

FLAVONOIDES DEL EXTRACTO ISOPROPANOL-AGUA DE *TIBOUCHINA CILIARIS* (MELASTOMATACEAE)

RESUMEN

Los compuestos: Quercetina-3'-*O*-Ramnosido (compuesto 2) y Kaempferol-7-*O*-*p*-cumaroil han sido aislados de las hojas secas de *Tibouchina ciliaris*, junto con otros compuestos como Kaempferol (compuesto 1) y Ácido elágico, sus estructuras fueron elucidadas por análisis de RMN, HPLC-DAD y MS, y por comparación con datos bibliográficos.

El Kaempferol presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 512 µg/mL contra *Escherichia coli*.

PALABRAS CLAVES: Flavonoides, *Tibouchia*, *ciliaris*.

ABSTRACT

Compounds; Quercetin-3'-*O*-rhamnoside (compound 2), Kaempferol-7-*O*-*p*-cumaroil have been isolated from the dry leafs of *Tibouchina ciliaris*, joined other compounds like: Kaempferol (compound 1) and Ellagic Acid, their structures were elucidated by RMM, HPLC-DAD, and MS analysis, and by comparison with bibliographic data.

Kaempferol showed a MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of 512 µg/mL against *Escherichia coli*.

KEYWORDS: Flavonoids, *Tibouchina*, *ciliaris*

ALEJANDRA COLORADO

Tecnóloga Química
coloradoaleja@hotmail.com

DIANA CAROLINA MAYA

Tecnóloga Química
dianamaya4@hotmail.com

SILVIA JULIANA DÍAZ GAMBA

Tecnóloga Química
sjdg07@hotmail.com

JOSÉ HIPÓLITO ISAZA M.

Profesor Titular
jhisaza@gmail.com

LEIDY JOHANA TAPIAS I

johatapias@gmail.com

LUZ ANGELA VELOZA

Profesor Asociado
lveloza@utp.edu.co

LUZ STELLA RAMIREZ A

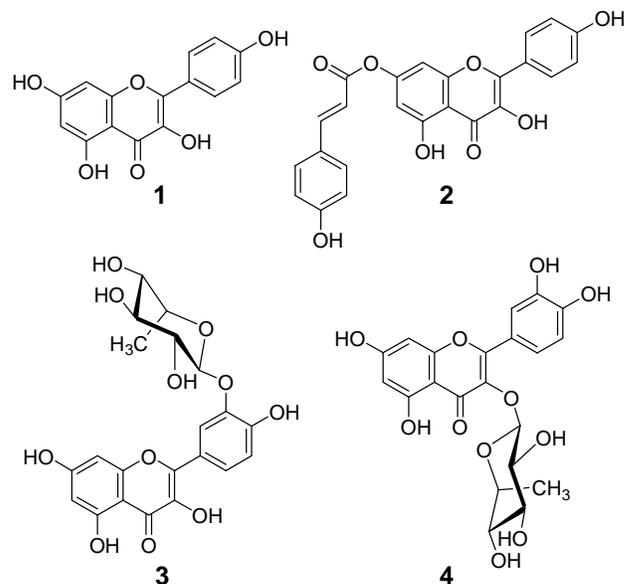
Profesor Asociado
luramire@utp.edu.co

Grupo Polifenoles UTP-CENIVAM
Escuela de Química
Universidad Tecnológica de Pereira

1. INTRODUCCIÓN

Estudios ya realizados en el género *Tibouchina* han mostrado que es rico en taninos hidrolizables oligoméricos, flavonoides y compuestos de tipo fenólico [1]. El presente trabajo reporta dos nuevos flavonoides aislados de las hojas de la especie *Tibouchina ciliaris* (Vent.) Cogn. y su potencial actividad antimicrobiana contra una de las bacterias que afectan más la industria avícola.

Por combinación de cromatografías en Diaion HP-20, Toyopearl HW 40C y MCI-Gel del extracto en isopropanol-agua (65:35) se aislaron kaempferol (1), ácido elágico y los dos nuevos flavonoides 7-*O*-*p*-cumaroil kaempferol (2) y 3'-*O*-ramnopiranosil quercetina (3) y se evaluó la actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método de microplaca de 96 pozos [2,3].



