

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Phyllanthus acuminatus vahl.*

CARMEN LILIA GRACIA DE GARCIA.\*

YACKELIN SANCHEZ.\*

ERNESTO GOMEZ.\*

### RESUMEN:

El extracto etanólico de las partes aéreas de *Phyllanthus acuminatus Vahl* presentó actividad antifúngica. Por medio de Cromatografía en capa delgada, en columna y preparativa se aislaron dos grupos de fracciones activas. De uno de los cuales se pudo separar la sustancia activa "Q.I.I.A" que presentó actividad contra 8 hongos. La Concentración Mínima Inhibitoria fué de 312 mcg/ml contra *Zygorrinchus sp*, *Penicillium sp* y *Aspergillus fumigatus*.

### SUMMARY.

The ethanolic extract from the aerial parts of *Phyllanthus acuminatus Vahl* showed antifungal activity. By means of column chromatography and preparative thin layer chromatography two groups of active fractions were obtained. From one of the fractions, compound "Q.I.I.A" was isolated. This compound was active against 8 fungi. The MIC against *Zygorrinchus sp*, *Penicillium sp* y *Aspergillus fumigatus*, was 312 mcg/ml.

### INTRODUCCION:

Debido a la resistencia cada vez mayor de los microorganismos ante los antibióticos, es necesario contar con nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas o encontrar metabolitos con otras propiedades terapéuticas por esto el estudio de extractos de plantas superiores con actividad antimicrobiana y productos de origen vegetal es quehacer de muchos investigadores.

Se pueden destacar los trabajos de Osborn y col (1) quienes investigaron la actividad antimicrobiana de cerca de 2300 especies de 166 familias, resultando 36 géneros activos. Huddleson y col (2) estudiaron algunas especies pertene-

cientes a 15 familias y los extractos activos fueron especies del género *Allium*, *Rheum* y *Ribes*. Farnsworth y col. (3) realizaron una revisión donde determinaron la actividad antimicrobiana en plantas superiores. En cuanto a especies en particular, Ferenczy y col. (4) determinaron la actividad antifúngica de un compuesto C-1 aislado de *Cynanchum vincetoxicum* L; de *Solanum carolinense* (5) se demostró que posee actividad contra bacterias Gram positivas., en *Artemisia tridentata* (6) se encontraron compuestos no volátiles activos frente a bacterias, de *Sapium japonicum* (7) se aisló un compuesto con actividad antifúngica. De las raíces de *Euphorbia jalkini* [Euphorbiaceae] (8) se aisló el galato de metilo que fué activo contra *E. coli* y dos hongos.

Del género *Phyllanthus*: Haicow (9) determinó la actividad antibacteriana de un extracto de *Ph. urinariae*, las sustancias activas eran compuestos fenólicos. De *ph. acuminatus vahl*, Petit G. y col. (10) aislaron un antineoplásico llamado: Phyllantosa y las phyllantostatina 1, 2, 3 (11) que presentaron la misma actividad, Hnatyszyn y col. de *Ph. sellowianus* (12) usado popularmente como antidiabético aislaron una flavona. Ueno M. y col. (13) estudiaron los extractos etanólicos de cerca de 60 ejemplares de *Ph. nirure* usada como diurético en el Paraguay y un 70% fueron activos inhibiendo la Enzima convertidora de angiotensina. De *phyllanthus nirure*, Satyanarayana y col. (14) aislaron dos nuevos hidroxy lignanos y una dibenzobutiurocetona. En Colombia, H. Garcia B. (15) de *Ph. niruri*, reporta su uso como diurético, purgante, en algunos casos de diabetes y como insecticida contra nuches y piojos de animales, también de *Ph. latryroides* (barbasco) como diurético, antiespasmódico y estimulante en molestias del aparato urogenital.

De acuerdo a estudios preliminares sobre varias plantas se reportó la actividad antimicrobiana de *Phyllanthus acuminatus Vahl* (16). En el presente trabajo se evaluó la actividad del extracto alcohólico, de las fracciones purificadas y sustancias aisladas mediante la utilización de métodos de separación corroborados en forma paralela con ensayos microbiológicos frente a bacterias y hongos.

\* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14490, Santafé de Bogotá.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material Vegetal.

El material vegetal se colectó en el Km 2 de la carretera que conduce de Villeta a Mabe (Cundinamarca- Colombia) a 1200 mt. de altitud. Un ejemplar se registró en el Herbario Nacional Colombiano con el N°.316580 y fué determinado como *Phyllanthus acuminatus Vahl* [Euphorbiaceae]. En el presente estudio se emplearon las partes aéreas de la planta (hojas, flores y tallos tiernos)

### Análisis Fitoquímico Preliminar

Con 50 g. de material vegetal pulverizado se realizó este estudio preliminar (17) para detectar la presencia de : alcaloides, esteroides y/o triterpenoides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, taninos, fenoles, lactonasterpénicas, cumarinas y de glicósidos cardiotónicos.

### Estudio de la Actividad Antimicrobiana.

#### Microorganismos de Ensayo.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se emplearon las siguientes bacterias:

*Sarcina lutea* UC 130 (Upjohn Company), *Staphylococcus aureus* ATCC 6338 (American Type Culture Collection), *S. epidermidis* UC 719. *Streptococcus faecalis* FUN (Dpto de Farmacia, Universidad Nacional), *Streptococcus pneumoniae* FUN, *Bacillus anthracis* FUN, *B. cereus* FUN, *Escherichia coli* UC 877, *Salmonella typhi* FUN, *Pseudomonas aeruginosa* INS (Inst. Nal de Salud) y la Levadura: *Candida albicans* FUN. Se empleó como medio de cultivo agar soya tripticasa, sulfato de estreptomina como sustancia de referencia (40 mcg/ml), 0,4 ml del producto a ensayar (extracto C y D) en 13 ml de medio, y se siguió el método de dilución en agar e inoculación múltiple en superficie modificado por Mantilla y Sanabria (18).

La actividad antifúngica fué determinada por el método de difusión en gel perforación (19), en agar sabouraud-destrosa. Los hongos para el ensayo fueron: *Penicillium sp.*, *Penicillium Steki*, *Aspergillus niger*, *Mucor sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporium*, *Absidia sp.*, *Circinella sp.*, *Zygorrhynchus sp.*, *Basidiobolus sp.*, *Sandaria sp.*, *Alternaria sp.*, *Scopulariopsis sp.*, *Aspergillus flavus* y Solución de nistatina (250 mcg/ml) como patrón y etanol como control de solvente; y extractos C y D (0,1 ml), todas las cepas bioquímicamente tipificadas del laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional.

La actividad antimicrobiana de *Phyllanthus Acuminatus vahl* se confirmó mediante el ensayo de los extractos C y D, frente a los microorganismos citados anteriormente. Dichos extractos fueron obtenidos por maceración con etanol de 10 g. de material vegetal con 120 ml. de alcohol, filtrado, lavado, concentrado al vacío y llevado a un volumen de 10 ml. con etanol del 95%: extracto C: 1g planta/ml de solvente y a la dilución 1:10: extracto D: 0,1 g de planta /ml.

### Extracción De Las Sustancias Responsables De La Actividad Antimicrobiana.

Con el fin de seleccionar el solvente de extracción se ensayaron los extractos de 10 g. de material con etanol del 95%, cloroformo y éter de petróleo efectuados de la manera descrita antes, para así obtener los extractos concentrados a sequedad y luego llevados a 10 ml con etanol para obtener el extracto C y D, de cada uno de los solventes. Se determinó la actividad antimicrobiana por duplicado. Se observó que el extracto etéreo presentó muy poca actividad, el clorofórmico y el etanólico fueron activos, siendo este último el que dió mayor actividad.

