

**Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana y toxicológica de la N-(fur-2-il-metilen)-isobutilamina**

**Preliminary Study of the Antimicrobial activity and toxicology of the N-(fur-2-il-methylene)-isobutylamine.**

**Lic. Ariel Ramírez Labrada, Lic. María E. Loret de Mola, Lic. Oscar Collado García, Lic. Eldris Iglesias Huerta, Dr. Felix A. Ramírez Labrada**

Universidad de Camagüey. Departamento de Farmacia. Camagüey, Cuba.

**RESUMEN**

En este trabajo se realizó un estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de la N-(fur-2-il-metilen)-isobutilamina por los métodos de doble dilución seriada y dilución-neutralización sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *C. albicans*, determinándose la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Microbicida (CMM), con 7, 26, 7, 26 y 3, 63 mg/ml, respectivamente, coincidiendo en todos los casos la CMI y CMM. Luego se comparó la actividad antimicrobiana de la imina con un antibiótico de uso clínico con estructura similar, la nitrofurantoína. Se observó que el *S. aureus* y *P. aeruginosa* son más sensibles a la nitrofurantoína, no ocurre así con la *C. albicans*. Se determinó el coeficiente de fenol y se observó que una solución de la imina al 3, 3% tiene el mismo efecto que una de fenol al 5%. Finalmente, se realizó un ensayo de irritabilidad dérmica primaria a la sustancia pura, obteniéndose un IIP de 1, 42 que se clasificó como ligeramente irritante.

**DeCS:** AMINAS; TOXICOLOGÍA.

## ABSTRACT

A preliminary study of the antimicrobial activity of the N-(fur-2-methyl-2-imino)-isobutylamine was performed by serial double dilution and neutralization-dilution methods on *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *C. albicans*, determining the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal, mg/ml, respectively, coinciding in all cases MIC and MMC. Afterwards, antimicrobial activity of imino with an antibiotic of clinical use with similar structure, nitrofurantoin was compared. It was observed that *S. aureus* and *P. aeruginosa* are more sensible to nitrofurantoin, different to *C. albicans*. Phenol coefficient was determined and it was observed that a solution of imino 3, 3% has the same effect as on phenol 5%. Concluding, a primary Dermic Irritability assay to pure substance was carried out, obtaining an IIP of 1.42, classified as slightly irritable.

**DeCS:** AMINES; TOXICOLOGY.

## INTRODUCCIÓN

La creciente resistencia bacteriana constituye un problema tan actual como no resuelto, por lo que se hace necesario perfilar las investigaciones químicas farmacéuticas hacia la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana.

Dentro de estos compuestos están los derivados furánicos con un grupo nitro exocíclico, el 1-(fur-2-il)-2-nitroeteno conocido como G-0 y el 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1), los cuales presentan propiedades antibacterianas y antifúngicas.<sup>1, 2</sup>

En investigaciones encaminadas a dilucidar con exactitud el mecanismo por el cual ocurre la reacción química de obtención del G-0, se propone a la N-(fur-2-il-metilen)-isobutilamina como el intermediario más probable de esta reacción. Esta sustancia pertenece al grupo de las Bases de Schiff (imina) y se plantea que la formación de este tipo de sustancia constituye una vía apropiada para obtener compuestos con actividad biológica y además, tienen la ventaja de no presentar el grupo nitro, que hasta en la posición exocíclica constituye una preocupación toxicológica.<sup>3, 4</sup>

## OBJETIVOS

1. Determinar el efecto antimicrobiano de la imina sobre cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Cándida albicans*.

2. Comparar el efecto antimicrobiano con un antibiótico de uso clínico relacionado estructuralmente (Nitrofurantóina) y con el fenol.
3. Determinar el Índice de Irritabilidad Dérmica Primaria de la N-(fur-2-il-metilen)-isobutilamina.

## MÉTODO

### Estudio Microbiológico

En la experiencia se utilizaron tres cepas de referencia, *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Candida albicans* (ATCC 102321), brindadas por el Instituto de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Ciudad de Camagüey.

