

PRODUCTO NATURAL

Aislamiento y caracterización de la fracción hexánica de las hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. con actividad antifúngica

Isolation and characterization of hexane fraction from *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob leaves with antifungal action

MSc. Patricia Manzano Santana,^I Dra. Cs. Migdalia Miranda Martínez,^{II} Lic. Cristian Paz Robles,^{III} Dr. Cs. Juan Abreu Payrol,^{II} Dr. Mario Silva Osorio,^{III} Dr. Víctor Hernández Santander^{III}

^I Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la ESPOL (CIBE). Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Guayaquil, Ecuador.

^{II} Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana. Cuba.

^{III} Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción. Santiago de Chile, Chile.

RESUMEN

Introducción: la medicina folclórica ecuatoriana, utiliza las cocciones de las hojas de *Vernonanthura pathens* (Kunth H. Rob), para combatir entre otras, paludismo, dolores pre y posparto, estomacales, erupciones de piel, diarreas y parásitos.

Objetivos: examinar la presencia de actividad antifúngica en fracciones obtenidas de un extracto metanólico de las hojas de *V. patens*.

Métodos: el extracto metanólico de hojas se fraccionó por columna cromatográfica empleando los siguientes sistemas de disolventes: hexano, hexano/acetato de etilo, acetato de etilo y acetato de etilo/metanol. La actividad antifúngica se midió mediante la técnica de difusión en agar con medio (potato dextrosa agar) PDA, en pocillos de 5 mm de diámetro, adicionando 20 µL de las fracciones en concentraciones de 100 y 200 µg/mL disueltas en dimetilsulfóxido. La fracción activa fue analizada para su identificación estructural por cromatografía gaseosa-spectrometría de masas.

Resultados: de las fracciones obtenidas solo presentó actividad antifúngica la fracción de hexano al 100 %, con porcentajes de inhibición del 57,6 y 80,2 % frente a *Penicillium notatum*, y 64,8 y 81,5 % frente a *Fusarium oxysporum*, a los

quince días de incubación. Se propusieron las estructuras de 29 compuestos como constituyentes de la fracción hexánica, los que en su mayoría, son hidrocarburos. **Conclusiones:** se comprobó la presencia de actividad antifúngica en la fracción de hexano al 100 %, lo que puede incrementar el arsenal de usos medicinales de la planta estudiada y enriquecer la medicina folclórica ecuatoriana.

Palabras clave: *Vernonanthura patens*, laritaco, *Penicillium notatum*, *Fusarium oxysporum*, antifúngico.

ABSTRACT

Introduction: the Ecuadorian folk medicine uses the coction from *Vernonanthura pathens* (Rob H. Kunth) leaves to treat, malaria, pain before and after childbirth, stomachache, skin rashes, diarrheas and parasitism.

Objectives: to examine the presence of antifungal activity in fractions obtained from a methanol extract from *V. patens* leaves.

Methods: the methanol extract from the leaves was fractionated by column chromatography using the following solvent systems: hexane, hexane/ethyl acetate, ethyl acetate and ethyl acetate/methanol. Antifungal activity was measured by the agar diffusion technique with PDA medium in 5 mm wells, by adding 20 µL fractions at concentrations of 100 and 200 µg/mL dissolved in dimethylsulfoxide. The active fraction was analyzed for structural identification by gas chromatography-mass spectrometry.

Results: of the fractions obtained, only the 100% hexane fraction showed antifungal activity, since its inhibitory percentages were 57.6 and 80.2 % against *Penicillium notatum* and 64.8 and 81.5 % vs. *Fusaryum oxysporum* on the fifteenth day of incubation. The structures of 29 compounds were suggested to be the constituents of the hexane fraction, most of them hydrocarbons.

Conclusions: the presence of antifungal activity in the 100 % hexane fraction was proved, which can extend the medicinal uses of the studied plant and to enrich the Ecuadorian folk medicine.

Key words: *Vernonanthura patens*, laritaco, *Penicillium notatum*, *Fusarium oxysporum*, antifungal.

