

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE PLANTAS SUPERIORES COLOMBIANAS*

Antonio Sanabria**
José Ramón Mantilla***

Resumen:

Fue evaluada la actividad antifúngica de los extractos etanólico de 56 plantas superiores por el método de difusión en gel-perforación en placa inoculada en profundidad frente a *Candida albicans*, *Candida sp.*, *Aspergillus niger*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.* y *Alternaria sp.* Las plantas *Ageratina ibaguensis*, *Conyza floribunda*, *Eupatorium albidifolium*, *E. densum*, *E. glyptophlebium*, *E. gracilae* var. *epilabioides*, *E. morifolium* y *E. tacotanum* de la familia *Compositae* y *Bucquetia glutinosa* (melastomataceae) presenta una actividad antifúngica significativa contra por lo menos 3 de los 6 hongos probados.

Summary:

Antifungal activity of the alcoholic extracts of 56 higher plants was evaluated by the method of diffusion in gel-perforation in plates inoculated in depth against *Candida albicans*, *Candida sp.*, *Aspergillus niger*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.* and *Alternaria sp.* A significant antifungal activity was presented against at least three of six tested fungi, in the extracts of *Ageratina ibaguensis*, *Conyza floribunda*, *Eupatorium albidifolium*, *E. densum*, *E. glyptophlebium*, *E. gracilae* var. *epilabioides*, *E. morifolium* and *E. tacotanum* of the family *Compositae* and *Bucquetia glutinosa* of the family *Melastomataceae*.

INTRODUCCION

Aunque muchas especies de hongos pueden producir infecciones graves en el hombre y en los animales, el número de agentes antifúngicos

desarrollados ha sido relativamente escaso, si lo comparamos con el número de antibacterianos empleados en terapéutica. Esta deficiencia radica esencialmente en que las enfermedades producidas por hongos, hasta hace algún tiempo, eran menos comunes que las causadas por bacterias; sin embargo, debido al uso frecuente de antibióticos, de adreno-corticoides, de inmunosupresores, de radioterapia y a otros factores, se ha incrementado el número de individuos susceptibles a micosis secundarias severas producidas especialmente por hongos de los géneros *Cándida*, *Aspergillus*, *Mucor* y en menor grado por *Penicillium*, *Torulopsis* y *Geotrichum* (1,2,3)

En la actualidad las fuentes más importantes para la obtención de sustancias con actividad antifúngica son especies de *Streptomyces*, algunos hongos y productos de síntesis orgánica; sin embargo, las plantas superiores han mostrado muy buenas perspectivas con este propósito y se han publicado un buen número de trabajos entre los cuales se pueden mencionar los siguientes:

Pitts y col. (4) demostraron la actividad de un extrato acuoso de los frutos de *Solanum carolinense* frente a *Penicillium sp.* y Khanna y Nene (5) detectaron la acción antifúngica de la planta *Anagallis orvensis*.

Se han aislado alcaloides con actividad antifúngica, por ejemplo Ferency y col. (6) determinaron que un alcaloide obtenido de *Cynanchum vincetoxicum* inhibió el crecimiento de levaduras, mohos y dermatofitos en concentraciones inferiores a 1.0 mcg/ml. Igualmente Hufford y col. (7) informaron de la actividad antifúngica de la liriodenina y de otros alcaloides con el núcleo de la oxoaporfina.

Algunos acetilenos aislados especialmente de plantas de las familias *Compositae*, *Umbelliferae*, *Araliaceae* y *Campanulaceae* presentan actividad antifúngica significativa. El safinol y el dihidrosa-

* Trabajo desarrollado dentro del proyecto de investigación "Contribución al estudio de la acción antimicrobiana de algunas plantas colombianas", copatrocinado por COLCIENCIAS y la Universidad Nacional.

** Profesor Asociado, Laboratorio de Fitoquímica, Departamento de Farmacia, U. Nal.

*** Profesor Asistente, Laboratorio de Microbiología, Departamento de Farmacia, U. Nal.

finol, obtenidos de Umbelíferas, mostraron actividad contra *Phytophthora drechleri* en concentraciones de 12 y 1.7 mcg/ml. respectivamente (8,9). De la Compuesta *Artemisia capillaris* (8) se aislaron cetonas acetilénicas como la capillina y de *Aegopodium podagraria*, en 1978, Kemp (10), identificó los poliacetilenos faltarinol y faltarindiol, sustancias que presentaron una potente actividad antifúngica. De *Vicia faba*, una leguminosa, Fawcett y col. (11) aislaron un cetoéster acetilénico derivado del furano, denominado wyerona y demostraron que este compuesto y algunos de sus derivados inhiben el crecimiento de varias especies de hongos.

