

Actividad antibacteriana de fracciones obtenidas de las hojas de *Cassia uniflora* frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina

Antibacterial activity of fractions obtained from Cassia uniflora leaves against methicillin-resistant Staphylococcus aureus

MSc. José Angel Morales-León^I, Dr. C. Quirino Arias-Cedeño^I,
Dr. C. Eugenio Torres-Rodríguez^I, Dr. C. Alejandro Alarcón-Zayas^{II},
MSc. Orlando R. Sario-Tamayo^{III}

jmorales@udg.co.cu

^I Centro de Estudios de Química Aplicada. Universidad de Granma, Cuba; ^{II} Departamento de Química. Universidad de Granma. Cuba; ^{III} Departamento de Ingeniería Forestal. Universidad de Granma. Cuba.

Recibido: 22 de noviembre de 2016

Aprobado: 11 de marzo de 2017

Resumen

En este trabajo se determina la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina y la composición fitoquímica de fracciones bioactivas, obtenidas a partir de las hojas de *Cassia uniflora*. Se prepararon 8 fracciones mediante cromatografía de columna, a partir del extracto clorofórmico de las hojas que fueron sometidas a determinaciones de la actividad antibacteriana por el método de Bauer-Kirby y de la composición fitoquímica mediante tamizaje fitoquímico, cromatografía de capa delgada y espectroscopias UV e IR. Dos fracciones presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina. Los metabolitos secundarios asociados a la actividad biológica pudieran ser flavonoides y cumarinas. Los espectros UV e IR y la comparación del espectro IR de la fracción más activa con una base de datos con más de 100 000 compuestos, sugieren que el componente activo puede ser una cumarina, específicamente una aminocumarina.

Palabras clave: actividad antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, metilina, *Cassia uniflora*, metabolitos secundarios.

Abstract

In this work the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin was determined and the phytochemical composition of bioactive fractions was obtained from *Cassia uniflora* leaves. Eight fractions were prepared by column chromatography from the chloroform extract of the leaves, which were subjected to determinations of the antibacterial activity by the Bauer-Kirby method and the phytochemical composition by phytochemical screening, thin layer chromatography and UV and IR spectroscopies. Two fractions showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. Secondary metabolites associated with biological activity could be flavonoids and coumarins. UV and IR spectra and

comparison of the IR spectrum of the most active fraction with a database with more than 100,000 compounds suggest that the active component may be a coumarin, specifically an aminocoumarin.

Keywords: antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, methicillin, *Cassia uniflora*, secondary metabolites.

Introducción

Estudios de bioactividad realizados a extractos de las hojas de *Cassia uniflora*, demostraron actividades analgésica, antiinflamatoria y antiartrítica asociadas a determinados componentes fitoquímicos [1]. Otros evidenciaron que la propiedad invasiva y dominante de esta planta está ligada a componentes aleloquímicos de las hojas con actividad fitotóxica, capaz de inhibir la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de otras especies y con la actividad larvicida frente a *Aedes aegypti* [2, 3].

En las hojas de *C. uniflora* se han encontrado terpenoides, esteroides, flavonoides, aceites esenciales amargos y purgantes, antocianidinas, fenoles, taninos, compuestos, quinonas y cumarinas [4]. Algunos de estos metabolitos secundarios están relacionados con la actividad antibacteriana de varias plantas [5].

Roig [6] informó que *C. uniflora* ha sido usada de forma empírica en el tratamiento de erupciones cutáneas que pueden ser de origen bacteriano. El impétigo es una de estas alteraciones y una de sus causas más importantes es la infección provocada por *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina [7].

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la actividad antibacteriana frente a *S. aureus* resistente al antibiótico metilina y la composición fitoquímica de fracciones bioactivas, obtenidas a partir de las hojas de *C. uniflora*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las hojas de plantas adultas de *C. uniflora* fueron seleccionadas y procesadas según NRSP 309 [8]. Con posterioridad se desinfectaron mediante una limpieza con agua potable y remojo en una disolución de hipoclorito de sodio al 2 % [4]. Luego, las hojas se secaron y fue obtenido un polvo a partir de ellas.

