

## ACTIVIDAD LEISHMANICIDA Y TRIPANOCIDA DE *ACACIA FARNESIANA*, *PIPER ARIEIANUM*, *P. SUBPEDALE*, *SPHAGNUM RECURVUM* Y *VISMIA BACCIFERA* SUBSP. *FERRUGINEA*

LEISHMANICIDAL AND TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF *ACACIA FARNESIANA*, *PIPER ARIEIANUM*,  
*P. SUBPEDALE*, *SPHAGNUM RECURVUM*, AND *VISMIA BACCIFERA* SUBSP. *FERRUGINEA*

Adriana Gallego<sup>1,5</sup>, Fernando Torres<sup>1,6</sup>, Sara Robledo<sup>2,7</sup>, Iván D. Vélez<sup>2,8</sup>, Lina Carrillo<sup>2</sup>, Diana L. Muñoz<sup>2</sup>,  
Winston Quiñones<sup>1,9</sup>, Ramiro Fonnegra<sup>3,10</sup>, Javier Roldán<sup>3</sup>, Lorena Valencia<sup>4</sup>, Omar Triana<sup>4,11</sup>,  
Fernando Echeverri<sup>1,12</sup>

### Resumen

Los extractos de *Acacia farnesiana*, *Piper arieianum*, *P. subpedale*, *Sphagnum recurvum* y *Vismia baccifera* subsp. *ferruginea* se evaluaron *in vitro* contra promastigotes de *Leishmania* spp. y amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los extractos de *V. baccifera* subsp. *ferruginea* y *P. arieianum* fueron promisorios por su baja citotoxicidad contra la línea celular U937 y buena actividad leishmanicida. Debido a la actividad *in vitro* presentada por la subespecie *V. baccifera* subsp. *ferruginea*, se estudió la posibilidad de obtener la propagación de esta planta por cultivo de tejidos. También se aisló un derivado del ácido cinámico, pero solo se mostró una actividad antiprotozoaria marginal.

*Palabras claves:* citotoxicidad, cultivo de tejidos, extractos vegetales, epoxicinámico, leishmaniosis, tripanosomiasis.

### Abstract

The extracts of *Acacia farnesiana*, *Piper arieianum*, *P. subpedale*, *Sphagnum recurvum*, and *Vismia baccifera* subsp. *ferruginea* were evaluated *in vitro* against promastigotes of *Leishmania* spp. and amastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis* and epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Extracts of *V. baccifera* subsp. *ferruginea* and *P. arieianum* were promising due to low cytotoxicity against the U937 cell line and good leishmanicidal activity. Because of the good leishmanicidal activity of the subspecies *V. baccifera* subsp. *ferruginea*, was studied the possibility to get by tissue culture propagation of this plant. A cinnamic acid derivative was isolated too, but only showed a marginal antiprotozoal activity.

*Key words:* cytotoxicity, epoxicinnamic, leishmaniasis, plant extract, tissue culture, trypanosomiasis.

## INTRODUCCIÓN

Aunque son notables los adelantos de la ciencia médica durante los últimos años, las enfermedades parasitarias siguen afectando o amenazando la vida de millones de personas en el mundo. La leishmanio-

sis ha sido informada en aproximadamente 88 países del mundo, calculándose que se presentan alrededor de 12 millones de casos anualmente y que existen aproximadamente 350 millones de personas en riesgo de adquirir la enfermedad. Todos los protozoos del género *Leishmania* poseen un ciclo

Recibido: abril de 2006; aceptado: junio de 2006.

Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia: <sup>1</sup> Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales-SIU; <sup>2</sup> Programa para el Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET); <sup>3</sup> Grupo de Estudios Botánicos; <sup>4</sup> Grupo de Chagas.

Correos electrónicos: <sup>5</sup> <agallegocruz@gmail.com>; <sup>6</sup> <ltorres@matematicas.udea.edu.co>; <sup>7</sup> <sara\_robledo@yahoo.com>; <sup>8</sup> <id\_velez@yahoo.com>; <sup>9</sup> <wquinone@quimbaya.udea.edu.co>; <sup>10</sup> <flora99@epm.net.co>; <sup>11</sup> <otriana@gmail.com>; <sup>12</sup> <echeverri@quimbaya.udea.edu.co>.

de vida similar, siendo transmitido el parásito desde un reservorio mamífero al humano por la picadura de insectos hembras del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. En el hombre existen tres formas principales de leishmaniosis: cutánea, mucocutánea y visceral. Estas formas han sido clasificadas con base a criterios clínicos y son causadas por al menos 15 especies diferentes del parásito (De Almeida et al., 2003; Desjeux, 2004).

