

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA SERIE DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO PARA-AMINO SALICÍLICO (PAS)

José G. Trujillo Ferrara*
Iván Vázquez Alcántara*
Olga Muñoz García*
Julio César Padilla Ramos**
Elio Valencia Márquez***
Penélope Noriega Zapata***
Sergio A. Pérez Gutiérrez***
Ricardo Yáñez Ávila*

RESUMEN

Se describe la síntesis y evaluación de la actividad antimicrobiana de una serie de análogos del PAS: maleamida, maleimida, succinamida, succinimida y fumaramida que se comportan como antimetabolitos del PABA y capaces de inhibir la dihidropirato sintetasa e impedir la biosíntesis del ácido fólico, y el crecimiento bacteriano. Todos los compuestos estudiados presentan actividad antimicrobiana aunque la potencia es menor a la de los fármacos utilizados como control.

INTRODUCCIÓN

Desde los clásicos experimentos realizados por Gerhard Domagk (1935),¹ quien demostró que el colorante rojo azoico, el *Prontosil rubrum*, era un compuesto eficaz en el tratamiento de infecciones por estreptococos, tanto en ratón como en el hombre, se han establecido las bases para una quimioterapia antimicrobiana específica basada en la inhibición de una determinada vía metabólica.

* Departamento de Bioquímica de la Escuela Superior de Medicina, IPN.

** Departamento de Microbiología de la Escuela Superior de Medicina, IPN.

*** Estudiantes becarios Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) de la Escuela Superior de Medicina, IPN.

Poco tiempo después del trascendental descubrimiento de Domagk se demostró que el *Prontosil rubrum* sólo tenía actividad *in vivo*, lo cual sugería que no era el colorante el compuesto activo sino un metabolito. En 1937 Fourneau y Trefouel² comprobaron que el *Prontosil rubrum* en el organismo se convierte en el *Prontosil album*, o sulfanilamida, que resultó ser el verdadero compuesto activo e incluso se pudo explicar su mecanismo de acción a nivel molecular al comprobarse que actúa como antimetabolito del ácido para-amino benzoico (PABA) y del ácido fólico.

Se sabe que el ácido fólico es vitamina para el hombre y otros mamíferos y por tanto tiene que ser administrado forzosamente en la dieta. Algunas bacterias no pueden absorber el folato del medio de cultivo, aunque exista en concen-

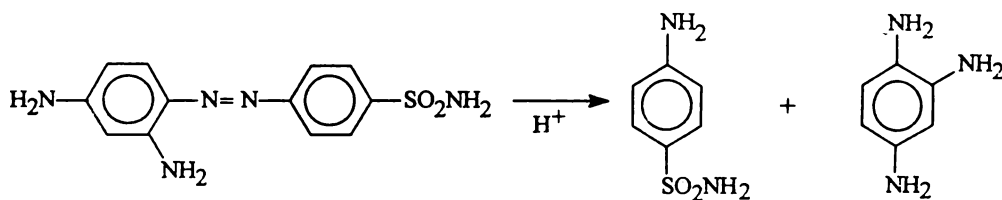


Fig. 1. *Prontosil rubrum* y su transformación a sulfanilamida.

traciones adecuadas y lo tienen que sintetizar a partir de la pterina, PABA y ácido glutámico, por acción de la enzima dihidropteroato sintetasa (2.5.1.15). El ácido para-amino-benzoico (PABA) es un componente de la molécula del ácido fólico, que es indispensable en la síntesis de DNA y RNA Farber (1948).³

El hecho de que algunas bacterias posean enzimas para la biosíntesis del ácido fólico, que no existen en el hombre, abre una estrategia terapéutica antimicrobiana, ya que la inhibición selectiva de estas enzimas afectará el metabolismo y la sobrevivencia de la bacteria pero no del huésped.

La inhibición enzimática se puede lograr en forma competitiva, no competitiva y acompetitiva, según sea la forma como se una el inhibidor a la enzima (Fersht, 1985⁴ y Segal, 1975⁵).

La sulfanilamida tiene efecto bacteriostático, porque actúa como un *inhibidor competitivo* de la dihidropteroato sintetasa, debido a la similitud estructural que presenta con el PABA (Woods, 1940⁶, Northey, 1948⁷ y Juskes, 1963⁸).

La sulfanilamida tiene interés histórico por haber sido uno de los primeros fármacos de los cuales ha sido posible explicar el mecanismo de acción a nivel molecular, lo cual motivó a los investigadores interesados en el desarrollo de nuevos fármacos y se han logrado sintetizar cientos de sulfas (Northey, 1948⁷), además, aplicando la misma teoría se han desarrollado gran cantidad de análogos de sustratos naturales que se comportan como antimetabolitos (como anti-vitamina K, Campbell, 1941;⁹ anti-vitamina B₂, Wright, 1944;¹⁰ análogos del ácido pantoténico, Brackett, 1946;¹¹ sulfas como inhibidores de la anhidrasa carbónica, Miller, 1950;¹² anti-vitamina B₆, Loefer, 1951¹³), y muchos otros que han proporcionado nuevos fármacos con diversas aplicaciones terapéuticas.

