

METABOLITOS SECUNDARIOS Y EFECTOS ANTIVIRALES DE ALGUNAS ESPECIES DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE

RESUMEN

Extractos de especies de la familia Euphorbiaceae fueron sometidos a evaluación de su actividad antiviral frente al virus de la influenza A/PR/8/34 y rhinovirus humano 14(1059). La fracción metanólica del látex de *Codiaeum variegatum* mostró ser altamente activa y no citotóxica frente al primero de ellos; de esta planta se aisló un glicósido cianogénico. De otro lado del látex de *Euphorbia tirucalli* se aisló un triterpeno, que presentó actividad frente a rhinovirus. Las estructuras de los compuestos fueron establecidas por espectroscopia de RMN (HMQC, HMBC y COSY) y aspectos biogénicos.

PALABRAS CLAVES: Euphorbiaceae, actividad antiviral, *Euphorbia tirucalli*, *Codiaeum variegatum*.

ABSTRACT

Extracts from several species of the Euphorbiaceae family were evaluated as antiviral against influenza A/PR/8/34 and human rhinovirus 14(1059). The methanolic extract from *Codiaeum variegatum* latex showed to be highly active and non cytotoxic to the former virus; a cyanogenic glycoside was isolated from this plant. In the other hands from the *Euphorbia tirucalli* latex, a triterpene was isolated; it displayed biological activity against rhinovirus. Compound structures were established through NMR spectroscopy (HMQC, HMBC y COSY) and biogenetic considerations.

KEYWORDS: Euphorbiaceae, antiviral activity, *Euphorbia tirucalli*, *Codiaeum variegatum*

PAULA TABARES

Química Industrial.
Estudiante Doctorado en Química
Universidad de Antioquia
paulita117@yahoo.com

LILIANA AVILA

Bióloga
Estudiante Maestría en Biología
Universidad de Antioquia
lilianaavila10@yahoo.es

FERNANDO TORRES

Ph.D. Ciencias Químicas
Universidad de Antioquia
ltorres@matematicas.udea.edu.co

DIANA CARDONA

Ph.D. Ciencias Químicas
Universidad de Antioquia
dpcardonas@yahoo.com

WINSTON QUIÑONES

Ph.D. Ciencias Químicas
Universidad de Antioquia
wquinone@quimbaya.udea.edu.co

JORGE E. FORERO

MSc. Ciencias Básicas Biomédicas
Investigador Asociado
Universidad de Antioquia
jforeroduarte@gmail.com

MARIA TERESA RUGELES

Ph.D. Inmunología
Universidad de Antioquia
mtrugel@quimbaya.udea.edu.co

FERNANDO ECHEVERRI

Ph.D. Ciencias Químicas
Universidad de Antioquia
echeveri@quimbaya.udea.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

La familia Euphorbiaceae ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional y varios de sus compuestos han sido reportados por su actividad antiviral reguladora del ciclo celular y de las funciones celulares [1,2]; una de estas moléculas, Prostratin tiene efecto sobre formas latentes del virus HIV [3,4]. Colombia dentro de su biodiversidad es rica en especies de esta familia, por lo

cual se ha emprendido un proyecto para detectar extractos con propiedades antivirales, citotóxicas e inmunomoduladoras, como nuevas alternativas farmacológicas contra infecciones causadas por los virus humanos, tales como influenza y rhinovirus. Para ello se realizó el tamizaje de la actividad biológica de varias fracciones de diez especies de esta familia, seleccionadas por criterios etnobotánicos y biogeográficos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

La selección y recolección del material vegetal se hizo con la asesoría del Botánico Ramiro Fonnegra z, en las granjas de la Universidad de Antioquia, ubicadas en los municipios de San Pedro de los Milagros (Hacienda La Montaña), Barbosa (Hacienda el Progreso), Porce (Hacienda la Clara) y Caucaasia (Hacienda la Candelaria); se colectaron entre 500-1000 gr (hojas, tallos, látex o y/o raíces, dependiendo de la información etnobotánica). Vouchers de estas plantas están depositadas en el Herbario de la Universidad de Antioquia. HUA.

