

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud,
Coyoacán, C.P. 04960, CDMX. México.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura de Química Farmacéutica Biológica

Evaluación microbiológica de la actividad antibacteriana de un derivado sulfónico

PROYECTO GENERICO CORRESPONDIENTE

Evaluación de productos relacionados con la salud.

ETAPA

Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y/o microbiológico de productos relacionados

Asesores:

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda **No. Económico:** 8351 Vo.Bo. 

Dr. Javier Águila Rosas **No. Económico:** 43870 Vo.Bo. 

Alumno:

Castro Moro Valeria Yarentzi **Matrícula:** 2192037695

Lugar de realización del proyecto:

Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada, edificio N-106, UAM
Xochimilco

Fecha de inicio: 14 / 03 / 2023

Fecha de término: 14 / 09 / 2023

Índice

1. Introducción	3
2. Antecedentes.....	4
2.1. Enfermedades infecciosas a nivel global y en México	4
2.2. Cepas de mayor impacto clínico y epidemiológico en la actualidad	4
2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.2. <i>Salmonella</i>	5
2.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2.4. <i>Streptococcus pyogenes</i>	7
2.3. Evolución de los antibióticos y su aplicación en la práctica clínica	¡Error!
Marcador no definido.	
2.3.1. Terapia con antibióticos en la actualidad.....	9
2.4. Concentración mínima inhibitoria.....	9
3. Objetivos	10
3.1. Objetivo general	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. Metodología.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1. Materiales	11
4.1.1. Moléculas.....	11
4.1.2. Reactivos	12
4.1.3. Equipos	13
4.1.4. Cepas bacterianas ATCC empleadas.....	13
4.2. Métodos.....	13
4.2.1. Acondicionamiento de las cepas	13
4.2.2. Estandarización de las cepas.....	14
4.2.3. Prueba de sensibilidad por microdilución en placa de 96 pozos.....	¡Error!
Marcador no definido.	
5. Resultados y discusión	16
6. Conclusiones	19
7. Perspectivas.....	19
8. Referencias	20

1. Introducción

En México, las enfermedades infecciosas ocupan un lugar entre las principales causas de muerte en la población, de las cuales, las infecciones nosocomiales ocupan un mayor porcentaje.

Las infecciones causadas por bacterias, hongos y levaduras se han manifestado en la humanidad desde sus inicios y siempre van de la mano con la calidad de vida de la población, como el nivel socioeconómico, las condiciones sanitarias y el desarrollo del país de residencia.

En el siglo XX la mortalidad por infecciones era alta debido a la falta de atención sanitaria, sin embargo, con la llegada de los antibióticos, a mediados del siglo las cifras de mortalidad disminuyeron, haciendo ilusión a haber ganado la guerra contra las infecciones. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2050, todos los antibióticos que conocemos hoy en día serán ineficaces.

Desde la síntesis del Prontosil en 1932, las sulfonamidas fueron de los primeros antibióticos en ser desarrollados, abriendo las puertas al desarrollo de muchas generaciones de antibióticos que ayudaban a combatir eficazmente las infecciones que se generaban en aquellos años.

La mayoría de los primeros antibióticos que se desarrollaron fueron sustituidos rápidamente con la aparición de nuevas familias de antibióticos, sin embargo, debido al reciente auge de la resistencia a los antibióticos y tras la falta de alternativas terapéuticas que sean prometedoras nos lleva a reevaluar moléculas derivadas de las sulfonamidas.

En el presente trabajo, se utilizaron diversos derivados sulfónicos, cuya estructura sufrió previamente una modificación en los radicales unidos al grupo "sulfonilo", para evaluar la actividad antibiótica mediante pruebas microbiológicas de sensibilidad bacteriana.

2. Antecedentes

2.1. Enfermedades infecciosas a nivel global y en México

Las enfermedades infecciosas (EI) se pueden definir como la aparición y propagación de enfermedades causadas por agentes infecciosos con un patrón de transmisión que está ligado al lugar, tiempo, huéspedes y condiciones ambientales (Riley L. & Blanton R., 2018). Las EI han existido entre la población desde hace siglos, y varias de ellas pueden clasificarse en la actualidad como emergentes; las cuales pueden ser infecciones nuevas o con una característica anormal que provoque su alta incidencia, o no emergentes, las cuales son aquellas que resurgen por temporadas o están limitadas a una población (McArthur, D., 2019).

Hasta el año 2019, la OMS reportó que las infecciones de las vías respiratorias se mantuvieron dentro de las 10 principales causas de defunción a nivel global y las infecciones causantes de las enfermedades diarreicas fueron la quinta causa de defunción en países de bajos ingresos (OMS, 2020).

Por otro lado, en México, las principales causas de enfermedad en la población son las infecciones por bacterias. En 2022 se registraron 16 millones de infecciones respiratorias agudas, 3 millones de infecciones de vías urinarias y 3.2 millones de infecciones intestinales, posicionando a las EI como las principales enfermedades a nivel nacional (Secretaría de Salud, 2022).

2.2. Cepas de mayor impacto clínico y epidemiológico en la actualidad

Las cepas causantes de las infecciones más frecuentes en la población son las que denominamos de alto impacto clínico y epidemiológico. Sin embargo, son apenas un pequeño grupo de especies bacterianas las que causan estas enfermedades.

Actualmente, las cepas más reportadas pertenecientes a las Gram negativas son: *Escherichia coli*, la cual juega un papel muy importante por su mecanismo uropatogénico (Li, D. *et al.*, 2020) y *Salmonella entérica*, con su alta prevalencia en los alimentos de consumo humano (Hernández, *et al.*, 2023). Por otro lado, pertenecientes a las Gram positivas, está la cepa más importante, *Staphylococcus aureus*, la cual se encuentra con mucha frecuencia en infecciones nosocomiales

(Bonfante, *et al.*, 2023) y *Streptococcus pyogenes*, que representa una de las principales causas bacterianas de la faringoamigdalitis aguda en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas (Otero, Ares & Piñeiro, 2023). A continuación, se abordarán las características más relevantes de estas cepas. Las imágenes del crecimiento bacteriano corresponden a muestras obtenidas en este trabajo.

