

Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas
Facultad Química Farmacia
Departamento De Licenciatura En Ciencias Farmacéuticas



*Tesis para optar por el grado de Licenciado
en Ciencias Farmacéuticas*

TÍTULO

**Influencia de Varios Factores en la Actividad In Vitro
del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano**

AUTOR

Enisleidy Rosales Navaja

TUTORES

Milagros García Bernal

Ricardo Medina Marrero

Pedro Iván Hidalgo Llanes

Año 49 de la Revolución

2007

PENSAMIENTO



Pensamiento:

“No basta dar pasos que un día puedan conducir hasta la meta, sino que cada paso ha de ser una meta, sin dejar de ser un paso”

Johann Peter Eckermann



DEDICATORIA



Dedicatoria

A mis padres por estar todos estos años a mi lado brindándome su apoyo

A mi futuro esposo por darme tanta fuerza para seguir adelante

A mis hermanos por su comprensión y constante estímulo

A Dios por que sin el no seria lo que soy

AGRADECIMIENTOS



Agradecimientos

Primero y antes que todo, Quiero dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de estudio.

Agradezco hoy y siempre a mis padres y hermanos por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos, a mi futuro esposo porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. A mis amigos por su continuo y afectuoso aliento.

A mis tutores de tesis, MSc. Ricardo Medina Marrero y a su esposa MSc. Milagros García Bernal, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A mi familiares y a todas aquellas personas que a lo largo de mi carrera me brindaron su colaboración y cariño sin ningún interés y que no necesito nombrar porque tanto ellos como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

A todos muchas gracias

RESUMEN



Resumen:

Se estudió el efecto que las variaciones del pH, el aumento de la carga del inóculo así como la presencia de suero, albúmina y cisteína tuvieron sobre la actividad *in vitro* del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1) frente a 30 aislamientos clínicos y cepas de referencia de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. El mismo se realizó por el método de microdilución en caldo según las normas internacionales establecidas (NCCLS). Se demostró que al aumentar el tamaño del inóculo sólo se afecta la actividad frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mientras que las variaciones de pH no tienen efecto en la actividad del G-1. Sin embargo, la presencia de suero, albúmina y cisteína disminuyeron significativamente la actividad de este producto frente a todos los microorganismos ensayados, a excepción de la cisteína frente a *Staphylococcus aureus*.

INDICE



	Introducción	1
Cap.# 1	Revisión Bibliográfica	4
1.1	<i>Agente Antimicrobianos. Mecanismo de acción y de resistencia</i>	4
1.1.1	<i>Quinolonas</i>	4
1.1.2	<i>β-Lactámicos</i>	4
1.1.3	<i>Aminoglucósidos</i>	5
1.1.4	<i>Macrólidos, Cetólidos y Streptograminas</i>	6
1.1.5	<i>Lincosamidas</i>	6
1.1.6	<i>Oxazolidinonas</i>	6
1.1.7	<i>Glicopéptidos</i>	6
1.1.8	<i>Tetraciclinas</i>	7
1.1.9	<i>Sulfonamidas</i>	7
1.1.10	<i>Azoles</i>	8
2.1	<i>Generalidades sobre el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-</i>	9
1.2.1	<i>Fórmula estructural y proceso de obtención</i>	9
1.2.2	<i>Estructura molecular y configuración espacial</i>	9
1.2.3	<i>Especificaciones de calidad y muestra de referencia</i>	10
1.2.4	<i>Estabilidad</i>	10
1.2.5	<i>Control microbiológico</i>	10
1.2.6	<i>Aspectos toxicológicos</i>	10
1.2.7	<i>Actividad antimicrobiana del G-1</i>	13
1.2.8	<i>Generalidades sobre Pruebas de Susceptibilidad</i>	14
Cap.# 2	Materiales y Método	17
2.1	<i>Microorganismos de ensayo y de referencia:</i>	17
2.2	<i>Medios de cultivo</i>	17
2.3	<i>Sustancia de ensayo y solvente</i>	17
2.4	<i>Método de Microdilución en Caldo</i>	18
2.5	<i>Preparación de las soluciones seriadas dobles</i>	18
2.6	<i>Preparación y Adición del inóculo</i>	18
2.7	<i>Determinación de la influencia de varios factores en la actividad de G-1</i>	18
2.7.1	<i>Carga del inóculo</i>	19
2.7.2	<i>Adición de suero.</i>	19
2.7.3	<i>Adición de albúmina</i>	19
2.7.4	<i>Adición de cisteína.</i>	19
2.7.5	<i>Variación del pH</i>	19
2.8	<i>Lectura de los resultados</i>	19

Cap. # 3	Resultados y Discusión	21
	Influencia de varios factores en la actividad del G-1 frente	
3.1	a <i>E.coli</i> .	21
	Influencia de varios factores en la actividad del G-1 frente	
3.2	a <i>P.aeruginosa</i>	22
	Influencia de varios factores en la actividad del G-1 frente	
3.3	a <i>S. aureus</i>	24
	Influencia de varios factores en la actividad del G-1 frente	
3.4	a <i>C. albicans</i>	25
	Conclusiones	28
	Recomendaciones	29
	Bibliografía	30

INTRODUCCIÓN



Introducción:

El tratamiento de las enfermedades mediante compuestos químicos no es nuevo, desde 1495 ya se utilizaban sales de mercurio para tratar la sífilis, aunque este tratamiento hizo bueno el axioma: *Graviora quaedum sunt remedia periculus*, es decir "Es peor el remedio que la enfermedad" ya que determinados tratamientos, como es el caso del mercurio, son tóxicos para las células animales y humanas. Para que un agente quimioterápico sea efectivo en el tratamiento de una enfermedad infecciosa no sólo debe de matar o inhibir al microorganismo causante de la infección sino que además debe ser relativamente inocuo para las células humanas al exhibir toxicidad selectiva. El primer gran descubrimiento en este sentido fue hecho por Paul Ehrlich a principios del siglo XX, lo llamó Salvarsan [1]. El mismo en el año 1929 fue reemplazado por un producto mucho más efectivo, el antibiótico penicilina, que fue descubierto gracias al microbiólogo inglés Alexander Fleming, luego se inicia la investigación de otros antibióticos tales como las cefalosporinas, la tirocidina, la gramicidina, la actinomicina, eritromicina, tetraciclinas y aminoglucósidos, que son actualmente la principal herramienta terapéutica para el tratamiento de infecciones bacterianas en el hombre y animales[2]. Sin embargo, desde que aparecieron en la década de 1940, se empieza a observar que estos inducen mecanismos de resistencia[3]. Aunque existe un amplio arsenal terapéutico en cada uno de dichos grupos químicos, el hecho de estar relacionados estructuralmente, hace que los microorganismos, al crear resistencia a uno de los compuestos desarrollan al mismo tiempo resistencia a los demás miembros del grupo, mecanismo que se ha dado en llamar resistencia cruzada. Así por ejemplo, si un microorganismo determinado se hace resistente a ciprofloxacino al mismo tiempo puede hacerse resistente a norfloxacino, ya que ambos son miembros del grupo químico de las quinolonas. Aún más, actualmente se conoce que algunos microorganismos no sólo codifican información genética para enfrentar a un grupo de antibióticos determinado, sino que además pueden llevar información dentro de su genoma contra la mayoría, si no todos, los

antibióticos actualmente disponibles en la terapéutica. A estos microorganismos se les llama “Supergérmes” por la amenaza que representan para la salud humana. Tal es el caso de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA, siglas en inglés) y de *Enterococcus* spp resistentes a vancomicina (VRE, siglas en inglés), los cuales son resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles.

Desafortunadamente, llegado el año 2000 ya no contamos con nuevas drogas; y es en este punto en donde debemos preguntarnos qué es lo que haremos de aquí en adelante. Es la implementación de terapéuticas racionales basadas en estos nuevos conocimientos, la que nos permitirá seguir siendo exitosos en la lucha contra las enfermedades infecciosas^[4].

En el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas se han sintetizado hasta la fecha más de 800 nuevas sustancias, algunas de las cuales presentan actividad biológica. Entre estas sustancias la de mayor grado de desarrollo es el derivado furil etilénico 2-bromo-5-(2bromo-2-nitrovinil)-furano, denominado G-1, nueva entidad molecular que ha sido caracterizada químicamente, con niveles relativamente bajos de toxicidad y que en estudios preliminares ha demostrado actividad antibacteriana y antifúngica.

Tomando como base la necesidad de disponer de nuevos medicamentos efectivos contra microorganismos multirresistentes y el descubrimiento y amplio potencial de desarrollo del G-1 formulamos la siguiente hipótesis:

La actividad antimicrobiana *in vitro* del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano no se afecta con la variación de factores físicos, bioquímicos y culturales.

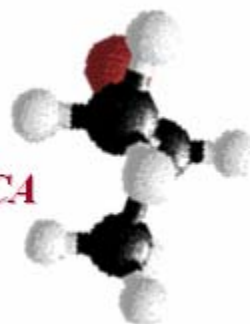
Objetivo general:

Estudiar cómo varía la actividad *in vitro* del **2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinyl)-furano** frente a diversos factores.

Objetivos específicos:

1. Estudiar cómo varía la actividad *in vitro* del **2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinyl)-furano** frente a algunos factores físicos como el pH del medio de cultivo.
2. Estudiar cómo varía la actividad *in vitro* del **2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinyl)-furano** frente a algunos factores bioquímicos como son la presencia de suero, albúmina y algunos aminoácidos.
3. Estudiar cómo varía la actividad *in vitro* del **2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinyl)-furano** frente a algunos factores culturales como son diferentes cargas del inóculo.

*REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA*



Capítulo #1. Revisión Bibliográfica

1.1 Agentes Antimicrobianos. Mecanismo de acción y de resistencia.

1.1.1 Quinolonas

Las quinolonas tienen su sitio blanco en las topoisomerasas bacterianas. Estas son enzimas esenciales para mantener estable su ADN. Las mismas son fuertes inhibidores de la topoisomerasa tipo II incluyendo la ADN girasa, así como de la topoisomerasa tipo IV. En general, la ADN girasa es el blanco principal en las bacterias gramnegativas y la topoisomerasa IV en las grampositivas [5].

Un paso importante en el mecanismo de acción de las quinolonas es la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN que contiene ADN roto. La unión de una quinolona a la ADN-girasa provoca un cambio conformacional en el complejo girasa-ADN responsable y han mostrado ser eficaces en tratamientos más prolongados, como infecciones genitourinarias, prostatitis, enfermedades respiratorias, enfermedades de transmisión sexual y gastroenteritis [6].

Los mecanismos prevaletentes de resistencia a las quinolonas están determinados por mutaciones cromosómicas que conllevan a una reducida afinidad de la ADN-girasa y topoisomerasa IV por las quinolonas y/o la sobreexpresión de transportadores multidrogas (MDR) que bombean a las quinolonas hacia el exterior[7].

1.1.2 β -Lactámicos:

Los antibióticos β -Lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) son análogos estructurales de la D-alanil-D-alanina presente en el extremo carboxiterminal del brazo peptídico del peptidoglicano bacteriano. Por tanto, actúan como pseudosustratos de las transpeptidasas (Penicillin Binding Proteins, PBP) [8], las

cuales son responsables de la formación de la estructura tipo enrejado del peptidoglicano [9].

Además, estos antibióticos acilan el sitio activo serina de dichas transpeptidasas incapacitándolas para realizar las funciones de entrecruzamiento en la formación del enrejado [10]. De esta forma se inhibe la formación de la pared celular, la cual es esencial para la división celular y protege a las bacterias del choque osmótico y lisis [11].

La causa primaria de resistencia a estos agentes se debe a la presencia de β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico, inactivándolos de esta manera [12,13]. La segunda causa son las alteraciones aminoacídicas en motivos conservados en o alrededor del sitio activo de las PBPs, lo que conlleva a una reducción de la afinidad por los β -lactámicos [14-16].

1.1.3 Aminoglucósidos:

Los aminoglucósidos inhiben la síntesis proteica [17-19]. Esta inhibición ocurre al unirse directamente a un motivo altamente conservado del ARNr 16S procariótico en el sitio A (Aceptor) de la región de decodificación codón-anticodón [20-22]. Esto provoca errores de traducción, [23] que inducen la síntesis de péptidos sin sentido o truncados [24] e inhibición de la translocación del ARNt del sitio A al sitio P (sitio Peptidil del ARNt) tanto *in vitro* como *in vivo* [25]. La resistencia bacteriana a los aminoglucósidos se manifiesta a través de la presencia de enzimas modificantes que inactivan a los aminoglucósidos, disminución de la permeabilidad de la membrana celular hacia estos, alteración estructural en el blanco ribosomal de la droga o la expulsión de los aminoglucósidos de la célula a través de bombas de eflujo. De estos mecanismos de resistencia, la inactivación por enzimas modificantes es el más importante por lo que se refiere al nivel y frecuencia de resistencia que confieren a las bacterias [26].

1.1.4 Macrólidos, Cetólidos y Estreptograminas:

Los macrólidos, cetólidos y estreptograminas son tres familias de antibióticos de estructura química muy diferente que comparten el mismo mecanismo de acción. Los tres se unen a distintas bases del centro peptidil transferasa del ARNr 23S. Los macrólidos también se unen de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico 23S.

Se han identificado los siguientes mecanismos de resistencia adquirida a los macrólidos, cetólidos y estreptograminas: Aparición de cambios estructurales en el sitio de unión de los mismos al ribosoma y existencia de bombas de expulsión activa así como presencia de enzimas inactivantes [27].

1.1.5 Lincosamidas:

Las lincosamidas son estructuralmente diferentes a los macrólidos y estreptograminas pero funcionalmente similares. Estas se unen cerca del centro peptidil transferasa e inducen la disociación del peptidil-tRNA conteniendo dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos [28,29], lo que conlleva a la acumulación de peptidil-tRNAs en la célula, los cuales son tóxicos para la misma [30, 31].

1.1.6 Oxazolidinonas:

Las oxazolidinonas inhiben la síntesis proteica en una diana distinta a la de otros antimicrobianos. Se fijan a la subunidad 50S, inhibiendo la formación del complejo de iniciación 70S. La resistencia se produce por una mutación en el gen 23S rRNA con lo cual se fija menos antimicrobiano al ribosoma [32].

1.1.7 Glicopéptidos:

Los glicopéptidos son antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis del péptidoglicano, y se han empleado desde hace casi 50 años, fundamentalmente para el tratamiento de infecciones por microorganismos

grampositivos. Actúan sobre la segunda fase de la síntesis de la pared de la bacteria, inhibiendo la formación del peptidoglicano. La resistencia a estos agentes se lleva a cabo a través de la formación de precursores pentapéptidos que terminan en D-alanil-D-lactato [33], al que los glicopéptidos se unen con una afinidad mil veces menor que los que terminan en D-alanina [34]. También la resistencia se puede deber a alteraciones en el nivel de entrecruzamiento, el cual interfiere con la unión de los glicopéptidos [35].

1.1.8 Tetraciclinas:

Las tetraciclinas se corresponden con una familia de antibióticos descubierta en la década de 1940 [36], que se unen con diferente grado de afinidad a seis sitios de la subunidad ribosomal 30S. Tet-1, el sitio de mayor afinidad por las tetraciclinas, se encuentra cerca del sitio aceptor (A) donde el aminoacil ARNt se ancla a la subunidad 30S [37] lo que conduce a que estos compuestos inhiban la síntesis proteica al evitar la unión del aminoacil-ARNt al sitio aceptor ribosomal.

La resistencia a estos agentes se lleva a cabo fundamentalmente a través de tres mecanismos: protección de los ribosomas, reducción de la concentración intracelular de las tetraciclinas e inactivación enzimática [38]. El primer mecanismo es mediado por un conjunto de proteínas denominadas Proteínas de Protección Ribosomal (PPR) Tet(M) [39], Tet(O) [40] TetB(P) [41], y TetS [42], las cuales promueven la liberación y evitan la posterior reunión [43] de las tetraciclinas a los ribosomas.

Las tetraciclinas son agentes con amplio espectro de actividad frente a bacterias grampositivas, gramnegativas, clamidias, micoplasmas, rickettsias y protozoos [43]. Se han usado fundamentalmente en la profilaxis y tratamiento de infecciones adquiridas en la comunidad, especialmente en infecciones respiratorias [44].

1.1.9 Sulfonamidas:

Están estructuralmente relacionadas con el ácido para-amino benzoico (PABA) y compiten con él por la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS) que interviene

en el metabolismo del ácido fólico. El ácido fólico es imprescindible para la síntesis de precursores de los ácidos nucleicos bacterianos. La resistencia a sulfonamidas es mediada por formas resistentes de DHPS codificadas por genes de origen plasmídico (sul1, sul2) [45, 46] o cromosómico (folP) [47-50].

1.1.10 Azoles:

Los azoles (denominados imidazoles o triazoles por tener dos o tres átomos de nitrógeno en el anillo azólico) fueron descubiertos en 1944. Estos compuestos deben su actividad antifúngica a un complejo proceso multimecanístico que se inicia con la inhibición de dos citocromos P-450 involucrados en la síntesis del ergosterol: el citocromo P-450 esterol-14 α -demetilasa [51], responsable de la demetilación del lanosterol [52] y el citocromo P-450 Δ^{22} -desaturasa [53, 54]. La inhibición de la esterol-14 α -demetilasa conlleva a una disminución de la disponibilidad de ergosterol y a la acumulación de esteroides 14 α -metilados [55] y 3-cetoesteroides [56], así como cambios en la estructura y función de la membrana y detención del crecimiento celular [57].

La resistencia a estos agentes está determinada por la producción de 14 α -demetilases con reducida afinidad por los azoles [58], a través de mutaciones que alteran la unión de estos, pero no de los sustratos internos, así como por la superproducción de 14 α -demetilases [59] a través de mecanismos de amplificación genética [60, 61]. La presencia de bombas de eflujo específicas (CDR1, PDR5, y BEN^r) [62-64] y cambios en la composición de los esteroides y/o fosfolípidos de la membrana celular fúngica conllevan a una disminución en la adquisición de los azoles [65, 66]. Cambios en la biosíntesis de esteroides debidos a mutaciones en la $\Delta^{5(6)}$ -desaturasa los cuales producen acumulación de 14 α -metil fecosterol en lugar de ergosterol [67] también han estado implicados en la resistencia a dichos agentes.

El uso de los imidazoles está limitado a las micosis superficiales con excepción del ketoconazol, mientras que los triazoles se emplean tanto para las infecciones fúngicas superficiales como sistémicas [68].

1.2 Generalidades sobre el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1).

1.2.1 Fórmula estructural y proceso de obtención:

El compuesto denominado G-1 es el (Z)-2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, presenta una masa molecular de 296.924, su fórmula global es $C_6H_3NO_3Br_2$ y la fórmula estructural aparece en la Fig. 1.

