



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Determinación de la actividad antimicrobiana de compuestos derivados de ácido carbámico (LQM 996, LQM 9012) y de un complejo de coordinación de Cobre II derivado de fenol (LQM 406) contra cepas clínicas de *Candida albicans*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

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

**ERANDENY MONSERRAT MENDOZA MEJÍA**

**ASESOR: Dr. Enrique Salas Téllez  
COASESOR: Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Determinación de la actividad antimicrobiana de compuestos derivados de ácido carbámico (LQM 996, LQM 9012) y de un complejo de coordinación de Cobre II derivado de fenol (LQM 406) contra cepas clínicas de *Candida albicans*.

Que presenta la pasante: Erandeny Monserrat Mendoza Mejía

Con número de cuenta: 311199628 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Noviembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.F.C. María Eugenia Rosalía Posada Galarza	
VOCAL	Dr. Enrique Salas Téllez	
SECRETARIO	M. en C. Georgina Enriqueta Espinosa Pérez	
1er. SUPLENTE	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
2do. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## **Dedicatoria**

*Con todo mi cariño para las personas más importantes de mi vida que no se cansaron de hacer todo lo posible para que yo pudiera cumplir esta meta, por motivarme, quererme, creer en mí y guiarme por este camino. Este trabajo es para mi mamá Esther, Susana y papá Alejandro.*

## Agradecimientos

Primero que nada, a DIOS por permitirme llegar hasta este punto, por enseñarme que en la vida nada fluye bien si tú no eres el centro de todo. Gracias padre por contestar mis oraciones de una manera sorprendente. Gracias por dejarme conocerte y por tu amor en mi vida.

*“Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora” Eclesiastés 3:1*

A mi familia... quizá esta sea la parte en donde entiendo que ha valido la pena todo, la parte donde reconozco que gracias a ustedes fue posible.

*“No hay duda alguna, que es alrededor de la familia y el hogar, donde las más grandes y dominantes virtudes de la sociedad humana se crean, fortalecen y prevalecen” Winston Churchill.*

A mi mamá Esther y papá Alejandro por darme todo su apoyo, no existen palabras para describir y agradecer todo lo que han hecho por mí...por cuidarme desde que era pequeña, por quererme, guiarme, por hacerme más fuerte, por formar la persona que soy ahora. Es por ustedes que yo entiendo el significado de amor incondicional, ustedes son lo más importante en mi vida. Los amo.

A mi mamá Susana, siempre voy a estar agradecida con Dios por darme a la mejor mamá, para mí eres el claro ejemplo de fortaleza, siempre voy a admirarte, gracias por todo lo que has dado y hecho por mí, por escucharme, apoyarme y estar para mí cuando más lo necesito, gracias por demostrarme tu amor de mil formas, por tú apoyo y amor incondicional que te caracteriza, por ayudarme a que yo pudiera terminar con mis estudios, voy a devolverte todo y más...

A mis hermanos Fany e Israel, no puedo imaginar mi vida sin tenerlos y poder molestarlos, gracias por tantos momentos que hemos pasado juntos y sé que vendrán mucho mejores. Los quiero.

A mis tíos... July desde que era niña te he admirado eres mi modelo para seguir y una de las razones por las que estudie esta carrera, a Gerardo gracias por ser un ejemplo, por las pláticas y consejos acerca del trabajo sé que algún día voy a estar en una farmacéutica como tú, a mi tío Moy, Grisel y Alejandro gracias por su apoyo yo sé que toda mi vida contaré con ustedes.

¡A mis primos... Valeria, ¡que padre que ya seamos dos universitarias en la familia!, Eduardo, Ximena, Fernanda y Aldo. Los quiero mucho.

A Mi carrera y profesores

Bioquímica Diagnóstica, me habían dicho que era una carrera de tiempo completo y ¡SI! realmente no fue fácil, pero sé que cada desvelo y días de estrés ahora tienen su recompensa, volvería a elegir este camino una vez más. Gracias a los excelentes profesores que tuve por sus enseñanzas y aprendizajes.

A Mis amigos Bioquímicos.

A Juan, amigo jamás podre creer como es que llegamos a ser tan amigos cuando al principio las cosas parecían ser tan diferentes, solo puedo decirte que gracias por estar conmigo todo el tiempo, por hacerme reír por todo, por ayudarme cuando las cosas iban mal, gracias por tantos momentos de diversión sin fin, por casi todas clases que compartimos y por siempre estar aguantándome. ¡Eres una persona única en esta vida!, te quiero mucho amigo. Éxito en todo lo que venga tú puedes mover el mundo como solo tú sabes.

A Oliver ¡Ay amiwi! sin duda conocerte cambio todo, que fortuna encontrarte en el camino porque por ti se inicia esta hermandad, ahora recuerdo los días de escuela y extraño esos momentos cuando tú y yo estudiábamos a morir sobre todo cuando me explicabas Hematología, eres la persona más divertida que conozco, gracias por hacerme pasar momentos de risa infinita siempre, por escucharme, darme consejos, por los días de ir a tu casa a ver películas, hacer de comer y festejar por todo ¡como solo nosotros sabemos!. Gracias por tu inigualable amistad ¡eres el mejor! Te quiero mucho y te aseguro que va a ir super bien en lo que venga, este es el principio de todo y además eres el más aplicado.

A Luz J. por los momentos vividos en clases y en el servicio social de ahí nació esta amistad, gracias por escucharme siempre y apoyarme, eres una gran amiga.

A Julie por estar ahí siempre... amiga gracias porque me llevaste a este camino de tesis, me acuerdo la primera vez que pisamos el laboratorio y estábamos bien emocionadas, no hubiera sido igual sin ti a lado trabajando también en tu tesis, gracias por ser mi amiga y por apoyarme. ¡Éxito en todo lo que te propongas! Te quiero.

A Diana Solís y Clara Orozco gracias por todos los momentos vividos a lo largo de la carrera, por su ayuda en las materias y por su amistad, ojalá que siga muchos años más. Las admiro mucho por lo que siguen haciendo ahora como egresadas sé que llegaran muy lejos. Las quiero.

A Michelle y Susana gracias por su amistad y por los días de estudio intenso de Genética, las quiero.

A mis amigos del cuadro

Iván, Israel, Gerardo, Manuel, Raquel, Anahí, Rodrigo y Jacky ¡ya son ocho años de amistad! Gracias porque a pesar de separarnos al entrar a la universidad esta amistad sigue con el tiempo, soy afortunada de tenerlos como amigos, sé que contaré siempre con ustedes, ¡que esta amistad siga por muchos años más!.Los admiro y los quiero mucho.

Para mi asesor Dr. Enrique Salas por brindarme la oportunidad de ser su tesista, agradezco su apoyo, confianza y paciencia, también por permitirme trabajar en su laboratorio y resolver mis dudas ¡yo sé que soy la más preguntona!, gracias por animarme a seguir aun cuando las cosas no parecían ir bien, es una excelente persona. Lo admiro.

Para la M. en F.C María Eugenia Posada Galarza de verdad muchas gracias por tomarse el tiempo de revisar cada detalle de este trabajo, por contestar mis dudas de último momento y por su agradable atención.

Al resto del jurado M. en C. Georgina Espinosa, M. en C. Sandra Martínez, y a la Dra. Alma Núñez gracias por su atención y tiempo de revisar este trabajo para su mejoría.

Al Laboratorio de Química Medicinal de la FES- Cuautitlán a cargo del Dr. Enrique Ángeles, gracias por la confianza y por su disposición a resolver mis dudas para la realización de este trabajo.

GRACIAS UNAM

“Por mi raza hablará el espíritu”

Monse M.

Investigación realizada gracias al apoyo de los siguientes programas:

Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME)

PE 209219 *“Aula virtual para el apoyo de la educación en Micología Médica.”*

Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI1845) *“Identificación de los*

*microorganismos involucrados en el biodeterioro y desarrollo de sistemas nanoparticulados para su control.”*

Y a la Beca de Titulación del Programa de Vinculación con los Egresados de la UNAM (PVEU)

Egresados - E. Ciclo escolar 2018-2019 que me fue otorgada.

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio 17 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, bajo la asesoría del Dr. Enrique Salas Téllez.



## Contenido

I. Abreviaturas.....	1
II. Índice de imágenes.....	2
III. Índice de diagramas.....	2
IV. Índice de tablas.....	3
V. Índice de gráficas.....	3
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivo General.....	7
3.2 Objetivos Específicos.....	7
4. MARCO TEÓRICO.....	8
4.1 Antimicrobianos.....	8
4.1.1 Definición.....	8
4.1.2 Clasificación.....	8
4.2 Química Medicinal.....	9
4.2.1 Definición.....	9
4.3 Investigación básica para el desarrollo de un nuevo fármaco.....	9
4.4 Carbamatos.....	10
4.4.1 Generalidades.....	10
4.4.2 Aplicaciones.....	11
4.4.3 Actividad biológica.....	12
4.5 LQM.....	12
4.5.1 Definición.....	12
4.5.2 Propiedades fisicoquímicas.....	13
4.5.3 Antecedentes de actividad biológica.....	13
4.6 <i>Candida albicans</i> .....	15
4.6.1 Generalidades.....	15
4.6.2 Pruebas Bioquímicas de Identificación.....	18
4.6.3 Genoma de <i>Candida albicans</i> .....	20
4.6.4 Resistencia de <i>Candida spp.</i> a los antifúngicos.....	20
4.7 Candidiasis.....	21
4.7.1 Definición.....	21
4.7.2 Agentes etiológicos.....	21
4.7.3 Clasificación taxonómica.....	22
4.7.4 Diseminación.....	22
4.7.5 Edad y sexo.....	23
4.7.6 Vía de infección.....	23
4.7.7 Patogenia.....	23
4.7.8 Factores predisponentes.....	24
4.7.9 Factores de patogenicidad.....	25
4.7.10 Mecanismos de defensa del huésped.....	26
4.8 Formas Clínicas de Candidiasis.....	27
4.8.1 Clasificación.....	27
4.9 Diagnóstico general de candidiasis en el laboratorio.....	28
4.10 Candidiasis Mucocutánea.....	28

4.10.1 Definición.....	28
4.10.2 Vaginitis candidósica .....	28
4.10.3 Vulvovaginitis por <i>Candida</i> .....	29
4.10.4 Balanitis.....	29
4.11 Candidiasis Orofaringea .....	30
4.11.1 Definición.....	30
4.11.2 Formas clínicas.....	30
4.12 Candidiasis sistémica.....	31
4.12.1 Definición.....	31
4.12.2 Etiopatogenia.....	31
4.12.3 Candidosis del tracto urinario .....	32
4.12.4 Candiduria .....	32
4.13 Panorama en México de Candidiasis.....	33
4.14 Anfotericina B .....	34
4.14.1 Historia.....	34
4.14.2 Propiedades Fisicoquímicas .....	34
4.14.3 Mecanismo de acción.....	35
4.14.4 Espectro antifúngico.....	36
4.14.5 Farmacodinamia y Farmacocinética.....	36
4.14.6 Posología y forma de administración .....	37
4.14.7 Reacciones adversas.....	37
5. JUSTIFICACIÓN .....	38
6. HIPÓTESIS.....	38
7. METODOLOGÍA.....	39
7.1 Preparación de medios de cultivo y material biológico.....	39
7.2 Método de microdilución en placa para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos: Anfotericina B y Compuestos orgánicos.....	40
7.2.1 Preparación del sistema Anfotericina B.....	40
7.2.2 Preparación del sistema: Compuestos Orgánicos.....	43
7.2.3 Preparación de inóculo de cepa ATCC 32354 y cepas clínicas de <i>C. albicans</i> .....	44
7.2.4 Llenado de placas microtiter: Sistema compuestos orgánicos .....	44
7.2.5 Llenado de placas microtiter: Sistema Antifúngico de Referencia .....	45
7.2.6 Concentración resultante después de realizar diluciones dobles de compuestos orgánicos .....	46
7.2.7 Incubación y lectura de placa microtiter .....	46
7.2.8 Actividad de los compuestos en medio SDA .....	47
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	51
9. CONCLUSIONES .....	63
10. REFERENCIAS.....	64
11. ANEXO.....	69

# I. Abreviaturas

µg.- microgramo  
AB.- Anfotericina B  
ABCL. - Anfotericina B complejo lipídico  
ABD.- Anfotericina B desoxicolato  
ABL. - Anfotericina B liposomal  
Ac. - Anticuerpo  
ADN. - ácido desoxirribonucleico  
Ag.- Antígeno  
ATCC. - American Type Culture Collection  
CC.- Control de crecimiento compuestos orgánicos  
CCA. - Control de crecimiento Anfotericina B  
CE. - Control de esterilidad compuestos orgánicos  
CEA. - Control de esterilidad Anfotericina B  
CLSI. - Estándares de Laboratorios Clínicos  
CMF. - Concentración Mínima Fungicida  
CMI.- Concentración Mínima Inhibitoria  
CVV. - Candidiasis vulvovaginal  
DMSO. - Dimetil Sulfoxido  
g.- gramo  
HRT. - Hospital Regional de Tlalnepantla  
im. - Intramuscular  
IUPAC. - Unión Internacional de Química Pura y Aplicada  
IFI. - Infección Fúngica Invasiva  
iv.- Intravenosa  
KOH. - Hidróxido de potasio  
LCR. - Líquido Ceforraquídeo  
LQM. - Laboratorio de Química Medicinal  
mg.-miligramo  
ml.- mililitro  
PCR. - Reacción en Cadena de la Polimerasa  
Sap. - secreted aspartic proteinase  
SDA. - Agar Dextrosa Sabouraud  
SSC. - Solución stock de compuestos orgánicos  
VIH. - Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## II. Índice de imágenes

Imagen 1. Estructura general del grupo carbamato .....	11
Imagen 2. Análogos de los carbamatos.....	11
Imagen 3. Estructura de Tolnaftato: antifúngico .....	12
Imagen 4. Distintas morfologías de <i>Candida albicans</i> .....	15
Imagen 5. Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular de <i>C. albicans</i> .....	17
Imagen 6. <i>Candida albicans</i> : Pruebas de Laboratorio .....	19
Imagen 7. Vulvovaginitis por <i>Candida</i> (observación en espejo vaginal).....	29
Imagen 8. Balanitis candidósica posterior a relaciones sexuales.....	30
Imagen 9. Estructura química de Anfotericina B.....	35
Imagen 10. Mecanismo de acción de Anfotericina B.....	35
Imagen 11. CMI de cepa ATCC 32354 de <i>Candida albicans</i> . .....	53
Imagen 12. Placa microtiter de cepa clínica <i>Candida albicans</i> L17-59-18.....	56
Imagen 13. Placa microtiter de cepa clínica <i>Candida albicans</i> L17-21-18.....	57

## III. Índice de diagramas

Diagrama 1. Esquema de diluciones de Anfotericina B (etapa 1) .....	40
Diagrama 2. Esquema de diluciones de Anfotericina B (etapa 2) .....	42
Diagrama 3. Llenado de placa microtiter: Sistema Anfotericina B y compuestos orgánicos.....	45
Diagrama 4. Actividad de los compuestos en medio SDA.....	48

## IV. Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos LQM 996, 9012 y 406. ....	13
Tabla 2. Especies de <i>Candida</i> asociadas patógenas.....	21
Tabla 3. Taxonomía del género <i>Candida</i> .....	22
Tabla 4. Variedades clínicas de Candidiasis.....	27
Tabla 5. Diluciones de Anfotericina B (Primera etapa).....	41
Tabla 6. Concentraciones finales de Anfotericina B. ....	42
Tabla 7. Concentración de cada sistema de compuestos orgánicos LQM.....	46
Tabla 8. Información general de cepas clínicas provenientes del HRT.....	49
Tabla 9. Identificación de pacientes por sexo de las cepas clínicas utilizadas. ....	50
Tabla 10. Identificación del tipo de muestras de cepas clínicas .....	50
Tabla 11. Resultados de la evaluación con la cepa <i>C. albicans</i> ATCC 32354.....	53
Tabla 12. Resultados de la CMI de cepas clínicas de <i>Candida albicans</i> .....	54
Tabla 13. Resultados de la actividad en placa con medio SDA y de CMF en cepas clínicas de <i>C. albicans</i> .....	58
Tabla 14. Resultados de la actividad que presentó la cepa L17-32-18.....	58

## V. Índice de gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de tipo de aislamiento clínico en cepas analizadas. ....	50
Gráfica 2. CMI de LQM 406 contra cepas clínicas de <i>C. albicans</i> .....	54
Gráfica 3. CMI de LQM 996 contra cepas clínicas de <i>C. albicans</i> . ....	55
Gráfica 4. CMI de LQM 9012 contra cepas clínicas de <i>C. albicans</i> . ....	55
Gráfica 5. CMI de Anfotericina B contra cepas clínicas de <i>C. albicans</i> .....	56

# 1. RESUMEN

La candidiasis es una enfermedad producida por levaduras del género *Candida* que causan infecciones superficiales no graves, hasta sistémicas y potencialmente mortales. El aumento en la incidencia de estas infecciones ha sido atribuido al uso desmedido de agentes antimicóticos, la resistencia que presentan las cepas a estos, al estado inmunológico del paciente entre otras causas. Por esta razón ha sido importante llevar a cabo estudios de perfiles de susceptibilidad antifúngica y pensar en la creación de nuevos compuestos orgánicos con actividad biológica que contribuyan a un mejor tratamiento de estas enfermedades.

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los agentes antifúngicos se han convertido en una necesidad actual de los laboratorios de micología médica. En este trabajo se evaluó la actividad de compuestos orgánicos (carbamatos y un complejo de coordinación de Cu II derivado de fenol) contra cepas de *Candida albicans* provenientes de muestras de exudados faríngeos, vaginales, así como urocultivos y secreciones aisladas de pacientes del Hospital Regional de Tlalnepantla Estado de México a través de una metodología *in vitro* con el objetivo de conocer sus posibles propiedades antifúngicas y se determinó la CMI y CMF que presentó cada compuesto.

Los resultados mostraron que frente a Anfotericina B el intervalo de CMI fue de 0.255 - 4.08 µg/ml, lo que indicó la efectividad *in vitro* de este fármaco resultando solo el 16% de cepas resistentes con una concentración superior a 1 µg/ml. En cuanto a los compuestos orgánicos sus intervalos de CMI con ( $p < 0.05$ ) fueron para LQM 406 (827.50 - 1093.23 µg/ml) donde el 82% de las cepas presentaron inhibición, para LQM 996 (357.8 - 502.5 µg/ml) y LQM 9012 (429.6 - 686.3 µg/ml) resultando inhibidas el 100% de las cepas.

