

# METABOLITOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR HONGOS Y PLANTAS

FÁTIMA ALEJOS-GONZÁLEZ, ROCÍO DE L. BORGES-ARGÁEZ, FABIOLA ESCALANTE-EROSA, MARCELA GAMBOA-ANGULO, LETICIA MEDINA-BAIZABAL, YAZMÍN DEL C. OJEDA-UC, FILOGONIO MAY-PAT, MATILDE PÉREZ-RODRÍGUEZ, SERGIO R. PERAZA-SÁNCHEZ, NORMA E. SALAZAR-AGUILAR Y LUIS M. PEÑA-RODRÍGUEZ\*

---

Desde sus inicios el hombre ha aprendido a conocer y clasificar las plantas de acuerdo a sus propios usos e intereses. Por un lado ha reconocido aquellas plantas que le sirven como alimento y, por otro, las plantas que puede utilizar con fines medicinales, tóxicos, insecticidas y de construcción.<sup>1,2</sup> La medicina tradicional, basada en el uso de plantas, nunca ha desaparecido por completo y en las zonas rurales remotas o entre minorías étnicas de la sociedad industrial moderna, persiste como complemento del hombre pobre o como alternativa de la asistencia médica inexistente.<sup>3</sup>

En los últimos 10-15 años ha renacido el interés por los productos naturales y sus posibles aplicaciones en la agricultura y las industrias alimentaria y farmacéutica. Lo anterior es particularmente evidente en el caso de esta última, la cual, en su búsqueda constante de nuevos y más eficientes medicamentos, actualmente muestra un renovado interés por las plantas utilizadas en la medicina tradicional mundial; se calcula que aproximadamente unas 35,000 especies son posibles fuentes de nuevos fármacos o modelos para los mismos. En la actualidad, existen en el mercado cerca de 120 productos naturales, puros, de origen vegetal utilizados medicinalmente y se espera que para el año 2000, a medida que la preferencia de los consumido-

res cambie hacia los medicamentos derivados de fuentes vegetales en lugar de químicas, el mercado para los fármacos obtenidos de plantas en el mundo occidental será de más de 50,000 millones de dólares. Cabe mencionar que de todos los fármacos de origen vegetal que se encuentran actualmente en el mercado, solamente 10 son preparados sintéticamente en el laboratorio, el resto todavía se extrae directamente de las plantas<sup>4,6</sup>.

En la actualidad se reconoce la importancia de los productos naturales como mediadores en la interacción del organismo productor con su entorno ecológico; actuando unas veces como protectores contra enfermedades o contra el ataque de otros organismos y otras como atrayentes entre individuos de una misma especie o para facilitar el proceso de polinización en plantas<sup>7</sup>. Tomando esto en cuenta, un número importante de instituciones académicas, en colaboración con las grandes compañías internacionales, se han dado a la tarea de establecer programas para la evaluación de productos naturales, utilizando técnicas de bioensayo altamente específicas, que permitan la detección de aquellos metabolitos secundarios con posible utilidad en la industria farmacéutica o agrícola.

En México se reconoce la existencia de aproximadamente 3000 plantas consideradas como medicinales, 225 de las cuales per-

\* Grupo de Química Orgánica, Departamento de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Apartado postal 87 Cordemex Mérida Yucatán, México 97310

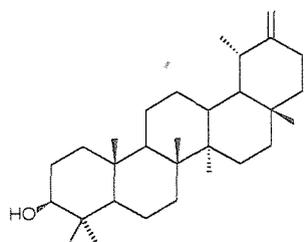
tenecen a la medicina tradicional Yucateca<sup>8</sup>. Hasta ahora menos del 5% de estas plantas han sido evaluadas en cuanto a su producción de metabolitos poseedores de actividad biológica, la cual pone de manifiesto la necesidad de continuar realizando estudios en esta área. Como consecuencia de lo anterior nuestro grupo decidió iniciar un proyecto dirigido hacia la detección, purificación e identificación de metabolitos bioactivos producidos por plantas medicinales Yucatecas.

