

CONSTITUYENTES NO POLARES DE LA CORTEZA DE *Esenbeckia alata* Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

CHEMICAL CONSTITUENTS OF NON-POLAR *Esenbeckia alata* BARK AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Olimpo García Beltrán, Luis Enrique Cuca Suárez*

Recibido: 02/06/03 – Aceptado: 30/06/03

RESUMEN

De la corteza de *Esenbeckia alata* (Rutaceae) se aislaron cuatro compuestos identificados como: 5-hidroxi-2-metil-cromanona aislado por primera vez en vegetales (en este trabajo se completan sus datos espectroscópicos), (-)-episesamina, la amida pellitonina y sitosterol. La elucidación estructural de estos compuestos se realizó mediante técnicas espectroscópicas (IR, UV, RMN ^1H y ^{13}C y EM).

Se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de éter de petróleo de *E. alata*, de algunas fracciones de ésta, y del lignano obtenido, presentando resultados significativos frente algunas cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas.

Palabras clave: Rutaceae, *Esenbeckia alata*, cromanona, lignanos, amidas, esteroides, antimicrobianos.

ABSTRACT

From the bark of *Esenbeckia alata* (Rutaceae), were identified four isolated compounds as: 5-hydroxy-2-methyl-chromanone, obtained by first time from plants (in this work their data spectroscopic are completed), (-)-episesamin, the amide pellitonin and sitosterol. The structural elucidation of the isolated compounds was carried out by means of spectroscopical techniques (IR, UV, RMN ^1H and ^{13}C and EM).

Key words: Rutaceae, *Esenbeckia alata*, chromanone, lignans, amides, sterols, antimicrobial.

The antimicrobial activity of the petroleum ether extract of *E. alata*, of the fractions and of the lignan was evaluated, the results were significant in front of some stumps of bacterias Gram positive and Gram negative.

* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: lécucas@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

El género *Esenbeckia* pertenece a la familia Rutaceae; está conformado por 38 especies nativas de América tropical (1). *Esenbeckia alata* es un arbusto medicinal cuya ecología es variada, encontrándose en diferentes zonas de nuestro país (2). En la Costa Atlántica colombiana le dan el nombre de "loro"; sus partes aéreas se utilizan como febrífugo e insecticida. De *E. alata* no se conocen estudios fitoquímicos; en miembros del género *Esenbeckia* se han reportado trabajos en metabolitos secundarios de tipo, alcaloides quinolínicos e indólicos (3), flavonoides (4) coumarinas, polifenoles y limonoides (5).

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal: la muestra de corteza de *E. alata* fue colectada en el municipio de Colosó (Sucre), Estación Experimental Primates, y determinada por el biólogo Olimpo García Beltrán. Un ejemplar reposa en el Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, con No. Col 481090.

Extracción y aislamiento: el material vegetal (1757 g) seco y molido fue extraído por maceración a temperatura ambiente con etanol (EtOH) al 96%, obteniéndose 96 g de extracto etanólico; éste se fraccionó por reparto, utilizando solventes de polaridad creciente, éter de petróleo (EdP), Cloroformo (CHCl₃), Acetato de etilo (AcOEt), Isopropanol (ip-OH) y agua (H₂O). De la fracción EdP se obtuvieron 22 g. Parte de éstos (19 g) fueron fraccionados por CC en silica gel (750 g) y eluida con EdP/AcOEt de pola-

ridad creciente. Las fracciones resultantes según su estudio en CCD fueron reunidas en un total de 19. La fracción 8 se purificó por CC repetitiva y eluida con una mezcla de EdP/AcOEt 8:2 y 7:3, obteniéndose los compuestos **1** (4 mg) y **2** (36 mg). De la fracción 9 se obtuvieron unos cristales y un aceite. Los cristales se lavaron con éter de petróleo, obteniéndose el compuesto **3** (144 mg). La fracción 13 se purificó por CC con una mezcla isocrática de EdP/AcOEt 7:3, obteniéndose el compuesto **4** (12 mg).

Test de inhibición de crecimiento bacteriano: para este test se siguió el método de difusión en agar (6) estandarizado en el laboratorio de microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. El inóculo se preparó por medio del método de turbidimetría para obtener una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonia y posteriormente adicionarlas al agar Muller-Hinton y dejar gelatinizar por 15 min en cajas de Petri de 20 cm de diámetro. Posteriormente se adicionaron los extractos y las fracciones a ensayar, y se incubaron por un periodo de 24 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del extracto EdP de *E. alata* se han aislado e identificado los compuestos **1-4**. El compuesto **1** es un sólido de p.f. 46-48°C; su espectro de masas indica un peso molecular de 178,1872 u.m.a, que corresponde a una fórmula condensada C₁₀H₁₀O₃. El espectro IR muestra señales en 3100 cm⁻¹ (OH), 3050 cm⁻¹ (C-H aromático), 2930 cm⁻¹ (C-H), 1671 cm⁻¹ (C=O), 1617 y 1582 (C=C) y 1118 cm⁻¹ (C-O). El espectro UV muestra bandas en

