

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE CUATRO PLANTAS USADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL PERUANA. AISLAMIENTO DE 3'-FORMIL – 2',4',6' – TRIHIDROXIDIHIDROCHALCONA, PRINCIPIO ACTIVO DE *Psidium acutangulum*

Louise Wen^a, Mohamed Haddad^{b,c}, Irma Fernández^d, Giovana Espinoza^e, Candy Ruiz^e, Edgar Neyra^f, Beatriz Bustamante^f, Rosario Rojas^{d,e,*}

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Apocynaceae), *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. (Rubiaceae) y *Psidium acutangulum* DC (Myrtaceae), cuatro plantas utilizadas en la medicina tradicional peruana contra las infecciones micóticas de la piel.

El extracto etanólico de *Psidium acutangulum* fue el más activo contra los hongos evaluados (*Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* y *Trichophyton mentagrophytes*), por lo que fue sometido a fraccionamiento biodirigido que condujo al aislamiento de 3'-formil-2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona. Este compuesto mostró concentraciones inhibitorias mínimas en el rango de 16-512 µg/mL contra los hongos *Cryptococcus neoformans*, *S. schenckii* y varias especies de *Candida*.

Los resultados obtenidos apoyan el uso de *Psidium acutangulum* en la medicina tradicional peruana. Su actividad antifúngica se debe principalmente a la 3'-formil-2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona.

Palabras clave: antifúngico, *Psidium acutangulum*, plantas peruanas

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FOUR PLANTS USED IN PERUVIAN TRADITIONAL MEDICINE: ISOLATION OF THE ACTIVE PRINCIPLE OF *Psidium acutangulum*

ABSTRACT

We report here the antifungal activities of the ethanolic extracts of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Apocynaceae), *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. (Rubiaceae) and *Psidium acutangulum* DC (Myrtaceae), four plants used in peruvian traditional medicine against skin mycosis. The most active sample against the evaluated fungi (*Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* and *Trichophyton mentagrophytes*) was the ethanol extract of *Psidium acutangulum*, which was submitted to bioassay-guided fractionation, leading to the isolation of 3'-formyl-2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone. This compound showed minimum inhibitory concentrations of

^a School of Medicine, Stony Brook University, USA; ^b IRD; UMR-152; Mission IRD; ^c Université de Toulouse, UPS, UMR152 PHARMA-DEV, Francia; ^d Dpto. de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), ^e Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, UPCH; ^f Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, UPCH

* autor de correspondencia: rosario.rojas@upch.pe, Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima, Perú, Tel +51 1 3190000 ext. 2705

16-512 µg/mL against *Cryptococcus neoformans*, *S. schenckii* and several *Candida* species. All these results support the use of *Psidium acutangulum* in Peruvian traditional medicine. Its antifungal activity is due mainly to the 3'-formyl-2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone.

Key words: antifungal, *Psidium acutangulum*, peruvian plants

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas representan un problema crítico para la salud y son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La aparición de resistencia de los microorganismos a algunos antibióticos sintéticos, junto con la toxicidad durante el tratamiento prolongado, hace que sea necesario continuar la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas, antifúngicos en particular¹⁻⁴ *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* son hongos patógenos frecuentemente implicados en las infecciones que amenazan la vida de seres humanos, particularmente de pacientes con sistemas inmunes comprometidos. *Cryptococcus neoformans* es un hongo oportunista que causa infecciones mortales en pacientes inmunodeprimidos por el SIDA, la quimioterapia, el trasplante de órganos, o por altas dosis de esteroides. Los tratamientos actuales son la anfotericina B, flucitosina y el fluconazol. La esporotricosis es una enfermedad crónica cutánea y subcutánea causada por el hongo dimorfo *Sporothrix schenckii* que es el agente más común de las micosis subcutáneas en América Latina. La terapia estándar para esta enfermedad se basa principalmente en el itraconazol; sin embargo, el yoduro de potasio es el fármaco de elección en los países en desarrollo debido a su bajo costo. Aunque los actuales fármacos disponibles suelen ser eficaces, los fracasos terapéuticos y la toxicidad después de la larga duración del tratamiento son comunes, por lo que es necesario explorar nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones graves.⁵⁻¹¹

Las plantas medicinales y sus extractos son ampliamente utilizados por los practicantes de la medicina tradicional para curar diversas enfermedades. La creciente aceptación de la medicina tradicional como una forma alternativa de atención de la salud y la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos a partir de plantas medicinales, se ha vuelto muy importante.^{12,13}

En el presente estudio se seleccionaron cuatro plantas peruanas que se usan tradicionalmente contra infecciones superficiales de la piel y se les evaluó por su actividad antifúngica *in vitro*. La planta más activa fue posteriormente sometida a fraccionamiento biodirigido para determinar el compuesto responsable de la actividad antifúngica.

