



Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA

**Departamento de Bioquímica,
Microbiología, Biología Celular y
Genética**

**Infecciones urinarias: Determinación de la
actividad antibacteriana de nuevas
quinolonas sintéticas**

**Urinary infections: Determination of
antibacterial activity of new synthetic
quinolones**

Trabajo Fin de Grado

Lorena Acosta Ruiz

Junio, 2015

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014_/2015__	ENTRADA Fecha: Núm:
---	--------------------------------------

Datos Personales


Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
78645608Y	Lorena Acosta Ruiz
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
667275231	Alu0100704587@ull.edu.es

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Infecciones urinarias: Determinación de la actividad antibacteriana de nuevas quinolonas sintéticas

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Laila Moujir Moujir	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética	
y D./Dña.	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: Laila Moujir Moujir	Fdo.:

La Laguna, a __ 5 __ de Junio _____ de 2015__

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

ÍNDICE

Resumen	4
1. Introducción.....	5
2. Objetivos	11
3. Material y Métodos	12
3.1. Microorganismos	12
3.2. Productos químicos.....	12
3.3. Mantenimiento y conservación de microorganismos	12
3.4. Medios de cultivo y soluciones de trabajo.....	12
3.5. Preparación de los inóculos microbianos	14
3.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB).....	14
4. Resultados y Discusión.....	16
5. Conclusiones	23
Referencias.....	25

Resumen

Las infecciones urinarias (IU) constituyen una de las patologías infecciosas más frecuentes en el ambiente hospitalario y ocupan el segundo lugar en el ámbito extrahospitalario. Son producidas por una amplia variedad de agentes etiológicos, siendo *Escherichia coli*, el que se aísla con mayor frecuencia (73%), seguido de *Klebsiella* sp (6,8%), *Proteus* sp (6,6%) y *Enterococcus* sp (5,5%). Las quinolonas, constituyen una familia de quimioterápicos útiles en el tratamiento de las IU. No obstante, el desarrollo de resistencias en los patógenos urinarios, estimula a numerosos investigadores al diseño de nuevas quinolonas que puedan resultar eficaces. Así, en este trabajo se aborda el estudio de la actividad antimicrobiana, por el método de microdilución, de una serie de nuevas quinolonas sintéticas y derivados, frente a una amplia variedad de microorganismos. Estos compuestos resultaron ser inactivos frente a las bacterias Gram positivas y negativas, así como la levadura *Candida albicans*. Sin embargo, la chalcona L10 exhibió una interesante actividad frente a *Mycobacterium smegmatis* (CMI de 2,5 µg/ml) y más moderada la L11 y la quinolona L3 (CMI de 20 µg/ml). Se llevó a cabo un estudio SAR, del que se deduce que la introducción de un grupo metoxi o nitro en posición 4 reduce la actividad.

Abstract

Urinary infections (UI) are one of the most common infectious diseases in the hospital environment and they take the second place in the community. Besides, UI are produced by a wide variety of etiological agents, and *Escherichia coli* is isolated most often (73%) followed by *Klebsiella* sp (6,8%), *Proteus* sp (6,6%) y *Enterococcus* sp (5,5%). Quinolones are a family of chemotherapy agents useful in the treatment of urinary tract infections. However, emerging antibiotic resistance in urinary tract pathogens encourages numerous researchers to focus on their research the design of quinolones with new and effective substituents. Thus, in this project we study the antimicrobial activity of new synthetic quinolones and derivatives against a wide range of microorganisms, by the microdilution method. These compounds were inactive against Gram positive and negative bacteria and yeast *Candida albicans*. Although, chalcone L10 exhibited the higher activity against *Mycobacterium smegmatis* (CMI = 2,5 µg/ml), as well as L11 and quinolone L3 which showed a moderate activity (CMI = 20 µg/ml). SAR studies established a correlation between the substituents nitro or methoxy in position 4 and the loss of activity.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, infecciones urinarias, microdilución, quinolonas.

Key words: antimicrobial activity, microdilution, quinolones, urinary infections.

1. Introducción

Una de las patologías infecciosas con mayor frecuencia, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad, son las infecciones del tracto urinario. En el año 2007 se realizó una encuesta epidemiológica a 6.545 mujeres españolas, de las cuales el 37% había presentado, al menos, un episodio de infección urinaria baja, y de ellas el 32% había contraído dos episodios. Por tanto, las infecciones urinarias representan un problema clínico y además, con gran repercusión económica por los costes sanitarios que conllevan (Pigrau, 2013).

Encontrar referencias en la antigüedad de una enfermedad de naturaleza infecciosa, es una tarea complicada, porque no fue hasta varios siglos después cuando se descubrirían los correspondientes agentes etiológicos. El libro de medicina más antiguo que se conoce procede de Egipto, data del año 1550 a.C. y consiste en un tratado de higiene, donde la descripción de las enfermedades ocupa un pequeño lugar. En la Grecia clásica destacó la escuela médica de Cos, siendo Hipócrates el primer médico que escribió acerca de la importancia del examen de orina o “uroscopia”. En Roma, Celso (año 1 d.C.) gran recopilador de Hipócrates, describe en su obra “De Re-médica” el cateterismo vesical y la talla. Galeno, en cambio, adquirió un gran mérito por combatir las teorías sin base que sostenían los médicos de la época y sus doctrinas obtuvieron un gran valor durante más de doce siglos. La medicina árabe y por extensión la medicina medieval, basaba todo el diagnóstico en la uroscopia o examen de orina y en la doctrina del “pulso”. En España, hacia 1588, Francisco Díaz, médico y filósofo de la Corte Real publica su obra sobre “Las enfermedades de los Riñones, y Vejiga, Carnosidades de la Verga, y Orina” (Dalet y del Río, 1997).