2.2.1. *Escherichia coli*

E. coli pertenece al grupo de bacilos Gram negativos, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Se la reconoce como parte del microbiota del cuerpo humano, sin embargo, cuando el paciente se encuentra inmunosuprimido o la cepa sobrepasa la barrera gastrointestinal, se convierte en un microorganismo patógeno y puede producir infecciones en superficies mucosas o su diseminación sistémica (Canata, M. G., *et al.*, 2016).



Figura 1. Crecimiento de *E. coli* en agar MacConkey.

La *E. coli* extraintestinal posee diversos factores de virulencia, de los que destacan las adhesinas uroepiteliales, su capacidad de formación de biofilm, la producción de β -lactamasas y la resistencia a múltiples generaciones de antibióticos como las cefalosporinas y los carbapenémicos (Kakoullis, *et al.*, 2021). Debido a sus características, es el agente etiológico responsable del 65% al 90% de los casos de infecciones del tracto urinario (ITU) (Ballesteros, *et al.*, 2023).

A nivel mundial, se reportaron 404.61 millones de casos (Yang, *et al.*, 2022) y en México, tan sólo en el periodo 2017-2019 se reportaron 3,809,727 casos de ITU cada año, por ende, en 2022 quedó registrada como la segunda causa de enfermedad a nivel nacional (Dirección general de Epidemiología, 2022).

2.2.2. *Salmonella*

La salmonella es un bacilo Gram negativo flagelado, anaerobio facultativo, de la familia *Enterobacteriaceae*; es un fermentador de lactosa, oxidasa positiva,

catalasa negativo y productor de sulfito de hidrógeno (Majak Gut, *et al.*, 2018). Consta de dos serotipos de importancia clínica en humanos, el serotipo *S. typhi* y *S. paratyphi*, responsables de la fiebre tifoidea (Contreras Soto, *et al.*, 2019).

La cepa es considerada de alto riesgo para la población debido a que es un patógeno transmitido por verduras, carnes y agua contaminada. Debido a su capacidad de transmisión es la cepa causante del 50% de las enfermedades transmitidas por alimentos en humanos (Berrocal, *et al.*, 2023).

En todo el mundo, se han registrado hasta 150 millones de casos de salmonella y hasta 60,000 muertes en 2018 (Healy & Bruce, 2018). En México, en el 2022, el número total de infecciones por Salmonella registradas en humanos alcanzó los 62,158 casos, de los cuales el 21.75% (13,527) correspondió a fiebre tifoidea, 9.65% (5,997) a paratifoidea, y el 68.6% a otras salmonelosis (Dirección General de Epidemiología, 2022).

2.2.3. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un patógeno Gram positivo en forma de cocos, inmóviles, siendo bacterias anaerobias facultativas y catalasa positivas. El medio de cultivo recomendado para el aislamiento de *S. aureus* es el agar sal y manitol, por su alto contenido en sales, donde se observa un virre de color del medio de rojo a amarillo y colonias blancas, pequeñas, elevadas y brillantes después de las 24 h de incubación (Cervantes, E., García, R. & Salazar, P.M., 2014), como se muestra en la figura 2 obtenida en este trabajo.

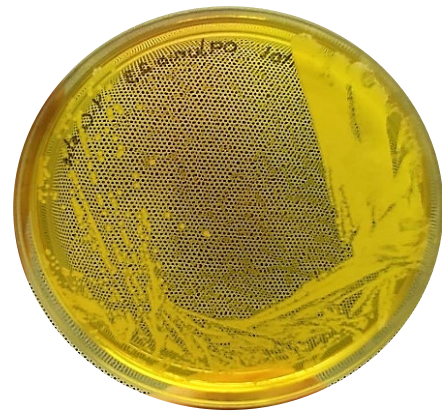


Figura 2. Crecimiento de *S. aureus* en agar Sal y Manitol.

S. aureus está presente tanto en infecciones comunitarias como hospitalarias, debido a su amplia diversidad de factores de virulencia y su capacidad de diseminación, causando desde infecciones leves del tejido blando y piel, hasta complicaciones asociadas al uso de catéteres y neumonías necrosantes. Se estima

que alrededor del 35% de la población humana se encuentra colonizado por *S. aureus* en piel y mucosas (Bonfante G., *et al.*, 2023).

El principal factor de virulencia es su capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos más comunes. Actualmente, *S. aureus* es resistente a los β -lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, clindamicina, trimetoprima-sulfametoxazol, vancomicina, daptomicina y linezolidina (Kakoullis, L., *et al.*, 2021).

En México, se estima que alrededor del 25% de las infecciones nosocomiales y comunitarias están dadas por *S. aureus* (Castañeda, M., *et al.*, 2018). Tan solo en 2022, un estudio reportó que aproximadamente el 11.2% de los pacientes positivos a COVID-19 presentaron por lo menos una neumonía bacteriana causada por *S. aureus* resistente a la meticilina, con más de un 40% de mortalidad (Ángeles, U., *et al.*, 2022).

2.2.4. *Streptococcus pyogenes*



Figura 3. Crecimiento de *S. pyogenes* en agar Sangre.

S. pyogenes es una bacteria anaerobia facultativa perteneciente a las Gram positivas, crece en forma de cadenas de cocos y no produce esporas (Díaz, I. & Díaz, M. 2021). Su diagnóstico se basa en el cultivo de la cepa en agar sangre, donde se caracteriza por formar colonias blancas o grisáceas y β -hemolíticas, como se muestra en la figura 3 (Kebede, *et al.*, 2021).