Los fármacos que actúan como antimetabolitos han tenido gran utilidad en el tratamiento de diversos padecimientos y se caracterizan por ser específicos, lo cual se explica por la similitud estructural con el metabolito endógeno; la inhibición enzimática que producen es reversible y dependiente de la concentración del sustrato. La inhibición de la enzima ocasiona que se acumule el sustrato natural, por lo que el efecto terapéutico generalmente es leve y temporal, ya que la acumulación del sustrato natural que ocasiona la inhibición de la enzima hace que en la competencia que se produce por el sitio activo gane el sustrato por encontrarse en mayor concentración. El ideal terapéutico se lograría si el antimetabolito afectara sólo el metabolismo del parásito, pero no el del huésped, lo cual no siempre es posible.

Woolley^{14,15,16,17,18} ha contribuido al desarrollo de antimetabolitos al postular una teoría que incrementa las posibilidades terapéuticas. Esta teoría de los *análogos agregados*, postula que un antimetabolito puede inhibir simultáneamente dos vías metabólicas si el compuesto que se sintetiza tiene dos grupos capaces de antagonizar a dos metabolitos endógenos. Por ejemplo el 1,2-dimetil-4-carboxifenil-azo-5-hidroxibenceno y el 1,2-dicloro-4-) p-nitrobencensulfonamida) 5-nitrobenceno. Estos compuestos actúan como antimetabolitos del ácido fólico y de la vitamina B₁₂, comprobándose¹⁵ que tenían efecto anti-neoplásico y se logró una regresión total del carcinoma mamario en rata y ratón en el 75% de los animales tratados.

Otro avance importante en el desarrollo de este tipo de fármacos fue la contribución de Baker,^{19,20,21,22} quien propuso la teoría de los *anti-metabolitos no clásicos*, según la cual un antimetabolito no necesariamente debe tener una estructura similar al sustrato natural; se puede

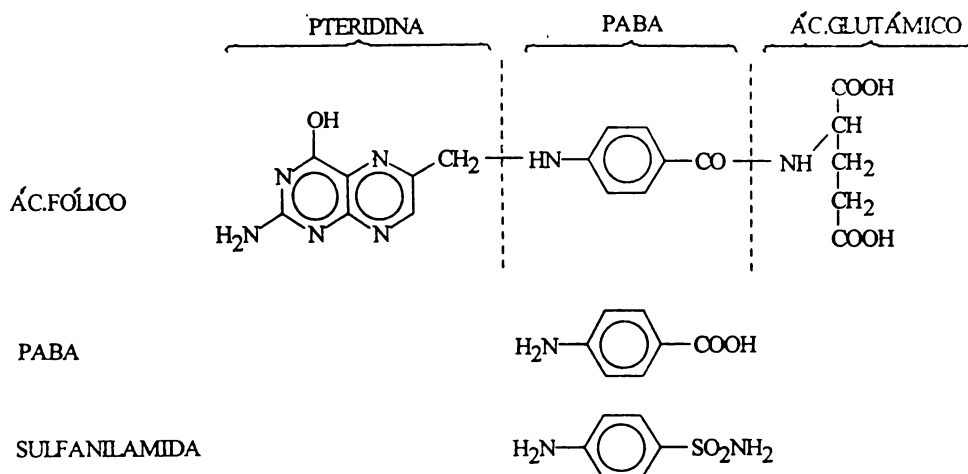


Fig. 2. Fórmula del ácido fólico, del PABA y de la sulfanilamida, donde se aprecia similitud estructural.

modificar la estructura, siempre y cuando se respete la parte de la molécula que va a ocupar el sitio activo. En otra parte de la molécula puede existir un grupo químico altamente reactivo o alquilante, o sea, un compuesto capaz de sustituir un átomo de hidrógeno de un compuesto orgánico por un radical alcoholo o alquilo y unirse covalentemente a la enzima, con lo que se logra una inhibición selectiva e irreversible, que asegura un efecto farmacológico selectivo y prolongado.

Aplicando la teoría de los antimetabolitos no clásicos se ha logrado la síntesis de inhibidores de la deshidrogenasa láctica, Baker, 1960;²⁰ Carvajal, 1959;^{23,24,25} Wong, 1968;²⁶ Yáñez, 1970;²⁷ de la ornitina descarboxilasa, Mendoza, 1987;²⁸ Rodríguez, 1984;²⁹ Trujillo, 1991;^{30,31} de la acetilcolinesterasa, Vázquez, 1994;³² de la arginasa extrahepática, Méndez, 1982.³³

El ácido para-aminosalicílico (PAS) es un análogo estructural del ácido para-aminobenzoico (PABA), que presenta actividad bacteriostática para el *M. Tuberculosis* y se ha propuesto que su mecanismo de acción es similar a las sulfonamidas. Es importante resaltar que la actividad antimicrobiana del PAS es altamente específica para el *M. Tuberculosis* y resulta poco activo para otros microorganismos. Con base en lo anterior se consideró conveniente sintetizar análogos del PABA y del PAS que en teoría actúen como inhibidores competitivos de la enzima dihidropteroato sintetasa (E:C. 2.5.1.15).

En este trabajo se informa respecto a la síntesis y evaluación de la actividad antimicrobiana de una serie de análogos del PAS (1), que poseen en su molécula el grupo maleamida (2), maleimida (3), succinamida (4), succinimida (5) y fumaramida (6), cuya estructura química se muestra en la figura 3. Los grupos maleamida, maleimida y fumaramida funcionan como grupos electrofílicos, los que pueden reaccionar con grupos nucleofílicos presentes en el sitio activo de la enzima, y formar enlaces covalentes. La capacidad reactiva de estos grupos se debe a la presencia del doble enlace en la posición alfa-beta con respecto al grupo carbonilo. Los compuestos que presentan estas características se denominan aceptores tipo Michael y son capaces de llevar a cabo reacciones de adición covalentes o alquilantes.

