

# HIDROCARBUROS Y UN DITERPENOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIINFLAMATORIA DE *Baccharis decussata*

Ahmed M. Salama\*  
Angel E. Polo\*  
Angela P. León\*  
Clara S. Medina\*  
Augusto Rivera\*\*

## RESUMEN

Del extracto en éter de petróleo de las hojas de *Baccharis decussata* fueron aislados tres compuestos. Con base en los datos químicos y espectrales, los compuestos aislados fueron identificados como los Hidrocarburos triacontano (I), hentriacontano (II) y el ácido diterpénico Kaur-16-en-19 $\alpha$ -oico. También el presente trabajo mostró un efecto antiinflamatorio de todas las sustancias y un efecto antimicrobiano alto para el ácido Kaurénico.

## SUMMARY

From the petroleum ether extract of the leaves of *Baccharis Decussata*, three compounds were isolated. On the base of spectral and chemical evidence, the isolated compounds were identified as the hydrocarbons triacontane (I) hentriacontane (II) and the diterpene Kaur-16-en-19 $\alpha$ -oic acid. Also the present study showed an antiinflammatory effect for the isolated compounds and a high antimicrobial effect for the Kaurenic acid.

## INTRODUCCION

Las informaciones fitoquímicas del género *Baccharis* que pertenece a la familia Compositae muestran el aislamiento de flavonoides citotóxicos de *Baccharis sarthroides* (1) y *B. angustifolia* Mich (2), esteroides y triterpenos de *B. Salicifolia* (3) y *B. Halimifolia* (4).

Además fueron aislados diterpenos de *B. articulata* y *B. crispa* (5,6). Trichotecnos triepóxidos de *B. megapotámica* y *B. coridifolia* mostraron ser agentes antileucémicos muy potentes (7,8,9). Así mismo fueron aislados compuestos con actividad antimicrobiana de *B. glutinosa* (10).

Las referencias de las investigaciones fitoquímicas y farmacológicas de *B. decussata* son muy limitadas y muestran únicamente el aislamiento de las flavonas nevadensina y pectolinarengina de las partes aéreas de la planta (11). En un estudio fitoquímico y farmacológico de las hojas de esta planta hemos detectado flavonoides, saponinas, triterpenos y compuestos fenólicos en el extracto alcohólico el cual mostró actividad antiinflamatoria (12).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material vegetal

Las hojas de la planta se recolectaron en el Municipio de Fusagasugá por la carretera que conduce a Viotá, Departamento de Cundinamarca, Colombia, en Junio de 1984. Un ejemplar se encuentra archivado en el Herbario Nacional Colombiano bajo el No. Col. 239935.

### Datos generales

Los puntos de fusión sin corregir, fueron tomados en el fusiómetro eléctrico Electrothermal Melting Point Apparatus, Undra S.A. No. 0322. Los espectros de UV se realizaron en el Espectrofotómetro Perkin Elmer-552.

Los espectros de IR fueron registrados en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer-700. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN fueron determinados en un espectrómetro Varian-EM-390, a 90 MHz en deuterocloroformo al 5% usando tetrametilsilano como patrón interno. Los espectros de masas registrados en un espectrómetro de alta resolución AEI MS 902 con un sistema de inyección directa y operando a 18 y 70 eV.

### Extracción

El material vegetal seco y pulverizado (1.0 Kg) se extrajo con éter de petróleo (p.e. 40-60). El extracto etéreo obtenido, filtrado y concentrado a presión reducida produjo un residuo seco de 48.8 g.

\* Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

\*\* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

# AISLAMIENTO DE TRIACONTANO (I), HENTRIACONTANO (II) Y ACIDO KAUR-16-EN-19- $\alpha$ -OICO (III)

El residuo del extracto de éter de petróleo (38 g) fue fraccionado por cromatografía en columna (116 x 5 cm) de sílica gel (765 g.) eluyendo con éter de petróleo (p.e. 40-60°) y cantidades crecientes de acetato de etilo con éter de petróleo; la separación fue controlada por cromatografía en capa delgada, desarrollando los cromatogramas con ciclohexano; acetato de etilo (80:20); se recolectaron 440 fracciones de 100 ml cada una, que fueron reunidas en 14 grupos a los cuales se les evaporó el solvente y los residuos fueron pesados obteniéndose un total de 35.6 g que muestra un rendimiento del 96.3%. Las fracciones 1-11 dieron un residuo blanco (1.72 g.) que fue cristalizado en cloroformo dando cristales en forma de escamas de la mezcla de sustancias I y II (1.02 g.) las cuales son solubles en cloroformo, benceno, e insoluble en metanol, etanol y agua; pf 69°; UV:  $\lambda$  max (CHCl<sub>3</sub>) 210 nm; IR:  $\nu$  max (película) 2975, 2950, 2870, 1460 y 720 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 90 MHz),  $\delta$  1.26 (s), y 0.90 (s); MS: m/z (%) 436 (M<sup>+</sup>, 1), 422 (0.3), 408(0.2), 407(0.4), 393(0.6), 380 (0.8), 366 (0.9) 352 (1), 338 (1), 324 (1), 295 (1), 281 (1), 267 (2), 254 (2), 239 (4), 255 (5), 211 (6), 198 (8), 183 (11), 168 (14), 155 (18), 141 (24), 127 (32), 113 (41), 99 (56), 85 (100).

Las fracciones 75-129 que constitúan el grupo No. 5 fueron eluidas con éter de petróleo: acetato de etilo (95:5), y los constituyentes fueron separados por cromatografía en capa delgada preparativa (Ciclohexano: acetato de etilo, 97: 3,4 recorridos). La cristalización en éter de petróleo: acetato de etilo (80:20) permitió la obtención de la sustancia III. (ácido Kaur-16-en-19  $\alpha$ -oico), soluble en cloroformo, etanol y metanol, insoluble en acetato de etilo, agua; pf 179 °C; UV:  $\lambda$  max (metanol) 208 nm ( $\epsilon$  = 791); IR:  $\nu$  max (nujol) 3110, 1660, 870, (CH<sub>2</sub>=C), 3400-2300 (-OH), 1695 (C=O) 1265 (C-O)<sub>cm-1</sub>; <sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 90 Mhz)  $\delta$  4.75 (2 H, dd, J=2 Hz, H-17), 2.65 (1 H,m, H-13), 2.25 (1H, m,H-5), 2.06 (2 H,s,H-15), 1.60 (2H, m,H-3), 1,27 (3H, s, Me-18), 0.97 (3H,s,Me- 20); MS: m/z (%), 302 (M<sup>+</sup>, 22), 287 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>,15), 284 (M<sup>+</sup> -H<sub>2</sub>O, 0.5), 274 (0.7), 269 (M<sup>+</sup>- CH<sub>3</sub>,H<sub>2</sub>O, 1.3), 259 (M<sup>+</sup>- C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, 27), 257 (M<sup>+</sup>- COOH,10), 256 (M<sup>+</sup>-HCOOH, 6) 243 (M<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>,CO<sub>2</sub>,28), 241(M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>, HCOOH, 29), 233 (5), 213 (29), 201(10), 187(21), 147(26), 131(95), 121(50), 119(54), 105(80), 91(100).

## Determinación de la actividad Antiinflamatoria

Los Hidrocarburos triacontano (I) y hentriacontano (II) como mezcla y el ácido Kaurénico III fueron evaluados frente a la indometacina (5 mg/Kg) y el vehículo como control utilizando carragenina para inducir el edema empleando el método de Winter (13) modificado en la forma de la medida del mercurio por los autores del presente trabajo.

Se emplearon grupos de 5 ratas albinas machos de peso corporal 250  $\pm$  20 g que recibieron por vía oral las sustancias ensayadas en dosis de 100 mg/kg en forma de suspensión acuosa con Tween 80. Luego de la administración de la sustancia, se introdujo la pata izquierda de la rata en el mercurio hasta la zona previamente marcada en la pata y se determinó el volumen del mercurio desplazado (D<sub>0</sub>). Una hora después se inyectó 0.05 ml de una suspensión (1%) recién preparada de carragenina en solución salina, en la zona metatarsiana de la pata de la rata, para producir el edema plantar.

A la hora y a las tres horas de la aplicación de la carragenina se midieron los volúmenes de mercurio desplazados por la pata de la rata (D<sub>1</sub> y D<sub>3</sub> respectivamente). Todos los ensayos se hicieron por triplicado y el promedio de los tres valores está reportado. El porcentaje de la inhibición se calculó así: 100 menos la diferencia del volumen desplazado del problema (D<sub>1</sub>-D<sub>0</sub> y D<sub>3</sub>-D<sub>0</sub>) dividido por la diferencia del volumen desplazado del control (D<sub>1</sub>-D<sub>0</sub> y D<sub>3</sub>-D<sub>0</sub>) y multiplicado por 100.