La CMF se evaluó con la actividad que presentaron los compuestos contra las levaduras en medio SDA donde el compuesto LQM 406 obtuvo una actividad fungicida del 85.4% y para

el caso de los demás compuestos incluyendo Anfotericina B la CMI coincidió con la CMF en todas las cepas clínicas resultando un 100% de actividad fungicida.

Se concluye que los compuestos orgánicos analizados tienen propiedades antifúngicas y podrían considerarse como posibles alternativas farmacéuticas pero su toxicidad y completo mecanismo de acción deberá ser estudiado más a fondo en otras investigaciones.

## 2. INTRODUCCIÓN

La química medicinal tiene como objetivo la identificación, la síntesis y el desarrollo de nuevos compuestos químicos que sean adecuados para el uso terapéutico y que tengan actividad biológica. Los compuestos antimicrobianos son sustancias que eliminan o inhiben el crecimiento de hongos, parásitos y bacterias, una de las clasificaciones por el tipo de microorganismo sobre el que actúa es el término *antifúngico* el cual engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia. (Gregorí, 2005).

Por ello en el presente trabajo se evaluará el efecto antifúngico de compuestos orgánicos (carbamatos y un complejo de coordinación de Cu II derivado de fenol) contra cepas clínicas de *Candida albicans* ya que se sabe en el tratamiento de las micosis existen dificultades como, los efectos secundarios y el uso incorrecto de los antifúngicos que conlleva a la evolución de cepas resistentes, por lo que recientemente se han estado buscando alternativas con el estudio de nuevas sustancias y en este sentido el desarrollo de nuevos compuestos orgánicos puede contribuir al tratamiento de diferentes padecimientos.

Además, la candidiasis ha surgido como un importante problema de salud pública y más del 70% de estas micosis son producidas por *C. albicans*, esta enfermedad afecta cualquier tejido, por lo que se presentan diversos cuadros clínicos, es cosmopolita, sin tener una predilección en cuanto a edad o sexo siempre y cuando se presenten los factores de oportunidad. (Romero, 2007).



## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad de compuestos orgánicos (carbamatos y un complejo de coordinación de Cu II derivado de fenol) a través de una metodología *in vitro* para conocer si presentan propiedades antifúngicas contra cepas de *Candida albicans*.

### 3.2 Objetivos Específicos

- 1) Realizar el método de microdilución en placa para comprobar el efecto antifúngico de los compuestos orgánicos a diferentes concentraciones contra cepas de *Candida albicans*.
- 2) Determinar la concentración mínima inhibitoria de compuestos orgánicos contra cincuenta cepas clínicas de *Candida albicans*.
- 3) Determinar la concentración mínima fungicida en placa con medio de cultivo SDA para conocer si existe un efecto fungicida o fungistático en la concentración determinada.
- 4) Comprobar estadísticamente los resultados del efecto antifúngico de compuestos orgánicos a diferentes concentraciones contra *Candida albicans*.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Antimicrobianos

#### 4.1.1 Definición

Se definen como sustancias que eliminan o inhiben el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, hongos y parásitos. (Girón, 2008)

#### 4.1.2 Clasificación

Se pueden clasificar en dos grupos:

1. Por su modo de acción

**a) Desinfectantes:** Son sustancias que eliminan la viabilidad microbiana y son aplicables sólo a sistemas inanimados.

**b) Antisépticos:** Son sustancias que reducen y controlan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos y son aplicables sobre la piel y/o mucosas de humanos y animales.

**c) Antimicrobianos de uso clínico-terapéutico:** Son sustancias capaces de reducir y controlar la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos de un individuo. Pueden ser moléculas naturales producidas por un organismo vivo (hongo o bacteria).

(Basualdo, et. al., 1996)

2. Según el tipo de microorganismo en el que actúan.

**a) Antibióticos:** Son sustancias químicas producidas por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles. Generalmente, son fármacos usados en el tratamiento de infecciones por bacterias (antibacterianos).

b) **Antiparasitario:** Son sustancias que reducen o matan a los parásitos.

c) **Antifúngico o antimicótico:** Son sustancias que tienen la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

(Iáñez, 1998).

## **4.2 Química Medicinal**

### **4.2.1 Definición**

Es una disciplina que forma parte de las ciencias farmacéuticas, su origen químico guarda una estrecha relación con la farmacología y farmacoterapéutica, está encargada del diseño y desarrollo de las moléculas con actividad biológica y los medicamentos con fines terapéuticos. Tiene como finalidad la síntesis e identificación de los compuestos orgánicos más adecuados para el uso terapéutico, lo cual implica el seguimiento de las propiedades biológicas de los fármacos existentes y su respectiva relación estructura-acción cuantitativa. (Andrade, 2017)

### **4.3 Investigación básica para el desarrollo de un nuevo fármaco.**

Los fármacos actúan produciendo cambios en algún proceso o función fisiológica. Muchos ejercen su efecto al interactuar específicamente con alguna estructura macromolecular del organismo.

Cuando se realiza la investigación de nuevos fármacos, nuevos o modificados a partir de moléculas existentes, primero se recopila toda la información posible sobre los procesos biológicos asociados a la enfermedad bajo estudio. En diversas ocasiones se logra identificar a un blanco molecular específico sobre el cual puede actuar un fármaco. (Medina, 2007)

A partir de la década de los sesenta, la metodología de la investigación de nuevos fármacos se basa cada día más en preparar compuestos químicos que interaccionen con rutas metabólicas o receptores conocidos a los cuales se les denomina como “compuesto líder”.

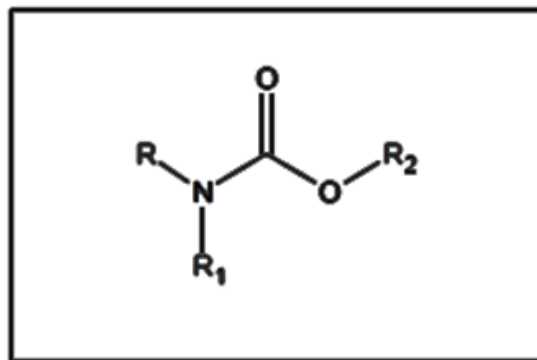
Para las etapas de descubrimiento de este compuesto y su optimización es necesaria una interrelación constante con los microbiólogos que realizan los ensayos de actividad biológica *in vitro*. (Saldívar et. al., 2017)

Ellos son los que determinan la actividad biológica de los compuestos que proveen los químicos para hallar el compuesto líder, continua con la optimización, la cual representa un proceso tardado ya que los resultados biológicos de los compuestos modificados guiarán las nuevas modificaciones químicas y así sucesivamente hasta encontrar el candidato, esta es la etapa en la que el químico medicinal u orgánico tiene mayor participación. Después de estas pruebas *in vitro* continúan las pruebas *in vivo* en la Fase Preclínica. (Medina et. al., 2013)

## **4.4 Carbamatos**

### **4.4.1 Generalidades**

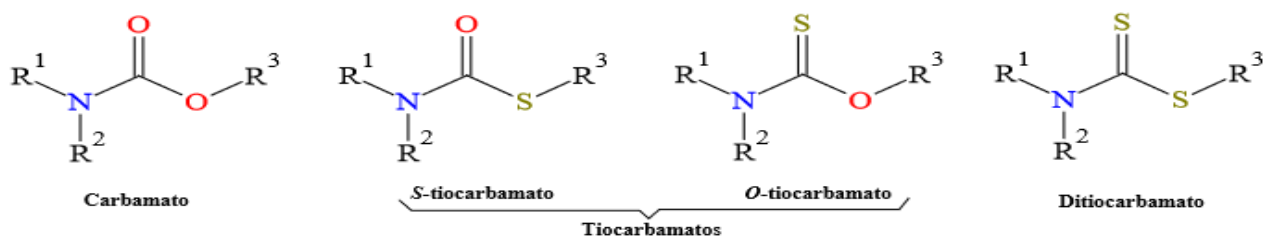
Los carbamatos son compuestos estables derivados del ácido carbámico ( $\text{H}_2\text{N-COOH}$ ) el cual es a su vez inestable, los carbamatos resultan de sustituir el grupo amino y el grupo carboxílico por diversas estructuras y son identificados por la presencia de un átomo de nitrógeno unido a un grupo carbonilo y este a su vez unido a un átomo de oxígeno. Se obtienen muchas variaciones modificando los grupos unidos al oxígeno y nitrógeno como se indica en la Imagen 1. (Muñoz, 2012)



**Imagen 1.** Estructura general del grupo carbamato (Muñoz, 2012)

Estos compuestos se nombran como “carbamato de alquilo” donde la parte de alquilo se refiere a O-alquilo (o a la mitad derivada de alcohol). Todos los carbamatos con sustituciones en el átomo de nitrógeno se indican mediante la notación: carbamato de (N-Alquilo). (Adams,1965)

Los carbamatos se pueden dividir en tres grandes grupos: carbamatos, tiocarbamatos (dos isómeros estructurales) y ditiocarbamatos los cuales se originan al sustituir uno o ambos átomos de oxígeno por azufre como se muestra en la Imagen 2.



**Imagen 2.** Análogos de los carbamatos (Martínez, 2016)

#### 4.4.2 Aplicaciones

Entre las aplicaciones de los carbamatos principalmente se encuentran como farmacéuticos, agroquímicos (pesticidas, herbicidas, fungicidas, etc). (Chaturvedi, 2012)

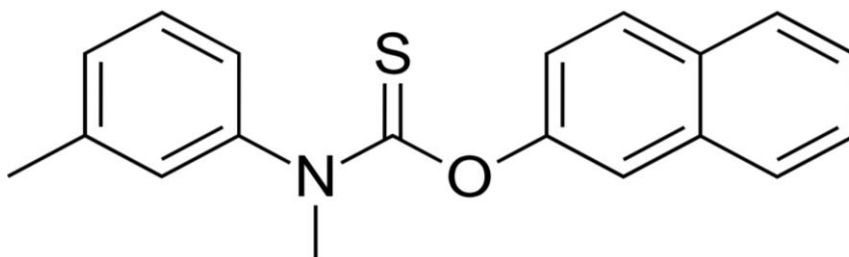
Además, en la fabricación de poliuretanos, los cuales pueden ser encontrados como asientos de espuma, sellos de espuma, adhesivos, fibras sintéticas e incluso en preservativos.

Su uso terapéutico se conoce desde hace mucho tiempo; como el carbamato de etilo que se utilizó como agente antineoplásico. (Adams, 1965)

Otra aplicación terapéutica que se les ha dado es en medicamentos como Meprobamato y dicarbamatos de propanodiolos como relajantes musculares.

#### 4.4.3 Actividad biológica

Existen diversos compuestos con actividad biológica utilizados para muy variados propósitos que tienen carbamatos en su estructura, como son los compuestos anticancerígenos, antibacteriales, antifúngicos, antipalúdicos, antidiabéticos, antioxidantes, antiinflamatorios, antituberculosos, antiprogestacionales, anti-VIH, antiestrogénicos, entre otros. (Chatuverdi. D, 2012)



**Imagen 3** Estructura de Tolnaftato: antifúngico. (Vasconcelos, 2006)

## 4.5 LQM

### 4.5.1 Definición

Son una serie de compuestos sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a los cuales se les han realizado pruebas para determinar actividad terapéutica (antibiótica, parasitaria, antifúngica, etc.) en diferentes modelos biológicos.

## 4.5.2 Propiedades fisicoquímicas

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de los compuestos LQM 996, 9012 y 406.  
(Martínez, 2016), (Escutia, 2012)

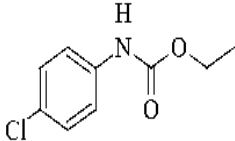
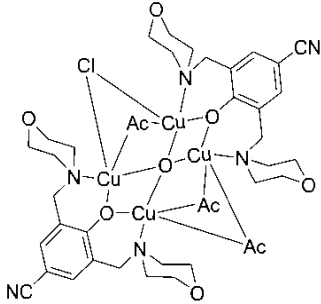
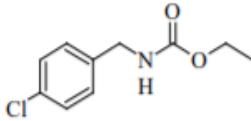
Estructura química	Nombre IUPAC	Peso molecular (g/mol)	Aspecto físico	Punto de fusión (°C)	Clave del compuesto
	4-Clorofenilcarbamato de etilo	199.63	Blanco aspecto brillante	58-60	LQM 996
	$\mu_4$ -Oxo- $\mu$ -triacetato- $\mu$ -cloro-bis [4-ciano-2,6-bis (morfolín-il-metil)fenolato]-N,N,O-tetracobre (II)	1115.52	Sólido amorfo color verde oscuro	198-200	LQM 406
	4-Clorobencilcarbamato de etilo	213.66	Cristales en forma de agujas blancas	56-59	LQM 9012

Tabla 1. Se presentan algunas propiedades fisicoquímicas de los compuestos LQM utilizados en este estudio.

## 4.5.3 Antecedentes de actividad biológica

Se han sintetizado y evaluado carbamatos de etilo y metilo en distintos trabajos dentro de la FES-Cuautitlán los cuales han mostrado ser efectivos contra la cepa *Rhipicephalus microplus*, en donde seis carbamatos inhibieron la puesta de huevos y el desarrollo del embrión en tanto que dos de estos alcanzaron el 100% de mortalidad en las larvas de estos ectoparásitos. Además, en

el estudio de toxicidad los carbamatos demostraron tener baja toxicidad para su aplicación veterinaria.

(Prado, et.al., 2013)

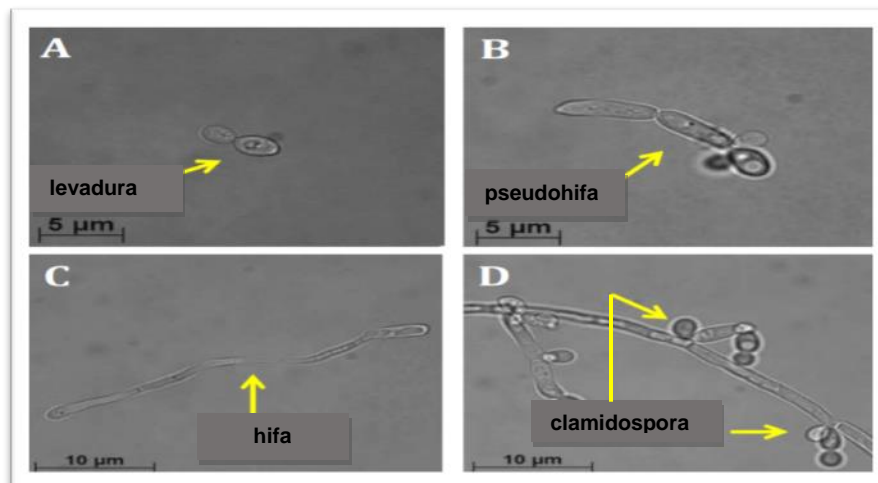
También se ha determinado su actividad contra *Helicobacter pylori* (mediante métodos de Kirby Bauer y de dilución en agar), *Criptococcus neoformans*, *Candida albicans* ATCC 12053 (por el método de microdilución en RPMI-1640), *Escherichia coli* (Método de difusión en agar), *S. aureus* por el método de microdilución. De los carbamatos probados el que mayor actividad ha presentado es el compuesto LQM 996. (Rodríguez, 2007)



## 4.6 *Candida albicans*

### 4.6.1 Generalidades

*Candida albicans* es un hongo dimórfico es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso a 25°C en la naturaleza. Pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas de (3-8 x 2-7  $\mu\text{m}$ ) de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio como lo indica la Imagen 4. (Potón, 2002)



**Imagen 4.** Distintas morfologías de *Candida albicans* (Vázquez, 2013)

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono.

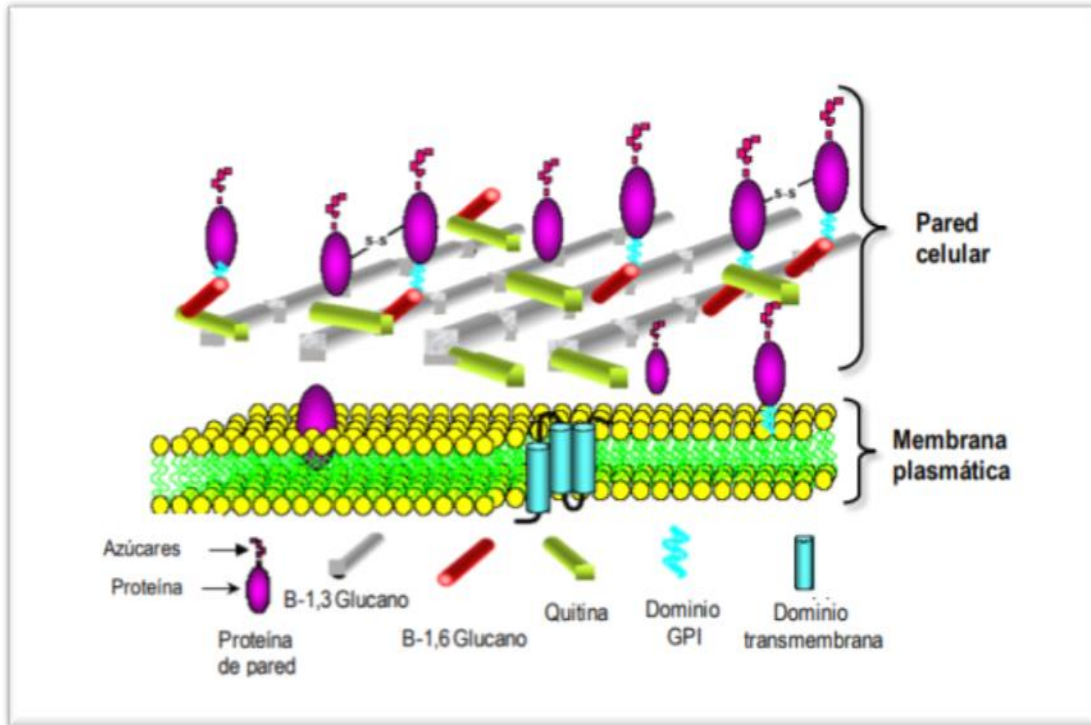
Su pared celular está compuesta principalmente por los polisacáridos mananos, glucanos y quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente

influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. (Calderone y Braun, 1991). El polisacárido manáno representa aproximadamente entre 15.2% y 22.9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán  $\beta$ -1-3 y el D-Glucán  $\beta$ -1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular. (Pierce. et. al., 1978)

Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y Quitina entre 0.6% y 9% del peso de la pared celular.

