

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL EXTRACTO DE *Brosimum rubescens* (Palisangre)

María Fachín-Espinar, Paolo López-Del Águila, Karina Arzubialdes, Wilfredo Gutiérrez y Alenguer Alva*

Universidad Nacional de la Amazonía Peruana – Facultad de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Industrias Alimentarias.
Avda. Freyre 610 – Iquitos.

*e-mail: alenalar@hotmail.com

RESUMEN

El extracto etanólico y sus fracciones cromatográficas del tallo de *Brosimum rubescens* Taubert fueron evaluados para determinar la actividad antifúngica *in vitro* mediante el método de macrodilución para hongos filamentosos. El tamizaje fitoquímico del extracto etanólico del tallo de *B. rubescens* evidenció la presencia de cumarinas, quinonas y taninos, además de flavonoides y triterpenos; para el estudio de la actividad antifúngica se utilizó cepas de *Trichosporum rubrum* ATCC 28188 y *Trichosporum mentagrophytes* ATCC 24953. En ambos casos la fracción insoluble en dilución ácida evidenció mayor actividad antifúngica que el extracto etanólico contra dermatofitos. El fraccionamiento del extracto etanólico permitió inferir que el responsable de la actividad se debe a los fitocomplejos, no así a las fracciones frente a *T. rubrum* ATCC 28188.

Palabras clave: Actividad antifúngica, *Brosimum rubescens*, hongos filamentosos, *Trichosporum rubrum*, *Trichosporum mentagrophytes*

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE EXTRACT OF *Brosimum rubescens* (Palisangre)

ABSTRACT

The ethanol extract and its chromatographic fractions of *Brosimum rubescens* Taubert's stem was evaluated stop determining the activity intervening antifúngica *in vitro* the macrodilution method in order to filamentous mushrooms. The phytochemistry screening of ethanol extract of the stem of *B. rubescens* showed the presence of coumarins, quinines and tannins, besides flavonoids and triterpenes. In order to the activity's study antifúngica utilized him *Trichosporum rubrum* ATCC'S ancestries 28188 and *Trichosporum mentagrophytes* ATCC 24953. Both times the insoluble fraction in acid dilution evidenced principal activity antifúngica than the ethanol extract against dermatofitos. The fractionations of the ethanolic extract allowed infer that the activity responsible is due to phytocomplex, thus no fractions against *T. rubrum* ATCC 28188.

Key words: Activity antifungal, *Brosimum rubescens*, filamentous mushrooms, *Trichosporum rubrum*, *Trichosporum mentagrophytes*

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales proporcionan estructuras simples o complejas con actividad biológica de gran interés terapéutico; constituyéndose en una fuente importante de medicamentos, las cuales han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina, y por ende han existido cientos de años. La Amazonia Peruana representa las tres cuartas partes del territorio nacional, y está poblada por diferentes etnias poseedoras de grandes conocimientos y experiencias empíricas en la utilización de plantas para uso medicinal (Rengifo, 1995; Pinedo, et. al. 1997).

Brosimum rubescens Taubert (sin. *Brosimum paraense* Huber), familia *Moraceae*, es una especie arbórea con una amplia distribución en la Amazonia (Brack, 1997). Esta especie es conocida como palo de sangre, su madera es utilizada para muebles de lujo, escaleras, instrumentos musicales, objetos de adorno, entre otros (Brack, 1997; Lock, 1994; Brako y Zarucchi, 1993). En los pueblos de la Amazonia, los lugareños por sus limitados recursos económicos y la no accesibilidad a los medicamentos occidentales, usan tratamientos caseros de plantas como el macerado de tallo de palisangre (*Brosimum rubescens* Taubert) para contrarrestar sus afecciones fúngicas (Kuklinski, 2000; Brack, 2000).