215 nm ($\epsilon = 0,3559$), 232 nm ($\epsilon = 0,8200$), 298 nm ($\epsilon = 0,8711$), de (C=O) y en 257 nm ($\epsilon = 0,895$), típicas de compuestos aromáticos. Su espectro de RMN ^1H muestra la señal correspondiente a un metilo en δ 1,53 (d, $J=6,4$ Hz, 3H), que según el espectro COSY ^1H - ^1H se encuentra acoplada con un sexteto en δ 4,93 ($J = 7,2; 6,4; 1\text{H}$), el cual a su vez está acoplado también con un doblete en δ 2,93 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H). En la región aromática aparecen señales de un sistema ABC en δ 6,7 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H) δ 6,9 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H) y δ 7,4 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H). A campo bajo se encuentra una señal desplazada a δ 11,0 (s, 1H), muy típica de un protón hidroxílico quelatado con un carbonilo (7).

La estructura de este compuesto se elucidó con base en experimentos de RMN ^{13}C JMOD, HMQC y HMBC. Así, el primero de ellos muestra señales para diez carbonos, que se distribuyen así:

Cuatro carbonos cuaternarios (δ 214,1, δ 163,0, δ 139,0 y δ 108,0), de los cuales los tres primeros son oxigenados. Tres carbonos metínicos (δ 136,5, δ 118,2 y δ 116,6), que según el experimento HMQC se encuentran conectados a los protones del sistema aromático ABC. Tres señales de carbono alifáticos, de los cuales la señal en δ 76,4 pertenece a un carbono oximetino que se encuentra conectado al protón en δ 4,93; el metileno en δ 35,0 correlaciona con los protones en δ 2,93 y el metilo en δ 21,1 se corresponde con el triplete en δ 1,53.

Hay varias conectividades importantes en el experimento HMBC; así, los protones del metilo en δ 1,53 con los

carbonos oximetínicos en δ 76,4 y metilénico en δ 35,0; los protones de este último δ 2,93 con un carbono cuaternario oxigenado δ 108,0. El protón en δ 6,90 se encuentra conectado con los carbonos de δ 116,6, δ 139,0 y δ 163,0. También se observa que el protón quelatado se encuentra correlacionado con los carbonos δ 108,0, δ 116,6 y δ 163,0. El carbono δ 108,0 tiene dos conectividades muy importantes para determinar la estructura completa de la molécula, ya que en el experimento HMBC se detectan correlaciones con el hidroxilo quelatado y con dos protones del sistema aromático ABC, lo cual fija automáticamente la posición del carbonilo (Figura 1). De esta manera, dicha sustancia corresponde a la 5-hidroxi-2-metilcromanona (8) que se reporta por primera vez en vegetales aunque anteriormente ha sido aislada de hongos. Todas las asignaciones espectroscópicas se reportan para este compuesto (Tabla 1).

El compuesto 2 se ha reportado en un gran número de especies y ha sido

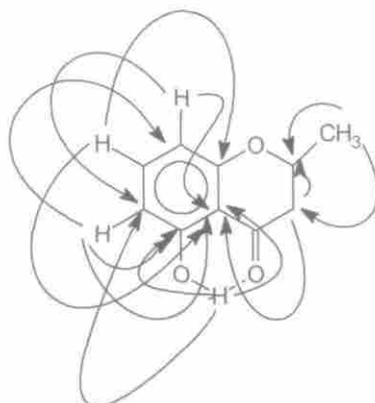
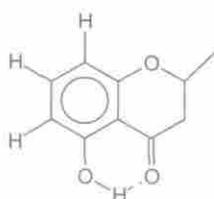


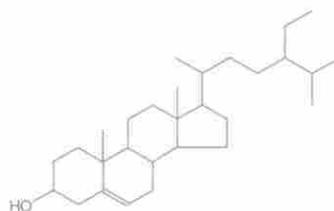
Figura 1. Correlación HMBC del compuesto 1

Tabla 1. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de la sustancia 1

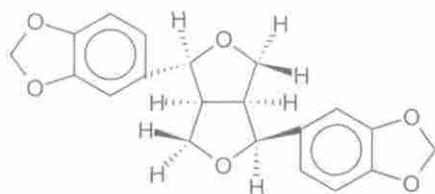
No. de carbono	RMN ^{13}C	RMN ^1H	HMQC	HMBC
2	76,4	4,93 (sex. $J = 7,2; 6,4$ Hz, 1H)	76,4	
3	35,0	2,93 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H)	35,0	76,4, 108,0, 118,2, 139,0
4	214,0			
5	163,0			
6	116,6	6,9 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H)	116,6	108,0, 118,2, 163,0
7	136,5	7,4 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H)	136,5	139,0, 163,0
8	118,2	6,7 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H)	118,2	35,0, 108,2, 116,6
4a	108,0			
8a	139,0			
1'	21,1	1,53 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H)	21,1	21,1, 35,0, 76,4
		11,0 (s, 1H)		108,0, 116,6, 163,0



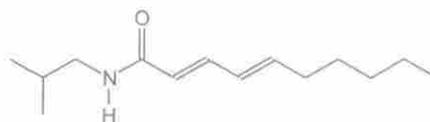
Compuesto 1



Compuesto 2



Compuesto 3



Compuesto 4

identificado como sitosterol; el compuesto 3 es el lignano conocido como (-)-episesamina 3 (9, 10), este tipo de metabolitos se reporta por primera vez

en este género; el compuesto 4 es la amida alifática denominada pellitonina, aislada anteriormente en *Zanthoxylum tessmannii* (11).

