

ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS*

LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF *PYCNOPORUS SANGUINEUS*

Edwin Correa^{1,3}, Winston Quiñones¹, Fernando Torres¹, Diana Cardona¹, Ana E. Franco², Sara Robledo³, Fernando Echeverri¹

Resumen

Mediante ensayos biodirigidos se aisló de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) un compuesto activo contra amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis*; su elucidación estructural se realizó mediante técnicas espectroscópicas (RMN ¹H y ¹³C y Espectrometría de Masas); este producto fue identificado como el ergosterol-5,8-endoperóxido.

Palabras clave: *Pycnoporus sanguineus*, ergosterol endoperóxido, leishmanicida

Abstract

Through bioguide assays a bioactive compound against *Leishmania (Viannia) panamensis* was isolated from *Pycnoporus sanguineus*, the structural elucidation was achieved with spectroscopical methods (¹H and ¹³C NMR and MS). This compound was identified as ergosterol-5,8-endoperoxide.

Key words: *Pycnoporus sanguineus*, ergosterol endoperoxide, leishmanicidal

INTRODUCCIÓN

De las especies del género *Pycnoporus* (Polyporaceae) (Yokohama y Natori, 1975), se han aislado varios compuestos intensamente coloreados del tipo fenoxazin-3-ona, que en primera instancia tienen una semejanza electrónica y topológica parcial con el residuo de pterina del ácido fólico (Achenbach y Blümm, 1991), (figura 1), un limitante en el metabolismo de parásitos tales como leishmania, tripanosoma y malaria, como lo reportan Cunningham y Beverley (2001) y Ouellette et al. (2002).

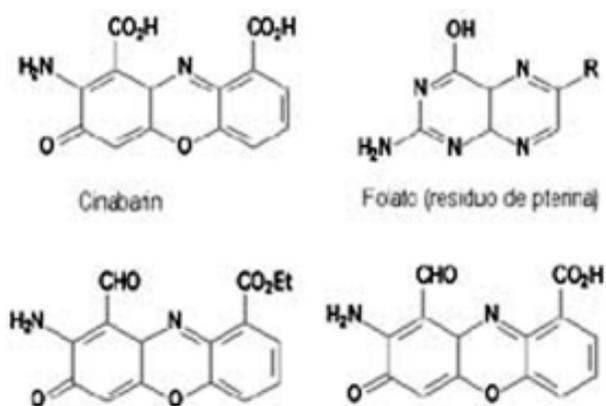


Figura 1. Compuestos aislados de *P. sanguineus* y estructura de ácido fólico

¹ Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales-SIU. Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

² Instituto de Biología. Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

³ PECET-SIU. Universidad de Antioquia A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia. Correo electrónico: <edwco32@yahoo.es>.

Por esta razón cabe la posibilidad de encontrar en este hongo sustancias antiparasitarias que ejerzan sus efectos con base en la inhibición o competición por la producción, transformación y uso de este sustrato. Dentro de nuestro interés por antiparasitarios de la flora colombiana, se llevó a cabo un estudio bioguiado para determinar su actividad sobre *Leishmania (Viannia) panamensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hongo. *Pycnoporus sanguineus* fue recolectado en el municipio de Medellín (Antioquia), Colombia, en el mes de noviembre de 2003 y una muestra está depositada en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA) con N.º 118775.

Extracción y aislamiento. Inicialmente los cuerpos fructíferos frescos de *Pycnoporus sanguineus* (250 g), se dividieron en pequeños trozos y se maceraron en acetona, se filtró y evaporó el solvente al vacío; el extracto resultante fue reextraído con acetato de etilo y secado sobre sulfato de sodio anhidro. Después de filtrar el acetato de etilo se evaporó a sequedad, dejando 1,5 g de un extracto crudo de intenso color rojo; una alícuota se sometió a ensayos para evaluar su actividad leishmanicida.

Una vez detectada esta actividad, el extracto se sometió a purificación por cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con CH_2Cl_2 :EtOAc (2:1 v/v), CH_2Cl_2 :EtOAc (1:2), CH_2Cl_2 :EtOAc (1:1), CH_2Cl_2 :EtOAc (1:2), las fracciones menos polares se reunieron, y posteriormente, se fraccionaron nuevamente en sephadex LH-20 con n-hexano: CH_2Cl_2 :MeOH (2:1:1) obteniéndose otras cuatro fracciones, una de las cuales produjo 95,5 mg de una mezcla de por lo menos tres compuestos según ccf de esta mezcla y luego de separación en una columna de sílica gel con benceno: acetato etilo se obtuvieron 25 mg de un sólido blanco correspondiente a ergosterol endoperóxido **1**. Las fracciones más polares de la columna inicial de sílica gel se reunieron en dos fracciones principales según crite-

rio de similitud por ccf y se sometieron a ensayo de actividad leishmanicida.

