

Estudio fitoquímico y actividad biológica de *Hinterhubera imbricata* Cuatrec. & Aristeg

Ysbelia Obregón-Díaz^{1a*}, Luis Rojas-Fermín^{†1b}, Alida Pérez-Colmenares^{1c}, Yndra Cordero^{1d}, Rosa Aparicio^{1e}, Wilberto De Lima^{2f}, Johana Hernández^{3g}, Alfredo Usubillaga^{1h}

¹ Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101. República Bolivariana de Venezuela. *Autora de correspondencia.

² Laboratorio de Análisis Instrumental, Núcleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de Los Andes, Trujillo C.P. 3150. República Bolivariana de Venezuela.

³ Laboratorio de Investigaciones en Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101. República Bolivariana de Venezuela.

Correos electrónicos: ^a ysbeliaobregon@gmail.com, ^b rojasfermin33@gmail.com, ^c alidaperezc@gmail.com, ^d yndracprdero@gmail.com, ^e apariciorosa12@gmail.com, ^f wilberto.a@gmail.com, ^g hjohannacarolina@gmail.com, ^h usubi80@gmail.com

Recibido: 22 de diciembre de 2023

Revisado: 23 de marzo de 2024

Aceptado: 26 de marzo de 2024

RESUMEN

Objetivo: En la presente investigación se realizó el estudio fitoquímico de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de las partes aéreas de *Hinterhubera imbricata* recolectada en el estado Mérida-Venezuela. **Métodos:** La purificación de los extractos y aislamiento de los metabolitos secundarios se hizo a través de cromatografía de columna. La identificación y caracterización de los compuestos fue mediante análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, espectroscopía infrarrojo y de resonancia magnética nuclear. La actividad antibacteriana se evaluó *in vitro* empleando el método de difusión en agar con discos frente a cepas de referencia internacional de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad antioxidante se determinó *in vitro* por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. **Resultados:** El tamizaje fitoquímico reporta la presencia en los extractos de hexano y diclorometano de las hojas-tallos de triterpenos y esteroides, y en los extractos de metanol de las hojas, tallos y flores; esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides y cumarinas. Se aislaron cuatro compuestos que fueron identificados como 7-hidroxi-6-metoxicumarina, friedelona, friedelan-3-ol y ácido ursólico. Todos los extractos presentaron actividad frente a *S. aureus* y *K. pneumoniae* en una concentración de

1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo los más activos los extractos de metanol (hojas-tallos y flores) con una concentración inhibitoria mínima de 250 y 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. La actividad antioxidante fue moderada, siendo la concentración efectiva media de 12,9 y 8,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para el extracto de metanol de hojas-tallos y flores. **Conclusión:** Las partes aéreas de *Hinterhubera imbricata* contienen metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y antioxidante, siendo esta especie una fuente de sustancias biológicamente activas.

Palabras clave: Asteraceae, Hinterhuberinae, *Hinterhubera imbricata*, triterpenos, cumarinas.

SUMMARY

Phytochemical study and biological activity of *Hinterhubera imbricata* Cuatrec. & Aristeg.

Objective: The phytochemical study of the extract of hexane, dichlorometane, and methanol from the aerial parts of *Hinterhubera imbricata* collected in the State of Mérida, Venezuela was performed in this research. **Methods:** The purification of the extracts and isolation of the secondary metabolites was done through column chromatography. Compounds were identified and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance analysis. Antibacterial activity was evaluated *in vitro* using the disk agar diffusion method against international reference strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antioxidant activity was determined *in vitro* through the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical method. **Results:** Phytochemical screening reports the presence in hexane and dichloromethane extracts of leaves-stems of triterpenes and sterols, and in methanol extracts of leaves, stems and flowers; sterols, phenolic compounds, flavonoids and coumarins. Four compounds were isolated and identified as 7-hydroxy-6-methoxycoumarin, friedelone, friedelan-3-ol and ursolic acid. All extracts showed activity against *S. aureus* and *K. pneumoniae* at a concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, being the most active the methanol extracts (leaves-stems and flowers) with a minimum inhibitory concentration of 250 and 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The antioxidant activity was moderate, being the median effective concentration of 12.9 and 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for the methanol extract of leaves-stems and flowers.

Conclusion: The aerial parts of *Hinterhubera imbricata* contain secondary metabolites with antibacterial and antioxidant activity, being this species a source of biologically active substances.

Keywords: Asteraceae, Hinterhuberinae, *Hinterhubera imbricata*, triterpenes, coumarins.

RESUMO

Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Hinterhubera imbricata* Cuatrec. & Aristeg.