INTRODUCCIÓN

Vernonanthura patens (Kunth) H. Rob, antiguo binomio *Vernonia pathens* (Kunth H. Rob),¹ Asteraceae, se trata de un arbusto silvestre originario de Sudamérica, distribuido desde el sur de México hasta el río de La Plata.^{2,3} La medicina folclórica utiliza las cocciones de sus hojas para combatir el paludismo, los dolores pre y posparto, los estomacales, las erupciones en la piel, las diarreas y como antihelmíntico.^{4,5} Se registra además, una práctica veterinaria, que consiste en curar heridas infectadas en animales, mediante el lavado con mezclas de plantas en las que se incluyen a las hojas de la especie que nos ocupa.⁶

Los pobladores de Loja, en la zona sur-oeste de Ecuador, emplean esta planta para lavar heridas, dadas sus propiedades cicatrizantes, así como también, contra el dolor de cabeza en humanos, atendiendo a su acción analgésica. En el Cantón Marcabeli, provincia del Oro, es muy utilizada como antiinflamatorio, para calmar la tos y para combatir ciertos tipos de cáncer. Gacheta y otros, reporta su uso en el tratamiento de leishmaniasis;⁷ Tene y otros, la emplean en la preparación de suero antiofídico.⁸ Las hojas, en forma de cataplasma, se usan para combatir el pie de atleta.⁹

Sobre la composición química de la especie, se informa la ausencia de lactonas sesquiterpénicas y la presencia de hidrocarburos sesquiterpenos en las partes aéreas^{10,11} y respecto a su actividad biológica, se notifica la actividad antimarialárica de los extractos acuosos contra *Plasmodium falciparum*⁵ y la ausencia de actividad antiprotozoaria, frente a diferentes cepas de *Leishmania*,¹² sin especificar los compuestos responsables de dicha actividad.

Se destacan, sin embargo, diferentes estudios de otras especies del género *Vernonanthura* en los que se ha demostrado la actividad diurética, hipotérmica, respiratoria, cardiovascular, antioxidante, antidiabética, antimarialárica^{5,8} y antibacteriana, efecto inhibidor de cepas de: *Staphylococcus aureus*^{9,13} y *Pseudomonas aeruginosa*;¹⁴ como inhibidor en la producción de células HeLa,¹⁵ y también sus propiedades antifúngicas^{5,16} y antimolusquicida.^{9,13} En todos los estudios se ha hallado la presencia de sequisterpenos lactónicos,^{5,8-16-20} diterpenos,^{9,15} flavonoides,^{17,21} triterpenos^{22,23} y saponinas¹⁷ que podrían ser los posibles grupos químicos responsables de las actividades terapéuticas atribuidas a estas especies.

Sería importante explorar la actividad antifúngica de *V. patens* (Kunth) H. Rob., acción farmacológica desconocida en la especie propia de la región ecuatoriana y ofrecer la posibilidad de incrementar los usos medicinales de la planta.

Para logro del objetivo se realizó el fraccionamiento de un extracto metanólico de las hojas de *V. patens* mediante cromatografía en columna y se midió la actividad antifúngica de las fracciones mediante la técnica de difusión en agar, frente a cepas de *Penicillium notatum* y *Fusarium oxysporum* y por último, se caracterizó químicamente, la fracción que mostró actividad biológica como antifúngica respecto a estas cepas.

MÉTODOS

Se trabajó con hojas adultas de *V. patens* (laritaco) en estado vegetativo estéril, recolectadas en horas de la mañana entre diciembre de 2009 y febrero de 2010, en las ciudadelas 25 de Julio, Imbabura y 24 de Junio del Cantón Marcabeli, en la provincia del Oro, Ecuador.

