

EXTRACTOS VEGETALES CON ACTIVIDAD SOBRE CEPAS MUTADAS DE *Saccharomyces cerevisiae* CON DEFICIENCIA EN EL MECANISMO DE REPARACION DEL ADN

RESUMEN

Ciento treinta y ocho extractos obtenidos de plantas pertenecientes a las familias botánicas Asteraceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Podocarpaceae, Rubiaceae y Solanaceae recolectadas en reservas naturales de la Ecorregión del Eje Cafetero (EEC) fueron evaluadas contra cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* RS 322N, R52Y y RS 321 por el método de difusión en agar, con el propósito de identificar nuevos extractos bioactivos que dañen el ADN y/o que inhiban las topoisomerasas I o II.

Los extractos metanólicos de las especies pertenecientes a la familia Solanaceae: *Browallia speciosa*, *Cestrum olivaceum* y *Solanum brevifolium* mostraron selectividad para el ensayo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mutada, presentando actividad como inhibidor de la topoisomerasa I. Adicionalmente, el extracto de diclorometano de *Solanum deflexiflorum* perteneciente a la misma familia presentó actividad inhibidora de la topoisomerasa II.

PALABRAS CLAVES: Asteraceae, Bioprospección, Euphorbiaceae, Flora Colombiana, Inhibidores de Topoisomerasas, Melastomataceae, Podocarpaceae, Rubiaceae, Solanaceae

ABSTRACT

One hundred thirty eight extracts derived from plant belonging to six botanical families collected in natural reserves from the Eje Cafetero Ecorregión (ECE, Colombia) were assayed against engineered yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains RS 322N, R52Y and RS 321 by the agar well diffusion method to identify novel bioactive extracts with DNA-damaging and/or topoisomerase I and II activities.

From this study the methanol extracts from the Solanaceae *Browallia speciosa*, *Cestrum olivaceum*, and *Solanum brevifolium*, showed selectivity toward DNA-repair-deficient yeast mutant *Saccharomyces cerevisiae*, evidencing topoisomerase I activity; in addition, the dichloromethane one of the Solanaceae, *Solanum deflexiflorum* exhibited topoisomerase II activity.

KEY WORDS: Asteraceae, Bioprospecting, Colombian flora, Topoisomerase Inhibitors, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Podocarpaceae, Rubiaceae, Solanaceae

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen una cantidad considerable de metabolitos secundarios, con una gama enorme de actividades biológicas y de estructuras químicas las cuales las hacen una fuente importante de quimiodiversidad para el hallazgo de nuevos agentes terapéuticos [1].

Varios estudios se han realizados para aislar los metabolitos secundarios bioactivos usando diferentes cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* porque es un microorganismo experimental ideal como sistema modelo para el descubrimiento de nuevos medicamentos [2,3]. Por ejemplo, las siete

JAIME NIÑO

Lic Bgía-Qca, Ph.D.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
janino@utp.edu.co

PAOLA A. MORALES

Estudiante Escuela de Tecnología Química

JULIANA BATERO

Estudiante Escuela de Tecnología Química

YANED M. CORREA

Química
Profesora Catedrática
Universidad Tecnológica de Pereira
yamico@utp.edu.co

OSCAR M. MOSQUERA

Químico, M.Sc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
omosquer@utp.edu.co

Grupo de Biotecnología-Productos Naturales (GBPN). Escuela de Tecnología Química- Universidad Tecnológica de Pereira, La Julita, Pereira.

furano-naftoquinonas de *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae) [4]; los alcaloides artabotrina y atherospermidina de *Artabotrys zeylanicus* (Annonaceae) [5]; el alcaloide bisisoquinolínico dicentrinona de la especie *Ocotea leucoxylo* (Lauraceae) [6], todos mostraron una amplia gama de efectos biológicos, tales como daño al ADN o actividad inhibitoria contra las topoisomerasas I y/o II.

El bioensayo *in vitro* empleado en este estudio para determinar agentes anticancerígenos potenciales se apoya en la capacidad de las cepas mutadas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para reparar rupturas o daños en su ADN. El ensayo se lleva a cabo midiendo la inhibición del crecimiento de la cepa

mutada en el mecanismo de reparación-deficiencia, generalmente el rad52, en comparación con la cepa silvestre RS 322N. Por lo tanto, una de las cepas mutadas que carezca de uno de los mecanismos de la reparación del ADN será más sensible que la cepa silvestre a los agentes que dañan el ADN, permitiendo que estas entidades sean detectadas selectivamente [7].