Como puede verse en la figura 3, los compuestos sintetizados poseen la estructura del PAS, que les permiten competir por el sitio activo de la enzima y poseen además los grupos maleimida, maleamida y fumaramida capaces de interactuar con los grupos funcionales (R-SH; R-OH; R-NH₂) de proteínas, dando lugar a adiciones tipo Michel, y en teoría a una inhibición irreversible.

En el caso de la succinamida y la succinimida, la inhibición, en teoría, debería ser reversible por la ausencia del doble enlace en posición en relación al carbonilo.

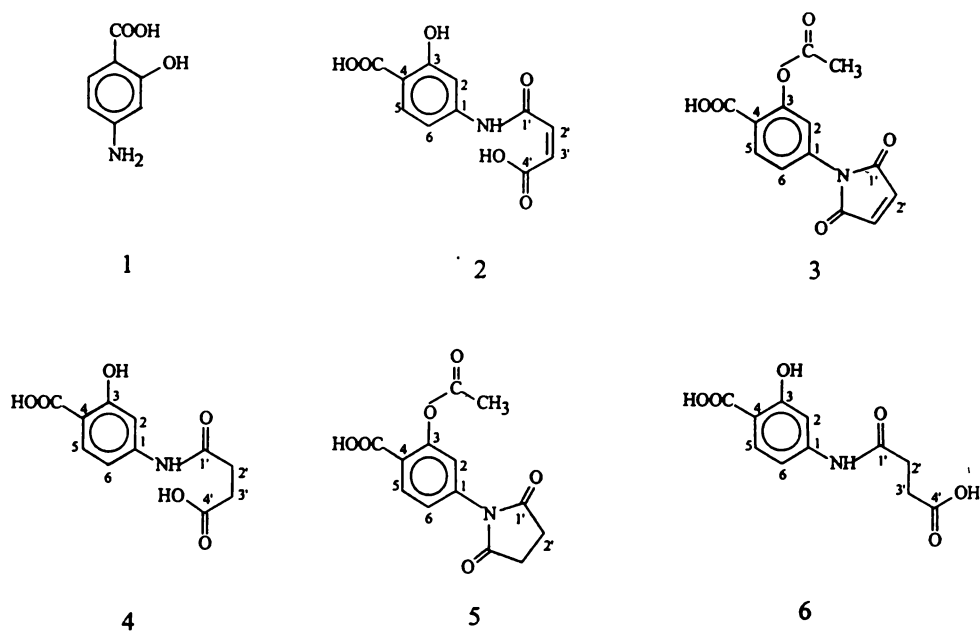


Fig. 3. Estructura de los compuestos estudiados, análogos del ácido p-amino salicílico (PAS). (1) Ácido para-amino-salicílico, (2) Maleamida del PAS, (3) Maleimida del PAS, (4) Succinamida del PAS, (5) Succinimida del PAS y (6) Fumaramida del PAS.

MATERIAL

Compuestos estudiados

Materiales sintetizados: maleamida del PAS, maleimida del PAS, fumaramida del PAS, succinamida del PAS, succinimida del PAS. Compuestos comerciales utilizados como referencia: ampicilina, trimetropin con sulfametoxazol. Cepas bacterianas: *Pseudomona aeruginosa* ATCC no. 27853, *Salmonella typhi* ATCC s/n, *Escherichia coli* ATCC no. 25922. Las cepas se adquirieron del cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

Medios de cultivo

Medio de cultivo, infusión cerebro-corazón (BHI) difco medio agar sólido de tripticaseína de soya. Difco.

Aparatos

Nefelómetro de McFarland, autoclave, campana de flujo-laminar, estufa de cultivo.

Material de vidrio y utensilios de laboratorio usuales en un laboratorio de microbiología.

MÉTODO

Compuestos sintetizados

La maleamida, maleimida, succinamida, succinimida y fumaramida del PAS se sintetizaron en el Departamento de Bioquímica de la Escuela Superior de Medicina, IPN, siguiendo las técnicas descritas por Trujillo (1994³⁴), y que en forma resumida consisten en lo siguiente:

Síntesis de la maleamida y succinamida. El método general de preparación consiste en mezclar, a temperatura ambiente y con agitación vigorosa, cantidades equimoleculares del PAS con el anhídrido maléico o succínico disueltos en tetrahidrofurano anhidro, durante 60 minutos. La reacción es exotérmica y se forma un precipitado, que se prepara por filtración. El filtrado se evapora al vacío y el residuo se junta con el precipitado para lavarse con agua acidulada con HCl 0.1 N a un pH de 3. Se seca a 40°C, el pro-

ducto es la amida correspondiente con un buen rendimiento (80-95%).

Síntesis de las maleimida y succinimida. El método general consiste en mezclar la amida en ácido acético glacial con una cantidad equivalente de acetato de sodio suspendido en anhídrido acético y calentar la mezcla con agitación en baño de maría a 70-80°C hasta disolución. La reacción se mantiene a esa temperatura por tres horas. Posteriormente se concentra la mezcla en un rotovapor y se adiciona HCl 0.1 N hasta obtener un pH de 3. Se forma un precipitado que se filtra y se lava con agua acidulada a pH 3 y se seca al vacío a 40°C. Las imidas obtenidas en esta forma dieron rendimientos de 50-70%.

