

Estudio fitoquímico preliminar y evaluación antimicrobiana del extracto neutro de las hojas de *Cordia cylindrostachya* (Boraginaceae)

José Ortega F.*, Andry Barboza U., Néstor Peña y Dinorah Ávila

Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Aptado. 526 Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 22-06-06 Aceptado: 29-03-07

Resumen

Diferentes investigaciones sobre la familia Boraginaceae se han enfocado en la búsqueda de sustancias de probada actividad farmacológica. La especie *Cordia cylindrostachya*, no ha sido estudiada hasta el presente química o farmacológicamente, por lo que resulta interesante estudiar esta planta endémica de la región andina venezolana. El material vegetal se colectó en la población de El Cobre, Estado Táchira; a partir de las hojas frescas se obtuvo el extracto hidroalcohólico crudo por maceración con isopropanol-agua (7:3). Mediante extracción ácido-base se obtuvo la fracción neutra, la cual mostró actividad inhibitoria contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus spp* y *Bacillus subtilis*. Mediante cromatografías sucesivas se separaron dos sólidos mayoritarios: uno de ellos, identificado según sus datos espectroscópicos como el ácido-3a-hidroxiolean-12-en-27-oico presentó actividad inhibitoria contra el crecimiento *in vitro* de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus spp* y *Bacillus subtilis*. Otro compuesto aislado se identificó como 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona, el cual no presentó actividad contra las cepas ensayadas. Adicionalmente se separó b-sitosterol, compuesto muy abundante en los vegetales superiores, de conocida actividad antimicrobiana.

Palabras clave:

Actividad antimicrobiana; Boraginaceae; *Cordia cylindrostachya*; flavonoides; triterpenos.

Preliminary phytochemical study and antimicrobial evaluation of the neutral extract from *Cordia cylindrostachya* (Boraginaceae) leaves

Abstract

Research on family Boraginaceae have been focused to search of substances with proved pharmacological activity. The specie *Cordia cylindrostachya* (Boraginaceae) has not been studied so far, since pharmacological point of view, so, it is interesting to study this endemic plant of the Andes region of Venezuela. The plant material was collected in El Cobre, Táchira State; maceration of the fresh leaves with (iso-propanol-water (70:30) gave origin to the hydroalcoholic extract which was fractionated to produce the neutral fraction. This fraction showed inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus spp* and *Bacillus subtilis*. By means of successive chromatographies two major solids were separated: one of them, identified as 3a-hydroxyolean-12-en-27-oic acid, resulted active against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus sp* and *Bacillus subtilis*; the second one was identified as 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxy-flavone and was not active against the tested strains. Additionally, b-sitosterol was isolated, a very common compound in higher plants, whose antibacterial activity is known.

[Frame 4](#)[Frame 5](#)

Key words:

Antimicrobial activity; Boraginaceae; *Cordia cylindrostachya*; flavonoids; triterpenes.

Introducción

Existen en Venezuela diferentes familias de plantas, cuyos géneros se caracterizan por poseer diversas actividades biológicas o son atractivos desde el punto de vista farmacológico. Una de las familias a la que se le atribuyen múltiples propiedades es la familia Boraginaceae, la cual comprende unos 100 géneros y 2000 especies de plantas herbáceas o leñosas de los países templados y cálidos. Dentro de ella el género *Cordia* es uno de los más importantes, muy difundido en zonas tropicales y subtropicales alrededor del mundo y está constituido por cerca de 250 especies (1-3).

La especie *Cordia cylindrostachya* no ha sido evaluada química o farmacológicamente hasta donde se conoce, por lo que resulta de gran interés realizar un estudio que permita establecer las posibles aplicaciones desde el punto de vista terapéutico y, de igual manera, dirigir el estudio químico que conllevará al aislamiento de los principios activos.

A partir de especies del género *Cordia* han sido aislados triterpenos, sesquiterpenos, benzoquinonas, naftoquinonas, hidroquinonas, cromenos, flavonoides, otros compuestos fenólicos y alcaloides (4).

C. cylindrostachya (basura prieta, namogre negro, chichi de virgen), constituye un especie endémica, que crece en Venezuela en el Estado Táchira, de la cual no se tiene conocimiento sobre su estudio químico o farmacológico; por tal motivo, el objetivo principal de este trabajo consiste en el estudio fitoquímico de esta especie y determinar su posible actividad antimicrobiana.