Las proporciones de los componentes que constituyen la pared celular de las levaduras y de los tubos germinales es relativamente similar, aunque la cantidad de Glucán Alkali-soluble, Alkali-insoluble y de Quitina de *C. albicans* varía de acuerdo con la forma de crecimiento. (Hathaway, et.al., 2001)

Estudios ultraestructurales de la pared celular de *C. albicans* han demostrado una compleja microarquitectura como lo indica la Imagen 5. El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación. (Howlett y Squier, 1980). La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): Manoproteínas,  $\beta$ -Glucán-Quitina,  $\beta$ -Glucán, manoproteínas y una capa de fibrillas (Cassone, et.al., 2003).



**Imagen 5.** Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular de *C. albicans* (Cardozo y Pardi., 2000)

La membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antimicóticos actúan a nivel de esta, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Esta presenta una doble capa compuesta por lípidos y posee invaginaciones, que se observan como surcos de 200 a 300 nanómetros de longitud, por 35 a 40 nanómetros de espesor. (Pesti, et.al., 1981). Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción.

En el citoplasma, al igual que otras células eucarióticas presenta: ribosomas, mitocondrias con doble capa, gránulos de glucógeno y vacuolas que, contienen en algunas ocasiones cuerpos lipídicos y gránulos de polifosfato. El núcleo es típico de una célula eucariótica, con membrana nuclear limitante, uno o varios nucléolos, ADN y ARN y varios cromosomas. (Cardozo y Pardi., 2000)

#### 4.6.2 Pruebas Bioquímicas de Identificación

En contraste con otras especies, *C. albicans* tiene una marcada tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa, denominadas clamidosporas, sobretodo cuando se cultivan en un medio especial como agar harina de maíz; la clamidospora tiene un diámetro de 7 a 8 micras y casi siempre se origina en el extremo del pseudomicelio. Es una importante característica morfológica en la identificación de *C. albicans*. Asimismo, tiene la capacidad de producir tubos germinales (filamentación en suero) cuando las colonias son inoculadas en 0.5 ml de suero a temperatura de 37°C observándose los resultados después de 2 o 3 horas. (Mackenzie, 2004)

Un tubo germinal se define como una extensión filamentosa de una célula levaduriforme que mide alrededor de la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula. El tubo germinal de *C. albicans* ha sido descrito como un tubo sin constricción en el punto de origen y tiene una apariencia similar a “espejo de mano”. (Williams, 2000)

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en Agar Sabouraud y miden de 1.5 a 2 mm de diámetro después de 5 a 7 días. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o requemado al continuar envejeciendo. Para aislarlas de las muestras clínicas que siempre llevan bacterias se agregan antimicrobianos como el Cloranfenicol al medio simple. (Nolte, 1996).

En Agar Sabouraud o en otros medios de cultivo similares, las colonias que crecen son lisas, suaves, húmedas y de color y aspecto cremoso. Estas colonias tienen un tamaño que oscila entre 1.5 y 2 mm de diámetro, con aspecto de levadura, de consistencia blanda y rápidamente proyectan filamentos hasta la profundidad del agar. (Cardozo, 2002)

Otros medios de cultivo en los cuales puede crecer *C. albicans* son: Pagano-Levin, en el cual las colonias se observan de color crema y CHROMagar® en donde las colonias de *C. albicans* se observan de color verde como se indica la Imagen 6. (Arenas, 2014).

Las colonias de *Candida* crecen *in vitro* en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2.5 - 7.5 y temperatura que oscila entre 25°C - 38°C. El crecimiento de colonias se puede detectar entre 48 a 72 horas después de la siembra, y los subcultivos pueden crecer más rápidamente. (Potón, 2002)

**Imagen 6.** *Candida albicans*: Pruebas de Laboratorio (Cardozo, 2002), (Mendoza, 2005)



CHROMagar *C. albicans*

Tubo germinativo (+)

Clamidosporas agar harina de maíz 40X

### **4.6.3 Genoma de *Candida albicans***

Se ha reportado que *C. albicans* posee de cuatro a siete cromosomas y un tamaño genómico de 14 Mb. En esta levadura diploide se ha referido un tamaño genómico haploide estimado entre 16 y 17 Mb, la variabilidad en su cariotipo parece estar asociada a su transición fenotípica y a ciertos aspectos de su fisiología. Además, en esta especie, el genoma haploide parece estar formado por ocho cromosomas, con tamaños de 0.42 a 3 Mb. (Martínez. et. al., 2004).

### **4.6.4 Resistencia de *Candida spp.* a los antifúngicos**

El tratamiento para combatir la candidiasis puede ser tópico o sistémico según el tipo de infección, los antifúngicos más utilizados son los derivados imidazólicos (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol etc.), sin embargo en la actualidad se observa una disminución en la efectividad de estos medicamentos, es decir, un fenómeno de resistencia de parte del microorganismo a estos fármacos, esto debido principalmente, al surgimiento de levaduras resistentes, a la aparición de nuevas especies patógenas, a la prescripción irracional de antimicóticos como profilaxis y al aumento de las dosis terapéuticas. (López, et. al., 2016)

En los últimos años, se ha incrementado el número de mujeres con cepas resistentes a azoles en algunos casos de candidiasis vulvovaginal. (Sobel, 2007).

En México, aunque no se han cuantificado los casos de resistencia en hospitales de atención general y de especialidades, se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos. (Manzano, 2008).

## 4.7 Candidiasis

### 4.7.1 Definición

Las candidosis o candidiasis son micosis producidas por hongos saprófitos oportunistas pertenecientes al género *Candida*. (Bonifaz, 2012). Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas, o sistémicas; pueden afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica. (Arenas, 2014)

### 4.7.2 Agentes etiológicos

Los agentes patógenos son levaduras (el estado anamorfo) del género *Candida* pertenecientes al Phylum Ascomycotina. Muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la microbiota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas y tracto gastrointestinal).

Este género incluye aproximadamente 150 especies identificadas, en la Tabla 2 se muestran las especies de *Candida* patógenas y su frecuencia.

**Tabla 2.** Especies de *Candida* asociadas patógenas. (Palacio, 2009)

<b>Especie</b>	<b>Frecuencia</b>
<i>C. albicans</i>	50%
<i>C. tropicalis</i>	15-30%
<i>C. parapsilosis</i>	15-30%
<i>C. glabrata</i>	15-30%
<i>C. krusei, C. guilliermondi, C. dubliniensis, C. lusitaniae</i>	~1%

Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis*. (Vázquez y Sobel. 2011).

### 4.7.3 Clasificación taxonómica

La actual taxonomía basada en la secuencialización genética, se les ordena dentro del tipo de levaduras ascosporadas, esta taxonomía del género *Candida* se resume en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Taxonomía del género *Candida*. (Bonifaz, 2012)

<b>Candidosis</b>	<b>Tipo clínico</b>
<b>Clase</b>	<i>Ascomycetes</i>
<b>Subclase</b>	<i>Hemiascomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Familia</b>	<i>Saccharomycete</i>
<b>Género</b>	<i>Pichia, hansenula, arxiozyma</i> (estados teleomórficos)
<b>Especies</b>	A los estados anamórficos se les denomina <i>Candida</i> y los ejemplos más importantes son: <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> (sensu stricto), <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> y <i>C. dubliniensis</i>

### 4.7.4 Diseminación

Su grado de diseminación no depende tanto del agente etiológico, sino del factor predisponente con el que se asocie; por ejemplo, los cambios en el pH, acumulaciones de nutrientes como el glucógeno, administración de antibióticos de amplio espectro, enfermedades o procesos que influyan en la respuesta inmunológica, sobre todo celular, así como defectos en los



linfocitos polimorfonucleares y linfocitos T y B, todos ellos factores importantes para padecer candidosis. (Reséndiz, 2007)

#### **4.7.5 Edad y sexo**

Se presenta en todas las edades; es común en lactantes, lo cual se origina por infección en las mucosas durante el parto, sobre todo porque la madre cursó con candidosis vulvovaginal en el último trimestre del embarazo; en los adultos se presenta entre la tercera y cuarta décadas de vida, aunque en ancianos también es frecuente; esto más bien está relacionado con procesos o enfermedades concomitantes. El padecimiento afecta a ambos sexos por igual, solo los casos genitales son más frecuentes en la mujer. (Bonifaz, 2012)

#### **4.7.6 Vía de infección**

Debido a que *Candida albicans* y otras especies oportunistas son parte integral de la flora habitual, en general van a provocar enfermedades endógenas favorecidas por algún factor de predisposición del paciente, sin embargo, hay ocasiones en que la candidiasis se adquiere en forma exógena, por ejemplo, por introducción de grandes inóculos de levaduras a través de catéteres y de jeringas no estériles, o bien por cateterismo. En pacientes masculinos la balanitis por *Candida* muchas veces es consecuencia de las relaciones sexuales, de manera que este tipo de candidiasis se considera exógena y adquirida por transmisión sexual. (Resendiz, 2007)

#### **4.7.7 Patogenia**

El delicado balance o equilibrio que existe entre comensal (levaduras) y hospedero podría romperse y dar lugar al parasitismo o desarrollo de una infección oportunista. El desarrollo de la enfermedad por *Candida* depende de la interacción de ciertos factores:

1. Factores predisponentes para la infección.
2. Patogenicidad intrínseca del microorganismo.

3. Mecanismos de defensa del huésped.

(Shoham, 2005)

#### **4.7.8 Factores predisponentes**

Los factores desencadenantes de la enfermedad son generalmente modificaciones en los mecanismos de defensa del huésped, los cuales, secundariamente, inducen transformaciones en el comportamiento del hongo. Las manifestaciones clínicas y la severidad de la infección están en relación con la naturaleza y el grado de compromiso de las defensas normales del huésped.

(Vázquez, 2010)

Las causas predisponentes se pueden agrupar en:

1. Factores fisiológicos: Cambios de pH de manera notable en vagina y boca, embarazo y prematurez.
2. Enfermedades o procesos debilitantes: Diabetes, tuberculosis, absceso hepático amibiano y desnutrición.
3. Inmunodeficiencias primarias o adquiridas: Leucemias, linfomas, enfermedad de Hodgkin, infección por VIH-SIDA y para el caso específico de la candidosis mucocutánea generalizada: Agammaglobulinemias; síndrome de Di George, timomas, hipoparatiroidismo e hipoadrenocortisolismo.
4. Iatrogénicos: Tratamientos prolongados con antibióticos, corticoesteroides y citotóxicos, tratamientos anticonceptivos orales, dispositivos intrauterinos, cateterismo y procesos quirúrgicos invasivos.
5. Misceláneo: Dermatitis inflamatorias previas (dermatitis por contacto y del área del pañal), traumatismos ungueales, mal estado de la dentadura, prótesis dentales mal adaptadas y humedad. (Bonifaz, 2012)

### 4.7.9 Factores de patogenicidad

El potencial patogénico de las levaduras varía considerablemente. Éstas no son un componente pasivo del proceso infeccioso, sino que poseen una serie de factores de virulencia. No existe un único factor que pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad, sino que se ha propuesto una combinación de diferentes factores que contribuyen a una o más etapas de la infección. Los principales factores de virulencia, que han sido estudiados en profundidad para *C. albicans* (aunque algunos de ellos han encontrados en otras especies) son:

1. Capacidad de adherencia de las levaduras a diferentes superficies: Es una interacción fuerte entre una adhesina de la levadura y un receptor de la célula del hospedero.
2. Producción de enzimas extracelulares: Son proteinasas y fosfolipasas específicas de cada cepa. Se han detectado en *C. albicans* una familia de 10 isoenzimas con actividad proteínasa conocidas como Sap (secreted aspartic proteinase), de las cuales Sap 1-3 son cruciales para la infección superficial y Sap 4-6 serían importantes en la candidiasis invasiva.
3. Adhesinas: Son una serie de sustancias que influyen en la adaptación o adhesión de la levadura; su presencia está bien comprobada en *C. albicans* y *C. glabrata*. Las más importantes son manoproteínas, las mananas y por parte de las células receptoras o del hospedero, las manoproteínas de superficie tipo lectina, las cuales están reguladas por genes específicos. Las más importantes son: queratinasas, peptidasas, hemolisinas, proteasas y hialuronidasas. En forma específica: aspartilproteínasa secretora, fosfolipasas y lipasas.

4. Producción de hifas y pseudohifas: Aumenta la capacidad invasiva de la levadura, la capacidad de adherencia, la resistencia a la fagocitosis y el poder killer sobre las células del hospedero.
5. “Switching” o variabilidad fenotípica y antigénica: Es un cambio espontáneo, frecuente y reversible entre diferentes fenotipos distinguibles por la morfología de la colonia o por la morfología celular.
6. Adaptación al pH: Las diversas especies de *Candida* tienen una gran adaptación a diversos medios y sustratos. Propiedad regida por 3 genes (PHR1 y PHR2), ambos se inactivan en diferentes condiciones, el primero se activa en pH neutro o ligeramente básico (sangre o piel alcalinizada) y se inactiva en medio ácido, activándose a su vez el segundo (por ejemplo, en vagina).
7. Formación de biopelículas: Una biopelícula es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y mantenidos con fuerza por sustancias poliméricas secretadas por los mismos, lo cual le da alta capacidad defensiva, persistencia, mayor resistencia al ataque de fármacos y más capacidad defensiva. (Bonifaz, 2012)

#### **4.7.10 Mecanismos de defensa del huésped**

- **No inmunes:**

1. La interacción con otros miembros de la flora microbiana.
2. La integridad funcional del estrato córneo.
3. El proceso de descamación debido a la proliferación epidérmica inducida por la inflamación.

- **Inmunes:**

1. Inmunidad mediada por células.

## 2. Inmunidad humoral.

(Shoham, 2005)

# 4.8 Formas Clínicas de Candidiasis

## 4.8.1 Clasificación

La enfermedad clínica puede dividirse en dos amplias categorías: infecciones mucocutáneas e infecciones sistémicas, cada una con sus propios factores de riesgo. En la Tabla 4 se observan las principales variedades clínicas. La transición de *Candida* de ser comensal al provocar invasión de las mucosas o diseminación sistémica depende de los factores predisponentes del paciente y de las características de la levadura. (Romero, et.al, 2014)

**Tabla 4.** Variedades clínicas de Candidiasis. (Bonifaz, 2012)

<b>Candidosis</b>	<b>Tipo clínico</b>
<b>Mucocutánea</b>	Oral Orofaringea Genital (vaginitis y balanitis) Mucocutánea crónica Gastrointestinal Bronquial/pulmonar
<b>Cutánea</b>	Intertrigos Onicomycosis (perionixis, onicólisis y onixis) Del área del pañal Pustulosis Granulomatosa Cutánea congénita
<b>Sistémica</b>	Tracto urinario Meningitis Endocarditis Candidemia (fungemia)
<b>Miscelánea</b>	Otitis (otomicosis) Úlceras corneales (oculomicosis) Endoftalmitis
<b>Alérgica</b>	Candidides (ides) Eccema Rinitis,alveolitis y asma Gastritis alérgica

## 4.9 Diagnóstico general de candidiasis en el laboratorio

- a) Muestras: Escamas de piel y faneras, hisopado de mucosa: bucal, vaginal, surco balano-prepucial, hemocultivo, esputo, biopsia, LCR, orina.
- b) Examen directo del material
  - Observación en fresco (con o sin agregado de KOH 10%).
  - Observación por tinción.
- c) Cultivo: Medios generales, medios selectivos, medios enriquecidos incubación de 28 y 37 °C (de acuerdo con la localización).
- d) Identificación de género y especie.
- e) Pruebas complementarias: Detección de Ac, Detección de Ag, Detección de metabolitos, ADN.

(Castañon, 2016)

## 4.10 Candidiasis Mucocutánea

### 4.10.1 Definición

Es una inmunodeficiencia primaria que se caracteriza por infecciones candidiásicas persistentes o recurrentes en piel, uñas o membranas mucosas. (Rolando et.al., 2016)

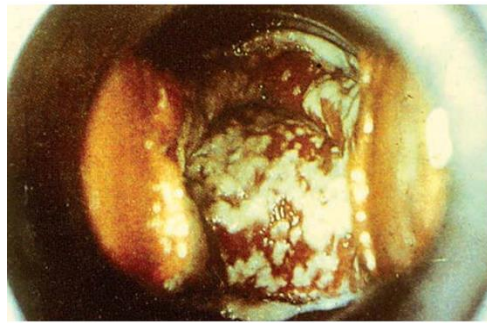
### 4.10.2 Vaginitis candidósica

Es la infección más frecuente recurrente y molesta que afecta el aparato genital de la mujer (en promedio 50% de las vaginitis); ocurre por lo común en la edad reproductiva, aunque es posible verla en niñas recién nacidas, lo cual se le atribuye a los altos niveles hormonales heredados de la madre y a la colonización de las mucosas durante el parto.

Aparte de los factores normales para el oportunismo, la candidosis vaginal se suele encontrar entre 20 y 60% en mujeres embarazadas, debido a que en este estado se presentan diversos cambios, como son: 1) Elevados niveles de glucógeno que al degradarse provocan un cambio en el pH, 2) Inmunosupresión del proceso, 3) Altos niveles de progesterona los cuales estimulan el crecimiento de *Candida albicans*, debido a que se ha comprobado que posee receptores específicos. (Bonifaz, 2010)

#### **4.10.3 Vulvovaginitis por *Candida***

La candidosis vulvovaginal (Imagen 7) es una infección del epitelio estrogenizado de la vagina y el vestíbulo, ocasionada por levaduras oportunistas del género *Candida*, la cual se puede extender hasta los labios menores y mayores, y región inguinal. (Mendling, 2012)



**Imagen 7.** Vulvovaginitis por *Candida* (observación en espejo vaginal). (Bonifaz, 2012)

#### **4.10.4 Balanitis**

La balanitis (Imagen 8) es una afección del glande y prepucio del pene, causada por diferentes especies de levaduras del género *Candida*, principalmente *Candida albicans*. (Araiza et.al., 2011)



**Imagen 8.** Balanitis candidósica posterior a relaciones sexuales. (Lisboa, 2010)

## 4.11 Candidiasis Orofaringea

### 4.11.1 Definición

Es una infección oportunista, que consiste en la inflamación de la mucosa orofaríngea debida a una infección por levaduras, principalmente por *Candida albicans*. Es una infección generalmente leve y con frecuencia asintomática (Puerto et.al., 2001)

### 4.11.2 Formas clínicas

Presenta dos tipos clínicos: Agudo y crónico.

