

Comparación del Efecto Postantifúngico de G-1 y Anfotericina B Frente a Cepas de *Candida albicans*

Milagros GARCÍA BERNAL *, Ricardo MEDINA MARRERO, Pedro HIDALGO LLANES, Roberto MACHADO PÉREZ, Yanet PÉREZ ACOSTA & Lillían VERGARA SALAZAR

Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, Carrera a Camajuaní Km 5 ^{1/2}, Santa Clara. Villa Clara, Cuba.

RESUMEN. 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.

SUMMARY. "Comparison of the postantifungal effect of G-1 and amphotericin B against *Candida albicans*". The Postantifungal Effect (PAFE) of G-1 and amphotericin B against *Candida albicans* strains was compared. PAFE was induced by exposure of microorganisms to G-1 and amphotericin B at 1 x MIC concentration, with agitation during one hour at 30 °C. As a result, G-1 produced a prolonged PAFE (> 2 hours) ranging from 4.47 to 6.23 hours in the assayed strains. G-1 induced a more prolonged PAFE than amphotericin B in all strains.

INTRODUCCION

En la actualidad se ha visto un incremento considerable de las infecciones causadas por hongos, por ejemplo las candidiasis, como también se ha observado el llamado fenómeno de la resistencia microbiana, provocado por el uso prolongado, irracional y excesivo de los antimicrobianos en el tratamiento de muchas infecciones humanas. Esto ha incentivado a que científicos de todo el mundo trabajen arduamente en la obtención de nuevos agentes antifúngicos, donde la combinación de su actividad y características intrínsecas, tales como, sus propiedades físico-químicas y farmacocinéticas, le confieran una mayor eficacia tanto para inactivar los hongos como inhibir su crecimiento.

El (EPAF) es un parámetro farmacodinámico ampliamente usado en los estudios microbiológicos, el cual se define como la supresión del crecimiento fúngico que persiste durante un tiempo luego de una limitada exposición a un

agente antifúngico ^{1,2}. Este se ha observado para una gran variedad de antimicrobianos, teniendo importante implicación clínica en la dosis del antimicrobiano en cuestión y en el intervalo de dosificación de éste en un tratamiento determinado.

El producto furil etilénico 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1) desarrollado por el Centro de Bioactivos Químicos de La Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas es un compuesto que no está relacionado estructuralmente ni presenta resistencia cruzada con ningún antibiótico en uso. Además, esta sustancia posee actividad combinada antibacteriana y antifúngica de amplio espectro ³⁻⁷, rasgo distintivo que no presenta ningún agente antimicrobiano en uso. Por esta razón para la realización de nuestra investigación nos trazamos como objetivo, estudiar el comportamiento del EPAF del G-1 frente a *Candida albicans*.

PALABRAS CLAVE: *Candida albicans*, Efecto Postantifúngico, G-1.
KEY WORDS: *Candida albicans*, G-1, Postantifungal Effect

* Autora a quien dirigir la correspondencia. E-mail: mrgarcia@cbq.uclv.edu.cu

MATERIALES Y METODOS

Sustancia de ensayo y solvente

La sustancia de ensayo fue el producto 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1), principio activo sintetizado en la Planta de Producción del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas (UCLV). Se utilizó como solvente polietilenglicol 400 de calidad farmacéutica.

Sustancia de referencia

La sustancia de referencia fue el principio activo de anfotericina B.

Microorganismos de ensayo

El estudio se realizó con una cepa clínica de *Candida albicans* aislada de lesiones en piel, procedente del Hospital Docente Clínico Quirúrgico "Arnaldo Milán Castro" de Santa Clara. La cepa fue identificada y caracterizada por los métodos internacionalmente aceptados y establecidos en los laboratorios de microbiología clínica del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MIN-SAP), utilizando como cepa control de la calidad *Candida albicans* ATCC 10231 proveniente del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) de Ciudad de La Habana ⁸.

Medios de cultivo

Se emplearon para las pruebas de susceptibilidad *in vitro* a agentes antimicrobianos, caldo y agar Dextrosa Sabouraud. Para realizar el conteo durante la determinación del EPAF se utilizó agar Dextrosa Sabouraud.

Determinación de la Concentración

Inhibitoria Mínima (CIM) ⁹.

Se determinó la CIM a cada una de las cepas en caldo Dextrosa Sabouraud para las cepas de ensayo, por el método de macrodilución en caldo. Se ensayó un rango de concentraciones de 64-0,25 µg/mL para G-1 y de 8-0,03125 µg/mL para anfotericina B, utilizando un inóculo de aproximadamente 2×10^5 UFC/mL. También se determinó la Concentración Fungicida Mínima (CFM) ¹⁰, en agar Dextrosa Sabouraud.