Materiales y Métodos

Recolección del vegetal y extracción

El material vegetal (hojas) de *C. cylindrostachya* fue colectado en El Cobre, Estado Táchira, a unos 2000 m de altitud, en Septiembre del 2002. El vegetal fue identificado plenamente por el Dr. Miguel Pietrangeli, del Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia; una muestra reposa en el herbario de esta facultad bajo el número MP-4592. Las hojas frescas se maceraron con isopropanol-agua (7:3), y la solución obtenida se concentró por evaporación a presión reducida para obtener el extracto hidroalcohólico crudo (EHC) y posteriormente fraccionarlo mediante reacciones ácido-base.

Actividad antimicrobiana

Se procedió según el método de difusión en agar, con el uso de discos de papel de filtro, según la técnica de Kirby-Bauer (5).

Se emplearon las siguientes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus spp*, *Basilus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae*, *Serratia mercenscens*, *Proteus vulgaris*, *Shigella boydii* grupo C, *Salmonella* grupo serológico B y la levadura *Candida albicans*. Estas fueron conservadas en tubos inclinados con agar y caldo nutritivo.

Aislamiento y caracterización

A partir del extracto neutro (23 g) cromatografiada sobre sílica-gel (1,6 Kg) se obtuvieron 24 fracciones, mediante elución consecutiva con EtOAc, Isopropanol y MeOH. Nueva cromatografía de la primera fracción (5 g, sílica-gel 350 g) eluida con cloroformo dio 12 fracciones de las cuales las n° 5, 6 y 9 contenían sólidos, que fueron separados según el caso.

3,7,4'-trimetoxi-5-hidroxi flavona (I)

De la fracción 5 (28 mg) se separó un sólido amarillo, (agujas de EtOH 27 mg, pf. 146°C). Coloración amarilla frente al reactivo de Naturstoff. UV (nm): 347 (banda I); 268 (banda II). IR $\text{g}_{\text{máx}}$ cm: 3078-3000 (C-H aromático); 2915 (C-H alifático); 1656 (C=O); 1598 (C=C aromático). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) d: 3,83 (s, 3H); 3,84 (s, 3H); 3,87(s, 3H); 6,32 (d, 1H, J= 2Hz); 6,41 (d, 1H, J= 2Hz); 6,99 (d, 2H, J= 9Hz); 8,05 (d, 1H, J= 9Hz); 12,63 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) d: 56,10; 56,46; 60,81; 92,82; 98,48; 106,73; 114,47; 114,91; 123,49; 130,83; 131,09; 139,54; 156,64; 157,43; 162,35; 162,69; 166,08; 179,46.

b-sitosterol (II). La subfracción 6 (12 mg) presentó un sólido que recristalizado de etanol dio agujas blancas (11 mg, Pf. 140-141°C; Pf_{rep} 141°C). Dicho sólido presentó reacción positiva (coloración fucsia) al reactivo de Liberman-Burchard, lo cual indica la presencia de triterpenos y/o esteroides Comparación con muestra auténtica confirmó la identificación de b-sitosterol (6).

Ácido 3a-hidroxiolean-12en-27oico (III). La fracción 9 (2 g), fue recromatografiada sobre sílica-gel (145 g) utilizando como eluentes CHCl_3 y MeOH. La tercera subfracción (311 mg, CHCl_3 -MeOH 8,5:1,5) dio un sólido blanco; agujas de EtOH (239 mg); de pf. 211-213°C (reportado 211 -213°C) homogéneas en TLC, positivas al reactivo de Lieberman-Burchard coloración violeta). IR ($\text{g}_{\text{máx}}$ cm^{-1}): 3632 (-OH, libre); 3300-2500 (banda ancha -OH); 3219 (C-H, olefínico); 2917 (C-H, alifático); 1708 (C=O); 1667 (C=C); 1453 y 1384 (flex. C-H, alifático). GC/MS, m/z (int. rel.): 412 [M^+ - CO_2] (55); 397 (90); 379 (21); 243 (82); 241 (100); 231 (34); 205 (14); 204 (48); 191 (33); 190 (60); 135 (97); 105 (55); 95 (91); 69 (96); 43 (83). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) d16,01; 18,02; 18,11; 22,11; 22,18; 22,84; 23,67; 24,65; 27,64;