Objetivo: Na presente investigação foi realizado o estudo fitoquímico dos extratos de hexano, diclorometano e metanol das partes aéreas de *Hinterhubera imbricata* recolhidas no estado de Mérida-Venezuela. **Métodos:** A purificação dos extratos e o isolamento dos metabolitos secundários foram efetuados por cromatografia em coluna. A identificação e caracterização dos compostos foi efetuada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, espectroscopia de infravermelhos e análise de ressonância magnética nuclear. A atividade antibacteriana foi avaliada *in vitro* utilizando o método de difusão em disco de ágar contra estirpes de referência internacional de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade antioxidante foi determinada *in vitro* pelo método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. **Resultados:** O rastreio fitoquímico indica a presença de triterpenos e esteróis nos extractos de hexano e diclorometano das folhas e caules, e de esteróis, compostos fenólicos, flavonóides e cumarinas nos extratos de metanol das folhas, caules e flores. Quatro compostos foram isolados e identificados como 7-hidroxi-6-metoxicumarina, friedelona, friedelan-3-ol e ácido ursólico. Todos os extratos mostraram atividade contra *S. aureus* e *K. pneumoniae* a uma concentração de 1000 µg/mL, sendo os mais ativos os extratos de metanol (folhas-caules e flores) com uma concentração inibitória mínima de 250 e 125 µg/mL, respetivamente. A atividade antioxidante foi moderada, com concentrações médias eficazes de 12,9 e 8,3 µg/mL para o extrato metanólico das folhas-caules e flores. **Conclusão:** As partes aéreas de *Hinterhubera imbricata* contém metabolitos secundários com atividade antibacteriana e antioxidante, sendo esta espécie uma fonte de substâncias biologicamente ativas.

Palavras-chave: Asteraceae, Hinterhuberinae, *Hinterhubera imbricata*, triterpenos, cumarinas.

INTRODUCCIÓN

El género *Hinterhubera* (Asteraceae), fue determinado por Schultz Bipontinus y posteriormente publicado por Weddell (1855), siendo José Cuatrecasas (1969) quien reconoció la singular morfología de sus corolas y estableció su ubicación en la subtribu *Hinterhuberinae* [1, 2]. Las 8 especies de *Hinterhubera* se encuentran distribuidas en las zonas andinas de Colombia y Venezuela [3, 4]; donde dos especies (*H. nevadensis* Cuatrec. y *H. harrietae* Cuatrec.), se ubican en la Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia) y siete en la Cordillera Andina Venezolana (*H. adenopetala* Cuatrec. & Aristeg., *H. columbica* Sch. Bip. ex Wedd., *H. ericoides* Wedd., *H. imbricata* Cuatrec. & Aristeg., *H. lanuginosa* Cuatrec. & Aristeg., *H. laseguei* Wedd. y *H. longiloba* M. Carrillo, M. Lapp et P. Torrecilla *sp. nov.*), siendo cinco especies endémicas en Venezuela localizadas desde el estado Mérida hasta las estribaciones andinas del estado Lara [1-5]. Algunas plantas pertenecientes a la subtribu *Hinterhuberinae* poseen actividades biológicas como citotóxico, antitumoral, antioxidante, antimicrobiano, hipotensor y antiinflamatorio [6-11]. Estudios previos reportan que de las partes aéreas de la especie *H. imbricata*, se logró aislar un triterpeno identificado como ácido oleanólico y tres diterpenos caracterizados como 3-hidroxi-imbricatol-valerico, 3-hidroxi-imbricatol- α -metilbutirato y 3-hidroxi-imbricatol-angelico [12]. En la presente investigación se realizó el estudio fitoquímico de las partes aéreas de *Hinterhubera imbricata*, logrando el aislamiento de cuatro compuestos los cuales fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Adicionalmente se evaluó la actividad antioxidante mediante el método de 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH) y antibacteriana por el método de difusión en agar con pozos (Kirby-Bauer).

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento general

Los puntos de fusión fueron determinados utilizando un instrumento digital Fisatom 430 D. Los análisis de espectroscopía ultravioleta (UV) se efectuaron con un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10 Bio, empleando celdas de cuarzo de 1×1×1 cm y celda de cuarzo de paso fino. Los espectros infrarrojos (IR) se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo Spectrum Two, en discos de KBr. Los espectros de masas (EM) se obtuvieron en un equipo de cromatografía de gases acoplado a masas marca Hewlett Packard, modelo 5973, utilizando una columna HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μ m de i.d) y un detector de impacto electrónico (IE energía e- 70 eV). Los espectros

de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) uni y bi dimensionales se realizaron en un equipo de RMN Bruker-Avance DRX 400. Como solventes se usaron metanol deuterado (CD_3OD) y cloroformo deuterado (CDCl_3).

Material vegetal

Las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de la especie fueron recolectadas en el año 2010 en el Parque Nacional La Culata, laguna Los Guaches vía pico El Águila (2500 m.s.n.m.), en el Estado Mérida-Venezuela. Una muestra testigo fue depositada en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Voucher specimen N° YO001) e identificada como *Hinterhubera imbricata* Cuatrec. & Aristeg por el Dr. Pablo Meléndez.

Obtención de los extractos

Las partes aéreas fueron separadas en hojas-tallos y flores, posteriormente se colocaron en bandejas y se secaron en estufa a 40 °C. Luego se procedió a moler hasta la obtención de un polvo fino, obteniéndose 2450,0 g de hojas-tallos y 117,0 g de flores. El material vegetal fue sometido a maceración a temperatura ambiente con disolventes en orden de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol), las soluciones provenientes de las extracciones se filtraron y se concentraron en un rotavapor a presión reducida a una temperatura no mayor a 45 °C., obteniéndose 140,0 g del extracto de hexano; 244,6 g del extracto de diclorometano y 385,1 g del extracto de metanol correspondiente a las hojas-tallos. Por otra parte, de las flores se obtuvo 8,6 g del extracto de hexano; 5,0 g del extracto de diclorometano y 13,2 g del extracto de metanol.