En 1851, Louis Pasteur, con sus estudios, proporcionó un gran hito que divide la historia en dos partes: pre-pasteuriana y post-pasteuriana. En 1859, Pasteur determinó que *Micrococcus ureae* era el microorganismo responsable de la descomposición amoniacal de la orina al aire libre, y ultimó, que igual descomposición tenía lugar en la vejiga por el mismo agente introducido accidentalmente por los instrumentos. Posteriores trabajos establecieron de forma definitiva la actuación de una serie de microorganismos en la eclosión de las enfermedades del aparato genitourinario (Dalet y del Río, 1997).

El diagnóstico microbiológico de la infección urinaria, tanto para el ámbito hospitalario como comunitario, es uno de los estudios que se realizan con mayor frecuencia en los laboratorios de microbiología. La infección urinaria se define como la existencia en las vías

urinarias de microorganismos patógenos, y según su localización anatómica se clasifican en bajas, (que incluyen uretritis, cistitis y prostatitis) y en altas o pielonefritis (que incluyen el absceso renal). La etiología de la infección urinaria varía dependiendo del tipo de infección (bacteriuria asintomática, cistitis, pielonefritis...), de la existencia o no de factores predisponentes, del ámbito de adquisición (comunitario o nosocomial) y de los tratamientos antimicrobianos previos. No obstante, la gran mayoría de las infecciones urinarias están producidas por microorganismos aerobios Gram negativos, que provienen del colon y por ello, la microbiota fecal del paciente determina la etiología de la infección urinaria en gran medida. (Andreu *et al.*, 2010). En la **Tabla 1**, se muestran los microorganismos causantes de los distintos tipos de infección urinaria y su frecuencia.

Tabla 1. Agentes etiológicos de la infección urinaria. Datos procedentes del Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

Microorganismos	Cistitis complicada n= 105	Pielonefritis no complicada n= 105	IU complicada n= 104	IU asociada a sondas n= 100
<i>E. coli</i>	86%	90%	51%	34%
<i>Klebsiella</i> sp	3%	1%	11%	9%
<i>Citrobacter</i> sp				
<i>Enterobacter</i> sp	1%	2%	5%	6%
<i>Serratia</i> sp				
<i>Proteus</i> sp				
<i>Morganella</i> sp	5%	2%	13%	15%
<i>Providencia</i> sp				
<i>Pseudomonas</i> sp		1%	8%	19%
<i>A. baumannii</i>			1%	1%
<i>Streptococo grupo D</i>	2%	1%	20%	19%
<i>Streptococo grupo B</i>	1%			
<i>S. aureus</i>				4%
<i>S. epidermidis</i>		2%		5%
<i>S. saprophyticus</i>	4%	1%		
Levaduras			1%	18%
Polimicrobiano (≥ 2 microorganismos)	1%	1%	14%	30%

Entre febrero y junio del 2006, se realizó el estudio “Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos de primera línea. Estudio nacional multicéntrico”, en el que se analizaron orinas procedentes de

pacientes de todas las edades y de ambos sexos, con confirmación microbiológica de infección complicada y no complicada del tracto urinario bajo, y adquirida en la comunidad, donde los agentes etiológicos más frecuentes fueron: *E. coli* 71%, *Klebsiella* sp 6,8%, *Proteus* sp 6,6% y *Enterococcus* sp 5,5% (Andreu *et al.*, 2008).

Uno de los tratamientos con mayor eficacia para las infecciones urinarias son las quinolonas, una familia de antibióticos sintéticos conocida desde la década de los 60. En general, las distintas quinolonas derivan de la misma estructura básica, o núcleo central: el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína (Figura 1) (Wolfson y Hooper, 1989).

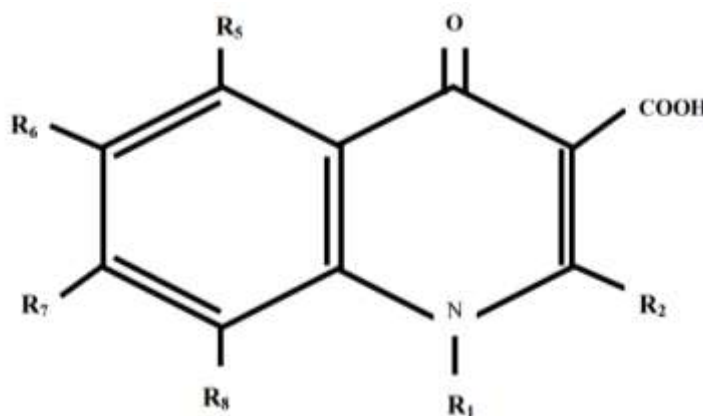


Figura 1. Estructura básica o núcleo de las quinolonas. Imagen obtenida de la Tesis Doctoral “Bases Moleculares de la Resistencia a Quinolonas en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Corynebacterium* spp”, perteneciente a Josep M^a Sierra i Ortigosa.

Éstas se pueden clasificar en varios grupos: quinolonas de primera generación, segunda, tercera y cuarta generación. Así, las de primera generación reúnen a las moléculas más antiguas y definen los núcleos químicos básicos de estos antimicrobianos, caracterizados por la ausencia de un radical 6-fluoro. Se comportan como antisépticos urinarios en sentido estricto, convergen en las vías urinarias y son activos frente a la mayoría de los microorganismos Gram negativos, destacando el ácido nalidíxico (Gootz y Brighty, 1998). El segundo grupo está constituido por las fluoroquinolonas o quinolonas fluoradas, con un átomo de flúor en la posición 6 y de piperazina o metil piperazina en la posición 7 del antibacteriano de manera que mejora el espectro y lo amplía a microorganismos Gram positivos (von Rosenstiel y Adam, 1994). Los derivados de las quinolonas fluoradas constituyen la tercera generación, con más de un átomo de flúor y con mayor espectro o semivida. Se incluyen también en la tercera generación otros compuestos modernos como la cinofloxacin, que incluso pueden considerarse de cuarta generación. Estas últimas, son más activas sobre estreptococos y estafilococos, y se utilizan principalmente en infecciones respiratorias (Lorenzo y Aleixandre, 2009).