Continuando con el estudio de la flora de diferentes reservas naturales regionales de la Ecorregión del Eje Cafetero (EEC, Colombia) como fuente de nuevos metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas [8,9,10] y al hecho de que hay gran interés por encontrar nuevos y mejores agentes que afecten el ADN o que envenen las topoisomerasas I y II. Por lo anterior, 69 extractos crudos de metanol y 69 de diclorometano de plantas pertenecientes a seis familias botánicas se evaluaron usando las cepas mutadas RS 322N, R52Y y RS 321 de la levadura *S. cerevisiae* [7].

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal.

Sesenta y nueve plantas pertenecientes a las familias: Asteraceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Podocarpaceae, Rubiaceae y Solanaceae fueron recolectadas en diferentes reservas naturales de la Ecorregión del Eje Cafetero (EEC, Colombia) en febrero de 2000, octubre de 2001 y de noviembre del 2003 y clasificadas por el profesor F.J. Roldán. Un voucher de cada planta recolectada fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia). Los materiales vegetales recolectados fueron extraídos según el procedimiento descrito por Niño et al. [9]. En resumen, la parte aérea de las plantas fue secada en horno a 50 °C, se molieron y se extrajeron por maceración tres veces durante 48 h sucesivamente con los siguientes solventes: hexano, diclorometano y metanol a temperatura ambiente; posteriormente, los diversos extractos fueron concentrados a sequedad a presión reducida y almacenados a -10 °C hasta su evaluación.

2.2 Tamizado fitoquímico.

Para cada extracto se efectuó la caracterización fitoquímica detectando la presencia de los metabolitos secundarios mediante cromatografía de capa delgada (CCD). Para los extractos metanólicos las cromatoplasmas fueron eluidas con acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10) y los de diclorometano se eluyeron con hexano-acetato de etilo (6:4). La detección de los núcleos fitoquímicos se llevó a cabo aplicando los siguientes agentes cromogénicos: el reactivo de Dragendorff para alcaloides, el anisaldehído-ácido sulfúrico para esteroides, el de vainillina al 1% en ácido sulfúrico-etanol absoluto para saponinas, el cloruro de aluminio al 2% en etanol para flavonoides, el cloruro férrico al 1% para taninos y el reactivo cloruro de hidroxilamina-férrico para lactonas [11].

2.3 Bioensayo de la levadura.

El bioensayo *in vitro* fue realizado con las cepas mutadas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* RS 322N, R52Y y RS 321. Las levaduras fueron cultivadas en el caldo YEPD y una porción de ellas se resuspendieron en 0.85% de solución salina hasta obtener una transmitancia del 25% a 600 nm y fueron usadas según el método de difusión del pozo en agar descrito por Ríos et al. [12]. Las cajas de Petri fueron preparadas adicionando 1 mL del caldo de la respectiva cepa de levadura como inóculo, seguidamente se transfirieron 20 mL del agar a cada caja con homogenización. Después de la solidificación del agar, se perforaron siete pozos de 6.0 mm de diámetro para depositar las cinco concentraciones de los extractos de las plantas y los controles respectivos. Los extractos metanólicos y de diclorometano se disolvieron en MeOH-H₂O (1:1) y DMSO-MeOH-H₂O (3:1:4), respectivamente y evaluados a las concentraciones de 4000, 2000, 1000, 500 y 250 µg/mL. Volúmenes de 20 µL de estas mezclas binarias y ternarias también fueron utilizados como controles negativos. Para las cepas mutadas de *S. cerevisiae*: RS 322N, R52Y y RS 321, nystatin a 30, 40 y 250 µg/mL respectivamente fueron utilizadas como control positivo. Después, las cajas de Petri fueron incubadas a 30 °C por 36 h y las zonas de inhibición fueron medidas en milímetros. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado con dos repeticiones.