La incidencia de leishmaniosis cutánea en Colombia ha presentado un aumento en los últimos años, pasando de un promedio de 6.000 casos reportados por el Ministerio de Salud en los años noventa a 9.533 casos en el 2003 y 14.000 casos en el año 2004. En junio de 2005, se reportaron 8.058 casos de leishmaniosis cutánea (99,3%), 30 casos de la forma mucosa (0,4%) y 27 casos de la forma visceral (0,3%). El incremento en los casos se debe principalmente a los siguientes factores: **1)** conflictos sociales internos, que generan desplazamientos de grupos de población a zonas endémicas donde adquieren la infección; también inciden los desplazamientos de zonas endémicas a áreas donde se encuentran los insectos vectores, estableciéndose nuevos focos de transmisión, al actuar el hombre y los animales domésticos como reservorios. Grupos móviles como soldados y ejércitos irregulares son las poblaciones con mayor incidencia de leishmaniosis en el país; **2)** los cultivos ilícitos que se llevan a cabo en áreas selváticas donde hay alta transmisión de la enfermedad; **3)** el proceso de domiciliación y urbanización de la enfermedad al adaptarse los vectores a las nuevas condiciones ecológicas, posiblemente como consecuencia del cambio climático; **4)** la deficiente atención en salud a las personas que viven en regiones rurales apartadas de los centros urbanos; **5)** y finalmente, la creciente resistencia o baja efectividad de las drogas utilizadas (Leandro y Campino, 2003; Oullette et al., 2002).

Los departamentos colombianos que registran mayor número de casos son: Antioquia —en su

mayoría procedentes de los municipios de Carepa, Turbo, Valdivia, Anorí e Ituango—, Santander —Cimitarra, El Carmen de Chucurí, Landazuri y El Playón—, Caquetá —San Vicente del Caguán y Cartagena del Chairá—, Tolima —Chaparral, San Antonio y Ortega—, y Nariño —Tumaco, Barbacoas y Samaniego— (Ministerio de Salud, 2005).

Por su parte, la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, causada por *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, representa un problema de salud pública en muchos países del continente americano y es la primera causa de lesiones cardíacas en adultos jóvenes. En Colombia, se calcula que 900.000 personas están infectadas y 3 millones en riesgo de contraer la infección (Moncayo, 2003). A pesar del conocimiento de la bioquímica y fisiología del parásito, el tratamiento de las infecciones producidas por el *T. cruzi* es considerado como uno de los más insatisfactorios y los avances en la quimioterapia para controlar la enfermedad de Chagas han sido muy pocos.

En la búsqueda de alternativas terapéuticas a esta problemática de salud se plantea el uso de las plantas, pues éstas han sido de gran importancia para el hombre a través de los tiempos; además, algunas de ellas se emplean en la medicina tradicional contra la leishmaniosis (Kayser et al., 2003, Rocha et al., 2005). Colombia cuenta con una gran diversidad en especies vegetales, que constituyen una fuente de productos naturales que pueden ser utilizados tanto en el tratamiento de las enfermedades parasitarias como para otras patologías. Por tal razón se emprendió un estudio sistemático para detectar extractos de plantas con actividad leishmanicida y tripanocida, a partir del conocimiento tradicional acoplado con ensayos experimentales bioguiados y perfiles analíticos de la composición de los extractos (Cardona et al., 2005); eventualmente se hizo la elucidación estructural de una sustancia obtenida durante los procesos de refinación. En este trabajo se reportan los resultados encontrados con cinco

especies de plantas que se emplean en diferentes partes de Colombia para tratar las lesiones cutáneas de la leishmaniosis.

Por otra parte, la disponibilidad de material vegetal puede llegar a ser una limitante para realizar estudios químicos y farmacológicos más profundos; debido a esto se emprendió una aproximación hacia la posibilidad de replicar la planta más promisoría mediante cultivo de tejidos (Vanisree et al., 2004).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colección de material vegetal.** La subespecie *Vismia baccifera* subsp. *ferruginea* (Kunth) fue colectada en diferentes municipios del departamento de Antioquia (Colombia): Puerto Berrío (planta estéril), San Roque (Corregimiento San José del Nus, planta en estado de floración), Cisneros (planta estéril) y Jericó (planta con frutos). Ejemplares de esta especie se encuentran en el herbario de la Universidad de Antioquia (HUA), Medellín (Antioquia), Colombia, bajo los números de colección F.J.R 3945, 3985 y 3987 respectivamente; del material colectado en Jericó no se tiene ejemplar en el herbario.

Material colombiano de las especies *Piper arieianum* C. DC., y *P. subpedale* Trel. y Yunck., fue obtenido en Puerto Berrío (Antioquia); de *Acacia farnesiana* (L.) Willd en Santa Fe de Antioquia; y del musgo *Sphagnum recurvum* P. Beauv., en San Antonio del Tequendama en Cundinamarca. Ejemplares de las especies de plantas superiores, se encuentran en el HUA, con los números F.J.R. 3941, F.J.R. 3942 y R.F. 7324, respectivamente. El del musgo en el herbario del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, con el número CIO 3753.

Algunas de estas plantas ya han sido sometidas a un estudio fitoquímico preliminar por otros autores (Baas et al., 2000; Delle Monache et al., 1979; El Sissi et al., 1973; Green et al., 1999; Politi et al., 2004; Sahu et al., 1997; Seigler et al., 1979) y han

sido seleccionadas para este trabajo exclusivamente por criterios etnobotánicos.

**Extracción y fraccionamiento.** Las hojas o los tallos de las plantas colectadas se picaron y extrajeron con etanol, seguido de filtración y evaporación del solvente a sequedad. El extracto se lavó con una mezcla triple que contenía hexano, diclorometano y metanol en proporción 2:1:1; la parte insoluble se disolvió en metanol. Posteriormente, se hizo un fraccionamiento de los extractos solubles en metanol en columnas de sílica gel eluidas con mezclas de solventes de polaridad creciente y de los solubles en mezcla triple, en columnas de Sephadex eluidas con mezcla triple, finalizando con metanol.