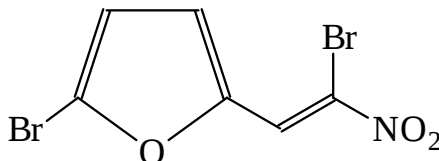


Fig 1. Fórmula estructural del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano.

El G-1 es un derivado furil-etilénico o vinil-furánico, obtenido a partir de los residuos de la caña de azúcar. En estado cristalino presenta una conformación S-trans del doble enlace exocíclico con respecto al anillo furánico, mientras que en solución su conformación es la S-cis como se ha mostrado por los estudios RMN^{1H} [69].

El proceso de obtención del G-1 consta de un paso de reacción a partir del 1-(fur-2-il)-2-nitroeteno agregando bromo en un solvente adecuado, controlando la temperatura a 80°C. Como resultado de la reacción se obtiene una mezcla de compuestos sólidos que se neutraliza y luego se purifica mediante recristalización. El producto se filtra, se seca y se envasa en frascos ámbar [69].

1.2.2 Estructura molecular y configuración espacial:

Mediante métodos espectroscópicos moleculares UV-VIS, IR, RMN^{1H} y ¹³C, espectrometría de masa y difracción de rayos X se determinó la estructura molecular del G-1 y su configuración espacial en estado cristalino y en solución [69].

1.2.3 Especificaciones de calidad y muestra de referencia:

Investigadores del Centro de Bioactivos Químicos desarrollaron y describieron los métodos de control del G-1 materia prima para las especificaciones de calidad [70]. Igualmente se describieron los métodos de control para las especificaciones de calidad del G-1 empleado como muestra de referencia [71].

1.2.4 Estabilidad:

El G-1 materia prima también cuenta con los estudios de estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento mediante métodos de análisis cualitativos (cromatografía de capa delgada, espectrofotometría ultravioleta-visible, temperatura de fusión y espectroscopía infrarroja) y cuantitativos (cromatografía gaseosa y HPLC), además de la determinación de la influencia de la humedad, la luz y la temperatura durante 90 días, así como por el método de vida de estante para determinar la degradación. Se concluyó que el G-1 es estable y se propuso como fecha de vencimiento a temperatura ambiente 2 años [72].

1.2.5 Control microbiológico:

En el aspecto de control microbiológico, debido a los requerimientos que se cumplen durante el proceso de fabricación en las áreas de producción, así como del personal que labora en ellas, el mencionado producto cumple con los requisitos exigidos para su evaluación como "materia prima estéril" de formas farmacéuticas tópicas [73].

1.2.6 Aspectos toxicológicos:

Varios estudios avalan la seguridad toxicológica del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. En estudios de toxicidad aguda se constató que la DL_{50} del producto, establecida por vía oral y percutánea en ratones OF-1 [74] y ratas Sprague Dawley [75] de ambos sexos, fue de 1506-1856 mg/kg y 1470-2370 mg/kg para la vía oral y percutánea, respectivamente. Estos resultados permitieron nominar al 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano como ligeramente tóxico tanto por la vía oral y por vía percutánea.

El estudio de toxicidad subcrónica por vía tópica durante 60 días en ratas de la línea Sprague Dawley [75], en concentraciones de 0.125, 0.5 y 1.25% del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano en petrolato blanco reveló que no hubo diferencias notables entre los grupos tratados y los controles en relación con los eventos clínicos, hemoquímicos, hemáticos y anatomopatológicos ensayados, lo que permitió concluir que el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano a las concentraciones y en el vehículo ensayado, no ejerce efecto tóxico subcrónico durante 60 días de aplicación tópica.

El estudio de toxicidad crónica [75] por vía percutánea realizado al 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano durante 180 días en ratas Sprague Dawley a dosis baja, media y alta (0.125, 1.062 y 2.0%, respectivamente) reveló que este compuesto produce una disminución significativa de la masa corporal en los grupos de dosis alta y media al compararlos con los controles. En los estudios hemoquímicos y hematológicos se apreciaron variaciones en las proteínas totales, albúmina, creatinina, hemoglobina, hematocrito y potasio plasmático. Los resultados para las enzimas lactato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina se comportaron con diferencias en ambos sexos. La glicemia sufrió variaciones al disminuir significativamente en machos y aumentar en las hembras. Los estudios anatomopatológicos concluyeron que el órgano más dañado fue la piel correspondiente al área de aplicación, donde se detectaron lesiones como hiperqueratosis, acantosis, aumento del número de folículos, colagenización de la dermis, liquefacción de la capa basal y engrosamiento ligero de la dermis,

estas alteraciones se asociaron con el incremento de la dosis, donde el grupo de máxima dosis fue el más dañado.

Posteriormente las muestras de piel se estudiaron mediante morfometría microscópica analizándose el espesor de la epidermis, de la capa de células de la epidermis, de la capa de queratina y la densidad de folículos [76]. Se encontró que entre los grupos tratados con el producto en estudio, el grupo sometido a dosis baja presentó los menores valores de altura del epitelio, de la capa celular y de queratina. El número de folículos pilosos de los grupos de dosis alta, media y baja registró valores significativamente mayores que el control. Se concluyó que el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano es un producto inocuo, que no ocasiona alteraciones en la piel.

Los estudios de genotoxicidad del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano comprenden un total de 10 trabajos realizados en Cuba y en Estados Unidos. Los estudios en su conjunto fueron sometidos al criterio de reconocidos especialistas en la materia [77], los cuales concluyeron que el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano permanece clasificado en el nivel de interés LOC I (de menor riesgo) como un compuesto capaz de interactuar con el ADN bajo ciertas condiciones *in vitro* (mutágeno *in vitro*) pero sin evidenciar genotoxicidad *in vivo*, por lo que puede asumirse que existen fuertes evidencias de que el riesgo genotóxico para el uso en humanos es poco probable. A esta conclusión se arribó después de realizar y analizar dos baterías de ensayos, de los cuales solamente fueron positivos los ensayos *in vitro* de Ames y el ensayo citogenético con células de ovarios de hamster [78]. El estudio de sensibilización en piel de cobayos con el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano marcado con ^{14}C y formulado al 0.15% en base oleosa (petrolato líquido-sólido) (p/p 20/csp100) según el procedimiento de "Maximization Test" reveló que el formulado no produjo sensibilización en las condiciones de ensayo [79].

Al evaluar el potencial irritante dérmico del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano al 0.15% formulado en base oleosa (petrolato líquido pesado/petrolato sólido blanco, p/p 20/csp100 g), en conejos albinos de la raza Nueva Zelandia,

no se observaron signos de irritación en piel y se obtuvo un Índice de Irritación Primaria (IIP) de 0 por lo que el producto se clasificó como no irritante [80]. Al estudiar la irritabilidad ocular aguda del G-1 puro en conejos albinos, raza Nueva Zelanda, [44] lo clasificaron como irritante severo para las estructuras oculares, ya que causa daños intensos e irreversibles al aplicarse en dosis única de 100 mg; sin embargo, el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano formulado al 0.15% en petrolato líquido-sólido (p/p 40/csp100) se clasificó como no irritante en un estudio de irritabilidad iterativa por Tenorio [81] al emplearlo con una frecuencia de dos veces al día durante 30 días.

1.2.7 Actividad antimicrobiana del G-1:

El G-1 ha mostrado potencial actividad *in vitro* como bactericida - fungicida de amplio espectro; comprobándose su efectividad frente a 908 cepas de bacterias gramnegativas y 119 cepas grampositivas. Otros trabajos refieren su actividad frente a *Enterobacter sp*, *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otra parte González y col. en 1993 obtuvieron resultados similares frente a 293 cepas de hongos gemantes del género *Candida* [82,83]. Esta actividad ha sido demostrada también frente a hongos dermatofitos y filamentosos [83;84].

Estudios realizados por Blondeau y col. en 1997, amplían y corroboran estos resultados de actividad *in vitro* frente a 2702 microorganismos multirresistentes [85]. Se comparó el Efecto Postantibiótico (EPA) del G-1 y la gentamicina frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El EPA fue inducido por exposición a una concentración de 4xCIM del G-1 y la gentamicina, excepto para *Escherichia coli* donde se utilizó 1xCIM de gentamicina. El G-1 produjo EPA prolongado (>2 horas), en el rango de 0.8 a 3.6 horas para las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ensayadas. En las bacterias gramnegativas evaluadas, el G-1 mostró EPA más prolongado que en las bacterias grampositivas, mientras que en las cepas de *Staphylococcus aureus* la gentamicina indujo EPA ligeramente superior al G-1 con diferencias estadísticamente no significativas. En las cepas de *Escherichia coli* el G-1 indujo EPA más prolongado que la gentamicina. Se

pudo observar que no hubo una correlación estadística entre la concentración y el EPA para el G-1, aunque a una concentración de 4xCIM de G-1 el EPA fue ligeramente superior que a una concentración de 2xCIM en las cepas de referencia estudiadas [86].

Se comparó el Efecto Postantifúngico (EPAF) de 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1) y de anfotericina B frente a cepas de *Candida albicans*. El EPAF fue inducido por exposición de los microorganismos durante 1 hora a 30 °C con agitación a una concentración de 1 x CIM de G-1 y de anfotericina B. Como resultado, G-1 produjo un EPAF prolongado (> 2 horas) en el rango de 4,47 a 6,23 h para las cepas ensayadas. G-1 indujo un EPAF más prolongado que anfotericina B en los microorganismos estudiados [87]. Se evaluó la eficacia de un nuevo ungüento tópico cuyo principio activo es el 2-bromo-5-(2-bromo-2nitrovinil)-furano (G-1) a una concentración de 0.125%; en un modelo de candidiasis cutánea desarrollado en curieles de la línea Hartley. Se comparó la evolución de la lesión utilizando intervalos de aplicación del ungüento 12 y 24 horas, durante tres días de tratamiento. Se pudo observar que la utilización del ungüento tópico cada 12 horas por tres días resultó ser eficaz en el tratamiento de este tipo de lesión. Mientras que el tratamiento cada 24 horas no fue suficiente para lograr una recuperación satisfactoria [88].