2.2 Extracción y aislamiento

Codiaeum variegatum. El extracto metanólico del látex fue particionado con hexano-CH₂Cl₂-CH₃OH (2:1:1 v/v), fracción 1, y CH₃OH, fracción 2. Posteriormente, la fracción 2 fue particionada con hexano, CH₂Cl₂, EtOAc y CH₃OH, obteniéndose sólo dos fracciones, la primera, en diclorometano 2a, y la segunda en metanol, 2b. Las fracciones 1, 2, 2a y 2b fueron evaluadas frente al virus de la influenza como se describirá posteriormente. Todo el proceso fue monitoreado por CCF, observándose que las fracciones 2a y 2b presentaron el mismo perfil cromatográfico por lo que se unieron, dando como resultado la fracción 3. Esta se pasó por un cartucho RP-18, el cual fue eluido con H₂O, H₂O-CH₃OH (1:1 v/v) y finalmente con CH₃OH. Los lavados con agua fueron llevados a sequedad y el extracto obtenido fue analizado por RMN.

Euphorbia tirucalli. El extracto en acetona del látex fue llevado a sequedad, redissuelto en hexano-EtOAc y fraccionado por cromatografía en columna utilizando sílicagel y como fase móvil C₆H₁₄:EtOAc en polaridad creciente. Se colectaron 28 fracciones. Las fracciones 4, 5 y 6 se unieron y fueron sometidas a fraccionamiento por cromatografía en columna con sílica gel, y hexano-EtOAc (6:1 v/v) como fase móvil. El triterpeno encontrado fue posteriormente cristalizado con CH₃OH y analizado por RMN.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H y ¹³C) fueron realizados en D₂O y CDCl₃, utilizando un equipo Bruker AMX 300 MHz; se reportan los desplazamientos químicos en (δ) en ppm, con base al solvente de referencia. La determinación de los tipos de carbono presentes en las moléculas se realizó a través de los experimentos desacoplados DEPT y JMOD y las correlaciones C-H fueron obtenidas por los experimentos HMBC y HMQC.

2.3 Actividad biológica

Preparación de las diluciones a evaluar. Se diluyeron 20 mg de extracto en 500 µl de dimetilsulfóxido

(DMSO), (Sigma, St Louis MO). De esta solución se hizo una dilución 1:80 en medio esencial mínimo (MEM, Sigma, St Louis MO) suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB, Sigma, St Louis MO), obteniéndose una concentración final de 1.000 µg/ml, a partir de la cual se hicieron diluciones dobles para obtener las concentraciones a evaluar: 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 µg/ml.

Evaluación de la actividad antiviral. En platos de 96 pozos de fondo plano se sembraron 20.000 células MDCK o HeLa-H1 por pozo, resuspendidas en 100 µl de MEM suplementado con SFB al 10%; 24 horas después de incubarse a 37°C en atmósfera con CO₂, se adicionó a los pozos para actividad antiviral (AAV) y actividad citotóxica (AC) 100 µl de la dilución de cada extracto en las concentraciones a evaluar (seis pozos por cada dilución). Una hora después del tratamiento con los extractos, los pozos destinados para AAV (tres pozos por dilución) se infectaron con 100 µl de 10 DICC₅₀ de FLUAV y HRV-14 respectivamente; en los pozos en los que se evaluó la AC se adicionó 100 µl de MEM al 5% de SFB. Además cada plato contenía como controles tres pozos por cada uno de los siguientes tratamientos: 10, 1, 0.1 y 0.01 DICC₅₀ del virus (controles de infección viral), células sin infectar (controles celulares); células + DMSO (dilución 1:40 en MEM) (control de citotoxicidad de DMSO); células + 10 DICC₅₀ de virus + DMSO (1:40) (control de actividad antiviral de DMSO).

