

Estandarización del control de la calidad microbiológica de productos vinilfuranicos (Microbiological quality control standarization of vinyl-furanic products)

Roberto Machado Pérez y Enrique A. Silveira Prado. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba.
Contacto: esilveira@cbq.uclv.edu.cu y esilveira@comunidad.veterinaria.org

RESUMEN

Se realizó un estudio preliminar de control de la calidad microbiológica de los productos vinil-furánicos 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1), 2-(2-nitrovinil)-furano (G-0) y 2-metil-(nitrovinil)-furano (UC-244) —sustancias con actividad biológica— determinándose el rango donde pierden la actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos de ensayo y cargas del inóculo. Mediante la técnica del tablero de damas se determinó que el G-1 se inactiva con tiosulfato de sodio y clorhidrato de cisteína frente a las bacterias Gram negativas pero no frente a las Gram positivas y *Candida albicans*. Se aislaron contaminantes a partir de las diluciones 10^{-4} a 10^{-5} para el G-1 y desde 10^{-2} a 10^{-5} para el G-0 y el UC-244 con las cargas mayor y menor del inóculo. Al inocular los productos en estado sólido se comprobó que el G-1 es capaz de auto esterilizarse por su alto poder antibacteriano y antifúngico, ocurriendo lo contrario con el resto de los productos en los cuales se pueden aislar contaminantes a partir de las diluciones antes mencionadas.

Palabras claves: Productos vinil-furánicos. 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. 2-(2-nitrovinil)-furano. 2- metil -(nitrovinil)-furano.

Abstract

A preliminary study was done for the microbiological quality control of vinyl-furanic products, 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan (G-1), 2-(2-nitrovinyl)-furan (G-0) and 2-methyl-(nitrovinyl)-furan (UC-244) —biological active substances—, determining the rate where these products last their microbiological activity. Through the checkerboard technique it was determined that G-1 is inactivated with sodium thiosulfate and cystein chlorhydrate against Gram-negative bacteria but not against Gram-positive and *Candida albicans*. Contaminant isolation was done from 10^{-4} - 10^{-5} dilutions for G-1 and from 10^{-2} - 10^{-5} for G-0 and UC-244 with the highest and the lowest inoculum load, when inoculation solid products it was achieved that G-1 is able to self sterilize, happening the contrary with the rest of the products to which contaminants can be isolated from the previous mentioned dilutions.

Keys words: Vinyl-furanic products. 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan. 2-(2-nitrovinyl)-furan. 2-mehtyl-(nitrovinyl)-furan.

INTRODUCCION

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, 2-(2-nitrovinil)-furano y 2-metil-(nitrovinil)-furano (denominados G-1, G-0 y UC-244 respectivamente) son sustancias derivadas del furfural sintetizadas en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba. Estas sustancias vinil-furánicas poseen actividad biológica, por lo que se exige en el proceso de elaboración del cumplimiento de una serie de medidas que garanticen la esterilidad o un determinado nivel de contaminación. Por tales motivos, el proceso de elaboración debe cumplir con un estricto control microbiológico, por lo que se establece realizar el ensayo preliminar de la prueba de esterilidad o de determinación de contaminantes.^[1]

El presente trabajo tiene como objetivo cumplir con el requisito antes expuesto para los tres productos y además, identificar una sustancia inactivante para el G-1 —producto de mayor grado de desarrollo y de reconocida acción *in vitro* antibacteriana de amplio espectro y antifúngica—^[2-4] donde la validez de los resultados que se obtengan en las pruebas para determinar esterilidad o contaminación se basan en el hecho de demostrar que el producto en estudio no inhibe la multiplicación de los microorganismos.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos de ensayo

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 y ATCC 13580, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 y otras cepas de bacterias y de *Candida albicans* obtenidas de aislamientos clínicos.

Sustancias de ensayo

2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1)

2-(2-nitrovinil)-furano (G-0)

2- metil -(nitrovinil)-furano (UC-244)

1. Ensayo preliminar de la prueba de esterilidad o de determinación de contaminantes

Preparación y normalización del inóculo

Para la preparación del inóculo en fase estacionaria de crecimiento se utiliza una dilución 10^{-2} de un cultivo de 24 h del microorganismo de ensayo, a la cual se le realiza conteo microbiológico en placas debiéndose obtener 10^7 UFC/mL aproximadamente.

