

Actividad *in vitro* 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* (In vitro activity of 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan in front of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*)

Enrique A. Silveira Prado, Oraidá González García y Ricardo Medina Marrero.
Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
Santa Clara. Cuba.

Contacto: esilveira@cbq.uclv.edu.cu yesilveira@comunidad.veterinaria.org

RESUMEN

Se determinó la actividad *in vitro* del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano —denominado G-1— sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (Cuba), frente a 74 cepas *Neisseria meningitidis* grupo B y 34 de *Haemophilus influenzae*. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se evaluó por el método de las diluciones seriadas en tubos en Caldo Mueller-Hinton suplementado con suero de ternera (*N. meningitidis*) y hemina y NAD (*H. influenzae*). La concentración bactericida mínima (CBM) se determinó por resiembras de 10 µL en placas de Agar Mueller-Hinton con incubación según los requerimientos de los microorganismos de ensayo en atmósfera de CO₂ al 6,5%, a partir de todos los tubos donde no se observó crecimiento visible. Además, se calcularon la CIM y CBM 50 y 90% respectivamente y los índices CBM₅₀/CIM₅₀ y CBM₉₀/CIM₉₀. Los valores de la CIM₅₀ y CBM₅₀ (µg/mL) fueron de 1,9 y 2,5 frente a *N. meningitidis* y de 3,5 y 8,9 frente a *H. influenzae*. Los valores de la CIM₉₀ y CBM₉₀ (µg/mL) fueron de 3,5 y 9,3 frente a *N. meningitidis* y de 39,3 y 39,2 frente a *H. influenzae*. En ambos casos el índice CBM/CIM fluctuó entre 1 y 2,7. Se concluyó, que en las condiciones del ensayo, el G-1 mostró capacidad bacteriostática y bactericida, ligeramente más intensa frente a *N. meningitidis*.

Palabras claves: 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Concentración inhibitoria mínima. Concentración bactericida mínima. *Neisseria meningitidis*. *Haemophilus influenzae*.

ABSTRACT

It was determined the *in vitro* activity of 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan (G-1) —synthesized in the Centro de Bioactivos Químicos of the Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (Cuba)— in front of 74 strains of *Neisseria meningitidis* group B and 34 of *Haemophilus influenzae*. The minimal inhibitory concentration (MIC) was evaluated by the serial dilutions method in tubes in Mueller-Hinton Broth plus calf serum (*N. meningitidis*) and hemine and NAD (*H. influenzae*). The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined by inoculating 10 µL in Mueller-Hinton Agar with incubation according to the requirements of the microorganisms in atmosphere of CO₂ to 6,5%, starting from all the tubes where visible growth was not observed. Also, the MCI and MBC 50 and 90% were

calculated respectively and the index MBC_{50}/MIC_{50} and MBC_{90}/MIC_{90} . The values of the MIC_{50} and MBC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) were of 1,9 and 2,5 in front of *N. meningitidis* and of 3,5 and 8,9 in front of *H. influenzae*. The values of the MIC_{90} and MBC_{90} ($\mu\text{g/mL}$) were of 3,5 and 9,3 in front of *N. meningitidis* and of 39,3 and 39,2 in front of *H. influenzae*. In both cases the index MBC/MIC fluctuated between 1 and 2,7. We concluded that under the conditions of the assay, the G-1 showed bacteriostatic and bactericidal capacity, lightly more intense in front of *N. meningitidis*.

Keys words: 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furan. Minimal Inhibitory Concentration. Minimal Bactericidal Concentration. *Neisseria meningitidis*. *Haemophilus influenzae*

INTRODUCCION

Dentro de la Revolución Científica que desarrolla actualmente Cuba, sin dudas la producción de nuevos productos con posible utilización terapéutica, ocupa un lugar de extrema importancia por su vinculación directa con el ser humano.

En la última década, en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, se han sintetizado a partir del furfural, materia prima derivada del bagazo de la caña de azúcar, un número importante de productos, entre ellos, el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (denominado G-1). Investigadores de esta institución comprobaron la actividad antimicrobiana del G-1, considerándolo un producto de amplio espectro antibacteriano y antifúngico.^[1-5] Sin embargo, a pesar de haberse demostrado su efecto antimicrobiano frente a diversos géneros y especies de bacterias Gram positivas y negativas incluyendo cepas multi-resistentes aisladas de casos de salas de terapia intensiva, actualmente constituye una interrogante su comportamiento frente a gérmenes de los géneros *Neisseria* y *Haemophilus*, importantes patógenos humanos en nuestro medio. Hasta el presente no existe información sobre el efecto *in vitro* del G-1 frente a cepas de *N. meningitidis* y *H. influenzae*.