- **Candidosis oral aguda**

- a) Seudomembranosa: La más común (trush o algodoncillo); se presenta en lengua (glositis), pero puede afectar también encías, paladar o invadir toda la boca (estomatitis). La morfología típica es de placas pseudomembranosas, cremosas y blanquecinas, con fondo eritematoso, que simulan restos de leche o crema. La sintomatología más común es ardor y dolor, que por lo general impiden la alimentación en los niños.
- b) Atrófica aguda: Se presenta más en paladar y es propia de pacientes bajo antibioticoterapia prolongada. (Puerto et.al., 2001)



- **Candidosis oral crónica**

- a) Hiperplásica o “lengua vellosa”: Es posible ver parasitación completa de la lengua, se manifiesta sobre todo en los bordes laterales de la lengua y en la mucosa yugal, llegando a ser indistinguible de la de origen viral por virus de Epstein-Barr; además pueden presentarse fisuras y úlceras muy dolorosas. En raras ocasiones se puede presentar, dando una parasitación negra, a la que se le denomina “lengua negra vellosa”; ésta se observa con más frecuencia en pacientes con VIH-SIDA o en fumadores por el depósito de la nicotina.
- b) Queilitis angular: Constituido por placas eritemato-escamosas y erosionadas, en pacientes aprensivos con escasa dentadura y puede acompañarse de estomatitis crónica. A partir del foco bucal la candidosis puede continuar hacia la faringe, laringe, esófago, tráquea, etc., lo cual es frecuente en pacientes con leucemia, linfomas y VIH-SIDA.
- c) Crónica atrófica o estomatitis subplaca: Se presenta en una sola placa bien adherida, habitualmente eritematosa, en pacientes con prótesis mal adaptadas. (Bonifaz, 2012)

## **4.12 Candidiasis sistémica**

### **4.12.1 Definición**

Son un grupo de enfermedades que se observan poco y se asocia con factores de predisposición muy severos; en general presenta mala respuesta a la terapia. (Bonifaz, 2012).

### **4.12.2 Etiopatogenia**

Las infecciones del tracto urinario son las que se producen con mayor frecuencia durante la internación hospitalaria. Los agentes etiológicos habituales son bacterias; los hongos son responsables del 5-12% de los casos. Dentro de este último grupo, las levaduras del género *Candida* son la etiología de la mayoría de estas infecciones. (Maldonado et. al., 2016)

### 4.12.3 Candidosis del tracto urinario

La infección urinaria inferior por *Candida* suele producirse en pacientes con sonda urinaria, especialmente después de una terapia con antibióticos, aunque las infecciones por *Candida* y por bacterias con frecuencia se producen simultáneamente. La prostatitis por *C. albicans* aparece con frecuencia en pacientes con diabetes, por lo general después de una instrumentación. (Vega, et.al., 2014)

### 4.12.4 Candiduria

Se define como la presencia de levaduras y/o seudomicelios en el sedimento de una muestra de orina o la recuperación de colonias de especies de *Candida*.

La infección urinaria candidiásica no es frecuente en individuos inmunocompetentes y por lo general su presencia se encuentra asociada a ciertas condiciones, ya sean locales o generales, que favorecen su aparición. (Vega et.al., 2014)

Situaciones que coexisten con la presencia de *Candida* en la orina:

- Candiduria asintomática transitoria
- Cistitis o colonización vesical por *Candida*
- Candidiasis renal (pielonefritis candidiasica)

(Maldonado et. al., 2016)

## 4.13 Panorama en México de Candidiasis

En México, según el anuario de morbilidad publicado en 2017 por la *Dirección General de Epidemiología* la candidiasis urogenital con clave B37.3-B37.4 se ha mantenido entre las 20 principales causas de enfermedad en todo el país, clasificó en el lugar 17 y además esta infección se presenta principalmente en mujeres de 20 a 44 años de edad. Esta es la única micosis registrada en el anuario desde 1988 hasta la fecha. Sin embargo, estos datos no concuerdan con los hallazgos de la revisión de la literatura, en que además de la candidiasis genital otras formas clínicas de candidiasis superficial también son frecuentes. (Reyes.et.al., 2017).

Esta discrepancia se debe al hecho de que las infecciones fúngicas no son enfermedades de declaración obligatoria. Los resultados mostrados en el estudio del *Estado actual de la etiología de Candidiasis en México* publicada en la Revista Iberoamericana de Micología en 2017 en donde se muestra que, entre 2005 y 2015, el número de informes de candidiasis superficial fue mayor (18 publicaciones) que la de la candidiasis invasiva (15 publicaciones). El tamaño de la población con sospecha de candidiasis superficial fue 4103, con una frecuencia positiva de 51.1%.

En la candidiasis invasiva la población sospechosa fue 4387 pacientes con una positividad de 49.8%. Estos datos revelan que en México, la prevalencia de candidiasis superficial es ligeramente mayor que la invasiva, probablemente porque los factores que predisponen al forma superficial (humedad, higiene inadecuada, edad pediátrica, embarazo, hipotiroidismo y diabetes mellitus tipo 2) son más frecuentes que aquellos que predisponen a la forma invasiva., es importante mencionar que en México, la diabetes tipo 2 es una de las enfermedades crónicas más frecuentes y es uno de los factores predisponentes más importantes para adquirir candidiasis superficial en comparación con factores predisponentes.

En cuanto a la etiología de la candidiasis superficial, especialmente la forma oral y genital estudios indican que *C. albicans* es la especie predominante. (Castañón, 2016). Además, que entre los pacientes con candidiasis oral, hay una mayor prevalencia de *C. albicans* en aquellos con VIH / SIDA que aquellos sin esta enfermedad. (Asmundsdottir, et. al., 2002).

## **4.14 Anfotericina B**

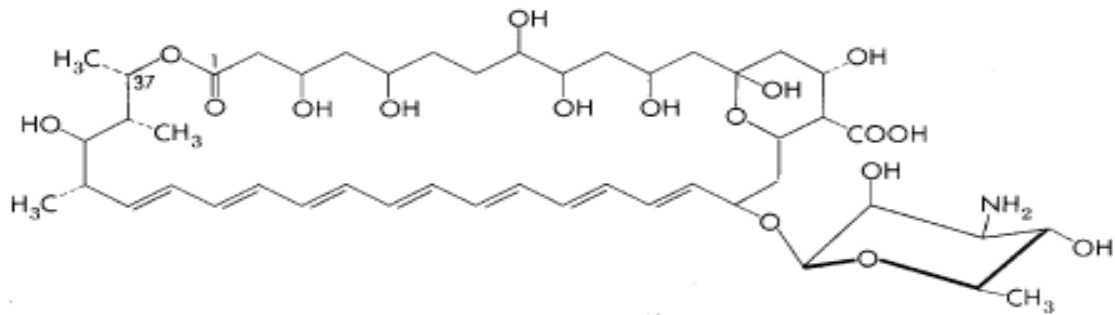
### **4.14.1 Historia**

En 1956, Gold y colaboradores descubrieron la anfotericina B al estudiar una cepa de *Streptomyces nodosus*, un actinomiceto aerobio obtenido del valle del Río Orinoco en Venezuela. (Adler-Moore y Proffitt, 2002)

### **4.14.2 Propiedades Fisicoquímicas**

Es un macrólido heptaeno. La molécula está formada por una porción hidrófila de varios carbonos hidroxilados, una porción hidrófoba que consta de siete átomos de carbono unidos por dobles enlaces (poliénico) y una cadena lateral de micosamina que es una aminodesoxihexosa como se muestra en la Imagen 9.

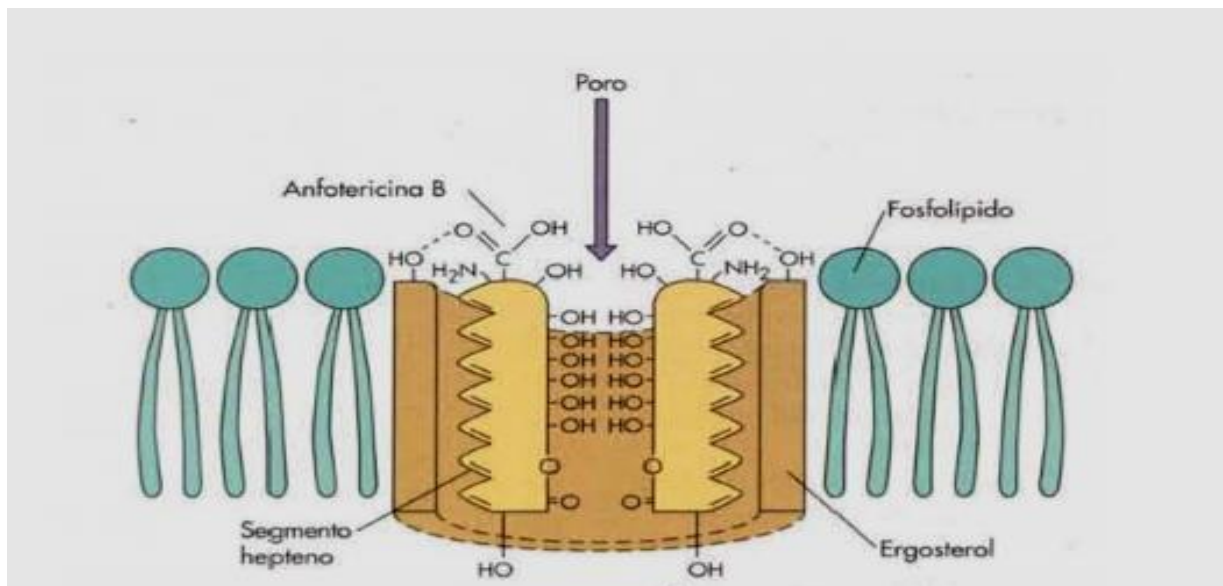
Puede comportarse como fungistático o fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada en el lugar de la infección. En la formulación convencional (anfotericina B desoxicolato) [ABD] se utilizan desoxicolato sódico y fosfato sódico como excipiente. La anfotericina B complejo lipídico [ABCL] es una formulación de anfotericina B asociada a lípidos (L- $\alpha$ -dimiristofosfatidilcolina; L- $\alpha$ - dimirstofosfatidilglicerol y anfotericina B) y la anfotericina B liposomal [ABL] es un compuesto de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diestearoilfosfatidilglicerol y anfotericina B. (Arikan, 2001)



**Imagen 9.** Estructura química de Anfotericina B. (Catalán, 2006)

#### 4.14.3 Mecanismo de acción

Se fija ávidamente a los esteroides de la membrana de células eucariotas, pero no de los procariontes. Es mayor su afinidad por el ergosterol de los hongos que por el colesterol de las células de mamíferos. Como consecuencia de esta fijación se producen alteraciones en la estructura de la membrana, probablemente por la formación de poros compuestos de pequeños agregados de anfotericina B y esteroides. Estos defectos originan una despolarización de la membrana y un aumento de la permeabilidad para protones y cationes monovalentes con pérdida de contenido citoplasmático y muerte de la célula, como se muestra en la Imagen 10. (Catalán, 2006)



**Imagen 10.** Mecanismo de acción de Anfotericina B (Arikan, 2001)

#### **4.14.4 Espectro antifúngico.**

Presenta un amplio espectro. Es activo frente *Aspergillus spp.*, *Blastomyces dermatiti* -  
dis, *Candida spp.*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y  
*Paracoccidioides brasiliensis*. También es eficaz frente a *Absidia spp.*, *Mucor spp.* y *Rhizopus*  
*spp.* y aquellas especies sensibles de los géneros de *Conidiobolus*, *Basidiobolus* y *Sporothrix*.

Como excepciones algunas especies de *Candida* como *Candida lusitaniae*, *Candida*  
*guilliermondii*, *Candida tropicalis*; *Pseudallescheria boydii* y algunas cepas de *Fusarium* y  
*Trichosporon* presentan resistencia clínica y concentraciones inhibitorias mínimas elevadas  
frente a este fármaco. (Herbrecht, 2003)

#### **4.14.5 Farmacodinamia y Farmacocinética**

La absorción oral es mínima (5%), por lo que la vía de administración de elección para el  
tratamiento de IFI es la vía intravenosa (iv). Se unen ampliamente a lipoproteínas del plasma  
(90-95%). El volumen de distribución (Vd) es elevado 4l/kg. Alcanza altas concentraciones en  
hígado, bazo, pulmón y riñones. En líquido pleural, peritoneal, sinovial y humor acuoso las  
concentraciones alcanzadas del fármaco son el 50-60% de la concentración plasmática mínima.  
Penetra mal en líquido cefalorraquídeo (LCR) 2- 4% aumentando en casos de inflamación  
meníngea. Atraviesa bien la placenta. No se disponen de ensayos clínicos que determinen la  
eliminación por leche humana ni la seguridad en la utilización en embarazadas. (Arikan, 2001)

Es metabolizada parcialmente en hígado y eliminada por bilis (<15%) y por orina en  
escasa proporción (4-5%). La vida media de eliminación inicial es de 24 horas seguida de una  
eliminación terminal más lenta de unos 15 días. (Catalán, 2006)

#### **4.14.6 Posología y forma de administración**

Todas las formulaciones de anfotericina B deben administrarse por infusión intravenosa (solución de glucosa 5%), por vía venosa central. La dosis administrada y la duración del tratamiento dependerá del tipo de anfotericina B que se utilice y la indicación clínica. La dosis diaria de anfotericina B oscila entre 0,3 a 1 mg/kg/día con una dosis acumulada recomendada máxima de 4 g. La dosis diaria del complejo lipídico es de 5 mg/kg y de la liposomal y la anfotericina B en dispersión coloidal son de 1 a 5 mg/kg. (Barrett, 2003)

#### **4.14.7 Reacciones adversas**

Entre los efectos adversos inmediatos son frecuentes fiebre, escalofríos y temblores durante la infusión del fármaco en la primera semana, a veces acompañado de cefalea, vómitos e hipotensión. La nefrotoxicidad está en relación directa con la dosis y/o la duración del tratamiento; suele ser reversible al suspender el fármaco. Más del 25% de los pacientes desarrollan hipopotasemia e hipomagnesemia. (Herbrecht, 2003) Es frecuente la anemia normocítica normocrómica. También se menciona la tromboflebitis asociada a la inyección, necrosis tisular por extravasación del fármaco; arritmias y paro cardíaco por infusión rápida. Puede aumentar la nefrotoxicidad si se la administra conjuntamente con fármacos potencialmente nefrotóxicos, puede potenciar la hipocalcemia por el uso simultáneo con corticoesteroides. La hipopotasemia puede aumentar la cardiotoxicidad de digitálicos, relajantes musculares y antiarrítmicos

La Anfotericina B sigue siendo el antifúngico de referencia en el tratamiento de las infecciones sistémicas graves y también el patrón con el que establecer comparaciones con los nuevos antifúngicos. (Catalán, 2006)

## 5. JUSTIFICACIÓN

El uso inadecuado de los diferentes grupos antifúngicos ha generado resistencia microbiana en los últimos años por esta razón, es prioritario estudiar el efecto de nuevos compuestos orgánicos que puedan ser utilizados como tratamiento ante las enfermedades infecciosas.

El presente trabajo estudiara el efecto de tres compuestos orgánicos sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán para conocer sus posibles propiedades antifúngicas contra cepas clínicas de *Candida albicans*.

## 6. HIPÓTESIS

Si los compuestos derivados de ácido carbámico (LQM 996, LQM 9012) y de un complejo de coordinación de Cobre II derivado de fenol (LQM 406) poseen propiedades antifúngicas entonces inhibirán el crecimiento de *Candida albicans* en estudios *in vitro*.



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Preparación de medios de cultivo y material biológico.

- Medio de cultivo SDA:

Suspender 65g de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

- Caldo Sabouraud:

Suspender en un litro de agua destilada 40g de dextrosa, 5g de peptona de caseína y 5g de Peptona de tejido animal. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

- Preparación e identificación de muestras clínicas de *Candida albicans*

Una vez recibidas las muestras provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla, se sembraron en Agar Dextrosa de Sabouraud (SDA) y se incubaron por 24 horas a 37°C, posteriormente fueron sembradas en CHROMagar Candida, con la finalidad de corroborar el género *Candida albicans*. Las muestras también fueron identificadas por PCR y el diagnóstico de esta especie se confirmó. Una vez identificadas fueron conservadas en un medio que consiste en Litmus Milk y glicerina estéril a -74°C. Luego se sembraron en tubo inclinado con medio Agar Yeast Mold a 4°C para su posterior uso experimental.

- Preparación de muestra ATCC 32354 y cepas clínicas de *Candida albicans*

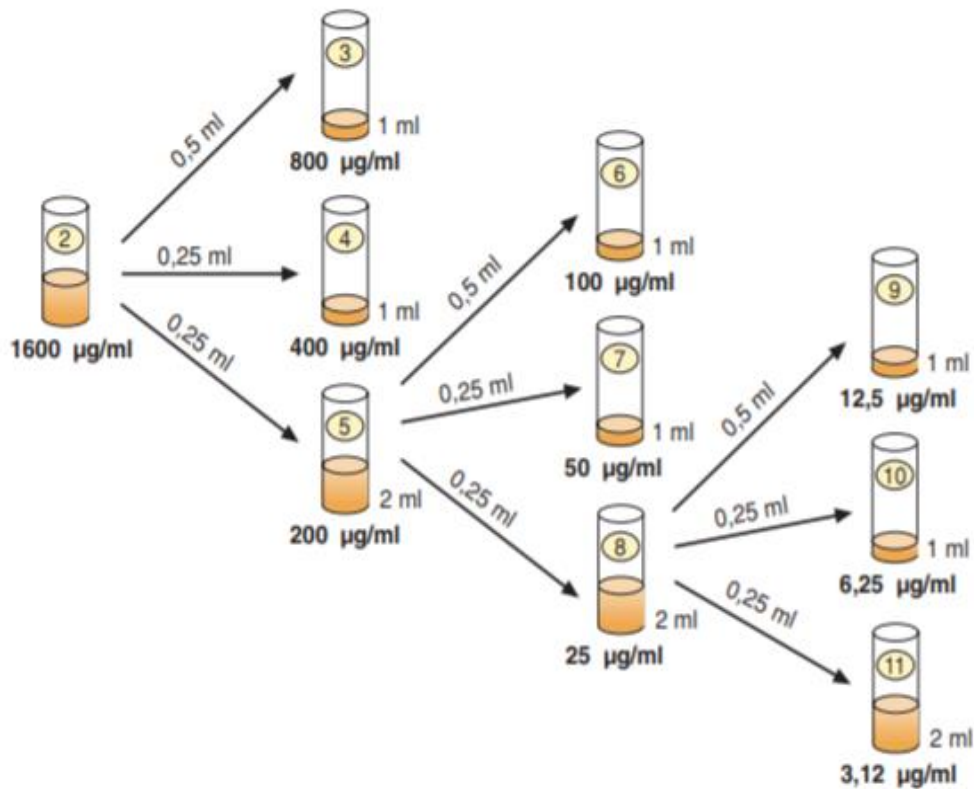
Sembrar en medio de cultivo SDA e incubar a 35°C por 24h.

