



## **Actividad antimicrobiana y estudio fitoquímico preliminar de *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Helms. (Apocynaceae)**

**Andrés Abad-Reyes<sup>a</sup>, Alí Bahsas<sup>a</sup>, Paulino Delgado-Méndez<sup>a</sup>, Juan M. Amaro-Luis<sup>a</sup>,  
G. H. Neil Towers<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,  
Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela-5101. E-mail: [abadjos@ula.ve](mailto:abadjos@ula.ve)

<sup>b</sup>Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canadá.

Recibido: 12/01/2006

Revisado: 20/02/2006

Aceptado: 31/01/2007

---

### **RESUMEN**

Se probó la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Hemsl. (Apocynaceae). Se observó una moderada actividad frente a las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, la cual puede ser atribuida, en parte, a los flavonoides 4'-O-metil-kaempferol (I) y quercetina (II), aislados de este extracto. **Palabras Clave:** Apocynaceae, *Mandevilla veraguasensis*, actividad antimicrobiana, flavonoides.

### **ABSTRACT**

Ethyl acetate extract from leaves of *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Hemsl. (Apocynaceae) has been assayed for antibacterial and antifungal activity. A moderate activity against Gram positive bacteria *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, which can be in part attributed to the flavonoids 4'-O-methyl-kaempferol (I) and quercetin (II) isolated from this extract, was observed. **Keywords:** Apocynaceae, *Mandevilla veraguasensis*, antimicrobial activity, flavonoids.

### **Introducción**

En la actualidad, la familia Apocynaceae “*sensu lato*”, es considerada como un grupo monofilético, en el cual se incluyen las familias Asclepiadaceae y Apocynaceae “*sensu stricto*”<sup>1,2</sup>. En este contexto, se considera que la misma incluye aproximadamente 5100 especies agrupadas en 395 géneros y cinco subfamilias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae and Asclepiadoideae<sup>3</sup>.

El estudio fitoquímico de numerosas especies de la familia Apocynaceae, ha conducido al aislamiento de metabolitos muy diversos, con una amplia variedad de actividades biológicas especialmente anticancerosa<sup>4,5</sup>, leishmanicida<sup>6</sup>, antibacteriana<sup>7,8</sup> y anti VIH (inhibidores de la transcriptasa reversa)<sup>9,10</sup>.

En términos generales, la familia se caracteriza por biosintetizar glicósidos cardiotónicos, flavonoides, cumarinas, iridoides, ciclitoles, triterpenoides y particularmente alcaloides esteroidales e indólicos<sup>11,12</sup>. Entre estos últimos se encuentran algunos metabolitos de gran interés farmacológico tales como la vincristina y la vinblastina, conocidos como “alcaloides de la vinca” (*Catharantus roseus*), y ampliamente utilizados en la quimioterapia del cáncer de mama, hígado, pulmón, leucemia y linfomas<sup>13,14</sup>; o la ajmalicina y la reserpina, alcaloides indólicos presente en la *Rauwolfia serpentina*, los cuales son reconocidos por sus propiedades antiarrítmicas e hipotensoras, respectivamente<sup>15-17</sup> (Fig.1).

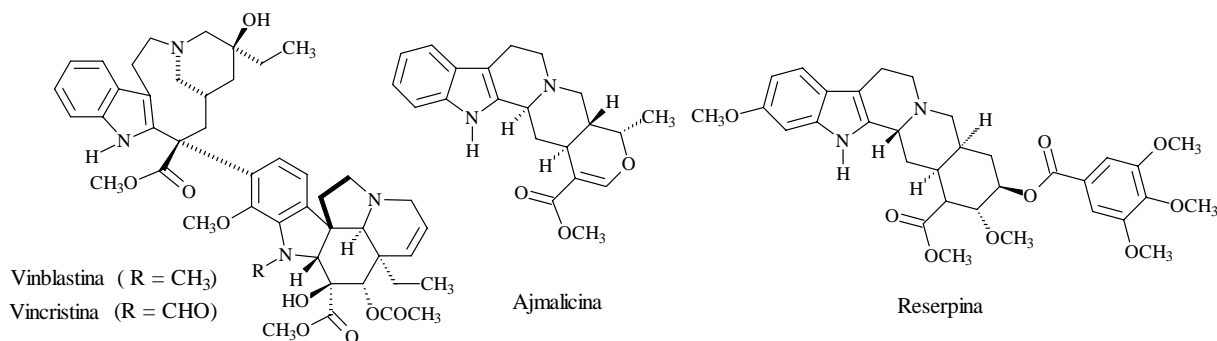


Figura 1. Alcaloides representativos aislados de especies de la familia Apocynaceae

