



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE TERPENOS PRESENTES EN EXTRACTOS ELABORADOS A PARTIR DE HOJAS MADURAS DE *MYROSPERMUM FRUTESCENS*

¹Héctor E. Montenegro M., ²Madelaine Aguilar, ³Dianeth Pineda

¹Universidad de Panamá; Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología.

hector.montenegro5@gmail.com

¹Universidad de Panamá; Laboratorio de Bioorgánica Tropical
Universidad de Panamá

³Universidad de Panamá; Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología.
Trabajo de graduación.

RESUMEN

Se realizó el aislamiento e identificación de un triterpeno y cuatro diterpenos de tipo cassano a partir del fraccionamiento del extracto de AcOEt/CH₃OH de hojas maduras de *Myrospermum frutescens*. Todos los compuestos aislados fueron evaluados para determinar su potencial antibacteriano frente a bacterias *Gram-positivas* y *Gram-negativas* mediante el método de antibiograma por disco difusión. Entre los compuestos ensayados, se observó que el compuesto 6 β ,13-dihidroxi-18-acetoxi-cassano-15,16-dieno (**4**), presentó mayor actividad contra *Staph. aureus* con halos de inhibición de 15, 16 y 17 mm para las cargas de 25, 50 y 75 μ g, respectivamente. Los valores registrados en relación a los rangos de sensibilidad para el control Gentamicina indicaron que esta bacteria presenta sensibilidad a este compuesto. Los compuestos Estigmasterol (**1**), 6 β -hidroxi-18-acetoxycassano-13,15-dieno (**2**), 6 β , -18-dihidroxycassano-13,15-dieno (**3**), y 6 β ,18,17-trihidroxycassano-13,15-dieno (**5**), presentaron actividad moderada, pero más baja en comparación con los controles positivos utilizados (Ampicilina y Gentamicina) en este ensayo.

PALABRAS CLAVES: Triterpeno, diterpeno, *Myrospermum frutescens*, cassano

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales aislados de plantas tienen relación con industrias como la farmacéutica, la biotecnológica, agro insumos, entre otros; reflejando el valor comercial cada vez mayor de los recursos biológicos y la vitalidad de la biodiversidad para la salud humana; calculándose que en la actualidad una cuarta parte de los productos farmacéuticos se basan en plantas o se derivan de ellas (Moran et al. 2001; Castree, 2003).

Los grupos que desarrollan actividades de investigación en bioprospección trabajan en la identificación y caracterización de principios que se podrían considerar bioactivos (actividad antiparasitaria, actividad antiinflamatoria, actividad antioxidante, producción de fitoalexinas, actividad citotóxica, actividad antifúngica, actividad antibacteriana y actividad antitumoral) (Duarte, 2009). Para las fases primeras se exploran una gran variedad de especies vegetales que se encuentran albergadas en su gran mayoría en los bosques lluviosos tropicales (Alarcón, 2010).

Entre las investigaciones realizadas en Panamá, se encuentran los trabajos realizados en el laboratorio de Biorgánica Tropical de la Universidad de Panamá, en los que el enfoque fue el aislamiento e identificación de compuestos terpénicos con posible aplicación para enfermedades parasitarias como Chagas y Leishmaniasis a partir de *Myrospermum frutescens* (Torres et al. 2003, 2004).

Resultados previos para *M. frutescens* reportaron el aislamiento e identificación de un triterpeno y cuatro diterpenos, a los cuales se les ha probado la actividad antibacteriana contra 16 bacterias de importancia hospitalaria, realizando una evaluación de sus potenciales actividades antibacterianas para ampliar el abanico de aplicaciones terapéuticas de estos compuestos (Figura 1).

