

Artículo de investigación

Propiedades antimicrobianas *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de *Peltostigma guatemalense*, una especie colombiana de Rutaceas contra el parásito *Plasmodium falciparum* y contra cepas bacterianas

José Manuel Lozano^{1,2}, Luis Enrique Cuca Suárez²

¹ Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Carrera 50 No. 26-00, Bogotá, Colombia. Tel.: +57-1-315-8920, ext. 139, fax +57-1-481-5269. Correo electrónico: jmlozanom@ciencias.unal.edu.co, jm_lozano@fidic.org.co

² Universidad Nacional de Colombia, Bogotá Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.

Recibido para evaluación: agosto 4 de 2008

Aceptado para publicación: octubre 27 de 2008

RESUMEN

Con el estudio de los extractos de *Peltostigma guatemalense*, algunas fracciones sin purificar y metabolitos aislados, se determinó la actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y gram negativas (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028s y MS 7953) así como la actividad antiparasitaria frente *Plasmodium falciparum*. Los metabolitos aislados de los extractos de hojas y extracto etanólico de madera fueron: siete alcaloides, skimmianina, γ -fagarina, anhidroevoxina, evoxina, 7-isopentiloxi- γ -fagarina, kokusaginina y 4-metoxi-1-metil-2-quinolona, una cumarina, escopoletina, un flavonoide, gardenina B, un lignano, siringaresinol, un terpeno, Lupeol, un esteroles, sitosterol y dos derivados del ácido benzoico: p-hidroxibenzoato metilo y ácido fenilacético, los cuales fueron identificados por métodos espectroscópicos y por comparación con los datos reportados en la literatura. Los compuestos alcaloidales, anhidroevoxina, kokusaginina y 4-metoxi-1-metil-2-quinolona, mostraron una fuerte actividad anti *Plasmodium* y el compuesto p-hidroxibenzoato de metilo presentó la actividad antimicrobiana más promisorio comparada con los demás compuestos ensayados.

Palabras clave: *Peltostigma guatemalense*, Rutaceae, alcaloide, flavonoide, actividad anti *Plasmodium falciparum*, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

***In vitro* antimicrobial properties of secondary metabolites from *Peltostigma guatemalense*, a Colombian Rutaceae specie, against the *Plasmodium falciparum* parasite and bacterial strains**

With the study of extracts *Peltostigma guatemalense*, some fraction without purify and isolated metabolites were found antimicrobial activity against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and Gram-negative *Salmonella typhimurium* ATCC 14028s and MS 7953 and as antiparasitic activity against *Plasmodium falciparum*. The metabolites isolated from extracts of ethanol extract of leaves and wood were: seven alkaloids γ -fagarine, anhidroevoxyn, evoxyn, skimmianine, 7-isopenthyloxi- γ -fagarina, kokusaginina and 4-methoxy-1-methyl-2-quinolone one coumarin, escopoletina, one flavonoid, gardenine B, one Lignan, syringaresinol, one terpene, lupeol, one sterol, sitosterol and two derivatives of benzoic acid: methyl-*p*-hydroxybenzoate, phenylacetic acid which were identified by spectroscopic methods and by comparison with the data reported in the literature. The alkaloid compounds, anhidroevoxyn, kokusaginine and 4-methoxy-1-methyl-2-quinolone, showed a strong anti *Plasmodium* activity and the compound *p*-hydroxybenzoate presented the most promising antimicrobial activity compared with the other compound tested.

Key words: *Peltostigma guatemalense*, *Rutaceae*, alkaloid, flavonoid, anti *Plasmodium falciparum* activity, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas cuatro décadas, la pérdida de actividad antimicrobiana de los antibióticos convencionales, ocasionada por el incremento de la resistencia microbiana a los mismos, ha generado una crisis mundial antibiótica constituyéndose en un grave problema de salud pública. A pesar de la existencia de cientos de compuestos disponibles comercialmente, la vida útil de los antibióticos tradicionales ha decrecido ostensiblemente debido a la "habilidad" de los microorganismos para desarrollar estrategias moleculares de resistencia y además para transferir tal información biológica a otros microbios patógenos.

Es así como las bacterias y algunos hongos coexisten en una asociación física constante junto a diferentes especies de animales y plantas. Sin embargo, una enfermedad ocasionada por un microorganismo patógeno de tipo bacteriano u hongo, el cual llega a ocupar un nicho particular en un hospedero, da a lugar a su proliferación y al desarrollo de sus factores de virulencia y a desarrollar nuevos mecanismos para la evasión del sistema inmune del hospedero.

Por estas razones, urge el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos más potentes y también la necesidad de establecer nuevas estrategias para el control de las infecciones humanas de tipo bacteriano y parasitario, entre otras.

