

NUEVAS CHALCONAS DE *Beilschmiedia towarensis***NEW CHALCONES FROM *Beilschmiedia towarensis***

Luis Enrique Cuca Suárez* y Óscar Eliécer Bañol Vargas*

Recibido: 06/05/05 – Aceptado: 27/06/05

RESUMEN

Del extracto etanólico de madera de *Beilschmiedia towarensis* fueron aisladas e identificadas dos nuevas chalconas: 2', 6'-dihidroxi-4'-isopenteniloxy-3,4(3''',3''')-dimetilpirano) chalcona y 4,2', 6'-trihidroxi-3', 4' metilenodioxi-3-isopentenilchalcona. El aislamiento y la purificación fueron realizados por técnicas cromatográficas. La elucidación estructural de estos compuestos se determinó mediante técnicas espectroscópicas (IR, RMN-¹H, ¹³C y EM).

Además, fue probada la actividad biológica *in vitro* del extracto etanólico de madera, dando resultados significativos para actividad antimicrobiana en cepas Gram(+): *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Las pruebas de actividades antimalárica y antituberculosa dieron resultados negativos.

Palabras clave: Lauraceae, *Beilschmiedia towarensis*, chalcona, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Two new chalcones: 2', 6'-dihydroxy-4-isopenteniloxy-3,4(3''',3''')-dimethylpyrano) chalcone and 4,2', 6'-trihydroxy-3', 4'-metilenodioxi-3-isopentenilchalcone were isolated from the wood ethanolic extract of *Beilschmiedia towarensis*. Isolation was performed by chromatographic techniques. The elucidation of the structure of the compounds was accomplished by spectroscopic techniques (IR, NMR-¹H, ¹³C and MS).

Also, the crude wood extract was tested *in vitro* for biological activity, having significant results for antimicrobial activity in Gram (+) stumps: *Sataphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Test of antimalarial and antituberculosis activities gave negative results.

Key words: Lauraceae, *Beilschmiedia towarensis*, chalcona, antimicrobial activity.

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

INTRODUCCIÓN

La especie *Beilschmiedia towarensis* pertenece a la familia Lauraceae (1), abunda en la región del eje cafetero y se conoce comúnmente con el nombre de laurel blanco. Tradicionalmente se tienen diversos usos, que van desde la utilización por la incorruptibilidad de sus maderas como material para la construcción de enseres domésticos y viviendas, hasta el uso de las partes aéreas en infusión como paliativo en las enfermedades del colon y en trastornos digestivos (2).

El género *Beilschmiedia* comprende 11 especies (3) que se distribuyen ampliamente dada su fácil adaptabilidad a condiciones climáticas variadas; es posible encontrarlas en pisos térmicos entre los 450 a 2500 metros sobre el nivel del mar. La especie *Beilschmiedia towarensis* no tiene ningún estudio fitoquímico precedente a éste.

PARTE EXPERIMENTAL

En la cromatografía de columna (CC) se usó sílica gel (Merck, 40-63 μm), para CCD se emplearon cromatoplasas Merck de sílica gel HF₂₅₄ de 0,3 mm de espesor. Los espectros IR fueron tomados en un equipo Perkin Elmer FTIR-1000 del Departamento de Química de la Universidad Nacional, sede Bogotá. Los espectros de RMN¹H en un BRUKER-400, empleando CDCl₃ como solvente, los desplazamientos químicos fueron referenciados con el patrón interno TMS (¹H 400 MHz y ¹³C 100 MHz). Los espectros de masas (EMIE), 70 eV fueron tomados en un equipo MS 80 RFA de la Universidad de Wayne (Estados Unidos).

Material vegetal. Las muestras de madera de *B. towarensis* fueron suministradas por el Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafe), recolectadas en la reserva del bosque de Las Hortensias (Dosquebradas-Risaralda), por el ingeniero forestal Carlos Mario Ospina Vallejo. Una muestra de herbario reposa en el Herbario de la Universidad de Antioquia con el número COP-458723.

Extracción y aislamiento

El material vegetal seco y molido, 3250 g de madera, fue extraído por maceración en frío con etanol (EtOH) al 96% obteniéndose 54,15 g del extracto. Éste se fraccionó por cromatografía de columna empacada con sílica gel y eluida con C₆H₅CH₃ incrementando la polaridad con AcOEt, hasta una mezcla de C₆H₅CH₃-AcOEt (7:3). Se recolectaron siete fracciones, marcadas como M1 a M7. El análisis por IR de las anteriores fracciones revela la presencia de compuestos aromáticos en las fracciones M2, razón por la cual se decide proceder a su purificación; las demás se dejan para estudios posteriores.

