

Actividad antimicobacteriana de terpenos

Antimycobacterial activity of terpenes

Juan Gabriel Bueno-Sánchez¹, Jairo René Martínez-Morales², Elena Stashenko²

RESUMEN

Introducción: La tuberculosis (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* es la mayor causa de mortalidad mundial por un único agente patógeno. Asimismo, un gran número de micobacterias no tuberculosas, especialmente *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. chelonae*, causan infecciones oportunistas en pacientes con SIDA. Muchos terpenos poseen actividad biológica y se emplean en el tratamiento de diversas enfermedades, razón que los hace fuente de moléculas promisorias. **Objetivo:** El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antimicobacteriana de 16 terpenos contra *M. tuberculosis* H37Rv y un aislamiento clínico de *M. chelonae*. **Materiales y métodos:** Se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los mismos y se realizaron curvas de letalidad para establecer actividad bactericida, empleando una técnica de macrodilución en caldo estandarizada para este tipo de compuestos volátiles. **Resultados:** Los terpenos con menor valor de CMI fueron timol y carvacrol, con concentraciones de 125-250 µg/mL, y actividad bactericida contra los dos microorganismos. Geraniol, mirceno, *p*-cimeno, alfa-pineno, presentaron valores de CMI entre 250 y 500 µg/mL. **Conclusiones:** Algunos terpenos han presentado actividad importante contra microorganismos del género *Mycobacterium*, sin embargo los valores de CMI obtenidos no explican el efecto antimicrobiano presentado por el aceite completo, se requiere evaluar las interacciones de sinergismo y/o antagonismo entre los terpenos para determinar los componentes responsables de la acción farmacológica. *Salud UIS* 2009; 41: 231-235

Palabras clave: Actividad antimicobacteriana, terpenos, tuberculosis

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* is the major source of global mortality from a single pathogen. Moreover, a large number of nontuberculous mycobacteria, especially *M. avium*, *M. intracellulare* and *M. chelonae*, cause opportunistic infection in AIDS patients. Terpenes, possess a wide spectrum of biological activity and are used in the treatment of various diseases, reason that makes them a source of promising molecules. **Objective:** To determine the antimycobacterial activity of 16 terpenes against *M. tuberculosis* H37Rv and a clinical isolate of *M. chelonae*. **Materials and methods:** Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of terpenes were obtained by macrodilution

1. Grupo Micobacterias, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Centro Colombiano de Investigación en Tuberculosis CCITB, Colombia.

2. Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Correspondencia: Juan Gabriel Bueno MD MSc, Grupo de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 No. 51-20 Zona 6 CAN Bogotá, D.C., Colombia, Tel.: (+571) 220 0926 ext 1260, Fax: (+571) 220 0926.

E-mail: jbueno@ins.gov.co

Recibido: 15 de octubre de 2009 - **Aceptado:** 11 de diciembre de 2009

colorimetric method standardized for this kind of volatile compounds, time kill curves were determined to establish bactericidal activity using CLSIM26-A method. **Results:** Terpenes with the lower MIC values were thymol and carvacrol at concentrations of 125-250 µg/mL, showing bactericidal activity against both microorganisms. Geraniol, myrcene, *p*-cymene, and alpha - pinene, showed MIC values ranging between 250-500 µg/mL. **Conclusión:** Some terpenes have presented significant activity against microorganisms of the *Mycobacterium* genus, but the MIC values obtained do not explain the antimicrobial effect showed by the complete oil, is necessary to assess the interactions of synergism and / or antagonism between the terpenes to determine the components responsible for Pharmacological. *Salud UIS* 2009; 41: 231-235

Keywords: Antimycobacterial activity, terpenes, tuberculosis

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* y otros miembros del complejo *M. tuberculosis*, es una enfermedad infecciosa considerada entre los mayores problemas de salud pública de la humanidad, que afecta aproximadamente a un 32% de la población mundial^{1,2}. La mortalidad de esta enfermedad ha aumentado debido al sinergismo que presenta con la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)^{1,2}. Por otro lado, han complicado aún más el control de la TB la aparición de aislamientos de *M. tuberculosis* multidrogorresistentes (MDR), definidos como los aislamientos resistentes por lo menos a los medicamentos de primera línea, isoniazida y rifampicina; así como de aislamientos extensivamente resistentes (XDR), que han desarrollado además de la multidrogorresistencia, resistencia a los fármacos de segunda línea como las fluoroquinolonas y al menos uno de los inyectables (amikacina, kanamicina o capreomicina)². La organización mundial de la salud (OMS) en su plan mundial para detener la TB 2006-2015 estipula como meta para el año 2010 introducir un nuevo fármaco o una asociación de fármacos que permita reducir la duración del tratamiento a 3 ó 4 meses y se espera que se pueda disminuir aún más el plan terapéutico, a 10 ó 12 días. Por los anteriores motivos existe una necesidad urgente de encontrar nuevos fármacos frente a esta enfermedad¹, en esta búsqueda los productos naturales provenientes de plantas y otros organismos han sido considerados una fuente importante de moléculas con actividad antituberculosa con estructuras diversas¹.