Extracto y fracciones

Unos 10 g del polvo de las hojas se introdujeron en un balón de 250 mL cubierto con papel y se adicionaron 50 mL de cloroformo, se tapó y agitó en zaranda a 60 rpm

durante 24 h. El extracto preparado se dejó reposar durante 2 h ($T= 4-8\text{ }^{\circ}\text{C}$) y después se filtró a presión reducida. El filtrado obtenido se concentró hasta sequedad en un evaporador rotatorio y fue usado en cromatografía de capa delgada (CCD), con el fin de fijar una proporción adecuada de solventes para la separación de los componentes fitoquímicos del extracto. La CCD sirvió como cromatografía preparativa. Una alícuota del extracto se depositó en la placa y se realizó la corrida utilizando una mezcla tolueno-acetato de etilo 3:1 (v/v) como fase móvil. La separación de los componentes se observó bajo luz visible (vis.) y UV ($\lambda=365\text{ nm}$).

Las fracciones fueron obtenidas mediante cromatografía de columna (CC), empleando como fase estacionaria gel de sílice. Las fases móviles se prepararon teniendo en cuenta los resultados en la cromatografía preparativa, usando tres mezclas tolueno-acetato de etilo (v/v) para conformar un gradiente de polaridad creciente (3:1, 1:1, 1:3). 10 mL del extracto clorofórmico seco redissuelto en tolueno-acetato de etilo 3:1 (v/v) se vertió por las paredes de la columna. Por cada componente del gradiente de polaridad se eluyeron dos volúmenes de columna. La colección de las fracciones se realizó considerando la resolución del cromatograma obtenido en CCD. Las fracciones colectadas fueron monitoreadas mediante CCD.

Ensayos antibacterianos

La actividad antibacteriana fue determinada por el método de Bauer-Kirby [9]. Se utilizó una cepa salvaje de *S. aureus* aislada en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Provincial Clínico Quirúrgico “Celia Sánchez” de Manzanillo, Cuba.

Las fracciones fueron evaporadas hasta sequedad y redissueltas en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final en los discos fue de 2,5 mg/disco.

Se aplicó un tratamiento con tres réplicas, utilizando como control negativo DMSO, y como controles positivos los antibióticos comerciales meticilina y ciprofloxacino. La meticilina se usó para determinar la resistencia de la cepa de *S. aureus*. La variable medida fue diámetro del halo de inhibición (DI) (mm) y los resultados se informaron como el promedio del diámetro de los halos de inhibición.

Composición fitoquímica

Teniendo en cuenta datos reportados [4] fue aplicado un conjunto de métodos específicos estandarizados de tamizaje fitoquímico [10], para la determinación de los grupos de metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas contra *S. aureus*.

Los resultados obtenidos fueron corroborados mediante espectroscopias UV e IR. Los espectrogramas UV fueron procesados a través del software UV2100 *Aplication* (Rayleigh, China) y se interpretaron utilizando una base de datos en línea [11]. La interpretación del espectro IR se realizó empleando tablas de correlación [12] y fue confirmada mediante comparaciones con una base de datos con espectros IR de más de 100 000 compuestos [13].

Resultados y discusión

En la tabla 1 están reflejados los valores de R_f y los colores de las fracciones de elución obtenidas en CC. El monitoreo mediante CCD permitió unir los volúmenes de elución colectados con R_f similares para formar las fracciones finales.

TABLA 1. R_f Y COLORES DE LAS FRACCIONES DE ELUSIÓN OBTENIDAS

Fracciones	R_f	Colores		
		Líquido (vis.)	CCD	
			vis.	UV ($\lambda=365$ nm)
F ₁	0,971 0	Amarillo	Amarillo	Blanco
F ₂	0,862 0	Verde oscuro	Verde	Marrón
F ₃	0,836 3	Verde	Verde-azul	Rosado intenso
F ₄	0,763 6	Marrón	Verde claro	Anaranjado
	0,600 0		Amarillo claro	Amarillo
	0,518 1		Blanco-amarillo	Azul claro
	0,472 7		Amarillo	Rosado
F ₅	0,518 1	Verde-amarillo	Verde limón	Azul
F ₆	0,526 7	Anaranjado intenso	Amarillo	Rosado azulado
F ₇	0,423 1	Anaranjado	Rosado claro	Marrón
	0,399 7		Carmelita claro	Rojo-marrón
F ₈	0,362 3	Anaranjado claro	Amarillo	Rosado
	0,352 6		Amarillo claro	Rosado

Los diferentes colores observados en vis. y 365 nm demuestran la existencia de varias sustancias. La CCD mostró que F₁ y F₅ pudieran estar formadas por un componente (figura 1). El resto de las fracciones constituyen mezclas.