2.4 Análisis de datos.

La actividad se determinó como IC₁₂ (µg/mL), la cual representa la concentración de la muestra evaluada para producir una zona de inhibición de 12 milímetros de diámetro y fueron obtenidos a través de una curva de dosis-respuesta mediante un análisis de regresión lineal [13]. En este bioensayo un extracto se considera inhibidor de la topoisomerasa I, II o un agente que dañe o afete el ADN si inhibe el crecimiento de una o más cepas mutadas, produciendo una zona de la inhibición considerable; por ejemplo, un agente que presente mayor actividad contra la RS 321 en vez de la R52Y, con un IC₁₂ 1/3 menor entre ambas cepas y en general si presentan un IC₁₂ menor de 2000, lo más probable que su actividad inhibitoria se exprese a través de la topoisomerasa II. A lo contrario, una mayor actividad contra R52Y implica un mecanismo inhibitorio de la ADN topoisomerasa I [6,7].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio con las cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae*, solo se presentan en la tabla 1, las plantas que fueron activas, no se incluyeron los extractos que resultaron inactivos. Los resultados mostraron que 6 extractos metanólicos (8.69%) de los cuales cinco pertenecieron a la familia Solanaceae y uno a la Melastomataceae, y 3 de diclorometano (4.34%) asociados con de la familia Solanaceae presentaron actividad de daño contra el ADN.

Los tres extractos metanólicos de las plantas de la familia Solanaceae: *Cestrum olivaceum*, *Solanum brevifolium* y *Browallia speciosa*, fueron selectivos para la topoisomerasa I presentando actividad fuerte, moderada y débil respectivamente. Mientras que solamente, el extracto de diclorometano de *Solanum deflexiflorum* Bitter mostró actividad selectividad para la topoisomerasa II. Es importante destacar que los dos extractos de *Solanum leuocarpum* mostraron actividad de daño al ADN.

El tamizado fitoquímico del extracto metanólico de *C. olivaceum* y de *B. speciosa* y el extracto de diclorometano de *S. deflexiflorum* evidenciaron la presencia de alcaloides y triterpenos y a estos metabolitos secundarios se pudo atribuir la actividad inhibitoria de éstos extractos.

Los mejores resultados fueron presentados por las plantas pertenecientes a la familia Solanaceae particularmente de las especies *C. olivaceu*, *B. speciosa* y *S. deflexiflorum*. Además, del extracto metanólico de *S. deflexiflorum* se aislaron dos alcaloides esteroidales (datos no demostrados). Estos resultados correlacionan con los alcaloides esteroidales solasodina y la O-acetilsolasodina aislados *Solanum umbelliferum* (Solanaceae) por Kim et al. [14]; así como con los alcaloides 20R y 20S verazina aislados de *Solanum hostmannii* por Pung [15], a través del bioensayo guiado con la levadura mutada *Saccharomyces cerevisiae*.

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Tecnológica de Pereira, al Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo territorial y CENICAFE por la ayuda financiera al proyecto. Así mismo a la Corporación Autónoma Regional de Risaralda (CARDER) por conceder los permisos de acceso a la recolección de plantas. Los autores también agradecen al Dr. D.G.I. Kingston del Virginia Polytechnic Institute and State University por el obsequio de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* mutadas usadas en este trabajo.

5. BIBLIOGRAFÍA

[1] VERPOORTE, R. 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. DDT 3:232-238.

[2] AUERBACH, D., ARNOLDO, A., BOGDAN, B., FETCHKO, M. & STAGLJAR, I. 2005. Drug discovery using yeast as a model system: A functional genomic and proteomic view. Current Proteomics 2: 1-13.

[3] CARDENAS, M.E., CRUZ, M.C., DEL POETA, M., CHUNG, N., PERFECT, J.R. & HEITMAN, J. 1999. Antifungal activities of antineoplastic agents: *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study drug action. Clin. Microbiol. Rev. 12: 583-611.

[4] HELTZEL, C.E., GUNATILAKA, A.A.L., GLASS, T.E. & KINGSTON, D.G.I. 1993. Bioactive furanonaphthoquinones from *Crescentia cujete*. J. Nat. Prod. 56:1500-1505.

[5] WIJERATNE, E.M.K., GUNATILAKA, A.A.L., KINGSTON, D.G.I., HALTIWANGER, R.C. & EGGLESTON, D.S. 1995. Artabotrine: A novel bioactive alkaloid from *Artabotrys zeylanicus*. Tetrahedron 51:7877-7882.

[6] ZHOU, B., JOHNSON, R., MATTERN, M., WANG, X., HECHT, S., BECK, H., ORTIZ, A. & KINGSTON, D.G.I. 2000. Isolation biochemical characterization of a new topoisomerase inhibitor from *Ocotea leucoxyllum*. J. Nat. Prod. 63:217-221.

