

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - FÍSICA

SELECCIÓN DE NUEVOS ANTIBACTERIANOS POR
TOPOLOGÍA MOLECULAR

VICTORIA EUGENIA SIMÓN GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 04 de Desembre de 2003 davant un tribunal format per:

- D. José Luis Moreno Frigols
- D^a. M^a Teresa Salabert Salvador
- D. Enrique Hernández Jiménez
- D^a. Stella Moreno Grau
- D^a. Marina Herraes Domínguez

Va ser dirigida per:

D. Facundo Pérez Giménez

D. Francisco José García March

©Copyright: Servei de Publicacions
Victoria Eugenia Simón García

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5170-3

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE QUÍMICA FÍSICA

**"SELECCIÓN DE NUEVOS ANTIBACTERIANOS POR
TOPOLOGÍA MOLECULAR"**

Memoria para optar al Grado de Doctora
en Farmacia, presentada por:

VICTORIA EUGENIA SIMÓN GARCÍA

Directores:

Prof. Dr. D. **FACUNDO PÉREZ GIMÉNEZ**

Prof. Dr. D. **FRANCISCO JOSÉ GARCÍA MARCH**



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE
DPTO. QUÍMICA FÍSICA
FACULTAD DE FARMACIA
Av. Vicente Andrés Estellés s/n
Tf. 963 86 48 94
Fax 963 86 48 92
46100 BURJASSOT (Valencia)
ESPAÑA

D. FACUNDO PÉREZ GIMÉNEZ y D. FRANCISCO JOSÉ GARCÍA MARCH, Doctores en Farmacia y Profesores Titular y Asociado del Departamento de Química Física de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral presentada sobre el tema “Selección de nuevos antibacterianos por topología molecular” ha sido realizada bajo nuestra dirección por la Licenciada en Farmacia Dña. **VICTORIA EUGENIA SIMÓN GARCÍA** y mediante este escrito, autorizan su presentación para optar al grado de Doctora en Farmacia.

Burjassot, 14 de Julio de 2003.

Fdo.: Facundo Pérez Giménez

Fdo.: Francisco José García March

**"SELECCIÓN DE NUEVOS ANTIBACTERIANOS POR
TOPOLOGÍA MOLECULAR"**

Quisiera expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a mis directores, Dr. D. Facundo Pérez Giménez y Dr. D. Francisco José García March quienes han prestado mucho más que su colaboración para la realización del presente trabajo, su tiempo, su dedicación, sus conocimientos, su experiencia, su paciencia, aportando además estímulo, apoyo y amistad. Sin el conjunto de todo ello no habría sido posible la realización de la presente Tesis Doctoral.

Mención muy especial al Dr. D. Miguel Murcia Soler, al que quiero agradecer su desinteresada colaboración, su consejo, su tiempo y su apoyo en todo momento. Su ayuda ha sido realmente inestimable.

A la Dra. Dña. María Teresa Salabert Salvador, quien siempre me ha mostrado su interés, su estímulo y ayuda.

A Ana Pérez Solsona, por su colaboración en la realización de los ensayos farmacológicos.

A todos los compañeros del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital General de Castellón por el ánimo y el interés mostrado, así como por haber compartido conmigo muchos momentos buenos y algunos que no lo fueron tanto..

A todos los que en algún momento me ayudaron y apoyaron.

A TODOS. Gracias por hacer que sea así.

Gracias a los que me disteis sin pedir nada a cambio. Gracias a los que pedisteis algo, sin duda me considerabais una amiga.

Gracias a los que en alguna ocasión me hicisteis llorar, de nuevo fui una niña.

Gracias a los que reísteis conmigo, sin duda fuimos felices.

Gracias a los que hablasteis de mí en algún momento, bien o mal, poco o mucho, entonces me hicisteis presente.

Gracias a los que nunca me echasteis nada en cara, a pesar de mi carácter.

Gracias a los que alguna vez me echasteis algo en cara, me hicisteis ver mi imperfección.

A mis padres, Juan y Victoria. Todo lo que soy se lo debo a ellos. Se esforzaron en mi educación y bienestar. Me han dado lo que jamás ellos tuvieron. Ojalá todos los padres fueran como vosotros.

A mi hermano, Juan, excelente hermano mayor, mejor persona, del que hay que aprender y tomar ejemplo.

A mi marido, Javi, por su aliento, su estímulo, a veces su comprensión y paciencia, siempre su fuerza y su amor.

A mi hijo, Ángel. Eres el mayor de mis éxitos.

A Ángel.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	25
1.1. CONCEPTO DE ANTIMICROBIANO	27
1.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS ANTIMICROBIANOS ...	28
2. <u>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</u>	33
2.1. CONECTIVIDAD MOLECULAR	36
2.1.1. Origen de la conectividad molecular	36
2.1.1.1. Significado de la estructura molecular	36
2.1.1.2. El aspecto topológico	40
2.1.2. Resultados obtenidos por la topología molecular	42
2.1.3. Elementos de la teoría de los grafos	45
2.1.4. La matriz topológica	47
2.1.5. Descripción del formato Smiles	49
2.1.6. Índices topológicos	51
2.1.6.1. Índice de Wiener	52
2.1.6.2. Índice de Randic	53
2.1.7. Descripción del método de conectividad molecular	55
2.1.8. Índices de conectividad de Kier y Hall	59
- Índice de orden cero (${}^0\chi$)	60
- Índice de primer orden (${}^1\chi$)	61
- Índice de segundo orden (${}^2\chi$)	61
- Índice de tercer orden (${}^3\chi$)	62
- Índice de cuarto orden (${}^4\chi$)	63
- Índices de orden superior	64
- Índices de valencia	64
- Índices topológicos	68

ÍNDICE

- Índices electrotopológicos	71
- Índices tipo de átomo de estado electrotopológico.....	73
- Índices tipo de enlace de estado electrotopológico.....	75
- Índices ortogonales: los índices de diferencia chi	77
2.2. FLUORQUINOLONAS: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	80
2.2.1. Antecedentes históricos.....	80
2.2.2. Estructura química.....	82
2.2.3. Relación estructura-actividad	84
2.2.4. Mecanismo de acción.....	85
2.2.5. Actividad antibacteriana	91
2.2.6. Selectividad	93
2.2.7. Resistencias	93
2.2.8. Farmacocinética.....	95
2.2.8.1. Absorción.....	95
2.2.8.2. Distribución	96
2.2.8.3. Eliminación.....	97
2.2.9. Actividad farmacológica	98
2.2.10. Aplicaciones terapéuticas.....	99
3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	103
3.1. DISEÑO Y SELECCIÓN MOLECULAR	105
3.1.1. Selección del grupo farmacológico a investigar.....	105
3.1.2. Obtención de las funciones topológicas	106
3.1.2.1. Búsqueda bibliográfica de las propiedades	106

ÍNDICE

3.1.2.2. Obtención de grafos a partir del formato Smiles y cálculo de los índices topológicos	106
3.1.2.3. Obtención de las funciones de conectividad	107
3.1.3. Obtención de las funciones discriminantes	108
3.1.3.1. Análisis lineal discriminante.....	108
3.1.3.2. Patrones de actividad farmacológica	111
3.2. TRATAMIENTO INFORMÁTICO	113
3.2.1. Obtención de los índices de conectividad	113
3.2.1.1. Descripción del programa Molconn-Z.....	113
3.2.2. Obtención de las funciones de conectividad y análisis lineal discriminante	116
3.2.2.1. Programas BMDP.....	117
A. Datos	117
B. Variables estadísticas	118
C. Representaciones e histogramas.....	120
D. Seguridad en el cálculo.....	120
3.2.2.1.1. Programa P9R.....	120
A. Pasos que constituyen este programa.....	122
B. Métodos de selección de variables.....	124
3.2.2.1.2. Programa P7M	125
3.2.3. Estudio de la estabilidad estadística de la función de conectividad seleccionada.....	128
3.2.4. Diagramas de distribución farmacológica	129
3.2.5. Selección de la ecuación discriminante y de las propiedades limitantes	130

ÍNDICE

3.2.6. Extrapolación de los resultados obtenidos y búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana	131
3.3. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS	132
3.3.1. Material y reactivos.....	133
3.3.2. Preparación de los productos y ensayo de solubilidad.....	134
3.3.3. Cepas de microorganismos	135
3.3.3.1. Apertura de liófilos	138
3.3.3.2. Viabilidad de los liófilos	139
3.3.3.3. Glicerinado de microorganismos	139
3.3.4. Actividad antimicrobiana	140
3.3.4.1. Método de las diluciones progresivas.....	140
3.3.4.1.1. Protocolo para las placas de microtitulación.....	141
3.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD	145
3.4.1. Material y reactivos.....	145
3.4.2. Preparación de los productos	146
3.4.3. Protocolo de ensayo	146
4. <u>RESULTADOS</u>	151
4.1. OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE LAS FUNCIONES DE CONECTIVIDAD.....	153
4.2. ESTABILIDAD ESTADÍSTICA DE LAS FUNCIONES DE CONECTIVIDAD SELECCIONADAS	171
4.3. OBTENCIÓN DE LAS FUNCIONES DISCRIMINANTES.....	175
4.4. BÚSQUEDA GUIADA Y SELECCIÓN MOLECULAR	211
4.5. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS	222

ÍNDICE

4.6. ENSAYOS DE TOXICIDAD	236
5. <u>DISCUSIÓN</u>	243
5.1.OBTENCIÓN DE LAS FUNCIONES DE CONECTIVIDAD, SU CAPACIDAD PREDICTIVA Y ESTABILIDAD ESTADÍSTICA ..	245
5.1.1. Concentración Mínima Inhibitoria frente a E. coli.....	246
5.1.2. Concentración Mínima Inhibitoria frente a P. aeruginosa	248
5.1.3. Concentración Mínima Inhibitoria frente a S. aureus.....	249
5.1.4. Concentración Mínima Inhibitoria frente a E. faecalis	250
5.1.5. Matrices de intercorrelación de la función de conectividad.....	251
5.1.6. Estabilidad estadística de las funciones de conectividad seleccionadas	251
5.2. OBTENCIÓN DE LA ECUACIÓN DISCRIMINANTE. SELECCIÓN MOLECULAR	252
5.2.1. Obtención de la ecuación discriminante.....	252
5.2.2. Selección molecular de moléculas con teórica actividad antimicrobiana.....	255
5.3. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS	256
5.3.1. Ensayos microbiológicos	256
5.3.2. Ensayos de toxicidad	260
6. <u>CONCLUSIONES</u>	263
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	269
8. <u>ANEXO</u>	295

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

1.1- CONCEPTO DE ANTIMICROBIANO

En 1877 Pasteur y Joubert observaron al cultivar dos microorganismos en un caldo, que su crecimiento era inferior al de cada uno por separado y que al menos uno era inhibido por el otro¹. Con estas observaciones surgió el concepto de “antibiosis”, que fue aplicado por primera vez en 1889 por el francés Paul Vuillemin, profesor de Historia Natural de la Facultad de Medicina de Nancy. Vuillemin denominó “influencias antibióticas” a determinadas interacciones entre animales y entre plantas². El primero en utilizar la palabra “antibiótico” como la conocemos hoy fue Marshall Ward en 1899, pero fue Salman Waksman, el descubridor de la estreptomicina, quien inmortalizó este vocablo en su uso actual.

Estrictamente hablando, los antibióticos son sustancias obtenidas de microorganismos que pueden, incluso muy diluidas, inhibir o matar a otros microorganismos. Los quimioterápicos poseen propiedades similares pero se obtienen por síntesis química. En este concepto, la penicilina sería un antibiótico y las sulfamidas un quimioterápico.

En el momento actual, la distinción entre antibiótico y quimioterápico no es tan sencilla, ya que algunas sustancias, como el cloranfenicol, pueden obtenerse más fácilmente por síntesis química que mediante fermentación. Además, el desarrollo en el campo de los antimicrobianos ha proporcionado una gran cantidad de productos semisintéticos mediante la adición de radicales, por métodos químicos, a sustancias obtenidas a partir de microorganismos. Estas sustancias son, por tanto, semisintéticas: en parte son antibióticos y en parte quimioterápicos.

INTRODUCCIÓN

El término “agente antimicrobiano” pretende abarcar a todos, pero es algo impreciso porque también puede incluir otros compuestos como los desinfectantes. Actualmente, “antibiótico” se usa para todas las sustancias con actividad antimicrobiana excepto los desinfectantes.

1.2- ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS ANTIMICROBIANOS

Sin ser consciente de ello, el ser humano ha utilizado sustancias con actividad antimicrobiana desde la prehistoria, de modo que el inicio de la farmacología y la utilización de sustancias con fines terapéuticos proviene de experiencias puramente empíricas y basada en la observación de sus efectos.

Para curar las heridas, los sumerios, 3000 años a.C., empleaban una sustancia parecida al jabón y emplastos realizados con vino, enebro y ciruelas.

La civilización egipcia para el tratamiento de las heridas empleó la mirra y el incienso. El papiro de Ebers (1550 a.C.) recomienda ciertas plantas como el ajo y la cebolla para el tratamiento de diarreas y otras infecciones cuyos poderes curativos no sólo eran conocidos por los antiguos egipcios sino también por griegos, romanos y otros pueblos.

Del mismo modo, otras culturas han empleado remedios naturales: los chinos recomendaban la aplicación de pan mohoso para el tratamiento de forúnculos y ántrax, 500 años a.C. Los romanos observaron que conservando el agua en vasijas de plata disminuía la transmisión de la disentería entre sus tropas; los árabes introdujeron el mercurio para el tratamiento de la sífilis y los asirios utilizaron el arsénico con fines medicinales.

INTRODUCCIÓN

Algunas plantas, además, suministraron sustancias de especial valor terapéutico, como la emetina, obtenida de la raíz de la ipecacuana, y la quinina a partir de la corteza del quino o cinchona. Ambas fueron traídas a Europa en el siglo XVII y son activas en enfermedades protozoarias, la disentería amebiana y la malaria, respectivamente. Desde su importación de Perú a Europa en 1632, la corteza de quino constituyó unos de los remedios terapéuticos de más éxito, y cuando en 1820 los franceses Pelletier y Caventou aislaron la quinina, el alcaloide de la corteza del quino activo contra la malaria, muchos investigadores intentaron sintetizar esta sustancia. Así, Perkin, en 1856, encontró la quinina en un colorante, la mauveína, que produjo al realizar la oxidación del sulfato de anilina con dicromato potásico.

Pero fue Ehrlich hacia principios del siglo XX, el primero en efectuar de forma científica una selección sistemática de compuestos en busca de una actividad específica de los mismos, logrando descubrir la arsfenamina para el tratamiento de la sífilis. Con Ehrlich comienza el verdadero diseño de nuevas estructuras con una determinada actividad farmacológica.

Además, fue el fundador de la quimioterapia, término que el mismo propuso en 1891 para designar el tratamiento de enfermedades mediante sustancias químicas sintéticas.

Ehrlich murió en 1915 dejando dos aportaciones fundamentales que influyeron de manera decisiva en el posterior florecimiento de la quimioterapia: la primera fue la modificación de un núcleo terapéutico mediante sustituciones químicas, obteniendo moléculas sintéticas capaces de unirse selectivamente al microorganismo patógeno, y la segunda fue la creación de una verdadera terapéutica experimental ensayando todas sus moléculas en animales previamente infectados.

INTRODUCCIÓN

Posteriormente se seleccionaron las sustancias realizando pruebas a numerosas moléculas para encontrar las que presentaron las mejores propiedades. Una vez halladas se intenta modificarlas estructuralmente buscando optimizar lo más posible sus efectos. Ha habido descubrimientos fortuitos, como la fenacetina o la antifebrina, modificaciones de fármacos con efectos secundarios. Así se han modificado sulfonamidas antibacterianas para obtener hipoglucemiantes orales, antihipertensivos, diuréticos... Pero poco a poco estos métodos han ido cediendo terreno frente a aquellos que dejan de lado el factor aleatorio e intentan relacionar la estructura química de una serie de compuestos y sus actividades farmacológicas, físico-químicas y/o toxicológicas.

Estos métodos se engloban en los llamados estudios Q.S.A.R.^{3,4}, los cuales buscan cuantificar las relaciones entre una o varias propiedades y la estructura química de una serie de moléculas, observando la variación de esa propiedad en la serie estudiada⁵. El objetivo en este trabajo es el empleo de métodos Q.S.A.R. para predecir propiedades en moléculas nuevas buscando mejorar la eficacia frente a las estructuras ya existentes.

En el campo de los estudios teóricos de diseño molecular de tipo Q.S.A.R. existen tres métodos diferentes^{6,7,8}:

-métodos tradicionales o de mecánica molecular: se basan en la obtención de descriptores moleculares y el desarrollo de métodos estadísticos capaces de establecer correlaciones entre los descriptores y las propiedades de las moléculas.

-métodos mecánico-cuánticos que se han desarrollado desde el auge de la informática ya que emplean complicados cálculos matemáticos para seleccionar conformaciones mínimo energéticas de moléculas con actividad biológica⁹.

INTRODUCCIÓN

-métodos gráficos o de modelado molecular que combinan los métodos mecánico-cuánticos con la tecnología más avanzada de representación gráfica^{10,11}.

En el Departamento de Química-Física se ha desarrollado un método de diseño de fármacos por ordenador basado en la topología molecular¹²⁻¹⁵. Esta disciplina consiste en caracterizar estructuralmente las moléculas a través de una serie de índices numéricos que se regresionan frente a los valores de propiedades físicas, químicas o farmacológicas de las moléculas a estudiar. Las funciones de correlación obtenidas entre los índices y las propiedades se denominan “funciones de conectividad” y permiten predecir el valor de dichas propiedades farmacológicas para moléculas no estructuradas, así como permitir la clasificación adecuada de las moléculas activas separándolas de las inactivas (función discriminante).

De este modo en el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

- *Obtención de las relaciones Q.S.A.R. y de las funciones de conectividad para el grupo de antimicrobianos denominado fluorquinolonas.*

Se eligió el grupo de las fluorquinolonas por su rápida evolución y su actualidad terapéutica. Las fluorquinolonas son antibióticos o quimioterápicos sistémicos de amplio espectro, eficaces en un amplio rango de dosis y posologías, y para infecciones de todo tipo, pero frente a las cuales han emergido numerosas cepas bacterianas que han desarrollado resistencia frente a ellas debido al abuso o mal uso de estos fármacos.

Se ha realizado una exhaustiva revisión bibliográfica del grupo de las fluorquinolonas para obtener la mayor información posible de sus propiedades tanto

INTRODUCCIÓN

físico-químicas, como farmacológicas y microbiológicas, las cuales son necesarias para el diseño molecular.

- *Búsqueda y/o selección de moléculas con teórica actividad antimicrobiana.*

Se realizarán a partir de las ecuaciones de discriminación obtenidas que permitan diferenciar las moléculas activas de las inactivas y que combinada con las funciones de conectividad obtenidas permitan una adecuada selección de moléculas con teórica actividad antimicrobiana .

- *Ensayos farmacológicos.*

En este caso serán ensayos microbiológicos, de modo que se realizarán las pruebas necesarias con diferentes microorganismos para poner de manifiesto la actividad antimicrobiana de las estructuras seleccionadas. Las estructuras que muestren actividad serán sometidas a ensayos de toxicidad aguda en animales de experimentación.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El diseño de fármacos ha evolucionado de forma vertiginosa con la aplicación de procesos informáticos que han permitido la creación de métodos de diseño capaces de encontrar nuevas drogas que mejoren las propiedades de las ya existentes o que vengan a cubrir las necesidades en el tratamiento de enfermedades incurables hasta el momento.

Casi todos estos métodos se basan en el establecimiento de relaciones entre la estructura molecular y las propiedades físicas, químicas, farmacológicas y toxicológicas de una serie de moléculas. La predicción de las propiedades moleculares se puede hacer de dos maneras:

- una de ellas consiste en determinar de forma precisa la estructura de la molécula, o sea, las coordenadas espaciales de cada uno de sus átomos, la determinación de sus niveles de energía y la forma de sus nubes electrónicas. Se trata de realizar un completo estudio mecánico-cuántico de las estructuras moleculares.

- la segunda de ellas determina las propiedades de fragmentos básicos de diferentes moléculas estableciendo las propiedades de cada fragmento mediante el análisis de una serie de moléculas semejantes a la estudiada.

Se han desarrollado otros métodos que no requieren de un estudio mecánico-cuántico completo para establecer las relaciones entre la estructura y las propiedades de las moléculas¹⁶, son los **métodos QSAR** (Quantitative Structure Activity Relationships). Estos métodos relacionan la estructura de una molécula con su actividad, caracterizando de forma numérica la estructura molecular, de esta manera las

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

diferencias estructurales entre moléculas se puede cuantificar y diferenciar numéricamente unas de otras¹⁷.

Uno de los métodos QSAR es el **Método de Conectividad Molecular**^{12,18} que caracteriza la estructura molecular a través de índices topológicos llamados índices de Conectividad que llevan información sobre el número de átomos, los enlaces, las insaturaciones y el ensamblaje topológico o conectividad de la molécula¹⁹.

2.1- CONECTIVIDAD MOLECULAR

2.1.1- ORIGEN DE LA CONECTIVIDAD MOLECULAR

Para comprender mejor el significado y origen de la conectividad molecular²⁰ se deben considerar antes varios aspectos:

2.1.1.1- SIGNIFICADO DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR

La concepción de la química como ciencia ha sido en parte debida al progreso que supuso el descubrimiento de las propiedades atómicas y moleculares y la adecuada cuantificación de sus valores. Se clasifican sistemáticamente los átomos o moléculas en base a características comunes, a las que se llama estructura, y se relacionan estas con los valores de propiedades. A esto se le llama relación cuantitativa estructura actividad (RCEA o QSAR). Así, el principal valor de una información estructural es la explicación y predicción de propiedades físicas, químicas o biológicas sin la necesidad de datos experimentales.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La estructura molecular puede definirse por tanto como una cualidad inherente a la molécula de la cual derivan todas sus propiedades. De esta manera de la globalidad de una molécula diferenciamos la *forma* (estructura) de la *función* (propiedades).

Una molécula tiene una “colección” de propiedades bajo unas determinadas condiciones, pero la información estructural no emerge directamente de las medidas de las propiedades físicas sino que es deducida a partir de ellas. Así, se puede realizar una construcción mental, un dibujo o una imagen que podemos manipular. De la misma manera como cuando a partir de la observación de una propiedad física o bien de unos resultados experimentales, es posible la abstracción, a partir de ellos, de una imagen de la estructura o fórmula química.

La conversión de la fórmula estructural en valores numéricos o índices que incluyan información estructural, nos da una oportunidad de comparar estructuras moleculares, almacenarlas y clasificarlas, además de correlacionarlas con sus propiedades. Porque la *forma* de una molécula no puede ser medida, sino modelada, bien como expresión matemática o con números²¹. Serán posibles, por tanto, distintos modelos moleculares derivados de diferentes significados de abstracción para la misma realidad molecular²².

Existen varios niveles de información estructural: el primero informa acerca de los átomos que constituyen la molécula, el segundo hace referencia a la proporción de cada uno de estos componentes, el siguiente nivel fija valor del número de átomos de cada elemento que compone la molécula, lo que permite predecir propiedades físicas sencillas tales como solubilidad, temperatura de ebullición, densidad, así como la reactividad química. En un nivel intermedio, se considera la molécula como un ensamblaje de átomos conectados por los enlaces propuestos por Lewis²³.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Tal aproximación expresa la estructura topológica de la molécula y puede ser utilizada como la base de una caracterización cuantitativa de la conectividad de la estructura. Se trata de un cuarto nivel que informa de las conexiones entre los distintos átomos constitutivos de la molécula e indica cómo los átomos están organizados y conectados, este es el nivel topológico.

En la acepción básica del modelo de enlace, la característica más significativa de las moléculas, es la manera en que los átomos se encuentran asociados. De modo que el tipo de conexiones entre pares de átomos constituye e incluye una información básica sobre la estructura molecular. Sin embargo, la huella dactilar de la molécula es, según Kier y Hall¹², el quinto nivel, que es el nivel mecanocuántico, en el cual mediante la ecuación de Schödinger se describe la energía y la distribución electrónica de la molécula.

No obstante, desafortunadamente, las aproximaciones necesarias que implican estos métodos, para moléculas grandes, suponen una pérdida de información concerniente a la estructura, de manera que estos métodos no son capaces de calcular propiedades de moléculas grandes, en especial moléculas que interaccionan. Sin embargo, no es necesario un tratamiento mecanocuántico de las moléculas para disponer de información suficiente sobre la correlación de la estructura con diferentes propiedades fisicoquímicas ya que el nivel topológico tiene capacidad tanto descriptora como predictora de las propiedades físicas, químicas e incluso biológicas de la molécula.

Hay muchos precedentes de empleo a lo largo de la Historia que utilizan el modelo de enlace químico como base para la correlación y predicción de propiedades fisicoquímicas, asignando valores a los átomos, enlaces o grupos, sumándose estos

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

valores sustitutivos de acuerdo con la topología molecular para obtener un valor para la molécula, asumiendo la independencia de los enlaces. Quizás el primero que propuso algo en este campo fue Koopen²⁴ (1885), quien realizó un cálculo aproximado para el volumen molar asignando valores a los átomos individuales. También Pauling²⁵ (1960) utilizó satisfactoriamente esta información basada en la descripción del enlace de la estructura en la predicción de propiedades termodinámicas.

Cuando se aplicó la suma de la energía de los enlaces para el cálculo aproximado de los calores de formación, se observó que los compuestos ramificados daban desviaciones significativas²⁶ pero fue Fajans²⁷ quien por primera vez reconoció la influencia de los grupos vecinos en los calores de formación. Incluyendo estos efectos se han visto varios trabajos²⁸. Por otra parte, desde hacía años, la química farmacéutica había tenido en consideración la topología de la estructura molecular, existía la intuición de que diferentes estructuras moleculares descritas con diferentes topologías, tendrían distintas propiedades. Pero no fue hasta 1976 en que Kier y Hall en su libro *Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research*¹², (1976), describen un nuevo avance para la evaluación cuantitativa de la estructura molecular, transformando esta intuición hasta entonces cualitativa, en una cuantificación de la topología, a la que llamamos Conectividad Molecular, que puede llevarnos a una información estructural que hace posible una correlación con las propiedades de la molécula. Proponen así un método práctico para el desarrollo de las relaciones entre la estructura molecular y las propiedades.

Así, la **Conectividad Molecular** podemos definirla como un método de cuantificación de la estructura molecular en el que los cálculos del aporte de los fragmentos de las subestructuras son convertidos en índices numéricos. Propiedades

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

moleculares tales como tamaño, ramificación, instauraciones, contenido de heteroátomos y ciclación son cuantificables y codificables mediante esta técnica.

2.1.1.2- EL ASPECTO TOPOLÓGICO

La **Topología** de cada molécula es la secuencia de las interconexiones entre átomos, que determinan su arquitectura definitiva. En el análisis topológico importan poco la morfología tridimensional real de la molécula, la naturaleza y longitud de los enlaces químicos que ligan sus átomos o los ángulos entre dichos enlaces. Como antes señalábamos, el análisis topológico de una molécula comienza por la representación de los átomos de la misma mediante puntos (llamados vértices) y la de los enlaces por segmentos (llamados ejes)²¹. Estas estructuras denominadas **grafos** químicos, no son un simple ordenamiento de puntos y segmentos sino un diagrama de la estructura molecular, y por tanto, una representación de la topología molecular.

Estudiados en 1871 por el ruso Flavitzky y en 1875 por el inglés Arthur Cayley, los grafos constituyen hoy la base de una disciplina matemática llamada **teoría de grafos**.

Los grafos son la herramienta matemática de la aplicación a los problemas químicos¹¹².

- Habitualmente se omite en dichos grafos la presencia de los hidrógenos, ya que de ordinario no representan un papel relevante en la determinación estructural. Este grafo en el que los hidrógenos no aparecen representados es el llamado **grafo de hidrógenos suprimidos**

- Se numera de forma aleatoria los átomos o vértices del grafo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

- Una vez dibujado el grafo, es posible reducirlo a una matriz numérica, la **matriz topológica** (o *matriz adyacente*)(matriz de dos dimensiones mediante la que se transforman los grafos químicos en expresiones matemáticas), cuyos elementos t_{ij} valen un número entero o cero (0,1,2 ó 3) dependiendo de que el átomo “i” esté enlazado al “j” o no, es decir dependiendo del número de enlaces o ejes que existan entre el átomo i y el átomo j.

El empleo de esta matriz topológica fue sugerido por el matemático Sylvester, en 1874, y es como se dijo anteriormente la primera expresión numérica de un grafo químico. Su importancia estriba en que su adecuada transformación matemática origina una serie de valores o números que le caracterice, este número se llama índice topológico cuyo cálculo es la base del presente trabajo. Existirán diferentes **índices topológicos**²⁹ que describen diferentes aspectos de la molécula y que, en cualquier caso siempre son independientes de la forma en que se haya dibujado el grafo por lo que los matemáticos los denominan **invariantes de grafo**.

De esta manera, es posible asignar algún valor numérico a los grafos de las moléculas de modo que estas diferencias estructurales puedan cuantificarse, y por tanto sería posible una diferenciación numérica suficiente de modo que se obtuviesen correlaciones significativas con propiedades físicas, químicas e incluso biológicas, relaciones denominadas **Funciones de Conectividad**.

Kier y Hall dictan una serie de premisas con el fin de garantizar la aplicación práctica y la efectividad del método¹², que debe ser capaz de describir numéricamente la molécula a varios niveles de información y debe reunir los siguientes requisitos:

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

- Debe servir como una definición básica de la estructura con capacidad de una amplia aplicación en la descripción de propiedades físicas, químicas y si fuera posible biológicas.
- Los avances deben estar contruidos sobre los principios de la estructura molecular antes que sobre magnitudes empíricas.
- Debe utilizar cálculos sencillos que no ocupen mucho tiempo.
- Los descriptores numéricos (índices), deben ser únicos para una estructura dada.
- Su aplicación práctica debe ser suficientemente flexible para considerar aspectos tales como heteroátomos, instauración, ciclación y aromaticidad.

2.1.2- RESULTADOS OBTENIDOS POR LA TOPOLOGÍA MOLECULAR

Durante algún tiempo los químicos utilizaron el número de átomos de carbono para deducir ciertas correlaciones sin advertir que estaban manejando un índice topológico.

En realidad el número de átomos de carbono constituye un índice apropiado para analizar moléculas de cadena lineal, pero no cadenas ramificadas ya que teniendo el mismo número de átomos de carbono presentan propiedades muy distintas; este índice es pues de un bajo poder discriminante.

Es evidente que la clave del método consiste en utilizar los índices que sean capaces de proporcionar una mejor descripción de la estructura y, por tanto, se correlacionen mejor con la propiedad química sujeta a estudio. Así, con un conjunto de índices se consigue una descripción completa de la estructura, por lo que con el manejo

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

del conjunto o bien con parte de él, es teóricamente posible una buena predicción de cualquier propiedad de la molécula. Por esta razón, gran parte de los esfuerzos realizados desde mediados de los 40, han ido orientados a encontrar índices cada vez más eficaces.

En 1947 Harry Wiener³⁰ describe el primer índice topológico capaz de caracterizar la ramificación de las moléculas. Se basa en la noción topológica de distancia, entendiendo por esta el número de enlaces de dos átomos por el camino más corto, este índice es mayor para moléculas con más átomos y a su vez es mayor para moléculas extensas. Ha mostrado una muy buena correlación con ciertas propiedades fisicoquímicas (temperatura de ebullición, viscosidad, tensión superficial, índice de refracción) e incluso con propiedades mucho más complejas, como energías de los electrones de enlace responsables del comportamiento químico de la molécula (O. Mekeyan et al, 1979).

Este índice no solo posibilita la predicción de propiedades como la conductividad eléctrica, afinidad electrónica y longitudes de onda de absorción, sino que tiene un significado más amplio, ya que permite predecir las estabilidades relativas de moléculas teóricas.

Un índice más sensible a la morfología de la molécula es el introducido por Milan Randić³¹ en 1975. Éste se preguntaba cuál de los dos isómeros del heptano 3-metilhexano o 3-etilpentano era más ramificado, hasta entonces el concepto de ramificación era una idea intuitiva pero Randić derivó a partir de la teoría de grafos una descripción cuantitativa de la ramificación de las estructuras, describiendo así un índice basado en el concepto topológico de grado de vértice (numero de ejes o aristas a los que se haya unido un vértice).

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Este índice se correlaciona con propiedades físicas como solubilidad, densidad, calor de vaporización, y lo que es más importante con un número elevado de propiedades biológicas tales como, olor, sabor y capacidad de actuar como anestésico, narcótico y alucinógeno.

Posteriormente los profesores L.B. Kier y L.H. Hall generalizaron este índice en una familia de índices de mismo orden y tipo, desarrollando el método conocido como Conectividad Molecular, recogido en su libro *Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Design*, y demostraron su utilidad en la realización posterior de distintos trabajos aplicados a la predicción de propiedades farmacológicas³².

Además de estos se han definido otros muchos índices, relacionados con distintas propiedades, entre los que se puede destacar los de Gordon y Scantlebury (Gordon, 1964), Hosota (Hosoya, 1971), Balaban (Balaban, 1982)³³, Electrotopológico (L.B. Kier, 1990)³⁴ por citar algunos de los más importantes.

Mediante el empleo de los índices de conectividad, diversos autores han llegado a resultados que sugieren la aplicabilidad del método en la predicción de propiedades físicas, como puntos de ebullición, refracción molar, calor de vaporización³⁵ y cromatográficas³⁶⁻³⁸. También se obtuvieron buenas correlaciones con algunas propiedades biológicas implicadas en el mecanismo de acción de ciertos fármacos, como es la inhibición de la monoamino oxidasa MAO por hidrazidas³⁹, la afinidad de las salicilamidas por los receptores D2 de la dopamina⁴⁰ o la inhibición de la ciclooxigenasa por distintos derivados fenólicos⁴¹.

Estos resultados demuestran la gran capacidad del método topológico tanto para describir como para predecir propiedades⁴².

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Estudios posteriores muestran interés en el desarrollo de las medidas de similitud entre moléculas y su aplicación en el estudio de distintas propiedades y diseño molecular⁴³.

Por su parte la Unidad de Investigación de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia inició una vía para el diseño de nuevos fármacos. La esencia del método consiste en la utilización de las funciones de conectividad de forma inversa a la convencional, es decir, en lugar de emplearlas para predecir el valor que un determinado compuesto va a poseer para una propiedad dada, se trata de usarla para obtener el compuesto o compuestos que posean un valor prefijado de dicha propiedad^{44,45}. El método introduce nuevos patrones topológicos de similitud, en base a los cuales es posible la selección y la búsqueda de compuestos con una actividad farmacológica deseada⁴⁶.

2.1.3- ELEMENTOS DE LA TEORIA DE GRAFOS

Un grafo (**G**) $G[V(G), E(G)]$ o más correctamente un grafo no dirigido, es un objeto matemático definido como una serie finita de números enteros o puntos llamados vértices $V(G)$ $V = (v_i/ i=1.....n)$ junto con una serie **E(G)** de pares no ordenados de los distintos puntos **V(G)**. Cada elemento de E indica pares de elementos de V en relación binaria simétrica y no reflexiva definida por G, esto es para cada par (p_i, p_j) perteneciente a G, (p_j, p_i) también pertenece a G.

Consiste por tanto en una serie de puntos o vértices **V(G)** conectados por ejes o líneas llamadas “ejes o aristas” **E(G)** que están limitados por dos vértices.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La letra **n** se empleará para designar el número de vértices, y la letra **m** para el número de ejes, siendo ambos números finitos. Un vértice del grafo se representa por v_i , un eje se designa haciendo referencia a los vértices que lo limitan (v_i, v_j) , estos vértices son llamados **extremos**. Cuando los extremos de V simbolizan cuerpos atómicos sin electrones de valencia y los elementos de E representan enlaces covalentes G es el **grafo molecular** de las especies químicas covalentes. El grafo molecular se representa como:

$$G = (V, E, \beta, \delta)$$

donde:

V es el conjunto de vértices.

E conjunto de ejes.

β son las etiquetas asignadas a cada uno de los vértices del grafo utilizando la aplicación supreyectiva δ (esto es, para cada vértice del grafo existe un elemento en β). Siendo los elementos de β los símbolos de los elementos químicos. $\beta = (C, O, N, H)$.

Cuando al grafo se le asignan estas etiquetas se le llama **grafo etiquetado**.

Un **grafo ponderado** es aquel en el que se asignan valores determinados a los vértices o aristas con el objeto de evaluar características diferenciales entre ellos. En química es corriente al representar una molécula, escribir sólo el esqueleto carbonado sin representar los átomos de hidrógeno, los cuales se presuponen en función de la valencia del carbono. A este tipo de grafos se les denomina **grafos de hidrógeno-suprimidos**, y son los que se van a utilizar a partir de este momento.

El grafo de una molécula que no contiene ningún ciclo es un **grafo libre** en el que se cumple que $m = n-1$; cuando contiene un ciclo es un **circuito**, y en el caso de que cada par de vértices esté unido por un eje al grafo se le denomina **grafo completo**.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La **valencia** del vértice v_i se define como el número de ejes que convergen en un vértice dado y se designa como $\delta(v_i)$. La suma de las valencias de cada uno de los vértices de que está compuesto el grafo es igual al doble del número de ejes del grafo¹¹³:

$$\sum \delta_i = 2m \quad (\text{Eq. 2.1})$$

La valencia corresponde con el número de electrones que se ven implicados en el enlace de una molécula saturada, es decir, el número de electrones sigma.

Un grafo cuyos vértices tienen la misma valencia se denomina **grafo regular**.

Un **eje secuencia** en G se define como un grupo de ejes conectados en G y representados por $(v_i, v_j) (v_j, v_k) (v_k, v_l) \dots (v_{m-1}, v_m)$ donde cada eje termina en dos vértices que son extremos de otros ejes en la secuencia, con la excepción de los vértices terminales.

La **longitud** de una secuencia es el número de ejes que tiene. Se define como longitud de un grafo al número de ejes que separan los vértices más separados por el camino más corto.

Un **subgrafo** es una porción de un grafo, por lo tanto las secuencias de ejes son ejemplos de subgrafos.

2.1.4- LA MATRIZ TOPOLÓGICA

Como se ha dicho antes, el primero en demostrar que una molécula podía ser representada por una matriz fue el matemático Sylvester, (1874). Dicha matriz se llama **matriz topológica o de adyacencia**.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Esta matriz $A = [a_{ij}]$ es una matriz cuadrada y simétrica de orden n , cuyos elementos a_{ij} toman el valor 1 si y solo si los vértices v_i v_j son adyacentes, y 0 en caso contrario.

Para construir la matriz, en primer lugar se dibuja el grafo correspondiente a la molécula estudiada, suprimiendo los hidrógenos (grafo de hidrógenos-suprimidos). A continuación, se numeran los átomos (o vértices) del grafo sin importar el orden en que se haga. Finalmente se construye la matriz topológica, de modo que un término a_{ij} de la misma tendrá el valor 1 cuando haya enlace entre el vértice v_i y el vértice v_j , respectivamente, y tendrá el valor 0 cuando no haya enlace entre ellos.

La matriz topológica es cuadrada, es decir, tiene igual número de filas que de columnas (“ n ” filas por “ n ” columnas) y este número “ n ” coincide con el total de átomos o vértices del grafo. Además la matriz es simétrica respecto de la diagonal principal, y la valencia de cada vértice, δ_i , equivale a la suma de los términos o valores de su fila o de su columna correspondiente a dicho vértice o lo que es lo mismo, el número de ejes que llegan a él¹¹⁶, lo cual se corresponde con la expresión:

$$\delta_i = \sum T_{ij} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

Es por tanto una expresión matemática que relaciona la estructura química con una descripción numérica. Su importancia en los estudios estructura-actividad radica en que a partir de ella se calculan la mayoría de los índices topológicos. La siguiente figura (figura 2.1) ilustra la construcción de la matriz topológica para el isopentano y el ciclohexano.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

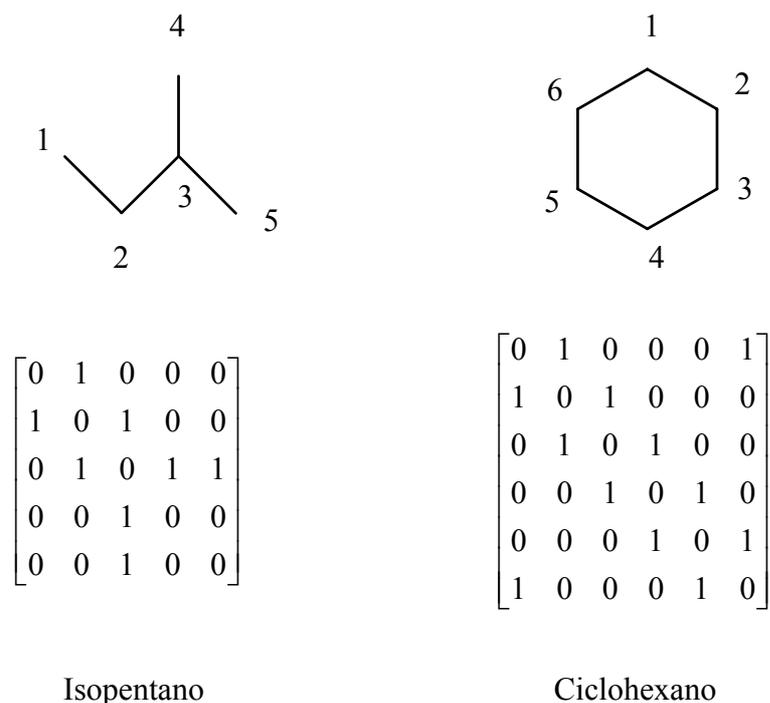


Figura 2.1.- Construcción de la matriz topológica para el isopentano y el ciclohexano.

2.1.5- DESCRIPCIÓN DEL FORMATO SMILES

Establecida la estructura de datos que vamos a utilizar para representar las moléculas, el siguiente paso es diseñar el algoritmo que nos permita obtener esta estructura a partir de la descripción de la molécula en formato SMILES¹¹⁴ (Simplified Molecular Input File Entry System).

Este formato es un sistema de notación química lineal diseñado para el procesado actual de información química, de modo que basándose en los principios de la teoría de grafos permite una rigurosa especificación estructural mediante el uso de un sencillo vocabulario. El sistema de notación SMILES es el más adecuado para conseguir una alta velocidad de procesamiento.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La ventaja principal de la notación SMILES es que tiene un número muy pequeño de reglas simples y su lectura es bastante fácil. Debido a su simplicidad es la notación lineal más usada en la actualidad.

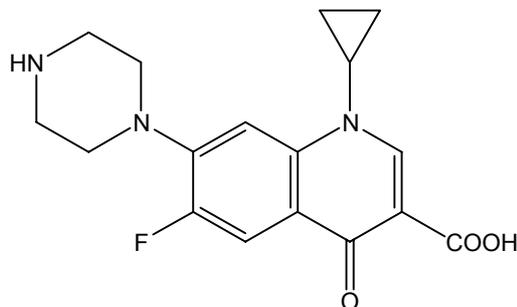
En general, la notación SMILES no es única, pero existe un algoritmo para obtener una notación única¹¹⁵. La desventaja de este algoritmo es que no es aplicable “a mano” pero, si consideramos que el uso de esta notación lineal siempre ha estado relacionado con aplicaciones computacionales, no resulta un problema importante.

La notación SMILES nos permite representar la estructura de una molécula mediante una cadena de caracteres de acuerdo con las reglas que a continuación se detallan:

- *Átomos*: Se representan por un símbolo atómico utilizando mayúsculas para átomos en forma alifática; si el símbolo atómico de un átomo se compone de dos letras, la segunda de ellas será minúscula; los átomos de hidrógeno se suelen omitir.
- *Enlaces*: Los enlaces simple, doble y triple se representan mediante los símbolos -, = y # respectivamente, pero los símbolos de los enlaces simples normalmente se omiten.
- *Ramificaciones*: Se especifican entre paréntesis, de modo que un paréntesis abierto significa el comienzo de la ramificación y el paréntesis cerrado su finalización.
- *Estructuras cíclicas*: Se escoge un enlace en el anillo, se numeran los átomos que une este enlace y queda una estructura sin ciclos la cual se puede expresar usando las reglas anteriormente descritas.
- *Aromaticidad*: Los átomos de anillos aromáticos se pueden escribir con minúscula o también con mayúscula e indicando la posición del enlace correspondiente.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

A continuación en la figura 2.2 se detalla la estructura del ciprofloxacino, molécula que es buen representante del grupo de las fluorquinolonas, con su correspondiente descripción SMILES:



:
N1CCN(CC1)C2=CC3=C(C=C2F)C(=O)C(=CN3C4CC4)C(=O)O

Figura 2.2.- Descripción Smiles para el ciprofloxacino.

2.1.6- INDICES TOPOLÓGICOS

El método topológico emplea una serie de números llamados “índices” para caracterizar estructuralmente a un compuesto. Para definir dichos índices, el primer paso es representar el grafo de la molécula, construyendo a continuación la matriz topológica. A partir de esta matriz, por medio de los algoritmos adecuados, se obtienen la mayor parte de los índices topológicos. Estos índices son, por tanto, descriptores numéricos de la estructura molecular, que se obtienen de la manipulación algebraica del grafo, son por tanto invariantes grafoteóricas que caracterizan a la molécula como un todo. En este sentido nos diferenciamos de la definición de invariante de un grafo dada por Harary¹¹⁷ y Basak¹¹⁸, los cuales admiten invariante de grafo como un objeto

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

matemático que caracteriza una molécula hasta el isomorfismo, es decir que caracteriza de forma distinta cualquier molécula que difiera en algo más que su geometría, sin embargo, admitimos aquí como invariante grafo-teórico a aquel objeto matemático que es independiente de la manera de numerar el grafo.

A continuación se describen algunos de los índices más significativos:

2.1.6.1- INDICE DE WIENER^{119,120}

Se define como el número total de enlaces entre todos los pares de átomos en el grafo.

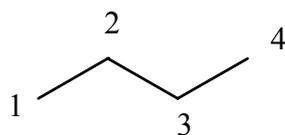
Para su cálculo se construye la matriz de distancia D (Hosoya)¹²¹ cuyos elementos d_{ij} se definen como el número de enlaces por el camino más corto desde el vértice i al vértice j. La suma de los elementos situados por encima de la diagonal principal es el valor del índice cumpliéndose que:

$$W = \frac{1}{2} \sum d_{ij} = \sum h \cdot g_h \quad (\text{Eq. 2.3})$$

donde g_h es el número de pares de vértices cuya distancia es h.

La siguiente figura (figura2.3) ilustra la construcción de la matriz de distancia (D) de Hosoya y cálculo del índice de Wiener para el butano.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS



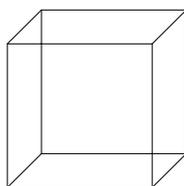
$$D = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 2 & 3 \\ 1 & 0 & 1 & 2 \\ 2 & 1 & 0 & 1 \\ 3 & 2 & 1 & 0 \end{bmatrix}$$

$$W = \frac{1}{2} \sum d_{ij} = \sum h \cdot g_h = (1+1+1+2+2+3) = 1 \cdot 3 + 2 \cdot 2 + 3 \cdot 1$$

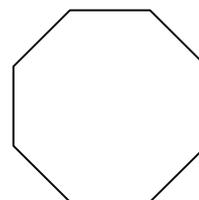
Figura 2.3.- Construcción de la matriz de distancia (D) de Hosoya y cálculo del índice de Wiener para el butano.

2.1.6.2- ÍNDICE DE RANDIC

Se define como la suma, para todos los ejes del grafo, de los inversos de las raíces cuadradas de los productos de las valencias de los vértices adyacentes que limitan cada eje. Este índice aporta información sobre la ramificación mayor o menor de la molécula; así, cuanto mayor ramificación mayor será el índice, si bien para dos grafos regulares con el mismo número de vértices, el índice de ramificación de Randic será el mismo. Esto ocurre con el cubano y con el octano.



Cubano



Octano

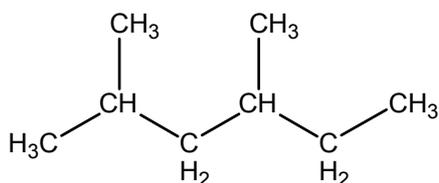


Fig. 2.4.- Representación del cubano y el octano.

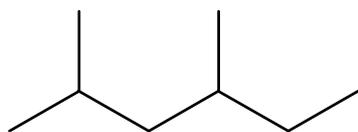
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El método del profesor Randic proporciona un sistema de estudio de los hidrocarburos asociando a cada uno de ellos un valor numérico determinado. Su principal ventaja es que permite el cálculo para moléculas con heteroátomos e insaturaciones lo que le transforma en el índice de elección. La desventaja consiste en la dificultad de su cálculo para moléculas complejas.

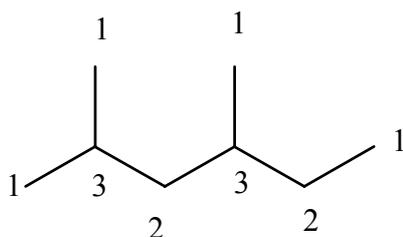
En la siguiente figura (figura 2.5) se muestra el esquema del cálculo del índice de ramificación de Randic para el 2,4-dimetilhexano:



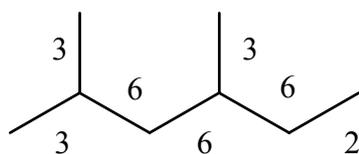
1º- Escribir la formula estructural.



2º- Dibujar el grafo de hidrógenos suprimidos.

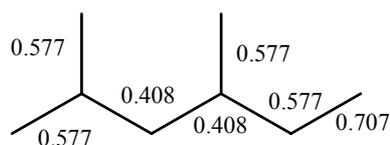


3º- Escribir la valencia de cada vértice.



4º- Calcular el producto de las valencias de los vértices que definen cada eje.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS



5° -Calcular el inverso de la raíz cuadrada.

6°- Sumar todos los valores.

$$I = 0.577 + 0.577 + 0.408 + 0.408 + 0.577 + 0.577 + 0.707 = 3.831$$

Figura 2.5.- Cálculo del índice de ramificación de Randić para el 2,4-dimetilhexano

2.1.7- DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE CONECTIVIDAD

MOLECULAR

El método de la conectividad molecular se basa en tres hipótesis.

1° Hipótesis.

El grafo de cada molécula nos facilita la suficiente información estructural de la misma para poder establecer relaciones cuantitativas entre su estructura y sus propiedades. Esta información está implícita en el grafo de la molécula, así, para los alcanos existe una relación entre la valencia de un átomo o vértice y el número de átomos de hidrógeno unidos a él. Esta relación se puede expresar matemáticamente del siguiente modo:

$$\delta_i = 4 - H_i \quad (\text{Eq. 2.4})$$

donde δ_i es la valencia del vértice i , H_i el número de átomos de hidrógeno unidos a él y 4 el número de electrones de valencia del carbono

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2ª Hipótesis.

Existe una relación entre la propiedad estudiada y las características de conectividad del grafo de la molécula. Esta relación es cuantificable a través de la función de Conectividad que llamaremos P y que se define como:

$$P = C(\chi) = A_0 + \sum_{i=1}^n A_i \chi_i \quad (\text{Eq. 2.5})$$

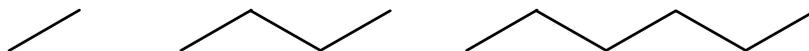
donde A_0 y A_i son los coeficientes e regresión de la ecuación obtenida. Estos coeficientes dependen de la propiedad P y se determinan por regresión múltiple de los valores de la propiedad frente a los índices de conectividad χ_i de las moléculas de la serie estudiada, siendo “n” el número total de índices presentes en la ecuación.

A diferencia de Randic que consideraba un solo grafo por molécula y obtenía un solo índice topológico¹²⁵, la Conectividad Molecular considera **subgrafos** de distintos ordenes para cada estructura (entendiendo por subgrafo cualquier parte de un grafo constituido por uno o varios de sus ejes interconectados). Los subgrafos se clasifican según su orden (**m**) y su tipo (**t**). El orden de un subgrafo no es más que el número de ejes que contiene, considerándose tanto los enlaces múltiples como los simples. El orden de cada uno de los subgrafos depende del número de enlaces que los formen, así varían desde orden cero para cada uno de los átomos aislados que constituyen la molécula hasta el orden máximo de la molécula que se atribuye al grafo completo.

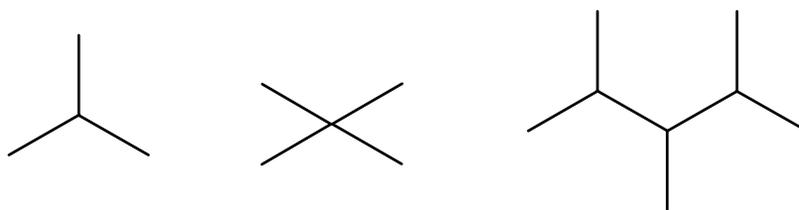
Los términos “CHI” o χ_i de la función de conectividad están definidos para subgrafos de tipo “t” con “m” enlaces y se representa como ${}^m\chi_i$. En función del valor de “m” podemos tener cuatro tipos de subgrafos :

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

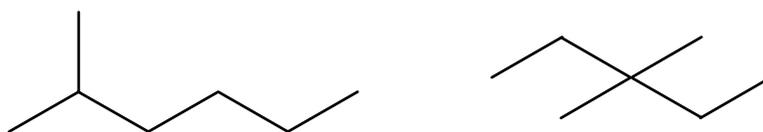
-Tipo I o de tipo PATH ($t = p$). La valencia de los átomos integrantes del subgrafo calculada como si se tratara de una molécula aislada no es mayor de 2.



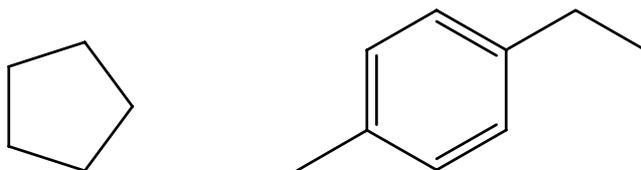
-Tipo II o tipo CLUSTER ($t = c$). El subgrafo presenta algún vértice de valencia 3 ó 4 pero no de valencia 2.



-Tipo III o tipo PATH-CLUSTER ($t = pc$). Como su nombre indica es una combinación de los dos anteriores, es decir, hay vértices con valencia 3 ó 4 y con valencia 2.



-Tipo IV o tipo CHAIN ($t = ch$). El subgrafo considerado presenta al menos un ciclo.



ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La siguiente figura (Figura 2.6) muestra los distintos subgrafos del isopentano (trazos continuos).

Término	Orden 1	Orden 2	Orden 3	Orden 4
PATH				
CLUSTER				
PATH-CLUSTER				

Figura 2.6- Representación de los subgrafos del isopentano

Los índices de conectividad ${}^m\chi_t$ se obtienen como resultado de la suma de los términos correspondientes a los diferentes subgrafos de tipo **t** y orden **m**, según la expresión:

$${}^m\chi_t = \sum_{j=1}^{n_m} {}^mS_j \quad (\text{Eq. 2.6})$$

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

donde n_m es el número del subgrafo de tipo “t” y orden “m” y mS_j es una cantidad calculada para cada subgrafo.

3ª Hipótesis.

Los términos mS_j de cada subgrafo son dependientes del inverso de la raíz cuadrada del producto de las valencias de cada uno de los vértices:

$${}^mS_i = \left[\prod_{i=1}^{m+1} (\delta_i) \right]^{-1/2} \quad (\text{Eq. 2.7})$$

donde “j” define cada uno de los subgrafos y δ_i depende del tipo de subgrafo, de forma que los de orden “m” están definidos por m+1 vértices siendo “m” el orden del subgrafo, excepto los de tipo Chain que lo están por “m” vértices como máximo.

Es decir, los índices de conectividad se obtienen como suma, para todos los subgrafos de un mismo tipo, de los inversos de las raíces cuadradas de los productos de las valencias de los vértices adyacentes que forman parte de cada subgrafo.

De todo ello se deduce que los índices de conectividad son una medida de la valencia de los grafos conectados¹²⁶.

2.1.8- ÍNDICES DE CONECTIVIDAD DE KIER Y HALL

Los índices de conectividad son descriptores numéricos que nos proporcionan información sobre la molécula, sus átomos constituyentes, los enlaces entre ellos, el ensamblaje topológico. No obstante su significado real y las características estructurales que los definen quedan todavía por aclarar.

Los índices de conectividad son índices de familia, de manera que para una misma molécula existen varios índices de conectividad de distinto orden y tipo, los

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

cuales aportan información estructural distinta pero no ortogonal, es decir, parte de estos índices pueden expresarse como combinación lineal de otros.

A continuación se describe los distintos tipos de índices en función de su orden tal y como propusieron Kier y Hall en su método de Conectividad Molecular¹².

-índice de orden 0 (${}^0\chi$)

Un subgrafo de orden cero consiste en un vértice aislado sin ningún tipo de enlace entre ellos, es decir, sin ejes. Por lo tanto ${}^0\chi$ es igual a la suma del inverso de la raíz cuadrada de las valencias de todos los vértices del grafo:

$${}^0\chi = \sum_{i=1}^{m+1} (\delta_i)^{-1/2} \quad (\text{Eq. 2.8})$$

Hay un solo tipo de vértice, representado por su valencia δ_i . Por lo tanto, hay un solo tipo de subgrafo de esta clase (grupo metileno).

Para series homologas este índice aumenta $2^{-1/2} = 0.707$ por la adición de cada grupo metileno. En su cálculo no se utilizan relaciones de adyacencia, siendo una simple medida del número y tipos de puntos de enlace de una molécula. Este índice, como se desprende de su propia formulación, da una idea del tamaño de la molécula y depende únicamente del número de átomos de carbono aumentando con la longitud de la cadena carbonada, pero no refleja, al menos de manera directa, ramificación o ciclación.

Dada su naturaleza, presenta el mismo valor para un amplio número de compuestos. Así, por ejemplo, ${}^0\chi$ es el mismo para el 1,2-dimetilciclohexano y el 1,3-dimetilciclohexano.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El índice de orden cero refleja el tamaño de la molécula por lo que es el índice de elección para correlaciones con propiedades de carácter aditivo como es la masa molecular.

-índice de primer orden (${}^1\chi$)

El índice de primer orden engloba todos los enlaces del grafo. Es la suma de todos los ejes del grafo, medidos como el inverso de la raíz cuadrada del producto de las valencias de los dos vértices implicados en el enlace. Hay sólo un tipo de eje y por tanto un solo tipo de subgrafo de orden uno:

$${}^1\chi = \sum_{s=1}^n (\delta_i \delta_j)^{-1/2} \quad (\text{Eq. 2.9})$$

donde el número de enlaces del grafo es “**n**”, y cada enlace viene determinado por los vértices *i* y *j*. Como se ve por su formulación, este índice ${}^1\chi$ coincide con el de ramificación de Randić.