Con el espécimen de *V. baccifera* subsp. *ferruginea* (colectada en Puerto Berrío), en el extracto soluble en mezcla triple, luego del proceso de secado se encontró que parte de este ya no era soluble en la mezcla, por lo que se denominó insoluble en mezcla triple y para el fraccionamiento de esta partición, se utilizó una columna de Sephadex eluida con metanol.

En los diferentes fraccionamientos se hicieron monitoreos por cromatografía de capa fina (ccf) para cada fracción y para fracciones que se tornaban interesantes, se tomaron espectros de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) en  $\text{CDCl}_3$  o en MeOD, utilizando un equipo Bruker AMX 300 MHz para  $^1\text{H}$  y 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) son expresados en ppm y son reportados relativos al TMS con constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz.

**Ensayos de actividad biológica.** Los ensayos de citotoxicidad y de actividad leishmanicida in vitro se realizaron en cooperación con el Programa para el Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET). La actividad citotóxica de extractos o fracciones fue evaluada en células promonocíticas humanas U937, utilizando el micrométodo enzimático MTT. La actividad leishmanicida fue evaluada en amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* Lainson y Shaw (MHOM/CO/87/UA/

UA140) de acuerdo a protocolos previamente descritos por Weniger et al. (2001). Los criterios de selección a tener en cuenta en la evaluación fueron:  $CL_{50}$  a una concentración superior a 50  $\mu\text{g/ml}$  y un porcentaje de inhibición en amastigotes mayor del 50% a la misma concentración; este criterio surgió después de evaluar los resultados preliminares del proyecto de investigación “*Búsqueda de antiparasitarios de la flora colombiana Leishmaniosis y Chagas*”, del cual derivó este manuscrito. Específicamente se detectó que el Índice de selectividad (IS) no era el parámetro de selección más adecuado ya que un buen IS se puede obtener por bajas toxicidades y altas actividades (p. e.  $CL_{50}$  1.000  $\mu\text{g/ml}$  y  $CL_{50}$  200  $\mu\text{g/ml}$ ) o al contrario.

Los ensayos sobre promastigotes fueron realizados en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (U. M. S. A., Bolivia) con las cepas PH8 (*L. amazonensis*), M2903 (*L. braziliensis*) y PP75 (*L. donovani*) bajo los protocolos establecidos por esta institución (Giménez et al., 2004). En este mismo sitio se realizaron los ensayos de actividad tripanocida (Del Olmo et al., 2001), aunque los ensayos de las fracciones MF2 y MF3 de *V. baccifera* fueron hechos en el Laboratorio de Chagas de la Universidad de Antioquia con la cepa HA de *T. cruzi*, aislada de humano.

**Cultivo de tejidos vegetales.** Para el cultivo de tejidos vegetales se colectaron estacas de la especie *V. baccifera* subsp. *ferruginea* en el municipio de San Roque (Corregimiento San José del Nus), las cuales fueron transportadas al vivero envueltas en papel periódico rociado con fungicida; posteriormente se sembraron en tierra y se humedecieron diariamente. A los 15 días de sembradas se obtuvieron brotes y a los 30 días se colectaron para el cultivo in vitro; los brotes se sumergieron en una solución de 150 ppm de Benlate y luego en una solución de Lark Sanitizer 0,5% y finalmente en hipoclorito de sodio al 2% con una gota de Tween 80 por cada 100 ml. En cada solución permanecieron por espacio de 20 minutos, enjuagándose con agua destilada estéril

después de cada desinfección. El periodo de incubación entre cada siembra fue de un mes.

El medio utilizado inicialmente para la siembra fue el medio basal de Murashige y Skoog (MS), suplementado con 0,5 mg de piridoxina, 0,5 mg de ácido nicotínico, 2,0 mg de glicina, 100 mg de mio-inositol, 0,2 mg de tiamina y 20 g de sacarosa por cada litro. Para las hojas además se adicionaron 0,5 mg de ácido indolbutírico (IBA), 2,0 mg de bencilaminopurina (BAP), mientras que para las yemas se adicionaron 0,5 mg de BAP y 0,5 mg de ácido naftalenacético (ANA). Finalmente, se ajustó el pH a 5,8 y se agregaron 1,7 g de fitagel. La temperatura promedio de incubación fue de 22 °C, con fotoperíodo de 12:12 horas de luz y oscuridad. Al mes, los explantes se sembraron en el mismo medio modificándose algunas condiciones, así: algunos explantes de hojas se mantuvieron en completa oscuridad a 22 o a 25 °C, mientras que otros permanecieron con fotoperíodo a 22 °C. Las yemas continuaron bajo las mismas condiciones.

Para el cambio de medio al final del periodo de incubación se cambiaron los reguladores de crecimiento utilizando 1,0 mg de ANA, ácido indolacético (AIA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para los explantes de hojas y para las yemas 0,5 mg de ácido giberélico ( $GA_3$ ) y 0,5 mg de BAP; además se le adicionó al medio 50 mg de ácido cítrico y 50 mg de ácido ascórbico, para evitar oxidación. Los explantes de hojas se dejaron a 25 °C, en oscuridad, mientras que las yemas permanecieron a 22 °C con fotoperíodo.