Estudio fitoquímico preliminar

Para la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de hexano, diclorometano y metanol de las hojas-tallos y flores de *H. imbricata* se efectuó una serie de pruebas químicas cualitativas siguiendo la metodología descrita por Marcano y Hasegawa [13].

Extracción y aislamiento de los compuestos

El extracto de metanol de las hojas-tallos (EMHT; 385,1 g) se sometió a una extracción líquido-líquido usando una mezcla de acetato de etilo y agua destilada (2:1), el procedimiento se realizó cuatro veces obteniéndose las fases orgánicas FO-1 (160,5 g), FO-2 (90,2 g), FO-3 (25,2 g) y FO-4 (55,6 g). Luego de realizar el análisis de las fracciones por cromatografía de capa fina (CCF), se tomó de la fracción orgánica identificada como FO-1 11,1 g y se purificaron en un sistema de cromatografía de columna flash, utilizando como fase estacionaria sílica gel 70-230 Mesh, 60-200 mm, 60 Å y como fase móvil hexano, diclorometano y metanol en mezclas en orden de polaridad cre-

ciente, obteniendo 11 sub-fracciones (FO-1.1 - FO-1.11). La subfracción FO-1.5 al ser analizada por CCF presentó un compuesto mayoritario, el cual se purificó mediante cromatografía de columna usando como soporte Sephadex LH20 y como fase móvil diclorometano y metanol (95:5), eluyendo el compuesto 1 (Figura 1).

Por otra parte, se pesaron 100,0 g del extracto de diclorometano obtenido de las hojas y tallos (EDHT) y fue sometido a procesos de separación y purificación mediante cromatografía flash, utilizando como soporte sílica gel 60 y como fase móvil hexano, mezclas de hexano:acetato de etilo y metanol en orden de polaridad creciente. Se obtuvieron 13 fracciones (EDHT-1 a EDHT-13) las cuales se analizaron mediante CCF y se reunieron de acuerdo a sus características comunes. La fracción EDHT-2 (4,4 g) fue recristalizada con acetato de etilo obteniendo el compuesto 2 (0,3 g). Adicionalmente, la fracción EDHT-3 (1,1 g) fue sometida nuevamente a cromatografía de columna y eluida con hexano y acetato de etilo (90:10), obteniéndose el compuesto 3 (0,4 g). Finalmente, la fracción EDHT-7 (3,4 g) se purificó bajo un sistema de cromatografía de columna flash y como fase móvil: hexano y acetato de etilo en mezclas de polaridad creciente, consiguiendo aislar el compuesto 4 (0,4 g) (Figura 1).

En cuanto al extracto de metanol de las flores (EMF), se tomaron 10,0 g y se purificaron mediante cromatografía flash, utilizando como soporte sílica gel 60 y como fase móvil diclorometano y metanol en orden de polaridad creciente, luego del análisis por CCF se reunieron 20 fracciones (EMF-1 a EMF-20). En la fracción EMF-8 se obtuvo un compuesto puro (0,08 g) que al ser comparado por CCF coincide con el compuesto 1 obtenido previamente en FO-1.5 (EMHT). Por otra parte, el extracto de hexano de las flores (EHF) fue analizado por cromatografía de gases-masas evidenciando la presencia de hidrocarburos saturados, donde el nonacosano resultó ser el componente mayoritario.

La caracterización estructural de los compuestos (1-4) fue realizada utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear uni y bidimensionales, infrarrojo y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para poder analizar el compuesto 4 por espectrometría de masas se procedió a realizar la metilación de la sustancia con diazometano *in situ* [14, 15]. Los datos obtenidos se compararon con los reportados previamente en la literatura.

Actividad antibacteriana

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) proporcionadas por el

Cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en agar con pozos [16], el ensayo se realizó con un cultivo de 18 horas de cada microorganismo en 2,5 mL de caldo Müeller-Hinton a 37 °C. El inóculo bacteriano fue ajustado con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10^{6-8} UFC/mL). Cada inóculo se diseminó sobre la superficie de una placa que contenía agar Müeller-Hinton y luego con una pipeta Pasteur estéril invertida se realizaron los pozos, posteriormente se depositan 10 μ L de las soluciones de los extractos obtenidos de las hojas-tallos (EHHT, EDHT, EMHT) y flores (EHF y EMF) a una concentración de 1000 ppm, así mismo se colocó el control negativo dimetilsulfóxido (DMSO) y los discos estándares de los antibióticos de referencias como control positivo (Amikacina® y Ampicilina®) para cada uno de los microorganismos, posteriormente se incubaron las placas por 24 horas a 37°C en atmósfera aeróbica y se realizó la lectura de los halos de inhibición en milímetros (mm). Se consideró un resultado positivo o sensible (actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los pozos. El caso contrario, la ausencia de dicho halo se interpretó como negativo o resistente (sin actividad antibacteriana). En los microorganismos que mostraron zona de inhibición se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) [17], disolviendo los extractos en DMSO a concentraciones de 500, 250, 125 y 62,5 mg/mL. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada mediante el método de cuantificación del poder captador del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) descrito por Díaz *et al.* [18] calculando el porcentaje de inhibición del DPPH (% I_{DPPH}) por medio de la siguiente ecuación:

$$\% I_{DPPH} = (A_{DPPH} - A_M / A_{DPPH}) \times 100$$

En la que A_{DPPH} es la absorbancia del DPPH y A_M es la absorbancia de la muestra.

