

## Actividad Antimicrobiana *in vitro* del Acido Epiforélico 1 (Sustancia Liquélica)

RAUL UGARTE\*, WANDA QUILHOT\*, BARBARA DIAZ\*,  
ALICIA VERA\*\* y PETER FIEDLER\*\*\*

RESUMEN. Mediante el método de dilución en tubo se ensayó la posible actividad antimicrobiana del ácido epiforélico 1 (difencil-éter de origen líquénico) en bacterias Gram-positivas y hongos. La sustancia probada frente a *Staphylococcus aureus*, presentó una CIM media geométrica de  $16,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ , las CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> fueron de 13,5 y  $44,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente. La constante de inhibición específica obtenida mediante estudios de cinética microbiana, para una cepa estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, fue de  $1,41 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1} \text{ ml } \mu\text{g}^{-1}$ . Entre los hongos, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* no mostraron desarrollo y las especies de *Candida* presentaron una CIM de  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

SUMMARY. "Antimicrobial activity *in vitro* of epiphorellic acid 1 (lichenic substance)". Using the tube dilution method, the possible antimicrobial activity of epiphorellic acid 1 (diphenyl ether of lichenic origin) was tested against Gram-positive bacteria and fungi. The compound tested against *Staphylococcus aureus* showed a CIM geometric mean of  $16,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; CIM<sub>50</sub> and CIM<sub>90</sub> was of 13.5 and  $44.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively. The specific inhibition constant obtained from microbial kinetic studies, related to standard strain *S. aureus* ATCC 6538 was  $1.41 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1} \text{ ml } \mu\text{g}^{-1}$ . Fungi presented different levels to susceptibility. *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* did not show development, but in *Candida* species CIM was of  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

### INTRODUCCION

Los líquenes sintetizan metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Dépsidos, Depsidonas, debenzofuranos y ácidos úsnicos, considerados sustancias líquénicas específicas<sup>1</sup>, inhiben, en gene-

ral, el crecimiento de bacterias Gram-positivas y de hongos patógenos<sup>2-5</sup>. Un compuesto líquénico, el ácido úsnico, es utilizado en preparados farmacéuticos y cosméticos<sup>6-8</sup>.

Los difencil-éteres constituyen un gru-

\* Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Casilla 92-V, Valparaíso, Chile

\*\* Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Casilla 92-V, Valparaíso, Chile

\*\*\* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Federico Santa María, Casilla 110-V, Valparaíso, Chile

PALABRAS CLAVE: Acido epiforélico 1; Sustancias líquénicas; Actividad antimicrobiana; Curvas de generación microbiana

KEY WORDS: *Epiphorellic acid 1*; *Lichenic substances*; *Antimicrobial activity*; *Microbial generation curves*

po limitado de metabolitos acumulados por líquenes cuyo primer miembro, la leprololina, fue descrito en 1973<sup>9</sup>. Se los considera como productos de degradación de depsidonas<sup>10</sup> o como resultantes de la oxidación de dos moléculas de C-metilfloacetofenona<sup>9</sup>. Dos nuevos difenil-éteres han sido informados recientemente, los ácidos epiforélicos 1 y 2<sup>11</sup>, compuestos que derivarían del metabolismo de sus depsidonas congénéricas.

No existe información sobre la actividad biológica de los difenil-éteres. Una depsidona clorada, la diploicina, se transforma por hidrólisis alcalina en un compuesto del tipo difenil-éter; en estas condiciones es efectivo frente a bacterias patógenas<sup>4</sup>. El propósito de este trabajo fue determinar si el ácido epiforélico 1 inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y de hongos.

#### MATERIALES Y METODOS

El ácido epiforélico 1 fue aislado de *Cornicularia epiphorella* (Parmeliaceae)<sup>11</sup> en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federico Santa María. Se preparó una solución en etanol-agua (2:3 v/v) que contenía 200 µg ml<sup>-1</sup> de la droga, a partir de la cual se prepararon las diluciones para los tests de susceptibilidad. La solución se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 30 minutos.

#### Organismos

Se utilizaron 17 cepas de bacterias Gram-positivas que provenían de aislados patológicos recientes: 12 cepas de *Staphylococcus aureus*, 2 cepas de *S. epidermis*, 2 cepas de *Corynebacterium spp* y 1 cepa de *Micrococcus luteus*, además de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, obtenida del Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud. Las bacterias fueron

identificadas en base a las características morfológicas, coloración de Gram y reacción de la coagulasa y la penicilinasasa<sup>12, 13</sup>.

