

ACTIVIDAD ICTIOTÓXICA DE *Miconia coronata* (BONPL.) D.C. (MELASTOMATACEAE)

RESUMEN

Miconia coronata (Bonpl.) DC., se homogenizó en *n*-hexano, diclorometano y acetona (70%). El homogenizado *n*-hexano se repartió entre *n*-hexano y MeOH. El homogenizado acetónico se fraccionó secuencialmente en EtOAc, *n*-BuOH y agua. Se desarrolló un ensayo semi-cuantitativo para la evaluación de ictiotoxicidad contra *Poecillia reticulata*. El rendimiento máximo (8.4%) y potente actividad ictiotóxica (50%) de la fracción EtOAc guió el fraccionamiento en DIAION HP-20. Los porcentajes de actividad ictiotóxica (%I.A.) de las fracciones fueron **1** (5%), **4** (20%), **5** (60%), **6** (100%) y **9** (100%). La fracción metanólica del extracto *n*-hexano produjo β -Sitosterol por cromatografía en columna sobre SiGel.

PALABRAS CLAVES: *Miconia coronata*; melastomataceae; ictiotoxicidad; β -sitosterol; actividad antibacteriana; taninos condensados.

ABSTRACT

Miconia coronata (Bonpl.) DC. (Melastomataceae), was homogenized in *n*-hexane, CH_2Cl_2 and 70% acetone. *n*-Hexane homogenate was partitioned in *n*-hexane and MeOH fractions. Acetone homogenate was sequentially liquid-liquid partitioned in EtOAc, *n*-BuOH and water. A semi-quantitative test for ichthyotoxicity against *Poecillia reticulata* was developed and highest yield (8.4%) and potent ichthyotoxic activity (50%) of EtOAc fraction prompted its fractionation on DIAION HP-20. Percentages of ichthyotoxic activity of fractions (% I.A.) were **1** (5%), **4** (20%), **5** (60%), **6** (100%) and **9** (100%). Column chromatography of methanolic fraction from *n*-hexane extract on SiGel afforded β -sitosterol.

KEYWORDS: *Miconia coronata*; melastomataceae; ichthyotoxicity; β -sitosterol; antibacterial activity; condensed tannins.

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas especies promisorias de plantas melastomataceas, condujo a la colección de la especie *Miconia coronata* (Bonpl.) D.C., de la cual no se tienen reportes ni químicos ni en farmacognosia. Este árbol nativo de Colombia, de 4-8m de altura, pertenece a la sección Tamonea de *Miconia*; el género más grande en la familia que agrupa unas 1000 especies distribuidas en toda América tropical [1,2,3]. Las plantas melastomataceas han sido usadas por años como medicina tradicional, especialmente en Asia y América Latina, como astringentes o hemostáticos, como remedios para diarrea, disentería, leucorrea y enfermedades de la piel [4]; contra afecciones respiratorias [5], malaria, cálculos en la vejiga y otras enfermedades del tracto genitourinario, irritaciones en las encías, y como diurético [6].

Muy pocos compuestos bioactivos han sido descritos previamente de especies de *Miconia*. Dos alquilbenzoquinonas ictiotóxicas y antitumorales, primin (1) y 2-metoxi-6-*n*-heptil-1,4-benzoquinona (2), fueron

Fecha de Recepción: 31 Mayo de 2005

Fecha de Aceptación: 12 Octubre de 2005

JOSÉ H. ISAZA M.

Ph.D. Profesor asociado, Grupo Polifenoles UTP, Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira.

jhim@utp.edu.co

LUZ A. VELOZA C.

Ph.D Profesor asistente, Grupo Polifenoles UTP, Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira.

lveloza@utp.edu.co

LUZ S. RAMIREZ A.

Ph.D. Profesor asistente, Grupo Polifenoles UTP, Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira.

luramire@utp.edu.co

LINA M. CALLE C.,

FRANCISCO J. JIMENEZ G.,

JULIÁN RAMIREZ V. Y

LILIAN CLAUDIA GÓMEZ A.