La incidencia global de una enfermedad transmisible como la malaria, que anualmente afecta a entre 200 y 500 millones de personas, causando la muerte a entre dos y tres millones de ellas —principalmente niños menores de cinco años en los países pobres— (1), requiere soluciones prontas basadas, por una parte, en el descubri-

miento de nuevos agentes terapéuticos para el control de las cepas emergentes del *Plasmodium* resistentes a los antimaláricos convencionales y, por otra, en el desarrollo de nuevas y más potentes vacunas para prevenir esta enfermedad. La obtención de nuevas y más potentes vacunas contra la malaria, así como el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos basados en agentes de tipo no peptídico o proteico, posibilitarán cambiar o modificar los patrones y las estrategias terapéuticas tradicionales para el manejo y control de este tipo de enfermedades y, en consecuencia, alterar los patrones de diseminación normales en el mundo de las mismas. El estudio de las tradiciones culturales y etnobotánicas Latinoamericanas está consolidándose progresivamente como un componente de gran importancia en el descubrimiento de nuevos fármacos.

Las plantas del género *Peltostigma* pertenecen a la tribu Zanthoxyleae (*Rutaceae*: Rutoideae), que incluye a la subtribu *Choisyinae*. Este género está conformado por tres especies: *P. exinium*, *P. parviflorum* y *P. ptelioides*, cuya principal característica son sus grandes flores de agradable aroma. Los programas de colección botánica desde Colombia hasta Costa Rica permitieron el descubrimiento de la *Peltostigma*, una especie relativamente nueva que difiere de las reportadas anteriormente debido a sus hojas sencillas y de flores más pequeñas (2, 3).

En este trabajo reportamos el aislamiento y la identificación de siete alcaloides, una cumarina, un flavonoide, un lignano, dos terpenos y un derivado del ácido fenilacético a partir de los extractos etanólicos de madera y hojas. Con estos extractos se realizaron estudios preliminares de actividad antibacteriana y antiparasitaria contra *Plasmodium falciparum in vitro*.

La actividad biológica de los compuestos aislados se ensayó *in vitro* empleando para ello cada extracto frente a microorganismos patógenos al humano y al ratón. Se emplearon dos cepas de bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y dos cepas de bacterias gram negativas (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028s) y MS 7953. La actividad contra el *Plasmodium falciparum* se evaluó frente a la cepa FCB-2 de este patógeno causante de malaria humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material analizado corresponde a extractos de hojas y madera de *Peltostigma guatemalense* (*Rutaceae*), recolectada en febrero de 1999 en la región de San Luis (Río Claro Antioquia) por el botánico Álvaro Cogollo Pacheco. Una muestra de este material se mantiene en el herbario de la Fundación Jardín Botánico Rafael Uribe Uribe en la ciudad de Medellín (Colombia), codificado con el número 24509.

Extracción, aislamiento e identificación de los compuestos

A partir de las hojas secas y maceradas (2.750 g) y mediante el uso de la metodología convencional utilizada en Productos Naturales Vegetales, se aislaron e identificaron los siguientes compuestos: skimmianina (4) –8 mg–, γ -fagarina (5) –14 mg–, 7-isopentiloxi γ -fagarina (5) –11 mg–, gardenina B (6) –190 mg–, lupeol (4) –1.024 mg– y sitosterol (4) –243 mg–; ácido fenilacético (7) –128 mg–, anhidroevoxina (5) –13 mg–, evoxina (5) –41 mg–, escopoletina (8) –92 mg–, p-hidroxibenzoato metilo (8) –117 mg–, kokusaginina (5) –125 mg–, 4-metoxi-1-metil-2-quinolona (5) –34 mg– y siringaresinol (8) –720 mg–.

Actividad biológica de los compuestos de *Peltostigma guatemalense*

Ensayos de actividad antibacteriana in vitro

La actividad antibacteriana de los extractos crudos de *Peltostigma guatemalense* y de sus compuestos purificados se probaron contra dos cepas bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), obtenidas del IBUN, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. También se probaron frente a dos cepas de bacterias gram negativas (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028s y MS 7953), gentilmente proporcionadas para este estudio por el doctor E. Groisman, Washington University, St. Louis, MO, USA.

Las muestras se ensayaron para actividad antibacteriana mediante ensayos in vitro de difusión radial empleando una adaptación hecha de un ensayo semejante reportado previamente (9).