Los trabajos se iniciaron llevando a cabo una revisión general de las plantas medicinales con mayor uso entre la población de la península de Yucatán. Las plantas fueron evaluadas tomando en cuenta el conocimiento popular de sus propiedades medicinales, la importancia de las enfermedades para las que eran utilizadas, su abundancia en la región y el conocimiento fitoquímico existente sobre ellas. De esta manera se seleccionaron cinco especies para ser estudiadas en cuanto a su producción de metabolitos bioactivos: *Ocimum basilicum* (L.) (Albahaca) (Labiatae), cuya infusión de la raíz es usada para curar infecciones de la piel;<sup>9</sup> *Ocimum micranthum* Willd (Xka-katúm o albahaca silvestre) (Labiatae), utilizada en infusión para aliviar la disentería; *Cnidioscolus aconitifolius* (Miller) I.M. Johnston (Chaya silvestre) (Euphorbiaceae), cuyas hojas son comestibles y en infusión se utilizan para tratar problemas de artritis; *Bursera simaruba* (L.) Sarg., (Cha-ká) (Burseraceae), cuya resina, diluida en agua, se utiliza contra irritaciones de la piel; *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Ka'anchakche') (Rubiaceae), cuya infusión de la raíz es utilizada para tratar la disentería, como antiinflamatorio y contra mordeduras de serpientes<sup>10</sup>.

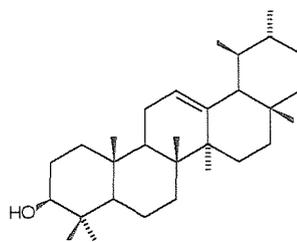
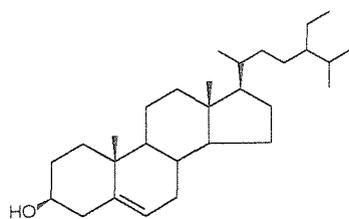
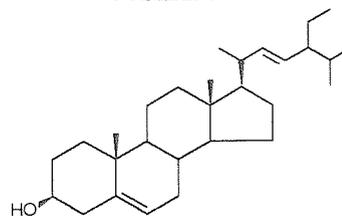
Inicialmente, cada una de las plantas fue preparada de acuerdo al procedimiento tradicional y las infusiones obtenidas se evaluaron en los bioensayos antimicrobiano<sup>11</sup>, de letalidad contra *Artemia salina*<sup>12</sup> y de inhibición de tumores en discos de papa<sup>13</sup>. Es interesante mencionar que ninguna de las infusiones eva-

luadas mostró actividad biológica en los bioensayos ya mencionados. Sin embargo, la presencia de actividad biológica fue evidente al evaluar los correspondientes extractos orgánicos, tanto de la infusión como del material vegetal residual, a una concentración del 5%. Lo anterior sugiere la presencia de metabolitos bioactivos en la infusión, pero en concentraciones demasiado bajas para ser detectados. Asimismo, la actividad biológica en el extracto metanólico del material vegetal residual indica que las propiedades curativas de las plantas medicinales no requieren necesariamente de una extracción total de los productos naturales bioactivos.

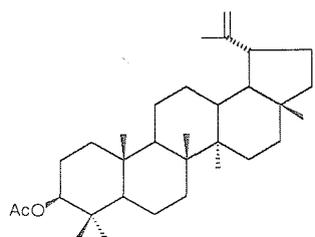
La mayoría de los estudios fitoquímicos realizados tanto con *O. basilicum* como con *O. micranthum* han sido dirigidos al estudio de la composición de sus aceites esenciales<sup>14,15</sup> y hasta ahora no existe reportes acerca del tipo de metabolitos presentes en las raíces de estas plantas. El extracto metanólico crudo de ambas plantas fue particionado con disolventes de polaridad ascendente, encontrándose que en ambos casos la fracción de baja polaridad era poseedora de actividad en los bioensayos antimicrobiano (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) y de inhibición de tumores en discos de papa. Después de purificar, la fracción activa en el bioensayo antimicrobiano, aun cuando por ccd mostraba la presencia de un solo componente, se identificó por GC/MS como una mezcla inseparable de taraxasterol y  $\alpha$ -amirina (Figura 1). De igual forma, la fracción activa en el bioensayo de inhibición de tumores en discos de papa se identificó como una mezcla de  $\gamma$ -sitosterol y estigmasterol (Figura 1). Sin embargo, aun cuando los extractos metanólicos, y las fracciones resultantes del proceso de partición, de ambas plantas mostraron una gran similitud por ccd, en el caso de *O. basilicum* se aisló betulina como triterpeno principal mientras que en los extractos de *O. micranthum* este metabolito no fue detectado, encontrándose en su lugar ácido betulínico (Figura 1) como el triterpeno de mayor abundancia.