Los aceites esenciales producidos por las plantas para combatir el ataque de los agentes infecciosos, son mezclas complejas de varias sustancias³. En los aceites esenciales los terpenos son los compuestos más abundantes, entre sesquiterpenos y monoterpenos. Los aceites esenciales y sus componentes mayoritarios poseen un amplio espectro de actividad biológica, en particular antimicrobiana³. Existen en el mundo pocos estudios que determinen la actividad antituberculosa de los aceites esenciales y sus componentes mayoritarios. En la literatura se encuentran reportes de la actividad sobre *M. tuberculosis* de diversos monoterpenos como geranilgeraniol con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1,56 µg/mL, geraniol (CMI 64 µg/mL), acetato de geranilgeraniol (CMI 3,13 µg/mL), citronelol (CMI 64 µg/mL) y nerol (CMI 128 µg/mL)^{4,5}. La ausencia de datos acerca de la actividad antituberculosa de los aceites esenciales y sus componentes mayoritarios es una evidencia importante de que este sigue siendo un campo inexplorado que puede llegar a ser promisorio, debido a la gran actividad antibacteriana que presentan este tipo de sustancias³. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicobacteriana de 16 terpenos componentes mayoritarios de aceites esenciales contra *M. tuberculosis* H37Rv y un aislamiento clínico de *M. chelonae* con el fin de identificar los compuestos responsables de la actividad biológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Terpenos

Se evaluaron 16 terpenos provenientes de Sigma-Aldrich (Sigma, New Jersey, USA), los cuales están consignados en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de 17 monoterpenos contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *M. chelonae* MNT 1407.

Terpeno	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		<i>M. chelonae</i> MNT 1407	
	CMI MG ^a (µg/mL)	ES ^b	CMI MG (µg/mL)	ES
α-Pineno	198,42	72,16	>500	0
Carvacrol	125	0	250	0
Linalool	>500	0	>500	0
Benzoato de benzilo	500	0	500	0
Geraniol	250	0	500	0
1-8 Cineol	>500	0	>500	0
mirceno	250	0	>500	0
α-Felandreno	500	0	>500	0
Limoneno	314,98	144,33	>500	0
Eugenol	>500	0	>500	0
6-metil-5-hepten- 2-ona	>500	0	>500	0
Acetato de geraniol	396,85	144,33	>500	0
Timol	125	0	250	0
Carvona	396,85	144,33	>500	0
γ-Terpineno	250	0	>500	0
p-Cimeno	250	0	>500	0
Isoniazida	0,25	0	>2	0
Rifampicina	0,25	0	0,5	0

^a Media geométrica de la Concentración Mínima Inhibitoria, ^b Error Standard

Microorganismos empleados

Se usaron la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y el aislamiento clínico *Mycobacterium chelonae* MNT 1407, este aislamiento proviene de un paciente con infección posterior al procedimiento de mesoterapia, su aislamiento y clasificación fenotípica fue llevado a cabo en el Instituto Nacional de Salud por el Grupo Micobacterias subdirección Red Nacional de Laboratorios. La clasificación genotípica fue realizada en el Grupo Micobacterias Subdirección Investigación.

Actividad antimicobacteriana

La actividad antimicobacteriana de los monoterpenos fue evaluada siguiendo el protocolo de macrodilución en caldo descrito por Abate y col (1998) con las

modificaciones de Bueno y col (2009)^{6,7}, se empleó el medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson and Co., Sparks MD, USA) suplementado con OADC al 10% (oleic acid-albumin-dextrose-catalase) (Becton Dickinson and Co., Sparks MD, USA) y 0,001% de Tween 80 (Sigma, New Jersey, USA). La suspensión bacteriana de 2×10^6 UFC/mL diluida 1:20 en Middlebrook 7H9 fue adicionada a tubos de vidrio con tapa que contenían previamente las diluciones dobles de los aceites esenciales a concentraciones entre 31,25 µg/mL a 500 µg/mL para ajustar un volumen final de 2 mL. Después de incubarlo por siete días, fue agregado a cada tubo 120 µL de una mezcla que contenía MTT (5mg/mL) (Sigma, New Jersey, USA) con Tween 80 al 20% (Sigma, New Jersey, USA). El color violeta indica crecimiento bacteriano. Los resultados se leyeron al día siguiente. Para pruebas estándar, se

determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los fármacos isoniazida y rifampicina (Sigma, New Jersey, USA) en cada ensayo. La CMI correspondió a la más baja concentración que inhibió el crecimiento microbiano. Las pruebas de susceptibilidad se realizaron en tres días distintos. Los resultados se expresaron como la media geométrica \pm el error estándar de los tres ensayos.

Curvas de letalidad

A los monoterpenos que presentaron mayor actividad se les determinó la actividad bactericida o bacteriostática mediante el ensayo de curvas de letalidad, empleando la técnica de macrodilución en caldo implementada por el Clinical and Laboratory Standard Institute (1999), con las modificaciones de Bueno y col (2009)^{7,8}. La actividad bactericida fue determinada en tubos de vidrio que contenían 2 mL del medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson and Co., Sparks MD, USA) medium suplementado con 10% OADC (ácido oleico-albumina-dextrosa-catalasa) (Becton Dickinson and Co., Sparks MD, USA) y 0,001% de Tween 80 (Sigma, New Jersey, USA). Para cada aceite y medicamento se evaluaron concentraciones que correspondían a dos veces la CMI, una vez la CMI y 0,5 veces la CMI. Se empleó un inóculo inicial de micobacterias correspondiente a 10^6 UFC/ mL. Los tubos se incubaron a 37°C en un Incubator Shaker Model G25 (New Brunswick Scientific Co, New Jersey, USA), se tomaron muestras cada dos días hasta el día sexto y se sembraron en tubos con medio Lowenstein-Jensen. Isoniazida fue usado como control. Los resultados se graficaron en escala logarítmica de las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (Log_{10} UFC/mL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la CMI de los 16 terpenos con los dos microorganismos están consignados en la Tabla 1. Los terpenos más activos frente a los dos microorganismos fueron timol y carvacrol (CMI entre 125 y 250 $\mu\text{g/mL}$). Se considera que el grupo hidroxilo presente en las dos estructuras es clave para la actividad antimicrobiana⁹. La actividad de los aceites esenciales puede ser explicada por la alta concentración de terpenos^{9,10}, los cuales han exhibido actividad antimicobacteriana *in vitro*^{4,5}. La actividad antibacteriana de este tipo de compuestos se debe a la perturbación de la bicapa lipídica en la membrana plasmática, lo que conduce a una alteración de la permeabilidad¹¹. La actividad antituberculosa de timol y carvacrol ha sido reportada por otros autores con valores de CMI entre 64-100 $\mu\text{g/mL}$ ^{12,13}; la

diferencia con los resultados obtenidos en este estudio es consecuencia de las técnicas de evaluación de la susceptibilidad empleadas (microdilución en platos plásticos de 96 pozos), debido a que estos compuestos son altamente volátiles y se adhieren a los materiales plásticos, factores éstos que alteran la CMI¹⁴. Timol presentó actividad bactericida contra H37Rv (Figura 1).

