

UN FLAVANONOL CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Chromolaena tacotana*

ANTONIO SANABRIA-GALINDO*
MARIA TERESA CARRERO*

RESUMEN

Mediante métodos de separación biodirigidos se aisló e identificó (p.f., UV, IR, RMN ¹H y EM) el flavanonol 7-metoxi-aromadendrina como el principal constituyente responsable de la actividad antibacteriana y antifúngica de *Chromolaena tacotana*.

SUMMARY

By means of a bioguided separation the flavanonol 7-metoxiaromadendrin was isolated and identified (m.p., UV, IR, NMR and MS) as the principal antibacterial and antifungal constituent of *Chromolaena tacotana*.

INTRODUCCION

En un estudio preliminar se encontró que el extracto etanólico de *Chromolaena tacotana* (Klatt) King & Robinson (antes *Eupatorium tacotanum* Klatt) presentó actividad antibacteriana (1) y antifúngica (2) significativas, motivo por el cual se emprendió el aislamiento e identificación de las sustancias responsables de dicha actividad.

El género *Chromolaena* no ha sido muy estudiado desde el punto de vista químico y menos por su actividad biológica. De este género se han aislado flavonoides, por ejemplo, flavanononas de *Chromolaena heterociclina* (3) y de *C. odorata* en un estudio se aislaron flavonoles y flavanononas (4) y en otro flavonas y chalconas (5).

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

El material vegetal se colectó en el Km. 38-40 de la carretera Bogotá-Silvania, Departamento de Cundinamarca, municipio de Silvania a una altitud de 1.950 m. Un ejemplar

reposa en COL bajo el número 206024 y se determinó como *Chromolaena tacotana* (Klatt) King & Robinson, tribu Eupatorieae, Asteraceae. Las extracciones se realizaron con la parte aérea de la planta.

Todos los ensayos microbiológicos se llevaron a cabo con cepas bioquímicamente tipificadas obtenidas de ATCC (*Staphylococcus aureus* 6358 P, *Escherichia coli* 10536, *Klebsiella pneumoniae* 10031), de los laboratorios Upjohn Company (*Staphylococcus epidermidis* 794, *Bacillus subtilis* 3440, *Candida albicans* 6308), del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional (*Salmonella typhi*) y del Instituto Nacional de Salud (*Pseudomonas aeruginosa*, *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp. y *Mycobacterium fortuitum*).

Análisis fitoquímico preliminar

Con el propósito de establecer la presencia de algunos metabolitos secundarios habitualmente relacionados con actividades biológicas, se llevó a cabo el análisis fitoquímico preliminar descrito por Sanabria (6), en el cual se realizan pruebas para alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, taninos, esteroides y/o triterpenoides, cumarinas, cardenólidos y lactonas terpénicas.

Ensayos microbiológicos

La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de inoculación en superficie descrito por Mantilla y Sanabria (1) y la actividad antifúngica por el método de perforación y difusión en gel estandarizado por Sanabria y Mantilla (2); este método también se utilizó para bacterias.

Obtención de las sustancias activas

Con el propósito de seleccionar el solvente más adecuado para extraer los principios activos, se prepararon por maceración y agitación mecánica de 10 g. de material vegetal en 120 ml de solvente extractos en etanol del 95%, en cloroformo y en éter de petróleo. Para cada uno de estos extractos se evaluó la actividad antimicrobiana frente a 7 bacterias por el método de inoculación en superficie (1), una levadura y 3 hongos filamentosos por el método de perforación y difusión en gel (2). Se probaron los tres extractos a una concentración de 10 mg/ml, concentrado (c) y a 1 mg/ml, diluido (d).

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14490

Como el extracto clorofórmico presentó la mayor actividad antimicrobiana. 1 Kg del material vegetal se extrajo por maceración y agitación mecánica con 12 litros de cloroformo, se evaporó el solvente a presión reducida y se obtuvieron 101 g. de residuo (EC).

Se repartieron 70 g. de EC en una mezcla de volúmenes iguales de éter de petróleo y metanol al 90%, se evaporó el solvente a presión reducida y se obtuvieron 50 g. de residuo de la fase metanólica y 18 g. de la fase etérea. Ensayos microbiológicos demostraron que en el residuo de la fase metanólica se concentran los principios activos.