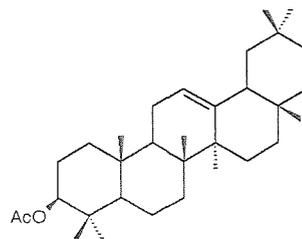
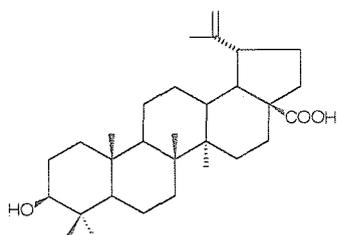
TARAXASTEROL

 $\alpha$ -AMIRINA $\gamma$ -SITOSTEROL

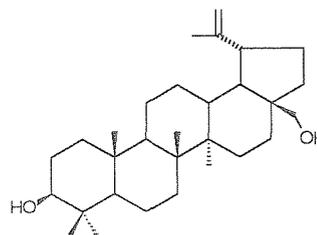
ESTIGMASTEROL



ACETATO DE LUPEOL

ACETATO DE  $\beta$ -AMIRINA

ACIDO BETULINICO



BETULINA

Figura1. Triterpenos de plantas medicinales yucatecas.

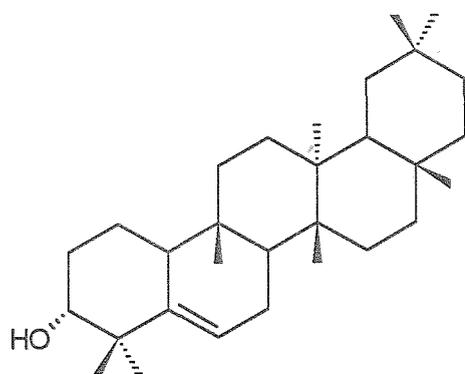
Al revisar la literatura se encontraron varios estudios fitoquímicos realizados con diferentes especies de *Cnidocolus*,<sup>16</sup> pero ninguno sobre *C. aconitifolius*. Aun cuando esta planta es ampliamente recomendada en Yucatán para aliviar una serie de dolencias, el extracto metanólico de sus hojas mostró apenas una débil actividad en el bioensayo antimicrobiano (*Staphylococcus aureus* AT-CC 6358). Los trabajos de purificación con el extracto de esta planta resultaron en el aislamiento de tres fracciones inactivas, dos de ellas conteniendo cada una los derivados acetylados de lupeol y  $\beta$ -amirina (Figura 1) y la tercera identificada como una mezcla inseparable de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina.

Como resultado de trabajos fitoquímicos realizados en varias especies de *Bursera* se ha reportado su producción de triterpenos<sup>17</sup>, bilignanos<sup>18</sup> y lignanos del tipo de la podofilotoxina<sup>19</sup>. Por otra parte, en el único estudio llevado a cabo con el extracto de la resina de *B. simuruba* se reporta el aislamiento de elemicina y amireno<sup>20</sup>. Durante nuestro trabajo se encontró que el extracto de la resina de *B. simaruba* mostraba una actividad importante en el bioensayo de letalidad contra nauplios de *A. salina*. Al llevar a cabo una purificación biodirigida del extracto, el metabolito responsable de la actividad biológica fue identificado como picropoligamaína (Figura 2), un lignano previamente reportado como constituyente de la resina de *Commiphora incisa* (Burseraceae)<sup>21</sup>. Una evaluación de picropoligamaína *in vitro*, contra tres líneas de células tumorales, mostró que posee una actividad citotóxica similar a adriamicina<sup>22</sup>. Al llevar a cabo la purificación de picropoligamaína se obtuvieron una serie de triterpenos inactivos identificados como lupeol, epilupeol, epiglutinol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y lup-20(29)-en-3b,23-diol (Figura 2), identificándose este último como un nuevo producto natural<sup>23</sup>.

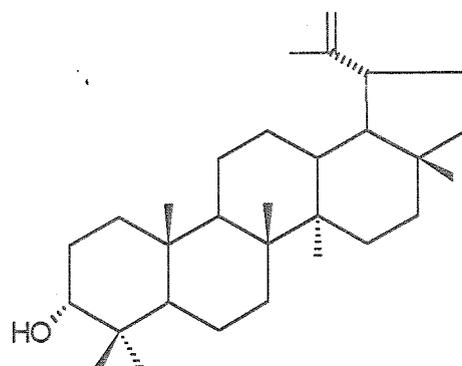
Finalmente, una revisión de la literatura mostró que la fitoquímica de *C. alba* es poco conocida; en los tres trabajos encontrados se

reportan el aislamiento de alcaloides quinolínicos,<sup>24</sup> cetolcoholes<sup>25</sup> y triterpenos<sup>26</sup> a partir de el extracto de la raíz. En nuestra investigación, el extracto de la raíz de *C. alba* mostro actividad en el bioensayo antimicrobiano (*S. aureus*), lo que ha resultado en el aislamiento de un metabolito bioactivo de tipo diterpeno que actualmente se encuentra en proceso de caracterización.