- Compuestos orgánicos: Los compuestos orgánicos fueron sintetizados y proporcionados por el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM a cargo del Dr. Enrique R. Ángeles Anguiano.

## 7.2 Método de microdilución en placa para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos: Anfotericina B y Compuestos orgánicos. (Metodología empleada para cepa ATCC y cepas clínicas de *C. albicans*)

### 7.2.1 Preparación del sistema Anfotericina B: (Metodología de CLSI M27-A3, 2007)

- 1) Preparar una solución stock, pesando 0.0016g de Anfotericina B y disolverla en 1ml de dimetil sulfoxido (DMSO Reactivo Analítico) para obtener una concentración de 1600  $\mu\text{g/ml}$  (solución stock).
- 2) La dilución de Anfotericina B consiste en dos etapas, la primera se describe en la Tabla 5 y en el Diagrama 1. Esta etapa se realizó en 10 tubos con tapa estériles previamente identificados del 2 al 11.



**Diagrama 1.** Esquema de diluciones de Anfotericina B (etapa 1). (Cantón, Martín.et.al, 2007)

**Tabla 5.** Diluciones de Anfotericina B (Primera etapa)

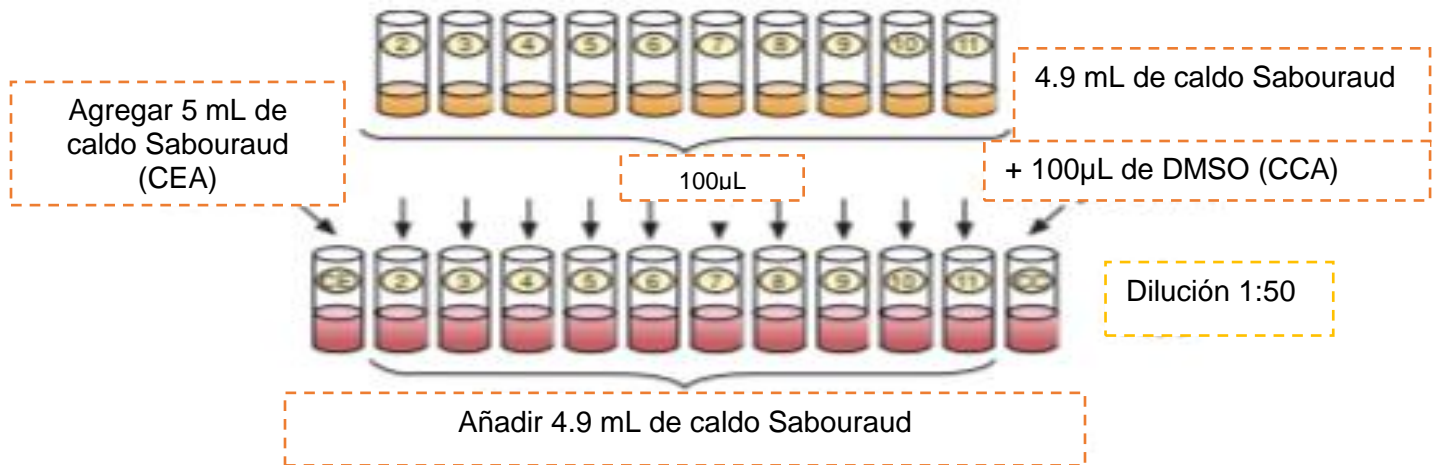
<b>Tubo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Transferir</b>	<b>A un tubo con</b>	<b>Concentración resultante</b>	<b>Tubo</b>
n° 2	1600 µg/ml	0,5 ml	0.5 ml	800µg/ml	n° 3
n° 2	1600 µg/ml	0,25 mL	0.75 ml	400µg/ml	n° 4
n° 2	1600 µg/ml	0,25 ml	1.75 ml	200µg/ml	n° 5
n° 5	200 µg/ml	0,5 ml	0.5 ml	100µg/ml	n° 6
n° 5	200 µg/ml	0,25 m	0.75 ml	50µg/ml	n° 7
n° 5	200 µg/ml	0,25 ml	1.75 ml	25µg/ml	n° 5
n° 8	25 µg/ml	0,5 ml	0.5 ml	12.5µg/ml	n° 8
n° 8	25 µg/ml	0,25 ml	0.75 ml	6.25µg/ml	n° 8
n° 8	25 µg/ml	0,25 ml	1.75 ml	3.12µg/ml	n° 8

3)\* Se realiza una dilución 1/50 tomando 100 µl de cada tubo y se transfieren a otros tubos identificados del 2 al 11 así como las iniciales CCA (control de crecimiento Anfotericina B) y CEA (control de esterilidad Anfotericina B) que contienen 4.9 ml de caldo Sabouraud a excepción del tubo CEA. Las concentraciones finales se muestran en la Tabla 6.

4)\* El tubo de control de esterilidad Anfotericina B (CEA) se prepara agregando 5 ml de caldo Sabouraud.

5)\* El tubo de control de crecimiento Anfotericina B (CCA) se prepara agregando 4.9 ml de caldo Sabouraud más 100µL de DMSO (Dimetil Sulfoxido).

\* Los pasos 3,4 y 5 se muestran en el Diagrama 2



**Diagrama 2.** Esquema de diluciones de Anfotericina B (etapa 2). Modificado de (Cantón, Martín.et.al, 2007)

6) Estos tubos con las concentraciones resultantes deseadas se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 6.** Concentraciones finales de Anfotericina B.

<b>Tubo</b>	<b>Concentración resultante [ µg/ml]</b>
n° 2	32.65
n° 3	16.32
n° 4	8.16
n° 5	4.08
n° 6	2.04
n° 7	1.020
n° 8	0.510
n° 9	0.255
n° 10	0.127
n° 11	0.063

7) Los tubos con la concentración deseada incluyendo los tubos de CEA y CCA se pueden guardar para su posterior uso experimental a -4°C.

### **7.2.2 Preparación del sistema: Compuestos Orgánicos**

- Preparación de tubos: (solución stock de compuestos orgánicos)

1. Se preparan en tubos estériles con tapa previamente identificados con nombre de compuesto y fecha de preparación de la siguiente manera:

➤ **LQM 406**

- 1) Pesar 0.0014g del compuesto.
- 2) Disolver en 1000µl de agua desionizada estéril.
- 3) Agitar en vortex hasta su disolución total.

➤ **LQM 996**

- 1) Pesar 0.0030g del compuesto.
- 2) Disolver en 100µl de DMSO hasta disolverse.
- 3) Agregar 900µl de agua desionizada estéril.
- 4) Agitar en vórtex hasta su disolución total.

➤ **LQM 9012**

- 1) Pesar 0.0016g del compuesto.
- 2) Disolver en 100µl de DMSO hasta disolverse.
- 3) Agregar 900µl de agua desionizada estéril.
- 4) Agitar en vórtex hasta su disolución total.

- Preparación de tubos CE y CC para el sistema compuestos orgánicos

1. El tubo de control de esterilidad de compuestos orgánicos (CE) se prepara en un tubo estéril previamente identificado agregando 2 ml de caldo Sabouraud.
2. El tubo de control de crecimiento de compuestos orgánicos (CC) se prepara en un tubo estéril previamente identificado agregando 100µl de DMSO+900µl de agua estéril desionizada.

### **7.2.3 Preparación de inóculo de cepa ATCC 32354 y cepas clínicas de *C. albicans* (ambos sistemas).**

1. Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias  $\geq 1$  mm y de 24 h de crecimiento en medio SDA que se resuspenden en un tubo que contiene 3 ml de solución salina al 0.9%. Se agita y se ajusta al 0.5 del Nefelometro de McFarland. Se toman 10 µl de esta solución y se transfieren a un tubo con 10 ml de caldo Sabouraud. Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas microtiter.

### **7.2.4 Llenado de placas microtiter: Sistema compuestos orgánicos\***

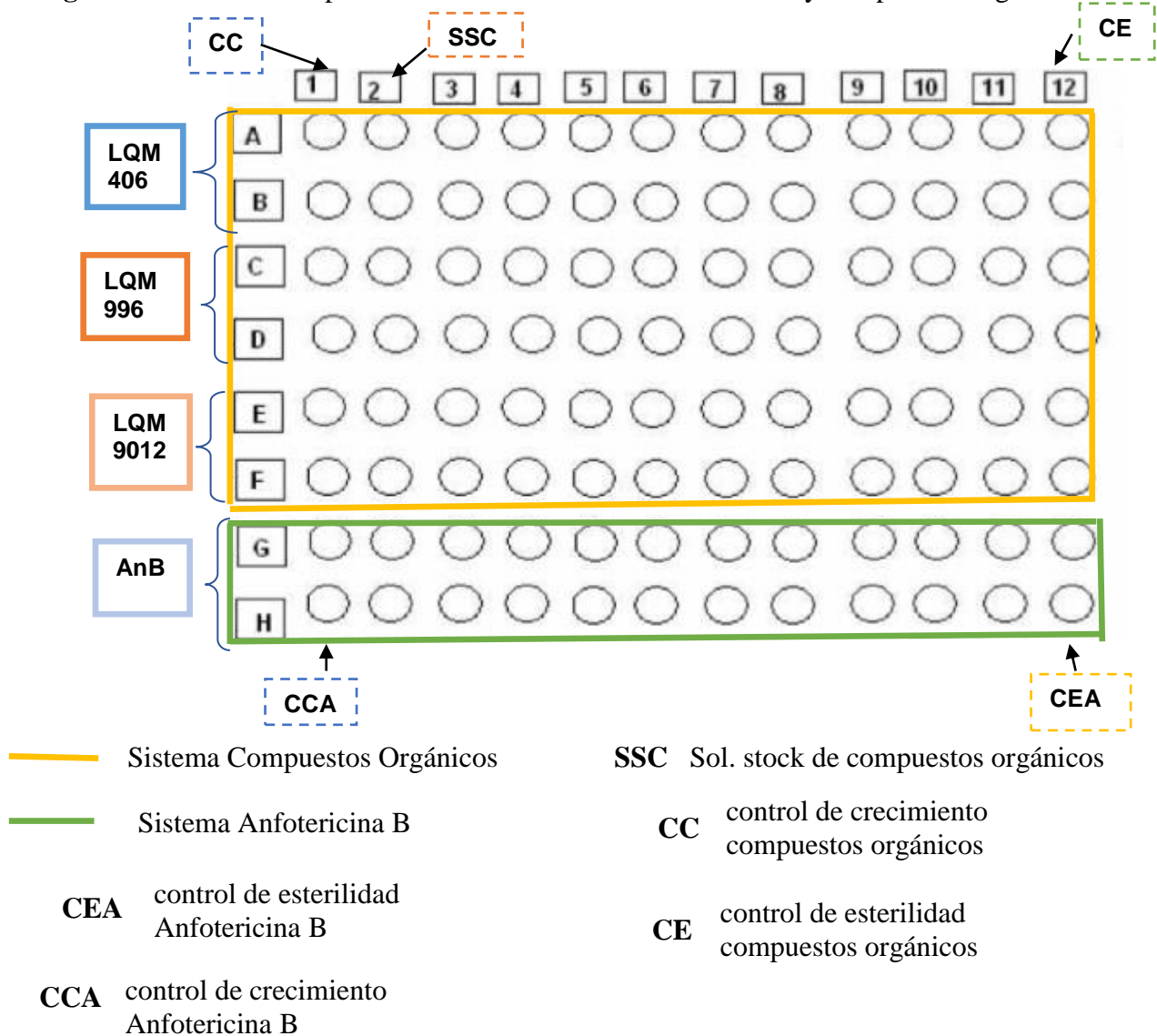
1. Llenar con 100 µl de agua 1B-1F,3A-3H,4A-4H, hasta 11A-11H.
2. Agregar a pozo 1A 200 µl del tubo CC.
3. Agregar a pozos 2A-2F 200 µl del tubo stock de compuesto orgánico a probar (considerar que se realiza por duplicado).
4. Realizar diluciones dobles para cada compuesto incluyendo el CC (1A-1F) (los últimos 100µl se desechan).
5. Llenar 12 A-12 F con 200 µl de caldo Sabouraud (CE).
6. Agregar a todos los pozos (excepto 12A-12H) 100 µl de tubo con inóculo de *C. albicans*.

## 7.2.5 Llenado de placas microtiter: Sistema Antifúngico de Referencia\*

1. Agregar 100 µl del tubo CCA a los pozos 1G y 1H.
2. Agregar tubos de anfotericina B de concentración final (ver tabla 6), como se indica en el tubo identificado del 2 al 11. ej. del tubo no.2 tomar 100 µl y agregar a pozo 2G y 100µl al pozo 2H y así respectivamente con cada concentración.
3. Agregar 200 µl del tubo CEA a los pozos 12G y 12 H.

\*Los puntos 7.2.4 y 7.2.5 se resumen en el Diagrama 3.

**Diagrama 3.** Llenado de placa microtiter: Sistema Anfotericina B y compuestos orgánicos.



## 7.2.6 Concentración resultante después de realizar diluciones dobles de compuestos orgánicos

**Tabla 7.** Concentración de cada sistema de compuestos orgánicos LQM.

LQM 406			LQM 996			LQM 9012		
No. de pozo	Dil.	Conc. [µg/ml]	No. de pozo	Dil.	Conc. [µg/ml]	No. de pozo	Dil.	Conc. [µg/ml]
2A -2B	1:1	1400	2C -2D	1:1	3000	2E -2F	1:1	1600
3A-3B	1:2	700	3C-3D	1:2	1500	3E-3F	1:2	800
4A-4B	1:4	350	4C-4D	1:4	750	4E-4F	1:4	400
5A-5B	1:8	175	5C-5D	1:8	375	5E-5F	1:8	200
6A-6B	1:16	87.5	6C-6D	1:16	187.5	6E-6F	1:16	100
7A-7B	1:32	43.75	7C-7D	1:32	93.75	7E-7F	1:32	50
8A-8B	1:64	21.87	8C-8D	1:64	46.87	8E-8F	1:64	25
9A-9B	1:128	10.93	9C-9D	1:128	23.43	9E-9F	1:128	12.5
10A-10B	1:256	5.46	10C-10D	1:256	11.71	10E-10F	1:256	6.25
11 A-B	1:512	2.73	11C-11D	1:512	5.85	11E-11F	1:512	3.12

*En la tabla 7 se muestra cada sistema de compuesto LQM utilizado, expresado en números y letras de placa microtiter que corresponden al pozo y la concentración resultante al realizar la dilución. Conc=concentración, Dil=dilución.*

## 7.2.7 Incubación y lectura de placa microtiter

1. Se incuba a 35°C por 24 horas.
2. La lectura de resultados se realiza visualmente exactamente a las 24h de incubación.



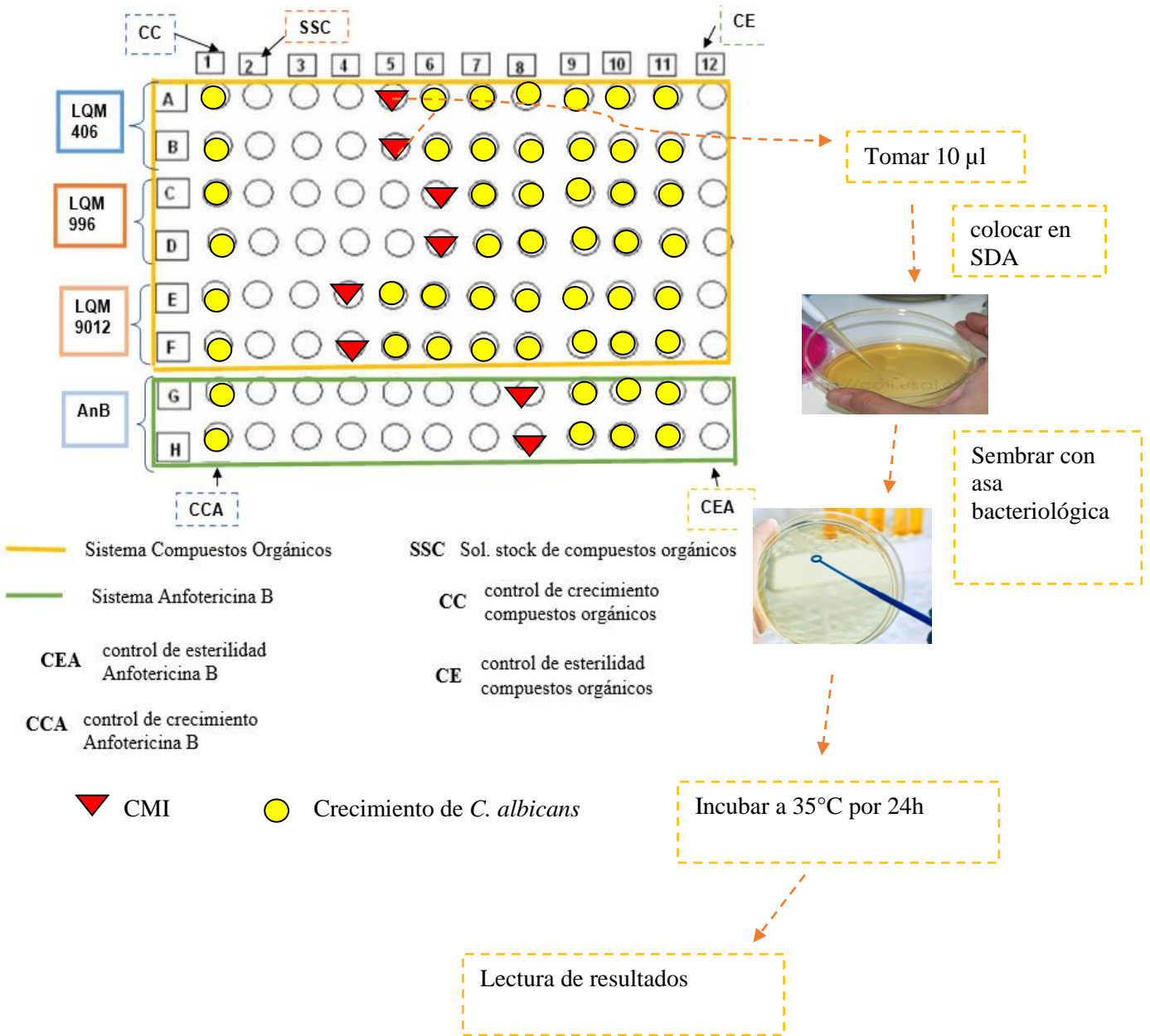
3. Se identifica la CMI de los compuestos orgánicos por duplicado, así como del antifúngico de referencia (Anfotericina B)
4. Se anotan los resultados de CMI de cada duplicado.