Brevemente, una colonia de cada cepa bacteriana en ensayo se inoculó en 2 mL de medio de cultivo líquido (caldo) durante toda la noche, a 37°C con agitación. Posteriormente se realizó un inóculo bacteriano de 200 a 500 μ L en 25 a 50 mL de medio fresco; según el caso, se empleó tripticasa de soya (TSB) al 3% (w / v) o medio líquido de Luria Bertoni (LB) (Becton-Dickinson, Cockesville, MD, USA) con agitación a 37°C. Una vez cada microorganismo alcanzó la fase logarítmica de crecimiento entre 2,5 y 5 horas, el material se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se realizaron dos lavados con una solución 10 mM buffer fosfato salino (PBS) pH 7.2 y el sedimento bacteriano se suspendió en 10 mL del buffer frío. Posteriormente se determinó la densidad óptica (DO) de cada suspensión a una longitud de onda de 620 nm y se cuantificó el crecimiento de cada cepa teniendo en cuenta la relación reportada de $DO_{620} \cdot 0.20 = 5 \times 10^7$ UFC / mL. En seguida se tomó un volumen equivalente a 1 a 4×10^6 UFC, el cual se adicionó a 14 mL de una suspensión precalentada que contenía 3 mg de medio TSB, agarosa de baja electroendósmosis al 1% (w/v) (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA) y Tween-20 al 0.02% (v/v) (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA). Luego de que las bacterias se dispersaron homogéneamente, la suspensión de agar se sirvió en cajas plásticas de Petri (Nunc, Naperville, IL, USA) y se dejaron en reposo para dar lugar a una

capa uniforme solidificada. Luego del enfriamiento, se realizaron perforaciones de 3 mm de diámetro sobre la mezcla homogénea agar-bacterias, empleando para ello un sacabocados de acero inoxidable. Luego se adicionaron las muestras a ensayar, incluidos los controles positivos y negativos, en volúmenes entre 5-10 μL por pozo. Las cajas se incubaron durante aproximadamente 3 horas a 37°C, para luego ser cubiertas con una capa constituida por un volumen aproximado de 10 mL de un medio enriquecido en nutrientes que permite su solidificación. Finalmente, luego de 12 a 16 horas de incubación a 37°C, se determinó el valor del diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano causado por las muestras en prueba. Los controles del ensayo fueron los antibióticos estándar Kanamicina, Ampicilina y Tetraciclina para efectos de comparación y tamizado de las diferentes muestras. Luego de este tamizado por difusión radial, se seleccionaron aquellas muestras promisorias para evaluación de actividad antibacteriana mediante ensayos cuantitativos *in vitro*. Las zonas claras correspondieron en todos los casos a la inhibición del crecimiento bacteriano causadas por la muestra en prueba. El valor de las Unidades de Actividad (UA) se reportó de acuerdo con la relación de que por cada 0.1 mm de zona clara producida por la inhibición del crecimiento bacteriano es igual a 1 UA (3). Las muestras positivas seleccionadas mediante el ensayo de difusión radial se evaluaron con ensayos antibacterianos de tipo cuantitativo. Este ensayo es una modificación del primero para el cual se evaluó el crecimiento continuo de 10.000-1 x 10⁶ UFC durante el tiempo de incubación a 37°C de cada cepa bacteriana en presencia o ausencia de los controles y muestras en prueba. La inhibición del crecimiento bacteriano se calculó como porcentaje (%) de inhibición de crecimiento = $100 \times (\text{DO}_{620} \text{ bacterias totales} - \text{DO}_{620} \text{ medio}) - (\text{DO}_{620} \text{ muestra en prueba} - \text{DO}_{620} \text{ blanco}) / (\text{OD}_{620} \text{ bacteria totales} - \text{DO}_{620} \text{ blanco})$.

Ensayos in vitro de actividad antiparasitaria contra Plasmodium falciparum

Las muestras también fueron evaluadas por su actividad antiparasitaria contra *Plasmodium falciparum* mediante el empleo de un ensayo reportado previamente (10). Para tal efecto, se empleó la cepa de malaria humana FCB-2 del *Plasmodium falciparum* en un cultivo rico en nutrientes y de glóbulos rojos humanos del grupo sanguíneo O Rh (+).

Brevemente, el ensayo antiparasitario contra el *Plasmodium falciparum* se realizó por infección normal de glóbulos rojos humanos con parásitos de la malaria en estadio de anillo, hasta llegar a una parasitemia > 5%. En seguida se realizó la sincronización de esta infección en cultivo con el objeto de estabilizar una población estadio-específica del parásito, empleando para ello sorbitol e incubación en medio de cultivo celular RPMI-1640 suplementado con buffer Hepes 25 mM, hipoxantina 1 mg/mL, gentamicina 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, penicilina 5 U/mL, glucosa 2 g/L, NaHCO₃ 5 % y plasma humano O + al 10%.