Para la preparación del inóculo en fase logarítmica de crecimiento, se realiza una resiembra (aproximadamente 0.1 mL) de un cultivo de 24 h del microorganismo de ensayo a un nuevo medio de cultivo en caldo, para que alcance la fase logarítmica de crecimiento dentro

de las 3 a 4 h siguientes con una turbidez equivalente a la del tubo 0.5 de la escala de McFarland. Posteriormente se hace una dilución de 10^{-3} , a la cual se le realiza conteo microbiológico en placas debiéndose obtener 10^5 UFC/mL aproximadamente.

Diluciones de la sustancia de ensayo e inoculación

Se pesa 1 g de la sustancia de ensayo y se suspende en un tubo que contiene 9 mL de buffer fosfato más Tween 80 (8 mL de buffer fosfato pH 7.2 y 1 mL de Tween 80) a 45°C mezclando bien durante 15 minutos en un baño de agua (dilución 10^{-1}).

Se prepara una gradilla con una fila de 8 tubos con 9 mL de Caldo Triptona Soya. Se agrega al primer tubo 1 mL de la dilución 10^{-1} de la sustancia de ensayo (dilución 10^{-2}), con la micropipeta se mezcla bien y se transfiere al tubo siguiente y así sucesivamente hasta el tubo No. 6 (dilución 10^{-7}). De este último tubo se elimina 1 mL para obtener en todos los tubos un volumen de 9 mL. Los tubos No. 7 y 8 contendrán solamente el medio de cultivo (controles).

Se agrega a cada tubo, excepto el No. 8 (control negativo de esterilidad del medio de cultivo), 1 mL del inóculo en fase estacionaria, se mezcla bien e inmediatamente se incuba la serie de tubos a 37°C durante 48 horas para las bacterias y 72 horas para la *Candida albicans*. El tubo No. 7 es el control positivo o de viabilidad del inóculo)

Para comprobar el posible aislamiento de contaminantes en los productos sólidos; se pesa 1 g de la sustancia de ensayo para cada microorganismo, que se inocula con 1 mL del inóculo en fase estacionaria. Luego se esperan 2 h para diluir el producto en buffer fosfato más Tween 80 y realizar las diluciones en Caldo Triptona Soya hasta el orden de 10^{-7} (igual que en el ensayo anterior). Se realizan tres réplicas para cada sustancia de ensayo.

Este ensayo se repite inoculando 1 mL del inóculo en fase logarítmica de crecimiento (menor carga del inóculo, 10^5 UFC/mL).

Lectura y evaluación de los resultados

Transcurrido el tiempo de incubación se realiza la lectura de los resultados. Los resultados se basan en la presencia de turbidez en el medio de cultivo líquido lo que indica crecimiento microbiano y lo contrario ausencia de éste. Para la evaluación se toma en cuenta la menor dilución de la sustancia de ensayo en que se observa turbidez.

Los resultados negativos dudosos se delimitan mediante siembra de una asa de la dilución en que se manifiesta la duda en placas de Agar Triptona Soya, las que se incuban acordes a las exigencias del microorganismo de ensayo.

Para descartar resultados falsos positivos debido a contaminaciones exógenas, se hacen resiembras en medios de cultivos diferenciales según el microorganismo de ensayo

(Agar McConkey para *Escherichia coli*, Agar Vogel-Johnson para *Staphylococcus aureus*, Agar Cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa*, Agar Triptona Soya para *Bacillus subtilis*, Agar Sabouraud Dextrosa para *Candida albicans*).^[5-6]

Observaciones

- ♦ El ensayo preliminar de la prueba de esterilidad se realiza con cepas de microorganismos ATCC.
- ♦ Todas las evaluaciones se hacen por triplicado utilizando sustancias de ensayo de tres lotes de producción, analizando finalmente la reproducibilidad del método.

2. Evaluación del tiosulfato de sodio y el clorhidrato de cisteína como inactivantes del G-1

Preparación del inóculo

Se procede exactamente según se describió para el ensayo preliminar de la prueba de esterilidad con una menor carga del inóculo (10^5 UFC/mL) (inóculo en fase logarítmica de crecimiento).

Concentración inhibitoria mínima (CIM) del G-1, tiosulfato de sodio y clorhidrato de cisteína

Consiste en determinar la concentración inhibitoria mínima de la sustancia de ensayo y de las posibles sustancias inactivantes frente a los microorganismos de ensayo. Se determina mediante la técnica de las diluciones seriadas en tubos con Caldo Mueller Hinton para las bacterias y en Caldo Sabouraud Dextrosa para la *Candida albicans*, con tres réplicas por microorganismo de ensayo. La CIM se define como la menor

concentración de la sustancia de ensayo que inhibe el desarrollo y crecimiento visible de los microorganismos después de 18 horas de incubación a 37°C para las bacterias y a 30°C durante 72 horas para las *Candida albicans*.^[7]

Determinación de la concentración del inactivante que inhibe la actividad del G-1 (técnica del tablero de damas).^[8-10]

Se prepara una solución del G-1 en polietilenglicol-400, solvente utilizado para esta sustancia, que posteriormente se diluye en 9 mL de Caldo Mueller-Hinton (dilución 10^{-1}) con lo que se garantiza la no interferencia del solvente en la actividad del G-1. Se procede de idéntica forma con la sustancia inactivamente pero utilizando el solvente adecuado a la misma.