La dermatofitosis constituye micosis superficiales causadas por hongos que tienen la capacidad de invadir tejido queratinizando como la piel, el pelo y las uñas, del hombre y de algunos animales (Méndez et. al., 2004). Esta enfermedad provoca a escala mundial entre 300 a 500 millones de casos clínicos cada año. Esto se debe a que la mayoría de la población mundial está distribuida en zonas altamente endémicas correspondientes a zonas subtropicales y tropicales. (CYTED, 2000)

Se han realizado diversos estudios acerca de la composición fitoquímica de *Brosimum rubescens* Taubert, que demuestran el potencial de esta planta y mediante este trabajo se pretende contribuir a un mayor conocimiento y uso del "PALISANGRE" evaluando su actividad antifúngica mediante el método de macrodilución para hongos filamentosos, como una alternativa de valor agregado a su alto potencial maderable y su uso para la elaboración de tallas artesanales, que enriquezca y conlleve al uso racional de este recurso en la región.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de *Brosimum rubescens* Taubert (Palisangre) fueron recolectadas en forma de pequeños trozos en la Reservada Natural Allpahuayo-Mishana, Iquitos, PERÚ y una parte fue depositada para su conservación en la xiloteca de la Facultad de Ingeniería Forestal –UNAP, la madera restante fue transportada a los laboratorios de ingeniería y microbiología de la Facultad de Industrias Alimentarias. La determinación del tamizaje fitoquímico fue hecha mediante protocolos estandarizados (Wagner et. al., 1984; Ruiz y Sáenz, 2000) y su fraccionamiento se realizó en el Área de Fitoquímica del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia Peruana (LIPNAA).

Se emplearon dos cepas, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, las cuales fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud (INS-Peru). Se empleo el método de macrodilución in vitro para hongos filamentosos. Esta técnica fue utilizada para determinar la sensibilidad antifúngica del extracto etanólico obtenido del tallo de *Brosimum rubescens* Taubert (palisangre) y de las fracciones obtenidas del mismo frente a *T. rubrum* y *T.mentagrophytes*.

El método ensayado fue realizado según los procedimientos establecidos en el protocolo M38-P elaborado por la *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* y modificado por *Espinoza et al (2005)*. En el ensayo se utilizó como control negativo dimetilsulfoxido (DMSO) así como Tween-80 y como control positivo el Ketoconazol.

El extracto etanólico a evaluar se obtuvo por maceración de la muestra por tres veces consecutivas con etanol durante 7 días cada vez. Posteriormente se realizó el fraccionamiento del extracto etanólico en extracto ácido, básico y neutro.

Para la evaluación de la actividad antifúngica del extracto etanólico y sus fracciones, se procedió a colocar 2 g del extracto etanólico total en 10 ml del solvente correspondiente para cada fracción, para lograr una concentración de 200 mg/ml. Posteriormente se procedió a realizar el método de las diluciones dobles seriadas aditivas, para obtener diferentes concentraciones, siendo 20 mg/ml la más alta hasta 0,03 mg/ml la más baja. Posteriormente se procedió a repartir en alícuotas de 0,1 ml en tubos de 11x70mm y se diluyeron añadiendo a cada tubo 0.9 ml de caldo Sabouraud inoculado, en una proporción de 1:10.

La lectura se hizo visualmente a las 72 y 168 horas de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control. El NCCLS utiliza una puntuación de 0 a 4 para medir la inhibición del crecimiento. (National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997, 1998)

RESULTADOS

La Tabla 1 se puede observar las características farmacognósticas de la madera siendo característico el color rojizo oscuro de esta planta además las partículas son viscosas y el rendimiento del extracto es del 15.85% una condición muy elevada para los extractos de otras maderas similares.

Tabla 1. Propiedades farmacognósticas del extracto etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* Taubert (Palisangre)

