

Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de lactonas sesquiterpénicas germacranólidas contra hongos filamentosos, levaduras y bacterias

MARTHA DÍAZ FLORES,* PATRICIA ÁLVAREZ SÁNCHEZ*
 MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ**

In vitro antimicrobial activity determination of germacranolides sesquiterpenic lactones against filamentous fungi, yeasts and bacteria

Abstract. *This work is the result of the study of in vitro antimicrobial activity of four sesquiterpenic lactones (belenaline, calein F, glaucolid A and glaucolid D), isolated from vegetal species supposed to have medical uses. The lactone antimicrobial activity was tested against dematophytes, yeast, gram negative bacteria as well as gram positive bacteria, using Halley's method.*

The lactone antimicrobial activity was compared with the activity of two commercial-use antimicrobial agents (ketoconazol and oxitetraciline). The results indicate that lactones have a very low antimicrobial activity compared to that of commercial-use antimicrobial agents; however, the belenaline appearly may have an antifungal use, and aiso may increase its activity by making structural arrangements.

Introducción

Los trabajos sobre lactonas sesquiterpénicas (LST) en México han sido una aportación de gran importancia al conocimiento universal, pues aproximadamente 10% de las nuevas sustancias que se conocen de este tipo ha sido descubierto por autores mexicanos. El aislamiento de las LST comienza a principios de los sesentas y rápidamente los

estudios fitoquímicos de estos compuestos empiezan a intensificarse, de tal manera que para 1974 se habían aislado ya 600 LST y para 1979, 1,000. En los últimos años se ha despertado notablemente el interés por el estudio de las LST dada la amplia gama de propiedades biológicas que presentan estos compuestos (Rodríguez, 1976:10).

Características de las lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos naturales producto del metabolismo secundario vegetal; son sustancias incoloras, amargas, relativamente estables y de carácter lipofílico que contienen como estructura principal una gamma-lactona, alfa beta insaturada, o una alfa-metilen-gamma lactona, las cuales han mostrado estar asociadas con sus actividades biológicas (Rodríguez, 1985:24).

Distribución en la naturaleza

Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios comunes de un gran número de géneros

* Facultad de Química, UAEM. Paseo Colón y Paseo Tollocan S/N. Toluca, México. Tel: 17-41-20, fax: 17-38-90. Proyecto financiado por la Universidad Autónoma del Estado de México con clave 776-92.

** Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

de la familia *Compositae*. Entre las tribus pertenecientes a esta familia, a partir de las cuales se han aislado lactonas sesquiterpénicas, se encuentran las *Vernoniae*, *Helianibeae* y *Cyperaceae*.

Las lactonas sesquiterpénicas se han encontrado principalmente en extractos de flores y partes aéreas de la planta en un porcentaje que puede variar en una especie de 0.001% a 5% de su peso seco (Rodríguez, 1985:36).

Mecanismo de acción

En el presente trabajo se estudió la actividad antimicrobiana de tres lactonas sesquiterpénicas germacranólidas de farmacología desconocida pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales.

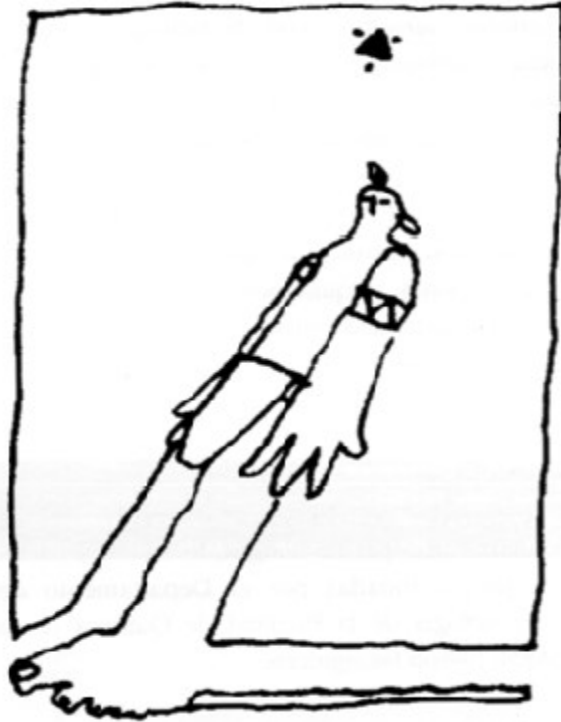
La *Catea zacatechichi* (fuente natural de obtención de la caléina F) es ampliamente usada por los indios chontales de Oaxaca en el tratamiento de afecciones estomacales, cólera y malaria, mientras que las plantas del género *Vernonia*, fuentes naturales de los glaucólidos A y D, al parecer presentan propiedades curativas en afecciones de tipo microbiano.

