.05 = No existe diferencia significativa

P<0.05 = Existe diferencia significativa

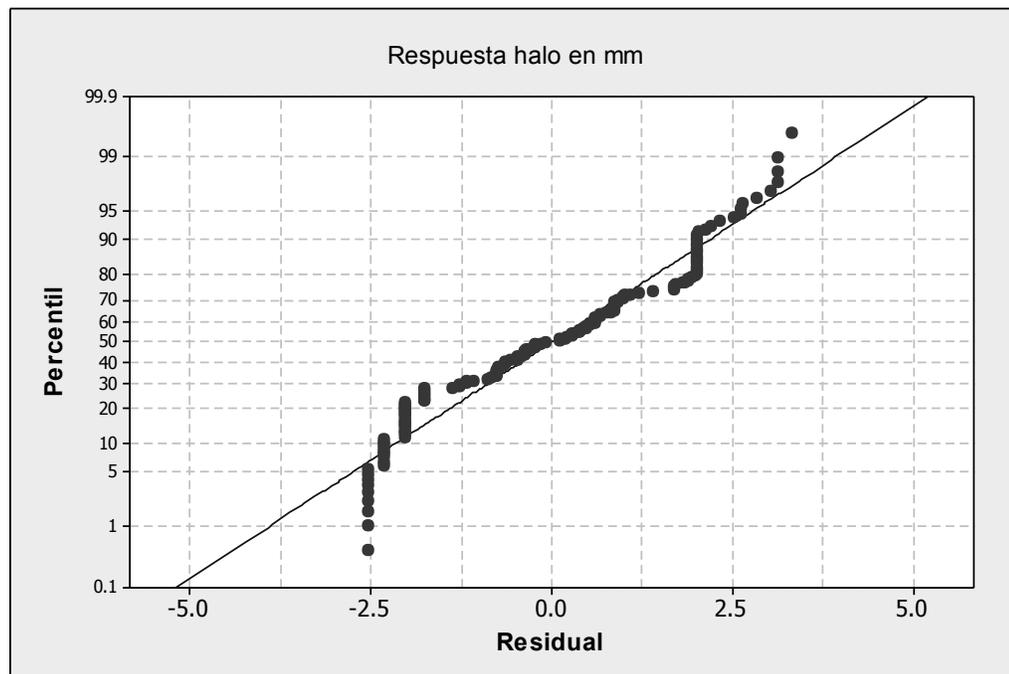
S = 1.73461

R-Sq = 84.57%

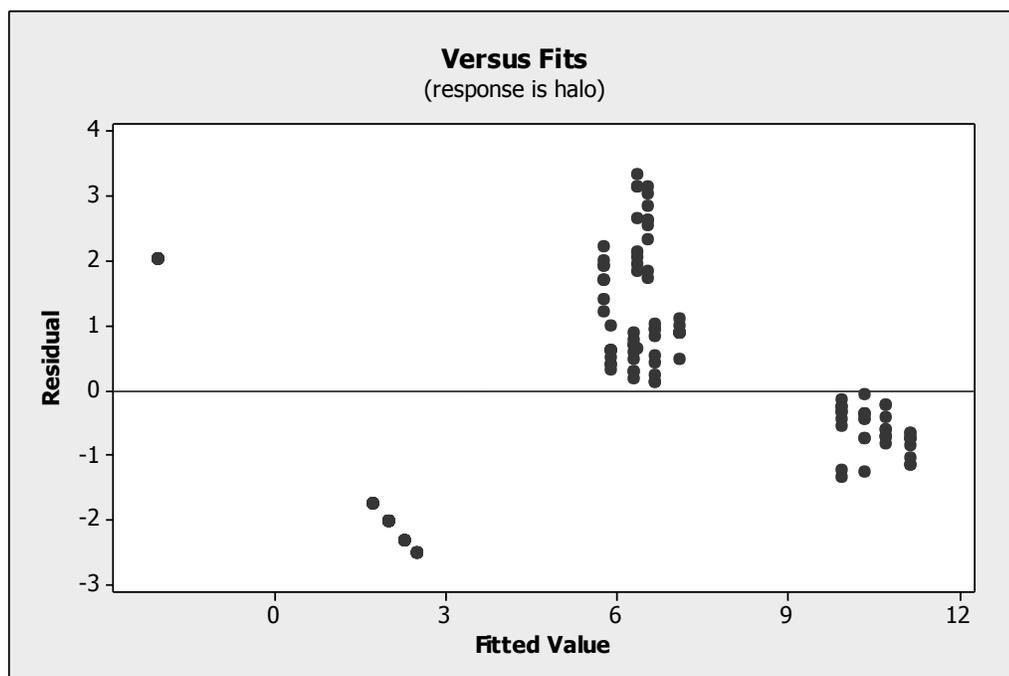
**Tabla 18.** Factores considerados para el análisis estadístico ANOVA mixto del compuesto **2a** contra los microorganismos *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228.