[7] GUNATILAKA, A.A.L., KINGSTON, D.G.I. & JOHNSON, R.K. 1994. Mechanism-based isolation and structures of some anticancer active natural products. Pure Appl. Chem. 66:2219-2222.

[8] NIÑO, J., ESPINAL, C.M., MOSQUERA, O.M. & CORREA, Y.M. 2003. Antimycotic activity of 20 plants from Colombian flora. Pharm. Biol. 41:491-496.

[9] NIÑO, J., CORREA, Y.M. & MOSQUERA, O.M. 2006. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities from eleven Solanaceae plants from Colombian flora. Pharm. Biol. 44:14-18.

[10] MOSQUERA, O.M., CORREA, Y.M. & NIÑO, J. 2004. Antibacterial activity of some Andean Colombian plants. Pharm. Biol. 42:499-503.

[11] HARBORNE, J.B. 1980. Phytochemical Methods (A guide to modern techniques of plant analysis). Chapman and Hall Ltd. London. 278p.

[12] RÍOS, J., RECIO, M. & VILLAR, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. J. Ethnopharmacol. 23:127-149.

[13] GUNATILAKA, A.A.L. & KINGSTON, D.G.I. 1998. DNA-damaging natural products with potential anticancer activity. In: Studies in Natural Products Chemistry (Atta-ur-Rahman, ed.). Elsevier, Amsterdam, vol 20:323-405.

[14] KIM, Y.C., CHE, Q. M., GUNATILAKA, A.A.L. & KINGSTON, D.G.I. 1996. Bioactive steroidal alkaloids from *Solanum umbelliferum*. J. Nat. Prod. 59:283-285.

[15] PUNG, T. 2000. Isolation of natural products from plant extracts. M. Sc Thesis: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg. Virginia. USA.

| Familia | Especies (Número de Voucher) | Extracto ¹ | <i>Saccharomyce cerevisie</i> Cepas | | |
|--|---|-----------------------|--|-------|--------|
| | | | RS 322N | R52Y | RS 321 |
| Melastomataceae | <i>Tibouchina grossa</i> (L.F.) Cogn. (FJR3157) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | 2828 | - | - |
| Solanaceae | <i>Browallia speciosa</i> Hook (FJR3732) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | 1180 | 2865 | 7539 |
| | <i>Cestrum ochranthum</i> Francey (FJR3166) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Cestrum olivaceum</i> Francey (FJR3159) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | 279 | 609 | 1196 |
| | <i>Deprea glabra</i> (Standl) A.T. Hunziker (FJR3722) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Lycianthes acutifolia</i> (R. & P.) Bitter (FJR3156) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Lycianthes radiata</i> (Sendt.) Bitter (FJR3154) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Lyciantes</i> sp (FJR3735) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Solanum aphyodendron</i> (FJR3729) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Solanum brevifolium</i> (FJR3923) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | 543 | 1000 | 20000 |
| | <i>Solanum deflexiflorum</i> Bitter (FJR3718) | DC | 76 | 1264 | 619 |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Solanum lepidotum</i> Dunal (FJR3728) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Solanum leucocarpum</i> Dunal (FJR3717) ² | DC | 788 | 3175 | - |
| | | MeOH | 707 | - | - |
| | <i>Solanum leucocarpum</i> Dunal (FJR3926) ² | DC | 456 | 16000 | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Solanum ochranthum</i> (FJR3922) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Solanum ovalifolium</i> Dunal (FJR3920) | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| | <i>Solanum</i> sp (FJR3173) ² | DC | - | - | - |
| | | MeOH | - | - | - |
| <i>Solanum</i> sp (FJR3921) ² | DC | - | - | - | |
| | MeOH | 1243 | - | - | |
| <i>Solanum stellatiglandulosum</i> Bitter (FJR3744) | DC | - | - | - | |
| | MeOH | - | - | - | |
| <i>Solanum sycophanta</i> Dunal (FJR3737) | DC | - | - | - | |
| | MeOH | - | - | - | |
| <i>Witheringia coccoloboides</i> (damn.) Hunz. (FJR3155) | DC | NE | NE | NE | |
| | MeOH | - | - | - | |

¹ DC= Diclorometano, MeOH= Metanol; ² Recolectada en tiempos diferentes; NE= No Evaluado

Tabla 1. Valores de IC₁₂ (µg/mL) de los extractos crudos de las plantas activas frente a *Saccharomyces cerevisiae* recolectadas en diferentes Reservas Naturales de la Ecorregión del Eje Cafetero (EEC)