Obtención del extracto etanólico desengrasado: Se tomaron 10 g. de material se maceraron con 50 ml de éter de petróleo se agitaron sobre un baño de maría a temperatura menor de 40 °C, por 5 minutos, se filtró en frío al vacío y se concentró a presión reducida, y el residuo del material vegetal secado al aire, se extrajo con etanol, y se le hizo el tratamiento adecuado para obtener el extracto etanólico C y D. Se evaluó microbiológicamente el extracto etéreo y el C y D. El extracto etanólico presentó actividad similar al que no había sido sometido a desengrase y el etéreo no presentó actividad por lo tanto este método fué seguido para la extracción de las sustancias activas del material vegetal.

Se tomaron 500 g. de material vegetal seco, se maceraron por 2 h con 1 lt. de éter de petróleo, se calentó sobre baño de maría a temperatura de 40 °C por 60 minutos, se agitó mecánicamente en intervalos de 15 min., se enfrió y se filtró al vacío, obteniéndose el material vegetal "desengrasado". El filtrado etéreo fué concentrado a presión reducida y determinada su actividad antimicrobiana. El material vegetal desengrasado, secado a temperatura ambiente, se maceró por 24 h. con 2,5 Lt. de etanol del 95%, se calentó con agitación mecánica a 200 r.p.m. sobre baño de maría a temperatura de 60°C por 1 h, en intervalos de 10 min., se enfrió y filtró al vacío; en igual forma el residuo fué extraído cada vez con 1 lt. de etanol del 95% (hasta 6 Lt). Se reunieron los filtrados se concentró a presión reducida y se obtuvieron 125 g. de extracto etanólico desengrasado: extracto "Q", el cual fué evaluado microbiológicamente.

50 g. del extracto "Q", fueron absorbidos en 60 g. de sílica gel S para cromatografía en columna (Ridel De-Haen) (columna N°1) hasta obtener un polvo fino homogéneo; la muestra así preparada fué separada por C. en C. sobre sílica gel tipo 60, se eluyó inicialmente con cloroformo, luego  $\text{CHCl}_3$ -metanol 98:2, 95:5. hasta 50:50. Se recolectaron 350 fracciones de a 25 ml, fueron concentradas y controladas por CCD. se combinaron de acuerdo a Rf y coloraciones con reveladores, obteniéndose 50 grupos de fracciones. Se redisolviéron en etanol para los ensayos microbiológicos, de acuerdo a resultados cromatográficos y actividad antimicrobiana se reunieron de la 10 a la 20 y 24 a 36, las cuales se denominaron "Q<sub>1</sub>" y "Q<sub>2</sub>", respectivamente

### Purificación de las Fracciones Activas:

La fracción activa "Q<sub>1</sub>" dió buena separación por CCD en Benceno-éter etílico 9:1. se tomaron 3 g. del extracto adsorbidos en sílica gel S y se separaron por CC (columna N° 2) sobre sílica gel 60 (para CC.), se empezó la elución con Benceno y se aumentó un poco la polaridad con éter etílico hasta 70:30, se recogieron 110 fracciones de a 10 ml., se concentraron, pesaron y por CCD y por evaluación según el ensayo antifúngico se reunieron en 13 grupos. Los grupos de la 5 a la 9 con Rf semejante y actividad antifúngica similar se reagruparon en una sola: "Q.1.1."

Q.1.1. por CCD. en Benceno-éter etílico 94:6, mostró 2 manchas definidas (Rf: 0.78, 0.53), por bioautografía en capa delgada (Kline y Golab (20), modificado por Castrillón y Farfán (21) se vió que la mancha de mayor Rf y coloración violeta con vainillina-acido o-fosfórico era responsable de la actividad. La sustancia activa se separó por Cromatografía preparativa en capa delgada (CCDP), en el solvente anterior, se raspó y se extrajo de la sílica con cloroformo, se concentró y se llamó "Q.1.1.A". de la cual se controló la pureza por C. bidimensional empleando diferentes solventes en una y en otra dirección; mostró una sola mancha. Con una cantidad adecuada de esta sustancia se efectuó la actividad antifúngica, contra los tres hongos que presentó mayor actividad.

