

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Chromolaena tequendamensis* (HIERON) R. KING & H. ROBINSON

Antonio Sanabria-Galindo*
Ana Magdalena García*
Ana Matilde Torres*
José Ramón Mantilla*

RESUMEN

De la parte aérea de *Chromolaena tequendamensis* (Hieron) R. King & H. Robinson se aisló una fracción con 4 cetósidos estructuralmente relacionados con prostaglandinas. Dicha fracción presentó actividad contra 13 bacterias Gram positivas a 62,5- 1.000 mcg./ml. y contra 4 hongos filamentosos a 2.000 mcg./ml.

SUMMARY

From the areal parts of *Chromolaena tequendamensis* (Hieron) R. King & H. Robinson a fraction which contained at least four keto acid (related with prostaglandins) was isolated. This fraction was active against 13 Gram (+) bacteria at a concentration ranging from 62.5 to 1.000 mcg./ml. and against 4 filamentous mushrooms at 2.000 mcg./ml.

racemosum y *Casia elata* [Caesalpinaceae] (7) cuyo extracto en cloroformo-etanol presentó actividad contra organismos Gram positivos y Gram negativos.

Muchas de las especies que han mostrado propiedades antimicrobianas pertenecen a la familia Asteraceae, entre ellas, el *Eupatorium coelestinum* (8) presenta una elevada actividad antifúngica, el *E. inulaefolium* (9) conocido como sanalotodo y empleado para lavar enconos y heridas, *E. capillifolium* (10) cuyo extracto etanólico presentó actividad contra *Bacillus subtilis* y *Chromolaena tacotana* (11) de donde se aisló un flavonoide con actividad antimicrobiana.

Teniendo en cuenta lo expuesto, el presente trabajo tuvo como objetivo aislar las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana de *Chromolaena tequendamensis* mediante la utilización de métodos de separación ejecutados en estrecha relación con los ensayos microbiológicos (12,13,14).

INTRODUCCION

En razón de los problemas de resistencia presentados por muchos antibióticos y de la necesidad de agentes de este tipo con mayor efectividad terapéutica, se ha incrementado desde hace muchos años la búsqueda de estas sustancias en plantas superiores (1).

El estudio de antimicrobianos en plantas superiores ha tenido éxito y hay información sobre muchas especies con esta actividad, entre las que se pueden destacar: *Solanum carolinense* [Solanaceae] (2) que posee actividad inhibitoria selectiva contra bacterias Gram negativas, diferentes especies del género *Thalictrum* (3,4) mostraron actividad contra infecciones causadas por hongos y bacterias Gram negativas, *Curcuma zedoaria* [Zingiberaceae] (5) de donde se aisló un potente antifúngico, *Liriodendrom tulipifera* [Magnoliaceae] (6) que mostró buena actividad contra *Trichophyton mentagrophytes* y *Syncephalestrum*

PARTE EXPERIMENTAL

Material Vegetal

Se emplearon las partes aéreas (hojas, flores y tallos tiernos) de *Chromolaena tequendamensis* (Hieron) R. King & H. Robinson [Asteraceae], colectada en San Francisco (Cundinamarca- Colombia). Un espécimen se registró en COL (Herbario Nacional Colombiano) con el número 227194.

Microorganismos

Para determinar la actividad antibacteriana se emplearon las siguientes bacterias:

Staphylococcus aureus ATCC 65389 P (American Type Culture Collection), *S. epidermis* UC 719 (Upjohn Company), *Bacillus subtilis* ATCC 86633, *Scherichia coli* UC 877, *Salmonella typhi* FUN (Departamento de Farmacia, Universidad Nacional), *Klebsiella pneumoniae* FUN, *Pseudomonas aeruginosa* (Pfizer) y *Mycobacterium fortuitum* INS (Instituto Nacional de Salud). Se empleó como medio de culti-

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia.

vo agar soya tripticasa y se siguió el método de Mitscher y col. (15,16) modificado por Mantilla y Sanabria (17).

La actividad frente a hongos y a levaduras fue determinada por el método de difusión en gel - perforación (12,13,18) en agar Sabraud-dextrosa. Los organismos de ensayo fueron: *Candida albicans* ATCC 752, *Candida sp.* INS, *Alternaria sp.* INS, *Mucor sp.* INS y *Penicillium sp.* INS. Como complemento, en la determinación de la actividad antifúngica se emplearon métodos bioautográficos (19,20); en este caso los hongos de ensayo fueron *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*

Las propiedades antimicrobianas de *Chromolaena tequendamensis* fueron confirmadas mediante la evaluación microbiológica del extracto etanólico en una relación de 1,0 y 0,1 g. de planta por ml. de solvente, frente a los organismos de ensayo citados antes.