Posteriormente, se aumentó la concentración de sacarosa en el medio a 30 g. Para los explantes de hojas se incrementó el 2,4-D a 4,0 mg y para los de yemas se adicionaron 0,05 mg de ANA y 0,5 mg de AIA. La incubación para las hojas continuó igual y para las yemas se aumentó la temperatura a 25 °C. La última siembra se realizó en estos mismos medios cambiando solo la temperatura de incubación de las yemas a 28 °C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Actividad sobre promastigotes y amastigotes de *Leishmania*.** En una primera aproximación se realizaron ensayos de activi-

dad sobre promastigotes de varias especies de *Leishmania* con los extractos así como con el epoxicinámico, una sustancia pura aislada de *Vismia* (tabla 1).

**Tabla 1.** Actividad antiparasitaria sobre promastigotes de *Leishmania amazonensis* (PH8), *L. braziliensis* (M2903) y *L. donovani* (PP75) (\* MT = soluble en mezcla triple; M = soluble en metanol; F4 y F7 = fracción 4 y 7 del extracto insoluble en mezcla triple; \*\* = inactivo a 100 µg/ml)

Especies	Muestra*	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
		CL <sub>50</sub> (µg/ml)	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	CL <sub>50</sub> (µg/ml)
<i>P. arieianum</i>	hojas MT	25,0	19,4	25,0
	hojas M	47,7	55,5	52,8
<i>V. baccifera</i> San José del Nus	hojas MT	37,5	44,2	52,5
	epoxicinámico	55,2	47,7	50,5
<i>V. baccifera</i> Puerto Berrío	hojas MT	58,9	61,6	61,6
	hojas MF4	Inactivo	Inactivo	** Inactivo
	hojas MF7	42,9	62,5	71,7
	epoxicinámico	55,5	48,9	43,9
Anfotericina		0,2	0,2	0,2
Pentamidina		10,0	10,0	10,0

El extracto soluble en mezcla triple de *P. arieianum* presenta los mejores resultados con una CL<sub>50</sub> a una concentración de 25,0 µg/ml para la cepas de *L. amazonensis* y *L. donovani* y de 19,4 µg/ml para la cepa de *L. braziliensis*.

En cuanto a las muestras evaluadas de *V. baccifera*, los extractos de hojas en mezcla triple de San José del Nus y de Puerto Berrío, tienen diferencias en la concentración requerida para inhibir el 50% de los parásitos, siendo más efectivo el extracto de San José del Nus. Lo anterior demuestra que el sitio de recolección, la época del año y el estado de desarrollo de la planta influye en la composición de los metabolitos. Por otro lado, la fracción 4 del extracto insoluble en mezcla triple de hojas recolectadas en Puerto Berrío no presentó actividad, aunque como se verá más adelante si fue muy activa contra amastigotes de *L. (V.) panamensis*, sugiriendo una

pobre correlación de la sensibilidad a compuestos observada en promastigotes y amastigotes. Los medicamentos de referencia, anfotericina y pentamidina (0,2 y 10 µg/ml), tienen resultados positivos dentro del criterio establecido de selección.

Para conocer el potencial de un extracto o fracción sobre amastigotes de *L. panamensis* los criterios de selección a tener en cuenta fueron: una CL<sub>50</sub> > 50,0 µg/ml y un porcentaje de inhibición > 50,0% a la misma concentración; de esta manera se logra un equilibrio entre lo posiblemente tóxico y lo activo. Con estos criterios, los extractos que presenten citotoxicidad a una concentración < 50,0 µg/ml y buena actividad contra amastigotes no deben ser descartados como posibles candidatos antiparasitarios, ya que posiblemente al hacer el fraccionamiento pueda separarse la fracción o sustancia tóxica de la parte activa o atóxica u obtener

compuestos que siendo tóxicos puedan ser utilizados como plantillas para desarrollar moléculas activas, utilizando modelación molecular y/o síntesis

orgánica (Cardona et al., 2005). La tabla 2 muestra los resultados encontrados en las cinco especies de plantas estudiadas.

**Tabla 2.** Citotoxicidad contra células U937 y actividad leishmanicida en amastigotes intracelulares de *Leishmania (V.) panamensis* (\*MT = soluble en mezcla triple; M = soluble en metanol, EtOH: soluble en etanol, F = fracción del extracto insoluble en mezcla triple; \*\*Máxima concentración evaluada a: a = 50,0 µg/ml; b = 15,0 µg/ml; c = 25,0 µg/ml; d = 35,0 µg/ml; \*\*\* colectada en Puerto Berrío (Antioquia), Colombia, las fracciones 1, 5 y 6 no fueron evaluadas, la primera debido a que en la ccf indica solamente carotenos y lípidos, las demás por la poca cantidad obtenida en el fraccionamiento)