Las quinolonas ejercen una acción bactericida y afectan el funcionamiento normal del ADN bacteriano (Crumplin *et al.*, 1984). Éstas penetran al interior celular por un sistema de difusión pasiva a través de las porinas o atravesando la membrana (Mouton y Leroy, 1991). Una vez dentro, inhiben la acción de las topoisomerasas tipo II, concretamente la ADN girasa y la topoisomerasa IV, involucradas en la replicación y transcripción del ADN. Ambas enzimas son tetrámeros formadas por dos subunidades A y dos subunidades B, GyrA y GyrB para la ADN girasa (Reece y Mazwell, 1991) y ParC y ParE (GrlA y GrlB en *S.aureus*) para la topoisomerasa IV (Pan y Fisher, 1996). La ADN girasa (**Figura 2**) es capaz de introducir superenrollamientos negativos en el ADN bacteriano y ayuda a separar sus hebras, de manera que cortan las bandas del ADN, a continuación un segmento pasa sobre otro y posteriormente se libera (Cozzarelli, 1980).

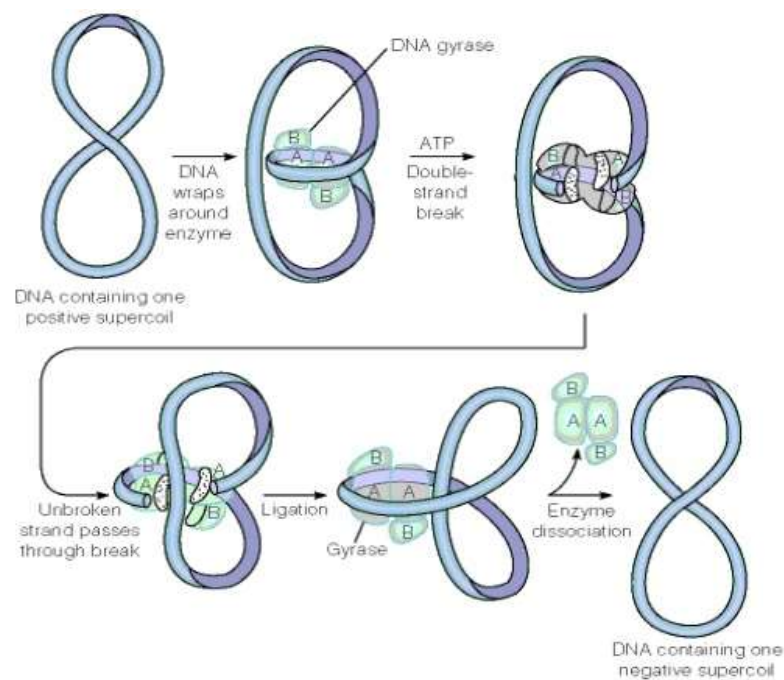


Figura 2. Acción de la ADN girasa sobre el ADN bacteriano. Las subunidades A de la enzima rompen las dos hebras de ADN, a continuación las subunidades B hacen pasar una banda sobre otra, a través de la rotura, y finalmente, las subunidades A sellan las cadenas. De esta forma la ADN girasa introduce superenrollamientos negativos. Imagen obtenida en el siguiente enlace:

http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=girasa+de+adn&lang=2

Las quinolonas se unen a las subunidades de la girasa en el complejo ADN-girasa e impide la rotura y el sellado de la cadena ADN de doble hélice, además de evitar la regeneración de la enzima y su intervención en nuevos ciclos. Por ende, la muerte bacteriana se explica por la inhibición de la girasa y la liberación de exonucleasas que degradan el ADN

(Gobernado *et al.*, 1999). Asimismo, cabe señalar que se requerirían mayores concentraciones de quinolonas para inhibir las ADN topoisomerasas II de las células eucariotas, debido a la baja especificidad existente entre ambas. No obstante, la acción sobre la topoisomerasa II eucariota podría asociarse con una potencial actividad antitumoral de los compuestos quinolónicos nuevos (Azanza, 2000).

A su vez, el desarrollo de las quinolonas se ve favorecido por la posibilidad de modificar su estructura básica y por alterar seis radicales, a excepción de la posición 3, que presenta un grupo carboxilo y la posición 4 con un radical ceto. Ello crea variaciones en la actividad de las quinolonas frente a los microorganismos y da lugar a modificaciones en los parámetros farmacocinéticos (Sierra, 2005).

Con respecto a la relación entre estructura y actividad (**Figura 3**) destacamos que la posición 3 y 4 que contienen un grupo carboxilo y ceto respectivamente, son necesarios para la formación del complejo Quinolona-Enzima-ADN, evitando que las topoisomerasas ejerzan su función (Higgins, 2003). La mayoría de las quinolonas presentan en la posición 2, un hidrógeno. Aunque no existe mucha información sobre su papel, se intuye que tiene que ser un radical pequeño ya que se sitúa cerca del sitio de unión al ADN, y un radical de mayor tamaño obstaculizaría esa unión por impedimento estérico (Gutierrez-Zufiaurre, 2004). La posición 5 parece “controlar” la actividad de la molécula, así como su espectro de acción. Las