S. pyogenes es un patógeno capaz de infectar a 18 millones de personas y causar hasta medio millón de muertes cada año (Avire, N., Whitney, H. & Ross, K. 2021). Puede causar enfermedades invasivas y no invasivas como la faringitis, escarlatina, impétigo, fascitis necrotizante tipo II, síndrome de shock toxico estreptocócico, fiebre reumática aguda y glomerulonefritis postestreptocócica (Kebede, *et al.*, 2021).

La cepa puede transmitirse por medio de gotitas respiratorias o contacto con llagas en la piel de personas infectadas (Avire, N., Whitney, H. & Ross, K. 2021). Sin embargo, lo que representa la importancia clínica son sus factores de virulencia, los cuales se caracterizan por causar una respuesta inespecífica y desacertada del sistema inmune debido a que posee múltiples proteínas de membrana que deterioran la función de las células inmunitarias (Villalón *et al.*, 2021).

Una ventaja importante que tiene la terapéutica sobre *S. pyogenes* está relacionada con su falta de enzimas β -lactamasas, debido a esto, la cepa aun es susceptible a antibióticos como las penicilinas y las generaciones posteriores a estas. Sin embargo, en los últimos años, se ha reportado una ligera resistencia a múltiples antibióticos como clindamicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol y levofloxacino (Maletis G. *et al.*, 2023).

En México, la población más vulnerable a sufrir infecciones por *S. pyogenes* son los niños menores de 5 años con padecimientos como la faringitis, amigdalitis aguda y laringitis. Tan sólo en 2022, estos padecimientos fueron la causa de casi el 3% de defunciones en niños menores de 5 años (INEGI, 2022).

2.3. Evolución de los antibióticos y su aplicación en la práctica clínica

Desde 1928 con el descubrimiento de la penicilina, la era de los antibióticos avanzó gradualmente, llegando a su punto máximo en la década de los años 50. No obstante, la evolución en el desarrollo de nuevos antibióticos se ha visto afectada debido a la resistencia que presentan diversos microorganismos a éstos (Hutchings, Truman & Wilkinson, 2019).

En México, desde 1942, tras la llegada de la penicilina, las muertes por enfermedades infecciosas disminuyeron un 13% (Aguilar, 2015). Una década después, la llegada de la estreptomomicina fue de gran auge para el tratamiento contra las infecciones por Gram negativas, debido a su eficacia para tratar la tuberculosis, pues era la séptima causa de muerte en esos años (Mayo Clinic, 2015).

Las causas del aumento de la resistencia antibiótica surgieron desde la evolución natural de las bacterias, hasta el uso indiscriminado de antibióticos tanto

por pacientes como por prescripción médica innecesaria (Isaías, J., *et al.*, 2018), debido a esto en 2018 se crea la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos (DOF, 2018), siguiendo el Plan de acción mundial promovido desde 2015 por la OMS.

2.3.1. Terapia con antibióticos en la actualidad

Las sulfonamidas fueron los primeros fármacos en introducirse a la terapia con antibióticos. Desde la introducción del Prontosil, las sulfonamidas han ido evolucionando estructuralmente, desde sus primeros derivados como el sulfatiazol, la sulfadiazina y la sulfametazina, hasta la combinación de los mismos derivados, con el objetivo de tratar eficazmente infecciones urinarias, gastrointestinales, vaginales y hasta la cicatrización de heridas y quemaduras (Swain, 2020).

En la actualidad, las sulfonamidas se encuentran en combinación con otros fármacos, por ejemplo, en combinación con trimetoprima la cual es comúnmente prescrita para tratar infecciones del tracto urinario, así como la terapia combinada con cotrimoxazol, la cual se utiliza para tratar enfermedades infecciosas como bronquitis, diarrea del viajero e infecciones por *S. aureus* multirresistentes (Griffith, E., *et al.*, 2018).

Por lo tanto, en los últimos años, por la alta resistencia, la tendencia del uso de los antibióticos incluyendo a las sulfonamidas, es a partir de terapias combinadas, ya que han resultado efectivas para el reducir rápidamente la infección por bacterias; por ejemplo, se han utilizado tratamientos combinados entre diferentes grupos de antibióticos, como han sido los siguientes casos: ceftazidima/avibactam, meropenem/vaborbactam, ceftolozano/tazobactam, plazomicina, dalbavancina, tedizolid, ceftarolina, ceftobiprol y eravaciclina (Bassetti, *et al.*, 2019; Escola, *et al.*, 2019).

2.4. Concentración mínima inhibitoria como valor para la determinación de sensibilidad bacteriana

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es la concentración más baja expresada en $\mu\text{g/mL}$ de un antibiótico que inhibe el crecimiento de las bacterias. Cada antibiótico tiene un valor de CMI, el cual define el grado de sensibilidad o

resistencia que tiene cada bacteria al antibiótico expuesto (Kowalska, B., & Dudek, R., 2021).

La importancia de la determinación de la CMI está relacionada con las terapias fallidas con antibióticos, debido a que, en la mayoría de las prescripciones médicas, la elección y las dosis de antibiótico no es la adecuada, lo cual provoca un aumento en la resistencia. Por lo tanto, una determinación de CMI mediante pruebas microbiológicas son una base fundamental para la elección de antibióticos que aumenten la respuesta positiva del tratamiento (Kowalska, B., & Dudek, R., 2021).

Existen métodos cuantitativos de pruebas de sensibilidad para conocer los antibióticos más eficaces frente a alguna infección por bacterias. El método de la microdilución en placa de 96 pocillos consiste en someter a la cepa de interés a diferentes concentraciones de antibiótico en caldo de infusión cerebro corazón (BHI). Los resultados de esta prueba son obtenidos por medio de un indicador redox denominada resazurina, la cual nos permite observar la viabilidad celular mediante un vire de color, en este caso de azul a rosa, incluso llegando al incoloro (EUCAST, 2020).