Medida del efecto postantifúngico (EPAF)

Preparación del inóculo

A partir de un cultivo en placa de toda la noche se preparó una suspensión en caldo Dextrosa Sabouraud y se incubó a 30 °C durante 4-6 horas hasta alcanzar la fase logarítmica que se correspondió aproximadamente con $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (tubo 0,5 de Mc. Farland).

Inducción del EPAF

Los cultivos microbianos fueron expuestos a una concentración de $1 \times \text{CIM}$ para todas las cepas frente a los productos de ensayo, por una hora a 30 °C con agitación. Para ello se tomaron cuatro tubos que contenían 5 mL de caldo con antifúngico y se inocularon con 50 µL del inóculo (aproximadamente 10^6 UFC/mL).

Seguidamente se procedió a eliminar los productos por centrifugación, lavando el cultivo con solución salina fisiológica incluyendo al control. Las células fúngicas fueron resuspendidas en 5 mL de caldo Dextrosa Sabouraud y los tubos fueron incubados a 30 °C con agitación, para ser usados posteriormente.

La determinación del número de microorganismos viables se realizó antes de la exposición a los productos, a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas. Para ello se realizó una dilución de 1/10 en solución salina fisiológica. Seguidamente se tomó 100 µL de los tubos alternos y se transfirieron a cada una de las tres réplicas de agar Dextrosa Sabouraud. Las mismas fueron incubadas de 48 a 72 horas a 30 °C y se consideraron contables cuando el número de microorganismos viables estuvo entre 30-300 colonias/placa.

El EPA se determinó según la fórmula ¹¹: $\text{EPAF} = T - C$, donde T es el tiempo requerido para que el conteo de microorganismos viables del cultivo expuesto al antifúngico aumente 1 log₁₀ unidades por encima del conteo observado inmediatamente después del lavado y C es el tiempo correspondiente al control no expuesto.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra la actividad antimicrobiana de G-1 y anfotericina B frente a cepas de *Candida albicans*. La CIM para G-1 obtenida frente a las cepas de ensayo fue de 1 µg/mL, registrándose igual CFM.

En esta investigación el valor de la CIM para anfotericina B frente a la cepa de referencia está dentro del rango que establece las NCCLS; mientras que en la cepa clínica el valor de CIM fue de 0.5 µg/mL, y la CFM fue de 1 µg/mL, lo que demuestra la alta sensibilidad de ésta a anfotericina B.

Para la comparación del EPAF se utilizó una concentración equivalente a múltiplos de $1 \times \text{CIM}$ para las cepas evaluadas.

Las Figuras 1 y 2 muestran las curvas del comportamiento de los microorganismos expuestos al G-1 y al anfotericina B en función del tiempo; obtenidas promediando los dos ensayos independientes realizados por cepa.

Microorganismo	Producto	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i> clínica	G-1	1	1
	anfotericina B	0,5	1
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	G-1	1	1
	anfotericina B	0,5	1

Tabla 1. Valores de la CIM y CFM del G-1 y anfotericina B frente a cepas de *Candida albicans*.

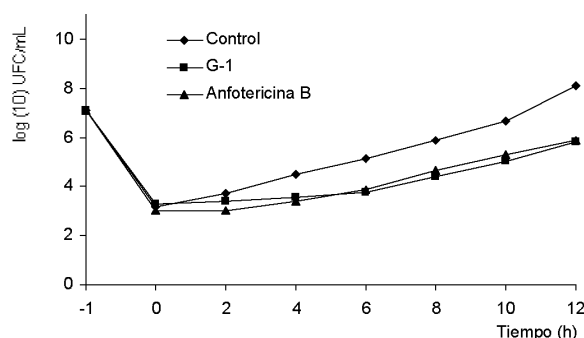


Figura 1. Comportamiento en el tiempo de la cepa de *Candida albicans* clínica después de la exposición a G-1 y anfotericina.

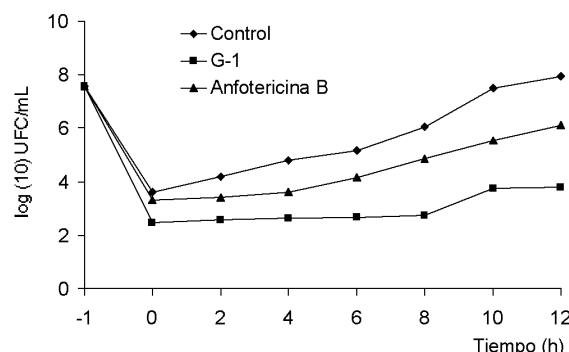


Figura 2. Comportamiento en el tiempo de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 después de la exposición a G-1 y Anfotericina B.