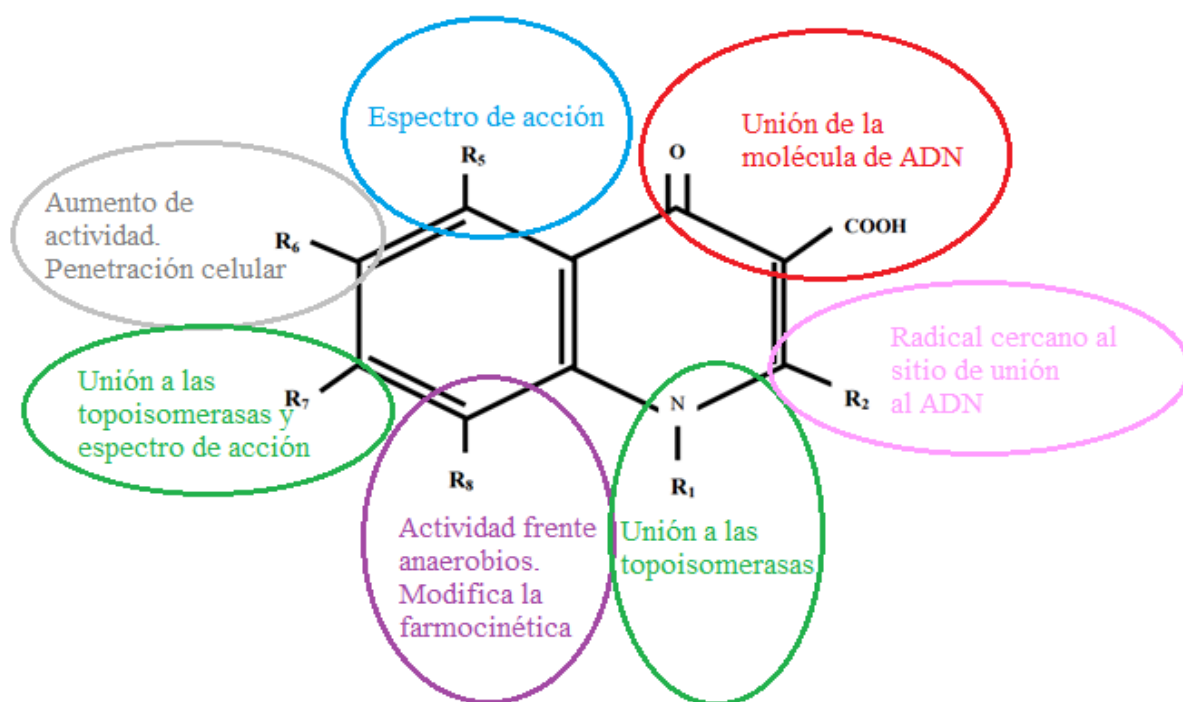


Figura 3. Esquema de la relación entre la estructura y la actividad de la molécula quinolona.

modificaciones en este radical incrementan la actividad de la molécula frente a bacterias Gram positivas, aunque también depende del conjunto molecular (Appelbaum y Hunter, 2000). La posición 6 consta de un grupo flúor que mejoró la actividad intrínseca de la molécula en comparación con aquellas que no lo presentaban. No obstante, hoy en día se están desarrollando un grupo nuevo de quinolonas, que no poseen el grupo de flúor, pero incrementan mucho su actividad frente a patógenos Gram positivos (Roychoudhury y Ledoussal, 2002). Las sustituciones en la posición 8 dan lugar a cambios en la estructura tridimensional de las moléculas (Gutierrez-Zufiaurre, 2004), de manera que se modifican los parámetros farmacocinéticos y se produce una mayor actividad frente a anaerobios (Higgins, 2003). Las posiciones 1 y 7, han sido las más modificadas y las más diferentes entre las quinolonas actuales. Dichas posiciones son esenciales para la unión de las quinolonas con las topoisomerasas, y por tanto, para la formación del complejo quinolona-enzima-ADN y el bloqueo de la función de las mismas (Sierra, 2005). En posición 1, el sustituyente con mejores propiedades espaciales y estéricas es el grupo ciclopropil (Tillotson, 1996). Finalmente, se tiene que tener en cuenta que la molécula actúa como un conjunto, y que a parte de la actividad que a priori presenta un radical, se deben considerar otros factores como la estructura tridimensional de la molécula o la interacción entre radicales (tamaño, carga, etc.) (Sierra, 2005).

No obstante, las bacterias han reprimido de forma inesperada la acción de los antimicrobianos. Éstas han desarrollado nuevos mecanismos de resistencia en la última década, y con mayor velocidad a la que se han incorporado nuevos antimicrobianos (Cisneros 2010). Las bacterias desarrollan resistencia frente a las quinolonas por mutaciones del gen que codifica las subunidades A de la enzima ADN girasa o bien, por la alteración en las porinas, que impiden la entrada del antimicrobiano (Taléns-Visconti *et al.*, 2002). De hecho, algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de expulsar el fármaco por complejos enzimáticos de membranas denominados, bombas de expulsión (Livermore, 2002).

De acuerdo con los antecedentes indicados anteriormente el presente trabajo tiene como objetivo determinar la actividad antimicrobiana de nuevas quinolonas y derivados, con el fin de que puedan resultar eficaces en el tratamiento de las infecciones urinarias.

2. Objetivos

Los objetivos que nos planteamos en el presente trabajo Fin de Grado y de acuerdo a la problemática de las infecciones urinarias y las resistencias mostradas por los microorganismos a los antibióticos actuales son:

- Determinar la actividad antimicrobiana de nuevas quinolonas sintéticas y derivados, frente a una amplia variedad de microorganismos responsables de las infecciones urinarias.

- Llevar a cabo una relación estructura-actividad de las moléculas con el fin de determinar los grupos responsables de la actividad.

3. Material y Métodos

3.1. Microorganismos

Para la realización del presente trabajo se han empleado las siguientes estirpes microbianas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans*.

3.2. Productos químicos

Las quinolonas sintéticas y derivados, objeto de estudio en este trabajo, fueron obtenidas por la Dra. Djenisa Rocha, bajo la dirección de los Profesores Artur Silva y Diana Pinto de la Universidad de Aveiro (Portugal).

La procedencia de los diferentes productos utilizados en cada experimento se indica en el apartado correspondiente.

3.3. Mantenimiento y conservación de microorganismos

Las bacterias fueron mantenidas en agar nutritivo, a excepción *M. phlei* y *M. smegmatis* que por sus exigencias metabólicas lo fue en agar cerebro corazón y la levadura *C. albicans* que fue mantenida en Agar Sabouraud. Las placas fueron conservadas a 4 °C, llevándose a cabo resiembras periódicas.

La conservación de las cepas durante largos periodos de tiempo se realizó por congelación (-80 °C), empleando una suspensión celular de glicerol al 15% (v/v).