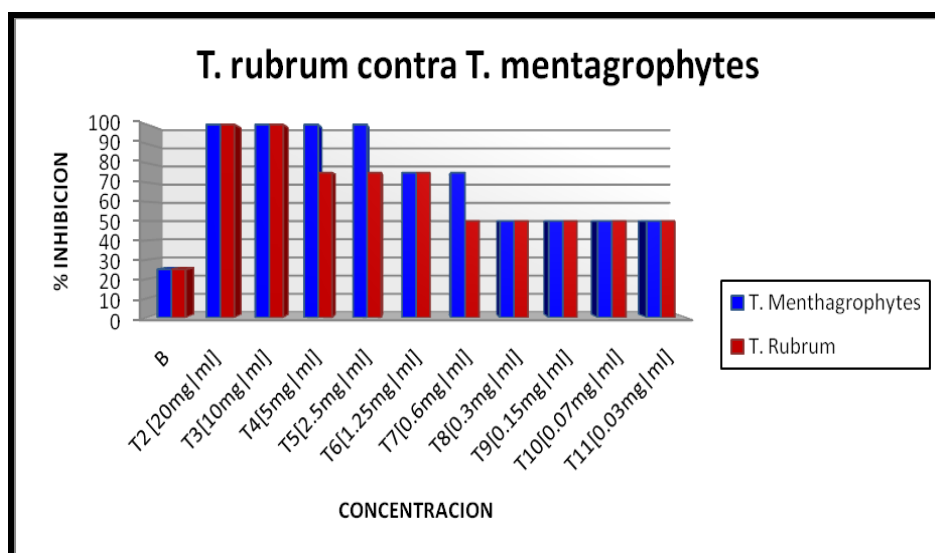
Propiedades	Características
Partículas	Viscosas
Color	Moderadamente rojizo oscuro
Olor	Sui generis
Rendimiento	aprox 15.85%
Determinación de pH	4.73 ± 1 a 25° C
Densidad relativa	978 – 0.9998 (25°C)

El tamizaje fitoquímico del extracto etanólico del tallo y de la fracción insoluble en solución ácida identificada como fracción B (Tabla 2), en ella se puede observar la concentración de metabolitos secundarios como quinonas en el extracto etanólico y lactonas en la parte insoluble, otros se mantienen igual, esto es debido a la solubilidad en los diferentes pH de la solución.

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* Taubert (Palisangre) y de su Fracción "B"
Resultados (*)

Pruebas	Extracto Etanólico	Fracción "B"	Metabolitos encontrados
Dragendorff	++	+	Alcaloides
Liebermann	++	++	Triperpenos
Buchard	-	-	Esteroides
Borntrager	+++	++	Quinonas
Baljet	++	++	Cumarinas fijas
	+	+	Cumarinas volátiles
	++	+++	Lactonas
Prueba de espuma	0	0	Saponinas
Cloruro Férrico	0	0	Fenoles
	+++	+++	Taninos
Ninhidrina	0	0	Aminas aminoácidos
Reactivo Shinoda	++	++	Flavonoide

Las actividades antifúngicas mostradas frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* en los Graficos 01 y 02 a las 72 h y 168 h, a diferentes concentraciones con el respectivo blanco, en ella podemos apreciar que la mayor actividad a mayores concentraciones a 20 y 10 mg/l y pequeñas actividad a concentraciones de 0,07 y 0,03 mg/l mostrando claramente la tendencia de que a mayor concentración del extracto mayor es la actividad antifúngica. La eficiencia a las 168 h es aproximadamente de un 80%.

**Gráfico 1.** Porcentaje de inhibición del extracto etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre) frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* a las 72 horas.

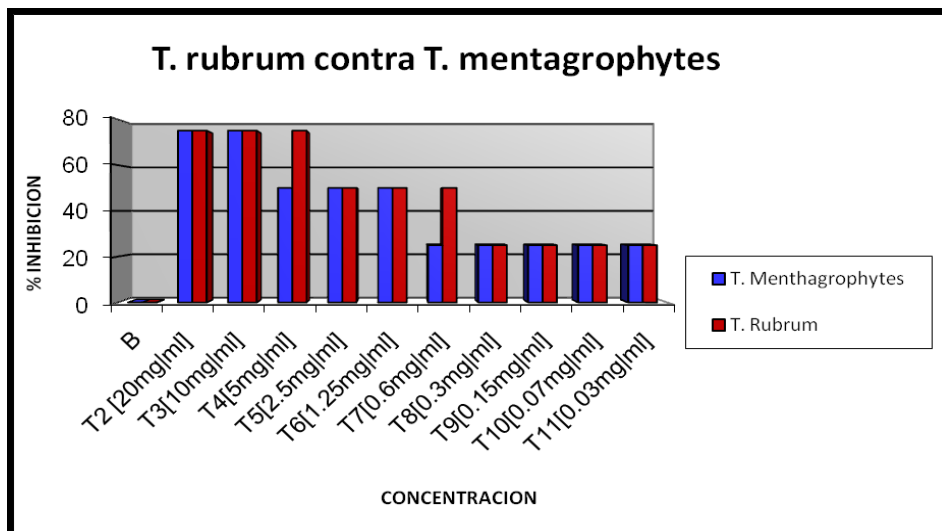


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición del Extracto Etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre) frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* a 168 hrs

