

AISLAMIENTO DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ANTOMICROBIANA DE *Raimondia quinduensis*.

Antonio Sanabria Galindo, *
Sonia A. Ospina, *
Jairo A. Cerón *
y José Ramón Mantilla *

RESUMEN

De la parte aérea de *Raimondia quinduensis* (H.B.K.) Safford, se aislaron dos fracciones principales: Una de alcaloides, activa contra 10 bacterias Gram positivas a nivel de 62,5-1.000 mcg/ml, y otra de flavonoides, activa contra 8 bacterias Gram positivas y 6 Gram negativas a 250-1.000 mcg/ml.

SUMMARY

From the aerial part of *Raimondia quinduensis* (H.B.K.) Safford, were isolated 2 principal fractions: one of alkaloids, with activity against 10 Gram positive bacterias to 62,5-1.000 mcg/ml and other of flavonoids, active against 8 Gram positive and 6 Gram negative bacterias to 250-1.000 mcg/ml.

INTRODUCCION

Las plantas se han utilizado desde hace mucho tiempo como agentes antimicrobianos en la curación de enfermedades infecciosas y por esta razón se han realizado muchas investigaciones con el fin de determinar la actividad antimicrobiana de numerosas especies. Por ejemplo, Farnsworth y col. (1) efectuaron una revisión sobre un gran número de trabajos que tuvieron como objetivo encontrar plantas con actividad antimicrobiana. Igualmente, vale la pena resaltar estudios preliminares masivos como el de Osborn (2), quien encontró que de 2.300 especies de plantas superiores, 63 presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*.

Se conocen pocas investigaciones sobre la actividad biológica de especies pertenecientes a la familia *Annonaceae*, se destacan la acción insecticida del aceite de *Annona reticulata* (3) y de *Annona squamosa* (4), la actividad citotóxica de liriodenina aislada del tallo de *Annona glabra* (5), de coridina obtenida de *Annona squamasa* (6) y de uvaretina e isouvaretina aislada de *Uvaria chamae* (7). Con relación a actividad antimicrobiana en especies de esta familia solo se conoce el estudio realizado por Yiadom y col. (8) sobre *Xilopia aethiopica*, de la cual se obtuvieron ácido xilópico, un diterpeno activo contra *Staphylococcus aureus*, *bacillus subtilis*, *candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron hojas y tallos tiernos de *Raimondia quinduensis* (H.B.K.) Safford (*Annonaceae*) recolectada en Santandercito (Cundinamarca - Colombia). En el Herbario Nacional Colombiano (COL) reposa un ejemplar del material estudiado.

MICROORGANISMOS DE ENSAYO

Con el fin de determinar el espectro de acción de la planta se seleccionaron microorganismos representativos de bacterias Gram positivas, Gram negativas y ácido resistentes (Tabla 1), los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *Mucor sp.* y *Penicillium sp.* y la levadura *Candida albicans*, todos suministrados por el Instituto Nacional de Salud (INS).

La actividad antibacteriana se determinó por el método de inoculación en superficie estandarizado por Mantilla y Sanabria (9) y empleando como medio de cultivo agar soya tripticasa. La actividad

* Universidad Nacional. Departamento de Farmacia, A.A. 14.489, Bogotá, COLOMBIA

TABLA 1. BACTERIAS EMPLEADAS EN LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Raimondia quinduensis*

No.	Microorganismo	Procedimiento	Tiempo de Incubación
1	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	INS	72 horas
2	<i>Brucella</i> sp.	FUN	72 horas
3	<i>Bacillus anthracis</i>	FUN	16 horas
4	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 86633	16 horas
5	<i>Micrococcus flevus</i>	ATCC 10240	16 horas
6	<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341 A	16 horas
7	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	FUN	16 horas
8	<i>Streptococcus faecalis</i>	FUN	16 horas
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	UC 719	16 horas
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 P	16 horas
11	<i>Shigella</i> sp.	INS	7 horas
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FUN	7 horas
13	<i>Serratia marcescens</i>	FUN	7 horas
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FUN	7 horas
15	<i>Escherichia coli</i>	UC 877	7 horas
16	<i>Salmonella typhi</i>	FUN	7 horas

Nota: ATCC = American Type Culture Collection

INS = Instituto Nacional de Salud

UC = Upjohn Company

FUN = Departamento de Farmacia, Universidad Nacional

frente a mohos y levaduras se determinó por el método de difusión en gel-perforación (10, 11) en agar Saboraud-dextrosa.