Una muestra del material vegetal se tomó para la identificación botánica en el Herbario Nacional del Ecuador QCNE Quito. Se conserva un testigo herbario (CIBE37) en el Laboratorio de Bioproductos del CIBE-ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

Las hojas se secaron en estufa con recirculación de aire a temperatura de 45 °C durante 48 h. Posteriormente se pulverizaron en un molino de cuchillas y se tamizaron. Se recolectó la fracción que permaneció en el tamiz equivalente a 2 mm de diámetro.

Se sometieron a tres extracciones 67 g de la droga seca mediante sucesivas maceraciones con metanol puro en recipiente cerrado, con agitación y en ausencia de luz. El tiempo total de extracción fue de 8 días (4 días la primera extracción y 2 días cada una de las restantes). El extracto se sometió a la acción de un evaporador rotatorio hasta lograr el secado y obtener un residuo de 7 g. Este residuo fue sometido a fraccionamiento mediante columna cromatográfica de 50 cm de largo y 3 cm de diámetro, empaquetada con 50 g de sílice activada de 60 a 200 Mesh, la elución se realizó con los siguientes disolventes de orden creciente de polaridad: hexano, hexano/acetato de etilo 90:10, 80:20 y 30:70 (v/v), acetato de etilo y acetato de etilo/metano 70:30 (v/v).

Para medir la actividad antifúngica se aplicó un diseño al azar, con el empleo de la técnica de difusión en agar, en placas con medio PDA (potato dextrosa agar), adicionando en pocillos de 5 mm de diámetro, 20 mL de las fracciones obtenidas en concentraciones de 100 y 200 mg/mL disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) y 20 mL de DMSO, disolvente utilizado como control negativo; se realizaron tres repeticiones.

Las evaluaciones fueron efectuadas a los 15 y 21 días de incubación a 22 °C. La actividad se expresó en porcentaje de inhibición (%). La cepa de *F. oxysporum* fue aislada de *Pinus radiata*, planta a raíz desnuda, viveros; y, la de *P. notatum* de naranja, frutales de la octava región de la República de Chile.

Con los datos obtenidos de la actividad antifúngica, se realizó la estadística descriptiva básica, para determinar las medidas de tendencia central y dispersión. Para obtener diferencias estadísticas significativas, se empleó el análisis de varianza y la prueba a posteriori de Tukey.

La fracción aislada fue analizada para su identificación estructural por cromatografía de gas-espectrometría de masas (CG-EM), utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7890A con detector Agilent 5975 (Avondale, PA.USA), equipado con una columna HP-5MS de 5 m de largo (0,25 mm de diámetro y 0,25 mm de diámetro interior). Como gas portador se empleó helio de grado electrónico y las condiciones de análisis fueron las siguientes: temperatura inicial: 100 °C por 3 min, incrementándose 8 °C por min hasta una temperatura final de 250 °C manteniendo por 10 min; temperatura del inyector y del detector de masas: 250 y 300 °C respectivamente. El detector de masas fue utilizado en modo de barrido (scan) con un rango de 100 a 400 unidades de masa.

RESULTADOS

De las fracciones obtenidas de la columna, solo presentó actividad frente a los patógenos *F. oxysporum* y *P. notatum*, la fracción 1 (hexano 100 %), en concentraciones de 100 y 200 µg, observados a los 15 y 21 días de incubación. Esta fracción presentó actividad antifúngica con un porcentaje de inhibición del 57,6 y 80,2 % frente a *P. notatum* y del 64,8 y 81,5 % frente a *F. oxysporum* a concentraciones de 100 y 200 µg respectivamente, a los 15 días de incubación.

Se demostró igualmente que el DMSO empleado como disolvente de la fracción, no influía en la actividad antimicrobiana. Los resultados del análisis estadístico del ensayo biológico, se muestran en la figura 1, en la que se aprecia el porcentaje de crecimiento de las cepas a los diferentes días de observación y con las concentraciones de extractos ensayados, así como del disolvente empleado como control negativo.

La fracción hexánica con actividad antifúngica, fue caracterizada mediante CG-EM. Según esta técnica y con las condiciones de análisis descritas, se obtuvo el cromatograma que se incluye en la figura 2.