En el presente trabajo se utiliza el método de microdilución, debido a su ventaja sobre la rapidez con la que se obtienen resultados, mismos que resultan ser más confiables porque el método nos permite triplicar muestras simultáneamente.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

- Evaluar la sensibilidad bacteriana de un derivado sulfónico, mediante la aplicación y estandarización el método de micro dilución para determinar la concentración mínima inhibitoria.

3.2. Objetivos específicos

- Adaptar y estandarizar procedimientos de sensibilidad microbiológica mediante investigación bibliográfica para evaluar el derivado sulfónico

- Realizar pruebas de viabilidad de cepas bacterianas conservadas a -80 °C mediante activación en cultivos microbiológicos específicos para ser empleadas posteriormente en pruebas de inhibición *in vitro*
- Determinar la concentración mínima inhibitoria *in vitro*, mediante el método de micro dilución a diferentes cepas bacterianas, para comprobar la sensibilidad bacteriana de los derivados sulfónicos.

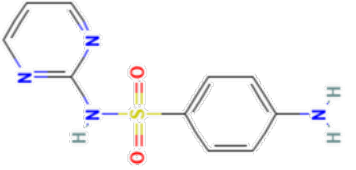
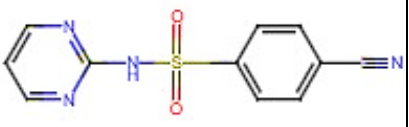
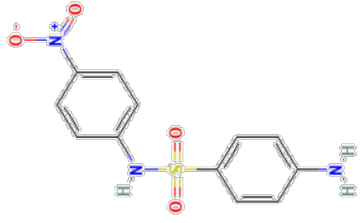
4. Metodología

4.1. Materiales

4.1.1. Moléculas empleadas

Para la determinación de la actividad antibacteriana se utilizaron 3 derivados sulfónicos, las cuales se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los 3 derivados sulfónicos utilizados (recuperado y modificado del *National Center for Biotechnology Information, 2023*).

Estructura química	Propiedades fisicoquímicas	No.
	<p>Nombre IUPAC: 4-amino- N -pirimidin-2-ilbencenosulfonamida</p> <p>Fórmula: C₁₀H₁₀N₄O₂S</p> <p>Peso molecular: 250,28 g/mol</p> <p>Fórmula SMILES: C1=CN=C(N=C1)NS(=O)(=O)C2=CC=C(C=C2)N</p> <p>Descripción física: Polvo blanco</p> <p>Solubilidad: Muy soluble en NaOH 0.02N</p>	1
	<p>Fórmula: C₁₁H₈N₄O₂S</p> <p>Peso molecular: 260,27 g/mol</p> <p>Fórmula SMILES: O=S(=O)(NC1=NC=CC=N1)C1=CC=C(C=C1)C#N</p> <p>Descripción física: Solido, color amarillo caramelo.</p> <p>Solubilidad: Soluble en NaOH 0.02N</p>	2
	<p>Nombre IUPAC: 4-amino-N-(4-nitrofenil) benceno sulfonamida</p> <p>Fórmula: C₁₂H₁₁N₃O₄S</p> <p>Peso molecular: 293,30 g/mol</p> <p>Fórmula SMILES: C1=CC(=CC=C1N)S(=O)(=O)NC2=CC=C(C=C2)[N+](=O)[O-]</p> <p>Descripción física: Polvo blanco</p> <p>Solubilidad: Muy soluble en NaOH 0.02N</p>	3

4.1.2. Reactivos

Los disolventes y reactivos fueron de grado reactivo analítico (RA). Se empleó agua destilada para la preparación de los medios estériles.

En la tabla 2 se enlistan todos los reactivos utilizados para la solubilidad de moléculas, el reactivo indicador de viabilidad celular y los medios líquidos y sólidos utilizados para cultivar las cepas de trabajo.

Tabla 2. Reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto.

Reactivos	Medios de cultivo
<ul style="list-style-type: none">Solución stock de Alamar Blue 25mMSolución salina isotónica 0.9%NaOH 0.02NHPMC 3%Escala <i>McFarland</i>	<ul style="list-style-type: none">Medio BHIAgar MacConkeyAgar Salmonella ShigelaAgar Sal y ManitolAgar Sangre

Las soluciones se prepararon como a continuación se describe:

- Solución stock de Alamar Blue 25 mM

La solución stock se preparó en un matraz volumétrico, agregando 40 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y disolviendo 286.488 mg de reactivo de Alamar Blue (Sigma Aldrich) en agitación constante. Se aforó a 50 mL y se esterilizó por filtro de 0.22 μm para posteriormente almacenar en tubos estériles y refrigerar.

- Escala *McFarland*

Para la obtención de la escala *McFarland* se preparó una solución de ácido sulfúrico a 0.36 M y una solución de cloruro de bario dihidratado a 0.048 M. En tubos de 10 mL se agregó 80% del volumen final de H_2SO_4 y mediante una micropipeta se agregó gota a gota el volumen requerido de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como se especifica en la tabla 3 y se agitó y se vertió el volumen faltante. Los tubos se sellaron con papel Parafilm® M y se almacenaron en refrigeración. Los tubos se verificaron con estándar en UV-vis.

Tabla 3. Escala Mc Farland, estándares preparados con su equivalente en UFC/mL.

No.	BaCl ₂ 0.048M (mL)	H ₂ SO ₄ 0.36M (mL)	V _r (mL)	UFC/mL (x10 ⁸)
0.5	0.05	9.95	10	1.5
1.0	0.1	9.9	10	3
1.5	0.15	9.85	10	4.5
2.0	0.2	9.8	10	6
3.0	0.3	9.7	10	9

- Medio de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon y esterilizaron de acuerdo con las instrucciones marcadas en el empaque del fabricante.

