

Propiedades antibacterianas *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae)

Antibacterial properties *in vitro* of secondary metabolites isolated from two species of *Zanthoxylum* (Rutaceae) genus

Oscar Javier Patiño Ladino^I, Juliet Angélica Prieto Rodríguez^{II}, José Manuel Lozano Moreno^{III}, Liliana Lesmes Sarmiento^{IV}, Luís Enrique Cuca Suárez^V

^I Químico. Doctor en Ciencias Química. Investigador Auxiliar. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

^{II} Química. Investigadora Auxiliar. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

^{III} Químico. Doctor en Ciencias Química. Investigador. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia. Bogotá, Colombia.

^{IV} Bacterióloga. Investigadora. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia. Bogotá, Colombia.

^V Químico. Doctor en Ciencias Química. Profesor Titular. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Actualmente las enfermedades infecciosas originadas por diferentes microorganismos, son una de las mayores causas de muerte a nivel mundial, razón por la que la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos se ha hecho indispensable, y los productos naturales han constituido una de las fuentes potenciales para encontrar compuestos antimicrobianos. Las especies del género *Zanthoxylum* se caracterizan por presentar diversos tipos de metabolitos secundarios, muchos de los cuales han mostrado interesantes propiedades biológicas contra diversos microorganismos patógenos humanos. El objetivo de esta investigación consistió en evaluar la actividad antibacteriana de 21 sustancias aisladas de 2 especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae). La actividad fue determinada por el método de difusión radial en agar contra cepas de bacterias estándar grampositivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y gramnegativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium*, cepas ATCC 14028s y MS7953. De las 21 sustancias naturales evaluadas, 11 causaron algún grado de

inhibición del crecimiento bacteriano. El alcaloide benzofenantridínico queleritrina presentó la mayor actividad, e inhibió el crecimiento de las 5 cepas con halos de inhibición comparables o superiores a los mostrados por los antibióticos empleados como controles positivos. Los alcaloides isoquinolínicos en general, son las sustancias más promisorias para continuar con estudios más específicos de actividad antibacteriana, pues además de presentar una actividad interesante, algunas de estas sustancias inhiben tanto el crecimiento de bacterias grampositivas como el de bacterias gramnegativas, lo cual indica que son sustancias que presentan actividad antibacteriana de amplio espectro.

Palabras clave: *Zanthoxylum*, Rutaceae, alcaloides, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Currently, infectious diseases caused by different microorganisms are one of major causes of death worldwide, so the search for new antimicrobial agents has become indispensable, being the natural products one potential source to find antimicrobial compounds. The species of *Zanthoxylum* genus are characterized by different types of secondary metabolites, many of which exhibit interesting biological properties against several human pathogens. In this research work, the antibacterial activity of 21 substances isolated from two species of *Zanthoxylum* (Rutaceae) genus was evaluated. It was determined by agar radial diffusion method against standard strains of Gram (+) bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and Gram (-) bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella tiphymurium*, strains ATCC 14028s and MS7953. Of the 21 natural substances evaluated, 11 caused some degree of bacterial growth inhibition. The benzophenanthridine alkaloid called chelerythrine showed the greatest antibacterial activity when inhibiting the growth of five strains with inhibition zones comparable or superior to those exhibited by the antibiotics used as positive controls. Isoquinoline alkaloids are the most promising substances for further specific studies of antibacterial activity; in addition to their interesting action, some of these substances are able to inhibit the growth of Gram (+) and Gram (-) bacteria, thus indicating their broad spectrum antibacterial action.