Especie	Extracto o fracción*	Citotoxicidad CL <sub>50</sub> (µg/ml)	% de inhibición**
<i>Acacia farnesiana</i>	hojas MT	120,8	45,0 <sup>a</sup>
	hojas M	154,6	43,8 <sup>a</sup>
<i>Piper arieianum</i>	hojas MT	<b>40,8</b>	<b>80,8</b> <sup>a</sup>
	hojas M	42,6	<b>67,9</b> <sup>a</sup>
	tallos MT	42,4	21,4 <sup>a</sup>
	tallos M	15,9	<b>42,6</b> <sup>b</sup>
	inflorescencia EtOH	<b>25,3</b>	<b>58,0</b> <sup>c</sup>
<i>Piper subpedale</i>	hojas MT	86,4	32,9 <sup>a</sup>
	hojas M	179,2	13,8 <sup>a</sup>
	tallos MT	50,0	20,9 <sup>a</sup>
	tallos M	161,4	33,0 <sup>a</sup>
	inflorescencia EtOH	<b>54,2</b>	<b>56,5</b> <sup>c</sup>
<i>Sphagnum recurvum</i>	MT	<b>33,9</b>	<b>68,6</b> <sup>d</sup>
	M	75,6	35,7 <sup>a</sup>
<i>Vismia baccifera</i> subsp. <i>ferruginea</i> ***	hojas MT	<b>21,9</b>	<b>70,2</b> <sup>a</sup>
	hojas insoluble MT	<b>254,1</b>	<b>64,0</b> <sup>a</sup>
	hojas M	623	24,5 <sup>a</sup>
<i>Vismia baccifera</i> subsp. <i>ferruginea</i> ** (fracciones del insoluble en mezcla triple)	hojas MF2	102,4	20,8 <sup>a</sup>
	hojas MF3	55,7	29,6 <sup>a</sup>
	hojas MF4	<b>754,0</b>	<b>84,6</b> <sup>a</sup>
	hojas MF7	<b>71,7</b>	<b>60,3</b> <sup>a</sup>

Los extractos de hojas de *Piper arieianum* poseen una CL<sub>50</sub> a una concentración de 40,8 y de 42,6 µg/ml, que esta cercana al límite establecido de 50,0 µg/ml. Los tallos e inflorescencias tienen también una buena actividad si se considera que se analizaron concentraciones de solo 15,9 y 25,3 µg/ml. Esto plantea la posibilidad de hacer otros fraccionamientos para determinar si la molécula

citotóxica es la misma molécula con propiedad leishmanicida.

Los extractos metanólicos de hojas y tallos de *P. subpedale* son poco activos y carecen de toxicidad, mientras que el de la inflorescencia se considera promisorio; los de *A. farnesiana* son poco citotóxicos y tienen una actividad muy reducida; la

parte soluble en mezcla triple de *S. recurvum* exhibe una mediana actividad pero también una toxicidad relativamente alta.

Comparando los diferentes extractos los mejores resultados provienen del extracto de hojas *V. baccifera* subsp. *ferruginea* insoluble en mezcla triple y al observar las diferentes fracciones obtenidas de este mismo extracto, la fracción 4 y 7 fueron las más efectivas. En este caso, el epoxicinámico no fue evaluado por la poca cantidad de sustancia disponible.

**Actividad sobre epimastigotes de *T. cruzi*.** Para determinar la actividad tripanocida in vitro, solo se tuvo en cuenta como criterio a tener en cuenta una  $CL_{50} < 50,0 \mu\text{g/ml}$ . De acuerdo a esto la muestra que presentó una mayor efectividad fue la fracción 7 del extracto metanólico de hojas de *V. baccifera* subsp. *ferruginea* colectada en Puerto Berrío (tabla 3), siendo este un valor muy bajo con respecto a los obtenidos con las otras muestras estudiadas y a la vez cercano al valor presentado por la pentamidina,  $10 \mu\text{g/ml}$ . El extracto crudo soluble en mezcla triple de la misma planta, presentó una buena actividad, siendo su  $CL_{50}$  de  $40 \mu\text{g/ml}$ .

**Tabla 3.** Actividad tripanocida sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (\*MT = soluble en mezcla triple; M = soluble en metanol; F = fracción del extracto insoluble en mezcla triple)

Especie	Muestra*	<i>T. cruzi</i> $CL_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>P. arieianum</i>	hojas MT	47,2
	hojas M	58,3
<i>V. baccifera</i> subsp. <i>ferruginea</i> Puerto Berrío	hojas MT	40,1
	hojas MF2	400,5
	hojas MF3	579,2
	hojas MF4	101,0
	hojas MF7	19,7
<i>V. baccifera</i> subsp. <i>ferruginea</i> San José del Nus	hojas MT	61,8
	epoxicinámico	53,3
Anfotericina		0,2
Pentamidina		10,0

Nuevamente se aprecia diferencia entre las actividades de los extractos de hojas en mezcla triple de *V. baccifera* subsp. *ferruginea* colectada en Puerto Berrío y San José del Nus, mostrando actividades a  $40,1$  y  $61,8 \mu\text{g/ml}$  respectivamente. El extracto crudo de *P. arieianum* soluble en mezcla triple y el compuesto naranja de la *V. baccifera* subsp. *ferruginea* de San José del Nus ( $47,2$  y  $53,3 \mu\text{g/ml}$ ), presentaron una actividad mediana cercana al límite establecido. Fueron inactivas las fracciones 2 y 3 del extracto de hojas insoluble en mezcla triple y el derivado del ácido cinámico de *V. baccifera* subsp. *ferruginea* de Puerto Berrío.

