

## ESTUDIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y CORTEZA DE *Virola calophylla* (Myristicaceae)

Constanza Ruge O. \*, Luis E. Cuca S. \*, Juan C. Martínez V. \*

\* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. A.A. 14490 Santafé de Bogotá, Colombia.  
E-mail Luisec @ ciencias.ciencias.unal.edu.co

### RESUMEN

Del extracto etanólico de las hojas de *Virola calophylla* se aislaron los compuestos denominados: Hidroxiotobaina, Otobaeno, Sitosterol, Dihidro-chalcona (2',4'-dihidroxi-4, 6'-dimetoxidihidrochalcona), Vainillina. Del extracto etanólico de corteza de *Virola calophylla* se aislaron dos compuestos: Safrol y Metilparabeno sustancias aisladas por primera vez en la familia Myristicaceae. Las estructuras fueron determinadas por métodos espectroscópicos y por comparación con datos de la literatura. A los extractos etanólicos de las hojas y corteza de *Virola calophylla* se les realizó un estudio preliminar de actividad antimicrobiana.

**Palabras Clave:** *Virola calophylla* - Myristicaceae - Lignanos

### SUMMARY

#### CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL STUDY OF THE ETHANOLIC EXTRACTS OF LEAVES AND BARK OF *Virola calophylla* (Myristicaceae)

From the ethanolic extract of the leaves of *Virola calophylla* were isolated the compounds designated: Hydroxyotobain, Otobaene, Sitosterol, Dihydro-chalcone (2',4'-dihydroxy-4, 6'-dimetoxydihydro-chalcone) and Vanillin. From the ethanolic extract of the bark of *Virola calophylla* were isolated two compounds: Safrole and Methylparaben isolated substances for the first time in the family Myristicaceae. The structures were determined by spectroscopic methods and by comparison with literature data. To the ethanolic extracts of leaves and bark of *Virola calophylla* a preliminary study of the antimicrobial activity was realized.

**Key Words:** *Virola calophylla* - Myristicaceae - Lignans.

### INTRODUCCIÓN

La familia Myristicaceae es de gran interés fitoquímico, las especies del género *Virola* contienen alcaloides tipo triptamina y carbolina responsables de la actividad alucinógena. Los indios del Amazonas elaboran un preparado alucinogénico, conocido como yakeé, de la resina de *Virola calophylla*, *Virola callophylloidea* ó *Virola peruviana*, para producir efectos alucinógenos o como narcótico (1).

Existen diversos reportes sobre usos de las especies de la familia Myristicaceae, siendo los más importantes: su aplicabilidad en farmacología (probada tanto científicamente, como en medicina popular); los usos microbiológicos y finalmente la utilidad industrial.

Otra propiedad encontrada en algunas especies corresponde a su actividad fungistática ó fungicida, la cual ha sido atribuida a la presencia de neolignanos, diferentes estudios han demostrado que sus extractos presentan actividad antimicrobiana, citotóxica y antibacteriana (2).

En el presente trabajo se describen 7 compuestos aislados de una especie de *Virola calophylla*: Hidroxiotobaina, Otobaeno, Sitosterol, Vainillina, Dihidrochalcona, Safrol y Metilparabeno. Los dos últimos aislados por primera vez en el género *Virola* de la familia Myristicaceae.

A los extractos etanólicos de hojas y corteza de *Virola calophylla* se les realizó un ensayo preliminar de actividad antimicrobiana empleando el método de perforación y difusión en gel. (3)

Los microorganismos empleados fueron : dos hongos *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*, cuatro bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y dos levaduras *Candida albicans* y *Sccharomyces cereviceae*.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Material vegetal utilizado

La muestra determinada como *Virola calophylla* (Warb) (hoja y corteza) fue recolectada en Amazonas en

Recibido para evaluación: 5 de mayo de 1997

Aprobado para publicación 2 de junio de 1997

abril de 1994 (parque Nacional Amacayacu), por el guía J. Miraña, el Doctor Luis Enrique Cuca S. profesor del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y el estudiante de posgrado L. M. Sosa V. del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. La determinación taxonómica fue realizada por el Doctor Roberto Jaramillo Mejía biólogo del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia. Una muestra de herbario se encuentra bajo el N°-COL 366259.

