

ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA DE ALGUNAS PLANTAS DE LA FLORA COLOMBIANA

RESUMEN

La incidencia actual de la tuberculosis a nivel mundial y la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes a los agentes quimioterapéuticos hace necesaria la búsqueda de nuevas sustancias que puedan ser usadas para el control de la enfermedad. Las familias Myristicaceae, Magnoliaceae, Lauraceae y Piperaceae presentan lignanos, compuestos que pueden ser potenciales agentes antimicobacterianos. En esta investigación extractos y fracciones de *Virola calophylla*, *V. flexuosa*, *Piper* sp., *P. hispidum*, y *Dugandiodendron* sp. presentan una buena actividad antibacteriana *in vitro* frente a *M. tuberculosis* H₃₇Rv. También se reporta el aislamiento de compuestos del tipo lignano y de un flavonoide.

PALABRAS CLAVES: Tuberculosis, lignanos, actividad antimicobacteriana, *Virola*, *Piper*, *Dugandiodendron*.

ABSTRACT

The current incidence of tuberculosis worldwide and the presence of Mycobacterium tuberculosis multi-resistant strains to chemotherapy agents make it necessary the search for new compounds that can be used for the control of the illness. Myristicaceae, Magnoliaceae, Lauraceae and Piperaceae families present lignans, compounds that can be potential antimycobacterial agents. In this investigation extracts and fractions from Virola calophylla, V. flexuosa, Piper sp., P. hispidum and Dugandiodendron sp., present an in vitro antibacterial good activity against M. tuberculosis H₃₇Rv. The isolation of lignans and one flavonoid is also reported.

KEYWORDS: Tuberculosis, lignans, antimycobacterial activity, *Virola*, *Piper*, *Dugandiodendron*.

EDUARD BAQUERO SALAZAR

Biólogo
Universidad de Antioquia

JULIE BENAVIDES

Química Farmacéutico
Est. Universidad de Antioquia

LIUDA SEPULVEDA

Química Farmacéutico
Universidad de Antioquia

WISTON QUIÑONES

Ph.D. Ciencias Químicas
Universidad de Antioquia

FERNANDO TORRES

Ph.D. Ciencias Químicas
Universidad de Antioquia

DIANA CARDONA

Ph.D. Ciencias Químicas
Universidad de Antioquia

ROSENDO ARCHBOLD

MSc. Docencia
Universidad de Antioquia

JUAN DAVID GUZMAN

Químico
Universidad Nacional de Colombia

LUIS ENRIQUE CUCA

Ph.D. Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Colombia

SCOTT FRANZBLAU

Ph.D. en Microbiología
ITR - Universidad de Illinois

FERNANDO ECHEVERRI

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

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, es uno de los mayores problemas de salud ocasionados por un agente infeccioso, debido a que alrededor de un tercio de la población

mundial padece de TB (1). Se estima que en el año 2004 se presentaron 9 millones de nuevos casos de TB y 2 millones de muertes en todo el mundo, y que esta incidencia sigue creciendo en promedio 1.0% anualmente, no obstante a los grandes esfuerzos que se hacen en materia de control (1). Existe además una gran preocupación debido a la asociación de esta enfermedad

con otras patologías tales como el SIDA para la cual se estima que un 13% de las muertes son causadas por TB.

El panorama de TB es aun más preocupante debido a la aparición de cepas multiresistentes a los agentes quimioterapéuticos usados comúnmente en el tratamiento de la enfermedad, por lo tanto es urgente el descubrimiento y desarrollo de una nueva generación sustancias antituberculosas que combatan de forma más efectiva el bacilo y sus formas resistentes. Para esto las plantas han demostrado ser un enorme reservorio a partir del cual se ha encontrado una gran diversidad de sustancias antimicrobianas que pueden servir para el desarrollo de nuevos medicamentos (2 – 5).

Recientemente Stephens y colaboradores reportaron la actividad de algunos compuestos sintéticos del tipo 2,5-difenilfurano con una concentración mínima inhibitoria (CMI) $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ frente a *M. tuberculosis* (6). Estos compuestos son análogos estructurales de compuestos naturales del tipo lignano. Especies Colombianas de las familias Magnoliaceae, Piperaceae, Myristicaceae y Lauraceae además de ser un importante componente de los bosques tropicales, se destacan por la presencia de una gran variedad de metabolitos de naturaleza lignoide, los cuales pueden ser potenciales agentes antimicobacterianos.