La cuantificación de % I_{DPPH} se realizó preparando una solución del radical DPPH 0,06 mM (23,64 mg/L) y una solución de ácido ascórbico 1 mM (176 μ g/mL como patrón de referencia). Ambas soluciones se almacenaron en frascos color ámbar para protegerlos de la luz. Para el ensayo, se colocó una alícuota de 0,2 mL de los extractos de metanol y el compuesto 1 (1000 μ g/mL) a analizar en tubos de ensayo por separado y se

adicionaron 2,8 mL de solución de DPPH a cada uno, se dejó en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente y en completa ausencia de luz. Se realizaron las lecturas de las absorbancias en un espectrofotómetro UV-visible (Spectronic GENESYS™ 10 Bio) a 517 nm. Una solución de 2,8 mL de DPPH y 0,2 mL de etanol fue usada como blanco. El ácido ascórbico se trató de igual manera que la muestra en estudio.

La determinación de la concentración efectiva media (CE_{50}), se llevó a cabo en las muestras que obtuvieron un porcentaje de inhibición mayor al 50 %. La CE_{50} indica la mínima concentración necesaria de un antioxidante para reducir en un 50 % la cantidad de radicales libres presentes en el medio. Para ello se prepararon diluciones de las muestras en concentraciones en el rango de 500 - 5 $\mu\text{g/mL}$, calculándose la CE_{50} por regresión lineal. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

La media y la desviación estándar de los extractos ensayados se calcularon por triplicado utilizando Microsoft Excel. Para evaluar su importancia, todos los resultados se sometieron a una prueba de Tukey ($p < 0,05$) para análisis unidireccional (ANOVA) [19].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tamizaje fitoquímico de los extractos de *Hinterhubera imbricata* (Tabla 1) se realizó mediante pruebas químicas cualitativas específicas, los extractos obtenidos se colocaron en contacto con diversos reactivos y se observaron las reacciones de coloración o precipitación que determinaron la presencia de ciertos metabolitos secundarios. Los análisis de los extractos de hexano y diclorometano de las hojas-tallos y flores presentaron una coloración roja y verde en la prueba de Liebermann-Burchard, indicando la presencia de triterpenos y esteroides, de igual modo, en el extracto de metanol las hojas-tallos y flores evidenciaron la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas y esteroides, siendo similar la composición química de las partes aéreas analizadas de *H. imbricata*. Estos resultados corresponden con los reportados por Bohlmann *et al.* [12] en el estudio del extracto etéreo de *H. imbricata* en el cual se aislaron diterpenos y triterpenos, sin embargo, en esta investigación se analizaron extractos más polares de hojas-tallos y flores evidenciándose la presencia de otros metabolitos secundarios como flavonoides y cumarinas.

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de los extractos de *Hinterhubera imbricata*

Metabolitos	Pruebas	Extractos Hojas-Tallos			Extractos flores		
		EHHT	EDHT	EMHT	EHF	EDF	EMF
Alcaloides	Reacciones Dragendorff Mayer Wagner	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	Reacción Shinoda	-	-	+	-	-	+
Compuestos Fenólicos	Reacción FeCl ₃ (1%)	-	-	+	-	-	+
Saponinas	Reacción Espuma	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	Reacción Hidróxido de amonio	-	-	Fluorescencias azul	-	-	Fluorescencias azul
Triterpenos y Esteroles	Reacción de Liebermann-Burchard	Esteroles +	Triterpenos Esteroles +	Esteroles +	Esteroles +	Triterpenos Esteroles +	Esteroles +
Taninos	Prueba de gelatina	-	-	-	-	-	-

Legenda: EHHT: Extracto de Hexano de Hojas-Tallos. EDHT: Extracto de Diclorometano Hojas-Tallos. EMHT: Extracto de Metanol Hojas-Tallos. EHF: Extracto de Hexano Flores. EDF: Extracto de Diclorometano Flores. EMF: Extracto de Metanol Flores.

Por otra parte, luego de sucesivas cromatografías realizadas en los diferentes extractos de *H. imbricata* se logró el aislamiento y caracterización de cuatro compuestos que fueron identificados como 7-hidroxi-6-metoxicumarina (1), friedelona (2), friedelan-3-ol (3) y ácido ursólico (4) (Figura 1), a continuación, se presentan sus características físicas y espectroscópicas:

7-hidroxi-6-metoxicumarina (1): Sólido cristalino; C₁₀H₈O₄; p.f. 202-204 °C; EM *m/z*: 192 (M⁺, 98,8), 177 (65,5), 164 (31,1), 149 (50); IR (KBr) ν_{máx.} cm⁻¹: 3342 (OH), 3002 (-C-H sp), 1709 (C=O), 1607 (C=C), 1200 (C-O); RMN ¹H (MeOD, 300 MHz) δ: 3,90 (3H, s, H-1'), 6,19 (1H, d, J= 10 Hz, H-3), 6,76 (1H, s, H-8), 7,10 (1H, s, H-5), 7,84 (1H, d, J=10 Hz, H-4); RMN ¹³C (MeOD, 100 MHz) δ: 164,06 (C-2), 153,99 (C-7), 151,40 (C-8a), 147,07 (C-6), 146,11 (C-4), 112,57 (C-4a), 112,51 (C-3), 109,87 (C-5), 103,94 (C-8), 56,78 (C-1').