Los estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de las LST señalan que sólo una cantidad limitada de estos metabolitos secundarios puede tener uso como posibles agentes antimicrobianos; entre éstas destaca la Helenalina por sus propiedades antifúngicas favorables, señaladas por Fieman en 1983, por lo que en el presente trabajo se consideró su estudio con la finalidad de tener un patrón de comparación entre el grado de actividad antimicrobiana de esta LST pseudoguayanólida y las LST germacranólidas.

Características generales de los agentes antiinicrohianos

En los últimos 25 años se han hecho esfuerzos intensos para descubrir nuevos antibióticos con utilidad clínica. Estos trabajos han culminado con la obtención de más de 1,000 sustancias con actividad antimicrobiana, de las cuales sólo dos docenas han tenido uso significativamente clínico. Por esta razón, la búsqueda de nuevos antibióticos efectivos y seguros aún continúa.

La búsqueda de nuevos antibióticos ha sido más intensa entre microorganismos, especialmente algunos hongos; sin embargo, en la actualidad las plantas superiores están cobrando gran importancia pues cada día aumenta el número de metabolitos secundarios de origen vegetal que pre-



sentan propiedades antimicrobianas (Mitsumas, 1981:157).

Estudios relacionados con la actividad antimicrobiana de las lactonas sesquiterpénicas

Los trabajos relacionados con la actividad antimicrobiana de las LST que han servido de base para el planteamiento del presente trabajo de investigación son los siguientes:

1. En 1981, Mitsumas y colaboradores aislaron la angeloilcumarin B, una guayanólida que presentó actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus pyogenes*, *Micobacterium smegmatis* y *Candida albicans* (Mitsumas, 1981:165).

2. En 1982, Kupka y colaboradores demostraron el efecto antibiótico producido por las LST aisladas del arbusto *Heliantbus annus* sobre bacterias gram positivas, gram negativas y hongos (Kupka, 1982:11).

3. En 1983, Picman examinó la actividad de dos lactonas sesquiterpénicas pseudoguayanólidas: la helenalina y la isohelenalina, que inhiben el crecimiento de *Microsporium cookei*, *Trichophyton mentar rophytes* y *Trichophyton roseum*. Picman y Towers estudiaron 57 LST (germacranólidas, guayanólidas y eudesmanólidas) que inhiben particularmente el crecimiento de las bacterias gram positivas (Picman, 1983:183).

4. En ese mismo año, Cárdenas realizó en la Facultad de Química de la UAEM un estudio sobre la inhibición del crecimiento *in vitro* de hongos filamentosos (*Trichophyton mentagrophytes*, *microsporium canis* y *Fusarium* sp.) y levaduras

(*Candida albicans*), con 28 lactonas sesquiterpénicas halogenadas pertenecientes al grupo de las pseudoguayanólidas (Cárdenas, 1983:40).

La actividad antimicrobiana reportada para lactonas sesquiterpénicas con semejanzas estructurales a las LST empleadas en el presente estudio nos llevaron a plantear la siguiente hipótesis:

Las lactonas sesquiterpénicas germacranólidas presentan actividad antimicrobiana *in vitro* contra hongos filamentosos, levaduras y bacterias de importancia clínica.

Metodología

Se utilizaron cepas de hongos, levaduras y bacterias proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Química de la UAEM; fueron las siguientes:

Dermatofitos: *Trichophyton mentagrophytes*
Microsporum canis

Levaduras: *Candida albicans*
Torulopsis glabrata

Bacterias Gram Negativas:
Salmonella typhi
Escherichia coli

Bacterias Gram Positivas:
Staphylococcus aureus
Streptococcus pyogenes.

Sustancias a estudiar:
Ketoconazol, oxitetraciclina,
helenalina, caleína F, glaucólido
A, glaucólido D.

Etapas de la metodología

1. Tipificación de los microorganismos (hongos filamentosos, levaduras y bacterias).
2. Elaboración de soluciones patrón de cada una de las sustancias empleadas.
3. Estandarización de los inoculos.
4. Realización de pruebas a los disolventes.
5. Evaluación del efecto de los disolventes sobre los microorganismos empleados.
6. Aplicar el método de Haley.

Tipificación de los microorganismos

Las cepas fueron sembradas e incubadas de la siguiente manera

Dermatofitos: se sembraron en PDA y se incubaron a 28°C por siete días.

Levaduras: se sembraron en PDA y se incubaron a 28°C por dos días.