Los 50 g. del residuo de la fase metanólica se adsorbieron en 90 g. de sílica gel H tipo 60 y se aplicaron en una columna de 80 mm de diámetro empacada con 500 g. del mismo soporte en cloroformo. Se empezó a eluir la columna con CHCl_3 y se terminó con una mezcla de CHCl_3 -acetona (90:10), incrementando gradualmente la proporción de acetona; se recogieron 60 fracciones de 125 ml y el análisis de estas fracciones por cromatografía en capa fina (CCF) eluyendo con CHCl_3 -acetona (80-20) y revelando con vainillina-ácido o-fosfórico, FeCl_3 -ferricianuro de potasio y subacetato de plomo (7) permitió obtener 14 fracciones. Se determinó la actividad antimicrobiana de estas 14 fracciones frente a *Staphylococcus aureus*, *Mucor* sp. y *Aspergillus niger* y se encontró que en la combinación de las fracciones 35 a 54 se encuentra la mayor actividad antimicrobiana; estas fracciones tienen en común una sustancia mayoritaria a Rf 0,48 y otra a Rf 0,63.

Por medio de una bioautografía en capa delgada utilizando como microorganismo de prueba *Mucor* sp. y siguiendo la metodología estandarizada por Castrillón y Farfán (8) se estableció que la actividad antifúngica se manifiesta fundamentalmente en la sustancia con Rf=0,48.

El residuo de estas fracciones (35-54) se lavó con una mezcla de éter de petróleo- acetona (50:50) y se obtuvo un sólido que pesó 1,5 g.. Se disolvieron 900 mg de dicho sólido en una mezcla de CHCl_3 -acetona-Hexano (80:20:50), se dejó cristalizar, se filtró y se repitió el proceso de cristalización, obteniéndose 428 mg de la sustancia con Rf 0,48 pura, la cual se denominó EC-M. Por CCF preparativa de las aguas madres de la anterior cristalización se obtuvieron 32 mg de la sustancia con Rf=0.63 (EC-N) pura.

Identificación de la sustancia EC-M

Punto de fusión: Se determinó en un fusiómetro Buchi 510 y los resultados están sin corregir.

Espectro UV-Vis: Se registró en un espectrómetro Specord a una concentración de 0,001 % en metanol.

Espectro IR: Se registró al 1 % en tabletas de KBr en un espectrofotómetro Perkin Elmer 410.

Espectro de RMN-¹H: Determinado en un espectrómetro Bruker WM de 250 MHz.

Espectro de masas: Determinado en un espectrómetro MAT 312 empleando un voltaje de ionización de 71 voltios.

Acetilación: A 160 mg de EC-M se adicionaron 1 ml de piridina y 2 ml de anhídrido acético, se dejó a temperatura ambiente con agitación continua por 24 horas; se adicionó hielo y se extrajo con acetato de etilo, se neutralizó con HCl al 5 % y la fase orgánica se lavó con agua hasta fin de ácido, se deshidrató y se cristalizó de hexano-etanol, obteniéndose 152 mg de un sólido blanco denominado EC-M-Ac₁. También se acetilaron 100 mg de EC-M por reflujo durante 4 horas, dando lugar a 48 mg de EC-M-Ac₂.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis fitoquímico preliminar

En el análisis preliminar efectuado se obtuvieron reacciones positivas para flavonoides (cianidina), taninos (gelatina-sal) y esteroides y/o triterpenoides (Liebermann-Burchard).

Obtención de las sustancias con actividad antimicrobiana

En la Parte Experimental se describió como mediante un procedimiento de separación biodirigido, finalmente se obtuvieron 428 mg. de la sustancia EC-M (Rf=0,48) y 32 mg de EC-N (Rf=0,63). En la Tabla 1 se presenta la actividad antimicrobiana expresada como el promedio de 2 determinaciones de los diámetros de inhibición (orificios de 8 mm de diámetro) del extracto etanólico (EE), el extracto clorofórmico (EC), las sustancias EC-M y EC-N, de una mezcla de partes iguales de EC-M y de EC-N (M+N), de EC-M-Ac₁ y de EC-M-Ac₂, todos a una concentración de 1 mg/ml en etanol.

TABLA 1. Diámetros de inhibición en mm de distintos extractos y sustancias aisladas de *Chromolaena tacotana*.

MICROORGANISMO	EE*	EC	EC-M	EC-N	M+N	EC-M-AC ₁	EC-M-AC ₂
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	13	13	10	13	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	28	18	14	18	8	8
<i>Staphylococcus epidermis</i>	22	21	17	12	16	8	8
<i>Mucor</i> sp.	14	16	14	10	14	8	8
<i>Penicillium</i> sp.	18	18	13	11	13	8	8
<i>Alternaria</i> sp.	16	17	14	8	14	8	8

*En el texto se explica el significado de las abreviaturas.