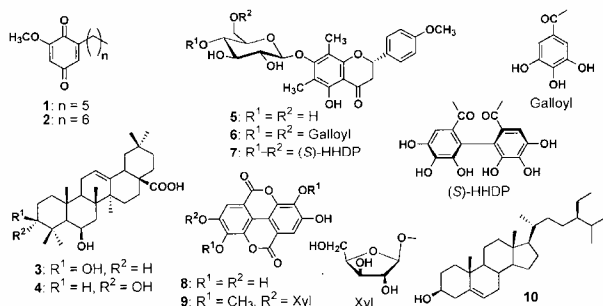
Estudiantes Tecnología Química, Grupo Polifenoles UTP Grupo Polifenoles UTP, Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira.

polifenoles@utp.edu.co

aisladas de *M. Lepidota* [7]; Del extracto etanólico de *M. stenotachya* se identificaron dos triterpenoides, ácido sumaresinólico (3) y ácido 3-epi-sumaresinólico (4) [8]; y de *M. myrianta* se aislaron dos compuestos inhibidores de proteasa aspártica secretada por *Candida albicans*, matucinol-7-*O*-[4'',6''-di-*O*-(*S*)-hexahidroxidifenoil]- β -D-glucopiranosido (7) y ácido elágico (8) junto con matucinol-7-*O*-[4'',6''-di-*O*-(*S*)-galoil]- β -D-glucopiranosido (6), matucinol-7-*O*- β -D-glucopiranosido (5), ácido 3,3'-di-*O*-metil-4-*O*- β -D-xilopiranosilelágico (9) y ácido gálico [9].

La actividad ictiotóxica es un ensayo preliminar conveniente para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos en plantas, por cuanto existen reportes de productos naturales ictiotóxicos que también exhiben una variedad de otras actividades biológicas, entre ellas actividad antitumoral [10]. Este artículo reporta el desarrollo de una escala semicuantitativa para determinar la actividad ictiotóxica en extractos vegetales y su

aplicación al fraccionamiento guiado por bioensayo de las hojas de *M. coronata*.



2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Material Vegetal

Las hojas de *Miconia coronata* fueron colectadas en la vereda la Bananera a orillas del Río Otún cerca de la ciudad de Pereira, Risaralda, Colombia, en Junio 18 del 2001. El Dr. Carlos Parra de la Universidad Nacional de Colombia, identificó la planta y se depositaron dos especímenes Voucher en el Herbario Nacional de Colombia, (COL462519 y 462534).

2.2 Procedimiento de extracción

Las hojas secas de *M. coronata* (359.5 g), fueron homogenizadas secuencialmente en *n*-hexano, cloruro de metileno y acetona acuosa al 70%. Cada homogenizado fue filtrado y concentrado a presión reducida a 40 °C. El homogenizado en *n*-hexano fue fraccionado con MeOH para obtener una fracción en *n*-hexano (0.79 g) y una fracción metanólica (1.19 g). El extracto en cloruro de metileno dio 3.63 g. El homogenizado en acetona acuosa fue fraccionado secuencialmente en embudo de separación líquido-líquido para obtener las fracciones en EtOAc (31.79g), *n*-BuOH (9.52g) y acuosa (11.94g); las cuales fueron concentradas al vacío.

2.3 Separación cromatográfica de la fracción MeOH

La fracción MeOH, del extracto en *n*-hexano (1.0 g) fue sometida a cromatografía en columna sobre Silica Gel 60 (3.4 cm diámetro interno x 25 cm de largo), con gradiente de pasos en *n*-hexano-acetona {(95:5) → (87.5:12.5) → (80:20) → (70:30) → (50:50)} y 100% MeOH, recogiendo 412 fracciones. Las fracciones fueron monitoreadas por TLC-SiGel y reunidas como sigue: Fr. 10-22 (97.7 mg), Fr. 23-57 (7.6 mg), Fr. 58-64 (111.7 mg), Fr. 65-137 (119.9 mg), Fr. 138-170 (70.0 mg), Fr. 171-221 (22.2 mg), Fr. 222-261 (16.4 mg), Fr. 262-270 (86.6 mg), Fr. 271-301 (10.0 mg), Fr. 302-325 (28.5 mg), Fr. 326-358 (20.6 mg) y Fr. 359-412 (239.5 mg). De las fracciones 58-64 se aisló el compuesto (**10**) (85mg) en cristales blancos; el cual fue identificado como β -Sitosterol.

