

TIMOL Y CARVACROL: SUSTANCIAS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Ageratina ibaguensis*

Antonio Sanabria-Galindo*, Nancy Arciniegas e Ingrid Suárez

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.
E.-Mail: asanab@ciencias.ciencias.unal.edu.co

RESUMEN

Mediante métodos de extracción y de separación bioguiados utilizando bacterias Grampositivas (*Staphylococcus aureus*), Gramnegativas (*Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*), hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Mucor* sp. y *Fusarium oxysporum*) y una levadura (*Candida albicans*), se logró el aislamiento e identificación por métodos espectroscópicos de timol y carvacrol como principales sustancias responsables de la actividad antibacteriana y antifúngica de *Ageratina ibaguensis*.

Palabras claves: Actividad antibacteriana - Actividad antifúngica - Actividad antimicrobiana - *Ageratina ibaguensis*.

SUMMARY

THYMOL AND CARVACROL: COMPOUNDS FROM *Ageratina ibaguensis* WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

By means of extraction and bioguided separation, using antimicrobial test with Gram positive (*Staphylococcus aureus*), Gram negative (*Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Scherichia coli*), filamentous fungus (*Aspergillus niger*, *Mucor* sp, and

Fusarium oxysporum) and the yeast (*Candida albicans*), thymol and carvacrol were isolated and identified by spectroscopic methods. Thymol and carvacrol are the main compounds with antibacterial and antifungal activity of *Ageratina ibaguensis*.

Key words: Antibacterial activity - Antifungal activity - Antimicrobial activity - *Ageratina ibaguensis*.

INTRODUCCIÓN

No obstante los innegables triunfos de la quimioterapia antimicrobiana, la cual ha revolucionado la práctica farmacéutica y médica y, muy probablemente, represente el principal logro de las ciencias biomédicas, los "microbios" no han sido en absoluto "vencidos", pues se ha visto un aumento en la prevalencia de cepas resistentes a medicamentos, lo que ha motivado la búsqueda de agentes antimicrobianos más eficaces, a partir de fuentes naturales y de síntesis (1).

Debido a lo anterior y a la necesidad de encontrar sustancias con actividad antimicrobiana que puedan ser aplicadas no sólo en el campo terapéutico, sino también en agricultura, se inició la evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de 56 especies de Angiospermas colombianas por los métodos de inoculación en superficie para bacterias y levaduras y de perforación y difusión en gel para hongos. Entre las especies que presentaron actividad antimicrobiana significativa en estos estudios se encuentra *Ageratina ibaguensis* (2, 3).

Recibido para evaluación: Septiembre de 1998
Aprobado para publicación: Junio de 1998

Posteriormente Sanabria-Galindo y col. (4) comprobaron dicha actividad, además de lograr la caracterización preliminar de una sustancia con actividad antimicrobiana en dicha especie. Por este motivo con el presente trabajo se pretende separar e identificar las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana, mediante diferentes métodos cromatográficos utilizados en estrecha relación con la evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de las diferentes fracciones.

PARTE EXPERIMENTAL

Material Vegetal

La especie analizada se colectó en Colombia, Cundinamarca, municipio de Chipaque, a 18 Km. de Bogotá y una altitud de 2.800 metros sobre el nivel del mar. Un espécimen de herbario se determinó como *Ageratina ibaguensis* (Schultz Bip. Ex Hieron) R.M. King & H. Robinson (Asteraceae), el cual reposa en COL bajo el número 364799. Para el desarrollo del trabajo se utilizó la parte aérea (hojas y flores); el material se secó en una estufa con aire circulante a 50°C, se molió y se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

Microorganismos de Ensayo

Los microorganismos para las pruebas se seleccionaron teniendo en cuenta su empleo en ensayos de susceptibilidad a antibióticos y el ser representativos de grupos microbianos de importancia clínica y agrícola (5). Se emplearon bacilos Gram negativos: *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 y *Escherichia coli* ATCC 13706; el coco Gram positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 13706; la levadura *Candida albicans* ATCC 10231; los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. y *Fusarium oxysporum* del cepario del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.

Ensayos microbiológicos

Los microorganismos se mantuvieron en el cepario, cada uno, en tubos de taparrosca que contenían agar en cuña, utilizando agar Mueller-Hinton y agar Sabouraud-dextrosa al 2% para bacterias y hongos respectivamente. Se conservaron bajo refrigeración a 4°C y a estos cultivos se les denominó cepas de mantenimiento (6).