Los resultados encontrados en todos los ensayos se resumen así. La fracción 7 de hojas metanol de *V. baccifera* subsp. *ferruginea*, presenta un buen porcentaje de inhibición (60,3%) en amastigotes de *L. panamensis*, buena actividad contra promastigotes de *L. amazonensis* ( $CL_{50}$  a  $42,9 \mu\text{g/ml}$ ) y baja actividad para *L. braziliensis* y *L. donovani* y tiene una muy buena actividad contra epimastigotes de *T. cruzi* ( $CL_{50}$  a  $19,7 \mu\text{g/ml}$ ). La fracción metanólica de hojas de *V. baccifera* subsp. *ferruginea* fue la más activa contra amastigotes de *L. panamensis* (84,6%) e inactiva contra los

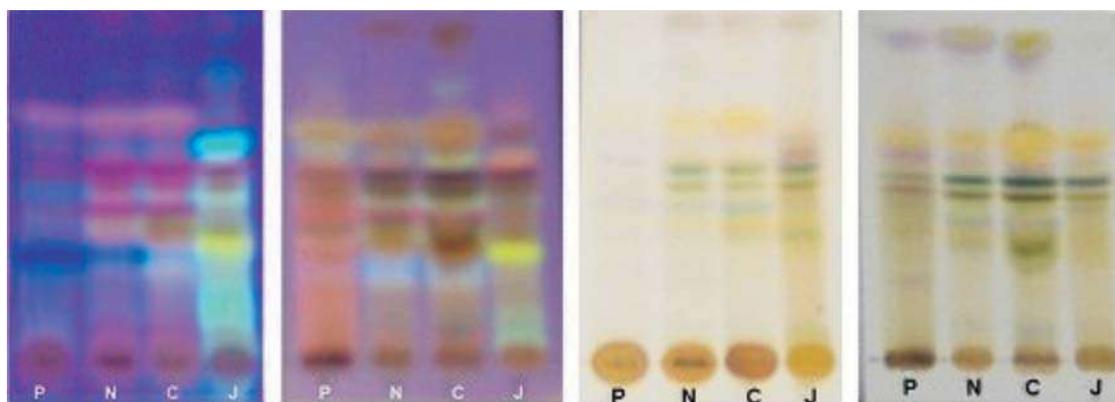
promastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* y epimastigotes de *T. cruzi*. El extracto de hojas mezcla triple de *P. arieianum* presentó un alto porcentaje de inhibición contra amastigotes de *L. panamensis* (80,8%) y buena actividad contra los promastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. donovani* ( $CL_{50}$  a 25,0, 19,4 y 25,0  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) y una actividad marginal contra epimastigotes de *T. cruzi* (47,2  $\mu\text{g/ml}$ ). El extracto metanólicos de hojas de *P. arieianum* presentó un buen porcentaje de inhibición contra amastigotes de *L. panamensis* (67,9%), pero una mediana actividad en los otros ensayos.

De otro lado el epoxicinámico solo tiene una actividad marginal contra epimastigotes de *T. cruzi*.

**Análisis estructural.** Los extractos ensayados en su actividad leishmanicida fueron sometidos a un análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para detectar la clase de compuestos presentes, así, los extractos de las especies de *Piper*

muestran señales principalmente para compuestos tipo prenil benzoato. Aunque la literatura reporta la presencia de antranoides en *Vismia baccifera* (Hussein et al., 2003; Delle Monache, 1979), los espectros de RMN del espécimen colectado en Puerto Berrío muestran xantonas, vismionas y posiblemente benzofenonas, uno de los cuales posee un metileno exocíclico.

No obstante al tratar de encontrar más material para otros fraccionamientos se observó que algunos especímenes de *V. baccifera* subsp. *ferruginea* tienen una composición química muy diversa, dependiendo de su origen, según se desprende de sus perfiles cromatográficos. La ccf de las particiones en metanol y de la parte soluble en mezcla triple de los ejemplares colectados en Puerto Berrío, San José del Nus, Cisneros y Jericó indica que los extractos de las *Vismia* de San José del Nus y Cisneros son similares, excepto por un compuesto de fluorescencia azul de  $R_f = 0,3$ , y ambos a su vez son muy diferentes de las plantas colectadas en Puerto Berrío y Jericó (figura 1).



**Figura 1.** Cromatografía de capa fina (ccf) al UV (izquierda) y placas después de reveladas (derecha) de extractos de *Vismia baccifera* de diferentes sitios. Partición en metanol (placas 1 y 3, siendo en ambas la muestra de Puerto Berrío sembrada, la parte del extracto insoluble en mezcla triple que se disolvió en metanol) y soluble en mezcla triple (placas 2 y 4). (P = Puerto Berrío; N = San José del Nus; C = Cisneros; J = Jericó)

**Estructura de un derivado del ácido cinámico.** Del extracto de *V. baccifera* subsp. *ferruginea* (Puerto Berrío) soluble en la mezcla triple se aisló un compuesto como agujas de color naranja, cuya

estructura se elucidó por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y 2D. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN muestra las siguientes señales:  $\delta$  3,06 (d ancho, H-1),  $\delta$  3,85, (dd,  $J = 3,6$  Hz y 7,0 Hz, H-2a),  $\delta$  4,22 (dd,  $J = 12,3$ , Hz y 7,0 Hz,

H-2a),  $\delta$  4,70 (d,  $J=3,6$  Hz, H-3), 5,94 (s, H-1''),  $\delta$  6,76 (m, H-2', H5'),  $\delta$  6,84 (s, H-6'); el experimento JMOD muestra los siguientes tipos de átomos de carbono:

