

ENSAYOS BIOLÓGICOS CON EXTRACTOS OBTENIDOS DE RAÍCES DE *Lonchocarpus* *latifolius* (WILLD) D.C. Y DE UN NUEVO DIBENZOILMETANO AISLADO¹

Aderbal F. Magalhães²
Ana M. A. Tozzi³
Eva G. Magalhães²
Marisa A. Nogueira²
Victor J. Flórez Roncancio⁴

1. INTRODUCCIÓN

Lonchocarpus Kunth es uno de los géneros más numerosos de las leguminosas tropicales (1). *Lonchocarpus latifolius* (Willd.) D.C. es un árbol ornamental, ampliamente distribuido en las Antillas, América Central y en el norte de América del Sur. En Brasil, ésta especie se encuentra en los Estados de Pará y São Paulo y se cultiva en Minas Gerais y Rio de Janeiro. Del extracto éter de petróleo, obtenido de las raíces de *L. latifolius* se aisló un nuevo dibenzoilmetano, cuya estructura molecular se determinó por medio de los espectros de UV, IR, EM, RMN ¹H y RMN ¹³C y de espectros bidimensionales (COSY, HETECOR y COLOC) (2). El metabolito

¹ Aceptado para publicación en 2.3.1998.

² Instituto de Química de la Universidad Estatal de Campinas – UNICAMP, Cx. P. 6154, Fax: 9055-019-2393805, 13081-970 Campinas-SP, Brasil. E-mail: aderbal@iqm.unicamp.br e marisanogueira@hotmail.com.

³ Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas – UNICAMP, 13081-970 Campinas-SP, Brasil.

⁴ Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional, Santafé de Bogotá, Colombia, Apartado 14490, Fax: 3681448, E-mail: vjflorez@bacata.usc.unal.edu.co.

secundario predominante fue dibenzoilmetano, el cual se cuantificó por HPLC en extractos de raíces, hojas y semillas. Se realizó el estudio biológico de los extractos en éter de petróleo, en cloroformo y en metanol y del nuevo dibenzoilmetano, aplicando las pruebas de bioautografía y antibiograma y el bioensayo de germinación de semillas de lechuga.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Bioensayo para la Actividad Bactericida y Fungicida (Bioautografía)*

Los extractos éter de petróleo, diclorometano y metanólico y el nuevo dibenzoilmetano puro fueron disueltos en los respectivos solventes en concentración de 1mg/mL. Inmediatamente después se aplicaron en las placas de cromatografía de capa fina (Sílica gel G F₂₅₄ Merck 6cm x 6cm) en la proporción de 20µg, junto con el antibiótico, en la proporción de 2µg, y eluidos con hexano:AcOEt (80:20). El eluyente se evaporó y las placas se observaron en lámpara de UV en las longitudes de onda de 254nm y 365nm. Las sustancias que absorbieron en estas longitudes de onda se marcaron en una de las placas de cromatografía (placa testigo) y se pulverizó con revelador específico (anisaldeído modificado). La otra placa cromatográfica se colocó dentro de una caja de Petri de 90mm de diámetro, a la cual se adicionaron 20mL del medio de cultivo específico para cada microorganismo. Se aplicaron, uniformemente, 100µL de una suspensión de concentración aproximada de 10⁶ células/mL. Se prepararon dos cajas de Petri, una con la placa cromatográfica y la otra, solo, con el medio de cultivo del microorganismo (caja blanco) para evaluar su crecimiento. Las dos cajas se incubaron (24h para bacterias y 7 días para hongos) a temperatura específica para cada microorganismo (37°C para bacterias y 25°C para hongos) y, después, se evaluaron los halos de inhibición y se comparó con la placa testigo.

Los medios de cultivo utilizados fueron: para bacterias, NA (agar nutritivo), constituido por 5g peptona + 3g de extracto de carne + 15g de agar + 1L de agua destilada y, para hongos, MA (agar malte), constituido de 20g de extracto de malte + 20g de agar.

2.2. *Bioensayo de Antibiograma*

La prueba de antibiograma fue realizada de acuerdo con la metodología de la United States Pharmacopea (USP XXIII), para dosificación de antibióticos. Para la obtención de resultados más

homogéneos, el inóculo se sembró sobre agar nutritivo en una capa fina. Se emplearon discos de papel, impregnados con la muestra prueba, los cuales fueron distribuidos sobre la placa. Para cada conjunto de ensayos, se prepararon cuatro placas. Después de la incubación, se midió el diámetro de los halos formados.