28,29; 28,37; 31,11; 32,81; 33,10; 33,27; 34,34; 36,13; 36,66; 36,99; 37,30; 39,90; 44,31; 47,15; 48,68; 49,03; 56,03; 76,34; 126,04; 137,78; 178,95. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) d: 0,82 (s, Me); 0,83 (s, Me); 0,85 (s, 2 Me); 0,88 (s, Me); 0,98 (s, Me); 1,03 (s, Me); 3,30 (m, 1H, J=6,5 Hz); 5,58 (m, 1H, J=7,5 Hz).

Ácido 3a-acetoxiolean-12en-27oico

El compuesto **II** (50,83 mg) se hizo reaccionar con 15 mL de piridina y 10 mL de anhídrido acético calentando bajo reflujo durante 15 minutos. La reacción fue monitoreada por TLC para garantizar la transformación al producto esperado. El producto se lavó con HCl 5% y posteriormente con agua para obtener 43,78 mg del compuesto acetilado. RMN ¹H (d): 0,76 (s, Me); 0,79 (s, Me); 0,80 (s, Me); 0,83 (s, Me); 0,84 (s, Me); 0,95 (s, Me); 1,00 (s, Me); 2,01 (s, Me); 4,57 (m, 1H, W_{1/2}=7 Hz); 5,68 (m, 1H, J=7 Hz). RMN ¹³C (d): 16,86; 18,80; 18,87; 21,76; 22,31; 22,67; 23,22; 24,27; 28,17; 28,46; 28,94; 31,72; 33,59; 33,92; 34,42; 34,92; 37,11; 37,27; 37,57; 41,04; 44,82; 47,45; 49,91; 50,57; 56,52; 78,80; 127,05; 138,23; 171,34; 182,75. GC/MS, m/z (int. rel.): 454 (10); 439 (12); 379 (6); 241 (36); 204 (16); 191 (22); 190 (25); 135 (34); 95 (39); 69 (35); 43 (100).

Resultados y Discusión

Cromatografías sucesivas del extracto neutro permitieron el aislamiento de un sólido cristalino amarillo, el cual presentó fluorescencia bajo luz UV (366 nm), lo que indicó la presencia de un cromóforo importante en la estructura del compuesto. El análisis por cromatografía en capa fina reveló homogeneidad, indicando su pureza (P.f. 146°C); adicionalmente, dio reacción positiva al reactivo de Naturstoff, empleado para la caracterización de flavonoides.

En efecto, en el espectro UV se observan dos bandas importantes ubicadas a 347 y 268 nm que son características de las bandas I y II, respectivamente, de esqueletos de flavonas y flavonoles.

En el espectro IR se muestra una banda poco pronunciada a 3078 cm⁻¹ atribuible a tensión C-H aromática; a 2915 cm⁻¹ se observa una banda que corresponde a la tensión C-H alifática; una banda en 1656 cm⁻¹ la cual es propia de un carbonilo conjugado, y en 1019 cm⁻¹ se muestra la banda de tensión C-O.

En la zona aromática del espectro de RMN de protones se observan cuatro señales: dos de ellas integran para dos protones cada una, a 8,05 y 7,00 ppm, (J= 9 Hz) propias de protones en carbonos adyacentes de un anillo bencénico, sugiriendo una *para*-sustitución en dicho anillo. Otras dos señales, a 6,41 y 6,32 ppm que integran para un protón cada una, corresponden a un sistema AB (J= 2 Hz) demostrando que los dos átomos de hidrogeno tienen configuración *meta*. Estos hechos sugieren que el esqueleto flavonoide está *meta*-sustituido en el anillo A y *para*-sustituido en el anillo B, es decir sustituciones en las posiciones 5, 7 y 4', que son las posiciones más comúnmente sustituidas en las flavonas. Adicionalmente, hay tres señales singletes a 3,87, 3,84 y 3,83 ppm, las cuales integran cada una para tres protones, características de grupos metoxilo soportados sobre anillos aromáticos, dado el desplazamiento que presentan. A 12,63 ppm se observa un singlete que integra para un protón, cuyo desplazamiento es característico de un protón fenólico enlazado en C-5, formando puente de hidrogeno con el C=O en C-4.