4.1.3. Equipos

- Campana de flujo laminar
- Lector o espectrofotómetro de placas Agilent Biotek® Epoch 2 con número de serie 1501254
- Lector de placas ThermoFisher® Scientific

4.1.4. Cepas bacterianas ATCC empleadas

- *Escherichia coli*
- *Salmonella spp*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*

4.2. Métodos estandarizados

4.2.1. Acondicionamiento de las cepas

Las cepas utilizadas se conservaron en crioprotector estéril de glicerol al 10% en tubos Eppendorf® y se almacenaron 4 copias de cada una en congelación. Se comprobó la viabilidad después del congelamiento.

Para las pruebas microbiológicas, cada cepa se sembró en agares selectivos según las necesidades metabólicas de cada una:

- *Escherichia coli* Agar MacConkey
- *Salmonella* Agar Salmonella-Shigela

- *Staphylococcus aureus* Agar Sal y Manitol
- *Streptococcus pyogenes* Agar Sangre

Una vez activada la cepa en cajas Petri, fueron selladas con Parafilm® y se almacenaron en refrigeración a 4°C.

4.2.2. Estandarización de las cepas

El método de microdilución en placa de 96 pozos planteado requería un tiempo máximo de 5 horas para obtener los resultados deseados, debido a eso, se determinó la concentración a la que cada cepa generaba una reacción positiva con el reactivo de Alamar Blue (Sigma Aldrich).

La tabla 5 representa el patrón que se utilizó para estandarizar la concentración de cada cepa que se utilizó en el experimento.

Tabla 5. Estandarización de la concentración óptima de crecimiento de cada cepa en placa de 96 pozos. Cada concentración se empleó por duplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B	0.5 McFarland (5µL)		0.5 McFarland (10µL)		1.0 McFarland (5µL)		1.0 McFarland (10µL)		1.5 McFarland (5µL)		Control -
C	0.5 McFarland (5µL)		0.5 McFarland (10µL)		1.0 McFarland (5µL)		1.0 McFarland (10µL)		1.5 McFarland (5µL)		Control -
D	0.5 McFarland (5µL)		0.5 McFarland (10µL)		1.0 McFarland (5µL)		1.0 McFarland (10µL)		1.5 McFarland (5µL)		Control -
E	0.5 McFarland (5µL)		0.5 McFarland (10µL)		1.0 McFarland (5µL)		1.0 McFarland (10µL)		1.5 McFarland (5µL)		Control -
F	0.5 McFarland (5µL)		0.5 McFarland (10µL)		1.0 McFarland (5µL)		1.0 McFarland (10µL)		1.5 McFarland (5µL)		Control -
G	0.5 McFarland (5µL)		0.5 McFarland (10µL)		1.0 McFarland (5µL)		1.0 McFarland (10µL)		1.5 McFarland (5µL)		Control -
H											

La estandarización de la alícuota adecuada de células viables de bacteria, se determinó al obtener la concentración a la cual en contacto con la resazurina se

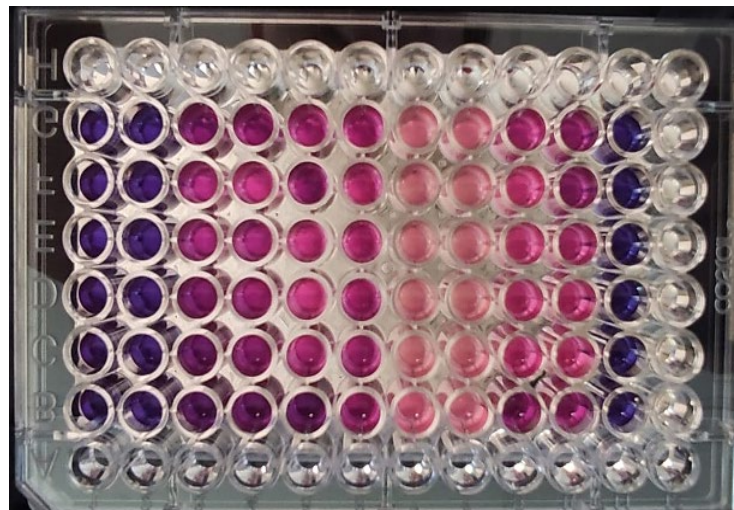


Figura 4. Estandarización de la concentración óptima de crecimiento de *S. pyogenes*.

mantuvo una coloración azul intenso estable antes de virar a un rosa en sus diferentes tonalidades, en un tiempo propuesto adecuado para el experimento, que en este caso fue de 4 a 5 horas. En la figura 4 se puede apreciar una correcta estandarización de la concentración de la cepa durante el tiempo establecido, debido a que en el carril 1 y 2 se mantiene la coloración azul similar al carril 11 que pertenece al control negativo, que contiene solamente medio y resazurina. Mientras que los carriles 2-3, 4-5, 6-7 y 8-9 son diferentes concentraciones en la escala de Mc Farland y de microlitros empleados en cada pozo con medio y resazurina. Los cuales se observa una coloración rosa que no permite determinar adecuadamente la concentración mínima inhibitoria (CMI).

4.2.3. Prueba de sensibilidad bacteriana por micro dilución en placa

La prueba de sensibilidad bacteriana por micro dilución se realizó mediante un barrido amplio de concentraciones que abarcaron de 20 a 500 µg/mL para hallar la CMI en cada una de las moléculas y bacterias. Las concentraciones analizadas se realizaron por triplicado para aumentar el nivel de confianza en los resultados. Para cada molécula se elaboró una concentración stock de 2000 µg/mL (4 mg/2 mL) en el disolvente adecuado y posteriormente se tomaron alícuotas necesarias para obtener las diluciones de las concentraciones evaluadas en cada pozo, de acuerdo como se muestra en la tabla 6 en carril 1-3, 4-5 y 7-9, además del control positivo en carril 10 y control negativo en carril 11.