Sólo existe un tipo de subgrafo de primer orden y dado que la relación de adyacencia entre átomos vecinos se tiene en cuenta para su obtención, posee mayor capacidad para distinguir entre isómeros. Sin embargo, está influido, no solo por el número y tipo de átomos, sino también por el plegamiento de la cadena carbonada. Es por esto por lo que no puede considerarse como un descriptor único. Por ejemplo,; el 1,3-dimetilciclohexano y el 1,4-dimetilciclohexano, tienen valores idénticos.

-índice de segundo orden (${}^2\chi$)

Los subgrafos de este orden contienen pares de conexiones, es decir, ejes adyacentes de un único tipo, el tipo **path**. Cada término contiene el inverso de la raíz

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

cuadrada del producto de las valencias del grafo para los tres vértices (i, j y k) que definen cada subgrafo de orden dos, es decir:

$${}^2\chi = \sum_{s=1}^n (\delta_i \delta_j \delta_k)_s^{-1/2} \quad (\text{Eq. 2.10})$$

donde “n” es el número de subgrafos de orden 2 y “s” identifica a un subgrafo en particular.

Este índice describe la presencia de ramificación o ciclación, hipótesis ésta confirmada por los estudios de Murray¹²⁷ (1975) ya que disminuye este índice disminuye con la ramificación y es mayor para los análogos cíclicos con sustituyentes alquílicos normales. Otros autores proponen este índice como una medida de las formas estructurales de los dobles enlaces. En alcanos no se han detectado redundancias en los valores de ${}^2\chi$ y esto parece que puede generalizarse para todas las moléculas orgánicas.

-índice de tercer orden (${}^3\chi$)

Este índice engloba tres tipos de términos: path, cluster y chain, siendo su expresión matemática la siguiente:

$${}^3\chi = \sum_{s=1}^n (\delta_i \delta_j \delta_k \delta_l)_s^{-1/2} \quad (\text{Eq. 2.11})$$

donde “n” es el número de subgrafos de orden tres de cada tipo, y “s” designa a un subgrafo en particular, formado por los ejes entre los cuatro vértices (i, j, k y l) unidos entre sí por tres enlaces.

El término chain ${}^3\chi_{\text{ch}}$ (índice de tercer orden de tipo chain) está definido únicamente por tres vértices. Este índice refleja el grado de ramificación de los cuatro átomos que forman el subgrafo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El índice path ${}^3\chi_p$ refleja algunas de las diferencias existentes entre las ramificaciones de los isómeros. En el caso de moléculas orgánicas cíclicas señala y distingue entre los compuestos orto, meta y para.

Para el término ${}^3\chi_c$ (índice de tercer orden de tipo cluster) no se han descrito redundancias.

-Índice de cuarto orden (${}^4\chi$)

Es el primer índice en el que se encuentran todos los tipos de términos: path, cluster, path-cluster y chain. Su valor se calcula con la expresión matemática:

$${}^4\chi = \sum_{s=1}^n (\delta_i \delta_j \delta_k \delta_l \delta_p)_s^{-1/2} \quad (\text{Eq. 2.12})$$

donde “n” es el número de subgrafos de un cierto tipo t, con cuatro ejes y cinco vértices (i, j, k, l y p) unidos por cuatro enlaces, y “s” designa a un subgrafo en particular.

Del término que conocemos más datos es el ${}^4\chi_{pc}$ (índice de cuarto orden tipo path-cluster), quizá porque sea de todos ellos el que refleja características estructurales más importantes para el comportamiento de las moléculas orgánicas. Este índice lleva información sobre el número de sustituyentes del anillo bencénico, el modo de sustitución, la longitud de los sustituyentes superiores a tres enlaces y el tipo de heteroátomos sustituyentes. Aparece siempre que existe un punto de ramificación en una cadena o anillo, aumentando su valor con la ramificación. Cada sustituyente del anillo contribuye por lo menos con dos términos a este índice. Es ideal para cuantificar las formas relacionadas con la sustitución del anillo, por ejemplo, la sustitución en las posiciones orto, meta y para¹²⁸.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

-índices de orden superior

Los índices de orden superior a cuatro son de menor importancia que los anteriores, ya que su papel parece ser el de reforzar o matizar las características de los índices ya descritos.

Su cálculo se realiza de manera análoga a los anteriores; generalizando para cada orden m , es decir, subgrafos con m enlaces. Así, la expresión matemática para el cálculo de su valor es, para el índice de orden m :

$${}^m\chi = \sum_{s=1}^n \left\{ \left[\prod_{i=1}^{m+1} (\delta_i) \right]^{-1/2} \right\}_s \quad (\text{Eq. 2.13})$$

donde “ n ” es el número de subgrafos de orden m con $m+1$ vértices, δ_i es la valencia particular de cada vértice y “ s ” designa a un subgrafo en particular.

De todos los términos ${}^6\chi_p$ y ${}^6\chi_{ch}$ son los descriptores moleculares más útiles. El primero lo es de la ciclación de la molécula, ya que aumenta con la longitud de las cadenas laterales, y el segundo lo es de la sustitución del anillo¹⁸.

-índices de valencia.

En los primeros estudios de conectividad se consideraba que los heteroátomos contribuían a los índices de igual forma que el carbono. Esto llevaba a repeticiones en los valores de ghi para isómeros.

En un principio se introdujo una nueva variable de regresión para tener en cuenta la contribución del grupo hidroxilo unido al carbono. Esta variable mejoraba la situación, pero sólo era útil para alcoholes.

Un segundo método propuesto por Murray, Kier y Hall¹²⁹ consistía en fraccionar en dos valores el índice de ramificación, uno que tiene en cuenta la posición

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

del grupo funcional y otra la ramificación del esqueleto carbonado. Pero tampoco fue solución para el problema de la contribución de los heteroátomos a la conectividad molecular.

Estos mismos autores desarrollaron en 1976 un método no empírico¹³⁰ basado en considerar como valor δ la valencia de enlace para átomos de carbono en dobles enlaces. Así, el valor δ se obtiene a partir del número total de enlaces del átomo teniendo en cuenta tanto los electrones de orbitales σ como los orbitales π .

El empleo de estos valores teniendo en cuenta la valencia de los heteroátomos, origina los índices llamados índices de Conectividad de Valencia que se representan por ${}^m\chi^v$.

Aunque se han ensayado distintos algoritmos se define δ^v como:

$$\delta^v = Z^v - H \quad (\text{Eq. 2.14})$$

siendo Z^v el número de electrones de valencia y H el número de átomos de hidrógeno a los que se une el heteroátomo. Por tanto, δ^v es el número de electrones sigma, pi y pares de electrones sin compartir.

Se puede representar δ^v frente a δ , obteniéndose una relación con los volúmenes, así como con la electronegatividad.

Fue introducido por Kier y Hall, el término $\delta_v - \delta$ conocido como electronegatividad de Kier y Hall, $\delta^v - \delta = (Z^v - H) - (\sigma - H) = Z^v - \sigma$, sería, por tanto, el número de electrones pi y pares de electrones sin compartir del átomo correspondiente. Este valor está altamente relacionado con la electronegatividad, así, cuanto mayor sea esta diferencia, más electronegativo es este vértice en el esqueleto carbonado.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En la Tabla 2.1 se pueden observar los valores de δ^v de valencia para los heteroátomos más comunes calculados mediante el último método expuesto, excepto el agua, el amoniac y los halógenos:

Tabla 2.1- Valores de los δ^v de valencia en los distintos heteroátomos

GRUPO	δ^v	GRUPO	δ^v
NH ₄	1	H ₃ O ⁺	3
NH ₃	2	H ₂ O	4
-NH ₂	3	-OH	5
-NH-	4	-O-	6
=NH	4	=O	6
-N-	5	O (grupo nitro)	5
=N-	5	=O (grupo carboxi)	6
=N+= (grupo azida)	4	-F	7
=N- (grupo azida)	6	-Cl	0.690
-N= (grupo nitro)	6	-Br	0.254
-S-	1.33	-I	0.15
=S	0.99	-P-	0.560
=S= (grupo SO ₂)	2.67	=P- y P(5-)	2.22

Así, como vemos en los valores de la tabla, el amoniac y el agua constituyen una excepción en la formula fijada. De igual forma y según la misma, el valor δ_i para los halógenos debería ser 7 para todos ellos, lo cual no coincide con los datos experimentales, por lo que se calcula de manera empírica correlacionando los valores δ_i de moléculas halogenadas y su refracción molar. Los valores obtenidos por este método se han probado frente a varias propiedades fisico-químicas como el punto de ebullición dando buenos resultados¹³¹.

El cálculo del valor de δ^v para el azufre y el fósforo también se hace de forma empírica^{12,132,133}.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Cuando se calcula la matriz topológica de una molécula con heteroátomos se procede de igual forma que para una molécula sin ellos, excepto para el valor de la diagonal principal, que en el caso de los heteroátomos se calcula según la expresión:

$$T_{ij} = \delta^v - E \quad (\text{Eq. 2.15})$$

siendo “E” el número de enlaces establecidos con otros átomos.

De estos índices de conectividad de valencia y no valencia se derivan otros, como son las diferencias de estos para el mismo orden y tipo, y el cociente de los mismos para un mismo orden y tipo¹³⁴. Estos índices si bien son derivados, y en muchos casos no ortogonales, aportan una información estructural adicional y no equivalente. Un esquema representativo de esta complementariedad podría ser el siguiente (figura 2.7):

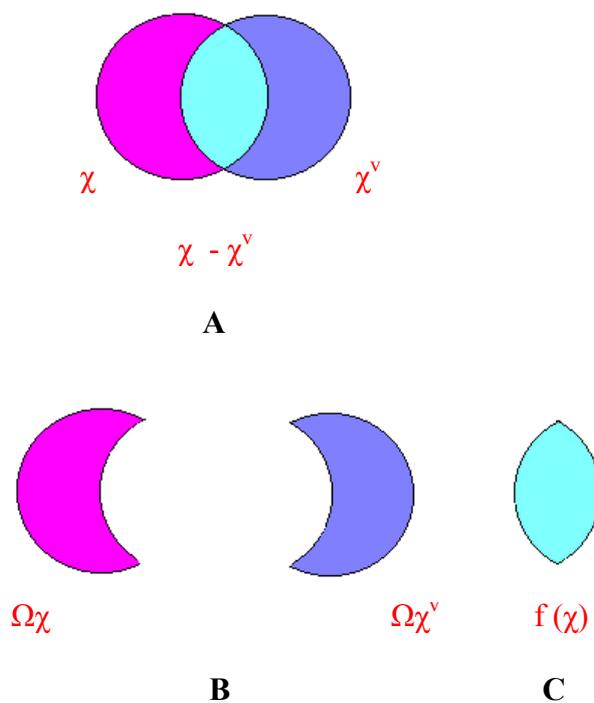


Figura 2.7- Esquema representativo de la complementariedad de índices.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

-El apartado A representa gráficamente de la relación entre los índices de conectividad de valencia y no valencia.

-El apartado B muestra gráficamente la información que supone la combinación de los índices de conectividad, donde $\Omega\chi$ representa la información estructural de χ ortogonal a χ^v y $\Omega\chi^v$ la parte de χ^v ortogonal a χ . Cuando en el esqueleto molecular no existen heteroátomos, la diferencia de índices vale cero por lo que la información correspondiente a la complementariedad de los mismos es nula.

-El apartado C muestra gráficamente la información común de estos índices. Cuanto mayor sea ésta, mayor dependencia existirá entre los mismos, por lo que se podría definir como la parte de χ^v que se puede expresar como función de χ .

-Índices de estado topológico

Definición: Los índices de estado topológico^{135,136} son valores numéricos asociados con cada átomo en una molécula, los cuales contienen información acerca del ambiente topológico que presenta ese átomo debido a la presencia de todos los demás átomos en la molécula. La relación topológica con cada uno de los otros átomos esta basada en la codificación de la información de ese átomo en todos los grafos que emanan de él. Así, átomos topológicamente equivalentes tiene idénticos valores de índice de estado topológico T_i y átomos que no sean equivalentes tienen diferentes valores.

El método para el cálculo de los índices de estado topológico es el siguiente:

Cada átomo en el esqueleto carbonado de la estructura de la molécula está identificado por un valor delta de valencia. Comenzando por cualquier átomo i , se identifican todos los grafos que emanan de ese átomo a cualquier otro átomo j . El orden de grafo más pequeño es el átomo sólo. Este proceso continúa con el hallazgo de todos

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

los grafos de primer orden (enlaces que contenga el átomo i) incluyendo el/los grafos más largos que terminan en el átomo i. Se calcula un valor numérico para cada uno de esos grafos lo cual es un dato en la Matriz de Estado Topológico T. Cada dato se calcula de acuerdo con la expresión:

$$t_{ij} = (GM_{ij})^a \cdot (d_{ij})^b \quad (\text{Eq. 2.16})$$

Donde GM_{ij} es la media geométrica de los valores delta de los átomos, en el grafo de átomos de longitud d_{ij} , entre los átomos i y j. Estos valores de los fragmentos de grafo se suman entonces para dar un valor de estado topológico T_i al átomo i. Los cálculos subsiguientes producen valores de T_i para cada átomo.

A continuación, en las figuras 2.8 y 2.9 y tablas 2.2 y 2.3 se detalla un ejemplo de cálculo de índice topológico para dos moléculas: el 2-propanol e isobutano.

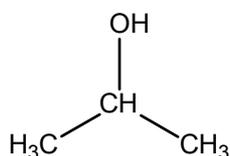


Figura 2.8- 2-propanol.

Tabla 2.2.- Cálculo de índices topológicos para el 2-propanol.

	<u>Grafos entre átomos</u>				<u>Matriz de Estado Topológico</u>				<u>T_i</u>
	1	2	3	4	<u>T</u>				
1	CH ₃ -	CH ₃ CH-	CH ₃ CHCH ₃	CH ₃ CHOH	1.000	1.154	2.080	1.216	5.451
2		-CH<	>CHCH ₃	>CHOH	1.154	0.333	1.154	0.516	3.159
3			CH ₃	CH ₃ CHOH	2.080	1.154	1.000	1.216	5.451
4				-OH	1.216	0.516	1.216	0.200	3.149

T_i = índice de estado topológico

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

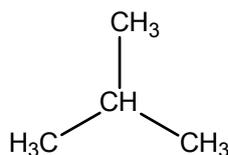


Figura 2.9- Isobutano.

Tabla 2.3.- Cálculo de índices topológicos para el isobutano.

	<u>Grafos entre átomos</u>				<u>Matriz de Estado Topológico</u>				<u>T_i</u>
	1	2	3	4	<u>T</u>				
1	CH ₃ -	CH ₃ CH-	CH ₃ CHCH ₃	CH ₃ CHCH ₃	1.000	1.154	2.080	2.080	6.314
2		-CH<	>CHCH ₃	>CHCH ₃	1.154	0.333	1.154	1.154	3.797
3			CH ₃	CH ₃ CHCH ₃	2.080	1.154	1.000	2.080	6.314
4				-CH ₃	2.080	1.154	2.080	1.000	6.314

T_i = índice de estado topológico

En estos ejemplos se puede observar que la equivalencia topológica está indicada por los valores de T_i. En el 2-propanol la equivalencia topológica de los dos grupos metilo se muestra en el hecho de que T₁ = T₃; ningún otro valor es igual, debido a que ningún otro átomo es topológicamente equivalente. En el caso del isobutano, tres valores de T_i son iguales, T₁ = T₃ = T₄, debido a que los tres grupos metilo son equivalentes y que el grupo CH- central es único. Así pues, los valores del índice de estado topológico representan la equivalencia topológica (simetría topológica) de la molécula. El resultado de valores de T_i para un fragmento de la molécula parece ser característico de ese fragmento y puede ser usado como base de medidas cuantitativas de fragmentos similares.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

-Índices de estado electrotopológico

Definición: Los índices de estado electrotopológico¹³⁷⁻¹⁴² son valores numéricos calculados para cada átomo en una molécula, los cuales encierran información acerca del ambiente topológico de ese átomo y las interacciones electrónicas con el resto de los átomos de la molécula. La relación topológica está basada en el grafo de distancia de cada uno de los otros átomos. La parte electrónica se basa en el estado intrínseco más la perturbación debida a las diferencias del estado intrínseco entre los átomos en la molécula.

El método para el cálculo de estos índices es el siguiente:

A cada átomo se le asigna un valor de estado intrínseco, I_j , según la expresión:

$$I_i = \frac{\left[\left(\frac{2}{N} \right)^2 \delta_v + 1 \right]}{\delta} \quad (\text{Eq. 2.17})$$

El estado intrínseco informa del estado de electronegatividad de valencia de un átomo así como de su topología local mediante el uso de la conectividad molecular simple y los valores de valencia delta, δ y δ_v .

La perturbación en el átomo i , aumentada por la presencia de todos los demás átomos j , está en función de la diferencia entre los estados intrínsecos de los átomos $I_i - I_j$. La influencia disminuye con la distancia; Esta disminución depende del cuadrado del número de átomos del grafo más corto entre el átomo i y el j (r_{ij}). Las perturbaciones son la suma de todas las de la molécula completa:

$$\Delta I_i = \frac{\sum (I_i - I_j)}{r_{ij}^2} \quad (\text{Eq. 2.18})$$

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El estado electrotopológico, llamado **estado-E**, de un átomo i , S_i , se da como la suma del estado intrínseco y de las perturbaciones:

$$S_i = I_i + \Delta I_i \quad (\text{Eq. 2.19})$$

Un ejemplo del cálculo del índice de estado electrotopológico para el caso de la alanina:

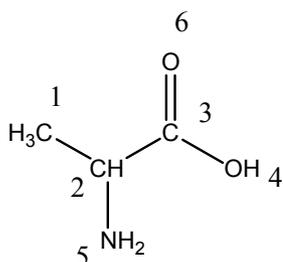


Figura 2.10.- Alanina.

Tabla 2.4.- Cálculo de índices topológicos para el isobutano.

Valores intrínsecos

$$\begin{array}{ll} I(1) = 2.000 & I(4) = 6.000 \\ I(2) = 1.333 & I(5) = 4.000 \\ I(3) = 1.667 & I(6) = 7.000 \end{array}$$

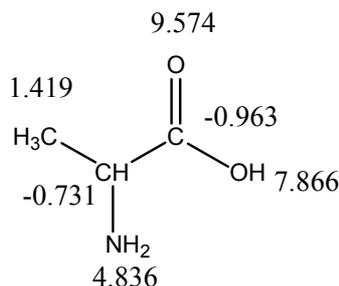
Matriz $(I_i - I_j)/r_{ij}^2$

i	1	2	3	4	5	6	ΔI_i = fila suma
1	0.0	0.1667	0.0370	-0.2500	-0.2222	-0.3125	-0.5810
2	-0.1667	0.0	-0.0833	-0.5185	-0.6667	-0.6296	-2.0648
3	0.0370	0.0833	0.0	-1.0833	-0.2593	-1.3333	-2.6296
4	0.2500	0.5185	1.0833	0.0	0.1250	-0.1111	1.8657
5	0.2222	0.6667	0.2593	-0.1250	0.0	-0.1875	0.835
6	0.3125	0.6296	1.3333	0.1111	0.1875	0.0	2.5741
suma		0.0000					

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El resumen de los valores de los índices de E-estado para la alanina:

$$S_i = I_i + \Delta I_i$$



Los índices de estado electrotopológico se usan para el desarrollo de relaciones QSAR para una gran variedad de propiedades biológicas.

-Índices tipo de átomo de estado electrotopológico^{143,144}

En algunas ocasiones, para el cálculo de índices en moléculas con una gran variedad de tipos de átomos, es útil tener índices de estado electrotopológico para cada tipo de átomos. Se calculan los índices de estado electrotopológico para cada átomo y se suma el valor de todos los átomos de un cierto tipo de átomo dado.

Se ha desarrollado un conjunto simple de símbolos para definir los índices tipo de átomo de estado electrotopológico. Así, por ejemplo, para los grupos metilo el símbolo es SsCH₃. Para el grupo metileno es SssCH₂; para el doble enlace terminal CH₂ es SdCH₂ y para el oxígeno ceto es SdO.

La siguiente tabla muestra los resultados del cálculo para una molécula como el 3,3-dimetil-4,5-diclorohexanol.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Tabla 2.5.- Cálculo de índices tipo de átomo electrotopológico para el 3,3-dimetil-4,5-diclorohexanol.

ID átomo	Grupo	Valencia Delta	Estado-E, S _i	Estado Intrínseco, I _i	Marcadores	Átomos conectados
1	CH ₃	1.00	1.87336	2.000		2
2	CH	3.00	-0.05721	1.333	HBDw	1 3 4
3	Cl	0.78	5.83490	4.111	HBA	2
4	CH	3.00	-0.08674	1.333	HBDw	2 5 6
5	Cl	0.78	6.04310	4.111	HBA	4
6	C	4.00	-0.08584	1.250		4 7 8 9
7	CH ₃	1.00	2.01366	2.0000		6
8	CH ₃	1.00	2.01366	2.000		6
9	CH ₂	2.00	0.69269	1.500		6 10
10	CH ₂	2.00	0.16650	1.500		9 11
11	OH	5.00	8.73082	6.000	HBDA	10

De forma que los valores de los índices de estado-E son:

Tipo de átomo	Valor de Estado-E
SsCH ₃	5.091
SssCH ₂	0.860
SsssCH	-0.087
SssssC	-0.086
SsOH	8.731
SsCl	11.878

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

-Índices tipo de enlace de estado electrotopológico

El formalismo del estado electrotopológico se basa en el esqueleto carbonado de átomos de la molécula. Se ha desarrollado un abordaje similar en el cual la base es el conjunto de enlaces en el esqueleto carbonado (ángulos de los grafos). Se asigna un estado intrínseco para cada arista y entonces se calcula la influencia de cada uno de los otros átomos y se añade al valor de la arista **I**. El valor de enlace de estado-E se calcula entonces de la misma manera que si fuera el valor para cada esqueleto de átomos.

$$I_{ij} = \frac{(I_i + I_j)}{2} \quad (\text{Eq. 2.20})$$

$$BES_{ij} = I_{ij} + \sum \frac{\Delta_{ij}}{\overline{r_{ij}}^2} \quad (\text{Eq. 2.21})$$

donde $\overline{r_{ij}}$ se calcula como promedio de los valores de r_{ij} de los átomos entre los dos enlaces.

Estos valores calculados para enlaces individuales son entonces reunidos para cada tipo de enlace en la molécula.

El símbolo asignado para cada tipo de enlace consiste en un indicador de orden de enlace, e1, e2, e3 o ea. Así, por ejemplo, para el enlace entre $-\text{CH}_3>$ y $-\text{CH}_2-$, el símbolo es e1C1C2. Para el enlace entre $=\text{CH}-$ y $-\text{CH}_2-$ es e1C2C2d. Para el enlace entre $=\text{CH}-$ y $=\text{CH}-$, hay dos posibilidades: e1C2C2d y e2C2C2s.

Así, por ejemplo, para el caso de la molécula 3,3-dimetil-4,5-diclorohexanol los índices tipo de enlace de estado electrotopológico son los que se muestran en la tabla 2.6.a y 2.6.b:

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Tabla 2.6.a.- Cálculo de índices tipo de enlace electrotopológico para el 3,3-dimetil-4,5-diclorohexanol.

<i>Enlace N°</i>	<i>Ids de átomo i</i>	<i>átomo j</i>	<i>Tipo i</i>	<i>átomo j</i>	<i>Orden de enlace</i>	<i>Enlace Estado-E</i>	<i>Símbolo de enlace</i>
1	1	2	-CH ₃	>CH-	1	1.383	e1C1C3
2	2	3	>CH-	-Cl	1	3.734	e1C3C1
3	2	4	>CH-	>CH-	1	0.389	e1C3C3
4	4	5	>CH-	-Cl	1	3.973	e1C3C1
5	4	6	>CH-	>C<	1	0.359	e1C3C4
6	6	7	>C<	-CH ₃	1	1.491	e1C1C4
7	6	8	>C<	-CH ₃	1	1.491	e1C1C4
8	6	9	>C<	-CH ₂ -	1	0.728	e2C2C4
9	9	10	-CH ₂ -	-CH ₂ -	1	0.843	e1C2C2
10	10	11	-CH ₂ -	-OH	1	5.220	e1C2O1

Tabla 2.6.b.- Cálculo de índices tipo de enlace electrotopológico para el 3,3-dimetil-4,5-diclorohexanol.

<i>Símbolo del tipo de enlace</i>	<i>NET Cantidad de enlaces</i>	<i>ETS Valor del índice de estado-E</i>
e1C1C3	1	1.28273
e1C1C4	2	2.98245
e1C2C2	1	0.84259
e2C2C4	1	0.72820
e1C3C3	1	0.38944
e1C3C4	1	0.35870
e1C3C1	2	7.70714

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

-índices ortogonales: los índices de diferencia Chi

En el desarrollo de las ecuaciones QSAR, funciones discriminantes, y otros aspectos del análisis de estructura, a veces, es deseable tener un conjunto de índices ortogonales. Lo normal en un conjunto de datos es que exista cierto grado de colinearidad entre las variables usadas para describir las moléculas. Bien si se usan los índices topológicos o bien las propiedades físicas o las cantidades calculadas, es de lo más inusual encontrar ortogonalidad estricta en un conjunto de datos.

Para los índices de conectividad molecular, cuando el conjunto de datos consiste en estructuras moleculares diversas, la colinearidad usualmente no es lo suficientemente extensa como para que suponga un problema significativo. Aun así, cuando el conjunto de moléculas cubre un amplio rango en tamaño molecular y/o no hay un alto grado de diversidad de estructuras, la colinearidad puede convertirse en un problema en algunos análisis estadísticos.

Existen diversos métodos para introducir la ortogonalidad en un conjunto de variables. El PCA (Principal component análisis) (análisis del componente principal) es frecuentemente usado. En este método, un conjunto de variables, x_i , es transformado por combinaciones lineales en un nuevo conjunto, x_i' . Estas nuevas variables se obtienen de forma que cada nuevo componente principal es una combinación lineal de todas las variables originales x_i . Tal arreglo facilita los subsiguientes análisis estadísticos pero la interpretación se hace confusa debido a que cada componente principal es una combinación lineal de cada variable en el conjunto de datos.

Un segundo método es usando el GSO (Gram-Schmidt type orthogonalization) (ortogonalización tipo Gram-Schmidt). Para un conjunto de variables ($x, i=1,n$), x_1 se seleccionada como la primera nueva variable, x_1' . x_2' se crea de forma que sea ortogonal de x_1' . Una forma simple de obtener x' es regresionar x_2 frente x_1' ($=x_1$). El conjunto de

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

residuales obtenida de esta regresión, res_2 , es un conjunto igual a x_2' . Debido a que res_2 es la parte de x_2 que no se correlaciona con x_1 , entonces, $res_2(=x_2')$ es ortogonal de x_1 . Se puede proceder de este modo para crear un conjunto de índices ortogonales, x_i' . Este método es un poco más tedioso que el anterior que usa los componentes principales. Los primeros dos o tres de estos índices x_i' con frecuencia tienen más interpretabilidad que los obtenidos por PCA. Hay que añadir que, en ambos métodos, el conjunto de índices ortogonales es dependiente de los datos específicos de los cuales son generados de forma que el adicionar nuevos datos tiende a disminuir la ortogonalidad así como la interpretación dada a estos índices ortogonales.

Otro método que también viene siendo utilizado abarca el problema de una forma diferente. El principal aspecto del problema de la colinearidad es la contribución significativa del tamaño molecular a la constitución de los índices chi. De hecho, cuando un conjunto de datos abarca un gran rango de tamaños, la colinearidad tiende a incrementarse significativamente. Por esta razón, se prefiere crear una cantidad de índices ortogonales que aunque no exactos, si son bastantes independientes del tamaño molecular.

Para cada orden de grafo de índices chi de una molécula dada, se crea un índice para codificar el tamaño solamente. Esta cantidad está definida por el grafo del mismo tamaño que la molécula dada pero para el grafo acíclico: ${}^m\chi_N$ para el grafo simple y ${}^m\chi_N^v$ para el grafo de valencia. El nuevo índice chi tamaño independiente de orden m se llama **índice de diferencia chi**. El índice de diferencia chi se define para ambos, el grafo simple y el grafo de valencia de orden m , como sigue:

$$d^m \chi_N = {}^m\chi_P - {}^m\chi_N, \text{ para índices de grafo simple} \quad (\text{Eq. 2.22})$$

$$d^m \chi_N^v = {}^m\chi_P^v - {}^m\chi_N^v, \text{ para los índices de grafo de valencia.} \quad (\text{Eq. 2.23})$$

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

De esta forma, el factor del tamaño en los índices de grafo chi se sustrae, dejando un índice que es mucho más independiente del tamaño. Para alcanos, la relación es exacta. Aun así, para los índices que contienen heteroátomos, la relación no es exacta. La independencia del tamaño de cada índice de diferencia depende un poco del conjunto específico de moléculas. Sin embargo, la definición de los índices de diferencia chi es independiente del conjunto de datos.

Un ejemplo de los índices de diferencia chi se ilustra en la siguiente tabla:

Tabla 2.7.- Índices de diferencia chi para diversas moléculas.

Molécula	${}^1\chi_N$	$d^1\chi$	${}^1\chi_N^2$	$d^1\chi^v$	${}^3\chi_N$	$d^3\chi_P$	${}^3\chi_N^v$	$d^3\chi_P^v$
	4.914	-0.395	4.914	-0.395	1.958			
	4.914	-0.395	5.272	-1.392	1.957			
	3.914	-0.127	3.914	-0.127	1.457			
	3.914	-0.127	4.167	-0.689	1.457			

2.2- FLUORQUINOLONAS: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.2.1- ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Desde hace aproximadamente tres décadas la humanidad dispone de agentes antimicrobianos sintéticos del tipo de las quinolonas o relacionados con ellas, de hecho el uso de quinolonas o drogas del tipo de naftiridinas en medicina data de hace más de 35 años, primero para el tratamiento de las infecciones de vías urinarias y más tarde, tras un continuo desarrollo, para cualquier tipo de infección, constituyendo hoy día, junto a los betalactámicos, una de las familias antimicrobianas más importantes.

En el escaso tiempo transcurrido este grupo de antimicrobianos ha sido objeto de progresos impresionantes con la introducción de las fluorquinolonas en los últimos 20 años.

Históricamente, el primer ancestro relacionado con este grupo se debe a Price⁴⁷, que en 1949 obtuvo una molécula, por degradación de alcaloides, sin actividad biológica, a la que denominó quinolona; era el ácido 1-metil-4-quinolona-3-carboxílico. En los años siguientes se fueron sintetizando más compuestos similares, de tal manera que en 1960 Barton patentó 80 moléculas con estructura similar, algunas ya con poder antibacteriano pero sin aplicación clínica⁴⁸. Dos años más tarde, en 1962, Leshner y cols.⁴⁹ dieron a conocer el descubrimiento del ácido nalidíxico, obtenido por síntesis a partir del antipalúdico cloroquina, útil por su actividad sobre algunas bacterias gram-negativas y por lograr concentraciones adecuadas en orina tras su administración oral, para el tratamiento de infecciones localizadas en las vías urinarias. Después se fueron desarrollando más derivados, que no diferían mucho del ácido nalidíxico en cuanto al espectro de acción antibacteriana o la farmacocinética: ácido oxolínico, ácido

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

piromídico, cinoxacino, rosoxacino, flumequina y otros^{50,51}. Diez años más tarde de la publicación del ácido nalidíxico, en 1973 apareció el ácido pipemídico⁵²⁻⁵⁴, con actividad, espectro y farmacocinética mejores que permitían administrar dosis más reducidas que las de los compuestos anteriores. La aparición de mutantes bacterianas resistentes durante el tratamiento y los efectos secundarios también eran menores. Estas primeras quinolonas, dada su principal indicación, se englobaron dentro de los llamados “antisépticos urinarios”.

Un hecho importante en la historia de las quinolonas fue el descubrimiento de que al incorporar un átomo de fluor en la posición 6 del anillo base se conseguía mejorar la farmacocinética y ampliar el espectro. En 1978, con la publicación de la síntesis del norfloxacin⁵⁵, se inició la etapa más importante de estos compuestos, empezando la serie de las que hoy se conocen como fluorquinolonas. Posteriormente, los nuevos descubrimientos no han cesado⁵⁶⁻⁶⁶, siendo muy numerosos estos fármacos, algunos comercializados, otros abandonados y otros en fase avanzada de desarrollo o simplemente patentados: ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacino, amifloxacino, fleroxacin, lomefloxacino, esparfloxacino, tosufloxacino, levofloxacino, grepafloxacino, trovafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, sitafloxacino, difloxacino, clinafloxacino, balafloxacino, sarafloxacino, plurifloxacino, pazufloxacino, gemifloxacino y otros, la mayoría con posibilidades de emplearse para el tratamiento de infecciones graves, incluidas las sistémicas.

Al inicio de los años 90, algunos de estos fármacos, como ciprofloxacino, que es el patrón con el que se comparan las nuevas fluorquinolonas por su estabilidad química y biológica, espectro de actividad muy amplio, potencia antibacteriana, concentraciones históricas elevadas, posibilidad de administración oral o parenteral

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

además de su elevada biodisponibilidad, fácil eliminación y pocos efectos secundarios, fueron considerados casi perfectos⁶⁷; no obstante, la diversidad de estos fármacos, la aparición de cepas resistentes, distinto espectro y farmacocinética, efectos secundarios, aparición de nuevos compuestos y otros aspectos, obligan a su revisión actualizada, por consiguiente se encuentran en estudios nuevas fluorquinolonas y otros grupos de compuestos relacionados con un mayor espectro de actividad antimicrobiana que incluyen, en algunos casos, su eficacia contra infecciones por microorganismos gram-positivos y anaerobios.

La mayor actividad de las nuevas fluorquinolonas, como esparfloxacino contra microorganismos anaerobios, cepas de neumococos resistentes a penicilinas y cefalosporinas han conllevado al estudio de otras fluorquinolonas, por ejemplo: levofloxacino, clinafloxacino, grepafloxacino, que muestran un aumento de su acción frente a bacterias gram-positivas y anaerobios. Otro empleo destacable incluye la obtención y uso de quinolonas para tratar infecciones por micobacterias (ciprofloxacino, ofloxacino, y esparfloxacino)⁶⁸.

2.2.2- ESTRUCTURA QUÍMICA

Las distintas fluorquinolonas, ácidos orgánicos con un pK elevado y la mayoría lipofílicas, en general comparten un núcleo común: la estructura bicíclica 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, o 4-quinolona compuesta de dos anillos, uno de tipo piridina, con un ácido carboxílico libre en posición 3 y un átomo de nitrógeno en posición 1, y un segundo anillo, aromático, bencénico o de otro tipo. Para que el núcleo bicíclico se active y estas sustancias tengan actividad biológica es necesario que el nitrógeno de la posición 1 incorpore una cadena lineal o cíclica⁶⁹. Clásicamente, según

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

las distintas incorporaciones de más átomos de nitrógeno, se clasificaron en cuatro grupos diferentes⁷⁰ que se representan en la figura 2.11:

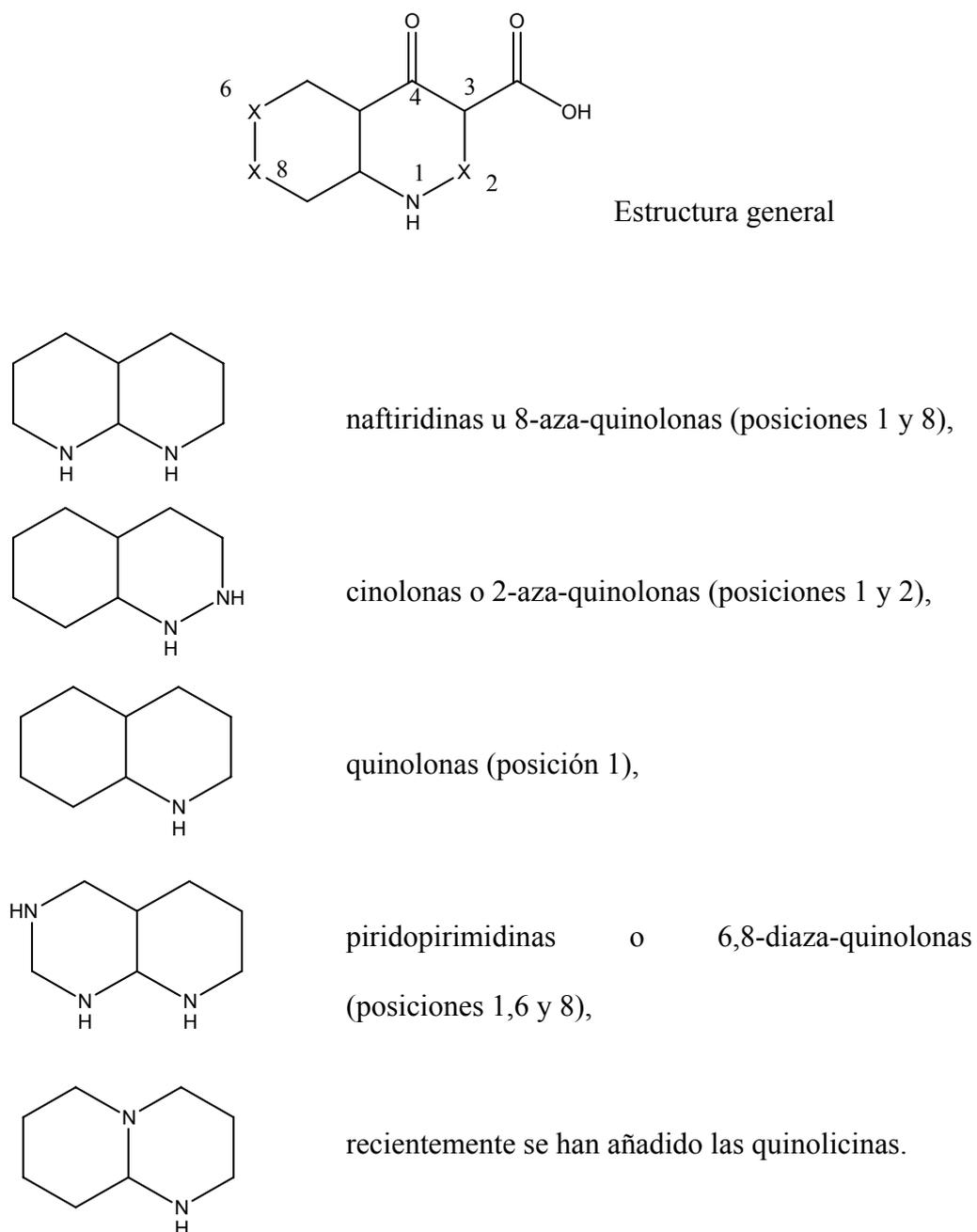


Fig. 2.11.- Clasificación de las fluorquinolonas según el número de átomos de nitrógeno.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La clasificación química es más compleja y se basa en el tipo de estructura química asociada al núcleo básico⁷¹⁻⁷³:

- grupo I o derivados monocíclicos
- grupo II o derivados bicíclicos que está subdividido en varias categorías:

*IIA con anillos de seis elementos

-IIA-1 (1-8 naftiridinas)

-IIA-2 (piridopirimidinas y piridopirazinas)

-IIA-3 (7-piperazina, 7-pirrolidina y 7-pirril)

*IIB con anillos de cinco elementos.

- grupo III o derivados tricíclicos
- grupo IV o derivados tetracíclicos.

2.2.3- RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Existe una clara asociación entre la estructura química, la actividad y los efectos secundarios de estas sustancias.

La mejor actividad antibacteriana y el mayor espectro de acción corresponden a la incorporación del átomo de fluor en la posición de la molécula y también de un grupo piperazina heterocíclico en la posición 7. El átomo de fluor en C6, o en C9, dependiendo de si la flourquinolona es bicíclica o tricíclica, controla la unión y los efectos sobre el complejo DNA-girasa y la penetración antibacteriana, aumentando notablemente la potencia^{74,75}.

Los sustituyentes en N1 determinan la estabilidad de la molécula y la potencia antibacteriana; el grupo etil confiere estabilidad, el grupo ciclopropil, de pequeño

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

tamaño y característico de ciprofloxacino, el fluorofenil y el 2,4-difluorofenil de difloxacino y temafloxazino, respectivamente, y también butil, son buenos para aumentar la potencia^{76,77}.

El ácido carboxílico en posición 3 y el cetónico en la 4 no pueden ser modificados, porque son esenciales para la unión a la girasa bacteriana y para el transporte intrabacteriano del antibiótico.

Sustituciones en la posición 5 controlan también la potencia y favorecen la acción frente a gram-positivos, siendo los radicales NH₂, como el del esparfloxacino, OH y CH₃ los más adecuados⁷³.

Diferentes radicales en C7 controlan la potencia, el espectro y la farmacocinética. Los más eficaces son los anillos heterocíclicos de 5 o 6 elementos, como piperazina, que aumenta la potencia sobre gram-negativos, y pirrolidina, que la aumenta sobre gram-positivos. En el grupo piperazínico se pueden incorporar otros adicionalmente, como el metil, mejorando las condiciones farmacocinéticas.

Las sustituciones por átomos de fluor, cloro, nitrógeno o grupos aromáticos en la posición 8 determinan cambios en la farmacocinética y en la actividad, incluyendo anaerobios^{71,73,78}.

2.2.4- MECANISMO DE ACCIÓN

El material genético de las células tanto procariontas como eucariotas está constituido por ácido desoxirribonucleico, ADN. Este se encuentra formando los cromosomas que, en las células eucariotas se encuentra en una zona específica y claramente definida llamada núcleo celular, mientras que en las células procariontas no

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

existe dicha zona. El ADN bacteriano es circular, y además presenta un aspecto retorcido, lo que se conoce como superenrollamiento, superretorcimiento o superhelicidad del ADN^{79,80,81}. Este estado de superenrollamiento es el estado nativo del ADN en los microorganismos, pero ha de ser modificado para que puedan ser llevados a cabo todos los procesos en los que se ve implicado el material genético como son la replicación, la transcripción, etc.

El superenrollamiento del ADN está controlado por un grupo de enzimas llamadas topoisomerasas las cuales son enzimas celulares que se encargan de regular el número de vueltas con que cada una de las cadenas de la doble hélice del DNA se trenza con su homóloga y catalizan la rotura de bridas de la configuración del DNA, transformando la energía química del ATP en mecánica, lo que permite un enrollamiento adicional, variando el número de giros secundarios al romper una o las dos cadenas, influyendo por lo tanto en su topología y de ahí el nombre que reciben.

Pueden ser de dos tipos:

- Las topoisomerasas de tipo I, que son capaces de producir cortes transitorios en una de las hebras del ADN. Estas enzimas son proteínas monoméricas de un peso molecular de unos 100-120 kDaltons que catalizan la relajación del superenrollamiento del ADN. Actúan sobre cadenas sencillas de DNA.
- Las topoisomerasas de tipo II, que cortan de manera transitoria los dos filamentos del ADN. Este tipo de enzimas (como la DNA-girasa y la topoisomerasa IV) son proteínas tetraméricas de unos 400 kDaltons de peso molecular formadas por dos pares de subunidades cada una: dos subunidades de tipo A (GyrA) y otras dos de tipo B (GyrB) en el caso de la DNA-girasa y las subunidades ParC y ParE en el caso de la topoisomerasa IV. Ambas enzimas actúan mediante ruptura de las dos cadenas de ADN,

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

producción de superenrollamiento y posterior reparación de la ruptura, de este modo que afecta al superenrollamiento negativo del ADN necesario para iniciar la replicación del ADN y elimina el superenrollamiento positivo que se acumula antes del avance de la horquilla de replicación.

Las topoisomerasas II, catalizan el superenrollamiento del ADN en presencia de ATP, al que hidrolizan aprovechando la energía liberada en dicha hidrólisis.

El mecanismo propuesto para el proceso de reacción de topoisomerización en el caso de la DNA-girasa es el siguiente: las dos subunidades A rompen el doble filamento de ADN dejando cuatro pares de bases desapareadas y los extremos 5' libres. Es entonces cuando las subunidades B introducen un superenrollamiento en el ADN y finalmente las subunidades A sellan el corte original.

En el caso de la topoisomerasa IV, la reacción de topoisomerización resulta de la separación de la interacción de la cadena de ADN hija durante el desarrollo de la replicación; lo cual facilita la segregación de las moléculas hijas de ADN en las células hijas⁸². Esta enzima cataliza la relajación de los supergiros de la doble cadena de DNA, pero no los genera, necesitando también el concurso del ATP^{83,84}.

Los agentes antimicrobianos del tipo de las quinolonas o relacionados con ellas se comercializaron mucho antes de que se dilucidara la base molecular de su acción en términos de inhibición de la DNA-girasa.

Las fluorquinolonas tienen un efecto bactericida sobre los microorganismos. Penetran en el interior de las células sin alterar la pared celular, a través de las porinas, y luego por la membrana citoplasmática, sin que el paso sea afectado por el estado de la pared celular, aunque sí por la temperatura, ya que no la atraviesa a 0 °C, al haber

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

menos síntesis de proteínas de estos canales⁸⁵. La entrada es pasiva sin consumo de energía y no saturable. Las quinolonas hidrófobas es probable que pasen por liposolubilidad. En las bacterias gram-positivas, que no tienen porinas ni lipopolisacáridos, el paso es por difusión simple. Una vez que se encuentran en el interior de las células son capaces de inhibir selectivamente la enzima responsable de preparar el ADN para la transcripción, es decir, la ADN-girasa o topoisomerasa II, a la que se unen por uniones covalentes^{86,87}. También son capaces de inhibir la topoisomerasa IV, un homólogo de la ADN-girasa, aunque su acción sobre esta última ha sido menos estudiada.

Así pues, la inhibición aparece mediante la interacción que se produce entre la droga con complejos compuestos de DNA por un lado y una de las dos topoisomerasas II por otro lado (complejo ternario): la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, impidiendo la rotura y sobre todo el sellado de la cadena de DNA de doble hélice, estabilizándola y evitando que la enzima se regenere e intervenga en nuevos ciclos y en la formación de ciclos adicionales, con lo que el DNA, demasiado expandido, no tiene suficiente espacio dentro de la bacteria^{88,89}.

De este modo, el mecanismo de acción propuesto para el grupo de las fluorquinolonas implica la inhibición de la topoisomerasa tipo II impidiendo el superenrollamiento del material genético bacteriano. En un primer momento se propuso la interacción de estos antibacterianos con las subunidades A de la enzima ADN-girasa⁹⁰, de manera que impidieran el sellado de los cortes en las hebras del ADN, debido a la existencia de mutantes de la subunidad A resistentes a fármacos de esta familia. Sin embargo, hay constancia de que las mutaciones ocurridas en la subunidad B

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

modifican la sensibilidad de los microorganismos frente a las fluorquinolonas, lo cual sugiere que estos antibacterianos también afectan a las subunidades B de la enzima.

Estos fármacos no modifican la estructura de los cromosomas humanos, ya que la topoisomerasa II de las células humanas está formada únicamente por dos subunidades en lugar de cuatro⁹¹.

Este mecanismo sería suficiente para explicar por si solo el poder bacteriostático de estas drogas pero no su capacidad bactericida la cual es además notable.

El mecanismo de acción bactericida se ha explicado en base a que la inhibición de las subunidades A deja dos roturas permanentes en el ADN. Estas roturas o interrupciones actúan como señales para la exonucleosis. La exonucleosis es un proceso de degradación del ADN mediado por unas enzimas, las exonucleasas, las cuales introducen roturas permanentes a lo largo del todo el ADN, lo que equivale a la muerte celular⁹².

La acción bactericida se observa principalmente en el caso de las fluorquinolonas, siendo además bifásica: para cada fluorquinolona existe una concentración bactericida máxima por encima de la cual la actividad disminuye, pero que vuelve a aumentarse si se incrementa más la concentración. Esta característica parece que se explica por el hecho de que con ciertas concentraciones la acción bacteriostática impide la síntesis de proteínas que participan en la acción bactericida.

También disminuye la acción bactericida si previamente se ha inhibido la síntesis de proteínas en las bacterias; por ello, no es recomendable su utilización conjunta con sustancias que inhiban la síntesis proteica o el ARN bacteriano

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

(rifampicina y cloranfenicol) ya que puede reducirse de forma significativa la actividad bactericida⁹¹.

Adicionalmente a los mecanismos expuestos, la bacteria responde a la inhibición de la DNA-girasa con una autoprotección hacia la replicación del DNA atacado, por medio de una respuesta de cascada de proteínas, lo que se denomina SOS (*SOS-RecA*), parando la división celular y protegiendo su supervivencia^{93,94}, fenómeno que se puede medir por el aumento de producción de B-galactosidasa. El sistema RecA se activa por una exonucleasa con síntesis de proteínas líticas letales⁹⁵⁻⁹⁷.

Otras consecuencias derivadas del mecanismo de acción, demostrada con algunas fluorquinolonas, es que al actuar sobre las bacterias se liberan polisacáridos, con aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular, mayor permeabilidad para la entrada de los antibióticos betalactámicos, vulnerabilidad a otros fármacos y menor lisis por los detergentes⁹⁸. también determina que los microorganismos sean más sensibles a la acción del complemento sérico, C3, aumentando la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares y polimorfonucleares, sin modificar su efecto microbicida^{99,100}.

En resumen, las quinolonas actúan en cuatro etapas:

- Paso a través de las porinas de la pared bacteriana y de la membrana citoplasmática hasta llegar al citoplasma.
- Inhibición de la enzima DNA-girasa y de la topoisomerasa IV.
- Inhibición de la síntesis de DNA y proteica.
- Inducción de la respuesta SOS y de autolisinas lo que conduce a un rápido efecto bactericida.

2.2.5- ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Las quinolonas presentan un espectro antibacteriano dirigido principalmente contra las bacterias gram-negativas aerobias, sobre todo enterobacterias, pero los nuevos compuestos 4-quinolónicos actúan también frente a bacterias gram-positivas, algunos anaerobios y micobacterias.

Las modernas 4-fluorquinolonas tienen un espectro más amplio: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, varios *Staphylococcus* (incluyendo cepas productoras de beta-lactamasas), *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Gardnerella vaginalis*, *Legionella*, *Campylobacter jejuni*, *Branhamella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Listeria monocytogenes*, *Clamidia* y *Mycoplasma*⁹¹.

Su actividad frente a las bacterias anaerobias es moderada, o nula en el caso de *Bacteroides fragilis*.

A continuación, en la tabla 2.8, se detallan las CMI de las principales quinolonas para un heterogéneo grupo de microorganismos.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Tabla 2.8.- CMI de las principales quinolonas ($\mu\text{g/mL}$)

Microorganismo	NAL	NOR	CIP	OFL	ENO	PFL	FLE	LOM
<i>Acinetobacter spp</i>	128	8	1	0.5	8	1	2	4
<i>Aeromonas spp</i>	4	0.03	0.007	0.06	0.03	0.06	0.03	0.06
<i>Bacteroides fragilis</i>	>128	128	8	8	64	16	4	16
<i>Campilobacter jejuni</i>	16	1	0.25	0.5	1	1	0.5	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	>128	4	1	4	16	4	8	8
<i>Escherichia coli</i>	4	0.12	0.06	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	0.12	0.01	0.03	0.06	0.06	0.12	0.06
<i>Legionella spp</i>	1	1	0.5	0.5	1	1	1	0.25
<i>Listeria spp</i>	>128	16	1	16	16	-	4	16
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	>128	4	0.5	2	4	8	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	2	0.03	0.007	0.01	-	0.03	-	-
<i>Pseudomonas spp</i>	-	2	0.5	4	8	8	8	4
<i>Staphylococcus spp</i>	128	2	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1

NAL: Ácido Nalidíxico; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacino; OFL: ofloxacino; ENO: enoxacino; PFL: pefloxacino; FLE: fleroxacino; LOM: lomefloxacino.

La duración del efecto post-antibiótico (término utilizado para describir la persistencia de la supresión del crecimiento bacteriano tras una corta exposición del microorganismo a los agentes antimicrobianos) para las quinolonas varía entre 0.5 y 3 horas (normalmente 1-2 horas), aumentando con el incremento de la concentración plasmática y el tiempo de exposición a estos antibióticos⁹¹.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.2.6- SELECTIVIDAD

Una de las características primordiales de los antibacterianos ha de ser su selectividad, es decir, la capacidad de afectar a las células infectantes, los microorganismos, pero no a las células hospedadoras.

Debido al mecanismo de acción propuesto para el grupo de las fluorquinolonas su selectividad es muy elevada ya que aunque exista una topoisomerasa de tipo II humana se diferencia de la microbiana en varios aspectos:

-Estructuralmente: puesto que la enzima humana es una proteína dímera de unos 345 kDaltons de peso molecular frente a los 400 kDaltons de la bacteriana.

-Funcionalmente: puesto que aunque corta el ADN de igual forma, dejando cuatro pares de bases desapareadas con los extremos 5' libres, todo el proceso siguiente es completamente diferente.

2.2.7- RESISTENCIAS

Las resistencias son modificaciones de la sensibilidad de un microorganismo frente a un antimicrobiano, de forma que se necesitan concentraciones mayores para obtener el efecto deseado, llegando incluso a no obtenerse efecto alguno cuando disminuye sobremanera la sensibilidad del germen. Cuanta más actividad intrínseca tiene una quinolona más tarda en aparecer la resistencia clínica.

En todas las especies estudiadas, los mecanismos de resistencia a fluorquinolonas incluyen uno, dos o tres de las cuatro principales categorías de mecanismo de resistencia:

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

- Los plásmidos, que son partículas de ADN extracromosómico con la información necesaria para disminuir la sensibilidad de los microorganismos frente a uno o más antimicrobianos e incluso llegar a hacerlo resistente. Las resistencias codificadas por plásmidos no sólo no parecen tener importancia en el caso de las fluorquinolonas debido a su mecanismo de acción, sino que además éstas pueden actuar como agentes capaces de eliminar los plásmidos^{79,101}.

- Alteraciones en la diana de acción de la droga, es decir, por modificación enzimática de las subunidades de la DNA-girasa (el principal) en la topoisomerasa II.

- Alteraciones en la permeabilidad de la droga para acceder a la diana de acción.

- Por aumento de la expulsión de la droga mediante bombas de flujo.

Estos tres últimos mecanismos de adquisición de resistencias son los responsables de la mayoría de las mismas dentro del grupo de las fluorquinolonas.

Ninguna modificación específica de la fluorquinolona ni ninguna degradación de la enzima ha sido encontrada como mecanismo para la resistencia bacteriana a las fluorquinolonas, aunque algunos hongos pueden degradar quinolonas mediante alguna ruta metabólica¹⁰².

2.2.8- FARMACOCINÉTICA

2.2.8.1- ABSORCIÓN:

Las fluorquinolonas se caracterizan por presentar todas ellas buena absorción tras su administración oral⁹¹, una rápida absorción en el tracto gastrointestinal, que ocurre concretamente en el duodeno y en el yeyuno¹⁰³. Así, el tiempo máximo (Tmax), entendiendo como tal, el tiempo necesario para alcanzar la concentración plasmática máxima (Cmax), oscila entre 1 y 3 horas de una dosis oral de 400 mg, después del cual se detectan valores máximos de ellas en plasma, y las cifras mencionadas varían de 1.5 µg/mL, con el norfloxacin, a 5.8 µg/mL con el pefloxacin, de hecho los valores plasmático relativamente pequeños del norfloxacin limitan su utilidad en el tratamiento de infecciones de vías urinarias¹⁰⁴.

Existen diferencias entre ellas respecto a su velocidad de absorción y al porcentaje de dosis absorbida. Aunque la presencia de alimentos no reduce significativamente la absorción oral de las fluorquinolonas en general, puede retrasar el Tmáx pero sin modificar, en cambio, ningún otro parámetro farmacocinético (Cmáx, AUC, t1/2beta). No ocurre lo mismo si se administran junto con antiácidos con sales de magnesio y/o aluminio ya que disminuye la biodisponibilidad debido a la capacidad quelante de estas sustancias, por lo que estos deben administrarse en tiempos diferentes.

La biodisponibilidad de las fluorquinolonas depende de su estructura molecular variando desde el 40% para el norfloxacin (una monofluorquinolona), la menor de todas, hasta el 95-100% para el pefloxacin (monofluorquinolona) y el fleroxacin (trifluorquinolona), las mayores.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La vida media desde el plasma varia de 3 a 5 horas con el norfloxacin, y con el pefloxacin y fleroxacin es de 10 a 11¹⁰⁴.

Existe proporcionalidad entre las dosis administradas y los parámetros farmacocinéticos tales como C_{máx} y AUC excepto cuando se alcanzan o superan las dosis más elevadas (p. Ej. 800 mg para el norfloxacin o 750 para el ciprofloxacino) debido a que se pierde la linealidad de la absorción.

2.2.8.2- DISTRIBUCIÓN:

Las fluorquinolonas son moléculas de tamaño relativamente pequeño, buena solubilidad en lípidos y una tasa de unión a proteínas plasmáticas baja (varía entre el 10% y el 50%)^{91,105,106}. Este escaso porcentaje de unión a proteínas plasmáticas que presentan la mayoría de las fluorquinolonas, junto con el bajo grado de ionización y la elevada solubilidad en agua favorecen su transporte al territorio extravascular, alcanzando concentraciones incluso superiores a las plasmáticas en muchos tejidos (mucosa bronquial, y gástrica, riñón, pulmón y líquido sinovial). Estas propiedades confieren a las fluorquinolonas una distribución amplia y rápida, con unos volúmenes de distribución (V_d) elevados, entre 1 y 3.6 L/Kg (correspondientes a unos 70-300 litros). La concentración que logran en esputo, piel, músculo, útero o saliva es superior al 50% de la plasmática, siendo sólo inferiores las concentraciones en LCR, líquido prostático, grasa y ojo. Probablemente como consecuencia de la concentración que las fluorquinolonas alcanzan en macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, en los tejidos infectados estos antibióticos se encuentran en niveles que superan los plasmáticos y los de los mismos tejidos en concentraciones normales.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las fluorquinolonas atraviesan la placenta y se concentran en líquido amniótico. Se eliminan por la leche, por lo que deben evitarse durante la lactancia.

Debido a la amplia distribución de estos antimicrobianos su farmacocinética puede estudiarse empleando un modelo bicompartimental, aunque en algunos casos particulares se ajusta mejor a un modelo tricompartmental abierto^{107,108}.

2.2.8.3- ELIMINACIÓN:

Existen diferencias notables en el grado de metabolismo hepático que sufren las fluorquinolonas: ofloxacino y sparfloxacino son prácticamente eliminados sin modificar por la orina. Sin embargo, ciprofloxacino, enoxacino, fleroxacino, lomefloxacino y norfloxacino se eliminan parcialmente por metabolismo hepático y parcialmente por riñón. En el hígado, la biotransformación ocurre fundamentalmente por reacciones de oxidación en las que intervienen enzimas del sistema citocromo P-450. Tanto los metabolitos como el fármaco sin modificar pueden encontrarse en la orina y en la bilis; algunos sufren circulación enterohepática, encontrándose en las heces en concentraciones elevadas.