Friedelona (2): Sólido oleoso amarillo; C₃₀H₅₀O; p.f. 251-253 °C; EM *m/z*: 426,4 (M⁺, 41,1); 411 (11,7); 341 (64,7); 273 (61,7); 207 (55,8); IR (KBr) ν_{máx.} cm⁻¹: 2918

(C-H sp^3), 1712 (C=O), 757 (C-H); RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ : 2,20 (1H, m, H-4), 1,26-2,40 (25H, m, H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22), 1,23 (3H, s, H-28), 1,14 (3H, s, H-27), 1,00 (3H, s, H-26), 0,98 (3H, s, H-29), 0,93 (3H, s, H-30), 0,89 (3H, s, H-25), 0,84 (3H, d, $J=7$ Hz, H-23), 0,64 (3H, s, H-24); RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz) δ : 213,3 (C-3), 59,43 (C-10), 58,19 (C-4), 53,06 (C-8), 42,74 (C-18), 42,13 (C-5), 41,50 (C-2), 41,25 (C-6), 39,66 (C-13), 39,22 (C-22), 38,26 (C-14), 37,40 (C-9), 35,97 (C-16), 35,31 (C-19), 35,58 (C-11), 35,00 (C-30), 32,73 (C-21), 32,38 (C-15), 32,06 (C-28), 31,76 (C-29), 30,48 (C-12), 29,96 (C-17), 28,14 (C-20), 22,26 (C-1), 20,24 (C-26), 18,65 (C-27), 18,20 (C-7), 17,92 (C-25), 14,63 (C-24), 6,80 (C-23).

Friedelan-3-ol (3): Sólido blanco-amarillento; $C_{30}H_{52}O$; p.f. 209-211 °C; EM m/z : 428,3 (M^+ , 14,48); 413,4 (27,86); 399 (9,65); 281 (39,62); 207 (100); IR (KBr) ν_{max} . cm^{-1} : 3471(OH), 2983 (C-H sp^3), 1108 (C-O); RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ : 3,72 (1H, m, H-3), 1,97 (2H, t, H-11), 1,72 (1H, H-18), 1,55 (2H, t, H-1), 1,53 (2H, t, H-16), 1,57 (1H, d, H-4), 1,44 (2H, m, H-2), 1,42 (2H, t, H-12), 1,38 (2H, m, H-7), 1,26 (1H, t, H-8), 1,24 (1H, s, H-29), 1,16 (1H, s, H-30), 1,00 (1H, s, H-28), 0,95 (1H, s, H-27), 0,92 (1H, s, H-25), 0,94 (1H, s, H-26), 0,85 (1H, s, H-24), 0,85 (2H, t, H-22), 0,84 (3H, d, H-23); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 72,74 (C-3), 61,30 (C-10), 53,16 (C-8), 49,13 (C-4), 42,77 (C-18), 41,68 (C-6), 39,64 (C-14), 39,25 (C-22), 38,33 (C-13), 37,79 (C-5), 37,06 (C-9), 36,04 (C-2), 35,52 (C-16), 35,30 (C-11), 35,13 (C-19), 35,01 (C-29), 32,77 (C-21), 32,29 (C-15), 32,06 (C-28), 31,77 (C-30), 30,61 (C-12), 29,99 (C-17), 28,15 (C-20), 20,10 (C-26), 18,63 (C-27), 18,22 (C-25), 17,52 (C-7), 16,37 (C-24), 15,76 (C-1), 11,61 (C-23).

Ácido ursólico (4): Sólido blanco cristalino; $C_{31}H_{50}O_3$ (Metil ursolato); p.f. 209-211 °C; EM m/z : 470, 411, 262, 203, 133; IR (KBr) ν_{max} . cm^{-1} : 2918 (C-H sp^3) 1712 (C=O) 1650 (C=C); RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ : 5,14 (1H, t, H-12), 2,99 (1H, t, H-3), 2,65 (1H, d H-18), 1,84 (2H, m, H-11), 1,56 (2H, m, H-22), 1,52 (1H, t, H-20), 1,47 (2H, m, H-2), 1,45 (1H, t, H-9), 1,38 (2H, m, H-21), 1,02 (3H, s, H-27), 0,91 (2H, m, H-1), 0,90 (1H, t, H-19), 0,90 (3H, s, H-23), 0,88 (3H, s, H-26), 0,84 (3H, s, H-25), 0,64 (3H, s, H-24); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 206,0 (C-28), 39,8 (C-1), 27,67 (C-2), 78,55 (C-3), 39,13 (C-4), 55,18 (C-5), 18,29 (C-6), 33,08 (C-7), 41,67 (C-8), 47,55 (C-9), 36,97 (C-10), 35,58 (C-11), 121,9 (C-12), 144,0 (C-13), 42,3 (C-14), 29,58 (C-15), 35,97 (C-16), 29,96 (C-17), 42,74 (C-18), 35,31 (C-19), 28,14 (C-20), 32,67 (C-21), 39,22 (C-22), 28,11 (C-23), 17,02 (C-24), 15,27 (C-25), 27,11 (C-26), 25,84 (C-27), 31,76 (C-29), 28,11 (C-30).