El inóculo se preparó de forma tal que quedara una suspensión de microorganismo con una concentración de  $10^8$  ufc/ml.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Microbicida (CMM) se determinaron utilizando la técnica de diluciones dobles seriadas, para esto se prepararon diluciones dobles seriadas de la imina en 1.8 ml de caldo nutriente como medio de cultivo y se inoculó con 0.2 ml de la suspensión del germen a ensayar, luego se incubaron los tubos a 37 °C durante 24 horas y se sembró cada dilución en agar nutriente para determinar el efecto microbiostático y microbicida, considerando la CMI como la mayor de las diluciones en la que no se produjo crecimiento o crecieron menos de 10 colonias microbianas, dichas diluciones se mantuvieron en incubación hasta las 72 horas para determinar el efecto microbiostático. Considerando la CMM como la mayor de las diluciones con la que no se produjo crecimiento o crecieron menos de 10 colonias.<sup>5, 6</sup>

También se utilizó la Técnica de dilución - neutralización modificada por Viallier, para esto se efectuaron las diluciones dobles seriadas de la imina en 2 ml de agua destilada estéril. Posteriormente se puso en contacto a los microorganismos con las diluciones de la imina. Los tubos que contenían agua destilada, imina y microorganismos se centrifugaron durante 30 minutos a 4 000 r.p.m. Luego se sembró el sedimento en placas Petri con medio agar nutriente y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se observaron las placas considerando la CMM como la mayor dilución en la que no se produjo crecimiento bacteriano o crecieron menos de 10 colonias bacterianas. Después de determinar la CMI y CMM se calcularon los índices CMI/CMM para cada microorganismo.<sup>7</sup>

Luego se comparó el efecto antimicrobiano de la imina con la nitrofurantóina sobre las cepas en estudio, según el método de difusión en Agar de Kirby y Bauer.<sup>8, 9</sup>

Determinación del coeficiente de fenol

Las muestras que estaban sometidas a prueba se diluyeron, siendo estas diluciones ordenadas en una serie de concentraciones decrecientes. A estas diluciones se le agregaron 0.1 ml de la suspensión de microorganismos de ensayo (*Staphylococcus aureus*) preparado; al final de períodos fijos (5, 10, 15 minutos) una pequeña parte de la mezcla del desinfectante diluido y del cultivo se trasladó a agar nutriente y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Si no aparece crecimiento en el subcultivo, indica que el microorganismo ha sido destruido. La mayor dilución del desinfectante que destruyó en un tiempo dado se dividió entre la mayor dilución del fenol que destruye en el mismo tiempo. Esta relación es el coeficiente de fenol.<sup>10</sup>

Ensayo de Irritabilidad Dérmica Primaria (Índice de Irritabilidad Primaria, IIP)

El ensayo de Irritabilidad Dérmica Primaria se realizó en el Instituto Superior de Ciencias Médicas de Camagüey, donde reside la Unidad Provincial de Toxicología Experimental de esta Provincia (UPTec). Para la realización del mismo se siguió el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) confeccionado por la Unidad de Garantía de Calidad del centro.<sup>11, 12</sup>

Estudio Toxicológico

Se emplearon en total tres conejos albinos Nueva Zelanda, machos procedentes del CENPALAB con una masa corporal mayor de 1.8 Kg. Las condiciones de alojamiento fueron óptimas, la alimentación y el agua se mantuvieron sin variación.<sup>12</sup>

Los animales se pelaron al dorso y los flancos, rasurándose luego con cuchilla de afeitar manual, exponiéndose un área de piel de aproximadamente de 10x10 cm. Por cada animal se emplearon dos sitios de aplicación. Veinticuatro horas después de haber preparado la piel, se procedió a la aplicación del producto. Sobre un parche de gasa quirúrgica de aproximadamente 2, 5 x 2, 5 cm se aplicó 0, 5 ml del producto en estudio y luego se cubrió el sitio de aplicación, fijándose estos con esparadrapo y venda elástica para prevenir el acceso del animal al sitio de aplicación. Pasadas cuatro horas se retiraron los parches y se lavó con agua destilada para eliminar restos del medicamento aplicado. Se marcó el área con un marker para facilitar la lectura de los sitios.