Por otra parte, Jurd y col. (12,13) demostraron que las cumarinas naturales seselina, xanthiletina, psoraleno y luvangetina inhiben a concentraciones comprendidas entre 30 y 300 mcg/ml, el crecimiento de los hongos *Aspergillus niger* y *Cornularia lanata*.

Finalmente, vale la pena citar la potente actividad antifúngica de un compuesto con una estructura sencilla, como el p-metoxycinamato de etilo, aislado por Gupta y Banerjee (14) de *Cucurma zedoira*, el cual fue activo contra 11 hongos de ensayo a una concentración de 50 mcg/ml.

Al evaluar la actividad antifúngica de plantas colombianas, además de contribuir al conocimiento de los recursos naturales del país, se pretende iniciar la búsqueda de sustancias con acción antifúngica en fuentes diferentes a las tradicionales, con el propósito de encontrar su aplicación no sólo en el campo terapéutico, sino en agricultura y en las industrias farmacéuticas y alimenticias.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal.

Todas las plantas analizadas en el presente estudio fueron colectadas en distintas regiones del Departamento de Cundinamarca (Colombia) teniendo en cuenta sus usos populares, reacciones positivas a pruebas de toque para alcaloides (Dragendorff), triptaminas (Ehrlich) y fenoles (cloruro férrico), o al hecho de pertenecer a familias de plantas con antecedentes de poseer metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Las diferentes partes de las plantas fueron secadas el mismo día de su colección en una estufa con aire circulante a 40°C y luego molidas hasta un tamaño de partícula adecuado para los procesos de extracción. Los ejemplares de las plantas fueron determinados taxonómicamente y registrados en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia por los

profesores Santiago Díaz P., Gustavo Lozano y Roberto Jaramillo.

Microorganismos de ensayo.

Las seis cepas enumeradas en la Tabla I fueron seleccionadas teniendo en cuenta su facilidad de desarrollo en medios de cultivo sencillos, el empleo de algunos de ellos en ensayos de sensibilidad a antimicóticos y el ser representativas de diferentes clases de hongos potencialmente patógenos.

Las cepas desarrolladas en agar Sabouraud-dextrosa fueron conservadas en refrigeración.

TABLA I. ORGANISMOS EMPLEADOS PARA LA EVALUACION PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE PLANTAS SUPERIORES COLOMBIANAS

No.	Organismo	Procedencia	Clasificación	Infección que puede causar
1.	Candida albicans	ATCC 752	levadura	Candidiasis
2.	Candida sp.	I.N.S.	levadura	Candidiasis
3.	Aspergillus niger	I.N.S.	Moho	Aspergillosis
4.	Mucor sp.	I.N.S.	Moho	Ficomicosis
5.	Penicillium sp.	I.N.S.	Moho	Micosis secundaria
6.	Alternaria sp.	I.N.S.	Moho	Reacciones alérgicas

ATCC: American Type Culture Collection

I.N.S.: Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia

Preparación de los extractos vegetales

Con el fin de obtener los extractos para la evaluación de la actividad antifúngica fue modificado el método de Mitscher y col. (15) de la siguiente manera: A 10g de material vegetal pulverizado se adicionaron 120 ml de etanol del 95%, se burbujeó nitrógeno, se tapó el recipiente herméticamente y se dejó en maceración durante la noche; luego, el conjunto fue colocado en un baño de maría a 60-70°C, se agitó durante 10 minutos a 200 r.p.m. se dejó enfriar y se filtró con vacío, lavando el residuo con 30 ml. de etanol. El filtrado fue llevado a sequedad en un evaporador rotatorio a una temperatura no superior a 40°C. El residuo fue disuelto en 10 ml. de etanol del 95%, con lo cual se obtuvo una solución en la que 1 ml. contiene los principios de 1g de planta (solución "C"). 1 ml. de la solución "C" fue diluido a 10 ml. con etanol del 95%, obteniéndose la solución "D".

Preparación de los inóculos.