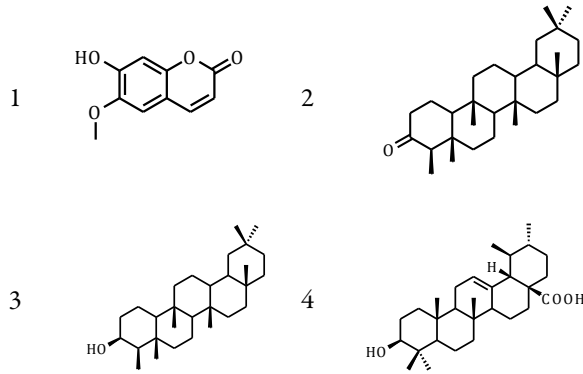


Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados de los extractos de *Hinterhubera imbricata*.

Con respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana (Tabla 2 y 3), todos los extractos de *H. imbricata* presentaron actividad contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* en una concentración de 1000 µg/mL, siendo más activos los extractos de metanol con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 250 y 125 µg/mL, frente ambas bacterias. En tal sentido, para los metabolitos secundarios determinados en estos extractos (triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos, cumarinas y flavonoides) se han descrito diversas actividades biológicas (antifúngica, antibacteriana y citotóxica) [20]. Siendo los compuestos fenólicos a los que se le atribuye el mecanismo de acción antibacteriano, al parecer está relacionado a la formación de complejos con las proteínas solubles y extracelulares de las células de la pared bacteriana, posiblemente mediante reacción con los grupos sulfhidrilos o por interacciones no específicas con las proteínas bacterianas [21]; por lo cual, se estima que *H. imbricata* representa una fuente de compuestos biológicamente activos. Este es el primer reporte sobre actividad antibacteriana del género *Hinterhubera*.

Tabla 2. Actividad antibacteriana de los extractos de *Hinterhubera imbricata*

Cepas Bacterias ATCC		Halos de Inhibición (mm)				
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Extractos Hojas-Tallos 1000 µg/mL	EHHT	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0
	EDHT	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0
	EMHT	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0

(Continúa)

		Halos de Inhibición (mm)				
Cepas Bacterias ATCC		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Extractos	EHF	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0
Flores	EDF	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0
1000 µg/mL	EMF	8,0	0,0	0,0	8,0	0,0
Antibióticos de referencia	PIP	-	-	24,0	27,0	26,0
	AMP	-	32,0	-	-	-
	ERI	33,0	-	-	-	-

Leyenda: **EHHT:** Extracto de Hexano de Hojas-Tallos. **EDHT:** Extracto de Diclorometano Hojas-Tallos. **EMHT:** Extracto de Metanol Hojas-Tallos. **EHF:** Extracto de Hexano Flores. **EDF:** Extracto de Diclorometano Flores. **EMF:** Extracto de Metanol Flores. **PIP:** Piperacilina * (100 µg). **AMP:** Ampicilina * (10 µg). **ERI:** Eritromicina * (15 µg). Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado de los halos de inhibición (mm) ± Desviación Estándar (DE) de los extractos ensayados.

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima de los extractos de *Hinterhubera imbricata*

Microorganismos	CIM (µg/mL)					
	Extractos Hojas-Tallos			Extractos Flores		
	EHHT	EDHT	EMHT	EHF	EDF	EMF
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	500	500	250	500	500	125
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	500	500	250	500	500	125

Leyenda: **EHHT:** Extracto de Hexano de Hojas-Tallos. **EDHT:** Extracto de Diclorometano Hojas-Tallos. **EMHT:** Extracto de Metanol Hojas-Tallos. **EHF:** Extracto de Hexano Flores. **EDF:** Extracto de Diclorometano Flores. **EMF:** Extracto de Metanol Flores. **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima. **NA:** No Activo. Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado de cada concentración (mg/mL) ± Desviación Estándar (DE) de los extractos ensayados.

Con respecto al análisis de la actividad antioxidante se empleó el método del radical libre DPPH•, siendo una manera efectiva de evaluar los extractos y compuestos naturales debido a su fuerte capacidad donadora de hidrógeno. La capacidad antioxidante de los extractos de metanol (hojas-tallos y flores) y el compuesto 1 (7-hidroxi-6-metoxicumarina) se determinó a una concentración de 1000 µg/mL. Los porcentajes de inhibición (% I_{DPPH} ± DE) fueron de 92,50 ± 0,13 % para extracto de metanol de hojas-tallos; 93,05 ± 0,20% para el extracto de metanol de flores y 71,59 ± 0,25 % para el compuesto 1 (Tabla 4). Con el fin de encontrar la concentración efectiva 50 (CE₅₀), se prepararon diluciones de las muestras a concentraciones entre 500 a 5 µg/mL, calculándose la CE₅₀ por regresión lineal. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 4. Resultados obtenidos de la actividad antioxidante *in vitro* por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) de *Hinterhubera imbricata*.

Muestras analizadas	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% $I_{\text{DPPH}} \pm \text{DE}$	$\text{CE}_{50} \pm \text{DE}$ ($\mu\text{g/mL}$)
EMHT	1000	$92,50 \pm 0,13$	$12,9 \pm 0,02$
EMF		$93,05 \pm 0,20$	$8,3 \pm 0,01$
Compuesto 1		$71,59 \pm 0,25$	$494,3 \pm 0,09$
Patrón:	Ácido Ascórbico	$96,51 \pm 0,01$	

Leyenda: EMHT: Extracto de Metanol Hojas-Tallos. EMF: Extracto de Metanol Flores. **Compuesto 1:** 7-hidroxi-6-metoxicumarina. Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado del Porcentaje de Inhibición (% I_{DPPH}) \pm Desviación Estándar (DE) de las muestras ensayadas.