Con el propósito de determinar la presencia de algunos grupos de metabolitos secundarios, se llevó a cabo el estudio fitoquímico preliminar establecido por Sanabria (12). En este estudio se encontró que la planta contenía como principales constituyentes alcaloides y flavonoides, por lo cual se adoptó el siguiente procedimiento con el fin de separar estos dos grupos de sustancias:

Se extrajeron 900 g. de material vegetal seco y pulverizado con 10 l de etanol del 95%, obteniéndose 178 g. de extracto. El extracto etanólico se adsorbió en 400 g. de celita, se empacó en una columna y se eluyó con HCl al 5% en etanol-agua (1:7) hasta prueba negativa para alcaloides (Dragendorff y Valser) y para flavonoides (Shinoda). El eluato se alcalinizó con NaOH al 10% hasta pH 8 y se extrajo con cloroformo; la fase clorofórmica se deshidrató con sulfato de sodio anhidro y la evaporación del solvente a presión reducida produjo un residuo de 3,8 g. (A) que presentó reacción positiva para alcaloides y negativa para flavonoides. La fase acuosa alcalina se llevó a pH 5 con HCl al 10% y se extrajo primero con acetato de etilo y luego con isobutanol; las dos fases se deshidrataron, se evaporó

el solvente y se obtuvieron residuos de 5,2 g. a partir de la capa de acetato de etilo (B) y de 10 g. a partir del isobutanol (C). Los dos residuos B y C dieron reacción positiva para flavonoides y negativa para alcaloides.

A las fracciones A, B y C se les determinó la actividad antimicrobiana a concentraciones de 1.000, 500, 250, y 62,5 mcg/ml y se comparó con la actividad del extracto etanólico total de la planta a concentraciones de 4.000, 2.000, 1.000, 500 y 250 mcg/ml de medio de cultivo.

La fracción A con alcaloides se separó por cromatografía en capa delgada (CCD) sobre sílica gel G desarrollada con $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}$ (90:10:1) y revelada con reactivo de Dragenddorff según Munier y Macheboeuf (13).

También se intentó la separación por CCD de las fracciones con flavonoides (B y C) utilizando como soportes sílica gel G, celulosa microcristalina y poliamida, y por cromatografía descendente en papel, ensayando un gran número de eluentes. Debido a la alta polaridad de los flavonoides, sólo se obtuvo alguna separación sobre placas cubiertas con celulosa microcristalina y desarrolladas con AcOH al 15%. Ante la dificultad para separar los extractos B y C, se sometieron a una hidrólisis por reflujo durante

4 horas con HCl al 5% en metanol del 50% , se concentró y se extrajeron los flavonoides con acetato de etilo. Ambas capas acuosas (de B y C) dieron reacción positiva para azúcares reductores con reactivo de Fehling. Una CCD sobre sílica del gel G desarrollada con C_6H_6 -AcOEt-MeOH-AcOH-HOH (40:30:20:5:5) y revelada con $FeCl_3 \cdot K_3Fe(CN)_6$, mostró que los flavonoides presentaron valores de Rf muy superiores después de la hidrólisis.

Finalmente, se comparó la actividad antimicrobiana de las fracciones con flavonoides (B y C) antes y después de la hidrólisis y se efectuaron ensayos de bioautografía en capa delgada (14) empleando como organismo de prueba *Serratia marcescens* con el propósito de determinar las características cromatográficas de los flavonoides activos.

RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis fitoquímico preliminar (12) mostró resultados positivos para flavonoides, alcaloides, terpenoides y taninos, y negativos para antraquinonas, saponinas, lactonas terpénicas y cardiotónicos.