2.4 Separación cromatográfica de la fracción en EtOAc

La fracción obtenida en EtOAc (3.0 g) del homogenizado en acetona acuosa al 70% fue disuelta en agua-MeOH (8:2) y aplicada a una columna cromatográfica DIAION HP-20 (2.5 cm de diámetro interno x 50 cm de largo). La elusión fue realizada con gradiente de pasos con agua, MeOH (10%, 20%, 40%, 70%, 100%), acetona acuosa al 70% y EtOH 95%, colectando 32 fracciones de 250 mL cada una. Las medidas de absorbancia de las fracciones a 280 nm (lectura directa) y a 820 nm (reactivo de Folin-Ciocalteu), en espectrofotómetro Génesis 5 Milton-Roy, fueron usadas para generar los dos cromatogramas que se muestran en la figura 4. Aquellas fracciones que formaron picos cromatográficos y mostraron espectros UV similares fueron reunidas para obtener solamente nueve fracciones: Fr. 1 (0.1279 g), Fr. 2 (0.0112 g), Fr. 3 (0.0250 g), Fr. 4 (0.1970 g), Fr. 5 (1.9795 g), Fr. 6 (0.1116 g), Fr. 7 (0.0201 g), Fr. 8 (0.0270 g), Fr. 9 (0.0690 g).

2.5 Ensayo de actividad ictiotóxica

Los guppies (*Poecilia reticulata*) fueron pescados en el lago Río Paila (La Paila, Valle del Cauca, Colombia) junto con otras especies, las cuales rápidamente murieron. Los peces seleccionados fueron acondicionados al ambiente del laboratorio por cuatro días en agua aireada.

Cada uno de los extractos y las fracciones 1, 4, 5, 6 y 9 fueron disueltas en acetona (40 mg/0.5 mL) y adicionadas a un beaker de 250 mL que contenía cinco peces en 100 mL de agua aireada. El blanco fue preparado por adición de 0.5 mL de acetona. El patrón de comportamiento de los peces, incluyendo natación errática, nerviosismo, inmovilidad y muerte, fue observado durante 24 horas. Se desarrolló una escala semi-cuantitativa para registrar los porcentajes de actividad ictiotóxica (% A.I.), la cual involucra tanto el número de muertes como el tiempo en el cual ésta ocurre. Un % A.I. = 100 fue asignado para el caso en que todos los cinco peces mueran antes de la primera hora de iniciado el ensayo y un % A.I. = 0, si todos los peces sobreviven después de las 24 horas como en el blanco. Los valores fueron calculados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%A.I. = 20(n \text{ peces muertos})/m \text{ horas}$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Actividad ictiotóxica de las fracciones del homogenizado en acetona

Los altos rendimientos de las fracciones EtOAc (8.4%), *n*-BuOH (2.5%) y acuosa (3.1%), respecto al peso de las hojas secas, y la prueba positiva con cloruro férrico

indican que *M. coronata* es una planta rica en compuestos fenólicos. La figura 1 muestra que la fracción más promisoría fue en EtOAc con el más alto rendimiento y la más potente actividad ictiotóxica (%A.I. = 50% a 400 $\mu\text{g/mL}$); seguido por la fracción *n*-BuOH con igual porcentaje de actividad ictiotóxica, pero menor rendimiento. Ambas fracciones mataron todos los peces dentro de la segunda hora de aplicación; mientras la fracción acuosa mostró solamente una actividad piscicida residual y solo tres peces murieron después de la 8^a, 12^a y 19^a horas de ensayo a la misma concentración. En todos los casos, los peces comenzaron con inversión longitudinal con la cabeza arriba hacia la superficie, y abriendo la boca después de la primera hora; luego cayeron rápidamente y permanecieron dorsalmente inmóviles, pero respondiendo a estimulación sonora por 20 minutos antes de morir. La dificultad respiratoria puede explicarse por la degradación de los centros respiratorios en el lóbulo vagal de los peces, un mecanismo similar al reportado para triterpenoides de *Aesculus indica* [11].