La Fracción activa "Q<sub>2</sub>". (fracciones de la 24 a la 36 de la columna n°1) fué analizada por CCD. con varias mezclas de solventes, dando 2 manchas bien definidas con: Benceno-acetato de etilo-acetona (60:30:10) y revelador: vainillina-ácido o-fosfórico. la actividad por Bioautografía se vió bastante disminuida; Se hizo separación de las 2 sustancias por CCDP. luego cada sustancia fué analizada microbiológicamente contra 3 hongos y también se efectuó una Bioautografía.

Concentración mínima inhibitoria: Se determinó a la sustancia activa "Q.1.1.A." por el método de difusión en gel

perforación (Castrillón, C.E. 22), la sustancia presenta actividad a concentraciones desde 10000 hasta 312 mcg/ml.. utilizando como patrón de comparación Nistatina, y contra los 3 hongos que dió mayor actividad en todos los ensayos.

### RESULTADOS Y DISCUSION.

#### Análisis Fitoquímico Preliminar.

En el análisis preliminar efectuado a la planta, se obtuvieron reacciones positivas para flavonoides (shinoda y cloruro férrico), lactonas terpénicas (CCD, hidroxámato férrico y vainillina ácido o-fosfórico), taninos (gelatina-sal y cloruro férrico al 10%), antraquinonas (Borträger-Kraus) y esteroides y/o triterpenoides libres (CCD, Lieberman-burchard). Se observaron reacciones negativas para alcaloides, cumarinas, saponinas y glicósidos cardiotónicos.

#### Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico

El extracto etanólico C y D no presentó actividad contra las bacterias Gram positivas, Gram negativas ni contra la levadura. Frente a los hongos, se observó que el extracto C presentó inhibición frente a *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporium*, *Absidia sp.*, *Circinella sp.*, *Zygorrinchus sp.*, *Basidiobolus* y el extracto D inhibió el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y *Zygorrinchus sp.*

#### Separación de las sustancias responsables de la Actividad:

Selección del solvente de extracción: los extractos C y D obtenidos en etér de petróleo, cloroformo y etanol, no presentaron actividad antibacteriana, pero su actividad antifúngica contra los 14 hongos permitió escoger al etanol del 95% como mejor solvente ya que se obtuvieron halos nítidos contra los hongos citados anteriormente. Igualmente el extracto de 10 g. de material desengrasado con etér de petróleo con el objetivo de empezar a eliminar impurezas como pigmentos y clorofilas. que luego fué tratado con etanol dió actividad comparable al extracto etanólico sin desengrasar respecto a las bacterias ensayadas y a los hongos. Y el líquido de desengrase en concentración proporcional no presentó actividad antifúngica. y fué el método escogido para preparar el extracto para separar las fracciones activas de la planta.

De acuerdo a ensayos preliminares 500 g. de material vegetal desengrasado y seco fueron extraídos con etanol del 95% se produjeron 125 g. de extracto denominado "Q". 50 g. fueron separados por CC. (columna N° 1) por elución con

cloroformo inicialmente y luego se aumento polaridad con metanol hasta obtener 350 fracciones. Se reunieron 50 grupos de acuerdo a Rf similares en varios solventes y con varios reveladores (cuyo peso fué de 27% de los 50 g) y por el ensayo antifúngico. Los grupos de fracciones de la 10 a la 20 en concentraciones de 10.000 a 785 mcg/ml presentan una actividad antifúngica marcada, se presentan halos nítidos especialmente contra: *Penicillium sp*, *Aspergillus fumigatus*; *Zygorrinchus sp.*; *Sandaria sp.* y *Scopulariopsis sp.* Además reducción de la actividad contra *Circinella sp*, *Sandaria Sp*, *Absidia Sp*, *Fusarium oxysporium*; *Aspergillus niger* y *Penicillium steki*. y de la 24 a la 36 presentan una actividad antifúngica reducida contra estos mismos microorganismos, y no hay actividad contra *Scopulariopsis sp.*