27 cepas de hongos patógenos y oportunistas se utilizaron en los ensayos e incluyen 15 levaduras, 4 aislados de hongos filamentosos, 6 dermatofitos y 2 mucorales.

Las bacterias obtenidas de aislados clínicos y el total de hongos provenían del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

#### Determinación de la actividad antimicrobiana

Para probar la susceptibilidad de cepas bacterianas y fúngicas al ácido epiforélico 1 (Fig. 1) se utilizó el método de dilución en tubo<sup>13</sup>, determinando las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM). Los ensayos para bacterias se prepararon a partir de soluciones seriadas de la droga en caldo nutritivo (Difco). El inóculo, 10<sup>5</sup> CFU ml<sup>-1</sup>, se preparó a partir de diluciones de un cultivo fresco incubado durante 16-18 horas a 37 °C.

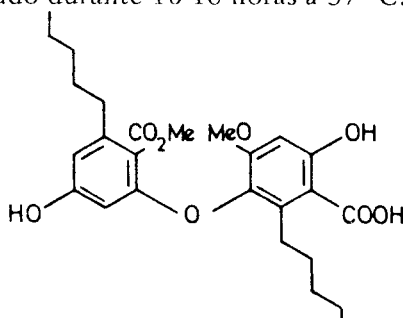


Figura 1. Acido epiforélico 1

Las cepas fúngicas, mantenidas en agar Sabouraud-dextrosa (Merck) al 2%, fueron removidas con suero salino estéril hasta la obtención de una suspensión ajustada a 90% de transmitancia, a 530 nm<sup>14</sup>. Todos los ensayos se realizaron en caldo Sabouraud-dextrosa al 2%.

Los tubos se inocularon e incubaron a 37 °C para las bacterias y a 27 °C para los hongos, con excepción de *Rhizomucor pusillus* que se incubó a 37 °C.

Para cada ensayo se realizaron los respectivos controles: medio de cultivo sin ácido epiforélico 1, solución de ácido epiforélico 1 sin medio de cultivo y control de solvente.

Los tests de susceptibilidad se hicieron por triplicado.

#### Curvas de generación de *S. aureus*

Se prepararon diluciones de ácido epiforélico 1 en caldo nutritivo entre 3,125 y 100,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . A 2,5 ml de cada dilución se agregaron 2,5 ml del inóculo y se midió la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro Sequoia Turner Modelo 340 en intervalos de 90 minutos.

El inóculo fue obtenido a partir de un cultivo fresco de *S. aureus* ATCC 6538 incubado durante 18 horas a 37 °C en caldo nutritivo y posterior dilución con solución de NaCl al 0,9% hasta obtener una suspensión final de  $10^5$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ .

#### RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de los efectos del ácido epiforélico 1 sobre bacterias Gram-positivas están contenidos en la Tabla 1, donde se expresan las cantidades acumulativas de las cepas inhibidas a las distin-

Tabla 1. Cantidad acumulativa de cepas de *Staphylococcus aureus* inhibidas a diferentes concentraciones de ácido epiforélico 1.

Acido epiforélico 1 ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )							CIM media geométrica ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
1,56	3,125	6,25	12,5	25,00	50,00	100,00	
0	2 <sup>a</sup>	3	7 <sup>b</sup>	9	13	13	16,3

a: incluye 1 cepa de *Micrococcus luteus*

b: incluye 1 cepa de *Staphylococcus epidermidis*

tas concentraciones de la droga y las CIM media geométrica para las cepas estudiadas. Las cepas de *S. aureus* mostraron diferentes grados de susceptibilidad; dos de ellas fueron resistentes a todas las concentraciones ensayadas, al igual que *Corynebacterium spp. M. luteus* no experimentó desarrollo durante las primeras 8 horas de incubación y a las 24 horas fue susceptible hasta 3,125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

La Fig. 2 muestra el porcentaje acumulativo de las cepas en función de las respectivas CIM. Los valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>, obtenidos de la curva, fueron de 13,5 y 44,55  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente.