Tabla 6. Diseño del experimento. La columna blanca representa la concentración a la que se encuentra cada triplicado. Todos los volúmenes están expresados en µL.

	1,2,3					4,5,6					7,8,9					10			11		12
	µg/mL	Alamar	Medio	Molécula	Cepa	µg/mL	Alamar	Medio	Molécula	Cepa	µg/mL	Alamar	Medio	Molécula	Cepa	Alamar	Medio	Cepa	Alamar	Medio	
A	sol salina																				
B	70	70	118.0	7.0	5	230	70	102.0	23.0	5	500	70	75.0	50.0	5	70	125	5	70	130	sol salina
C	60	70	119.0	6.0	5	210	70	104.0	21.0	5	450	70	80.0	45.0	5	70	125	5	70	130	
D	50	70	120.0	5.0	5	190	70	106.0	19.0	5	400	70	85.0	40.0	5	70	125	5	70	130	
E	40	70	121.0	4.0	5	160	70	109.0	16.0	5	350	70	90.0	35.0	5	70	125	5	70	130	
F	30	70	122.0	3.0	5	130	70	112.0	13.0	5	300	70	95.0	30.0	5	70	125	5	70	130	
G	20	70	123.0	2.0	5	100	70	115.0	10.0	5	250	70	100.0	25.0	5	70	125	5	70	130	
H	sol salina																				

5. Resultados y discusión

El porcentaje de inhibición de cada concentración mediante el método por micro dilución en placa se obtuvo a partir de las absorbancias brindadas por el lector de placa de UV-Vis a una longitud de 570 nm, con un análisis cada 30 min durante 4-5 horas. Estos valores se sustituyen en la fórmula 1 y una vez obtenidos los porcentajes de cada pozo, se calculó un promedio de porcentaje de inhibición final de cada concentración evaluada por triplicado.

Formula 1:

$$\% \text{ de inhibición} = 1 * \frac{Abs_{\text{pozo prueba}}}{Abs_{\text{Control}}} * 100 \quad [1]$$

Por consiguiente, en las tablas 4, 5 y 6 se presentan los resultados de CMI obtenidos con cada molécula de trabajo, así como el porcentaje de inhibición más alto obtenido en cada experimento.

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria de Sulfadiazina (No. 1) frente las cepas de prueba.

Cepa bacteriana	Tiempo de procesamiento (h)	CMI [$\mu\text{g/mL}$]	Sensibilidad en % al CMI
<i>Escherichia coli</i>	4.5 - 5	60	99.36
<i>Salmonella</i>	4 – 4.5	230	92.27
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.5	20	95.68
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4.5	40	94.58

Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria del derivado sulfónico No. 2

Cepa bacteriana	Tiempo de procesamiento (h)	CMI [$\mu\text{g/mL}$]	Sensibilidad en % al CMI
<i>Escherichia coli</i>	4.5 - 5	R	-
<i>Salmonella</i>	4 – 4.5	210	96.27
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.5	R	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4.5	350	95.39

R= No hay inhibición en concentraciones evaluadas

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria del derivado sulfónico No. 3

Cepa bacteriana	Tiempo de procesamiento (h)	CMI [$\mu\text{g/mL}$]	Sensibilidad en % al CMI
<i>Escherichia coli</i>	4.5 - 5	50	97.01
<i>Salmonella</i>	4 - 4.5	50	94.91
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.5	R	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4.5	210	96.96

R= No hay inhibición a concentraciones evaluadas

Como se puede observar, la sulfadiazina y el derivado sulfónico No. 3, mostraron una capacidad de inhibición mejor que el derivado No.2, el cual no presenta sensibilidad bacteriana en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Este último, tampoco fue inhibido por el derivado sulfónico 3.

En la figura 5, se observa la inhibición de la sulfadiazina sobre la cepa de *S. pyogenes*, mientras que en la figura 6, se muestra una imagen representativa de la inhibición que produce el derivado sulfónico No.3 en la cepa *E. coli*, el cual se relaciona al valor de concentración mostrada por la sulfadiazina para la misma cepa.

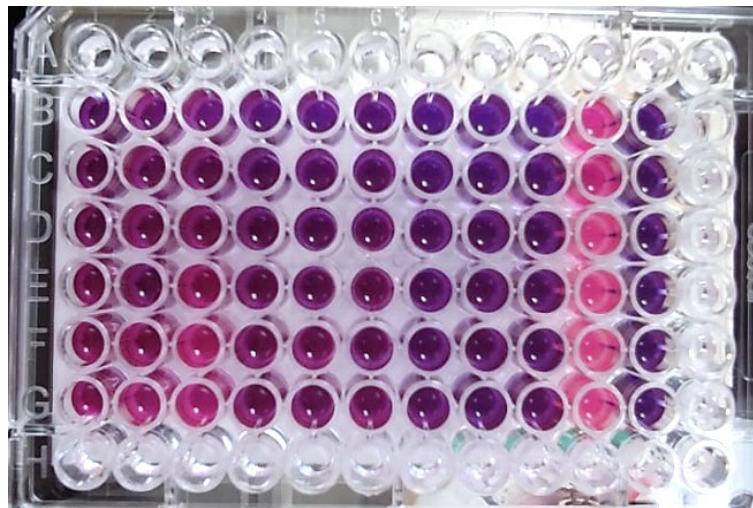


Figura 5. Determinación del CMI de la sulfadiazina sobre *S. pyogenes*.