Considerando lo anteriormente expuesto, nuestro grupo de trabajo se propuso realizar la presente investigación para aportar nuevos datos sobre la actividad antimicrobiana de este producto, candidato evidente a introducirse de forma efectiva en nuestra industria farmacéutica y determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) del G-1 frente a cepas de *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos de ensayo

Cepas de *N. meningitidis* grupo B (74) y *H. influenzae* (34), procedentes de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología del Área de Desarrollo del Instituto Finlay (Ciudad de La Habana), diagnosticadas e identificadas según la marcha técnica vigente en dicho laboratorio.^[6]

Sustancia de ensayo

2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1), producido en el Laboratorio de Producción del Centro de Bioactivos Químicos.

Solvente de la sustancia de ensayo

Polietilenglicol 400 de calidad farmacéutica

Procedimientos

La determinación de la CIM se realizó mediante el método de diluciones seriadas en tubos y la CBM por siembras en medios de cultivo a partir de las diluciones en que no se detectó crecimiento visible del microorganismo.^[7]

La totalidad de los procedimientos técnicos fueron realizados por el mismo personal, en iguales condiciones de trabajo y en gabinete de seguridad biológica grado II.

1. Preparación de la muestra de ensayo

Se preparó una solución de G-1 a una concentración de 4 000 µg/mL en polietilenglicol 400, la que se distribuyó en viales estériles a razón de 600 µL y se almacenó a 4°C hasta su utilización por un término de 7 días.

2. Preparación de la porción de ensayo:

Diariamente agregando 500 µL de la muestra de ensayo a 4,5 mL de caldo Mueller-Hinton (Oxoid) estéril, distribuido en tubos estériles, homogenizando la mezcla con micropipeta (Labsistem Finnpiptette) y agitación en Vortex (Whirli Vortex. FSA) durante un minuto. La concentración final es de 400 µg/mL.

3. Preparación y estandarización del inóculo:

Se realizó la replicación de las cepas según los requerimientos de los microorganismos:

- ♦ *N. meningitidis*: Mueller-Hinton Agar (Merck) suplementado con suero de ternera (12%)
- ♦ *H. influenzae*: Mueller-Hinton Agar (Merck) suplementado con hemina y NAD (400 µg/mL).

Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 6,5%.

A partir del aislamiento en las placas se realizó la suspensión de una asada del cultivo en 10 mL del medio Caldo Mueller-Hinton (Oxoid) con incubación posterior a 36,5°C durante cuatro horas y dilución de la suspensión bacteriana en fase logarítmica hasta una concentración de 1000 UFC/mL.

4. Diluciones seriadas dobles ($1/2$) de la porción de ensayo e inoculación de éstas:

Se distribuyeron 500 µL de caldo Muller-Hinton (Oxoid) en una serie de 12 tubos de 13 x 100 mm (suplementado con hemina y NAD para *H. influenzae*), excepto en el primero.

Se añadieron 500 µL de la porción de ensayo al 1^{er} y 2^{do} tubos. Se realizaron diluciones seriadas dobles a partir del segundo tubo traspasando 500 µL de cada tubo mediante micropipetas garantizando la homogeneidad de la disolución por agitación en el Vortex. Luego se sembraron los tubos con 500 µL del inóculo estandarizado.

Se prepararon para cada serie controles positivos y negativos de los componentes que intervienen en el procedimiento.

Las concentraciones finales de la sustancia de ensayo para cada tubo son: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,7812, 0,390, 0,1953 y 0,0976 (µg/mL).

Las gradillas se incubaron durante 18 a 24 horas a 36,5°C, en que se leyeron e interpretaron los resultados, considerándose como valor de la CIM el tubo de menor concentración del producto en que no se apreció crecimiento del microorganismo lo que se equivale a la menor concentración de la sustancia de ensayo que inhibió el desarrollo y crecimiento visible de los microorganismos de ensayos en las condiciones de incubación requeridas por el microorganismo de ensayo.^[8]

5. Prueba de control:

Se consideró la reproducibilidad del procedimiento según el comportamiento de una cepa de *S. aureus* con valores de CIM conocidos.