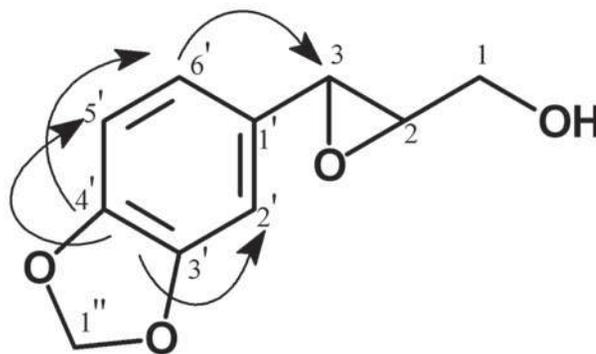
- Cinco metinos en  $\delta$  54,7 (C-2), 86,2 (C-3), 106,9 (C-2'), 108,6 (C-5') y 119,8 (C-6'); estas dos últimas señales forman parte del multiplete en  $\delta$  6,76, de un sistema aromático, de acuerdo al HMQC.
- Dos metilenos en  $\delta$  72,1 (C-1) y  $\delta$  101,5 (C-1''); según el experimento HMQC la última señal correlaciona con el singlete en  $\delta$  5,94, que se asigna a un grupo metilendioxi.
- Tres carbonos cuaternarios en  $\delta$  135,4 (C-1'),  $\delta$  147,5 (C-3') y  $\delta$  148,4 (C-4').

El experimento COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  indica acoplamiento entre la señal de  $\delta$  4,70 con la de  $\delta$  3,06 y a su vez está con las otras dos señales en  $\delta$  3,85 y a 4,22, que se encuentran mutuamente acopladas.

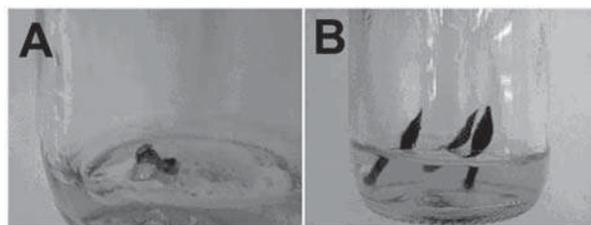
Con los datos anteriores se puede proponer una fórmula  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ , indicando así seis insaturaciones en la molécula, de las cuales cuatro corresponden al sistema aromático y una al metilendioxi; la otra insaturación entonces debe involucrar a los dos metinos oxigenados por lo cual se deduce la presencia de un grupo epóxido en la molécula. La estructura final se asignó mediante el experimento HMBC (figura 2); así las dos señales en  $\delta$  147,5 y  $\delta$  148,4 (carbonos aromáticos oxigenados) muestran correlaciones a larga distancia con los tres protones aromáticos, mientras que el metino en  $\delta$  119,8 tiene correlaciones a larga distancia con el doblete en  $\delta$  4,70 (figura 2). Esta molécula ha sido reportada en *Artemisia vulgaris* (Tigno et al., 2000).

**Cultivo de tejidos.** Debido a los buenos niveles de actividad de los extractos de *Vismia* y a la posibilidad de que se requiera el suplemento de material para ensayos más avanzados, se

analizaron varias condiciones para tratar de producir material por cultivo de tejidos. Por esta razón solamente se estudiaron algunas condiciones de reproducción, más no las de producción de metabolitos, que se espera estandarizar en otra fase. Este aspecto cobra importancia si además se tiene en cuenta que existe una variabilidad química de las especies colectadas en varios sitios. La evolución de los experimentos se siguió durante cinco meses; al final del segundo mes se observó la formación de callos en los explantes de hojas en los cultivos que se encontraban en oscuridad. Hubo un crecimiento mayor en los callos que se mantuvieron a 25 °C. En vista de que se presentó fenolización, se adicionó al medio ácido cítrico y ácido ascórbico; además se hicieron cambios en los reguladores de crecimiento, pero a pesar de estos cambios el crecimiento observado fue muy lento. Para las yemas no se observó crecimiento en este tipo de cultivos a pesar de las modificaciones realizadas (figura 3).



**Figura 2.** Estructura de un derivado epoxicinámico aislado de *V. baccifera ferruginea* y correlaciones HMBC



**Figura 3.** Cultivo de tejidos de *V. baccifera* subsp. *ferruginea*, callo (A) y yemas (B)

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El número de plantas estudiadas contra enfermedades parasitarias como la leishmaniosis y la tripanosomiosis, crece considerablemente a diario; no obstante no se obtienen resultados tangibles que sean fácilmente apropiables por la sociedad. Una de las razones para este hecho es la búsqueda de novedad estructural como forma de aseguramiento de un mecanismo de protección a la propiedad intelectual; de esta manera se desechan muchas sustancias conocidas aunque potencialmente útiles. De otro lado, las metodologías de trabajo se enfocan más hacia el aislamiento de metabolitos que hacia la detección de una actividad específica y por tal razón los presupuestos y los tiempos de investigación se incrementan desmesuradamente.

Los futuros procedimientos de aislamiento y purificación bioguiados tendientes a identificar las moléculas bioactivas serán facilitados en gran medida por los perfiles de RMN, que permiten definir la presencia de núcleos conocidos de metabolitos secundarios.