2.3. Bioensayo de Germinación en Semillas de Lechuga

Este bioensayo se realizó de acuerdo con la descripción de WEEB y WAREING (5). Se emplearon semillas de lechuga del cultivar 'Grand Rapids', las cuales se colocaron en cajas de Petri de 90mm de diámetro, formando una cámara húmeda con los extractos para evaluar. Se realizaron cuatro repeticiones con 20 semillas por placa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se verificó que el nuevo dibenzoilmetano (Figura 1) se encuentra en gran cantidad en extractos éter de petróleo de raíces y, en menor cantidad, en hojas y semillas de *L. latifolius* (Cuadro 1). Asumiendo que esta sustancia, en estas cantidades, puede actuar como una fitoalexina, sustancia de defensa común en plantas de la orden Leguminosae, se procedió a realizar los bioensayos de bioautografía con hongos y bacterias de las cepas más conocidas y el bioensayo de inhibición de germinación de semillas de lechuga en los extractos éter de petróleo de raíces. Algunas especies de las Leguminosae producen fitoalexinas, independientemente del agente causal. Los agentes causales pueden ser infestación por microorganismos o otros factores, como temperatura o radiación UV (3).

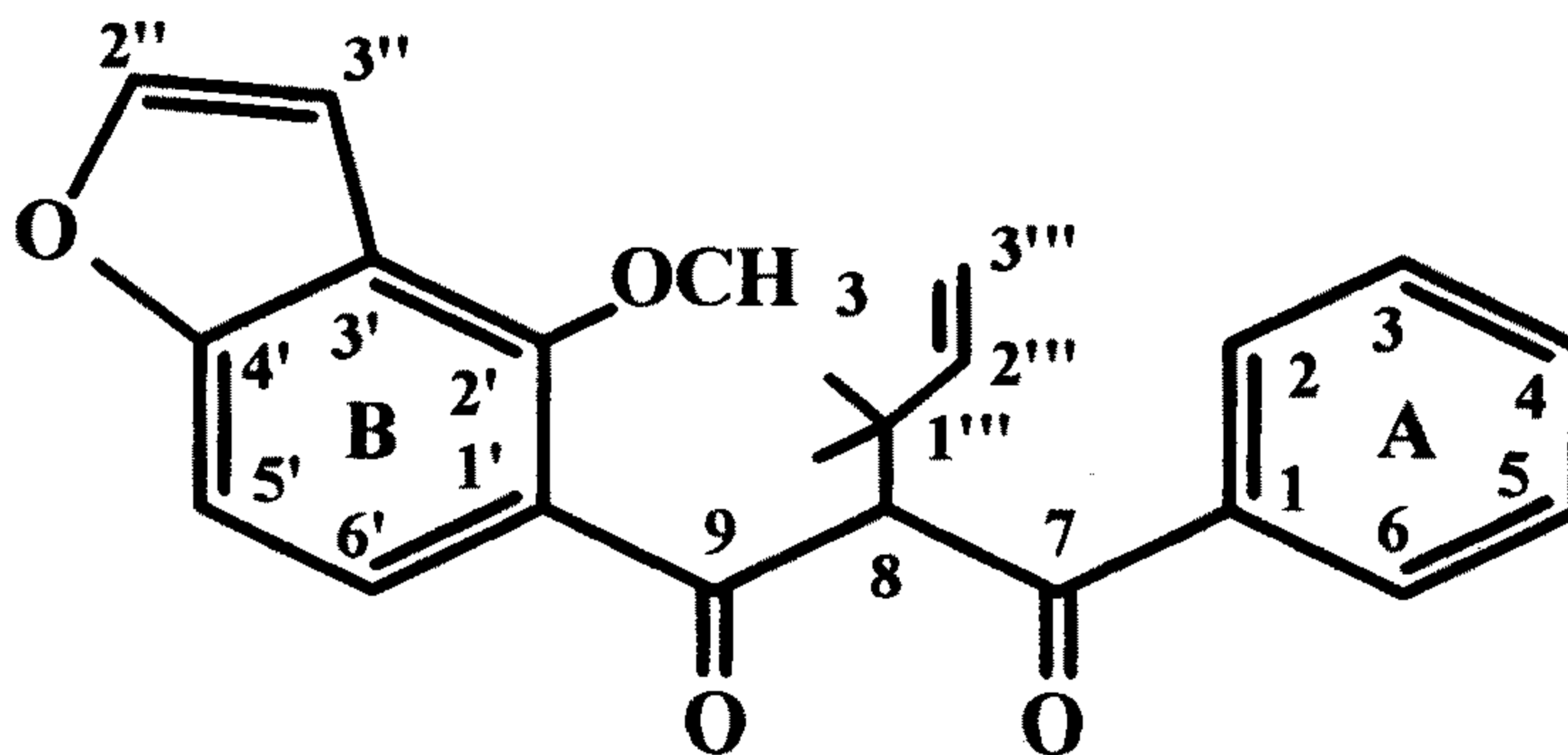


FIGURA 1 - Nuevo dibenzoilmetano aislado.