### *Extracción y aislamiento de los constituyente*

Las hojas secas y molidas (1700 g) se extrajo por percolación en frío con EtOH obteniéndose (220 g) de extracto seco. Parte de este extracto (150 g) fue sometido a extracción con Soxhlet con solventes de polaridad creciente eter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo obteniéndose los respectivos extractos: MH-E (11.64 g), MH-C (21.90 g), MH-Ac (2.58 g); los extractos MH-E y MH-C fueron fraccionados y purificados utilizando cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) con silica gel de columna y silica gel de placa delgada, respectivamente. El extracto eter de petróleo de hoja se fracciona por cromatografía en columna (CC) eluyendo con tolueno:AcOEt de polaridad creciente (9:1 hasta 7:3). De la fracción MH-E-12 (535 mg) se aisló un sólido en forma de agujas, las cuales se purificaron por medio de una cristalización con metanol obteniéndose el compuesto 1. La fracción MH-E-19 (1768 mg) se purificó en CC y CCDP obteniéndose los compuestos 2 (57 mg) y el compuesto 3 (8 mg).

El extracto clorofórmico de las hojas se purificó en CC eluyendo con solvente de polaridad creciente empezando con tolueno y finalizando con tolueno:AcOEt (7:3) recogiendo 19 fracciones. La fracción MH-C-11 se purificó por CC y CCDP eluyendo con Benceno:AcOEt (8:2) donde se obtuvieron los compuestos 4 (26 mg) y 5 (8 mg).

La corteza seca y molida (1350 g) se extrajo por maceración en frío con EtOH, obteniéndose (128 g) de extracto seco; se tomaron (100 g) de extracto seco y se sometió a proceso de extracción por Soxhlet con solventes de polaridad creciente EdeP, CHCl<sub>3</sub> y AcOEt obteniéndose los respectivos extractos: MC-E (1.79 g), MC-C (4.46 g) y MC-Ac (9.61 g). El extracto eter de petróleo de corteza se purificó en CC con silica gel y se obtuvo el compuesto 6 (29 mg). De la fracción MC-E-11 se aisló un sólido blanco el cual se purificó por medio

de una cristalización con metanol obteniéndose el compuesto 7 (61 mg).

El ensayo de actividad antimicrobiana fue empleado el método de perforación y difusión en gel, el cual permite hallar la concentración crítica, que es la representación teórica bajo la cual no se forma zona de inhibición. Esto representa una medida de la susceptibilidad de un organismo prueba (4). Las concentraciones empleadas fueron 12000, 6000, 3000, 1500 mcg/mL.

Sitosterol 1 agujas blancas, pf 135°C-136°C. IR  $\gamma^{KBr}$   $cm^{-1}$ : 3031, 2938, 2931, 2903, 2890, 2855. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, p.p.m.)  $\delta$  0.68(s, CH<sub>3</sub>-18), 0.82(t, J=6.6 Hz, CH<sub>3</sub>-28), 1.00(s, CH<sub>3</sub>-19), 3.38(m, H-3), 5.94(m, H-6), 6.60(m, H-7). RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, p.p.m.), 37.21 (C-1), 31.60 (C-2), 72.00 (C-3), 42.24 (C-4), 140.70 (C-5), 12.00 (C-6), 31.80 (C-7), 33.00 (C-8), 50.00 (C-9), 36.08 (C-10), 21.04 (C-11), 28.27 (C-12), 42.24 (C-13), 56.70 (C-14), 24.27 (C-15), 39.70 (C-16), 56.00 (C-17), 11.90 (C-18), 19.80 (C-19), 33.85 (C-20), 18.90 (C-21), 36.46 (C-22), 24.24 (C-23), 39.70 (C-24), 29.04 (C-25), 23.04 (C-26), 22.98 (C-27), 31.66 (C-28), 11.95 (C-29).