Una vez los parásitos alcanzaron el estadio esquizonte, se distribuyeron cuantitativamente en una caja para cultivo celular de 96 pozos previamente servida con las

muestras a analizar. El volumen final por pozo fue de 100 μL , con un hematocrito de 1,5% y 0,3% de parasitemia. Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se incubaron durante 18 horas a 37°C, en una atmósfera de CO_2 al 5%, O_2 al 5% y N_2 al 90%. Posteriormente, las cajas se centrifugaron, las células se cosecharon y de cada sobrenadante del cultivo se retiraron 50 μL , siendo reemplazados por 100 μL de una suspensión de leche descremada con una concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hidroetidina. Seguidamente se incubaron durante otros 30 minutos a 37°C y posteriormente se realizaron lavados con PBS. El sedimento obtenido se resuspendió en 300 μL PBS y esta suspensión celular se vertió en tubos de poliestireno con el objeto de cuantificar los porcentajes de parasitemia en cada muestra mediante la técnica de citometría de flujo, en un equipo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA). La secuencia de eventos se registró y analizó empleando el programa Cell Quest del mismo fabricante. La cantidad de glóbulos rojos parasitados se cuantificó por análisis de cuadrantes. Los glóbulos rojos normales y los parasitados por el *Plasmodium falciparum* en presencia de una concentración de EGTA 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se emplearon como los controles negativo y positivo del ensayo, respectivamente. La inhibición de la invasión del parásito a los glóbulos rojos se calculó mediante la relación: $\% \text{II} = (\% \text{ parasitemia del control} - \% \text{ parasitemia de la muestra}) / (\% \text{ parasitemia del control})$ multiplicado por 100.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antibacteriana de los compuestos aislados de *Peltostigma guatemalense*

Ensayo cualitativo de difusión radial

Se analizaron extractos crudos obtenidos de hojas y madera de la *Peltostigma guatemalense* mostrando perfiles de actividad contra bacterias, como se observa en la Tabla 1, siendo los extractos provenientes de las hojas mucho más activos. Algunos de los extractos obtenidos mostraron propiedades antibacterianas luego de ser fraccionados por reparto en solventes; por ejemplo, el extracto en cloroformo de hojas fue activo contra los dos tipos de cepas de bacterias ensayadas tanto gram positivas como gram negativas. El extracto obtenido en acetato de etilo a partir de las hojas de la *Peltostigma guatemalense*, así como el extractos de la madera de esta planta obtenidos en éter de petróleo, éter etílico y en fase acuosa, no presentaron actividad contra ninguna de las cepas bacterianas.

Ensayo cuantitativo de actividad antibacteriana

El ensayo cuantitativo de actividad antibacteriana se realizó empleando los extractos crudos que fueron positivos en los ensayos de tamizado cualitativos realizados por la técnica de difusión radial. Los extractos obtenidos por fraccionamiento del extracto total etanólico a partir de las muestras de *Peltostigma guatemalense*, mediante

fraccionamiento por reparto con solventes de polaridad creciente, también fueron evaluados, como se puede observar en la Tabla 2. Los compuestos puros aislados de los diferentes extractos también fueron sometidos a análisis antimicrobianos, como se describió en la sección de Materiales y métodos. Las densidades ópticas (DO) se midieron a una longitud de onda de 620 nm a diferentes tiempos, 0, 5 y 24 horas luego de iniciarse la prueba. Un valor superior a 25% de inhibición del crecimiento bacteriano se consideró como estadísticamente significativo. No fue posible detectar actividad inhibitoria alguna del crecimiento bacteriano para algunas de las muestras ensayadas debido a interferencias producidas por el desarrollo del color propio de las mismas, por lo que fueron reportadas como ND (actividad no detectada o determinada).

Tabla 1. Tamizado de extractos crudos de *Peltostigma guatemalense* por su actividad antibacteriana mediante ensayos cualitativos de difusión radial.

<i>P. guatemalensis</i> Extractos y controles	Cepa bacteriana (Unidades de actividad)			
	<i>Salmonella typhimurium</i> MS7953	<i>Salmonella typhimurium</i> 14028s	<i>Enterococcus Faecalis</i> 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538
Madera (etanol)	45 ± 0.3	36 ± 0.2	32 ± 0.4	34 ± 0.2
Hojas (etanol)	0	0	42	45
Madera (éter de petróleo)	0	0	0	0
Madera (butanol)	0	32 ± 0.4	0	0
Madera (agua)	0	0	0	0
Hojas (éter etílico)	43 ± 0.2	34 ± 0.3	-	-
Hojas (cloroformo)	0	0	34 ± 0.2	42 ± 0.3
Hojas (acetato de etilo)	0	0	0	0
Ampicilina (0.20 µg)	90 ± 0.5	80 ± 0.3	50 ± 0.3	60 ± 0.2
Kanamicina (0.10 µg)	100 ± 0.3	90 ± 0.4	0	0
Tetraciclina (0.21 µg)	100 ± 0.3	60 ± 0.5	-	-
EtOH/ PBS-RPMI	0	0	0	0

+ Zona clara producida por la muestra asociada con la inhibición del crecimiento bacteriano.