Después del tratamiento y la infección, los sobrenadantes fueron removidos de los pozos y se agregaron 28 µl de una solución de MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-bromuro difeniltetrazolio) (MP Biomédicas, Francia), a una concentración de 2mg/ml en PBS (phosphate buffer solution). Los platos fueron incubados por 2 h a 37 °C. Para disolver los cristales de MTT se adicionaron 130 µl de DMSO/pozo y los platos se agitaron en un agitador orbital (Heidolph unimax 1010) durante 15 min a 150 rpm a temperatura ambiente; Por último se leyó la densidad óptica de los pozos a una longitud de onda de 492 nm (DO₄₉₂) en un espectrofotómetro (Dynex Revelation MRX Versión 3.2 Serial # 1CX1463).

Con las DO₄₉₂ se calcularon los porcentajes de protección que tuvieron las diferentes concentraciones de los extractos de las plantas contra los virus en estudio utilizando la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de Protección} = \left[\frac{(A - B)}{C - B} \right] * 100$$

Donde **A** corresponde a la DO₄₉₂ de células tratadas infectadas, **B** a la DO₄₉₂ de células infectadas no tratadas y **C** a la DO₄₉₂ de células no tratadas – no infectadas.

Una vez determinados los porcentajes de protección de las diferentes concentraciones de extracto, se halló la concentración que protegió el 50% de las células

(Concentración inhibitoria 50%: IC₅₀), ésta se obtuvo a partir de una curva dosis respuesta, con la que se graficó una curva de tendencia, aplicando regresión lineal (concentración vs porcentajes de protección).

Ensayo de citotoxicidad por la técnica MTT. La concentración citotóxica del 50% (CC₅₀) fue obtenida a partir de las curvas de dosis respuesta correlacionando la concentración vs el porcentaje de citotoxicidad y aplicando regresión lineal; La CC₅₀ se definió como la concentración de extracto que ejerce un daño del 50% de las células tratadas. El porcentaje de citotoxicidad fue calculado así:

$$\text{Porcentaje de Citotoxicidad} = \left[\frac{(A - B)}{B} \right] * 100$$

Donde **A** es la DO₄₉₂ de células no tratadas y **B** corresponde a la DO₄₉₂ de células tratadas.

2.5 Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó por medio de regresión lineal con un 95% de confiabilidad. La CC₅₀ e IC₅₀ para cada extracto fue obtenida de la curva concentración/efecto calculada con el programa GRAPH PAD PRISM 4.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Triterpeno de *Euphorbia tirucalli*. El espectro de ¹³C RMN (CDCl₃) indica la presencia de ocho grupos metilo en la estructura (d 15.9, 16.0, 18.1, 19.3, 20.5, 24.9, 26.1 y 28.4), ver tabla 1. Igualmente, en el espectro de ¹H RMN (CDCl₃) se observaron las señales en ppm H-3 (d 3.29), H-18 (d 0.81), H-19 (d 1.03), H-21 (d 0.91), H-24 (d 5.15), H-26 (d 1.74), H-27 (d 1.66), H-28 (d 0.86) y H-30 (d 1.01). Las señales observadas indican un triterpeno cuyas propiedades espectroscópicas son similares a las del Euphol o Tirucalol, que se diferencian unicamente en la estereoquímica del C-20 [5].

C	d (ppm)	C	d (ppm)	C	d (ppm)
1	36.3	11	21.9	21	19.3
2	28.1	12	31.3	22	36.3
3	79.4	13	44.5	23	25.1
4	39.3	14	50.5	24	125.6
5	51.3	15	30.2	25	130
6	19.3	16	28.5	26	18.1
7	28.3	17	50.0	27	26.1
8	134.3	18	15.9	28	28.4
9	133.9	19	20.5	29	16.0
10	37.6	20	36.7	30	24.9

Tabla 1. ¹³C RMN deL triterpeno de *E. tirucalli*

Actividad antiviral del triterpeno de *Euphorbia tirucalli*. El triterpeno muestra actividad antiviral frente a rhinovirus a una concentración a la cual presenta muy baja citotoxicidad (IC₅₀=20.72 µg/ml, CC₅₀=91,17

µg/ml), (figura 1). Al ensayar concentraciones mas bajas se observó la disminución en la citotoxicidad pero igualmente se observa una protección significativa, obteniéndose un índice de selectividad de 4.39.