En los resultados de la Tabla 1, se aprecia que en contra de lo esperado, el extracto clorofórmico (EC) presenta mayor actividad antimicrobiana que la sustancia EC-M; este resultado podría indicar que EC contiene además de EC-M y EC-N una o más sustancias que potencian la actividad o favorecen la difusión en el medio de cultivo, o que existe(n) otra(s) sustancia(s) que tienen una actividad antimicrobiana superior a EC-M con un espectro de actividad similar. Los dos productos de la acetilación de EC-M (EC-M-Ac₁ y AC-M-Ac₂) no presentan actividad antimicrobiana, lo cual indica que la presencia de dicha actividad está asociada con grupos -OH libres. Aunque EC-N tiene una actividad antimicrobiana muy inferior con respecto a EC-M, cuando se mezclan estas dos sustancias, se obtiene una actividad superior a la esperada, lo cual puede sugerir que EC-N potencia la actividad de EC-M.

Actividad antimicrobiana de EC-M

La sustancia EC-M presentó las siguientes respuestas de actividad antimicrobiana a una concentración de 1 mg/ml: Inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. y *Alternaria* sp.; reduce el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* y de *Candida albicans*; es inactiva frente a *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium fortuitum*, *Sarcina lutea*, *Shigella* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus hemolyticus*, *Brucella* sp. y *Pasteurella haemolytica*.

Teniendo en cuenta los criterios de Lorian (9), se determinaron los diámetros de inhibición producidos por EC-M a 500, 1000, 1500 y 2000 mcg/ml frente a *Mucor* sp., *Penicillium* sp. y *Staphylococcus aureus*. Estos resultados permitieron calcular la concentración crítica (CC) de EC-M frente a estos microorganismos, la cual fue de 492 mcg/ml para *Penicillium* sp., de 897 mcg/ml para *Mucor* sp. y de 772 mcg/ml para *Staphylococcus aureus*.

Los anteriores resultados indican que la potencia de la actividad antimicrobiana de EC-M es inferior a la de los antibióticos de uso clínico actuales y por tanto es preferible la utilización del extracto clorofórmico o etanólico. El hecho que en una misma sustancia se encuentre simultáneamente actividad antifúngica y antibacteriana es interesante desde el punto de vista de la aplicación terapéutica en caso de infecciones cruzadas entre hongos y bacterias. En relación con la actividad antibacteriana, se observó que EC-M tiene preferencialmente actividad frente a bacterias Gram (+) y es prácticamente inactiva contra Gram (-).

Identificación de la sustancia EC-M

Punto de fusión: EC-M funde a 179-180 °C, EC-M-Ac₁ a 134-135 °C y AC-M-Ac₂ a 134-135 °C.

Reacción de la cianidina: EC-M disuelta en etanol produjo una coloración violeta al ser tratada con Mg y HCl, indicando una *g*-benzopirona, presente en las estructuras de flavonoides.

Espectrofotometría UV-Vis: En el espectro UV-Vis de una solución metanólica al 0,001 % se observan máximos de absorción a 334 nm (Banda I) y a 292 nm (Banda II). La absorbancia de la banda I es inferior al 10 % de la absorbancia de la banda II, hecho que puede indicar la ausencia de conjugación entre los anillos A y B como ocurre en isoflavonoides, flavanonas y flavanoles (10). Con el fin de establecer la posición de los grupos -OH se registraron los espectros UV-Vis adicionando reactivos de desplazamiento según los procedimientos de Mabry, Markhan y Thomas (11); estos resultados se muestran en la Tabla 2, donde B significa desplazamiento batocrómico.

TABLA 2. Máximos de absorción al UV-Vis y desplazamientos químicos de EC-M

CONDICIONES	Banda I nm	Banda II nm	Desplaz. Banda I nm	Desplaz. Banda II nm
Metanol	334	292		
MeOH+MeONa	364	292	B 30	0
MeOH+AcONa	334	292	0	0
MeOH+AcONa+				
H ₃ BO ₃	334	292	0	0
MeOH+AlCl ₃	384	318	B 50	B 26
MeOH+AlCl ₃ +				
HCl	375	315	B 41	B 23

El desplazamiento producido por el MeONa indica la presencia de un -OH libre sobre el anillo B. El AcONa no alteró el espectro y significa ausencia de un -OH sobre el C-7. El desplazamiento de 26 nm sobre la banda II producido por el AlCl₃ indica la presencia de un -OH en C-5. El H₃BO₃ no alteró el espectro y significa ausencia de grupos -OH en posición orto, lo cual se confirma porque el HCl no produjo un desplazamiento hipsocrómico significativo.