1.2.8 Generalidades sobre Pruebas de Susceptibilidad:

Las pruebas de susceptibilidad se emplean tanto en los laboratorios de microbiología clínica como en los laboratorios de investigación para ayudar a los clínicos en la elección de un antibiótico adecuado para tratar al paciente o para el descubrimiento de agentes novedosos, respectivamente [89].

La mayoría de estas pruebas se desarrollan en medio sólido o líquido. En medio sólido se han desarrollado las pruebas de difusión, usando discos (las pruebas de Stokes y de Kirby–Bauer), tiras de papel (E-test) o tabletas impregnadas de antibióticos o haciendo pozos en el agar los cuales se llenan con una solución de antibiótico. También se usan las pruebas de dilución en agar, en las que se

realizan diluciones decrecientes del antibiótico en medio agarizado. En medio líquido existen dos formatos: macrodilución y microdilución, donde igualmente se realizan diluciones decrecientes del antibiótico en el medio.

Debido a que varios factores afectan la reproducibilidad de las pruebas de susceptibilidad [90-92], estas técnicas han sido ampliamente estandarizadas [93]. Para garantizar la calidad de los resultados se exige la realización de controles de calidad rutinarios [94]. Para aumentar la calidad de la lectura final de los resultados se han desarrollado equipos y/o métodos que facilitan dicha función. Los sistemas más ampliamente utilizados son el de Oxoid Aura [95] para la difusión en disco, y MicroScan, Vitek [96] así como el MIDITECH [97] para la dilución en caldo.

Para la evaluación de agentes antifúngicos se recomienda el uso de los métodos de macro y microdilución en el caso de las levaduras [98, 99] y la microdilución para hongos filamentosos [100, 101], mientras que para los dermatofitos en muchas ocasiones se usan métodos que llevan agar debido al lento crecimiento de los mismos, aunque se ha trabajado en la estandarización de las técnicas de microdilución en caldo [102].

Uno de los aspectos más importantes de las pruebas de susceptibilidad antifúngica es el tamaño del inóculo, el cual puede tener influencia en los resultados de la susceptibilidad [103, 104]. Aunque el NCCLS (Document M38-P, 1998) recomienda el método espectrofotométrico para ajustar el tamaño del inóculo de hongos formadores de conidios, se documentó que variables tales como el tamaño y el color de las esporas pueden influir en la densidad óptica y que el método espectrofotométrico requiere de un proceso de estandarización dependiente de la especie [105], por lo que se sugiere que la preparación del inóculo a través del conteo en un hematocitómetro es un proceso más exacto [106, 107].

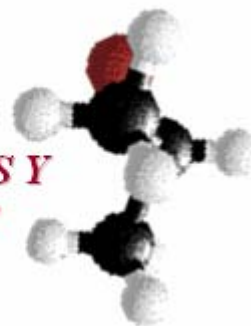
Por otro lado, se plantea que las condiciones óptimas para evaluar los hongos dermatofitos son: un inóculo de 10^4 ufc/mL y una temperatura de incubación de 28°C durante un período de siete días [102], mientras que para otros hongos

filamentosos de crecimiento más rápido se emplea una densidad de inóculo similar, lectura dentro de las 48-72 h de incubación y determinación colorimétrica de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)^[100]. El empleo de métodos colorimétricos para determinar la lectura final de los resultados se ha corroborado por varios autores ^[108-111].

Para determinar la CIM de los agentes antifúngicos se han seguido varios criterios. Estos incluyen la ausencia de crecimiento, reducción del crecimiento a trazas y marcada reducción del crecimiento de forma visual ^[112, 113], así como la reducción del crecimiento en un 20, 50 ó 70% con relación al control con medición espectrofotométrica ^[114]. Otros métodos alternativos para evaluar la susceptibilidad de los agentes antifúngicos incluye la metodología E-test, la cual se ha adaptado a algunos agentes y es aceptable para las levaduras y los agentes antifúngicos azoles ^[115-117], aunque también se ha utilizado para evaluar algunos hongos filamentosos ^[101, 118, 119]. También la citometría de flujo se ha reconocido como una herramienta para determinar la susceptibilidad antifúngica ^[120-123], especialmente cuando se usen colorantes vitales fluorescentes ^[124-126].

La determinación de la CIM se usa en los laboratorios de diagnóstico fundamentalmente para confirmar la resistencia, pero más a menudo se emplea como herramienta para determinar la actividad *in vitro* de nuevos antimicrobianos, y los datos de tales estudios se usan para determinar el punto de corte de cada antibiótico ^[93] en combinación con otros datos microbiológicos, farmacocinéticos, farmacodinámicos y clínicos ^[127].

*MATERIALES Y
MÉTODOS*



Capítulo # 2 Materiales y Método

2.1 Microorganismos de ensayo y de referencia:

Los ensayos se realizaron con 30 cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* procedentes de aislamientos clínicos del Hospital “Arnaldo Milián Castro” así como con las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Candida albicans* ATCC 10231. Las mismas habían sido previamente aisladas y caracterizadas según los métodos establecidos internacionalmente en los laboratorios microbiológicos y del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP).

2.2 Medios de cultivo:

Para realizar las pruebas de sensibilidad antibacteriana *in vitro* se utilizó el caldo Mueller-Hinton, pH $7,3 \pm 0,2$. Para las levaduras se utilizó el medio RPMI-1640, pH $7,0 \pm 0,1$. El pH del Mueller-Hinton se ajustó previo a la esterilización por autoclave mientras que el pH del RPMI se ajustó antes de esterilizarlo a través de filtros millipore.

2.3 Sustancia de ensayo y solvente:

La sustancia de ensayo fue el producto 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1), principio activo sintetizado en la Planta de Producción del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas (UCLV) con una pureza superior al 98%. Se utilizó como solvente polietilenglicol 400 de calidad farmacéutica.

2.4 Método de Microdilución en Caldo:

Para la determinación de la actividad antimicrobiana del G-1 en condiciones estándares se siguió la metodología descrita por el National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS):

2.5 Preparación de las soluciones seriadas dobles:

Se adicionaron 200 μ L de caldo de cultivo estéril al pozo # 1 de placas de microtitulación, el cual se dejó como control del medio. A los pozos 2 al # 12 se les adicionó 100 μ L del caldo estéril. Seguidamente se diluyó la solución de trabajo del antimicrobiano con pipeta regulable en los pozos del # 2 al # 11 lo que resultó en diluciones decrecientes 1:2 del mismo. Se ensayaron concentraciones de 512 a 1 μ g/mL, realizándose tres réplicas por microorganismo de ensayo.

2.6 Preparación y Adición del inóculo:

El inóculo se preparó por ajuste de la suspensión de los microorganismos de ensayo en fase logarítmica de crecimiento con el standard 0.5 de McFarland, adicionando medio de cultivo cuando fuere necesario. Se tomó 0.01 mL de esta suspensión y se añadió a 9.99 mL de caldo estéril para cada cultivo lo que resultó en una carga aproximada de $1-2 \times 10^5$ ufc/mL. A los pozos del # 2 al # 12 se adicionó 100 μ L de la suspensión del inóculo. El pozo 12 se reservó como control del crecimiento. Las placas se incubaron a 35-37°C en condiciones aerobias.

2.7 Determinación de la influencia de varios factores en la actividad de G-1:

Para estudiar la influencia de varios factores en la actividad *in vitro* del G-1 se comparó la sensibilidad a este producto por el método de microdilución en caldo en condiciones estándares y variando varios parámetros según ha sido descrito por varios autores_[128]: carga del inóculo (10^7 y 10^4 UFC/ml para bacterias y

levaduras, respectivamente), pH (5,8 y 8,8 para bacterias; 7,0 y 7,4 para levaduras), adicionando albúmina (3,2 g/dl), suero humano (20 % y 70 %) y cisteína al medio de cultivo.

2.7.1 Carga del inóculo

Para ajustar la carga del inóculo se hicieron diluciones de orden 1:10 hasta obtener la carga deseada a partir de un inóculo estandarizado según la escala de McFarland.

2.7.2 Adición de suero.

El suero fue obtenido de varios voluntarios sanos, inactivado a 56 °C durante 30 minutos y adicionado al medio de cultivo.

2.7.3 Adición de albúmina

Se adicionó albúmina humana al medio de cultivo a una concentración de 3.2 g/dl.

2.7.4 Adición de cisteína.

Se adicionó cisteína al medio de cultivo en relación molar 2:1 con relación al G-1 (208 µg/ml cisteína: 256 µg/ml G-1, a nivel de la solución de trabajo) y se esterilizó a través de filtros Millipore.

2.7.5 Variación del pH

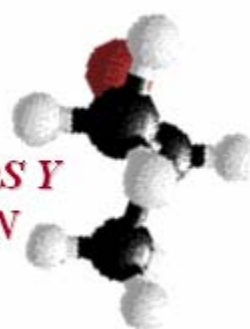
Los valores de pH deseados del medio de cultivo se ajustaron previa esterilización por autoclave.