Los objetivos del metabolismo hepático son los siguientes:

- el grupo ácido carboxílico que es acetilado e incluso, a veces, eliminado.
- y, sobre todo, el sustituyente del carbono 7 de la estructura base de las fluorquinolonas que suele ser un anillo piperazínico y que es oxidado, conjugado (acetilado, metilado o formilado principalmente) e incluso abierto.

Los metabolitos de las fluorquinolonas suelen tener cierta actividad antibacteriana, aunque en la mayoría de los casos ésta es muy baja y despreciable frente

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

a la actividad de la droga original, o bien la cantidad del metabolito es tan escasa que independientemente del grado de actividad que presente tampoco influyen en la de la droga madre¹⁰⁹. Hay algunas excepciones importantes como es el caso del pefloxacino, uno de cuyos metabolitos, el compuesto desmetilado, es el norfloxacino (que es un miembro de las fluorquinolonas empleado como tal en clínica), o el caso del amifloxacino cuyo metabolito piperazinil-N-demetil tiene una actividad antimicrobiana semejante a la del compuesto original^{105,110,111}.

El aclaramiento renal del norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino, enoxacino y lomefloxacino ocurre por filtración glomerular y secreción tubular activa. El 15% aproximadamente de la dosis de ciprofloxacino administrada por vía intravenosa se elimina por secreción transintestinal.

La semivida de eliminación varía, oscilando para las fluorquinolonas entre 4 y 14 horas; para el ciprofloxacino, el ofloxacino, el norfloxacino y el enoxacino es de 5-7 horas, mientras que para el pefloxacino alcanza unas 12 horas aproximadamente. Las fluorquinolonas son poco dializables. La insuficiencia renal prolonga la semivida de eliminación, siendo necesario en ocasiones reducir la dosis o ampliar el intervalo de administración.

2.2.9- ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

Las fluorquinolonas muestran actividad bactericida rápida *in vitro* y son mucho más potentes que las quinolonas no fluoradas contra *E. coli* y varias especies de *Salmonella*, *Enterobacter*, *Campylobacter* y *Neisseria* (Sanders, 1988). Las concentraciones inhibitorias mínimas de las fluorquinolonas para el 90% de estas cepas (MIC₉₀) por lo común son menores de 0.2 µg/mL (Norris y Mandell, 1988). El

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

ciprofloxacino es más activo que el norfloxacino contra *Pseudomonas aeruginosa*, enterococos y neumococos; las cifras de MIC₉₀ varían de 0.5 a 6 µg/mL. El ciprofloxacino, ofloxacino, pefloxacino y el esparfloxacino tienen actividad satisfactoria contra estafilococos, incluidas las cepas resistentes a meticilina (MIC₉₀ = 0.1 a 1 µg/mL). Las fluorquinolonas inhiben la acción de algunas bacterias intracelulares en concentraciones que se logran en el plasma; comprenden especies de *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Brucella* y *Mycobacterium* (incluida *M. tuberculosis*; Leysen y col., 1989) Ciprofloxacino, ofloxacino, fleroxacino y esparfloxacino tienen cifras de MIC₉₀ que van de 0.5 a 3 µg/mL correspondientes a *M. tortuatum*, *M. tansassi* y *M. tuberculosis*; ofloxacino y pefloxacino son activos en modelos animales de lepra (Hooper, 1995a). Sin embargo, es poca la experiencia clínica acumulada con estos microorganismos patógenos.

Casi todos los gérmenes anaerobios son resistentes a las fluorquinolonas, excepto el esparfloxacino. Puede surgir resistencia a los medicamentos durante el tratamiento, en particular, en *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, la frecuencia de selección de mutantes monofásicos espontáneos de *E. coli* que se han vuelto resistentes a las fluorquinolonas es 100 veces menor con ciprofloxacino que con ácido nalidíxico (una quinolona no fluorada)¹⁰⁴.

2.2.10- APLICACIONES TERAPÉUTICAS

La aparición de las fluorquinolonas supuso un avance importante puesto que estos antimicrobianos poseen un espectro más amplio y una farmacocinética mejorada respecto a las primeras quinolonas no fluoradas, de manera que sus aplicaciones terapéuticas son mucho más amplias.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Así, el norfloxacin se utiliza principalmente en el tratamiento de infecciones urinarias, pero sus aplicaciones se amplían a infecciones intestinales (disentería bacilar y salmonelosis), infecciones biliares, profilaxis de las diarreas de los viajeros y descontaminación intestinal en inmunodeprimidos.

Las restantes fluorquinolonas, gracias a su amplio espectro antibacteriano, gran difusión tisular (concentraciones elevadas en tejidos pulmonares, bronquial, óseo, etc.), semivida prolongada, buena absorción oral y resistencia no cruzada con otros antibióticos, pueden utilizarse para el tratamiento de un amplio número de enfermedades infecciosas, preferentemente en pacientes hospitalizados. Sus indicaciones más importantes son:

- Infecciones urinarias complicadas o no.
- Infecciones respiratorias (*H. influenza*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *P. aeruginosa*), sobre todo las causadas por bacilos gram-negativos o por microorganismos multirresistentes, además de ser especialmente útil para el tratamiento de pacientes con fibrosis quística.
- Infecciones gastrointestinales, incluyendo las causadas por *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* y *Campylobacter*.
- Infecciones ginecológicas (generalmente asociado a metronidazol por su escasa actividad frente a gérmenes anaerobios como *Bacteroides fragilis*).
- Infecciones de la piel y los tejidos blandos, en infecciones otorrinolaringológicas, oculares, biliares, en septicemias.
- Como profilaxis antibiótica en pacientes inmunodeprimidos (en pacientes neutropénicos han disminuido la incidencia de bacteriemias por bacilos gram-negativos) y en meningitis meningocócica.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

- Prostatitis.
- En enfermedades de transmisión sexual (gonorrea, chancro blando, uretritis no gonocócicas, etc.).
- Infecciones de hueso, articulaciones y tejidos blandos.
- Tratamiento de ántrax o carbunco pulmonar.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1- DISEÑO Y SELECCIÓN MOLECULAR

El diseño de nuevos fármacos por Conectividad Molecular se realiza a través de las siguientes etapas:

3.1.1) Selección del grupo farmacológico a investigar.

3.1.2) Obtención de las funciones topológicas.

3.1.3) Obtención de las funciones discriminantes.

3.1.4) Selección de los compuestos con teórica actividad antimicrobiana.

3.1.1- SELECCIÓN DEL GRUPO FARMACOLÓGICO A INVESTIGAR

Uno de los problemas actuales de la terapéutica antimicrobiana es la aparición, debida fundamentalmente al uso indiscriminado de antibióticos, de cepas resistentes de determinados microorganismos patógenos; esto unido al hecho de que la terapia antiinfecciosa debe ser rápida y eficaz, y a la aparición de hipersensibilidades y efectos secundarios, explica que hoy sea un objetivo prioritario para los investigadores el encontrar nuevas moléculas o combinaciones de ellas con actividad antimicrobiana para poder combatir las enfermedades infecciosas. Estas razones, junto a la disponibilidad de abundante información bibliográfica, así como la posibilidad de realizar los correspondientes ensayos experimentales, nos llevaron a seleccionar este grupo terapéutico.

En nuestro caso se seleccionó, dentro del grupo de los antimicrobianos, a las fluorquinolonas por ser un grupo de antibióticos que han desarrollado gran cantidad de

MATERIAL Y MÉTODOS

resistencias por distintos mecanismos debido al mal uso y abuso de éstos fuera del ámbito hospitalario.

3.1.2- OBTENCIÓN DE LAS FUNCIONES TOPOLÓGICAS

3.1.2.1- BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA DE LAS PROPIEDADES

La búsqueda bibliográfica se centró en una propiedad farmacológica propia de los antimicrobianos que es la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La **concentración mínima inhibitoria (CMI)** se define como la mínima concentración ($\mu\text{g/mL}$) capaz de inhibir el crecimiento para un grupo representativo de microorganismos. En nuestro trabajo nos centramos en el estudio de las CMI para cuatro determinados microorganismos, dos del grupo de los gram-positivos (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) y dos del grupo de los gram-negativos (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*).

3.1.2.2- OBTENCIÓN DE GRAFOS A PARTIR DEL FORMATO SMILES Y CÁLCULO DE LOS ÍNDICES TOPOLÓGICOS

El análisis de la descripción SMILES es el análisis de una cadena en la que se van identificando una serie de elementos que definen la estructura de la molécula gracias a una función. Esta función recorre la cadena SMILES y nos proporciona información relativa a los átomos y enlaces que va encontrando, así como información referente a ramificaciones y ciclos, irá obteniendo los elementos de la cadena y creando la estructura de grafo que represente a la molécula.

MATERIAL Y MÉTODOS

El proceso de creación del grafo es similar al de dibujo de la molécula partiendo del formato SMILES gracias a la similitud de nuestra estructura de datos con la estructura real de la molécula.

Una vez tenemos creado el grafo estamos en disposición de realizar el cálculo de índices.

3.1.2.3- OBTENCIÓN DE LAS FUNCIONES DE CONECTIVIDAD

Esta etapa consiste en la búsqueda de la relación estructura-actividad, es decir, el establecimiento de una correlación entre una propiedad ya sea física, química o biológica con los descriptores de la estructura molecular, en este caso, los descriptores son los **índices topológicos (IT)**.

Mediante correlación de valores experimentales de la propiedad y haciendo uso de paquetes estadísticos de correlación multilineal, en este caso mediante el programa BMDP 9R, se obtienen las funciones de regresión que describen una propiedad $P(IT)$. Dichas funciones se conocen como **funciones de conectividad**, puesto que los índices topológicos utilizados, son derivados de la matriz de conectividad, es decir:

$$P(IT) = A_0 + \sum_{i=1}^m A_i(IT) \quad (\text{Eq. 3.1})$$

donde A_0 y el conjunto de términos A_i representan los coeficientes de regresión de la ecuación obtenida e IT representa cada uno de los índices topológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las correspondientes ecuaciones de regresión se obtienen entre la propiedad a estudiar y los distintos índices de conectividad, y por cada ecuación de regresión se acompaña de una serie de parámetros estadísticos:

N = Número de moléculas empleadas en la regresión.

r = Coeficiente de correlación.

SE = Error estándar de la regresión.

Cp = Parámetro de Mallow.

F = Parámetro de Snedecor.

p = Significación estadística de la regresión.

Si se sustituyen los valores de los índices en la función de conectividad, para moléculas no utilizadas en la correlación, se puede predecir el valor teórico de la propiedad P para ese compuesto.

3.1.3- OBTENCIÓN DE LAS FUNCIONES DISCRIMINANTES^{145,146}

3.1.3.1- ANÁLISIS LINEAL DISCRIMINANTE

Mediante el **análisis lineal discriminante (ALD)** que se realiza en este caso con el programa BMDP 7M se pretende buscar una ecuación de tipo lineal capaz de clasificar los compuestos por su actividad farmacológica, en nuestro caso actividad antimicrobiana.

Para ello se selecciona un grupo amplio de compuestos y se distribuye en dos subgrupos: uno con actividad antimicrobiana contrastada (el de las fluorquinolonas) al que llamamos en nuestro estudio “grupo de moléculas activas” y otro con el mismo u

MATERIAL Y MÉTODOS

otro número de moléculas, para las que no se había descrito actividad antimicrobiana alguna, al que llamamos “grupo de moléculas inactivas”.

Se realiza la discriminación usando como variables independientes varios tipos de índices de conectividad entre los que se incluyen los índices de valencia y los índices de estado electrotopológico, siendo la propiedad a discriminar la actividad antibacteriana (medida mediante la MIC de la sustancia frente a un determinado grupo de microorganismos). Para ello se utiliza un determinado número de moléculas escogido al azar del “grupo de moléculas activas” al que llamamos “grupo de entrenamiento de compuestos con actividad antimicrobiana o activas” y un determinado número de moléculas del “grupo de moléculas inactivas” al que llamamos “grupo de entrenamiento de compuestos sin actividad antimicrobiana o inactivas”.

Las funciones discriminantes, son capaces de describir patrones de actividad farmacológica, además de patrones de “no actividad”, es decir, agrupando no solo los compuestos activos en funciones de distribución, sino que también los compuestos inactivos se agrupan en funciones de distribución mas o menos simétricas a las anteriores.

Se realizan los llamados **Diagramas de distribución farmacológica** donde se representa la expectancia de actividad, expresada como el cociente entre el número de compuestos con actividad farmacológica deseada (actividad antimicrobiana) que presenta un valor de propiedad v_i (Na_{vi}) y el número de compuestos que carecen de dicha actividad (Nn_{vi}) y presentan ese mismo valor de v_i de la propiedad, evitando la división por cero sumando al denominados la unidad, es decir:

$$E(a)_{vi} = \frac{Na_{vi}}{(Nn_{vi} + 1)} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

MATERIAL Y MÉTODOS

donde:

$E(a)_{v_i}$ = Expectancia de que un compuesto cuyo valor de la propiedad sea igual a v_i sea activo.

Na_{v_i} = Número de compuestos activos con valor de la propiedad v_i (del grupo de entrenamiento de compuestos con actividad antimicrobiana).

Nn_{v_i} = Número de compuestos no activos con valor de la propiedad v_i (del grupo de entrenamiento de compuestos que carecen de actividad antimicrobiana).

A mayor $E(a)_{v_i}$, mayor probabilidad de que el compuesto sea activo para el valor de la propiedad v_i .

De igual manera se representa:

$$E(i)_{v_i} = \frac{Nn_{v_i}}{(Na_{v_i} + 1)} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

donde:

$E(i)_{v_i}$ = expectancia de que un compuesto cuyo valor de la propiedad sea igual a v_i sea inactivo, es decir, expectancia de inactividad.

A mayor $E(i)_{v_i}$, mayor número de compuestos inactivos tienen el valor de la propiedad v_i .

Dichas funciones son patrones de similitud topológica no solo de compuestos activos sino de compuestos inactivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Si se representa $E(a)$ y $E(i)$ frente a v_i puede existir una zona donde exista solapamiento entre ambas curvas. En ella existen conjuntamente compuestos activos e inactivos en distinta proporción según sea la relación:

$$\frac{E_{(a)v_i}}{E_{(i)v_i}} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Para comprobar la efectividad de las funciones discriminantes se utiliza un “grupo test de compuestos con actividad antimicrobiana” y un “grupo test de compuestos que carecen de dicha actividad”. Con dichos grupos se construyen las funciones de distribución de actividad y de no actividad; si dichas funciones se superponen con las de entrenamiento, se da por válida la correspondiente función discriminante.

3.1.3.2- PATRONES DE ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

En numerosos grupos terapéuticos, la actividad farmacológica puede ser descrita por lo que se denomina “**patrón topológico de actividad**”, de tal manera que los compuestos activos pueden agruparse en una función de distribución de actividad.

Determinadas funciones de conectividad tienen la capacidad de describir dichos patrones. Estas funciones además de describir una propiedad particular, contiene la descripción estructural por la cual los compuestos activos tienen valores acotados de dicha función. Son por tanto funciones de similaridad topológica que agrupan los compuestos por su actividad.

Esto se refleja en los llamados “**diagramas de distribución de actividad**”. Para obtenerlos se representa, como en el apartado anterior, la expectativa de actividad,

MATERIAL Y MÉTODOS

expresada como el cociente entre el número de compuestos con la actividad farmacológica deseada (actividad antimicrobiana) que presentan un valor de la propiedad v_i y el número de compuestos que carecen de dicha actividad y presentan ese mismo valor v_i de la propiedad, evitando la división por cero sumando al denominador la unidad.

A mayor $E(a)_{v_i}$, mayor probabilidad de que el compuesto sea activo para el valor de la propiedad v_i . Se puede, así mismo, acotar intervalos de v_i para los que la probabilidad $E(a)_{v_i}$ sea máxima.

3.2- TRATAMIENTO INFORMÁTICO

Los valores de las propiedades (en este caso valores de concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de diversas moléculas de fluorquinolonas frente a distintos grupos de microorganismos) obtenidos a partir de la revisión bibliográfica realizada se regresionan frente a los índices de Conectividad de Kier y Hall, a fin de obtener las Funciones de Conectividad de cada una de las propiedades estudiadas.

El tratamiento informático de toda esta serie de datos precisa de una infraestructura o “hardware” para ejecutar los programas informáticos o “software”.

3.2.1- OBTENCIÓN DE LOS INDICES DE CONECTIVIDAD

El cálculo de los índices de conectividad se realizó con ayuda del programa Molconn-Z versión 3.0.

3.2.1.1- DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA MOLCONN-Z

El programa Molconn-Z está diseñado para realizar el cálculo de una amplia gama de índices topológicos de una estructura molecular. Estas variables de la estructura molecular incluyen, entre otros, los índices de conectividad chi, ${}^m\chi_t$ y ${}^m\chi_t^v$; los índices de forma kappa, ${}^m\kappa$ y ${}^m\kappa_a$; los índices de estado electrotopológico, T_i ; los índices de estado electrotopológico de hidrógeno, HES_i; índices tipo de átomo de estado electrotopológico e índices tipo de enlace de estado electrotopológico, índices de equivalencia topológica e índice topológico total; alguna información de otros índices como los índices de Shannon y los de Bonchev-Trinajstić, conteniendo fragmentos de grafo, de átomos, de tipo de átomos, de tipo de enlace, etc.,

MATERIAL Y MÉTODOS

Estos índices se han utilizado extensamente en análisis QSAR y otros tipos de relaciones entre la estructura de las moléculas y sus propiedades.

Hay varias opciones disponibles para la entrada de información de la estructura molecular en el programa Molconn-Z. La versión utilizada del programa Molconn-Z está preparado para el uso del formato SMILES que es el utilizado en el presente estudio. También existen formatos de datos disponibles en el programa Molconn-Z para el caso de que se tengan bases de datos comerciales y sistemas de entrada de datos comúnmente usados, incluyendo aquellos en que la base de datos esté realizada con el programa ChemDesign e incluso con el ChemDraw como es nuestro caso. Incluso en el caso de no poseer alguno de estos formatos de entrada de datos o no poder hacer uso del formato SMILES, el programa Molconn-Z tiene su propio formato Connection Table.

Además de poseer formas flexibles de entrada de datos, el programa Molconn-Z también los posee para la salida de información. Hay un listado de ficheros de salida estándar (.L) cuyo contenido se puede seleccionar en un menú. Hay también un fichero de salida estándar de los índices calculados que se pueden utilizar en análisis estadísticos. Este fichero de índices de salida (llamado fichero .S) puede ser usado directamente como el fichero de entrada en paquetes estadísticos estándar.

El usuario puede seleccionar qué registros quiere incluir en los ficheros .S. Esta opción se obtiene seleccionando un submenú desde el menú principal. Los índices tipo de enlace de estado electrotopológico tienen un fichero de salida especial llamado .E. Existe una opción del MENU para el cálculo de los índices tipo de enlace que son activados como respuesta al ejecutar los archivos .E.

MATERIAL Y MÉTODOS

El flujo general de información del Molconn-Z se describe de forma abreviada en el siguiente organigrama (Figura 3.1):

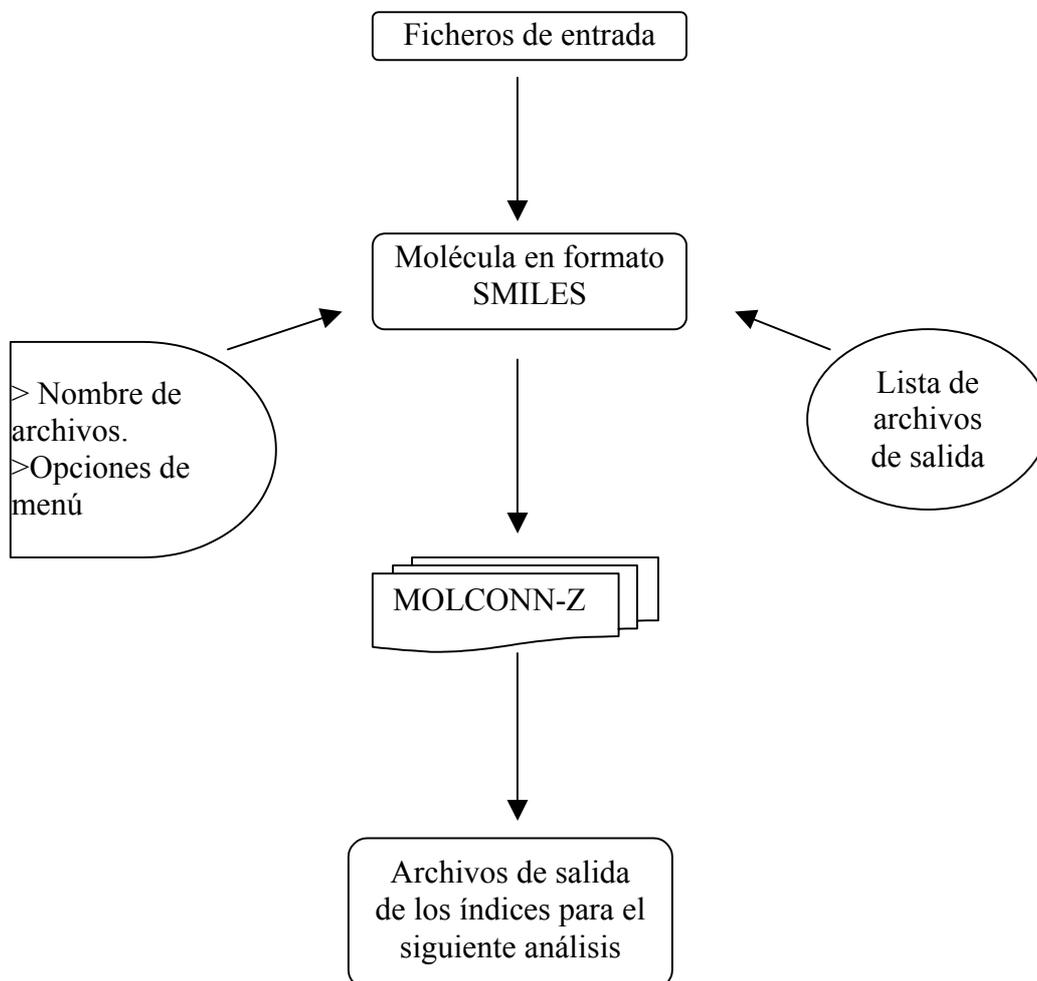


Figura 3.1.- Organigrama general del programa Molconn-Z

En general, el usuario crea los formatos de la molécula, bien formato vectores de conexión, formato .mol, o formato SMILES, mediante el uso de paquetes comerciales o, quizá, simplemente lo hace con un archivo de texto editado (ASCII). Bien los formatos son incluidos en el archivo o bien los nombres de los archivos que contienen esos formatos. Este fichero se llama fichero .B en este programa.

3.2.2- OBTENCIÓN DE LAS FUNCIONES DE CONECTIVIDAD Y ANÁLISIS LINEAL DISCRIMINANTE

Las funciones de conectividad se obtienen empleando un programa incluido en un paquete estadístico informático denominado BMDP (Biomedical Computer Program) creado bajo la dirección de W.J. Dixon de la Universidad de California en 1982, en lenguaje FORTRAN¹⁴⁷.

La primera edición del manual de programas BMDP data del año 1961, pero fue en 1968 cuando se modificó el lenguaje de los programas BMDP utilizando uno más sencillo y de empleo más flexible que dio lugar a dichos programas tal y como los conocemos en la actualidad.

Cada uno de los programas BMDP se identifica por un código de tres dígitos:

-el primero de ellos es la letra P (correspondiente a Programa).

-el segundo es un número del 1 al 9 que se le asigna a cada programa en función del orden de creación de los mismos, aunque este número en algunos casos no aparece.

-el tercero es una letra que describe el tipo de programa y que puede ser:

- D : descripción de los datos.
- F : tablas de frecuencia.
- R : análisis de regresión.
- V : análisis de varianza.
- M : análisis multivariante.
- L : tablas de vida y análisis de supervivencia.
- S : mezcla de distintos programas.
- T : series de tiempo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muchos programas están incluidos en dos de los grupos anteriores. Son programas que están en continua revisión, introduciéndose constantes cambios y mejoras.

3.2.2.1- PROGRAMAS BMDP

El significado de los datos del análisis varía según el tipo de programa y el nivel estadístico que se desea obtener. Así, cada programa BMDP presenta una capacidad analítica diferente así como la descripción de datos, graficas y análisis de regresión, el programa P9R o P7M son dos ejemplos de ellos, aunque como se verá a continuación todos ellos tienen unas características comunes:

A) Datos

Se denominan también variables y son códigos que representan características, en este caso son valores de las medidas (propiedad e índice). Cada caso presenta valores para todas las variables del mismo que, en nuestro caso, son moléculas.

Se llaman **valores perdidos** a algunos valores de un caso (conjunto formado por moléculas, propiedad, índices) que no se registra o bien se dejan en blanco o se registran con un código especial. Se denomina **valor aceptable** a aquel que está aceptado dentro del rango fijado, es decir, aquel que no es valor perdido ni está fuera del intervalo. Cuando todos los valores de un caso son valores aceptables el caso recibe el nombre de **caso completo**.

Estos programas incluyen los casos en el análisis de acuerdo con tres criterios:

1-Se incluyeron todos los casos.

MATERIAL Y MÉTODOS

2-Los casos se incluyen solamente si tienen valores aceptables para todas las variables específicas en el análisis.

3-Sólo se incluyen los casos completos.

Es posible también emplear transformaciones matemáticas de una o más variables a fin de modificar sus valores. Estas funciones llamadas transformaciones pueden ser operaciones algebraicas, aritméticas, funciones trigonométricas, etc.

En la práctica nos encontramos con algunas variables que son combinación lineal del resto, lo que nos obliga a excluirlas de los cálculos.

B) Variables estadísticas

La mayoría de los programas calculan variables estadísticas como la media, desviación estándar y frecuencia además de otras variables.

Si $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ son los valores aceptables de una variable y N es el tamaño de la muestra, entonces podemos definir las siguientes variables estadísticas :

- -media (\bar{X}) : $\bar{X} = \frac{\sum X_j}{N}$ (Eq. 3.5)

- -desviación estándar (S) : $S = \sqrt{\frac{\sum (X_j - \bar{X})^2}{N}}$ (Eq. 3.6)

- -varianza (S^2) : $S^2 = \frac{\sum (X_j - \bar{X})^2}{N}$ (Eq. 3.7)

- -error estadístico o error tipo : $\frac{S}{\sqrt{N}}$ (Eq. 3.8)

- -coeficiente de variación (CV) : $CV = \frac{S}{\bar{X}}$ (Eq. 3.9)

MATERIAL Y MÉTODOS

cuando el coeficiente de variación adopta valores muy bajos se produce una disminución en la seguridad de los cálculos, debido a que disminuye la probabilidad de que el número pueda expresarse internamente en el computador.

- -parámetro de Skewness (g_1):
$$g_1 = \frac{\sum (x_j - \bar{x})^3}{(NS^3)} \quad (\text{Eq. 3.10})$$

muchos análisis requieren que la distribución de los datos sea simétrica. Este parámetro refleja la simetría de la distribución de forma que ésta será tanto más simétrica cuanto más se acerque a cero el valor de g_1 . Si g_1 tiene un valor positivo la distribución está desviada hacia la derecha mientras que si éste es negativo el desplazamiento será hacia la izquierda.

- -parámetro de Kurtosis (g_2):
$$g_2 = \frac{\sum (x_j - \bar{x})^4}{(NS^4) - 3} \quad (\text{Eq. 3.11})$$

el parámetro de Kurtosis es una medida de la longitud de la distribución de tal manera que un valor muy elevado de g_2 supone una distribución muy dispersa.

- -covarianza:
$$COV(x, y) = \frac{\sum (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y})}{N - 1} \quad (\text{Eq. 3.12})$$

- -coeficiente de correlación (r):
$$r = \frac{COV(x, y)}{S_x S_y} = \frac{\sum (x_j - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_j - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{Eq. 3.13})$$

el coeficiente de correlación múltiple r es el mejor indicador de la correlación que se puede obtener entre cualquier variable y una combinación lineal del resto de las mismas. El coeficiente indica la correlación existente entre la primera variable y los valores obtenidos a partir de la ecuación calculada con el resto de las variables.

El término r^2 mide la proporción de la varianza de la primera variable respecto del resto de las mismas.

C) Representaciones e histogramas

Sirven para resolver dudas como pueden ser comprobar la normalidad de una distribución a simple vista, tanto para el caso de los datos como para los residuales (diferencia entre los valores observados y los valores predichos).

D) Seguridad en el cálculo

El programa representa cada número por una secuencia binaria de seguridad limitada. Esta representación puede originar una pérdida de seguridad en ciertos cálculos (como en el caso de la inversión de una matriz), que puede ser importante cuando las variables presentan un coeficiente de variación pequeño o una correlación múltiple con el resto de las variables. En la práctica debemos excluir aquellas variables que sean combinación lineal del resto.

3.2.2.1.1- PROGRAMA P9R

El fundamento del programa es el algoritmo de FURNIVAL-WILSON, el cual haciendo series de variables, las identifica de modo adecuado, mientras calcula una pequeña parte de las ecuaciones de regresión. Permite obtener las ecuaciones de regresión para las mejores series de variables (desde el punto de vista estadístico).

Para definir y seleccionar las mejores correlaciones el programa dispone de tres criterios r^2 , r^2 ajustado y C_p de Mallows. El primero de ellos identifica la mejor ecuación dentro de todas aquellas con igual número de variables, mientras que si se elige algunos de los otros dos la selección se realiza sin tener en cuenta el número de variables.

MATERIAL Y MÉTODOS

Una correlación será tanto mejor cuanto más se aproximen a la unidad los dos primeros y cuanto menor sea el tercero.

a) r^2 (cuadrado del coeficiente de correlación múltiple) se define como el cuadrado de la correlación entre la variable dependiente y el valor predicho. La correlación es mejor cuanto mas se acerca a 1 este valor. Cuando se elige este criterio la mejor correlación será aquella que presente un mayor valor de r^2 .

b) r^2 **ajustado** se representa como:
$$r^2 - \frac{p(1-r)}{(N-p')} \quad (\text{Eq. 3.14})$$

donde N es el número de casos, y p' es el número de variables independientes (p cuando la ordenada en el origen es cero y p+1 cuando esta sea distinta de cero). En este caso la mejor correlación corresponde a la que presente un mayor valor de r^2 ajustado.

c) C_p **de Mallow** se define como :
$$C_p = \frac{RSS}{S^2 - (N - 2p')} \quad (\text{Eq. 3.15})$$

siendo RSS la suma residual de cuadrados de las variables independientes seleccionadas y S^2 el cuadrado de la media residual obtenida en la regresión con todas las variables independientes. La mejor correlación se define como aquella cuyo valor de C_p de Mallow es menor.

La función estadística **F de Snedecor** es un test de significación del coeficiente de correlación, esto es, la significación global de la ecuación de regresión obtenida. La función F se define como:

$$F = \frac{N - m - 1}{m} \frac{r^2}{1 - r^2} \quad (\text{Eq. 3.16})$$

Para los coeficientes de cada variable de la ecuación obtenida se calculan sus intervalos de confianza con ayuda de la **t de Student** y las tablas estadísticas

MATERIAL Y MÉTODOS

correspondientes. La t de Student se define como el cociente de un término dividido por su desviación estándar:

$$t = A_i / S_{A_i} \quad (\text{Eq. 3.17})$$

siendo A_i el coeficiente del término x_i , y S_{A_i} la desviación estándar de dicho término.

A) Pasos que constituyen este programa

1-Control o interpretación de las instrucciones específicas del programa P9R.

La mayoría de las opciones se encuentran predeterminadas.

2-El programa proporciona datos de los cinco primeros casos utilizados en los cálculos. Si se quieren relacionar mayor número de casos se debe indicar en el paso anterior. La opción predeterminada hace que se impriman sólo los datos empleados en los cálculos, pero éste se puede modificar de forma que se impriman todos los datos.

3-En los cálculos sólo se utilizan los casos completos, es decir, aquellos que no presentan valores perdidos o fuera de rango. Las variables dependiente e independiente sólo se calculan para valores aceptables.

4-El programa calcula para cada una de las variables de los casos completos los siguientes parámetros estadísticos: media, desviación estándar, menor y mayor valor observado (siempre dentro del rango fijado), menor y mayor error estadístico, coeficiente de variación y los parámetros de Skewness y de Kurtosis.

5-Una vez introducidos los datos en el ordenador, el programa calcula todas las regresiones entre la variable dependiente (propiedad objeto de estudio) y las distintas variables independientes (índices de conectividad de las moléculas pertenecientes al

MATERIAL Y MÉTODOS

grupo objeto de estudio, en este caso fluorquinolonas). En primer lugar se efectúan todas las correlaciones simples que originan funciones de conectividad en las que la propiedad objeto de estudio depende de una única variable dependiente. A continuación se realizan las regresiones múltiples entre la variable dependiente y cada una de las posibles combinaciones de los índices calculados, tomados de 2 en 2. Seguidamente, todas las regresiones entre la variable dependiente y cada una de las posibles combinaciones de los índices tomados de 3 en 3. El proceso continúa de forma análoga, realizando combinaciones de los índices en grupos de 4,5,6,etc. hasta el número máximo de variables dependientes.

De todas las regresiones efectuadas el programa selecciona las cinco mejores (cinco es un valor preestablecido que puede modificarse) para cada número de variables independientes, esto es, las cinco mejores regresiones con una variable independiente, las cinco mejores con dos, las cinco mejores con tres, etc. Todo esto, como se ha dicho antes, lo hace en función de r^2 , r^2 ajustado y C_p de Mallow.

6-Una vez seleccionada la mejor función de conectividad se realiza un análisis estadístico de la misma que incluye los siguientes parámetros: r^2 , r^2 ajustado, C_p de Mallow, la desviación estándar y la función F de Snedecor (que es una prueba de la significación del coeficiente de correlación).

7-Por último, el programa realiza un estudio de la linealidad de las variables independientes, para poder descartar aquellas regresiones en las que aparezca dependencia lineal entre algunas de las variables independientes. Las variables independientes presentarán dependencia lineal entre ellas cuando el coeficiente que calcula el programa sea superior a 0.900 en valor absoluto.

B) Métodos de selección de variables

La elección de variables independientes para las diferentes correlaciones se puede realizar por varios métodos, uno de ellos consiste en seleccionar un número grande de las mismas e ir eliminando aquellas que aparecen como claramente superfluas respecto de la variable dependiente. Después se selecciona otro grupo de variables independientes para poder eliminar otras. El proceso se podrá repetir tantas veces como sea necesario. El número de variables que se elige cada vez, así como el criterio de selección de las mismas depende mucho de lo avanzado que se encuentre el proceso de selección de dichas variables.

Para cualquier selección final de las variables, todos los errores estándar de los coeficientes deben ser altamente significativos tanto desde el punto de vista estadístico como práctico.

El problema de la selección de variables independientes se hace más complicado al aumentar el número de variables irrelevantes. La inclusión de tales variables origina artefactos matemáticos que dan lugar a valores falsamente aumentados de los errores estándar, de r^2 y de r^2 ajustado y valores falsamente pequeños de C_p de Mallows, es decir, parámetros estadísticos óptimos pero falseados para la regresión realizada. Sin embargo, se le puede solicitar al programa que realice un listado de los residuales o bien su representación gráfica para compararlos con los de ecuaciones cuyos parámetros estadísticos no estén falseados para facilitar así el proceso de selección.

Como norma general práctica, un número reducido de variables independientes probablemente proporciona los mejores resultados frente a una

MATERIAL Y MÉTODOS

validación cruzada (aplicación de los coeficientes de regresión obtenidos a nuevos datos).

3.2.2.1.2- PROGRAMA P7M

Existen propiedades que no están cuantificadas, son aquellas, por ejemplo, que poseen un valor positivo o negativo de un parámetro o propiedad determinada. Éste es el caso de describir la actividad antimicrobiana como positiva o negativa para un determinado grupo de compuestos.

En estos casos los programas P9R no se pueden aplicar y sí el análisis discriminante P7M. Este programa es capaz de discriminar entre dos o mas grupos de poblaciones de datos. Dicha discriminación se ejecuta con la ecuación discriminante de la que forman parte distintas variables independientes. La selección para la entrada de variables en la ecuación se hace por etapas.

La primera etapa calcula los parámetros estadísticos F de cada variable y selecciona aquella que da un valor mas alto de F y fuera del intervalo prefijado para la exclusión.

El proceso se repite adicionando otras variables a la ecuación hasta que ninguna de las restantes supera la barrera estadística impuesta.

Las variables empleadas en los cálculos de las funciones de clasificación lineal se eligen paso a paso, pero también es posible realizar una selección previa o posterior de las mismas. En cada etapa se introduce en la función discriminante la variable que mejor diferencia a los grupos, o bien se elimina aquella que menos los diferencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

El programa evalúa en número de casos correctamente clasificados en cada grupo y permite realizar una validación de Jacknife para reducir las posibles desviaciones en la clasificación de los grupos.

El resultado final en cada paso incluye parámetros tales como la F estadística para las variables elegidas, la lambda de Wilks, o U estadística (con una F estadística aproximada), D^2 de Mahalanobis para las medias de los grupos, las funciones de clasificación, la matriz de clasificación, la clasificación de Jacknife, los porcentajes de clasificación correctos, las probabilidades posteriores y las distancias de Mahalanobis para cada paso dentro de cada grupo.

El programa P7M emplea sólo los casos completos en los cálculos, lo cual significa que si una variable presenta algún valor perdido o fuera de rango se le excluye de todos ellos. Dentro de los cálculos realizados se incluyen las medias, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación de todas las variables en cada grupo y para todos los grupos.

La desviación estándar dentro de cada grupo se calcula según la siguiente expresión:

$$\left\{ \frac{\sum (N_k - 1) S_k^2}{\sum (N_k - 1)} \right\}^{1/2} \quad (\text{Eq.3.18})$$

donde S_k^2 es la varianza y la N_k el tamaño de la muestra del grupo k.

La lambda de Wilks o U estadística, es un análisis multivariable de la varianza estadística, comprueba la igualdad de las medias de grupo para la variable o variables de la función discriminante.

MATERIAL Y MÉTODOS

La F estadística aproximada es una transformación de la lambda de Wilks que se puede comparar con la F de distribución.

La matriz de F que está formada por valores de F calculados a partir de D^2 estadística de Mahalanobis, prueba la igualdad de las medias de grupo para cada par de grupos, sólo para las variables integrantes de la función discriminante.

Las funciones de clasificación que permiten asignar cada caso a su grupo correspondiente lo hacen de acuerdo con la función de clasificación de mayor valor.

En la matriz de clasificación, cada observación se incluye dentro de un grupo, de acuerdo con la función discriminante, indicando el número de casos incluidos dentro de cada grupo, así como el porcentaje de clasificación correcta para todos los datos analizados.

Se obtiene con todo una tabla resumen que tiene una línea para cada etapa y que incluye la F inicial o modificada para la variable, la lambda de Wilks y la F estadística aproximada. Para cada caso se calcula la D de Mahalanobis con referencia a la media del grupo.

Con todo ello podemos realizar estudios de validación de ejemplos escogidos al azar, así como la clasificación de nuevos casos. Es posible incluso realizar un cálculo de la función de clasificación para un subgrupo del conjunto inicial. El programa entonces usa estas funciones para clasificar el dato en el grupo o grupos que quedan. Así, un nuevo grupo de datos pueden clasificarse usando derivadas de los grupos originales.

Esta característica del programa también permite trabajos de validación de la función discriminante, para evaluar la bondad y calidad del ajuste, pudiéndose

MATERIAL Y MÉTODOS

subdividir al azar los casos en cada grupo dentro de dos grupos separados, el primer grupo se usa para estimar la función de clasificación y el segundo grupo se clasifica de acuerdo con la función. Este segundo grupo de moléculas que no ha sido utilizado previamente es al que llamamos grupo de moléculas TEST para diferenciarlo del grupo de moléculas PRUEBA que son las utilizadas para la determinación de la función de conectividad molecular o función de clasificación. Observando el porcentaje de clasificación correcta para el segundo grupo, se tiene una medida empírica del éxito de la discriminación.

3.2.3- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD ESTADÍSTICA DE LA FUNCIÓN DE CONECTIVIDAD SELECCIONADA

Los parámetros estadísticos que se obtienen al realizar un análisis de regresión multilínea dependen de los datos específicos incluidos en la serie, moléculas que intervienen en la misma e intervalo de valores de la propiedad que define el espacio en el que la regresión se lleva a cabo.

Para el estudio de la estabilidad estadística de la ecuación (también llamado validación cruzada) se emplea el método de Jackknife^{148,149}. Éste consiste en eliminar un número de observaciones, n , a través de un proceso al azar y ejecutar el programa BMDP 9R. En primer lugar se ha de determinar la cantidad de casos a eliminar, la bibliografía citada recomienda que dicha cantidad de casos no sea superior al 10-15% del número total de casos. Posteriormente se fija el número de veces que se repetirá el proceso, que se recomienda sea igual al número total de casos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todo el proceso ha de cumplir unas condiciones determinadas: se debe eliminar al menos una vez cada caso y, en el caso de eliminaciones múltiples no se debe eliminar el mismo caso más de cuatro veces en el conjunto total.

Los valores del coeficiente de correlación, de las desviaciones estándar y de los residuales obtenidos al ejecutar el programa BMDP 9R con las sucesivas eliminaciones se comparan con los de la ecuación seleccionada.

La función de conectividad será estable si la eliminación aleatoria de las observaciones no produce modificaciones significativas en los valores del coeficiente de correlación, de las desviaciones estándar y de los residuales respecto de la ecuación seleccionada.

3.2.4- DIAGRAMAS DE DISTRIBUCIÓN FARMACOLÓGICA

Los diagramas de distribución farmacológica son representaciones en forma de histogramas que nos dan una mayor perspectiva de la eficacia de una función de conectividad. Además estos diagramas nos permiten visualizar las funciones de regresión lineal que pueden actuar como funciones limitantes, así como los intervalos de las mismas en los que se pueden definir zonas de actividad farmacológica.

Llamamos propiedades limitantes a aquellas propiedades cuyas funciones de conectividad pueden emplearse como funciones de clasificación.

Un diagrama de distribución farmacológica es un diagrama de distribución de frecuencias de una variable dependiente, en cuya ordenada representamos las expectativas de esta variable para cada intervalo. Cuando el diagrama se realiza para una función de conectividad de una propiedad limitante, la expectativa de actividad, E_a ,

MATERIAL Y MÉTODOS

adquiere la forma de una distribución normal y además la expectación de inactividad, E_i , tiende a cero bajo dicha curva. Dicho de otra forma, el solapamiento tiende a ser mínimo.

La principal ventaja de estos diagramas es que permiten determinar visualmente aquellos intervalos de la propiedad en los que la probabilidad de encontrar nuevos compuestos activos sea máxima frente a la probabilidad de dar con un falso positivo.

En este trabajo se realiza la representación de estos diagramas frente a la propiedad estudiada, tratando de encontrar aquella que pueda actuar como propiedad limitante. Para ello se construye primero una tabla en la que se calcula tanto la expectación de actividad como la de inactividad en cada uno de los intervalos en los que se define la función de conectividad.

3.2.5- SELECCIÓN DE LA ECUACIÓN DISCRIMINANTE Y DE LAS PROPIEDADES LIMITANTES

Llamamos ecuación discriminante a la combinación lineal de funciones de conectividad que mejor predice la pertenencia de cada uno de los datos a una u otra población de los mismos. Es decir, aquella ecuación que mejor clasifica los compuestos en activos o inactivos.

Además de obtener la ecuación discriminante, se realiza también la representación de su diagrama de distribución farmacológica para observar en que intervalo de valores el solapamiento es mínimo entre ambos grupos de moléculas.

MATERIAL Y MÉTODOS

De todas las funciones de conectividad seleccionadas (una para cada grupo de microorganismos) se ha realizado la representación de su diagrama de distribución para poder seleccionar aquellas que pueden actuar como propiedades limitantes. De todas las propiedades limitantes seleccionadas escogeremos la combinación de las mismas que, junto con la ecuación discriminante actúen como filtros para definir de manera más exacta posible el carácter activo o inactivo de los compuestos.

3.2.6- EXTRAPOLACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El grupo de moléculas objeto de estudio, las fluorquinolonas, constituye desde el punto de vista de su estructura química un grupo muy homogéneo de moléculas.

En el presente trabajo se intenta extrapolar los resultados obtenidos con ellas a moléculas cuya estructura química posea determinados fragmentos moleculares o grupos de átomos similares a los de las fluorquinolonas.

Para ello se aplica la ecuación discriminante obtenida así como las propiedades limitantes a un muy amplio grupo de moléculas que no posean actividad antimicrobiana y cuya estructura no corresponda con la de las fluorquinolonas aunque si contenga determinados radicales o grupos moleculares en común en su estructura

Así, aplicando la ecuación discriminante y las funciones limitantes a bases de datos comerciales de estructuras químicas sin actividad antimicrobiana referenciada, se seleccionan las moléculas a ensayar.

3.3- ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

Con los productos seleccionados como teóricos antimicrobianos se realizan los correspondientes ensayos microbiológicos para determinar y así poder confirmar su actividad antimicrobiana frente a una serie de microorganismos (concretamente cuatro).

En el siguiente esquema se detalla el procedimiento:

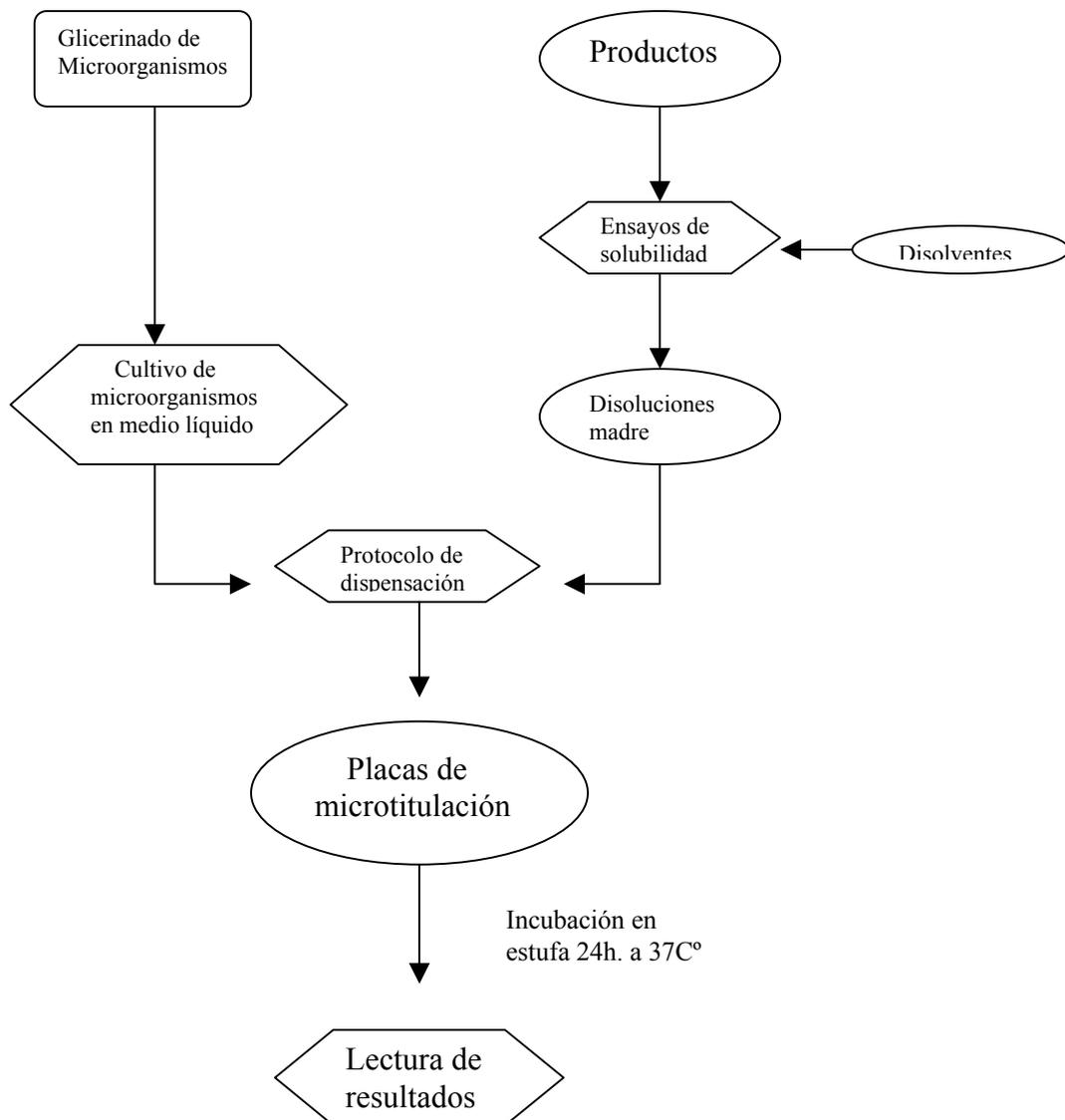


Fig. 3.2.- Procedimiento de trabajo de los ensayos microbiológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1- MATERIAL Y REACTIVOS

a) *Materiales empleados para la preparación de las disoluciones de los productos.*

- Balanza de precisión METTLER H31.
- Baño de ultrasonidos P- SELECTA ULTRASONOS-H.
- Viales estériles de 20 mL.
- Lámpara ultravioleta estéril P- SELECTA.
- Pipeta aforada de 5 mL BRAND.
- Espátula de metal.
- Agua estéril.
- Micropipetas NICHIRYO NICHIPET: 100-1000 μL , 1000-5000 μL .
- Dimetilsulfóxido
- Tween 80
- Polietilenglicol 400

b) *Material empleado en la realización de los ensayos microbiológicos.*

- Medio de cultivo líquido Caldo TSB (Trypticase-Soja).
- 5 placas microtiter estériles de 96 pocillos con tapa.
- Agua estéril.
- Liófilos de diferentes cepas de microorganismos.
- Tubos para siembra en medio líquido.
- Chupete de goma.
- Estufa de cultivo a 37 °C.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Estándar Mc Farland.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Mechero Bunsen.
- Puntas estériles de 100 μL .
- Micropipetas 10-100 μL SOCOREX y de 1000-5000 μL .
- Pipeta multicanal TRANSFERPETTE-8 BRAND.
- Nevera.

3.3.2- PREPARACION DE LOS PRODUCTOS Y ENSAYO DE SOLUBILIDAD

Las disoluciones de los productos se preparan pesando una determinada cantidad de cada uno de ellos en la balanza de precisión y posteriormente se les añade un volumen determinado de disolvente para lograr la disolución madre de éstos así como de los productos de referencia. La concentración de las disoluciones madre es distinta dependiendo del producto (2000 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$).

Se utilizaron varios disolventes con la finalidad de obtener una mejor disolución de los productos a ensayar. Dichos disolventes fueron previamente ensayados comprobando que no inhibían el crecimiento de los microorganismos que posteriormente se utilizarán en el ensayo microbiológico.

Los disolventes empleados en este trabajo son:

- agua estéril
- mezcla de dimetilsulfóxido y agua estéril en una proporción 1:4
- mezcla de Tween 80, polietilenglicol y agua estéril en proporción 1:1:8.

El disolvente se añade en cantidad suficiente para obtener la concentración final requerida para cada uno de los productos así como de los dos productos utilizados

MATERIAL Y MÉTODOS

como referencia. Una vez añadido el disolvente se agita el vial que contiene el producto y el disolvente y se lleva a un baño de ultrasonidos termostataado a 37 °C durante 15-30 minutos con el fin de facilitar el proceso de disolución.

3.3.3- CEPAS DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos seleccionados para realizar los ensayos microbiológicos pretenden cubrir un amplio espectro bacteriano, incluyendo los microorganismos habitualmente recomendados para la realización de ensayos de susceptibilidad a antibacterianos.

Las cepas de estos microorganismos fueron proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) dependiente del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

A continuación se realiza una descripción de las cepas de microorganismos utilizadas distinguiéndolas en dos grupos: microorganismos gram-positivos y gram-negativos.

-GRAM-POSITIVOS:

- ***Staphylococcus aureus*. CECT 240 (ATCC [American Type Culture Collection] 6538P):** Son cocos de 0.5 a 1.5 µm de diámetro, no esporulados ni capsulados, inmóviles, catalasa y coagulasa positivos que fermentan la glucosa, hemolizan la sangre y son aerobios / anaerobios facultativos. Son poco exigentes nutricionalmente y presentan resistencia al medio ambiente. Aparecen agrupados en masa o en racimos, aunque en ocasiones también se presentan como elementos únicos, en pares, en

MATERIAL Y MÉTODOS

tétradas o en cadenas cortas de tres o cuatro células. Esta especie se considera patógena o potencialmente patógena para el ser humano produciendo principalmente infecciones de la piel y mucosas (carbunco, impétigo), como el síndrome de la piel escaldada producido por la toxina exfoliativa, el síndrome del shock tóxico, intoxicaciones alimentarias por enterotoxinas preformadas en el alimento y enterocolitis estafilocócica así como infecciones viscerales localizadas (endocarditis infecciosa subaguda). Es una especie problemática por la gran cantidad de resistencias que presenta además de ser la que actualmente produce más infecciones nosocomiales.

- ***Enterococcus faecalis*. CECT 795 (ATCC 29212):** Streptococo del grupo D. Son células ovoideas y pequeñas, de menos de 2 μm , no esporuladas, inmóviles y que aparecen dispuestas en parejas o en agrupaciones cortas. No producen esporas. Catalasa negativa. Son gamma-hemolíticos (no producen hemólisis). Forman parte de la flora intestinal humana y de muchos animales de sangre caliente, por lo que son eliminados por las heces, pudiendo contaminar aguas y alimentos. Debido a su gran resistencia a la desecación, este microorganismo es utilizado como índice de contaminación fecal en aguas y alimentos congelados. Su principal consecuencia patógena son las infecciones del tracto urinario y endocarditis aguda.

MATERIAL Y MÉTODOS

-GRAM-NEGATIVOS:

- ***Escherichia coli*. CECT 405 (ATCC) 10536:** Enterobacteria patógena. Dentro de este género encontramos bacilos no esporulados, no móviles o móviles por flagelos peritricos, aerobios facultativos, lactosa positivos, oxidasa negativos con requerimientos de nutrición relativamente simples. Son habitantes casi universales de las vías intestinales de los humanos y de los animales de sangre caliente. Las cepas enteropatogénicas (ECEP) de *E. coli* que producen diarreas en lactantes y niños pequeños, se han vuelto más frecuentes en relación a las infecciones disentéricas y las fiebres generalizadas. Las cepas enterotoxigénicas (ECET) son la causa más frecuente de la “diarrea del viajero”. Estas cepas forman el antígeno K, que permite ataque y colonización del intestino delgado, y la enterotoxina responsable de los síntomas de la diarrea, también pueden ser causantes de infecciones urinarias extrahospitalaria, septicemias, colecistitis, peritonitis y meningitis en neonatos.
- ***Pseudomonas aeruginosa*. CECT 108 (ATCC) 27853:** Bacilos rectos o ligeramente curvos; tamaño de 0.5-1.0 μm por 1.5-4.0 μm , móviles por uno o múltiples flagelos polares, sin esporas, metabolismo respiratorio, nunca fermentativo (aerobio estricto), aunque puede producir pequeñas cantidades de ácido a partir de glucosa aeróbicamente, oxidasa y catalasa positivos. Esta especie es la más difundida del género. Habita en el suelo y en las aguas, apareciendo en el 10% de muestras de heces humanas. Es un patógeno oportunista capaz de infectar cualquier órgano o tejido del

MATERIAL Y MÉTODOS

cuerpo humano produciendo otitis, sinusitis, queratitis, neumonías, enterocolitis, endocarditis, infecciones del tracto urinario, meningitis, etc. Ya que se encuentra en el ambiente hospitalario y puede infectar con facilidad a pacientes que reciben tratamiento por otras enfermedades, así como en pacientes con quemaduras graves. Presenta resistencia a numerosos antibióticos.

3.3.3.1- APERTURA DE LIÓFILOS

Las cepas de microorganismos se suministraron en forma de liófilos, los cuales deben ser rehidratados y comprobar su viabilidad antes de ser empleados en los ensayos.

El procedimiento comienza quitando la etiqueta identificativa del liófilo la cual debe conservarse para una correcta identificación de las cepas durante todo el proceso. A continuación se deben etiquetar tubos, placas, etc. Seguidamente se toma agua estéril con la Pipeta Pasteur, se calienta la parte media del liófilo en la llama del mechero hasta que empiece a oscurecerse el algodón, se echa agua sobre esta zona (de la mitad del algodón hacia la parte estrecha del liófilo), con lo que el cristal se cuartea. Se devuelve la pipeta Pasteur a su envoltorio estéril. Con unas pinzas, previamente mojadas en alcohol y flameadas, se rompe con cuidado el liófilo de la mitad del algodón hacia la parte estrecha intentando evitar la entrada de aire al interior (que empujaría el algodón hacia el interior), y el liófilo así roto puede manejarse como un tubo cualquiera. Por último se deben rehidratar las células con agua o con el medio donde vayan a crecer y poner los cultivos a la temperatura, agitación, etc., adecuadas para la cepa.

3.3.3.2- VIABILIDAD DE LOS LIÓFILOS

Una vez tenemos hidratados los liófilos, el siguiente paso es comprobar la viabilidad de los mismos, realizando el cultivo de los microorganismos mediante una siembra en medio líquido (caldo TSB) y en medio sólido (TSA).

Tras realizar la siembra en ambos medios partiendo de los liófilos rehidratados, se procede a su incubación en condiciones adecuadas de temperatura durante 24 horas, al cabo de las cuales, se observa la presencia de crecimiento en ambos medios y la uniformidad de colonias aisladas en el medio sólido. Si el crecimiento es adecuado, a partir de cualquiera de los dos medios, se puede tomar una muestra para obtener el inóculo necesario para el ensayo de susceptibilidad a antimicrobianos.

3.3.3.3- GLICERINADO DE MICROORGANISMOS

El proceso de glicerinado es una técnica de conservación de cultivos que los mantiene viables durante largos periodos de tiempo y que además permite una rápida y cómoda accesibilidad a los mismos para resiembras posteriores.

En primer lugar se deben de etiquetar dos viales eppendorf por cada una de las cepas, de forma que quede perfectamente identificado el nombre del microorganismo, su número de colección, la fecha del glicerinado y la letra A o B. A partir de los cultivos puros de los microorganismos en medio líquido se dispensa a cada vial 0.8 mL junto a 0.2 mL de glicerol, agitando para obtener una mezcla homogénea. Posteriormente los viales se almacenan a -70°C para su conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para revivir los microorganismos se descongela uno de los dos eppendorf, el A o el B, se toma una alícuota del mismo y se siembra en medio líquido (TSB) o en medio sólido (TSA) y después de 24 horas de incubación se comprueba el crecimiento.