Key words: *Zanthoxylum*, Rutaceae, alkaloids, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales se han utilizado por miles de años para el beneficio de la humanidad, ya sea para alimentos, ropa, cosméticos, construcciones, herramientas, como medicamentos y agentes de protección de cultivos. Han hecho enormes contribuciones a la salud humana a través de compuestos como la quinina, la morfina, la aspirina (un análogo de un producto natural), digitoxina y muchos otros.¹ Las investigaciones en este campo son cada vez más numerosas, a tal punto que en los últimos años más de la mitad de los productos farmacéuticos usados son derivados de fuentes naturales.² La importancia de los productos naturales se debe a que son fuente de nuevos compuestos por la producción de diversos metabolitos secundarios bioactivos de las plantas e invertebrados marinos como defensa química, han proporcionado muchos medicamentos nuevos, algunos de los cuales

son inaccesibles por otras vías y porque estos pueden proporcionar las plantillas necesarias para el diseño de nuevos productos en el futuro.^{1,3,4}

Las necesidades terapéuticas insatisfechas en el tratamiento de infecciones bacterianas, parasitarias, virales y fúngicas, el cáncer, el Alzheimer y el SIDA, entre otras enfermedades, han llevado a que la búsqueda de nuevas sustancias con aplicaciones terapéuticas sea indispensable, pues si bien para la mayoría de enfermedades existe algún tratamiento, muchos de estos son o han empezado a ser insuficientes debido al desarrollo de resistencia a los fármacos y a la baja seguridad que muchos medicamentos presentan para los pacientes. En consecuencia, el desarrollo de alternativas terapéuticas, eficaces y seguras, es esencial para garantizar la disponibilidad de nuevos productos que reduzcan la mortalidad y morbilidad derivadas de estas y otras enfermedades.⁵⁻⁸

Las infecciones causadas por bacterias se han convertido en una de las enfermedades más difíciles y costosas de tratar, debido a la aparición de nuevas enfermedades, al resurgimiento de infecciones que parecían haber sido controladas y al aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos.^{9,10}

Si bien la resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural que está en continua evolución, esta se ha convertido en un importante problema de salud pública a nivel mundial, pues las bacterias se han adaptado rápidamente a diferentes agentes antimicrobianos debido a su inadecuado uso en medicina, en la alimentación de animales, en producción de cultivos y en productos de aseo.¹⁰⁻¹⁴ La rápida propagación de multirresistencia en cepas bacterianas ha generado investigaciones dirigidas hacia la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos.

Las especies del género *Zanthoxylum* tienen gran importancia a nivel etnobotánico, fitoquímico y de actividad biológica. A nivel etnobotánico se reporta que diversas especies del género han sido utilizadas en distintas partes del mundo para el tratamiento de un sinnúmero de afecciones en humanos y animales;¹⁵⁻¹⁹ a nivel de actividad biológica se ha comprobado que algunos extractos y metabolitos secundarios aislados de especies de este género han mostrado interesante actividad antibacteriana, antifúngica, insecticida, citotóxica, antitumoral, antiparasitaria y antioxidante;¹⁷⁻¹⁹ y a nivel fitoquímico estas especies se reconocen como una fuente promisoría de alcaloides entre los que se destacan los benzofenantridínicos.¹⁸⁻²⁰ Siendo Colombia uno de los países con mayor biodiversidad y en donde se encuentra un número importante de especies pertenecientes al género *Zanthoxylum*, hacen de este país un lugar atractivo para emprender estudios multidisciplinarios que involucren diversas áreas como fitoquímica y farmacología, entre otras.

El objeto del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios aislados de *Z. monophyllum* y *Z. quinduense* y contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de dichas sustancias.

MÉTODOS

Material vegetal

La especie *Z. monophyllum* (Lam.) P. Wilson (COL-517520) fue recolectada en febrero de 2007 en el municipio de San Bernardo, Departamento de Cundinamarca. La muestra fue determinada por Adolfo Jara Muñoz. La especie *Z. quinduense* Tul. (COL-511101) fue recolectada y determinada en septiembre de 2005 en el

municipio de Albán, Departamento de Cundinamarca por Zaleth Cordero. Un espécimen de cada especie reposa el Herbario Nacional de Colombia del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.