### Purificación de las Fracciones Activas:

De acuerdo a su actividad antifúngica semejante y por CCD. manchas con Rf semejantes, las fracciones activas de la 10 a la 20 fueron reunidas en la fracción activa "Q1". (peso 3.15 g). por CCD se vió la presencia de más de 3 manchas no definidas y por bioautografía se observó que sólo una era responsable de la actividad. de la separación de 3 g. por CC. eluida con benceno-éter etílico. de las 110 fracciones (82,54% de peso). obtenidas se reunieron en 13 grupos debido a similitud de Rf por CCD. y a la actividad antiúngica contra 12 hongos. Se vió que las fracciones de la 5 a la 9 presentaron halos nítidos y diámetro semejante que los de ensayos anteriores. especialmente contra *Penicillium sp*, *Aspergillus* y *Zygorrinchus sp.* Estas se reunieron en una denominda fracción activa "Q.1.1." (1.03 g). por CCD. en Benceno-éter etílico 94:6 y revelado con vainillina-Acido o-fosfórico; dió dos manchas A y B con Rf: 0.53 (morado) y Rf: .78 (violeta). Por bioautografía se vió que la mancha con Rf .78 era la responsable de la actividad. por lo tanto por CCDP (preparativa) se aisló la sustancia "Q.1.1.A" (peso: 0,20 g), la cual por CCD bidimensional con 3 sistemas de solventes de diferente polaridad mostró que estaba pura.

El ensayo antifúngico de "Q.1.1.A." en concentración de 3.000 mcg/ml muestra actividad contra *Penicillium sp.* (19 mm N), *Aspergillus fumigatus* (25 Nítido), *Absidia sp.* (15 R), *Circinella sp.* (14 R), *Zygorrinchus sp.* (25N), *Basidiobolus* (12N), *Sandaria Sp.* (14 R), *Scopulariopsis sp.* (12R). contra unos microorganismos mayor a la del extracto etanólico original.(C) y contra otros dió actividad que antes no se mostraba.

El grupo de fracciones de la 24 a la 36 eluidas de la columna N° 1. mostraron actividad antifúngica pero especialmente reducción de la actividad contra *Aspergillus niger*, *Circinella sp* y *Zygorrinchus sp.* y por CCD. por Rf se reagruparon en la denominada Fracción activa "Q.2." (1,7 g). Por CCD, con

Benceno-acetato de etilo- acetona 60:30:10 mostró 2 manchas A de Rf: 0.62 (azul fluorescente al U.V. y violeta con vainillina) y B: Rf: 0,54 (azul). y por bioautografía ambas presentan actividad antifúngica como reducción del crecimiento. La separación por CCDP. con el solvente anterior. produjo dos sustancias: "Q.2.A" y "Q.2.B". que fueron evaluadas por el método de difusión en gel contra 3 hongos dando como resultado pérdida de la actividad antifúngica. Esto hace pensar que las dos sustancias aisladas no presentan actividad pero reunidas en la fracción "Q.2" poseen potenciación de sus actividades.

La sustancia activa "Q.1.1.A", se presenta como un líquido amarillo de consistencia viscosa, no cristizable. soluble en etanol, cloroformo, y un poco en agua. Por CCD. desarrollada en Benceno-éter etílico 94:6 y revelada con vainillina-ácido o-fosfórico dió coloración violeta al igual que con vainillina ácido sulfúrico y Lieberman Burchard, característica de esteroides y de triterpenoides libres. Con hidroxamato férrico da coloraciones características de lactonas terpénicas, con 2-4 Dinitro fenilhidrazina coloración amarilla característica de grupos carbonilos y con yodo coloración amarilla intensa. En resumen la sustancia posiblemente presenta un grupo lactona, carbonilo con estructura terpénica pero debido a todos los ensayos microbiológicos no alcanzó para continuar su identificación por métodos espectroscópicos. además se nota que con el tiempo alcanza a perder un poco de actividad.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de la sustancia activa "Q.1.1.A".

A La sustancia activa "Q.1.1.A" pura se le determinó la CMI. por difusión en gel, los resultados se pueden observar en la tabla N°. 1. se observa que la sustancia es activa hasta 312 mcg./ml. (menor concentración que inhibe el crecimiento).

**TABLA N° 1.** Resultados Del Ensayo Microbiológico Para La Determinación De La Concentración Mínima Inhibitoria de la sustancia activa "Q.1.1.A".