Los resultados obtenidos reflejan que los extractos de metanol de las hojas-tallos ($\text{CE}_{50} = 12,9 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) y flores ($\text{CE}_{50} = 8,3 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) poseen mayor actividad antioxidante que la 7-hidroxi-6-metoxicumarina (compuesto 1, $\text{CE}_{50} = 494,3 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$). Según el tamizaje fitoquímico, la composición química de ambos extractos es semejante (compuesto 1, flavonoides, triterpenos y esteroides), por lo cual se presume que hay un sinergismo entre la cumarina aislada y los otros metabolitos presentes en los extractos aumentando la actividad de los mismos. En este sentido, estudios previos reportan la actividad antioxidante de las cumarinas [22, 23] y sus derivados hemisintéticos [24, 25] determinando que la actividad captadora de radicales libres depende del número y localización de los grupos hidroxilo en la estructura del derivado fenólico, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la quinona resultante que soporta un electrón desapareado [26-28], la 7-hidroxi-6-metoxicumarina (1), posee un solo grupo hidroxilo, a lo cual puede atribuirse que la actividad es más baja en comparación a los extractos de metanol ensayados.

CONCLUSIONES

La composición química de los extractos obtenidos de las hojas-tallos y flores de *Hinterhubera imbricata* es similar, se logró el aislamiento de cuatro compuestos que fueron identificados como 7-hidroxi-6-metoxicumarina, friedelona, friedelan-3-ol y ácido ursólico, siendo la primera vez que se reportan para el género *Hinterhubera*. Los extractos presentaron actividad antibacteriana y antioxidante a bajas concentraciones lo que cataloga esta planta como punto de partida para la búsqueda y caracterización de nuevos compuestos con actividad biológica.

AGRADECIMIENTOS

Todos los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA). Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” y al Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes por su apoyo. Al Dr. Juan Manuel Amaro Luis por su apoyo y colaboración en la recolección de la especie en estudio. A la Université de Bordeaux, Institut des Sciences Moléculaires (CNRSUMR 5255) y el Institut Européen de Chimie et Biologie, por la colaboración prestada para obtener los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) uni y bi dimensionales.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. J. Cuatrecasas, Prima Flora Colombiana. 3. *Compositae-Astereae, Webbia: Journal of Plant Taxonomy and Geography*, **24**(1), 1-335 (1969). Doi: <https://doi.org/10.1080/00837792.1969.10669907>
2. G.L. Nesom, *Aztecaster* (Asteraceae: Astereae). A new ditypic genus of dioecious shrubs from Mexico with redefinitions of the subtribes Hinterhuberinae and Baccharidinae, *Phytologia*, **75**(1), 45-54 (1993). URL: <https://www.biodiversitylibrary.org/partpdf/96825>
3. V. Karaman, *Phylogeny of Hinterhubera, Novenia and related genera based on the nuclear ribosomal (nr) DNA sequence data (Asteraceae: Astereae)*, Ph. D. thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, Louisiana, USA, 2006. 202 p. URL: https://repository.lsu.edu/gradschool_dissertations/2200/
4. A.A. Anderberg, B.G. Baldwin, R.G. Bayer, J. Breitwieser, C. Jeffrey, M.O. Dillon, P. Eldenäs, V. Funk, N. García-Jacas, P.O. Hind Karis, *et al.*, Compositae, en: J.W. Kadereit, C. Jeffrey (editores), *Flowering Plants · Eudicots: Asterales*, Springer - Verlag, Berlin Heidelberg, 2007, Vol. VIII, pp. 61-588. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-31051-8_7

5. V. Badillo, S. Díaz-Piedrahita, C. E. Benítez, Asteraceae, en: O. Hokche, P.E. Berry, Otto Huber (editores), *Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela*, Fundación Instituto Botánico de Venezuela “Dr. Tobías Lasser”, Caracas, Venezuela, 2008, Vol. 28, pp. 1-44.
6. I.C. Zampini, S. Cuello, M.R. Alberto, R.M. Ordoñez, R. D’Almeida, E. Solorzano, M.I. Isla, Antimicrobial activity of selected plant species from “the Argentine Puna” against sensitive and multi-resistant bacteria, *Journal of Ethnopharmacology*, **124**(3), 499-505 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.011>
7. R.E. D’Almeida, M.R. Alberto, C. Quispe, G. Schmeda-Hirschmann, M.I. Isla, Antimicrobial phenylpropanoids from the Argentinean highland plant *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera, *Journal of Ethnopharmacology*, **142**(2), 407-414 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.010>
8. C. Echiburu-Chau, L. Pastén, C. Parra, J. Bórquez, A. Mocan, M.J. Simirgiotis, High resolution UHPLC-MS characterization and isolation of main compounds from the antioxidant medicinal plant *Parastrephia lucida* (Meyen), *Saudi Pharmaceutical Journal*, **25**(7), 1032-1039 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.03.001>
9. L.S. Di Ciaccio, V.G. Spotorno, M.M. Córdoba-Estévez, D.J.L. Ríos, R.H. Fortunato, A.E. Salvat, Antifungal activity of *Parastrephia quadrangularis* (Meyen) Cabrera extracts against *Fusarium verticillioides*, *Letters in Applied Microbiology*, **66**(3), 244-251 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12844>
10. F. Cifuentes, J.R. Palacios, C.R. Nwokocha, J. Bórquez, M.J. Simirgiotis, I. Norambuena, M. Chiong, A. Paredes, Polyphenolic composition and hypotensive effects of *Parastrephia quadrangularis* (Meyen) Cabrera in rat, *Antioxidants* (Basel), **8**(12), 591 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3390/antiox8120591>
11. S.M. Alcalde Bahamonde, M.L. Flores, A.V. Uhrich, M.D. Escobar Daza, O.L. Córdoba, *Chiliotrichum diffusum* (G. Forst.) Kuntze, en: A. Máthé, A. Bandoni (editores), *Medicinal and Aromatic Plants of South America Vol. 2: Argentina, Chile and Uruguay*, Springer, 2021, Vol 7, p. 1-60.
12. F. Bohlmann, M. Grenz, H. Schwarz, Naturally occurring terpene derivatives. XXV. New diterpenes from *Hinterhubera imbricata* [Natürlich vorkommende Terpendervative, XXV. Neue Diterpene aus *Hinterhubera imbricata* Cuatr.], *Chemische Berichte*, **106**(8), 2479-2484 (1973). Doi: <https://doi.org/10.1002/cber.19731060808>