### **7.2.8 Actividad de los compuestos en medio SDA**

1. Tomando la CMI de cada compuesto se procede a tomar con una micropipeta 10 µl de cada pozo y se colocan en la caja Petri con medio de cultivo SDA. (se realiza por cada duplicado). \*
2. Posteriormente se toma con un asa bacteriológica y se siembra por toda la caja con medio. \*
3. Se incuba a 35°C por 24 horas. \*
4. La lectura es visual y se identifica el crecimiento de *C. albicans*.
5. Se toma como actividad fungicida (FC) si no hay crecimiento o fungistática (FT) si hay crecimiento.
6. Se identifica la CMF de cada compuesto, así como del Antifúngico de Referencia.

\*Los pasos 1,2 y 3 se describen en el Diagrama 4.

**Diagrama 4.** Actividad de los compuestos en medio SDA.



**Tabla 8.** Información general de cepas clínicas provenientes del HRT.

No. de Cepa	Clave	Sexo	Tipo de muestra	Diagnostico confirmatorio
1	L17-2-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>
2	L17-3-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>
3	L17-4-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>
4	L17-6-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
5	L17-7-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
6	L17-8-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
7	L17-12-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
8	L17-13-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
9	L17-14-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
10	L17-15-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
11	L17-16-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
12	L17-17-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
13	L17-20-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
14	L17-21-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
15	L17-25-18	INP	Secreción	<i>Candida albicans</i>
16	L17-29-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
17	L17-32-18	Femenino	Secreción	<i>Candida albicans</i>
18	L17-33-18	Masculino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
19	L17-34-18	Masculino	Secreción	<i>Candida albicans</i>
20	L17-36-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
21	L17-39-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
22	L17-45-18	Femenino	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>
23	L17-49-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
24	L17-50-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
25	L17-52-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
26	L17-54-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
27	L17-55-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
28	L17-56-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
29	L17-58-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>
30	L17-59-18	Masculino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
31	L17-60-18	Femenino	Secreción	<i>Candida albicans</i>
32	L17-61-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
33	L17-62-18	Masculino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
34	L17-65-18	Masculino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
35	L17-70-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>
36	L17-71-18	Femenino	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>
37	L17-72-18	INP	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>
38	L17-75-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>
39	L17-77-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
40	L17-78-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
41	L17-80-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>
42	L17-81-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
43	L17-82-18	Femenino	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>
44	L17-83-18	Femenino	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>
45	L17-85-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
46	L17-86-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
47	L17-87-18	Masculino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>
48	L17-88-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
49	L17-90-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>
50	L17-101-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>

En la tabla 8. Se muestra la clave de cada cepa clínica utilizada, el sexo del paciente al que pertenece y el tipo de muestra de donde provienen, así como del diagnóstico confirmatorio que se realizó en el laboratorio 17 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC, UNAM.

**Tabla 9.** Identificación de pacientes por sexo de las cepas clínicas utilizadas.

Sexo	Total	Porcentaje
Femenino	34	68%
Masculino	6	12%
INP	10	20%

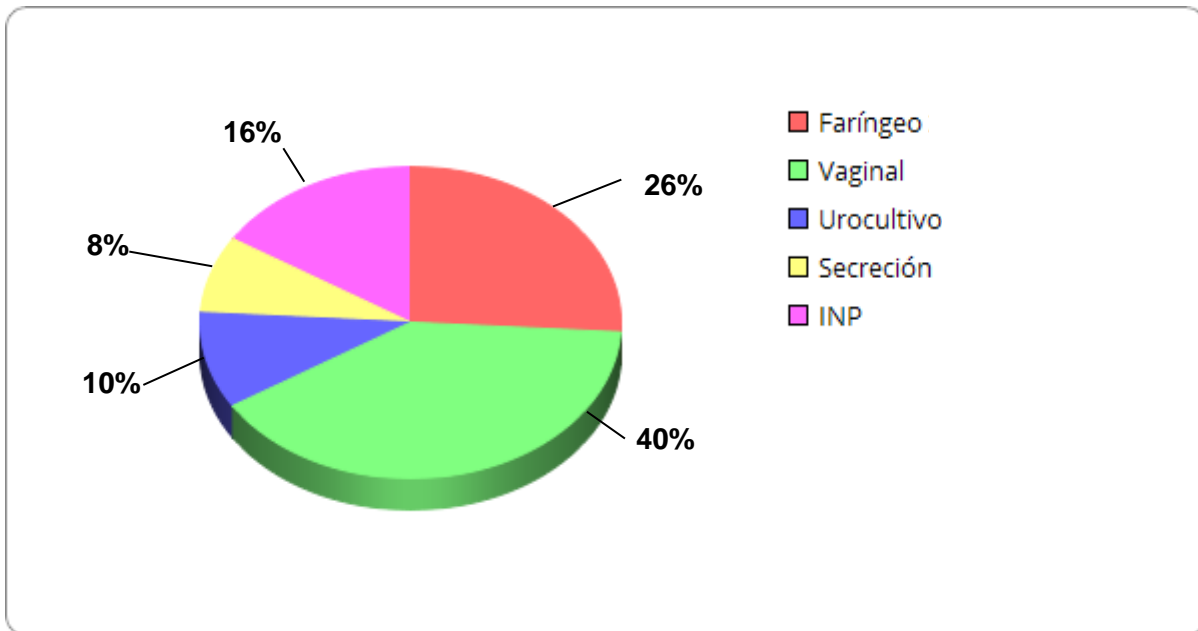
En la tabla 9 se muestran la cantidad total de hombres y mujeres de las cepas clínicas analizadas. INP=información no proporcionada por el HRT.

**Tabla 10.** Identificación del tipo de muestras de cepas clínicas

Sexo	Aislamiento				
	Faríngeo	Vaginal	Urocultivo	Secreción	INP
Femenino	8	20	4	2	0
Masculino	5	NA*	0	1	0
INP	0	0	1	1	8
<b>Total</b>	13	20	5	4	8

En la tabla 10 se muestra en resumen los datos de las cepas clínicas utilizadas, el sexo de paciente y el tipo de aislamiento de donde se obtuvo la muestra. INP=Información no proporcionada. NA=no aplica.

**Gráfica 1.** Porcentaje de tipo de aislamiento clínico en cepas analizadas.



En la gráfica 1 se presenta el porcentaje de tipo de aislamiento clínico de las cepas provenientes del HRT utilizadas en este estudio.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La creación de nuevas sustancias antifúngicas representa un gran reto para la investigación biomédica. Algunos autores consideran que la tendencia en la tasa de producción de nuevos fármacos es más lenta que la capacidad que tienen los microorganismos para generar resistencia. Por esta razón ha sido importante llevar a cabo estudios de perfiles de susceptibilidad antifúngica.

Las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos son influenciadas por un número de variables técnicas, que incluyen, el tamaño del inóculo y la preparación de este, la formulación, el pH del medio, la duración, la temperatura de incubación, y el criterio usado para la determinación del punto final.

Tomando en cuenta los criterios antes mencionados en la experimentación, se utilizó el caldo glucosado de Sabouraud que por sus ingredientes proporciona el crecimiento adecuado siendo la peptona de caseína y la peptona de carne la fuente de nitrógeno, vitaminas y carbono necesario para el crecimiento de levaduras y la glucosa es la fuente de energía con un pH final de  $5.6 \pm 0.2$ , la incubación fue a una temperatura controlada de  $35^{\circ}\text{C}$ , la cual es una temperatura óptima para el crecimiento de levaduras, la lectura de todas las placas fue a las 24 horas.

La interpretación de la CMI se definió como la menor concentración de los compuestos frente a la cual las levaduras ensayadas no exhibieron crecimiento visible, el criterio de crecimiento fue una turbidez definida o un solo botón sedimentado. En la determinación del punto final, se consideró el desarrollo o su falta en el pozo en estudio en comparación con las características de crecimiento en el pozo de control de crecimiento. La determinación de la actividad fungicida o fungistática de todos los compuestos utilizados fue evaluada al tomar de la

placa microtiter el pozo de CMI resultante y posteriormente ser sembrada en medio de cultivo SDA por duplicado, se definió como actividad fungicida aquel compuesto que eliminaba totalmente el crecimiento de las levaduras en el medio y con actividad fungistática el compuesto que no eliminaba por completo el crecimiento de estas.

Así mismo fueron consideradas las propiedades fisicoquímicas de los compuestos utilizados considerando la solubilidad por lo que fueron disueltos en DMSO también se controló el porcentaje de este considerando que se ha descubierto por trabajos en 1968 de los doctores H. Bash y H. Gadebush en el cual demostraron que una dilución al 30% detiene el crecimiento *in vitro* de *C. albicans*. Esto fue monitoreado en la experimentación por los controles de crecimiento en cada placa.

Este trabajo se enfocó en la evaluación de compuestos orgánicos con posible actividad antifúngica, estos compuestos LQM no habían sido evaluados contra una levadura y se desconocían las concentraciones efectivas para analizarlos. Se decidió estudiar estos compuestos por sus antecedentes de actividad biológica ya que los carbamatos están teniendo un rol importante en la química medicinal por su estabilidad química y su capacidad de incrementar la permeabilidad a través de las membranas celulares. Estos atributos de los carbamatos orgánicos se han explotado en el diseño de fármacos (Ghosh,2015). También se ha estudiado el cobre contra *Candida albicans*, y se demostró que las cepas fueron inhibidas en su crecimiento y alteradas en morfología en contacto con cobre.

Esta técnica se probó primero con la cepa ATTC 32354 y como se muestra en la Tabla 11. la CMI y CMF coincidieron en la evaluación en placa microtiter y en medio SDA. En la

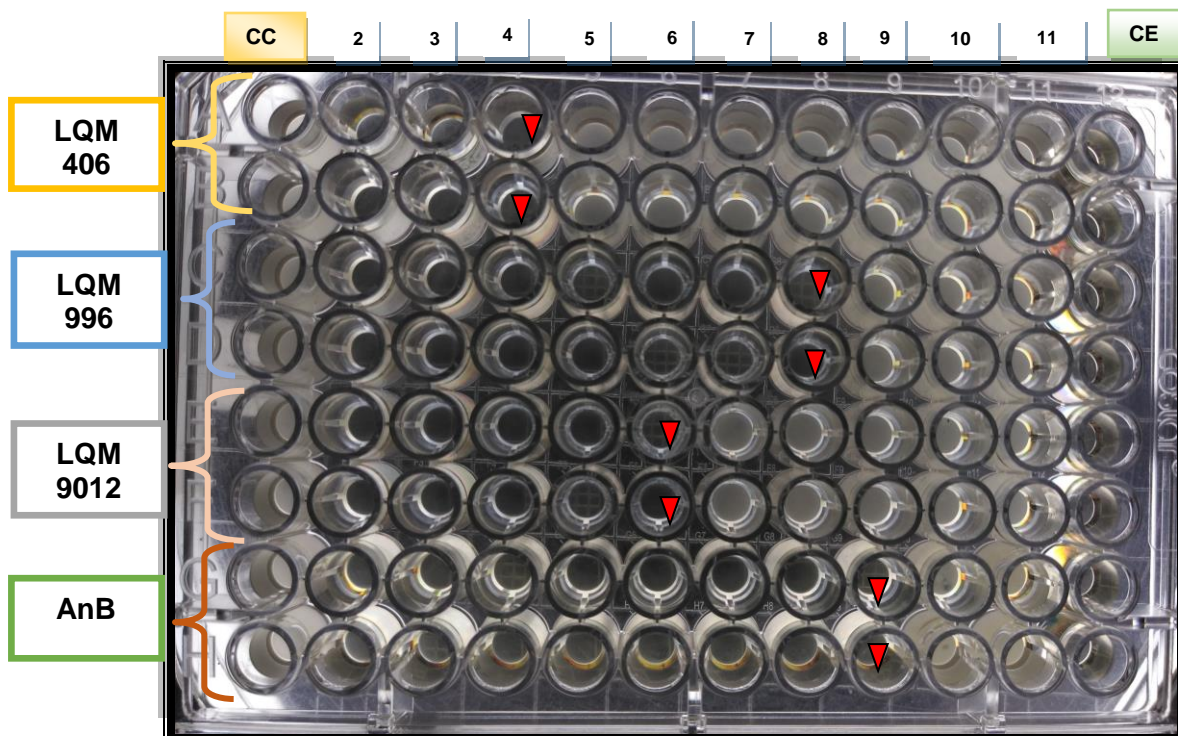
Imagen 11 se presenta una de las placas donde se evaluó la CMI de esta cepa; estos datos fueron tomados en cuenta como referencia en la experimentación utilizando las cepas clínicas.

**Tabla 11.** Resultados de la evaluación con la cepa *C. albicans* ATCC 32354

Compuesto	CMI [µg/ml]	Actividad en placa SDA FC/FT	CMF* [µg/ml]
LQM 406	350	FC	350
LQM 996	46.875	FC	46.875
LQM 9012	100	FC	100
Anfotericina B	0.255	FC	0.255

En la tabla 11 se muestran los resultados de la evaluación de la técnica con la cepa ATCC 32354 de *Candida albicans*, la CMI=concentración mínima inhibitoria, CMF=concentración mínima fungicida, la actividad fungicida (FC) ó fungistática (FT) que presentó.

**Imagen 11.** CMI de cepa ATCC 32354 de *Candida albicans*.



En la imagen 11 se muestra la placa de la evaluación de la técnica con la cepa ATCC 32354 de *C. albicans*; donde: No.2=dil.1:1, No.3=dil 1:2, No.4=dil.1:4, No.5= dil.1:8, No.6= dil.1:16, No.7=dil.1:32, No.8=dil.1:64, No.9=dil. 1:128, No.10=dil.1:250, No.11=dil.1:512. Se observa el CE= control de esterilidad (sin crecimiento) y CC=control de crecimiento (con crecimiento). También se muestran los sistemas de compuestos orgánicos y antifúngico de referencia. La flecha roja indica la concentración mínima inhibitoria.

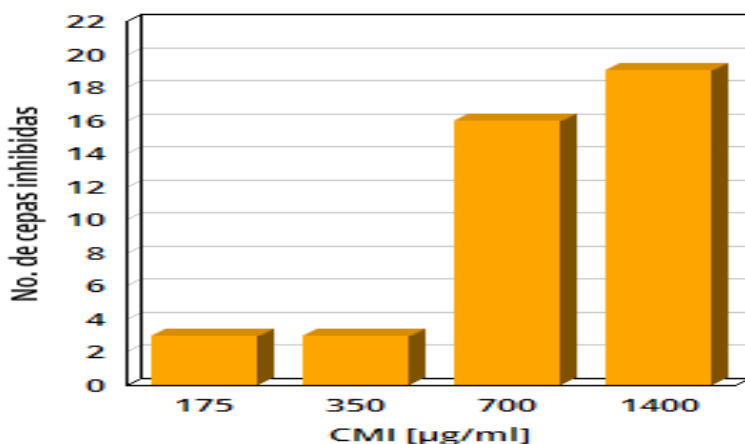
En el caso de las cepas clínicas los intervalos de CMI en placa microtiter se muestran en la Tabla 12, en donde solo el compuesto LQM 406 resultó con el 82% de cepas clínicas inhibidas. Las gráficas 2, 3, 4 y 5 permiten apreciar los intervalos de CMI y el número de cepas inhibidas por cada compuesto.

**Tabla 12.** Resultados de la CMI de cepas clínicas de *Candida albicans*

Compuesto	% de cepas inhibidas	Intervalo de CMI [µg/ml]	Intervalo de confianza	Promedio
LQM 406	82	175 - 1400	827.50 - 1093.23	960.36
LQM 996	100	23.43 - 750	357.87 - 502.59	430.23
LQM 9012	100	50 - 1600	429.67 - 686.32	558
Anfotericina B	100	0.255 - 4.08	0.82 - 1.19	1.00

En la tabla 12 se muestran los resultados de los intervalos de CMI de las cepas clínicas que fueron inhibidas, el intervalo de confianza del 95% al realizar análisis estadístico ( $p < 0.05$ ) y el promedio que presentaron.

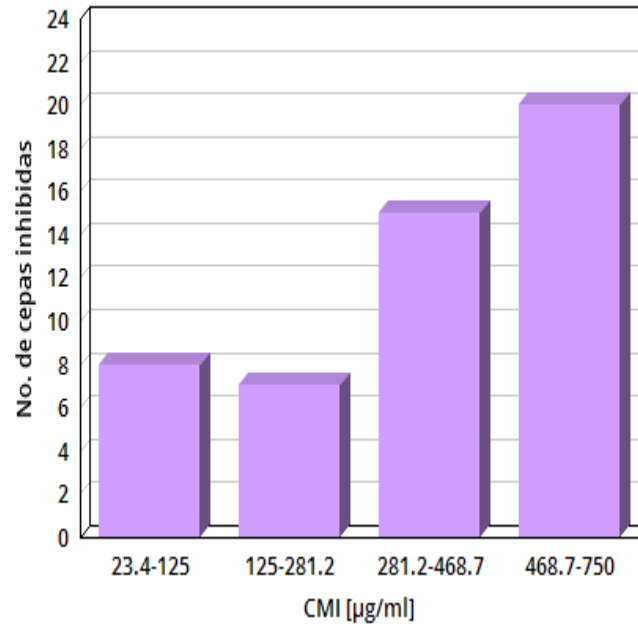
**Gráfica 2.** CMI de LQM 406 contra cepas clínicas de *C. albicans*



En la gráfica 2. Se muestra las 41 cepas clínicas de *C. albicans* inhibidas con el compuesto LQM 406.