Los flavonoides reciben considerable atención especialmente por su importancia biológica y fisiológica. Son uno de los más grandes grupos de metabolitos secundarios, influyen en la salud humana y animal por su

papel en la dieta, el cual es atribuido a sus propiedades antioxidantes o a su acción estrogénica y hasta un amplio rango de actividades antimicrobianas y farmacológicas. Diferentes enzimas implicadas en la señalización intracelular pueden ser afectadas por flavonoides.[4]

2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1. Material Vegetal

Tibouchina ciliaris (Vent.) Cogn (*T.c*), fue colectada por José H. Isaza M. en la vía Armenia, vereda Laguneta e identificada por el Dr. Frank Almeda de la Academia de Ciencias de California. Las hojas se secaron al ambiente y se molieron en un molino de cuchillas

2.2. Métodos instrumentales generales

Para el monitoreo por HPLC-DAD se empleó un HPLC System 2000 plus (Jasco), equipado con bomba de gradiente cuaternario (PU-2089 Plus), automuestreador inteligente (AS-2059 Plus), horno para columna (CO-2065 Plus), detector inteligente de arreglo de diodos (MD-2015 Plus), y LC Net II/ADC controlado por software EZChrom Elite. Columna Ultra-aqueous C18 de 3 μ m (150 \times 3.2mm, RESTEK), eluido en un gradiente binario compuesto por A (H₃PO₄ 0.05%) y B (acetonitrilo), iniciando con 15% de B durante 5 minutos, se aumenta linealmente la concentración de B hasta 37%, esta concentración se mantuvo por 3 minutos en un tiempo total de 60 minutos.

Los espectros de RMN ¹H, ¹³C y ¹H-¹H COSY, HMQC y HMBC se midieron en espectrómetro Bruker avance 400 en DMSO-*d*₆. Los espectros de masas se midieron por inserción directa (DI 2010) en un sistema GC-MS QP-2010 Shimadzu equipado con autoinyector AOC-20i / automuestreador con inyección AOC-20s Split/splitless, modo de ionización EI/PCI/NCI, controlado por software GCMSolution. Las pruebas con reactivos para desplazamiento ultravioleta con MeONa, AlCl₃, AcONa, se realizaron en espectrofotómetro Pharmaspec 1700 Shimadzu.

2.4. Proceso de aislamiento

La fase acuosa del extracto i-PrOH-Agua (65:35) de *Tibouchina ciliaris* inicialmente se fraccionó por una columna empacada con DIAION HP 20 (5 cm I.D x 30 cm largo) obteniendo un total de 8 fracciones de las cuales se fraccionó la número 4 por sus resultados espectrofotométricos y análisis por HPLC-DAD. Este fraccionamiento se realizó sobre una columna empacada con TOYOPEARL HW 40 (2,5 cm I.D x 20 cm largo) y se obtuvieron 49 fracciones, de las cuales la más promisorias y de mayor rendimiento fue la número 27, que se fraccionó sobre una columna empacada con MCI-TGel (1,8 cm I.D x 32 cm largo), obteniendo 9 fracciones, de las cuales se identificó la número 5 como el ácido elágico por su análisis por HPLC-DAD y comparación de su tiempo de retención y espectro UV con un estándar Sigma.

De la primera separación realizada, se tomó la fracción número 6 y se pasó por una columna empacada con MCI-Gel (1,8 cm I.D x 16 cm largo), obteniendo 8 fracciones, de las cuales se separa nuevamente la número 7 sobre una columna empacada con Silica gel (1,5 cm I.D x 30 cm largo), de las cuales se identificó la número 10 (2.4 mg) como 7-*O-p*-cumaroil Kaempferol (**1**).

Finalmente, también se tomó la fracción número 5 de la primera separación y se fraccionó sobre una columna empacada con ODS (1,1 cm I.D x 5 cm largo), obteniendo 8 fracciones, de las cuales se identificaron la número 4 (1.9 mg) y la número 5 como quercetina-3'-*O*-ramnosido y Kaempferol respectivamente.

A estos dos últimos compuestos se les realizó pruebas antimicrobianas en microplaca de 96 pozos contra *Escherichia coli*, encontrando que el único compuesto que presentó inhibición fue el Kaempferol (**1**), con una MIC de 512 μ g/mL.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro ultravioleta del compuesto **2** muestra dos bandas similares a las de los flavonoides a 265 nm banda II y una a 312 nm con forma parecida a la del ácido *p*-cumárico, superpuesta sobre la banda I del flavonoide; la cual solo se evidenció, al adicionar MeONa, por el desplazamiento batocrómico hasta 363.5 nm, indicando la hidroxilación sobre C-4', característica del tipo kaempferol. El espectro de masas mostró el pico del ión molecular [M]⁺ a *m/z* 432 (11%) y dos rutas de fragmentación complementarias (Figura 1) que producen los iones fragmento [M-C₁₅H₉O₆]⁺ a *m/z* 147 (pico base), el cual evidencia el sustituyente *p*-cumaroilo; mientras el ión fragmento [M-C₉H₆O₂]⁺ a *m/z* 286 (70%), confirma la aglicona con estructura tipo kaempferol. Las señales de los grupos hidroxilo observadas en el espectro de ¹H-RMN a δ 12.59 5-OH, a δ 9.66 3-OH y a δ 10.17 confirman la sustitución cumaroilo sobre C-7. El hidroxilo del grupo *p*-cumaroilo se observó a δ 11.97 ppm. De esta manera, el compuesto **2** fue identificado como 7-*O-p*-cumaroil kaempferol y al máximo de nuestro conocimiento, este es el primer reporte para esta sustancia.