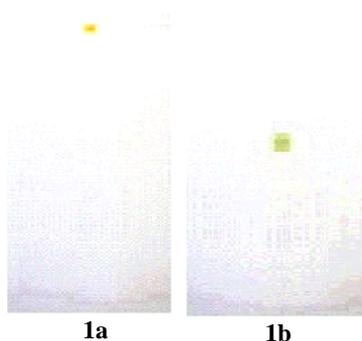


Fig. 1. CCD. 1a: Fracción F₁. 1b: Fracción F₅

Los resultados de la actividad antibacteriana mostraron que *S. aureus* desarrolló resistencia frente al control meticilina, mientras que el antibiótico ciprofloxacino y dos fracciones de elusión presentaron actividad (tabla 2).

TABLA 2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS FRACCIONES DE ELUSIÓN FRENTE A *S. aureus*

Fracciones	Concentración (µg/disco)	DI (mm)
F ₁	2,5	-
F ₂	2,5	-
F ₃	2,5	-
F ₄	2,5	10,6± 0,6
F ₅	2,5	16,6± 0,6
F ₆	2,5	-
F ₇	2,5	-
F ₈	2,5	-
Ciprofloxacino	5	18± 0,6
Meticilina	30	-

(-): No presentó actividad.

La meticilina es un antibiótico β-lactámico. La resistencia de *S. aureus* frente a este antibiótico está asociada a la adquisición de un gen no nativo que codifica una proteína de unión a penicilina (PBP2a) con una afinidad menor por β-lactamas. Esta resistencia permite la biosíntesis de la pared celular, el blanco de β-lactamas, para continuar incluso en presencia de concentraciones inhibitorias típicas de antibiótico [14].

Según los datos obtenidos el componente activo se encuentra en F₄ y F₅. Los resultados de la actividad antibacteriana sugieren una mayor concentración en F₅, demostrando la existencia de dosis-dependencia. Por tanto, F₄ puede ser considerado como F₅ contaminado.

Es interesante la relación de los DI de los productos activos con las concentraciones utilizadas. La concentración del antibiótico es dos veces superior a la de las fracciones, sin embargo, la diferencia entre los DI del ciprofloxacino y la fracción más activa no es relevante, demostrando la potencia del producto natural frente a *S. aureus*. Este es un resultado alentador, pues no son frecuentes DI de extractos de plantas similares a los de antibióticos [15].

El tamizaje fitoquímico de las fracciones antibacterianas sugiere que los componentes activos de las hojas pueden ser flavonoides y cumarinas, con mayor incidencia en estas últimas pues en F₅ no se encontraron flavonoides (tabla 3).

**TABLA 3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LAS
FRACCIONES ANTIBACTERIANAS**

Metabolitos	F ₄	F ₅
Cumarinas	++	++
Fenoles y/o taninos	-	-
Quinonas	-	-
Flavonoides	+	-

(-): ausente, (+): presente; (++) : abundante

F₄ y F₅ fueron sometidas a ensayos espectroscópicos en UV. Los espectros obtenidos aparecen en la figura 2.

En el espectro UV de F₄ aparecen trece máximos de absorción con distintos valores de absorbancia (tabla 4), por tanto, puede ser una mezcla de varios compuestos. Están delimitadas dos áreas de absorción, una entre 196 y 422 nm con cuatro picos principales que se encuentran dentro de la zona de absorción de los flavonoides [16]; y la otra entre 522 y 850 nm, con un pico de absorción intenso a 666 nm, visible también en el espectro de F₅. Considerando el resultado del tamizaje fitoquímico, esta señal pudiera corresponder a una cumarina muy conjugada pues presenta un corrimiento batocrómico que puede estar relacionado con efectos combinados de dobles enlaces adicionales, sustituyentes como el -NH₂, efectos del solvente y condensación [17-19].