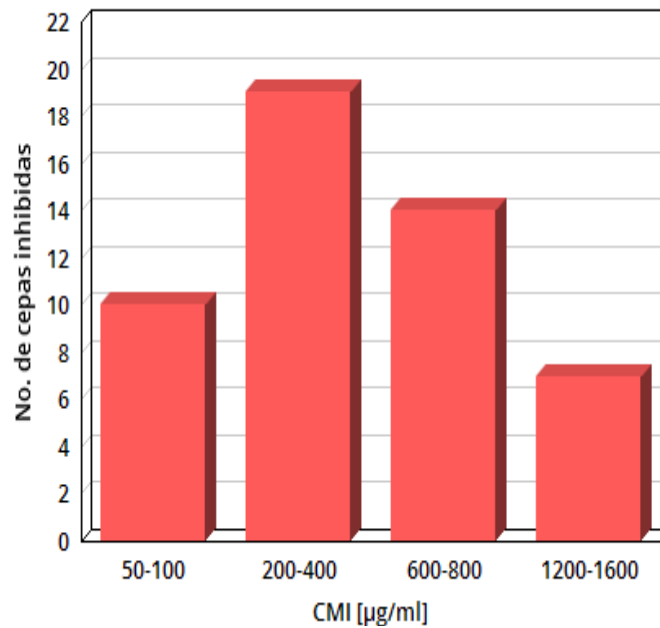


**Gráfica 3.** CMI de LQM 996 contra cepas clínicas de *C. albicans*.



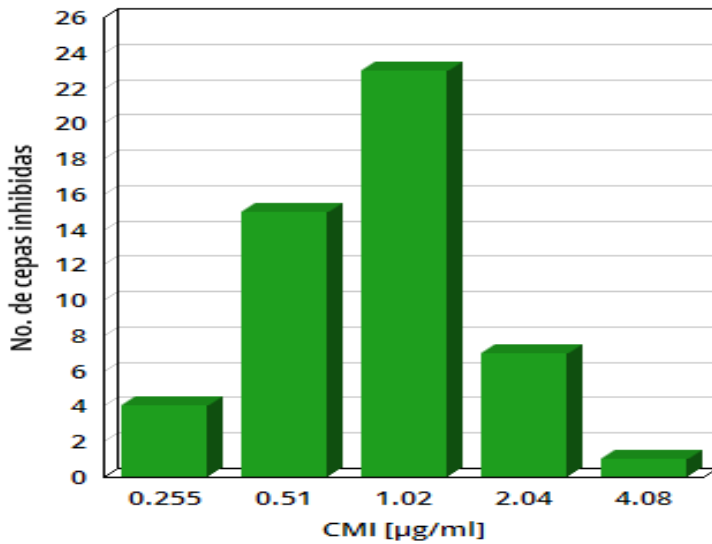
En la gráfica 3. Se muestra el número de cepas clínicas inhibidas y los intervalos de CMI que presentaron con el compuesto LQM 996.

**Gráfica 4.** CMI de LQM 9012 contra cepas clínicas de *C. albicans*.



En la gráfica 4. Se muestra el número de cepas clínicas inhibidas y los intervalos de CMI que presentaron con el compuesto LQM 9012.

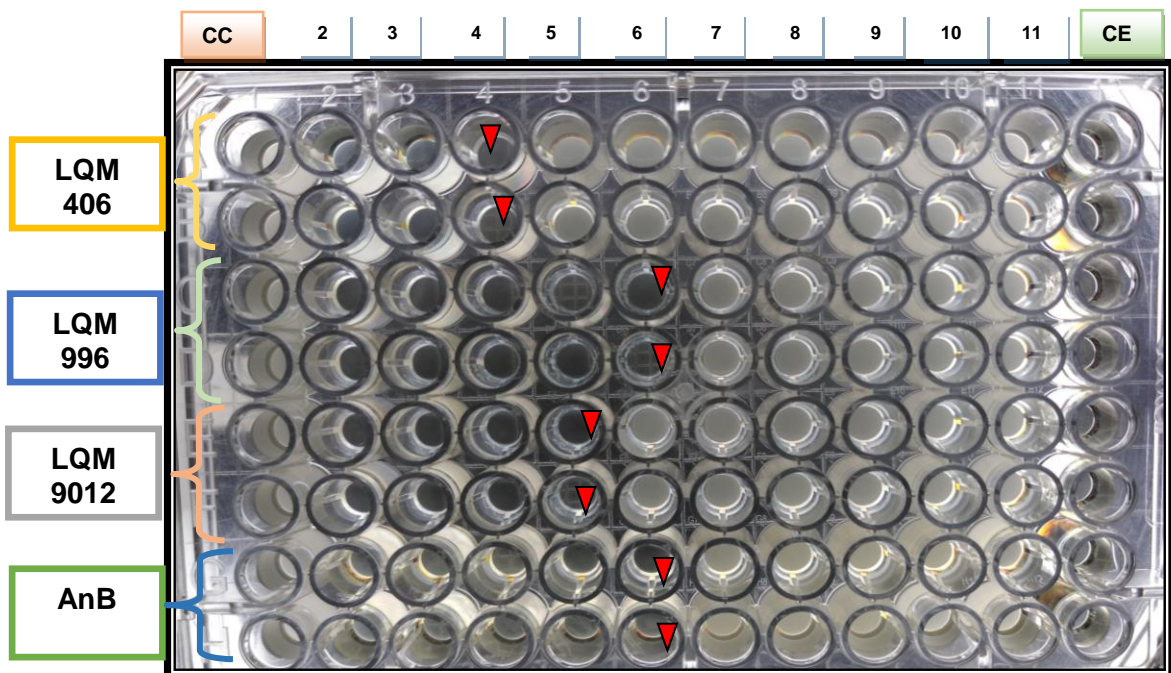
**Gráfica 5.** CMI de Anfotericina B contra cepas clínicas de *C. albicans*



En la gráfica 5. Se muestra el número de cepas clínicas inhibidas y los intervalos de CMI que presentaron con Anfotericina B.

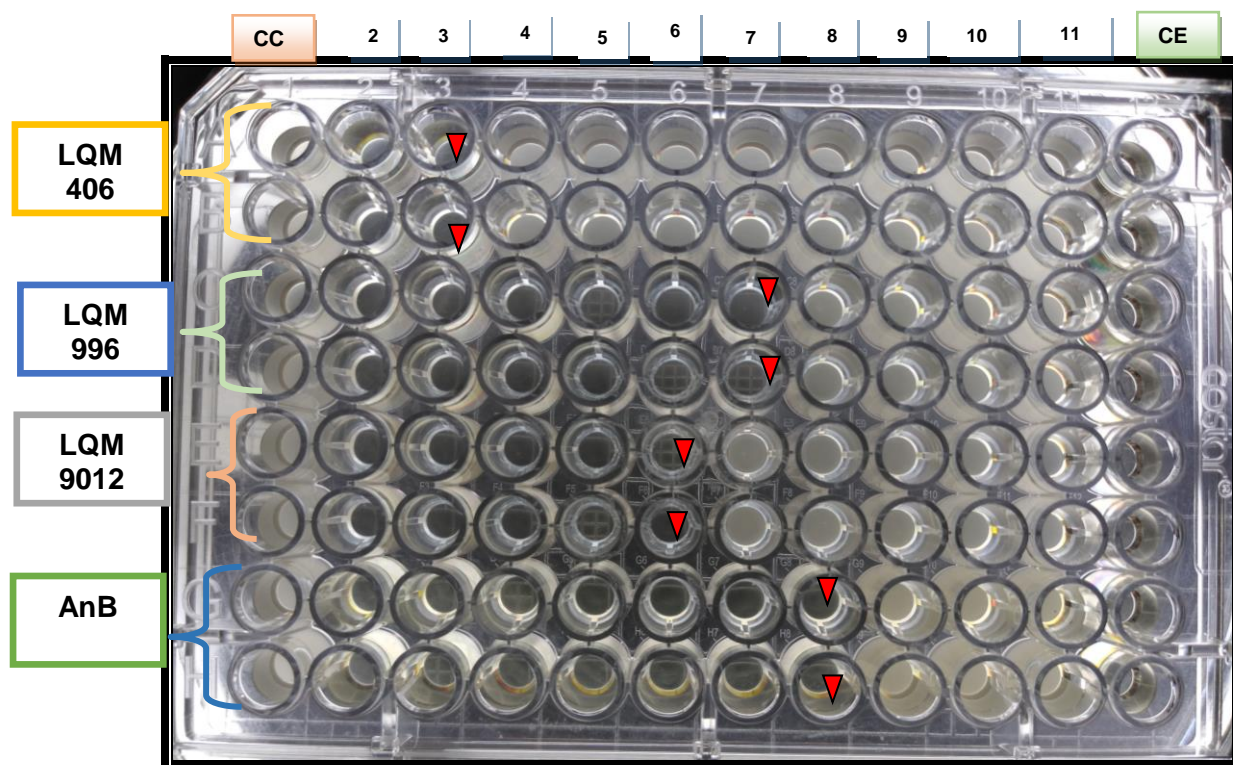
Las imágenes 12 y 13 muestran el resultado de lectura e indican la CMI que presentaron el sistema compuestos orgánicos y sistema Anfotericina B de las cepas L17-59-18 y L17-21-18.

**Imagen 12.** Placa microtiter de cepa clínica *Candida albicans* L17-59-18.



En la imagen 12 se muestra los resultados en placa de la cepa L17-59-18 de *C. albicans*; donde: No.2=dil.1:1, No.3=dil 1:2, No.4=dil.1:4, No.5= dil.1:8, No.6= dil.1:16, No.7=dil.1:32, No.8=dil.1:64, No.9=dil.1:128, No.10=dil.1:250, No.11=dil.1:512. Se observa el CE= control de esterilidad (sin crecimiento) y CC=control de crecimiento (con crecimiento). La flecha roja indica la concentración mínima inhibitoria.

**Imagen 13.** Placa microtiter de cepa clínica *Candida albicans* L17-21-18.



En la imagen 13 se muestra los resultados en placa de cepa L17-21-18 de *C. albicans*; donde: No.2=dil.1:1, No.3=dil 1:2, No.4=dil.1:4, No.5= dil.1:8, No.6= dil.1:16, No.7=dil.1:32, No.8=dil.1:64, No.9=dil.1:128, No.10=dil.1:250, No.11=dil.1:512. Se observa el CE=control de esterilidad (sin crecimiento) y CC=control de crecimiento (con crecimiento). También se muestran los sistemas de compuestos orgánicos y antifúngico de referencia. La flecha roja indica la concentración mínima inhibitoria.

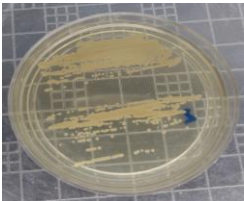
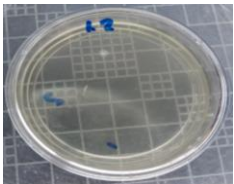
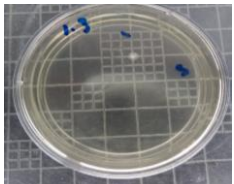
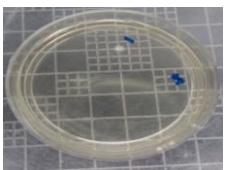
La CMF se evaluó con la actividad que presentaron los compuestos contra las cepas clínicas en medio SDA y como se indica en la Tabla 13 solo para el caso del compuesto LQM 406 se obtuvo 85.4 % de actividad fungicida en el intervalo de concentración de 700-1400  $\mu\text{g/ml}$  y 14.6% de actividad fungistática en el intervalo 175-350  $\mu\text{g/ml}$ , y para el caso de los demás compuestos incluyendo Anfotericina B la CMI coincidió con la CMF en todas las cepas clínicas resultando en un 100% fungicidas. Esta actividad se representa también en la Tabla 14 con los resultados de la cepa L17-32-18.

**Tabla 13.** Resultados de la actividad en placa con medio SDA y de CMF en cepas clínicas de *C. albicans*

Compuesto	Actividad en placa SDA	CMF [µg/ml]	Porcentaje de actividad fungicida	Porcentaje de actividad fungistática
LQM 406	Fungicida	700 - 1400	85.4%	14.6%
	Fungistática	175 - 350		
LQM 996	Fungicida	23.43 - 750	100%	0%
LQM 9012	Fungicida	50 - 1600	100%	0%
Anfotericina B	Fungicida	0.255 - 4.08	100%	0%

En la tabla 13 se presentan los resultados de actividad en placa y CMF resultante, así como el porcentaje de actividad fungicida o fungistática de cada compuesto.

**Tabla 14.** Resultados de la actividad que presentó la cepa L17-32-18

Compuesto	Actividad en placa con medio SDA	Actividad en medio SDA	CMF [µg/ml]
LQM 406		FT	ND
LQM 996		FC	375
LQM 9012		FC	400
Anfotericina B		FC	0.255

En la tabla 14 se muestra la actividad fungicida (FC) o (FT) fungistática de los compuestos contra la cepa L17-32-18 de *C. albicans* en medio SDA después de tomar su CMI en placa microtiter y la CMF a la que se presentó.  
ND= no determinada

En general los tres compuestos analizados poseen bencenos en sus estructuras, estos anillos debido a su baja polaridad se introducen más fácilmente a las células por lo que estos compuestos tienen actividad sobre la célula fúngica, aunque esto no siempre asegura su efectividad para tener un efecto antifúngico, pero contener electrones en movimiento en sus anillos, facilita la interacción biológica (Botello, 2005). La presencia de un átomo de nitrógeno unido a un grupo carbonilo también contribuye a esta actividad. (Korolkovas, et. al., 1983)

Los tres compuestos tienen en común el enlace C -Cl el cual es bastante estable y permite su inserción en diversos heterocíclicos de valor farmacológico. (Zaldani, et. al., 2010)

Además, tienen presente al Cloro en sus estructuras y estudios indican que la incorporación de halógenos como el Cloro en el compuesto líder resulta en análogos más lipofílicos y menos solubles en agua, por esta razón se usan para aumentar la permeabilidad de las membranas.

También se sabe que la introducción de grupos metilo en nuevos compuestos orgánicos generalmente aumenta la lipofilicidad y reduce su solubilidad en agua, puede mejorar la facilidad de absorción de un análogo a una membrana biológica, pero hará más difícil que su paso desde ésta al medio acuoso intracelular. (Herrera, 2016)

Con respecto a lo anterior los compuestos LQM 996 y LQM 9012 tienen como sustituyente al 4-clorofenil y 4-clorobencil respectivamente por lo que el grupo funcional del compuesto LQM 996 se encuentra más cerca del anillo aromático (Ver tabla 1) y como se muestra en la tabla 14 se obtuvo un promedio de CMI para LQM 996 de 430.23  $\mu\text{g/ml}$  y para LQM 9012 de 558  $\mu\text{g/ml}$ , lo cual comprueba mejor afinidad y efecto biológico a menor concentración del compuesto LQM 996.

Los compuestos LQM 996 y LQM 9012 son carbamatos que por sus antecedentes permiten especular que deberían tener acción, ya sea sobre estructuras celulares por ejemplo la membrana citoplasmática y acción en organelos como son los ribosomas, constituyentes moleculares (ergosterol) o vías metabólicas comunes de levaduras. Esta preposición está avalada por el trabajo “Actividad Antifúngica de Quitosano carbamato de etilo (QCE) en *C. albicans*” de Valenzuela et.al., 2003, en el cual los resultados de microscopia óptica mostraron que las células de *C. albicans* en adición de QCE se apreciaron de menor tamaño (2-3 $\mu$ m de diámetro), no presentaron gemación y algunas se mostraron colapsadas pero no rotas, posiblemente debido a la salida de material citoplasmático, además se observó que estas células no presentaron tubo germinativo y pseudomicelio, esto se podría deber a que alguna de las vías metabólicas no operan o algunos metabolitos esenciales no están siendo sintetizados para formar pseudomicelio.

Como referencia también tenemos al Tolnaftato (Imagen 3) un derivado de tiocarbamato con propiedades fungicidas o fungistáticas el cual es un inhibidor selectivo, reversible y no competitivo de la escualeno-2,3-epoxidasa unida a la membrana, una enzima implicada en la biosíntesis del ergosterol. Este punto de acción fue confirmado por la inhibición directa de la enzima en *C.albicans*. (Ryder, et.al., 1986). La inhibición conduce a la acumulación de escualeno y a una deficiencia en ergosterol, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana y altera la organización celular causando la muerte de las células. Además, el tolnaftato también puede distorsionar las hifas y obstaculiza el crecimiento micelial en hongos susceptibles.

En el caso del compuesto LQM 406 que presenta Cu II en su estructura, un metal que tiene antecedentes de actividad biológica en hongos, entre ellos *C. albicans*. Estudios recientes indicaron que la actividad antifúngica ocurre mediante un proceso complejo denominado

“muerte por contacto” en el cual se produce fundamentalmente un daño a la membrana citoplasmática, que se despolariza; no está claro aún si el daño afecta a las proteínas o los lípidos de la membrana. Esto facilita la entrada de iones de cobre a la célula, amplificando el daño y secundariamente se produce un aumento en el estrés oxidativo, sin apreciar daño aparente del ADN de estas células. (Prado et. al., 2012)

Por lo que respecta al antifúngico de referencia se ha sugerido previamente que la CMI utilizando la técnica de microdilución en placa de la CLSI para el caso de anfotericina B se consideran cepas susceptibles en el rango de 0-0.8µg/ml; mientras que las cepas moderadamente susceptibles se inhiben en concentraciones de 1.6-3.25 µg/ml y las resistentes a > 6.45µg/ml. Sin embargo, a pesar de la gran información disponible sobre la susceptibilidad de las especies de *Candida* a la anfotericina B, no hay un punto de corte firmemente establecido; aunque los aislamientos con CMI > 1.05 µg/ml se consideran resistentes. (Paniagua, et, al., 2002). Con los dos criterios antes mencionados, se puede decir que los aislamientos de *C. albicans* analizados en este trabajo fueron susceptibles en un 84% y resistentes a la anfotericina B un 16% (CMI = 0.255-4.08 µg/ml) como se indica en la Tabla 12.

La anfotericina B es uno de los pocos compuestos que tiene actividad fungicida *in vitro* y aún se considera como un tipo de paradigma para la terapia antifúngica *in vivo*.