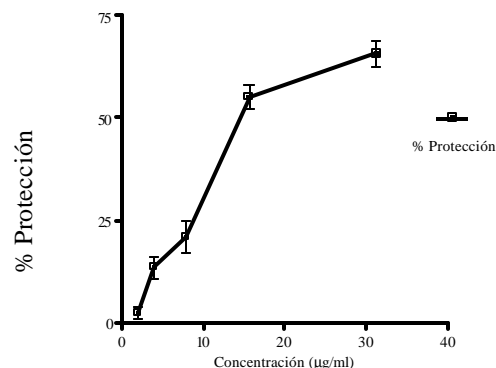


Figura 1. Efecto del triterpeno contra rhinovirus. IC₅₀ = 20.72804 µg/ml. R² = 0,8558. IS = 4.39

Glicósido cianogénico de *Codiaeum variegatum*. El espectro de ¹³C RMN (D₂O) indica claramente señales correspondientes a un glicósido: C-1' (d 102.9, anomérico), C-2' (d 74.5), C-3' (d 77.2), C-4' (d 71.1), C-5' (d 77.5), C-6' (d 62.2); además de aprecia un carbono vinílico exocíclico cuaternario (d 120, C-2), un metileno exocíclico (=CH₂, d 137,207 C-5), un carbono cuaternario (d 119.543, C-1) para un grupo nitrilo (-CN), cuya presencia fue confirmada por IR (2210-2260 cm⁻¹); finalmente también hay un grupo -CH₂ (d 70.294, C-4). En el espectro de ¹H RMN (CD₃OD) se observaron las siguientes señales: d 4.36 (1H, s, H anomérico), d 3.70 (2H, dd., H-6 glucosídico), d 4.4 (2H, dd), d 6.25 y 6,13 (1H cada uno, s, vinílicos); las señales de los demás hidrógenos glucosídicos se observaron entre d 3.2-3.5. Estas características indican una sustancia del tipo cardiospermin (figura 2); su elucidación estructural se encuentra en proceso.

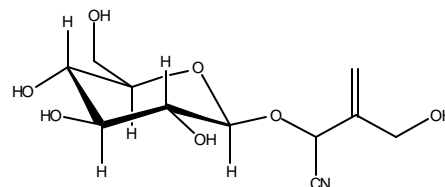


Figura 2. Estructura de Cardiospermin

Actividad antiviral de *Codiaeum variegatum*.

Las fracciones evaluadas ejercieron alteración morfológica visible al microscopio sobre las células MDCK a las concentraciones analizadas (500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.12 ug/ml). Los valores de DO₄₉₀ obtenidos por la técnica del MTT no presentan diferencias significativas entre las células tratadas no infectadas y el control celular. (Datos no mostrados). Estos resultados indican que la concentración toxica es mucho mayor que 500 µg/ml.

En la tabla 2 se presentan los resultados de la actividad antiviral evaluada en las fracciones 1, 2, 2a y 2b.

Especie	Fracción	CC ₅₀	Influenza	
		MDCK	IC ₅₀	IS
<i>Codiaeum variegatum</i>	1	230,9838	-1661,123	-0,14
	2	1019,121	192,3031	5,30
	2a	*500	133,3501	3.74
	2b	*500	175,4527	2.82

Tabla 2 Actividad antiviral de *Codiaeum variegatum*. CC₅₀, Concentración Citotóxica 50; IC₅₀, concentración Inhibitoria 50; IS, Índice de selectividad. *Concentración máxima evaluada.

La fracción 1 no presentó actividad, mientras que la 2, 2a y 2b, mostraron porcentajes de protección que alcanzaron el 100% a las concentraciones más altas; se observa una gran correlación entre la concentración y la respuesta contra el virus de la influenza (figuras 3 y 4), evidenciándose un aumento en la protección con el aumento de la dosis, sin presentar citotoxicidad. Las IC₅₀ alcanzan valores de 133,3 µg/ml y 175,4 µg/ml en las fracciones 2a y 2b respectivamente obteniendo IS de 3.74 y 2.82 que son relativamente bajos, sin embargo, estos pueden aumentar, teniendo en cuenta que dichas fracciones podrían ser tóxicas a dosis por encima de 1000 µg/ml.