En otro ensayo, los cuerpos fructíferos (41,4 g) secos y molidos fueron extraídos por maceración con hexano, a este extracto bruto se le evaluó la actividad leishmanicida in vitro.

Síntesis de ergosterol-5,8-endoperóxido.

Ergosterol (198 mg, 0,49 mmol) fue disuelto en 50 ml de diclorometano en un balón de 100 ml, se adicionaron 25 mg de azul de metileno y se burbujeo oxígeno durante cuatro horas, la solución fue irradiada con una lámpara de mercurio a 254 nm, durante este periodo de tiempo; la reacción se monitoreo por ccf y se detuvo después de las cuatro horas, el crudo de la reacción se purificó por cromatografía de columna en sílica gel, bajo el sistema: hexano: acetato de etilo (100:0-90:10) para dar ergosterol-5,8-endoperóxido (130 mg, 0,30mmol) en 61% de producto como un sólido blanco, con espectro de RMN de ^1H y ^{13}C similares a las del compuesto **1**, aislado de los cuerpos fructíferos de *P. sanguineus*.

Selección del medio óptimo de cultivo. Para la selección del medio de cultivo, las esporas del hongo fueron obtenidas de basidiocarpos frescos; se usaron los medios de cultivo agar extracto de malta, agar extracto de levadura, agar sabouraud y agar papa-dextrosa. El crecimiento se evaluó en cajas de petri con los cuatro medios de cultivo a 20 y 24 °C durante diez días, observándose la formación de micelios.

Ensayos biológicos. Los ensayos de actividad leishmanicida y de citotoxicidad in vitro se realizaron en cooperación con el PECET de acuerdo a protocolos previamente descritos (Robledo et al., 1999; Weniger et al., 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estructura del compuesto **1** (figura 2) se elucidó por RMN y EM como se describe a continuación.

El espectro de RMN ^1H indica una sustancia del tipo esterooidal por las señales de los metilos en 1,06-1,49 ppm, además posee un protón geminal a un hidroxilo por la señal en 4,2 ppm (m, 1H.). Adicionalmente, se observan tres señales en 5,42 ppm (m, 2H, H-22,23), 6,74 ppm (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-7), 6,48 ppm (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-6) correspondientes a protones vinílicos; el experimento JMOD indicó los siguientes tipos de átomos de carbono: CH_3 (6), CH_2 (7), CH (7, incluyendo uno oxigenado), CH vinílicos (4); Cq, (2), Cq oxigenados (2). Con esta distribución se puede proponer la fórmula $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$, acorde con el peso molecular m/z 428 encontrado por espectrometría de masas.

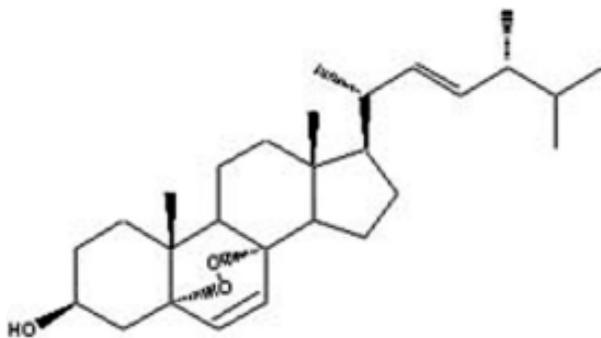


Figura 2. Estructura del ergosterol-5, 8-endoperóxido 1

El experimento COSY ^1H - ^1H , indica entre otras cosas que los protones de los dobles en 6,48 ppm y en 6,74 ppm están mutuamente acoplados e igualmente los dos protones de la señal compleja en 5,42 ppm (H-22, 23). Además, estos últimos protones vinílicos correlacionan con dos carbonos que se desplazan en 40,1 ppm (C-20) y en 43,2 ppm (C-24), adicionalmente se observan correlaciones entre Me-21 (1,24 ppm, d, $J = 6,6$ Hz) y C-22 (132,7 ppm) y entre Me-28 (1,15 ppm, d, $J = 6,9$ Hz) y C-23 (135,8 ppm) según los experimentos HMQC y HMBC.

El espectro de masas muestra un ión en 396 m/z debido a la pérdida de 32 u.m.a., este dato es muy importante puesto que implica la presencia de un

peróxido en la molécula. Efectivamente, el experimento HMBC muestra correlaciones a larga distancia de los protones vinílicos 6,48 (H-6) y 6,74 (H-7) ppm con carbonos cuaternarios oxigenados en 79,8 ppm (C-5) y en 82,6 ppm (C-8) y con un grupo metileno en 37,4 ppm (C-4) y dos metinos en 51,5 y 52,1 ppm (C-9, C-14) (figura 3).