Preparación de los inóculos de bacterias y de levaduras

Las cepas de mantenimiento de cada bacteria se sembraron por estrías en placas con agar Mueller-Hinton, se incubaron a 37 °C por 24 horas. Una colonia del anterior cultivo se sembró en 25 mL de caldo Mueller-Hinton, se incubó a 37 °C por 24 horas, se homogenizó y se hizo una resiembra de 40 mL de este cultivo en 25 mL del mismo caldo y se incubó por 18 horas a la misma temperatura y se hicieron las siguientes diluciones en solución salina: bacterias gramnegativas 1:100.000 y para las bacterias grampositivas y *Candida albicans* 1:100, con lo cual se obtuvo una población entre 10^7 y 10^8 UFC (unidades formadoras de colonias) por caja, número recomendado en la literatura para este tipo de ensayos (7). Para *Candida albicans* se llevó a cabo el mismo procedimiento cambiando únicamente caldo Mueller-Hinton por caldo Sabouraud-dextrosa al 2%.

Preparación del inóculo de hongos

Para la preparación de cada inóculo se realizó previamente un microcultivo, con dos rodajas de agar Sabouraud-dextrosa al 2% (diámetro 1 cm. y altura 3 mm), a las cuales se les realizó un repique en cuatro puntos equidistantes con el hongo correspondiente; se incubó a 27° C por 72 horas, se suspendieron las rodajas en 10 mL de solución salina 0.9% estéril y se homogenizó por un minuto en agitador Vortex.

Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Antifúngica

Método de perforación y difusión en gel. Este método permite hallar la **Concentración Crítica**, que es el cálculo teórico de la concentración a la cual se inicia la formación de la zona de inhibición. Esta representa una medida de la susceptibilidad de un organismo prueba (8).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las distintas fracciones de *Ageratina ibaguensis* se tomaron 0.5 mL de las diluciones indicadas antes para cada microorganismo y se inocularon sobre 25 mL del agar correspondiente mantenido a 42°C, se homogenizó en Vortex y se vertió en cajas de Petri estériles de 90 mm de diámetro, se dejó solidificar y se hicieron 7 perforaciones equidistantes de 7 mm de diámetro; en las perforaciones se aplicaron 100 mcL del solvente (etanol), del patrón y 5 concentraciones del extracto o fracciones, se dejó en predifusión por 30 minutos a temperatura ambiente, se incubó a 37°C y se hicieron lecturas a las 24 y 48 horas. En el caso de las bacterias se empleó agar Müeller-Hinton y la sustancia patrón sulfato de estreptomicina a 400 mcg/mL frente a *Pseudomonas aeruginosa* y 40 mcg/mL contra las demás bacterias; en el caso de los hongos y la levadura se siguió el mismo procedimiento, cambiando agar Müeller-Hinton por agar Sabouraud-dextrosa al 2% y la temperatura de incubación a 27°C, se utilizó como patrón isoconazol a 500 mcg/mL para *Fusarium oxysporum* y *Mucor sp.* y 62.5 mcg/mL para *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, las lecturas se realizaron a las 48 y 72 horas.

Una vez realizadas las lecturas de los halos de inhibición, se graficó el logaritmo natural de las concentraciones contra el cuadrado de los halos de inhibición; se trazó la recta y el punto de intersección con el eje de las ordenadas correspondió al valor de la Concentración Crítica (CC) (4,8,9).

Método del tubo pequeño. Mediante este método es posible determinar la **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)** (8, 10). Se emplearon las siguientes concentraciones de sustancias para los distintos microorganismos de ensayo:

Bacterias: Sulfato de estreptomicina 10, 20, 40, 80 mcg/mL.

Candida albicans y *Aspergillus niger*: Nitrato de isoconazol 15.6, 31.25, 62.5, 125 mcg/mL. *Mucor sp.* y *Fusarium oxysporum*: Nitrato de isoconazol 62.5, 125, 250, 500 mcg/mL

Para los extractos y fracciones: 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 mcg/mL disueltos en etanol del 95%.