CUADRO 1 - Cuantificación del dibenzoilmetano aislado de los extractos éter de petróleo de raíces, hojas y semillas de <i>Lonchocarpus latifolius</i> (Willd) D.C. por HPLC.			
Sustancia	Cantidad de sustancia en el extracto éter de petróleo (mg/g)		
	Raíces	Hojas	Semillas
Nuevo dibenzoilmetano aislado	8,053	3,673	1,021

En el bioensayo de bioautografía se probaron seis bacterias (Cuadro 2) y siete hongos, de los cuales seis eran filamentosos y otro levadura (Cuadro 3). Los extractos éter de petróleo, diclorometano y el dibenzoilmetano fueron positivos solamente para la bacteria *Bacillus subtilis* (Cuadro 2). Para los hongos ensayados, los extractos éter de petróleo y diclorometano presentaron actividad para *Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae*. Solamente el nuevo dibenzoilmetano presentó actividad para *Aspergillus niger* (Cuadro 3).

CUADRO 2 - Bacterias utilizadas en la prueba bioautográfica con extractos de raíces de <i>Lonchocarpus latifolius</i> (Willd) D.C.				
Bacterias	Extractos			Sustancia
	E P	CH ₂ Cl ₂	MeOH	1
<i>Escherichia coli</i> (gram -) ^a	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i> (gram +) ^b	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (gram +) ^c	+	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (gram +) ^d	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> (gram +) ^e	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (gram -) ^f	-	-	-	-

a CCT 5050; b CCT 0541; c CCT 0089; d CCT 4295; e CCT 2720; f CCT 0528.
 E P: éter de petróleo; CH₂Cl₂: diclorometano; MeOH: metanol; 1: Nuevo dibenzoilmetano aislado.

CUADRO 3 - Hongos utilizados en la prueba bioautográfica con extractos de raíces de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) D.C.

Hongos	Extractos			Sustancia
	E P	CH ₂ Cl ₂	MeOH	
<i>Candida albicans</i> ^a	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ^b	++++	++++	-	++++
<i>Penicillium funiculosum</i> ^c	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> ^d	-	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i> ^e	++++	++++	-	-
<i>Alternaria alternata</i> ^f	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> ^g	-	-	-	-

a CCT 0776; b CCT 1435; c CCT 0490; d CCT 3244; e CCT 4964; f CCT 1250; g CCT 01277.
E P: éter de petróleo; CH₂Cl₂: diclorometano; MeOH: metanol; 1: nuevo dibenzoilmetano aislado.

Luego de verificar que el nuevo dibenzoilmetano fue activo solamente para la bacteria *B. subtilis*, se realizó el antibiograma para comprobar el MIC (Mínima Concentración Inhibitoria) (Cuadro 4), donde se observó que el nuevo dibenzoilmetano es activo a partir de la concentración de 10 µg.

De acuerdo con los datos observados, el nuevo dibenzoilmetano es activo para el *Bacillus subtilis* y para el *Aspergillus niger*, pero no se puede afirmar que sea una fitoalexina producida por infestación de microorganismos, porque pudieron influir otras variables ambientales.

CUADRO 4- - Resultados obtenidos en el antibiograma para el nuevo dibenzoilmetano

Dosis (µg/disco)	Repetición (halos en mm)				Medias
	1	2	3	4	
0	0	0	0	0	0
10	8	9	10	10	9,25
20	10	10	11	11	10,50
30	10	11	10	11	10,50
40	11	11	11	11	11,00
50	12	11	12	11	11,50

En el bioensayo de germinación de semillas de lechuga, los tres extractos presentaron actividad inhibitoria sobre la germinación. La

actividad fue más acentuada en los extractos metanólico y diclorometano, en las diluciones de 5, 10 y 12,5 mg/mL (Cuadro 5).