La sustancia **3** mostró las dos bandas características de flavonoides en espectro UV, banda II a 258, 266.6 nm y banda I a 366.5 nm en MeOH. El desplazamiento batocrómico de 66 nm de la banda I al adicionar AlCl₃ indica hidroxilación en 3,5 y posible orto hidroxilación del anillo B; pero, al adicionar HCl, no hubo regresión alguna, haciendo dudosa la hidroxilación en C-3', aparentando una aglicona de tipo Kaempferol. Sin embargo, el espectro de resonancia mostró un anillo B con patrón de sustitución tipo quercetina con las señales correspondientes a H-5' a δ 6.88 ppm d (*J* 8.4 Hz), H-6' a δ 7.54 ppm dd (*J* 8.4, 2.4 Hz) y H-2' a δ 7.67 ppm d (*J* 2.4 Hz). Esto fue confirmado por el espectro de masas

mostrando el pico del ión molecular $[M]^+$ m/z 448 (22%) correspondiente a la fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$ y el ión fragmento $[M-C_6H_{10}O_4]^+$ a m/z 302 (57%), producido por la pérdida del residuo rhamnosa de la posición 3'. Las señales restantes de H-6 y H-8 se observaron a δ 6.19 ppm d d (J 2.0 Hz), y a δ 6.41 ppm d (J 2.0 Hz), respectivamente. El protón anomérico de la rhamnosa se observó a δ 5.07 ppm d (J 8.0 Hz). Las señales de este compuesto difieren de su isómero quercetín 3-*O*-ramnósido (**4**) [6], por lo cual el compuesto **3** se identificó como un nuevo flavonoide correspondiente a 3'-*O*- β -D-ramnopiranosil quercetina.

5. BIBLIOGRAFÍA

[1] Yoshida, T., et al. (1999) *Oligomeric Hydrolyzable Tannins from Tibouchina multiflora*, *Phytochemistry*, **52**(8):1661-1666.

[2] Fossen, T., Andersen, OM. *Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Boca Raton FL. 2006, p. 37-142.

[3] Harborne, JB, Mabry, TJ and Mabry, H., *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, 1975, p. 47-61.

[4] Rijke, ED, et al. (2006) *Analytical separation and detection methods for flavonoids.*, *J Chromatogr A*, 1112, p. 31-63.

[5] Harborne, JB and Mabry, TJ. *The Flavonoids Advances in Research*, Chapman and Hall, 1982, p. 4-10.

[6] X. Ma, et al. (2005) *Isolation of Quercetin-3-O-L-rhamnoside from Acer truncatum Bunge by high-speed counter-current chromatography*. *J. Chromatogr. A*. 1070(1-2):211-214.

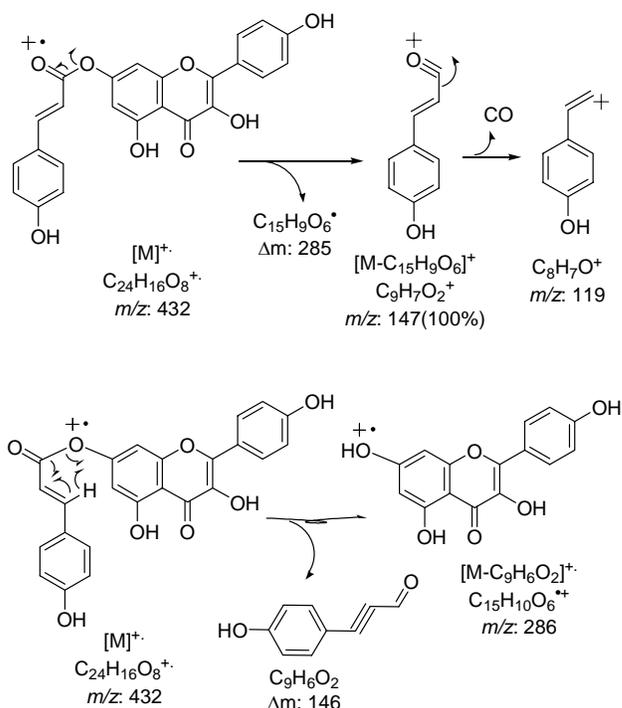


Figura 1. Patrón de fragmentación en el espectro de masas del compuesto **2**.