Síntesis de la fumaramida. El método general para la preparación de fumaramida consiste en mezclar, con agitación y en atmósfera de nitrógeno, soluciones equimoleculares del ácido fumárico y dicitohexilcarbodiimida (DCC) disueltos en la mínima cantidad de dimetil-sulfóxido (DMSO).

La mezcla se mantiene entre 3-6°C por 20 minutos y posteriormente se adiciona gota a gota, durante 30 minutos, una solución del PAS disuelto en DMSO anhidro. Terminada la adición, se mantiene la agitación y la temperatura 3-6°C por 30 minutos, se elimina por filtración la dicitohexilurea y el filtrado se vierte en agua para formar un precipitado que se filtra y se lava con solución de NaHCO₃ a pH 8. Las aguas de lavado se reúnen y se acidifican a pH de 3.0 con HCl 0.1 N. Se deja reposar por 24 horas a temperatura ambiente, el sólido cristalino se filtra y se seca al vacío a 40°C, la fumaramida da un rendimiento entre 20-35%.

Purificación y caracterización química de los compuestos sintetizados. La purificación de los compuestos descritos en este trabajo se pudo realizar con relativa facilidad, ya que todos los compuestos tienen protones ionizables y por consiguiente una carga eléctrica dependiente del pH.

Si se toman en cuenta los pKa de los grupos funcionales tales como Ar-N⁺H₃ (4.6), Ar-COOH (4.2) y Ar-OH(10.1), se puede predecir el punto isoeléctrico, en el cual la carga neta del compuesto es cero, y por lo tanto insolubles en

agua. La pureza de los compuestos se comprobó por cromatografía en placa fina (Stahl, 1965³⁵).

La caracterización química se realizó por determinación del punto de fusión en un aparato *Fisher Johns* (los puntos que se informan no están corregidos). Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro *Perkin-Elmer* 16F-Ft-IR, en pastilla de KBr o en solución de CHCl₃ y celdas de NaCl. Los espectros de luz ultravioleta (UV) se realizaron en un espectrofotómetro *Unicam* SP-800 en solución de etanol.

Los espectros de RMN de ¹H a 300 MHz y ¹³C a 75 MHz se obtuvieron en un espectrómetro *Varian* XL-300GS, en solución de DMSO-d₆. Los espectros de correlación heteronuclear en dos dimensiones ¹³C--¹H, se obtuvieron utilizando la secuencia de pulsos Héctor. La mayor parte de las determinaciones químicas se realizaron en el Departamento de Química del CINVESTAV-IPN y se describen con detalle en Trujillo (1994³⁴).

Determinación de la actividad antimicrobiana de los análogos del PAS estudiados. Después de probar diferentes técnicas (Bauer, 1966³⁶), se decidió utilizar la técnica nefelométrica de McFarland.

Preparación de medio de cultivo infusión cerebro-corazón. Se pesan 3.7 g del polvo BHI (infusión cerebro-corazón) que contiene 60 g de infusión cerebro-corazón, 60 g de peptona de carne, 5.0 g de NaCl, 3.0 g de glucosa, 14.5 g de peptona de gelatina y 2.5 g de fosfato disódico (pH 7.4), se mezclan en un litro de agua destilada agitando para lograr una dispersión homogénea. Se calienta a ebullición durante un minuto a fuego directo hasta lograr la dispersión completa y homogénea del medio de cultivo, posteriormente se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

Preparación del medio de agar sólido de *tripticaseína* de soya. Se pesan 40 g del medio (fórmula: 15 g peptona de caseína, 5 g peptona de soya, 5 g de NaCl y 15 g de agar-agar, pH 7.3) y se dispersan en un litro de agua destilada, agitando enérgicamente hasta lograr la completa disolución, se esteriliza en el autoclave a 121°C por 15 minutos.

Mantenimiento de cepas bacterianas. En cajas de Petri estériles se colocan 15 ml del medio

recién esterilizado, se deja reposar hasta que solidifique el medio, posteriormente, en condiciones estériles, se toma una asada del cultivo madre y se resiembrar. El cultivo se deja en la estufa a 37°C por 24 horas. Se recomienda realizar la resiembra cada 20 días.

Preparación del inóculo. Un ml del medio de cultivo infusión cerebro-corazón (BHI) estéril se inocula con la cepa bacteriana que se desee trabajar y se incuba a 37°C por cuatro horas o el tiempo necesario para que el inóculo tenga un crecimiento bacteriano similar o igual al tubo no. 3 del nefelómetro de McFarland que corresponde a 9×10^8 UFC de bacterias. Un ml de este cultivo se vierte en 99 ml del medio BHI para lograr 9×10^6 UFC de bacterias. De esta dilución se toma 1 ml y se diluye con 8 ml del medio BHI, de ésta se toma 1 ml que equivale a 1×10^6 UFC de bacterias/ml, y es la que se utiliza para agregar a los tubos problema.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Se utilizó el método clásico de dilución en caldo. Se preparan series de 12 tubos de ensayo, en cada uno se añade 1 ml del inóculo (que contiene 1×10^6 UFC de bacterias), se añaden concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano que se va a estudiar en 1 ml de solución, se incuban a 37°C por 24 horas y se lee la densidad celular en el nefelómetro. El testigo positivo tiene 1 ml del medio BHI más 1 ml del inóculo, y se considera que es equivalente al 100% de crecimiento, el testigo negativo tiene 2 ml del medio BHI sin inóculo, y es equivalente a un crecimiento bacteriano del 0%.