Extracción, aislamiento e identificación de los compuestos

Los extractos etanólicos de corteza y madera de *Zanthoxylum quinduense* y corteza de *Z. monophyllum* fueron obtenidos a partir del material vegetal seco y molido, empleando maceración como método de extracción y como solvente etanol al 96 %. Mediante el uso de la metodología convencional utilizada en productos naturales vegetales, se aislaron e identificaron 21 sustancias como resultado del estudio fitoquímico parcial de los extractos etanólicos de madera y corteza de *Z. quinduense* y corteza de *Z. monophyllum*. Los metabolitos aislados corresponden a triterpenos, cumarinas, lignanos, bencenoides y alcaloides.^{19,21-23}

Cepas bacterianas

Se emplearon cepas de bacterias estándar grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y gramnegativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028s y MS7953 (cepa bacteriana mutada menos virulenta que la cepa madre *S. typhimurium* ATCC 14028s)). Las bacterias se mantienen en medio de agar nutritivo a 37 °C

Ensayo de actividad antibacteriana por el método de difusión radial

La actividad antibacteriana cualitativa de los compuestos aislados y sintetizados fue evaluada frente a las 5 cepas bacterianas por la técnica de difusión radial en agar.²⁴ Para el ensayo las muestras se prepararon disolviendo 1 mg de compuesto puro en 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO); 8 µL de la solución se aplican por duplicado. Para determinar la actividad antibacteriana se mide el diámetro del halo formado por cada compuesto. En el ensayo se utilizaron como controles positivos los antibióticos ampicilina (50 mg/mL), kanamicina (10 mg/mL) y tetraciclina (4,12 mg/mL) en una dilución 1:100 en solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) y como controles negativos se emplearon DMSO y PBS, aplicando 8 µL de cada uno por pozo. El diámetro de las zonas claras o halos de inhibición de crecimiento bacteriano causado por el compuesto en análisis se midió en milímetro y los resultados son reportados como halos de inhibición.

RESULTADOS

Los resultados de actividad antibacteriana se resumen en la tabla, en donde se reportan como halos de inhibición que están ordenados y diferenciados por colores de acuerdo con el origen de las sustancias. De las 21 sustancias ensayadas, 11 mostraron algún grado de inhibición del crecimiento frente a por lo menos una de las 5 cepas bacterianas. Los compuestos de origen natural, mostraron una tendencia a inhibir selectivamente el crecimiento de bacterias grampositivas y no el de bacterias gramnegativas.

Los alcaloides naturales queleritrina, la mezcla de N-metiltetrahydrocolumbamina con N-metiltetrahidropalmatina y berberina fueron las sustancias más promisorias

contra las bacterias grampositivas y gramnegativas; queleritrina resultó el compuesto más activo, con valores de halos de inhibición entre 8,5 y 10,3 mm, presentando una actividad antibacteriana comparable con la de los 3 antibióticos empleados como controles positivos a la dosis evaluada. Las demás sustancias activas corresponden a (-)-6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina, (-)-isotembetarina, (-)-xylopinidina, norqueleritrina, decarina, berberina, xanthoxylina, (-)-columbianetina, (+)-marmesina, y la mezcla de N-metiltetrahidrocolumbamina y N-metiltetrahidropalmatina, las cuales presentaron valores de halos de inhibición iguales o superiores a 3 mm.

Tabla. Resultados de actividad antibacteriana para las sustancias naturales

Sustancia	Halos de inhibición (mm)				
	A	B	C	D	E
(-)-6-acetonildihidroqueleritrina	-	3,0	-	-	3,0
p-hidroxibenzaldehído	-	-	-	-	-
Ácido vainillínico	-	-	-	-	-
Evofolina-C	-	-	-	-	-
(-)-6-carboximetildihidroqueleritrina	-	-	-	-	-
Queleritrina	10,3	8,8	8,5	10,0	10,3
Mezcla N-metiltetrahidrocolumbamina y N-metiltetrahidropalmatina	3,0	4,0	3,0	-	3,5
(-)-isotembetarina	3,0	3,5	-	-	-
(-)-xylopinidina	-	3,0	-	-	-
Norqueleritrina	-	3,0	-	-	-
(+)-siringaresinol	-	-	-	-	-
Decarina	3,5	3,5	-	-	-
Lupeol	-	-	-	-	-
Nornitidina	-	-	-	-	-
Berberina	4,0	3,5	3,5	3,5	5,5
Xanthoxylina	3,0	4,0	-	-	-
4,6-dimetoxi-2-hidroxibenzaldehído	-	-	-	-	-
(-)-hinokinina	-	-	-	-	-
(-)-columbianetina	3,0	3,5	-	-	-
(+)-marmesina	3,5	3,5	-	-	-
(+)-ulopterol	-	-	-	-	-
Tetraciclina	9,0	9,0	10,0	11,0	0
Antraciclina	12,0	11,0	7,0	16,0	14,0
Kanamicina	9,0	6,0	9,0	8,0	9,0