En estas condiciones la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del sulfato de estreptomicina para las distintas bacterias osciló entre 30 y 80 mcg/mL y el Nitrato de isoconazol 62.5 mcg/mL para *Candida albicans* y *Aspergillus niger* y 500 mcg/mL para *Fusarium oxysporum* y *Mucor sp.*

El ensayo se hizo en viales de 4.2 cm de altura x 2 cm de diámetro de la base, que contienen 1.5 mL del medio, el cual produce un espesor de la capa de agar de 3 mm. A un vial con 1.5 mL de agar Müeller-Hinton a 42 ± 2°C se le adicionaron 50 mcL de las diferentes concentraciones de la muestra (blanco, extracto o patrón), se homogenizó en un vortex, se dejó solidificar y sobre la superficie se agregaron 40 mcL de la suspensión del microorganismo previamente homogenizado, se incubó a 37°C y se observó el crecimiento a las 24 y 48 horas.

Para *Candida albicans* y hongos se cambió agar Müeller-Hinton, por agar Sabouraud-dextrosa al 2%, temperatura 27°C y las lecturas se realizaron a las 48 y 72 horas.

Extracción y separación

1.5 Kg de material vegetal seco y pulverizado se extrajeron por percolación durante tres semanas con 10 litros de etanol al 95%. El extracto etanólico (EE) se concentró en evaporador rotatorio a 40°C y se obtuvieron 266 g de residuo.

258 g del residuo del extracto etanólico se redisolviéron en la mínima cantidad de etanol hirviendo y se precipitaron las clorofilas con (AcO)₂Pb al 4 % que contenía 0.5 % de AcOH. El filtrado se concentró a 2/3 del volumen y se extrajo con CHCl₃, la fase clorofórmica se deshidrató con

Na_2SO_4 , se evaporó el solvente y se obtuvieron 13 g del extracto clorofórmico (EC).

Los extractos etanólico (EE) y clorofórmico (EC) se evaluaron microbiológicamente frente a los microorganismos mencionados, mediante los métodos de perforación y difusión en gel y del tubo pequeño.

Purificación del extracto clorofórmico (EC) por cromatografía "flash".

El extracto clorofórmico (8g) se separó en una columna (105x420 mm) con 560 g de sílica gel H tipo 60. La columna se eluyó con CH_2Cl_2 -hexano-AcOEt 40:55:5 (fracciones A, B y C), 40:50:10 (D) y 40:30:30 (E). Se recogieron fracciones de 100 mL, se inspeccionaron por cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando como eluyente diclorometano-hexano-acetato de etilo 40:55:5 y como reveladores vapores de yodo y vainillina (1%)-ácido sulfúrico (5%)-ácido acético (20%)-etanol del 95% (45%)-agua (29%) seguido de calentamiento a 100 °C. Se combinaron las fracciones similares cromatográficamente y al final se obtuvieron 5 fracciones: A(1.5 g, Rf 0.67); B(2.0 g, Rf 0.67; 0.54); C(0.2 g, Rf 0.67; 0.47; 0.36); D(0.3 g, Rf 0.33); E(0.3, Rf 0.45; 0.25). Se determinó la actividad antimicrobiana de estas 5 fracciones.

Cromatografía en Columna de las Fracciones A y B

Las fracciones A (1 g) y B (1.7 g), las cuales presentaron la mayor actividad antimicrobiana, se separaron en columnas con 40 y 60 g de sílica gel H tipo 60, se inició la elución con hexano-acetona 98:2 y se finalizó con la misma mezcla en proporción 95:5; se obtuvieron 54 fracciones de 10 mL de A y 53 de B. Las fracciones se reunieron con base en sus semejanzas cromatográficas obteniéndose siete fracciones mayores de A (A1-A7) y cinco fracciones mayores de B (B1-B5), las que se evaluaron microbiológicamente.

Cromatografía Preparativa

Como la fracción B4 presentó la mayor actividad antimicrobiana, se purificó por CCD preparativa, utilizando como soporte sílica gel 60 GF₂₅₄ de 0.5 mm de espesor y eluyente CH_2Cl_2 -hexano-AcOEt (40:55:3) en doble recorrido. La elución de las bandas con CHCl_3 -MeOH 90:10 produjo 9 mg de B4a (Rf = 0.65), 112 mg de B4b (Rf = 0.52) y 6 mg de B4c (Rf = 0.26).