6. Evaluación de la CBM:

Se realizó mediante siembras posteriores de 10 µL de cada tubo sin crecimiento visible del microorganismo en placas de Agar Mueller-Hinton con incubación 24 horas a 36,5°C en atmósfera de CO₂ al 6,5%.

Se consideró como valor de la CBM, la menor concentración en la que se recuperó el microorganismo, lo que equivale a la menor concentración de la sustancia de ensayo que mató el ≥ 99,9% del inóculo inicial (≤ 10 UFC/mL) del microorganismo de ensayo.^[8]

7. Diseño experimental y biometría

- ◆ Resultados de la CIM y CBM ($\mu\text{g/mL}$)
- ◆ Cálculo de la CIM₅₀ y CIM₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
- ◆ Cálculo de la CBMM₅₀ y CBM₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
- ◆ Índices CBM₅₀/CIM₅₀ y CBM₉₀/CIM₉₀

Los resultados de la CIM y CBM fueron tabulados según las concentraciones de la sustancia de ensayo y constituyeron la entrada de información para un programa computadorizado basado en el método de interpolación logarítmica^[9] para el cálculo de las variables CIM₅₀ y CIM₉₀ y CBM₅₀ y CBM₉₀.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se exponen los resultados de la CIM y CBM en las cepas estudiadas de ambos microorganismos.

Tabla 1. Resultados de la CIM y CBM (%)

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	<i>N. meningitidis</i>		<i>H. influenzae</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
≥ 200	-	-	5,9	11,8
100	-	-	-	-
50	2,7	2,7	11,8	11,8
25	-	2,7	17,6	29,4
12,5	2,7	10,8	-	5,9
6,25	5,4	18,9	17,6	23,5
3,125	51,3	45,9	41,2	23,5
1,5625	24,3	13,5	5,9	-
0,7812	10,8	5,4	-	-
0,3906	2,7	-	-	-
	n = 74		n = 34	

La totalidad de las cepas de *N. meningitidis* mostraron una CIM entre 0,3906 y 50 $\mu\text{g/mL}$, destacándose que en el 51,3% fue de 3,125 $\mu\text{g/mL}$ y en el 89,1% entre 0,3906 y 3,125 $\mu\text{g/mL}$.

En el caso de *H. influenzae* se obtuvo una CIM superior a la de *N. meningitidis*, detectándose el 94,1% de las cepas entre 1,5625 y 50 µg/mL. En la concentración de 3,125 µg/mL alcanzó una frecuencia del 41,2%.

En forma semejante al comportamiento de la CIM para *N. meningitidis* se observó que la CBM la concentración de 3,125 µg/mL fue la de mayor proporción (45,9%), sin embargo para el *H. influenzae* la concentración bactericida más efectiva fluctuó entre 3,125 y 25 µg/mL.

Los resultados del cálculo de la CIM y CBM 50 y 90% (Tabla 2), nos permiten apreciar que ambos indicadores fueron superiores en el caso del *H. influenzae*. Al comparar ambos microorganismos podemos observar que la CIM₅₀ y CBM₅₀ de este microorganismo fue semejante a la CIM₉₀ y CBM₉₀ de la *N. meningitidis*, por otra parte, la CIM₉₀ y CBM₉₀ del *H. influenzae* fue superior en 11 y 4 veces, respectivamente a la obtenida con la *N. meningitidis*.

La comparación y relación entre la CIM y CBM sirve para medir la potencia de un antimicrobiano,^[10] cuanto más se acercan los dos valores tanto mayor es el efecto microcida. Para el G-1 se demostró que en los microorganismos de ensayo éste índice fluctuó entre 1 y 2,7 sin diferencias estadísticamente significativas, resultados que nos permiten inferir que la sustancia de ensayo posee una actividad bactericida frente *N. meningitidis* y *H. influenzae*

Tabla 2. Resultados de la CIM y CBM e Índice CBM/CIM 50 y 90% (µg/mL)