3.3.4- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana de una sustancia se puede poner de manifiesto por su capacidad de inhibir o retardar el crecimiento bacteriano de diferentes especies de microorganismos tanto en medio sólido como en medio líquido.

Esta actividad o potencia se determina por comparación de la concentración a la que inhibe el crecimiento de un microorganismo susceptible y adecuado con la concentración de una preparación patrón del antimicrobiano que produce la misma inhibición.

De los ensayos de susceptibilidad de antimicrobianos existentes se ha elegido en es presente trabajo la prueba de las diluciones progresivas.

3.3.4.1- MÉTODO DE LAS DILUCIONES PROGRESIVAS

Este método se basa en la inhibición del crecimiento del cultivo de un microorganismo en una disolución uniforme del compuesto a ensayar en un medio fluido, que en ausencia del antimicrobiano permite el rápido crecimiento del microorganismo utilizado en la valoración. De esta forma se determina la actividad o potencia de un determinado compuesto objeto de ensayo por comparación de la concentración a la cual se inhibe el crecimiento de un microorganismo susceptible y adecuado con la concentración de una preparación patrón del antimicrobiano que produce la misma inhibición.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.4.1.1) Protocolo para las placas de microtitulación

Para cada uno de los microorganismos objeto de estudio se prepara una placa de microtitulación, así determinamos la sensibilidad frente a los distintos productos y medimos la CMI correspondiente a cada uno de ellos.

Las placas de microtitulación constan de 96 pocillos con una capacidad de 200 μ L distribuidos en 8 filas (de la A a la H) con 12 columnas (de la 1 a la 12), de modo que en las columnas de la 1 a la 9 se sitúan los productos que se van a ensayar, en las columnas 10 y 11 se sitúan los productos usados como referencia, en nuestro caso el Ácido nalidíxico y la Cefalosporina C, mientras que en las filas de la A a la G contienen diluciones dobles de cada producto hasta alcanzar siete concentraciones diferentes, una por cada fila.

Al primer pocillo de cada columna se le añadió una cantidad determinada de disolución del compuesto a testar de concentración prefijada, del pocillo inicial se inocula al siguiente la misma cantidad predeterminada el cual contiene además la misma cantidad en volumen de agua estéril y así sucesivamente. Se obtiene así baterías de pocillos que contienen el mismo volumen de disoluciones cada vez más diluidas. A cada uno de los pocillos se le inocularon cantidades constantes de suspensión bacteriana, realizando un pocillo control de crecimiento de cada uno de los productos en el cual en lugar de añadirle el inóculo de suspensión bacteriana en lo que se añade es caldo estéril. Estos pocillos son lo que denominamos **control negativo**, son los pocillos de H1 a H11 y nos permiten determinar si durante el proceso de dispensación se ha producido algún tipo de contaminación por microorganismos. Estos pocillos contienen diluciones muy bajas de los productos que se están ensayando así como de los productos de referencia y caldo estéril. Así, si las disoluciones, el agua estéril o las

MATERIAL Y MÉTODOS

placas hubieran sufrido algún tipo de contaminación microbiana se observaría crecimiento en el pocillo o pocillos correspondientes. Además, también se realiza un **control positivo** para lo cual en el último pocillo de cada una de las filas de la placa de microtitulación, es decir, en la columna 12, se introduce el agua estéril utilizada para el ensayo junto con el inóculo del microorganismo para el que se esté ensayando los productos.

El protocolo para preparar las placas y el proceso de dispensación se realiza de la siguiente forma:

1. Preparar tantas placas como microorganismos se vayan a probar, en este caso cuatro, más una placa en la que se pondrán la última dilución realizada de cada uno de los productos a ensayar.
2. Añadir 50 μL en cada uno de los pocillos agua estéril, desde B1 hasta H11, es decir se le añade el agua estéril a todas las filas excepto a la primera. Además también se le añade el agua estéril al pocillo H12 que es el que nos servirá como control positivo.
3. Se adicionan 50 μL de la disolución madre (2000, 1000, 500 ó 250 $\mu\text{g/mL}$) de cada producto a ensayar en el pocillo correspondiente, del A1 al B9.
4. Se adicionan 50 μL de disolución de los productos de referencia, 500 $\mu\text{g/mL}$ para el ácido nalidíxico y 1000 $\mu\text{g/mL}$ para la cefalosporina C en los pocillos B10, B11, A10 y A11.
5. Posteriormente se mezcla bien el contenido de los pocillos de la fila B (B1 a B11) mediante la pipeta multicanal para favorecer la

MATERIAL Y MÉTODOS

homogeneidad en la concentración de los productos. Se pipetea 50 μL de producto de cada uno de los pocillos B y se añaden en cada uno de sus correspondientes pocillos C (del B1 al C1, del B2 al C2.... y así sucesivamente hasta del B11 al C11) donde se hallan ya depositados 50 μL de agua estéril. Se repite la operación consecutivamente (de la C a la D, de la D a la E....) hasta llegar a la fila H. De la fila H una vez mezclado el contenido de los pocillos se toman 50 μL y se desechan. De este modo tenemos tantas columnas de pocillos como productos a ensayar, de modo que cada pocillo de cada columna contiene la mitad de concentración de ese producto que su inmediatamente anterior y el doble de concentración que su pocillo inmediatamente posterior.

6. Se añaden 50 μL de inóculo en los pocillos A1 a G12.
7. Se añaden 50 μL de caldo estéril a los pocillos H1 a H11.

Una vez se ha completado la dispensación se procede a la incubación de la placa en estufa de cultivos a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se procede a la lectura de los resultados, obteniendo así los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada producto frente al microorganismo utilizado.

La siguiente figura 3.3 muestra un ejemplo de las distintas concentraciones resultantes tras la realización del proceso de diluciones seriadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

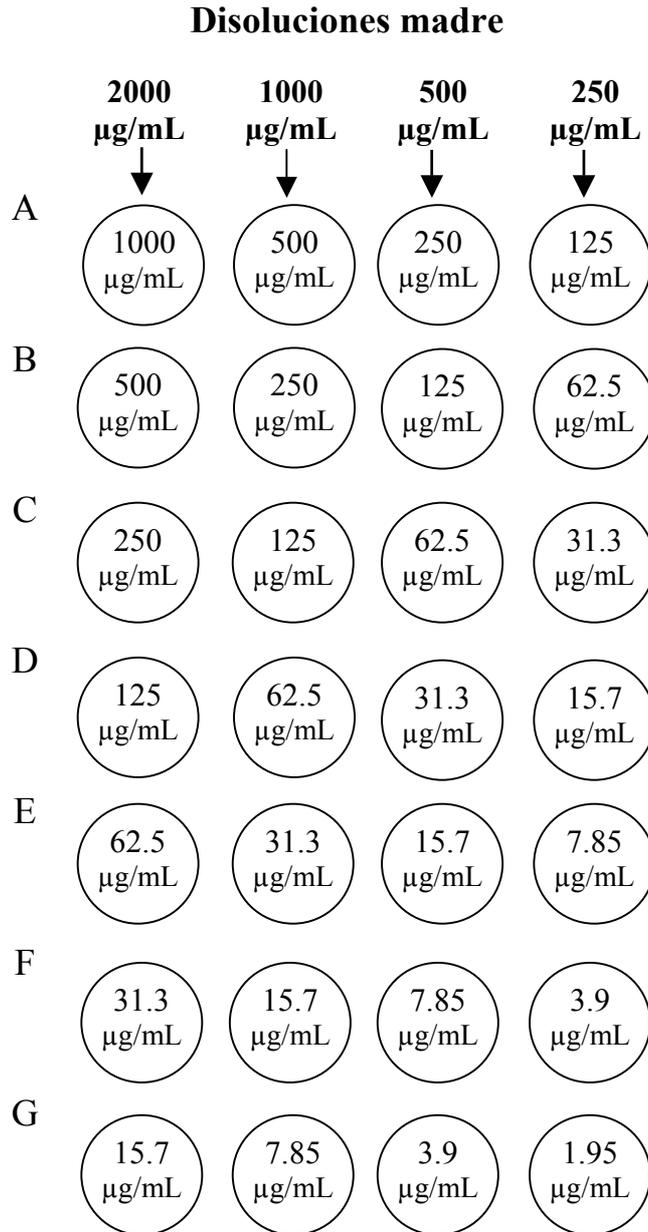


Fig. 3.3.- Concentraciones resultantes tras el proceso de diluciones seriadas.

3.4- ENSAYOS DE TOXICIDAD

Con objeto de comprobar la toxicidad de los productos que muestren actividad antibacteriana tras los correspondientes ensayos microbiológicos se realizará la determinación de la **Dosis Letal 50 (DL₅₀)**.

La determinación de la Dosis Letal 50 refleja la toxicidad aguda de un producto, al indicar la dosis que mataría al 50% de la población en estudio cuando se administra por una vía específica dicho producto. Por lo tanto, siempre se refiere a un animal de experimentación y a una vía de administración determinada¹⁵⁰.

El método seguido para la realización de los ensayos es el propuesto por Miller y Tainter¹⁵¹. Consiste en administrar dosis crecientes de los productos en estudio, partiendo de una dosis que no mata a ningún animal hasta la que los mata a todos.

3.4.1- MATERIAL Y REACTIVOS

- Cabina U.V. P-Selecta.
- Balanza de precisión Mettler H31
- Espátula de metal
- Baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons-H
- Viales estériles de 20 mL
- Micropipeta Nichiryo Nichipet: 1000-5000 µL
- Puntas estériles
- Agua estéril
- Etanol absoluto
- Tween 80

MATERIAL Y MÉTODOS

- Jeringas estériles de 1 mL Plastipak
- Mortero de cerámica
- Jaulas para ratones de laboratorio
- Ratones de laboratorio raza Swiss.

3.4.2- PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS

Los productos se deben preparar de la forma adecuada para ser administrados a los animales de experimentación. Inicialmente los productos se pesan en una balanza de precisión para posteriormente ser pulverizados en un mortero y se les añade el excipiente. El excipiente utilizado es Etanol/ Tween 80 / Agua estéril en proporción 2:2:35. Se agita el vial y se lleva a un baño de ultrasonidos durante 15 minutos.

3.4.3- PROTOCOLO DE ENSAYO

Se emplearon ratones de laboratorio no consanguíneos de la raza Swiss de pesos comprendidos entre 26 y 30 g, elegidos aleatoriamente y distribuidos en lotes de 10 animales.



Fig. 3.4.- Distribución en lotes de los ratones.

MATERIAL Y MÉTODOS

La administración de los productos se realiza siguiendo un orden aleatorio, de modo que cada ratón recibe un volumen igual de 0.25 mL por vía intraperitoneal. Las dosis administradas han seguido una progresión aritmética en la mayoría de los casos. Al lote testigo se le inyecta el excipiente utilizado para suspender los productos, comprobándose la inocuidad del mismo.

En la siguiente figura (figura 3.5) se puede observar el proceso de administración de los productos por vía intraperitoneal.



Fig. 3.5.- Administración de producto vía intraperitoneal

Tras la administración del producto los animales se observan a distintos tiempos: 1, 2, 4, 8 y 24 horas, anotando el número de animales muertos transcurridas las 24 h. Posteriormente se calcula el porcentaje de animales muertos para cada una de las dosis de un mismo producto, realizando una transformación de este valor en su probit (probabilidad de que haya respuesta para distintos niveles o dosis aplicados)¹⁵² correspondiente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con respecto al número de muertes debemos realizar una correlación adicional, ya que en ocasiones se da la circunstancia de que existe una dosis lo suficientemente alta o por el contrario lo suficientemente baja para que mueran o sobrevivan respectivamente todos los animales de experimentación, de manera que no encontramos un valor finito del probit para estos datos, por lo que debemos calcular sus valores aproximados mediante la transformación propuesta por el método de Miller y Tainter:

- Casos de 0% de muertes: $100\left(\frac{0.25}{N}\right)$, pasando a ser 2.5%

- Casos de 100% de muertes: $100\left[\frac{(N-0.25)}{N}\right]$, pasando a ser 97.5%

donde N es el número de animales del lote experimental. A estos nuevos porcentajes se les calcula su probit correspondiente, señalado en tablas¹⁵³ que relacionan el porcentaje de mortalidad con los probits.

Posteriormente se representa gráficamente el probit en ordenadas frente al logaritmo de la dosis administrada en abcisas.

La dosis correspondiente al 50% de muertes o también llamado probit 5 es la que representa la DL_{50} .

Como error de la DL_{50} se toma la desviación estándar V , definida por la siguiente expresión:

$$V = \frac{\Delta D}{\sqrt{4N}} \quad (\text{Eq. 3.19})$$

MATERIAL Y MÉTODOS

donde ΔD es la diferencia de las dosis correspondientes a los probits 6 y 4, y N es el número de ratones de un lote.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1- OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE LAS FUNCIONES DE CONECTIVIDAD

El primer paso ha consistido en la determinación de los índices de conectividad de Kier y Hall correspondientes a cada una de las moléculas con actividad antimicrobiana en estudio^(73,75,78,154,168), aplicando el tratamiento informático a las matrices topológicas obtenidas a partir de los grafos de cada una de dichas moléculas.

En el caso de los índices de conectividad de valencia, se calculan introduciendo las valencias de los heteroátomos en el lugar correspondiente a la diagonal principal de las matrices topológicas.

También se calculan los índices de estado electrotopológico para los diferentes tipos de átomos de las moléculas antimicrobianas en estudio.

Las ecuaciones de regresión o funciones de conectividad han sido obtenidas al correlacionar la propiedad objeto de estudio frente a los distintos índices de conectividad de cada molécula. Cada ecuación de regresión o función de conectividad va acompañada de una serie de datos estadísticos que se señalan a continuación:

n = número de moléculas empleadas en la regresión.

r = coeficiente de correlación.

F = F de Snedecor

CP = CP de Mallow de la ecuación de regresión.

SE = error estándar de la ecuación de regresión y de cada una de las variables.

DF = grados de libertad.

RESULTADOS

S = significación estadística de la regresión y de cada variable.

t = t de Student de cada variable.

Junto a cada ecuación de regresión se encuentra una tabla de valor observado y valor calculado por Conectividad Molecular para todas las propiedades estudiadas. Se entiende por valores observados los obtenidos para cada una de las propiedades a partir de la revisión bibliográfica, mientras que por valores calculados se entiende a los obtenidos por medio de la Conectividad Molecular para la propiedad estudiada.

Para cada ecuación, se realiza una representación gráfica de los valores de CMI de las moléculas antimicrobianas calculados mediante la función de conectividad seleccionada para cada uno de los microorganismos frente a los valores observados de cada una de ellas, así como una representación gráfica de los valores residuales para cada una de las moléculas estudiadas, en la que se ha indicado el intervalo de confianza de \pm una desviación standard.

Por último, se incluye, para cada ecuación la matriz de intercorrelación de las variables independientes empleadas en cada una de las fórmulas de conectividad..

RESULTADOS

Tabla 4.1 - Valores de los Índices de Conectividad de Kier y Hall de valencia, de no valencia y de tipo de átomo de estado electrotopológico para los antimicrobianos de referencia utilizados para la obtención de la función de conectividad correspondiente a la MIC para *Escherichia coli*.

MOLECULA	${}^4\chi$	${}^1\chi^V$	${}^4\chi_C^V$	${}^3\chi_{CH}^V$	SsNH ₂	SaaN
CONTROL POSITIVO 13	8.174	8.0667	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 15	5.9737	7.406	0	0	5.4087	0
CONTROL POSITIVO 27	7.0947	7.9773	0	0	0	4.2964
CONTROL POSITIVO 35	8.6369	8.5653	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 43	8.9193	8.6054	0	0.2887	5.878	0
CONTROL POSITIVO 82	8.7676	8.0806	0	0	5.9416	0
CONTROL POSITIVO 110	9.1122	9.2723	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 185	11.5418	10.8086	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 194	11.239	10.0309	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 233	8.9731	8.7931	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 256	9.343	10.1823	0	0.2887	5.8531	0
CONTROL POSITIVO 263	9.7192	10.2296	0.1768	0.2887	12.0461	0
CONTROL POSITIVO 310	8.5081	9.3622	0	0.2887	0	0
CONTROL POSITIVO 313	9.8418	9.3195	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 318	10.3697	10.8475	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 319	10.1448	9.77	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 324	7.3492	7.5252	0	0	5.8739	0
CONTROL POSITIVO 326	7.9697	8.7035	0.2236	0	0	0
CONTROL POSITIVO 332	7.5612	7.9148	0	0	5.896	0
CONTROL POSITIVO 335	8.7194	9.4753	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 337	8.5335	9.5051	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 339	8.4586	9.1242	0.2236	0	0	0
CONTROL POSITIVO 353	9.2365	9.8518	0	0.2887	0	0
CONTROL POSITIVO 357	9.4366	9.0896	0	0	0	0
CONTROL POSITIVO 385	7.8389	8.5766	0	0.2887	5.9191	0

RESULTADOS

Tabla 4.2 - Valores de los Índices de Conectividad de Kier y Hall de valencia, de no valencia y de tipo de átomo de estado electrotopológico para los antimicrobianos de referencia utilizados para la obtención de las función de conectividad correspondiente a la MIC para *Pseudomonas aeruginosa*.

MOLECULA	$^3\chi$	$^4\chi$	$^2\chi^V$	$^4\chi^V$	SsCH ₃	SdO
CONTROL POSITIVO 34	9.5637	8.3373	6.2166	3.3964	1.6928	23.5436
CONTROL POSITIVO 77	9.14	8.104	5.875	3.1587	1.6843	23.4587
CONTROL POSITIVO 86	10.2862	9.1107	7.641	3.9907	2.0118	23.9371
CONTROL POSITIVO 129	11.0902	9.3071	8.327	4.0778	3.3879	24.2164
CONTROL POSITIVO 140	9.7155	8.7231	7.081	3.653	0	23.8061
CONTROL POSITIVO 188	9.4739	8.4932	7.1054	3.8395	0	23.8817
CONTROL POSITIVO 230	10.2811	8.8214	6.4404	3.437	0	24.1347
CONTROL POSITIVO 246	10.045	8.7869	7.2422	3.6797	3.4763	24.1733
CONTROL POSITIVO 268	10.7637	9.3394	7.6193	4.009	0	24.1023
CONTROL POSITIVO 270	9.7155	8.7231	7.4523	4.0097	4.1225	24.257
CONTROL POSITIVO 273	9.3884	8.4116	6.7505	3.6612	1.9606	24.1519
CONTROL POSITIVO 274	9.3884	8.4116	7.1988	3.9918	2.0014	24.1858
CONTROL POSITIVO 301	9.3752	7.8389	6.9266	3.3809	2.034	23.8375
CONTROL POSITIVO 304	9.7835	8.1495	7.0576	3.6386	2.1117	23.9048
CONTROL POSITIVO 307	9.0501	7.7649	6.631	3.3397	0	23.7361
CONTROL POSITIVO 308	9.5934	8.2978	7.2947	3.8403	1.9104	23.9026
CONTROL POSITIVO 311	10.042	8.1824	7.8226	3.7296	2.0885	23.9075
CONTROL POSITIVO 313	11.4007	9.8418	7.2647	3.7561	1.9524	24.1935
CONTROL POSITIVO 319	11.7024	10.1448	7.6219	4.1117	1.8425	24.2498
CONTROL POSITIVO 321	8.6362	7.2715	5.5209	2.9614	1.8506	23.504
CONTROL POSITIVO 324	8.7218	7.3492	5.7786	3.0618	1.8376	23.482
CONTROL POSITIVO 338	10.5779	9.6099	7.8031	4.0579	3.8376	24.1225
CONTROL POSITIVO 367	9.7155	8.7231	7.0338	3.5753	1.9328	23.823
CONTROL POSITIVO 425	10.3442	9.1254	7.1434	3.748	1.3995	24.2833
CONTROL POSITIVO 429	9.3884	8.4116	6.8881	3.7627	1.981	24.1689
CONTROL POSITIVO 438	9.3884	8.4116	7.0914	3.8941	1.8414	24.0122
CONTROL POSITIVO 440	9.7154	8.2171	7.1416	3.6513	2.0934	23.9257
CONTROL POSITIVO 443	11.4842	9.6859	7.2539	3.6523	1.9549	24.1847
CONTROL POSITIVO 448	9.1723	7.7398	7.5334	3.2901	5.7004	23.904

RESULTADOS

Tabla 4.3 - Valores de los Índices de Conectividad de Kier y Hall de valencia, de no valencia y de tipo de átomo de estado electrotopológico para los antimicrobianos de referencia utilizados para la obtención de la función de conectividad correspondiente a la MIC para *S. aureus*.

MOLECULA	χ^4_V	SdsCH	SaasC	SssNH	SaaN	SdO
CONTROL POSITIVO 4	3.103	1.332	0.6292	0	0	23.5833
CONTROL POSITIVO 8	3.2163	0.9041	-2.8908	0	0	23.5492
CONTROL POSITIVO 13	3.1983	1.1128	-2.1528	0	0	23.5601
CONTROL POSITIVO 47	4.0986	1.3618	0.456	3.3249	0	24.1107
CONTROL POSITIVO 51	3.7083	1.3584	0.081	3.3212	4.4945	23.9
CONTROL POSITIVO 77	3.1587	1.0908	-2.352	0	0	23.4587
CONTROL POSITIVO 367	3.5753	1.1903	-2.0207	3.2194	0	23.823
CONTROL POSITIVO 372	4.0242	1.3787	-0.0254	3.3283	0	24.1717
CONTROL POSITIVO 134	3.6629	0.9577	-3.9835	3.0021	0	23.9296
CONTROL POSITIVO 138	3.563	1.1821	-2.0804	0	0	23.7972
CONTROL POSITIVO 144	3.2916	1.413	0.8299	0	0	23.6819
CONTROL POSITIVO 391	4.2838	0.9629	-4.0076	3.1966	0	24.1059
CONTROL POSITIVO 223	3.488	1.3855	1.6427	3.0334	4.4366	24.03
CONTROL POSITIVO 230	3.437	1.3073	1.1148	3.2228	0	24.1347
CONTROL POSITIVO 232	3.4812	1.0882	-0.6991	3.1807	0	24.1171
CONTROL POSITIVO 255	4.1186	1.3778	0.5756	0	0	24.3878
CONTROL POSITIVO 269	3.9043	1.5155	3.7128	0	0	24.2483
CONTROL POSITIVO 270	4.0097	1.5119	3.6671	3.4235	0	24.257
CONTROL POSITIVO 271	4.3837	1.5145	3.655	3.5207	0	24.3452
CONTROL POSITIVO 440	3.6513	1.4156	0.7604	3.4092	0	23.9257
CONTROL POSITIVO 441	3.9277	1.4256	0.8129	0	0	24.0129
CONTROL POSITIVO 309	3.9001	1.4209	0.8032	3.3416	0	23.9604
CONTROL POSITIVO 315	3.9227	0.9837	-2.418	3.3345	0	24.2729
CONTROL POSITIVO 322	3.5792	1.331	0.5837	3.4026	0	23.6803
CONTROL POSITIVO 328	3.7908	1.3636	0.6086	3.1577	0	24.0704

RESULTADOS

Tabla 4.4- Valores de los Índices de Conectividad de Kier y Hall de valencia, de no valencia y de tipo de átomo de estado electrotopológico para los antimicrobianos de referencia utilizados para la obtención de la función de conectividad correspondiente a la MIC para *E. faecalis*.

MOLECULA	${}^4\chi$	${}^3\chi_C^V$	${}^4\chi_C^V$	SaaN	SsssN
CONTROL POSITIVO 48	9.2365	1.3153	0	0	5.8228
CONTROL POSITIVO 70	10.7096	1.3268	0.0722	0	3.047
CONTROL POSITIVO 77	8.104	0.8244	0	0	2.8322
CONTROL POSITIVO 87	8.4116	0.8645	0	0	3.5914
CONTROL POSITIVO 91	8.4947	0.8796	0	0	2.7138
CONTROL POSITIVO 119	8.4947	0.9324	0	0	2.8738
CONTROL POSITIVO 134	9.0188	0.9194	0.0135	0	2.509
CONTROL POSITIVO 135	9.5203	1.8462	0.1903	0	2.5153
CONTROL POSITIVO 136	9.3303	1.1236	0.0135	0	2.5309
CONTROL POSITIVO 184	11.5095	1.4159	0	0	5.8229
CONTROL POSITIVO 216	7.6872	0.7193	0	3.9209	1.7821
CONTROL POSITIVO 217	8.2171	0.8105	0	4.2334	1.7967
CONTROL POSITIVO 246	8.7869	0.9974	0	0	5.8747
CONTROL POSITIVO 263	9.7192	1.7558	0.1768	0	3.5957
CONTROL POSITIVO 276	8.5633	1.0057	0	0	4.0981
CONTROL POSITIVO 278	9.216	1.4539	0	0	4.3383
CONTROL POSITIVO 350	7.5825	0.8319	0	0	3.5987
CONTROL POSITIVO 361	10.3966	0.9726	0	0	1.6078
CONTROL POSITIVO 385	7.8389	0.9068	0	0	3.7676
CONTROL POSITIVO 391	9.8232	1.3277	0.0135	0	2.5528
CONTROL POSITIVO 430	9.216	1.2099	0	0	4.1821
CONTROL POSITIVO 438	8.4116	0.8478	0	0	3.9334

RESULTADOS

FUNCIONES DE CONECTIVIDAD SELECCIONADAS

- Función de Conectividad correspondiente a Concentración Mínima

Inhibitoria para E. coli, con sus parámetros estadísticos.

$$\text{CMI}_{E. coli} = - (0.276406 \pm 0.0548) {}^4\chi + (0.301284 \pm 0.0571) {}^1\chi^V - (1.80695 \pm 0.47817) {}^4\chi_C^V - (1.46632 \pm 0.32829) {}^3\chi_{CH}^V + (0.031717 \pm 0.01188) SsNH_2 - (0.10716 \pm 0.03884) SaaN + (0.117986 \pm 0.3611) \quad \text{(Eq. 4.1)}$$

n = 25	r = 0.84811	SE = 0.151839	DF = 6
F = 7.69	CP = 7	p < 0.0003	

Tabla 4.5 – Comparación entre los valores observados y los obtenidos por conectividad molecular para la predicción de la CMI (µg/mL) frente a E. coli.

MOLÉCULA	MIC Obs.	MIC Calc.
CONTROL POSITIVO 27	0.1	0.100
CONTROL POSITIVO 353	0.1	0.110
CONTROL POSITIVO 185	0.1	0.184
CONTROL POSITIVO 194	0.1	0.034
CONTROL POSITIVO 233	0.1	0.287
CONTROL POSITIVO 256	0.1	0.366
CONTROL POSITIVO 263	0.1	0.153
CONTROL POSITIVO 313	0.1	0.205
CONTROL POSITIVO 326	0.1	0.133
CONTROL POSITIVO 13	0.2	0.289
CONTROL POSITIVO 43	0.2	0.008
CONTROL POSITIVO 357	0.2	0.248
CONTROL POSITIVO 310	0.2	0.164
CONTROL POSITIVO 319	0.2	0.257
CONTROL POSITIVO 339	0.2	0.125
CONTROL POSITIVO 35	0.4	0.311
CONTROL POSITIVO 82	0.4	0.318
CONTROL POSITIVO 110	0.4	0.393
CONTROL POSITIVO 385	0.4	0.300
CONTROL POSITIVO 324	0.4	0.540
CONTROL POSITIVO 335	0.4	0.563
CONTROL POSITIVO 15	0.8	0.870
CONTROL POSITIVO 318	0.8	0.520
CONTROL POSITIVO 332	0.8	0.600
CONTROL POSITIVO 337	0.8	0.623

RESULTADOS

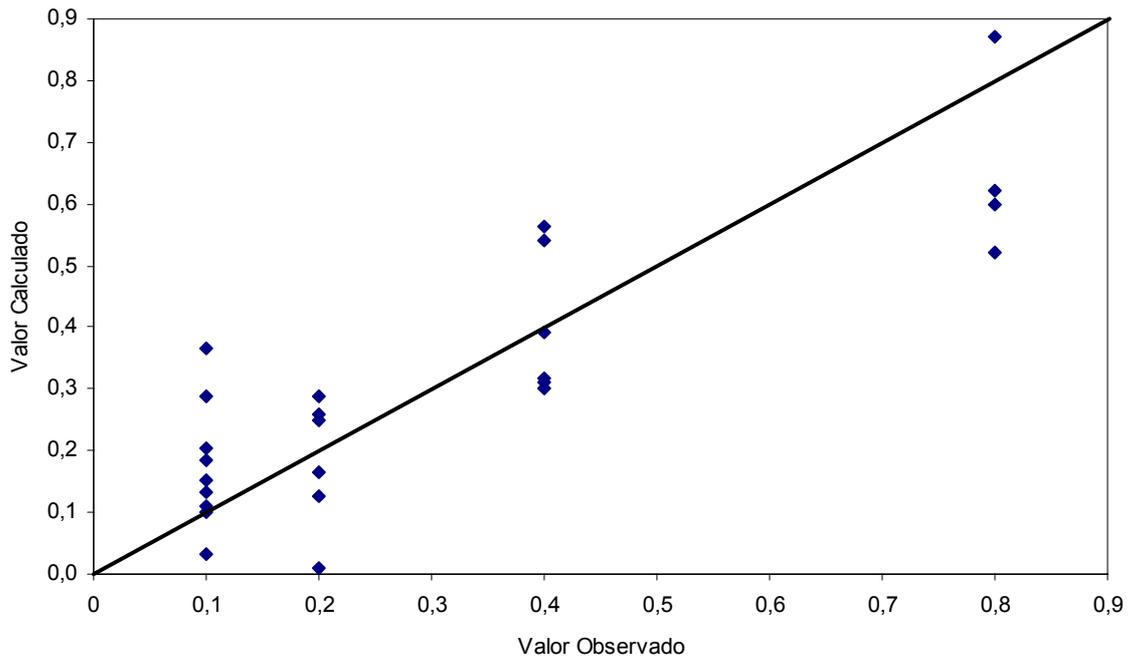


Figura 4.1. – Representación de los valores de CMI para *Escherichia coli*, calculados por conectividad frente a sus correspondientes valores observados (Eq. 4.1.)

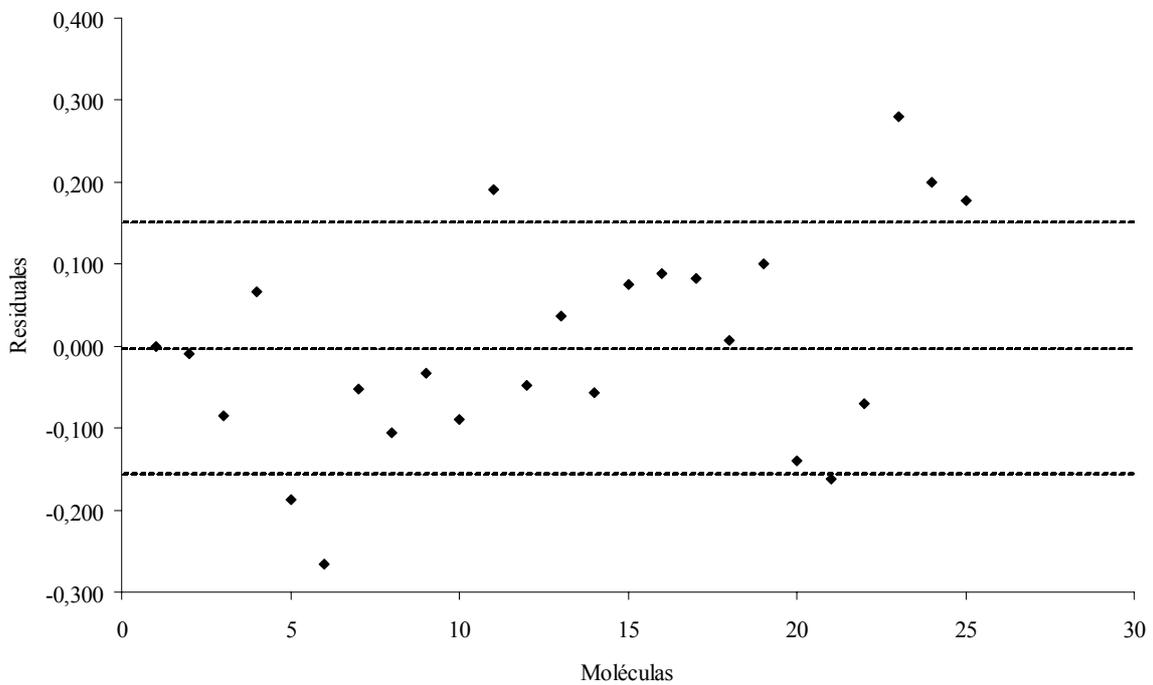


Figura 4.2. – Residuales de los valores de CMI para *Escherichia coli*, con su intervalo de confianza $\pm \sigma$

RESULTADOS

Tabla 4.6. – Matriz de intercorrelación de la variables independientes usadas en la función de conectividad de CMI para E. coli.

	${}^4\chi$	${}^1\chi^V$	${}^4\chi_c^V$	${}^3\chi_{CH}^V$	SsNH ₂	SaaN
${}^4\chi$	1.000					
${}^1\chi^V$	-0.663	1.000				
${}^4\chi_c^V$	0.300	-0.321	1.000			
${}^3\chi_{CH}^V$	0.348	-0.489	0.184	1.000		
SsNH ₂	-0.094	0.297	-0.200	-0.561	1.000	
SaaN	0.213	-0.049	0.084	0.024	0.159	1.000

RESULTADOS

-Función de Conectividad correspondiente a Concentración Mínima

Inhibitoria para P. aeruginosa

$$\text{MIC}_{P. \text{ aeruginosa}} = (0.431638 \pm 0.0933) \chi^3 - (0.532047 \pm 0.1133) \chi^4 - (0.769983 \pm 0.08246) \chi^2 + (1.33046 \pm 0.18877) \chi^4 + (0.111603 \pm 0.01902) \text{SsCH}_3 + (0.638145 \pm 0.14247) \text{SdO} - (13.9539 \pm 3.0481) \quad \text{(Eq. 4.2.)}$$

n = 30	r = 0.92251	SE = 0.106162	DF = 6
F = 21.9	CP = 7	p < 0.0001	

Tabla 4.7 – Comparación entre los valores observados y los obtenidos por conectividad molecular para la predicción de CMI (µg/mL) frente a Pseudomonas aeruginosa.

MOLECULA	MIC obs	MIC calc
CONTROL POSITIVO 140	0.2	0.20
CONTROL POSITIVO 307	0.2	0.31
CONTROL POSITIVO 77	0.4	0.52
CONTROL POSITIVO 367	0.4	0.36
CONTROL POSITIVO 86	0.4	0.56
CONTROL POSITIVO 188	0.4	0.49
CONTROL POSITIVO 301	0.4	0.53
CONTROL POSITIVO 311	0.4	0.46
CONTROL POSITIVO 448	0.4	0.35
CONTROL POSITIVO 34	0.8	0.68
CONTROL POSITIVO 129	0.8	0.73
CONTROL POSITIVO 230	0.8	0.81
CONTROL POSITIVO 246	0.8	0.84
CONTROL POSITIVO 425	0.8	0.79
CONTROL POSITIVO 266	0.8	0.57
CONTROL POSITIVO 440	0.8	0.73
CONTROL POSITIVO 304	0.8	0.83
CONTROL POSITIVO 308	0.8	0.73
CONTROL POSITIVO 443	0.8	0.78
CONTROL POSITIVO 313	0.8	0.79
CONTROL POSITIVO 319	0.8	0.98
CONTROL POSITIVO 321	0.8	0.80
CONTROL POSITIVO 324	0.8	0.71
CONTROL POSITIVO 338	0.8	0.71
CONTROL POSITIVO 270	1	1.13
CONTROL POSITIVO 429	1	0.97
CONTROL POSITIVO 273	1	0.93
CONTROL POSITIVO 274	1	1.05
CONTROL POSITIVO 438	1	0.87

RESULTADOS

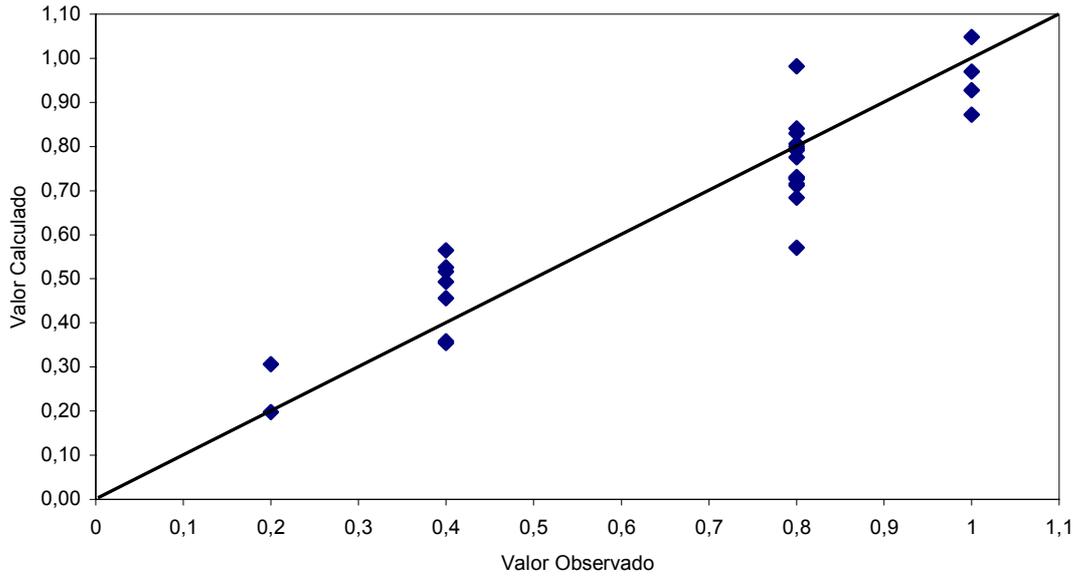


Figura 4.3. – Representación de los valores de CMI para *Pseudomonas aeruginosa*, calculados por conectividad frente a sus correspondientes valores observados (Eq. 4.2.)

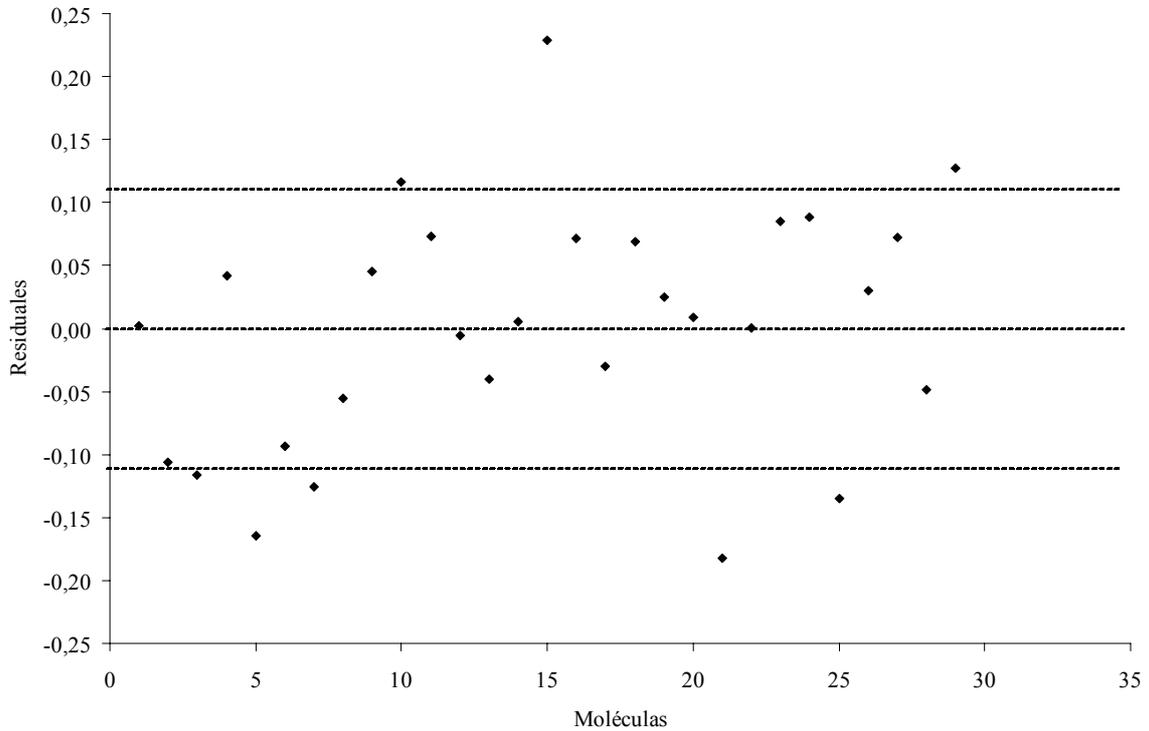


Figura 4.4. – Residuales de los valores de CMI para *Pseudomonas aeruginosa*, con su intervalo de confianza $\pm \sigma$

RESULTADOS

Tabla 4.8. – Matriz de intercorrelación de la variables independientes usadas en la función de conectividad de CMI para *P. aeruginosa*.

	${}^3\chi$	${}^4\chi$	${}^2\chi^V$	${}^4\chi^V$	SsCH ₃	SdO
${}^3\chi$	1.000					
${}^4\chi$	-0.818	1.000				
${}^2\chi^V$	-0.591	0.522	1.000			
${}^4\chi^V$	0.610	-0.637	-0.787	1.000		
SsCH ₃	0.236	-0.137	-0.511	0.398	1.000	
SdO	-0.097	-0.059	0.018	-0.334	-0.223	1.000

RESULTADOS

-Función de Conectividad correspondiente a Concentración Mínima

Inhibitoria para S. aureus

$$\text{MIC}_{S. \text{ aureus}} = (0.698416 \pm 0.22287) \chi^4 - (3.0172 \pm 0.61466) \text{ SdsCH} + (0.296473 \pm 0.055278) \text{ SaasC} + (0.0993492 \pm 0.02755) \text{ SssNH} - (0.0985801 \pm 0.03241) \text{ SaaN} - (1.10416 \pm 0.31275) \text{ SdO} + (28.0693 \pm 7.21913) \quad \text{(Eq. 4.3.)}$$

$$\begin{array}{llll} n = 25 & r = 0.87140 & SE = 0.182462 & DF = 6 \\ F = 9.47 & CP = 7 & p < 0.0001 & \end{array}$$

Tabla 4.9 – Comparación entre los valores observados y los obtenidos por conectividad molecular para la predicción de CMI ($\mu\text{g/mL}$) frente a *Staphylococcus aureus*.

MOLÉCULA	MIC obs	MIC calc
CONTROL POSITIVO 144	0.05	0.202
CONTROL POSITIVO 255	0.05	0.031
CONTROL POSITIVO 51	0.1	0.082
CONTROL POSITIVO 138	0.1	0.098
CONTROL POSITIVO 223	0.125	0.143
CONTROL POSITIVO 4	0.2	0.364
CONTROL POSITIVO 367	0.2	0.391
CONTROL POSITIVO 372	0.2	0.354
CONTROL POSITIVO 328	0.2	0.519
CONTROL POSITIVO 13	0.4	0.293
CONTROL POSITIVO 77	0.4	0.385
CONTROL POSITIVO 134	0.4	0.433
CONTROL POSITIVO 441	0.4	0.238
CONTROL POSITIVO 315	0.4	0.654
CONTROL POSITIVO 269	0.5	0.550
CONTROL POSITIVO 8	0.8	0.729
CONTROL POSITIVO 47	0.8	0.666
CONTROL POSITIVO 391	0.8	0.669
CONTROL POSITIVO 230	0.8	0.527
CONTROL POSITIVO 232	0.8	0.697
CONTROL POSITIVO 440	0.8	0.495
CONTROL POSITIVO 309	0.8	0.620
CONTROL POSITIVO 322	0.8	0.917
CONTROL POSITIVO 270	1	0.952
CONTROL POSITIVO 271	1	1.114

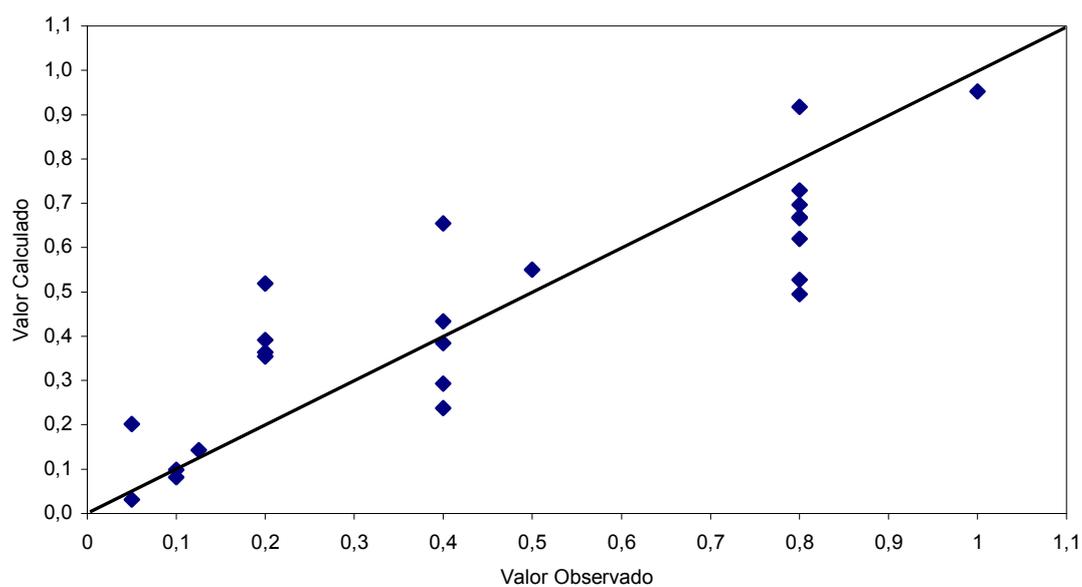


Figura 4.5. – Representación de los valores de CMI para *Staphylococcus aureus*, calculados por conectividad frente a sus correspondientes valores observados (Eq. 4.3.)

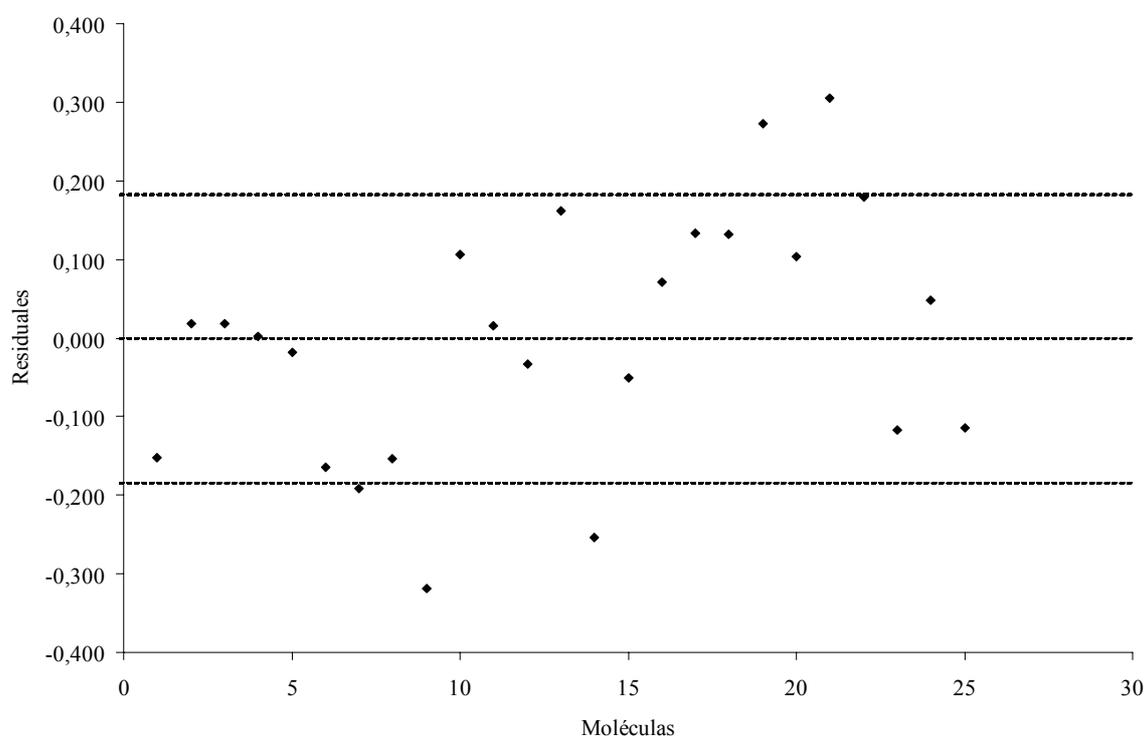


Figura 4.6. – Residuales de los valores de CMI para *Staphylococcus aureus*, con su intervalo de confianza $\pm \sigma$

RESULTADOS

Tabla 4.10. – Matriz de intercorrelación de la variables independientes usadas en la función de conectividad de CMI para *S. aureus*.

	χ^4_V	SdsCH	SaasC	SssNH	SaaN	SdO
χ^4_V	1.000					
SdsCH	-0.487	1.000				
SdsCH	0.488	-0.834	1.000			
SdsCH	-0.188	0.075	-0.021	1.000		
SdsCH	0.231	-0.169	0.102	-0.280	1.000	
SdsCH	-0.817	0.463	-0.552	-0.119	-0.095	1.000

RESULTADOS

-Función de Conectividad correspondiente a Concentración Mínima

Inhibitoria para S. faecalis

$$\text{MIC}_{E. \text{ faecalis}} = - (0.306736 \pm 0.05212) \chi^4 + (1.65118 \pm 0.28353) \chi^{3\text{CV}} - (8.60359 \pm 1.29235) \chi^{\text{CV}} - (0.0897469 \pm 0.03329) \text{SaaN} - (0.157139 \pm 0.03677) \text{SsssN} + (2.19434 \pm 0.3659) \quad \text{(Eq. 4.4.)}$$

$$\begin{array}{llll} n = 22 & r = 0.89092 & SE = 0.157594 & DF = 5 \\ F = 12.31 & CP = 6 & p < 0.0001 & \end{array}$$

Tabla 4.11 – Comparación entre los valores observados y los obtenidos por conectividad molecular para la predicción de CMI (µg/mL) frente a *Enterococcus faecalis*.

MOLÉCULA	MIC obs	MIC calc
CONTROL POSITIVO 70	0.05	0.00
CONTROL POSITIVO 263	0.1	0.03
CONTROL POSITIVO 361	0.2	0.36
CONTROL POSITIVO 135	0.2	0.29
CONTROL POSITIVO 184	0.2	0.09
CONTROL POSITIVO 246	0.2	0.22
CONTROL POSITIVO 217	0.25	0.35
CONTROL POSITIVO 438	0.25	0.40
CONTROL POSITIVO 48	0.4	0.62
CONTROL POSITIVO 77	0.4	0.62
CONTROL POSITIVO 87	0.4	0.48
CONTROL POSITIVO 134	0.4	0.44
CONTROL POSITIVO 216	0.5	0.39
CONTROL POSITIVO 276	0.5	0.58
CONTROL POSITIVO 350	0.8	0.68
CONTROL POSITIVO 91	0.8	0.61
CONTROL POSITIVO 119	0.8	0.68
CONTROL POSITIVO 136	0.8	0.67
CONTROL POSITIVO 385	0.8	0.70
CONTROL POSITIVO 391	0.8	0.86
CONTROL POSITIVO 430	1	0.71
CONTROL POSITIVO 278	1	1.09

RESULTADOS

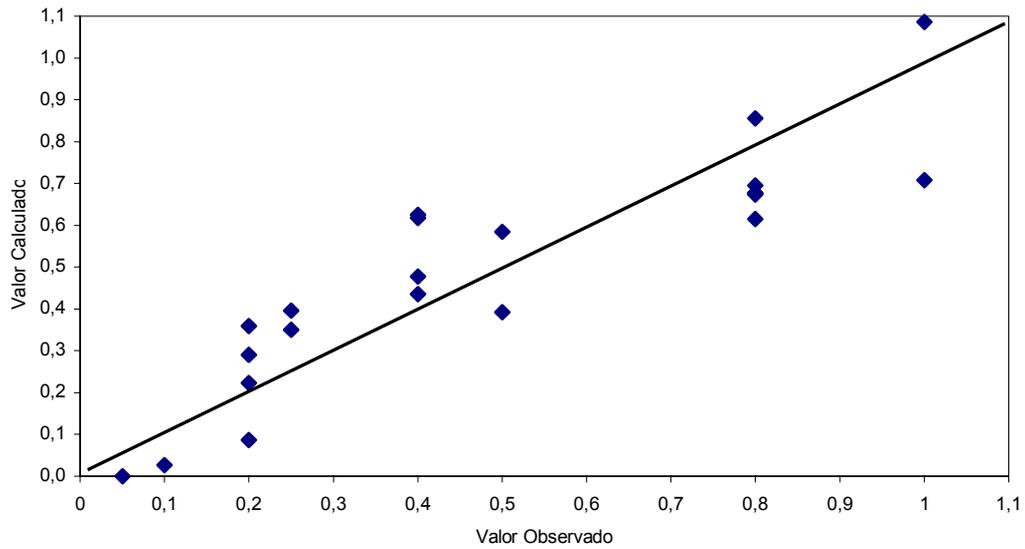


Figura 4.7. – Representación de los valores de CMI para *Enterococcus faecalis*, calculados por conectividad frente a sus correspondientes valores observados (Eq. 4.4.)

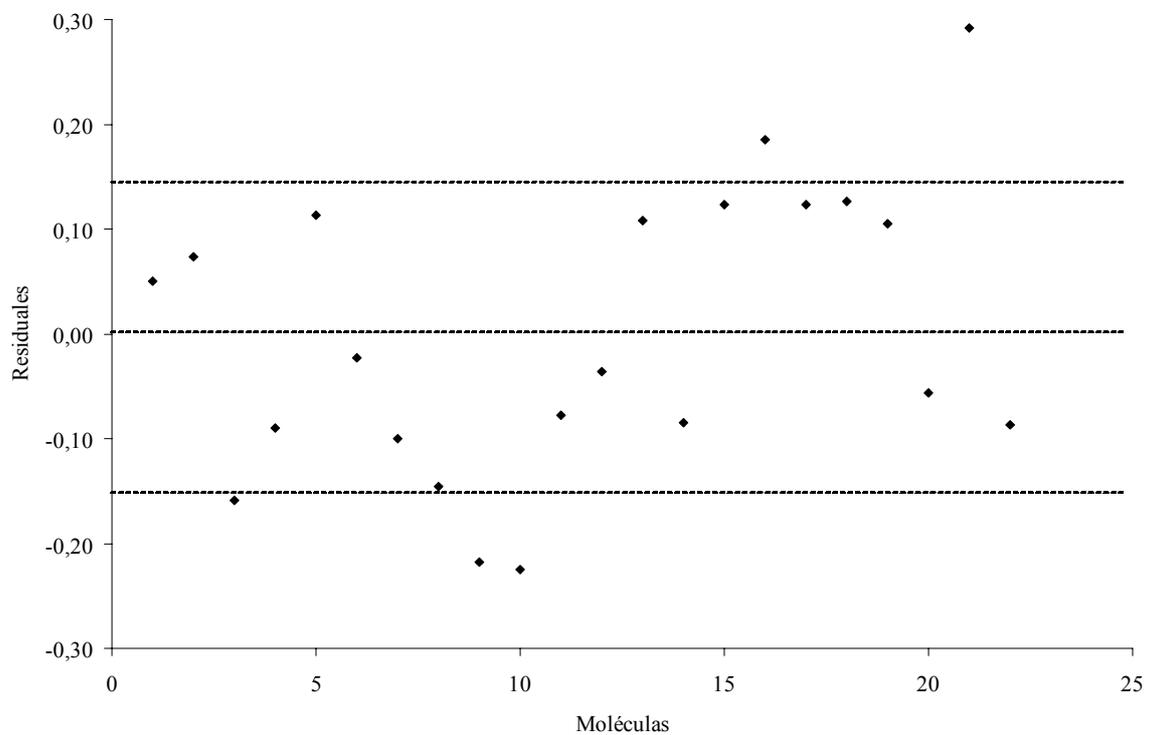


Figura 4.8. – Residuales de los valores de CMI para *Enterococcus faecalis*, con su intervalo de confianza $\pm \sigma$

RESULTADOS

Tabla 4.12. – Matriz de intercorrelación de la variables independientes usadas en la función de conectividad de CMI para *E. faecalis*.

	${}^4\chi$	${}^3\chi_c^V$	${}^4\chi_c^V$	SaaN	SsssN
${}^4\chi$	1.000				
${}^3\chi_c^V$	-0.669	1.000			
${}^4\chi_c^V$	0.445	-0.848	1.000		
SaaN	0.157	0.028	0.040	1.000	
SsssN	0.267	0.525	0.557	0.327	1.000

RESULTADOS

4.2- ESTABILIDAD ESTADÍSTICA DE LAS FUNCIONES

DE CONECTIVIDAD SELECCIONADAS

Para llevar a cabo los estudios de estabilidad (validación cruzada) de las funciones seleccionadas, se empleó el método de Jacknife ya descrito en el capítulo de material y métodos. Se realizaron los análisis de regresión eliminando moléculas de cada serie, en cada caso aproximadamente el 10% de las moléculas estudiadas.

La comparación de los resultados obtenidos en cada caso con los de la ecuación seleccionada muestra que, en todos ellos, dicha ecuación es estable ya que se observan mínimas discrepancias, lo que refuerza la calidad predictiva del modelo. Los resultados se muestran en las tablas que aparecen a continuación.

Tabla 4.13. - Estudio de estabilidad de la ecuación correspondiente a $CMI_{E. coli}$.

	Ecuación seleccionada (sin eliminaciones)		3 Eliminaciones por correlación (25 correlaciones)	
	Valores de la regresión	Desviación estándar	Valores de la regresión	Desviación estándar
Coefficiente de correlación	0.84811		0.8471	0.015
Desviación estándar	0.1518		0.1718	0.083
Coefficiente de ${}^4\chi$	-0.2764	0.0548	-0.2853	0.0567
Coefficiente de ${}^1\chi^V$	0.30128	0.0751	0.30763	0.0702
Coefficiente de ${}^4\chi_c^V$	-1.80695	0.47817	-1.80131	0.47012
Coefficiente de ${}^3\chi_{CH}^V$	-1.46632	0.32829	-1.47018	0.32113
Coefficiente de $SsNH_2$	0.03172	0.01188	0.03025	0.01211
Coefficiente de $SaaN$	-0.10716	0.03884	-0.10622	0.03798
Constante	0.11799	0.3611	0.12025	0.3592
Media residual	0.1518	0.086	0.1602	0.085
Residuales < 1 sd.	72.00 %		69.00 %	
Residuales entre 1 y 2 desviaciones estándar	28.00 %		29.00 %	
Residuales > 2 sd.	0.0 %		2.00 %	

RESULTADOS

Tabla 4.14. - Estudio de estabilidad de la ecuación correspondiente a CMI_{p. aeruginosa}.