En las mismas se aprecia que en la cepa de referencia el número de microorganismos viables a través del tiempo fue similar cuando fue expuesta a G-1 y a anfotericina B. En la cepa clínica el número de microorganismos viables a través del tiempo fue menor cuando fue expuesta a G-1 y no a anfotericina B.

La Tabla 2 muestra los valores del EPAF del G-1 y anfotericina B en las dos cepas estudiadas. De forma general, anfotericina B mostró un EPAF mayor de 3 horas en la cepa clínica y en la de referencia, 3,17 h y 3,22 h respectivamente.

Microorganismo	Producto	EPAF (horas)
<i>Candida albicans</i> clínica	G-1	6,11 (6,23-5,99)
	Anfotericina B	3,17 (3,25-3,09)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	G-1	4,51 (4,56-4,47)
	anfotericina B	3,22 (3,39-3,06)

Tabla 2. Duración del EPAF para *Candida albicans*.

G-1 mostró un prolongado EPAF (mayor de 2 horas) en la cepa clínica y en la cepa de referencia, de 6,11 h y 4,51 h, respectivamente. Al comparar el EPAF de G-1 y de anfotericina B observamos que G-1 mostró un EPAF superior a anfotericina B.

DISCUSION

Los estudios preliminares de sensibilidad coincidieron con los resultados reportados por

otros investigadores, tanto en Cuba ^{13,14} como en Canadá ¹⁵. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Blondeau *et al.* ¹⁵, quienes evaluaron 154 cepas de levaduras y de ellas 138 fueron *Candida albicans*, por el método de microdilución en caldo, donde reportaron valores de CIM para el G-1 en el rango de 1 a 4 $\mu\text{g/mL}$.

Fung-Tomc *et al.* ¹⁶ determinaron la actividad in vitro de anfotericina B frente a 35 especies de

hongos y levaduras incluyendo cepas de *Candida albicans* y obtuvieron valores de CIM en el rango de 0.25 a 1 µg/mL.

En nuestro estudio el EPAF de anfotericina B en las cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 y clínica fue de 3,22 y 3,17 horas, respectivamente. La duración del EPAF difiere significativamente según el microorganismo de ensayo e incluso puede depender de una cepa dentro de una misma especie¹⁷. Por ejemplo, Ernest *et al.*¹⁸ realizaron un estudio con anfotericina B para determinar el EPAF frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 y una cepa clínica de *Candida albicans* y obtuvieron un EPAF mayor de 2 h, mientras que en un ensayo similar Egusa *et al.*¹⁹ obtuvieron un EPAF frente a 12 aislamientos de *Candida albicans* de $8,73 \pm 0,93$ h.

Otros autores han determinado el EPAF frente a *Candida albicans* del voriconazol a 1 x CIM y 4 x CIM obteniendo valores de EPAF de 0.5 ± 0.3 h y 3.0 ± 1.1 h respectivamente²⁰. Gunddersson *et al.*²¹ midieron el EPAF de la nistatina en cepas de *Candida albicans* a dife-

rentes concentraciones (0,25, 0,5 y 1 x CMI), donde los valores de EPAF fueron de 5, 7 y 9 h, respectivamente. En otro estudio Lewis *et al.*²² determinaron el EPAF de la fluocitosina frente a dos aislados de *Candida albicans*, el cual fue aproximadamente de 2,5 a 4 h.

García *et al.*²³ realizaron un estudio donde compararon el EPA del G-1 y la gentamicina frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. En este trabajo el G-1 produjo un EPA en el rango de 0,8 a 3,6 h en la mayoría de las cepas ensayadas. Por tanto si tenemos en cuenta nuestros resultados podemos inferir que el G-1 presenta una mejor actividad farmacodinámica frente a levaduras, lo cual puede ser debido a la elevada sensibilidad de *Candida albicans* al G-1.