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo indican que todos los compuestos sintetizados presentan actividad antimicrobiana y que ésta depende de la concentración del compuesto en el medio de cultivo. Se pudo constatar que la actividad antimicrobiana es similar en los cinco compuestos estudiados en las diferentes cepas que se utilizaron, y por regla general presentan menor potencia que los fármacos control empleados para comparar los resultados. En todas las pruebas se utilizaron 12 tubos de ensayo, cada uno con 1 ml del inóculo que contiene 1×10^6 UFC de bacterias y 1 ml de la solución del agente antimicrobiano. La máxima concentración que se utilizó en todos los

casos fue de 2 mg/ml y se disminuyó a la mitad en todos los tubos subsiguientes.

Los resultados obtenidos con *Escherichia coli*, como se aprecia en la figura 4, muestran que concentraciones de ampicilina de 0.0625 mg/ml inhiben cerca del 90% del crecimiento bacteriano, el trimetropín con sulfametoxazol (TMP + SMX) produce inhibición del 70%, y los compuestos sintéticos logran una inhibición del 40-50% pero a concentraciones de 0.5 mg/ml.

Los estudios con *Staphylococcus aureus* muestran que la ampicilina produce inhibición del 90% en el crecimiento bacteriano a concentración de 0.25 mg/ml, mientras que el TMS + SMX y los compuestos sintéticos producen inhibiciones del 40-50% a una concentración de 0.125 mg/ml; concentraciones superiores no modifican apreciablemente el grupo de inhibición, como se puede ver en la figura 5.

Los resultados obtenidos con *Salmonella typhi*, que se muestran en la figura 6, indican que la ampicilina inhibe totalmente el crecimiento bacteriano a concentraciones de 0.125 mg/ml; a esta concentración el TMS + SMX produce 70% de inhibición, y la succinimida y fumaramida del PAS producen inhibición cercana al 60%. Los otros tres compuestos estudiados (succinamida, maleamida y maleimida del PAS) inhiben esa misma concentración a sólo el 30%, figura 6.

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos con *Pseudomonas aeruginosa*, en donde se puede apreciar que la ampicilina presenta pobre actividad antimicrobiana para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*, ya que a la dosis más alta (2 mg/ml) sólo inhibe el 40%, mientras que el TMS + SMX logra inhibición cercana al 80% en los compuestos sintéticos, la fumaramida, maleimida y maleamida del PAS inhiben un 60% y la succinamida y succinimida del PAS sólo inhiben entre 40-50%.

DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan en este trabajo forman parte de una línea de investigación que pretende la síntesis de una serie de inhibidores enzimáticos específicos tomando como base la teoría de los antimetabolitos, según ésta la similitud estructural del análogo sintético con el sustrato natural permiten predecir la competencia por el sitio activo de la enzima. Si además del

grupo que compite con el sustrato, el análogo sintético posee un grupo alquilante o un grupo capaz de establecer enlaces hidrofóbicos en la vecindad del sitio activo, la unión del análogo sintético con la enzima puede presentar diferentes grados de estabilidad, lo cual se reflejaría en un fármaco con un efecto terapéutico de duración variable.

Los compuestos sintetizados que se estudian en este trabajo reúnen los requisitos estructurales para ser considerados como antimetabolitos del PAS, ya que todos poseen el grupo capaz de competir con el ácido salicílico o su análogo, el PABA, por el sitio activo de la enzima; además un grupo alquilante, ya sea los grupos maleamida o maleimida y fumaramida, o también grupos con estructura similar pero que por carecer de doble enlace no formarán enlaces covalentes y la unión con la enzima se esperaría que fuera reversible como son los grupos succinamida y succinimida. La fumaramida puede presentar diferente afinidad por ser el isómero trans del ácido maleico.

La síntesis de los compuestos se realizó con resultados satisfactorios, tanto por los rendimientos obtenidos como por la rapidez de las técnicas utilizadas y la pureza que se logró en todos los productos. La descripción detallada de las técnicas que se utilizaron para comprobar la estructura que se describen en otra comunicación (Trujillo, 1994³⁴).

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos estudiados: maleamida, maleimida, succinamida, succinimida y fumaramida del ácido P-aminosalicílico, demuestran que todos ellos presentan actividad antimicrobiana que es dependiente de la concentración. Como se puede apreciar en las figuras 4, 5, 6 y 7 que comparan la actividad antimicrobiana, los compuestos que se utilizaron como testigos positivos: la ampicilina y el trimetropin con sulfametoxazol (TMP + SMX), a las mismas concentraciones, presentan generalmente mayor efecto antimicrobiano.

Las potencias antimicrobianas de estos cinco compuestos estudiados son similares. La utilidad terapéutica de un fármaco no depende únicamente de su potencia farmacológica, aunque obviamente es una cualidad importante; sin embargo, existen otros parámetros como son: toxicidad,

efectos colaterales, interacciones farmacológicas, duración del efecto farmacológico, especificidad, inocuidad de metabolitos, ausencia de efectos teratológicos, neoplásicos y otros. En realidad los compuestos que se presentan en este trabajo, análogos sintéticos del PAS han demostrado actividad antimicrobiana al actuar como antimetabolitos del PABA, debido a la similitud estructural que presentan ambos compuestos. Se decidió utilizar al PAS como antimetabolito del PABA además de su similitud estructural por presentar actividad antimicrobiana propia. Aunque los compuestos que se describen en este trabajo presentan actividad antimicrobiana para ser considerados como fármacos con posibilidades terapéuticas, deben de ser sometidos a estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y toxicológicos. Sin embargo, se considera que la importancia de los resultados radica en que se apoya la hipótesis planteada y comprobar que es posible la síntesis de nuevos fármacos tomando como base la teoría de los antimetabolitos.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo nos permiten concluir que los compuestos sintetizados, derivados del ácido para-aminosalicílico (maleamida, maleimida, succinamida, succinimida y fumaramida del PAS), presentan actividad antimicrobiana y que ésta es dependiente de la concentración. El estudio comparativo indica que la actividad antimicrobiana de todos ellos es similar y presentan menor potencia que los fármacos que se utilizaron como control positivo: la ampicilina y el trimetropín con sulfametoxazol (TMO + SMX).