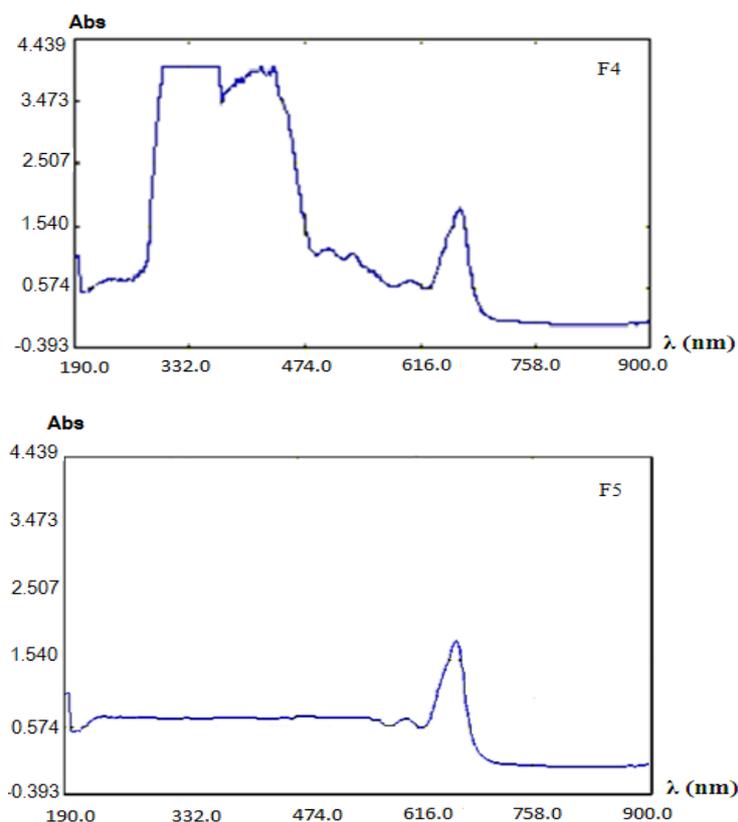


Fig. 2. Espectros UV de las fracciones antibacterianas

TABLA 4. MÁXIMOS DE ABSORCIÓN Y VALORES DE ABSORBANCIA REGISTRADOS EN LOS ESPECTROS UV DE F₄ Y F₅

Picos	λ (nm)	Absorbancia
1	900,00	0,045 5
2	666,00	1,802 9
3	604,00	0,691 6
4	534,00	1,114 1
5	504,00	1,1855
6	436,00	4,0000
7	422,00	3,975 5
8	392,00	3,803 9
9	302,00	4,000 0
10	260,00	0,730 7
11	250,00	0,727 4
12	234,00	0,730 2
13	196,00	1,060 2

Fuente: Espectrogramas UV de F₄ y F₅.

En la figura 3 aparece el espectro IR obtenido para F₅, indicando las bandas de absorción (ν , cm^{-1}).

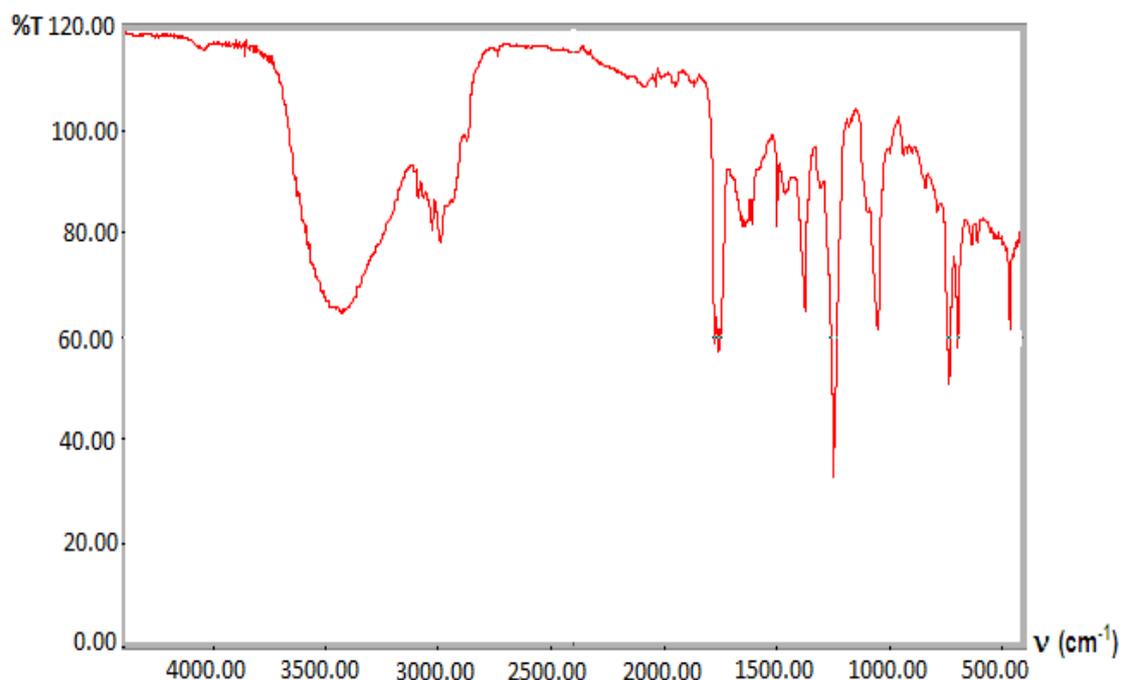
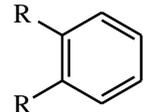