PARTE EXPERIMENTAL

Colecta de las plantas

Las especies *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Apocynaceae), *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), *Calycophyllum spruceanum* (Benth) Hook. f. ex K. Schum. (Rubiaceae) y *Psidium acutangulum* DC. (Myrtaceae) fueron seleccionadas en base a su uso en la medicina tradicional de la tribu shipibo-conibo¹⁴ y colectadas por uno de nosotros (I.F.) en el barrio de San Francisco de Pucallpa, Perú. Las muestras botánicas de las plantas fueron depositadas en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en Lima.

Preparación de los extractos

El material vegetal fue secado bajo sombra, molido finamente y posteriormente extraído por percolación a temperatura ambiente con etanol al 95%. El solvente se evaporó a sequedad bajo presión reducida a una temperatura inferior a 40 °C. Los rendimientos de extracción de cada una de las especies se muestran en la tabla 1. Para los bioensayos, los extractos fueron resuspendidos en DMSO a una concentración de 20 mg/ml.

Ensayos antifúngicos

El ensayo de difusión en agar se utilizó para evaluar la actividad de extractos de plantas y fracciones frente a *Candida albicans* ATCC 90028, *Sporothrix schenckii* IHEM 15503 y *Trichophyton mentagrophytes* IHEM 0584. Se mezcló 20 mL de agar dextrosa Sabouraud (Difco) fundido con 1 mL de una suspensión fúngica (10^4 CFU/mL para *C. albicans* y 10^5 CFU/mL para *S. schenckii* y *T. mentagrophytes*). La mezcla se vertió en placas de Petri estériles de 100 mm x 15 mm. Luego que el agar se solidificó, se perforó pozos de 10 mm con un sacabocados estéril.

Sobre los pozos se depositaron 100 μ L de los extractos de plantas (20 mg/mL) o de las fracciones (10 mg/mL) y posteriormente las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 48 h (*C. albicans*) o 7 días (*S. schenckii* y *T. mentagrophytes*). Anfotericina B (0,2 mg/ml) y DMSO fueron utilizados como controles positivos y negativos, respectivamente. Los ensayos se realizaron por triplicado y la actividad antifúngica se midió por el diámetro (mm) de la zona de inhibición del crecimiento.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del compuesto activo, anfotericina B y fluconazol se determinaron mediante un ensayo de microdilución en caldo de acuerdo con el International Control Laboratory Standards (ICLS) método de referencia M27-A3 y M-38A. El inóculo fúngico fue visualmente estandarizado a 0,5 de la escala de McFarland ($2,4$ a $3,5 \times 10^6$ CFU/mL de células de levadura y $2,3 \times 10^4$ CFU/mL para *Sporothrix schenckii*). Los pozos se llenaron con 100 L de la dilución de los compuestos. Posteriormente se añadieron 100 L del inóculo a cada pozo y las microplacas se incubaron durante 48 -72 horas a 35 °C. La CMI se define como la menor concentración de la muestra en la que se observó inhibición del crecimiento del hongo.

Fraccionamiento bioguiado del extracto etanólico de *Psidium acutangulum*

Hojas secas de *P. acutangulum* (262 g) se percolaron con 2 litros de etanol al 95%. El extracto etanólico (9,7 g) obtenido después de la evaporación del disolvente a presión reducida fue extraído con solventes de diferente polaridad (éter de petróleo, el 90% de metanol 90%, acetato de etilo, agua). La evaluación antifúngica de estas cuatro fracciones en contra de *C. albicans* mostraron que la actividad se concentró en la fracción de metanol al 90%; esta fracción (4,2 g) fue sometida a fraccionamiento mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente de cloroformo-metanol. Las 4 fracciones obtenidas (A: 0,20 g; B: 0,36 g; C: 0,16 g; D: 2,45 g) fueron evaluadas a una concentración de 10 mg/mL frente a *C. albicans* en el test de difusión en agar. La fracción más activa (D: 24 mm de inhibición del crecimiento de diámetro) se purificó aún más, utilizando una columna de fase reversa. Una porción (200 mg) de la fracción D fue sometida a cromatografía de columna de fase reversa con 10 g de gel de sílice RP-18, con MeOH-H₂O (1:1) como sistema de solvente, obteniéndose tres fracciones (D1: 8 mg; D2: 72 mg; D3: 53 mg). La fracción con mejor actividad anti *C. albicans* (D2) fue finalmente purificada por recristalización en diclorometano, obteniéndose 34 mg de un polvo de color rosa claro (compuesto **1**, 0,16% de rendimiento).