	Ecuación seleccionada (sin eliminaciones)		3 Eliminaciones por correlación (30 correlaciones)	
	Valores de la regresión	Desviación estándar	Valores de la regresión	Desviación estándar
Coefficiente de correlación	0.92251		0.90263	0.019
Desviación estándar	0.106162		0.113873	0.078
Coefficiente de $^3\chi$	0.431638	0.0933	0.46132	0.0896
Coefficiente de $^4\chi$	-0.532047	0.1133	-0.50163	0.1235
Coefficiente de $^2\chi^v$	-0.769983	0.08246	-0.79023	0.08453
Coefficiente de $^4\chi^v$	1.33046	0.18877	1.40236	0.19432
Coefficiente de SsCH ₃	0.111603	0.01902	0.16352	0.02245
Coefficiente de SdO	0.638145	0.14247	0.59625	0.15029
Constante	-13.9539	3.0481	-13.8642	3.2367
Media residual	0.10616	0.053	0.12113	0.055
Residuales < 1 sd.	76.34 %		73.12 %	
Residuales entre 1 y 2 desviaciones estándar	23.33 %		24.77 %	
Residuales > 2 sd.	0.33 %		2.11 %	

RESULTADOS

Tabla 4.15.- Estudio de estabilidad de la ecuación correspondiente a $CMI_{S. aureus}$.

	Ecuación seleccionada (sin eliminaciones)		3 Eliminaciones por correlación (25 correlaciones)	
	Valores de la regresión	Desviación estándar	Valores de la regresión	Desviación estándar
Coefficiente de correlación	0.8714		0.8571	0.1239
Desviación estándar	0.182462		0.19231	0.087
Coefficiente de χ^4_V	0.698416	0.22287	0.70123	0.23462
Coefficiente de SdsCH	-3.0172	0.61466	-3.2671	0.59326
Coefficiente de SaasC	0.296473	0.055278	0.28742	0.056734
Coefficiente de SssNH	0.099349	0.02755	0.09854	0.02862
Coefficiente de SaaN	-0.09858	0.03241	-0.09932	0.03352
Coefficiente de SdO	-1.10416	0.31275	-1.09687	0.32463
Constante	28.0693	7.21913	27.6352	7.4512
Media residual	0.18246	0.075	0.10616	0.082
Residuales < 1 sd.	80.00 %		77.00 %	
Residuales entre 1 y 2 desviaciones estándar	20.00 %		21.00 %	
Residuales > 2 sd.	0.0 %		2.00 %	

RESULTADOS

Tabla 4.16 .- Estudio de estabilidad de la ecuación correspondiente a CMI_{E. faecalis}.

	Ecuación seleccionada (sin eliminaciones)		2 Eliminaciones por correlación (22 correlaciones)	
	Valores de la regresión	Desviación estándar	Valores de la regresión	Desviación estándar
Coefficiente de correlación	0.89092		0.88653	0.1326
Desviación estándar	0.157594		0.16146	0.0987
Coefficiente de $^4\chi$	-0.306736	0.05212	-0.31676	0.05631
Coefficiente de $^3\chi^{CV}$	1.65118	0.28353	1.58234	0.3122
Coefficiente de $^4\chi^{CV}$	-8.60359	1.29235	-8.8231	1.3653
Coefficiente de SaaN	-0.089747	0.03329	-0.088432	0.03582
Coefficiente de SsssN	-0.157139	0.03677	-0.151231	0.03843
Constante	2.19434	0.3659	2.3564	0.3711
Media residual	0.15759	0.082	0.17653	0.112
Residuales < 1 sd.	77.27 %		76.30 %	
Residuales entre 1 y 2 desviaciones estándar	22.73 %		21.70 %	
Residuales > 2 sd.	0.0 %		2.00 %	

4.3- OBTENCIÓN DE LA ECUACIÓN DE DISCRIMINACIÓN

Una etapa importante es la selección de la ecuación de discriminación que nos permita establecer unos intervalos en los cuales queden incluidas las moléculas que posean la actividad farmacológica buscada, en este caso la acción antibacteriana, evitando que aparezcan moléculas inactivas.

Con ayuda del paquete informático BMDP 7M descrito en el apartado 3.2.2.1.2. de Material Y Métodos, se procedió a realizar el análisis lineal discriminante (ALD) que permitiera seleccionar las propiedades o índices de conectividad capaces de distinguir aquellas moléculas que presentan acción antimicrobiana de las que no la presentan (distinguir entre compuestos activos e inactivos).

Para realizar este análisis hemos dispuesto de un grupo de 451 moléculas del grupo de las fluorquinolonas con actividad antimicrobiana, entre las cuales se encuentran las 85 utilizadas para la obtención de las funciones de conectividad y de un grupo de 731 moléculas sin dicha actividad terapéutica.

El estudio se realizó empleando como grupo discriminante un total de 339 moléculas con actividad antimicrobiana y 529 moléculas sin dicha acción, siendo el resto de moléculas de cada grupo empleadas para realizar el correspondiente test de validación cruzada de la ecuación discriminante obtenida.

El criterio para la selección de la mejor función discriminante se realizó basándonos en los siguientes aspectos:

- comparación de los valores de F y U estadísticas,

- determinación del porcentaje de moléculas correctamente clasificadas durante el proceso de entrenamiento (grupo de entrenamiento activo y grupo de entrenamiento inactivo),
- predicción de la clasificación de moléculas no incluidas en el proceso de entrenamiento (grupo test activo y grupo test inactivo), a lo que se denomina validación cruzada.

El programa BMDP 7M realizará numerosas correlaciones pero sólo seleccionaremos aquella correlación que presente los mejores resultados para los tres criterios anteriormente mencionados.

El criterio de clasificación para la función fue que cada molécula con valor de $\Delta P < 0$ se clasificará como inactiva (I) mientras que moléculas con valores de $\Delta P > 0.5$ serán clasificadas como activas (A). Aquellas moléculas que tengan un valor de ΔP comprendido entre 0 y 0.5 serán clasificadas como indeterminadas. Estas condiciones de discriminación intentan minimizar el porcentaje de error, es decir, obtener el menor número posible de falsos positivos, aunque se vean sacrificadas algunas moléculas activas.

Tabla 4.17. Clasificación de moléculas en función del valor de ΔP .

Valor de la función discriminante	Clasificación
$\Delta P > 0.5$	Activa
$\Delta P < 0$	Inactiva
$0.5 > \Delta P > 0$	Indeterminada

La mejor función discriminante que se obtuvo fue la siguiente:

$$\Delta P = 16.23446 \chi_{CH}^V + 1.48373 SdsCH - 5.10146 SdssC + 1.78995 SsssN - 13.86063 \quad (\text{Eq. 4.5})$$

en la que intervienen índices de valencia e índices tipo de átomo de estado electrotopológico.

En la siguiente tabla (Tabla 4.18) se pueden observar los coeficientes de cada una de las variables que participan en la función discriminante junto con los valores para la F estadística y U estadística de los mismos.

Tabla 4.18. Parámetros de la función discriminante.

Variable	Coficiente	F estadística	U estadística
χ_{CH}^V	16.23446	0.1821	968.877
SdsCH	1.48373	0.2024	1135.129
SdssC	- 5.10146	0.3718	1463.454
SsssN	1.78995	0.2326	1427.217
constante	- 13.86063	-	-

En las tablas siguientes (Tablas 4.19 y 4.21) se muestran los resultados obtenidos en la discriminación de 339 moléculas con actividad antimicrobiana contrastada remitiéndonos a su correspondiente valor de CMI (grupo entrenamiento activo) y de 529 moléculas sin dicha actividad (grupo entrenamiento inactivo) respectivamente. También se

muestran los resultados de los índices que participan en la ecuación de discriminación además del valor de la misma para cada caso (ΔP) junto con la clasificación de las mismas con arreglo a dicho valor (signo "A" para las moléculas activas, signo "I" para las inactivas, "INDETERMINADA" para las indeterminaciones), así como la probabilidad de pertenencia a cada grupo de clasificación.

En las tablas 4.20 y 4.22 se analizan los resultados obtenidos para estos grupos de moléculas, los grupos activo e inactivo del proceso de entrenamiento (moléculas que participan en la selección de la función discriminante) como porcentaje de aciertos obtenidos a partir del valor de la función discriminante, con los criterios de clasificación anteriormente nombrados, así como el porcentaje de acierto ajustado, entendiendo como tal aquellos valores en los que han sido excluidos los casos indeterminados.

Tabla 4.19.- Resultados obtenidos del análisis discriminante efectuado a un grupo de 339 antimicrobianos fluorquinolonas activas (grupo de entrenamiento activo).

MOLECULA	$3\chi_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 1	0	1.4326	-1.4204	1.7549	-1.348	I	47.08
CONTROL POSITIVO 2	0	1.3554	-2.2588	8.6591	15.173	A	82.93
CONTROL POSITIVO 3	0	1.2104	-1.7054	1.2549	-1.118	I	47.57
CONTROL POSITIVO 4	0	1.332	-2.2826	5.8196	10.177	A	72.09
CONTROL POSITIVO 5	0	1.3268	-2.2767	3.5986	6.164	A	63.38
CONTROL POSITIVO 6	0	1.2209	-2.4251	5.5294	10.220	A	72.18
CONTROL POSITIVO 7	0	1.4061	-1.8548	1.7826	0.879	A	51.91
CONTROL POSITIVO 8	0	0.9041	-3.1844	4.5829	11.929	A	75.89
CONTROL POSITIVO 9	0	1.439	-1.7744	4.0946	4.656	A	60.10
CONTROL POSITIVO 10	0	1.2645	-2.3886	1.2213	2.387	A	55.18
CONTROL POSITIVO 11	0	1.2373	-2.4275	1.5471	3.128	A	56.79
CONTROL POSITIVO 12	0	1.296	-2.2928	1.6316	2.679	A	55.81
CONTROL POSITIVO 13	0	1.1128	-2.7977	5.0304	11.067	A	74.02
CONTROL POSITIVO 14	0	1.2821	-2.3408	1.6116	2.868	A	56.22
CONTROL POSITIVO 15	0	1.2939	-2.3392	1.6311	2.912	A	56.32
CONTROL POSITIVO 16	0	1.199	-2.6447	3.0538	6.876	A	64.92
CONTROL POSITIVO 17	0	1.2857	-2.7587	3.4475	8.291	A	67.99
CONTROL POSITIVO 18	0	1.3273	-2.3084	5.8628	10.379	A	72.52
CONTROL POSITIVO 19	0	1.4183	-1.8504	6.1361	8.667	A	68.81
CONTROL POSITIVO 20	0	1.3446	-2.2776	8.2611	14.540	A	81.55
CONTROL POSITIVO 21	0	1.3467	-1.908	1.6738	0.867	A	51.88
CONTROL POSITIVO 22	0	1.3765	-1.9047	3.8724	4.830	A	60.48
CONTROL POSITIVO 23	0	1.2716	-2.3994	3.4332	6.412	A	63.91
CONTROL POSITIVO 24	0	1.2129	-2.512	1.4933	3.427	A	57.44
CONTROL POSITIVO 25	0	1.2695	-2.3943	3.4202	6.359	A	63.80
CONTROL POSITIVO 26	0	1.2226	-2.9654	4.7481	11.580	A	75.13
CONTROL POSITIVO 27	0	1.2643	-2.4069	3.3764	6.338	A	63.75
CONTROL POSITIVO 28	0	1.2481	-2.0119	5.2237	7.605	A	66.50
CONTROL POSITIVO 29	0	1.9466	-2.6521	1.4111	5.083	A	61.03
CONTROL POSITIVO 30	0	1.9466	-2.6521	1.4111	5.083	A	61.03
CONTROL POSITIVO 31	0	1.3487	-2.035	3.7213	5.183	A	61.25
CONTROL POSITIVO 32	0	1.3426	-2.3612	5.8165	10.588	A	72.98
CONTROL POSITIVO 33	0	0	-1.8927	1.5049	-1.511	I	46.72
CONTROL POSITIVO 34	0	1.1016	-2.8265	2.9228	7.425	A	66.11
CONTROL POSITIVO 35	0	1.1166	-2.7957	3.0013	7.430	A	66.13
CONTROL POSITIVO 36	0.2887	1.1516	-2.943	5.0775	16.637	A	86.10
CONTROL POSITIVO 37	0.2887	1.1554	-2.941	3.0608	13.023	A	78.26
CONTROL POSITIVO 38	0.2887	1.2012	-2.7704	3.1997	12.469	A	77.06
CONTROL POSITIVO 39	0.2887	1.1055	-4.5021	2.9598	20.732	A	94.99
CONTROL POSITIVO 40	0.2887	1.1976	-2.7083	3.1791	12.110	A	76.28
CONTROL POSITIVO 41	0.2887	1.2031	-2.7062	3.2043	12.152	A	76.37

MOLECULA	$3\chi_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 42	0.2887	1.2026	-2.7027	5.2603	15.814	A	84.32
CONTROL POSITIVO 43	0.2887	1.1618	-2.8445	2.585	11.688	A	75.36
CONTROL POSITIVO 44	0.2887	1.1918	-2.7914	2.8224	11.887	A	75.80
CONTROL POSITIVO 45	0.2887	1.1777	-2.8049	2.7062	11.727	A	75.45
CONTROL POSITIVO 46	0.2887	1.3576	-2.3555	3.6791	11.442	A	74.83
CONTROL POSITIVO 47	0.2887	1.3618	-2.3509	3.698	11.459	A	74.87
CONTROL POSITIVO 48	0.2887	1.3626	-2.35	5.8228	15.259	A	83.11
CONTROL POSITIVO 49	0.2887	1.3393	-2.3542	3.5543	11.185	A	74.27
CONTROL POSITIVO 50	0.2887	1.3543	-2.3235	3.6328	11.191	A	74.29
CONTROL POSITIVO 51	0.2887	1.3584	-2.3189	3.6517	11.208	A	74.32
CONTROL POSITIVO 52	0.2887	1.3593	-2.3179	5.7806	15.015	A	82.58
CONTROL POSITIVO 53	0.2887	1.3444	-2.3323	3.5589	11.089	A	74.07
CONTROL POSITIVO 54	0	1.3314	-2.39	3.6071	6.764	A	64.68
CONTROL POSITIVO 55	0	1.3514	-2.3536	5.8351	10.596	A	72.99
CONTROL POSITIVO 56	0	1.0652	-2.8305	2.8813	7.317	A	65.88
CONTROL POSITIVO 57	0	2.1941	-2.9579	2.7498	9.406	A	70.41
CONTROL POSITIVO 58	0	0.4476	-4.0228	1.7126	10.391	A	72.55
CONTROL POSITIVO 59	0	1.0096	-2.9336	2.7424	7.512	A	66.30
CONTROL POSITIVO 60	0	0.8985	-3.0761	2.4646	7.577	A	66.44
CONTROL POSITIVO 61	0.2357	1.2122	-2.7106	3.2199	11.356	A	74.64
CONTROL POSITIVO 62	0.25	1.211	-2.7237	3.2212	11.655	A	75.29
CONTROL POSITIVO 63	0.2887	1.2024	-2.7046	3.186	12.110	A	76.28
CONTROL POSITIVO 64	0	1.2418	-2.6808	3.2761	7.522	A	66.32
CONTROL POSITIVO 65	0	1.2557	-2.6722	3.3023	7.546	A	66.37
CONTROL POSITIVO 66	0	1.1022	-2.9097	1.6637	5.596	A	62.14
CONTROL POSITIVO 67	0	4.3933	-2.5165	2.9301	10.740	A	73.31
CONTROL POSITIVO 68	0.2887	1.1881	-2.7727	3.1376	12.350	A	76.80
CONTROL POSITIVO 69	0.2887	1.2072	-2.7374	3.235	12.373	A	76.85
CONTROL POSITIVO 70	0.2887	1.1772	-2.7904	3.047	12.262	A	76.61
CONTROL POSITIVO 71	0.2887	1.1785	-2.7873	3.0579	12.268	A	76.62
CONTROL POSITIVO 72	0.2887	1.1894	-2.7696	3.1486	12.356	A	76.81
CONTROL POSITIVO 73	0.2887	1.1826	-2.739	3.1006	12.104	A	76.27
CONTROL POSITIVO 74	0	1.3399	-2.2761	3.6961	6.355	A	63.79
CONTROL POSITIVO 75	0	1.1067	-2.8046	2.9274	7.329	A	65.90
CONTROL POSITIVO 76	0	1.1119	-2.8124	2.9713	7.455	A	66.18
CONTROL POSITIVO 77	0	1.0908	-2.8442	2.8322	7.337	A	65.92
CONTROL POSITIVO 78	0	1.1208	-2.7911	3.0202	7.447	A	66.16
CONTROL POSITIVO 79	0	1.2648	-2.4655	3.4355	6.743	A	64.63
CONTROL POSITIVO 80	0	1.2674	-2.4694	3.4574	6.806	A	64.77
CONTROL POSITIVO 81	0	1.2463	-2.5012	3.3183	6.688	A	64.51
CONTROL POSITIVO 82	0	2.6874	-1.5298	1.8898	1.314	A	52.85
CONTROL POSITIVO 83	0	2.7668	-1.2864	2.04	0.459	INDETER.	51.00
CONTROL POSITIVO 84	0.2887	1.1877	-2.7171	3.1052	12.008	A	76.06
CONTROL POSITIVO 85	0.2887	1.1929	-2.7249	3.1491	12.134	A	76.33
CONTROL POSITIVO 86	0.2887	1.2018	-2.7037	3.198	12.126	A	76.32
CONTROL POSITIVO 87	0.2887	1.3432	-2.3742	3.5914	11.360	A	74.65

MOLECULA	$3\chi_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 88	0.2887	1.3573	-2.3607	3.6841	11.477	A	74.91
CONTROL POSITIVO 89	0	1.0644	-3.0374	2.8091	8.242	A	67.89
CONTROL POSITIVO 90	0	1.0671	-3.0413	2.831	8.305	A	68.02
CONTROL POSITIVO 91	0	1.0485	-3.077	2.7138	8.250	A	67.90
CONTROL POSITIVO 92	0	1.0785	-3.0239	2.9019	8.360	A	68.14
CONTROL POSITIVO 93	0	1.22	-2.6944	3.2952	7.593	A	66.48
CONTROL POSITIVO 94	0	1.2341	-2.681	3.388	7.712	A	66.74
CONTROL POSITIVO 95	0	0.9353	-3.2854	1.7433	7.408	A	66.08
CONTROL POSITIVO 96	0	1.4633	-2.6189	1.8307	4.948	A	60.74
CONTROL POSITIVO 97	0.2887	1.3646	-2.4348	3.6628	11.828	A	75.67
CONTROL POSITIVO 98	0.2887	1.3672	-2.4387	3.6848	11.891	A	75.81
CONTROL POSITIVO 99	0.2887	1.3487	-2.4744	3.5676	11.836	A	75.69
CONTROL POSITIVO 100	0.2887	1.1455	-2.9499	2.9869	12.921	A	78.04
CONTROL POSITIVO 101	0.2887	1.1481	-2.9538	3.0088	12.984	A	78.18
CONTROL POSITIVO 102	0.2887	1.1296	-2.9895	2.8916	12.929	A	78.06
CONTROL POSITIVO 103	0.2887	1.301	-2.607	3.473	12.273	A	76.63
CONTROL POSITIVO 104	0.2887	1.3036	-2.6109	3.4949	12.336	A	76.77
CONTROL POSITIVO 105	0.2887	1.3062	-2.6147	3.5169	12.398	A	76.91
CONTROL POSITIVO 106	0.2887	1.3151	-2.5935	3.5658	12.391	A	76.89
CONTROL POSITIVO 107	0	1.0089	-3.2979	2.6491	9.202	A	69.97
CONTROL POSITIVO 108	0	1.0115	-3.3018	2.671	9.265	A	70.11
CONTROL POSITIVO 109	0	0.993	-3.3375	2.5538	9.210	A	69.99
CONTROL POSITIVO 110	0	1.023	-3.2845	2.7419	9.321	A	70.23
CONTROL POSITIVO 111	0.2887	1.3091	-2.6954	3.5028	12.789	A	77.75
CONTROL POSITIVO 112	0.2887	1.0899	-3.2105	2.8269	13.882	A	80.13
CONTROL POSITIVO 113	0.2887	1.0925	-3.2144	2.8488	13.945	A	80.26
CONTROL POSITIVO 114	0.2887	1.074	-3.2501	2.7316	13.889	A	80.14
CONTROL POSITIVO 115	0	1.3392	-2.2617	3.645	6.189	A	63.43
CONTROL POSITIVO 116	0	1.3444	-2.2695	3.6889	6.315	A	63.70
CONTROL POSITIVO 117	0	1.3233	-2.3013	3.5498	6.197	A	63.45
CONTROL POSITIVO 118	0	1.12	-2.7768	2.9691	7.281	A	65.80
CONTROL POSITIVO 119	0	1.1041	-2.8164	2.8738	7.289	A	65.82
CONTROL POSITIVO 120	0	0.9883	-3.021	1.8048	6.248	A	63.56
CONTROL POSITIVO 121	0	0.9724	-3.0606	1.7295	6.291	A	63.65
CONTROL POSITIVO 122	0	1.0024	-3.0075	1.8797	6.334	A	63.75
CONTROL POSITIVO 123	0.2887	1.4202	-2.1743	3.8228	10.868	A	73.59
CONTROL POSITIVO 124	0.2887	1.4043	-2.2139	3.7276	10.876	A	73.60
CONTROL POSITIVO 125	0.2887	1.4164	-2.2032	3.8291	11.021	A	73.92
CONTROL POSITIVO 126	0.2887	1.201	-2.6894	3.1469	11.961	A	75.96
CONTROL POSITIVO 127	0.2887	1.1851	-2.729	3.0516	11.969	A	75.97
CONTROL POSITIVO 128	0.2887	1.2151	-2.6759	3.2397	12.079	A	76.21
CONTROL POSITIVO 129	0.2887	1.1973	-2.7183	3.1532	12.114	A	76.29
CONTROL POSITIVO 130	0.2887	1.3407	-2.386	3.5378	11.320	A	74.57
CONTROL POSITIVO 131	0.2887	1.4341	-2.1385	3.8628	10.778	A	73.39
CONTROL POSITIVO 132	0.2887	1.4367	-2.1424	3.8848	10.841	A	73.53
CONTROL POSITIVO 133	0.2887	0.9418	-3.3739	2.4137	13.756	A	79.85

MOLECULA	$3\chi_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 134	0.2887	0.9577	-3.3343	2.509	13.748	A	79.84
CONTROL POSITIVO 135	0.2887	0.9539	-3.3632	2.5153	13.901	A	80.17
CONTROL POSITIVO 136	0.2887	0.9603	-3.3382	2.5309	13.811	A	79.97
CONTROL POSITIVO 137	0.2887	0.9521	-3.3574	2.4954	13.833	A	80.02
CONTROL POSITIVO 138	0.2887	1.1821	-2.7403	3.0917	12.094	A	76.24
CONTROL POSITIVO 139	0.2887	0.9479	-3.3688	2.4528	13.809	A	79.97
CONTROL POSITIVO 140	0.2887	1.1779	-2.7516	3.049	12.069	A	76.19
CONTROL POSITIVO 141	0	0.992	-3.0406	2.7734	8.087	A	67.55
CONTROL POSITIVO 142	0	2.1341	-3.011	2.5618	9.252	A	70.08
CONTROL POSITIVO 143	0.25	1.181	-2.7767	3.0331	11.545	A	75.05
CONTROL POSITIVO 144	0.2887	1.413	-2.1766	3.8202	10.865	A	73.58
CONTROL POSITIVO 145	0.2887	1.3494	-2.3487	3.6304	11.308	A	74.54
CONTROL POSITIVO 146	0.2887	1.3739	-2.3161	3.7068	11.315	A	74.56
CONTROL POSITIVO 147	0.2887	0.9639	-3.3088	2.5481	13.697	A	79.72
CONTROL POSITIVO 148	0.2887	1.3382	-2.3961	3.5867	11.455	A	74.86
CONTROL POSITIVO 149	0.2887	0.9526	-3.3562	2.5043	13.844	A	80.04
CONTROL POSITIVO 150	0.2887	1.3395	-2.4031	3.5977	11.513	A	74.98
CONTROL POSITIVO 151	0.2887	1.4181	-2.2002	3.866	11.075	A	74.03
CONTROL POSITIVO 152	0.2887	1.1989	-2.7153	3.1901	12.167	A	76.40
CONTROL POSITIVO 153	0.2887	1.3545	-2.3724	3.6762	11.519	A	75.00
CONTROL POSITIVO 154	0.2887	0.9689	-3.3325	2.5938	13.907	A	80.18
CONTROL POSITIVO 155	0.2887	1.3556	-2.3305	3.6438	11.249	A	74.41
CONTROL POSITIVO 156	0.2887	1.3485	-2.382	3.6352	11.486	A	74.93
CONTROL POSITIVO 157	0.2887	1.3496	-2.3401	3.6028	11.215	A	74.34
CONTROL POSITIVO 158	0.2887	1.3376	-2.3973	3.5778	11.445	A	74.84
CONTROL POSITIVO 159	0.2887	1.3388	-2.3554	3.5454	11.175	A	74.25
CONTROL POSITIVO 160	0.2887	1.3346	-2.3668	3.5027	11.150	A	74.20
CONTROL POSITIVO 161	0	0.8954	-3.2605	1.6138	6.990	A	65.17
CONTROL POSITIVO 162	0	0.5099	-4.2206	1.0726	10.347	A	72.45
CONTROL POSITIVO 163	0	0.9254	-3.2074	1.7639	7.032	A	65.26
CONTROL POSITIVO 164	0.2887	1.3531	-2.3882	3.5834	11.431	A	74.81
CONTROL POSITIVO 165	0.2887	0.9431	-3.3809	2.4247	13.813	A	79.98
CONTROL POSITIVO 166	0	0.914	-3.2248	1.7076	7.003	A	65.20
CONTROL POSITIVO 167	0	0.5284	-4.1849	1.1664	10.360	A	72.48
CONTROL POSITIVO 168	0.2887	1.4184	-2.2342	3.7808	11.096	A	74.08
CONTROL POSITIVO 169	0.2887	0.7884	-4.1278	1.9754	16.590	A	86.00
CONTROL POSITIVO 170	0.2887	0.9551	-3.3461	2.4554	13.708	A	79.75
CONTROL POSITIVO 171	0.2887	1.299	-2.6108	3.4178	12.190	A	76.45
CONTROL POSITIVO 172	0.2887	1.4343	-2.1608	3.9156	10.986	A	73.84
CONTROL POSITIVO 173	0.2887	1.0484	-3.4576	2.7597	14.960	A	82.47
CONTROL POSITIVO 174	0.2887	1.0674	-5.0039	2.8508	23.040	A	100.00
CONTROL POSITIVO 175	0	1.836	-1.0809	5.4514	4.135	A	58.97
CONTROL POSITIVO 176	0	1.874	-0.8528	5.819	3.686	A	58.00
CONTROL POSITIVO 177	0	1.856	-0.9703	5.6485	3.954	A	58.58
CONTROL POSITIVO 178	0	1.8804	-0.874	5.8859	3.924	A	58.51
CONTROL POSITIVO 179	0	1.869	-0.8989	5.7698	3.826	A	58.30

MOLECULA	$3\chi_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 180	0	1.874	-0.8863	8.017	7.791	A	66.91
CONTROL POSITIVO 181	0	1.871	-0.9057	5.7963	3.911	A	58.49
CONTROL POSITIVO 182	0	1.876	-0.8932	8.0852	7.952	A	67.26
CONTROL POSITIVO 183	0	1.876	-0.8932	5.8456	3.943	A	58.56
CONTROL POSITIVO 184	0	1.8731	-0.9126	5.8229	3.997	A	58.67
CONTROL POSITIVO 185	0	1.8781	-0.9001	8.1534	8.112	A	67.60
CONTROL POSITIVO 186	0	1.8822	-0.89	8.3124	8.351	A	68.12
CONTROL POSITIVO 187	0.2887	1.3284	-2.3719	3.4637	11.097	A	74.08
CONTROL POSITIVO 188	0.2887	1.3273	-2.4138	3.4961	11.367	A	74.67
CONTROL POSITIVO 189	0	0.8965	-3.2186	1.5976	6.749	A	64.65
CONTROL POSITIVO 190	0	1.861	-0.961	5.6978	4.002	A	58.68
CONTROL POSITIVO 191	0	1.8621	-0.9737	5.7111	4.092	A	58.88
CONTROL POSITIVO 192	0	1.866	-0.9485	5.747	4.034	A	58.75
CONTROL POSITIVO 193	0	1.8165	-1.2197	5.3392	4.614	A	60.01
CONTROL POSITIVO 194	0	1.833	-1.1293	5.4752	4.420	A	59.59
CONTROL POSITIVO 195	0	1.8536	-1.0288	5.6451	4.242	A	59.21
CONTROL POSITIVO 196	0	1.866	-0.9736	7.784	7.808	A	66.94
CONTROL POSITIVO 197	0.2887	1.4	-1.9873	1.811	6.283	A	63.64
CONTROL POSITIVO 198	0.2887	1.4566	-1.9466	5.7054	13.130	A	78.49
CONTROL POSITIVO 199	0.2887	1.4531	-2.0209	3.9928	10.439	A	72.65
CONTROL POSITIVO 200	0.2887	1.4726	-1.8889	4.047	9.891	A	71.47
CONTROL POSITIVO 201	0.2887	1.4895	-1.8365	4.1375	9.811	A	71.29
CONTROL POSITIVO 202	0.2887	1.4566	-1.899	1.895	6.067	A	63.17
CONTROL POSITIVO 203	0	1.4414	-1.9579	6.3348	9.605	A	70.84
CONTROL POSITIVO 204	0	1.4435	-1.9444	4.086	5.514	A	61.97
CONTROL POSITIVO 205	0	1.4354	-1.9952	1.8453	1.751	A	53.80
CONTROL POSITIVO 206	0	1.4429	-1.9797	4.0771	5.677	A	62.32
CONTROL POSITIVO 207	0	1.4365	-2.0019	6.2867	9.736	A	71.13
CONTROL POSITIVO 208	0.2887	1.2776	-2.344	3.5184	10.977	A	73.82
CONTROL POSITIVO 209	0.2887	1.3899	-2.2055	6.0594	14.986	A	82.52
CONTROL POSITIVO 210	0.2887	1.4524	-2.0752	6.3094	14.861	A	82.25
CONTROL POSITIVO 211	0.2887	1.1959	-2.6967	3.1573	12.009	A	76.06
CONTROL POSITIVO 212	0.2887	1.1939	-2.7102	5.2203	15.768	A	84.22
CONTROL POSITIVO 213	0.2887	1.1652	-2.7926	1.4577	9.411	A	70.42
CONTROL POSITIVO 214	0.2887	1.4975	-1.7625	1.949	5.528	A	62.00
CONTROL POSITIVO 215	0.2887	1.3218	-2.4078	1.6846	8.086	A	67.55
CONTROL POSITIVO 216	0.2887	1.3739	-2.2824	1.7821	7.698	A	66.71
CONTROL POSITIVO 217	0.2887	1.3853	-2.2731	1.7967	7.694	A	66.70
CONTROL POSITIVO 218	0.2887	1.3911	-2.2741	1.8049	7.722	A	66.76
CONTROL POSITIVO 219	0.2887	1.3706	-2.2898	1.7773	7.722	A	66.76
CONTROL POSITIVO 220	0.2887	1.3815	-2.2845	1.7917	7.737	A	66.79
CONTROL POSITIVO 221	0.2887	1.3747	-2.288	1.7825	7.729	A	66.77
CONTROL POSITIVO 222	0.2887	1.3505	-2.3715	1.7541	8.068	A	67.51
CONTROL POSITIVO 223	0.2887	1.3855	-2.2903	1.7973	7.783	A	66.89
CONTROL POSITIVO 224	0.2887	1.3896	-2.2857	1.8023	7.774	A	66.87
CONTROL POSITIVO 225	0.2887	1.3905	-2.2847	3.7901	11.329	A	74.59

MOLECULA	$3\chi_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 226	0	1.1716	-2.7217	0	1.762	A	53.82
CONTROL POSITIVO 227	0	1.3311	-2.3931	1.7054	3.375	A	57.32
CONTROL POSITIVO 228	0	1.3033	-2.365	1.6429	3.079	A	56.68
CONTROL POSITIVO 229	0.2887	1.0118	-3.5465	1.2385	12.637	A	77.42
CONTROL POSITIVO 230	0	1.3073	-2.4081	1.9268	3.813	A	58.27
CONTROL POSITIVO 231	0	1.3282	-2.3991	1.9336	3.810	A	58.27
CONTROL POSITIVO 232	0	1.0882	-2.8106	1.8398	5.385	A	61.69
CONTROL POSITIVO 233	0	1.1941	-2.6462	1.8709	4.759	A	60.33
CONTROL POSITIVO 234	0	1.3374	-2.3953	1.9377	3.812	A	58.27
CONTROL POSITIVO 235	0	1.0974	-2.8069	1.8439	5.387	A	61.69
CONTROL POSITIVO 236	0	1.2099	-2.6252	1.8836	4.698	A	60.20
CONTROL POSITIVO 237	0	0.9883	-3.0431	1.7892	6.333	A	63.74
CONTROL POSITIVO 238	0	1.3334	-2.4068	1.9706	3.923	A	58.51
CONTROL POSITIVO 239	0	1.3218	-2.412	1.9679	3.928	A	58.52
CONTROL POSITIVO 240	0	1.0934	-2.8184	1.8769	5.499	A	61.93
CONTROL POSITIVO 241	0	1.3426	-2.403	1.9747	3.925	A	58.52
CONTROL POSITIVO 242	0	1.2202	-2.6449	1.9147	4.870	A	60.57
CONTROL POSITIVO 243	0	1.1026	-2.8146	1.881	5.501	A	61.94
CONTROL POSITIVO 244	0	0.9935	-3.0509	1.8262	6.446	A	63.99
CONTROL POSITIVO 245	0.2887	1.3677	-2.3416	3.6677	11.366	A	74.67
CONTROL POSITIVO 246	0.2887	1.3739	-2.3347	5.8747	15.291	A	83.18
CONTROL POSITIVO 247	0.2887	1.3729	-2.3493	3.7116	11.492	A	74.94
CONTROL POSITIVO 248	0.2887	1.3518	-2.3812	3.5725	11.374	A	74.68
CONTROL POSITIVO 249	0.2887	1.3626	-2.3635	3.6631	11.462	A	74.87
CONTROL POSITIVO 250	0.2887	1.3639	-2.3705	3.6741	11.519	A	75.00
CONTROL POSITIVO 251	0.2887	1.3579	-2.3761	3.6115	11.427	A	74.80
CONTROL POSITIVO 252	0.2887	1.3688	-2.3584	3.7022	11.515	A	74.99
CONTROL POSITIVO 253	0.2887	1.3842	-2.3297	3.7297	11.441	A	74.83
CONTROL POSITIVO 254	0.2887	1.3657	-2.3654	3.6125	11.386	A	74.71
CONTROL POSITIVO 255	0.2887	1.3778	-2.3547	3.7141	11.531	A	75.02
CONTROL POSITIVO 256	0.2887	1.3827	-2.3426	3.7422	11.527	A	75.01
CONTROL POSITIVO 257	0.2887	1.4018	-2.3072	3.8396	11.549	A	75.06
CONTROL POSITIVO 258	0.2887	1.3307	-2.5821	3.5932	12.405	A	76.92
CONTROL POSITIVO 259	0.2887	1.3217	-2.6033	3.5557	12.432	A	76.98
CONTROL POSITIVO 260	0.2887	1.3157	-2.6088	3.4932	12.340	A	76.78
CONTROL POSITIVO 261	0.2887	1.3199	-2.5975	3.5359	12.365	A	76.83
CONTROL POSITIVO 262	0.2887	1.3234	-2.5982	3.4941	12.299	A	76.69
CONTROL POSITIVO 263	0.2887	1.3356	-2.5875	3.5957	12.444	A	77.01
CONTROL POSITIVO 264	0.2887	1.3296	-2.5931	3.5332	12.352	A	76.81
CONTROL POSITIVO 265	0.2887	1.408	-2.2188	3.8156	11.064	A	74.01
CONTROL POSITIVO 266	0.2887	1.1888	-2.7339	3.1397	12.157	A	76.38
CONTROL POSITIVO 267	0.2887	1.3444	-2.391	3.6258	11.509	A	74.98
CONTROL POSITIVO 268	0.2887	1.1466	-2.9667	3.0213	13.070	A	78.36
CONTROL POSITIVO 269	0.2887	1.5155	-1.8284	6.5355	14.101	A	80.60
CONTROL POSITIVO 270	0.2887	1.5119	-1.8392	4.2383	10.038	A	71.78
CONTROL POSITIVO 271	0.2887	1.5145	-1.843	4.2602	10.101	A	71.92

MOLECULA	$3\chi_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 272	0.2887	1.5176	-1.8149	4.2684	9.977	A	71.65
CONTROL POSITIVO 273	0.2887	1.497	-1.8659	4.1382	9.973	A	71.64
CONTROL POSITIVO 274	0.2887	1.5217	-1.8047	4.2945	9.978	A	71.65
CONTROL POSITIVO 275	0.2887	1.5237	-1.808	4.3075	10.021	A	71.75
CONTROL POSITIVO 276	0.2887	1.4837	-1.9088	4.0981	10.101	A	71.92
CONTROL POSITIVO 277	0.2887	1.5256	-1.8156	4.3274	10.098	A	71.91
CONTROL POSITIVO 278	0.2887	1.5269	-1.8124	4.3383	10.103	A	71.92
CONTROL POSITIVO 279	0.2887	5.7819	-1.839	4.1897	16.286	A	85.34
CONTROL POSITIVO 280	0.2887	1.5155	-1.8098	4.2554	9.924	A	71.54
CONTROL POSITIVO 281	0.2887	1.5077	-1.8161	4.1897	9.827	A	71.33
CONTROL POSITIVO 282	0.2887	1.5278	-1.7996	4.3335	10.030	A	71.77
CONTROL POSITIVO 283	0.2887	1.5466	-1.7762	4.4397	10.129	A	71.98
CONTROL POSITIVO 284	0.2887	1.517	-1.8502	4.2595	10.140	A	72.01
CONTROL POSITIVO 285	0.2887	1.4947	-1.8424	6.4522	13.992	A	80.36
CONTROL POSITIVO 286	0.2887	1.4885	-1.8493	4.1423	9.883	A	71.45
CONTROL POSITIVO 287	0.2887	1.4937	-1.8571	4.1861	10.009	A	71.72
CONTROL POSITIVO 288	0.2887	1.4967	-1.8289	4.1944	9.885	A	71.45
CONTROL POSITIVO 289	0.2887	1.4947	-1.8238	4.1813	9.832	A	71.34
CONTROL POSITIVO 290	0	1.3028	-2.2725	4.422	7.581	A	66.45
CONTROL POSITIVO 291	0	1.3436	-2.1919	4.4538	7.287	A	65.81
CONTROL POSITIVO 292	0.2887	1.4219	-2.2451	3.7138	11.037	A	73.95
CONTROL POSITIVO 293	0.2887	1.4239	-2.2484	3.7302	11.086	A	74.06
CONTROL POSITIVO 294	0.2887	1.4172	-2.2906	3.6709	11.185	A	74.27
CONTROL POSITIVO 295	0.2887	1.5645	-1.6741	6.5239	13.365	A	79.00
CONTROL POSITIVO 296	0	1.2819	-2.2865	4.3757	7.538	A	66.36
CONTROL POSITIVO 297	0.2887	1.4339	-2.1811	6.0928	14.986	A	82.52
CONTROL POSITIVO 298	0.2887	1.4354	-2.2029	3.8984	11.172	A	74.24
CONTROL POSITIVO 299	0.2887	1.2755	-2.3575	5.6631	14.882	A	82.30
CONTROL POSITIVO 300	0.2887	1.4322	-1.9727	6.2022	14.117	A	80.63
CONTROL POSITIVO 301	0.2887	1.413	-2.1952	6.0094	14.878	A	82.29
CONTROL POSITIVO 302	0.2887	1.4095	-2.2059	3.8031	10.978	A	73.82
CONTROL POSITIVO 303	0.2887	1.4121	-2.2098	3.825	11.041	A	73.96
CONTROL POSITIVO 304	0.2887	1.418	-2.1896	6.1606	15.128	A	82.83
CONTROL POSITIVO 305	0.2887	1.4197	-2.1924	6.211	15.235	A	83.06
CONTROL POSITIVO 306	0.2887	1.4235	-2.1875	6.2599	15.303	A	83.21
CONTROL POSITIVO 307	0.2887	1.3909	-2.2416	3.6859	10.923	A	73.70
CONTROL POSITIVO 308	0.2887	1.4168	-2.1932	3.855	11.017	A	73.91
CONTROL POSITIVO 309	0.2887	1.4209	-2.1886	3.8739	11.034	A	73.94
CONTROL POSITIVO 310	0.2887	1.4218	-2.1876	6.0232	14.877	A	82.29
CONTROL POSITIVO 311	0.2887	1.4031	-2.231	3.7875	11.069	A	74.02
CONTROL POSITIVO 312	0	0.975	-3.0488	1.7839	6.332	A	63.74
CONTROL POSITIVO 313	0	0.9776	-3.0526	1.8025	6.389	A	63.86
CONTROL POSITIVO 314	0	0.9802	-3.0565	1.821	6.446	A	63.99
CONTROL POSITIVO 315	0	0.9837	-3.0457	1.8337	6.419	A	63.93
CONTROL POSITIVO 316	0	0.9878	-3.0391	4.1042	10.455	A	72.69
CONTROL POSITIVO 317	0	0.9916	-3.0342	4.1484	10.515	A	72.82

MOLECULA	$3\chi_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 318	0	0.9937	-3.0279	4.1667	10.519	A	72.83
CONTROL POSITIVO 319	0	0.9849	-3.0399	1.845	6.411	A	63.91
CONTROL POSITIVO 320	0	0.989	-3.0353	1.8589	6.419	A	63.93
CONTROL POSITIVO 321	0	1.3258	-2.2895	3.6034	6.236	A	63.53
CONTROL POSITIVO 322	0	1.331	-2.2973	3.6472	6.362	A	63.81
CONTROL POSITIVO 323	0	1.337	-2.2771	5.9707	10.427	A	72.63
CONTROL POSITIVO 324	0	1.3099	-2.3291	3.5081	6.244	A	63.55
CONTROL POSITIVO 325	0	1.3536	-2.3176	3.6728	6.545	A	64.20
CONTROL POSITIVO 326	0	1.3562	-2.3215	3.6947	6.608	A	64.34
CONTROL POSITIVO 327	0	1.3648	-2.3051	6.0433	10.741	A	73.31
CONTROL POSITIVO 328	0	1.3636	-2.3087	3.7467	6.647	A	64.42
CONTROL POSITIVO 329	0	1.3444	-2.2976	3.6496	6.388	A	63.86
CONTROL POSITIVO 330	0	1.347	-2.3015	3.6716	6.451	A	64.00
CONTROL POSITIVO 331	0	1.3555	-2.2852	6.0191	10.582	A	72.97
CONTROL POSITIVO 332	0	1.3284	-2.3372	3.5544	6.396	A	63.88
CONTROL POSITIVO 333	0	1.3543	-2.2887	3.7235	6.489	A	64.08
CONTROL POSITIVO 334	0	1.4295	-2.1945	3.8422	6.333	A	63.74
CONTROL POSITIVO 335	0	1.4321	-2.1984	3.8641	6.396	A	63.88
CONTROL POSITIVO 336	0	1.438	-2.1782	6.2038	10.489	A	72.76
CONTROL POSITIVO 337	0	1.4368	-2.1817	3.8941	6.371	A	63.83
CONTROL POSITIVO 338	0.2887	1.1507	-2.9577	3.0307	13.047	A	78.31
CONTROL POSITIVO 339	0	1.3588	-2.3253	3.7166	6.670	A	64.48

Tabla 4.20.- Resultados obtenidos en la clasificación del grupo de activos en el proceso de entrenamiento.

	G. ACTIVOS	% ACIERTO	ACIERTO AJUSTADO
ACTIVOS	335	98.82	99.11
INACTIVOS	3	0.88	0.89
INDETERMINADOS	1	0.29	0.00
TOTAL	339		

Tabla 4.21.- Resultados obtenidos del análisis discriminante efectuado a un grupo de 529 moléculas sin actividad antimicrobiana (grupo de entrenamiento inactivo).

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Alfentanil	0	0	-0.0681	7.0292	-0.931	I	47.98
Allylprodine	0	1.9318	-0.1273	2.3007	-6.227	I	36.49
Alphaprodine	0	0	-0.1109	2.2973	-9.183	I	30.07
Benzylmorphine	0	4.1959	0	2.4819	-3.193	I	43.07
Bezitramide	0	0	-0.4072	5.5618	-1.828	I	46.03
Butorphanol	0	0	0	2.6282	-9.156	I	30.13
Codeine	0	4.1721	0	2.4724	-3.245	I	42.96
Desomorphine	0	0	0	2.5616	-9.275	I	29.87
Dextromoramide	0	0	0.2576	4.5435	-7.042	I	34.72
Diampromide	0	0	0.1708	4.2317	-7.157	I	34.47
Dihydrocodeine	0	0	0	2.5237	-9.343	I	29.72
DihydrocodeinoneEnolAcetate	0	2.0739	0.3947	2.4889	-8.342	I	31.90
Dimenoxadol	0	0	-0.3856	1.9729	-8.362	I	31.85
Dimepheptanol	0	0	0	2.2252	-9.878	I	28.56
Dimethylthiambutene	0	2.3449	1.3576	2.2234	-13.327	I	21.08
Dipipanone	0	0	0.3183	2.5765	-10.873	I	26.40
Eptazocine	0	0	0	2.46	-9.457	I	29.48
Ethoheptazine	0	0	-0.0588	2.2956	-9.452	I	29.49
Ethylmorphine	0	4.1877	0	2.4786	-3.211	I	43.03
Etonitazene	0	0	0.9341	4.4532	-10.655	I	26.88
Fentanyl	0	0	0.2305	4.5671	-6.862	I	35.11
Hydromorphone	0	0	0.2204	2.4549	-10.591	I	27.02
Hydroxypethidine	0	0	-0.1725	2.2086	-9.027	I	30.41
Isomethadone	0	0	0.2817	2.1609	-11.430	I	25.20
Levorphanol	0	0	0	2.5873	-9.229	I	29.97
Lofentanil	0	0	-0.3893	4.0937	-4.547	I	40.13
Meperidine	0	0	-0.0655	2.2643	-9.474	I	29.44
Metazocine	0	0	0	2.5022	-9.382	I	29.64
MethadoneHydrochloride	0	0	0.2811	2.1841	-11.385	I	25.29
Metopon	0	0	0.2042	2.4583	-10.502	I	27.21
Myrophine	0	4.4677	-0.0963	2.5108	-2.246	I	45.13
Nalbuphine	0	0	0	2.5254	-9.340	I	29.73
Narceine	0	0	-1.6794	2.0273	-1.664	I	46.39
Normethadone,	0	0	0.284	2.1424	-11.475	I	25.10
Normorphine,	0	4.0188	0	0	-7.898	I	32.86
Norpipanone	0	0	0.3212	2.5348	-10.962	I	26.21
Oxymorphone	0	0	0.0522	2.2142	-10.164	I	27.94
Pentazocine	0	2.3489	1.4001	2.648	-12.778	I	22.27
Phenadoxone	0	0	0.287	2.4515	-10.937	I	26.27
Phenoperidine	0	0	-0.111	2.3399	-9.106	I	30.24
Piminodine	0	0	-0.068	2.4654	-9.101	I	30.25

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Pirtramide	0	0	-0.1676	4.7567	-4.491	I	40.25
Propiram	0	0	0.1465	4.3211	-6.873	I	35.08
Propoxyphene	0	0	-0.1617	2.146	-9.194	I	30.05
Remifentanil	0	0	-0.7757	3.7165	-3.251	I	42.94
Tilidine	0	4.2902	-0.1164	2.0968	-3.148	I	43.17
Aceclofenac	0	0	-1.8338	0	-4.506	I	40.22
Acetaminophen	0	0	-0.1151	0	-13.273	I	21.19
Acetanilide	0	0	-0.0359	0	-13.677	I	20.32
AcetylsalicylicAcid	0	0	-2.6033	0	-0.580	I	48.74
Alclofenac	0	1.6126	-0.8835	0	-6.961	I	34.89
Aminochlorthenoxazin	0	0	-0.1679	0	-13.004	I	21.78
2-Amino-4-picoline	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Aminopropylon	0	0	0.6109	5.0855	-7.874	I	32.91
AmtolmetinGuacil	0	0	-1.0815	0	-8.343	I	31.89
Antipyrine	0	1.6319	0.9676	3.4931	-10.123	I	28.03
Antrafenine	0	0	-0.5709	3.9645	-3.852	I	41.64
Aspirin	0	0	-1.6476	0	-5.455	I	38.16
Benorylate	0	0	-1.3573	0	-6.936	I	34.95
Benoxaprofen	0	0	-0.865	0	-9.448	I	29.50
Benzydamine	0	0	0	2.1622	-9.990	I	28.32
Bermoprofen	0	0	-0.9726	0	-8.899	I	30.69
Bromfenac	0	0	-1.2017	0	-7.730	I	33.22
5-BromosalicylicAcidAcetate	0	0	-1.683	0	-5.275	I	38.55
Bucetin	0	0	-0.1952	0	-12.865	I	22.08
Bufexamac	0	0	-0.417	0	-11.733	I	24.54
Butacetin	0	0	-0.0699	0	-13.504	I	20.69
Carbamazepine	0	3.9943	-0.4735	0	-5.519	I	38.02
Carbiphene	0	0	-0.048	4.0683	-6.334	I	36.25
Chlorthenoxazin(e)	0	0	-0.0954	0	-13.374	I	20.98
Cinchophen	0	0	-0.9345	0	-9.093	I	30.27
Ciramadol	0	0	0	2.1468	-10.018	I	28.26
Clonixin	0	0	-1.0229	0	-8.642	I	31.24
Cropropamide	0	3.2213	-0.1017	3.1965	-2.841	I	43.84
Crotethamide	0	3.1874	-0.1303	3.1271	-2.869	I	43.77
Diflunisal	0	0	-1.3223	0	-7.115	I	34.56
Dioxadrol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Diprocetyl	0	0	-2.6219	0	-0.485	I	48.95
EnfenamicAcid	0	0	-0.9048	0	-9.245	I	29.94
Epirizole	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Etersalate	0	0	-1.2756	0	-7.353	I	34.04
Ethoxazene	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Etodolac	0	0	-0.8203	0	-9.676	I	29.00
Felbinac	0	0	-0.7986	0	-9.787	I	28.76
Floctafenine	0	0	-0.7547	0	-10.011	I	28.28
FlufenamicAcid	0	0	-1.1527	0	-7.980	I	32.68
Fluoresone	0	0	0	0	-13.861	I	19.92

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Fluproquazone	0	0	0.3096	1.6898	-12.415	I	23.06
Flurbiprofen	0	0	-0.9566	0	-8.981	I	30.51
GentisicAcid	0	0	-1.2654	0	-7.405	I	33.93
Ibufenac	0	0	-0.7763	0	-9.900	I	28.51
Indomethacin	0	0	-1.1899	0	-7.790	I	33.09
Isofezolac	0	0	-0.8853	0	-9.344	I	29.72
Isonixin	0	4.6259	-0.6707	0	-3.575	I	42.24
Ketoprofen	0	0	-0.996	0	-8.780	I	30.95
Ketorolac	0	0	-0.8811	0	-9.366	I	29.68
Lefetamine	0	0	-0.4174	0	-11.731	I	24.54
Lornoxicam	0	0	-1.6187	0.7282	-4.299	I	40.67
Loxoprofen	0	0	-0.4382	0	-11.625	I	24.77
Metofoline	0	0	0	2.4347	-9.503	I	29.38
Mofezolac	0	0	-0.9795	0	-8.864	I	30.76
Morazone	0	0	1.9138	6.0669	-12.764	I	22.30
Naproxen	0	0	-0.8075	0	-9.741	I	28.86
Nefopam	0	0	0	2.3056	-9.734	I	28.88
Nifenazone	0	0	0.3184	3.2408	-9.684	I	28.98
Parsalmide	0	0	-0.1919	0	-12.882	I	22.05
Perisoxal	0	0	0	2.2967	-9.750	I	28.84
Phenacetin	0	0	-0.0656	0	-13.526	I	20.65
Phenocoll	0	0	-0.1999	0	-12.841	I	22.13
Phenopyrazone	0	0	-0.5394	1.3056	-8.772	I	30.96
PhenylSalicylate	0	0	-0.5655	0	-10.976	I	26.18
Pipebuzone	0	0	-0.2224	7.7877	1.214	A	52.63
Piperylone	0	0	2.0491	4.1919	-16.811	I	13.52
Propacetamol	0	0	-0.4146	1.9802	-8.201	I	32.20
Ramifenazone	0	0	1.6146	3.558	-15.729	I	15.87
Salacetamide	0	0	-1.0427	0	-8.541	I	31.46
Salicylamide	0	0	-0.6129	0	-10.734	I	26.71
SalicylsulfuricAcid	0	0	-1.3433	0	-7.008	I	34.79
Salsalate	0	0	-2.007	0	-3.622	I	42.14
Salverine	0	0	-0.1577	2.2844	-8.967	I	30.54
Suprofen	0	0	-0.8964	0	-9.288	I	29.84
Talniflumate	0	0	-1.4685	0	-6.369	I	36.18
Tenoxicam	0	0	-1.4466	0.7735	-5.096	I	38.94
Tetrandrine	0	0	0	4.8142	-5.243	I	38.62
Tinoridine	0	2.2067	1.242	0	-16.922	I	13.28
TolfenamicAcid	0	0	-0.9604	0	-8.961	I	30.55
Tropesin	0	0	-0.7723	1.5463	-7.153	I	34.48
Viminol	0	6.0118	0.9412	4.5087	-1.672	I	46.37
Xenbucin	0	0	-0.7593	0	-9.987	I	28.33
Adinazolam	0	0	0.93	2.0801	-14.882	I	17.70
Adrafinil	0	0	-0.6526	0	-10.531	I	27.15
Amitriptyline	0	2.4196	1.4172	2.2416	-13.488	I	20.73
Amoxapine	0	0	0.9342	2.2888	-14.530	I	18.47

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Benactyzine	0	1.6957	0.1818	0	-12.272	I	23.37
Benmoxine	0	0	-0.1265	0	-13.215	I	21.32
Binedaline	0	0	0	4.4812	-5.840	I	37.33
Butacetin	0	0	-0.0699	0	-13.504	I	20.69
Butriptyline	0	0	0	2.3047	-9.735	I	28.87
Caroxazone	0	0	-1.0844	1.2685	-6.058	I	36.85
Clomipramine	0	0	0	2.2387	-9.853	I	28.62
Cotinine	0	0	0.2304	1.8026	-11.809	I	24.37
Desipramine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Dibenzepin	0	0	0.0641	3.9802	-7.063	I	34.67
Dimethazan	0	0	-0.6577	4.5251	-2.406	I	44.78
Dioxadrol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Dothiepin	0	2.4063	1.3963	2.2364	-13.410	I	20.90
Doxepin	0	2.3396	1.2922	2.2104	-13.025	I	21.73
Duloxetine	0	8.3581	0	0	-1.459	I	46.83
Febarbamate	0	0	-3.262	0.8836	4.362	A	59.47
Femoxetine	0	0	0	2.4043	-9.557	I	29.26
Fencamine	0	0	-0.7163	4.7919	-1.629	I	46.46
Fluacizine	0	0	-0.1989	2.1206	-9.050	I	30.36
Fluoxetine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Fluvoxamine	0	0	0.6095	0	-16.970	I	13.17
ImipramineN-Oxide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Indalpine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
IndeloxazineHydrochloride	0	4.3304	0	0	-7.435	I	33.86
Iprindole	0	0	0	2.2871	-9.767	I	28.80
Iproniazid	0	0	-0.1425	0	-13.134	I	21.50
Isocarboxazid	0	0	-0.3076	0	-12.291	I	23.33
Levophacetoperane	0	0	-0.2165	0	-12.756	I	22.32
Maprotiline	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Melitracen	0	2.4096	1.3957	2.2377	-13.400	I	20.92
Metapramine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Metralindole	0	0	3.9133	4.6907	-25.428	I	-5.18
Milnacipran	0.2041	0	0.2446	1.9193	-8.360	I	31.86
Minaprine	0	0	0	2.4004	-9.564	I	29.24
Mirtazepine	0	0	0	4.9237	-5.047	I	39.05
Nefazodone	0	0	0.7649	8.1879	-3.107	I	43.26
Nomifensine	0	0	0	2.3436	-9.666	I	29.02
Nortriptyline	0	2.3884	1.4064	0	-17.492	I	12.04
Octamoxin	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Opipramol	0	4.4614	0	4.908	1.544	A	53.35
Oxaflozane	0	0	0	2.2167	-9.893	I	28.53
Oxypertine	0	0	0	5.0447	-4.831	I	39.52
Piberaline	0	0	0.037	4.2791	-6.390	I	36.13
Pizotyline	0	0	3.2311	2.4456	-25.966	I	-6.35
Protriptyline	0	4.5124	0	0	-7.165	I	34.45
Pyrisuccideanol	0	0	-1.025	1.8803	-5.266	I	38.57