Se coloca una fila de tubos en una gradilla conteniendo 1 mL del medio de cultivo (Caldo Mueller Hinton para las bacterias y Caldo Sabouraud Dextrosa para la *Candida albicans*)

y se realizan diluciones seriadas 1/2 a partir de la dilución 10⁻¹. Se procede de idéntica forma con la sustancia inactivamente

Se colocan en una gradilla los tubos de ensayos de modo que las filas correspondan a las diluciones del inactivante y las columnas a cada una de las diluciones del G-1. Se añade 0.5 mL de cada dilución del inactivante y del G-1. Una vez mezclados ambos productos se agrega en todos los tubos 1 mL del inóculo del microorganismo ensayo recién preparado

Lectura y evaluación de los resultados

La concentración final de la sustancia inactivante se corresponde con la menor concentración anteriormente determinada que presenta una buena inactivación del G-1, para lo que se usó el índice de inactivación:

$$II = \frac{CIM_{AB} \cdot CIM_{BA}}{CIM_A \cdot CIM_B} + \frac{CIM_{BA} \cdot CIM_{AB}}{CIM_A \cdot CIM_B}$$

Donde:

- II = Índice de inactivación
- CIM_{AB} = Concentración inhibitoria mínima del producto A en presencia del B
- CIM_{BA} = Concentración inhibitoria mínima del producto B en presencia del A
- CIM_A = Concentración inhibitoria mínima del producto A
- CIM_B = Concentración inhibitoria mínima del producto B

RESULTADOS Y DISCUSION

Al inocular con diferentes cargas del inóculo las sustancias de ensayo en estado sólido y en diluciones, con el G-1 no se detectó crecimiento microbiano en ninguna dilución, lo que evidencia que el producto en estado sólido es capaz de auto esterilizarse. Por el contrario, con el G-0 y el UC-244 en estado sólido, a partir de las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ para el G-0 y de 10⁻⁴ para el UC-244 se lograron aislar los microorganismos de ensayo (Tabla 1).

Tabla 1. Crecimiento en los productos inoculados en estado sólido

Microorganismo	G-1		G-0		UC-244	
	Carga del inóculo					
	Menor	Mayor	Menor	Mayor	Menor	Mayor
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
<i>S. aureus</i>	-	-	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
<i>E. coli</i>	-	-	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴

<i>B. subtilis</i>	-	-	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
<i>C. albicans</i>	-	-	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴

Según los resultados del estudio preliminar de diluciones del G-1, G-0 y UC-244 inoculados con los microorganismos de ensayo, con el G-1 éstos pudieron aislarse a partir de las diluciones 10⁻⁴ y 10⁻⁵, en que la sustancia no ejerció su actividad antimicrobiana, independientemente del tamaño del inóculo. En el caso del G-0 se pudieron aislar los microorganismos de ensayo a partir de la dilución 10⁻² y para el UC-244 a partir de 10⁻³. (Tabla 2).

Tabla 2. Crecimiento en las diluciones de los productos inoculados con diferentes cargas del inóculo

Microorganismo	G-1		G-0		UC-244	
	Carga del inóculo					
	Menor	Mayor	Menor	Mayor	Menor	Mayor
<i>P. aeruginosa</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³
<i>S. aureus</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻³
<i>E. coli</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻³
<i>B. subtilis</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻³
<i>C. albicans</i>	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁵	10 ⁻³

Los resultados antes expuestos son útiles a los efectos del control de calidad microbiológico de éstas sustancias, por lo que deberán tenerse en consideración, pues determinan los límites de dilución en que pueden aislarse contaminantes.

