

Actividad Antimicrobiana de *Baccharis crispa* Sprengel («Carqueja», F. A.) y *Baccharis notoserghila* Gris.

PATRICIA PALACIOS*, GABRIEL GUTKIND**,
RUBEN V. D. RONDINA*, RAMON DE TORRES** y JORGE D. COUSSIO*

Cátedra de Farmacognosia* y Cátedra de Microbiología**,
Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires 1113, Argentina

RESUMEN. Se siguió por bioautografía la actividad antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*, del cocimiento y extractos alcohólicos de partes aéreas desecadas de las especies citadas (Compositae), aislándose *genkwanina* como su principal compuesto activo y, además *apigenina*, que demostró actividad solamente sobre las dos primeras especies microbianas. El rendimiento de *genkwanina* fue de 250 mg por 100 g de material vegetal desecado para *B. crispa* y 100 mg para *B. notoserghila*. Ambas rindieron respectivamente 150 mg y 90 mg de *apigenina*. La presencia de estas sustancias y de otras activas en menor escala justifica el uso popular de las mismas en la cura de heridas e infecciones locales.

SUMMARY. "Antimicrobial activity of *Baccharis crispa* Sprengel and *B. notoserghila* Gris." Antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of the aerial parts of the stated species (Compositae) was traced by bioautography of their TLC chromatograms. *Genkwanin* was isolated as one of the active compounds, yielding 250 mg p. 100 of dried plant material from *B. crispa*. A lower yield (100 mg) was shown in *B. notoserghila*. *Apigenin* was also isolated from both species (150 mg and 90 mg respectively) but showed a minor activity. The antimicrobial tests were run against *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*. The presence of *genkwanin*, *apigenin* and other minor active substances not isolated justifies the popular use of these plants for the curing of wounds and local infections.

INTRODUCCION

Baccharis crispa (n.v.: "carqueja") ya fue objeto de investigación por nuestra parte en un trabajo anterior¹ y es una de las aproximadamente cien especies de *Baccharis* que crecen en la Argentina. La infusión obtenida a partir de su parte aérea es utilizada en medicina popular, atribuyéndosele propiedades colagogas, digestivas y antiespasmódicas. La parte aé-

rea o su infusión se usan también externamente para el tratamiento de enfermedades de la piel, heridas y ulceraciones, mientras que diferentes extractos forman parte de diversas especialidades medicinales. Por todas estas razones la droga se incluyó en la Farmacopea Argentina^{2,3} desde 1966, con el principal objeto de definir legalmente su calidad. Su propiedad de curar heridas sugiere una pro-

PALABRAS CLAVE: *Baccharis crispa*; *Baccharis notoserghila*; Compositae; Genkwanina; Apigenina; Flavonoides; Antibacterianos.

KEY WORDS: *Baccharis crispa*; *Baccharis notoserghila*; Compositae; Genkwanin; Apigenin; Flavonoids; Antibacterial.

bable actividad antimicrobiana, razón por la cual se ensayaron diferentes extractos (acuosos, hidroalcohólicos y alcohólicos) en busca de dicha actividad. Los mismos se mostraron activos frente a cultivos de *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y en menor grado frente a *Staphylococcus aureus*⁴. Los resultados antes mencionados condujeron al presente trabajo, consistente en el aislamiento e identificación de genkwanina y apigenina como los principales principios antimicrobianos de *B. crispa*.

Baccharis notoserghila es una especie estrechamente relacionada con la anterior. Llamada también "carqueja", crece en las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires. Se utiliza su parte aérea en medicina popular: la infusión como colagoga, digestiva y antirreumática⁵ y también como tónica y febrífuga. Su cocimiento se utilizó externamente contra la lepra y el reumatismo muscular⁶. Ensayos previos también demostraron actividad antibacteriana⁴. Sobre la base de estos datos y de los resultados obtenidos con la especie anterior se analizaron los extractos de *B. notoserghila*, hallándose también en ellos ambos flavonoides, aunque en menor proporción.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. Se colectaron las partes aéreas de pies masculinos y femeninos en floración de *Baccharis crispa* Sprengel (Compositae) en el Departamento Capital, Provincia de Córdoba, en abril de 1975. El mismo tipo de material proveniente de *Baccharis notoserghila* Gris. fue colectado en el Partido de Pilar, Provincia de Buenos Aires, entre diciembre de 1979 y enero de 1980. Se han depositado ejemplares de herbario en la Cátedra de Farmacognosia.