3'-formil-2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona (**1**) (figura 1).

Los espectros de RMN (300 MHz para ¹H-NMR y 125 MHz para ¹³C-NMR) fueron obtenidos con CDCl₃ en un espectrómetro Bruker Avance 500. El espectro de masas ESI-MS (3,5 kV en MeOH- CH₃CN) se registró en un equipo Perkin-Elmer Sciex API-365; [M-H]⁻: 285 (de acuerdo con PM=286). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3,01 ppm (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H- β), 3,45 ppm (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H- α), 5,77 ppm (1H, s, H-3'), 7,18 ppm (5H, m, Ar), 10,02 ppm (1H, s, OH). ¹³CNMR (125 MHz, CDCl₃): 30,4 ppm (C-), 45,6 ppm (C- β), 94,8 ppm (C-3'), 126,1 ppm (C-4), 128,6 ppm (C-3, C-5), 141,1 ppm (C-1), 192,47 ppm (CHO), 205,4 ppm (C=O).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestra búsqueda de productos naturales con actividad antifúngica, escogimos cuatro plantas utilizadas en la medicina tradicional peruana para el tratamiento de lesiones infecciosas de la piel. La tabla 1 muestra el nombre científico, nombre popular, el número de muestra (voucher) y actividad antifúngica de los extractos etanólicos de las plantas seleccionadas.

Tabla 1. Actividades antifúngicas *in vitro* de cuatro plantas peruanas

| Especies de plantas | Familia (Voucher) | Nombre común (parte usada) | Rendimiento de extracción (%) | Diámetro de inhibición de crecimiento (mm) ^(*) | | |
|--|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|---|------|------|
| | | | | C.a. | S.s. | T.m. |
| <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. | Rubiaceae (IFV2511) | Capirona (corteza) | 22,7 | 0 | 0 | 18 |
| <i>Psidium acutangulum</i> DC. | Myrtaceae (IFV2509) | Guayaba de agua (hojas) | 12,6 | 22 | 22 | 29 |
| <i>Spondias mombin</i> L. | Anacardiaceae (IFV2510) | Ubos (corteza) | 25,8 | 0 | 0 | 19 |
| <i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K. Schum | Apocynaceae (IFV2508) | Shacapa (hojas) | 11,4 | 0 | 0 | 0 |
| Controles | | | | | | |
| Anfotericina B (0.2 mg/ml) | | | | 31 | 0 | 31 |
| DMSO | | | | 0 | 0 | 0 |

^(*) C.a.: *Candida albicans*; S.s.: *Sporothrix schenckii*; T.m.: *Trichophyton mentagrophytes*

En base a los resultados obtenidos, el extracto etanólico de las hojas de *Psidium acutangulum* fue elegido para los estudios de fraccionamiento biodirigido, que condujo al aislamiento e identificación del compuesto 3'-formil-2',4',6'-trihydroxidihidrochalcona (figura 1). La tabla 2 muestra los valores de CMI de este compuesto contra de diversos hongos

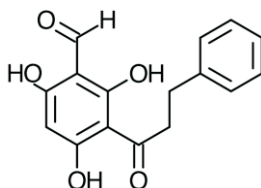


Figura 1. 3'-formil-2',4',6'-trihydroxidihidrochalcona (1)

Tabla 2. CIM del compuesto **1** contra diversos hongos

| Microorganismos | CIM (µg/ml) | | |
|--|-------------|----------------|------------|
| | 1 | Anfotericina B | Fluconazol |
| <i>Candida glabrata</i> CAP F-7 | 16 | 1 | 32 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 | 128 | 0,5 | >64 |
| <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 | 512 | 0,5 | 2 |
| <i>Candida krusei</i> ATCC 6928 | 64 | 1 | 16 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 14053 | 128 | 0,5 | >64 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 3963 | 32 | 1 | 4 |
| <i>Sporothrix schenckii</i> ISHEM 15503 | 32 | 8 | 64 |