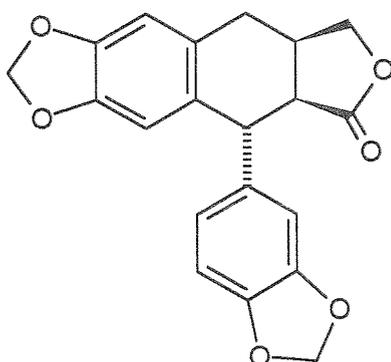
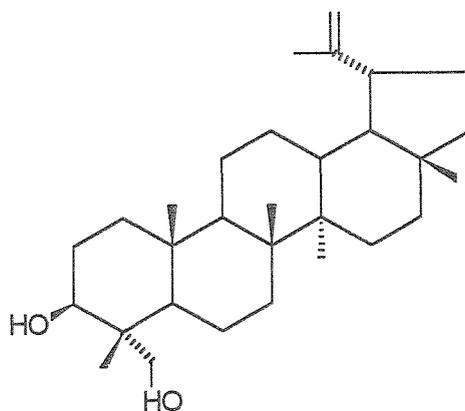
Otras fuentes importantes de productos naturales son los hongos, organismos marinos e insectos, los cuales producen una amplia variedad de metabolitos secundarios, muchos de ellos poseedores de actividades biológicas con un potencial económico importante. Los hongos fitopatogénicos representan una de las principales causas de enfermedades en cultivos agrícolas y son responsables de severas pérdidas económicas al reducir el potencial de producción de los cultivos que atacan<sup>27</sup>. Al iniciar el proceso de infección de una planta huésped, los hongos fitopatogénicos producen una serie de metabolitos tóxicos conocidos como fitotoxinas. estas fitotoxinas son utilizadas por el microorganismo para eliminar las barreras defensivas de la planta e inducir condiciones favorables para su colonización. De manera general, las fitotoxinas se definen como metabolitos secundarios de bajo peso molecular con capacidad para perturbar el crecimiento normal de las plantas superiores<sup>28</sup> y se clasifican como fitotoxinas específicas (HST's) o no específicas (no-HST's) dependiendo del papel que jueguen en el proceso de infección<sup>29</sup>. Las HST's son consideradas determinantes primarios de patogenicidad ya que son requeridas por el hongo para infectar la planta, mientras que las no-HST's son responsables por el grado de virulencia observado en las lesiones y se les conoce como determinantes secundarios de patogenicidad. Tomando en cuenta que se ha demostrado la existencia de una correlación directa entre la tolerancia de una planta a una HST con su resistencia a la infección del patógeno que la produce,<sup>30</sup> la importancia de purificar y caracterizar químicamente las HST's pro-



EPIGLUTINOL



EPILUPEOL

PICROPOLIGAMAINA  
LC<sub>50</sub> 52.2 ppm

LUP-20(29)-EN-3β,23-DIOL

Figura 2. Metabolitos presentes en la resina de *Bursera simaruba*.

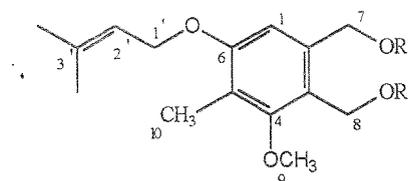
ducidas por un fitopatógeno reside en su posible utilización como marcadores en la rápida selección de genotipos resistentes obtenidos *in vitro*.

Uno de los fitopatógenos de mayor importancia económica es *Alternaria solani* (Ell, y Mart) Jones y Grout, identificado como el agente causal del tizón temprano en papa [*Solanum tuberosum* (L.)] y tomate [*Lycopersicon esculentum* (L.)].<sup>31</sup> Los primeros sínto-

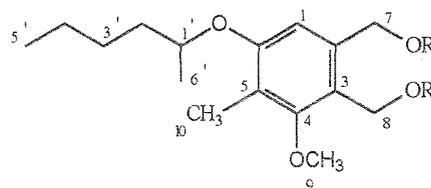
mas de la infección causada por *A. solani* aparecen en forma de lesiones necróticas rodeadas de un halo clorótico en las hojas de la planta infectada. La severidad de la enfermedad puede causar la desfoliarización de la planta y una pérdida importante en el rendimiento de la cosecha. Aun cuando existe un número importante de trabajos dirigidos hacia la obtención de los metabolitos fitotóxicos producidos por *A. solani*,<sup>29</sup> hasta ahora no se

conoce la identidad de las HST's producidas por este fitopatógeno.