Las respuestas se evaluaron a las primeras 24, 48 y 72 horas después de haber retirado los parches utilizando la escala de Draize para la evaluación de las lesiones en piel.<sup>16</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio Microbiológico

En todas las cepas probadas se obtuvieron efectos microbiostático y microbicida idénticos (Tabla 1), además, para el análisis del efecto bactericida se emplearon

dos métodos diferentes, dilución doble seriada y dilución - neutralización, obteniéndose iguales resultados en todas las réplicas, siendo de 7, 26 mg/ml, 7, 26 mg/ml y 3, 63 mg/ml la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida para el *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, respectivamente. Se obtuvo el mayor efecto de la imina sobre la *C. albicans*, fue menor para las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* e idénticas entre ellas.

Al comparar el efecto antimicrobiano de la imina con la nitrofurantoina se detectaron halos de inhibición del crecimiento frente a la nitrofurantoina en las cepas bacterianas, no así frente a la *C. albicans* para la cual no tiene efecto antimicrobiano este fármaco, tomándolo por lo tanto como control negativo.

**Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Microbicida de la Imina frente *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans***

Cepas	Concentración mínima inhibitoria			Concentración mínima microbicida		
<i>S. aureus</i>	7,26	7,26	7,26	7,26	7,26	7,26
<i>P. aeruginosa</i>	7,26	7,26	7,26	7,26	7,26	7,26
<i>C. albicans</i>	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63

Se observó un mayor halo de inhibición de la nitrofurantoina que de la imina frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* con un radio medio de 12.3 y 10.3 mm respectivamente para la primera, y 2.33 y 1.66 mm para la segunda, existiendo diferencias significativas, lo que nos permite comprobar que a pesar de que hay cierto efecto de la imina sobre estas bacterias la nitrofurantoina es mucho más efectiva (Tabla 2).

**Tabla 2. Radio de inhibición de la Nitrofurantoina y la Imina frente a *S.aureus*, *P.aeruginosa* y *C. albicans***

Cepas	Radio (mm)						Sd	T	P
	Nitrofurantoina			Imina					
<i>S. aureus</i>	13	10	12	2	2	3	1	17,321	0,003
<i>P. aeruginosa</i>	10	10	11	1	2	2	0,577	26	0,001
<i>C. albicans</i>	0	0	0	14	16	15	1	-24.25	0,002

Sin embargo, es de destacar el marcado efecto de la imina sobre la *C. albicans* (15 mm de radio medio de halo de inhibición) con diferencia significativa. Señalamos que a pesar de tener la imina una estructura semejante a la nitrofurantoína se destaca en ella el efecto antifúngico sobre la *C. albicans*.<sup>3, 13-15</sup>

#### Determinación del coeficiente de fenol

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la comparación de diferentes concentraciones de fenol y de la imina en el tiempo. El comportamiento de la imina en el tiempo (5, 10,15 min.) es el mismo y también a las 24 y 72 horas. Se tomó como la mayor dilución de la imina para el cálculo del coeficiente de fenol 1:128 y la del fenol 1:90 y el coeficiente de fenol 1, 42.

La concentración que ha de usarse en la práctica de la N-(fur-2-il-metilen)-isobutilamina se calcula multiplicando el valor del coeficiente de fenol de este producto por 20, es por tanto 1:28, 4, lo que equivale a una dilución de 3.27% de la N-(fur-2-il-metilen)-isobutilamina, menor que la del fenol al 5%. Esto demuestra que la imina en menor concentración, 3, 27%, cumple el mismo efecto que el fenol al 5% por lo que le conferimos actividad desinfectante a la N-(fur-2-il-metilen)-isobutilamina.

**Tabla 3. Comparación del efecto antimicrobiano de diferentes soluciones de fenol e imina a los 5, 10 y 15 minutos frente a *S. aureus***

Sustancia	Dilución	Crecimiento		
		5 minutos	10 minutos	15 minutos
FENOL	1:90	+	-	-
	1:100	+	+	-
	1:110	+	+	+
IMINA	1:1	-	-	-
	1:2	-	-	-
	1:4	-	-	-
	1:8	-	-	-
	1:16	-	-	-
	1:32	-	-	-
	1:64	-	-	-
	1:128	-	-	-
	1:256	+	+	+
	1:512	+	+	+
	1:1024	+	+	+
	B	+	+	+

**+: Crecimiento -: No Crecimiento**

Estudio Toxicológico. Ensayo de Irritabilidad Dérmica Primaria (IIP)

Las lesiones de edema o eritema provocadas por la imina en los animales de ensayo (conejos) se evaluaron (Tabla 4).