3.4. Medios de cultivo y soluciones de trabajo

Los medios líquidos que se utilizaron en el experimento se describen a continuación:

- ❖ Nutrient Broth (Oxoid), que será designado como caldo nutritivo y cuya composición es la siguiente:

- “Lab-Lemco” Powder	1,0 g/l
- Extracto de levadura	2,0 g/l
- Peptona	5,0 g/l
- Cloruro sódico	5,0 g/l

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121° durante 20 minutos.

- ❖ Infusión Cerebro Corazón (Scharlau), que será designado como BHI, y cuya composición es la siguiente:

- Extracto de cerebro	12,5 g/l
- Extracto de corazón	5,0 g/l
- Peptona	10,0 g/l
- Dextrosa	2,0 g/l
- Cloruro sódico	5,0 g/l
- Fosfato disódico	2,5 g/l

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121° durante 20 minutos.

- ❖ Sabouraud Dextrose Broth (Fluka), cuya composición es la siguiente:

- Mycological Peptona	10 g/l
- Dextrosa	20 g/l

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

- ❖ Medio YP, cuya composición es la siguiente:

- Extracto de peptona (Scharlau)	10 g
- Extracto de levadura (Scharlau)	10 g
- Agua destilada	1000 ml

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

- ❖ Medio YPD, cuya composición es la siguiente:

- Extracto de peptona (Scharlau)	10 g
- Extracto de levadura (Scharlau)	10 g
- Glucosa	10 g

- Agua destilada 1000 ml

El extracto de levadura y la peptona fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos y la glucosa, por filtración a través de filtros Millipore de 0,45 µm de diámetro de poro.

- ❖ Suero fisiológico, cuya composición es la siguiente:

- Cloruro sódico (Scharlau) 9 g
- Agua destilada 1000 ml

El suero se adicionó en tubos mediante dispensadora y se autoclavaron a 121°C durante 20 minutos.

- ❖ Tween 80 (Vorquímica S.L.), agente dispersante que fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.5. Preparación de los inóculos microbianos

A partir de cultivos en medio sólido, se prepararon pre-inóculos en 20 ml de medio YP que fueron incubados a 37 °C durante 18 horas en agitación orbital. Estos cultivos fueron diluidos en suero fisiológico o en medio de cultivo, para ser utilizados como inóculos para llevar a cabo los ensayos a la densidad celular deseada.

3.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB)

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) fueron determinadas por el método de microdilución en medio líquido utilizando placas de 96 pocillos (Iwaki). Las quinolonas y derivados previamente disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) se añadieron en el medio de experimentación (caldo nutritivo o BHI en el caso de las bacterias y Sabouraud para la levadura), a doble concentración de la requerida para el ensayo.

En el caso de las micobacterias, debido a su crecimiento en grumos, se añadió al medio de cultivo Tween 80 al 0,06%, agente dispersante el cual no ejerce influencia sobre el crecimiento (Mizuguchi *et al.*, 1985).

Se depositaron 200 µl de los antibióticos al doble de concentración en el medio de cultivo en uno de los pocillos (columna 2) y 100 µl de medio en los restantes, para a continuación llevar a cabo diluciones seriadas a mitades. Estas placas fueron inoculadas con 100 µl de una suspensión del microorganismo a ensayar, preparada a partir de cultivos de 18 horas en agitación orbital a 37 °C, diluido previamente en el mismo medio de cultivo de tal forma que quedara una concentración celular en los pocillos de $1-5 \times 10^5$ u.f.c./ml. Cada ensayo fue realizado por duplicado y como control positivo se inocularon pocillos (columna 12) en las mismas condiciones, pero carentes de producto y con DMSO a una concentración equivalente a la máxima utilizada en los cultivos problemas, en ningún caso la concentración de DMSO superó la máxima tolerable por cada bacteria (Moujir, 1988). El control negativo (blanco control), se preparó añadiendo 200 µl de medio a una columna de pocillos (columna 1).

Tras 24 horas de incubación a 37 °C en agitación orbital se determinó la turbidez de los cultivos en un lector ELISA (Infinite M200, Tecan) a 550 nm. De aquellos pocillos en los que no se observó crecimiento visible, se tomaron alícuotas (100 µl) para efectuar un recuento de unidades viables, con el fin de establecer la CMI (mínima concentración de producto a la cual no hubo crecimiento) y la CMB (mínima concentración de producto que produce la muerte del 99,9% de la población inicial) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

Con el fin de comparar la actividad antimicrobiana de estos compuestos, se empleó como control de referencia, la ciprofloxacina (Sigma), que fue disuelta en agua destilada a una concentración de 750 µg/ml. Se tomaron alícuotas de 8 µl, que se conservaron a -80°C, hasta su utilización (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

4. Resultados y Discusión

Se determinó la actividad antimicrobiana de 12 quinolonas, 2 furanoquinolinas y 6 intermediarios en la síntesis de las quinolonas, correspondientes a tres benzamidas y tres chalconas, cuyas estructuras químicas se describen en las **Tablas 2.1-2.5**, por el procedimiento descrito en el apartado 3.6. de Material y Métodos.

Tabla 2.1. Estructura química y actividad de las benzamidas, objeto de estudio del presente trabajo.

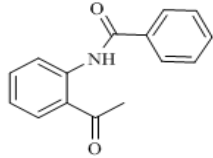
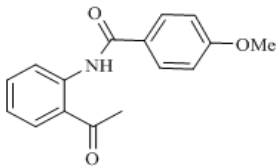
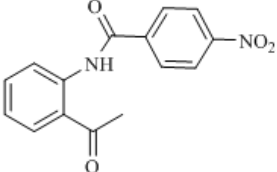
Estructura	Nombre	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
	L1 N-(2-acetylphenyl)benzamide	>20
	L2 N-(2-acetylphenyl)-4-methoxybenzamide	>20
	L9 N-(2-acetylphenyl)-4-nitrobenzamide	>20

Tabla 2.2. Estructura química y actividad de las chalconas, objeto de estudio del presente trabajo.