Tabla 2. Resultados ensayo antimicrobiano preliminar

No. de fracción	<i>Micrococcus luteus</i>
1, 2, 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15	+
6, 7, 18, 19	++
8, 9, 10, 17	+++
Control (+) DMSO 5 %	No actividad

El test antibacteriano se evaluó utilizando como modelo preliminar *Micrococcus luteus*. El extracto total de éter de petróleo se evaluó, mostrando poca actividad; sin embargo, al fraccionarlo se hallaron actividades muy relevantes (Tabla 2). Posteriormente se evaluaron de nuevo las fracciones 1 a 19 y el compuesto **3** frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las fracciones 1-5, 11,

12- y 15 mostraron actividad parcial; las fracciones 6, 7, 18 y 19 exhibieron unas actividades moderadas pero superiores a las primeras, mientras que las fracciones 8, 9, 10 y 17 produjeron una inhibición total. La sustancia **3** presentó una actividad promisoriosa frente a los microorganismos *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados ensayo antimicrobiano contra cepas bacterianas Gram (+) y Gram (-)

Tipo de microorganismo	Microorganismo	Actividad
Gram (+)	<i>Bacillus subtilis</i>	9, 10 y compuesto 3
	<i>Enterococcus faecalis</i>	10
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9,10
	<i>Enterococcus iaelium</i>	7, 10
	<i>Micrococcus luteus</i>	Todas
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	10
	<i>Citrobacter freundii</i>	8, 10
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	No actividad
	<i>Pseudomonas putida</i>	10, 17
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9, compuesto 3
	<i>Serratia arizona</i>	No actividad
	<i>Salmonella enteritis</i>	3, 10, 17
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8, 9, 10, compuesto 3

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, al profesor Edelberto Silva del Departamento de Farmacia por su asesoría en los ensayos biológicos, a Patricia Alba del FIDIC por la toma de espectros de RMN a 500 MHz, y a los profesores Fernando Echeverri y Winston Quiñones de la Universidad de Antioquia por la toma de espectros de RMN a 300 MHz.

BIBLIOGRAFÍA

- Gentry W. (1993). Plantas Maderables del Noroeste de Suramérica. Washington D. C.: Conservación Internacional, pp. 830-832.
- SPICA (2002). Programa de Botánica Económica. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Familia Rutaceae. Atención profesora Nivea Cristina Garzón.
- Guilhon G.; Baetas A. C.; Mata J.; Conserva L. (1994). 2-Alkil-4-Quinolona Alkaloids and Cinnamic Acid Derivatives From *Esenbeckia alma-willia*. *Phytochemistry* **37**, 1193-1195.
- Torres O.; Cuca L. E. Estudio fitoquímico y de actividad biológica (antimalarica y antimicrobiana) de los extractos etanólicos de las hojas, corteza y madera de *Esenbeckia litoralis* (Rutaceae). Tesis de magister, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., IN, 2001, p. 19.
- Dreyer D. (1980). Alkaloids, Limonoids and Furocoumarins From Three Mexican *Esenbeckia* Species. *Phytochemistry* **19**, 941-944.
- Konemman E.; Allen V. R.; Sommers H.; Winn W. (1988). Diagnóstico microbiológico. Ed. Panamericana, pp. 280-320.
- Simonsen T.; Larsen M.; Nielsen M.; Adersen A.; Olsen A.; Strasberg D.; Smitt U.; Jaroszewski J. (2002). Methyleneedioxy- and methoxyflavones from *Melicope coodeana* syn. *Evodia simplex*. *Phytochemistry* **60**, 817-820.
- Geissman T.; Crout D. (1969). Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. Freeman, Ed. Cooper & Company, Cap. 4, p. 104.
- Ayres D.; Loike J. (1990). Lignans. Chemical, biological and clinical properties. New York: Cambridge University Press, pp. 44.
- Ahdan M.; Islan S. (1997). (-)-episesamina from *Boronia bowmanii*. *Fitoterapia*, **68** (5):464-465.
- Latuf Z.; Hertley T.; Rice M.; Waigh R.; Waterman P. (1998). Novel and Insecticidal isobutilamidas from *Dinosperma erythrococe*. *J. Nat. Prod.* **61**, 614-619.