La maceración con alcohol del 95% de 1.500 g. de material vegetal produjo 231 g. de extracto etanólico. Este extracto fue absorbido en celita y eluido sucesivamente con éter de petróleo (fracciones FE-I y FE-II), cloroformo (fracciones FC-I y FC-II), etanol del 95% y etanol del 50%.

Las fracciones obtenidas se agruparon de acuerdo con las características observadas por cromatografía en capa delgada sobre sílica gel G desarrollada con cloroformo-acetona (90:10) (solvente I), empleando como revelador vainillina-ácido o- fosfórico [revelador A] (21a) y cloruro férrico-ferricianuro de potasio [revelador B] (21b).

Cada una de las fracciones fue evaluada microbiológicamente a concentraciones de 2.000 y 200 mcg/ml. frente a *Staphylococcus epidermis*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* (organismos para los que el extracto etanólico presentó mayor actividad en los ensayos preliminares).

Con las fracciones que presentaron mayor actividad antimicrobiana (FE-I, FE-II, FC-I y FC-II) se efectuó una bioautografía en capa delgada utilizando como organismo de prueba *Aspergillus niger* (solvente I). En las 4 fracciones se obtuvo una amplia zona de inhibición a $R_f = 0,27$.

Las 4 fracciones activas se combinaron y se sometieron a separación en una columna con sílica gel H eluida con cloroformo seguido de concentraciones crecientes de acetona hasta un 10%. Las 120 fracciones obtenidas se combinaron con base en sus características por cromatografía en capa delgada (c.c.d.) [solvente I y revelador A] en 16 fracciones mayores (I-XVI). Las fracciones V a XVI presentaron actividad antimicrobiana y una bioautografía mostró que en todas estas fracciones había una zona de inhibición a $R_f = 0,27$, la cual coincide con una mancha café observada al revelar con vainillina.

En razón de que las fracciones VIII-X presentaron la mayor actividad antimicrobiana, se combinaron y se les registró un espectro infrarrojo (IR).

El espectro IR (Espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo 700) muestra un máximo de absorción a 2.930 cm^{-1} que puede ser asignado al -OH del dímero de un ácido carboxílico que se confirma por el máximo de absorción del grupo C=O del ácido a 1.700 cm^{-1} y la tensión C-O a 1.215 cm^{-1} .

Conocida la naturaleza ácida, 9,3 g. de las fracciones VIII, IX y X se disolvieron en 300 ml. de carbonato de sodio al 5% y se extrajeron repetidas veces con cloroformo, el extracto clorofórmico se lavó con agua, se deshidrató y se obtuvieron 1,4 g. de un residuo "BM"; la capa alcalina se aciduló con HCL al 10% y se extrajo varias veces con cloroformo, la capa clorofórmica se lavó con agua, se deshidrató y se obtuvieron 6,2 g. de un líquido oleoso de color amarillo denominado "AM". La evaluación microbiológica mostró una actividad antimicrobiana significativa para "AM", mientras que el residuo "BM", presentó una actividad muy débil.

Se trataron 1,2 g. de AM en una columna con sílica gel (0,063- 0,200 mm.) y se eluyó con mezclas de cloroformo-acetona en orden creciente de polaridad. Las fracciones obtenidas se reunieron en 5 grupos (C₁ - C₅) de acuerdo con las semejanzas cromatográficas; luego se evaluaron microbiológicamente y se estableció que la actividad se había concentrado en la fracción C₂.

Los 5 g. restantes de AM se purificaron por extracción con hexano mediante agitación mecánica. Se obtuvieron 2 g. de un líquido oleoso amarillo "EH" (soluble en hexano) y 2,6 g. de un residuo oscuro "RH". Por medio de evaluaciones microbiológicas (difusión en gel y bioautografía) se estableció que "EH" contenía las sustancias con actividad microbiana.

Por medio de cromatografía preparativa en capa delgada empleando sílica gel GF₂₅₄ y benceno-acetato de etilo-ácido fórmico (75:20:1) como eluente, se separaron 500 mg. de "EH". Este método permitió obtener el producto de 4 manchas denominadas I-IV; una evaluación microbiológica mostró que la mancha II con $R_f = 0,58$ presentaba la mayor actividad antimicrobiana.