El compuesto **1** fue aislado previamente de *Psidium acutangulum*, mostrando actividad contra los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Helminthosporium teres*.¹⁵ En el presente trabajo el compuesto **1** fue aislado a través de fraccionamiento bioguiado, evaluando las fracciones obtenidas contra varios hongos patógenos humanos. Interesantemente, el compuesto **1** mostró actividad contra los hongos *Candida glabrata* y *Sporothrix schenckii* que fue comparable a la del fluconazol.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Psidium acutangulum* mostró una buena actividad antifúngica *in vitro* frente a diversos hongos patógenos humanos. Este hallazgo apoyaría el uso de esta planta en la medicina popular para el tratamiento de infecciones de la piel. Los estudios de fraccionamiento bioguiado sobre el extracto etanólico de *P. acutangulum* mostraron que la actividad antifúngica de dicha especie se debe principalmente a la 3'-formil-2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona.

AGRADECIMIENTO

L.W. recibió una subvención de Stony Brook Escuela de Medicina de Barry Coller (Fondo para la Investigación en Salud Internacional). Agradecemos al Dr. Nicolás Fabre de la Universidad de Toulouse, Francia por la asistencia en la obtención de espectros RMN (¹H, ¹³C) y MS.

BIBLIOGRAFÍA

- Weitzman, I., Summerbell, R., *Clinical Microbiology Reviews*. **1995**, *8*, 240–259.
- Freixa, B., Vila, R., Vargas, L., Lozano, N., Adzet, T., Cañigual, S. *Phytotherapy Research*. **1998**, *12*, 427–431.
- Sangeorzan, J.A., Bradley, S.F., He, X., Zarins, L.T., Ridenour, G.L., Tiballi, R.N., Kauffman, C.A., *American Journal of Medicine*. **1994**, *97*, 339–346.
- Debruyne, D., *Clinical Pharmacokinetics*. **1997**, *33*, 52–77.
- Mathew, B.; Nath, M. *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4*, 310–323.
- Mukherjee, P.K., Leidich, S.D., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N.S., Ghannoum, M.A., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2003**, *47*, 82–86.
- Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Filho, V.C., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, S.A., Gupta, M., *Journal of Ethnopharmacology*. **2010**, *127*, 137–158.

8. Redding, S., Smith, J., Farinacci, G., Rinaldi, M., Fothergill, A., Rhine-Chalberg, J., Pfaller, M., *Clinical Infectious Diseases*. **1994**, *18*, 240–242.
9. Ruhnke, M., Eigler, A., Tennagen, I., Geiseler, B., Engelmann, E., Trautmann, M., *Journal of Clinical Microbiology*. **1994**, *32*, 2092–2098,
10. Goldman, M., Cloud, G.A., Wade, K.D., Reboli, A.C., Fichtenbaum, C.J., Hafner, R., Sobel, J.D., Powderly, W.G., Patterson, T.F., Wheat, L.J., Stein, D.K., Dismukes, W.E., Filler, S.G., *Clinical Infectious Diseases*. **2005**, *41*, 1473–1480,
11. Hamza, O.J.M., van den Bout-van den Beukel, C.J.P., Matee, M.I.N., Moshi, M.J, Mikx, F.H.M., Selemani, H.O., Mbwambo, Z.H., Van der Ven, A.J.A.M., Verweij, P. E., *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, *108*, 124–132
12. Cos, P., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., Maes, L., *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, *106*, 290–302,
13. Maregesi, S.M., Pieters, L., Ngassapa, O.D., Apers, S., Vingerhoets, R., Cos, P., Vanden Berghe, D.A., Vlietinck, A.J., *Journal of Ethnopharmacology*. **2008**, *119*, 58–66,
14. Arévalo, G., “Medicina Indígena. Las plantas medicinales y su beneficio en la salud Shipibo-Conibo”, Editorial AIDSESEP, Lima, Perú, 1994. 354 pp.
15. Miles, D.H., Rosa del Medeiros, J.M., Chittawong, V., Hedin, P.A., Swithenbank, C., Lidert, Z., *Phytochemistry*. **1991**, *30*, 1131-1132