La fracción M2 (5,31 g) fue sometida a CC eluyendo con C₆H₆-AcOEt de polaridad creciente (95:5 hasta 6:4) obteniéndose ocho fracciones que se rotularon M2-1 a M2-8. Después del estudio por CCD, se continuaron purificando las fracciones M2-4 (102 mg) y M2-5 (43 mg). La fracción M2-4 se sometió a CC repetitiva eluyendo con C₆H₆ hasta obtener el compuesto 1 (28 mg). La fracción M2-5 se sometió a lavado con éter de petróleo y luego con MeOH para obtener el compuesto 2 (36 mg).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para este test se siguió el protocolo estandarizado en el Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por el doctor José Manuel Lozano. Se prepara un patrón disolviendo de 15 a 20 mg del extracto a ensayar en un mL de etanol, y a partir de éste se hacen diluciones 1:1 y 1:10 en PBS (buffer de fosfato salino). De cada una de las diluciones anteriores se aplican 2 y 8 μ L en pozos de siembra sobre agar-agarosa de baja electroendosmosis. Posteriormente se siembran aproximadamente 40 millones de bacterias obtenidas por replicación y se adiciona tripticasa de soya como medio superior para luego proceder al incubado. La evaluación de la actividad antimicrobiana se hizo contra referentes de kanamicina (Km), tetraciclina (Tc), ampicilina (Amp) y contra blancos de etanol y PBS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto 1 es un aceite que dio positivo el ensayo de FeCl_3 , lo que reveló la presencia de OH fenólico.

En el IR de 1 se observan señales en 3389 cm^{-1} (tensión OH), 1220 cm^{-1} (flexión CO) confirmativa de OH fenólico; señal en 1712 cm^{-1} (tensión C=O), $2853\text{-}2924\text{ cm}^{-1}$ (tensión CH).

El experimento DEPT-135 (Tabla 1) permitió determinar que el compuesto 1 posee 10 grupos CH, 4CH_3 , 1CH_2 y por diferencia con el espectro de RMN^{-13}C se deducen 10 Carbonos cuaternarios; de estos últimos, cinco son oxigenados (dos de ellos hidroxilados). Lo anterior permitió deducir la fórmula molecular

$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_5$ para el compuesto 1. El EMIE del compuesto 1 muestra un ión molecular m/z 406, que confirma la fórmula condensada.

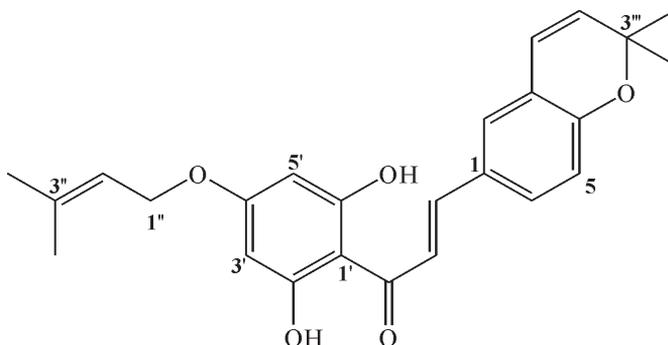
El espectro RMN^{-1}H , muestra señales en δ 9,98 (s, 2H), por su desplazamiento químico corresponde a hidrógenos de grupos hidroxilo en posición orto a un carbonilo, también aparecen señales en δ 7,34 (d, $J=17\text{Hz}$, 1H), δ 7,16 (d, $J=17\text{Hz}$, 1H) las cuales son características de un sistema vinílico cuyos protones están en posición trans; lo anterior permite determinar que el núcleo básico del compuesto 1 es de una charcona; además, aparecen señales de un sistema AB que indican la presencia de un anillo tetra sustituido en δ 6,45 (d, $J=3\text{Hz}$, 1H), δ 6,36 (d, $J=3\text{Hz}$, 1H) que corresponden a protones sobre anillo aromático en posición meta; señales en δ 7,26 (dd, $J=8$ y 4Hz , 1H), δ 5,94 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H) y δ 6,64 (d, $J=4\text{Hz}$, 1H) característico de un sistema AMX para 3 protones sobre anillo aromático formando un sistema orto y meta, característico de un anillo trisustituido; señales de un anillo crománico (6) δ 6,19 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H), δ 5,73 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H), δ 1,58 (s, 6H); también se observaron señales características de un grupo isopreno unido a un oxígeno δ 5,44 (m, 2H), δ 5,10 (m, 1H), δ 1,60 (s, 3H) y δ 2,09 (s, 3H). El anterior análisis permite ubicar en el núcleo de la chalcona los dos sustituyentes establecidos, el isopreniloxi en la posición 4' y un hidroxilo en 6', el anillo crománico en la posición 3,4. Estas sustituciones se confirman por los fragmentos que muestra el EM con los fragmentos m/z 222 (47%) y m/z 194 (14%) característicos para el anillo A de la chalcona y m/z 213 (23%) y 185 (38%) característicos para el anillo B, obteniéndose la es-