**Tabla 4. Registro de las observaciones de eritemas y edemas en los sitios de aplicación a las 1, 24, 48 y 72 horas**

#	Eritema	Edema	1 hora		24 horas		48 horas		72 horas	
1	Derecho		4	4	4	1	4	0	4	1
	Izquierdo		3	4	1	1	1	0	1	0
2	Derecho		1	2	0	0	0	0	0	0
	Izquierdo		1	2	0	0	0	0	0	0
3	Derecho		4	4	4	1	4	0	4	1
	Izquierdo		4	4	4	2	4	1	4	2

Con ello se calculó el Índice de Irritabilidad Primaria que fue de 1, 42 por lo que la N-(fur-2-il-metilen)-isobutilamina se clasifica como ligeramente irritante.<sup>16</sup>

Cabe señalar que en nuestro trabajo se determinó el Índice de Irritabilidad Dérmica a la sustancia pura, por lo que ésta puede ser significativamente menor al formular. Se corrobora con esto nuestra idea de que la imina puede ser utilizada frente a infecciones tópicas, principalmente las causadas por *Candida albicans*

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Informe preliminar del Comité de Resistencia a antimicrobianos de la Asociación Panamericana de Infectología. En: Boletín de la Asociación Panamericana de Infectología (API) 1994; 1 (2): 3- 4.
2. Esteve M, Moros M, Col R, Xicota MA. Antimicrobial activity of E- 4441 a representative azetidine quinolone. Drugs Expt. Clin 1980; 16 (9): 445- 449.
3. Rashid A. New mechanisms of action with fungicidal antifungals. Br J Dermatol 1996; 134 (46): 1- 6.
4. Carrazana J. Utilización del IR cercano en el estudio cinético de reacciones de formación de bases de Schiff. Rev Cubana de Química 1992; 6: 3- 42.
5. Howard Barbara J, Keiseu JF and Smith TF. Clinical and Pathogenic Microbiology. Washington D.C: Ed. Mosby: Year Book Inc; 1994.P. 940.
6. Atlas M. Microbiology Fundamentals and aplicaciones. New York: Ed. Macmillen Publishing Company; 1984.P. 900.



7. Wardle HM, Law D. and Denning DW. *In vitro* of BMS- 1811 84 compared with those of fluconazole and amphotericin B against various *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996; 40 (9): 2229- 31.
8. Venugopal PV and Venugopal TV. Disk Diffusion Susceptibility Testing of Dermatophytes with Allylamine. *Int J Dermatol* 1994; 3 (3): 730- 732.
9. Baver AW. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J*
10. Tice O, Cook M. *Farmacia Práctica de Remington*. La Habana: Instituto Cubano del Libro; 1972. P. 2047. (Edición Revolucionaria)
11. Normas ISO Guías 25 y 43 y NC-ISO equivalente a la serie 9000.
12. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Buenas Prácticas de Laboratorio y Garantía de Calidad en ensayos toxicológicos. Resolución 152. MINSAP. 1993.
13. Gómez C, Lauzardo N and Martínez J. *Apuntes de química y síntesis de medicamentos* Martínez. La Habana: Ed. Pueblo y Educación; 1989. P. 356.
14. Jawetz E. *Manual de Microbiología Médica*. La Habana: Ed. Pueblo y Educación; 1985. P. 560.
15. Brennan B and Leyden JJ. Overview of topical therapy for common superficial fungal infections and the role of new topical agents. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36 (2): 3-8.
16. Betancourt M, Altumaga L and García G. Evaluaciones de la irritabilidad dérmica y oftálmica de soluciones desinfectantes utilizadas en instituciones de salud. *Revista Cubana de Farmacia* 1994; 28 (1): 17-21.

*Lic. Ariel Ramírez Labrada*. Lic. Ciencias Farmacéuticas. Farmacia Clínica. Policlínico Julio A. Mella. Universidad de Camagüey. Departamento de Farmacia. Camagüey, Cuba.