## Determinación de la actividad antimicrobiana

Con el objeto de establecer el tipo de microorganismos frente a los cuales presentaban actividad los hidrocarburos Triacontano y Hentriacontano en forma de mezcla y el ácido Kaur-16-en-19- $\alpha$ -oico, se realizó un ensayo microbiológico en serie y por duplicado empleando microorganismos de naturaleza Gram positiva y Gram negativa y una levadura (tabla 1), siguiendo el método de Mitscher y Col. (14), las sustancias fueron ensayadas en concentración de 1,5,10,15,25,50,100,150 y 200 mcg/ml, empleando alcohol etílico 96% y cloroformo como controles y Agar soya tripticasa como medio de cultivo. Se observó la ausencia o reducción del crecimiento de los microorganismos inoculados. La lectura se hizo a las 24 horas y los resultados se reportan en la Tabla 1.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Identificación de los Compuestos I y II

Del primer grupo de fracciones obtenidas de la cromatografía en columna, se aisló por cristalización repetitiva en cloroformo, una sustancia (0.13%) en forma de cristales p.f. 69°C. Su espectro de masas presenta el pico del ión molecular a m/z 436, que sugiere una fórmula química de un hidrocarburo saturado C<sub>31</sub>H<sub>64</sub> lo cual se confirma por el espectro IR, característico de este tipo de compuestos que presenta bandas a  $\nu$  máx 2975, 2950, 2870 cm<sup>-1</sup> debidas al estiramiento C-H y 1460, 720 cm<sup>-1</sup> por deformaciones C-C y C-H; el espectro <sup>1</sup>H-RMN presenta una señal a 1,26 que corresponde a los protones de los CH<sub>2</sub> de la molécula.

En el espectro de masas se observa una forma de fragmentación que corresponde a las pérdidas de -

TABLA No. 1

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA  
DE LOS HIDROCARBUROS TRIACONTANO,  
HENTRIACONTANO Y ACIDO KAUR-16-EN-19- $\alpha$ -OICO**

Microorganismos Ensayados	Sustancia ensayada	Concentración de la sustancia (mcg/ml)								
		1	5	10	15	25	50	100	150	200
<b>Candida albicans</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Streptococcus faecalis</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Bacillus anthracis</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Bordetella bronchiseptica</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Staphylococcus aureus</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Sarcina lutea</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Staphylococcus pneumoniae</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Serratia marcescens</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Staphylococcus epidermidis</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Klebsiella pneumoniae</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Bacillus cereus</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Proteus vulgaris</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Salmonella typhi</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Escherichia coli</b>	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) = Crecimiento; (-) = No crecimiento; ( $\pm$ ) = Reducción del crecimiento.

I = Mezcla de Hidrocarburos Triacontano y Hentriacontano; II = Acido Kaurénico

$\text{CH}_2$ -secuenciales, es decir, 14 u.m.a. cada vez, también la presencia de picos de una serie de iones de hidrocarburos a  $m/z$  29, 43, 57, 71, 85, 99, 113, etc., y una serie de iones  $\text{C}_n\text{H}^{+}_{2n-1}$  a  $m/z$  27, 41, 55, 69, 83, 97, 111, etc., de una abundancia moderada; el espectro muestra una intensidad decreciente de los picos desde el extremo de baja masa hasta el pico del ión molecular, también se observa fácilmente el pico del ión molecular con una intensidad moderada, lo cual indica posiblemente que el compuesto no es Hidrocarburo ramificado; sin embargo se encuentra otro pico a  $m/z$  422, a una diferencia de 14 u.m.a., es decir un  $-\text{CH}_2-$  con el pico a  $m/z$  436, lo que indica que la sustancia aislada es una mezcla de los homólogos triacontano  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{28}-\text{CH}_3$  (I) y hentriacontano,  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{29}-\text{CH}_3$  (II).

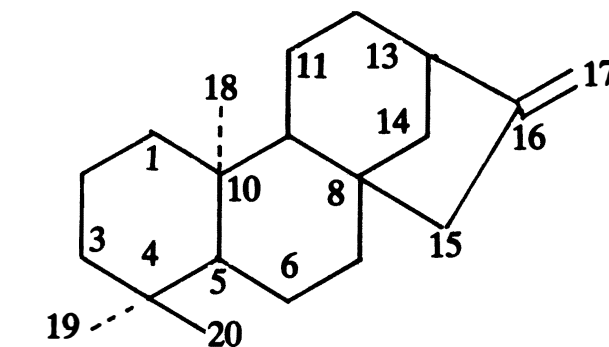
En el presente trabajo se está reportando por primera vez, el aislamiento de los hidrocarburos triacontano y hentriacontano de *B. decussata*, ya que no han sido reportados previamente en ninguna especie del género *Baccharis*.