<b>Factor</b>	<b>Tipo</b>	<b>Niveles</b>	<b>Valores</b>
Concentración	Fijo	9	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9
Microorganismo	Aleatorio	2	1; 2

Para observar el comportamiento de los valores u observaciones obtenidas experimentalmente se graficó la probabilidad normal de los residuales, Figura 31. Esta gráfica nos muestra un comportamiento y acercamiento semejante a la recta de los valores obtenidos experimentalmente de los valores estimados, con lo que podemos decir que la dispersión de los datos experimentales de esta prueba es pequeña.



**Figura 31.** Gráfica de probabilidad normal de los residuales del compuesto **2a** contra *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228.



**Figura 32** Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del compuesto **2a** contra el microorganismo *E. coli* ATCC 35218 y *S. epidermidis* ATCC 12228.

**Tabla 19.** ANOVA mixto: Halo (mm) frente a los compuestos **1a**, **1f** y **2a** a diferentes concentraciones contra el microorganismo *S. epidermidis* ATCC 12228.

Efecto	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Compuesto	2	24.789	12.395	4.94	0.009
Concentración	3	238.372	79.457	31.67	0.000
Error	102	255.896	2.509		
Total	107	519.057			

P>0.05 = No existe diferencia significativa

P<0.05 = Existe diferencia significativa

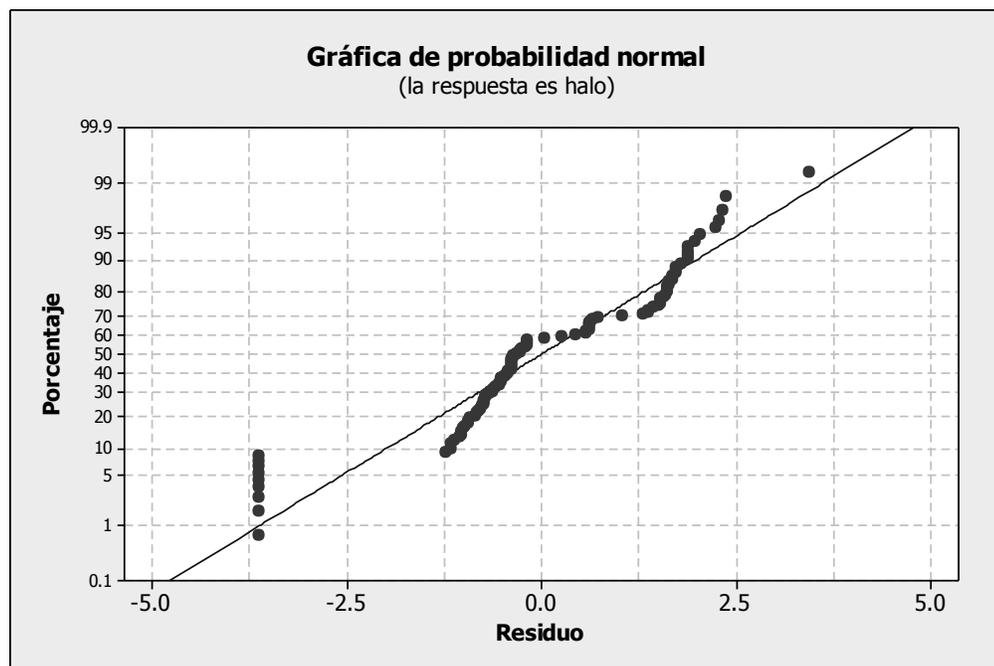
S = 1.58391

R-Sq = 50.70%

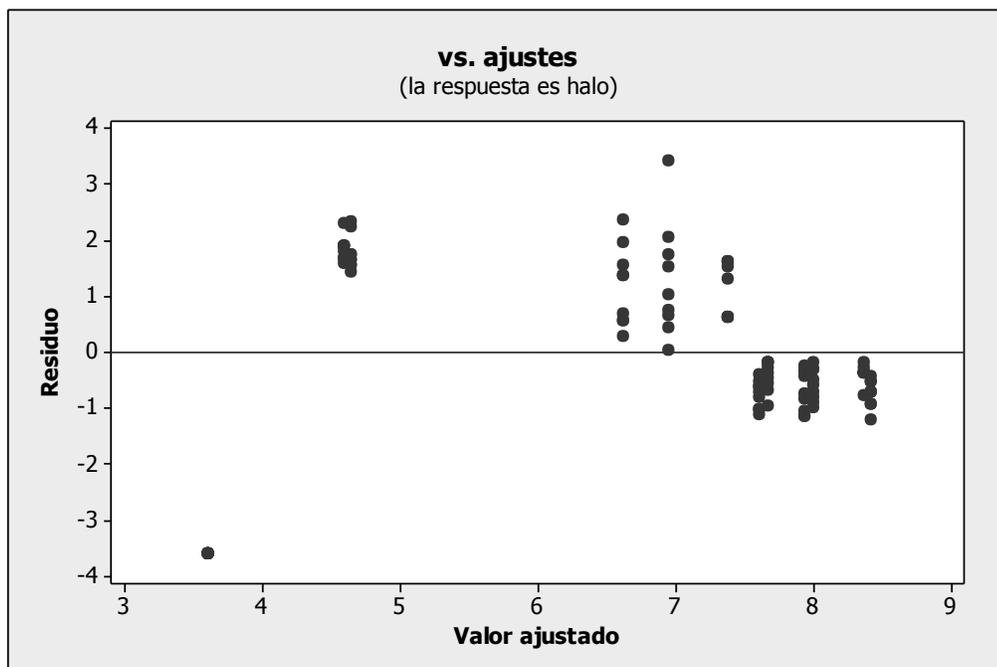
**Tabla 20.** Factores considerados para el análisis estadístico ANOVA mixto de los compuestos **1a**, **1f** y **2a** contra el microorganismo *S. epidermidis* ATCC 12228.

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Compuesto	Aleatorio	3	1; 2; 3
Concentración	Fijo	4	1; 2; 3; 4

La gráfica de probabilidad normal de los datos, Figura 33, nos indica que el error estimado es pequeño por lo tanto la cercanía de los valores reales con los estimados es máxima, al estar cercanos a la línea recta de la gráfica. La dispersión de los datos es reducida y los datos reales experimentales obtenidos tienen una distribución normal.



**Figura 33.** Gráfica de probabilidad normal de los residuales de los compuestos **1a**, **1f** y **2a** contra *S. epidermidis* ATCC 12228.



**Figura 34** Gráfica de los residuales contra los valores ajustados del efecto antibacteriano (halo de inhibición) frente a los compuestos **1a**, **1f** y **2a** a diferentes concentraciones contra el microorganismo *S. epidermidis* ATCC 12228.