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Quinupramine	0	0	0	2.6674	-9.086	I	30.28
Ritanserine	0	3.7972	4.2681	4.1591	-22.556	I	1.05
Rolipram	0	0	0.1288	0	-14.518	I	18.49
Sertraline	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Sulpiride	0	0	-0.3655	2.3177	-7.847	I	32.97
Tandospirone	0	0	0.2753	6.2893	-4.008	I	41.30
Thiazesim	0	0	0.2066	4.0634	-7.641	I	33.42
Thozalinone	0	0	0.1238	1.6814	-11.483	I	25.08
Tianeptine	0	0	-0.765	1.3106	-7.612	I	33.48
Toloxatone	0	0	-0.3892	1.5356	-9.126	I	30.19
Tranlycypromine	0.2357	0	0	0	-10.034	I	28.22
Venlafaxine	0	0	0	2.1681	-9.980	I	28.34
Viloxazine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Acetohexamide	0	0	-0.8523	0	-9.513	I	29.36
1-Butyl-3-metanilylurea	0	0	-0.7307	0	-10.133	I	28.01
Carbutamide	0	0	-0.722	0	-10.177	I	27.91
Chlorpropamide	0	0	-0.7344	0	-10.114	I	28.05
Glibornuride	0	0	-0.7948	0	-9.806	I	28.72
Gliclazide	0	0	-0.6939	1.8279	-7.049	I	34.70
Glimepiride	0	0	0.2016	1.2028	-12.736	I	22.36
Glipizide	0	0	-1.016	0	-8.678	I	31.17
Gliquidone	0	0	-1.3974	1.2397	-4.513	I	40.21
Glisocepid	0	0	-1.1042	1.7456	-5.103	I	38.93
Glibenclamide	0	0	-1.0214	0	-8.650	I	31.23
Glybuthiazol(e)	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Glybuzole	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Glyhexamide	0	0	-0.6181	0	-10.707	I	26.76
Glymidine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Glypinamide	0	0	-0.7437	1.7497	-6.935	I	34.95
Karanjin	0	7.2049	1.7024	0	-11.855	I	24.27
Phenbutamide	0	0	-0.6923	0	-10.329	I	27.58
Tolazamide	0	0	-0.7107	1.7708	-7.065	I	34.67
Tolbutamide	0	0	-0.6907	0	-10.337	I	27.57
Tolcyclamide	0	0	-0.6412	0	-10.590	I	27.02
Alacepril	0	0	-1.79	1.516	-2.015	I	45.63
Alfuzosin	0	0	0.8561	1.9075	-14.814	I	17.85
Alprenolol	0	1.8462	0	0	-11.121	I	25.87
Amlodipine	0	0	0.4964	0	-16.393	I	14.42
Amosulalol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Arotinolol	0	0	-0.4162	0	-11.737	I	24.53
Barnidipine	0	0	0.4227	1.9821	-12.469	I	22.94
Benazepril	0	0	-1.8389	1.2934	-2.164	I	45.30
Benidipine	0	0	0.4388	2.0169	-12.489	I	22.90
Betaxolol	0.2887	0	0	0	-9.174	I	30.09
Bethanidine	0	0	0.8091	0	-17.988	I	10.96
Bevantolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Bisoprolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Budralazine	0	3.7669	2.7476	0	-22.288	I	1.63
Bufuralol	0	1.934	0.6321	0	-14.216	I	19.15
Bunitrolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Bupranolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Cadralazine	0	0	-0.5809	1.903	-7.491	I	33.74
Candesartan	0	0	-0.6045	1.8109	-7.535	I	33.65
Captopril	0	0	-0.9934	1.4615	-6.177	I	36.60
Carazolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Carmoxirole	0	2.367	0.5898	2.5181	-8.850	I	30.79
Carteolol	0	0	0.0362	0	-14.045	I	19.52
Carvedilol	0	6.1514	0.8875	0	-9.261	I	29.90
Cetamolol	0	0	-0.2183	0	-12.747	I	22.34
Ciclosidomine	0	0	0.0509	2.0171	-10.510	I	27.19
Clonidine	0	0	0.7222	0	-17.545	I	11.93
Delapril	0	0	-1.7983	1.43	-2.127	I	45.38
Deserpidine	0	0	-0.8988	2.5123	-4.779	I	39.63
Dihydralazine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Doxazosin	0	0	-0.0834	3.8061	-6.622	I	35.63
Enalapril	0	0	-1.6831	1.3883	-2.789	I	43.95
Epanolol	0	0	-0.1116	0	-13.291	I	21.16
Eprosartan	0	3.4068	0.0266	2.0167	-5.332	I	38.43
Fantofarone	0	9.4028	1.8856	4.1476	-2.105	I	45.43
Felodipine	0	0	0.6835	0	-17.347	I	12.35
Fenoldopam	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Guanabenz	0	1.4088	-0.2459	0	-10.516	I	27.18
Guanacline	0	2.2612	1.5412	2.3501	-14.161	I	19.27
Guanadrel	0	0	-0.0109	0	-13.805	I	20.04
Guanethidine	0	0	0.0806	2.4674	-9.855	I	28.61
Guanfacine	0	0	-0.8188	0	-9.684	I	28.99
Guanochlor	0	0	-0.1567	0	-13.061	I	21.66
Guanoxan	0	0	-0.0579	0	-13.565	I	20.56
Hydracarbazine	0	0	-0.6101	0	-10.748	I	26.67
Hydralazine	0	1.7045	0.6047	0	-14.416	I	18.71
Imidapril	0	0	-3.1196	1.9177	5.486	A	61.91
Indoramin	0	0	0.0443	2.5069	-9.599	I	29.17
Irbesartan	0	0	1.1799	1.9485	-16.392	I	14.43
Isradipine	0	5.3026	1.399	0	-13.130	I	21.51
Ketanserin	0	0	-0.6457	3.3964	-4.487	I	40.26
Labetalol	0	0	-0.7169	0	-10.203	I	27.86
Lacidipine	0	2.9663	0.3008	0	-10.994	I	26.14
Levcromakalim	0	0	0.0464	1.7172	-11.024	I	26.08
Lisinopril	0	0	-2.3731	1.3736	0.704	A	51.53
Manidipine	0	0	0.3435	4.5213	-7.520	I	33.68
Mecamylamine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Methyldopa	0	0	-1.1157	0	-8.169	I	32.27

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Methyl4-PyridylKetone Thiosemicarbazone	0	0	0.9756	0	-18.838	I	9.12
Metipranolol	0	0	-0.3385	0	-12.134	I	23.67
Metoprolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Moprolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Moveltipril	0	0	-1.4245	1.409	-4.072	I	41.16
Moxonidine	0	0	0.6599	0	-17.227	I	12.61
Naftopidil	0	0	0	4.6363	-5.562	I	37.93
Nebivalol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Nicardipine	0	0	0.2919	1.7719	-12.178	I	23.57
Nifedipine	0	0	-0.048	-0.2998	-14.152	I	19.29
Nipradilol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Nisoldipine	0	0	0.0681	-0.2837	-14.716	I	18.06
Nitrendipine	0	0	0.3466	-0.2782	-16.127	I	15.00
Pargyline	0	0	0	2.1065	-10.090	I	28.10
Penbutolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Perindopril	0	0	-1.52	1.5813	-3.276	I	42.89
Phentolamine	0	0	0.9851	0	-18.886	I	9.01
Pinacidil	0	0	0.4501	0	-16.157	I	14.94
Pindolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Piperoxan	0	0	0	2.4915	-9.401	I	29.60
Prazosin	0	0	0.7896	3.7699	-11.141	I	25.82
Pronethalol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Ramipril	0	0	-1.5789	1.5665	-3.002	I	43.49
Raubasine	0	1.6411	0.4366	2.5684	-9.056	I	30.35
Rescimetol	0	2.9382	-0.8832	2.4946	-0.530	I	48.85
Reserpine	0	0	-0.9218	2.4957	-4.691	I	39.82
Rilmenidine	0.5774	0	0.8091	0	-8.614	I	31.31
Spirapril	0	0	-1.6569	1.4769	-2.764	I	44.00
Sulfinalol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Talinolol	0	0	-0.1581	0	-13.054	I	21.67
Temocapril	0	0	-1.7519	1.3788	-2.455	I	44.67
Tertatolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Timolol	0	0	0	2.0993	-10.103	I	28.08
Todralazine	0	0	-0.5535	0	-11.037	I	26.05
Toliprolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Tolonidine	0	0	0.8016	0	-17.950	I	11.05
Trimazosin	0	0	0.2551	3.5207	-8.860	I	30.77
Urapidil	0	1.4657	-0.0467	7.3746	1.752	A	53.80
Valsartan	0	0	-1.1007	1.5058	-5.550	I	37.96
Acrivastine	0	4.8826	0.1139	2.4468	-2.818	I	43.89
Ahistan	0	0	0.0928	1.8981	-10.937	I	26.27
Alloclamide	0	1.6279	-0.1547	2.2473	-6.634	I	35.60
Astemizole	0	0	0.8909	4.7525	-9.899	I	28.52
Azatadine	0	0	3.0178	2.4226	-24.919	I	-4.08
Azelastine	0	0	0.977	4.0907	-11.523	I	24.99

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Bromodiphenhydramine	0	0	0	2.1286	-10.051	I	28.19
Brompheniramine	0	0	0	2.2171	-9.892	I	28.53
Carbinoxamine	0	0	0	2.0946	-10.111	I	28.06
Cetirizine	0	0	-0.9227	4.8149	-0.535	I	48.84
Cetoxime	0	0	0.1942	2.0599	-11.164	I	25.77
Chlorothen	0	0	0	4.4578	-5.881	I	37.24
Chlorpheniramine	0	0	0	2.2003	-9.922	I	28.47
Cinnarizine	0	4.5139	0	5.1717	2.094	A	54.54
Clobenztropine	0	0	0	2.5552	-9.287	I	29.85
Clocinizine	0	4.4918	0	5.1209	1.970	A	54.28
Cyproheptadine	0	4.5212	3.0889	2.4274	-18.565	I	9.71
Deptropine	0	0	0	2.5921	-9.221	I	29.99
Dimethindene	0	0	3.0733	2.2629	-25.488	I	-5.31
Diphenhydramine	0	0	0	2.132	-10.044	I	28.20
Diphenylpyraline	0	0	0	2.3749	-9.610	I	29.15
Ebastine	0	0	0.2474	2.482	-10.680	I	26.82
Embramine	0	0	0	2.1319	-10.045	I	28.20
Emedastine	0	0	1.0937	7.1378	-6.664	I	35.54
Etymemazine	0	0	0	2.2764	-9.786	I	28.76
Fexofenadine	0	0	-0.8652	2.4287	-5.100	I	38.93
Histapyrrodine	0	0	0	5.078	-4.771	I	39.65
Hydroxyethylpromethazine-N	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Hydroxyzine	0	0	0	4.9737	-4.958	I	39.24
Isopromethazine	0	0	0	2.2477	-9.837	I	28.65
Levocabastine	0	0	-0.7414	2.4313	-5.727	I	37.57
Loratadine	0	0	2.3818	1.798	-22.793	I	0.54
Mebhydroline	0	0	0	5.1174	-4.701	I	39.80
Medrylamine	0	0	0	2.1211	-10.064	I	28.16
Methaphenilene	0	0	0	4.6629	-5.514	I	38.03
Methapyrilene	0	0	0	4.524	-5.763	I	37.49
Moxastine	0	0	0	2.1353	-10.039	I	28.21
Orphenadrine	0	0	0	2.1388	-10.032	I	28.23
Pheniramine	0	0	0	2.2211	-9.885	I	28.55
Promethazine	0	0	0	2.2708	-9.796	I	28.74
Pyrrobutamine	0	2.3981	1.398	2.5325	-12.901	I	22.00
Setastine	0	0	0	2.5419	-9.311	I	29.79
Talastine	0	0	0.9346	3.6536	-12.089	I	23.77
Terfenadine	0	0	0	2.4884	-9.407	I	29.59
Thenyldiamine	0	0	0	4.5195	-5.771	I	37.48
Tolpropamine	0	0	0	2.2541	-9.826	I	28.68
Tripelennamine	0	0	0	4.5102	-5.788	I	37.44
Tripolidine	0	2.3317	1.2384	2.511	-12.224	I	23.47
Tritoqualine	0	0	-0.5299	2.1417	-7.324	I	34.11
Zolamine	0	0	0	4.5011	-5.804	I	37.40
Acemetacin	0	0	-1.0926	1.5117	-5.581	I	37.89
Amfenac	0	0	-1.1793	0	-7.844	I	32.98

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Ampiroxicam	0	0	-2.0837	0.8195	-1.764	I	46.17
Bromosaligenin	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
BucloxicAcid	0	0	-1.1178	0	-8.158	I	32.30
Clidanac	0	0	-0.722	0	-10.177	I	27.91
Clopirac	0	0	-0.8136	0	-9.710	I	28.93
Diclofenac	0	0	-0.8893	0	-9.324	I	29.77
Etofenamate	0	0	-0.6318	0	-10.638	I	26.92
Fenbufen	0	0	-1.0868	0	-8.316	I	31.95
FenclozicAcid	0	0	-0.8676	0	-9.435	I	29.53
Fendosal	0	0	-1.1417	0	-8.036	I	32.56
Fentiazac	0	0	-0.8625	0	-9.461	I	29.47
Feprazone	0	1.9426	0.7223	2.9745	-9.339	I	29.73
Flunoxaprofen	0	0	-0.892	0	-9.310	I	29.80
Ibuprofen	0	0	-0.7717	0	-9.924	I	28.46
Indoprofen	0	0	-0.8639	1.7082	-6.396	I	36.12
Isoxicam	0	0	-1.6145	0.743	-4.294	I	40.68
Lonazolac	0	0	-0.8863	0	-9.339	I	29.73
MeclofenamicAcid	0	0	-1.0111	0	-8.703	I	31.11
MetiazinicAcid	0	0	-0.7996	0	-9.782	I	28.77
Mofebutazone	0	0	-0.3315	1.3499	-9.753	I	28.83
NiflumicAcid	0	0	-1.2152	0	-7.661	I	33.37
Oxametacine	0	0	-0.7927	0	-9.817	I	28.70
Oxaprozin	0	0	-0.8604	0	-9.471	I	29.45
Phenylbutazone	0	0	-0.2806	3.0238	-7.017	I	34.77
Piroxicam	0	0	-1.5116	0.7668	-4.777	I	39.63
Pirprofen	0	4.1748	-0.8364	2.1365	0.425	INDETER.	50.92
Proglumetacin	0	0	-1.5301	6.3288	5.273	A	61.44
ProtizinicAcid	0	0	-0.8091	0	-9.733	I	28.88
Sulindac	0	1.9477	1.4193	0	-18.211	I	10.48
Suxibuzone	0	0	-2.8301	2.6635	5.345	A	61.60
TiaprofenicAcid	0	0	-0.9444	0	-9.043	I	30.38
Tolmetin	0	0	-1.0049	0	-8.734	I	31.05
Zaltoprofen	0	0	-0.7752	0	-9.906	I	28.50
Acefylline	0	0	-2.1341	2.1225	0.826	A	51.79
Acetazolamide	0	0	-0.3499	0	-12.076	I	23.79
Althiazide	0	1.7135	0	0	-11.318	I	25.44
Amanozine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Amiloride	0	0	-1.3023	0	-7.217	I	34.34
Amisometradine	0	1.2265	0.1546	2.3225	-8.672	I	31.18
Azosemide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Bendroflumethiazide	0	1.1088	-2.7229	0	1.675	A	53.64
Benzylhydrochlorothiazide	0	2.4571	-0.4575	0	-7.881	I	32.90
Bumetanide	0	0	-1.2549	0	-7.459	I	33.81
Buthiazide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Chloraminophenamide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Chlorazaniil	0	0	0	0	-13.861	I	19.92

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Chlorothiazide	0	0.9768	0	0	-12.411	I	23.07
Clofenamide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Cloпамide	0	0	-0.373	1.9137	-8.532	I	31.48
Cyclopenthiazide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Cyclothiazide	0	4.3225	0	0	-7.447	I	33.84
Disulfamide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
EthacrynicAcid	0	0	-1.0111	0	-8.703	I	31.11
Ethiazide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Ethoxzolanide	0	0	-0.073	0	-13.488	I	20.73
Fenquizone	0	0	-0.3989	0	-11.826	I	24.34
Furosemide	0	0	-1.3069	0	-7.194	I	34.39
Hydracarbazine	0	0	-0.6101	0	-10.748	I	26.67
Hydrochlorothiazide	0	2.3901	-0.4372	0	-8.084	I	32.46
Indapamide	0	0	-0.4304	1.7806	-8.478	I	31.60
Isosorbide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Methazolamide	0	0	-0.4938	1.1863	-9.218	I	30.00
Methyclothiazide	0	0	0	1.017	-12.040	I	23.87
Metochalcone	0	3.2754	-0.1293	0	-8.341	I	31.90
Metolazone	0	0	-0.3129	1.5818	-9.433	I	29.53
Morpholinomethyl theophylline-7	0	0	-0.6732	4.696	-2.021	I	45.61
Muzolimine	0	0	0.225	1.3699	-12.556	I	22.75
Paraflutizide	0	2.355	-0.5477	0	-7.572	I	33.57
Perhexiline	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Piretanide	0	0	-1.2254	1.9161	-4.180	I	40.93
Polythiazide	0	0	0	0.8329	-12.370	I	23.16
Teclothiazide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Theobromine	0	0	-0.8525	1.3023	-7.181	I	34.42
Torsernide	0	0	-0.7821	0	-9.871	I	28.58
Triamterene	0	0	0.2346	0	-15.057	I	17.32
Xipamide	0	0	-0.6653	0	-10.467	I	27.29
Acifran	0	1.0231	-1.8885	0	-2.709	I	44.12
Acipimox	0	0	-1.1594	0	-7.946	I	32.76
Atorvastatin	0	0	1.1866	1.993	-16.347	I	14.53
Azacosterol	0	2.5728	1.6032	5.0264	-9.225	I	29.98
Beclobrate	0	0	-0.3354	0	-12.150	I	23.63
Benzalbutyramide-beta	0	1.9631	0.6976	0	-14.507	I	18.52
Binifibrate	0	0	-2.1008	0	-3.143	I	43.18
Ciprofibrate	0.2041	0	-1.0053	0	-5.419	I	38.24
Clofibrate	0	0	-0.3843	0	-11.900	I	24.18
ClofibricAcid	0	0	-1.007	0	-8.723	I	31.07
Clomestron	0	0	0.3038	0	-15.410	I	16.56
Eritadenine	0	1.3408	-1.499	1.3931	-1.731	I	46.24
Etofibrate	0	0	-1.0966	0	-8.266	I	32.06
Fenofibrate	0	0	-0.5505	0	-11.052	I	26.02
Furazabol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Lovastatin	0	6.7721	0.8643	0	-8.222	I	32.16
Melinamide	0	9.1923	0.1646	0	-1.061	I	47.70
Mytatrienediol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Nicoconate	0	0	-0.3688	0	-11.979	I	24.00
Nicofibrate	0	0	-0.4432	0	-11.600	I	24.83
Oryzanol-gamma	0.1768	5.7206	1.1768	0	-8.506	I	31.54
OxiniacicAcid	0	0	-1.0524	0	-8.492	I	31.57
Phenylbutyramide-alfa	0	0	-0.2466	0	-12.603	I	22.65
Pirifibrate	0	0	-0.5105	0	-11.256	I	25.57
Pirozadil	0	0	-1.2124	0	-7.676	I	33.34
Probucol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Ronifibrate	0	0	-0.9705	0	-8.910	I	30.66
Simvastatin	0	6.7768	0.842	0	-8.101	I	32.42
SultosilicAcid	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Theofibrate	0	1.4392	-0.9362	3.8565	-0.046	I	49.90
Triparanol	0	0	0	2.33	-9.690	I	28.97
Acecarbromal	0	0	-1.738	0	-4.994	I	39.16
Allobarbital	0	2.9414	-1.9853	0	0.632	A	51.37
Amobarbital	0	0	-1.6552	0	-5.417	I	38.25
Amphenidone	0	6.7599	-0.0573	1.5519	-0.761	I	48.35
Apronalide	0	1.658	-1.1369	0	-5.601	I	37.85
Barbital	0	0	-1.7176	0	-5.098	I	38.94
Brallobarbital	0	1.4632	-1.5348	0	-3.860	I	41.62
Brotizolam	0	0	0.8958	0	-18.431	I	10.00
Butabarbital	0	0	-1.5881	0	-5.759	I	37.50
Butallylonal	0	0	-1.3204	0	-7.125	I	34.54
Butethal	0	0	-1.6482	0	-5.452	I	38.17
Butoctamide	0	0	-0.0417	0	-13.648	I	20.38
Carbubarb	0	0	-3.1372	0	2.144	A	54.65
Carfimate	0	0	-0.8687	0	-9.429	I	29.54
Chlorhexadol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Cinolazepam	0	0	-0.5407	1.2747	-8.821	I	30.86
Clomethiazole	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Cyclopentobarbital	0	5.3671	-1.799	0	3.280	A	57.12
Doxylamine	0	0	0	2.1149	-10.075	I	28.14
Ectylurea	0	1.6511	-0.6721	0	-7.982	I	32.68
Enallypropymal	0	1.5289	-1.6648	0.9493	-1.400	I	46.96
Estazolam	0	0	0.9293	0	-18.601	I	9.63
Etaqualone	0	0	0.7117	1.7095	-14.431	I	18.68
Ethinamate	0	0	-0.7687	0	-9.939	I	28.43
Etodroxizine	0	0	0	5.0076	-4.897	I	39.37
Fenadiazole	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Flunitrazepam	0	0	0.0072	1.1061	-11.917	I	24.14
Furfuryl-5-isopropyl barbituric-5Acid	0	0	-1.9389	0	-3.969	I	41.39
Glutethimide	0	0	-0.3172	0	-12.242	I	23.43

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Haloxazolam	0	0	-0.1275	1.8879	-9.831	I	28.67
Hexethal	0	0	-1.5237	0	-6.088	I	36.79
Hexobarbital	0	1.9633	-0.648	1.0385	-5.783	I	37.45
Homofenazine	0	0	0	4.7104	-5.429	I	38.22
Loprazolam	0	1.8162	1.1234	5.6597	-6.766	I	35.32
Meclozamine	0	0	0	2.1368	-10.036	I	28.22
Meparfynol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Mephobarbital	0	0	-1.709	0.9563	-3.431	I	42.56
Methaqualone	0	0	0.6902	1.6782	-14.378	I	18.80
Methyl-4-thiazoleethanol-5	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Narcobarbital	0	0	-1.1695	0.9418	-6.209	I	36.53
Nealbarbital	0	1.5285	-1.8373	0	-2.220	I	45.18
Niaprazine	0	0	-0.0771	4.6908	-5.071	I	39.00
Nitrazepam	0	0	0.3801	-0.2127	-16.180	I	14.89
Novonal	0	1.7617	-0.2061	0	-10.195	I	27.87
Paraldehyde	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Pentobarbital	0	0	-1.6554	0	-5.416	I	38.25
Phenobarbital	0	0	-1.9029	0	-4.153	I	40.99
PhenylmethylbarbituricAcid	0	0	-1.9831	0	-3.744	I	41.88
Piperidione	0	0	0.0278	0	-14.002	I	19.61
Propiomazine	0	0	0.1965	2.2273	-10.876	I	26.40
Proxibarbal	0	1.414	-2.2182	0	-0.447	I	49.03
Pyrrithydione	0	2.8498	-0.2396	0	-8.410	I	31.75
Rilmazafone	0	0	-1.1127	2.6464	-3.447	I	42.52
Secobarbital	0	1.5432	-1.6955	0	-2.921	I	43.66
Sulfonmethane	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Temazepam	0	0	0.0859	1.3986	-11.795	I	24.40
Tetrabarbital	0	0	-1.6125	0	-5.635	I	37.77
Triazolam	0	0	2.4355	2.0129	-22.682	I	0.78
Vinbarbital	0	1.8322	-1.0484	0	-5.794	I	37.43
Zolpidem	0	6.0771	3.8985	3.6528	-18.194	I	10.52

Tabla 4.22.- Resultados obtenidos en la clasificación de grupo de inactivos en el proceso de entrenamiento.

	G. INACTIVOS	% ACIERTO	ACIERTO AJUSTADO
ACTIVOS	15	2.84	2.84
INACTIVOS	513	96.98	97.16
INDETERMINADOS	1	0.19	0.00
TOTAL	529		

La validación de esta función se realizó mediante un grupo de moléculas no utilizadas en la realización del análisis discriminante, siendo los resultados obtenidos los que se indican en las siguientes tablas (Tablas 4.23, 4.24, 4.25 y 4.26), las cuales están realizadas siguiendo las mismas condiciones de nomenclatura que las anteriores.

Tabla 4.23 .- Resultados obtenidos al aplicar la función discriminante obtenida a un grupo de compuestos antimicrobianos no incluidos en el análisis discriminante (grupo test activo).

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 340	0	1.3106	-1.8613	5.4737	7.377	A	66.01
CONTROL POSITIVO 341	0	1.3341	-2.2691	3.6554	6.238	A	63.54
CONTROL POSITIVO 342	0	1.2826	-2.3009	1.6107	2.663	A	55.78
CONTROL POSITIVO 343	0	1.332	-2.264	3.6424	6.185	A	63.42
CONTROL POSITIVO 344	0	8.2292	-2.3504	3.2331	16.127	A	85.00
CONTROL POSITIVO 345	0	1.3051	-2.3655	5.5316	10.045	A	71.80
CONTROL POSITIVO 346	0	1.2633	-2.4198	3.3811	6.410	A	63.91
CONTROL POSITIVO 347	0	3.0295	-1.9796	5.9166	11.324	A	74.57
CONTROL POSITIVO 348	0	1.2648	-2.4387	5.6128	10.504	A	72.79
CONTROL POSITIVO 349	0	1.3549	-2.0095	3.7604	5.132	A	61.14
CONTROL POSITIVO 350	0	1.3208	-2.3114	3.5987	6.332	A	63.74
CONTROL POSITIVO 351	0.2887	1.1404	-2.9718	2.9823	13.017	A	78.25
CONTROL POSITIVO 352	0.2887	1.4018	-2.2239	3.7765	11.011	A	73.90
CONTROL POSITIVO 353	0.2887	1.3582	-2.3598	5.8072	15.274	A	83.15
CONTROL POSITIVO 354	0.2887	1.3318	-2.404	3.51	11.349	A	74.63
CONTROL POSITIVO 355	0.2887	1.3477	-2.3644	3.6052	11.341	A	74.61
CONTROL POSITIVO 356	0.2887	1.3598	-2.3213	3.658	11.233	A	74.38
CONTROL POSITIVO 357	0	1.3464	-2.3592	3.6857	6.770	A	64.69
CONTROL POSITIVO 358	0	0.912	-3.1778	2.6172	8.389	A	68.20
CONTROL POSITIVO 359	0	1.1393	-2.7992	3.0665	7.599	A	66.49
CONTROL POSITIVO 360	0	1.2218	-2.6923	3.2371	7.481	A	66.24
CONTROL POSITIVO 361	0	0.989	-3.1478	1.6078	6.543	A	64.20
CONTROL POSITIVO 362	0.2887	1.2081	-2.7364	5.3274	16.114	A	84.97
CONTROL POSITIVO 363	0.2887	1.1731	-2.7638	3.0209	12.073	A	76.20
CONTROL POSITIVO 364	0	1.1093	-2.8085	2.9493	7.392	A	66.04
CONTROL POSITIVO 365	0	1.2622	-2.4617	3.4135	6.680	A	64.50
CONTROL POSITIVO 366	0	1.2763	-2.4482	3.5063	6.799	A	64.75
CONTROL POSITIVO 367	0.2887	1.1903	-2.721	3.1272	12.071	A	76.20
CONTROL POSITIVO 368	0.2887	1.3458	-2.3781	3.6133	11.422	A	74.79
CONTROL POSITIVO 369	0	1.0697	-3.0451	2.8529	8.368	A	68.16
CONTROL POSITIVO 370	0	1.2252	-2.7022	3.339	7.719	A	66.75
CONTROL POSITIVO 371	0	1.4933	-2.3388	1.9808	3.832	A	58.32
CONTROL POSITIVO 372	0.2887	1.3787	-2.4214	3.7556	11.947	A	75.93
CONTROL POSITIVO 373	0.2887	1.1595	-2.9365	3.0797	13.040	A	78.30
CONTROL POSITIVO 374	0.2887	1.2851	-2.6466	3.3778	12.281	A	76.65
CONTROL POSITIVO 375	0	1.0141	-3.3057	2.6929	9.328	A	70.24
CONTROL POSITIVO 376	0.2887	1.2932	-2.735	3.4076	12.797	A	77.77
CONTROL POSITIVO 377	0.2887	1.1839	-2.7461	3.1116	12.162	A	76.39
CONTROL POSITIVO 378	0	1.3533	-2.2483	3.7378	6.307	A	63.69
CONTROL POSITIVO 379	0	0.9909	-3.0249	1.8233	6.305	A	63.68
CONTROL POSITIVO 380	0.2887	1.4228	-2.1782	3.8448	10.931	A	73.72
CONTROL POSITIVO 381	0.2887	1.2036	-2.6932	3.1688	12.023	A	76.09

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 382	0.2887	1.3566	-2.3464	3.633	11.312	A	74.55
CONTROL POSITIVO 383	0.2887	1.4182	-2.1781	3.7676	10.786	A	73.41
CONTROL POSITIVO 384	0.2887	0.9718	-3.3208	2.6018	13.866	A	80.09
CONTROL POSITIVO 385	0.2887	1.4013	-2.2252	3.7676	11.001	A	73.87
CONTROL POSITIVO 386	0	1.2288	-2.4186	3.4183	6.420	A	63.93
CONTROL POSITIVO 387	0.2887	1.1939	-2.6916	3.1443	11.957	A	75.95
CONTROL POSITIVO 388	0.2887	1.3505	-2.3068	3.598	11.038	A	73.95
CONTROL POSITIVO 389	0.2887	1.3406	-2.3613	3.5653	11.243	A	74.40
CONTROL POSITIVO 390	0.2887	1.3789	-2.3397	3.7526	11.525	A	75.01
CONTROL POSITIVO 391	0.2887	0.9629	-3.3421	2.5528	13.874	A	80.11
CONTROL POSITIVO 392	0.2887	1.3335	-2.4087	3.5351	11.420	A	74.78
CONTROL POSITIVO 393	0	0.9199	-3.2279	1.652	6.928	A	65.04
CONTROL POSITIVO 394	0	0.5112	-4.2276	1.0819	10.401	A	72.57
CONTROL POSITIVO 395	0.2887	1.0184	-3.5106	2.5716	14.850	A	82.23
CONTROL POSITIVO 396	0.2887	1.282	-2.661	3.3689	12.334	A	76.77
CONTROL POSITIVO 397	0.2887	1.312	-2.608	3.5569	12.444	A	77.01
CONTROL POSITIVO 398	0	1.8769	-0.8822	5.8609	3.915	A	58.50
CONTROL POSITIVO 399	0	1.8781	-0.8762	8.176	8.030	A	67.43
CONTROL POSITIVO 400	0	1.881	-0.8806	8.19	8.082	A	67.54
CONTROL POSITIVO 401	0	1.8757	-0.862	5.8355	3.765	A	58.17
CONTROL POSITIVO 402	0	1.859	-0.9542	5.6712	3.917	A	58.50
CONTROL POSITIVO 403	0	1.8486	-1.0439	5.6036	4.238	A	59.20
CONTROL POSITIVO 404	0	1.8619	-0.9836	5.7131	4.146	A	59.00
CONTROL POSITIVO 405	0.2887	1.4899	-1.8682	6.4954	14.194	A	80.80
CONTROL POSITIVO 406	0.5774	1.474	-1.8557	1.9144	10.594	A	72.99
CONTROL POSITIVO 407	0	1.4414	-1.9393	4.073	5.462	A	61.85
CONTROL POSITIVO 408	0	1.284	-2.273	2.1626	3.511	A	57.62
CONTROL POSITIVO 409	0.2887	1.2333	-2.5903	5.5203	15.752	A	84.18
CONTROL POSITIVO 410	0.2887	1.2783	-2.2775	1.611	7.225	A	65.68
CONTROL POSITIVO 411	0.2887	1.3791	-2.28	1.7889	7.706	A	66.72
CONTROL POSITIVO 412	0.2887	1.3758	-2.2874	1.7841	7.730	A	66.78
CONTROL POSITIVO 413	0.2887	1.3755	-2.3155	1.785	7.875	A	67.09
CONTROL POSITIVO 414	0.2887	1.3843	-2.2775	1.7957	7.713	A	66.74
CONTROL POSITIVO 415	0	1.1922	-2.5075	1.3929	3.193	A	56.93
CONTROL POSITIVO 416	0	1.3166	-2.4043	1.9309	3.815	A	58.28
CONTROL POSITIVO 417	0	1.215	-2.6372	1.8777	4.757	A	60.32
CONTROL POSITIVO 418	0	1.3125	-2.4158	1.9638	3.926	A	58.52
CONTROL POSITIVO 419	0	1.1993	-2.6539	1.9079	4.873	A	60.57
CONTROL POSITIVO 420	0	1.2151	-2.633	1.9206	4.812	A	60.44
CONTROL POSITIVO 421	0.2887	1.3703	-2.3455	3.6897	11.429	A	74.80
CONTROL POSITIVO 422	0.2887	1.3818	-2.3281	3.7605	11.484	A	74.92
CONTROL POSITIVO 423	0.2887	1.3706	-2.351	3.7095	11.493	A	74.94
CONTROL POSITIVO 424	0.2887	1.3718	-2.3603	3.6515	11.439	A	74.82
CONTROL POSITIVO 425	0.2887	1.3096	-2.6139	3.4541	12.287	A	76.66
CONTROL POSITIVO 426	0.2887	1.3266	-2.5911	3.5838	12.428	A	76.97
CONTROL POSITIVO 427	0.2887	1.1718	-2.7567	3.01	12.016	A	76.08

MOLECULA	\bar{X}_{CH}^V	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
CONTROL POSITIVO 428	0.2887	1.3455	-2.3491	3.5934	11.238	A	74.39
CONTROL POSITIVO 429	0.2887	1.5093	-1.8353	4.2164	9.976	A	71.65
CONTROL POSITIVO 430	0.2887	1.5022	-1.8736	4.1821	10.099	A	71.92
CONTROL POSITIVO 431	0.2887	1.5243	-1.8086	4.3164	10.041	A	71.79
CONTROL POSITIVO 432	0.2887	1.4904	-1.9025	4.1461	10.164	A	72.06
CONTROL POSITIVO 433	0.2887	1.5454	-1.7767	4.4555	10.158	A	72.04
CONTROL POSITIVO 434	0.2887	1.4911	-1.8532	4.1642	9.946	A	71.59
CONTROL POSITIVO 435	0.2887	1.4629	-1.9228	4.024	10.009	A	71.72
CONTROL POSITIVO 436	0.2887	1.4157	-2.2689	5.8448	14.963	A	82.47
CONTROL POSITIVO 437	0.2887	1.5543	-1.697	4.4429	9.742	A	71.14
CONTROL POSITIVO 438	0.2887	1.44	-2.1574	3.9334	11.009	A	73.89
CONTROL POSITIVO 439	0.2887	1.4069	-2.2021	3.7812	10.916	A	73.69
CONTROL POSITIVO 440	0.2887	1.4156	-2.199	3.8422	11.022	A	73.92
CONTROL POSITIVO 441	0.2887	1.4256	-2.1812	6.2806	15.311	A	83.23
CONTROL POSITIVO 442	0.2887	1.4223	-2.1911	3.8802	11.060	A	74.00
CONTROL POSITIVO 443	0	0.9811	-3.0419	3.9108	10.113	A	71.95
CONTROL POSITIVO 444	0	0.9861	-3.0363	4.0558	10.352	A	72.46
CONTROL POSITIVO 445	0	0.959	-3.0883	1.7087	6.376	A	63.84
CONTROL POSITIVO 446	0	1.3284	-2.2934	3.6253	6.299	A	63.67
CONTROL POSITIVO 447	0	1.3358	-2.2806	3.6772	6.338	A	63.75
CONTROL POSITIVO 448	0	1.3377	-2.3572	3.5775	6.553	A	64.22
CONTROL POSITIVO 449	0	1.3496	-2.3054	3.6935	6.514	A	64.14
CONTROL POSITIVO 450	0	1.4269	-2.1906	3.8202	6.270	A	63.61
CONTROL POSITIVO 451	0	1.4109	-2.2302	3.725	6.278	A	63.62

Tabla 4.24.- Resultados obtenidos en la clasificación del grupo de activos en el proceso de test.

	G. ACTIVOS	% ACIERTO	ACIERTO AJUSTADO
ACTIVOS	112	100.00	100.00
INACTIVOS	0	0.00	0.00
INDETERMINADOS	0	0.00	0.00
TOTAL	112		

Tabla 4.25.- Resultados obtenidos al aplicar la función discriminante obtenida a un grupo de compuestos no antimicrobianos no incluidos en el análisis discriminante (grupo test inactivo).

MOLECULA	$^3X_{CH}^Y$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Anileridine	0	0	-0.0793	2.4412	-9.086	I	30.28
Clonitazene	0	0	0.9232	4.4218	-10.655	I	26.88
Dezocine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Dihydromorphine	0	0	0	2.4846	-9.413	I	29.57
DioxaphetylButyrate	0	0	-0.1753	2.3644	-8.734	I	31.05
Ethylmethylthiambutene	0	2.3762	1.3683	2.3484	-13.112	I	21.55
Hydrocodone	0	0	0.283	2.494	-10.840	I	26.48
Ketobemidone	0	0	0.2928	2.254	-11.320	I	25.43
Meptazinol	0	0	0	2.4311	-9.509	I	29.36
Morphine	0	4.07	0	2.4333	-3.466	I	42.48
Norlevorphanol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Oxycodone	0	0	0.1149	2.2532	-10.414	I	27.40
Phenazocine	0	0	0	2.7036	-9.021	I	30.42
Proheptazine	0	0	-0.1062	2.3285	-9.151	I	30.14
Sufentanil	0	0	0.1716	4.542	-6.606	I	35.66
Acetaminosalol	0	0	-0.8201	0	-9.677	I	29.00
Alminoprofen	0	0	0.2552	0	-15.163	I	17.10
Aminopyrine	0	0	1.7096	5.4254	-12.871	I	22.07
Apazone	0	0	0.1321	4.6737	-6.169	I	36.61
Benzpiperylon	0	0	1.9463	4.2094	-16.255	I	14.72
p-Bromoacetanilide	0	0	-0.0488	0	-13.612	I	20.46
Bumadizon	0	0	-1.56	1.3232	-3.534	I	42.33
Carsalam	0	0	-1.1384	0	-8.053	I	32.52
Clometacin	0	0	-1.1511	0	-7.988	I	32.66
Difenamizole	0	0	-0.0679	3.6382	-7.002	I	34.80
Emorfazone	0	1.6783	0.9454	3.359	-10.181	I	27.91
Ethenzamide	0	0	-0.4592	0	-11.518	I	25.00
Fenoprofen	0	0	-0.8409	0	-9.571	I	29.23
Flupirtine	0	0	-0.5805	0	-10.899	I	26.35
Glafenine	0	0	-0.5954	0	-10.823	I	26.51
Isoladol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
p-Lactophenetide	0	0	-1.1852	0	-7.814	I	33.04
Methotrimeprazine	0	0	0	2.2517	-9.830	I	28.67
Morpholine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
5'-Nitro-2'-propoxyacetanilide	0	0	-0.2788	-0.2689	-12.920	I	21.96
PhenazopyridineHydrochloride	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Phenyramidol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Propyphenazone	0	0	2.0244	3.6505	-17.654	I	11.69
Salicylamide0-AceticAcid	0	0	-1.7544	0	-4.911	I	39.34
Simetride	0	0	-0.2316	3.4406	-6.521	I	35.85

MOLECULA	³ X _{CH} ^V	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Terofenamate	0	0	-0.4848	0	-11.387	I	25.29
Tramadol	0	0	0	2.1678	-9.980	I	28.34
Zomepirac	0	1.7334	0.8139	1.6393	-12.507	I	22.86
Amitriptylinoxide	0	2.2909	1.3168	0	-17.179	I	12.72
Bupropion	0	0	0.0671	0	-14.203	I	19.18
Citalopram	0	0	0	2.1458	-10.020	I	28.26
Demexiptiline	0	4.2585	0.891	0	-12.088	I	23.77
Dimetacrine	0	0	0	2.2556	-9.823	I	28.68
Etoferidone	0	0	0.9053	8.2374	-3.734	I	41.90
Fenpentadiol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
5-Hidroxitriptófano(Oxitriptan)	0	0	-1.0329	0	-8.591	I	31.36
Imipramine	0	0	0	2.2596	-9.816	I	28.70
Iproclozide	0	0	-0.2188	0	-12.744	I	22.34
Lofepamine	0	0	0.1247	2.1037	-10.731	I	26.71
Medifoxanine	0	0	0	2.0382	-10.212	I	27.84
Mianserin	0	0	0	5.0625	-4.799	I	39.59
Moclobemide	0	0	-0.0556	2.2834	-9.490	I	29.41
Nefopam	0	0	0	2.3056	-9.734	I	28.88
Nialamide	0	0	-0.3318	0	-12.168	I	23.59
Noxiptilin	0	0	0.9606	2.0924	-15.016	I	17.41
Paroxetine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Prolintane	0	0	0	2.691	-9.044	I	30.37
Propizepine	0	0	-0.0192	3.9433	-6.704	I	35.45
Rolicyprine	0.236	0	-0.0603	0	-9.727	I	28.89
Roxindole	0	2.3902	1.4865	2.5491	-13.335	I	21.06
Tofenacin	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Trazodone	0	7.3557	0.638	7.9704	8.065	A	67.50
Trimipramine	0	0	0	2.2781	-9.783	I	28.77
L-Tryptophan	0	0	-0.972	0	-8.902	I	30.68
Zimeldine	0	2.2364	1.2169	2.148	-12.906	I	21.99
Acebutolol	0	0	-0.2479	0	-12.596	I	22.66
Ajmaline	0	0	0	4.8299	-5.215	I	38.68
Aranidipine	0	0	-0.9885	-0.3378	-9.422	I	29.55
Atenolol	0	0	-0.3575	0	-12.037	I	23.88
Bopindolol	0	2.0586	0.7297	0	-14.529	I	18.47
Bunazosin	0	0	0.2177	4.0214	-7.773	I	33.13
Butofilolol	0	0	-0.1534	0	-13.078	I	21.62
Celiprolol	0	0	-0.3907	1.6492	-8.916	I	30.65
Cicletanine	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Cilazapril	0	0	-1.6351	3.2694	0.333	INDETER.	50.72
Cilnidipine	0	3.554	0.101	-0.2771	-9.599	I	29.17
Clentiazem	0	0	-0.745	3.6929	-3.450	I	42.51
Debrisoquin	0	0	0.1755	1.8912	-11.371	I	25.32
Dilevalol	0	0	-0.7169	0	-10.203	I	27.86
Enalaprilat	0	0	-2.4032	1.3295	0.779	A	51.69
Endralazine	0	1.84	2.5056	1.8191	-20.657	I	5.17

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Flosequinan	0	1.4863	-0.0597	1.6077	-8.473	I	31.61
Guanazodine	0	0	0.073	0	-14.233	I	19.11
Guanoxabenz	0	1.3577	-0.3524	0	-10.048	I	28.19
Lercanidipine	0	0	0.2384	1.8969	-11.681	I	24.65
Lofexidine	0	0	0.8435	0	-18.164	I	10.58
Losartan	0	0	1.9592	2.028	-20.225	I	6.11
Mebutamate	0	0	-1.6785	0	-5.298	I	38.50
Mepindolol	0	2.0589	1.1047	0	-16.441	I	14.32
Mibefradil	0	0	-0.3461	2.2977	-7.982	I	32.68
Nadolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Nilvadipine	0	0	-1.2518	-0.3333	-8.071	I	32.48
Oxprenolol	0	1.6788	0	0	-11.370	I	25.33
Pempidine	0	0	0	2.5174	-9.355	I	29.70
Pildralazine	0	0	0	1.8174	-10.608	I	26.98
Propranolol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Quinapril	0	0	-1.7974	1.3906	-2.202	I	45.22
Rescinnamine	0	2.9912	-0.8805	2.5008	-0.454	I	49.01
Semotiadil	0	0	0.0222	3.9286	-6.942	I	34.94
Sotalol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Syrosingopine	0	0	-2.0112	2.4667	0.815	A	51.77
Terazosin	0	0	0.0907	3.9133	-7.319	I	34.12
Tiamenidine	0	0	0.8226	0	-18.057	I	10.81
Tilisolol	0	1.6613	0.5467	1.4975	-11.504	I	25.03
Trandolapril	0	0	-1.568	1.5865	-3.022	I	43.44
Antazoline	0	0	1.0878	2.3537	-15.197	I	17.02
Bamipine	0	0	0	5.0184	-4.878	I	39.41
Chlorcyclizine	0	0	0	4.9573	-4.987	I	39.18
Chloropyramine	0	0	0	4.4594	-5.879	I	37.24
Clemastine	0	0	0	2.4499	-9.475	I	29.44
Clemizole	0	0	0	2.4996	-9.386	I	29.63
Clobenzepam	0	0	0.0056	3.8726	-6.957	I	34.90
Doxylamine	0	0	0	2.1149	-10.075	I	28.14
Epinastine	0	0	0.6335	2.1817	-13.187	I	21.38
Fenethazine	0	0	0	2.2291	-9.871	I	28.58
Isothipendyl	0	0	0	2.243	-9.846	I	28.63
Mequitazine	0	0	0	2.6678	-9.085	I	30.28
Methafurylene	0	0	0	4.3858	-6.010	I	36.96
Methyldiphenhydramine-p	0	0	0	2.1361	-10.037	I	28.22
MetronS	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Phenindamine	0	0	0	2.503	-9.380	I	29.64
Phenyltoloxamine	0	0	0	2.1248	-10.057	I	28.17
Pyrilamine	0	0	0	4.4779	-5.845	I	37.31
Thenaldine	0	0	0	5.0314	-4.855	I	39.46
Thonzylamine	0	0	0	4.3391	-6.094	I	36.78
Butibufen	0	0	-0.7369	0	-10.101	I	28.08
Cinmetacin	0	8.9046	1.039	1.6685	-2.962	I	43.57

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Droxicam	0	0	-2.0606	1.5359	-0.599	I	48.70
Glucametacin	0	0.2213	-1.0194	0	-8.332	I	31.92
Ibuproxam	0	0	-0.3781	0	-11.932	I	24.11
Isoxepac	0	0	-1.0484	0	-8.512	I	31.53
MefenamicAcid	0	0	-0.9274	0	-9.130	I	30.19
Mesalamine	0	0	-1.1854	0	-7.813	I	33.04
Olsalazine	0	0	-2.6253	0	-0.468	I	48.98
Oxyphenbutazone	0	0	-0.4206	2.8536	-6.607	I	35.66
Piketoprofen	0	0	-0.215	0	-12.764	I	22.30
Pirazolac	0	0	-0.968	0	-8.922	I	30.64
Pranoprofen	0	0	-0.8206	0	-9.674	I	29.01
Tiamide	0	0	-0.2037	5.3873	-3.178	I	43.10
Ximoprofen	0	0	0.055	0	-14.141	I	19.31
Ambuside	0	3.6747	-0.0554	0	-8.126	I	32.37
Aminometradine	0	2.8022	-0.5858	2.4283	-2.368	I	44.86
Arbutin	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Benzthiazide	0	2.3554	-0.2138	0	-9.275	I	29.87
Butazolamide	0	0	-0.2272	0	-12.702	I	22.44
Chlortalidone	0	0	-0.4535	0	-11.547	I	24.94
Clorexolone	0	0	-0.1125	1.8403	-9.993	I	28.31
Epithiazide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Etozolin	0	1.4127	0.3522	3.7637	-6.824	I	35.19
Hydroflumethiazide	0	1.0418	-2.7026	0	1.472	A	53.20
Mannitol	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Mefruside	0	0	0	1.1473	-11.807	I	24.38
Meticrane	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Protheobromine	0	0	-0.8971	2.3272	-5.119	I	38.89
Quinethazone	0	0	-0.3498	0	-12.076	I	23.79
Ticrynafen	0	0	-1.368	0	-6.882	I	35.07
Trichlormethiazide	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Tripamide	0	0	-0.3297	1.9795	-8.635	I	31.26
Benfluorex	0	0	-0.3954	0	-11.844	I	24.30
Bezafibrate	0	0	-1.1793	0	-7.844	I	32.98
Clinofibrate	0	0	-1.9589	0	-3.867	I	41.61
EicosapentaenoicAcid	0	21.5848	-0.7154	0	21.815	A	97.34
Fluvastatin	0	3.3492	0.6626	2.1438	-8.434	I	31.70
Gemfibrozil	0	0	-0.7553	0	-10.007	I	28.28
Meglutol	0	0	-2.4236	0	-1.497	I	46.75
Niceritrol	0	0	-2.951	0	1.194	A	52.59
Nicomol	0	0	-2.8132	0	0.491	INDETER.	51.07
Pentaerythritoltetraacetate	0	0	-2.2487	0	-2.389	I	44.82
PravastatinSodium	0	5.8852	-0.3933	0	-3.122	I	43.22
Simfibrate	0	0	-1.0552	0	-8.478	I	31.60
Sitosterol-Beta	0	2.5977	1.6188	0	-18.265	I	10.36
Xenbucin	0	0	-0.7593	0	-9.987	I	28.33
Aprobarbital	0	1.5089	-1.8587	0	-2.140	I	45.36

MOLECULA	$^3X_{CH}^V$	SdsCH	SdssC	SsssN	DELTA P	CLASIF.	PROBAB. %
Butalbital	0	1.5251	-1.8165	0	-2.331	I	44.94
Capuride	0	0	-1.0314	0	-8.599	I	31.34
Chloralose-alfa	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Cyclobarbital	0	1.9742	-0.8352	0	-6.671	I	35.52
Doxefazepam	0	0	-0.564	1.2159	-8.807	I	30.89
Ethchlorvynol	0	2.609	0	0	-9.990	I	28.32
Etomidate	0	0	-0.3354	0	-12.150	I	23.63
Flurazepam	0	0	0.3624	3.9938	-8.561	I	31.42
Heptabarbital	0	2.0054	-0.8129	0	-6.738	I	35.38
Hexapropymate	0	0	-0.711	0	-10.233	I	27.79
IsovalerylDiethylamide	0	0	0.2824	1.875	-11.945	I	24.08
Lormetazepam	0	0	-0.0704	1.3648	-11.059	I	26.00
Mecloqualone	0	0	0.5213	1.5463	-13.752	I	20.16
Methitural	0	0	-0.3695	0	-11.976	I	24.01
Methyprylon	0	0	0.0295	0	-14.011	I	19.59
Perlapine	0	0	1.1469	4.8279	-11.070	I	25.98
Phenallymal	0	1.4881	-2.0367	0	-1.263	I	47.26
Propallylonal	0	0	-1.3741	0	-6.851	I	35.13
Quazepam	0	0	0.2314	0.9706	-13.304	I	21.13
Reposal	0	0	-1.4695	0	-6.364	I	36.19
Sulfonethylmethane	0	0	0	0	-13.861	I	19.92
Talbutal	0	1.5289	-1.8158	0	-2.329	I	44.95
Trimetozine	0	0	-0.0625	1.7542	-10.402	I	27.43
Vinylbital	0	1.3238	-1.9393	0	-2.003	I	45.65

Tabla 4.26.- Resultados obtenidos en la clasificación del grupo de inactivos en el proceso de test.

	G. INACTIVOS	% ACIERTO	ACIERTO AJUSTADO
ACTIVOS	6	2.97	3.00
INACTIVOS	194	96.04	97.00
INDETERMINADOS	2	0.99	0.00
TOTAL	202		

En la tabla 4.27 se representa los valores de expectativas de actividad para los grupos de entrenamiento (E_a) y test (E_{at}), así como la expectativa de inactividad para los mismos grupos, E_i y E_{it} respectivamente. La columna A e I representa el número de moléculas activas e inactivas respectivamente dentro de un mismo intervalo de ΔP

Tabla 4.27.- Valores de expectativa de actividad e inactividad obtenidos para los grupos de entrenamiento y test.

INTERVALOS	A	I	TEST A	TEST I	Ea	Ei	Eat	Eit
-26 a -24	0	4	0	0	0	0.007782101	0	0
-24 a -22	0	4	0	0	0	0.007782101	0	0
-22 a -20	0	0	0	2	0	0	0	0.010152284
-20 a -18	0	7	0	3	0	0.013618677	0	0.015228426
-18 a -16	0	15	0	4	0	0.029182879	0	0.020304569
-16 a -14	0	17	0	8	0	0.03307393	0	0.040609137
-14 a -12	0	110	0	41	0	0.214007782	0	0.208121827
-12 a -10	0	70	0	34	0	0.13618677	0	0.172588832
-10 a -8	0	127	0	48	0	0.247081712	0	0.243654822
-8 a -6	0	56	0	23	0	0.108949416	0	0.116751269
-6 a -4	0	53	0	10	0	0.10311284	0	0.050761421
-4 a -2	0	33	0	16	0	0.064202335	0	0.081218274
-2 a 0	3	17	0	5	0.008566238	0.032783808	0	0.025380711
0 a 2	6	9	0	6	0.017394541	0.017205211	0	0.030456853
2 a 4	21	3	9	0	0.061587443	0.005496109	0.080357143	0
4 a 6	24	4	7	0	0.070249769	0.007267582	0.0625	0
6 a 8	75	0	29	0	0.221238938	0	0.258928571	0
8 a 10	30	0	8	1	0.088495575	0	0.071067821	0.004737733
10 a 12	99	0	36	0	0.292035398	0	0.321428571	0
12 a 14	57	0	15	0	0.168141593	0	0.133928571	0
14 a 16	19	0	6	0	0.056047198	0	0.053571429	0
16 a 18	3	0	2	0	0.008849558	0	0.017857143	0
18 a 20	0	0	0	0	0	0	0	0
20 a 22	1	0	0	1	0.002949853	0	0	0.005076142
22 a 24	1	0	0	0	0.002949853	0	0	0
24 a 26	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	339	514	112	197				

A continuación se representa el diagrama de distribución farmacológica para los intervalos de valores de ΔP como se observa en la Figura 4.9.

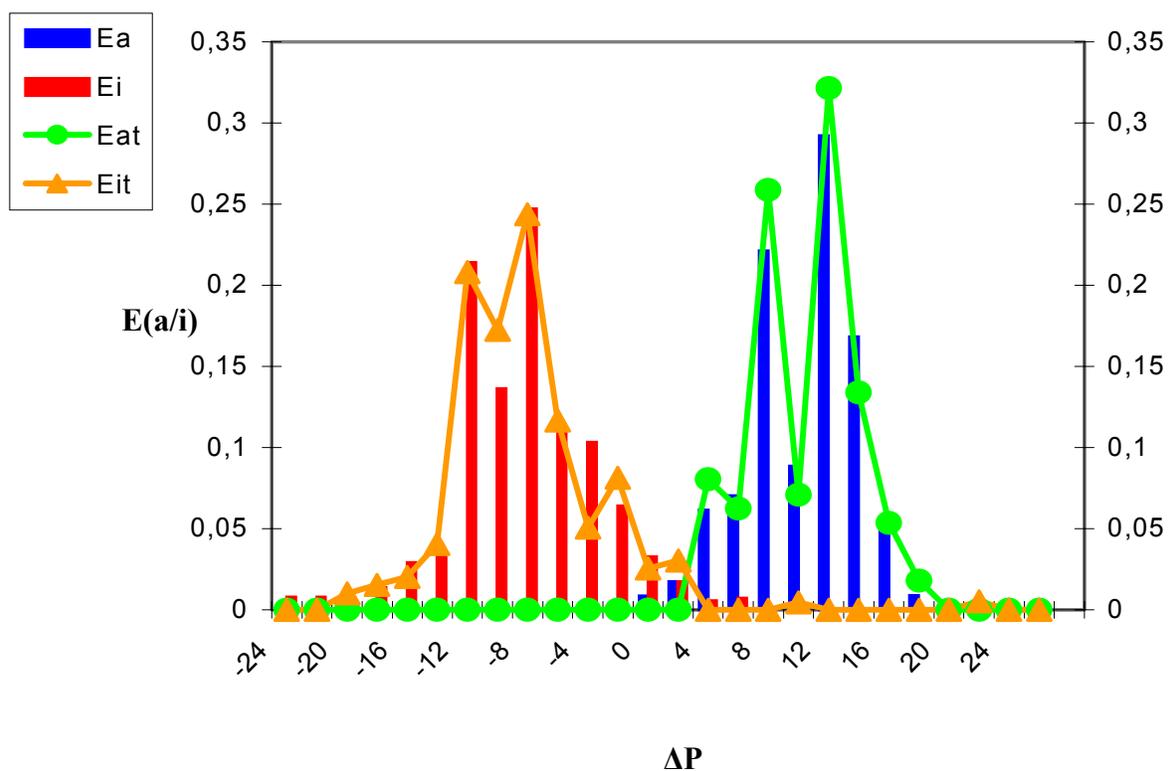


Figura 4.9.- Diagrama de distribución farmacológica de actividad antimicrobiana, obtenido a partir de la ecuación de discriminación, donde Ea/i representa la expectativa de actividad o inactividad, y ΔP , el valor de la función discriminante.

4.4- BÚSQUEDA GUIADA Y SELECCIÓN MOLECULAR

Después de haber obtenido la función discriminante el siguiente paso es realizar una búsqueda guiada de estructuras con teórica actividad antibacteriana.

Haciendo uso de la información topológica que contiene la función de discriminación, utilizamos como parámetros de búsqueda aquellos índices topológico-estructurales que contribuyen de forma positiva en dicha función.

Función discriminante:

$$\Delta P = 16.23446 \chi_{CH}^V + 1.48373 SdsCH - 5.10146 SdssC + 1.78995 SsssN - 13.86063$$

Se observa que tres de los cuatro índices de la función discriminante contribuyen de forma positiva a la misma, estos índices son: χ_{CH}^V , SdsCH, SsssN.

Mientras que la presencia de átomos SdssC influiría de manera negativa.

En la siguiente figura (figura 4.10) se muestran algunos de los fragmentos estructurales derivados de los tres índices que contribuyen de forma positiva a la función discriminante que utilizamos como parámetros de búsqueda de nuevas estructuras con teórica actividad antibacteriana.



Figura 4.10. Fragmentos moleculares empleados como parámetros de búsqueda

RESULTADOS

Para realizar la búsqueda utilizamos el módulo CS ChemFinder 5.1 del paquete CS ChemOffice, el cual nos permite establecer parámetros de búsqueda constituidos por los fragmentos de estructuras antes expuestos, con los cuales el programa realiza una selección de estructuras entre bases de datos de amplia utilización en química, como son Sigma-Aldrich, Fluka, Fisher, Avocado, etc., de forma que nos permite obtener un listado de moléculas que contienen uno o varios de estos fragmentos, proporcionando, además, su correspondiente descripción SMILES, el número C.A.S., el peso molecular y algunas propiedades físicas de dichas moléculas.

Como resultado de la búsqueda se obtuvo un listado con numerosas moléculas, del que fueron excluidas aquellas moléculas en cuya composición formaban parte átomos que por sí mismos pudieran presentar un efecto tóxico, como Hg, Pb, As, Sb, Bi, Ni, etc.. Asimismo se excluyeron las moléculas constituidas por grandes polímeros agregados de macromoléculas. A partir de la información de dichas moléculas existentes en los catálogos comerciales, también excluimos aquellas estructuras para las que se había descrito algún efecto teratógeno, mutagénico, cancerígeno o citotóxico, así como aquellas para las que se hubiera descrito algún tipo de actividad farmacológica.

A cada una de las moléculas restantes se les hizo el cálculo de los correspondientes índices topológico-estructurales a partir del formato SMILES. Posteriormente se les aplicó la función discriminante con el propósito de seleccionar aquellas moléculas que mejores valores de ΔP presentasen para dicha función, las cuales atendidos a estos valores de ΔP son clasificadas como teóricos antibacterianos. El resultado final fueron las siguientes moléculas que se presentan en la tabla 4.28.