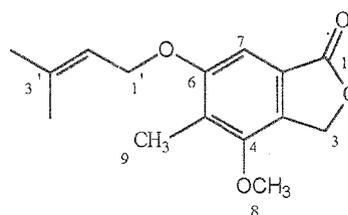
Nuestra investigación dirigida hacia la obtención de las HST's producidas por *A. solani* se inicio con el establecimiento del bioensayo de gota para la detección de actividad fitotóxica en filtrados y extractos orgánicos. El hongo fue cultivado en medio de Richard's, durante 35 días, bajo condiciones de cultivo estacionario. El filtrado fue extraído con acetato de etilo y el extracto correspondiente sometido a un proceso de partición con disolventes de polaridad ascendente. Cada uno de los filtrados, extractos y fracciones obtenidos fueron evaluados en el bioensayo de gota,<sup>32</sup> observándose fitotoxicidad importante en el extracto orgánico crudo y las fracciones hexánica y butanólica. Una purificación bio-dirigida de la fracción de menor polaridad dio lugar al aislamiento de una fracción fitotóxica la cual, después de una reacción de acetilación, permitió la obtención de dos metabolitos fitotóxicos en forma pura. El producto de menor polaridad fue identificado como el derivado acetilado de zinniol(1a, Figura 3), una no-HST comunmente producida por hongos del género *Alternaria*<sup>33,34</sup>. El metabolito de mayor polaridad fue identificado como el derivado acetilado de un nuevo producto natural al que se le ha asignado el nombre de homozinniol (2, Figura 3), tomando en cuenta que este último metabolito cuenta con un carbono adicional en la cadena lateral. La diferencia estructural entre ambos metabolitos es evidente por la falta de protones vinílicos en el <sup>1</sup>H-RMN de 2 y por la presencia de fragmentos importantes a m/z 69 y 85, correspondientes a la estructura de la cadena lateral, en el espectro de masas de 1 y 2 respectivamente. Finalmente, al llevar a cabo el aislamiento de cantidades adicionales de 2, con el fin de confirmar su estructura propuesta, se obtuvo un tercer metabolito, inactivo en el bioensayo de gota, también relacionado estructuralmente a zinniol. Este último producto fue identificado como el ftárido de 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metilo (3, Fi-



1 R = H  
1a R = Ac



2 R = H  
2a R = Ac



3

Figura 3. Metabolitos fitotóxicos producidos por *Alternaria solani*.

gura 3), un metabolito originalmente obtenido por oxidación de zinniol<sup>33</sup> y recientemente reportado como producto natural de *Alternaria porri*<sup>36</sup>.

## AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer al Dr. Francisco Talamás Murra (Syntex de México S.A., Cuernavaca, Morelos), Dr. Guillermo Delgado Lamas (Instituto de Química UNAM, México, D.F.), Prof. William A. Ayer (The University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada) y Prof. John A. Findlay (University of New Brunswick, Fredericton, New Brunswick, Canada) por su apoyo en la obtención de espectros de alta resolución. Al Dr. Javier Flores Abuxapqui (CIR Hideyo Noguchi, Mérida, Yucatán) por su ayuda en el establecimiento de bioensayo antimicrobiano; al Departamento de Acuicultura del CINVESTAV Unidad Mérida por su asistencia en la implementación de bioensayo de letalidad contra *A. salina* y al Sr. Julián Coello Coello por su apoyo en el

establecimiento del bioensayo de inhibición de tumores en discos de papa. Al Prof. J.L. McLaughlin (Purdue University, Indiana EUA) por el programa de computación para el análisis de datos del bioensayo de letalidad contra *A. salina* y al Purdue Cell Culture laboratory (Indiana EUA) por la determinación de actividad citotóxica. Al Departamento de Recursos Naturales de CICY por su asistencia en la identificación y colección del material vegetal utilizado y a los Drs. Sinclair Mantell y Paulina Martínez (Wye College, Wye, Inglaterra) por facilitarnos la cepa de *Alternaria solani* utilizada en este estudio. Finalmente agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México, 4871-E) y a la Internacional Foundation for Science (Suecia, F-1744-1/2) su apoyo económico para la realización de nuestras investigaciones.