Fig. 3. Espectro IR de F₅

F₅: IR (KBr) ($\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}) 3 630 (OH) ancha, 3 080 (-CH=) (aromáticos), 1 715 (C=O) (aromático), 1 185 (C-O-C), 1 720-1 950, 750 (Ar) tonos armónicos.

La existencia de bandas superpuestas a 3 080 y 1 715 cm^{-1} pueden ser consecuencia de la presencia de varios grupos C=O; los tonos armónicos (1 720-1 950 y 750 cm^{-1}) son característicos de anillos aromáticos polisustituídos. La banda ancha (OH) es propia de los grupos involucrados en puentes de hidrógeno intramoleculares. El doblete de Ferming en 3 000-2 900 cm^{-1} revela la presencia del grupo -NH₂ como sustituyente en anillos aromáticos, por lo que pudiera tratarse de una aminocumarina (tabla 5). Estos datos y la aparición de la banda C-O-C ayudan a confirmar que F₅ contiene los elementos principales de la estructura base de las cumarinas.

TABLA 5. BANDAS DE ABSORCIÓN EN EL ESPECTRO IR DE F₅ (ν , cm^{-1})
ASIGNADAS A GRUPOS FUNCIONALES

Grupo funcional	OH	-CH=	-NH ₂		C=O	C-O-C	-N(CH ₃) _n
ν (cm^{-1})	3 630	3 080	3 000-2 900	1 720-1 950, 750	1 715	1 185	1 210

El espectro IR de F₅ se introdujo en una base de datos con más de 100 000 compuestos, para realizar una comparación basada en los valores de la distancia euclidiana y ratificar

la asignación de las señales a los grupos funcionales. Las mayores aproximaciones se obtuvieron en 4 casos (figura 4).