Con esta información podríamos proponer la estructura de la 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona (**I**) como el compuesto aislado. Este compuesto se aisló por primera vez del helecho *Cheilantes farinosa* (Cheilanteae) (7), y posteriormente se aisló a partir de plantas superiores como *Aniba riparia* (8) y *Amomun koenigii* (9). La información espectroscópica coincide con la reportada en el estudio de las especies antes señaladas, y es la primera vez que se reporta este compuesto en el género *Cordia*.

A partir de la fracción 6 de la cromatografía del extracto neutro, se aisló un sólido cristalino, homogéneo en TLC, aparentemente de tipo terpenico o esteroideal dado que dio positivo al reactivo de Lieberman-Burchard. La información espectroscópica obtenida, (6) y comparación con muestra auténtica, permiten identificar al compuesto como b-sitosterol (**II**), fitosterol muy difundido en el reino vegetal.

A partir de la fracción 9 de la misma cromatografía, se obtuvo otro sólido cristalino de p.f. 260-261°C, el cual también dio positivo al reactivo de Lieberman-Burchard, indicando que se trata de otro compuesto de tipo terpenoide. El espectro infrarrojo del compuesto muestra absorción intensa a 3632 cm⁻¹ atribuible a un grupo hidroxilo libre; una banda ancha entre 3300-2500 cm⁻¹ y otra intensa a 1708 cm⁻¹ de tensión carbonílica, indican un grupo carboxilo en la molécula; adicionalmente, existe una banda intensa en 2917 cm⁻¹ que corresponde a tensión C-H alifática, bandas a 1453 y 1384 cm⁻¹ correspondientes a flexiones de CH₂ y CH₃, respectivamente.

El espectro de RMN ¹³C exhibe un total de resonancias de 30 carbonos: 8 carbonos cuaternarios, 7 metílicos, 10 metilénicos y 5 metínicos. Por su parte, el espectro de resonancia protónica exhibe 6 señales singletes propias de grupos metílicos soportados sobre carbonos sustituidos, 0,82; 0,83; 0,85 (6 H); 0,88; 0,98; 1,03 ppm.

Dado que los triterpenos contienen en su esqueleto un total de 8 grupos metilo, es de suponer que, en este caso, uno de ellos está funcionalizado como grupo carboxílico, lo cual se corrobora por la señal correspondiente al carbonilo del ácido a 178,95 ppm. Este hecho que conduce a pensar que el espectro de masas no presenta el verdadero ión molecular, sino un fragmento m/e 412 (55) correspondiente a la pérdida de CO₂, con lo cual el peso molecular debe ser de 456 uma.

Las señales de RMN de ^{13}C a 126,04 y 137,78 ppm son propias de carbonos olefínicos, correspondiendo la de campo más bajo a un carbono totalmente sustituido, y la otra a uno trisustituido. Otra señal de carbono cuaternario aparece a 76,34 ppm, desplazamiento que sugiere un carbono carbinólico, en concordancia con el espectro infrarrojo que mostró la banda de un grupo hidroxilo libre propia de un alcohol secundario.

Adicionalmente, el espectro de protones exhibe una señal a 3,3 ppm que integra para un protón, asignable al protón geminal al grupo en C-3, posición típica de oxigenación dada la ruta biogénica de los triterpenos; el ancho de banda a media altura, resultó difícil de medir debido a la forma de la señal y a su pequeño valor, lo cual indica un hidrógeno con orientación b-ecuatorial, llevando a una estereoquímica a para el grupo OH. La acetilación del compuesto permitió corroborar este hecho. El espectro de RMN ^1H del derivado obtenido muestra una señal a 2,01 ppm que integra para tres protones, correspondiente al grupo metilo del grupo acetilo, indicando la existencia de sólo un grupo hidroxilo acetilable en la molécula, además, la señal del protón geminal a dicho grupo aparece ahora a 4,5 ppm, como era de esperarse, y no existe otra señal asignable a protones hidroxílicos.

Con esta información podríamos plantear dos esqueletos triterpénicos pentacíclicos, el primero un 3a-hidroxi-urseno, el segundo 3a-hidroxioleaneno. La ausencia de dobletes en la zona metílica del espectro RMN ^1H nos lleva a descartar el esqueleto ursano y, consecuentemente, a proponer una estructura del tipo oleanano para el compuesto aislado.