De los cultivos de mantenimiento se hicieron siembras por estrías en placas de agar Sabouraud-dextrosa, se incubaron a 25°C por 48 horas (levaduras y *Aspergillus niger*) y por 72 horas (los demás hongos filamentosos). Las levaduras se sembraron en tubos con caldo Sabouraud-dextrosa se incubaron a 25°C por 24 horas y antes de la inoculación se diluyó 1:100 con solución salina estéril. Dos rodajas de agar de 10 mm. de diámetro de los cultivos en placa de los hongos filamentosos, fueron colocadas en tubos de ensayo

TABLA II. PLANTAS SUPERIORES ESTUDIADAS

PLANTA	Parte	PLANTA	Parte	PLANTA	Parte
ANNONACEAE		Diplostheplum phyllcolides H.B.K.	Aer.	EUPHORBIACEAE	
Raymondia quinduensis	Aer.	Erechtites valerianifolia Wolf.	Aer.	Croton mutisianus H.B.K.	Aer.
BERBERIDACEAE		Eupatorium acuminatum H.B.K.	Aer.	Croton polycarpus Benth	Aer.
Berberis rigidifolia H.B.K.	Aer.	Eupatorium af. altidifolium Zauss.	Aer.	Euphorbia caracasana Bolssier	Aer.
BIGNONIACEAE		Eupatorium angustifolium H.B.K.	Aer.	Euphorbia caracasana Bolssier	C.T.
Tabebuia chrysantha (J.) Nichols	C.T.	Eupatorium densum Benth	Aer.	LABIATAE	
Tecoma stans (L.) Juss	Hoj.	Eupatorium glyptophlebium	Aer.	Hyptis colombiana Epling	Aer.
Tecoma stans (L.) Juss.	Vain.	Eupatorium gracile H.B.K. var epilabioides Robin	Aer.	Hyptis mutabilis (Rich.) Epling.	Aer.
BURSERACEAE		Eupatorium morifolium Mill.	Aer.	Lepechina conferta (Benth.) Epling.	Aer.
Bursera graveolens (H.B.K.) Tr. P.	Hoj.	Eupatorium tacotanum Klatt	Aer.	Salvia tillaeifolia Vahl.	Aer.
Bursera graveolens (H.B.K.) Tr. & P1.	C. T.	Eupatorium tequendamense Hieron	Aer.	LEGUMINOSAE	
CAPPARIDACEAE		Gnaphallium graveolens H.B.K.	Aer.	Dioclea sericea H.B.K.	Aer.
Cleome anomala H.B.K.	Aer.	Heliopsis buphtalmoides (jacq.) Dun.	Aer.	Indigofera suffruticosa Mill.	Aer.
COMPOSITAE		Hypochaeris radicata L.	Aer.	Lupinus bogotensis Benth	Aer.
Ageratina ibaguensis King Rob.	Aer.	Hypochaeris radicata L.	Ra.	Polretia scandens Vent.	Aer
Baccharis prunifolia H.B.K.	Aer.	Mikania cardifolia (L.) WILLD	Aer.	MELASTOMATACEAE	
Baccharis prunifolia H.B.K. var. subprunifolia Cuatr.	Aer.	Munnozia seneccionidis Benth.	Hoj.	Bucquetia glutinosa (L.F.) D.C.	Ra.
Baccharis trinervis (Lam.) Pers.	Aer.	Munnozia seneccionidis	C.T.	PHYTOLACCACEAE	
Bidens pilosa L.	Aer.	Schistocarpa eupatorioides (Fenzl.)	Aer.	Phytolacca bogotensis	Aer.
Calea glomerata Klatt.	Aer.	Stelactina af. longipes Blake	Aer.	POLYGALACEAE	
Calea glomerata Klatt.	C.T.	Verbesina crassiramea	Aer.	Monnina phytolaccifolia H.B.K.	Aer.
Cilbadium villosum Benth.	Aer.		Aer.	SOLANACEAE	
Conyza bonariensis (L.) Crong.	Aer.			Cestrum venosum Willd.	Aer
Conyza floribunda H.B.K.	Aer.				
Dahlia imperialis Roetz.ex. Ortg.					

Parte de la planta: Aérea (Aer.); Hojas (hoj.); Vainas (Vain.); Corteza del tallo (C.T.); Raíz (Ra.)