- No se observa zona clara, asociada con carencia o no actividad antibacteriana.

Una unidad de actividad (UA) es igual a 0.1 mm de zona clara [3]. Valores representan la media ± DE, n=3.

Como puede observarse en la Tabla 2, los extractos etanólicos de corteza y madera no tuvieron efecto alguno en el crecimiento de ninguna de las cepas bacterianas analizadas, mientras que el extracto etanólico de hojas inhibió significativamente el crecimiento de *Enterococcus faecalis* en un $41.84 \pm 1.25\%$ luego de 24 horas. Este hecho sugiere la presencia de algún componente activo en este extracto responsable de la actividad antibacteriana. El extracto acuoso obtenido de la madera inhibió el crecimiento de la misma cepa bacteriana en un $38.64 \pm 1.28\%$ luego de 5 horas de comenzado el ensayo, pero no se observó efecto alguno posterior a este tiempo, probablemente debido a un efecto temporal de tipo bacteriostático. Un comportamiento semejante presentó el extracto obtenido en acetato de etilo a partir de las hojas, inhibiendo el crecimiento bacteriano del *Enterococcus* en un $29.54 \pm 1.32\%$ sólo a las 5 horas de la prueba. No se encontró evidencia de actividad contra las cepas de bacterias gram negativas en ninguno de estos extractos.

Tabla 2. Ensayos de actividad cuantitativa antibacteriana dependiente del tiempo de extractos crudos de *Peltostigma guatemalense*. Expresados como porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano.

<i>P. guatemalensis</i> Extractos	Cepa bacteriana							
	<i>Salmonella typhimurium</i> MS7953		<i>Salmonella typhimurium</i> 14028s		<i>Enterococcus faecalis</i> 29212		<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	
	5 horas	24 horas	5 horas	24 horas	5 horas	24 horas	5 horas	24 horas
Madera (etanol)	ND	13.87 ± 1.15	ND	0	ND	6.61 ± 3.26	0	ND
Hojas (etanol)	ND	3.71 ± 2.33	ND	0	ND	41.84 ± 2.25	0	ND
Madera (éter de petróleo)	ND	0	ND	ND	ND	0	0	ND
Madera (butanol)	11.72 ± 2.12	10.02 ± 1.19	17.44 ± 2.26	16.07 ± 2.28	18.05 ± 1.22	0	8.20 ± 1.30	ND
Madera (agua)	15.86 ± 3.34	19.84 ± 2.26	0	4.46 ± 0.2	38.64 ± 1.28	0	8.93 ± 1.15	ND
Hojas (éter etílico)	0	17.26 ± 1.27	14.73 ± 2.28	13.04 ± 2.19	18.18 ± 1.24	0	8.39 ± 1.23	ND
Hojas (cloroformo)	ND	4.19 ± 1.24	16.28 ± 2.34	17.14 ± 2.24	20.45 ± 1.43	13.02 ± 1.55	0	ND
Hojas (acetato de etilo)	17.51 ± 2.52	6.29 ± 0.33	12.4 ± 1.35	12.32 ± 1.44	29.54 ± 2.32	0	8.5 ± 1.37	ND

Ampicilina	93.3 ± 4.29	101.3 ± 5.12	98.45 ± 3.29	100 ± 5.38	102.3 ± 6.12	100 ± 7.22	98.81 ± 5.44	99.71 ± 7.25
Kanamicina	98.27 ± 7.12	55.81 ± 4.51	98.45 ± 6.37	50 ± 6.23	81.18 ± 7.11	63.84 ± 7.39	88.69 ± 9.12	58.6 ± 7.8
Tetraciclina	78.27 ± 8.44	65 ± 6.23	73.25 ± 8.7	87.32 ± 8.18	85.2 ± 8.51	86.98 ± 2.5	63.09 ± 7.16	90.52 ± 8.3
EtOH/PBS	7.24 ± 3.37	12.9 ± 4.12	17.05 ± 6.33	11.45 ± 6.11	2.94 ± 2.23	9.71 ± 7.38	0	0

ND = Actividad no determinada o detectada. Un valor igual o superior a 25% se considera estadísticamente significativo. Se usó EtOH en PBS como control del ensayo. Valores representados como la media ± DE, n=3.