Queda por definir la posición de la instauración en la molécula y dado que se trata de un doble enlace trisustituido, (señal ensanchada a 5,58 ppm) pudiera corresponder a una instauración D⁵, D^{9,11}, D¹² ó D¹⁸. La espectrometría de masas resulta en este caso de gran ayuda. Efectivamente, el espectro de masas exhibe un fragmento m/e 204, resultante la reacción retro-Diels-Alder con apertura en el anillo C, en un compuesto D¹²-insaturado; dicho fragmento no sería posible a través de la Diels-Alder de D⁵-, D^{9,11}- ó D¹⁸-oleanenos (10). Con estos resultados se propone la estructura como el ácido 3a-hidroxiolean-12-en-27-oico (**III**). Estos datos concuerdan con los reportados previamente para este compuesto aislado a partir de la especie *Cordia alliodora* en 1983 (11).

Actividad antimicrobiana

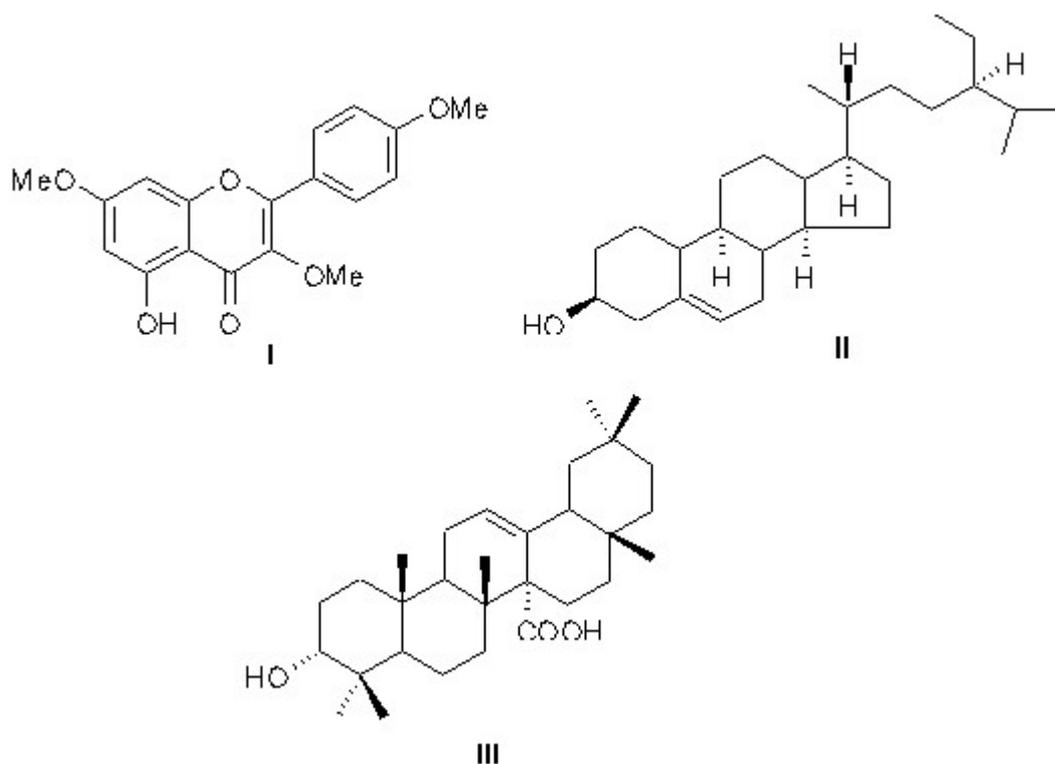
La fracción neutra mostró actividad contra algunos de los microorganismos estudiados (5 cepas), siendo *Staphylococcus aureus* la cepa más sensible a esta fracción, al desarrollarse halos de inhibición de 18, 20 y 20 mm para 1, 3 y 5 mg del extracto, respectivamente. Este efecto es comparable al efecto ejercido por los antibióticos comerciales Gentamicina de (10 µg) y Norfloxacin de (10 µg).