### Identificación del compuesto III

El residuo del grupo No. 5 de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna (4.30 g) mostró por cromatografía en capa delgada la presencia de nueve manchas una de las cuales es de alta intensidad. La purificación por medio de cromatografía en capa delgada preparativa seguida de cristalizaciones repetitivas en éter de petróleo-acetato de etilo (80:20) dió unos cristales incoloros de la sustancia III (0.44 g), p.f.  $179^\circ\text{C}$ , soluble en cloroformo, etanol y metanol, ligeramente soluble en benceno e insoluble en acetona, acetato de etilo, ciclohexano, éter de petróleo. El compuesto dió pruebas negativas con las reacciones de Lieberman-Burchard para esteroides y triterpenos, de Shinoda para flavonoides y no precipitó la 2,4- dinitrofenilhidrazona para grupos carbonilo. El espectro de masas presenta el pico del ión molecular a  $m/z$  302, que sugiere una fórmula química de  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ , la presencia de dos señales agudas a  $\delta$  0.97 y 1.27 que integran cada una para tres protones y un pico a  $\delta$  4.75 que integra para dos protones en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, junto con lo anterior indica que el compuesto se trata de un diterpeno tetracíclico con dos grupos metilo y un doble enlace exocíclico. El espectro de IR muestra una serie de bandas a  $\nu$  3400-2300  $\text{cm}^{-1}$  y una banda intensa a 1695  $\text{cm}^{-1}$  indicando que la sustancia tiene un grupo carboxilo, lo cual se confirma por la presencia de un pico a  $m/z$  257 en el espectro de masas causado por la pérdida de 45 u.m.a. correspondientes a  $\text{M}^+ - \text{COOH}$  y el pico de  $m/z$  259, debido a la pérdida de un  $\text{CH}_3$  y  $\text{CO}_2$  del ión molecular a  $m/z$  302. En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se observa una señal ancha intensa a  $\delta$  4.75 que integra para dos protones y muestra dos dobletes con iguales constantes de acoplamiento,  $J = 2$  Hz, indicando la presencia de un doble enlace exocíclico que se puede confirmar por las bandas a 3110, 1660 y 870  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro IR. La señal a  $\delta$  1.27 en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN que in-

tegra para tres protones muestra que existe un grupo metilo cerca a un centro electronegativo que es el grupo carboxilo y se encuentra en el C-4 junto con este grupo metilo. La forma de fragmentación de masas muestra un pico a  $m/z$  259 debido a la pérdida de  $\text{C}_3\text{H}_7$  desde el  $\text{M}^+$ . Los picos  $m/z$  257 y 213, así como la señal singlete a  $\delta$  2.06 que integra para dos protones aislados indican que el doble enlace exocíclico se encuentra en el C-16 del anillo D.

Con base en lo anterior, la sustancia se identificó como ácido Kaur-16-en-19- $\alpha$ -ioco (III). Los datos espectroscópicos y el p.f.  $179^\circ\text{C}$  están de acuerdo con los reportados (15) para dicha sustancia la cual fue aislada de *Wedelia glauca*, familia Compositae, entre otras.



HOOC

III

En el género *Baccharis* solamente se ha reportado ácido Kaur-16-en-19- $\alpha$ -ioco de la especie *B. trinervii*. Esta es la primera vez que se reporta en *B. decussata*, lo cual podría significar que éste ácido tiene algún valor taxonómico.

### Actividad antiinflamatoria

En la determinación del efecto antiinflamatorio de los compuestos aislados en dosis de 100 mg/kg se pudo observar que el ácido Kaur-16-en-19- $\alpha$ -ioco (III) tiene un efecto de inhibición de la inflamación de 16% a la hora y de 28.3% a tres horas de la administración de la carragenina mientras que la mezcla de los hidrocarburos Triacontano (I) y Hentriacontano (II) tiene un efecto de 25% a la hora y a las tres horas, comparados con el efecto de la indometacina (5 mg/kg) que fue de 52% a la hora y 71.7% a las tres horas.

### Actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados fue llevada a cabo con base en las informaciones encontradas en la literatura (16,17), las cuales indican que algunas especies del género *Baccharis* poseen dicha actividad. Los resultados que se encuentran en la Tabla No. 1 muestran que

la mezcla de hidrocarburos hentriacontao y triacontano no inhiben el crecimiento de los microorganismos empleados, en las condiciones del ensayo en un rango de 1 a 200 mcg/ml; de acuerdo a esto se puede afirmar que estos compuestos no poseen actividad antimicrobiana. Sin embargo, el ácido Kaur-16-en-19  $\omega$ -oico (III) en las condiciones del ensayo a una concentración comprendida entre 25-200 mcg/ml presenta actividad frente a las bacterias Gram positivas empleadas, excepto contra el *Staphylococcus aureus* mientras que de las siete bacterias Gram negativas ensayadas solamente mostró actividad contra la *Pseudomonas aeruginosa*; También presenta actividad frente a la levadura ensayada; *Candida albicans*.

Teniendo en cuenta que el ácido Kaur-16-en-19  $\omega$ -oico manifestó actividad antimicrobiana en las condiciones del ensayo, a una concentración relativamente baja (25 mcg/ml) y además posee especificidad por determinados microorganismos, como por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa* se recomienda conti-

nuar los estudios microbiológicos, para determinar la potencia de este compuesto y ver la posibilidad de aplicación como antibiótico. En la revisión bibliográfica se reportó que el ácido Kaur-16-en-19  $\omega$ -oico tiene un ligero efecto antimicrobiano (18), mientras que en el presente trabajo mostró un efecto a unas concentraciones mayores que 25 mcg/ml, indicando una muy buena actividad.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Doctor Mahmoud A. Elsohly, Research Professor, The University of Mississippi, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University, MS 38677, por la ayuda en la obtención de los espectros de resonancia magnética y de masas. Y al Programa de Productos Naturales, Depto. de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia por la financiación del trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

1. S.M. KUPACHAN and BAUER SCHMIDT, *Phytochemistry*, 10, 664, (1971).
2. H. WAGNER, M.A. IYENGAR and W. HERZ, *Phytochemistry*, 11(1), 444 (1972).
3. X.A. DOMINGUEZ, H. SANCHEZ, B.A. MERIJAMIAN and M. ROJAS, *Phytochemistry*, 11(8), 2628 (1972).
4. T. ANTHONSEN, T. BRUUN, E. HEMMER, D. HOLME, A. LAMRIK, E. SUNDE and N.A. SORENEN, *Acta Chem. Scand.*, 24(7), 2479 (1970).
5. G. STAPEL, H.G. MENBEN and G. SNATZKE, *Planta Médica*, 39(4), 366, (1980).
6. C.E. TONN, J.C. GIANELLA and O.S. GIOR-DANO, *An. Asoc. Quím. Argent.*, 67(1), 1 (1979).
7. S.M. KUPCHAN, W. JARVIS, R.F. BRYAN and Y. SHIZURI, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (22), 7092-93 (1976).
8. S.M. KUPCHAN, B.B. JARVIS, N.S.S. KUPCHAN and R.G. DAILEY, *Ger. Offen*, 2(846), 210 (1979).
9. G.A. HABERMEHL, L. BUSAM and STEGEMANN, *Z. NATURRSCH. C. BIOSCI.*, 39c(3-4), 212, (1984).
10. M. MIYAKADO, T. KATO, N. OHMO and T.I. MABRY, *Phytochemistry*, 15 (5), 846 (1976).
11. A. MORALES, O. NUÑEZ, C. ROSQUETE and MANTILLA, *An. Quim, Ser. C.* 80(1), 98 (1984).
12. A.M. SALAMA, A.E. POLO, C.R. CONTRERAS y L. MALDONADO, *Revista Colombiana Ciencias Químico Farmacéuticas*. No. 16, 45, (1987).
13. C.A. WINTER, E.A. RISLEY and G.W. NUSS, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N.Y. 111, 544(1962).
14. L.A. MITSCHER, P.R. LEW, M.S. BATHALLA and J.J. BEAL, *Lloydia* 35, 157 (1972).
15. J.C. OBERTI, A.B. POMILIO and E.G. GROS, *Phytochemistry*, 19, 2051, (1980).
16. R. WASICKY, O. UNTI and E. BARBIERI, *Anais Faculdade Farm. Odontol, Univ. Sao Paulo*, 3, 137 (1942).
17. E. GANTIER, *Bol. Acad. Nac. Cienc. (Córdoba)*, 40(214), 209, (1958).
18. E.K. ADESOGAN and J.I. DURODOLA, *Phytochemistry*, 15(8), 1311 (1976).