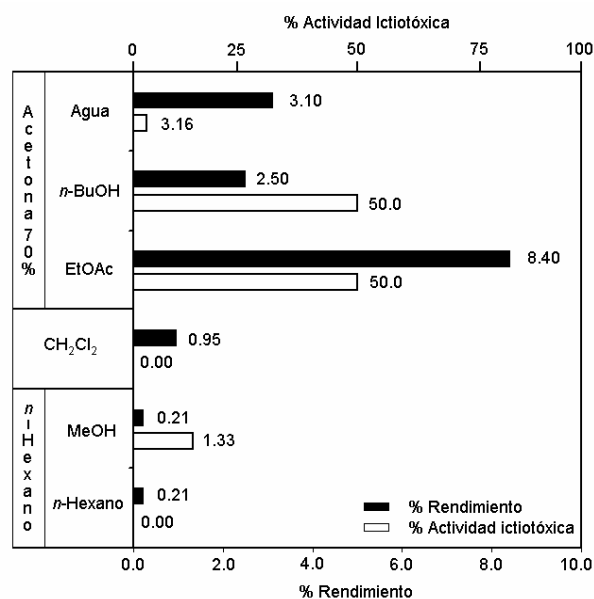


Figura 1. Comparación de rendimiento y porcentajes de actividad ictiotóxica de las fracciones iniciales obtenidas de las hojas de *M. coronata*. % A. I. es un parámetro semi-cuantitativo (Ver materiales y método)

La fracción metanólica del extracto *n*-hexano dio actividad ictiotóxica promisoría, pero muy bajos rendimientos. La cromatografía en columna de esta fracción produjo β -Sitosterol (10), el cual fue identificado por comparación de sus propiedades físicas y espectros FTIR, RMN ¹H y RMN ¹³C con aquellos previamente reportados [12,13,14]. Las fracciones 326-358 (20.6 mg) exhibieron ictiotoxicidad y contienen una mezcla compleja de fenoles simples, de acuerdo con su perfil cromatográfico en TLC y el espectro UV.

3.2 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción en EtOAc

El cromatograma generado a 820 nm por reacción postcolumna con el reactivo de Folin-Ciocalteu fue más confiable para la detección de fenoles que a 280 nm, tanto en la sensibilidad como en la resolución. La interferencia causada por la elusión con acetona al final de la corrida en el cromatograma a 280 nm, no se observó a 820 nm y este último además correlacionó con el método gravimétrico como se muestra en las figuras 2 y 3. De esta manera, el fraccionamiento del extracto EtOAc de *M. coronata* por cromatografía en columna de DIAION HP 20 dio nueve fracciones con un porcentaje de recuperación de 85.6%. La fracción principal fue la quinta, correspondiendo al 66% de la fracción EtOAc. Una coloración verde con cloruro férrico y una coloración roja con HCl/*n*-BuOH y calentamiento [13], junto con bandas de absorción UV a 279 y a 273 nm en las fracciones 4 y 5, respectivamente, indicaron taninos condensados como componentes mayoritarios. El color verde de la reacción con el reactivo de antrona indica que las fracciones 2, 3, 6 y 7 contienen glicósidos de aromáticos o fenoles simples, los cuales fueron evidenciados por la presencia de bandas de absorción a 264 nm en la fracción 2, a 258 y 291 nm en la 3, y a 255 nm en la 7.