Este trabajo tiene como objetivo la búsqueda de sustancias activas frente a *M. tuberculosis* a partir de plantas de la flora Colombiana, las cuales pueden ser usadas a mediano o largo plazo en el tratamiento de TB, así como también contribuir al conocimiento de la química de nuestras especies vegetales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

En la Vereda Cristalina del municipio de Puerto Berrio - Antioquia - Colombia se colectaron hojas, corteza y/o tallos de 15 especies vegetales pertenecientes a cuatro familias, Myristicaceae: *Virola* sp., *V. peruviana*, *V. sebifera*, *V. flexuosa*, *V. calophylla*, *Iryanthera* sp., *I. laevis*; Piperaceae: *Piper* sp., *P. peltatum*, *P. hispidum*, *P. auriculatum*, *P. jericense*; Magnoliaceae: *Dugandiodendron* sp. y Lauraceae: *Persea americana*. Una muestra de cada espécimen fue depositado en el Herbario del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia (HUA) y/o en el Herbario Nacional (COL)

2.2 Extracción y Fraccionamiento

El material vegetal seco y molido (1 kg) fue extraído en un percolador con hexano y luego etanol (relación muestra-solvente, 1:4) a temperatura ambiente. Los extractos fueron concentrados a presión reducida. El fraccionamiento inicial de los extractos fue realizado por cromatografía de columna (CC) usando como fase estacionaria Sephadex LH-20 (Sigma) y como eluente

una mezcla de Hexano- CH_2Cl_2 -MeOH (2:1:1). Fraccionamientos adicionales se realizaron mediante CC en Silica gel 60 H (Merck, relación muestra-fase estacionaria 1:30) y como fase móvil mezclas de polaridad creciente de Hexano-EtOAc (100:0 hasta 0:100), mediante esta metodología se aislaron los compuestos dehidroxicubebina, metilpiperitol, isokusunokinina, episesamina, metilpluviatilol y titonina.

2.3 Ensayo de Microcultivo con Azul de Alamar (MABA)

La evaluación de la actividad antimycobacteriana *in vitro* fue realizada de acuerdo a la metodología propuesta por Collins y Franzblau, 1997 (7), utilizando la cepa H₃₇Rv de *M. tuberculosis*. La evaluación de extractos, fracciones y moléculas se realizó a la concentración de 128 $\mu\text{g/mL}$ y se consideraron promisorios aquellos extractos o fracciones que presentan porcentajes de inhibición de la proliferación superiores a 90.

2.4 Análisis Espectroscópico

Se realizaron espectros ¹H y ¹³C RMN uni y bidimensionales de fracciones y compuestos aislados usando un espectrómetro Bruker AMX300. Se tuvo como criterio para la evaluación de la actividad biológica la presencia en extractos o fracciones de señales de RMN asociadas a compuestos del tipo lignano, detectadas por la presencia de grupos metilendioxi, metilos y lactonas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la actividad antimicobacteriana *in vitro* muestra que solo 4 de los extractos totales evaluados presentaron un buen potencial como inhibidores del crecimiento de *M. tuberculosis* (Tabla 1) y aunque el extracto de tallo de *V. calophylla* no mostró actividad significativa, algunas de las fracciones obtenidas de este revelaron mejores resultados de bioactividad, lo que se debe a que el extracto presenta tal complejidad química que no permite dimensionar el real efecto antibacteriano de las sustancias allí presentes.

De *V. flexuosa* y *V. sebifera* se aislaron lignanos con agrupamientos del tipo monofuranico (Dehidroxicubebina), butirolactona (Isokusunokinina) y furanofuranicos (Episesamina y metilpluviatilol) (Figura 1), los cuales han presentado porcentajes de inhibición inferiores al 90%, por lo cual su actividad no se considera significativa (Tabla 1). Otros metabolitos aislados de *V. flexuosa* son la titonina (flavona) e isohinokinina (lignano-butirolactona), los cuales aun no han sido evaluados biológicamente. Todos estos compuestos se han aislado de otras especies del género *Virola* (8-9).

No existen reportes hasta la fecha sobre la actividad antimycobacteriana de plantas pertenecientes al género *Virola* y *Dugandiodendron*. En el género *Piper* se han

encontrado moléculas activas frente a *M. tuberculosis* tales como la piperina (CMI 50 µg/ml) (10), la 5,6-dehidro-7,8-dihidrometisticina (CMI 4 µg/ml) (11), el 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil) tetradecano (CMI 6.25 µg/ml) (11), entre otros. Por otra parte algunos lignanos furanofuranicos como (+)-Sesamina y horsfieldina, aislados de *P. sarmentosum*, se han considerado inactivos por presentar CMI > 200 µg/ml (12).

Especie y Parte de Planta	Extracto, Fracción o Compuesto	%Inhibición (128 µg/ml)
<i>Virola</i> sp. (Hojas)	Ext. EtOH	38
	Fracc. 2	64
	Fracc. 3-4	62
	Fracc. 5	19
<i>Virola</i> ? (Hojas)	Ext. EtOH	25
	Episesamina	60
<i>Virola sebifera</i> (Hojas)	Fracc. 9	61
	metilpluviatilol	71
	Isokusunokinina	67
<i>Virola peruviana</i> (Hojas)	Ext. EtOH	31
	Fracc. G	29
	Fracc. H	20
<i>Virola calophylla</i> (Tallo)	Ext. EtOH	29
	Fracc. G	58
	Fracc. I	48
	Fracc. EF	97
<i>Virola calophylla</i> (Hojas)	Ext. EtOH	89
	Fracc. GH	35
	Fracc. II	92
	Fracc. 45	41
	Fracc. IV	36
	Fracc. 23	61
	Fracc. 34	90
	Fracc. 2	75
	Fracc. L	44
	Fracc. III	45
<i>Virola flexuosa</i> (Hojas)	Ext. EtOH	95
	Ext. Hexano	94
	Fracc. 3	58
	Fracc. 4	74
	Fracc. 5	54
<i>Virola flexuosa</i> (Corteza)	Fracc. 3	27
	Fracc. 4	56
<i>Iryanthera</i> sp. (Corteza)	Fracc. I	64
	Fracc. L.	24
<i>Iryanthera laevis</i> (Tallo)	Fracc. 3	32
<i>Piper</i> sp (Hojas)	Ext. EtOH	92
<i>Piper peltatum</i> (Hojas)	Ext. EtOH	35
<i>Piper Hispidum</i> (Hojas)	Ext. EtOH	27
<i>Piper Hispidum</i> (Madera)	Ext. EtOH	95
<i>Piper auriculatum</i> (Hojas)	Ext. EtOH	27
<i>Piper jericense</i> (Hojas)	Fracc. 10-11	44
	Fracc. 9	63
<i>Dugandiodendron</i>	Fracc. 5	99