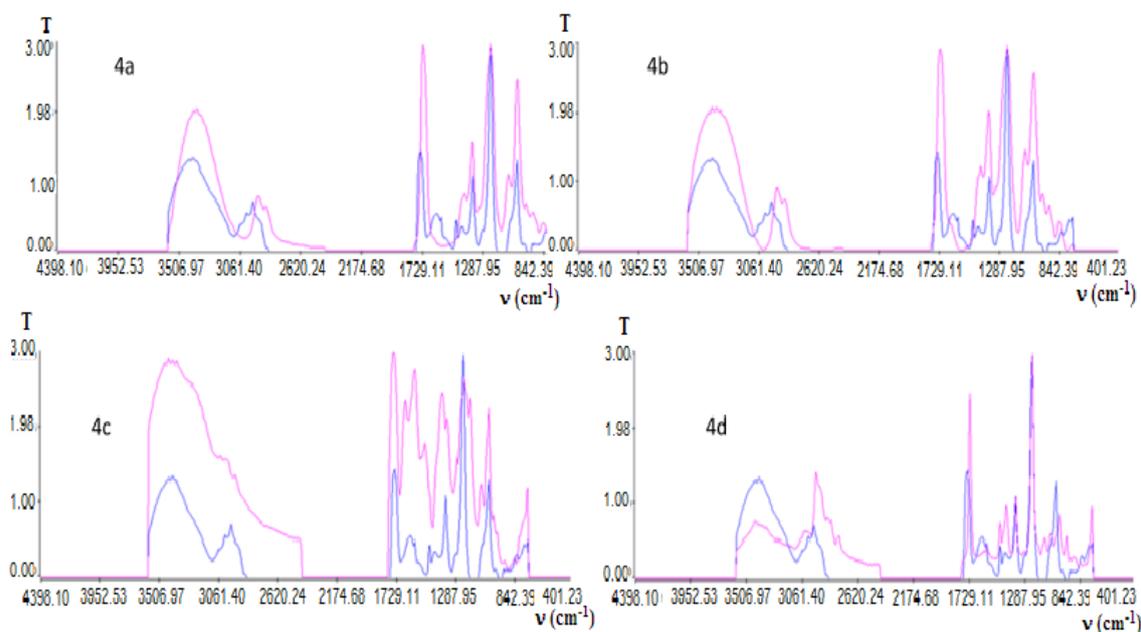


Fig. 4. Aproximaciones obtenidas en las comparaciones del espectro IR de F5 con la base de datos empleada. Comparaciones: 4a. Monooleato de glicerina. 4b. 1, 2, 3-propanotriol monoacetato, 4c. Cefalosporina. 4d. L- α -acetil-N-normetadol

Las aproximaciones obtenidas sugieren la presencia de la agrupación C-O-C=O en la estructura de F5 (figuras 4a y 4b), así como de grupos nitrogenados probablemente contenidos en la agrupación -N(CH₃)_n, con n=1, 2 (figuras 4c y figura 4d).

Los datos IR revelan que F5 presenta los grupos funcionales característicos del esqueleto 2*H*-1-benzopirán-2-ona, concordando con estudios realizados que refieren que muchas cumarinas naturales y sintéticas, incluidas las aminocumarinas, contienen grupos OH, libres o combinados [20-22]. Es probable que las señales registradas en la huella dactilar de la molécula (por debajo de los 1 500 cm^{-1}) pertenezcan a anillos aromáticos condensados, fenoles prenilados, unidades isoprenoides sustituyentes o grupos glicosídicos unidos al anillo cumarínico.

Los espectros UV e IR obtenidos confirman los resultados del tamizaje fitoquímico y permiten prever que el componente antibacteriano detectado en las hojas de *C. uniflora* sea una cumarina, específicamente una aminocumarina. Los resultados de actividad antibacteriana del componente activo coinciden con otros en los que se ha demostrado la actividad de las cumarinas y sus derivados frente a *S. aureus* [23], donde se destacan

las aminocumarinas novobiocina, clorobiocina y coumermicina A1 por su potente efecto inhibitor sobre la girasa bacteriana [24].

Conclusiones

Fueron obtenidas ocho fracciones de elusión a partir de un extracto clorofórmico de las hojas de C. uniflora. De ellas, dos resultaron activas frente a una cepa de S. aureus resistente a la metilina. Los metabolitos secundarios asociados a la actividad biológica pudieran ser flavonoides y cumarinas, con mayor relevancia para estas últimas. Los datos espectroscópicos UV e IR conllevan a considerar que el componente activo pueda ser una cumarina, específicamente una aminocumarina.

Agradecimientos

Ofrecemos nuestro agradecimiento al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por el apoyo técnico-material brindado en la realización de esta investigación.

Referencias bibliográficas

1. CHAUDHARI, S. S.; CHAUDHARI, S. R.; CHAVAN, M. J. "Analgesic, anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Cassia uniflora* Mill". *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012, **2** (1), S181-6.
2. GHAYAL, N.; PADHYE, A.; DHUMAL, K. "Larvicidal activity of invasive weeds *Cassia uniflora* and *Synedrella nodiflora*". *Int J Pharma Bio Sci.* 2010, **1** (3), 1-10. ISSN 0975-6299.
3. VITONDE, S.; THENGANE, R. J.; GHOLE, V. S. "Allelopathic effects of *Cassia tora* and *Cassia uniflora* on *Parthenium hysterophorous* L". *J Med Plants Res.* 2014, **8** (4), 194-196. ISSN 1996-0875.
4. MORALES LEÓN, J. A.; FONSECA GARCÍA, A.; ALMEIDA SAAVEDRA, M.; MORALES TORRES, G.; TORRES RODRÍGUEZ, E. "Tamizaje fitoquímico de *Cassia uniflora* Mill". *Rev Cub Plant Med.* 2011, **16** (4), 331-336. ISSN 1028-4796.
5. COMPEAN, K. L.; YNALVEZ, R. A. "Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review". *Res J Med Plant.* 2014, **8** (5), 204-213. ISSN 1819-3455.
6. ROIG MESA, J. T. *Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos*. 4ta ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica. 2014. ISBN 959-05-0712-3.