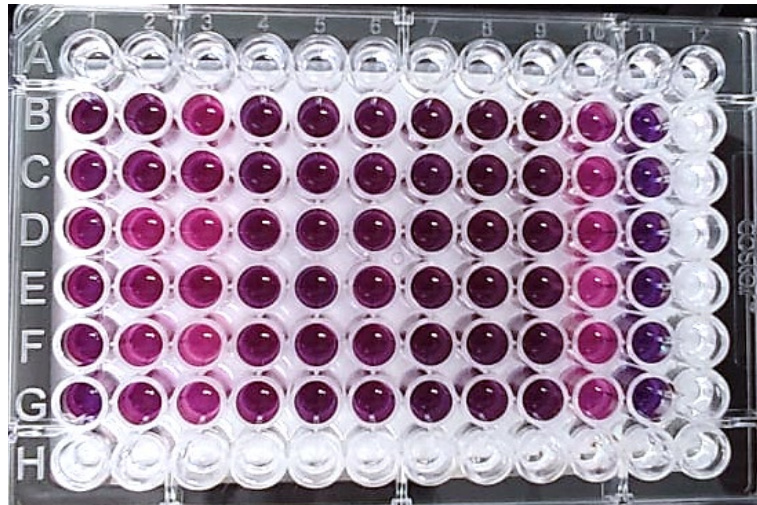
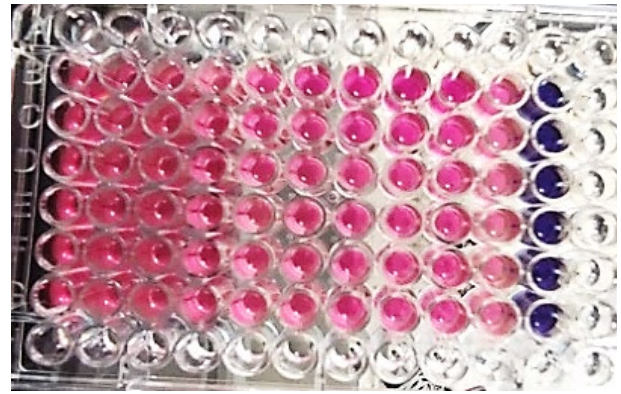
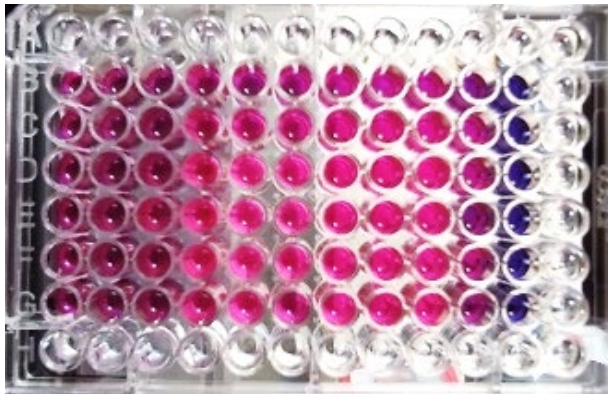


Figura 6. Determinación del CMI del derivado sulfónico No.3 sobre *E. coli*.

Como se puede observar, la cepa de *S. aureus* presenta resistencia a las moléculas de prueba 2 y 3. Así mismo, el derivado sulfonamida No.2 presenta baja inhibición bacteriana frente a las cepas *Salmonella* y *Streptococcus pyogenes* y nula inhibición bacteriana frente a cepas como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como se muestra en la figura 7, que es representado además por un resultado visual por el cambio de coloración.



Figuras 7. Análisis cualitativo de la resistencia bacteriana del derivado sulfónico 2. En la imagen derecha, se observa la nula inhibición a concentraciones evaluadas en *Escherichia coli* y a la izquierda frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*

6. Conclusiones

Los datos de la evaluación de sensibilidad bacteriana de los derivados sulfónicos 2 y 3 comparados con un fármaco control como la sulfadiazina, demuestran que presentan actividad de inhibición frente a las cepas evaluadas. En especial el derivado 3 fue una molécula adecuada para inhibir bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas de acuerdo con su CMI, demostrando que los grupos funcionales que lo constituyen no afectan y mantienen la actividad biológica, mientras que el derivado 2, presenta inhibición solo a dos cepas evaluadas, pero a través de emplear una alta CMI.

Así mismo, con este estudio se constata que existen cepas que, a pesar de modificar la molécula, son capaces de inactivar el efecto inhibitorio y presentar una resistencia bacteriana.

El proyecto también nos presenta una estandarización del método de micro dilución en placa, el cual se presenta como un método sencillo y rápido para la determinación de las CMI. Por lo que se proponen y presentan estrategias de experimentación que facilitaron el proceso de la evaluación de los derivados sulfónicos y las cepas propuestas.

7. Perspectivas

A partir de la discusión y resultados presentados, las perspectivas de trabajos futuros sobre esta investigación se orientan en continuar con las modificaciones estructurales de las moléculas con un enlace sulfónico y sus respectivas pruebas microbiológicas, mediante la realización de un screening por estudios computacionales (*in silico*) que estén orientados por los grupos funcionales y forma estructural del derivado 3. Para proponer otros derivados estructurales que presenten actividad biológica, y posteriormente se evalúen mediante el método estandarizado de micro dilución en placa que se presenta en esta investigación

Y así reposicionar al mercado los derivados de las sulfonamidas como alternativa a la resistencia bacteriana y posteriormente proponer sistemas de

liberación modificada que alarguen el tiempo o bajen la concentración para que las bacterias de relevancia clínica no presenten resistencia.