2.8 Lectura de los resultados

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se definió como la menor concentración de la sustancia de ensayo que inhibió el crecimiento visible de los

microorganismos y fue dada en términos de CIM_{50} y CIM_{90} ; calculadas mediante un programa para microcomputadora basado en el método de interpolación logarítmica^[129].

*RESULTADOS Y
DISCUSIÓN*



Capítulo # 3 Resultados y Discusión

3.1 Influencia de varios factores en la actividad del G-1 frente a *Escherichia coli*.

La tabla 1 muestra los valores de CIM del G-1 en términos de CIM₅₀ y CIM₉₀ frente a cepas de *Escherichia coli* en condiciones normales y variando ciertos factores como el pH, tamaño del inóculo y presencia de suero (20% y 70%), cisteína y albúmina. Al comparar los valores de CIM₅₀ determinados en condiciones estándar con los obtenidos al aumentar el tamaño del inóculo se pudo apreciar que la CIM₅₀ aumentó 7.2 veces (de 6.1 a 43.6 µg/ml), pero al disminuir el pH hasta 5.8 la actividad del G-1 aumentó ligeramente 2.65 veces (de 6.1 a 2.3 µg/ml), mientras que al aumentarlo hasta 8.8 el valor de la CIM₅₀ aumentó 2.13 veces su valor. Por otro lado, la presencia de suero, albúmina y cisteína aumentó notablemente los valores de la CIM del G-1, siendo la presencia de albúmina, cisteína los que mayor efecto negativo mostraron sobre la actividad, donde la albúmina aumentó alrededor 20.54 veces su valor y la cisteína (8.73) veces, mientras que el suero 20% aumentó solamente 2.04 veces su valor, en el caso del suero 70% fue 7.13 veces superior. Por otro lado al comparar los valores de CIM₉₀ se pudo observar que la actividad del G-1 al disminuir el pH aumentó su actividad 2.88 veces, mientras que al aumentar el pH los valores de la CIM₉₀ aumentaron 2.42 veces su valor. Al incrementar el tamaño del inóculo y la adición del suero 70% la CIM₉₀ aumentó 5.7 veces su valor. Sin embargo, en el caso de la albúmina y la cisteína se observó que los valores de CIM₉₀ aumentaron en gran medida.

Tabla 1. Influencia de varios factores en la actividad del G-1 medida en términos de CIM₅₀ y CIM₉₀, frente a *Escherichia coli*.

CIM (µg/ ml)	Condición							
	Normal	Inóculo 10 ⁷ UFC/mL	pH 5.8	pH 8.8	Suero 20 %	Suero 70 %	Albúmina	Cisteína
CIM₅₀	6.1	43.6	2.3	13	12.5	43.6	125.3	53.3
CIM₉₀	10.4	59.3	10.6	25.2	23.5	59.3	221.8	149.6

Se pudo observar que el aumento del tamaño del inóculo tuvo un efecto significativo frente a *E. coli*, aunque dicho efecto podría compensarse aumentando las concentraciones del producto en infecciones con alta densidad de inóculo como la peritonitis, siempre que no se aumenten los efectos tóxicos secundarios. A pesar de que la actividad de G-1 disminuye a pH básico y aumenta a pH ácido, dicha variación no es significativa (<4 veces). La actividad *in vitro* de algunos agentes antimicrobianos como las quinolonas no se afecta a pH básico, sin embargo a pH ácido esta disminuye significativamente de 4 a 16 veces, [130], al igual que la amoxicilina pierde su actividad rápidamente a pH 2, y para ejercer su acción tiene que encontrarse en contacto con las bacterias durante un periodo largo y en cantidad suficiente, específicamente a pH 5.5 la actividad de la amoxicilina es 10 veces menor que a pH 7, en el caso de los macrólidos la sensibilidad se ve afectada por los cambios de pH. Sin embargo, la actividad bactericida del metronidazol y la tetraciclina es similar a los diferentes pH estudiados [131]. Esta estabilidad relativa del G-1 a las variaciones de pH puede favorecer su uso en ciertas infecciones como abscesos y en la erradicación de *Helicobacter pylori* de las úlceras gástricas donde el pH es bajo [132]. En presencia de albúmina y suero, la actividad del G-1 disminuye significativamente (> 4 veces). En este sentido, se plantea que la reducción de la actividad antimicrobiana de un producto superior a ocho veces, se observa cuando la unión a proteínas del mismo es superior al 90%. Sin embargo, fármacos como el faropenem, el cual se une entre un 95 y un 98% al suero y a albúmina humanos sólo ve afectada su actividad en dos o tres diluciones [133].

3.2 Influencia de varios factores en la actividad del G-1 frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Al comparar los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ frente a *Pseudomonas aeruginosa*, en condiciones normales y variando ciertos factores como el tamaño del inóculo

y el pH (tabla 2), se pudo apreciar que la diferencia fue de 1.95 veces para el inóculo y de 1.86 veces para el pH, sin embargo al disminuir el pH la actividad del G-1 aumentó 1.53 veces (de 6 a 3.9). Por otro lado, la presencia de suero, albúmina y cisteína aumentaron notablemente los valores de la CIM del G-1, siendo la presencia de suero al 70% y albúmina los que mayor efecto negativo mostraron sobre la actividad. El aumento de los valores de CIM₅₀ en presencia de albúmina fue alrededor de 25.5 veces, sin embargo la adición de suero 20% y Cisteína fue de 7.83 y 8.96 veces (de 6 a 47 y de 6 a 53.8), respectivamente. En el caso de la CIM₉₀ se pudo observar que la actividad del G-1 al disminuir el pH aumentó su actividad 1.36 veces, mientras que al aumentar el pH el valor de la CIM₉₀ disminuyó su actividad 1.27 veces su valor. Por otro lado, al aumentar el tamaño del inóculo no se observó muchos cambios en relación con los obtenidos en condiciones normales, pero con la adición de cisteína el valor de CIM₉₀ aumentó 13.5 veces y 6.78 para el suero 20%. Sin embargo, en el caso de la albúmina y suero al 70% se observó que los valores aumentaron en gran medida por encima de 20.81 veces.

Tabla 2. Influencia de varios factores en la actividad del G-1 medida en términos de CIM₅₀ y CIM₉₀ frente a *Pseudomonas aeruginosa*

CIM (µg/ ml)	Condición							
	Normal	Inóculo 10 ⁷ UFC/mL	pH 5.8	pH 8.8	Suero 20 %	Suero 70 %	Albúmina	Cisteína
CIM₅₀	6	11.7	3.9	11.2	47	102.1	153.5	53.8
CIM₉₀	9.4	16	6.9	12	63.8	195.7	231.1	126.9

Al aumentar el tamaño del inóculo se pudo observar que el mismo no tuvo un efecto significativo frente a *Pseudomonas aeruginosa*, la diferencia solo fue de 1.5 veces con respecto a los valores de CIM₅₀ determinados en condiciones estándar. El efecto del inóculo se ha observado con algunos fármacos como el faropenem el cual disminuye su actividad 4 veces al aumentar el tamaño del inóculo de 10⁴ a 10⁶ UFC/ml frente a algunos microorganismos [134]. También el incremento del inóculo elevó la CIM del faropenem para *Morganella morganii*

desde (0.06-1 hasta 2–4 mg/L)^[135] lo cual avala la fuerte actividad de G-1 frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Al variar el pH se pudo apreciar que a pH básico dicha actividad disminuyó aunque no fue muy notable, pero a pH ácido la actividad del G-1 aumentó discretamente. La actividad *in vitro* de algunos agentes antimicrobianos como es el caso de la nueva fluoroquinolona CFC-222 no se ve afectada por el tamaño del inóculo, composición del medio, o la presencia de suero de caballo. Sin embargo, su actividad disminuyó significativamente por un cambio en el pH del medio de (7,0 a 6.0) como fue el caso de otras quinolonas probadas ^[136] Por otro lado la presencia de cisteína, albúmina y suero al 70%, fueron los que mayor efecto negativo mostraron sobre la actividad de G-1 con una disminución significativa (> 4 veces).

3.3 Influencia de varios factores en la actividad del G-1 frente a *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 3 se puede apreciar que al comparar los valores de CIM₅₀ determinados en condiciones estándar con los obtenidos al aumentar el tamaño del inóculo la CIM₅₀ aumentó 3.57 veces (de 10.4 a 37.2 µg/ml), pero al disminuir el pH hasta 5.8 la actividad del G-1 aumentó ligeramente 3.85 veces (de 10.4 a 2.7 µg/ml), mientras que al aumentarlo hasta 8.8 los valores de la CIM₅₀ aumentó 1.79 veces. Por otro lado, la presencia de suero, albúmina y cisteína aumentaron notablemente los valores de la CIM del G-1, siendo la presencia de albúmina y suero al 70% los que mayor efecto negativo mostraron sobre la actividad del mismo, donde la albúmina aumentó alrededor 16.28 veces su valor y el suero al 70% 15.72 veces, mientras que el suero al 20% aumentó solamente 5.01 su valor, por otro lado al comparar los valores de CIM₉₀ se pudo observar que la actividad del G-1 al disminuir el pH aumentó su actividad 3.97 veces, mientras que al aumentar el pH los valores de la CIM₉₀ aumentaron 1.95 veces su valor. Al incrementar el tamaño del inóculo y la adición de cisteína las concentraciones aumentaron (4.33 y 2.01) veces su valor, sin embargo en el

caso del suero al 20% fue de 6.85, no siendo así para el suero 70% y la albúmina que mostraron valores por encima de 15.92

Tabla 3. Influencia de varios factores en la actividad del G-1 medida en términos de CIM₅₀ y CIM₉₀ frente a *Staphylococcus aureus*.