Concentración mcg/ml.	Penicillium sp.	Aspergillus fumigatus	Zygorrinchus sp.
10000	14 R	13 R	16 N
5000	15 R	12 R	15 N
2500	13 R	11 R	14 N
1250	10 R	13 R	13 N
625	9 R	10 R	10 N
312	9 R	10 N	11 R
156	--	--	--
78	--	--	--
39	--	--	--
19	--	--	--

Convenciones: Blanco: etanol 95%. Halo se expresa en mm.  
N: halo nudo. R: halo de reducción, No activo (-), Control  
de comparación: Nistatina 250 mcg/ml.

De acuerdo con estos resultados esta sustancia "Q.1.1.A" debido a su actividad antifúngica amerita seguir estudiandola puesto que sustancias con este tipo de actividad son importantes por la resistencia que presentan estos microorganismos. Además su posible utilidad en la industria agrícola como sustancia preservadora de plantas en infecciones causadas por hongos ya que contra varios de los que presenta actividad son fitopatógenos. Se continuará la elucidación estructural de esta y de las sustancias que poseen sinergismo en su actividad.

## AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a Colciencias y a la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo financiero, a través del Programa de Investigación: "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas".

## BIBLIOGRAFIA.

- H.W. Florey. *Antibiotics*. Oxford Medication Publications London. Vol I. pag 587 (1949).
- Ibid.*, pag 588 (1949).
- N.R. Farnsworth. *J. Pharm. Sci.* **55**, 225-269 (1966)
- L. Ferenczy., y col. *Acta Microbial Acad. Sci. Hung.* **12**, 337-344 (1966)
- O.M. Pitts. *J. Pharm. Sci.* **58**, 379-380 (1969)
- C. Ramirez. *Can. J. Microbial.* **15**, 1341 (1970).
- H. Ohisgasgi, H. Kazuyoshi y K. Hiroshi. *Agric. Biol. Chem.* **36** (8), 1399-1403 (1972).
- S. Higashi, M. Abe y T. Hase. *Chemical Abstracts.* **84**, 130819 (1976). 9. R. Haicow y C. Hebd. *Chemical Abstracts.* **83**, 111087s (1975).
- G. Pettit. y col. *J. Chem.* **61** (11), 2630-2632 (1983)
- G. Pettit. *J. Org. Chem.* **49** (22), 4258-4266 (1984).
- Hnatyszyn y col. *J. of Natural Products.* **50** (6), 1156-1157 (1987).
- M. Ueno y col., *J. of Natural Products.* **51** (2), 357-359 (1988).
- Satyanarayana y col., *J. of Natural Products.* **51** (1), 44-49 (1988).
- H. Garcia Barriga, "*Flora Medicinal de Colombia: Botánica Médica*", Tomo III. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, 1975.
- A.M. Rodriguez, G. E. Lucero. "*Estudio comparativo del efecto antimicrobiano de diferentes extractos de Plantas superiores Colombianas*". Tesis, Universidad Nacional, Departamento de Farmacia, Bogotá. (1986)
- A. Sanabria. *Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 especies de la familia Compositae*, Universidad Nacional, Departamento de Farmacia, Bogotá, 1.983.
- J.R. Mantilla y A. Sanabria. *Rev. Colomb. de Cienc. Quím-Farm.* **4** (2), 25-33 (1985).
- A. Sanabria y J.R. Mantilla. *Rev. Colomb. de Cienc. Quím-Farmac.* **Nº. 15**, 17 (1986)
- R.M. Kline y T. Golab. *J. Chromatog.* **18**, 409 (1965).
- C.E. Castrillón F.E. Farfán. Aislamiento de sustancias con Actividad Antimicrobiana de *Conyza floribunda* H.B.K. Tesis, Universidad Nacional, Bogotá, 1981.
- C.E. Castrillón F.E. Farfán. Aislamiento de sustancias con Actividad Antimicrobiana de *Conyza floribunda* H.B.K. Tesis, Universidad Nacional, Bogotá, 1981.