Hidroxiobaina (3,4,3'.4'-dimetilenodioxi-7'-hidroxi-2,7', 8,8'-lignano), 2 sólido. IR  $\gamma^{KBr}$   $cm^{-1}$ : 3551, 2953, 2919, 2891, 2830, 1607, 1503, 1486, 1454. RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, p.p.m.)  $\delta$  0.89(d, J=6.8 Hz, 3H), 1.04(d, J=6.5 Hz, 3H), 1.58(m, 1H), 1.86(m, 1H), 2.29(s, 1H), 2.54(dd, J=12.1 Hz, 1H), 2.79(dd, J=3.6 Hz, 1H), 5.56(s, 1H), 5.72(s, 1H), 5.92(s, 2H), 6.61(d, J=7.9 Hz, 1H), 6.71(m, 1H), 6.81(m, 2H).

Otobaeno (3,4, 3'.4'-dimetilenodioxi- $\Delta^{7'8'}$ .2,7', 8,8'-lignano), 3 sólido. IR  $\gamma^{KBr}$   $cm^{-1}$ : 2950, 2919, 2897, 2860, 1502, 1483, 1464, 1438, 809. RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, p.p.m.)  $\delta$  0.99(d, J=7 Hz, 3H), 1.25(s, 2H), 1.58(s, 1H), 1.77(s, 3H), 2.35(m, 1H), 2.50(dd, J=15, 4 Hz, 1H), 3.00(dd, J=15, 4 Hz, 1H), 5.54(s, 1H), 5.61(s, 1H), 5.97(s, 2H), 6.60(m, 3H), 6.78(d, J=7.8 Hz, 1H).

Vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) 4 sólido blanco, pf 82°C. IR  $\gamma^{KBr}$   $cm^{-1}$ : 3176, 3197, 2854, 1666, 1589, 1510, 1465, 859, 813. RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, p.p.m.)  $\delta$  3.96(s, 3H), 6.45(s, 1H), 7.04(d, J=8.5 Hz, 1H), 7.43(d, J=8.5 Hz, 2H), 9.82(s, 1H). RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, p.p.m.) 56.1, 108.7, 114.4, 127.6, 129.7, 147.1, 151.7, 191.0.

Dihidrochalcona (2',4'-dihidroxi-4,6'-dimetoxidihidrochalcona). 5 IR  $\gamma^{KBr}$   $cm^{-1}$ : 3333, 1647, 1637, 1626,

1610, 815. RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, p.p.m.)  $\delta$  2.93(2H, t, J=7.6 Hz, H- $\beta$ ), 3.28(2H, t, J=7.6 Hz, H- $\alpha$ ), 3.79(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.84(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 5.71(1H, s, -OH<sub>ar</sub>), 5.91(1H, d, J=1.7 Hz, H-5'), 5.99(1H, d, J=1.7 Hz, H-3'), 6.85(2H, d, J=8.3 Hz, H-2,6), 7.16(2H, d, J=8.3 Hz, H-3,5), 13.9(1H, s, OH<sub>punteo</sub>). EM-I.E (70 eV) m/z (%): 302 [M]<sup>+</sup> (40), 167 (100), 134 (98), 121 (55).

Safrol (4 alil-1,2-metilenodioxibenceno) **6**, aceite. IR  $\gamma$  película cm<sup>-1</sup>: 3077, 2976, 2857, 1638, 1489, 807. RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, ppm)  $\delta$  5.05(m, 2H), 5.92(m, 2H), 6.62(d, J=7.8 Hz, 1H), 6.66(s, 1H), 6.72(d, J=7.8 Hz, 1H). RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, p.p.m) (Tabla 1).

Metilparabeno (p-hidroxibenzoato de metilo) **7**, sólido, pf 125°C. IR  $\gamma$  KBr cm<sup>-1</sup>: 3629, 3034, 1682, 1607, 1457, 1233, 850. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, ppm)  $\delta$  3.9(s, 3H), 6.88(d, J=8.8 Hz, 2H), 7.27(s, 1H), 7.97(d, J=8.8 Hz, 2H). RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, p.p.m) 103.3, 115.2, 131.9, 159.9, 167.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del extracto Eter de petróleo de las hojas de *Virola calophylla* fueron aislados e identificados tres compuestos, dos tipo lignano y un esteroide, los cuales fueron identificados al comparar sus datos espectroscópicos con los de muestras auténticas y con los reportados en la literatura, así: Sitosterol **1** (5, 6, 7), Hidroxiotobaina **2** (5, 8, 9), Otobaeno **3** (5, 10, 11). Del extracto clorofórmico de las hojas se aislaron dos compuestos que fueron identificados como: Vainillina **4** (11, 12) y (2',4'-dihidroxi-4, 6'-dimetoxidihidro-chalcona) **5** (13, 14, 15), sus datos espectroscópicos concuerdan con los reportados. Las dihidrochalconas compuestos característicos de *Iryanterias* ahora se reportan en *Virolas*.