Identificación

En un espectrómetro Bruker WM de 250MHz, se registró el espectro de RMN^1H de 20mg de la fracción mayoritaria B4b disuelta en CDCl_3 . El análisis de dicho espectro permitió observar que la fracción B4b correspondía a una mezcla de sustancias y por esta razón se intentó separarla e identificarla mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. Este análisis se realizó en un cromatografo HP 5890A serie II, columna DB-5 (5% fenil-metil polisiloxano) de 30m; inyector 250°C; detector FID (250°C); split 1:10; gas de arrastre helio; voltaje de ionización de 70 eV de impacto electrónico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se muestra en la Tabla 1, las CMI obtenidas por el método del tubo pequeño y las CC por el método de difusión en agar del extracto clorofórmico (EC) son inferiores a las del extracto etanólico (EE), lo cual indica que mediante el proceso de purificación llevado a cabo se logra una mayor concentración de principios activos en EC. En términos generales, se observa que la CC es entre 5 y 10 veces menor que el intervalo de CMI y el poder calcular un valor preciso de CC es ventajoso en la apreciación cuantitativa de la actividad antibacteriana y antifúngica, resultados que son útiles cuando se pretende aislar las sustancias con mayor actividad biológica en una especie vegetal. Por lo anterior, en el proceso de

separación se evaluó la CC de las distintas fracciones utilizando los microorganismos más sensibles a los extractos EE y EC.

La separación por una columna rápida ("flash") del extracto clorofórmico dió lugar a 5

fracciones A, B, C, D y E entre las cuales A y E produjeron los menores valores de CC frente a los 6 microorganismos de ensayo que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Crítica (CC) de los extractos etanólico (EE) y clorofórmico (EC) de *A. Ibaguensis*

EXTRACTO MICRO.	ETANOLICO		CLOROFORMICO	
	CMI	CC	CMI	CC
<i>S. typhi</i>	3200-6400	533	1600-3200	135
<i>K. pneumoniae</i>	•	*	3200-6400	473
<i>P. aeruginosa</i>	•	*	3200-6400	602
<i>E. coli</i>	•	*	3200-6400	528
<i>S. aureus</i>	1600-3200	242	200-400	239
<i>A. niger</i>	3200-6400	1465	800-1600	735
<i>F. oxysporum</i>	1600-3200	1274	1600-3200	403
<i>Mucor sp.</i>	3200-6400	796	800-1600	411
<i>C. albicans</i>	1600-3200	720	1600-3200	821

• No se determinó a las concentraciones trabajadas. * No se tienen los datos necesarios para hallar la CC

Las fracciones A y B se separaron por cromatografía en columna, obteniéndose después de combinar las fracciones iniciales, 7 fracciones de A (A1-A7) y 5 de B (B1-B5) entre las cuales A6 y B4 presentaron la mayor actividad antimicrobiana; como se aprecia en la Tabla 2, la fracción B4 muestra mayor actividad que A6 (menores valores de CC) y por esta razón sus constituyentes se separaron por CCD preparativa dando lugar a las fracciones B4a, B4b y B4c, entre las cuales B4b mostró una significativa actividad antibacteriana y antifúngica (Tabla 2).

En las Tablas 1 y 2 se aprecia claramente como a través del proceso de purificación se incrementa gradualmente la actividad antibacteriana y antifúngica (disminuye la CC) de las distintas fracciones, a excepción de la actividad sobre *Candida albicans* en donde se observa que la fracción B4 tiene mayor actividad (CC=110 mcg/mL) que B4b (CC=320 mcg/mL).

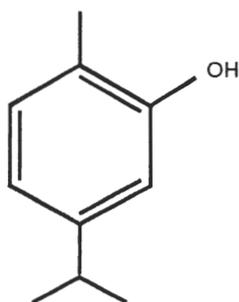
Como se expuso antes, el espectro de RMN¹H de B4b puso en evidencia que esta fracción correspondía a una mezcla de por lo menos 2 sustancias. El cromatograma de gases de B4b

muestra dos sustancias mayoritarias con tiempos de retención de 33.77 min. (B4b-1) y de 34.38 min. (B4b-2) y sus áreas son de 20,9 y 35,1 % respectivamente. Los espectros de masas de estas dos sustancias son iguales y en ellos se observa un M⁺ (ión molecular) a m/z 150 (37%), el pico base a m/z 135 (M-CH₃), un pico a m/z 117 (9%; 135-H₂O), uno a m/z 91 (18%) que corresponde al ión tropilío. De acuerdo con la base de datos WILEY138.L, con una probabilidad del 90 % estos 2 espectros corresponden al carvacrol y también son iguales al publicado por Budzikiewicz (11) para el timol

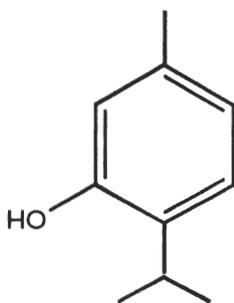
Lo expuesto antes lleva a concluir que B4b-1 y B4b2 corresponden al timol y al carvacrol, pero no se tuvo la oportunidad de aplicar patrones internos para establecer cual tiempo de retención corresponde a cada una de estas 2 sustancias.