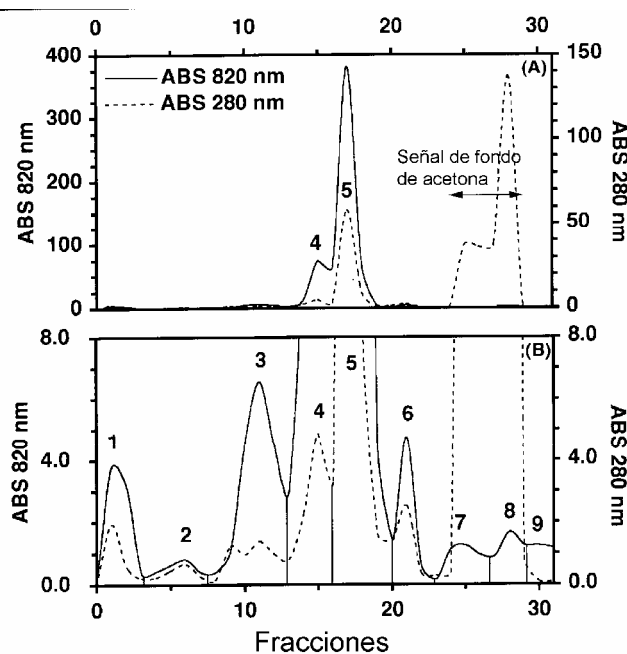


Figura 2. Cromatograma de la fracción EtOAc de *M. coronata* en DIAION HP 20 construido a partir de la absorbancia directa a 280 nm (línea continua) y a 820 nm después de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Línea punteada). A. Escala total y B. es una expansión que muestra las fracciones minoritarias.

3.3. Actividad ictiotóxica de las fracciones de la columna DIAION de la fracción EtOAc

Las fracciones 1, 4, 5, 6 y 9 exhibieron actividad piscicida como lo muestra la figura 3. Las respuestas de los peces a los tratamientos con diferentes fracciones fueron manifestadas por diversos comportamientos; los cuales indicaron varios tipos de compuestos como también diferentes mecanismos de acción. Las fracciones más promisorias para investigaciones farmacológicas posteriores fueron 4, 5 y 6 con los más altos rendimientos y actividad ictiotóxica de 20, 60 y 100% respectivamente (Figura 3). El comportamiento de los peces en estas fracciones fue el mismo que en el extracto EtOAc, indicándolas como las responsables del mecanismo de acción principal; el cual involucra daño en los lóbulos vagales de los centros respiratorios. Aunque las fracciones 1 y 9 no fueron promisorias debido a la escasa ictiotoxicidad y bajo rendimiento respectivamente, fue interesante que las dos causaran inversión transversal y pérdida total de la capacidad de flotar en la fracción 1, lo cual indica un mecanismo depresivo relacionado con neurosis en el cerebro posterior del pez [15] en contraste con convulsiones similares a epilepsia en el tratamiento con la fracción 9, sugiriendo un mecanismo mixto.

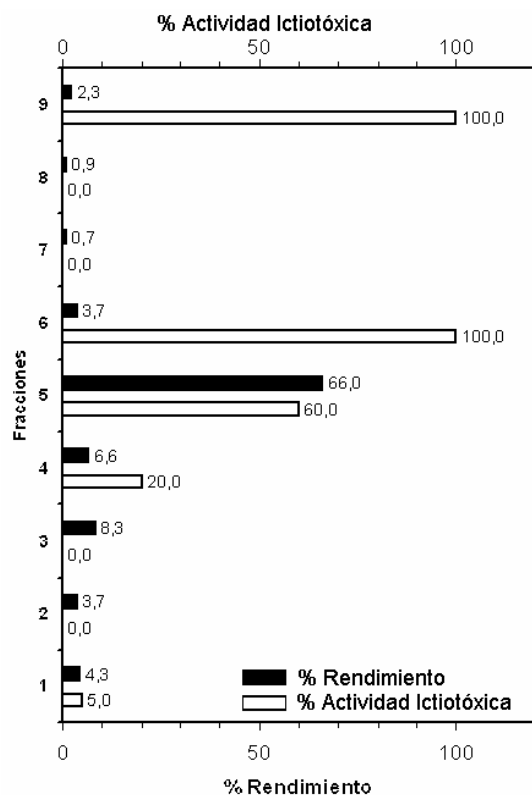


Figura 3. Comparación de los rendimientos y de la actividad ictiotóxica de las fracciones cromatográficas obtenidas de la columna DIAION HP 20 de la fracción EtOAc de *M. coronata*. Los rendimientos fueron determinados gravimétricamente respecto a la fracción EtOAc.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Aunque no se encontraron reportes de usos etnofarmacológicos de *M. coronata*, los resultados presentados indican que la especie es rica en taninos condensados y su actividad ictiotóxica la hace promisoría en la búsqueda más avanzada de metabolitos secundarios y evaluación de los mismos con otros ensayos de actividades biológicas in Vitro.