La Fracción insoluble de la solución ácida del tallo del *Brosimum rubescens* mostro actividad eficiente a las concentraciones de 20 y 10 mg/l de extracto, y también muestra una tendencia de a medida de que aumenta la concentración aumenta la actividad biológica pero con mayor eficiencia del 100 y 70%.

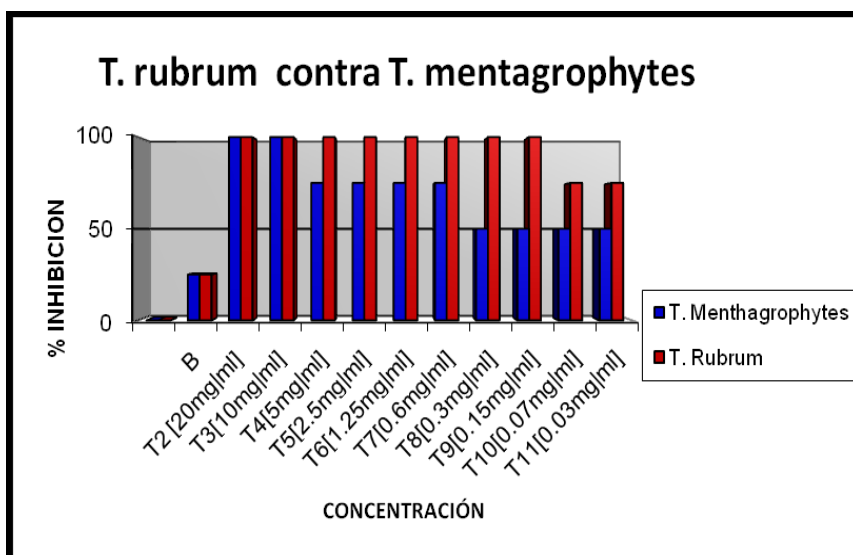


Gráfico 3. Porcentaje de inhibición de la Fracción insoluble del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre) frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* a las 72 horas.

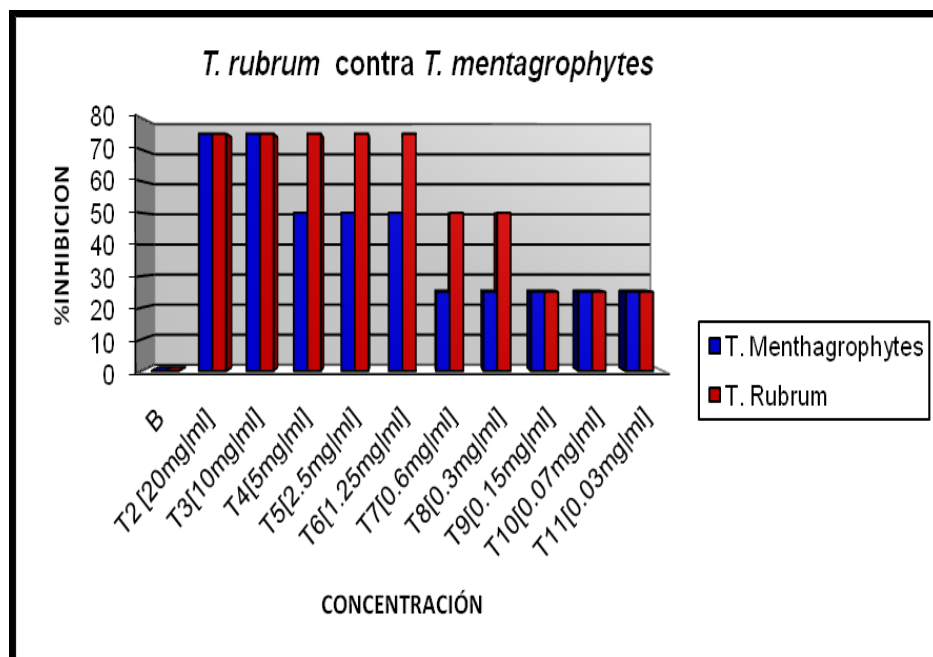


Gráfico 4. Porcentaje de inhibición de la Fracción insoluble del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre) frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* a las 168 horas.