Bacterias: se sembraron en TSA y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Para comprobar la identidad de los microorganismos antes de ser empleados en el estudio, se realizó lo siguiente:

Dermatofitos:

- Estudio morfológico microscópico. Por medio de la técnica de Ridell se observaron las estructuras vegetativas y de reproducción de las cepas correspondientes.
- Estudio morfológico macroscópico. Se observó el crecimiento, aspecto y color de la colonia (Cárdenas, 1983:46).

Levaduras:

- Examen microscópico. Tinción de Gram.
- Fermentación de azúcares.
- Cultivos en agar Corn Meal para la producción de pseudomicelio y clamidosporas.

Bacterias:

- Examen microscópico. Tinción de Gram.
- Morfología de colonias. Se sembraron en medios de cultivo selectivos y diferenciales.
- Pruebas bioquímicas.

Elaboración de soluciones patrón

A fin de obtener con mayor exactitud el peso real de las sustancias ensayadas, se sometieron al método ordinario de secado en estufa (se coloca la sustancia en un pesafiltro y se seca durante una hora a 100°C), para librarlas de humedad. La oxitetraciclina se trató como lo indica el método descrito por la *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, colocando la sustancia en un pesafiltro y en un desecador con silicagel seca por un periodo de dos días.

Solubilidad

Se realizó una prueba para determinar la capacidad del disolvente de solubilizar adecuadamente las sustancias empleadas en este estudio.

Efecto del disolvente sobre los microorganismos

Con la finalidad de comprobar que la inhibición del crecimiento microbiano era causada por la acción de las lactonas sesquiterpénicas y de los agentes antimicrobianos, y no por la del disolvente, se procedió a realizar un estudio de inocuidad del disolvente.

El método de Haley (Haley, 1971:52), empleado en este estudio, tiene su fundamento en los ensayos de diluciones seriadas en tubo. Se inoculan varios tubos que contengan un vehículo nutritivo y diluciones seriadas del antibiótico con suspensiones estandarizadas del microorganismo de prueba. La determinación de la susceptibilidad al fármaco queda indicada por la incapacidad del microorganismo de crecer en una dilución determinada. Este método proporciona datos cualitativos y semicuantitativos de la actividad antimicrobiana.



Resultados y discusión

El método empleado fue el descrito por Haley, que presenta las ventajas de ser sensible, preciso, exacto, así como de lectura fácil de resultados. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se recurrió a la observación directa en los tubos de la dilución con menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento microbiano correspondió a la CMI.

Actividad antimicrobiana

Calzada y colaboradores proponen que un compuesto posee una actividad antimicrobiana moderada cuando presenta concentraciones mínimas inhibitorias *in vitro* dentro de un rango de 100 a 1,000 mcg/ml, y una actividad antimicrobiana favorable cuando estas concentraciones son inferiores a 25 mcg/ml; de acuerdo a este criterio, las LST probadas en este estudio presentan las siguientes actividades microbianas.

Helenalina. Presenta actividad antimicrobiana moderada contra las bacterias: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, mientras que contra los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *M. canis* presenta una actividad antimicrobiana favorable.

Calcina F. Presenta actividad antimicrobiana moderada contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*.

Glaucólidos A y D. Presentan actividad antimicrobiana moderada contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

El ketoconazol y la oxitetraciclina usados como patrones de comparación también presentan actividades antimicrobianas favorables contra los microorganismos empleados.

Estudio comparativo

Primer objetivo. Comparar la actividad antimicrobiana de las LST germacranólidas y pseudoguayanólidas. En el presente estudio se consideró a la helenalina como el prototipo más representativo de las LST pseudoguayanólidas, y a las lactonas calcina F, glaucólido A y glaucólido D como representantes del grupo de las germacranólidas. Para efectos de comparación se recurrió a los resultados de las CMI presentadas en las bacterias gram positivas, ya que todas las lactonas sesquiterpénicas mostraron actividad antimicrobiana frente a este grupo de microorganismos; de acuerdo a los resultados obtenidos de actividad antimicrobiana, se puede decir que va de mayor a menor en el siguiente orden:

1. Helenalina
2. Calcina F.
3. Glaucólido D.
4. Glaucólido A.

Esto indica una mayor actividad de la lactona sesquiterpénica pseudoguayanólida; sin embargo, cabe hacer notar que grupos funcionales tales hidroxilos, epoxidos, D-acilos y cetonas insaturadas, presentes en las LST, tienen igual o mayor importancia que el esqueleto hidrocarbonado (Rodríguez, 1985:1580). En otras palabras, la comparación realizada en este caso toma en consideración tanto el esqueleto hidrocarbonado como los grupos funcionales sin hacer discriminación en la contribución a la actividad antimicrobiana.