TABLA III. ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE EXTRACTOS ALCOHOLICOS DE PLANTAS SUPERIORES

PLANTA	Parte	S	Levaduras*		Hongos filamentosos*				Observaciones**
			1	2	3	4	5	6	
ANNONACEAE									
Raymondia quinduensis	Aer.	C	13	12	-	25	14	19(27)	Poca actividad
		D	11	10	-	13	11	14(20)	
COMPOSITAE									
Ageratina ibaguensis King Rob.	Aer.	C	23(27)	20(25)	21	25	23	30(35)	Buena actividad
		D	16(23)	15(22)	11	13	10	17(22)	
Baccharis prunifolia H.B.K.	Aer.	C	-	-	14	16	15	18	Poca actividad
		D	-	-	-	-	-	13	
Baccharis prunifolia H.B.K. var. subprunifolia Cuatr.	Aer.	C	11	-	-	12	12	30	Poca actividad
Calea glomerata Klatt.		D	-	-	-	-	-	13	
	Aer.	C	12	10	12	-	14	-	Poca actividad
		D	10	-	-	-	-	-	
Conyza floribunda H.B.K.	Aer.	C	11	-	25(27)	22(25)	20(25)	10(15)	Buena actividad
		D	-	-	13(25)	12(15)	12(15)	-	
Erechtites valerianifolia Wolf.	Aer.	C	13	13	-	-	12	-	Poca actividad
		D	-	-	-	-	9	-	
Eupatorium acuminatum H.B.K.	Aer.	C	10	12	9(12)	11	15(22)	12(17)	Poca actividad
		D	-	-	-	-	-	-	
Eupatorium af. altidifolium Zauss.	Aer.	C	29	27	20	20	18	24	Buena actividad
		D	17	20	12	11(15)	11	15	
Eupatorium angustifolium H.B.K.	Aer.	C	-	-	-	11	12	12(14)	Inactiva
		D	-	-	-	-	10	10	
Eupatorium densum Benth	Aer.	C	13	12	17(23)	17(19)	17(20)	18(20)	Mediana actividad
		D	10	10	10(13)	9(11)	10(12)	11(13)	
Eupatorium glyptophlebium Rob.	Aer.	C	15	13	17	17	15	30	Mediana actividad
		D	13	10	10	10	9	19	
Eupatorium gracillae H.B.K. var epilabioides Robin.	Aer.	C	18(26)	20(30)	30	22	24	28	Buena actividad
		D	14	15	22	17	17	19	
Eupatorium morifolium Mill.	Aer.	C	14	13	17	12	17	20	Buena actividad
		D	12	10	12	-	12	16	
Eupatorium tacotanum Klatt	Aer.	C	12	12	26	18	16	30	Buena actividad
		D	10	10	10	14	12	12	
Eupatorium tequendamense Hieron	Aer.	C	15	13	13(20)	12	12	16	Poca actividad
		D	12	10	12(18)	-	-	-	
LABIATAE									
Lepechina conferta (Benth.) Epling.	Aer.	C	14	14	-	12	14	13	Poca actividad
		D	12	10	-	10	10	10	
MELASTOMATACEAE									
Bucquetia glutinosa (L.F.) D.C.	Ra.	C	18(23)	17(20)	11	15	12	20	Mediana actividad
		D	11(16)	10(15)	-	-	-	-	

Parte de la planta: Aérea (Aer.); Hojas (hoj.); Vainas (Vain.); Corteza del tallo (C.T.); Raíz (Ra.)

S: Dilución del extracto etanólico

C: Solución en la que 1 ml. contiene los principios de 1g de planta seca

D: Dilución decimal de C.

* : Los números se refieren a los organismos de la Tabla I

** : El significado se explica en la Tabla III.

con 10 ml. de solución fisiológica (NaCl 0.9%) estéril y antes de la inoculación fueron suspendidas las esporas por agitación vigorosa en un agitador mecánico de tubos (Vortex).

Evaluación de la actividad antifúngica.

La determinación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de las plantas fue llevada a cabo por el método de difusión en gel-perforación en placa (16,17), trabajando para cada microorganismo por duplicado.