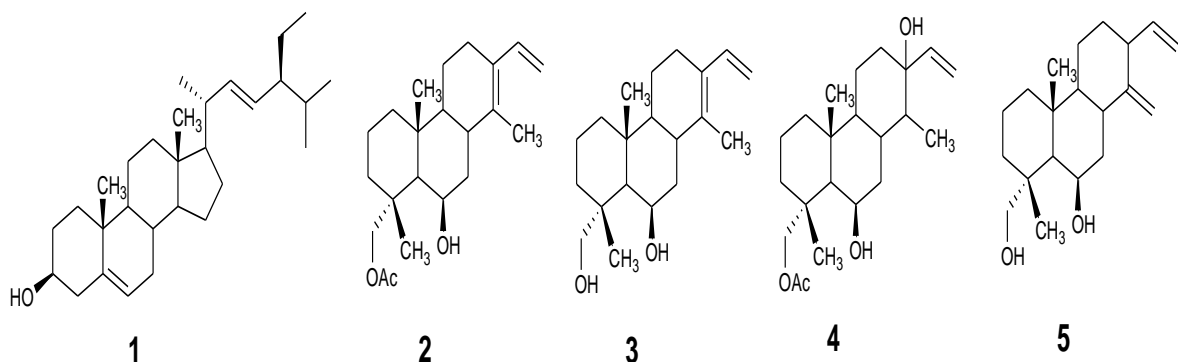


Figura 1. Estructuras de los terpenos aislados de hojas maduras de *Myruperмум frutescens*.

PARTE EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS TERPENOS

OBTENIDOS.

-Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar.

Preparación del estándar de turbidez

Se agregó 0.5 mL de una disolución de BaCl₂ (0.048 M) a 99.5 mL de una disolución de H₂SO₄ (0.18 M). Posteriormente, se verificó la densidad del estándar 0.5 Mcfarland con la ayuda de un espectrofotómetro que presentó valores de absorbancia comprendidos entre 0.08-0.10 a una longitud de onda de 625 nm. Finalmente se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente (22 °C - 26 °C).

Inoculación de los platos Petri

De un cultivo en placa incubado a 24 horas se seleccionaron entre cuatro y cinco colonias aisladas de la cepa, con ayuda de un asa, se transfirió a un tubo que contiene solución salina isotónica (85.0 %), luego se procedió a comparar visualmente con el tubo de solución 0.5 Mcfarland, preparado previamente, utilizando un contra fondo negro como contraste; esta suspensión contiene aproximadamente 1-2 x 10⁸ (UFC/mL).

Cada placa Petri de 45 mm con agar ATS (Agar Trypticasa y Soya) fue inoculada con 100 μ L de la dilución bacteriana, que, con ayuda de un hisopo estéril, se distribuyó homogéneamente sobre el medio. Se dejó secar el inóculo a temperatura ambiente dentro de la cámara de seguridad durante 15 minutos; posteriormente se colocaron los discos de difusión sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril, presionando suavemente sobre cada disco, para asegurar el contacto directo con la superficie del agar; cada disco se distribuye uniformemente de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm para evitar la superposición de las zonas de inhibición.

Una vez se colocaron todos los discos se procedió a colocar 15 μ L de una alícuota con cargas de 25, 50 y 75 μ g. Las placas se incubaron a 37 °C en una cámara de incubación durante 24 horas, luego se examinó cada plato Petri y se midieron los diámetros de inhibición, que se observaron alrededor de cada disco en cada plato y de la réplica para determinar la sensibilidad de las bacterias con respecto a los compuestos evaluados (Jorgensen et al. 2007).

Para esta prueba, utilizamos las siguientes cepas patogénicas: *Escherichia coli* (CECT 433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (CECT5050), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Enterococcus cloacae* (ATCC 13047), *Listeria monocytogenes* (CECT 935), *Proteus mirabilis* (CECT 4168T), *Pasteurella multocida* (CECT 962), *Salmonella enterica tiphy* (CECT 7161), *Salmonella enterica enterica* (CECT 7159), *Micrococcus luteus* (CECT 241), *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* (ATCC 13883), *Streptococcus oralis* (ATTC 35037), *Klebsiella pneumoniae ozaenae* (ATCC 11296), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) y *Shigella flexneri* (CECT 4804)].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de prueba de susceptibilidad de los compuestos obtenidos.