DISCUSIÓN

En las propiedades fisicoquímicas del extracto, el pH mantiene una ligera acidez ($\text{pH } 4,73 \pm 1$ a 25°C) debido a la moderada presencia de hidrogeniones; puede señalarse además una densidad relativa dentro de los normal ($0,9978-0,9998$ a 25°C) con relación al agua destilada. En forma general se analizaron las propiedades organolépticas del extracto etanólico, presentado un color rojizo oscuro característico de esta especie, el rendimiento del extracto etanólico del tallo *B. rubescens* (aproximadamente $15,85\%$), puede ser debido a que se agoto hasta tres veces con etanol 96° para obtener el máximo posible del extracto bruto.

El examen tamizaje fitoquímico del tallo *B. rubescens* dio como resultado la presencia abundante de quinonas y taninos; además se encontraron cumarinas, tal como reporta Braz Filho *et al* (1972), Gottlieb *et. al.* (19729), Silva (1991), en estudios realizados al aserrín de la madera del *Brosimum rubescens* (palisangre); también se determinó la presencia de flavonoides y terpenos, al igual que lo reportado por Alba y Cuca (2007), en un estudio fitoquímico parcial de los extractos etanólicos de madera, hojas y corteza de la especie del *Brosimum rubescens* (Moraceae).

Se ha demostrado que ciertos factores como la concentración y el tiempo de incubación, influyen en la sensibilidad de los hongos filamentosos a los antifúngicos. (Cantón *et. al.*, 2001)

Para el extracto etanólico, con respecto a la variable tiempo, se pudo evidenciar claramente que la mayor efectividad tanto en *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se presentó a las 72 h. En cuanto a la concentración, la mayor efectividad se presentó en las concentraciones T2 (20mg/l) y T3 (10 mg/l), tanto en a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. (Gráfico N° 01 y Gráfico N° 03).

La CMI de la fracción insoluble a las 72 h, para a *T. rubrum* estuvo representada por una concentración de $30 \mu\text{g/ml}$ (Gráfico N°03), concentración considerada como de eficiente grado de inhibición según de De Campos *et al* (2005). Así mismo, la CMI a las 168 h, para a *T. rubrum*, estuvo representada por una concentración de $300 \mu\text{g/ml}$ y $600 \mu\text{g/ml}$ (Gráfico N°04), mientras que para *T. mentagrophytes*, la CMI fue de $1250 \mu\text{g/ml}$ (Gráfico 4), lo cual determinó que el

factor tiempo es determinante en cuanto a la efectividad del antifúngico. Además, se resalta que la fracción insoluble a las 168h, es más efectiva frente a *T. rubrum*.

A pesar de que la fracción insoluble provocó un porcentaje de inhibición mayor del 50% frente a *T. rubrum* como en *T. mentagrophytes* (Gráfico N° 03 y 04), su fraccionamiento condujo a una reducción de su actividad casi equitativa en estos organismos, de ello es posible inferir, que en la fracción existe un efecto combinado de sustancias que potencian su actividad frente a estos organismos.

La Tabla 2, muestra que la naturaleza química del extracto etanólico obtenido del tallo de *B. rubescens*, contiene sustancias como alcaloides, cumarinas y triterpenos, compuestos que se presentan comúnmente entre otras especies de la familia *Moraceae* (Alba y Cuca, 2007), de todo esto y de acuerdo a los resultados obtenidos podemos inferir que la actividad antifúngica presentada por el extracto etanólico del tallo de *B. rubescens*, puede estar determinada por un sinergismo entre los compuestos antes mencionados tal y como lo refieren diferentes autores. (Anaya *et. al.*, 2005; Godoy *et. al.*, 2005, Portillo *et. al.*, 2005)

CONCLUSIONES

En el extracto etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* Taubert. donde se encontró la presencia de quinonas, taninos, triterpenoides, alcaloides, flavonoides y saponinas; así mismo presentó mayor actividad antifúngica a las 72 h y concentraciones de 20 mg/l y 10 mg/l, *in vitro* sobre *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*.