El compuesto **6** es un aceite amarillento, su espectro de RMN<sup>1</sup>H presenta señales correspondientes a hidrógenos aromáticos: ( $\delta$  6.62, d, J=7.8 Hz, 1H y  $\delta$  6.72, d, J=7.8 Hz, 1H) en un sistema ortosustituido; y una señal de un protón ( $\delta$  6.66, d, J=1.5 Hz, 1H) todo lo anterior indica la presencia de un anillo aromático trisustituido. Existe una señal ( $\delta$  5.92, m, 2H) característica de un grupo metilenodioxo sustituyente de un anillo aromático. Dos señales, una en ( $\delta$  3.28, m, 3H) en la cual esta presente un sistema vinílico, la otra en ( $\delta$  5.05, m, 2H) corresponde a un grupo metileno (16). En el RMN<sup>13</sup>C (Tabla 1) se observan seis señales (108.1, 109.0, 121.2, 133.8, 145.8, 147.6 ppm) correspondien-

tes a carbonos aromáticos; según espectro DEPT 90 tres señales son de carbonos protonados (CH) (121.2, 109.0, 108.1 ppm). Las tres restantes señales no aparecen en el espectro DEPT 90, lo que indica que estas corresponden a carbonos cuaternarios. Una señal en 100.7 ppm según DEPT 135, corresponde al CH<sub>2</sub> de un grupo metilodioxo. Una señal en 115.6 ppm de un carbono con hibridación sp<sup>2</sup> característica de un CH<sub>2</sub> terminal y otra en 39.9 ppm también con hibridación sp<sup>2</sup> de un carbono protonado CH<sub>2</sub>. Otra señal se encuentra en 137.5 ppm que según el espectro DEPT 90 corresponde a un grupo CH. El análisis anterior conlleva a decir que el compuesto **6** corresponde al 4 alil-1,2-metilenodioxibenceno (Safrol). Este compuesto conocido por su uso como conservador en mucilagos y pastas para encuadernación siendo muy superior al salicilato de metilo para este fin. Se usa a veces junto con otros agentes para aplicación local en enfermedades de la nariz y la garganta (17). Es utilizado como estimulante aromático (18). También es conocido por su potente acción citotóxica.

El compuesto **7** es un sólido blanco de pf 125°C, su espectro de RMN<sup>1</sup>H presenta las señales: ( $\delta$  3.9, s, 3H) característico de un grupo metoxi -OCH<sub>3</sub> sustituyente en un anillo aromático; ( $\delta$  5.93, s ancho, 1H) que por su desplazamiento indica que es un grupo OH sustituyente de un anillo aromático; dos señales en ( $\delta$  6.88, d, J=8.8 Hz, 2H) y  $\delta$  7.97, J=8.8 Hz, 2H) que son característicos de los hidrógenos de un anillo aromático en un sistema paradisustituido. En el espectro de RMN<sup>13</sup>C aparece las siguientes 5 señales (103.24, 115.21, 131.92, 159.92, 167.08 ppm), las cuales según su desplazamiento puede corresponder a carbonos de un compuesto de carácter aromático. La señal que aparece en 131.92 corresponde a dos carbonos aromáticos que tienen los mismos sustituyentes vecinos por lo cual presentan el mismo desplazamiento, la señal en 115.21 presenta la misma situación anterior. Las señales presentes en 159.92 y 167.08 corresponden a carbonos oxigenados, la última característica de un carbono con un grupo ester.

Los datos obtenidos comparados con los calculados indican que el compuesto **7** corresponde al p-hidroxibenzoato de metilo ó Metilparabeno un potente agente antimicrobiano. Este compuesto es empleado como antiséptico y conservador en diversos preparados farmacéuticos (pequeñas concentraciones), también se usa en preparados cosméticos que contienen grasas y aceites vegetales y animales que pueden descomponerse. Es combinado con otros agentes preservantes para hacer mas potente su acción (17).