Microorganismo	CIM ₅₀	CBM ₅₀	Índice	CIM ₉₀	CBM ₉₀	Índice
<i>N. meningitidis</i>	1,9	2,5	1,3	3,5	9,3	2,7
<i>H. influenzae</i>	3,5	8,9	2,5	39,2	39,2	1,0

Como señalamos en la introducción del presente trabajo, a pesar de haberse demostrado el efecto antimicrobiano del G-1 frente a diversos géneros y especies bacterias Gram positivas y Gram negativas, hasta el presente no se había evaluado frente a *N. meningitidis* y *H. influenzae*. No obstante, con posteridad a los trabajos realizados en Cuba, la actividad antimicrobiana del G-1 se corroboró en Royal University Hospital de la Universidad de Saskatoon (Saskatchewan, Canadá)^[11] aumentándose significativamente el número de géneros y especies evaluadas (1620 cepas de 29 especies de bacterias Gram negativas, 898 cepas de 15 especies de bacterias Gram positivas, —se incluyeron en ambos casos bacterias anaerobias— 154 cepas de 5 especies de levaduras del género *Candida* y 30 cepas de 4 especies de hongos dermatofitos) y los resultados se compararon en términos de la MCI₅₀ y MCI₉₀ con los obtenidos en Cuba. En la mayoría de las cepas evaluadas los resultados fueron semejantes quedando bien establecida la correspondencia y los autores concluyeron que los resultados sugieren que el G-1 es un compuesto antimicrobiano sin igual, con un amplio espectro de actividad frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos, levaduras y hongos filamentosos. En el caso particular de las bacterias Gram negativas, la CIM₅₀ y CIM₉₀ fluctuaron entre 1 y 32, resultados que se encuentran dentro del rango de mayor frecuencia en nuestro estudio.

En el trabajo antes citado realizado en Canadá con el G-1 utilizando el método de microdiluciones en placas, se obtuvo un CIM₅₀ de 1 para la *N. meningitidis*, si embargo, solamente se investigaron 5 cepas. Los autores no incluyeron en el estudio cepas de *H. influenzae*.^[11]

CONCLUSIONES

En las condiciones del ensayo, el G-1 mostró capacidad bacteriostática y bactericida frente a cepas de *N. meningitidis* y *H. influenzae*, más intensa en ambos casos frente a *N. meningitidis*.

BIBLIOGRAFIA

1. González Oraidá, 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.
2. González Oraidá, Silveira EA, Castañedo NR, Magariño Ofelia y 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 Oraidá, Silveira EA. Actividad antifúngica in vitro del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a diferentes especies de hongos filamentosos. REDVET Vol. IV No. 12. Diciembre 2003. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121203.html>
4. Silveira EA, González Oraidá. Actividad *in vitro* del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a hongos dermatofitos. REDVET Vol. V No. 3. Marzo 2004. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030304.html>
5. Silveira EA, Medina R, Blondeau J, Castañedo N, González Oraidá, García Milagro, Delgado María S. In vitro evaluation of 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furan: a novel antipseudomonal agent. Primer Simposio Internacional de infecciones por *Pseudomonas*. V Taller Nacional de Fibrosis Quística Habana 2004. Instituto Finlay. Diciembre 6-8 2004. C. de La Habana.
6. Marchas Técnicas del Laboratorio de Microbiología. Instituto Finlay. Folleto. 1990. Ciudad de La Habana.
7. Silveira EA, González Oraidá: Propuesta de norma. Método para determinar la mínima concentración inhibitoria (MCI) y microcida (MCM) de productos bioactivos. Centro de Bioactivos Químicos. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1992.

8. 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.
9. Izada D, Silveira EA. Cálculo de la MCI y MCB 50 y 90% mediante interpolación logarítmica. Programa para microcomputadora. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1992. Santa Clara. Cuba.
10. Esteve M, Moros M, Coll R, Xicota MA, Llovera S. Antimicrobial Activity of E-4441, A Representative Azetidine Quinolone. Drugs Expt Clín Res 1980; 16(9):445-449.
11. Blondeau JM, Castañedo N, González Oraida, Medina R, Silveira E. In vitro evaluation 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan: A novel antimicrobial compound. Int J Antimicrob Agents 1999; 11(2):163-166.

Trabajo recibido el 30/07/2005, nº de referencia **100505_RED VET**. Enviado por su autor principal, el miembro de la [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) @ **esilveira**. 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)