El género *Mandevilla* Lindl., incluido en esta familia, está representado por unas 110 especies de plantas neotropicales<sup>18</sup>. Aún cuando en la bibliografía se encuentran pocos trabajos relativos a la fitoquímica de este género, la mayoría de ellos demuestran que sus taxa se especializan en la elaboración de glicósidos esteroidales, muchos de los cuales poseen un amplio espectro de actividades farmacológicas<sup>19-21</sup>.

A la vista de los importantes antecedentes de la familia Apocynaceae, se ha considerado interesante iniciar un estudio fitoquímico biodirigido orientado a la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana, de la especie *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Hemsl. En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antimicrobiana del extracto en acetato de etilo de esta especie, y el aislamiento e identificación de dos flavonoles, posiblemente responsables de dicha actividad.

## Parte Experimental

### 1.- Técnicas Generales:

*1.1.- Puntos de fusión:* Se determinaron en un aparato Buchi 510, en un baño de sílica.

*1.2.- Espectros de RMN-<sup>1</sup>H y de RMN-<sup>13</sup>C:* Se realizaron en un espectrómetro Bruker ARX 400 (400 MHz), utilizando CD<sub>3</sub>OD como solvente.

*1.3.- Cromatografía de capa fina:* Se utilizaron láminas prefabricadas de gel de sílice Polychrom Si-F<sub>254</sub> de 0,25 mm de espesor. Para el revelado se utilizó una disolución de ácido sulfúrico al 10% en

etanol, con posterior calentamiento durante algunos minutos.

*1.4.- Cromatografía en columna:* Se utilizó gel de sílice Merck 60 (0,63-0,2 nm), en una proporción de 40 g de gel de sílice por cada gramo de sustancia a separar.

*1.5.- Cromatografía de exclusión:* se desarrollaron en columnas con Sephadex LH-20 en una proporción de 100 g de adsorbente por cada 100 mg de muestra, utilizando como eluyente mezclas hexano:diclorometano:metanol (2:2:1).

**2.- Selección y Recolección de la Planta:** La especie *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Hemsl. (Apocynaceae) se recolectó en febrero del año 2000, en los alrededores de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes, Distrito Libertador, Mérida, Estado Mérida, Venezuela. La especie fue identificada por el Prof. Gilberto Morillo y un *Voucher specimen* (J. A. Abad, N° 722) fue depositado en el Herbario MER de la Facultad de Ciencias Forestales (ULA), Mérida.

**3.- Extracción y fraccionamiento biodirigido:** Las hojas de la planta una vez secas y molidas (aprox. 2,0 Kg.), fueron extraídas con metanol hasta agotamiento; la disolución obtenida, fue filtrada y concentrada al vacío para dar un extracto (aprox. 210 g.), el cual se disolvió en agua y se sometió a extracción secuencial con hexano, diclorometano y acetato de etilo. En cada caso, el disolvente se evaporó a presión reducida obteniéndose extractos que pesaron aproximadamente 70 g (hexano), 90 g (diclorometano), 20 g (acetato de etilo) y 28 g (agua). El extracto en acetato de etilo resultó ser

el más activo en los ensayos de actividad antimicrobiana y por ello se estudió en detalle; una proporción (1,5 g) de este extracto fue cromatografiada sobre columna de gel de sílice, utilizando mezclas de hexano acetato de etilo en orden de polaridad creciente, con lo cual se lograron obtener, en un primer fraccionamiento, 20 fracciones (I-XX). Las fracciones más activas (XII y XV) se purificaron mediante columna de Sephadex LH-20 y por posterior precipitación en acetona se obtuvieron dos compuestos.

4. Identificación de los compuestos aislados: los dos compuestos aislados fueron identificados mediante estudios espectrales de RMN y por comparación de sus constantes físicas con las reportadas en la literatura con los flavonoles 4'-*O*-metil-kaempferol (I) y quercetina (II).