Según los resultados de determinación de la concentración del inactivante que no inhibe la actividad del G-1, el tiosulfato de sodio y el clorhidrato de cisteína a las concentraciones de 5 y 0.5 mg/mL respectivamente exhibieron buena inactivación del G-1 frente a la bacterias Gram negativas no siendo así frente a las Gram positivas y *Candida albicans*, ya que se mantiene el mismo valor de CIM (Tablas 3 y 4). Estas sustancias se utilizan con frecuencia en varios medios de cultivos.^[11]

Tabla 3. Efecto del tiosulfato de sodio como inactivante del G-1

Microorganismo	Concentración (µg/mL)										CIM	
	40	20	10	50	25	12.	6.2	3.1	1.5	0.7		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3.13

27853											
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 13580	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6.25
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6.25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	12.5
<i>E. coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	6.25
<i>E. coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	3.13
<i>S. typhi</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1.56
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	6.25
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	6.25
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	6.25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	12.5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	6.25

Tabla 4. Efecto del clorhidrato de cisteína como inactivante del G-1

Microorganismo	Concentración (µg/mL)										CIM
	40 0	20 0	10 0	50	25	12. 5	6.2 5	3.1 3	1.5 6	0.7 8	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	3.13
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 13580	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	6.25
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	6.25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	12.5
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6.25
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	3.13
<i>S. typhi</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1.56
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	6.25
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	6.25
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	6.25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	12.5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	6.25

CONCLUSIONES

En las condiciones del ensayo, en el G-1 se pueden aislar contaminantes a partir de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} , pero el producto sólido es capaz de auto esterilizarse y no contaminarse. Los productos G-0 y UC-244 pueden contaminarse y aislarse dichos contaminantes a partir de la dilución 10^{-2} para el G-0 y de 10^{-3} para el UC-244 cuando se utiliza una carga de inóculo mayor, y cuando se utiliza una menor carga de inóculo en fase logarítmica de crecimiento se aíslan a partir de las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} para ambos productos.

El tiosulfato de sodio y el clorhidrato de cisteína poseen efecto inactivante sobre el G-1 frente a bacterias Gram negativas en concentraciones de 5 y 0.5 mg/mL respectivamente, no siendo así para las bacterias Gram positivas ni para la *Candida albicans*.

BIBLIOGRAFIA

1. British Pharmacopeia. Published on the recommendation of the Medicines Commissions pursuant to the Medicine Act 1968. Ed Her Majesty's Stationary Office. pp 191-200. London. 1988.
2. González Oraida, Silveira EA, Castañedo NR, Magariño Ofelia, Gómez R. Actividad antimicrobiana del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1993. Santa Clara. Cuba.
3. González Oraida, Silveira EA, Medina R, Machado R, Delgado María S, Castañedo NR, Rodríguez N, Caballero A, Ramírez Teresita. Concentración inhibitoria mínima del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a bacterias y levaduras del género *Candida*. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1993. Santa Clara. Cuba.
4. Blondeau JM, Castañedo N, González Oraida, Medina R, Silveira E. In vitro evaluation 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furan: A novel antimicrobial compound. Final Report. Royal University Hospital. 1998. Saskatoon, Saskatchewan, Canada. Int J Antimicrob Agents 1999; 11(2):163-166.
5. United States Pharmacopeia. 22nd ed. 1990..
6. NC 26-121:93 Medicamentos. Medicamentos no estériles. Determinaciones microbiológicas. Norma cubana. 1993. C. Habana.
7. Guinea J, Robert Marta, Gargallo-Viola D, Xicota MA, García J, Tudela Encarna, Esteve Montserrat, Coll R, Pares Marta, Roser R. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activities of E-4868, a New Fluoroquinolone with a 7-Azetidin Ring Substituent. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(4):868-874.

Revista Electrónica de Veterinaria REDVET

ISSN 1695-7504

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>



Vol. VI, Nº 10, Octubre/2005 –

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>

8. Thabaut A, Meyran M. Méthodes d'études in vitro des associations d'antibiotiques. Press Méd. 1987; 16(43):2148-2152.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standard M7-A2. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Villanova, PA,
10. Machado R, Silveira EA, González Oraida, Martínez Lissette. Efecto de la combinación *in vitro* del 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1) con algunos antimicrobianos usuales. SANINET. Publicaciones de Sanidad Animal 2001.
<http://www.iicasaninet.net/pub/gen/>
11. Merck. Manual de Medios de Cultivo. Ed. Merck. pp 260-257. 1990. Darmstadt.

Trabajo recibido el 30/07/2005, nº de referencia **100501_REDVET**. Enviado por la Comisión de Arbitraje para REDVET en la Universidad de Santa Clara. Publicado en **REDVET®** el 01/10/05. (Copyright) 1996-2005.

[Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](http://www.veterinaria.org), ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - www.veterinaria.org y **REDVET®** www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html)

Machado Perez, Roberto; Siveira Prado, Enrique - **Estandarizacion del control de la calidad microbiologica de productos vinilfuranicos**- **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®**, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 10, Octubre/2005, [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>