13. D. Marcano, M. Hasegawa, *Fitoquímica Orgánica*, 2ª ed., Editorial Torino, Caracas, Venezuela, 2002, 588 p.
14. W. Hartman, L. Roll, α -Methyl- α -phenylhydrazine, Organic syntheses, Collective Vol II, John Wiley & Sons, New York, 1957, p. 418. URL: <https://www.orgsyn.org/Content/pdfs/procedures/cv2p0418.pdf>
15. F. Arndt, Diazomethane, Organic syntheses, Collective Vol II, John Wiley & Sons, New York, 1957, p. 165. URL: <https://orgsyn.org/Content/pdfs/procedures/cv2p0165.pdf>
16. CLSI supplement M100, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA), USA, 2018, pp. 1-15. URL: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
17. D.W. Tholen, A. Kallner, J.W. Kennedy, J.S. Krouwer, K. Meier, *Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods, Approved guideline—Second Edition*, Volume 24, Number 25, CLSI document EP05-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA), 2004. URL: https://webstore.ansi.org/preview-pages/CLSI/preview_EP05-A2.pdf
18. L. Díaz, S. De Montijo, A.L. Medina, P. Meléndez, V. Laurence, G. Marti-Mestres, Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast, *Revista Peruana de Biología*, **18**(2), 153-158 (2011). URL: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v18n2/a04v18n2.pdf>
19. V. Bewick, L. Cheek, J. Ball, Statistics review 9: one-way analysis of variance, *Critical Care*, **8**, 130 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1186/cc2836>
20. L. Hernández-Vásquez, J. Palazon, A. Navarro-Ocaña, The pentacyclic triterpenes α,β -amyrins: A review of sources and biological activities, en: V. Rao (editor), *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, InTechOpen, Rijeka, Croatia, 2012, pp. 487-502. URL: <https://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/176113/1/267422.pdf>
21. D. Domingo, M. López-Brea, Plantas con acción antimicrobiana, *Revista Española de Quimioterapia*, **16**(4), 385-393 (2003). URL: <https://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>

22. K.C. Fylaktakidou, D.J. Hadjipavlou-Litina, K.E. Litinas, D.N. Nicolaidis, Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities, *Current Pharmaceutical Design*, **10**(30), 3813-33 (2004). Doi: <https://doi.org/10.2174/1381612043382710>
23. A. Basile, S. Sorbo, V. Spadaro, M. Bruno Maggio, N. Faraone, S. Rosselli, Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae), *Molecules*, **14**(3), 939-952 (2009). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules14030939>
24. G. Tataringa, C. Stan, C. Mircea, A. Jitareanu, A.M. Zbancioc, Antioxidant evaluation of some coumarin derivatives, *Farmacia*, **64**(4), 533-538 (2016). URL: https://farmaciajournal.com/wp-content/uploads/2016-04-art-09-Tataringa_San_Mircea_533-538.pdf
25. Zabiulla, F.H. Al-Ostoot, Y.H.E. Mohammed, M. Jyothi, S.V. Mamatha, N.F. Khanum, S.A. Khanum, Evaluation of antioxidant activity of coumarin derivatives conjugated with benzophenone, *International Journal of Scientific Progress and Research*, **32**(90), 47-51 (2017). URL: https://www.ijSpr.com/citations/v32n1/IJSPR_3201_1810.pdf
26. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**(7), 933-956 (1996). Doi: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
27. G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radical Biology and Medicine*, **22**(5), 749-760 (1997). Doi: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00351-6)
28. A.S. Pannala, T.S. Chan, P. O'brien, C. Rice-Evans, Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **282**(5), 1161-1168 (2001). Doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4705>

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Y. Obregón-Díaz, L. Rojas-Fermín, A. Pérez-Colmenares, Y. Cordero, R. Aparicio, W. De Lima, J. Hernández, A. Usubillaga, Estudio fitoquímico y actividad biológica de *Hinterhubera imbricata* Cuatrec. & Aristeg, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(2), 471-487 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n2.114452>