Espectro de actividad antifúngica y concentración crítica (C.C.)

Los productos C₂, purificado por cromatografía en columna y II, separado por cromatografía preparativa en capa delgada, se evaluaron a una concentración de 1.000 mcg./ml. frente a *Aspergillus niger*, *penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Alternaria sp.* y *Candida albicans*. Por medio de este ensayo se estableció que tanto II como C₂ eran activas contra *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* a la concentración del ensayo.

Con el fin de establecer la concentración crítica se hicieron ensayos a concentraciones de 2.000, 1.000, 500 y 250 mcg./ml.

Espectro Antibacteriano y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se determinó el espectro de actividad frente a 19 bacterias y la CMI de las fracciones impuras que habían mostrado actividad, del extracto etanólico (ET) y de la mezcla C₂; con este fin se siguió el método de diluciones seriadas en agar e inoculación en superficie. Las concentraciones de ensayo fueron 1.000, 500, 250, 125 y 62,5 mcg. de muestra por ml. de medio.

Espectro de absorción al infrarrojo y al ultravioleta

Se registró el espectro de absorción al IR de la sustancia II en película en un espectrofotómetro para IR Perkin Elmer Mod. 521. Igualmente se registró un espectro UV-Vis de una solución metanólica de la sustancia II en un espectrofotómetro Perkin Elmer Mod. 750.

RESULTADOS Y DISCUSION

Por maceración de 1.500 g. de material vegetal con etanol del 95% se obtuvieron 231 g. de extracto, el cual fue fraccionado por percolación sobre celita eluyendo con éter de petróleo, cloroformo, etanol del 95% y etanol del 50%. La evaluación microbiológica de los extractos reveló que la actividad antimicrobiana se concentraba en las fracciones de éter de petróleo (FE-I y FE-II) y clorofórmicas (FC-I y FC-II), por lo cual se escogieron para el aislamiento de las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana.

Por medio de una bioautografía frente a *Aspergillus niger* se obtuvo una zona de inhibición producida por las anteriores fracciones a una RF=0,27 que coincidió con una mancha de color café que revela con vainillina.

Por cromatografía en columna de la mezcla de las fracciones FE-I, FE-II, FC-I y FC-II se obtuvieron 16 grupos de fracciones [I- XVI], cada una de las cuales se evaluó frente a hongos y bacterias. Los resultados mostraron que la actividad antimicrobiana se presentaba entre las fracciones V a XVI y que dicha actividad se concentraba en las fracciones VIII, IX y X. Una cromatografía en capa delgada (c.c.d.) de las fracciones activas mostró en todas una mancha café a RF=0,27.

El espectro IR de las tres fracciones más activas reveló máximos de absorción característicos de ácidos carboxílicos y por esta razón se purificaron mediante la formación de la sal sódica.

Vale la pena anotar que en 1982 Bohlmann y col. informaron por primera vez sobre la presencia de ácidos relacionados con las protaglandinas en *Chromolaena morii* y *C. chasleae* (23,24).

La purificación de 9,3 g. de las tres fracciones más activas con carbonato de sodio al 5% produjo 6,2 g. de un líquido oleoso amarillo "AM". Por medio de estudios cromatográficos y bioautográficos se demostró que en AM estaba presente la mancha con RF=0,27 junto con otras impurezas.

1,2 g. de AM se purificaron por cromatografía en columna y los 6 g. restantes por extracción con hexano y cromatografía preparativa en capa delgada. Por el primer método se obtuvieron 5 grupos de fracciones (C₁ - C₅) de los cuales C₂ exhibió la mayor actividad antimicrobiana. Por el segundo método se obtuvieron 2 g. de un líquido oleoso amarillo "EH" correspondiente a las sustancias solubles en hexano. Una cromatografía preparativa de 500 mg. de esta mezcla desarrollada con benceno-acetato de etilo-ácido acético (75:20:1) permitió la separación de 4 sustancias (I-IV); un estudio microbiológico de dichas sustancias indicó que la actividad se concentra en II.

Una c.c.d. utilizando el último eluyente mencionado mostró que el producto C₂ está constituido por 4 sustancias con Rf 0,32, 0,48, 0,58 y 0,66, mientras que el producto II sólo tenía una sustancia con RF²0,58 y una mancha muy débil a RF²0,66. Lo anterior indica que la c.c.d. preparativa fue más efectiva para la separación de las sustancias activas que la cromatografía en columna.