RESULTADOS

Tabla 4.28.- Valores de ΔP para las moléculas seleccionadas.

	Nombre molécula	Número CAS	Valor de ΔP
1.	Methylthymol blue, sodium salt	1945-77-3	35.657
2.	Glycine, N,N'-[3H-2,1-benzoxathiol-3-ylidenebis[(6-hydroxy-5-methyl-3,1-phenylene)methylene]]bis[N-(carboxymethyl)-, S,S-dioxide, tetrasodium salt	3618-43-7	28.230
3.	o-Cresolphthalein complexone	2411-89-4	17.953
4.	5-Nitroorotic acid potassium, salt monohydrate	60779-49-9	14.517
5.	Tetrazolium violet	1719-71-7	11.159
6.	1,1'-(Methylenedi-4,1-phenylene) bismaleimide	13676-54-5	9.726
7.	N,N'-(1,3-phenylene)dimalimide)	3006-93-7	8.654
8.	2',3'-Di-O-benzoyluridine	50408-20-3	6.170
9.	Quinoline Yellow	8004-92-0	6.138
10.	2,3,4-Trifluoroaniline	3862-73-5	4.948
11.	Ethylenediaminetetraacetic dianhydride	23911-25-3	3.798
12.	Direct Yellow 27	10190-68-8	2.343
13.	5-Phenyl-2-(2-((5-phenyl-3-(4-sulfobutyl)-2(3H)-benzoxazolylidene)methyl)-1-butenyl)-3-(4-sulfobutyl)benzoxazolium hydroxide, inner salt, sodium salt	35501-76-9	1.672
14.	N-[4-(2-Benzoxazolyl)phenyl]maleimide	16707-41-8	1.438
15.	2-Benzofurancarboxylic acid	496-41-3	1.071

Las estructuras de estas moléculas se detallan a continuación en las figuras de la 4.11 a la 4.25:

RESULTADOS

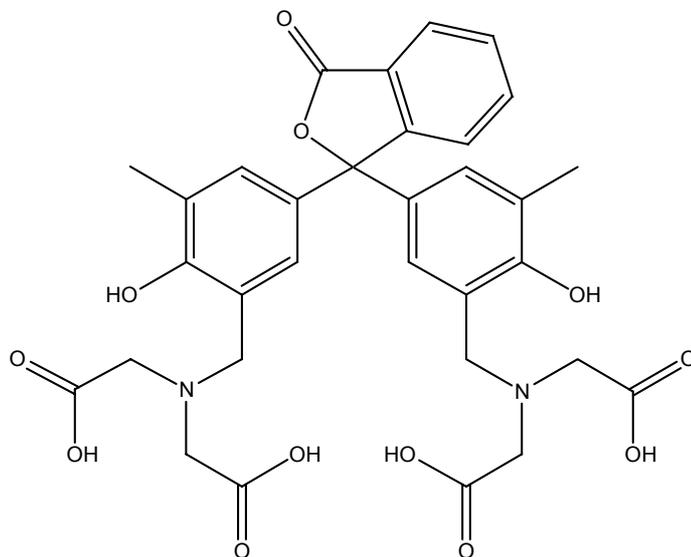


Figura 4.13.- N° C.A.S. 2411-89-4.

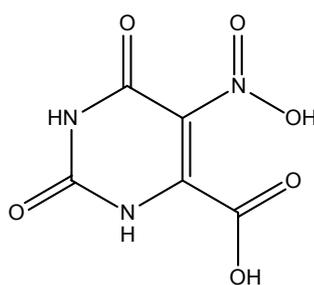


Figura 4.14.- N° C.A.S.60779-49-9.

RESULTADOS

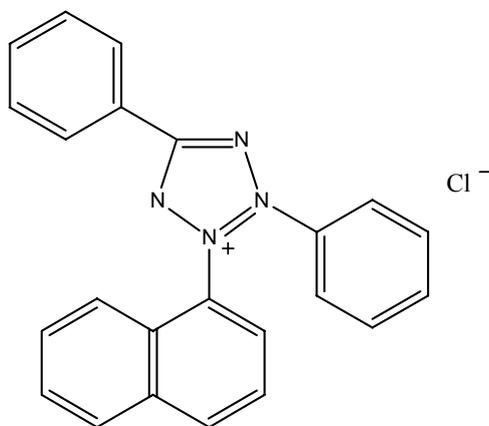


Figura 4.15.- N° C.A.S. 1719-71-7

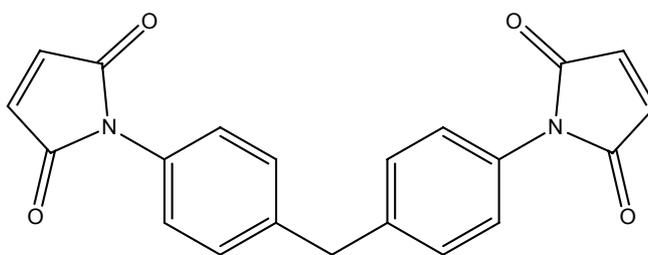


Figura 4.16.- N° C.A.S. 13676-54-5.

RESULTADOS

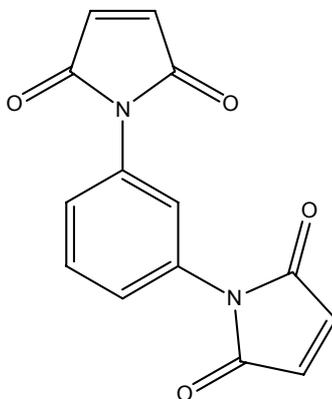


Figura 4.17.- N° C.A.S. 3006-93-7.

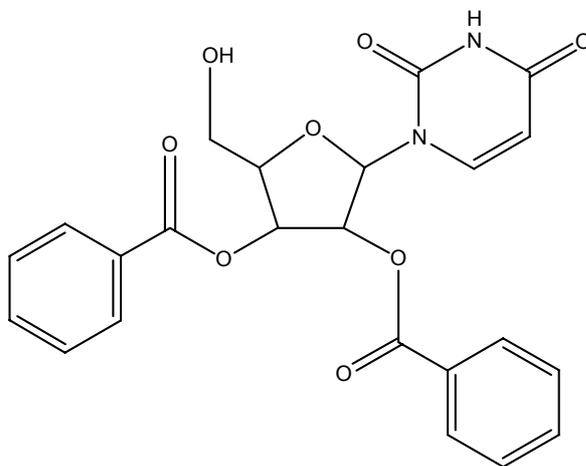


Figura 4.18.- N° C.A.S. 50408-20-3.

RESULTADOS

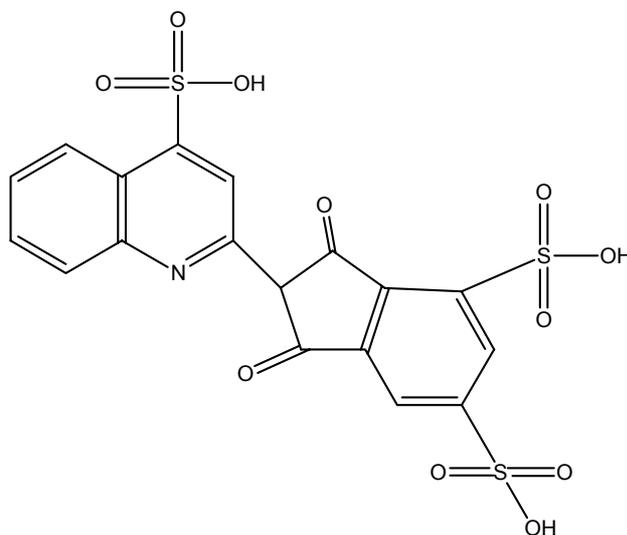


Figura 4.19.- N° C.A.S. 8004-92-0.

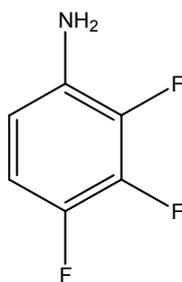


Fig. 4.20.- N° C.A.S. 3862-73-5

RESULTADOS

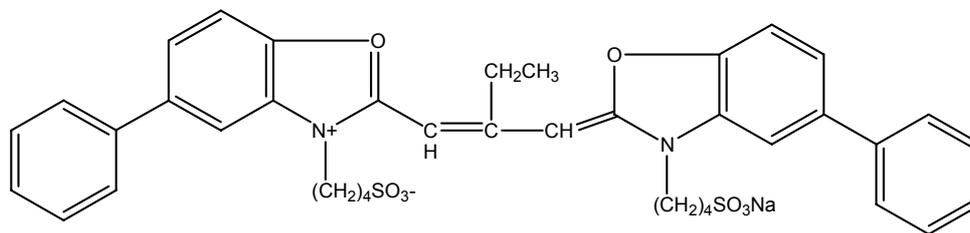


Fig. 4.23. N° C.A.S. 3551-76-9.

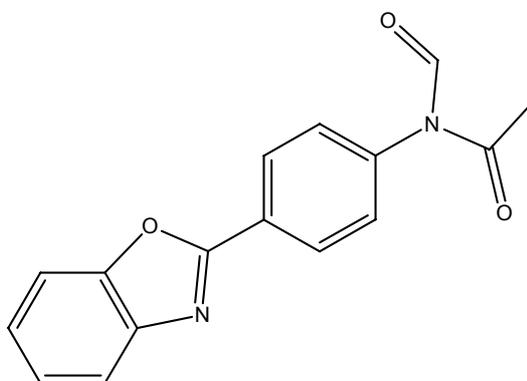


Figura 4.24. N° C.A.S.16707-41-8.

RESULTADOS

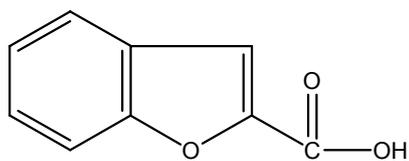


Fig. 4.25. N° C.A.S. 496-41-3

4.5- ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.

Las 15 moléculas que se han seleccionado como teóricos antibacterianos se sometieron a ensayos microbiológicos con el fin de confirmar su actividad antibacteriana.

Antes de realizar este ensayo microbiológico, las moléculas se sometieron a ensayos de solubilidad para poder determinar cuál era el disolvente o mezcla de disolventes más idóneo para cada una de ellas. De igual modo se comprobó la solubilidad de los dos productos de referencia utilizados en los ensayos que en este caso fueron una quinolona de reconocida actividad y espectro antibacteriano, el ácido nalidíxico (C.A.S.: 3374-05-8) y un antimicrobiano con diferente mecanismo de acción que el de las fluorquinolonas, la cefalosporina C (C.A.S.:12567-06-5).

Para poder comprobar que los disolventes utilizados para disolver cada uno de los productos a ensayar no inhibieran el crecimiento bacteriano, se realizaron ensayos microbiológicos con combinaciones de tales disolventes frente a cepas de dos microorganismos, un gram-negativo, *E. coli*, y un gram-positivo, *S. aureus*.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.29.

RESULTADOS

Tabla 4.29.- Resultados de susceptibilidad de *E. coli* y *S. aureus* frente a distintas combinaciones de disolventes.

	AGUA ESTÉRIL (ML)	POLIETILEN GLICOL 400 (ML)	TWEEN 80 (ML)	HCL 0.1 M (ML)	NAOH 0.1M (ML)	DMSO (ML)	CRECIMIENTO
1	10	-	-	-	-	-	+
2	-	10	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	10	-
4	7.5	2.5	-	-	-	-	+
5	5	5	-	-	-	-	-
6	2.5	7.5	-	-	-	-	-
7	7.5	-	-	-	-	2.5	-
8	5	-	-	-	-	5	-
9	2.5	-	-	-	-	7.5	-
10	-	7.5	-	-	-	2.5	-
11	-	5	-	-	-	5	-
12	-	2.5	-	-	-	7.5	-
13	9.5	-	-	-	-	0.5	+
14	9	-	-	-	-	1	+
15	9	0.5	-	-	-	0.5	+
16	8	-	-	-	-	2	+
17	8	1.5	-	-	-	0.5	+
18	8	1	-	-	-	1	+
19	8	0.5	-	-	-	1.5	+
20	7.5	2	-	-	-	0.5	+
21	7	2	-	-	-	1	-
22	7	1	-	-	-	2	-
23	8	-	2	-	-	-	+
24	8	-	-	2	-	-	+
25	8	-	-	-	2	-	+
26	8	2	-	-	-	-	+
27	8	1	1	-	-	-	+

RESULTADOS

En la tabla 4.30 se muestran los disolventes utilizados para cada una de las moléculas que se sometieron a ensayos microbiológicos.

Tabla 4.30.- Disolventes de las 15 moléculas sometidas a ensayos microbiológicos.

<i>Molécula (C.A.S.)</i>	<i>Disolvente</i>	<i>Proporción de disolvente</i>
1. 1945-77-3	Agua	10
2. 3618-43-7	Agua	10
3. 2411-89-4	Agua / DMSO	8:2
4. 60779-49-9	Agua	10
5. 1719-71-7	Agua	10
6. 13676-54-5	Agua / Tween 80 / PEG	8 : 1 : 1
7. 3006-93-7	Agua / Tween 80 / PEG	8 : 1 : 1
8. 50408-20-3	Agua / Tween 80 / PEG	8 : 1 : 1
9. 8004-92-0	Agua	10
10. 3862-73-5	Agua	10
11. 23911-25-3	Agua / Tween 80	8:2
12. 10190-68-8	Agua	10
13. 35501-76-9	Agua	10
14. 16707-41-8	Agua / Tween 80 / PEG	8:1:1
15. 496-41-3	Agua / DMSO	8:2

RESULTADOS

Las cuatro cepas de microorganismos utilizadas para llevar a cabo los ensayos de susceptibilidad antibacteriana fueron dos gram-positivos y dos gram-negativos, las cuales fueron:

- *Enterococcus faecalis* CECT 795 [ATCC 29212]
- *Staphylococcus aureus* CECT 240 [ATCC 6538P]
- *Escherichia coli* CECT 405 [ATCC 10536]
- *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 [ATCC 27853]

Estas cepas de microorganismos fueron proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) dependiente del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

En la tabla 4.31 se reflejan los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenidas para los 15 productos ensayados, frente a las distintas cepas de microorganismos utilizados:

Tabla 4.31.- Valores de Concentración Mínima Inhibitoria para los productos ensayados y los de referencia obtenidos en los ensayos microbiológicos.

Molécula (C.A.S.)	C.M.I. (µg/mL)			
	S. aureus	E. faecalis	E. coli	P. aeruginosa
1. 1945-77-3	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
2. 3618-43-7	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
3. 2411-89-4	>1000	>1000	1000	1000
4. 60779-49-9	>1000	>1000	>1000	>1000
5. 1719-71-7	15.7	125	500	>1000

RESULTADOS

Molécula (C.A.S.)	C.M.I. ($\mu\text{g/mL}$)			
	S. aureus	E. faecalis	E. coli	P. aeruginosa
6. 13676-54-5	125	250	> 500	> 500
7. 3006-93-7	250	250	250	>500
8. 50408-20-3	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
9. 8004-92-0	>1000	>1000	>1000	>1000
10. 3862-73-5	>1000	>1000	>1000	>1000
11. 23911-25-3	>1000	1000	500	>1000
12. 10190-68-8	>1000	>1000	>1000	>1000
13. 35501-76-9	>1000	>1000	>1000	>1000
14. 16707-41-8	15.7	31.3	500	>1000
15. 496-41-3	>1000	>1000	1000	1000
Cefalosporina C	31.3	> 500	31.3	> 500
Ácido Nalidíxico	62.5	1000	15.7	500

En las figuras 4.27, 4.28, 4.29 y 4.30 se muestran las placas de microtitulación para cada una de las cepas de microorganismos, donde se detalla y señala la CMI de los productos activos.

Las columnas de la 1 a la 9 corresponden a productos ensayados, la 10 y la 11 corresponden a los productos de referencia, la cefalosporina C y ácido nalidíxico respectivamente y la columna 12 contiene el control positivo de crecimiento.

RESULTADOS

Las filas de la A a la G contienen diluciones dobles de cada producto hasta obtener siete concentraciones diferentes de cada producto uno por cada fila. Los pocillos desde H1 hasta H11 se utilizan como control negativo.

Las concentraciones de partida en la fila A son distintas para cada uno de los productos, ya que dependen de sus respectivas solubilidades.

La mayoría de los productos comienzan en la fila A con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ hasta llegar a una concentración de 15.7 $\mu\text{g/mL}$ mientras que otros comienzan con concentraciones de 500 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$ y alcanzan a concentraciones en la fila G de 7.85 $\mu\text{g/mL}$ y 3.9 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Únicamente el producto 496-41-3 en la placa de *P. aeruginosa* parte de una concentración de 2000 $\mu\text{g/mL}$ obteniéndose una concentración de 31.3 $\mu\text{g/mL}$ en el pocillo G.

En cuanto a los productos de referencia, para la cefalosporina C se parte siempre de una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ llegando a alcanzar una concentración de 7.85 $\mu\text{g/mL}$ en el pocillo G, mientras que para el ácido nalidíxico partimos de una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ salvo en la placa de *E. faecalis* que se parte de 1000 $\mu\text{g/mL}$ alcanzando concentraciones en la fila G de 7.85 $\mu\text{g/mL}$ y 15.7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

La actividad antimicrobiana de los productos antes citados, que efectivamente se demuestra que poseen en los ensayos in vitro, frente a las diferentes cepas de microorganismos descritas, se ve ratificada por la predicción teórica mostrada por los mismos en sus correspondientes funciones de conectividad, obteniéndose valores positivos de las mismas para las moléculas que han mostrado valores de C.M.I. medios o bajos y negativos para las que presentan valores de C.M.I. elevados, o son inactivas (Tabla 4.32 y 4.33).

RESULTADOS

Tabla 4.32.- Valores de C.M.I. obtenidos para las cuatro moléculas activas, mediante las funciones de conectividad correspondientes a los diferentes microorganismos ensayados.

Molécula (C.A.S.)	Predicción de la C.M.I. ($\mu\text{g/mL}$)			
	S. aureus	E. faecalis	E. coli	P. aeruginosa
1719-71-7	Valor Positivo	Valor Positivo	Valor Positivo	Valor Negativo
13676-54-5	Valor Positivo	Valor Positivo	Valor Negativo	Valor Negativo
3006-93-7	Valor Positivo	Valor Positivo	Valor Positivo	Valor Negativo
16707-41-8	Valor Positivo	Valor Positivo	Valor Positivo	Valor Negativo

Tabla 4.33.- Valores de C.M.I. obtenidos para las cuatro moléculas activas en los ensayos microbiológicos frente a los diferentes microorganismos ensayados.

Molécula (C.A.S.)	Valor obtenido de C.M.I. ($\mu\text{g/mL}$) en ensayos			
	S. aureus	E. faecalis	E. coli	P. aeruginosa
1719-71-7	15.7	125	500	>1000
13676-54-5	125	250	>500	>500
3006-93-7	250	250	250	>500
16707-41-8	15.7	31.3	500	>1000

RESULTADOS

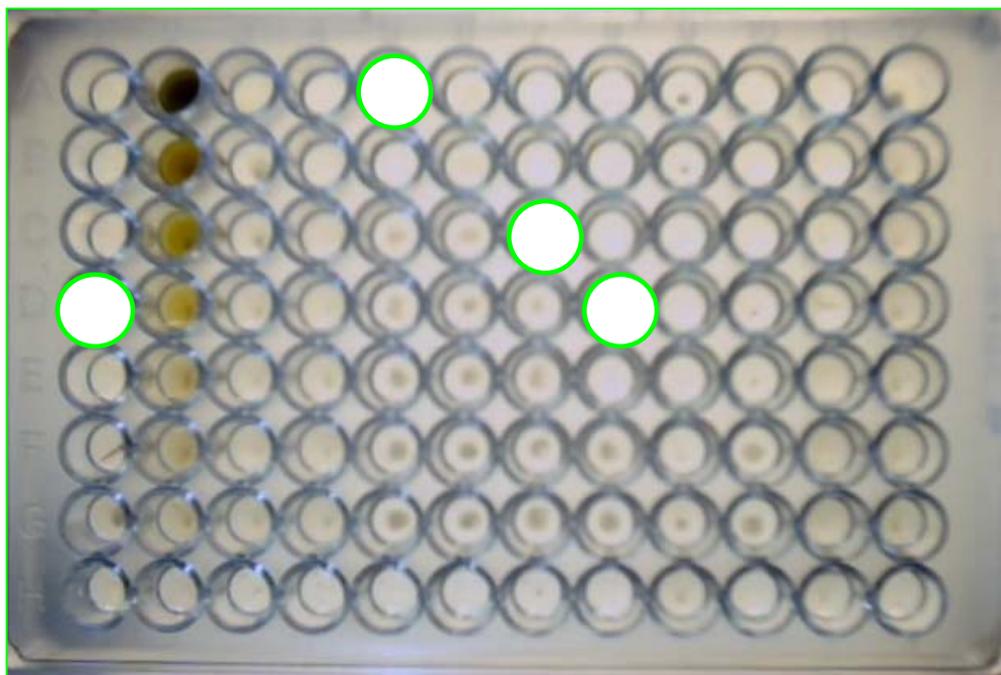


Figura 4.27. Placa de microtitulación para *Staphylococcus aureus* CECT 240.

Para esta cepa de microorganismo resultaron activos los siguientes productos:

- **1719-71-7:** Columna 1; partimos del pocillo A1 con una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo E1 que corresponde a una concentración de 15.7 $\mu\text{g/mL}$.
- **3006-93-7:** Columna 5; partimos del pocillo A5 con una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo B5 que corresponde a 250 $\mu\text{g/mL}$.
- **13676-54-5:** Columna 7; partimos del pocillo A7 con una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo C7 que corresponde a 125 $\mu\text{g/mL}$.
- **16707-41-8:** Columna 8; partimos del pocillo A8 con una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo E8 que corresponde a una concentración de 15.7 $\mu\text{g/mL}$.

RESULTADOS

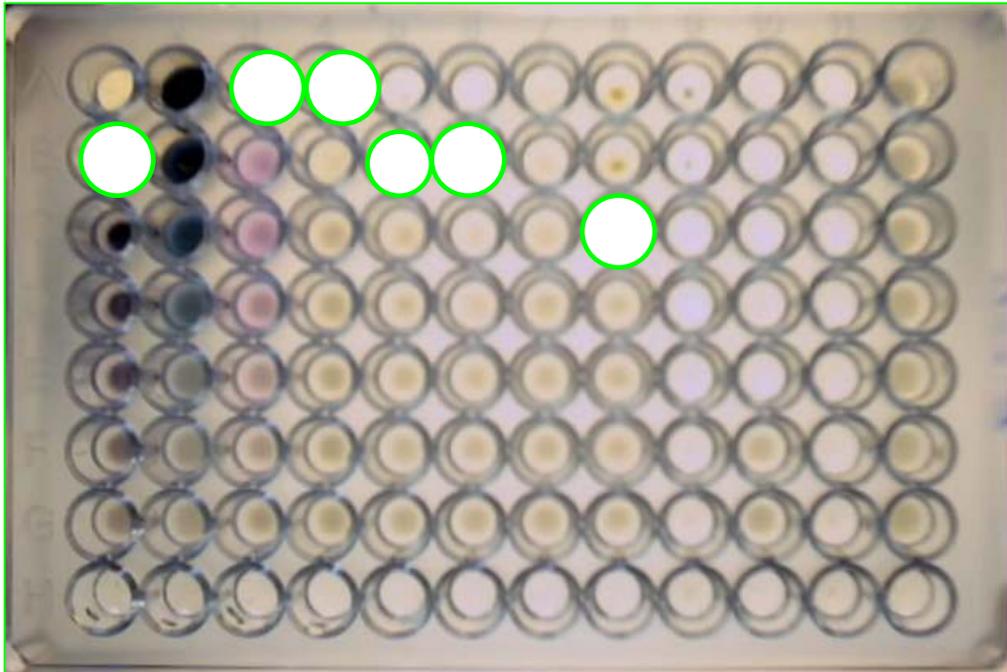


Figura 4.28. Placa de microtitulación para *Escherichia coli* CECT 405.

Para esta cepa de microorganismo resultaron activos los siguientes productos:

- **1719-71-7:** Columna 1; partimos del pocillo A1 con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo B1 que corresponde a 500 $\mu\text{g/mL}$.
- **2411-89-4:** Columna 3; partimos del pocillo A3 con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo A3 que corresponde a 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- **496-41-3:** Columna 4; partimos del pocillo A4 con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo A4 que corresponde a 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- **3006-93-7:** Columna 5; partimos del pocillo A5 con una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo B5 que corresponde a 250 $\mu\text{g/mL}$.

RESULTADOS

- **23911-25-3:** Columna 6; partimos del pocillo A6 con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo B6 que corresponde a 500 $\mu\text{g/mL}$.
- **16707-41-8:** Columna 8; partimos del pocillo A8 con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo B8 que corresponde a 500 $\mu\text{g/mL}$.

RESULTADOS

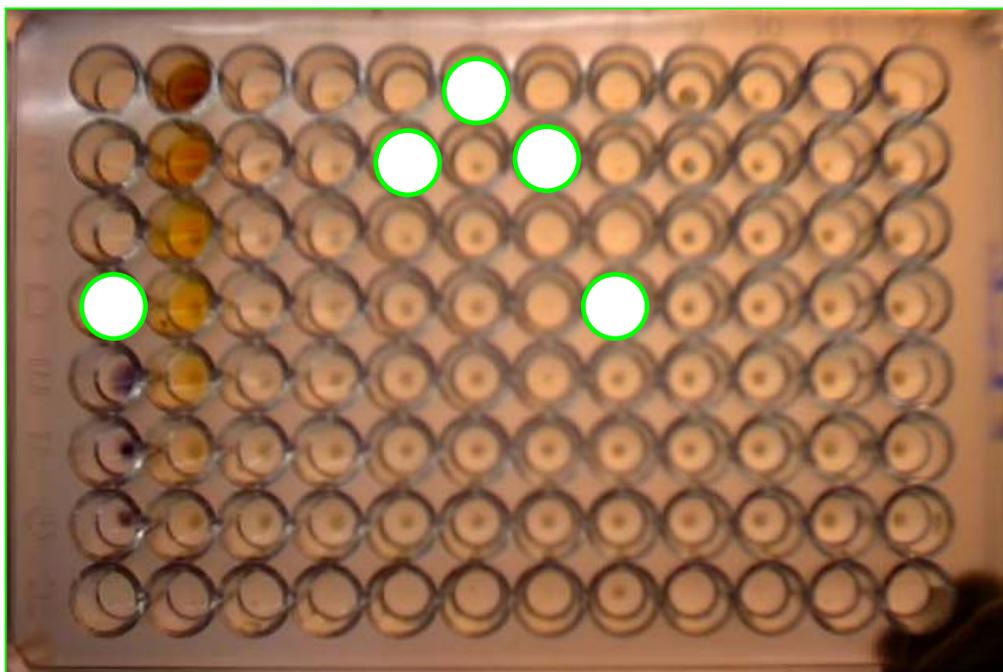


Figura 4.29. Placa de microtitulación para *Enterococcus faecalis* CECT 795

Para esta cepa de microorganismo resultaron activos los siguientes productos:

- **1719-71-7:** Columna 1; partimos del pocillo A1 con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo D1 que corresponde a 125 $\mu\text{g/mL}$.
- **3006-93-7:** Columna 5; partimos del pocillo A5 con una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo B5 que corresponde a 250 $\mu\text{g/mL}$.
- **23911-25-3:** Columna 6; partimos del pocillo A6 con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo A6 que corresponde a 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- **13676-54-5:** Columna 7; partimos del pocillo A7 con una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo B7 que corresponde a 250 $\mu\text{g/mL}$.

RESULTADOS

- **16707-41-8:** Columna 8; partimos del pocillo A8 con una concentración de 250 µg/mL; su CMI se encuentra en el pocillo D8 que corresponde a 31.3 µg/mL.

RESULTADOS

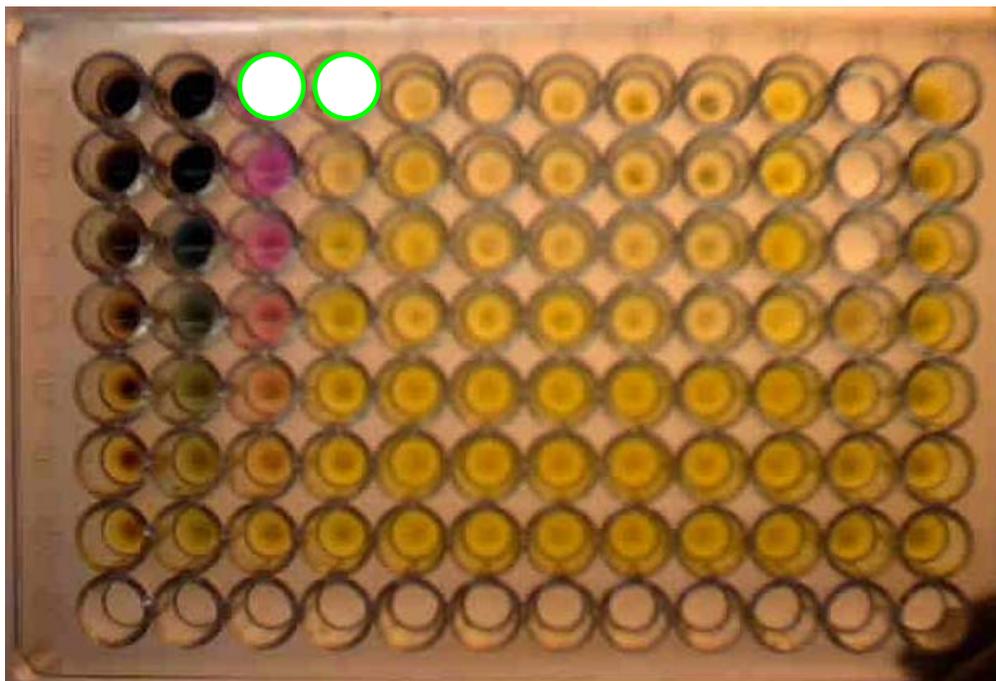


Figura 4.30. Placa de microtitulación para *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108.

Para esta cepa de microorganismo resultó activo el siguiente producto:

- **2411-89-4:** Columna 3; partimos del pocillo A3 con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo A3 que corresponde a 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- **496-41-3:** Columna 4; partimos del pocillo A4 con una concentración de 2000 $\mu\text{g/mL}$; su CMI se encuentra en el pocillo A4 que corresponde a 2000 $\mu\text{g/mL}$.

De esta forma encontramos que los productos 3006-93-7, 1719-71-7 y 16707-41-8 fueron activos frente a todas las cepas de los microorganismos ensayados excepto para *P. aeruginosa*.. El producto 23911-25-3 sólo lo fue para *E. coli* y *E. faecalis*, mientras que el producto 13676-54-5 lo fue solo para *S. aureus* y

RESULTADOS

E. faecalis, los dos microorganismos gram-positivos. De igual forma, se observa que los productos 2411-89-4 y 496-41-3 sólo fueron activos para los dos microorganismos gram-negativos, es decir, para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

RESULTADOS

4.6- ENSAYOS DE TOXICIDAD

Los productos ensayados que han mostrado actividad antibacteriana en los ensayos microbiológicos se someten a ensayos de toxicidad aguda en animales de experimentación, en nuestro caso ratones, administrándoles dichos productos por vía intraperitoneal.

La Dosis Letal 50, DL_{50} , se define como la dosis de producto que mata al 50 % de los animales tratados con ese producto utilizando como vía de administración la intraperitoneal.

En nuestro caso, se comienza por probar una dosis aproximadamente igual o ligeramente superior a la CMI del producto a ensayar, y en función de los resultados obtenidos para esta dosis, se continúa el estudio con dosis inferiores o superiores.

Se deben tabular de forma adecuada los valores correspondientes a cada dosis (D), indicando: el log D, el porcentaje de muertes y los probits correspondientes a este porcentaje de muertes. A continuación se procede a su representación gráfica y al final se determina la dosis correspondiente al probit 5, es decir, la DL_{50} con su correspondiente desviación estándar V, según indica el método.¹⁵¹

En las tablas de la 4.32 a la 4.38 se expresan los resultados obtenidos para los productos ensayados.

RESULTADOS

Tabla 4.32.- Toxicidad aguda intraperitoneal para el producto 2411-89-4.

Dosis (mg/Kg)	log D	N° Muertes	% Muertes
375	2.574	0	0
750	2.875	0	0
1125	3.051	0	0
1500	3.176	4	40
DL₅₀ >1500 mg/Kg			

La DL₅₀ para este producto resultó ser mayor de 1500 mg/Kg, ya que con una dosis de 1500 mg/Kg el porcentaje de muertes es inferior al 50 %, y una mayor dosis dificulta la suspensión de producto y la administración del mismo.

Tabla 4.33.- Toxicidad aguda intraperitoneal para el producto 1719-71-7.

Dosis (mg/Kg)	log D	N° Muertes	% Muertes
250	2.398	10	100
500	2.699	10	100
1000	3.000	10	100
DL₅₀ <250 mg/Kg			

RESULTADOS

Tabla 4.34.- Toxicidad aguda intraperitoneal para el producto **13676-54-5**.

Dosis (mg/Kg)	log D	Nº Muertes	% Muertes	Probit
250	2.398	2	20	4.158
500	2.699	4	40	4.747
1000	3.000	6	60	5.253

La figura 4.31 muestra la recta de regresión para la toxicidad aguda i.p. del producto 13676-54-5, así como la ecuación de la misma y la DL_{50} con su desviación estándar.

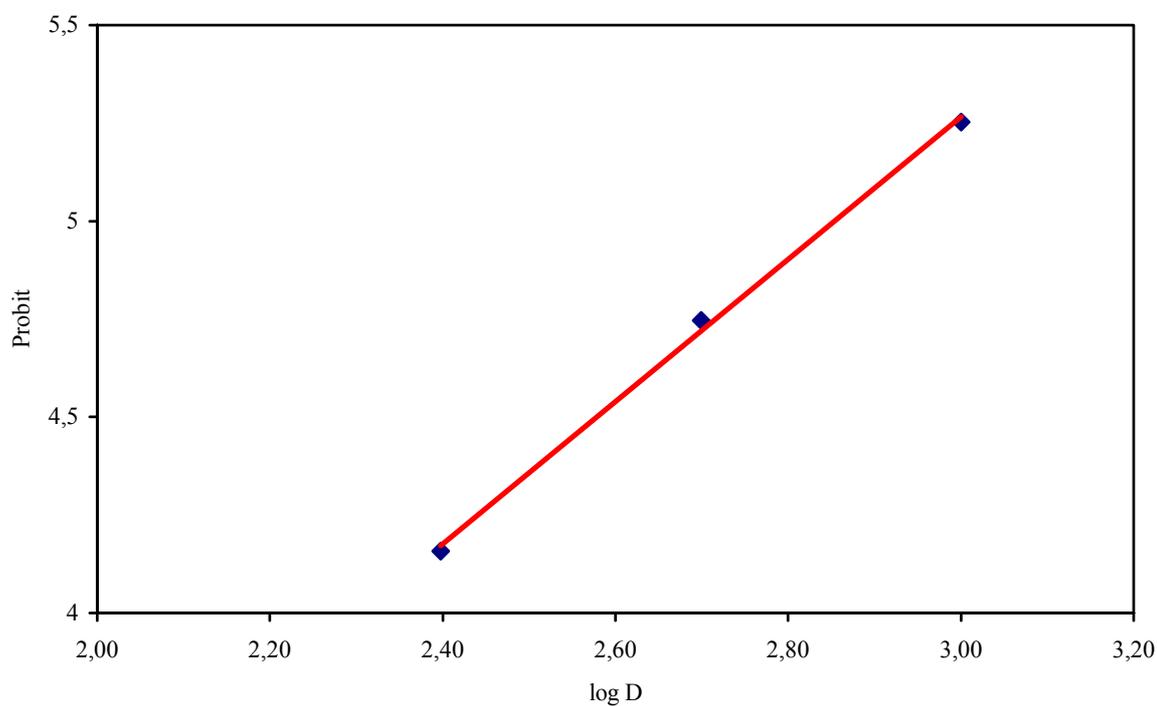


Figura 4.31.- Recta de regresión para la toxicidad aguda i.p. del producto 13676-54-5.

RESULTADOS

Ecuación de la recta y DL₅₀ del producto 13676-54-5:

$$\text{Probit} = -0.1894 + 1.8188 \log D \quad (\text{Eq.4.6})$$

$$r = 0.999$$

$$\text{DL}_{50} = 713 \pm 368 \text{ mg/Kg}$$

Tabla 4.35.- Toxicidad aguda intraperitoneal para el producto 3006-93-7.

Dosis (mg/Kg)	log D	Nº Muertes	% Muertes
250	2.398	10	100
500	2.699	10	100
750	2.875	10	100
DL ₅₀ <250 mg/Kg			

Tabla 4.36.- Toxicidad aguda intraperitoneal para el producto 23911-25-3.

Dosis (mg/Kg)	log D	Nº Muertes	% Muertes
500	2.699	10	100
1000	3.000	10	100
DL ₅₀ <500 mg/Kg			

RESULTADOS

Tabla 4.37.- Toxicidad aguda intraperitoneal para el producto 16707-41-8

Dosis (mg/Kg)	log D	Nº Muertes	% Muertes	Probit
125	2.097	0	2.5	3.040
250	2.398	4	40	4.747
500	2.699	8	80	5.842

La figura 4.32 muestra la recta de regresión para la toxicidad aguda i.p. del producto 16707-41-8, así como la ecuación de la misma y la DL_{50} con su desviación estándar.

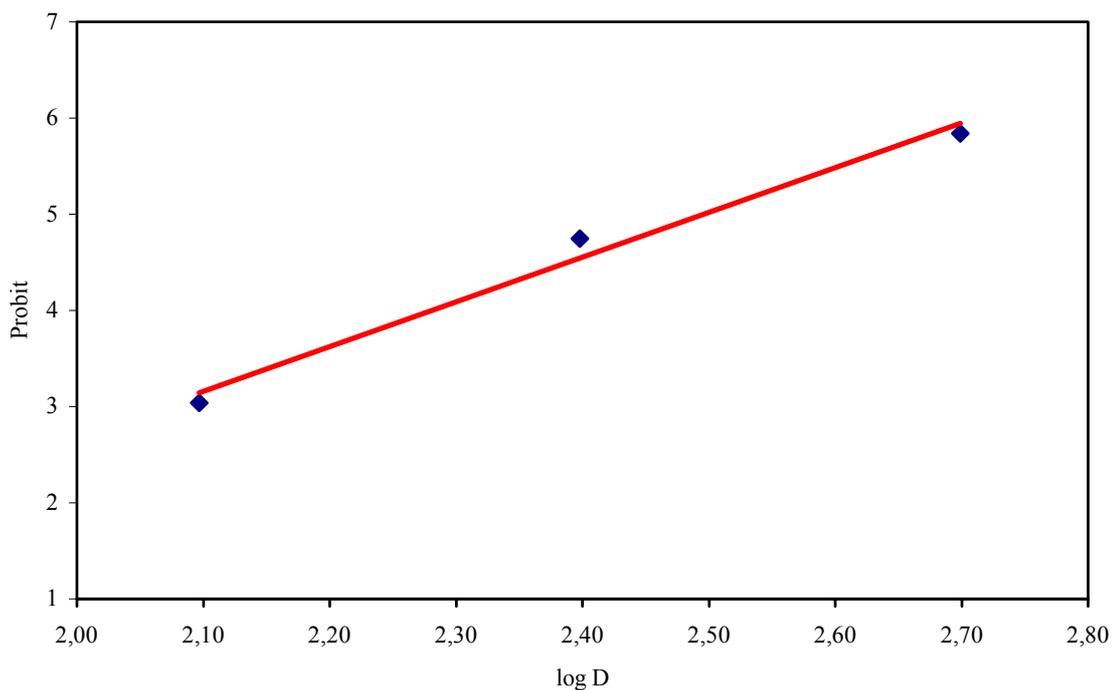


Figura 4.32.- Recta de regresión para la toxicidad aguda i.p. del producto 16707-41-8.

RESULTADOS

Ecuación de la recta y DL₅₀ del producto 16707-41-8:

$$\text{Probit} = - 6.6171 + 4.654 \log D \quad (\text{Eq. 4.7})$$

$$r = 0.992$$

$$\text{DL}_{50} = 313 \pm 51 \text{ mg/Kg}$$

Tabla 4.38.- Toxicidad aguda intraperitoneal para el producto 496-41-3.

Dosis (mg/Kg)	log D	Nº Muertes	% Muertes
1000	3.000	6	60
1250	3.097	10	100
1500	3.177	10	100
DL₅₀ <1000 mg/Kg			

5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

5- DISCUSIÓN

Este apartado se ha estructurado siguiendo el mismo desarrollo expuesto en el anterior capítulo con el objetivo de facilitar el seguimiento, entendimiento y el seguimiento de los resultados obtenidos. De este modo, se ha dividido el presente capítulo en tres subapartados :

1.-Obtención de las funciones de conectividad correspondientes a la Concentración Mínima Inhibitoria de un grupo de antimicrobianos, frente a diferentes cepas de microorganismos, la capacidad predictiva de las mismas y su estabilidad estadística.

2.-Obtención de la ecuación discriminante y selección molecular de compuestos con posible acción antimicrobiana.

3.-Ensayos farmacológicos.

5.1- OBTENCIÓN DE LAS FUNCIONES DE CONECTIVIDAD, SU CAPACIDAD PREDICTIVA Y ESTABILIDAD ESTADÍSTICA.

Se ha procedido a una exhaustiva y minuciosa búsqueda bibliográfica de moléculas con estructura de fluorquinolona las cuales presenten demostrada capacidad antimicrobiana. Esta búsqueda se ha centrado principalmente en conseguir en mayor número posible de datos de la propiedad más significativa de un antimicrobiano, como es la Concentración Mínima Inhibitoria, tratando de concentrar dicha búsqueda en torno a los datos correspondientes a dicha propiedad, frente a microorganismos tipo, representativos de los que con mas frecuencia se consideran agentes causantes de diferentes tipos de infecciones frecuentes en la clínica diaria y que presenta una

DISCUSIÓN

dificultad mas o menos acentuada en cuanto al tratamiento de las mismas. Tales microorganismos son: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Es necesario mencionar también la notable discrepancia que hemos observado en los datos bibliográficos de estas propiedades lo que nos ha obligado a desechar muchos de ellos.

Como quiera que el estudio se ha realizado para cuatro microorganismos distintos, para los cuales se ha obtenido una función de conectividad distinta para cada uno de ellos, vamos a proceder a analizar los resultados obtenidos en este apartado de forma independiente para cada uno de dichos microorganismos.

5.5.1- CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA FRENTE A

E. COLI

En este caso se seleccionó la función de conectividad formada por seis variables la cual fue obtenida con 25 observaciones de CMI de distintas moléculas con estructura de fluorquinolona.

$$\text{CMI}_{E. coli.} = - (0.276406 \pm 0.0548) {}^4\chi + (0.301284 \pm 0.0571) {}^1\chi^V - (1.80695 \pm 0.47817) {}^4\chi_C^V - (1.46632 \pm 0.32829) {}^3\chi_{CH}^V + (0.031717 \pm 0.01188) \text{SsNH}_2 - (0.10716 \pm 0.03884) \text{SaaN} + (0.117986 \pm 0.3611)$$

n = 25	r = 0.84811	SE = 0.151839	DF = 6
F = 7.69	CP = 7	p < 0.0003	

Como puede apreciarse en la ecuación 4.1, en la tabla 4.5 y en las figuras 4.1 y 4.2, con la ecuación seleccionada se obtiene una buena predicción, ya que los valores calculados a partir de ella coinciden en gran medida con los observados, y aunque

DISCUSIÓN

existen discrepancias en algunos de ellos, el 72 % de los resultados se encuentran dentro del intervalo de confianza de $\pm \sigma$, viéndose tan solo excluidos algunos de los valores de CMI mas elevados. Esa discrepancia es debida en gran medida a que para la construcción de la función de conectividad se han utilizado no datos de CMI concretos sino intervalos de ellos, ya que en los estudios y publicaciones de los que han sido extraídos los datos, han utilizado para el cálculo de la CMI el método de las diluciones dobles, de forma que cuando se hace referencia al dato de una concentración correspondiente para una molécula, en realidad el verdadero valor de su CMI puede ser cualquier valor comprendido entre ese intervalo.

En lo referente a los índices que aparecen en la ecuación, es de destacar la contribución positiva del índice ${}^1\chi^V$, indicativo de la importancia del tamaño de la molécula y la presencia de heteroátomos, así como la contribución negativa de las ramificaciones y ciclaciones, manifestadas por la presencia con signo negativo de los índice ${}^4\chi_C^V$ y ${}^3\chi_{CH}^V$. Corroborando lo anterior, aparecen los índices de estado electrotopológico S_{sNH_2} , con contribución positiva, y el S_{aaN} con contribución negativa. Es decir, la presencia de heteroátomos como el N, con ramificaciones y ciclaciones, contribuyen al aumento de la actividad o eficacia frente a E. coli, ya que provocan un descenso del valor de la CMI.

DISCUSIÓN

5.1.2- CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA FRENTE A

P. AERUGINOSA

En el caso de la ecuación seleccionada para P. eruginosa, ésta está formada a su vez también por seis variables , utilizándose para ello 30 observaciones.

$$\text{MIC}_{P. \text{ aeruginosa}} = (0.431638 \pm 0.0933) {}^3\chi - (0.532047 \pm 0.1133) {}^4\chi - (0.769983 \pm 0.08246) {}^2\chi^V + (1.33046 \pm 0.18877) {}^4\chi^V + (0.111603 \pm 0.01902) \text{ SsCH}_3 + (0.638145 \pm 0.14247) \text{ SdO} - (13.9539 \pm 3.0481)$$

n = 30	r = 0.92251	SE = 0.106162	DF = 6
F = 21.9	CP = 7	p < 0.0001	

A la vista de los resultados de la tabla 4.7 y las figuras 4.3 y 4.4, con dicha ecuación se obtiene una buena predicción, como ya lo hacia prever su coeficiente de correlación de 0.922, siendo los valores calculados a partir de la misma, coincidentes en gran medida con los observados y aunque exista discrepancia en algunos de ellos, el 73.3 % de los resultados se encuentran dentro del intervalo de confianza de $\pm \sigma$.

En lo referente a los índices que aparecen en la ecuación, presentan contribución positiva los índices de estado electrotopológico SsCH₃ y SdO lo que indica una disminución de la actividad frente a este microorganismo, con la presencia de ramificaciones y átomos de O de tipo carbonilo y carboxilo en la molécula.

DISCUSIÓN

5.1.3- CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA FRENTE A

S. AUREUS

Para el caso de este microorganismo la función de conectividad seleccionada utilizando los datos correspondientes a 25 moléculas , posee un total de 6 variables.

$$\text{MIC}_{S. aureus} = (0.698416 \pm 0.22287) \chi^V - (3.0172 \pm 0.61466) \text{SdsCH} + (0.296473 \pm 0.055278) \text{SaasC} + (0.0993492 \pm 0.02755) \text{SssNH} - (0.0985801 \pm 0.03241) \text{SaaN} - (1.10416 \pm 0.31275) \text{SdO} + (28.0693 \pm 7.21913)$$

n = 25	r = 0.87140	SE = 0.182462	DF = 6
F = 9.47	CP = 7	p < 0.0001	

En este caso se obtiene un buen coeficiente de correlación con una muy alta significación estadística, lo que se traduce en una buena predicción y con ello notables correspondencias entre los valores observados y los calculados (tabla 4.9), de forma que, como se puede apreciar en las figuras 4.5 y 4.6, son pocos los casos cuya discrepancia supera la desviación estándar de los residuales ($\pm \sigma$), ya que el 80 % de los resultados se encuentran dentro del mismo. De este modo, se produce una buena predicción, especialmente para valores medios y bajos de dicha propiedad.

Respecto a los índices que aparecen en la ecuación, es de destacar la contribución negativa de los índices de estado electrotopológico SdsCH, SaaN y SdO, con lo que la presencia de instauraciones y heteroátomos como N y O en la molécula provocará una disminución del valor de CMI y por lo tanto un aumento en la actividad y en la potencia de la misma frente a este microorganismo.

DISCUSIÓN

5.1.4- CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA FRENTE A E. FAECALIS

En este caso se seleccionó la función de conectividad formada por 5 variables la cual fue obtenida con 22 observaciones de CMI de distintas moléculas con estructura de fluorquinolona.

$$\text{MIC}_{E. \text{ faecalis}} = - (0.306736 \pm 0.05212) {}^4\chi + (1.65118 \pm 0.28353) {}^3\chi^{\text{CV}} - (8.60359 \pm 1.29235) {}^4\chi^{\text{CV}} - (0.0897469 \pm 0.03329) \text{SaaN} - (0.157139 \pm 0.03677) \text{SsssN} + (2.19434 \pm 0.3659)$$

n = 22	r = 0.89092	SE = 0.157594	DF = 5
F = 12.31	CP = 6	p < 0.0001	

Los valores dispuestos en la tabla 4.11, así como en las figuras 4.7 y 4.8, ponen en evidencia la buena predicción obtenida con esta ecuación, ya que los valores calculados a partir de ella, coinciden en su mayor parte con los observados, pues aunque exista cierta discrepancia en algunos de ellos, el 77.3 % de los resultados se encuentran dentro del intervalo de confianza de $\pm \sigma$, presentando una buena predicción, principalmente los valores medios y bajos de dicha propiedad.

En lo referente a los índices que aparecen en la ecuación destaca la contribución negativa del índice ${}^4\chi^{\text{CV}}$ y de los índices de estado electrotopológico SaaN y SsssN. El primero de ellos muestra la influencia de la presencia de carbonos cuaternarios con heteroátomos, información, en cierto modo coincidente con la presencia de átomos de N en anillos aromáticos y en forma de amina terciaria. Todos ellos provocarán un descenso del valor de CMI obtenido, lo que significa un aumento de la actividad antibacteriana de la molécula.

DISCUSIÓN

5.1.5- MATRICES DE INTERCORRELACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CONECTIVIDAD

Las tablas 4.6, 4.8, 4.10 Y 4.12, muestran las matrices de entercorrelación de las funciones de conectividad obtenidas para la CMI frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* respectivamente. En todos los casos los valores del coeficiente de correlación obtenidos son muy inferiores a los de cada una de sus respectivas funciones de conectividad, lo cual ratifica la validez de las mismas y la no interdependencia de las variables seleccionadas en cada caso.

5.1.6- ESTABILIDAD ESTADÍSTICA DE LAS FUNCIONES DE CONECTIVIDAD SELECCIONADAS.

La comparación de los resultados entre los valores obtenidos para cada ecuación seleccionada para cada uno de los microorganismos, antes y después de realizar las eliminaciones de dos o tres moléculas según el número de variables que compongan la función (tablas 4.13, 4.14, 4.15 y 4.16), muestra que las ecuaciones seleccionadas son altamente estables, como queda demostrado por la igualdad de los coeficientes de correlación y de las variables independientes obtenidas, así como por las bajas desviaciones estándar de estos últimos. Los análisis de los residuales obtenidos para el modelo seleccionado, así como para los modelos con 2 o 3 eliminaciones muestran discrepancias mínimas en los valores, así como en su desviación estándar, aspecto que refuerza la calidad predictiva del modelo seleccionado.

5.2- OBTENCIÓN DE LA ECUACIÓN DISCRIMINANTE.

SELECCIÓN MOLECULAR.

5.2.1- OBTENCIÓN DE ECUACIÓN DISCRIMINANTE

En apartados anteriores de este trabajo, hemos puesto de manifiesto la importancia que posee la Conectividad Molecular en la predicción de propiedades características de los antibacterianos, como lo son las CMI frente a diferentes microorganismos. Si bien dicha propiedad puede definir por si misma, la actividad de una molécula frente a un determinado tipo de microorganismo, hemos creído conveniente, buscar una ecuación que, mediante los índices de conectividad, permita discriminar la actividad antibacteriana de modo general y actúe como una verdadera función discriminante que permita la ulterior selección de moléculas con dicha actividad.

De este modo, y con ayuda del paquete informático BMDP 7M se procedió a realizar el análisis lineal discriminante (ALD) que permitiera seleccionar las propiedades o índices de conectividad capaces de distinguir aquellas moléculas que presentan acción antimicrobiana de las que no la presentan (distinguir entre compuestos activos e inactivos).

Como se explicó en el capítulo de resultados, para realizar el proceso de discriminación, se tomaron dos grupos representativos de compuestos, uno de ellos constituido por 451 moléculas con actividad antimicrobiana (del grupo de las fluorquinolonas), entre las cuales se encuentran las 85 utilizadas para la obtención de las funciones de conectividad y otro grupo formado por 731 moléculas para las cuales no se ha descrito dicha actividad terapéutica.

DISCUSIÓN

El conjunto de moléculas citadas se subdividió en dos subgrupos, uno como grupo discriminante, empleando aproximadamente el 70 % de compuestos de cada tipo, concretamente un total de 339 moléculas con actividad antimicrobiana y 529 moléculas sin dicha acción, siendo el resto de moléculas de cada grupo, empleadas en la realización del correspondiente test de validación cruzada que asegure la validez de los resultados obtenidos con la función discriminante seleccionada.

Así pues, realizado el análisis discriminante en la forma y modo ya indicado, se obtuvo la siguiente ecuación discriminante:

$$\Delta P = 16.23446 \chi_{CH}^V + 1.48373 SdsCH - 5.10146 SdssC + \\ + 1.78995 SsssN - 13.86063$$

en la que intervienen índices de valencia e índices tipo de átomo de estado electrotopológico.

El valor de ΔP obtenido en esta función ha permitido clasificar los compuestos en activos, aquellos que tuvieran un valor de $\Delta P > 0.5$, inactivos los que tuvieran un valor de $\Delta P < 0$ y un grupo de clasificación indeterminada para aquellos cuyos valores de ΔP está comprendido entre 0 y 0.5, es decir, aquellos cuya probabilidad de actividades encuentra entre el 50 y 60 %. Este criterio, aunque conduce a una ligera disminución en el porcentaje de acierto de compuestos activos, proporciona un intervalo de confianza que permite garantizar la no inclusión de compuestos inactivos (tablas 4.19 a 4.26), y con ello, minimizar la aparición de posibles falsos positivos con valores bajos de ΔP (próximos a 0). En esta línea se destaca que tanto en el análisis discriminante propiamente dicho como en la posterior prueba de validación, el porcentaje de falsos positivos es muy pequeño, 0.88% y 0.0% respectivamente.

DISCUSIÓN

Como estas condiciones de discriminación restrictivas no se aplica en el caso de las moléculas inactivas, es decir, no se asigna un margen de valores de ΔP en el que se clasificarían las moléculas como indeterminadas, el porcentaje de falsos negativos es un poco más alto en este caso, del orden de 2.84% y del 2.97%, para el análisis discriminante y la posterior validación respectivamente.

Con tan sólo cuatro variables, la función discriminante que se ha obtenido permite realizar una adecuada discriminación tanto en el grupo de moléculas de discriminación (entrenamiento) como en el grupo de moléculas test, de modo que se obtienen porcentajes de acierto del 99.11 % para las moléculas activas del grupo de entrenamiento y del 97.16 % para las inactivas, mientras que en el caso de las moléculas activas del grupo test (validación cruzada) se ha obtenido aciertos del 100 % y del 97 % para las moléculas inactivas del mismo grupo.

En cuanto a los valores de expectancia obtenidos para todos los grupos de moléculas (tabla 4.27) y su correspondiente representación gráfica respecto a los valores de la función discriminante, proporcionan un diagrama de distribución farmacológica (figura 4.9), en la que se aprecia claramente la distribución de las poblaciones de moléculas activas e inactivas a ambos lados del valor 0 de ΔP , no existiendo zonas de solapamiento entre ambas, con los máximos de los valores de moléculas activas e inactivas netamente separadas, lo que refuerza la capacidad discriminante de esta ecuación a la hora de predecir la teórica actividad antimicrobiana de un compuesto que no haya intervenido en el proceso de discriminación.

A la vista del diagrama se puede afirmar que para valores de ΔP superiores a 0.5 tan sólo aparecen moléculas activas, con lo que el intervalo de valores clasificado

DISCUSIÓN

como de indeterminación (0 a +0.5) nos ha permitido asegurar la no existencia de compuestos falsamente activos por encima de 0.5 (falsos positivos).

Este es el objetivo buscado cuando se pretende evitar que en la fase de selección molecular se obtengan estructuras cuyos posteriores ensayos farmacológicos pudieran conducir a consumir recursos y esfuerzos en ensayar o analizar estructuras que no posean la actividad predicha.

De todo ello se deduce, tal y como lo demuestra los resultados obtenidos por el método de discriminación de actividad utilizado, no sólo por el alto porcentaje de acierto obtenido en cada grupo sino también por la inexistencia de zona de solapamiento, de forma que se minimiza la posibilidad de que nos pueda conducir a una clasificación errónea o a la inclusión de compuestos falsamente activos, que la función discriminante obtenida es una herramienta útil, válida y eficaz en la discriminación de la actividad antibacteriana, lo cual nos permite la validación de los índices de conectividad topológicos que la forman como un método de búsqueda de nuevas estructuras con teórica actividad antimicrobiana.

5.2.2- SELECCIÓN MOLECULAR DE MOLÉCULAS CON TEÓRICA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Se ha realizado una búsqueda guiada o selección de nuevas estructuras, tomando como punto de partida la información topológica de gran utilidad contenida en los índices que aparecen en la función discriminante, empleando para ello como parámetros de búsqueda las subestructuras que contengan los índices que presentan contribución positiva al valor de dicha función, como son el índice ${}^3\chi_{CH}^V$, y los índices de estado electrotopológico SdsCH y SsssN, por lo que la selección molecular realizada

DISCUSIÓN

en bases de datos químicas comerciales se realizó empleando los fragmentos moleculares que contuvieran aminas terciarias y carbonos con doble enlace (figura 4.10), como filtros previos a la determinación de ΔP , tras calcular sus correspondientes índices topológicos y sustituirlos en la función discriminante con el propósito de seleccionar aquellas moléculas que mejores valores de ΔP presentasen para dicha función, las cuales atendiendo a estos valores de ΔP son clasificadas como teóricas antibacterianas. El resultado final fueron las 15 moléculas seleccionadas por presentar los valores más altos de ΔP , cuyas características se muestran en la tabla 4.28 y figuras 4.11 a 4.25, siendo éstas por tanto las que posteriormente serán sometidas a ensayos microbiológicos que permitan realizar la comprobación de su actividad antibacteriana.

5.3- ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

5.3.1- ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

Con los compuestos con teórica actividad antimicrobiana obtenidos por el método de selección molecular descrito anteriormente, se realizaron los correspondientes ensayos farmacológicos *in vitro*, en este caso microbiológicos, frente a las distintas cepas de microorganismos citados en el apartado anterior, a fin de validar el método de predicción de actividad utilizado en el presente estudio.