SUMMARY

It is described the synthesis and evaluation of the activity antimicrobiotic of a series of analogous of the PAS: maleamide, maleimide, succinimide and fumaramide that are behaved as antimetabolites of PABA and able of inhibiting the dihydropteroate synthetase and to prevent the biosynthesis of folic acid and the bacterial growing.

All the studied compounds present antimicrobiotic activity though the potency is smaller that the drug used as control.

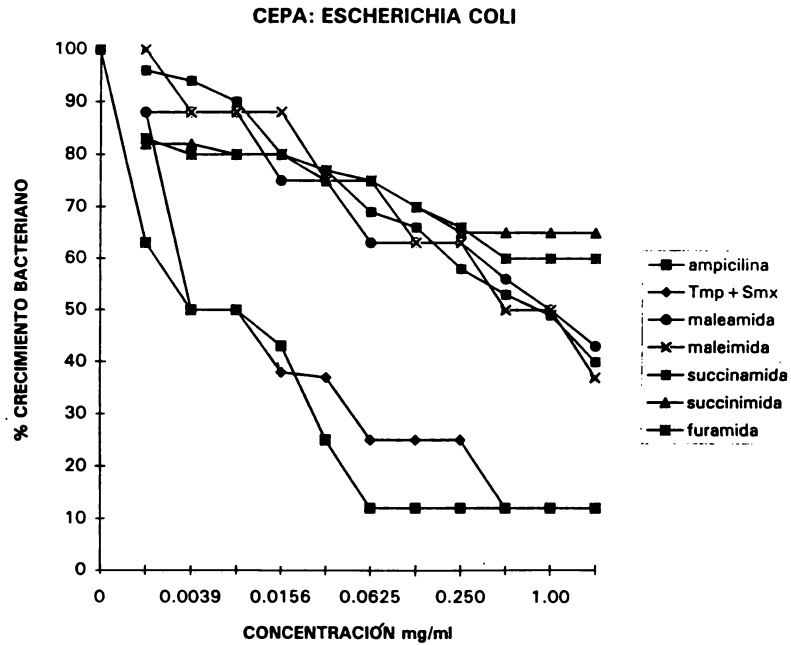


Fig. 4. Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* por los compuestos: (■) Ampicilina, (◇) trimetropín con sulfametoxazol (TMP + SMX), (●) Maleamida del PAS, (x) maleimida del PAS, (+) succinamida del PAS, (Δ) Succinimida del PAS, y (*) furamida del PAS.

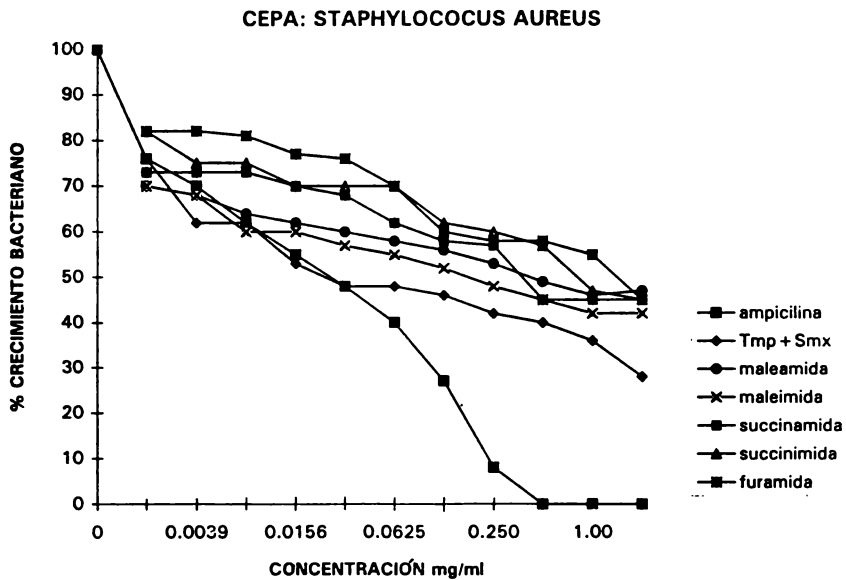


Fig. 5. Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* por los compuestos: (■) Ampicilina, (◇) trimetropín con sulfametoxazol (TMP + SMX), (●) Maleamida del PAS, (x) maleimida del PAS, (+) succinamida del PAS, (Δ) Succinimida del PAS, y (*) furamida del PAS.