Los metabolitos detectados fueron comparados con los de una base de datos asociada al equipo, NIST 05, y se consideraron aquellos compuestos que tuvieran una similitud superior al 90 %. De acuerdo con esto, se sugiere la composición que se detalla en tabla.

DISCUSIÓN

Los resultados de los ensayos biológicos realizados a las fracciones de *V. patens* frente a cepas de *P. notatum* y *F. oxysporum*, mostraron un bajo porcentaje de crecimiento de los patógenos evaluados en la fracción 1 (hexano al 100 %) en concentraciones de 100 y 200 µg. Esto se constató en las observaciones realizadas tanto a los 15 como a los 21 días de incubación. Se comprobó que el DMSO utilizado como disolvente de la fracción y como control negativo, no influía en los resultados de la evaluación biológica y que a los 21 días no se observaba mayor inhibición.

El análisis estadístico de la evaluación del porcentaje de crecimiento de *F. oxysporum* y *P. notatum* en relación con la concentración de la fracción hexánica de la especie (100 y 200 µg), permitió determinar que existían diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas para los patógenos evaluados a los 15 y 21 días de incubación. Se concluyó que la mayor inhibición observada para *P. notatum* (80,2 %) y *F. oxysporum* (81,5 %) ocurría con una concentración de la fracción hexánica de *V. patens* de 200 µg a los 15 días de incubación. El mayor porcentaje de crecimiento de los dos patógenos ensayados se observó a los 15 y 21 días en el disolvente (DMSO) utilizado como control negativo y en la fracción hexánica evaluada a los 21 días de incubación respecto a *F. oxysporum*, cuyo porcentaje de crecimiento fue del 55 % (15 días) y 30 % (21 días) respectivamente.

Los compuestos propuestos para este extracto se corresponden en su mayoría con hidrocarburos, lo cual era de esperar, teniendo en cuenta la polaridad del disolvente utilizado. Se observó relativa abundancia de posibles sesquiterpenos bicíclicos (picos 1-5) y del triterpeno acíclico escualeno (pico 26). Para los sesquiterpenos existen antecedentes de actividades antimicrobianas²⁴ y para el escualeno reportes de actividad antioxidante, antitumoral y antimicrobiana, además de reconocerse su efecto benéfico en la prevención de enfermedades cardiovasculares, dado que reduce los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre.²⁵

Se puede concluir que existe actividad antifúngica en la fracción de hexano al 100 %, frente a *P. notatum* y a *F. oxysporum*, lo que puede incrementar el arsenal de usos medicinales de la planta estudiada y enriquecer la medicina folclórica ecuatoriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Genetic Resources Program. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Germplasm Resources Information Network-(GRIN). 1992.

[cited 2011 Feb 2]. Available from: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/index.pl?language=es>