Como se observa en la Tabla 3, los compuestos puros aislados de los extractos previamente estudiados mostraron una actividad inhibitoria diferencial contra todo el grupo de cepas bacterianas analizadas. La Gardenina B inhibió pobremente el crecimiento de las cepas de bacterias gram negativas, mientras que mostró una capacidad inhibitoria específica contra la cepa gram positiva de *Staphylococcus aureus* en un $44.64 \pm 1.12\%$ a las horas del ensayo. El *p*-hidroxibenzoato de metilo, por el contrario, mostró cierta preferencia de actividad inhibitoria por las bacterias gram negativas, registrando valores de inhibición moderados de $20.32 \pm 1.23\%$ y $39.64 \pm 1.44\%$ a las 24 horas del ensayo frente a las cepas de *Salmonella typhimurium*.

Los compuestos kokusaginina y 7-isopentiloxi- γ -fagarina evidenciaron actividad antibacteriana contra las cepas de bacterias gram positivas y una tendencia bacteriostática respecto a las cepas bacterianas gram negativas, de acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 3.

Fue posible confirmar que los extractos de la *Peltostigma guatemalense* tuvieron una actividad antibacteriana moderada, como se observa en los ensayos de actividad cuantitativa del crecimiento bacteriano. Se demostró también un incremento en la actividad inhibitoria específica de los compuestos puros aislados de los extractos iniciales.

Actividad antiparasitaria contra *Plasmodium* de los compuestos aislados de *Peltostigma guatemalense*

En este ensayo se observó que algunos de los extractos crudos obtenidos fueron capaces de inhibir el proceso de invasión *in vitro* del parásito de la malaria humana causada por el *Plasmodium falciparum* a glóbulos rojos humanos, incluso a concentraciones de 35 ppm. Los extractos acuosos de madera de *Peltostigma guatemalense* mostraron los valores de actividad más bajos respecto a los demás extractos analizados, como se observa en la Figura 1.

Tabla 3. Ensayos de actividad cuantitativa antibacteriana dependiente del tiempo de metabolitos aislados de extractos *Peltostigma guatemalense*. Expresados como porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano.

Compuesto /Estándar	Cepa bacteriana							
	<i>Salmonella typhimurium</i> MS7953		<i>Salmonella typhimurium</i> 14028s		<i>Enterococcus faecalis</i> 29212		<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	
	5 horas	24 horas	5 horas	24 horas	5 horas	24 horas	5 horas	24 horas
2	ND	0	ND	ND	ND	0	ND	ND
4	18.96 ± 2.33	13.87 ± 2.37	32.56 ± 1.12	25.71 ± 1.18	47.74 ± 1.70	0.90 ± 0.11	44.64 ± 1.12	ND
8	13.79 ± 1.29	20.32 ± 1.23	54.26 ± 1.38	39.64 ± 1.44	31.82 ± 1.35	0.83 ± 0.18	37.50 ± 1.12	ND
1f	20.34 ± 1.44	20.64 ± 1.29	27.52 ± 1.33	24.46 ± 1.23	38.64 ± 1.51	0.90 ± 0.37	49.40 ± 1.23	ND
1c	16.21 ± 1.29	15.00 ± 1.35	41.47 ± 2.38	25.89 ± 2.51	47.73 ± 1.38	0.90 ± 0.29	45.25 ± 1.47	ND
1d	3.45 ± 0.23	24.19 ± 2.51	17.05 ± 3.11	16.25 ± 3.12	34.09 ± 3.33	0	54.17 ± 4.35	ND
Ampicilina	93.30 ± 4.29	101.30 ± 5.12	98.45 ± 3.29	100.00 ± 5.38	102.30 ± 7.22	100.00 ± 6.12	98.81 ± 5.44	99.71 ± 7.25
Kanamicina	98.27 ± 7.12	55.81 ± 4.51	98.45 ± 6.37	50.00 ± 6.23	81.18 ± 7.39	63.84 ± 7.11	88.69 ± 9.12	58.60 ± 7.80
Tetraciclina	78.27 ± 8.44	65.00 ± 6.23	73.25 ± 8.70	87.32 ± 8.18	0	86.98 ± 8.51	63.09 ± 7.16	90.52 ± 8.30
Etanol-PBS	7.24 ± 3.37	12.90 ± 4.12	17.05 ± 6.33	11.45 ± 6.11	2.94 ± 7.38	9.71 ± 2.23	0	0

Actividad no determinada o detectada. Un valor igual o superior a 25% se considera estadísticamente significativo. Se usó EtOH en PBS como control del ensayo. Valores representados como la media ± DE, n=3.