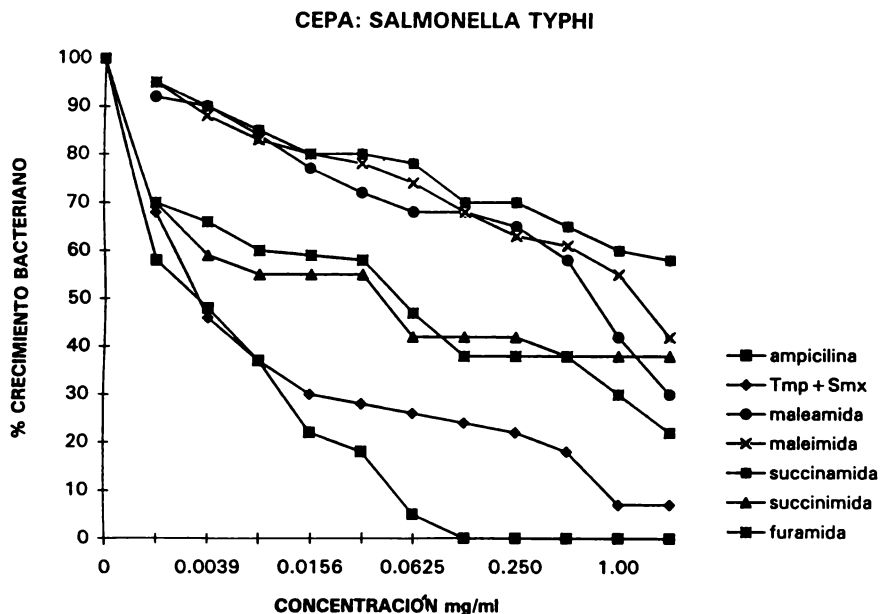


Fig. 6. Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de *Salmonella Typhi* por los compuestos: (■) Ampicilina, (◇) trimetropín con sulfametoxazol (TMP + SMX), (●) Maleamida del PAS, (x) maleimida del PAS, (+) succinamida del PAS, (Δ) Succinimida del PAS, y (*) furamida del PAS.