CONCLUSIONES

G-1 mostró un EPAF prolongado (> 2 horas) en el rango de 4,47 a 6,23 horas para las cepas estudiadas. En las cepas ensayadas G-1 indujo un EPAF más prolongado que anfotericina B.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Craig, W.A. & S. Gudmundsson (1996) "The Postantibiotic effect", en "Antibiotics in Laboratory Medicine" (2a. ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, págs. 403-31.
2. Farkas, B. & A. Dobzy (1993) *Mykosen*. 26: 22-36.
3. Castañedo, N.R., R.D. Goizueta, O. González, J.A. Pérez, J. González, E.A. Silveira, E. Estrada, A. Martínez, M. Cuesta, E. Lugo, O. Navia, A. Carta & M.S. Delgado, inventores. Procedure for the obtention of 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno and its action as microcide. US solicitud 60/008,011 (1995) Oct 27.
4. Castañedo, N.R., R.D. Goizueta, O. González, J.A. Pérez, J. González, E.A. Silveira, E. Estrada, A. Martínez, M. Cuesta, E. Lugo, O. Navia, A. Carta & M. S. Delgado, inventores. Procedimiento de obtención del 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno y su acción como microcida. Certificado No. 22446 Resolución No. 2190/1996. ONIITEM. Oficina Nacional de Inventiones, Información Técnica y Marcas. Ciudad de La Habana. Cuba (1996).
5. Castañedo, N.R., R.D. Goizueta, O. González, J.A. Pérez, J. González, E.A. Silveira, E. Estrada, A. Martínez, M. Cuesta, E. Lugo, O. Navia, A. Carta & M. S. Delgado, inventores. Procedure for the obtention of 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno and its action as microcide. Canada patent 2,147,594 (1999).
6. Castañedo, N.R., R.D. Goizueta, O. González, J.A. Pérez, J. González, E.A. Silveira, E. Estrada, A. Martínez, M. Cuesta, E. Lugo, O. Navia, A. Carta & M. S. Delgado, inventores. Procedure for the obtention of 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno and its action as microcide. Japan patent 2,875,969 (1999).
7. Castañedo, N.R., R.D. Goizueta, O. González, J.A. Pérez, J. González, E.A. Silveira, E. Estrada, A. Martínez, M. Cuesta, E. Lugo, O. Navia, A. Carta & M. S. Delgado, inventores. Procedure for the obtention of 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno and its action as microcide. European solicitud 95 500056, 7/1270 (1995).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents (NCCLS). Document M26-T. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test (NCCLS). Document M7-A3. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
10. Murray, P., E. Baron, M. Pfaller, F. Tenovar &

- R. Yolken (1996) "Manual of Clinical Microbiology" (6th. ed.), American Society for Microbiology, Washington.
11. Craig, W.A., S. Gudmundsson (1996) "The Postantibiotic effect", en "Antibiotics in Laboratory Medicine"(2a. ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, págs. 296-329.
12. Volgelman, B., J. Gudmundsson, J. Leggett, J. Turnidge & S. Ebert (1988) *J. Infect. Dis.* **158**: 831-47.
13. Silveira E.A., R. Estévez, J.A Rodríguez, I. Pérez, O. González, A. Martínez, M. S. Delgado & A. Estrada (1986) *Bol. Cient. ISCM Stgo de Cuba* **4**: 131-40.
14. Silveira E.A., O. González, F. Lloréns & J.L. Molina (1986) *Bol. Cient. ISCM Stgo de Cuba* **4**: 215-24.
15. Blondeau, J., N.R Castañedo, O. González, R. Medina & E. A. Silveira (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**: 1663-9.
16. Fung-Tomc, J.C., B. Minassian, E. Huczko, B. Kolek, D.P. Bonner & R.E. Kessler (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 295-300.
17. Kumar, A., M.B. Hay, G.A. Maier & J.W. Dyke (1992) *J. Antimicrob. Chemother.* **30**: 597-602.
18. Ernest, E.J., M. E. Klepser & M. A. Pfaller (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1108-11.
19. Egusa, H., A.N. Ellepola, H. Nikawa, T. Hamada & L.P. Samaranayake (2000) *J. Oral Pathol. Med.* **29**: 206-13.
20. García, M.T., Llorente M.T., J.E. Lima, F. Mínguez, F. Del Moral & J. Prieto (1999) *J. Infect. Dis.* **31**: 501-4.
21. Gunddersson, S.M., H. Hoffman, E.J. Erenst, M.A. Pfaller & M.E. Klepser (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2887-90.
22. Lewis, R.E., M.E. Klepser & M.A. Pfaller (2000) *Diag. Microb. Infect. Dis.* **36**: 101-5.
23. García, M., R. Medina, G. Toraño & L.M. Gutiérrez (2000) *Acta Farm. Bonaerense* **19**: 225-30.