El extracto etanólico de *Raimondia quinduensis* en una proporción de 1 g. de planta por 1 ml. de etanol, probado por el método de difusión en agar, no presentó actividad contra ninguno de los hongos y la levadura probados. En cambio este mismo extracto probado por el método de inoculación en superficie, mostró actividad en una proporción de 10 mg. de planta por ml. de medio de cultivo contra las bacterias 2, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 13 y 15 de la Tabla 1, a 20 mg/ml frente a 6, y fue inactiva contra las bacterias 1, 7, 8, 11, 14 y 16. En estas mismas condiciones, un patrón de sulfato de estreptomycin presentó actividad frente a la mayoría de bacterias a concentraciones comprendidas entre 2,5 y 40 mcg/ml.

De los anteriores resultados se destaca la actividad de la planta contra bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Escherichia coli*, por esta razón se procedió a obtener las fracciones con las sustancias responsables de dicha actividad.

Al someter el extracto etanólico al proceso de separación descrito, se obtuvieron las fracciones A (alcaloides solubles en cloroformol, B (flavonoides solubles en acetato de etilo) y C (flavonoides solubles en isobutanol), las cuales se evaluaron microbiológicamente

(9) a concentraciones de 1.000, 500, 250, 125 y 62,5 mcg/ml. Como blanco se empleó etanol del 95% y como patrón sulfato de estreptomycin a 40, 20, 10, 5 y 2,5 mcg/ml. En el ensayo también se incluyeron el extracto etanólico total (ET), el residuo final de la extracción (RE) y la capa acuosa que al final se extrajo con AcOEt (CAF) a concentraciones de 4.000, 2.000, 1.000, 500 y 250 mcg/ml. La hidrólisis ácida de las fracciones con aglicones de los flavonoides HB y HC, las cuales también se evaluaron microbiológicamente a las mismas concentraciones de 1.000, 500, 250, 125 y 62,5 mcg/ml.

Los resultados del anterior ensayo se muestran en la Tabla 2, en donde se observa que el extracto etanólico total (ET) presenta un amplio espectro de actividad antibacteriana frente a los organismos probados a concentraciones de 1.000, 500, 250 y 62,5 mcg/ml.

La fracción A de alcaloides mostró actividad selectiva contra todas las bacterias Gram positivas a concentraciones comprendidas entre 62,5 y 1.000 mcg/ml., incluso contra *Staphylococcus epidermidis* que resultó resistente al patrón de estreptomycin y de todas las fracciones ensayadas, fue la única que inhibió a *Candida albicans*.

La fracción B de flavonoides solubles en acetato de etilo presentó un espectro de acción similar al extracto etanólico (ET), pero con una potencia incrementada notablemente (entre 2 y 4 veces). La actividad frente a bacterias Gram positivas es menor que la fracción A, pero a diferencia de esta última, la fracción es activa contra todas las bacterias Gram negativas probadas. El producto de la hidrólisis ácida de estos flavonoides (HB), conservó y aún incrementó ligeramente la actividad frente a las 10 bacterias Gram positivas con respecto a los flavonoides sin hidrolizar (B), pero a las concentraciones del ensayo, perdió totalmente la actividad contra las 6 bacterias Gram negativas.

Por otra parte, la fracción con flavonoides solubles en isobutanol (C) únicamente mostró actividad contra *Brucella sp.* a 1.000 mcg/ml. y fue inactiva contra los demás organismos ensayados. En cambio el producto de la hidrólisis ácida (HC), presentó actividad a concentraciones comprendidas entre 500 y 1.000 mcg/ml. contra 8 de las 10 bacterias Gram negativas y la levadura.

TABLA 2. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DISTINTAS FRACCIONES DE *Raimondia quinduensis*

No.	Microorganismo	Nivel de actividad (mcg./ml.)								
		Pat.	A	B	HB	C	HC	RE	CAF	ET
1	M. fortuitum	20	62,5	1000	500	—	1000	500	—	4000
2	Brucella sp.	5	125	125	250	1000	500	—	—	500
3	B. anthracis	5	125	500	500	—	500	—	—	1000
4	B. subtilis	2,5	250	500	500	—	1000	—	—	2000
5	M. flavus	2,5	125	1000	1000	—	1000	—	—	4000
6	S. lutea	5	125	1000	1000	—	1000	—	—	4000
7	S. pneumoniae	20	500	—	—	—	—	—	—	—
8	S. faecalis	40	1000	—	—	—	—	—	—	—
9	S. epidermidis	—	125	1000	500	—	1000	—	—	2000
10	S. aureus	2,5	500	1000	500	—	1000	—	—	200
11	Shigella sp.	5	—	1000	—	—	—	—	—	4000
12	P. aeruginosa	—	—	1000	—	—	—	—	—	2000
14	K. pneumoniae	10	—	1000	—	—	—	—	—	1000
15	E. coli	40	—	1000	—	—	—	—	—	4000
16	S. typhi	40	—	500	—	—	—	1000	—	2000
17	C. albicans	—	1000	—	—	—	—	—	—	—