**4'-*O*-metil-kaempferol (I):** sólido amorfo de color amarillo, P. F. = 179-183°C. RMN-<sup>1</sup>H,  $\delta_H$ : 6,32 (*d* 2,2 Hz; H-6); 6,41 (*d* 2,2 Hz; H-8); 6,93 (*d* 8,4 Hz; H-2' y H-6'); 8,06 (*d* 8,4 Hz; H-3' y H-5'); 3,79 (s OCH<sub>3</sub>). RMN-<sup>13</sup>C,  $\delta_C$ : 146,2 (C-2); 138,0 (C-3); 178,5 (C-4); 162,2 (C-5); 98,6 (C-6); 163,9 (C-7); 93,7 (C-8); 156,8 (C-9); 103,0 (C-10); 121,2 (1'); 130,0 (C-2' y C-6'); 115,3 (C-3' y C-5'); 159,7 (C-4'); 55,3 (OCH<sub>3</sub>).

**Quercetina (II):** sólido amorfo de color amarillo, P. F. = 168-169°C. RMN-<sup>1</sup>H,  $\delta_H$ : 6,15 (*d* 2,2 Hz; H-6); 6,35 (*d* 2,2 Hz; H-8); 7,62 (*d* 2,2 Hz; H-2'); 6,87 (*d* 8,4 Hz; H-5'); 7,60 (*dd* 2,8 Hz; 8,4, H-6'). RMN-<sup>13</sup>C,  $\delta_C$ : 146,9 (C-2); 135,9 (C-3); 176,0 (C-4); 180,9 (C-5); 98,4 (C-6); 163,9 (C-7); 93,6 (C-8); 156,4 (C-9); 103,2 (C-10); 122,2 (C-1'); 115,2 (C-2'); 145,2 (C-3'); 147,8 (C-4'); 115,8 (C-5'); 120,2 (C-6').

5.- Ensayo de la actividad antimicrobiana: para el ensayo de la actividad antimicrobiana se emplearon microorganismos estándar de la colección del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de British Columbia, Vancouver, Canadá. Se utilizaron tres bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* sensible a la methicilina, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*; dos Gram negativas: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; también se incluyó la micobacteria *Mycobacterium phlei*; la actividad antifúngica se ensayó con la

levadura *Candida albicans*. Cada microorganismo, recogido con un hisopo estéril desde la cepa silvestre, fue suspendido en 5 mililitros del caldo de cultivo Muller-Hinton y luego se inoculó sobre una cápsula de petri, previamente preparada con el mismo medio de cultivo. En la placa se colocaron ocho discos de difusión impregnados con 20 µg de extracto y los dos controles. Como control positivo se utilizó gentamicina (10 µL = 10 µg) y neomicina (10 µL = 10 µg) como antibacterianos y antifúngicos, respectivamente; como control negativo se utilizó metanol (20 µL). Cada extracto vegetal fue ensayado bajo la influencia de la luz ultravioleta y en la oscuridad. Luego de dos horas bajo la influencia de las mismas, se incubaron todas las placas en la estufa a 37 °C por 18 horas (a excepción de las de *Mycobacterium phlei* que se incubó por 48 horas), y a continuación se midieron las zonas de inhibición. El mismo procedimiento se utilizó para la prueba de los productos aislados, impregnando los discos con 10 µg de la sustancia pura. Cada experimento se realizó por triplicado para contrastar la reproducibilidad de los resultados.

### Resultados y discusión

El extracto en acetato de etilo de las hojas de la *Mandevilla veraguasensis* resultó tener actividad contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium phlei*. Del extracto en acetato de etilo se lograron aislar dos sustancias (I) y (II) que mostraron actividad moderada contra las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*.

En la tabla 1 se presentan los resultados de inhibición del extracto en acetato de etilo, de las dos sustancias aisladas y de la gentamicina (utilizada como control antibacteriano). La zona de inhibición del extracto es menor que la de la gentamicina, pero debe tomarse en cuenta que el extracto contiene una mezcla de compuestos y que, probablemente, no todos son activos frente a los diferentes microorganismos. En razón a ello, la actividad mostrada puede calificarse como

moderada, en un todo de acuerdo con los estándares aceptados para extractos vegetales<sup>22</sup>. No se observó ninguna diferencia entre la inhibición bajo la

influencia de la luz ultravioleta y en la oscuridad, indicativo que los productos no se transforman por acción de la luz ultravioleta.