Los datos observados en la Figura 1 revelan que los extractos etanólicos de madera y el extracto obtenido en éter etílico de las hojas fueron capaces de inhibir la invasión del *Plasmodium falciparum* en los glóbulos rojos, incluso a concentraciones de 35 ppm. Los datos observados en la Figura 2 muestran que los compuestos 4-metoxi-1-metil-2-quinolona y p-hidroximetilbenzoato de metilo, respectivamente, inhibieron el proceso de invasión del parásito de la malaria a glóbulos rojos humanos, mientras que los compuestos kokusaginina, 7-isopentiloxi-γ-fagarina y anhidroeovixina (alcaloi-

des de tipo furoquinolínico, inhibieron este proceso infeccioso in vitro de una manera dependiente de la dosis. La gardenina B mostró un efecto efectivo pero moderado respecto a este proceso infeccioso. Este compuesto se encuentra frecuentemente en plantas de la familia *Rutaceae*, pero rara vez aparece en plantas del género *Peltostigma*.

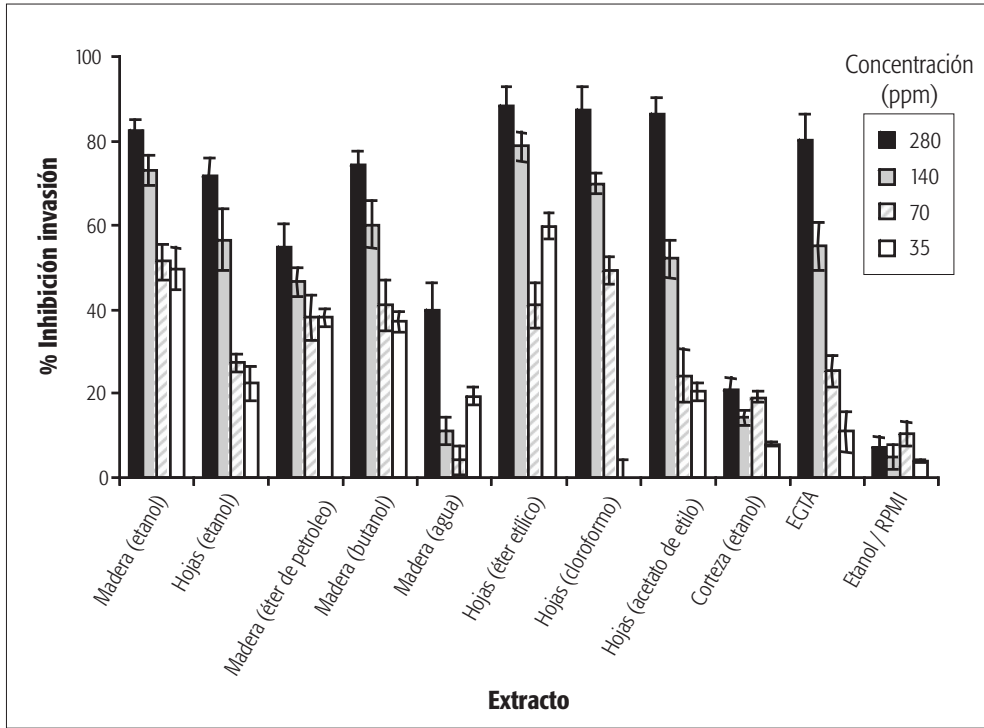


Figura 1. Inhibición de la invasión del *Plasmodium falciparum* a glóbulos rojos humanos por extractos obtenidos de *Peltostigma guatemalense*. Los valores representados por la media \pm DE (desviación estándar), $n=3$.

De acuerdo con los resultados obtenidos, 6 de los 12 compuestos aislados ensayados presentaron una fuerte actividad antiparasitaria contra el *Plasmodium falciparum* in vitro, incluso a una concentración de 35 ppm.

El patrón de metabolitos secundarios encontrados en la especie colombiana de *Peltostigma guatemalense* confirmó que este grupo pertenece a la familia *Rutaceae*, como se había propuesto taxonómicamente (11).

Estudios fitoquímicos para esta nueva especie de *Rutaceae* demuestran de esta manera que esta especie tiene una tendencia a expresar un patrón molecular de metabolitos secundarios normalmente encontrados en esta familia.