En primer lugar y antes de realizar este ensayo microbiológico, se realizaron ensayos de solubilidad para poder determinar cual era el disolvente o mezcla de ellos más idóneo para cada una de ellas, comprobándose al mismo tiempo que éstos no inhibieran el crecimiento bacteriano.

DISCUSIÓN

Tras ello se procedió a realizar la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada producto frente a diferentes cepas de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

La determinación de la CMI se realizó en medio líquido en placas de microtitulación empleando diluciones seriadas de cada producto, comparándose con las obtenidas para dos productos de referencia, en este caso la Cefalosporina C y Ácido Nalidíxico.

Los resultados para los dos microorganismos gram-positivos fueron:

-En el caso de *Staphylococcus aureus* CECT 240, se obtuvieron cuatro productos activos. La CMI para el compuesto de número C.A.S. 1719-71-7 fue de 15.7 µg/mL, para el de número C.A.S. 13676-54-5 de 125 µg/mL, para el producto de número C.A.S. 3006-93-7 de 250 µg/mL y para el de número C.A.S. 16707-41-8 de 15.7 µg/mL, mientras que para los productos de referencia, Cefalosporina C y Ácido Nalidíxico, fueron de 31.3 µg/mL y 62.5 µg/mL respectivamente. Se observa así, que dos de los cuatro compuestos activos, consiguen reducir a la mitad la CMI experimental del fármaco de referencia que mostró mas eficacia, la Cefalosporina C, y a una cuarta parte la CMI del otro antimicrobiano de referencia, el Ácido Nalidíxico. De esta forma se duplica y cuadriplican la potencia de los antimicrobianos de referencia respectivamente.

-Para el caso de *Enterococcus faecalis* CECT 795, se obtuvieron cinco productos activos, el compuesto de número C.A.S. 1719-71-7 con 125 µg/mL de CMI, el producto de número C.A.S. 13676-54-5 con 250 µg/mL, el producto de número C.A.S 3006-93-7 con 250 µg/mL y el compuesto de número C.A.S. 16707-41-8 con

DISCUSIÓN

valor de CMI de 31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el quinto activo, el de número C.A.S. 23911-25-3. En este sentido se puede observar que los cuatro primeros productos activos, que coinciden con los que presentan actividad frente a *S. aureus*, presentan valores de CMI muy inferiores a los que presentan los antimicrobianos de referencia (>500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la Cefalosporina C y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Ácido Nalidíxico).

De esta forma, los resultados que se han obtenido frente a los dos microorganismos gram-positivos utilizados en los ensayos son altamente satisfactorios, ya que se supera ampliamente la potencia mostrada por dos fármacos de referencia, que por otra parte son amplia y extensamente utilizados en la práctica clínica diaria.

Los resultados para los dos microorganismos gram-negativos fueron:

-Para el caso de *Escherichia coli* CECT 405 se han obtenido seis productos activos, pero solo uno de ellos presenta una CMI que se puede considerar aceptable aunque es del orden de ocho veces superior a la CMI del fármaco de referencia menos potente. Este es el caso del producto con número C.A.S. 3006-93-7 cuya CMI es de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de los productos de número C.A.S. 1719-71-7, 16707-41-8 y 23911-25-3 la CMI fue de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que el valor de la misma para los compuestos de número C.A.S. 2411-89-4 y 496-41-3 fue de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ambos valores muy por encima de los encontrados para los productos de referencia utilizados en el mismo ensayo.

-Por último, el caso de *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 muestra los resultados menos favorables, ya que solo encontramos un producto activo, el compuesto con número C.A.S. 2411-89-4, cuya CMI es de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la correspondiente al fármaco de referencia más activo.

DISCUSIÓN

Es conveniente destacar, que aunque los resultados frente a microorganismos gram-negativos no sean tan favorables, se da el caso de que algunos de los compuestos que han demostrado actividad, lo son simultáneamente para ambos grupos de microorganismos, gram-positivos y gram-negativos, ya que presentan excelentes valores de CMI frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y/o *Enterococcus faecalis* y además también presentan actividad frente a *Escherichia coli*.

De este modo, los productos de número C.A.S. 3006-93-7, 1719-71-7 y 16707-41-8 mostraron actividad frente a todas las cepas de los microorganismos ensayados excepto frente a *P. aeruginosa*. El producto de número C.A.S. 23911-25-3 lo fue frente a *E. coli* y *E. faecalis*, mientras que el producto de número C.A.S. 13676-54-5 lo fue frente a *S. aureus* y *E. faecalis*. De igual modo, se observa que los productos de número C.A.S. 2411-89-4 y 496-41-3 sólo mostraron actividad frente a los dos microorganismos gram-negativos, es decir, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Tales resultados fueron corroborados, aunque de modo cualitativo, mediante la predicción de los valores de CMI que aparecen en la tabla 4.32, mostrando valores positivos de las mismas para aquellas moléculas que poseen manifiesta actividad antimicrobiana y negativos, para aquellas que no la poseen o lo son en escasa cuantía.

DISCUSIÓN

5.3.2- ENSAYOS DE TOXICIDAD

Los productos ensayados que han mostrado actividad antibacteriana en los ensayos microbiológicos se sometieron a ensayos de toxicidad aguda en animales de experimentación, determinando la Dosis Letal 50 intraperitoneal en ratones raza Swiss, obteniéndose los siguientes resultados.

-Los compuestos con número C.A.S. 23911-25-3 y el C.A.S. 496-41-3, aunque presentaron una cierta actividad frente a los microorganismos ensayados, sus DL_{50} son iguales o menores que sus respectivas CMI, con lo que no existe margen terapéutico alguno para estos compuestos. Algo parecido ocurre con el compuesto de número C.A.S. 1719-71-7 cuya eficacia es excelente para los microorganismos gram-positivos ensayados, pero posee una DL_{50} que es inferior a algunas de las CMI obtenidas para los microorganismos gram-negativos, por lo que su acción antimicrobiana puede ser debida a su propia toxicidad.

-El compuesto de número C.A.S. es 2411-89-4, que mostró actividad frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, aunque con una CMI elevada, posee una DL_{50} ligeramente superior a dicho valor, por lo que el producto tendría un estrecho margen terapéutico.

- En el caso del producto con número C.A.S. 13676-54-5, se ha obtenido un valor de DL_{50} de 713 mg/Kg (Ecuación 4.6), el cual es del orden de entre 3 y 6 veces mayor que la CMI que presenta dicho producto frente a microorganismos gram-positivos como *Staphylococcus aureus* (125 $\mu\text{g/mL}$) y *Enterococcus faecalis* (250 $\mu\text{g/mL}$). Por lo que este compuesto tiene un amplio margen terapéutico de utilización frente a microorganismos gram-positivos.

DISCUSIÓN

-De similares características es el producto con número C.A.S. 16707-41-8, el cual presenta una DL_{50} de 313 mg/Kg (Ecuación 4.7), cuyo valor es del orden de entre 10 y 20 veces superior al de la CMI obtenida para este producto frente a *Enterococcus faecalis* (31.3 $\mu\text{g/mL}$) o frente a *Staphylococcus aureus* (15.7 $\mu\text{g/mL}$), lo que le confiere un notable margen terapéutico de utilización, lo que permite corroborar la eficacia antimicrobiana de dichos compuestos, así como la capacidad predictiva del método propuesto.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Se ha aplicado el método de la Conectividad Molecular a un grupo de moléculas con y sin actividad antibacteriana, a las que se les calculó una amplia gama de índices topológicos, mediante el programa Molconn-Z 3.0, obteniéndose buenas ecuaciones de correlación, tanto por la estabilidad mostrada por las mismas como por su capacidad predictiva.
2. La función discriminante obtenida, mediante el paquete informático BMDP, es capaz de discernir, con un elevado grado de acierto, las estructuras que poseen actividad antibacteriana de aquellas que no la presentan, alcanzándose porcentajes de acierto del 99.11 % y 97.16 % para las poblaciones activa e inactiva respectivamente del grupo de entrenamiento y del 100 % y 97 % para las mismas poblaciones de moléculas del grupo test.
3. El diagrama de distribución farmacológica obtenido por aplicación del método de análisis lineal discriminante, pone de manifiesto que se consigue una muy buena separación y discriminación de las poblaciones de moléculas activas e inactivas, no existiendo apenas zonas de solapamiento entre ambos grupos de moléculas.
4. Mediante la función discriminante obtenida, se ha realizado una búsqueda guiada de estructuras con teórica acción antimicrobiana, empleando la información topológica de los índices que aparecen en la misma. De esta forma se realiza una selección molecular, obteniéndose

CONCLUSIONES

un total de quince compuestos con teórica actividad antibacteriana al presentar valores de $\Delta P > 5$.

5. Los quince compuestos seleccionados se sometieron a ensayos de actividad antimicrobiana frente a cepas de microorganismos, gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* (CECT 240) y *Enterococcus faecalis* (CECT 795) y gram-negativos, como *Escherichia coli* (CECT 405) y *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 108), mostrando actividad siete de ellos:

- N-[4-(2-Benzoxazolil)fenil]maleimida (n° C.A.S.16707-41-8).
- Tetrazolium violet (n° C.A.S 1719-71-7).
- 1,1'-(Metilene-di-4,1-fenilen)bismaleimida (C.A.S. 13676-54-5).
- N,N'-(1,3-phenylene)dimaleimida (n° C.A.S. 3006-93-7).
- Dianhidrido etilendiaminotetraacético (n° C.A.S. 23911-25-3).
- o-Cresolftaleina complexona (n° C.A.S. 2411-89-4).
- 2-Benzofurancarboxylic acid (n° C.A.S. 496-41-3)

6. Los productos N-[4-(2-Benzoxazolil)fenil]maleimida y Tetrazolium violet mostraron actividad simultáneamente frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*, obteniendo valores de CMI que mejoran ampliamente los que presentan la Cefalosporina C y el Ácido Nalidíxico, fármacos utilizados como referencia.

El producto 1,1'-(Metilene-di-4,1-fenilen)bismaleimida resultó activo frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

CONCLUSIONES

El compuesto N,N'-(1,3-phenylene)dimalleimide también resulto activo frente a los dos microorganismos gram-positivos, así como frente a *Escherichia coli*, pero con un valor de CMI mayor que los anteriores.

El compuesto Dianhidrido etilendiaminotetraacético presentó actividad frente a *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* mientras que los productos o-Cresolftaleina complexona y 2-Benzofurancarboxylic acid solo se mostraron activos frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

7. La determinación de la DL₅₀ intraperitoneal en ratón para los siete productos que presentaron actividad antimicrobiana nos permite demostrar y comprobar la escasa toxicidad de dos de ellos, los productos N-[4-(2-Benzoxazolil)fenil]maleimida y 1,1'-(Metilene-di-4,1-fenilen) bismaleimida, los cuales presentan márgenes terapéuticos de considerable amplitud, pues el primero presenta valores de DL₅₀ entre diez y veinte veces superior a los de CMI obtenidos frente a *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* respectivamente; mientras que el segundo posee valores de DL₅₀ entre tres y seis veces superiores a sus valores de CMI frente a *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* respectivamente.
8. Los resultados obtenidos confirman plenamente la validez del método topológico utilizado, en la predicción y discriminación de la actividad antimicrobiana, así como en la búsqueda y selección de nuevas estructuras con teórica actividad antimicrobiana.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

7- **BIBLIOGRAFIA**

- 1 -REINER, R.
“Antibiotics, chemotherapeutic agents, and development of chemotherapy”.
En: Reiner; r. (Ed). Antibiotics. An introduction. Roche; Basle; Switzerland; 1982; 2-20.
- 2 -LEVY, S.B.
“The antibiotic paradox. How miracle drugs are destroying the miracle”.
Plenum Press; New York and London; 1992.
- 3 -GUND, P.; ANDOSE, J.D.; RHODES, J.B.; SMITH, G.M.
“Three-dimensional molecular modeling and drug design”.
Science; 1980; 208: 1425-1431.
- 4 -GRAIG, P.N.
“Q.S.A.R. Origins and present: A historical perspective”.
Drug. Inf. J.; 1984; 18: 123-130.
- 5 -HADZI, D.; JERMAN-BLAZIC, B.
“Q.S.A.R. in drug design and toxicology”.
Elsevier Science Publishers B. V.; Amsterdam; 1987.
- 6 -WOLD, S.; DUNN, W.J.; HELLBERG, S.; JOLLES, G.; WOOLRIDGE, K.R.H.
“Drug design: fact or fantasy”.
Academic Press; New York; 1984.
- 7 -GENNARO, A.R.
“Remington. Farmacia”. Vol. I.
“Investigación”.
Editorial Medica Panamericana; Buenos Aires; 1991; pág. 94-103.

BIBLIOGRAFÍA

- 8 -ARIENS, E.J.
“Drug design”. Vol. I.
Academic Press; New York; 1977.
- 9 -SEGAL, G.A.
“Methods of electronic structure calculations”.
Plenum Press; New York; 1977.
- 10 -UPTON, R.; GASKING, H.
“Use of computer-aided molecular modeling in drug design”.
Int. Lab. (Sep.); 24-28; 1988.
- 11 -LANDRIDGE, R.; FERIN, T.E.; KUNTZ, I.D.; CONOLLY, M.L.
“Real-time color graphics in studies of molecular interactions”.
Science; 1981; 211: 661-666.
- 12 -KIER, L.B.; HALL, L.H.
“Molecular connectivity in chemistry and drug research”.
Academic Press; London; 1976.
- 13 -GALVEZ, J.; GARCIA-DOMENECH, R.; BERNAL, J.; GARCIA-MARCH,
F.
“Desarrollo de un nuevo metodo de diseño de fármacos por topología molecular.
Su aplicación a analgésicos narcóticos”.
An. Real Acad. Farm.; 1991; 57: 533-546.
- 14 -CIUDAD, J.; GARCIA, R.; GALVEZ, J.
“Algoritmo para el cálculo de los índices de conectividad. Su aplicación a la
determinación de la refracción molar de un grupo de moléculas”.
An. Quim.; 1987; 83: 385-389.

BIBLIOGRAFÍA

- 15 -ANTON-FOS, G.M.; GARCIA-DOMENECH, R.; PEREZ-JIMÉNEZ, F.; PERIS-RIBERA, J.E.; GARCIA-MARCH, F.J.; SALABERT-SALVADOR, M.T.
“Pharmacological studies of the two new hypoglicaemic compounds 4-(3-methyl-5oxo-2pyrazolin-1-yl)benzoic acid and 1-(mesitylen-2-sulfonyl)-1H-1,2,4-triazole”.
Arzneimittel-Forschung; 1994; 44(II); 821-826.
- 16 -CHRISTOPHERSON, R.E.; PULLMAN, B.
“Quantum mechanics of molecular compounds”.
John Wiley; New York; 1975.
- 17 -LIEN, E.J.
“SAR: Side effects and drug design”.
Marcel Dekker Inc.; New York; 1987
- 18 -ATWINKS, P.W.
“La naturaleza de la materia: orientacion y transfondo”.
Fisicoquímica; Addison-Wesley Iberoamericana; México D.F.; 1991; pág 2-19.
- 19 -ROUVRAY, D.H.
“De la topología a la química”.
Invest. Ciencia; 122; (Nov.); 16-24; 1986.
- 20 -KIER, L.B.; HALL, L.H.
“Molecular connectivity in Structure-Activity”.
Analysis Research Studies press LTD New York; 1986
- 21 -TESTA, B.; KIER, L.B.
“The concept of molecular structure in structure-activity. Relationships studies and drug desing”.
Medical Research Reviews; 11:35-48. 1991

BIBLIOGRAFÍA

- 22 -PRIMAS, H.
“Chemistry; quantum mechanics and reductionism”.
Spinger-Verlag; Berlin; 1981
- 23 -LEWIS, G.N.
J. Am. Chem. Soc. 38; 762. 1916.
- 24 -GLASSTONE, S.
“Textbook of physical chemistry”.
2nd ed; Chapter 8; Van Nostrand Reinhold; Princeton; New Jersey; 1946.
- 25 -PAULING, L.
“The nature of the chemical bond”
3rd ed.; Chapter 3; Cornell Univ. Press; Ithaca; New York; 1960.
- 26 -ZAHN, C.T.
J. Chem. Phys. 2;671; 1934
- 27 -FAJANS, K.
Chem. Be. 53; 643; 1920.
- 28 -COX, J.D.; PILCHER, G.
“Thermochemistry of organic and organometallic compounds”.
Academics Press; New York; 1970
- 29 -TRINAJSTIC, N.
“Chemical graph theory”.
Vols I and II. CRC Press; 1983; Boca Raton; Florida
- 30 -WIENER, H.
“Structural determination of paraffin boiling points”.
J. Am. Chem. Soc.; 1947; 69; 17-20.

BIBLIOGRAFÍA

- 31 -RANDIC, M.
“On characterization of molecular branching”.
J. Am. Chem. Soc.; 1975; 69; 17-20.
- 32 -KIER, L.B.; HALL, L.H.; MURRAY, W.J.; RANDIC, M.
“Molecular connectivity and relationship to nonspecific local anesthesia”.
J. Pharm. Sci.; 1975; 64;1971-75.
- 33 -MOSQUEIA-TORIBIO, A.
“Diseño de medicamentos”.
Real Academia de Farmacia. Farmaindustria; Madrid; 1994; 358-92
- 34 -KELLOGG, G.E.; KIER, L.B.; GAILLARD, P.; HALL, L.H.
“E-state fields: Applications to 3-D Qsar”.
J. Comput-aided Mol. Desing; 1996; 116; 513-20.
- 35 -ESTRADA, E.
“Spectral moments of edge adjacency matrix in molecular graphs. Definition and applications to the prediction of physical properties of alkanes”.
Comunicacion 1995.
- 36 -GARCÍA-MARCH, F.J.; ANTÓN-FOS, G.M.; PÉREZ-GIMENEZ, F;
SALBERT-SALVADOR, M.T.; CERCÓS-DEL-POZO, R.A.; DE JULIÁN-
ORTIZ, J.V.
“Prediction of chromatographic properties for a group of natural phenolic derivatives by molecular topology”.
J. Chromatogr. A.; 1996; 719:45-51.
- 37 -SOLER-ROCA, R.; GARCIA-MARCH, F.J.; ANTÓN-FOS, G.M.; GARCIA-
DOMENECH, R.; PÉREZ-GIMENEZ, F.; GALVEZ-ALVAREZ, J.
“Molecular topology and chromatographic retention parameters for benzodiazepines”.
J. Chromatogr.; 1992; 607:91-95.

BIBLIOGRAFÍA

- 38 -SALABERT-SALVADOR, M.T.; GARCIA-MARCH, F.J.; PEREZ-JIMENEZ, F.; ANTON-FOS, G.M.; CERCOS-DEL-POZO, R.A.; JAEN-OLTRA, J.
“Calculation of chromatographic properties of barbiturates by molecular topology”.
Chromatographia; Dec 1995; 141:No11/12 702-06.
- 39 -HALL, L.H.; MOHNEY, B.K.; KIER, L.
“Comparison of electrotopological state indexes with molecular orbital parameters: inhibition of MAO by hidrazides”.
Quant Struct.-Act. Relat.; 1993; 12:44-48.
- 40 -HALL, L.H.; KIER, L.
“Binding of salicylamides: QSAR analysis with electrotopological state indexes”.
Med Chem Res.; 1992; 2:497-502.
- 41 -GALVEZ-ALVAREZ, J.; GARCIA-DOMENECH, R.; DE JULIAN-ORTIZ, J.V.; SOLER-ROCA, R.
“Topological approach to analgesia”.
J Chem. Inf. Comput Sci.; 1994; 34:1198-1203
- 42 -SKVORTSOVA, M.I.; BASKING, I.I.; SLOVOKHOTOVA, O.L.; PALYULIN, P.A.; ZEFIROV, N.S.
“Inverse problem in QSAR/QSPR studies for the case of Topoñpgical Indices characterizing molecular shape (Kier Indices)”.
J. Chem. Inf. Comput. Sci.; 1993; 33:630-34.
- 43 -BASAK, S.C.; GUTE, B.D.; GRUNWALD, G.D.
“Estimation of the normal boliling points of haloalkanes using molecular similarity”.
CCACAA 69 3; 1159-1173; 1996.

BIBLIOGRAFÍA

- 44 -GALVEZ-ALVAREZ, J.; GARCIA-DOMENECH, R.; DE JULIAN-ORTIZ, J.V.; SOLER-ROCA, R.
“Topological approach to drug desing”.
J. Chem. Inf. Comput. Sci.; 1995; 35:No 2; 272-84.
- 45 -GALVEZ-ALVAREZ, J.; GARCIA-DOMENECH, R.; DE JULIAN-ORTIZ, J.V.; SOLER-ROCA, R.
“A topological approach to drug design”.
QSAR Mol. Modeling: (Proceeding) Barcelona; Sep 1995.
- 46 -GALVEZ, J.; GARCIA-DOMENECH, R.; DE GREGORIO-ALAPONT, C.; DE JULIAN-ORTIZ, J.V.; POPA, L.
“Pharmacological distribution diagrams: A tole of the novo drug desing”.
J. Mol. Graph.; 14:272-76; 1996.
- 47 -PRICE, J.R.
“Some reactions of 1-methyl-4-quinolone-3 carboxylic acid; a degradation product of the alcaloids”
Aust. J. Sci. Res; 1949; 217: 272-81.
- 48 -BARTON, N.; CROWTHER, A.F.; HESWORTH, W. y cols.
“Quinolones and therapeutic compositions containing them”.
UK patent no. 830-832; March 1960.
- 49 -LESHER, G.Y.; FROELICH, E.J.; GRUETT, M.D.; BAILEY, J.H.; BRUNDAGE, R.P.
“1,8 naphthyridine derivatives: A new class of chemotherapeutic agents”.
J. Med. Chem.; 1962; 5: 1063-65.
- 50 -KAMISKY, D.; MELTZER, R.I.
“Quinolone antibacterial agents. Oxolinic acid and related compounds”.
J. Med Chem.; 1968; 11: 160-63.

BIBLIOGRAFÍA

- 51 -LUMISH, R.M.; NORDEN, C.W.
“Cinoxacin: In vitro antibacterial studies of a new synthetic organic acid”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1975; 7: 159-163.
- 52 -SHIMIZU, M.; TAKASE, Y.; NAKAMURA, S. y cols.
“Pipemidic acid; a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*: In vitro properties”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1975; 8: 132-138.
- 53 -LAJUDIE DE P; HORVATH, B.; LERICHE, S.; PATTE, S..
“L’acide pipemidique; nouvel antibacteriene de synthese”.
J. Pharmacol. Clin.; 1975; 13: 155-158.
- 54 -INOUE, S.; OHUE, T.; TAMAGISHI, J.; NAKAMURA, S.; SHIMIZU, M.
“Mode of incomplete cross-resistance among pipemidic acid; piromidic; and nadilixic acids”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1983; 14, 240-245.
- 55 -ITO, A.; HIRAI, K.; INOUE, M. y cols.
“In vitro antibacterial activity of AM 175, a new nalidixic acid analog”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1980; 17: 103-108.
- 56 -SATO, K.; MATSUURA, Y.; INOUE, M. y cols.
“In vitro and in vivo activity of DL 8280, a new oxacine derivate”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1982; 22: 548-553.
- 57 -GOUEFFON, Y.; MONTAY, G.; ROQUET, F.; PESSON, M.
“Sur un nouvel antibactérien de synthèse: l’acide éthyl-1-fluoro-6 (méthyl-4-piperazinyl-1)7-oxo-4-dihydro-1,4-quinoleine-3 carboxylique”.
Comptes-rendues de l’Académie des Sciences; Serie 3; 1981; 292: 37-40.
- 58 -CANTÓN, E.; MARÉS, M.; ROMÁN, J.; GOBERNADO, M.
“Norfloxacin: estudios in vitro”.
Enf. Infec. Microbiol. Clin.; 1984; 6: 249-253.

BIBLIOGRAFÍA

- 59 -CHIN, N.X.; BRITAIN, D.C.; NEU, H.C.
“In vitro activity of RO 23-6240, a new fluorinated 4-quinolone”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1986; 4: 675-680.
- 60 -HIRAI, K.H.; AOYAMA, H.; HOSAKA, M. y cols.
“In vitro and in vivo antibacterial activity of AM-833, a new quinolone derivative”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1986; 29: 1059-1066.
- 61 -HIROSE, T.; OKEZAKAI, E.; KATO, H.; ITO, Y.; INOUE, M.;
MITSUHASHI, S.
“In vitro and in vivo activity of NY-198, a new difluorinated quinolone”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1987; 31: 854-859.
- 62 -ESPINOZA, A.M.; CHIN, N.Y.; NOELLI, A.; NEU, H.C.
“Comparative in vitro activity of a new fluorinated 4-quinolone, T-3262 (A-60969)”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1988; 5: 663-670.
- 63 -IMADA, T.; MIYAZAKI, S.; NISHIDA, M.; YAMAGUCHI, K.; GOTO, S.
“In vitro and in vivo antibacterial activities of a new quinolone; OPC-17116”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1992; 36: 537-579.
- 64 -SHIMIZU, M.
“Quinolone antibacterial agents: Their past; present; future”.
J. Infect. Chemother; 1995; 1:16-29.
- 65 -GOODING, B.B.; JONES, R.N.
“In vitro antimicrobial activity of CP-99,219, a novel azobicyclo-naphthyridone”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1993; 37: 349-353.

BIBLIOGRAFÍA

- 66 -WAKABAYASHI, E.; MITSUHASHI, S.
“In vitro antibacterial activity of AM-1155, a novel 6-fluoro-8-methoxy quinolone”.
Antimicrob. Agents Chemother.; 1994; 38: 594-601.
- 67 -TALLEY, J.P.
“Fluorquinolones-New miracle drugs?”.
Postgrad Med.; 1991; 89: 101-113.
- 68 -ALFREDO J. CÉSPEDES VALCARCEL Y PABLO F. PORTEL GONZALEZ.
“Actualidad y perspectivas de la farmacología de drogas antibacterianas”.
Rev. Med. Milit.: 1998;27(2):85-93.
- 69 -ALBRECHT, R.
“Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type”.
Prog. Drug Res.; 1997; 21: 99-104.
- 70 -GARCÍA SÁNCHEZ, J.E.; LÓPEZ, R.; PRIETO, J.
“Antimicrobianos en Medicina”
Sociedad Española de Quimioterapia. 1999. Cap. 30; pág.384.
- 71 -BRYSKER, A.; CHANTOT, J.F.
“Classification and structure-activity relationships of fluorquinolones”.
Drugs; 1995; 49 (Suppl. 2): 16-28.
- 72 -DOMAGALA, J.M.
“Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials”.
J. Antimicrob. Chemother.; 1994; 33, 685-706.

BIBLIOGRAFÍA

- 73 -DOMAGALA, J.M; BRIFGES, A.J.; CULBERSTON, T.P; GAMBINO, L.; HAGEN, S.E ; KARRIC, G.
“Synthesis and biological activity of 5-amino and 5-hydroxyquinolones; and the overwhelming influence of remote N₁ substituent in determining the structure relationship”.
J. Med Chem.; 1991, Vol 34, No 3, 1142-1154.
- 74 -KOGA, H.; ITOH, A.; MURAYAMA, S.; SUZUE, S.; IKURA, T.
“Structure-activity relationship of the antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkil-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid”.
J. Med. Chem.; 1980; 23: 1358-1363.
- 75 -DOMAGALA, J.M; HANNA, L. D.; HEIFETZ, C.L.; HUTT, M.P.; MICH, T.F; SANCHEZ, J.P.; SOLOMON, M.
“New structure-activity relationships of the quinolone antibacterial using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay”.
J. Med. Chem. 1986, Vol. 29, No. 3, 394-404, *Tabla IV*.
- 76 -CHU, D.; FERNÁNDEZ. P.; PERNET, A.G.
“Síntesis and biological activity of benzothiazol (3,2-a)quinolone antibacterial agents”.
J. Med. Chem.; 1986;29: 1531-1534.
- 77 -CHU, D.; FERNÁNDEZ, P.
“Structure activity relationship of the fluorquinolones”.
Antimicrob. Agents Chemother.; 1989; 33: 131-135.
- 78 -SANCHEZ, J.P.; DOMAGALA, J.M.; HAGEN, S.E. y cols.
“Quinolone antibacterial agents. Synthesis and structure-activity relationships of 8-substituted quinoline-3-carboxylic acids and 1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid”.
J. Med Chem., 1988, Vol 31, No 5, 983-991.

BIBLIOGRAFÍA

- 79 -ANDRIOLE, V.T.
“Las quinolonas”.
Academic Press; San Diego; 1989.
- 80 -VOET, D.; VOET, J.G.
“Bioquímica”
“Replicación; reparación y recombinación del DNA”
Ediciones Omega; Barcelona; 1992; pág:1017-60.
- 81 -AYALA, F.J.; KIGER, J.A. Jr.
“Genética moderna”
Ediciones Omega; Barcelona; 1984.
- 82 - DAVID, C., HOOPER.
“Emerging Mechanisms of Fluorquinolone Resistance”.
Special Issue. Vol. 7; No. 2. Mar-Apr 2001.
- 83 -FERRERO, L.; CAMERON, B.; MANSA, B. y cols.
“Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluorquinolones”.
Mol. Microbiol.; 1994; 13: 641-53.
- 84 -KATO, J.; SUZUKI, H.; IKEDA, H.
“Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*”;
J. Biol. Chem; 1992; 267: 25676-25684.
- 85 -DIVER, F.M.; PIDDOCK, L.J.V.; WISE, R.
“The accumulation of five quinolone antibacterial agents by *Escherichia coli*”.
J. Antimicrob. Chemother.; 1990; 25: 319-333.
- 86 -YOSHIDA, H.; NAKAMURA, M.; BOGAKIM y cols.
“Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase”.
Antimicrob. Agents Chemother; 1993;37: 839-845.

BIBLIOGRAFÍA

- 87 -YANG, H.; HELLER, K.; GELLERT, M.; ZUBAY, G.
“Differential sensitivity of gen expresion in vitro inhibitors of DNA gyrase”.
Proc. Natl. Acad: sci.; USA; 1979;; 76: 3304-3308.
- 88 -MILLER, K.G.; LIU, F.L.; ENGLUND, A.T.
“A homogeneous type II DNA topoisomerase from Hela cell nuclei”
J. Biol. Chem.; 1981; 256: 9334-9335.
- 89 -SHEN, L.L.; MITSCHER, L.A.; SHARMA, P.N. y cols.
“Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials. A cooperative drug-DNA binding model”
Biochemistry; 1989; 28: 2886-2894.
- 90 -EGGLESTON, M.; PARK, S.Y.
“Review of the 4-Quinolones”
Infection Control; 8; (3); 119-25; (1987).
- 91 -FLOREZ.
“Farmacología humana”
Masson. 3ª edición. 2000. Pág 1145-51.
- 92 -GEORGE PAPADAKOU, N.; DIX, B.; ANGEHRN, P.; OLSON, G.
“Monocyclic and Tricyclic Analogs of Quinolones: Mechanism of action”.
Antimicrob. Agents Chemother; (Apr.); 614-16; 1987.
- 93 -LITTLE, J.W.; MOUNT, D.W.
“The SOS regulatory system of E. coli”
Cell; 1982; 29: 11-22.
- 94 -MAXWELL, A.
“The molecular basis of quinolone action”
J. Antimicrob. Chemother.; 1990; 30: 409-416.

BIBLIOGRAFÍA

- 95 -WALTERS, R.N.; PIDDOCK, L.J.V.; WISE, R.
“The effect of mutations in the SOS response on the kinetics of quinolone killing”
J. Antimicrob Chemother.; 1989; 24: 863-873.
- 96 -PIDDOCK, L.J.V.; WALTERS, R.N.
“Bactericidal activities of five quinolones for Escherichia coli strains with mutations in genes encoding the SOS response or cell division”
Antimicrob. Agents Chemother.; 1992; 36: 819-825.
- 97 -PHILLIPS, I.; CULEBRAS, E.; MORENO, F.; BAQUERO, F.
“Induction of the SOS response by new 4-quinolones”
J. Antimicrob. Chemother.; 1987; 20: 631-638.
- 98 -CHAPMAN, J.; GEORGOPAPADAKOU, N.H.
“Routes of quinolone permeation in Escherichia coli”
Antimicrob. Agents Chemother.; 1988; 4: 438-442.
- 99 -WILLIAMS, P.
“Sub-MICs of cefuroxime and ciprofloxacin influence interaction of complement and immunoglobulins with Klebsiella pneumoniae”
Antimicrob. Agents Chemother.; 1987; 31: 758-762.
- 100 -DESNOTRES, J.F.; JACOTOT, F.; BRUEL, J.; BASSOULLET, M.T.; NIEL, G.
“Effects of pefloxacin on phagocytosis function of rat macrophages and polymorphonuclear leucocytes”
J. Antimicrob. Chemother.; 1986; 17 (Suppl. B): 53-57.
- 101 -GOBERNADO, M.; SANTOS, M.
“Fluorquinolonas: estructura; actividad *in vitro*; mecanismo de acción y resistencia”.
Medicine; (Nov); 33-40; (1988).

BIBLIOGRAFÍA

- 102 -WETZSTEIN, H.G.; SCHMEER, N.; KARL, W.
“Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: Identification of metabolites”.
Appl. Environ. Microbiol. 1997;63:4272-81.
- 103 -WOLFSON, J.S.; HOOPER, D.C.
“Pharmacokinetics of the quinolones: Newer aspects”.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.; (Apr.); 267-74; 1991.
- 104 -GOODMAN AND GILLAN.
“Las bases moleculares de la terapeutica”
McGraw-Hill Interamericana. 9º edicion. 1996. Pa{gs: 1132-36.
- 105 -BERGERON, M.G.
“The pharmacokinetics and tissue penetration of the fluoroquinolones”.
Clin. Incest. Med.; 12; (1); 20-27; 1989.
- 106 -FITTON, A.
“The quinolones. An overview of their pharmacology”
Clin. Pharmacokinet.; 22; (Suppl. 1); 1-11; 1992.
- 107 -HONORATO PEREZ, J.; SUAREZ OCHOA, J.R.; AZANZA PEREA, J.R.
“Farmacología clinica de las fluorquinolonas”.
Medicine; (Nov); 41-47; 1988.
- 108 -BROUWERS, J.R.B.J.
“Pharmacokinetics of the newer fluoroquinolones”.
Pharm. Weekbl. Sci.; 9 Suppl.; S16-S22; 1987.
- 109 -THIBAUT, M.; KOUMARE, B.; SOUSSY, C.J.; DUVAL, J.
“Relations structure-activité dans le group des quinolones: Etude de al activité antibactérienne de deux nouveaux composés”.
Ann. Microbiol.; 132^a; 267-81; 1981.

BIBLIOGRAFÍA

- 110 -NEUMAN, M.
“Clinical pharmacokinetics og thr newer antibacterial 4-quinolones”.
Clin. Pharm.; 14; 96-121; 1988.
- 111 -VREE, T.R.; WIJNANDS, N.J.; GUELEN, P.J.; BAARS, A.M.; HEKSTER,
Y.A.
“Pharmacokinetics: Metabolism and renal excretion of quinolones in man”.
Pharm. Weekbl. Sci.; 8; (1); 29-34; 1986.
- 112 -BALABAN, A.T.
“Applications of graph theory in chemistry”.
J. Chem. Inf. Comput. Sci.; 1985; 25:334-43.
- 113 -KIER, L.B.; HALL, L.H.
“Dervation and significance of valence molecular connectivity”.
J. Pharm: Sci.; 1981; 70:583-89.
- 114 -WEININGER, D.
"SMILES, a Chemical Language and Information System.1. Introduction to
Methodology and Encoding Rules"
J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1988, 28, 31-36.
- 115 -WEININGER.
“SMILES, 2. Algorithm for Generation of unique SMILES notation”.
J. Chem. Inf. Comput. Sci.;1989; 29: 97-101.
- 116 -HALL, L.H.; KIER, L.B.; BROWN, B.
“Molecular similarity on novel atom –type electrotopological state indices”.
J. Chem. Comput. Sci.; 1995; 35:6; 1074-80.
- 117 -HARARY, F.
“Graph theory”.
Addison Wesley Publishing Co.; Reading; Massachusetts; 1969.

BIBLIOGRAFÍA

- 118 -BASAK, S.C.; GUTE, B.D.
“Characterization of molecular structures using topological indices”.
SAR and QSAR in Environmental Research; aceptado 1997. (Comunicacion personal).
- 119 -WIENER, H.
“Correlation of heats of isomerization and differences in heats of vaporization of isomers among the paraffin hydrocarbons”.
J. Am. Chem. Soc.; 1947; 69:2636-38.
- 120 -WIENER, H.
“Structural determination of paraffin boiling points”.
J. Am. Chem. Soc.; 1947; 69:17-20.
- 121 -HOSOYA, H.
“Topological index. A newly proposed quantity characterizing the topological nature of structural isomers of saturated hydrocarbons”.
Bull. Chem. Soc.; Jpn.; 1971; 44:2332-39.
- 122 -BASAK, S.C.
“Predicting physicochemical and biomedical properties of molecules using topological indices”.
Proceedings of NATO Advanced Study Institute (ASI) on Pharmacokinetics; Erice Sicily; Abril 1994; 4-17.
- 123 -KIER, L.B.; HALL, L.H.
“The generation of molecular structures from a graph-based QSAR equation”.
Quant. Struct-Act. Relat.; 1993; 12:383-88.
- 124 -SOSTIC, M.; PLAVSIC, D.; TRINAJSTIC, N.
“2-Difluoromethylthio-4,6-bis(monoalkylamino)-1,3,5-triazines as inhibitors of hill reaction: A QSAR study with ortogonalized descriptors”.
J. Chem. Inf. Comput. Sci.; 1996; 36:146-50.

BIBLIOGRAFÍA

- 125 -RANDIC, M.
“On characterization of molecular branching”.
J. Am. Chem. Soc.; 97; 6609-15; 1975.
- 126 -KIER, L.B.; HALL, L.H.
“Molecular connectivity in structure-activity analysis”.
Research Studies Press; Letchwoeth; England; 1986.
- 127 -MURRAY, W.; KIER, L.B.; HALL, L.H.
“Molecular connectivity III: Relationship to partition coefficients”.
J. Pharm. Sci.; 64; 1978-1981; (1975).
- 128 -KIER, L.B.
“Structural information from molecular connectivity 4Xpc index”.
J. Pharm. Sci.; 1980; 69:9-13.
- 129 -MURRAY, W.; KIER, L.B.; HALL, L.H.
“Molecular connectivity IV: Examination of the parabolic relationship between molecular connectivity and biological activity”.
J. Med. Chem.; 19; 573-78; 1976.
- 130 -KIER, L.B.; HALL, L.H.; MURRAY, W.; RANDIC, M.
“Molecular connectivity V: Connectivity series concept applied to density”.
J. Pharm. Sci.; 65; 801-05; 1976.
- 131 -HALL, L.H.; KIER, L.B.; MURRAY, W.
“Molecular connectivity II: Relationship to water solubility and boiling point”.
J. Pharm. Sci.; 64; 1975-77; (1975).
- 132 -SOLER-ROCA, R.; SIPAN-SARRION, M.C.; GARCIA-DOMENECH, R.; GALVEZ-ALVAREZ, J.
“Prediction and interpretation of different properties of a group of adrenergic amines by molecular connectivity”.
Indian. J. Chem.; 1994; 33B:209-15.

BIBLIOGRAFÍA

- 133 -KUPCHIK, E.J.
“Structure-molar refraction relationships of alkylgermanes using molecular connectivity”.
Quant. Struct.-Act. Relat.; 7:57-59; 1988.
- 134 -GALVEZ, J.; GARCIA DOMÉNECH, R.; DE GREGORIO ALAPONT, C.;
DE JULIAN ORTIZ, J.V.; SALABERT SALVADOR, M.T.; SOLER ROCA,
R.
“New antibacterial drugs designed by molecular connectivity”.
Advances in molecular similarity; New York; 1996; 1:267-80; JAI press Inc.
- 135 -HALL, L.H.; KIER, L.B.
Quant. Struct.-Act. Relat.; 1990; 9: 115.
- 136 -HALL, L.H.
“Computational Aspects of Molecular Connectivity and its Role in Structure-
Activity Modeling”
Computational Chemical Graph Theory; D. H. Rouvray; Ed. Nova Press.
- 137 -KIER, L.B.; HALL, L.H.
“The electrotopological State Index: An Atom-Centered Index for QSAR”
Advances in Drug Design; Vol 22; ed. B. Testa; Academic Press; 1992.
- 138 -KIER, L.B.; HALL, L.H.
“An Electrotopological State Index for Atoms in Molecules”
Pharmaceutical Res.; 1990; 7: 801.
- 139 -HALL, L.H.; MOHNEY, B.K.; KIER, L.B.
“The electrotopological State: Structure Information at the Atomic Level for
Molecular Graphs”
J. Chem. Inf; Comput; Sci.; 1991; 31: 76.

BIBLIOGRAFÍA

- 140 -HALL, L.H.; MOHNEY, B.K.; KIER, L.B.
“The Electrotopological State: An Atom Index for QSAR”
Quant. Struct.-Act. Relat.; 1991; 10: 43.
- 141 -KIER, L.B.; HALL, L.H.
“An Index of Electrotopological State of Atoms in Molecules”
J. Math. Chem.; 1991; 7: 229.
- 142 -KIER, L.B.; HALL, L.H.
“An Index of Atom Electrotopological State in QSAR in the Design of Bioactive Compounds”
A telesymposium; A. Biabbi; ed.; J.R. Prous Publishers; S.A.;
- 143 -HALL, L.H.; KIER, L.B.
“Electrotopological State Indices for Atom Types: A Novel Combination of Electronic; Topological; and Valence State Information”
J. Chem. Inf. Comput. Sci.; 1995; 35: 1039-1045.
- 144 -HALL, L.H.; KIER, L.B.; BROWN, B.B.
“Molecular Similarity Based on Novel Atom Type Electrotopological State Indices”
J. Chem. Inf. Comput. Sci.; 1995; 35: 1074-1080.
- 145 -COLLOUS, T.
“Discriminant análisis and applications”.
Academics press; New York; 1973.
- 146 -GALVEZ ALVAREZ, J.; GARCIA DOMÉNECH, R.; DE JULIAN ORTIZ, J.V.; SOLER ROCA, R
“Topological approach to drug desing”.
J. Chem. Inf. Comput. Sci.; 1995; 35:2:272-84.

BIBLIOGRAFÍA

- 147 -DIXON, W.J.
“Manual BMDP: Biomedical Computer Programs”.
University of California Press; Berkeley and Los Angeles; 1982
- 148 -GRAY, H.L.; SHUCANY, W.R.
“The generalized Jackknife Statistic”.
Marcel Dekker; New York; 1972.
- 149 -TOPLISS, J.; COSTELLO, R.
J. Med Chem.; 15; 1066; (1972).
- 150 -TURNER, R.A.
“Quantal response calculation of the ED₅₀”.
Pharmacology; second printing; Academic Press; New York; 1972.
- 151 -MILLER, L.C.; TAINTER, M.L.
“Estimation of the LD₅₀ and its error by means for logarithmic-probit graph paper”
Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 1994; 57: 261-264.
- 152 -COPAS, J.B.
“Using regression models for prediction: shrinkage and regression to the mean”
Statistical Methods in Medical Research; 1997; 6: 167-183.
- 153 -PASCUA, M.
“Metodología bioestadística”
Segunda edición. Ed. Paz Montalvo; Madrid; 1974.
- 154 -DOMAGALA, J.M; HEIFETZ, C.L.; MICH, T.F; NICHOLS, J.B.
“1-Ethyl-7-[3-[(ethylamino)methyl]-1-pyrrolidinyl]-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone-carboxylic Acid. New Quinolone Antibacterial with Potent Gram-Positive Activity”.
J. Med. Chem. 1986, Vol. 29, No. 4, 445-448.

BIBLIOGRAFÍA

- 155 -DOMAGALA, J.M; HAGEN, S.E.; HEIFETZ, C.L.; HUTT, M.P.; MICH, T.F.; SANCHEZ, J.P.; TREHAN, A.K.
“7-substituted 5-Amino-1-ciclopropyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic Acids: Syntesis and Biological Activity of a New Class of Quinolone Antibacterials”.
J. Med. Chem. 1988, Vol. 31, No. 3, 503-506.
- 156 -DOMAGALA, J.M; HEIFETZ, C.L.; HUTT, M.P.; MICH, T.F.; NICHOLS, J.B.; SOLOMON, M.; WORTH, D.
“1-Substituted 7-[3-[(ethylamino)methyl]-1-pyrrolidinyl]-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone-carboxylic Acid. New Quantitative Structure-Activity Relationships at N₁ for the Quinolone Antibacterials”
J. Med. Chem. 1988, Vol. 31, No. 5, 991-1001.
- 157 -HAGEN, S.E.; DOMAGALA, J.M; HEIFETZ, C.L.; SANCHEZ, J.P.; SOLOMON, M.
“ New Quinolone Antibacterials Agents. Synthesis and Biological Activity of 7-(3,3- or 3,4-Disubstituted-1-pyrrolidinyl)quinoline-3-carcoxylic Acids”.
J. Med. Chem. 1990, Vol. 33, No. 2, 849-854.
- 158 -HAGEN, S.E.; DOMAGALA, J.M; HEIFETZ, C.L.; JOHNSON, J.
“Synthesis and Biological Activity of 5-Alkyl-1,7,8-trisubstituted-6-fluoroquinoline-3-carboxylic Acids”
J. Med. Chem. 1991, Vol. 34, No. 3, 1155-1161.
- 159 -SANCHEZ, J.P.; BRIDGES, A.J.; BUSCH, R.; DOMAGALA, J.M; HAGEN, S.E.; GOGLIOTTI, R.D.; HAGEN, S.E.; HEIFETZ, C.L.; JOANNIDES, E.T.; SESNIE, J.C.; SHAPIRO, M.A.; SZOTEK, D.L.
“New 8-(Trifluoromethyl)-Substituted Quinolines. The Benefits of the 8-Fluoro Group with Reduced Phototoxiz Risk”.
J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 2, 361-367.

BIBLIOGRAFÍA

- 160 -SUTO, M.J.; DOMAGALA, J.M.; ROLAND, G.E.; MAILLOUX, G.B.; COHEN, M.A.
“Fluoroquinolones: Relationships between Structural Variations, Mammalian Cell Cytotoxicity, and Antimicrobial Activity”.
J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 25, 4745-4750.
- 161 -INOUE, Y.; KONDO, H.; TAGUCHI, M.; JINBO, Y.; SAKAMOTO, F.; TSUKAMOTO, G.
“Synthesis and Antibacterial Activity of Thiazolopyrazine-Incorporated Tetracyclic Quinolone Antibacterials”.
J. Med. Chem. 1994, Vol. 37, No. 5, 586-592.
- 162 -JINBO, Y.; KONDO, H.; TAGUCHI, M.; INOUE, Y.; SAKAMOTO, F.; TSUKAMOTO, G.
“Synthesis and Antibacterial Activity of Thiazolopyrazine-Incorporated Tetracyclic Quinolone Antibacterial Agents”.
J. Med. Chem. 1994, Vol. 37, No. 17, 2791-2796.
- 163 -CECCHETTI, V.; CLEMENTI, S.; CRUCIANI, G.; FRAVOLINI, A.; PAGELLA, P.G.; SAVINO, A.; TABARRINI, O.
“6-Aminoquinolones: A New Class of Quinolone Antibacterials”.
J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 6, 973-982.
- 164 -REUMAN, M.; DAUM, S.J.; SINGH, B. and cols.
“Synthesis and Antibacterial Activity of Some Novel 1-Substituted 1,4-Dihydro-4-oxo-7-pyridinyl-3-quinolinecarboxylic Acids. Potent Antistaphylococcal Agents”.
J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 14, 2531-2540.
- 165 -RENAU, T.E.; SANCHEZ, J.P.; SAPHIRO, M.A.; DEVER, J.A.; GRACHECK, S.J.; DOMAGALA, J.M.
“Effect of Lipophilicity at N-1 on Activity of Fluoroquinolones against *Micobacteria*”.
J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 15, 2974-2977.

BIBLIOGRAFÍA

- 166 -SANCHEZ, J.P.; GOGLIOTTI, R.D.; DOMAGALA, J.M.; GRACHECK, S.J.; HUBAND, M.D.; SESNIE, J.A.; COHEN, M.A.; SAPHIRO, M.A..
“The Synthesis, Structure-Activity, and Structure-Side Effect Relationships of a Series of 8-Alkoxy- and 5-Amino-8-alkoxyquinolone Antibacterials Agents”.
J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 22, 4478-4487.
- 167 -CECCHETTI, V.; FRAVOLINI, A.; LORENZINI, M.C.; TABARRINI, O.; TERNI, P.; XIN, T.
“Studies on 6-Aminoquinolones: Syntehsis and Antibacterial Evaluation of 6-Amino-8-methylquinolones”.
J. Med. Chem. 1996, Vol. 39, No. 2, 436-445.
- 168 -RENAU, T.E.; SANCHEZ, J.P.; GAGE, J.W.; DEVER, J.A.; SAPHIRO, M.A.; GRACHECK, S.J.; DOMAGALA, J.M.
“Structure-Activity Relationships of the Quinolone Antibacterials against Mycobacteria: Effect of Structural Changes at N-1 and C-7”.
J. Med. Chem. 1996, Vol. 39, No. 3, 729-735.

8. ANEXO

8- ANEXO**Tabla 8.1-** Artículos de los que están extraídos las CMI de los antimicrobianos de referencia utilizados para la obtención de las funciones de conectividad de los distintos microorganismos y su posterior validación

MOLÉCULA	ARTÍCULO
CONTROL POSITIVO 1-33	J. Med. Chem. 1986, Vol. 29, No. 3, 394-404, Tabla IV, compd. no. 1a1-1b1-1d1-1d2-1o-1g-1h-1i-1k-1l-1n-1q-1r-1s-1u-1v-1w-1y-1z-2a-2c-2d-2e-h-2i-2j-2l-2o-2p-3b-4-5 respectivamente
CONTROL POSITIVO 34-35	J. Med. Chem. 1986, Vol. 29, No. 4, 445-448, Tabla I, compd. no. 9d-9e respectivamente
CONTROL POSITIVO 36-39	J. Med. Chem. 1988, Vol. 31, No. 3, 503-506, Tabla II, compd. no. 3b-4c-4e-4f respectivamente
CONTROL POSITIVO 40-55	J. Med. Chem. 1988, Vol. 31, No. 5, 983-991, Tabla III, compd. no. 2c-2e-2f-4a-4d-4g-5c-5d-5f-6b-6c-6d-6f-6g-7b-7f respectivamente
CONTROL POSITIVO 56-67	J. Med. Chem. 1988, Vol. 31, No. 5, 991-1001, Tabla III, compd. no. 14a-14c-14e-14f-14g-14j-14k-14l-14n-14°-14p-14r respectivamente
CONTROL POSITIVO 68-73	J. Med. Chem. 1990, Vol. 33, No. 2, 849-854, Tabla III, compd. no. 19a-19b-19d-19e-19f-7 respectivamente
CONTROL POSITIVO 74-114	J. Med. Chem. 1991, Vol. 34, No. 3, 1142-1154, Tabla III, compd. no. 1a5-1b1-1b3-1b4-1b5-1c2-1c3-1c4-1e4-1e5-1g1-1g3-1g5-1h1-1h5-1j1-1j2-1j4-1j5-1k1-1k5-1l2-1m4-1n1-1n2-1n4-1°1-1°2-1°4-1p1-1p2-1p3-1p5-1q1-1q2-1q4-1q5-1r1-1s1-1s2-1s4 respectivamente
CONTROL POSITIVO 115-132	J. Med. Chem. 1991, Vol. 34, No. 3, 1155-1161, Tabla III, compd. no. 1g1-1g3-1g4-1h1-1h4-1i1-1i4-1i5-1j1-1j4-1j6-1k1-1k4-1k5-1k6-1l4-1m1-1m2 respectivamente
CONTROL POSITIVO 133-140	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 2, 361-367, Tabla I, compd. no. 17a-18a-19a-21a-22a-22b-23a-23b respectivamente
CONTROL POSITIVO 141-143	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 25, 4745-4750, Tabla II, compd. no. 11-20-22 respectivamente
CONTROL POSITIVO 144-160	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 25, 4745-4750, Tabla III, compd. no. 23a-23c-23d-23e-25c-25e-27c-28a-28b-28c-28e-28f-30c-30f-31c-31f-32f respectivamente
CONTROL POSITIVO 161-167	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 25, 4745-4750, Tabla IV, compd. no.
CONTROL POSITIVO 168-174	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 25, 4745-4750, Tabla V, compd. no. 50-57-61-64-73-74-76 respectivamente

ANEXO

CONTROL POSITIVO 175-186	J. Med. Chem. 1994, Vol. 37, No. 5, 586-592, Tabla 2, compd. 1-5a-5b-5d-5f-5g-5i-5j-5k-5m-5n-5o respectivamente
CONTROL POSITIVO 187-189	J. Med. Chem. 1994, Vol. 37, No. 6, 733-738, Tabla 3, compd. no. 16A-19A-20A respectivamente
CONTROL POSITIVO 190-196	J. Med. Chem. 1994, Vol. 37, No. 17, 2791-2796, Tabla 2, compd. 8b-8c-8d-8f-8g-8h-8j respectivamente
CONTROL POSITIVO 197-212	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 6, 973-982, Tabla 2, compd. 10-17e-17j-17k-17l-17n-18 ^a -18g-18 ^o -18p-18q-38g-45 ^a -46 ^a -48-49 respectivamente
CONTROL POSITIVO 213-215 226-229	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 14, 2531-2540, Tabla 1, no. 10b-15b-16b respectivamente 4b-4c-4d-8 respectivamente
CONTROL POSITIVO 216-225	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 14, 2531-2540, Tabla 2, no. 18a-18c-18d-18e-18g-18h-21b-24b-25b-26b respectivamente
CONTROL POSITIVO 230-244	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 15, 2974-2977, Tabla 3, compd. 6a-6b-6d-6e-6f-6i-6j-6k-7b-7c-7d-7f-7h-7i-7k respectivamente
CONTROL POSITIVO 245-268	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 22, 4478-4487, Tabla 2, compd. no. 10a-10b-10d-10e-10h-10j-10k-10l-11a-11b-11c-11e-11f-15a-15d-15e-15f-16a-16b-16c-21a-21b-21c-21e respectivamente
CONTROL POSITIVO 269-300	J. Med. Chem. 1996, Vol. 39, No. 2, 436-445, Tabla 3, compd. 19a-19b-19d-19e-19f-19i-19j-19k-19m-19n-19o-19q-19r-19s-19u-19v-1a-1c-1d-1e-1q-20a-22a-24i-24j-24v-27j-2a-30a-30v-4a-5a respectivamente
CONTROL POSITIVO 301-339	J. Med. Chem. 1996, Vol. 39, No. 3, 729-735, Tabla 5, compd. 1b-1c-1d-1f-1g-1h-1j-1k-1l-1n-1 ^o -2a-2c-2d-2e-2g-2h-2i-2k-2l-3a-3d-3f-3j-4a-4c-4f-4k-5a-5c-5f-5j-5k-6c-6d-6f-6k-A-D
CONTROL POSITIVO 340-349	J. Med. Chem. 1986, Vol. 29, No. 3, 394-404, Tabla IV, compd. no. 1c2-100-1j-1o-1t-1x-2b-2g-2k-3a respectivamente
CONTROL POSITIVO 350	J. Med. Chem. 1986, Vol. 29, No. 4, 445-448, Tabla I, compd. no. 9a
CONTROL POSITIVO 351	J. Med. Chem. 1988, Vol. 31, No. 3, 503-506, Tabla II, compd. no. 4b
CONTROL POSITIVO 352-357	J. Med. Chem. 1988, Vol. 31, No. 5, 983-991, Tabla III, compd. no. 1b-3f-5a-5g-6e7c respectivamente
CONTROL POSITIVO 358-361	J. Med. Chem. 1988, Vol. 31, No. 5, 991-1001, Tabla III, compd. no. 14d-14i-14m-14q respectivamente
CONTROL POSITIVO 362-363	J. Med. Chem. 1990, Vol. 33, No. 2, 849-854, Tabla III, compd. no. 19c-20a respectivamente

ANEXO

CONTROL POSITIVO 364-376	J. Med. Chem. 1991, Vol. 34, No. 3, 1142-1154, Tabla III, compd. no. 1b2-1c1-1c5-1g2-1h2-1j3-1k3-1m5-1n5-1o5-1p4-1q3-1r4 respectivamente
CONTROL POSITIVO 377-383	J. Med. Chem. 1991, Vol. 34, No. 3, 1155-1161, Tabla III, compd. no. 1e6-1g5-1i2-1j2-1k2-1l1-1m4 respectivamente
CONTROL POSITIVO 384-385	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 2, 361-367, Tabla I, compd. no. 20a-22c respectivamente
CONTROL POSITIVO 386	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 25, 4745-4750, Tabla II, compd. no. 18
CONTROL POSITIVO 387-392	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 25, 4745-4750, Tabla III, compd. no. 23b-23f-27f-28d-30e-32c respectivamente
CONTROL POSITIVO 393-394	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 25, 4745-4750, Tabla IV, compd. no. 35b-39b respectivamente
CONTROL POSITIVO 395-397	J. Med. Chem. 1992, Vol. 35, No. 25, 4745-4750, Tabla V, compd. no. 56-65-78 respectivamente
CONTROL POSITIVO 398-401	J. Med. Chem. 1994, Vol. 37, No. 5, 586-592, Tabla 2, compd. 5c-5h-5l-5q respectivamente
CONTROL POSITIVO 402-404	J. Med. Chem. 1994, Vol. 37, No. 17, 2791-2796, Tabla 2, compd. 8a-8e-8i respectivamente
CONTROL POSITIVO 405-409	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 6, 973-982, Tabla 2, compd. 17f-17m-18i-19g-47a respectivamente
CONTROL POSITIVO 410 y 415	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 14, 2531-2540, Tabla 1, no. 10d y 4e respectivamente
CONTROL POSITIVO 411-414	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 14, 2531-2540, Tabla 2, no. 18b-18f-23-4a respectivamente
CONTROL POSITIVO 416-420	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 15, 2974-2977, Tabla 3, compd. 6c-6h-7a-7e-7j respectivamente
CONTROL POSITIVO 421-428	J. Med. Chem. 1995, Vol. 38, No. 22, 4478-4487, Tabla 2, compd. no. 10c-10i-10m-11d-15b-15g-17a-21d respectivamente
CONTROL POSITIVO 429-438	J. Med. Chem. 1996, Vol. 39, No. 2, 436-445, Tabla 3, compd. 19c-19g-19f-19p-19t-1b-1k-24 ^a -26j-30i respectivamente
CONTROL POSITIVO 439-451	J. Med. Chem. 1996, Vol. 39, No. 3, 729-735, Tabla 5, compd. 1a-1e-1i-1m-2b-2f-2j-3c-3k-4j-5d-6a-6j respectivamente