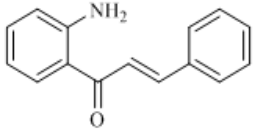
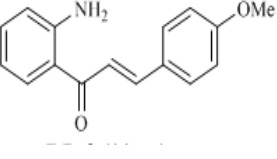
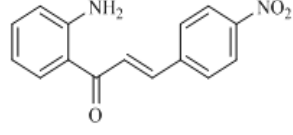
Estructura	Nombre	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
	L10 (E)-1-(2-aminophenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one	>20 2,5 (<i>M. smegamatis</i>)
	L11 (E)-1-(2-aminophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one	>20 20 (<i>M. smegamatis</i>)
	L12 (E)-1-(2-aminophenyl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one	>20

Tabla 2.3. Estructura química y actividad de las furanoquinolinas, objeto de estudio del presente trabajo.

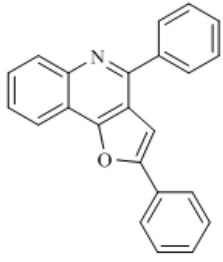
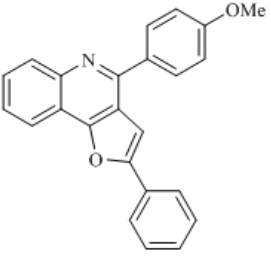
Estructura	Nombre	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
	L21 2,4-diphenylfuro[3,2-c]quinoleína	>20
	L22 4-(4-methoxyphenyl)-2-phenylfuro[3,2-c]quinoleína	>20

Tabla 2.4. Estructura química y actividad de las quinolonas, objeto de estudio del presente trabajo.

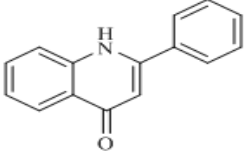
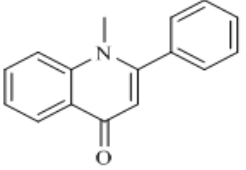
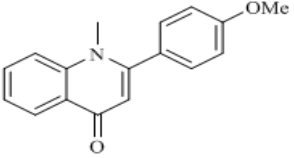
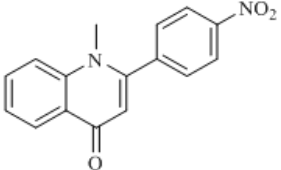
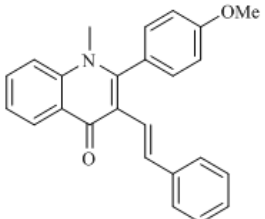
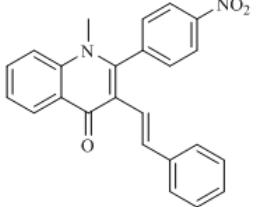
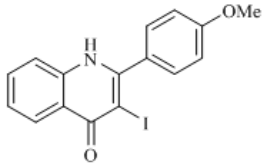
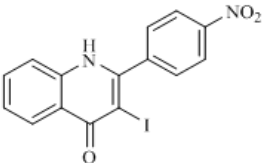
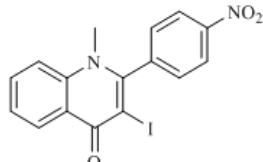
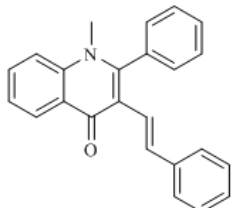
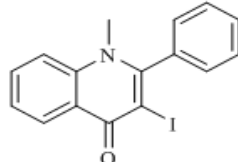
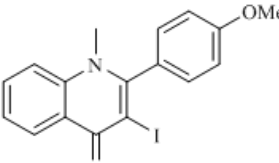
Estructura	Nombre	CMI
	<p>L6</p> <p>2-phenylquinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>
	<p>L7</p> <p>1-methyl-2-phenylquinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>
	<p>L8</p> <p>2-(4-methoxyphenyl)-1-methylquinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>
	<p>L14</p> <p>1-methyl-2-(4-nitrophenyl)quinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>
	<p>L19</p> <p>(E)-2-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-3-styrylquinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>
	<p>L20</p> <p>(E)-1-methyl-2-(4-nitrophenyl)-3-styrylquinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>

Tabla 2.5. Estructura química y actividad de las quinolonas, objeto de estudio del presente trabajo.

Estructura	Nombre	CMI
	<p>L16</p> <p>3-iodo-2-(4-methoxyphenyl)quinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>
	<p>L17</p> <p>3-iodo-2-(4-nitrophenyl)quinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>
	<p>L18</p> <p>3-iodo-1-methyl-2-(4-nitrophenyl)quinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>
	<p>L3</p> <p>(<i>E</i>)-1-methyl-2-phenyl-3-styrylquinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p> <p>20 (<i>M. smegmatis</i>)</p>
	<p>L4</p> <p>3-iodo-1-methyl-2-(4-nitrophenyl)quinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>
	<p>L5</p> <p>3-iodo-2-(4-methoxyphenyl)-1-methylquinolin-4(1 <i>H</i>)-one</p>	<p>>20</p>

Los microorganismos ensayados resultaron ser insensibles a la acción de las quinolonas y derivados, al menos hasta una concentración de 20 µg/ml (CMI > 20 µg/ml) a excepción de *M. smegmatis* (Tablas 2.1-2.5). Es de destacar, la interesante actividad mostrada por la chalcona L10 frente a la micobacteria (CMI de 2,5 µg/ml) dada la importancia que ha adquirido las infecciones por *M. tuberculosis*, y la moderada actividad de la quinolona L3 y la chalcona L11 (CMI = 20 µg/ml).

En la **Tabla 3**, se muestran los resultados de la actividad antibacteriana de la ciprofloxacina, utilizada como control de referencia. Como era de esperar, se comportó como una sustancia de amplio espectro, ya que actuó sobre las bacterias Gram positivas y negativas, pero no así frente *Candida albicans* (CMI > 20 µg/ml). Resultaron ser más sensibles a la acción de la quinolona las bacterias Gram negativas utilizadas en este estudio (CMI < 0,008 µg/ml). Con respecto a los cocos, la ciprofloxacina tuvo una actividad más moderada frente a *S. saprophyticus* y *E. faecalis* (CMI = 1,25 µg/ml) que sobre *S. aureus* y *S. epidermidis* (CMI ≤ 0,5 µg/ml). Por otra parte, la ciprofloxacina se comportó como una sustancia bactericida como se deduce de las diferencias existentes entre sus CMI y CMB (menos de dos diluciones).