CIM (µg/ ml)	Condición							
	Normal	Inóculo 10 ⁷ UFC/mL	pH 5.8	pH 8.8	Suero 20 %	Suero 70 %	Albúmina	Cisteína
CIM₅₀	10.4	37.2	2.7	18.7	52.2	163.5	169.4	21.8
CIM₉₀	14.7	63.7	3.7	28.7	100.8	234.1	235.7	29.6

Al comparar los valores obtenidos en estos estudios *in vitro* se observó que al variar ciertos factores como el tamaño del inóculo, el mismo tuvo un efecto significativo frente a *Staphylococcus aureus*; este mismo efecto se ha observado con algunos fármacos como es el caso del cefamandol, cefaclor, penicilina G y vancomicina frente a este microorganismo, los cuales disminuyeron su actividad al aumentar el tamaño del inóculo de 10⁴ a 10⁶ [137]. Aunque la actividad de G-1 disminuye a pH básico y aumenta a pH ácido, dicha variación no es significativa (<4 veces); sin embargo, en el caso de una nueva 6-fluoro-8-difluorometoxi quinolona (CS-940), ésta disminuyó su actividad considerablemente bajo condiciones ácidas [138]. Esta estabilidad relativa del G-1 a las variaciones de pH puede favorecer su uso en ciertas infecciones como abscesos y en la erradicación de ciertas bacterias donde el pH es bajo [139]. Por otro lado la presencia de suero (70% y 20%) y albúmina fueron los que mayor efecto negativo mostraron sobre la actividad del G-1. Lo que no tiene explicación aparente es la significativa disminución de su actividad para levaduras y bacterias gramnegativas y no para *S. aureus*. En este sentido podría especularse que el producto de la reacción G-1/cisteína solo tendría actividad frente a *S. aureus* o que el paso de G-1 al interior de este microorganismo podría ser más rápido que la velocidad de reacción de adición, lo cual no

ocurriría del mismo modo para el resto de los microorganismos. De todos modos esta hipótesis debería comprobarse experimentalmente.

3.4 Influencia de varios factores en la actividad del G-1 frente a *Candida albicans*

Al comparar los valores de CIM₅₀ determinados frente a *Candida albicans* en condiciones estándar con los obtenidos al aumentar el tamaño del inóculo (Tabla 4), se puede apreciar que la CIM₅₀ permaneció prácticamente constante al variar este factor, aunque un aumento del pH hasta 7,0 y 7,4 (ver (b) y (c)) incrementó ligeramente los valores hasta 1.41 y 1.33 veces. Sin embargo en presencia de suero, albúmina y cisteína aumentó notablemente los valores de la CIM del G-1, siendo la presencia de suero al 70% y cisteína los que mayor efecto negativo mostraron sobre la actividad. El aumento de los valores de CIM₅₀ en presencia de cisteína fue alrededor de 78.33 veces muy similar al del suero 70%. En el caso de la CIM₉₀ tampoco ocurrieron muchos cambios, prácticamente se mantuvo constante con respecto a los valores estándar como es el caso del tamaño del inóculo y el pH, pero en el caso de la albúmina y del suero 20% sus valores aumentaron 12 y 23.5 veces, respectivamente. Sin embargo, en el caso del suero al 70% y cisteína se observó que aumentaron notablemente sus valores por encima de 63.8 veces.

Tabla 4. Influencia de varios factores en la actividad del G-1 medida en términos de CIM₅₀ y CIM₉₀ *Candida albicans*.

CIM (µg/ ml)	Condición							
	Normal	Inóculo 10 ⁷ UFC/mL	pH 5.8	pH 8.8	Suero 20 %	Suero 70 %	Albúmina	Cisteína
CIM₅₀	0.6	0.7	0.9	0.8	12.5	48.4	3.4	47
CIM₉₀	1.2	1.3	1.7	1.6	23.5	83.3	14.4	63.8
Leyenda: para C. albicans: (a) = 104, (b) = 7.0, (c) = 7.4, n = 30 para c/especie								

El aumento del tamaño del inóculo y la variación del pH no mostraron efecto significativo frente a *Candida albicans*; sin embargo, la actividad antimicrobiana de un nuevo antibiótico inyectable, carbapenem (BO-2727) con amplio espectro y potente actividad antibacteriana, fue afectada por el pH del medio y tamaño del inóculo, de la misma manera que el meropenem y imipenem [140], lo cual avala la fuerte actividad de G-1 frente a estos microorganismos. En presencia de suero y cisteína, la actividad del G-1 disminuyó significativamente (> 4 veces). Sin embargo, en el caso de los imidazoles (fluconazol, itraconazol y ketoconazol), los mismos se unen fuertemente a las proteínas y disminuyen su actividad entre 16 y 1024 veces frente a algunas cepas de *Candida albicans* en presencia de suero al 20% [141]. Por tal razón puede esperarse una elevada unión de G-1 a proteínas. Dicha suposición debería comprobarse experimentalmente así como su significado farmacocinético y clínico, pues se plantea que solamente la fracción no unida es la que tiene actividad antimicrobiana [142]. No obstante, algunos fármacos como la daptomicina con unión a proteínas superior al 98% mejora su actividad clínica al aumentar su concentración sérica por más de cuatro veces su CIM [143]. Con excepción de *Staphylococcus aureus*, la presencia de cisteína disminuyó significativamente la actividad del G-1. Esta disminución es lógica toda vez que se plantea que el G-1 puede sufrir reacciones de adición al doble enlace exocíclico.

CONCLUSIONES



Conclusiones:

1. La actividad *in vitro* del G-1 permanece prácticamente invariable al variar el pH del medio, siendo ligeramente superior a pH ácido que a pH básico, frente a todos los microorganismos ensayados.
2. La actividad *in vitro* del G-1 disminuye significativamente al adicionar suero, albúmina y cisteína al medio de cultivo frente a todos los microorganismos ensayados excepto para la cisteína frente a *Staphylococcus aureus*.
3. La actividad *in vitro* del G-1 disminuye frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y permanece invariable frente a *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* al aumentar la carga del inóculo.

RECOMENDACIONES



Recomendaciones:

4. Realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar el grado de unión del G-1 a proteínas plasmáticas así como su significado farmacodinámico.
5. Dilucidar el mecanismo de acción del G-1 y su relación con la disminución de la actividad del mismo en presencia de cisteína.
6. Realizar experimentos *in vivo* producidos con elevadas cargas de inóculo de *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* y tratados con G-1.

BIBLIOGRAFIA



1. Mateos, P. Agentes antimicrobianos y microorganismos cited; Available from: [http://coli.usal.es /Web/educativo/micro2/tema20.html](http://coli.usal.es/Web/educativo/micro2/tema20.html) - 29k.
2. Dax, S.L. and Blackie.A. P. Antibacterial Chemotherapeutic Agents. 1997[cited; Available from: <http://www.thomson.com> GOPHER: gopher.thomson.com A service of I(T)P. Scott L. Dax The RW Johnson Pharmaceutical Research Institute Spring House.
3. Errecalde, J, Nueva Revolución en Quimioterápicos 2004. **3**(25): p: 10-11, Facultad de Cs. Veterinarias, U, N La Plata. <http://www.producción-animal.com.ar>.
4. Hagman, H. and L. Strausbaugh, Vancomycin-resistant enterococci. The 'superbug' scourge that's coming your way. 1996: **99** (5): p. 60-65.
5. Fournier, B., et al., Selective targeting of topoisomerase IV and DNA gyrase in *Staphylococcus aureus*: different patterns of quinolone-induced inhibition of DNA synthesis. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(8): p. 2160-5.
6. Kampranis, S.C. The DNA gyrase-quinolone complex-ATP hydrolysis, and the mechanism of DNA cleavage. J Biol Chem 1998, 273: 22615
7. Hooper, D.C., Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(2): p. 337-41.
8. Dessen, A., et al., Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45106-12.
9. Goffin, C. and J.M. Ghuysen, Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1079-93.
10. Gordon, E., et al., The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. J Mol Biol, 2000. **299**(2): p. 477-85.

11. Höltje, J.V., Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev 1998; **62**: p. 181–203.
12. Massova, I. and S. Mobashery, Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(1): p. 1-17.
13. Bush, K., New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis, 2001. **32**(7): p. 1085-9.
14. Mouz, N., et al., Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 19175-80.
15. Nagai, K., et al., Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(5): p. 1273-80.
16. Asahi, Y. and K. Ubukata, Association of a thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(9): p. 2267-73.
17. Fourmy, D., et al., Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. Science, 1996. **274**(5291): p. 1367-71.
18. Recht, M.I.; S.Douthwaite, and J.D. Puglisi, Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. Embo J, 1999. **18**(11): p. 3133-8.
19. Yoshizawa, S; D, Fourmy, and J.D. Puglisi, Structural origins of gentamicin antibiotic action. Embo J, 1998. **17**(22): p. 6437-48.
20. Moazed, D. and H.F. Noller, Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. Nature, 1987. **327**(6121): p. 389-94.