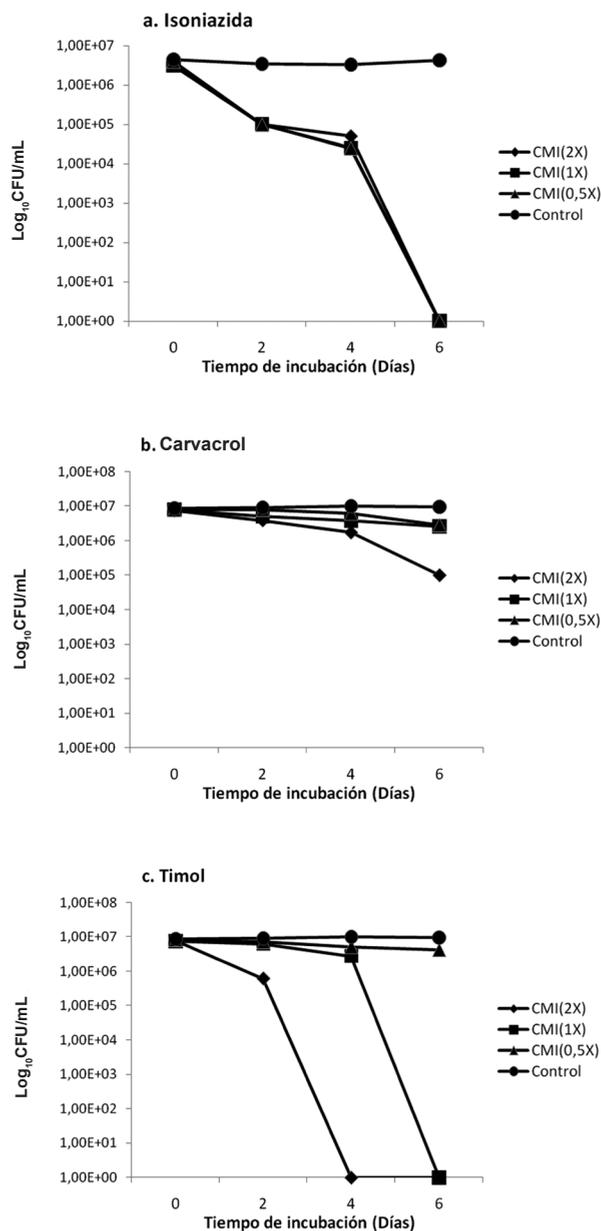


Figura 1. Curva de letalidad de *M. tuberculosis* H37Rv en Log_{10} CFU/mL frente a: a. isoniazida, b. carvacrol y c. timol a concentraciones de dos veces la CMI (CMI-2X), una vez la CMI (CMI-1X) y 0,5 veces la CMI (CMI-0,5X).

Las diferencias entre las actividades biológicas de los terpenos frente a los dos microorganismos pueden ser explicadas por las diferencias en la composición de la pared de las micobacterias, conformada en su mayoría por ácidos micólicos; esta barrera enteramente lipídica impide el paso de solutos a través de la misma y protege a la micobacteria de los cambios ambientales¹⁵.

La actividad de los terpenos por separado no explica la actividad antimicobacteriana presentada por el aceite esencial completo en anteriores estudios⁷. La posible explicación a este fenómeno es el sinergismo entre los diversos componentes de la mezcla³. Es de interés realizar ensayos de sinergismo mediante la técnica del tablero de ajedrez con el fin de determinar las interacciones entre los compuestos presentes en los aceites esenciales.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación cuenta con el apoyo financiero del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas”, COLCIENCIAS-CENIVAM, CCITB (Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, Centro Colombiano de Investigación en Tuberculosis) (contratos No 432-2004 y 431-2004) y el Instituto Nacional de Salud, Subdirección de Investigación.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores certifican que no existe conflicto de intereses manifiesto con los resultados y conceptos emitidos en el presente manuscrito.

REFERENCIAS

1. Palomino JC, Ramos DF, da Silva PA. New anti-tuberculosis drugs: strategies, sources and new molecules. *Curr Med Chem* 2009; 16:1898-1904.
2. Donald PR, van Helden PD. The global burden of tuberculosis--combating drug resistance in difficult times. *N Engl J Med* 2009; 360: 2393-2395.
3. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res* 2007; 21:308-323.
4. Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med* 2001; 67: 685-694.
5. Vik A, James A, Gundersen LL. Screening of terpenes and derivatives for antimycobacterial activity; identification of geranylgeraniol and geranylgeranyl acetate as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Planta Med* 2007; 73:1410-1412.
6. Abate G, Mshana RN, Miorner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:1011-2026.
7. Bueno Sánchez JG, Martínez Morales JR, Stashenko E, Ribón W. Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. *Biomédica* 2009; 29: 51-60.
8. CLSI, 1999. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. CLSI Document M26-A. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
9. Koroch A, Juliani R, Zygodlo J. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In: Berger RG, editor. *Flavours and Fragrances*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 87-103.
10. Gershenson J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* 2007; 3: 408-414.
11. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2474-2478.
12. Kilic T. Analysis of essential oil composition of *Thymbra spicata* var. *spicata*: antifungal, antibacterial and antimycobacterial activities. *Z Naturforsch C* 2006; 61: 324-328.
13. Jiménez-Arellanes A, Martínez R, García R, León-Díaz R, Luna-Herrera J, Molina-Salinas G, et al. *Thymus vulgaris* as a potential source of antituberculous compounds. *Pharmacologyonline* 2006; 3: 569-574.
14. Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, Yamaguchi H. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol Immunol* 2001; 45: 201-208.
15. Jarlier V, Nikaido H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* 1990; 172: 1418-1423.