El espectro UV-Vis de la sustancia II mostró un máximo de absorción a 238 nm. que puede ser atribuido a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de una cetona α, β -insaturada y un pequeño máximo de absorción a 300 nm. que se puede justificar por la transición $n \rightarrow \pi^*$ de la mencionada cetona.

El espectro IR de la sustancia II mostró los siguientes máximos de absorción en Cm^{-1} : 3.600-2.500, estiramiento O-H de un ácido carboxílico (22); 2.930-2.860, estiramiento C-H que posiblemente aparece superpuesto con el -OH de ácido; 1.710, estiramiento C=O del dímero de un ácido carboxílico (25); 1.630 y 1.580, estiramiento C=O de una cetona α, β -insaturada; 1.460 y 1.410, deformación en el plano C-O-H; 1.210, estiramiento C-O del dímero de un ácido carboxílico; 970, deformación O-H fuera del plano de un ácido.

Teniendo en cuenta los resultados de los espectros UV-Vis e IR, aunque es aventurado afirmarlo, se puede pensar que la sustancia II está estructuralmente relacionada con los ácidos carboxílicos tipo prostaglandinas aislados por Bohlmann y col. (23,24) de plantas del mismo género *Chromolaena* (*C. morii* y *C. chasleae*). El hecho de que la sustancia II es un ácido sí queda demostrado por el espectro IR y porque fue posible extraerla por formación de la sal del ácido con carbonato de sodio.

Las sustancias II y C₂ se evaluaron a una concentración de 1.000 mcg./ml. por el método de difusión en

gel- perforación frente a *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Alternaria sp.*, *Sccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. De estos organismos sólo *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* fueron sensibles a II y a C₂. Se observó que C₂ (donde están presentes I, II, III y IV) producen halos de reducción de la población microbiana superiores a los obtenidos con II; este hecho se puede explicar aceptando la existencia de una potenciación de la actividad antifúngica entre la sustancia II y I, III y IV juntas o con alguna de ellas.

Con el fin de establecer la concentración crítica (C.C.) de II y de la mezcla C₂ frente a *Aspergillus niger* y a *Penicillium sp.*, se ensayaron a concentraciones de 2.000, 1.000 y 500 mcg./ml. Los resultados permitieron establecer que a partir de una concentración de 500 mcg./ml. se produce reducción del crecimiento y que la concentración crítica está por encima de 2.000 mcg./ml.

La mezcla C₂ se evaluó en concentraciones de 1.000, 500, 250, 125 y 62,5 mcg./ml. frente a 19 bacterias siguiendo el método de dilución seriada en agar e inoculación en superficie. Además se incluyeron en este ensayo el extracto etanólico inicial (ET) y las fracciones VI a XVI con el fin de tener una idea de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos.

Los resultados se presentan en la Tabla I, los cuales indican que la mezcla C₂ (donde están presentes I, II, III y IV) es inactiva frente a los bacilos Gram negativos evaluados, pero posee actividad contra *Mycobacterium fortuitum* (ácido resistente) y contra las bacterias Gram positivas incluidas en el ensayo.

En cuanto a la concentración mínima inhibitoria (CM) se observó que no en todos los casos el producto C₂ presentó la mayor actividad, lo cual puede deberse a que existen otras sustancias que dan lugar a que algunas de las fracciones sin purificar o el extracto etanólico inicial manifiesten mayor actividad.

De acuerdo con los resultados que aparecen en la Tabla I, C₂ presenta una CMI de 62,5 mcg./ml. frente a algunas bacterias Gram positivas, valor que según Mitscher y col. (15) está en el límite dentro del cual un antibiótico puede ser clínicamente útil.

TABLA I

RESULTADOS DE LA DETERMINACION DEL ESPECTRO DE ACCION ANTIBACTERIANA Y DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA APROXIMADA DE DIFERENTES FRACCIONES DE *Chromolaena tequendamensis*

MICROORGANISMOS	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (mcg./ml.)					
	ET	A	B	C	D	C ₂
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1.000	250	250	500	62,5	1.000
<i>Brocella sp.</i>	1.000	1.000	1.000	250	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	1.000	1.000	1.000	-	-	500
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	-	500
<i>Streptococcus fecalis</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	-	500
<i>Staphylococcus albus</i>	62,5	500	500	250	125	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	62,5	125	125	250	125	62,5
<i>Micrococcus flavus</i>	500	1.000	500	125	250	125
<i>Sarcina lutea</i>	62,5	250	250	125	250	125
<i>Shiguella sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus anthracis</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
<i>Staphylococcus epidermis</i>	62,5	62,5	62,5	250	62,5	500
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-

- A: Fracciones VI y VII
- B: Fracciones VIII-X
- C: Fracción XI
- D: Fracción XVI
- ET: Extracto etanólico
- C₂: Fracción obtenida por cromatografía en columna

El hecho de que una misma sustancia posea ambas actividades [antibacteriana y antifúngica], puede tener importancia en terapéutica para los casos en que se presentan infecciones cruzadas por hongos como un efecto secundario a la terapia con antibacterianos.