Por otro lado, además debe evaluarse con precaución la correlación de los nombres científicos con los nombres vulgares que se le asignan a las plantas en determinadas regiones y además, la extrapolación de sus usos etnomédicos: el *Carate* puede ser una especie de *Vismia* pero en otra región puede corresponder a una planta de la familia

Euforbiaceae. También debe tenerse en cuenta la parte de la planta que se utiliza en la medicina tradicional, la época de recolección del material, la forma de aplicación (infusión, emplasto, etc.) y la influencia de factores ambientales —ecológicos, climáticos, geomorfológicos y edáficos—, en la producción de metabolitos secundarios. Es posible que esta variabilidad en los nombres y en la composición química sea la causante de que muchas veces los ensayos in vitro no confirmen la actividad para la cual se usa corrientemente la planta.

Finalmente, se comprueba que efectivamente en la biodiversidad colombiana hay plantas que tienen actividad leishmanicida y tripanocida; además los resultados de esta investigación pueden ser punto de partida para buscar las moléculas responsables de dicha acción y elucidar y modificar su estructura para obtener sustancias que eventualmente puedan ser desarrollados para la farmacoterapia antiprotozoaria humana.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia y a COLCIENCIAS por el apoyo financiero; a Aída Hurtado y a los profesores Tatiana Lobo y Rodrigo Hoyos de la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín) y Clara Orozco de la Universidad Nacional (sede Bogotá). Al Dr. Alberto Giménez del Instituto de Investigaciones Farmacobiológicas (La Paz, Bolivia).

## REFERENCIAS

- Baas M, Pancost RD, van Geel B, Sinnighe-Damsté JS.** 2000. A comparative study of lipids in *Sphagnum* species. *Organic Geochemistry*, 31:535-541.
- Cardona D, Quíñones W, Torres F, Vélez ID, Robledo S, Fonnegra R, Triana O, Upegui-González L, Orozco C, Torrenegra R, Echeverri F.** 2005. Búsqueda de sustancias antiparasitarias de la flora colombiana. *Actualidades Biológicas*, 27(Suplemento 1):65-69.

- Desjeux P.** 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27:305-318.
- De Almeida MC, Vilhena II V, Barral A, Barral-Netto M.** 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98:861-870.

- Del Olmo E, García M, López-Pérez J, Ruiz G, Vargas F, Giménez A, Dehrod E, San Feliciano A.** 2001. Anti-Trypanosoma activity of some natural stilbenoids and synthetic related heterocyclic compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11:2755-2757.
- Delle Monache F, Marquina M, Ferrari F, Marini-Bettolo GB.** 1979. Ferruginin A and B and ferruanthrone, new triphenylated anthranoids from *Vismia baccifera* var. *ferruginea*. *Tetrahedron*, 35:2143-2149.
- El Sissi H, El Ansari M, El Negoumy S.** 1973. Phenolics of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, 12:2303.
- Giménez A, Gupta M, Deharo E (eds.).** 2004. *Manual de técnicas de laboratorio para la evaluación de sustancias tripanocidas y leishmanicidas*. Editorial Prisa. La Paz, Bolivia.
- Green T, Treadwell E, Wiemer D.** 1999. Arieianal, a prenylated benzoic acid from *Piper arieianum*. *Journal of Natural Products*, 62:367-368.
- Hussein AA, Bozzi B, Correa M, Capson T, Kursar TL, Coley PD, Solis PN, Gupta MP.** 2003. Bioactive constituents from three *Vismia* species. *Journal of Natural Products*, 66:858-860.
- Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL.** 2003. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, 90:S55-S62.
- Leandro C, Campino L.** 2003. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22:352-357.
- Ministerio de Salud.** 2005. Informe leishmaniasis I semestre de 2005. SIVIGILA Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública. República de Colombia. <[http://www.ins.gov.co/pdf/vcs\\_p/informe\\_leishmaniasis\\_1sem\\_2005.pdf](http://www.ins.gov.co/pdf/vcs_p/informe_leishmaniasis_1sem_2005.pdf)>. Fecha de consulta: 21 de agosto de 2006.
- Moncayo A.** 2003. Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98:577-591.
- Ouellette M, Drummel-Smith J, El Fadili A, Christoph K, Richard D.** 2002. Pterin transport and metabolism in *Leishmania* and related trypanosomatid parasites. *International Journal for Parasitology*, 32:385-398.
- Rocha L, Almeida J, Macêdo R, Barbosa-Filho J.** 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, 12:514-535.
- Sahu N, Koike K, Banerjee A, Jia Z, Nikaido T.** 1997. A novel diterpene glycoside from the seed of *Acacia farnesiana*. *Tetrahedron*, 38:8405-8408.
- Seigler D, Conn E, Dunn J, Janzen D.** 1979. Cyanogenesis in *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, 18:1389-1390.
- Tigno X, de Guzman F, Flora A.** 2000. Phytochemical analysis and hemodynamic action of *Artemisia vulgaris* L. *Clinical Hemorheology*, 23:167-175.
- Vanisree M, Lee Ch, Lo S, Nalawade S, Lin Ch, Tsay H.** 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 45:1-22.
- Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Muñoz V, Callapa J, Lobstein A, Anton R.** 2001. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 78(2):193-200.