estructura del compuesto 1 que corresponde a 2', 6'-dihidroxi-4'-isopreniloi-3,4 (3'', 3''')-dimetil pirano) chalcona. Las asignaciones espectroscópicas de RNM aparecen en la Tabla 1. Este compuesto no está reportado en la literatura como producto natural.

El compuesto 2 muestra en RMN-¹³C, 21 carbonos; con el experimento DEPT-135 se pueden detectar 2CH₃, 2CH₂, 7CH y por comparación con el ¹³C 10C cuaternarios; de estos últimos, seis son oxigenados (uno correspondiente C=O, 180,75 ppm) y cuatro no oxigenados lo

Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto 1

Carbono	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	DEPT
1'	–	121,1	C
2'	–	148,0	C
3'	6,36 (d)	112,8	CH
4'	–	145,8	C
5'	6,45 (d)	115,8	CH
6'	–	147,3	C
1	–	128,2	C
2	6,64 (d)	123,5	CH
3	–	124,3	C
4	–	146,0	C
5	7,26 (dd)	128,5	CH
6	5,94 (d)	128,9	CH
α	7,34 (d)	126,1	CH
β	7,16 (d)	146,0	CH
β'	–	180,9	C
1''	5,44 (m)	140,0	CH ₂
2''	5,10 (m)	124,4	CH
3''	–	135,0	C
4''	1,60 (s)	17,7	CH ₃
5''	2,09 s	26,7	CH ₃
1'''	6,19 (d)	134,5	CH
2'''	5,73 (d)	123,9	CH
3'''	–	75,2	C
4'''y 5'''	1,58 (s)	22,5	CH ₃
(OH)	9,98 (s)	–	–



Compuesto 1

cual permite proponer una fórmula condensada para el compuesto 2 de $C_{21}H_{17}O_6$.

El espectro RMN- 1H del compuesto 2 mostró las siguientes señales características de un compuesto tipo chalcona: δ 10,60 (s, 2H), δ 7,24 (d, $J=16$ Hz, 1H), δ 7,18 (d, $J=16$ Hz, 1H), en RMN- ^{13}C presenta una señal en 180 ppm característica de un grupo carbonilo. Además, el RMN- 1H muestra señales de cuatro protones aromáticos, δ 6,85 (s, 1H), δ 6,70 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), un acoplamiento orto-meta δ 6,61 (dd, $J=8,5$ y 2,2Hz, 1H) y un acoplamiento meta en δ 6,50 (d, $J=2,2$ Hz, 1H); señal en δ 5,86 (s, 2H) característica de un grupo metileno-dioxi (O-CH $_2$ -O); δ 5,50 (m, 1H), δ 3,10 (m, 2H), δ 1,63 (s, 3H) y δ 1,74 (s, 3H) característicos de un grupo isoprenilo (7), señal en δ 5,44 (s_{ancho} , 1H) característico de un protón hidroxílico sobre anillo aromático.

El EMIE del compuesto 2 muestra un ión molecular m/z 368 y dos picos importantes característicos de una 2-hidroxi-chalcona, que permiten ubicar los sustituyentes; m/z 181 (39%) indica que en un anillo está el metileno dioxi y dos hidroxilos, y m/z 215 (18%) indica que en el otro está un grupo isopropilo y un hidroxilo.

El análisis anterior permite asignar el nombre del compuesto 2 como 4,2', 6'-trihidroxi-3', 4'-metilendioxi-3-isopentenilchalcona, compuesto que no está reportado en la literatura, las asignaciones espectroscópicas correspondientes se encuentran en la Tabla 2.

Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana

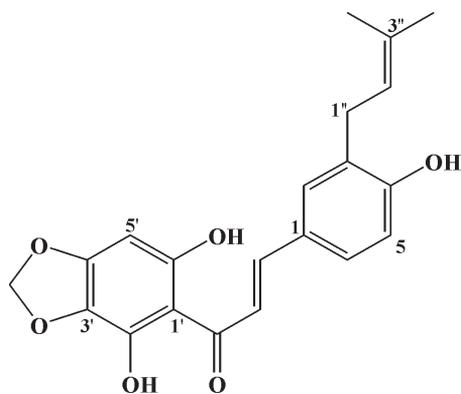
La técnica de difusión radial permite, a través de la medición del halo de inhibición, estimar la capacidad bactericida o bacteriostática de un extracto o metabolito, el cual puede actuar lesionando la pared celular o inhibiendo la producción de sustancias vitales del microorganismo.

De las cepas Gram(-) probadas: *Escherichia coli*, cepa 25922; *Salmonella typhimurium*, cepas EG-10627, 14028-S, MS-7953, ninguna fue inhibida por el extracto probado (madera de *B. tovarensis*).

El extracto etanólico de madera mostró actividad antimicrobiana frente a cepas Gram(+) *Staphylococcus aureus* (cepas 25923 y 6538) y *Enterococcus faecalis* (cepa 29212).

Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto 2

Posición	¹³ C (ppm)	DEPT	¹ H (ppm)
1	130,6	C	
2	112,3	CH	6,61 (dd)
3	105,2	C	
4	147,6	C	
5	123,3	CH	6,70 (d)
6	119,0	CH	6,50 (d)
1'	105,3	C	
2'	147,2	C	
3'	147,9	C	
4'	147,9	C	
5'	115,4	CH	6,89 (s)
6'	146,9	C	
1''	22,7	CH ₂	3,10 (m)
2''	120,8	CH	5,50 (m)
3''	137,4	C	
4''	16,7	CH ₃	1,63 (s)
5''	24,8	CH ₃	1,74 (s)
α	126,1	CH	7,42 (d)
β	146,9	CH	7,18 (d)
β'	180,8	C	
O-CH ₂ -O	100,6	CH ₂	5,86 (s)
OH quelatado			10,60
OH			5,44



Compuesto 2

Tabla 3. Resultados de la evaluación de actividad antimicrobiana

Cepas Gram(+) inhibidas	Sustancia probada	Cantidad aplicada(μ L)	Medida del halo (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	Ampicilina (90 μ g/mL)	5	33
	Kanamicina (90 μ g/mL)	5	11
	Tetraciclina (90 μ g/mL)	5	12
	Ext. Madera (1260 μ g/mL)	2	5
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	Ampicilina (90 μ g/mL)	5	17
	Ext. Madera (2.120 μ g/mL)	8	5
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	Ampicilina (90 μ g/mL)	5	22
	Ext. Madera (2120 μ g/mL)	8	7

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, al doctor José Manuel Lozano del FIDIC, por su asesoría en los ensayos de actividad biológica; al ingeniero agrónomo Carlos Mario Ospina Vallejo y al doctor Gabriel Cadena del Centro Nacional de Investigaciones del Café Cenicafe por la consecución y el aporte de las muestras. Al doctor Ricardo Fierro por la toma de los espectros de RMN en el equipo de la Universidad Nacional, sede Bogotá, y al doctor Eduardo Palomino por la toma de los espectros de masas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gentry, H. (1993). A field Guide to the families and Genera of Woods plants of Northwest South América With Supplementary Notes on Herbaceous Taxa. Conservation International U.S.A., pp. 484-495.
- Atta, A.; Alkofahi, A. (1998). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *J. of Ethnopharmacology*, 60, 117-124.
- Instituto Nacional de Biodiversidad Missouri Botanical. (2002). Current Specimen List for *Beilschmiedia tovarensis*. <http://biodiversity.uno.cdu/delta>, version 22.
- Gottlieb, O. (1992). Review article chemosystematics of the lauraceae. *Phytochemistry*, 11, 1537-1550.
- Cogollo, A. (2003). Caracteres taxonómicos en Lauraceae. U. Antioquia. Medellín. Colombia, pp. 35-37.
- Tomazela, D.; Pupo, M.; Passador, E. (2000). Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their Tripanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. *Phytochemistry*, 55, 643-651.
- Koorbanally, N.; Randrianarivelojosia, M.; Ufford, L. (2003). Chalcones from the seed of *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). *Phytochemistry*, 62, 1225-1229.