Con el fin de verificar si la potencial actividad antimicrobiana de la fracción neutra es debida a la 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona aislada, se realizó un ensayo utilizando discos impregnados con el mismo, observándose que el compuesto no ejerció efecto inhibitorio sobre las cepas sensibles a la fracción neutra, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus spp*, *Bacillus subtilis*.

Posteriormente se evaluó la posible actividad antibacteriana del ácido 3a-hidroxiolean-12-en-27-oico.

Se observa que el compuesto ejerció efecto inhibitorio sobre las cepas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus spp*, *Bacillus subtilis*, no mostrando actividad sobre *E. coli*. La dosis de 10 µg fue la más efectiva, sin embargo, debido a que los valores de halos de inhibición están por debajo de los obtenidos para la fracción neutra (Tabla 1), es de suponer la existencia de otros metabolitos análogos que potencien de forma sinérgica la actividad antibacteriana.

[Frame 23](#)



En efecto, la presencia de b-sitosterol lleva a presumir que este compuesto estaría potenciando la actividad antibacteriana de la fracción neutra. Se ha demostrado que varios fitosteroles poseen esta propiedad (12) y, en particular el b-sitosterol ha sido activo contra *Bacillus subtilis* (13) y *S. aureus* (14).

Conclusiones

A partir de la fracción neutra de las hojas de *Cordia cylindrostachya* se aislaron tres compuestos que se identificaron como: 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona, el ácido 3a-hidroxiolean-12-en-27oico, y b-sitosterol.

El extracto presentó moderada inhibición del crecimiento *in vitro* de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus spp* y *Bacillus subtilis*.

La flavona aislada no ejerció efecto inhibitorio de las cepas estudiadas; por el contrario el ácido 3a-hidroxiolean-12-en-27-oico resultó activo contra las cepas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus spp* y *Bacillus subtilis*.

Estos resultados parecen indicar que la potencial actividad antibacteriana del extracto es debida a los compuestos de tipo terpenoide.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia por el financiamiento del proyecto FDI N° 28-02 y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el soporte económico brindado (Proyecto CC-0930-04). Asimismo al soporte brindado por el proyecto LAB-000665 de FONACIT.

Referencias Bibliográficas

1. ERCOLINI I.C., DE OLIVERIA F., ZANINI L.H., MYIAKE E.T., GARCIA T. *Revista Lecta* 20(1): 15-34, 2002.
2. PITTIER H. *Manual de las Plantas usuales de Venezuela*, Ed. Ariel, Madrid (España), pp. 333: 425, 1978.
3. SCHNEE L. *Plantas comunes de Venezuela*. UCV, Caracas (Venezuela), p. 75, 1984.
- 4.

- PAIVA DOS SANTOS R., LEMOS T.L., PESSOA O.D., BRAZ-FILHO R., RODRIGUES-FILHO E., VIANA F.A., SILVEIRA E.R. *J Braz Chem Soc* 16(3B): 662-665, 2005. 5.
- BAUER A., KIRBY M., SHENIS J., TURCK M. *Annual Journal of Clinical Pathology*. 45(4): 493-496, 1996. 6.
- POUCHERT C.J., BEHNKE J. *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra*, Edition I, Vol III, 569 A, 1993. 7.
- ERDTMAN H., NOVOTNY L., ROMANUK M. *Tetrahedron* 8(1): 71-74, 1966. 8.
- ROSSI M.E., YOSHIDA M., SOARES M.J. *Phytochemistry* 45(6): 1263-1269, 1997. 9.
- DONG H., GOU Y.L., CAO S.G., CHEN S.X., SIM K.Y., GOH S.H., KINI M. *Phytochemistry* 50: 899-902, 1999. 10.
- BUDZIKIEWICZ H., WILSON J.M., DJERASSI C. *J A C S* 85: 3688-3699, 1963. 11.
- CHEN T.K., ALES D.C., BAENZINGER N.C., WIEMER D.F. *J Org Chem* 48: 3525-3531, 1983. 12.
- HETHERINGTON M., STECK W. *Can Chem News* 51: 20-21, 1999. 13.
- BELTRAME F.L., PESSINI G.L., DORO D.L., DIAS FILHO B.P., BARBOSA R., GARCIA CORTEZ D.A. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45(1): 21-25, 2002. 14.
- CUNICO M.M., MIGUEL O.C. *Visão Acadêmica*, Curitiba. 3(2): 124, 2002.