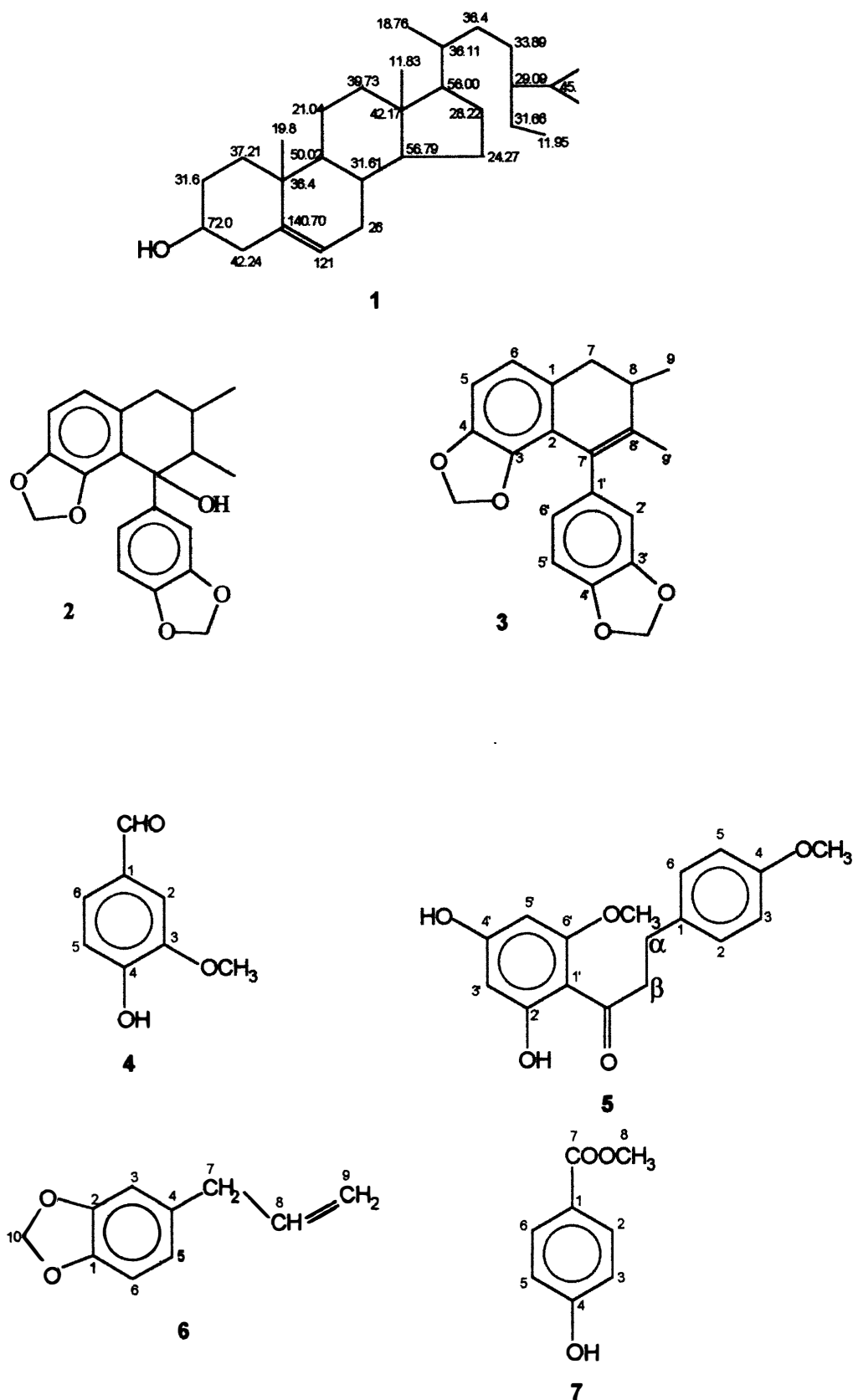


Figura 1. Estructura de los compuestos aislados.

El encontrar este compuesto en esta especie de planta es innovador ya que se obtiene por síntesis orgánica.