A 50 ml. de agar Sabouraud-dextrosa a 42°C se agregaron 0.5 ml. del inóculo, se homogenizó por agitación y se vertió en una caja de Petri de 150 mm. de diámetro, se dejó solidificar y se mantuvo a 4°C durante 1 hora. En cada una de las placas de agar se hicieron 15 perforaciones de 8 mm. de diámetro, distribuidas en forma adecuada, en dichas perforaciones se incorporaron 0.1 ml. de: 6 soluciones 'C' y 6 soluciones 'D' correspondientes a 6 muestras de plantas, una solución de anfotericina al 0.2% en etanol (Control positivo) y 2 blancos del etanol del 95% empleado en la extracción. Las cajas de Petri fueron dejadas en predifusión a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se incubaron a 25°C y fueron examinadas a las 24,48 y 72 horas. Los extractos que mostraron actividad antifúngica fueron reevaluados a los 8 días.

RESULTADOS Y DISCUSION

De varios métodos ensayados para evaluar la actividad antifúngica de plantas superiores, se obtuvieron los mejores resultados por un procedimiento en el cual las sustancias presentes en extractos etanólicos se les dejó difundir en placas de agar inoculadas en profundidad.

Siguiendo el procedimiento descrito, fue posible evaluar en un solo ensayo la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de 6 muestras vegetales en 2 concentraciones: Con la solución "C", en la que 1 ml. contiene los principios de 1g de planta, se obtuvo información sobre la presencia o ausencia de sustancias con actividad antifúngica y con la solución "D" (dilución 1:10 de "C") se logró conocer la potencia aproximada de las sustancias con dicha actividad.

Los resultados se consideraron válidos cuando, por duplicado, se obtuvo un crecimiento homogéneo del hongo cultivado, no hubo inhibición por el etanol del 95% utilizado para la extracción y solubilización de los extractos y los diámetros de inhibición producidos por una solución de anfotericina B al 0.02% en etanol fueron nítidos y superiores a 12 mm. (incluido el diámetro del orificio de 8 mm).

En la Tabla II se relacionan las plantas que fueron estudiadas y en la Tabla III se presentan los resultados de la evaluación de los extractos etanólicos correspondientes a las muestras vegetales que mostraron alguna actividad. Se expresan en mm los diámetros de inhibición que producen las soluciones etanólicas "C" y "D" frente a los 6 microorganismos de ensayo descritos en la Tabla I. En algunos casos, además del diámetro de inhibición nítido, se observó una zona en la cual disminuye el crecimiento microbiano y el valor de este diámetro de reducción aparece en la Tabla III entre paréntesis.

Teniendo en cuenta las correlaciones establecidas por Kirby y Bauer (18) para ensayos de susceptibilidad, se adoptaron los criterios presentados en la Tabla IV, que aunque arbitrarios hasta cierto punto, permiten catalogar las muestras de las plantas estudiadas en INACTIVAS, con POCA ACTIVIDAD, MEDIANA ACTIVIDAD y BUENA ACTIVIDAD, de acuerdo con los diámetros de inhibición producidos por las soluciones etanólicas "C" y "D" sobre por lo menos 3 hongos de los 6 ensayados.

TABLA IV. CRITERIOS TENIDOS EN CUENTA PARA CATALOGAR LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LAS MUESTRAS VEGETALES ESTUDIADAS.

CATALOGACION	Diámetros de inhibición		No. de muestras vegetales
	Solución "C"	Solución "D"	
Inactivas	≤ 11 mm		39
Poca actividad	12-16 mm		8
Mediana actividad	≥ 17 mm		3
Buena actividad	≥ 17 mm	≥ 12 mm	6

Los datos anotados en las Tablas III y IV permiten deducir los siguientes resultados globales:

De las 56 muestras vegetales analizadas, 17 (30%) presentaron actividad antifúngica. De las anteriores, 8(14%) mostraron POCA ACTIVIDAD, 3(5%) MEDIANA ACTIVIDAD y 6(11%) BUENA ACTIVIDAD.

Vale la pena considerar por separado las plantas de la familia *Compositae* analizadas, debido a que se observó una actividad antifúngica particularmente importante. De las 32 muestras vegetales de esta familia, 14(44%) mostraron POCA ACTIVIDAD, 2(6%) MEDIANA ACTIVIDAD y 6(19%) BUENA ACTIVIDAD. Es interesante resaltar el hecho que dentro de las 9 plantas que produjeron la mayor actividad antifúngica, 8 fueron Compuestas. Los anteriores resultados hacen pensar en la posibilidad de considerar la familia *Compositae* como una buena fuente de sustancias con actividad antifúngica.