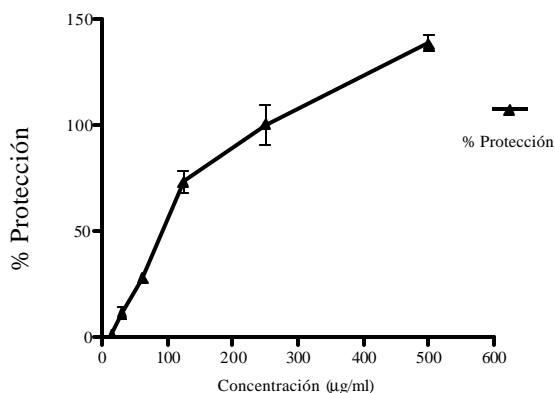


Figura 3. Efecto de la fracción 2a contra el virus de la influenza. IC₅₀ = 133,3 µg/ml. R² = 0.8911, IS = 3.74.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La estructura del triterpeno involucrado en la actividad antiviral es susceptible de modificarse en varios puntos para tratar de establecer una relación entre la estructura y la actividad y eventualmente optimizarla, bien sea incrementándola o disminuyendo su toxicidad. Estas transformaciones se facilitan por la abundancia de esta sustancia en látex y su relativa facilidad para purificarla.

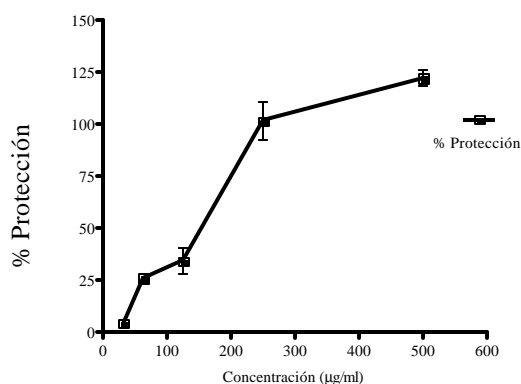


Figura 4. Efecto de la fracción 2a contra el virus de la influenza. IC₅₀ = 175,4 µg/ml. R² = 0,8768. IS = 2.82

De otro lado, los resultados de los extractos del látex de *Codiaeum variegatum* indican un alto potencial antiviral, que amerita realizar estudios bioguiados para aislar el metabolito activo. Además, la alteración morfológica visible al microscopio sobre las células MDCK a las concentraciones analizadas (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.12 µg/ml), indica que esta fracción podría tener una actividad proliferativa sobre las células, lo cual es de bastante interés para posteriores estudios.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS y a la Universidad de Antioquia por la financiación de este proyecto.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] UNANDER, D.W., WEBSTER, G.L., BLUMBERG, B.S. Clustering of antiviral uses and other effects. *J Ethnopharmacol.* 45, 1-18 (1998).
- [2] DEL BARRIO, G; PARRA, F. Evaluation of the antiviral activity. of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J Ethnopharmacol* 72: 317-322. (2000).
- [3] GULAKOWSKIA, R.J; MCMAHON, J.B.; BUCKHEIT JR, W.; GUSTAFSON, K.R.; BOYD, M.R.. Antireplicative and anticytopathic activities of prostratin, a non-tumor-promoting phorbol ester, against human immunodeficiency virus (HIV)1 *Antiviral Research* 33, 87-97 (1997).
- [4] KULKOSKY J, CULNAN, D M, ROMAN, J, DORNADULA, G; SCHNELL, M; BOYD, M R, POMERANTZ, R J. Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood* 98, 3006-3015 (2001).
- [5] W. DAVID NES, ROSALIND Y. WONG, MABRY BENSON, JOSEPHINE R. LANDREt, WILLIAM R. NES. Rotational isomerism about the 17(20)-bond of steroids and euphoids as shown by the crystal structures of euphol and tirucalol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5896-5900 (1984)