21. Woodcock, J., et al., Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. *Embo J*, 1991. **10**(10): p. 3099-103.
22. Purohit, P. and S. Stern, Interactions of a small RNA with antibiotic and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature*, 1994. **370**(6491): p. 659-62.
23. Yoshizawa, S., D. Fourmy, and J.D. Puglisi, Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science*, 1999. **285**(5434): p. 1722-5.
24. Corvaisier, S., V. Bordeau, and B. Felden, Inhibition of transfer messenger RNA aminoacylation and trans-translation by aminoglycoside antibiotics. *J Biol Chem*, 2003. **278**(17): p. 14788-97.
25. Edelman, P. and J. Gallant, Mistranslation in *E. coli*. *Cell*, 1977. **10**(1): p. 131-7.
26. Azucena, E. and V. Mobashery, Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. 2001. **4**: p. 106–117.
27. Mensa, J., E. García, and J. Vila, Macrólidos, Cetólidos y Estreptogramina. 2003. **21**(4): p. 200-8
28. Schlunzen, F., et al, Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 2001. **413**(6858): p. 814-21.
29. Hansen, J.L., et al., The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol Cell*, 2002. **10**(1): p. 117-28.
30. Heurgue-Hamard, V., et al., Origins of minigene-dependent growth inhibition in bacterial cells. *Embo J*, 2000. **19**(11): p. 2701-9.
31. Tenson, T., M. Lovmar, and M. Ehrenberg, The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol*, 2003. **330**(5): p. 1005-14.
32. Pigrau, C., Servicio de Enfermedades Infecciosas. . 2003. **21**(3): p. 157-65

33. Billot-Klein, D., et al, Peptidoglycan synthesis and structure in *Staphylococcus haemolyticus* expressing increasing levels of resistance to glycopeptide antibiotics. J Bacteriol, 1996. **178**(15): p. 4696-703.
34. Arthur, M.; Reynolds P, and Courvalin P, Glycopeptide resistance in enterococci. 1996. **4**: p. 401–407.
35. Hanaki, H., et al., Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. J Antimicrob Chemother, 1998. **42**(3): p. 315-20.
36. Chopra, I. and M. Roberts, Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(2): p. 232-60; second page, table of contents.
37. Pioletti, M., et al., Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. Embo J, 2001. **20**(8): p. 1829-39.
38. Schnappinger, D. and W. Hillen, Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. Arch Microbiol, 1996. **165**(6): p. 359-69.
39. Burdett, V., Tet (M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. J Bacteriol, 1996. **178**(11): p. 3246-51.
40. Ohnuki, T., et al., Molecular cloning of tetracycline resistance genes from *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces griseus* and characterization of the cloned genes. J Bacteriol, 1985. **161**(3): p. 1010-6.
41. Sloan, J., et al., The *Clostridium perfringens* Tet P determinant comprises two overlapping genes: tetA(P), which mediates active tetracycline efflux, and tetB(P), which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants. Mol Microbiol, 1994. **11**(2): p. 403-15.
42. Nikolich, M.P., N.B. Shoemaker, and A.A. Salyers, a *Bacteroides* tetracycline resistance gene represents a new class of ribosome

- protection tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. **36**(5): p. 1005-12.
43. Connell, S.R., et al., Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Embo J*, 2003. **22**(4): p. 945-53.
44. Roberts, MC. Tetracycline Therapy. *Clin Infect Dis*. 2003. **36**: p. 462-467.
45. Sundstrom, L., et al., Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of dhfrV and sull and a recombination active locus of Tn21. *Mol Gen Genet*, 1988. **213**(2-3): p. 191-201.
46. Enne, V.I., et al., Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of sul2 or a short insertion in chromosomal folP. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(6): p. 1934-9.
47. Maskell, J.P., A.M. Sefton, and L.M. Hall, Mechanism of sulfonamide resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. **41**(10): p. 2121-6.
48. Radstrom, P., et al., Transformational exchanges in the dihydropteroate synthase gene of *Neisseria meningitidis*: a novel mechanism for acquisition of sulfonamide resistance. *J Bacteriol*, 1992. **174**(20): p. 6386-93.
49. Vedantam, G., et al., Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(1): p. 88-93.
50. Padayachee, T. and K.P. Klugman, Novel expansions of the gene encoding dihydropteroate synthase in trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(9): p. 2225-30.
51. De Backer, M.D., et al., Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(6): p. 1660-70.

52. Hitchcock, C.A., et al., Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. *Biochem J*, 1990. **266**(2): p. 475-80.
53. Kelly, S.L., et al., Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol delta22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *J Biol Chem*, 1997. **272**(15): p. 9986-8.
54. Lamb, D.C., et al., Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol delta22-desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(7): p. 1725-8.
55. Kelly, S.L., et al., Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 alpha-methylergosta-8, 24(28)-dien-3 beta, 6 alpha-diol. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **207**(3): p. 910-5.
56. Marichal, P., et al., Accumulation of 3-ketosteroids induced by itraconazole in azole-resistant clinical *Candida albicans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(11): p. 2663-70.
57. Georgopapadakou, N.H. and T.J. Walsh, Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. **40**(2): p. 279-91.
58. Orozco, A.S., et al., Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(10): p. 2645-9.
59. Bossche, V; Marichal, HP; Odds, F; Jeune, LL; Coene, MC, et al., Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. 1992. **36**: p. 2602-2610.
60. Marichal, P., et al., Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. **41**(10): p. 2229-37.

61. White, T.C., K.A. Marr, and R.A. Bowden, Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(2): p. 382-402.
62. Clark, F.S., et al., Correlation between rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in Candida species: possible role for drug efflux in drug resistance. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(2): p. 419-25.
63. Denning, D.W., et al., Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of Aspergillus fumigatus infection. J Antimicrob Chemother, 1997. **40**(3): p. 401-14.
64. Lopez-Ribot, J.L., et al., Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(11): p. 2932-7.
65. Hitchcock, C.A., K.J. Barrett-Bee, and N.J. Russell, The lipid composition and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant mutant of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol, 1987. **25**(1): p. 29-37.
66. Mago, N. and G.K. Khuller, Influence of lipid composition on the sensitivity of *Candida albicans* to antifungal agents. Indian J Biochem Biophys, 1989. **26**(1): p. 30-3.
67. Ghannoum, M.A. and L.B. Rice, Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(4): p. 501-17.
68. Sheehan, D.J., C.A. Hitchcock, and C.M. Sibley, Current and emerging azole antifungal agents. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(1): p. 40-79.
69. Estrada, E., N. Castañedo, and R. Pomés, Análisis estructural del G-1. En: Dermofural. 1996: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED).

70. Jorge, E., et al., Estudios de estabilidad de la materia prima para medicamentos. En: Dermofural. 1996: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED).
71. Jorge, E., et al., Propuesta de sustancia de referencia. En: Dermofural. 1996: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED).
72. Jorge, E., et al., G-1 Materia prima. Métodos de control. En: Dermofural. 1996: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED).
73. Silveira, E. and R. Machado, G-1 Materia prima. Esterilidad. En: Queratofural. Registro de Medicamentos de Uso Veterinario. No. 211. C. Habana. 1993, Registro de Medicamentos de Uso Veterinario. No. 211: C. Habana
74. Pérez, J., et al., DL50 del producto G-1 administrado por las vías oral y percutánea en ratones de la línea OF 1. 2003, Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: Santa Clara. Cuba.
75. Pérez JA, et al., Efecto de la aplicación tópica del G-1 en solución aceite-acetona durante 180 días en ratas. . 2003, Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: Santa Clara. Cuba.
76. Garcia, M; Medina, R; Hidalgo, P, Comparación del Efecto Postantifúngico de G-1 y Anfotericina B, Frente a Cepas de *Candida albicans*. 2003. **22** (1): p. 5-9.
77. French, IW., in Comunicación personal. 1996, Presidente de la firma IWF CONSULTING SERVICES: Canadá.
78. Pérez, G; Saíenz, O; González JI. Evaluación in vivo del potencial del G-1 para inducir reticulocitos micronucleados en sangre periférica de ratón. 1997, Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu"

- de Las Villas. Centro de Toxicología Experimental. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara.: Santa Clara. Cuba.
79. Pucaj, K; Niarchos, F; Kenthol, A; Walker, A; Taylor, Kulasothy, K; Mihalcea, E., Skin sensitization study in guinea pigs (Maximization Test) of G-1 ointment. 0, 15% WPMO. 1998, Nucro-Technics, Scarborough, Ontario .Canada.
 80. Høltje, JV. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. 1998. **62**: p. 181–203.
 81. Tenorio, E; Cotado, C; Peres, JA, Irritabilidad oftálmica iterativa del 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1) en petrolato líquido-sólido. 2003, Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas: Santa Clara. Cuba
 82. González, O., et al., Estandarización de la técnica para la evaluación “in vitro” de la actividad antifúngica del producto G-1 frente a los hongos dermatofitos. En: Queratofural., in Registro de Medicamentos de Uso Veterinario No`211. . 1993, Laboratorio de control Estatal. Instituto de Medicina Veterinaria. Ministerio de la Agricultura: La Habana.
 83. González, O., et al., Mínima Concentración Inhibitoria del G-1 frente a bacterias y levaduras del género Candida. En Queratofural, in Registro de Medicamentos de Uso Veterinario No`211. 1993, Laboratorio de control Estatal. Instituto de Medicina Veterinaria, ministerio de la Agricultura.
 84. Estrada, E., et al., Actividad antifúngica del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1) frente a hongos filamentosos. En Queratofural. 1993, Instituto de Medicina Veterinaria. Ministerio de la Agricultura,: La Habana.
 85. Blondeau, J.M., O. González, and R. Medina, In vitro evaluation of G-1: A novel antimicrobial compound. 1997, Department of Clinical Microbiology, St. Paul’s Hospital. Saskatoon. 1997.