Nota: En el texto se explican los significados de todas las abreviaciones

Finalmente, en la Tabla 2, se observa que el residuo RE y la capa acuosa final CAF, prácticamente no presentaron actividad a las concentraciones probadas frente a los organismos ensayados.

Los resultados preliminares obtenidos en el presente trabajo indican que la especie *Raimondia quinduensis* como mecanismo de defensa frente a bacterias, sintetiza dos grupos de sustancias estructuralmente muy diferentes: alcaloides, activos contra bacterias Gram positivas e inactivos contra Gram negativas y flavonoides con mayor actividad sobre bacterias Gram negativas. Desde el punto de vista ecológico, no es habitual que en una misma especie se encuentren dos grupos de metabolitos secundarios estructuralmente distintos con acción biológica similar, pero para el caso de *Raimondia quinduensis*, posiblemente en el ambiente en que se desarrolla, es una especie muy atacada por bacterias y por esta razón requiere de dos grupos de sustancias que le permitan completar un amplio espectro de actividad antibacteriana. Cuando se aislen puros e identifiquen los distintos compuestos será posible entender la relación entre la estructura química y la acción antimicrobiana de dicha especie.

Muy al contrario de la creencia generalizada que la presencia del azúcar en un glicósido influye más desde el punto de vista cuantitativo que cualitativo, en el presente trabajo se demostró que al hidro-

lizar los flavonoides solubles en acetato de etilo (B) se conserva y aún incrementa ligeramente la actividad frente a bacterias Gramnegativas. Igualmente, los flavonoides solubles en isobutanol (C), incrementaron notablemente sus espectros de acción contra Gram positivas cuando se hidrolizaron.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen sinceramente a COLCIENCIAS por el apoyo financiero prestado al proyecto "Contribución al estudio de la acción antimicrobiana de algunas plantas colombianas", dentro del Programa de Farmacología de los Productos Naturales.

BIBLIOGRAFIA

1. N.R. Fensworth, *J. Pharm. Sci.* 55, 225 (1966).
2. E.M. Osborn, *Brit. J. Esp. Patol.* 24, 227 (1943).
3. S.H. Harper, C. Potter y E. Gillman, *Ann. Applied. Biol.* 34, 104 (1947). Vía Chem. Abstr. 42, 1700d (1948).
4. N. Bhojra, B.N. Mohan, Z.H. Osmani y S. A. Saletore, *J. Indian Chem. Soc.* 16, 179 (1953). Vía Chem. Abstr. 49, 1269g (1955).
5. D. Warthem, E. Gooden y M. Jacobson, *J. Pharm. Sci.* 58, 637 (1969).
6. D.S. Bhakuni, T. Shobla y M.M. Dhar, *Phytochem.* 11, 1819 (1971).

7. C.D. Hufford y W.L. Lasswell, J. Org. Chem. 41, 1297 (1976).
8. K.B. Yiadom, N.I.Y. Fiagbe y J.S.K. Ayim, Lloydia 40, 543 (1977).
9. J.R. Mantilla y A. Sanabria, Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 4(2), 25 (1985).
10. A. Sanabria y J.R. Mantilla, Rev. Col. Cien. Quím. Farm. No. 15, 17 (1986).
11. M. Espinosa y M.A. Iriarte, "Producción y caracterización preliminar de sustancias antimicrobianas de una cepa de Nocardia, Tesis, Universidad Nacional de Colombia, 1980, p. 79-80.
12. A. Sanabria-Galindo, "Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación a la evaluación de 40 especies de la familia Compositae. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia Bogotá, 1983, p. 65-77.
13. E. Stahl, "Thin-Layer Chromatography". Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1969, p. 873.
14. E. Meyers y D.A. Smith, J. Chromatog. 14, 127 (1964).