Espectro IR: El espectro IR de EC-M muestra los siguientes máximos en Cm⁻¹: 3340 (OH asociado

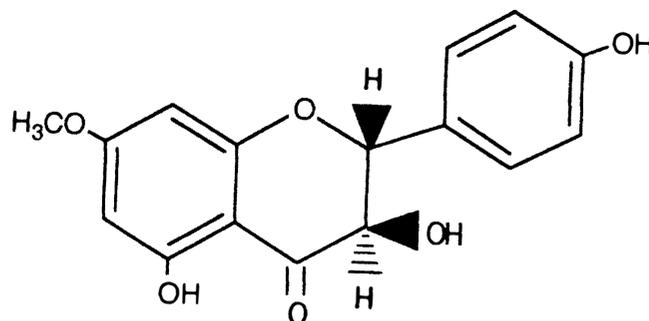
intramolecularmente), 1635 ($=C=O$ de cetona), 1570, 1515 y 1460 (aromaticidad) y 1210, 1190 (vibraciones de tensión C-O).

Espectroscopía de RMN¹H: El espectro de EC-M en CD₃-CO-CD₃ muestra las siguientes señales en ppm: 3,88 (s, 3H) característico de un grupo -OCH₃; 5,13 (d, 1H, $J_{AB}=12$ cps) y 4,69 (dd, 1H, $J_{BA}=12$ cps y $J_{B-OH}=4,5$ cps). Las dos señales anteriores constituyen un sistema AB en donde A ($\delta=5,13$) corresponde a H-2 y B ($\delta=4,69$) a H-3 de un flavanonol con $J_{AB}=J_{BA}=12$ cps (11); el registro de B como doblete (dd) se explica por el acoplamiento de H-3 con el protón del -OH situado en el mismo C-3 y cuya $J_{B-OH}=4,5$ cps es característica para este acoplamiento. A 7,44 (d, 2H, $J_{OH-H3}=4,5$ cps) señal asignable al -OH sobre el C-3 de un flavanonol; a 6,09 (d, 1H, $J^{AB}=2$ cps) y 6,04 (d, 1H, $J_{BA}=2$ cps), sistema AB en donde A ($\delta=6,09$) corresponde al H-8 y B ($\delta=6,04$) al H-6 del anillo A de un flavonoide, en donde $J_{AB}=J_{BA}=2$ cps son característicos del acoplamiento de 2 protones en posición meta sobre un anillo bencénico. A 7,44 (d, 2H, $J_{AB}=J_{A'B'}=8$ cps) y a 6,09 (d, 2H, $J_{BA}=J_{B'A'}=8$ cps), sistema AA'BB' en donde A y A' ($\delta=7,44$) corresponden respectivamente a los protones H-3' y H-5' y BB' a H-2' y H-6'; $J_{AB}=J_{A'B'}=J_{BA}=J_{B'A'}=8$ cps es un valor típico para el acoplamiento de dos protones aromáticos en posición orto (H-2' con H-3' y H-5' con H-6'). A 8,53 (s, 1H) corresponde a un -OH fenólico sobre el C-4' y a 11,70 (s, 1H) señal asignada a un -OH sobre C-5 cuya resonancia a campo tan bajo es debida a la influencia del grupo carbonilo sobre C-4.

El espectro de RMN¹H de EC-M-Ac₂ en CDCl₃ muestra señales a 2,01 (s, 3H), 2,32 (s, 3H) y 2,39 (s, 3H) que indican la presencia de 3 grupos acetato. Un sistema AB donde $\delta A=5,69$ (d, 1H, $J_{AB}=12$ cps) y $\delta B=5,40$ (d, 1H, $J_{BA}=12$ cps), A corresponde al H sobre C-2 y B al H sobre C-3 de un flavanonol cuyo H sobre el C-3 está sustituido; las constantes de acoplamiento $J_{AB}=J_{BA}=12$ cps indican que los H sobre C-2 y C-3 tienen una conformación a-a (axial-axial), porque para conformaciones a-e (axial-ecuatorial) o e-e J_{AB} y J_{BA} deben ser inferiores a 5 cps, de acuerdo con la ecuación de Karplus o con base en datos experimentales (12). Se observa otro sistema AB donde $\delta A=6,42$ (d, 1H, $J_{AB}=3$ cps) y $\delta B=6,55$ (d, 1H, $J_{BA}=3$ cps), constantes características de 2 protones sobre un anillo de benceno en posición meta (13) y para el caso de un flavonoide corresponden a los H sobre C-6 ($\delta=6,35$) y C-8 ($\delta=6,42$); la presencia de este sistema AB significa que C-6 y C-7 están sustituidos. Como en el caso de EC-M, también hay señales de un sistema AA'BB' para los protones aromáticos del anillo B de un flavonoide; AA' producen una señal a