Segundo objetivo. Comparar la actividad antimicrobiana de las LST y los agentes antimicrobianos de uso comercial ketoconazol y oxitetraciclina. Los resultados muestran con claridad de que en general

las LST presentan una actividad antimicrobiana muy inferior a los agentes antimicrobianos de uso comercial. No obstante, la helenalina aparentemente puede tener uso como agente antifúngico y a la vez incrementar su actividad al hacer modificaciones en su estructura, tal y como lo proponen Lee y colaboradores (8), por medio de la esterificación del grupo hidroxilo ubicado en el carbono 6.

La helenalina presenta una CMI cuatro veces menor que el ketoconazol para el caso de *T. mentagrophytes* y 60 veces menor para el caso de *M. canis*; pese a ello, las modificaciones estructurales antes mencionadas pueden hacer menores estas diferencias, de tal manera, que se pudiera pensar en el uso de este compuesto como agente antifúngico.

Conclusiones

- Las lactonas sesquiterpénicas helenalina, caleína F, glaucólido A y glaucólido D presentan actividad antimicrobiana moderada *in vitro* contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.
- La lactona sesquiterpénica pseudoguayanólida helenalina posee una actividad antimicrobiana favorable contra los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *M. canis*, que aparentemente la sitúan como un posible agente antifúngico.
- La lactona sesquiterpénica germacránólida caleína F muestra actividad antimicrobiana moderada contra las bacterias *Salmonella typhi* y *E. coli*.
- Las LST helenalina, caleína F, glaucólido A y

glaucólido D son inactivas contra la levadura *Candida albicans*.

- Las lactonas sesquiterpénicas muestran una actividad antimicrobiana *in vitro* muy inferior a la de los compuestos antimicrobianos de uso comercial (ketoconazol y oxitetraciclina) empleados en este estudio como sustancias de comparación.
- El sistema conjugado cetona alfa, beta insaturado exocíclico, presente en las LST helenalina y caleína F, es más activo que el sistema conjugado endocíclico de las lactonas sesquiterpénicas glaucólido A y glaucólido D.
- La lactona sesquiterpénica con esqueleto pseudoguayanólido (helenalina) mostró mayor actividad antimicrobiana que las lactonas sesquiterpénicas con esqueleto germacránólido (caleína F, glaucólido A y glaucólido D).

En resumen, los factores estructurales que influyen en la actividad antimicrobiana de las lactonas sesquiterpénicas empleadas en este estudio son el sistema conjugado cetona alfa, beta-insaturado, el esqueleto carbocíclico sesquiterpénico unido al grupo funcional gamma-lactona y la presencia de grupos funcionales que aumentan la reactividad de conjugación de las lactonas sesquiterpénicas.

En el presente trabajo de investigación se han cubierto únicamente los estudios *in vitro*, los cuales constituyen el primer paso en la investigación; no obstante, la realización de estudios *in vivo* es imprescindible para confirmar la supuesta actividad antimicrobiana de las LST encontrada en este estudio y para situarlas como posibles agentes antimicrobianos de uso comercial. •

BIBLIOGRAFIA

- Calzada, J. y Ciccio, J. (1980). "Antimicrobial activity of the heliangolide chromoanide and related sesquiterpene lactones", en *Phytochemistry*. 19(5): 967-968.
- Cárdenas, H. O. A. (1983). *Inhibición del crecimiento de hongos y levaduras utilizando lactonas sesquiterpénicas batogenadas*. Tesis de licenciatura, QFB Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México.
- Colowick, S. P. (1987). "Methods in enzymology", Vol. XLIII *Antibiotics*. Ed. Jhon. H. Hash.
- Cowan y Steel. (1979). *Manual para la identificación de bacterias de importancia médica*. Ed. CECSA México.
- Haley, L. D. (1971). "Laboratory methods in systematic mycoses", Micología. Unit. EU.
- Jawad, A. L. (1985). "Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones extrated from iraqi plants. (Part II)", en *Journal Biol. Sci. Research*: 16 (2);17-22.
- Kupka, J. (1982). "Biological activies of sesquiterpene lactones from helianthus annus, antimicrobial and citotoxic properties", *Biosci.* 37(11-12):1087-1091.
- Lee, K. H. (1977). "Structure antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compound", en *Phytochemistry* 16:1177-1181.
- Mitsumas, L. A. (1981). "Antimicrobial agents from higher plants I", *Lloydia* 35(2): 157-166.
- Picman, A. K. y Towers. (1983). "Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones", en *Chem. Biol. Research*. 4 (11) 183-186.
- Rodríguez, E. (1976). "Biology activity of sesquiterpene lactones", en *Phytochemistry*. 15 1573-1580.
- Rodríguez, L. L. C. (1985). *Lactonas sesquiterpénicas del género Parthenium, actividad biológica*. Tesis de licenciatura QFB, Universidad Nacional Autónoma de México.