2. Vega AJ, Dematteis M. Análisis de la morfología del polen en especies del género Vernonanthura (Vernonieae, Asteraceae). Proyecto de Investigación y Desarrollo, Secretaría General de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Nordeste. PI 44/2007. UNNE-CONICET. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, 2009. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/investigacion/com2009/CB-046.pdf>
 3. Juárez AM., Ayasta J, Aguirre ER, Rodríguez EF. La Oscurana (Cajamarca), un bosque relictó más para conservar en las vertientes occidentales andinas del norte del Perú. Bosques relictos del NO de Perú y SO de Ecuador. Weigend, Rodríguez y Arana (Comps.) Rev Perú Biol. 2005;12(2):289-98.
 4. Acuña O. Valoración de las características físico químicas de especies ligno-cellulosicas y subproductos agroindustriales en la obtención de pulpa y elaboración de papel. Primer Encuentro Nacional de Productores y Artesanos de Fibras Naturales. Memorias Técnicas, 2000. Ibarra-Ecuador. Disponible en: http://biblioteca.espe.edu.ec/upload/Memorias_Tecnicas.pdf
 5. Blair S. Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica Colombiana. Universidad de Antioquia. 2005;1(347):84-7.
 6. Kvist LP, Aguirre Z, Sánchez O. Bosques montanos bajos occidentales en Ecuador y sus plantas útiles. Botánica Económica de los Andes Centrales La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 2006. p. 205-23.
 7. Gacheta M, Salazar J, Kaiserc M, Brunc R, Navarrete H, Muñoz R, et al. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. J Ethnopharmacol. 2010;128:184-97.
 8. Tene V, Malangón O, Vita P, Vidari G, Armijos Ch, Zaragoza T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. J Ethnopharmacol. 2007;111:63-81.
 9. Valadeau C, Pabon A, Deharo E, Albán-Castillo J, Estévez Y, Lores F, et al. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. J Ethnopharmacol. 2009;123:413-22.
 10. Mabry TJ, Abdel-Baset Z. Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of Vernonia. Biochem Sist Ecol. 1975;2:185.
 11. Jakupovic, J, Schmedia-Hirschmann G. Hirsutinolides, glaucolides and sesquiterpene lactones in species of Vernonia. Biochem Phytochemistry. 1986;25: 145-58.
 12. Fournet A, Barrios AA. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 1994;41:19-37.
 13. Bardón A, Borkosky S, Ybarra M, Montanaroa S, Cartagena E. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. Fitoterapia. 2007;78(3):227-31.
 14. Borkosky S, Bardón A, Catalán CAN, Díaz JG, Herz W. Glauconides, hirsutinolides and other sesquiterpene lactones from Vernonanthura pinguis. Phytochemistry. 1997;44(3):465-70.
-

15. Portillo A, Vila R, Freixaa B, Ferrob E, Parellac T, Casanovad J. Cañigueral S. Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. *J Ethnopharmacology*. 2005; 97(1):49-52.
16. Cartagena E, Montanaro S, Bardón A. Improvement of the antibacterial activity of sesquiterpene lactones. *Rev Latinoam Química*. 2008; 36(2):43-50.
17. Borkosky S, Ponce S, Gabriela Juárez G, González M, Bardón A. Molusquicida Sesquiterpene Lactones from Species of the Tribe Vernonieae (Compositae). *Chemistry & Biodiversity*. 2009; 6(4):513-9
18. Kos O, Castro V, Murillo R, Poveda L, Erfurt I. Ent-kaurane glycosides and sesquiterpene lactones of the hirsutinolides type from *Vernonia triflosculosa*. *Phytochemistry*. 2006; 67:62-9.
19. Katinas L, Gutiérrez D, Grossi M, Crisci J. Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina. *Bol Soc Argent Bot*. 2007; 42:1-2.
20. Panero J, Funk V. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 2002; 115(4):760-73.
21. Mendonça C, Gonçalves-Esteves V, Esteves R, Nunes A. Palynotaxonomy of *vernonanthura* H. Rob. (Vernonieae, Asteraceae) Species from southeast Brazil. *Rev Brasil Bot*. 2009; 32(4):647-62.
22. Gallo M, Sarachine M. Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and pharmaceutical Sciences*. *Int J Biomed Pharm Sci*. 2009; 3(Supl 1):42-62.
23. Tolstikova T G, Sorokina I V, Tolstikov GA, Tolstikov AG, Flekhter OB. Biological Activity and Pharmacological Prospects of Lupane Terpenoids: I. Natural Lupane Derivatives. *Russian J Bioorganic Chemistry*. 2006; 32(1):37-49.
24. Gregori Valdés S. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm [Internet]* 2005 [citado 12 Feb 2011]; 39(2). Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012
25. García Luján C, Martínez A, Ortega J, Castro F. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*. 2010; 9(2):86-96.

Recibido: 13 de abril de 2012.

Aprobado: 7 de junio de 2012.

Patricia Manzano Santana. Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la ESPOL (CIBE). Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Km 30.5 Vía Perimetral, Campus Proserpina, Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador. Correo electrónico: pmanzano@espol.edu.ec, manzanopatricia@hotmail.com