$\delta=7,50$ (d, 2H, $J_{AB}=J_{A'B'}=9$ cps) que corresponde a los protones sobre C-2' y C-6', y BB' con $\delta=7,16$ (d, 2H, $J_{BA}=J_{B'A'}=9$ cps) corresponden a los 2 protones sobre C-3' y C-5'; de lo anterior se deduce que en C-4' del anillo B del flavonoide existe una función oxigenada.

Espectrometría de masas: El espectro de EC-M presenta las siguientes señales de m/z: 302 (M⁺, 21,5%) para una fórmula condensada C₁₆H₁₄O₆; además 167 (100%), 273 (29,1%), 179 (20,1%), 151 (31,9%), 134 (48,3%), 136 (20,6%) y 107 (37,6%). De acuerdo con los patrones de fragmentación para un flavanonol propuestos por Harborne y col. (14), cada uno de los anteriores fragmentos de m/z corresponden perfectamente con la siguiente estructura, deducida de la visión global de los estudios espectroscópicos expuestos antes.



Esta estructura corresponde a 2R,3R-4',5-dihidroxi-7-metoxi-flavanonol. Herz y col. (15) aislaron a partir de *Eupatorium capillifolium* un flavanonol (dihidroflavonol) con una estructura igual que denominaron 7-metoxi-aromadendrina. Los resultados de los estudios espectroscópicos de EC-M concuerdan muy bien con los publicados por Herz y col.

AGRADECIMIENTOS:

AL Dr. Hans Achenbach, del Chemisches Laboratorium de Alemania, por la generosa realización de los espectros de RMN¹H y de masas, al Dr. Rubén Torrenegra de la Universidad Javeriana por el registro de los espectros UV-Vis e IR y al Dr. José Ramón Mantilla por su orientación en los ensayos microbiológicos. A COLCIENCIAS por el apoyo financiero y al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.

BIBLIOGRAFIA

1. J.R. MANTILLA y A. SANABRIA. *Rev. Col. Cienc. Quím.-Farm.* **4**(2), 25-33 (1985).
2. A. SANABRIA y J.R. MANTILLA. *Rev. Col. Cienc. Quím.-Farm.* **Nº 15**, 17-22 (1986).
3. R. BOEKER y F. BOHLMANN. *Rev. Latinoam. de Quím.* **17**, 45-46 (1986).
4. A.M. METAWALLY y E. C. EKEJUIBA. *Planta Medica* **42**, 403-405 (1981).
5. R. N. BARUA, R. P. SAHRMA, G. THYAGARAJAN y W. HERZ. *Phytochem.* **17**, 1807-08 (1978).
6. A. SANABRIA. **Análisis Fitoquímico preliminar.** Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 especies de la familia Compositae, Universidad Nacional. Departamento de Farmacia, Bogotá, 1.983.
7. E. STAHL. **Thin-layer Chromatography**, 2ª Ed., Springer-Verlag, New York, pp. 883-895, 1969.
8. C. CASTRILLON y F. FARFAN. **Aislamiento de los constituyentes con actividad antimicrobiana de *Conyza floribunda* H.B.K.** Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, p.52, 1.980.
9. V. LORIAN. **Antibiotics in Laboratory Medicine.** Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, London, pp. 9-14, 1980.
10. J.B. HARBORNE, T.J. MABRY y H. MABRY. **The Flavonoids.** Chapman and Hall, London, p. 50, 1975.
11. T.J. MABRY, K.R. MARKHAM y M.B. THOMAS. **The Systematic Identification of Flavonoids.** Springer-Verlag, Berlin, p.61, 1.970.
12. I. FLEMING Y D.H. WILLIAMS. **Métodos espectroscópicos en Química Orgánica.** Ediciones Urmo, Bilbao, p.110, 1972.
13. J. Nathan y E. Díaz. **Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear.** Ed. Limusa Wiley S.A. México, p.72, 1.970.
14. J.B. HARBORNE, T.J. MABRY y H. MABRY. **The Flavonoids.** Chapman and Hall, London, p. 105, 1975.
15. W.HERZ, S. GIBAJA, S.V.BHAT y A. SRINIVASAN. *Phytochem.* **11**, 2859-63 (1972).