A: *S. aureus*, B: *E. faecalis*, C: *E. coli*, D: *S. typhimurium* ATCC 14028s, E: *S. typhimurium* MS7953.

DISCUSIÓN

Entre los compuestos activos contra las diferentes cepas bacterianas empleadas en esta investigación se encuentran cuatro alcaloides benzofenantridínicos, dos alcaloides bencilisoquinolínicos, un alcaloide berberínico, una mezcla de dos alcaloides protoberberínicos, dos cumarinas y un bencenoide, lo que indica que los alcaloides isoquinolínicos en general son las sustancias más promisorias para continuar con estudios más específicos de actividad antibacteriana, pues además de

presentar una actividad interesante, algunas de estas sustancias inhiben tanto el crecimiento de bacterias grampositivas como el de bacterias gramnegativas, lo cual indica que son sustancias que presentan actividad antibacteriana de amplio espectro.

En cuanto a los compuestos evaluados en este trabajo y que presentaron alguna tendencia a inhibir el crecimiento de alguna cepa bacteriana, solo se han reportado algunos estudios de actividad antibacteriana para los alcaloides (-)-6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina y berberina. Para el alcaloide (-)-6-acetonildihidroqueleritrina se ha reportado que no posee actividad antibacteriana sobre las cepas *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella setubal*.²⁵ A queleritrina se le ha determinado actividad contra *Mycobacterium aurum*, *M. smegmatis* y *M. bovis*,^{26,27} así como contra algunas cepas grampositivas y gramnegativas, dentro de las cuales se encuentran las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.²⁵ Finalmente, a berberina se le han determinado que presenta promisorio actividad contra diversas cepas bacterianas, incluidas *S. aureus* y *E. coli*.^{28,29} Los resultados obtenidos en estas investigaciones sobre las cepas *S. aureus* y *E. coli*, concuerdan con los encontrados en este trabajo.

La actividad antibacteriana preliminar mostrada por varios de los compuestos evaluados está de acuerdo con los usos etnobotánicos dados para diferentes especies del género *Zanthoxylum*,^{15,17} y los hace promisorios para continuar con ensayos de actividad biológica más específicos, que permitan obtener resultados más completos, a fin de determinar si estas sustancias pueden llegar a convertirse en nuevos antibióticos y/o en compuestos plantilla para el diseño de nuevos medicamentos antibacterianos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia y a Colciencias por la financiación del trabajo y a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por la colaboración en los ensayos de actividad antibacteriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ, editors. Anticancer agents from natural products. New York: Taylor & Francis Group; 2005: 1-3.
2. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007; 70: 461-77.
3. Colegate SM, Molyneux RJ. An introduction and overview. En: Colegate SM, Molyneux RJ, editors. Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination. 2nd. ed. New York: CRC Press; 2008. p. 1-3.
4. Kaufman PB, Kirakosyan A, McKenzie M, Dayanandan P, Hoyt JE, Li C. The uses of plant natural products by humans and risks associated with their use. En: Cseke L, Kirakosyan A, Kaufman P, Warber S, Duke J, Brielmann H, editors. Natural products from plants. New York: CRC Taylor & Francis; 2006. p. 442-68.
5. Pan L, Chay H, Kinghorn AD. The Continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem Lett*. 2010; 3: 1-8.