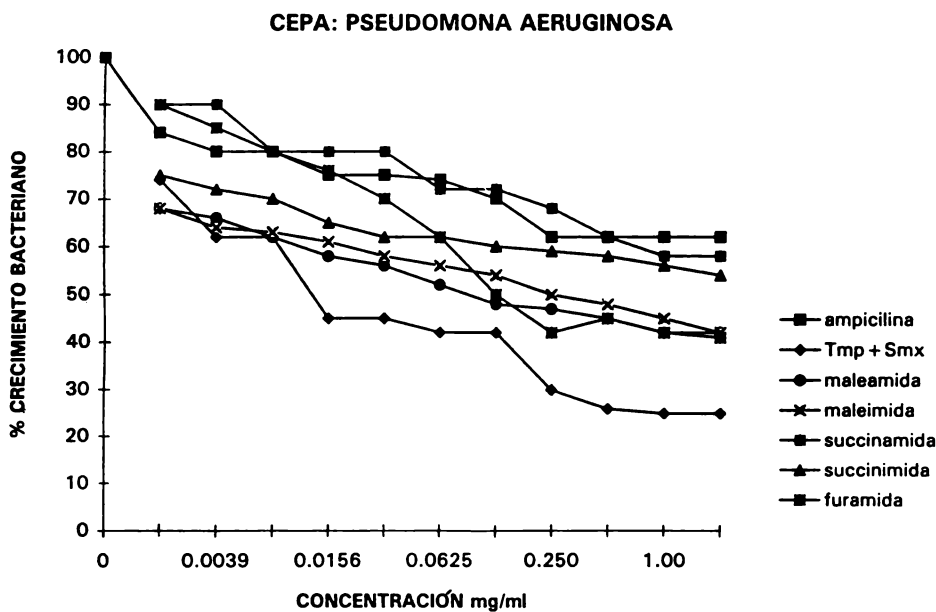


Fig. 7. Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas Aeruginosa* por los compuestos: (■) Ampicilina, (◇) trimetropín con sulfametoxazol (TMP + SMX), (●) Maleamida del PAS, (x) maleimida del PAS, (+) succinamida del PAS, (Δ) Succinimida del PAS, y (*) furamida del PAS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Domagk, G. 1935. "Ein Beitrag zur chemotherapie der Bakteriellen infektionen". *Deutsch. Med. Wocheschr.*, **61**, 250.
2. Fourneau, E.; Trefouel, J.; Mitti, F. and Boyet, D. 1937. "Chemothérapie action antistreptococcique des dérivés sulfores organiques". *Comp. Rend.*, **204**, 1763.
3. Farber, S.; Diamod, L.K.; Mercer, R.D.; Sylvester, R.F. and Wolf, J.A. 1948. "Temporary remissions in acute leukemia in children produced by the folic acid antagonist, 4-aminoptero-glutamic acid". *New Engl. J. Med.*, **238**, 787.
4. Ferstht, A. 1985. *Enzyme structure and mechanism*. 2a. ed. Editorial Freeman and Co. New York.
5. Segel, I.H. 1975. *Enzyme kinetic: behavior and analysis of rapid equilibrium and Steady State enzyme systems*. Ed. Willey-Inter-science, New York.
6. Woods, D.F. 1940. "The relation of p-amino-benzoic acid to the mechanism of the action of sulphanimide". *Brit. Jour. Exp. Path*, **21**, 74-89.
7. Northey, E.H. 1948. "The sulfonamides and allied compounds". *Am. Chem. Soc. Monographs*, Series, Washington, D.C.
8. Juskes, T.H.; Broquist, H.P. 1963. Sulfonamides and folic antagonists. en *Metabolic inhibitors, a comprehensive treatise*, vol. I. Ed. R.M. Hoschester y Quastel. Academ. Press, Nueva York.
9. Campbell, H.A. and Link, K.P. 1941. "Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. IV The isolation and crystallization of the hemorrhagic agent". *J. Biol. Chem.*, **138**, 21.
10. Wright, C.I. and Sabine, J.C. 1944. "The effect of atabrine on the oxygen consumption of tissues". *J. Biol. Chem.*, **155**, 315.
11. Brackett, S.; E. Waletzky and M. Baker. 1946. The relation between pantothenic acid and plasmodium gallinaceum infections in the chicken and the animalarial activity of analogues of pantothenic acid. *J. Parasit.*, **32**, 453.
12. Müller, W.H.; Dessert, A.M. and Roblin, R.O. 1950. "Heterocyclic sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors". *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4893.
13. Loefer, J.B. 1951. "Effect of pyridoxine and deoxyypyridoxine on rat fibro sarcoma grafts". *Cancer Res.*, **11**, 481.
14. Woolley, D.W. 1952. *Study of antimetabolites*. Ed. John Willey and Sons., Nueva York.
15. _____. 1953. "Evidence for the synthesis of vitamine B₁₂ by spontaneous tumors". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington **31**, 6-18.
16. Woolley, D.W. and Schffner, G.C. 1954. "Effects of analogs of dimethyldiamino benzene on various strains of transplanted mamary cancer of mice". *Cancer Research*, **14**, 802-807.
17. Woolley D.W. and Snaw, E.A. 1954. A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **40**: 228-231.
18. Woolley, D.W. 1963. *The Biochemical bases of psychoses*. Ed. John Willey and Sons. Nueva York.
19. Baker, B.P.; Lee, W.W.; Skinner, W.A.; Martínez, A.P. and Tong, E. 1960. "Potential anticancer agents. Non classical antimetabolites II. Some factors in the design of exoalkylating enzyme inhibitors particularly of lactic dehydrogenase". *J. Med. Pharm. Chem.*, **11**: 633-657.
20. Baker, B.R. 1960. Chemical Structure as related to antitumor action. *Cancer Inst. Monogr.*, **3**: 9-22.
21. Baker, B.R.; Lee, W.W. and Tong E., 1962. "Non classical antimetabolites VI. 4 (Iodoacetamido) -salicylic acid, an exoalkylating irreversible inhibitor". *J. Theoret. Biol.*, **3**: 459.
22. Baker, B.R. 1967. *Design of active-site directed irreversible anzyme inhibitors*. Ed. Willey and Sons. New York.
23. Carvajal, S.G. 1959. La quimioterapia racional y su futuro. *Acta Politéc. Mex.*, **1**: 29-37.
24. Carvajal, S.G. 1965. "Diseño, síntesis y estudio del efecto antitumoral de un inhibidor de la deshidrogenasa láctica". Tesis doctoral, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, Méx. D.F.
25. Carvajal, S.G.; Carvajal, J.E.; Yáñez, A.R. and Medina, Z.V. 1966. Lactic dehydrogenase activity and aerobic glycolysis in tumors. *Natl. Cancer Instituto Monograph.*, No. **27**: 111-124.
26. Wong, C.R. 1968. "Diseño, síntesis y estudio de diazocetonas, posibles inhibidores de la deshidrogenasa láctica". Tesis doctoral, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, Méx. D.F.
27. Yáñez, A.R. 1970. "Diseño síntesis y estudio de algunos inhibidores de la deshidrogenasa láctica". Tesis doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Méx. D.F.
28. Mendoza, Z.R. 1987. "Bioevaluación del ácido 2-amino-6-iodoacetamidohexanoico (AYAH) como inhibidor de la descarboxilasa de la ornitina". Tesis de maestría en ciencias. Escuela Superior de Medicina. IPN, Méx. D.F.
29. Rodríguez, P.L.; Baeza, R.I.; Wong, R.C. y Yáñez, A.R. 1984. "Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas". *Acta Médica*, **23**, 92.

30. Trujillo, F.J.G.; Ceballos, R.G.; Yáñez, A.R. and Joseph-Nathan, P. 1991. "Resigioselective synthesis of (+) S-2-amino-5-iodoacetamido-pentanoic and (+) S-2-amino-6-iodoacetamido hexanoic-acid". *Synthetic Communication*, **21**: 683.
31. Trujillo, F.J.G.; Koizumi, G.; Muñoz, G.O.; Yáñez, A.R. and Joseph-Nathan, P. 1992. "Antitumor effect and toxicity of two new active-site-directed irreversible ornithine decarboxilase and extrahepatic arginase inhibitors". *Cancer Letters*, **67**: 193-197.
32. Vázquez, A.I. 1994. "Síntesis y evaluación colinérgica de la maleimida del m. aminofenol". Tesis de maestría en ciencias. Escuela Superior de Medicina. IPN, Méx. D.F.
33. Méndez, J.D.; Yáñez, A.R.; Wong, R.C. and Hicks, J.J. 1986. "Uterine arginase inhibition affect the rat embryonic development". *Contraception*, **33**: 597-604.
34. Trujillo, F.J.G. 1994. "Síntesis de análogos estructurales de la acetilcolina y de los ácidos paraaminobenzoico y gamma-aminobutírico". Tesis maestría en ciencias especialidad en química orgánica. CINVESTAV-IPN. Méx. D.F.
35. Stahl, E. 1965. *Thin-Layer chromatography a laboratory handbook*. Ed. Springer-Verlag. Academic Press Inc. New York.
36. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. and Turck, M. 1966. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method". *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-496.