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Domínguez, X.A. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa. 1973.
2. Der Marderosian, A. and Liberti, L.E. *Natural Product Medicine*. Goerge F. Sticley Co. 1988.
3. Thompson, W. *Guía Práctica Ilustrada de las Plantas Medicinales*. Editorial Blume. 1980.
4. Tyler, V.E. *Economic Botany*, 40, 279 (1986).
5. Balandrin, M.F.; Klocke, J.A.; Wurtele, E.S. and Bollinger, W.H. *Science*, 228, 1154 (1985).
6. Farnsworth, N.R. and Soejarto, D.D. *Economic Botany*, 39, 231 (1985).
7. Mann, J. *Secondary metabolism*. Clarendon Press. 1978.
8. BADEPY. *Banco de datos Etnobotánicos de la Península de Yucatán*. Xalapa, Veracruz.
9. Morton, J.F. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Charles C. Thomas Publisher. 1981.
10. Mendieta, R.M. y Del Amo, R.S. *Plantas Medicinales del Estado de Yucatán*. Editorial CECSA 1981.
11. Clark, A. *Antimicrobial Screening. Workshop on Bioassays*. 30th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. San Juan, Puerto Rico. 1989.
12. Hui, Y.H.; Rupprecht, H.K.; Liu, Y.M.; Anderson, J.E.; Smith, D.L.; Chang, C.J. and McLaughlin, J.L. *J. Nat. Prod.*, 52, 463 (1989).
13. Galsky, A.G.; Wilsey, J.P. and Powell, R.G. *Plant Physiol.*, 65, 184 (1980).
14. Wagner, H. and Bladt, S. *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag. 1984.
15. Charles, D.J.; Simon, J.E. and Wook, K.V. *J. Agric. Chem.*, 38, 120 (1990).
16. Caballero, P.; Fronczek, F.R. and Fischer, N.H. *J. Nat. Prod.*, 47, 5 (1984).
17. Parsons, I.C.; Gray, A.I.; Lavaud, C.; Massiot, G. and Waterman, P.G. *Phytochemistry*, 30, 1221 (1991).
18. Hernández, J.D.; Román, L.U.; Espiñeira, J. and Joseph-Nathan, P. *Planta Med.*, 47, 215 (1983).

19. Jolad, S.D.; Wielhopf, R.M. and Cole, J.R. *J. Pharm. Sci.*, 66 892 (1977).
20. Pernet, R. *Lloydia*, 35, 280 (1972).
21. Provan, G.J. and Waterman, P.G. *Planta Med.*, 271 (1985).
22. Peraza-Sánchez, S.R. and Peña-Rodríguez, L.M. *J. Nat. Prod.*, 55, 1768 (1992).
23. Peraza-Sánchez, S.R., Salazar-Aguilar, N.E. and Peña-Rodríguez, L.M. *J. Nat. Prod.*, 58 271 (1995).
24. El Abbadi, N., Weniger, B.; Lobstein, A.; Quiron, J.C. and Anton, R. *Planta Med.*, 55 (1989).
25. Abd El-Hafiz, M.A.; Weniger, B.; Quiron, J.C. and Anton, R. *Phytochemistry*, 30, 2029 (1991).
26. Bhattacharya, J. and Cunha, E.V.L. *Phytochemistry*, 31, 2546 (1992).
27. Durbin, R.D. *Toxins in Plant Disease*. Academic Press. 1981.
28. Kohmoto, K. and Otani, H. *Experientia*, 47. 755 81991).
29. Nishima, S. and Kohmoto, K., *Ann Rev. Phytopathol.*, 21, 87 (1983).
30. Lynch, D.R.; Coleman, M.C. and Lyon, G.D. *Plant Cell Report*, 9, 607 (1991).
31. Pound, G.S. and Stahmann. *Phytopathology*, 83, 1104 (1951).
32. Pena-Rodríguez, L.M.; Armingeon, N.A. and Chilton, W.S. *J. Nat. Prod.*, 51, 821 (1988).
33. Starrat, A.N. *Can. J. Chem.*, 46, 767 (1968).
34. Ichihara, A.; Tazaki, H. and Sakamura, S. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2811 (1985).
35. Gamboa-Angulo, M.M.; Alejos-González, F. and Peña-Rodríguez, L.M. *J. Agric. Food Chem.*,  
Enviado.
36. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Morikawa, Y. and Nagatomo, S. *Phytochemistry*, 38, 495 (1995).