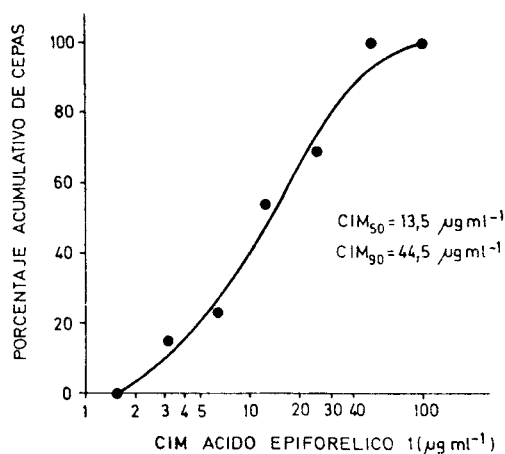


Figura 2. Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* al ácido epiforélico 1.

Las curvas de generación de *S. aureus* ATCC 6538 en función de las distintas concentraciones de ácido epiforélico

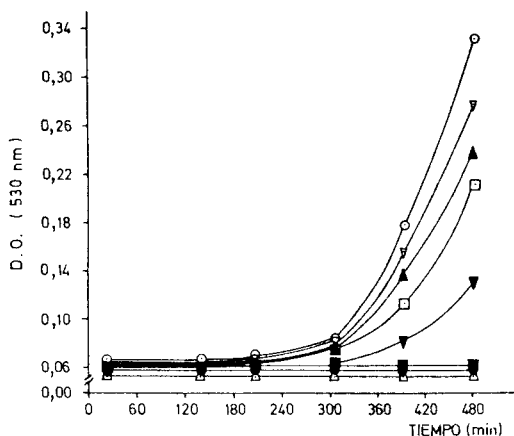


Figura 3. Curvas de generación de *Staphylococcus aureus* ATCC 3598 en presencia de diferentes concentraciones de ácido epiforélico 1. Control libre de droga: ○; medio de cultivo: ●; 3,125 µg ml<sup>-1</sup>: ▽; 6,25 µg ml<sup>-1</sup>: ▲; 12,5 µg ml<sup>-1</sup>: □; 25,00 µg ml<sup>-1</sup>: ►; 50,00 µg ml<sup>-1</sup>: ■; 100,00 µg ml<sup>-1</sup>: △.

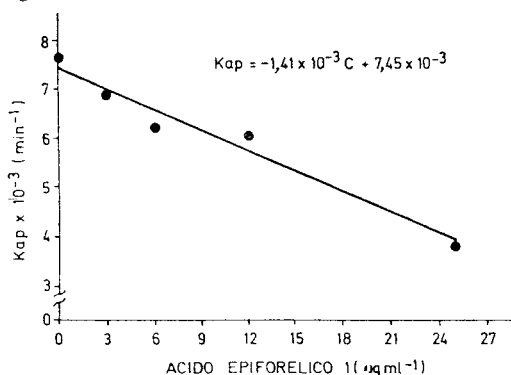


Figura 4. Dependencia de la constante de generación aparente ( $k_{ap}$  en min) en función de la concentración de droga (µg ml<sup>-1</sup>) *Staphylococcus aureus* ATCC 3598.

co (Fig. 3), muestran que a concentraciones de 50 y 100 µg ml<sup>-1</sup> no existe desarrollo bacteriano al cabo de 8 horas de incubación. En cambio, entre 3,125 y 25,00 µg ml<sup>-1</sup> se produce una disminución en la pendiente de la región logarítmica de la curva de crecimiento. Considerando que las curvas de generación de *S. aureus* concuerdan con la expresión:

$$\ln D.O. = \ln D.O._0 + k_{ap} t^{15}$$

de la pendiente de la porción lineal del gráfico  $\ln D.O.$  versus  $t$ , se obtuvo la constante de generación aparente ( $k_{ap}$  en min<sup>-1</sup>) de cultivos infectados por la droga. Se observa que  $k_{ap}$  disminuye en función de la concentración de ácido epiforélico (Fig. 4), lo que demuestra el efecto bacteriostático de la droga. Tomando en consideración que la dependencia funcional de la constante de velocidad de generación respecto de la concentración de la droga concuerda con la expresión:

$$k_{ap} = k_o - k_c C^{16}$$

se determinó la constante específica de inhibición,  $k_c$ , cuyo valor fue de  $1,41 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1} \text{ ml } \mu\text{g}^{-1}$ ; la constante de generación en ausencia de la droga,  $k_o$ , tiene un valor de  $7,45 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ .

HONGOS	CIM (µg ml <sup>-1</sup> )			
	20	40	60	80 100
<b>LEVADURAS</b>				
<i>Candida albicans</i>	[Barra]			
<i>C. guilliermondii</i>	[Barra]			
<i>C. krusei</i>	[Barra]			
<i>C. parapsilosis</i>	[Barra]			
<i>Cryptococcus neoformans</i>	*	[Barra]		
<i>Torulopsis glabrata</i>	[Barra]			
<i>Trichosporon cutaneum</i>	[Barra]			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[Barra]			
<b>FILAMENTOSOS</b>				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	*	[Barra]		
<i>A. flavus</i>	[Barra]			
<i>Chaetomium globosum</i>	[Barra]			
<b>DERMATOFITOS</b>				
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	[Barra]			
<i>T. rubrum</i>	[Barra]			
<b>MUCORALES</b>				
<i>Mucor racemosus</i>	[Barra]			
<i>Rhizomucor pusillus</i>	[Barra]			

\* Susceptibles a todas las concentraciones de la droga

Figura 5. Actividad inhibitoria del ácido epiforélico 1 contra 27 aislados de hongos patógenos y oportunistas, determinada por el método de dilución en tubo.

La actividad del ácido epiforélico sobre los diferentes grupos fúngicos se expresa en la Fig. 5, donde se observan las CIM para cada cepa ensayada. *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*

fueron susceptibles a todas las concentraciones ensayadas; en cambio, *Chaetomium globosum* fue resistente hasta dosis de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Las especies de *Candida* mostraron igual grado de susceptibilidad con CIM de  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

No es posible comparar los resultados obtenidos con ácido epiforélico 1 con otras moléculas relacionadas porque no existen datos en la literatura.

Nuevos ensayos con otros difeniléteres deberían realizarse para tener una idea cabal de la actividad antimicrobiana

de estas nuevas moléculas aisladas de líquenes, que podrían estar en la base de futuros agentes antimicrobianos de uso corriente en infecciones producidas por estos organismos.

AGRADECIMIENTOS. Al Dr. E. Piontelli y a la Prof. M.A. Toro, Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Valparaíso, y al financiamiento otorgado por la Universidad de Valparaíso, Proyecto UV 22/83.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Vicente, C. (1975) "Fisiología de las sustancias líquénicas". Alhambra S.A.
2. Bustinza, F. y A.C. López (1946) *An. Jar. Bot. Madrid* 7: 511-33
3. Marshak, A., G.T. Terry y L.C. Craig (1947) *Science* 106: 394-5
4. Vartia, K.O. (1950) *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., suppl.* 7: 1-83
5. Klosa, J. (1953) *Pharmazie* 8: 435-42
6. Vartia, K.O. (1973 en "The Lichens" (V. Ahmadjian y M.E. Hale, eds.) *Academic Press*, págs. 547-61
7. Bergerhausen, H. (1975) *Kosmetic and Aerosole* 48: 144
8. Bergerhausen, H. (1976) *Cosm. Toil.* 91: 25-6
9. Elix, J.A., U. Engkaninan, A.J. Jones, C.L. Raston, M.V. Sargent y A.H. White (1973) *Aust. J. Chem.* 31: 2057-68
10. Sala, T., M.V. Sargent y J.A. Elix (1981) *J. Chem. Soc.* 849-54
11. Fiedler, P., V. Gambaro, J.A. Garbarino y W. Quilhot (1986) *Phytochemistry* 25: 461-5
12. Bailey, W.R. y E. Scott (1973) *Diagnóstico Microbiológico*. Edit. Médica Panamericana S.A., 3a. edición; págs. 154-73, 253-7, 381-9
13. Lennette, E., E. Spaulding y J. Truant (1974) "Manual of Clinical Microbiology" American Society, Washington; págs, 410-6, 502-54
14. *United States Pharmacopœia XX* (1980) Pharmacopœial Conventions, Inc. Hookville; págs. 883-8
15. Heman-Ackah, S.M. (1975) *J. Pharm. Sci.* 64: 1612-20
16. Heman-Ackah, S.M. (1974) *J. Pharm. Sci.* 63: 1077-84