Tabla 1: Inhibición del crecimiento bacteriano Inducida por el extracto en acetato de etilo y por los flavonoles aislados de *M. veraguasensis* (Seem.) Hemsl.

	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>M. phlei</i>
Extracto en AcOEt	12 mm	9 mm	9 mm	10 mm
Gentamicina	24 mm	24 mm	10 mm	---
4'- <i>O</i> -Metil-Kaemferol (I)	14 mm	12 mm	16 mm	---
Quercetina (II)	16 mm	12 mm	14 mm	---

El análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y de RMN-<sup>13</sup>C y su comparación con los reportados en la literatura<sup>23,24</sup>, permitió identificar las sustancias aisladas con el 4'-*O*-metil-kaemferol (I) y la quercetina (II). Estos dos flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal<sup>25</sup>. Los

resultados obtenidos son concordantes con otros estudios, a través de los cuales se ha demostrado que un número significativo de flavonoles posee actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas<sup>26</sup>.

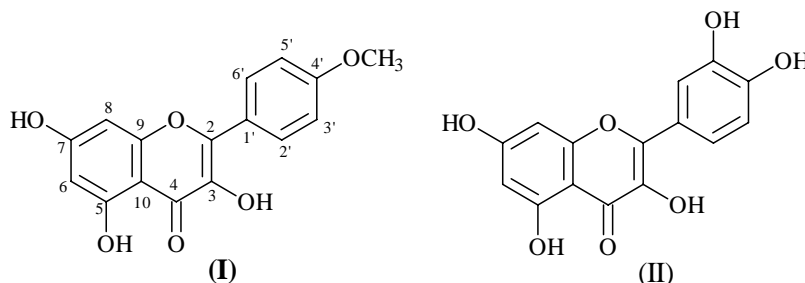


Figura 2. Flavonoides aislados de las hojas de la especie *M. veraguasensis* (Seem.) Hemsl.

## Conclusiones

1.- El extracto en acetato de etilo de las hojas de la *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Hemsl. posee actividad inhibidora del crecimiento de bacterias Gram positivas.

2.- Del extracto en acetato de etilo de esta planta se aislaron e identificaron los flavonoides 4'-*O*-metil-kaempferol (I) y quercetina (II), los cuales probablemente son responsables de la actividad antibacteriana.

**Agradecimientos:** Lo autores expresan su agradecimiento al Prof. Gilberto Morillo por la determinación botánica de la especie estudiada.

## Referencias

1. M. E. Endress. "Apocynaceae: Brown and now". *Telopea*, **10**, 525-540 (2004).
2. B. Sennblad, B. Bremer. "The familial and subfamilial relationships of Apocynaceae and