La escala semi-cuantitativa que se desarrolló resulta ser un instrumento sencillo para la evaluación de actividad ictiotóxica, sin necesidad de utilizar rotenona como control positivo. En el futuro se involucrará una tercera dimensión, variando la concentración de las sustancias de prueba.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte de un macroproyecto cofinanciado entre COLCIENCIAS (1110-07-12-544), la Universidad Tecnológica de Pereira (511-3-265-01) y CENIVAM contrato (COLCIENCIAS) RC-432, 2004. Los autores agradecen a los Drs. Fernando Echeverry y Winston Quiñones del Instituto de Química, Universidad de Antioquia, por los espectros de RMN y al Laboratorio de Suelos, Escuela de Química, Universidad Tecnológica de Pereira por suplir algunas de las necesidades de solventes para esta investigación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. QUIÑONES M, L.M., Diversidad de la Familia Melastomataceae en la Orinoquia Colombiana. 2001. pag 125
- [2]. Renner, S.S. 1993. Phylogeny and Classification of the Melastomataceae and Memecillaceae. Nordic Journal of Botany. **13**: 519-540.
- [3]. Umaña Dodero, G. and Alameda, F. 1995. *Miconia amplinoies* (Melastomataceae: Miconieae), una nueva especie para Costa Rica. Novon. 5: 110-113.
- [4]. Perry, L.M. and Metzger, J. 1980. Medicinal Plants of East and Southeast of Asia, MIT Press, Cambridge.
- [5]. Renner, S.S. 1990. A Revision of *Rychanthera* (Melastomataceae). Nord. J. Bot. (9): 601-630.
- [6]. Garcia Barriga, H. 1992. Flora Medicinal Colombiana. Botanica Medica. Vol. 2. Tercer Mundo Editores., Santafe de Bogota.
- [7]. Gunatilaka, A.A., Berger, J.M., Evans, R., Miller, J.S., Wisse, J.H., Neddermann, K.M.,

- Bursuker, I., and Kingston, D.G. 2001. Isolation, synthesis, and structure-activity relationships of bioactive benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname rainforest. *Journal Natural Products*. 64: 2-5.
- [8]. Chan, W.R. and Sherppard, V. 1992. Triterpenoids from *Miconia stenotachya*. *Journal of Natural Products*. 55: 963-966.
- [9]. Li, X.C., Jacob, M.R., Pasco, D.S., ElSohly, H.N., Nimrod, A.C., Walker, L.A., and Clark, A.M. 2001. Phenolic Compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* Aspartic Proteases. *J Nat Prod*. 64:1282-1285
- [10]. Ito, H., Muranaka, T., Mori, K., Jin, Z.-X., Tokuda, H., Nishino, H., and Yoshida, T. 2000. Ichthyotoxic phloroglucinol Derivatives from *Dryopteris fragrans* and their Anti-tumor Promoting Activity. *Chem. Pharm. Bull.* 48:1190-1195.
- [11]. Bhatt, J.P. 1992. Neurodepressive action of a piscicidal glycoside of plant, *Aesculus indica* (Colebr.) in fish. *Indian J Exp Biol*. 30: 437-439.
- [12]. Adler, J.H. 1983. Configuration at C-24 of Sterols from the Liverwort *Palavicinia lyellii*. *Phytochemistry*. 22: 607-608.
- [13]. Castola, V., Bighelli, A., Rezzi, S., Melloni, G., Gladiali, S., Desjobert, J.-M., and Casanova, J. 2002. Composition and Chemical Variability of the Triterpene Fraction of Dichloromethane Extracts of Cork (*Quercus suber* L.). *Industrial Crops and Products*. 15: 15-22.
- [14]. Garg, V.K. and Nes, W.r. 1984. Codisterol and Other A5-Sterols in the Seeds of *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry*. 23: 2925-2929.
- [15]. Bhatt, J.P. 1991. Neurolytic manifestation of piscicidal flavanoid of plant, *Engelhardtia colebrookiana* (Lindle) in fish. *Indian J Exp Biol*. 29: 588-590.