La fracción insoluble del extracto etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* Taubert. "Palisangre" presentó actividad antifúngica eficiente a la concentración de 30 µg/ml *Trichophyton rubrum* y sobre *Trichophyton mentagrophytes* a las concentraciones de 300 µg/ml y 600 µg/ml.

AGRADECIMIENTO

A la Oficina General de Investigaciones de la UNAP por el Financiamiento del Proyecto de Investigación "Estudio químico y Biológico de la especie *Brosimum rubescens* (palisangre)".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alba SMA, Cuca SLE. 1997. Identificación de metabolitos secundarios de *Brosimum rubescens* (MORACEAE) Determinación de Actividad Antimalárica. *Scientia et técnica*, 13(33), 129-131
- Anaya AL, Rubalcava MM, Ortega RC, Santana CG, Monterrubio, Bautista BEH, Rachel MR. 2005. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry* 66 (4), 487-494
- Brack EA. 1997. Amazonía peruana, comunidades indígenas, conocimientos y tierras tituladas. CEF/ PNUD/UNOPS. Lima- Perú
- Brack EA. 2000. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas. Cuzco, Perú.
- Brako L, Zarucchi J. 1993. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 45.
- Braz-Filho R, Farias MA, Gottlieb. 1972. Coumarins from *Brosimum rubescens*. *Phytochemistry* 11, 3307-3310.

- CYTED. 2000. Métodos Farmacológicos para Validación de Plantas Medicinales. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- De Campos MP, Cechinel V, Da Silva RZ, Yunes RA, Zacchino S, Juarez S, Bella RC, Bella A. 2005. Biol. Pharm. Bull. 28, 1527.
- Cantón LE, Martín ME, Espinel-Ingroff A. 2001. Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6; Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos.
- Espinoza MML, Herrera LL. 2005. Evaluación Fitoquímica del Extracto de Hojas de *Genipa Americana* L. "Huito" y su Actividad Antifúngica in vitro frente a los dermatofitos de importancia médica. Instituto Nacional De Salud. Perú
- Godoy MFP, Víctor SR, Bellini AM, Guerreiro G, Rocha WC, Bueno OC, Hebling MJA, Bacci-JR M, Silva MFGF, Vieira PC, Fernandes JB, Pagnocca FC. 2005. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. Journal of the Brazilian Chemical Society 16(3B), 669-672.
- Gottlieb OR, Leao DSM, Soares MJ. 1972. Distribution of coumarins in Amazonian species. Phytochemistry 11, 3479-2480.
- Kuklinski C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona- España.
- Lock O. 1994. Investigación Fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales. Pontifica Universidad Católica del Perú.
- Méndez TLJ, López MR, Hernández H. 2004. Parte III. Micosis superficiales. Dermatofitos. En: Actualidades en Micología Médica (2ª ed.). México, Facultad de Medicina UNAM, 109-142.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Pinedo PM, Rengifo SE, Cerrutti ST. 1997. Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana; Estudio de Uso y Cultivo. PNUD. FIDA. TCA. IIAP. Iquitos, Perú
- Portillo A, Villa R, Freixa B, Ferro E, Parello TT, Casanova J, Cañigweral SJ. 2005. Etnofarmacología 97, 49.
- Rengifo E. 1995. Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana 1era Edición. Lima – Perú. Pág. 249
- Ruiz W, Sáenz C. 2000. Screening Fitoquímico de Productos Naturales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía (UNAP-LIPNAA). Iquitos.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. Plant Drug Analysis. Springer-verlag. Berlín. Heidelberg New York. Tokyo.

Recibido: 19 setiembre 2012 / **Aceptado:** 20 noviembre 2012