A los extractos etanólicos de hojas y corteza de *Virola calophylla* se les realizó un estudio preliminar de actividad antimicrobiana empleando el método de perforación y difusión en gel, obteniéndose como resultado reducción e inhibición de crecimiento de las cepas empleadas en el ensayo, demostrándose así que estos extractos presentan una buena actividad antimicrobiana. Al comparar el resultado del ensayo realizado para bacterias se aprecia que la inhibición es mayor que la que presenta el ensayo realizado para hongos, lo cual hace a los extractos buenos agentes antibacterianos. Comparativamente el extracto etanólico de corteza tiene mayor actividad antimicrobiana que el extracto etanólico de hojas, además la corteza tiene mayor actividad antibacteriana que antifúngica. La presencia de sustancias biológicamente activas como son Metilparabeno y Safrol hacen que la corteza de esta especie sea una fuente promisoría antimicrobiana. Los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos se confirman con los valores de Concentraciones Críticas (CCr) indicando que a un menor valor una mayor actividad antimicrobiana.

**Tabla 1. Asignaciones de RMN<sup>13</sup>C para la sustancia 6 con técnica DEPT 90 y 135.**

C	RMN <sup>13</sup> C	DEPT 90	DEPT 135	
			CH <sub>2</sub>	CH - CH <sub>3</sub>
1	145.800			
2	147.611			
3	109.071	109.071		109.071
4	133.806			
5	121.275	121.276		121.276
6	137.589	137.589		137.589
7	100.780		100.780	
8	108.133	108.133		108.133
9	39.901	39.901	39.901	
10	115.662		115.662	

### Agradecimientos

El presente trabajo fue desarrollado dentro del Proyecto de Investigación "Estudio Químico de los Componentes de Myristicaceas Colombiana", financiado por COLCIENCIAS (Proyecto 1101-05-002-92).

### BIBLIOGRAFÍA

- Agurell, S., Holmstedt, B., Lindgren, J.E. and Schultes, R.E. *Acta chemica scandinavica* **23**, 903-16, (1969).
- Gottlieb, O.R. *Journal of Ethnopharmacology* **1**, 309-23, (1979).
- Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods. Academic Prees Inc. London. (1984) p. 23,86.
- Kavanagh, F. "Analytical microbiology" 2<sup>nd</sup> print. Academic press. New York, (1979) p. 58, 59, 126.
- Cuca, L.E. "Estudios de los extractos bencénicos de las hojas, corteza y madera de *Virola calophyllodea*". Tesis de Magister, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. (1985).
- Alvarez, E., Cuca, L. E. y Martinez, J. C. *Revista Colombiana de Química* **14**, 31-41 (1985).
- Peña, L. y De Diaz A.M.P. *Revista Colombiana de Química* **24** (1), 17 (1995).
- Wallage, R., Porte, A.L., and Hodges, R. *J. Chem. Soc.*, 1445-49 (1963).
- Gilchrist, T., Hodges, R. and Porte., *J. Chem. Soc.* 1780-6 (1962).
- Kohen, F., McLean, J. and Stevenson, R. *J. Chem. Soc. (c)*. 1775-80 (1966).
- Urrutia Bermúdez, I., "Estudio Fitoquímico del fruto de *Osteophloeum sulcatum* (Myristicaceae)". Tesis. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. (1994).
- Silverstein, R.M., "Spectrometric Identification of Organic Compounds". Fifth edition. John Wiley & Sons, Inc. (1991). pg. 265,240,246.
- Garzon, L. "Estudio Químico del fruto de *Iryanthera laevis*". Tesis de grado Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias; Departamento de Química, Bogotá D. E. (1985).
- Martinez V., J. C., Cuca, L.E. *Revista Colombiana de Química*. **18**. Nos 1-2 (1989). pg. 37-46.
- Braz-Filho, R., Gottlieb, O.R. and Silva, M.S., *Phytochemistry* **19**, 1195 (1980).
- Aldrich- RMN<sup>1</sup>H. Tomo IV. 97B. pg 86.
- Remington. "Farmacia". 17<sup>a</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. P 1753, 1584 (1990).
- Gomez, M. J. "Química Orgánica". Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. p 220 (1988).