

SCREENING DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS MOLÉCULAS ORGÁNICAS ORTOFENANTROLINA, CIANOguanIDINA, METIMAZOL, GLICINA Y S-METILCISTEÍNA FRENTE A CINCO INDICADORES BIOLÓGICOS

Libertad Leonor López Tévez y Juan José Martínez Medina

Universidad Nacional del Chaco Austral, Comandante Fernández N° 755, CP 3700, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina. e-mail: juanjoc_mm09@yahoo.com.ar.

Introducción

Las moléculas orgánicas estudiadas en el presente trabajo tienen funciones muy diversas: la glicina es un aminoácido, el metimazol es la droga anti-tiroidea de primera elección para pacientes con la enfermedad de Graves [1] y las fenantrolinas y sus derivados son potenciales antitumorales, antibacterianos, antivirales y antifúngicos [2].

Los microorganismos empleados como indicadores son especies bacterianas representativas de distintos grupos bacterianos por su clasificación, su morfología, su importancia clínica y su facilidad para mutar y volverse resistentes a los agentes antibacterianos convencionales.

Objetivos

Determinar el perfil antimicrobiano de ortofenantrolina (1,10-fenantrolina), cianoguanidina, metimazol (1-metil-3*H*-imidazol-2-tiona), glicina y S-metilcisteína frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

Materiales y Métodos

La actividad antibacteriana de las moléculas orgánicas se estudió empleando el método de microdilución en agar para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de cada metal frente a las cinco cepas bacterianas. Los cultivos bacterianos utilizados derivan de cepas ATCC (American Type Culture Collections) y son: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1263) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Para el cultivo de las bacterias y para el ensayo de dilución en agar se utilizaron como medios de cultivo el caldo Mueller Hinton y el agar Mueller Hinton (CMH, AMH) respectivamente [3].

El inóculo de cada cepa se preparó a partir de cultivos bacterianos de 18 horas de incubación y luego la suspensión bacteriana fue ajustada a una turbidez comparable al estándar 0,5 de la escala de Mc Farland. La suspensión anterior fue diluida al 10 % en solución fisiológica para dar una suspensión final de aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonia por mililitro [4,5].

Se preparan soluciones acuosas de ortofenantrolina (clorhídrica), cianoguanidina, glicina y S-metilcisteína, y el metimazol se disolvió en una mezcla de agua-dimetilsulfóxido (1:1). Las soluciones anteriores fueron esterilizadas por filtración. Posteriormente se preparó un stock de diluciones a partir de la solución madre. Para preparar las diluciones dobles seriadas, se tomaron 0,5 mL de cada dilución anterior y se incorporaron a los 4,5 mL del medio AMH fundido y termostatzado a 45°C, se homogeneizó por agitación mecánica (vortex) y se vertió en sendas placas de Petri estériles debidamente rotuladas. Se dejó enfriar en ambiente estéril (cabina de seguridad

biológica) para que solidifique. De este modo se obtuvieron diluciones dobles seriadas en un rango de concentraciones desde 2,93 µg/mL hasta 1.500 µg/mL (concentración límite considerada). En cada placa se inocularon 2 µL de la suspensión bacteriana sobre la superficie del AMH y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis [3,4,6].

Para la lectura de los resultados, la inhibición del crecimiento bacteriano se determina por comparación con el crecimiento del microorganismo en la placa control (sin antimicrobiano). La CIM se define como la concentración más baja del compuesto estudiado que es capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo ensayado. Las colonias aisladas o el crecimiento irregular no fueron considerados resultados positivos [3,4,7]. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Como se mencionó anteriormente, la concentración límite ensayada fue 1.500 µg/mL ya que por encima de este valor las determinaciones *in vitro* de CIM carecen de relevancia clínica [8,9].

Resultados y Discusión

Como podemos observar en la Tabla 1, de las cinco moléculas ensayadas solamente la ortofenantrolina presenta actividad antibacteriana relevante, las demás moléculas no interfieren en el crecimiento de las bacterias estudiadas. El orden de sensibilidad de las bacterias frente a la ortofenantrolina es *E. coli* = *S. epidermidis* > *S. aureus* > *E. faecalis* > *P. aeruginosa*, el que concuerda con los datos de otros autores [10]

Tabla 1. CIM de ortofenantrolina, cianoguanidina, metimazol, glicina y s-metilcisteína, para las cepas de referencia expresada en µg/mL.

Moléculas orgánicas	<i>Bacterias Gram negativas</i>		<i>Bacterias Gram positivas</i>		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
ortofenantrolina	11,71	375	93,75	23,43	11,71
cianoguanidina	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500
metimazol	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500
glicina	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500
s-metilcisteína	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que la actividad de la ortofenantrolina sobre las bacterias no depende de la composición de la pared bacteriana, pues demuestra gran actividad sobre *E. coli* y no así sobre *P. aeruginosa* (ambas Gram negativas). Podemos inferir entonces que su actividad se debe solamente a la interferencia en la síntesis de ADN ya que interactúa a través de su sistema π aromático con la molécula de ADN y se intercala con los pares de bases (esta interacción se traduce en alargamiento, rigidez y anulación de la hélice) [2].

Referencias

- [1] N.M. Urquiza, S.G. Manca, M.A. Moyano, R. Arrieta Dellmans, L. Lezama, T. Rojo, L.G. Naso, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer. *Biometals* (2010) 23:255–264.
- [2] S. Roy, K.D. Hagen, P. Uma Maheswari, M. Lutz, A.L. Spek, J. Reedijk, G.P. van Wezel. *ChemMedChem* 2008, 3, 1427 - 1434.
- [3] A. Klančnik, S. Piskernik, B. Jeršek, S. Smole Možina. *Journal of Microbiological Methods* 81 (2010) 121-126.

- [4] A. Berahou, A. Auhmani, N. Fdil, A. Benharref, M. Jana, C.A. Gadhi. *Journal of Ethnopharmacology* 112 (2007) 426-429.
- [5] F. Rowe, S. Vargas Superti, R. Machado Scheibe, C. Gomes Dias. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43 (2002) 45-48.
- [6] M. Fettouhi, M.I.M. Wazeer, A.A. Isab. *Journal of Coordination Chemistry* 60 (2007) 369-377.
- [7] C.E. Smith, B.E. Foleno, J.F. Barrett, M.B. Fresco. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 27 (1997) 85-92.
- [8] J.C.A. Tanaka, C.C. da Silva, A.J.B. de Oliveira, C.V. Nakamura, B.P. Dias Filho. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 39, 387 (2006).
- [9] A.A. Aliero and A.D. Ibrahim. *Salmonella. A diversified Superbug*. Y. Kumar (Ed.) *In Tech, Open Access Company* (2012). ISBN: 978-953-307-781-9.
- [10] S.B., Kalia, G. Kaushal, M. Kumar, S.S. Cameotra, A. Sharma, M.L. Verma, S.S. Kanwar. *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (2009) 916-922.