- Asclepiadaceae evaluated with rbcL data". *Plant Syst. Evol.*, **202**, 153-175 (1996).
3. M. E. Endress, P.V. Bruyns. "A revised classification of the Apocynaceae s.l." *Bot. Rev.* **66**, 1-56 (2000).
  4. S. P.Gunasekera, M. M. Badawi, G. A. Cordell, N. R. Farnsworth, M. Chitnisl. "Plant anticancer agents X. Isolation of camptothecin and 9-methoxycamptothecin from *Ervatamia heyneana*". *J. Nat. Prod.*, **42**, 475-477 (1979).
  5. N. C. Garbett, D. E.Graves. "Extending nature's leads: The anticancer agent ellipticine". *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **4**, 149-172 (2004).
  6. J. C. Delorenzi, L. Freire-de-Lima, C. R. Gattass, D. de Andrade Costa, L. He, M. E. Kuehne, E. M. Saraiva. "In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*". *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 111-115 (2002).
  7. E. A. Lindsay, Y. Berry, J. F. Jamie, J. B. Bremner. "Antibacterial compounds from *Carissa lanceolata* R.Br." *Phytochemistry*, **55**, 403-406 (2000).
  8. J. C. Tanaka, C. C. Silva, A. J. Oliveira, C. V. Nakamura, B. P..Dias Filho. "Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*". *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **39**, 387-391 (2006).
  9. I. B. Suffredini, A. D. Varella, A. A. Oliveira, R. N. Younes. "In vitro anti-HIV and antitumor evaluation of amazonian plants belonging to the Apocynaceae family". *Phytomedicine*, **9**, 175 (2002)
  10. E. M. Silva, C. C. Cirne-Santos, I. C. Frugulhetti, B. Galvao-Castro, E. M. Saraiva, M. E. Kuehne, D. C..Bou-Habib. "Anti-HIV-1 activity of the iboga alkaloid congener 18-methoxycoronaridine". *Planta Medica*, **70**, 808-812 (2004).
  11. M. Volkan Kisakurek, A. J. M. Leeuwenberg, M. Hesse. "A chemotaxonomy investigation of plant families Apocynaceae, Loganiaceae and Rubiaceae by their indole alkaloid content". **En**, S. W. Pelletier (Ed.) "Alkaloids: Chemical and biological perspectives", Vol 1, pág. 211-376. Wiley-Interscience. New York. (1983).
  12. A. U. Rahman, A. Muzaffar. "Steroidal Alkaloids of Apocynaceae and Buxaceae". **En**, A. Brossi (Ed.) "The Alkaloids", Vol. 32, Chapt. 2, pág. 79-92. Academic Press. New York. (1988).
  13. R. L. Noble. "The discovery of the *Vinca* alkaloids, chemotherapeutic agents against cancer". *Biochem. Cell Biol.*, **68**, 1344-1351 (1990).
  14. R. van Der Heijden, D. I. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard, R..Verpoorte. "The *Catharanthus* alkaloids: Pharmacognosy and biotechnology". *Curr. Med. Chem.*, **11**, 607-628. (2004).
  15. M. Lounasmaa, P. Hanhinen. "The ajmaline group of indole alkaloids". *Alkaloids. Chem Biol.*, **55**, 1-87 (2001).
  16. R. E..Stitzel. "The biological fate of reserpine". *Pharmacol. Rev.*, **28**, 179-208 (1976).
  17. R. J. Vakil. "*Rauwolfia serpentina* in the treatment of high blood pressure: A review of the literature". *Circulation*, **12**, 220-229 (1955).
  18. J. F. Morales. "A synopsis of the genus *Mandevilla* (Apocynaceae) in Mexico and Central America". *Brittonia*, **50**, 214-232 (1998).
  19. G. Cabrera, A. M. Seldes, E..G..Gross. "A pregnane glycoside from the roots of *Mandevilla pentlandiana*". *Phytochemistry*, **32**, 171-173 (1993).
  20. R. Niero, R. V. Alves, V. C. Filho, J. B. Calixto, J. E. Hawkes, A. E. Sant'Ana, R. A..Yunes. "A new anti-oedematogenic nor-pregnane derivative isolated from *Mandevilla illustris*". *Planta Medica*, **68**, 850-853 (2002).
  21. W. M. Mattos, J. Ferreira, G. P. Richetti, R. Niero, R. A. Yunes, J. B..Calixto. "Antinociceptive properties produced by the pregnane compound velutinol A isolated from *Mandevilla velutina*". *Neuropeptides*, **40**, 125-132 (2006).
  22. G. G. F. Nascimento, J. Locatelli, P. C. Freitas, G. L. Silva. "Antibacterial activity of plant extracts

and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria". *Braz. J. Microbiol.*, **31**, 247-256 (2000).

23. K. R..Markham, H..Geiger. "<sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterated dimethylsulfoxide". En, J. B. Harborne (Ed.) "The flavonoids: Advances research since 1986". pág. 441-497. Chapman and Hall. London. (1993).

24. P. K. Agrawal, "Carbon-13 NMR of flavonoids", pág. 152-155. Elsevier. New York. (1989).

25. E..Wollenweber, V. H. Dietz 1981. "Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants". *Phytochemistry*, **20**, 869-932 (1981).

26. T. P. Cushnie, A. J. Lamb. Antimicrobial activity of flavonoides". *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26**, 343-356 (2005).