86. Pedro, I; Ricardo; M, Milagros, G, Enma, T, María, S, Deldado; Rodríguez, E Eficacia del G-1 en el modelo de candidiasis cutanea en curieles 2004. **5(6)**: p. 1695-7504
87. García, M; Medina, R; Toraño, G; Miguel, L; Ferrás, G. Comparación del efecto postantibiotico del G-1y la gentamicina frente a cepas *staphylococcus aureus* y *escherichia coli* 2000. **19**. (3): p. 225-30.
88. Medina, R; García, M; Fabré, E; Rodríguez, JA., Introducción de referencias in vitro al 1-(5-bromofur-2-il) -2-bromo -2-nitroeteno (G-1) frente a cepas de candida albicans y *pseudomonas aeruginosa*. 2000. **19(4)**: p. 289-94.
89. Gosden, P.E., et al., Comparison of the modified Stokes' method of susceptibility testing with results obtained using MIC methods and British Society of Antimicrobial Chemotherapy breakpoints. J Antimicrob Chemother, 1998. **42(2)**: p. 161-9.
90. Andrews, J.M., Effect of medium composition on the MIC breakpoint for gentamicin. J Antimicrob Chemother, 2000. **46(5)**: p. 851-2.
91. Hedges, A.J., The influence of factors affecting the 'critical population' density of inocula on the determination of bacterial susceptibility to antibiotics by disc diffusion methods. J Antimicrob Chemother, 1999. **43(2)**: p. 313.
92. Gould, I.M., Towards a common susceptibility testing method? J Antimicrob Chemother, 2000. **45(6)**: p. 757-62.
93. Andrews, J.M., BSAC standardized disc susceptibility testing method. J Antimicrob Chemother, 2001. **48 Suppl 1**: p. 43-57.
94. King, A. and D.F. Brown, Quality assurance of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion. J Antimicrob Chemother, 2001. **48 Suppl 1**: p. 71-6.

95. Andrews, J.M., F.J. Boswell, and R. Wise, Evaluation of the Oxoid Aura image system for measuring zones of inhibition with the disc diffusion technique. *J Antimicrob Chemother*, 2000. **46**(4): p. 535-40.
96. Steward, C.D., et al., Comparison of agar dilution, disk diffusion, MicroScan, and Vitek antimicrobial susceptibility testing methods to broth microdilution for detection of fluoroquinolone-resistant isolates of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(3): p. 544-7.
97. Gattringer, R., et al., Evaluation of MIDITECH automated colorimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*, 2002. **49**(4): p. 651-9.
98. Rex, J.H., et al., Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**(4): p. 643-58.
99. Moore, C.B., C.M. Walls, and D.W. Denning, Comparison of three methods for in vitro susceptibility testing of *Candida* species with flucytosine. *J Antimicrob Chemother*, 2003. **51**(2): p. 297-304.
100. Espinel-Ingroff, A., et al., Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol*, 1997. **35**(1): p. 139-43.
101. Espinel-Ingroff, A. and A. Rezusta, E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. To the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents: comparison with NCCLS broth microdilution method. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(6): p. 2101-7.
102. Fernandez-Torres, B., et al., Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(11): p. 3999-4003.
103. Espinel-Ingroff, A. and T.M. Kerkering, Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol*, 1991. **29**(2): p. 393-4.

104. Espinel-Ingroff, A., Germinated and nongerminated conidial suspensions for testing of susceptibilities of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(2): p. 605-7.
105. Petrikkou, E., et al., Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(4): p. 1345-7.
106. Cuenca-Estrella, M., et al., Comparative in-vitro activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *J Antimicrob Chemother*, 1999. **43**(1): p. 149-51.
107. Aberkane, A., et al., Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother*, 2002. **50**(5): p. 719-22.
108. Meletiadis, J., et al., Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-Thiazyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(8): p. 2949-54.
109. Meletiadis, J., et al., Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(9): p. 3402-8.
110. Meletiadis, J., et al., Comparison of spectrophotometric and visual readings of NCCLS method and evaluation of a colorimetric method based on reduction of a soluble tetrazolium salt, 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide], for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(12): p. 4256-63.
111. Meletiadis, J., et al., Comparison of the Etest and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed standard for antifungal

- susceptibility testing of *Aspergillus* species. J Clin Microbiol, 2002. **40**(8): p. 2876-85.
112. Espinel-Ingroff, A., et al., Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J Clin Microbiol, 1992. **30**(12): p. 3138-45.
 113. Rex, J.H., et al., Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(4): p. 367-81.
 114. Rodriguez-Tudela, J.L., et al., Correlation of in-vitro susceptibility test results with clinical response: a study of azole therapy in AIDS patients. J Antimicrob Chemother, 1995. **35**(6): p. 793-804.
 115. Favel, A., et al., In-vitro susceptibility pattern of *Candida lusitanae* and evaluation of the Etest method. J Antimicrob Chemother, 1997. **39**(5): p. 591-6.
 116. Pfaller, M.A., et al., in vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. J Clin Microbiol, 2000. **38**(9): p. 3359-61.
 117. Simor, A.E., et al., Antifungal susceptibility testing of yeast isolates from blood cultures by microbroth dilution and the E test. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1997. **16**(9): p. 693-7.
 118. Espinel-Ingroff, A., Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. J Clin Microbiol, 2001. **39**(4): p. 1360-7.
 119. Pfaller, M.A., et al., Evaluation of the Etest method for determining voriconazole susceptibilities of 312 clinical isolates of *Candida* species by using three different agar media. J Clin Microbiol, 2000. **38**(10): p. 3715-7.
 120. Ramani, R. and V. Chaturvedi, Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(10): p. 2752-8.

121. Ramani, R., A. Ramani, and S.J. Wong, Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(9): p. 2320-4.
122. Peyron, F., et al., Evaluation of a flow cytofluorometric method for rapid determination of amphotericin B susceptibility of yeast isolates. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(7): p. 1537-40.
123. Alvarez-Barrientos, A., et al., Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(2): p. 167-95.
124. Wenisch, C., et al., Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. J Clin Microbiol, 1997. **35**(1): p. 5-10.
125. Lass-Flörl, C., et al., Studies of in vitro activities of voriconazole and itraconazole against *Aspergillus* hyphae using viability staining. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(1): p. 124-8.
126. Liao, R.S., R.P. Rennie, and J.A. Talbot, Assessment of the effect of amphotericin B on the vitality of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(5): p. 1034-41.
127. Ferraro, M.J., Should we reevaluate antibiotic breakpoints? Clin Infect Dis, 2001. **33 Suppl 3**: p. S227-9.
128. Woodcock, J., The in-vitro activity of faropenem, a novel oral penem. J Antimicrob Chemother, 1997 p. 35-43.
129. JM., A., Effect of medium composition on the MIC breakpoint for gentamicin. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**: p. 851-852. .
130. D, G.V., et al., Antibacterial Activities and Pharmacokinetics of E-4767 and E-5065, Two New 8-Chlorofluoroquinolones with a 7-Azetidin Ring Substituent. . Antimicrob Agents Chemother 2001. **45**(11): p. 3113–3121.
131. Sjöström, J.E. and H. Larsson, Factors affecting growth and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* effect of pH and urea on the survival of a wild type strain and a urease deficient mutant. 1996. **44**: p. 425-43.

132. Wise, R .The clinical relevance of protein binding and tissue concentrations in antimicrobial therapy. . Clinical Pharmacokinetics 1986. **11**: p. 470–82.
133. Boswell.F.J; Ashby.J.P et al., Effect of protein binding on the in vitro activity and pharmacodynamics of faropenem. J Antimicrob Chemother, 2002. **50**: p. 525–532.
134. Izada,D; Silveira,E.A and E.A. Silveira, Cálculo de la CIM y CBM 50 y 90% mediante interpolación logarítmica, in Programa para microcomputadora. 1992, Universidad Central de Las Villas: Santa Clara.
135. Woodcock, JM, Andrews, JM, et al., The in-vitro activity of faropenem, a novel oral penem. J Antimicrob Chemother 1997. **39**: p. 35-43.
136. Jehak, k, Jin, K, et al., In Vitro and In Vivo Antibacterial Efficacies of CFC-222, a New Fluoroquinolone. 1997. **41**(10): p. 2209–2213.
137. Malouin,F;Blais,J et al., RWJ-54428 (MC-02,479), a New Cephalosporin with High Affinity for Penicillin-Binding Proteins, Including PBP 2a, and Stability to Staphylococcal Beta-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(2): p. 658–664.
138. MASUDA, N., et al., In Vitro and In Vivo Antibacterial Activities of CS-940, a New 6-Fluoro-8-Difluoromethoxy Quinolone. 1996. **40**(5): p. 1201–1207.
139. Boswell, F.J., et al., Effect of protein binding on the in vitro activity and pharmacodynamics of faropenem Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2002. **50**: p. 525–532.
140. Yoshiaki, K., O. Masako, and N. Takeshi, Antibacterial properties of BO-2727, a new carbapenem antibiotic. 1997. **40**: p. 195–203.
141. Gargallo, VD; Ferrer, S; et al., Influence of Human Serum on Antifungal Pharmacodynamics with *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(7): p. 2018–2022.

142. Nix, D, E; Matthias, K, and F. EC, Effect of Ertapenem Protein Binding on Killing of Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. **48**(9): p. 3419-3424.
143. Rybak, M, Hershberber, E, et al., In Vitro Activities of Daptomycin, Vancomycin, Linezolid, and Quinupristin-Dalfopristin against Staphylococci and Enterococci, Including Vancomycin-Intermediate and -Resistant Strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000. **44**(4): p. 1062–1066.