7. LADHANI, S.; JOANNOU, C. L.; LOCHRIE, D. P.; EVANS, R. W.; POSTON, S. M. "Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome". *Clinical microbiology reviews*. 1999, **12** (2), 224–242.
8. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. NRSP No. 309. Medicamentos de origen vegetal: droga cruda. Métodos de ensayos. La Habana: MINSAP, 1992.
9. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method". *Amer Clin Pathol*. 1966, **45**, 493-6.
10. THANGARAJ, P. "Extraction of Bioactive Compounds". En: *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*. Switzerland: Springer International Publishing; 2016. vol. 71, p. 188. ISBN 978-3-319-26810-1.
11. NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. Libro del Web de Química del NIST [en línea]. [Consulta: 14 octubre 2016]. Disponible en: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
12. UNIVERSITY OF CALIFORNIA. Infrared Spectroscopy Absorption Table - Chemistry LibreTexts [en línea]. [Consulta: 15 octubre 2016]. Disponible en: https://chem.libretexts.org/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table
13. NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. AIST: Spectral Database for Organic Compounds, SDBS [en línea]. [Consulta: 15 octubre 2016]. Disponible en: http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
14. PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. "Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*". *Annual Review of Biochemistry*. 2015, **84** (1), 577-601. ISSN 0066-4154, 1545-4509.
15. GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. "Natural products as antimicrobial agents". *Food Control*. 2014, **46**, 412-429. ISSN 0956-7135.
16. SISA, M.; BONNET, S. L.; FERREIRA, D.; VAN DER WESTHUIZEN, J. H. "Photochemistry of Flavonoids". *Molecules*. 2010, **15** (8), 5196-5245. ISSN 1420-3049.

17. YAMAJI, M.; HAKODA, Y.; OKAMOTO, H.; TANI, F. "Photochemical synthesis and photophysical properties of coumarins bearing extended polyaromatic rings studied by emission and transient absorption measurements". *Photochem. Photobiol. Sci.* 2017, **16** (4), 555-563.
18. LIU, X.; COLE, J. M.; LOW, K. S. "Solvent Effects on the UV-vis Absorption and Emission of Optoelectronic Coumarins: a Comparison of Three Empirical Solvatochromic Models". *The Journal of Physical Chemistry C.* 2013, **117** (28), 14731-14741. ISSN 1932-7447, 1932-7455.
19. DONOVALOVÁ, J. *et al.* "Spectral Properties of Substituted Coumarins in Solution and Polymer Matrices". *Molecules.* 2012, **17** (12), 3259-3276. ISSN 1420-3049.
20. DAVIS, R. A.; VULLO, D.; MARESCA, A.; SUPURAN, C. T.; POULSEN, S. A. "Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases". *Bioorganic Med Chem.* 2013, **21** (6), 1539-1543.
21. MOSTAFAVI, H.; NAJJAR, R.; MASKANI, E. "Synthesis and characterization of novel 7-hydroxycoumarin derivatives". *Chemistry of Natural Compounds.* 2013, **49** (3), 423-425.
22. FYLAKTAKIDOU, K. C.; HADJIPAVLOU LITINA, D. J.; LITINAS, K. E.; NICOLAIDES, D. N. "Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities". *Current pharmaceutical design.* 2004, **10** (30), 3813-3833.
23. HOTI, R.; VEHAPI, I.; MULLIQI OSMANI, G.; ISMAILI, H.; VEPRIM, T. "Synthesis of Some New Heteroaryl amino-3-Nitro-2H-[1]-Benzopyran-2-ones and their Antibacterial Activity". *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences.* 2016, **22** (1), 1-9.
24. HEIDE, L. "New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors". *International Journal of Medical Microbiology.* 2014, **304** (1), 31-36. ISSN 14384221.