REFERENCIAS

1. Aguilar, R. (2015). Los albores de la penicilina en México. *Tzintzun. Revista de Estudios Históricos*. (62). 249–270.
2. Ángeles, G. U., Hernández H. J., Procopio V. J., Alvarado, Y. J. E., & González. C. I. (2022). Etiología de neumonías bacterianas en pacientes con COVID-19. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 60(6), 632–639.
3. Avire, N. J., Whiley, H., Ross, K. (2021). Una revisión de *Streptococcus pyogenes*: factores de riesgo, prevención y control de la salud pública. *Patógenos*. 10(2), 248.
4. Ballesteros, M. G., Mendez, P., Barrios, E., Arenas, M., Enciso, Y., Sepúlveda, C., Bolado, E. & Valencia, D. (2023). Uropathogenic *Escherichia coli* in Mexico, an Overview of Virulence and Resistance Determinants: Systematic Review and Meta-analysis. *Archives of Medical Research*, 54(3), 247-260.
5. Bassetti, M., Peghin, M., Vena, A., & Giacobbè, D. R. (2019). Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in Medicine*, 6(74).
6. Berrocal, M. T., Ruiz D., Gutiérrez, M. & Olivares, J. (2023). Comportamiento epidemiológico de *Salmonella* sp. en alimentos de origen vegetal por región intercontinental. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 14(1), 109-121.
7. Canata, M. G., Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F., Céspedes, A., Espínola, C., Canese, J., & Guillén, R. (2016). Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. *Pediatría (Asunción)*; 43(1), 13-17.
8. Castañeda, M. P., Hernández J. D., Muñoz L. M., Soto R. L. (2018). Frecuencia de infecciones por *S. aureus* en pacientes hospitalizados en un hospital privado de tercer nivel de la Ciudad de México. *Revista Médica MD*. 9(4), 317-321.
9. Cervantes, E., García, R. & Salazar, P.M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*. 61 (1), 28-40.
10. Contreras Soto, M. B., Medrano Félix, J. A., Ibarra Rodríguez, J. R., Martínez Urtaza, J., Chaidez, Q. C., Castro del Campo, N. (2019). The last 50 years of *Salmonella* in Mexico: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista Bio Ciencias* 6(nesp): Inocuidad Alimentaria, e540.
11. Díaz, L. I. & Díaz, C. M. (2021). Síndrome de choque tóxico por *Streptococcus pyogenes* en un hospital de la Ciudad de México. *Medicina crítica (Colegio Mexicano de Medicina Crítica)*. 33(6).

12. Dirección General de Epidemiología. (2022). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Boletín epidemiológico*. 40(48).
13. Diario Oficial de la Federación. (2018). Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos.
14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2020). Clinical Breakpoint Tables v. 10.0. Publicado en línea en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf
15. Escolà, L., Los Arcos, I., & Almirante, B. (2020). Nuevos antibióticos para el tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes. *Medicina Clínica*. 154(9). 351-357.
16. Griffith, E. C., Wallace, M. J., Wu, Y., Kumar, G., Gajewski, S., Jackson, P., White, S. W. (2018). The structural and functional basis for recurring sulfa drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* dihydropteroate synthase. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1369
17. Healy, J. M. and Bruce, B. B. (2018). Salmonellosis Nontyphoidal. In Travel-related infectious diseases. Ed. National center for emerging and zoonotic infectious diseases (NCEZID), *Center for disease control and prevention (CDC)*.
18. Hutchings, M., Truman, A. y Wilkinson, B. (2019). Antibióticos: pasado, presente y futuro. Opinión actual en microbiología, 51, 72–80.
19. NEGI. 2022. Estadísticas de defunciones registradas en 2022. Comunicado de prensa.
20. Isaías, J.O., Salinas E., Rodríguez F.L., Díaz E. (2018). Prescripción racional de antibióticos: una conducta urgente. *Med Int Méx*. 34(5):762-770.
21. Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P., & Panos, G. (2021). Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. *Antibiotics*, 10(4), 415.
22. Kebede, D., Admas, A. & Mekonnen, D. (2021). Perfiles de prevalencia y susceptibilidad a los antibióticos de *Streptococcus pyogenes* entre pacientes pediátricos con faringitis aguda en el Hospital Integral Especializado Felege Hiwot, noroeste de Etiopía. *BMC Microbiology*. 21, 135.
23. Kowalska, B., & Dudek, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10(2), 165.
24. Meletis, G., Soulopoulos, A. L., Floropoulou, N., Tychala, A., Kagkalou, G., Vasilaki, o., Mantzana, P., Skoura, L., Protonotariou E. (2023). Antimicrobial resistance rates of *Streptococcus pyogenes* in a Greek tertiary care hospital: 6-year data and literature review. *New Microbiologica*, 46(1), 37-42.
25. Majak Gut. A., Vasiljevic T., Yeager T. & Donkor O. (2018). Salmonella infection – prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology*; 164, 1327–1344.

26. McArthur, D.B. (2019). Emerging Infectious Diseases. *Nursing Clinics of North America*; 54(2), 297-311.
27. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 311763, 4-amino-N-(4-nitrophenyl) benzene sulfonamide. Retrieved July 13, 2023.
28. Organización Mundial de la Salud. (2016). Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. Ginebra, 22 pp.
29. Organización Mundial de la Salud. (2020). Estimaciones de salud mundial 2020: muertes por causa, edad, sexo, país y región, 2000-2019. Ginebra.
30. Riley, L.W., Blanton, R.E. (2018). Advances in molecular epidemiology of infectious diseases: definitions, approaches, and scope of the field. *Microbiology Spectrum*; 6(6), 01-012.
31. Dirección General de Epidemiología. (2022). Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad en los Estados Unidos Mexicanos 2022, población general. *Secretaría de Salud*
32. Swain, S. S., Paidesetty, S. K., & Padhy, R. N. (2020). Phytochemical conjugation as a potential semisynthetic approach toward reactive and reuse of obsolete sulfonamides against pathogenic bacteria. *Drug Development Research*, 82(2), 149–166.
33. Villalón, P., Sáez-Nieto, J. A., Rubio-López, V., Medina-Pascual, M. J., Garrido, N., Carrasco, G., Valdezate, S. & Pino, S. (2021). Invasive Streptococcus pyogenes disease in Spain: a microbiological and epidemiological study covering the period 2007–2019. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 40, 2295-2303.
34. Yang X., Chen H., Zheng Y., Qu S., Wang H. & Yi F. (2022). Disease burden and long-term trends of urinary tract infections: A worldwide report. *Frontiers in Public Health*, 10.