En los últimos años, se aísla cada vez con mayor frecuencia, cepas de levaduras con susceptibilidad disminuida o resistentes a los antifúngicos. La resistencia a antifúngicos puede ser clínica o *in vitro*, siendo la primera, consecuencia fundamental del bajo nivel del fármaco en el tejido y/o sangre, debido a una interacción entre fármacos o al severo grado de inmunodepresión del paciente.

Según Vanden (1997) se han determinado distintos tipos de resistencia de los hongos a los antifúngicos, como la resistencia intrínseca definida como la ausencia de sensibilidad de una determinada especie de hongo hacia un determinado antifúngico; la resistencia primaria que es aquella que presentan determinadas cepas de una especie de hongo a un antifúngico de forma natural (sin exposición previa), y la resistencia secundaria, aquella que es adquirida por el hongo como resultado del contacto con la sustancia antifúngica o similares anteriormente. (Maldonado, 2003)

En comparación con la cepa ATCC las cepas clínicas presentan intervalos más altos de CMI esto es porque las cepas clínicas pueden tener factores de patogenicidad lo cual las hace resistentes y la historia clínica del paciente nos indicaría sus antecedentes.

Los resultados de este estudio podrían colocar a los compuestos como una posible alternativa de tratamiento contra *C. albicans*, aunque el compuesto LQM 406 fue el que presentó el intervalo de CMI más alta y además los resultados de CMF indican que es necesario altas concentraciones de este para que se tenga una actividad fungicida. Es importante mencionar que para el desarrollo de nuevos fármacos los compuestos deben pasar por pruebas preclínicas como se muestra en el Anexo.



## 9. CONCLUSIONES

1. Se observó el efecto que presentaron los compuestos orgánicos y Anfotericina B a diferentes concentraciones contra la cepa ATCC 32354 y las cincuenta cepas clínicas de *C. albicans* con el método de microdilución en placa.
2. Se comprobó que los compuestos orgánicos tienen propiedades antifúngicas *in vitro* para la cepa control ATCC 32354 y las cepas clínicas analizadas presentando intervalos de CMI de LQM 406 (827.50-1093.23  $\mu\text{g/ml}$ ) donde el 82% de las cepas presentaron inhibición, para LQM 996 (357.8-502.5 $\mu\text{g/ml}$ ) y LQM 9012 (429.6-686.3  $\mu\text{g/ml}$ ) resultando inhibidas el 100% de las cepas. Frente al antifúngico de referencia anfotericina B el intervalo de CMI fue de 0.255-4.08 $\mu\text{g/ml}$  en donde el 16% de cepas fueron resistentes con una concentración superior a 1  $\mu\text{g/ml}$ .
3. En la evaluación de la CMF el compuesto LQM 406 obtuvo una actividad fungicida del 85.4% y para el caso de los demás compuestos coincidió con la CMI resultando un 100% de actividad fungicida.
4. Se obtuvieron intervalos de CMI en las diluciones más concentradas y esto podría ser una desventaja para que los compuestos puedan considerarse como posible alternativa farmacéutica, su toxicidad y su completo mecanismo de acción debe ser estudiado más a fondo en otros estudios.

## 10. REFERENCIAS

1. Adams, P., Baron, F.A. (1965). Esters of carbamic acid. *Chemical Reviews*. vol, (65:5),567-602.
2. Adler-Moore J, Proffitt RT. (2002). AmBisome: liposomal formulation structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother*, vol. (49:1) ,21-30.
3. Araiza, A., Montes de Oca, G., Ponce, O.R., Bonifaz, J. (2011). Balanitis y balanopostitis candidósica. Comunicación de 20 casos *Rev Mex*, vol. (55),342-346
4. Arenas, G.R., (5ed). (2014). *Micología Médica Ilustrada*, México: McGraw-Hill
5. Arikan S, Rex JH. (2001) Lipid-based antifungal agents: current status. *Curr Pharm Des*, vol (7),393-415.
6. Ávila, L., Morgan, O. F., Muñoz, E.V., Rubio, R.M., Gómez, LL.N., Lizárraga, Gutiérrez, G.C., (2010). Infección por Candida y vaginosis bacteriana y su asociación con parto pretérmino y ruptura prematura de membranas. *Rev Med, UAS*, vol. (1), 13-20.
7. Barrett JP, Vardulaki KA, Conlon C, Cooke J, Daza-Ramirez P, et.al. (2003); Amphotericin B Systematic Review Study Group. A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin Ther*, vol. (25), 1295-1320
8. Basualdo Juan A.; Coto, Celia; de Torres Ramón A. (1996). *Microbiología Biomédica*
9. Bonifaz, T.J., (4ed). (2012). *Micología médica básica*, México: Mc Graw-Hill
10. Botello, A. (2005). Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias (2ed), México: Universidad Autónoma de Campeche.
11. Cantón, L.E., Mazuelos, M.E., Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Rev Ibero Micol*, Recuperado de <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
12. Cardozo, E.I., Pardi., (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal, *Acta Odontológica Venezolana*, vol. (40:1),1-5.
13. Cassone, A.; Simonetti, N.; Strippoli, V. (2003): Ultrastructural changes in the cell wall during germ tube formation from blastospores of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*, vol.77, 417-426
14. Castañón. (2016). *Candidiasis o Candidosis*, Unidad de Micología: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
15. Catalán, M. Montejo, J.M., (2006). Antifúngicos sistémicos Farmacodinamia y Farmacocinética. *Rev Iberoamericana de Micología*, vol. (23),39-49.

16. Chaturvedi, D. (2012). Perspectives on the synthesis of organic carbamates, *Tetrabedron*, vol. (68:1),15-45.
17. Escutia, C.D., (2012). *Síntesis de complejos de coordinación de Cobre (II) derivados de fenol con posible actividad antineoplásica y caracterización mediante técnicas espectroscópicas*, (Tesis de Licenciatura). UNAM, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
18. Ghosh, A. K., Brindisi, M. (2015). Organic Carbamates in drug Design and Medicinal Chemistry, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol (58), 2895-2940.
19. Girón, Matute, (2008). Antimicrobianos, Rev. Fac. Cienc. Méd, Recuperado de <http://cidbimena.desastres.hn/RFCM/pdf/2008/pdf/RFCMVol5-2-2008-11.pdf>, 70-71.
20. Goffeau. (2008) Drug resistance: the fight against fungi. *Nature*, vol. (14),452:541-542
21. Gregorí, V. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos, *Rev, Cubana, Farm*, vol. (39:2)
22. Hathaway, F.W.; Holmes, M.R.; Barlow, A.J. (2001): Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. 51: 367-3760.
23. Herbrecht R, Natarajan, A. S, Nivoix Y, Letscher-Bru V. (2003) The lipid formulations of amphotericin B. *Expert Opin Pharmacother*,vol. (4), 1277-1287.
24. Herrera, G. (2016). Generalidades de la Química Medicinal, *Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*.
25. Iáñez. (1998). Acción de los agentes químicos sobre bacterias., Curso de Microbiología general.
26. Korolkocas, A. y Burckhalter, J. (1983). Compendio esencial de química farmacéutica. España, Reverte.
27. Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P., The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*, *US National Library of Medicine National Institutes of Health*,vol.(3:4), doi: 10.4161/viru.20746
28. Lisboa, C., Santos, A., Días C., Azevedo F., et al. *Candida* balanitis: risk factors. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, vol. (24), 820-826
29. López, K., Rosaldo, K., Lugo, C., et.al. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*, *Revista Biomedica*, vol. (27:3).
30. Mackenzie, D.W.R. (2004): Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol*, vol. (15), 563-565.
31. Maldonado, I., Arechavala, A., Guelfand, L., Relloso, S., Garbasz, C., (2016). Infecciones urinarias nasocomiales por levaduras. Estudio multicéntrico de 14 hospitales de la red de micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. (32:2),104-109.
32. Maldonado, V., C. (2003). *Determinación de la actividad antifúngica in vitro de Quitosanato Carbamato de Etilo sobre cepas de Candida albicans*, (Tesis de Licenciatura), Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
33. Manzano, P., Méndez, L., Hernández, F., López, M. (2008). La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México, *Gaceta Médica*, vol. (1), 23-26.

34. Martínez, B. D. (2016). *Síntesis de cinco nuevos compuestos derivados del ácido carbámico con posible actividad ixodida en garrapatas del género Rhipicephalus* (Tesis de Licenciatura). UNAM, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
35. Medina, F, J. L. (2013). Avances in computacional approaches for drug discovery based on natural products. *Revista Latinoamericana de Química*, Vol. (41:2), 95-110.
36. Medina, F., J. L. (2007). Aplicaciones exitosas del diseño de fármacos utilizando métodos computacionales. *Ciencia*, vol. (59:1), 1-8.
37. Mendling, W.B., (2010). Vulvovaginal candidosis. *Mycoses*, vol. (55),1-13
38. Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. (25:1), 135-138
39. Muñoz, C.C. (2012). Síntesis de derivados del ácido carbámico de la serie LQM 900, los cuales han mostrado actividad ixodida. Tesis de Licenciatura, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
40. Nolte, W., (4 ed.). (1996). *Microbiología Odontológica*, México: Editorial Interamericana.
41. Odds., Alistair, J., Gow, N. (2004) *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics, *Genome Biology*, vol. (5:1),1-23.
42. Palacio, A., Villar J., Alhambra A. (2009) Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Rev Iberoam Micol.*, vol. (26:1),2-7
43. Paniagua, G. C., Monroy, E. P., Negrete, E. A., Vaca, S. P., (2002). Susceptibility to 5-Fluorocytosine, miconazole and amphotericin B of *Candida albicans* strains isolated from the throat of non-AIDS patients, *Rev.Latinoamericana de Microbiología* vol. (44:2), 65-68. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2002/mi022d.pdf>
44. Pesti, M.; Novak, E.K.; Ferenczy, L., Svoboda, A. (1981): Freeze fracture electron microscopical investigation of *Candida albicans* cells sensitive and resistant to nystatin. *Sabouraudia. Microbiological Reviews*, vol 19. 17-26.
45. Pierce, A.M.; Pierce, H.D.; Unrau, A.M.; Oehlschlager, A.C. (1978): Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans*. *Can J Biochem.*, vol (56), 135-142
46. Pontón, MD Moragues. (2002). J Gené, J Guarro, G Quindós. Hongos y actinomicetos alérgicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao.
47. Potenziani, B.J. (2011). *Balanitis y Epididimitis en el Adulto y en Jóvenes*, *Academia Nacional de Medicina de Venezuela*.
48. Potón, M.D., Moragues, J., Gené, J.G. (2002). *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. (5).26-28
49. Prado, J. V., Vidal, A. R., Durán, T. C., (2012). Aplicación de la actividad bactericida del cobre en la práctica médica, *Rev Med Chile*, vol. (140),1325-1332.
50. Prado,O.,M.,Ramírez,N.,Díaz,T.R.,Garrido,F.G.,Vázquez,V.V.,Velázquez,S.A.,Muñoz,G .M.,Angeles,E.,Alba,H.F.(2013).The action of two ethyl carbamates on acetylcholinesterase and reproductive organs of *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, vol. (199),215-224.

51. Puerto, P., García, M., Márquez, A., García, A., Mira, J. (2001). Candidiasis orofaríngea, *Rev, Diagn Biol*, vol. (50:4).
52. Reséndiz, S.J., Morales, A.J. (2007). Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida spp* en niños. *Bol Med Hosp Infant Mex*, vol. (64: 2), 81-98.
53. *Revista Iberoamericana de Micología*. (2017). Estado actual de la etiología de Candidiasis en México.
54. Reyes, M.M., Duarte, E.E., Martínez, H.E., Acosta, A.G., Frías, D. (2017). Current status of the etiology of candidiasis in México, *Rev. Iberoamericana de Micología*, vol. (1), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2017.05.001>
55. Rodríguez, O.J., Miranda, T.J., Morejón, L.H., Santana, G., (2002). Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica, *Rev Cubana Estomatol*, vol. (39:2), Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072002000200007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200007)
56. Rodríguez, S. O. (2007). *Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los derivados de ác. carbámico sobre aislamientos clínicos de C. albicans*. Tesis de Licenciatura, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
57. Rolando, E. J., González, M. A., Valdebrán, C. Guidos, M. H. (2016). Candidiasis mucocutánea crónica. Informe de un caso, *Arch. argent. pediatr*. vol. (108:2), Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/scielo>.
58. Romero, L.A., Araiza, S.J., Hernández, M.A., Cerón, A.M., et.al., (2014). Candidosis mixtas en aislamientos clínicos de pacientes procedentes del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga; identificación e importancia. *Dermatol Rev Mex*, vol. (58), 239-246
59. Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. 3ed, Medica Panamericana: México, 1199.
60. Ryder, NS; Frank, I; Dupont, MC. (1986). Ergosterol biosynthesis inhibition by the thiocarbamate antifungal agents tolnaftate and tolciolate, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 29 (5): 858-60.
61. Saldívar, F., Prieto, F., Medina, F., (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional, *Educación Química*, vol. (28:1).
62. Shoham, S., Levitz, S.M., (2005). The immune response to fungal infections. *Br J Haematol*, vol. (129), 569-582.
63. Vázquez, J.A., Sobel, J.D. (2011). Candidiasis. *Chapter. Essentials of Clinical Mycology*, vol (5), 167-206, Doi: 10.1007/978-1-4419-6640-7\_11
64. Vázquez, M.R. (2013). *Efectos de las nanopartículas de plata en el hongo patógeno Candida albicans*. Tesis de posgrado, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Ensenada Baja California, México.
65. Vázquez. R.F., Beiro, R., Vidal, G., Orgeira, P. (2010) Factores predisponentes de la candidiasis. *Rev Med Gener*, vol. (1:5). 23-28.
66. Vega, S.D., Bernal, L.L., Villanueva, R.S., Arenas, G.R., (2014). Infecciones urinarias por *Candida spp*. Estudio de 29 pacientes en un hospital general, *Med Int Méx*, vol.

- (31),19-24. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2015/mim151d.pdf>
67. White, D., (2006). Guideline on the management of vaginal discharge, *International Journal of STD & AIDS*, vol. (22),421-429.
68. Williams, D.W.; Lewis, M.A.O. (2000). Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Rev. Oral Diseases*, vol. (6) 3-11.
69. Zaldini, H. M.,<sup>1</sup> Suellen, M. T., Cavalcanti, D. R., Moreira, Walter F. et. al. (2010). Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design, *Current Drug Target*.

# 11. ANEXO

## A1. Fases de desarrollo de un nuevo medicamento

### 1. ESTUDIOS DE LA FASE PRECLINICA (fase 0)

#### 1.1. Fase Química: caracterización fisicoquímica y desarrollo farmacéutico

Lo primero que se debe conocer de una nueva molécula es todo el conjunto de propiedades fisicoquímicas que permitan identificarla y caracterizarla de la mejor manera posible: estado físico, estructura química, peso molecular, solubilidad en agua y en lípidos, punto de fusión y de ebullición, densidad, pKa, espectros infrarrojo y ultravioleta, espectrometría de masas y RMN, termolabilidad, fotosensibilidad y estabilidad en disolución o en presencia de humedad, etc; éste trabajo es desarrollado por químicos, mientras que simultáneamente los farmacéuticos inician el proceso de desarrollo de formas farmacéuticas adecuadas para el posible uso del nuevo compuesto como un medicamento en el hombre.

#### 1.2. Fase Biológica:

Antes de iniciarse las pruebas clínicas en seres humanos, se debe tener al menos una aproximación acerca del perfil farmacocinético y farmacodinámico del producto en dos especies animales diferentes, incluyendo su potencial toxicológico a corto y largo plazo; éstas pruebas se realizan en animales íntegros, en órganos aislados de animales, en cultivos celulares o a escala molecular, dependiendo de cuál sea el objetivo farmacológico. La evaluación toxicológica incluye la realización de las siguientes pruebas: toxicidad aguda (efectos de dosis únicas), toxicidad subaguda y crónica (efectos de dosis múltiples durante tiempos prolongados, dato muy importante sobretodo si el fármaco va a ser utilizado de manera crónica en el ser humano), efectos sobre el comportamiento reproductivo (conducta de apareamiento, reproducción, preñez, parto, descendencia, teratogénesis y defectos congénitos), potencial carcinogénico, mutagénico y otras pruebas de toxicología de investigación como son la dosis sin efecto (dosis máxima a la cual el efecto tóxico específico no se observa), la dosis letal mínima (dosis más pequeña que produce la muerte de cualquier animal) y la dosis letal media o DL50 (dosis que ocasiona la muerte en el 50% de los animales). Todas las anteriores pruebas preclínicas tienen una serie de limitaciones, entre las cuales se destacan: a) Se necesita un número muy grande de animales para obtener resultados válidos, por eso cada día se utilizan más las pruebas de cultivo de células y tejidos, pero éstas también tienen un valor muy limitado. b) Los datos de toxicidad obtenidos en animales, no

siempre son extrapolables al ser humano y en ocasiones se encuentran resultados bien diferentes de toxicidad entre el humano y distintas especies animales. c) Por razones estadísticas, es poco probable que se detecten efectos adversos poco frecuentes. Con toda esta información y siempre y cuando el producto investigado haya demostrado una aceptable eficacia y seguridad, el interesado solicita autorización ante la FDA para iniciar los estudios en seres humanos (fase clínica); si la FDA aprueba la solicitud, el fármaco es declarado como NFI (Nuevo Fármaco en Investigación, en inglés: IND = Investigational New Drug) y se inicia la fase de investigación clínica. Además, se le asigna un nombre genérico (o DCI, Denominación Común Internacional con que será reconocido en adelante y empieza a correr el tiempo de la Patente.

## **2. ESTUDIOS CLINICOS (ENSAYOS CLINICOS)**

El término “Ensayo clínico” (sin el adjetivo “controlado”) es muy amplio y se refiere a los procesos de evaluación de un nuevo medicamento en el ser humano. En general, el término ensayo clínico es aplicable a todas las fases (I a IV) del desarrollo de un nuevo medicamento, ya que contempla la evaluación experimental de una sustancia o medicamento mediante su administración o aplicación al ser humano con alguno de estos fines:

- a) Poner de manifiesto sus efectos farmacodinámicos o farmacocinéticos.
- b) Establecer su eficacia para una indicación terapéutica, profiláctica o diagnóstica determinada.
- c) Conocer el perfil de sus reacciones adversas y establecer su seguridad.