Extracción y aislamiento de las sustancias. El material vegetal (100 g)

fue desecado a 55°C en corriente de aire y pulverizado posteriormente por medio de un molino de cuchillas rotativas, para ser luego macerado con 1000 ml de etanol o etanol-agua (1:1) durante 24 horas, calentado a 60°C durante 5 minutos y filtrado. La solución fue llevada a sequedad *in vacuo* por medio de un evaporador rotativo a una temperatura inferior a los 60°C y el residuo pesado y redisolto en 60 ml de etanol (*extracto crudo*). El rendimiento de los extractos alcohólicos de ambas especies fue de aproximadamente el 10%.

Ensayos de la actividad antimicrobiana. Las cepas y técnicas empleadas para la detección de la actividad de los extractos crudos ya han sido descriptos⁴. Otras técnicas aplicadas fueron bioautografías^{7,8} y ensayos de difusión por impregnación en discos de papel.

Bioautografía. Fase estacionaria: Silicagel 60 F254 (Merck) sobre láminas de aluminio de 60 mm por 80 mm. **Fase móvil:** Las mismas que se indican para los sistemas en capa fina I, III y IV. El procedimiento fue el siguiente: cada extracto fue sembrado bajo la forma de banda y los cromatofolios, colocados entre capas de papel estéril, se secaron a menos de 50°C. Cada cromatofolio fue cortado asépticamente en tiras de 80 mm x 12 mm, cada una de las cuales fue colocada en una cápsula de Petri previamente inoculada, con la fase estacionaria en contacto con el medio. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. La presencia de zonas laterales de inhibición fue considerada como una prueba de la presencia de sustancias con actividad antibacteriana en la zona en cuestión. Se realizaron controles con cromatofolios no sembrados, desarrollados y no desarrollados, a fin de descartar la probable existencia de actividad debida a

sustancias presentes previamente en los cromatofolios o en las fases móviles, o bien la presencia de restos de fase móvil debidos al procedimiento utilizado.

Técnica de impregnación en discos

Se impregnaron discos de papel de filtro estériles con las diferentes fracciones a ser ensayadas, evaporándose el disolvente correspondiente a una temperatura inferior a 50 °C. La actividad de las sustancias remanentes fue determinada sobre los mismos cultivos y en las condiciones ya mencionadas.

Cromatografía en capa fina.

Fase estacionaria 1. (f.e. 1): Los cromatofolios ya descriptos.

Fase estacionaria 2. (f.e. 2): Poliamida en polvo para capa fina (Merck) sobre soporte de vidrio de 5 cm x 20 cm, con un espesor de capa de 0,2 mm.

Fases móviles: Sistema I (f.e.1) cloroformo-metanol (5:1). Sistema II (f. e. 1) cloroformo-metanol (5:0,5). Sistema III (f.e. 1) cloroformo-metanol (10:0,75). Sistema IV (f.e. 1) cloroformo-metanol (10:0,5). Sistema V (f.e. 2) cloroformo-metanol-butanona-acetilacetona (20:10:5:1).

Cromatografía en papel.

Fase estacionaria: Papel para cromatografía Whatman 1.

Fases móviles: Sistema I: ácido acético al 15% en agua. Sistema II: *ter*-butanol-ácido acético-agua (3:1:1).

Cromatografía en capa preparativa

Fase estacionaria: Silicagel PF254 (Merck) sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm, con un espesor de 1 mm y previamente activadas a 110°C durante 30 min.

Fase móvil: cloroformo-metanol (100:5)

Muestra sembrada: Extracto crudo a razón de 0.7 ml por placa.

Detección: A la luz ultravioleta de

366 nm y a 254 nm (interferencia) y a la luz visible las bandas coloreadas.

Elución de las bandas: Una vez marcadas y extraídas de las placas, las sustancias fueron eluidas por percolación de cloroformo-metanol (3:2) o de metanol, de acuerdo con el R_f de cada banda.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Equipo: Cromatógrafo líquido con bomba recíproca de doble pistón con control electrónico de flujo por retroalimentación y monitor de presión, (SpectraPhysics 770), con válvula de inyección (Valco) de volumen fijo (10 μ l); detector de índice de refracción (Micromeritics 771) con salida de 10 mV; registrador *ad hoc* (Omniscribe) de 25 cm.