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y mínimas bactericidas (CMB), expresadas en µg/ml de la ciprofloxacina frente a los microorganismos estudiados.

CIPROFLOXACINA		
Microorganismos	CMI	CMB
<i>S. aureus</i>	0,5	0,5
<i>S. epidermidis</i>	0,08	0,08
<i>S. saprophyticus</i>	1,25	1,25
<i>B. subtilis</i>	0,16	0,31
<i>B. cereus</i>	0,16	0,16
<i>E. faecalis</i>	1,25	1,25
<i>M. phlei</i>	0,016	0,031
<i>M. smegmatis</i>	1,25	1,25
<i>P. mirabilis</i>	0,04	0,04
<i>P. aeruginosa</i>	0,08	0,15
<i>E. coli</i>	0,004	0,008
<i>Salmonella sp</i>	0,03	0,03
<i>K. pneumoniae</i>	0,008	0,008
<i>C. albicans</i>	>20	>20

Como hemos comentado, la mayoría de los microorganismos resultaron ser insensibles a la acción de los productos. No obstante, se detectó un menor crecimiento de los cultivos con respecto a los cultivos control, al cabo de las 24 o 48 h de incubación, cuando éstos estaban sometidos a la acción de los compuestos a diferentes concentraciones. Por ello, se calculó el porcentaje de supervivencia a partir de las medidas de absorbancia a 550 nm, de la siguiente manera:

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\text{DO muestra} - \text{DO blanco muestra}}{\text{DO control} - \text{DO blanco control}} \times 100$$

Como se observa en la **Tabla 4**, las bacterias más sensibles a la acción de los compuestos fueron *S. saprophyticus* y en especial *M. smegmatis*, donde se detectó una inhibición del crecimiento superior al 70% con las quinolonas L4 y L19. Por otra parte, las chalconas L10 y L11 produjeron inhibiciones del crecimiento entre el 20 y el 30% frente a un mayor número de bacterias. Así por ejemplo, frente a *M. smegmatis* L10 produjo una inhibición del 82% a 0,3 µg/ml y L11 del 66,7% a 10 µg/ml (datos no mostrados). Asimismo, la quinolona L3, presentó una inhibición del 52% a 5µg/ml.

Uno de los objetivos, al estudiar la actividad de nuevos compuestos, es determinar los grupos funcionales responsables de la actividad (estudios SAR). Así, basándonos en la inhibición del crecimiento, podemos deducir que, en el caso de las chalconas, la presencia del grupo 4-metoxi o 4-nitro, hace que la molécula reduzca o pierda su actividad (L10 vs L11) y (L10 vs L12), respectivamente. Este mismo hecho se puso de manifiesto al comparar las actividades de las benzamidas (L1 vs L2 y L9), así como las quinolonas (L3 vs L19) y las furanoquinolinas (L21 vs L22).

Tabla 4. Inhibición del crecimiento (%)^a de los cultivos en presencia de los compuestos L1, L3-L8, L10-11, L14, L17-L19 y L21 a una concentración de 20 µg/ml tras 24h de incubación.

Productos	Microorganismos								
	S.a	S.e	S.s	B.c	M.s	M.p	E.f	S.sp	P.a
L1	na	na	36,2	na	68,7	na	na	na	na
L3	27	na	na	na	100	na	na	na	na
L4	na	na	28,8	na	71,2	na	na	na	na
L5	na	na	23,4	na	na	na	na	na	na
L6	na	na	46,16	31,9	56,3	na	na	na	na
L7	na	na	26,57	na	na	na	na	na	na
L8	na	na	36,83	na	na	na	na	na	na
L10	na	na	na	20,0	100	22,7	31,0	22,7	na
L11	na	na	na	na	100	na	29,0	na	20,3
L14	na	31,7	23,1	21,9	na	na	na	na	na
L17	na	na	na	na	28,9	na	na	na	na
L18	29,5	na	na	na	45,3	na	na	na	na
L19	56,9	na	na	30	72,7	na	na	na	na
L21	32,7	na	na	na	na	na	na	na	na

^aLos valores representan la media tres determinaciones.

na: no activo.

S.a (*Staphylococcus aureus*), S.e (*Staphylococcus epidermidis*), S.s (*Staphylococcus saprophyticus*), B.c (*Bacillus cereus*), M.s (*Mycobacterium smegmatis*), M.p (*Mycobacterium phlei*), E.f (*Enterococcus faecalis*), S.sp (*Salmonella* sp), P.a (*Pseudomonas aeruginosa*).

5. Conclusiones

En el presente trabajo se estudian las actividades antimicrobianas de 20 quinolonas y derivados, obtenidas por síntesis en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Aveiro (Portugal) y como resultado del mismo se han elaborado las siguientes conclusiones:

1. Las bacterias Gram positivas y Gram negativas ensayadas, así como *Candida albicans* resultaron ser insensibles a la acción de estos compuestos, al menos hasta 20 µg/ml.

2. Las chalconas (L10 y L11) y la quinolona (L3) resultaron ser activas frente a la bacteria ácido-alcohol resistente (*Mycobacterium smegmatis*) presentando una CMI de 2,5 (L10) y 20 µg/ml (L11 y L3).

3. Del análisis de la relación estructura-actividad de estos compuestos, y su actividad inhibitoria del crecimiento frente a los microorganismos ensayados, se puede concluir que la presencia de un grupo metoxi ó nitro en la molécula, lleva a una reducción o pérdida de la actividad.

4. Frente a *M. smegmatis* se detectó una reducción de la supervivencia superior al 70% en presencia de las quinolonas L4 y L19 a una concentración de 20 µg/ml, y por otra parte, las chalconas L10 y L11, exhibieron inhibiciones del 82% a 0,3 µg/ml y 66,7% a 10 µg/ml, respectivamente.