Los resultados obtenidos del análisis de actividad antibacteriana son presentados en la Tabla 1.

Discusión de prueba de susceptibilidad antibacteriana.

Al evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos obtenidos se observó que el compuesto (3), en función de su espectro, fue el que afectó el mayor número de bacterias; el mismo presentó halos de inhibición de 9, 10 y 11 mm para las cargas de 25, 50 y 75 µg, respectivamente contra *Staph. aureus*. Estos resultados parecen indicar que un aumento de 25 µg es directamente proporcional en un aumento de 1.0 mm de diámetro en el halo de inhibición para el caso de *Staph. aureus*. Por otro lado, para este mismo compuesto se observaron halos de inhibición parciales entre 9.0 mm y 10 mm para *Ent. fecalis*, *L. monocytogenes*, *Past. multocida*, *M. luteus* y *Ent. cloacae*.

En el caso del compuesto (2), fue el segundo en afectar el mayor número de bacterias, inhibiendo el crecimiento de 2 de las 16 evaluadas, el mismo presentó halos de inhibición entre 7.5 y 9.5 mm los cuales en relación a los controles positivos (Ampicilina y Gentamicina) indican resistencia para ambas bacterias a pesar de presentar halos de inhibición totales.

En relación al compuesto (4) la única bacteria inhibida por este compuesto fue *Staph. aureus* el cual presentó halos de inhibición de 15, 16 y 17 mm para las concentraciones de 25, 50 y 75 µg, respectivamente. Estos valores con relación a los rangos de sensibilidad para el control Gentamicina indican que esta bacteria presenta sensibilidad a este compuesto. El compuesto (5) registró actividades con halos de inhibición parciales entre 8.5

Tabla 1. Actividad antibacteriana de los compuestos aislados de *Myrospermum frutescens*, mediante el antibiograma de disco difusión.

Compuestos evaluados	MF2-64-004			MF2-63-005			MF2-58-002			MF2-57-002			Control	Control	Rangos		Rangos			
	(2)			(3)			(4)			(5)			(A+1)	(G+2)	(A+1)	(G+2)	(A+1)	(G+2)		
(µg)	25	50	75	25	50	75	25	50	75	25	50	75	10	10	10	10				
Bacterias																	R≤	S≥	R≤	S≥
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	9.0	10	11	15	16	17	8.5*	8.5*	10*	28	18.7	12	26	12	15		
<i>Bacillus cereus</i>	7.5*	7.5	8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	18	5	10	10	15		
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	9.0*	9.0*	10*	-	-	-	-	-	-	23	11.7	16	17	6	10		
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	9.0*	9.0*	-	-	-	-	8.5*	9.0*	31	22	11	14	12	15		
<i>Pasturella multocida</i>	-	-	-	-	9.5*	10.5*	-	-	-	-	-	-	22	10.6	29	30	12	15		
<i>Micrococcus luteus</i>	9.5	9.5	9.5	9.0*	9.0*	10	-	-	-	-	-	-	50	30	14	15	19	20		
<i>Enterococcus cloacae</i>	-	-	-	-	9.0*	10*	-	-	-	-	-	-	22	11	16	17	6	10		

1. Halo de inhibición en (mm) 2. (*) Indican halos parciales.

y 10 mm para *Staph. aureus* y *L. monocytogenes*. El compuesto (1) fue el único que no registró actividad con ninguna de las cepas evaluadas.

En función de la relación estructura (grupos funcionales presentes en los compuestos) y la actividad antibacteriana; para el caso del compuesto (2) en relación al compuesto (3) para efecto del número de bacterias inhibidas, es probable que el sólo reemplazo del grupo hidroxilo por un grupo acetyl en C-18 parece conferirle la actividad para un mayor número de bacterias; sin embargo, si comparamos éste mismo compuesto (3) con el compuesto (4) se puede observar que la presencia de un grupo hidroxilo (-OH) en el C-13 disminuye la actividad, reduciéndola a inhibir solo una bacteria (*Staph. aureus*) pero a su vez ésta inhibición es la única, significativamente efectiva, al compararla contra uno de los controles positivos evaluados (Gentamicina).