Con base en los anteriores resultados se evaluó la actividad antimicrobiana de un patrón de timol frente a los mismos 6 microorganismos; como se muestra en la Tabla 2, la actividad antimicrobiana del timol no difiere significativamente de la actividad de la fracción B4b, resultado que

insinúa que el timol puede ser el componente mayoritario responsable de la actividad antimicrobiana de *Ageratina ibaguensis*. Desde el punto de vista filogenético, de *Ageratina glechonophylla* también se aislaron derivados del timol y cromenos (12,13).



CARVACROL



TIMOL

Tabla 2. Concentraciones Críticas de fracciones aisladas de *Ageratina ibaguensis* y del timol

CC (mcg/mL) / MICRO.	A	B	A6	B4	B4b	Timol
<i>S. typhi</i>	478	347	432	67	67	65
<i>P. aeruginosa</i>	252	157	164	130	67	57
<i>S. aureus</i>	37	148	148	75	23	33
<i>Mucor</i> sp.	645	418	*	61	80	75
<i>F. oxysporum</i>	403	314	361	213	270	270
<i>C. albicans</i>	206	608	1086	110	320	317

* Datos insuficientes para calcular la CC

Agradecimientos

Se agradece al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional y a COLCIENCIAS por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo a través del proyecto "Búsqueda de principios bioactivos en plantas medicinales colombianas" que dirige el doctor Roberto Pinzón. A la doctora Elena Stashenko de la UIS por los cromato-

gramas de gases acoplados a espectrometría de masas.

BIBLIOGRAFÍA

1. A.F. Bob. "Microbiología de Burrows", Ed. Interamericana, Mc Graw-Hill, México 1989, pp. 420, 428, 511, 545, 622, 1061.
2. J.R. Mantilla y A. Sanabria. Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. *Rev. Col. Cienc. Quím.-Farm.* 4 (2), 25-30 (1985).
3. A. Sanabria y J.R. Mantilla. Actividad antifúngica de plantas superiores colombianas. *Rev. Col. Cienc. Quím.-Farm.* N° 15, 17-22 (1986).
4. A. Sanabria-Galindo, G.R. Sarmiento y M.A. Rodríguez.. Actividad antifúngica y antibacteriana de *Ageratina ibaguensis*. *Rev. Col. Cienc. Quím.-Farm.* N° 23, 58-63 (1995).
5. M.M. Quetin y S.W. Russell. "Bacteriología y Micología Médicas", Segunda edición, Interamericana Mc Graw Hill, 1991, pp. 22, 301.
6. B.E. Kirsop and J.J.S. Snell. "A Manual of Laboratory Methods", Ed. Academic Press Inc. London, 1984, pp. 92-93.
7. W.B. Hugo and A.D. Rusell. "Pharmaceutical Microbiology", Blackwell Scientific Publications, 1977, p. 103.
8. V. Lorian. "Antibiotics in Laboratory Medicine", Williams & Wilkins, 1981, pp. 27-31.
9. F. Kavanagh. "Analytical microbiology", 2nd print, Academic Press, New York, 1979, pp. 58, 59, 126.
10. P. Catafolmo and H.W. Schultz. Small tube method for the evaluation of antifungal and antibacterial activity. *J. Pharm. Sci.* 55, 117-19 (1966).
11. H. Budzikiewicz, C. Djerassi and D.H. Williams. "Structure elucidation of natural products by mass spectrometry", Ed. Holden-Day, Inc. San Francisco, 1964, p. 150.
12. G. Delle Monache, F. Delle Monache, J. Becerra, M. Silva and F. Menichini.. Thymol derivatives from *Eupatorium glechonophyllum*. *Phytochemistry* 23, 1947-50 (1984).
13. A.G. González, C. Yanes Hernández and J. Bermejo Barrera. Thymol derivates and a chromene from *Ageratina glechonophylla*. *Phytochemistry* 31, 714-16 (1992).