sp. (Corteza)	Fracc. 7	51
<i>Persea americana</i> (Tallo)	Fracc. B	18
	Fracc. C	29
	Fracc. D	24

Tabla 1. Actividad inhibitoria de extractos, fracciones y compuestos sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

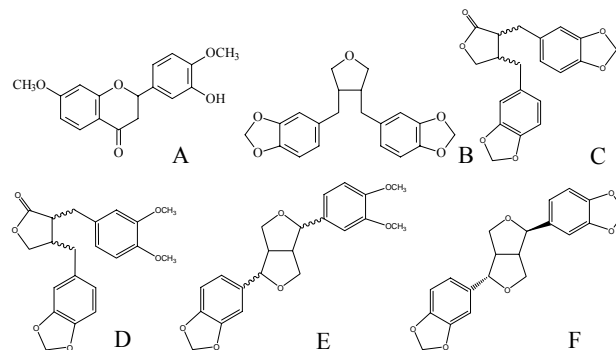


Figura 1. Estructuras de metabolitos aislados de *V. flexuosa* y *V. sebifera*. Titonina (A), Dehidroxicubebina (B), Isohinokinina (C), Isokusunokinina (D), Metilpluviatilol (E), Episesamina (F).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Son promisorios los extractos y/o fracciones de *V. calophylla*, *V. flexuosa*, *Piper* sp., *Piper Hispidum* y *Dugandiodendron* sp., los cuales serán sometidos a posteriores procesos de fraccionamiento con el fin de aislar los constituyentes activos.

De los lignanos aislados solo la dehidroxicubebina es monofuranico y por lo tanto análogo a los compuestos sintéticos del tipo 2,5- difenilfurano, no obstante esta sustancia presenta baja acción inhibitoria del crecimiento de *M. tuberculosis*.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS, la Universidad de Antioquia y la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá) por la financiación de este proyecto.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] WHO, Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report. <http://www.who.int/tb>. (2006).
- [2] COWAN, M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 12, 564–582. (1999)
- [3] RIOS J., RECIOS M. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 100, 80–84. (2005).

[4] COPP, B. Antimycobacterial natural products. *Natural Products Report*. 20, 535-557. (2003)

[5] OKUNADE A., ELVIN-LEWIS M., LEWIS W. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*. 65, 1017-1032. (2004)

[6] STEPHENS CH., TANIOUS F., KIM S., WILSON W. D., SCHELL W., PERFECT J. FRANZBLAU S. BOYKIN D. Diguanidino and reversed diamidino 2,5-diarylfurans as antimicrobial agents. *J. Med. Chem.* 44, 1741-1748. (2001).

[7] COLLINS L. A. & FRANZBLAU S. G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for High-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1004-1009 (1997)

[8] CARVALHO J., FERREIRA L., DA SILVA SANTOS L., CORREA M., DE OLIVEIRA CAMPOS L., BASTOS J., SARTI S. Anti-inflammatory activity of flavone and some of its derivates from *Virola michelli* Heckel. *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 173-177. (1999).

[9] WARD, R. Lignans, neolignans and related compounds. *Natural Products Reports*. 16, 75-96. (1999).

[10] PHONGPAICHIT S., VUDDHAKUL V., SUBHADHIRASAKUL S., WATTANAPIROMSAKUL C. Evaluation of the Antimycobacterial Activity of Extracts from Plants Used as Self-Medication by AIDS Patients in Thailand. *Pharmaceutical Biology*. 44, 71 - 75. (2006).

[11] MATA R., MORALES I., PÉREZ O., RIVERO-CRUZ I., ACEVEDO L., ENRIQUEZ-MENDOZA I., BYE R., FRANZBLAU S., TIMMERMANN B. Antimycobacterial Compounds from *Piper sanctum*. *Journal of Natural Products*. 67, 1961 - 1968. (2004).

[12] TUNTIWACHWUTTIKUL P., PHANSA P., POOTAENG-ON Y., TAYLOR W. Chemical Constituents of the Roots of *Piper sarmentosum*. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 149 - 151. (2006)