CUADRO 5 - Influencia de la dilución de los extractos sobre la % de germinación de semillas de lechuga *						
Diluciones (mg/mL)	% de Germinación					
	24 h			48 h		
	E P	CH ₂ Cl ₂	MeOH	E P	CH ₂ Cl ₂	MeOH
Blanco	86 ^a	80 ^a	92 ^a	93 ^{ab}	95 ^a	98 ^a
Testigo	88 ^a	84 ^a	-	98 ^a	96 ^a	-
2,5	71 ^{ab}	55 ^b	78 ^a	86 ^b	90 ^{ab}	94 ^a
5	80 ^{ab}	40 ^{bc}	35 ^b	90 ^{ab}	89 ^{ab}	71 ^{ab}
10	58 ^b	21 ^c	4 ^c	83 ^b	85 ^b	56 ^b
12,5	66 ^{ab}	35 ^{bc}	0 ^c	88 ^{ab}	89 ^{ab}	43 ^b

*Medias seguidas de la misma letra no difieren entre si en 5 % de probabilidad por el ensayo de Tukey.

De acuerdo con los datos observados, se verificó la presencia de sustancias que inhiben la germinación de semillas de lechuga, principalmente en el extracto metanólico. Esta inhibición no está asociada con la presencia del nuevo dibenzoilmetano aislado, ya que en el extracto éter de petróleo, donde esta sustancia está presente en gran cantidad, la inhibición no fue significativa. En *Lonchocarpus sericeus* (Poir) H. B. K., una especie que pertenece a la misma subclase de *Lonchocarpus latifolius* (Willd.) D.C, la actividad está asociada con la presencia de un aminoácido no esencial (3-[2-amino-2-imidazolin-4-il]alanina) (4). La actividad alelopática de *L. latifolius* (Willd.) D.C. también podría estar asociada con la presencia de aminoácidos, por lo cual se realizó un análisis por cromatografía de capa fina con en el extracto metanólico, donde se identificó aminoácidos.

4. RESUMEN

Lonchocarpus latifolius (Willd.) D.C. es un árbol de 3 a 4m de altura. Del extracto éter de petróleo obtenido de las raíces, se aisló un nuevo dibenzoilmetano. Este fue el metabolito secundario predominante, que se cuantificó por HPLC en extractos de raíces, hojas y semillas. El metabolito se encontró en mayor proporción en extractos de raíces, por lo cual se realizó el estudio biológico de los extractos éter de petróleo, diclorometano

y metanólico, así como del nuevo dibenzoilmetano puro. Se aplicaron las pruebas de bioautografía y antibiograma, y el bioensayo de la germinación de semillas de lechuga. Los extractos éter de petróleo, diclorometano y el nuevo dibenzoilmetano fueron positivos para *Bacillus subtilis* y presentaron actividad para *Aspergillus niger*. Los extractos éter de petróleo y diclorometano también fueron activos para *Aspergillus niger* e *Rhizopus orizae*. En el bioensayo de germinación de semillas de lechuga presentaron actividad más acentuada los extractos metanólico y diclorometano.

5. SUMMARY

Light petroleum extracts from roots of *Lonchocarpus latifolius* furnished a new dibenzoylmethane compound. It was the most abundant compound and was quantified in HPLC analysis of light petroleum extracts of roots, leaves and seeds. The light petroleum extract, dichromethane extract and new dibenzoylmethane derivative were tested against some fungi and bacteria through the bioautography method and showed activity against *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger*. Light petroleum and dichromethane extracts of roots showed activity against *Aspergillus niger* and *Rhizopus orizae*. The dichromethane and methanol extracts of roots were the most active in the bioassay, inhibiting lettuce seed germination.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación Tropical de Investigación y Tecnología "André Tosello", Campinas - São Paulo, Brasil, por los cultivos de microorganismos utilizados en las pruebas bioautográficas y por el análisis del antibiograma; y a la Sección de Semillas del Instituto Agronómico de Campinas (IAC), São Paulo, Brasil.

7. LITERATURA CITADA

1. LEWIS, G. P. & OWEN, P. E. *Legumes of Ilha de Maracá*. Kew, Royal Botanic Gardens, 1989. 95p.
2. MAGALHÃES, A. F., TOZZI, A. M. A., MAGALHÃES, E. G., BLANCO, I. S. & NOGUEIRA, M., A. Three new dibenzoilmetane isolated from *Lonchocarpus* species. *Phytochemistry*, 46 (6):1029-1033, 1997.

3. AFZAL, M. & AL-ORQUAT, G. Proton magnetic resonance spectra of pterocarpan and related phytoalexins. *Heterocycles*, 24(10):2911-2941, 1986.
4. WILSON, M. F. & BELL, A. Amino acids and β -aminopropionitrile as inhibitors of seeds germination and growth. *Phytochemistry*, 17:403-406, 1978.
5. WEBB, D. P. & WAREING, P. F. Seed dormancy in Acer: endogenous germinating inhibitors and dormancy in *Acer pseudoplatanus* L. *Planta*, 104:115-125, 1972.