6. Nwaka S, Hudson A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Rev Drug Discov*. 2006;5:941-55.
7. Segal E, Elad D. Fungal vaccines and immunotherapy. *J Mycol Med*. 2006;16:134-51.
8. Waldvogel F. Infectious diseases in the 21st century: old challenges and new opportunities. *Int J Infect Dis*. 2004;8:5-12.
9. Valgas C, Machado de Souza S, Smania E, Smania A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol*. 2007;38:369-80.
10. Patrick G. An Introduction to medicinal chemistry. 2nd. ed. New York: Oxford University Press; 2001. p. 429-31.
11. Biswas S, Roul D, Rolain JA. Bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *Int J Antimicrob. Ag*. 2008;32:207-20.
12. Lobova T, Barkhatov Y, Salamatina O, Popova L. Multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in the littoral zone of lake shira as an indicator of human impact in the ecosystem. *Microbiol Res*. 2008;163:152-60.
13. Nuñez B, Salazar R. Uso racional de antibióticos. Módulo 2. Línea antibiótica-Bristol Mayers Squibb. Quito: Universidad Central de Ecuador; 2005. p. 4-5.
14. Benin AL, Dowell SF. Antibiotic resistance and implications for the appropriate use of antimicrobial agents. En: Mainous A, Pomeroy C, editors. Management of antimicrobials in infectious diseases: impact of antibiotic resistance. New York: Humana Press; 2001. p. 13-8.
15. McGaw LJ, Lall N, Meyer JJM, Eloff JN. The potential of south african plants against *Mycobacterium* infections. *J Ethnopharmacol*. 2008;119:482-500.
16. Rochfort S, Parker AJ, Dunshea FR. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 2008;69:299-322.
17. Adesina SK. The Nigerian *Zanthoxylum*: chemical and biological values. *Afr J Trad CAM*. 2005;2:282-301.
18. Dieguez-Hurtado R, Garrido-Garrido G, Prieto-González S, Iznaga Y, González L, Molina-Torres J, Curini M, et al. Antifungal activity of some cuban *Zanthoxylum* species. *Fitoterapia*. 2003;74:384-86.
19. Patiño OJ, Cuca LE. Alcaloides Benzofenantridínicos de *Zanthoxylum quinduensis*. *Rev Colomb Quim*. 2004;33:13-20.
20. Waterman PG, Grundon MF. Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales. London: Academic Press; 1983.
21. Patiño OJ, Cuca LE. Isoquinoline alkaloids of *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). *Biochem Sys Ecol*. 2010;38:853-6.
22. Patiño OJ, Cuca LE. Chemical constituents of the wood of *Zanthoxylum quinduense* Tul. (Rutaceae). *Quim Nova*. 2010;33:1019-21.

23. Cuca LE, Martinez JC, Monache FD. Constituyentes químicos de *Zanthoxylum monophyllum*. Rev Colomb Quim. 1998;27:17-27.
24. Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SSSL, Jackson R, Eisenhauer P. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. J Immunol Methods. 1991;137:167-73.
25. Weber AD. Estudo fitoquímico e da actividade biológica de *Zanthoxylum rhoifolium*. Tesis de Maestría. Centro de Ciencias Naturais e Exatas. Santa Maria, RS, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria; 2005. p. 116-21.
26. Okunade AL, Elvin-Lewis MPF, Lewis WH. Natural antimycobacterial metabolites: current status. Phytochemistry. 2004;65:1017-32.
27. Newton SM, Lau C, Gurcha SS, Bersa GS, Wright CW. The evaluation of forty-three plant species for *in vitro* antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. J Ethnopharm. 2002;79:57-67.
28. Wang X, Yao X, Zhu Z, Tang T, Dai K, Sadovskaya I, Flahaut S, Jabbouri S. Effect of berberine on *Staphylococcus epidermis* biofilm formation. Int J Antimicrob Agents. 2009;34:60-6.
29. Iwasa K, Kamigauchi M, Ueki M, Taniguchi M. Antibacterial activity and structure-activity relationships of berberine analogs. Eur J Med Chem. 1996;3:469-78.

Recibido: 28 de febrero de 2011.

Aprobado: 15 de abril de 2011.

Dr. C. *Oscar Javier Patiño Ladino*. Universidad Nacional de Colombia. KR. 30 No. 45-03. Bogotá, Colombia. Correo electrónico: ojpatinol@unal.edu.co