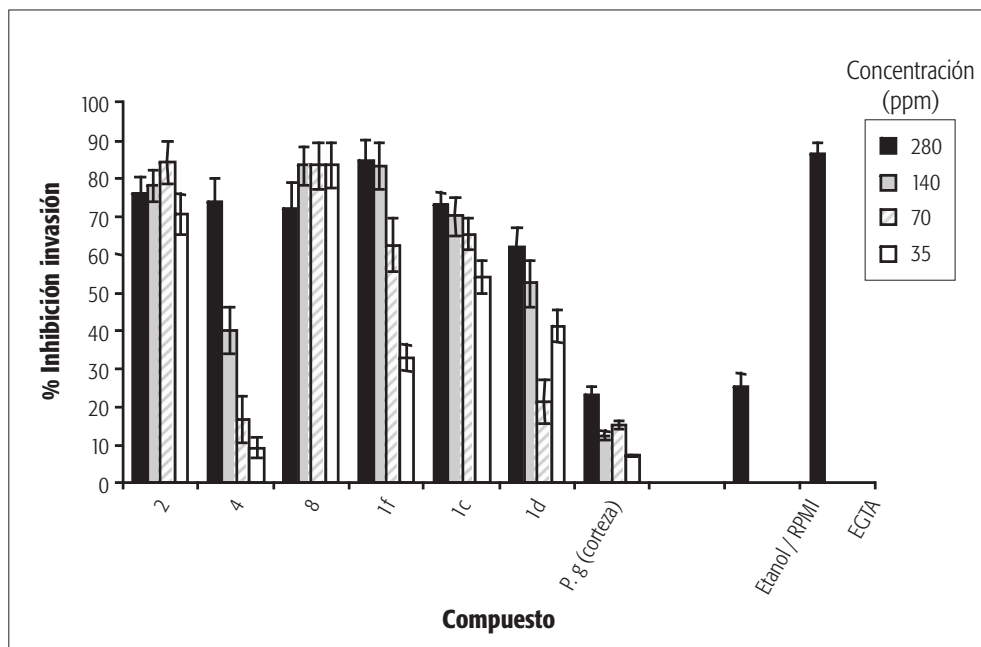


Figura 2. Inhibición de la invasión del *Plasmodium falciparum* a glóbulos rojos humanos por metabolitos aislados de extractos de *Peltostigma guatemalense*. Los valores representados por la media \pm DE (desviación estándar), n=3.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por las siguiente entidades: Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas - COLCIENCIAS, European Economical Community y el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Deseamos expresar nuestra gratitud al profesor Manuel Elkin Patarroyo por sus valiosos aportes a este trabajo, así como a los grupos funcionales de investigación de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC.

REFERENCIAS

1. World Health Organization (2002). WHO Report ([http:// www.who.int/infectious-disease-report/2002/index.html](http://www.who.int/infectious-disease-report/2002/index.html)). R.E. Gereau, Novon. **5**, 34 (1995).
2. R. Lehrer, M. Rosenman, S. Harwig, R. Jackson, and P. Eisenhauer. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides *J. Immunol. Methods.* **137**, 167 (1991).

3. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 527- 530. Missouri Botanical Garden Press, 1991.
4. C.A. Coy. *Biochemical Systematics and Ecology*. Metabolites isolated from *Esenbeckia alata* (Karst & Triana). **2007**. **35**. 386-388.
5. F. Ayafor, L. Sondengam, Ngo Bilon, E. Tsamo, F. Samuel, J. Kimbu. Furoquinoline alkaloids of *Teclea ouabanguensis* . *J. Nat. Prod.*, **1982**, **45** (6), pp 714-717.
6. A. Bartholomeu, F. Barros-Filho, M. Nunes, F. Conceição, M. de Oliveira, M. Marcos. Metabolitos secundarios de *Esenbeckia almawillia* Kaastra (RUTACEAE). *Quim. Nova*. **2007**. 30. (7). 1589-1591.
7. Niedermayer O. Determination of Phenylacetic Acid in Penicillin Fermentation Media by Means of Gas Chromatography. *Anal. Chem.*, **1964**, 36 (4), pp 938-939.
8. T. Mabry, A. Ulubelen. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins, and lignans. *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, 28 (2), pp 188-196.
9. J.M. Lozano, F. Espejo, D. Díaz, L.M Salazar, J. Rodríguez, C. Pinzón, J.C. Calvo, F. Guzmán, M.E. Patarroyo. Reduced amide pseudopeptide analogues of a malaria peptide possess secondary structural elements responsible for induction of functional antibodies which react with native proteins expressed in *Plasmodium falciparum* erythrocyte stages. *J. Peptide Res.*; **52**, 457 (1998).
10. E. Couillerot, C. Caron, L. Comes, J.C. Audran, and J.C. Chenieux, Benzophenanthridine and fluoroquinoline accumulation in cell suspension cultures of *Fragaria zanthoxyloides*. *Phytochemistry* **37**, 425 (1994).
11. P.G. Waterman, and M.F. Grudon. In "Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales", Annual Preceedings of the Phytochemical Society of Europe, (Proceedings of the Phytochemical Society of Europe). Academic Press, 1984, Number 22.