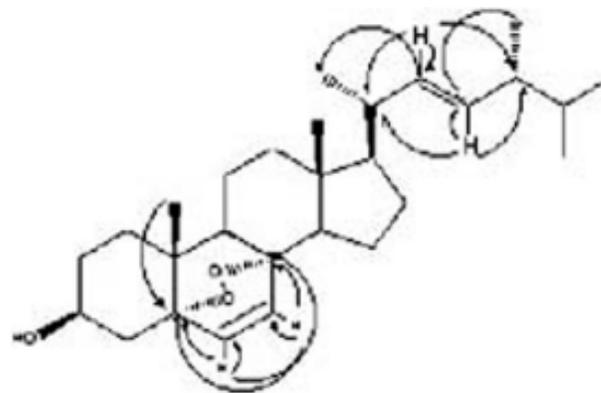


Figura 3. Correlaciones HMBC, HMQC del ergosterol-5, 8-endoperóxido 1

Estos datos coinciden con los reportados en la literatura para el ergosterol-5, 8-endoperóxido, una molécula de origen natural que previamente demostró actividad antituberculosa (Cantrell *et al.*, 1999) y antimalarica (Kurita *et al.*, 2002) y que fue corroborada en este trabajo mediante síntesis orgánica.

Actividad leishmanicida. El extracto acetónico de *P. sanguineus* mostró un interesante nivel de actividad leishmanicida (tabla 1): CE_{50} (0,82 $\mu\text{g/ml}$) y una CL_{50} de 8,5 $\mu\text{g/ml}$. No obstante el compuesto puro **1** mostró una inhibición del 100% a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ con una toxicidad inferior a la del extracto acetónico, aunque los resultados de las fracciones 1 y 2 indican que en este aun pueden permanecer sustancias mas activas, entre las cuales cabría esperar compuestos muy polares como las cinabarinas. Adicionalmente la actividad del extracto hexánico corrobora el nivel de inhibición del compuesto **1**, ya que es muy rico en dicha sustancia.

Tabla 1. Actividad leishmanicida y citotóxica de *P. sanguineus*

Muestra	CL ₅₀ µg/ml	Inhibición (%)	CE ₅₀	IS *
Extracto hexano	39,2	100,0	7,30	5,4
Extracto acetona	8,5	—	0,82	10,4
Fracción 1	33,4	55,6	10,20	3,3
Fracción 2	60,8	87,7	7,50	8,1
Ergosterol Endoperóxido 1	15,4	100,0	4,10	3,8

* IS: Índice de selectividad

Esta actividad leishmanicida es muy importante porque eventualmente cabe la posibilidad de suministrarlo en alimentos previamente irradiados que contengan ergosterol en buenas cantidades. Posiblemente el mecanismo de acción consiste en la formación de especies reactivas de oxígeno que perturban el funcionamiento de la membrana celular.

Cultivo in vitro de *Pycnopus sanguineus*. Los ensayos preliminares para la elección del medio de

cultivo permitieron elegir el agar extracto de malta (extracto malta 30,0 g/l, peptona 3,0 g/l, agar-agar 15,0 g/l) como medio óptimo para el crecimiento, ya que se observó formación de micelio y esporulación a los diez días de crecimiento a 24 °C.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias la financiación de este trabajo.

REFERENCIAS

- Achenbach H, Blümm E. 1991. Investigation of the pigments of *Pycnopus sanguineus* – pycnosanguin and new phenoxazin-3-ones. *Arch Pharmazie*, 324:3-6.
- Cantrell CL, Rajab MS, Franzblau SG, Fronczek FR, Fischer NH. 1999. Antimycobacterial ergosterol-5, 8-endoperoxide from *Ajuga remota*. *Planta Medica*, 65:732-4.
- Cunningham M, Beverley S. 2001. Pteridine salvage throughout the *Leishmania* infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 113:199–213.
- Kuria KA., Chepkwony H, Govaerts C, Roets E, Busson R, Witte P, Zupko I, Hoornaert G, Quirynen L, Maes L, Janssens L, Hoogmartens J, Laekeman G. 2002. The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*. *Journal of the Natural Products*, 65:789-93.
- Ouellette M, Drummel-Smith J, El Fadili A, Kundig C, Richard D, Roy G. 2002. Pterin transport and metabolism in leishmania and related trypanosomatid parasites. *International Journal for Parasitology*, 32:385-398.
- Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG. 1999. Sensitivity to glucantime of *Leishmania (Viannia)* isolates from patients prior to treatment. *Journal Parasitology*, 85:360-366.
- Weniger B, Robledo SM, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Muñoz V, Callapa J, Lobstein A, Anton R. 2001. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 78:193-200.
- Yokohama A, Natori S. 1975. Distribution of tetracyclic triterpenoids of lanostane group and sterols in the higher fungi specially of the polyporaceae and related families. *Phytochemistry*, 14:487-497.