No obstante, para el caso del compuesto (5) con el compuesto (4), la presencia del doble enlace en C-14 y C-17 y el grupo hidroxilo (OH) en el C-18 a diferencia del compuesto (4) que presenta un grupo acetyl parece disminuir la actividad frente *Staph. aureus*.

CONCLUSIÓN

La evaluación de la actividad antibacteriana mediante disco difusión reveló que los compuestos 1, 2, 3 y 5 presentaron actividades mucho más bajas en comparación con los controles positivos Ampicilina y Gentamicina. Mientras, que el compuesto 4 fue el compuesto que registró halos de inhibición entre 15 y 17 mm para *Staphylococcus aureus* el cual en relación al control positivo Gentamicina indica que esta bacteria presenta sensibilidad a este compuesto.

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TERPENES PRESENT IN EXTRACTS
PREPARED FROM MATURE LEAVES OF *MYROSPERMUM FRUTESCENS***

SUMMARY

Isolation of a triterpene and four diterpenes of the cassano type was performed from the fractionation of the AcOEt / CH₃OH extract of mature leaves of *Myrospermum frutescens*. All the isolated compounds were evaluated to determine their antibacterial potential against Gram-positive and Gram-negative bacteria by the diffusion-disk antibiogram method. Among the compounds tested, it was observed that the compound 6 β ,13-dihidroxi-18-acetoxi-cassano-15,16-diene (**4**) showed higher activity against *Staph. aureus* with inhibition halos of 15, 16 and 17 mm for the loads of 25, 50 and 75 μ g, respectively. The values registered in relation to the sensitivity ranges for the Gentamicin control indicated that this bacterium shows sensitivity to this compound. Compounds Estigmasterol (**1**), 6 β -hidroxi-18-acetoxycassano-13,15-diene (**2**), 6 β , -18-dihidroxicassano-13,15-dieno (**3**), and 6 β ,18,17-trihidroxicassano-13,15-dieno (**5**), showed moderate activity, but lower compared to the positive controls used (Ampicillin and Gentamicin) in this trial.

KEYWORDS: Triterpene, diterpene, *Myrospermum frutescens*, cassane, antibacterial.

BIBLIOGRAFÍA

MORAN, K., KING, S. R. y CARLSON, T. J. (2001). Biodiversity Prospecting: Lessons and Prospects. *Annual Review Anthropology*, 30: 505–526.

CASTREE, N. (2003). Bioprospecting: from theory to practice (and back again). *Transactions of the Institute of British Geographers*, 28: 35-55.

DUARTE, O. T. (2009). La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ciência da Informação*, 38(3):96-110.

ALARCON, R. R. L. (2010). La biopiratería de los recursos de la medicina indígena tradicional en el estado Chiapas, México. *Pueblos y Fronteras Digital*, 6(10): 151-180.

JORGENSEN, J. H., HINDLER, L. B., BARTHRELLER, L. y WEINSTEIN, M. P. (2007). New Consensus Guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 44: 280-286.

TORRES, D., UREÑA, L., ORTEGA, E., CAPSON, T. y CUBILLA, L. (2003). Five New Cassane Diterpenes from *Myrospermum frutescens* with Activity against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Natural Products*, 66: 928-932.

TORRES, D., UREÑA, L., ORTEGA, E., CAPSON, T., COLEY, P., KURSAR, T., MACPHAIL, K., y CUBILLA, L. (2004). Novel Cassane and Cleistanthane Diterpenes from *Myrospermum frutescens*: Absolute Stereochemistry of the Cassane Diterpene Series. *Journal of Natural Products*, 67:1711-1715.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Laboratorio de Bioorgánica Tropical de la Universidad de Panamá y a SENACYT por el financiamiento de esta investigación.