Conclusions

In this work we studied the antimicrobial activities of 20 quinolones and derivatives, obtained by synthesis in the Department of Organic Chemistry at the University of Aveiro (Portugal), and as a result we reach the following conclusions:

1. Gram positive and Gram negative bacteria as well as *Candida albicans* were insensitive to the action of these compounds, at least to 20 µg/ml.

2. Chalcones (L10 and L11) and quinolone (L3) were found to be active against acid-fast bacteria (*Mycobacterium smegmatis*) showing CMI of 2,5 (L10) and 20 µg/ml (L11 and L3).

3. The analysis of the structure-activity relationship of these compounds, considering growth inhibition over time of incubation, it can be concluded that the presence of a methoxy or nitro group in the molecule decrease or lost of the activity.

4. The quinolones L4 and L19 at 20 µg/ml showed pronounced reduction in the survival against *M. smegmatis* (>70%). Furthermore, chalcones L10 and L11 exhibited growth inhibition of 82% at 0,3 µg/ml and 66,7% at 10 µg/ml, respectively.

Referencias

- Andreu A., Cacho J., Coira A., Lepe, J.A. 2010. Diagnóstico Microbiológico de las infecciones del tracto urinario. Procedimientos en Microbiología Clínica. Ed. Emilia Cerneado y Rafael Cantón. 1-40. España. Disponible en:
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia14a.pdf>
- Andreu, A., Planells, I., y Grupo Cooperativo Español para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana de los patógenos urinarios. 2008. Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos de primera línea, Estudio nacional multicéntrico. *Medicina Clínica*. 130:481-486.
- Appelbaum, P. C. y Hunter, P. A. 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16:5-15.
- Azanza, J. R., Sádaba, B., Mediavilla, A. 2000. Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoína. En Farmacología Humana. Ed. Masson. 1145-1157. Barcelona, España.
- Cisneros, J.M. 2010. Viejos antimicrobianos para nuevos usos. En: Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica, XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Elsevier. 28:4. Barcelona, España. Disponible en:
<http://www.seimc.org/contenidos/congresosyeventos/seimc anteriores/seimc-EIMC-2010.pdf>
- Cozzarelli, N.R. 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*. 207:953-960.
- Crumplin, G. C., Kenwright, M. y Hirst, T. 1984. Investigations into the mechanisms of action of the antibacterial agent norfloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 13:9-23.
- Dalet, F. y del Río, G. 1997. Generalidades de las infecciones urinarias. En: Infecciones Urinarias. Ed. Médica Panamericana. 3- 12. España. Disponible en:
https://books.google.es/books?id=iZsq1o5MIFUC&pg=PA1&lpg=PA1&dq=Generalidades+de+las+infecciones+urinarias&source=bl&ots=yzdRd0k60&sig=9mGDtVvO_AIOiX5UC4Zj9SILCj0&hl=es&sa=X&ei=omtsVerYGcjUNeLgZgL&ved=0CEAQ6AEwBA#v=onepage&q&f=false
- Gobernado, M., Salavert, M., Santos, M., Cantón, E., Pastor, A., Romá, E. 1999. Quinolonas. En: Antimicrobianos en Medicina. Sociedad Española de Microbiología. Ed. García Sánchez, J.E., López D., Prieto, J. 383-416. Barcelona, España.
- Gootz, T. D. y Brighty, K. E. 1998. Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. En: The Quinolones, 2º ed. Andriole, V.T. Academic Press. 29-80. San Diego, USA.
- Gutierrez-Zufiaurre, N. 2004. Relation between structure, activity and adverse effects of quinolones. *Revista Española de Quimioterapia*. 17:232-243.
- Higgins, P., Fluit, G. A., Schmitz, F. J. 2003. Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Current Drug Targets*. 4:181-190.
- Livermore, D.M. 2002. Multiple mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases*. 34:634-640.
- Lorenzo, P. y Aleixandre, A. 2009. Sulfamidas y trimetoprima. Quinolonas. En: Velázquez. Farmacología Básica y Clínica. Ed. Médica Panamericana, 18ª. 857-869. Madrid, España. Disponible en:
https://books.google.es/books?id=BeQ6D40wTPQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Mizuguchi, Y., Ogawa, M., Udou, T. 1985. Morphological Changes Induced by β -Lactam Antibiotics in *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 27:541-547.

- Moujir, L. 1988. Actividad antibiótica de la netzahualcoyona, una triterpenoquinona aislada de *Schafferia cuneifolia*. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna. España.
- Mouton, Y. y Leroy, O. 1991. Ofloxacin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1:57-74.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 5th ed., NCCLS document M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa. 17:1-36.
- Pan., X.S. y Fisher L.M. 1996. Cloning and characterization of the parC and parE genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. *Journal of Bacteriology*. 14:4060-4069.
- Pigrau, C. 2013. Infección del tracto urinario. Ed. Carlos Pigrau. 1-169. Barcelona, España. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/otrosdeinteres/seimc-dc2013-LibroInfecciondeltractoUrinario.pdf>
- Reece, R. y Maxwell, A. 1991. DNA Gyrase: Structure and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 26:335-375.
- Roychoudhury, S. y Ledoussal, B. 2002. Non-fluorinated quinolones (NFQs): new antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. *Current Drug Targets Infectious Disorders*. 2:51-65.
- Sierra, J.M. 2005. Bases moleculares de la resistencia a quinolonas en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Corynebacterium* spp. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. España. Disponible en: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2419/01.JMSO_TESI.pdf?sequence=1
- Taléns-Visconti, R., Garrigues, T. M., Cantón, E. 2002. Mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas. *Revista Española de Quimioterapia*. 1:25-27.
- Tillotson, G. S. 1996. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *Journal of Medical Microbiology*. 44:320-324.
- von Rosenstiel, N. y Adam, D. 1994. Quinolone antibacterials. An update of their pharmacology and therapeutic use. *Drugs*. 6:872-901.
- Wolfson, J. S. y Hooper, D. C. 1989. Fluoroquinolone Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 2: 378-424.