Agradecimientos. Los autores agradecen a COLCIENCIAS y la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA por su apoyo financiero dentro del proyecto "Contribución al estudio de la acción antimicrobiana de algunas plantas colombianas".

BIBLIOGRAFIA

1. NICKELL, L.G.: *Economic Botany*. 13, 281-282 (1959).
2. PITTS, O.M., THOMPSON, H.S. & HOCH, J.M.: *J. Pharm. Sci.* 58, 379-380 (1969).
3. MITSCHER, L.A., WU, W., DOSKOTCH, R.W. & BEAL, J.L.: *Lloydia* 35, 167-176 (1972).
4. GHARBO, S.A., BEAL, J.L., DOSKOTCH, R.W. & MITSCHER, L.A.: *Lloydia* 36, 349-351 (1973).
5. GUPTA, S.K. & BANERJEE, A.B.: *Lloydia* 39, 218-222 (1976).
6. HUFFORD, C.D., SHARMA, A.S. & OGUNTINEIN, B.O.: *J. Pharm. Sci.* 69, 1180-1182 (1980).
7. BENJAMIN, T.B. & LAMINKANRA, A.: *Quart. J. Crude Drug Res.* 19, 93-96 (1981).
8. LE-VAN, N. & PHAM, T.V.C.: *Phytochemistry* 18, 1859-1861 (1979).
9. FERRARO, G.E., MARTINO, V.S. & COUSIO, J.D.: *Phytochemistry* 16, 1618-1619 (1977).
10. RAO, K.V. & ALVAREZ, F.M.: *J. Nat. Prod.* 44, 252-256 (1981).
11. CARRERO, M.T.: Aislamiento de los constituyentes con actividad antimicrobiana de *Chromolaena tacotana*. Tesis, Universidad Nacional, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Bogotá, 1983.
12. AKPATA, E.S., LEEDS, B.C.D. & AKINRIMISI, E.O.: *Oral Surg.* 44, 717-721 (1977).
13. BOAKYE-YIADOM, K., FIAGBE, N.I.Y. & AYIM, J.S.K.: *Lloydia* 40, 543-545 (1977).
14. CARLSON, H.J., DOUGLAS, H.G. & ROBERTSON, J.: *J. Bacteriol.* 55, 241-248 (1948).
15. MITSCHER, L.A., LEU, R., BATHALA, M.S., WU, W. & BEAL, J.L.: *Lloydia* 35, 157-166 (1972).
16. MANTILLA, J.R.: Universidad Nacional de Colombia. Comunicación Personal (1985).
17. MANTILLA, J.R. & SANABRIA, A.: *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 4(2), 25-33 (1985).
18. SANABRIA, A. & MANTILLA, J.R.: *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* No. 15, 17-22 (1986).
19. MEYER, E. & SMITH, D.A.: *J. Chromatog.* 14, 127-129 (1964).
20. SANABRIA, A.: Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Universidad Nacional, Departamento de Farmacia, Bogotá, 1983.
21. STHAL, E.: *Thin-Layer Chromatography*. 2nd edition, Springer Verlag, Berlin Heidelberg-New York, 1969. a.p. 904. b.p. 876.
22. SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, C.G. & MORRILL, T.C.: *Spectrometric identification of Organic Compounds*. Third edition, John Wiley & Sons, New York, London, Toronto, 1974.
23. BOHLLMANN, F., SINGH, P., JAKUPO-VINC, J., KING, R.M. & ROBINSON, H.: *Phytochemistry* 21, 371-374 (1982).
24. BOHLLMANN, F., BORTHAKUR, N., KING, R.M. & ROBINSON, H.: *Phytochemistry* 21, 125-127 (1982).
25. SIMON, W. & CLERC, T.: Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Vol. I, primera edición en español, Editorial Alhambra S.A., 1970, p. 14.