Columna de acero inoxidable de 9.4 mm x 25 cm. *Fase estacionaria:* Silicagel (Zorbax Sil, Dupont) con partículas de 10 μ m. *Fase móvil:* cloroformo-metanol (99:1) calidad para HPLC, reciclado. *Flujo:* 2 ml/min (presión: 50 atm)

Muestra: Fracciones obtenidas por cromatografía en capa preparativa, en una concentración de 10 mg/ml.

Volumen por corrida: 0,5 ml.

Tiempos de retención: tiempo muerto (t_0) 6,0 min; genkwanina 12,5 min; impureza 21,5 min.

Colección: Cada pico fue coleccionado siguiendo su evolución a través del registro. Para evitar la incorporación de impurezas no visibles se colectó sólo la parte central de cada pico.

Aislamiento e identificación de genkwanina y apigenina. Las bandas de R_f 0.50 y 0.23, una vez eluidas luego de la cromatografía preparativa, fueron llevadas a sequedad *in vacuo* para dar res-

pectivamente *genkwanina* y *apigenina*. El rendimiento total en mg de sustancia por 100 g de muestra vegetal desecada fue el siguiente (genkwanina-apigenina): *Baccharis crispa* 250-150; *B. notoserghila* 100-90. La pureza de estas sustancias fue comprobada mediante las técnicas cromatográficas ya descritas. La probable identidad de las mismas fue determinada por medio de ensayos con diferentes reactivos, espectros ultravioletas desplazamientos en el ultravioleta y comparación de las propiedades cromatográficas y de su reactividad frente a diferentes agentes de revelación^{7,9}. Luego se confirmó la identidad por comparación con nuestras auténticas. En el caso del compuesto más activo (la genkwanina) el mismo fue cristalizado de metanol y parte también purificado por cromatografía del alta resolución (HP LC) preparativa. Su espectro de masa resultó coincidente con el publicado⁷: m/e (intensidad relativa hallada, id. publicada) (Equipo Varian Mat mod CH7 A a 70 eV; temp. 195 °C) 284 (M⁺; 100%, 99%), 283 (12%, 10%), 255 (32% 18%), 241 (11%, 9%), 167 (9%, 5%), 166 (10%, 5%), 138 (11%, 7%), 118 (7%, 5%), 121 (5%, 4%), 95 (10%, 8%), 93 (3%, 2%).

Detección de *genkwanina* y *apigenina* en los cocimientos. Las decocciones se prepararon calentando 4 g de material con 20 ml de agua durante 30 min a 100 °C. La decocción fue inmediatamente filtrada, enfriada a temperatura ambiente y extraída con eter etílico (5 x 5 ml). La fase orgánica, previamente deshidratada con sulfato de sodio anhidro, fue filtrada y evaporada *in vacuo*. El residuo se redisolvió en 0,7 ml de cloroformo-etanol (3:2) y fue cromatografiado sobre planos utilizando los sistemas ya descritos.

RESULTADOS Y DISCUSION

El principal objetivo del presente trabajo era el aislamiento de las sustancias antibacterianas presentes en *Baccharis crispa*. Se consideró para ello como el mejor enfoque la detección de las mismas por bioautografía. La primera decisión a adoptar era el tipo de extractos a fraccionar. Para determinarlo se prepararon y ensayaron extractos acuosos, hidroalcohólicos y alcohólicos en la forma descrita⁴. Los mismos presentaron idénticos patrones sobre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo los extractos acuosos mostraban mapas cromatográficos diferentes y mucho más complejos. Por dicha razón se prefirió continuar operando con los extractos alcohólicos. Se prepararon y cromatografiaron varios extractos, estableciéndose el R_f de las bandas activas luego de bioautografiadas. De ellas una se mostró como la más activa sobre las tres especies microbianas ensayadas. Se trataba de una banda amarilla cuyo color se profundizaba al aplicar ácido sulfúrico concentrado. Además mostraba fluorescencia violeta a 366 nm, que viraba al naranja por exposición al amoníaco y además absorbía a 254 nm. Por medio de la cromatografía preparativa en capa se obtuvieron 70 mg de dicha sustancia, que se recrystalizó de metanol. Ensayada en discos de papel, se confirmó su actividad sobre las especies citadas. Cromatografiada por alta resolución (HPLC) mostró la presencia de ca. 5% de una impureza, lo que dejaba remanente una duda sobre la responsabilidad de la actividad. Por ello se recurrió a la separación de ambas sustancias utilizando el mismo procedimiento y a un nuevo ensayo de cada una por impregnación de discos de papel. Sólo el componente principal demostró

poseer actividad, por lo que se prosiguieron los ensayos tendientes a determinar su estructura química. Su reactividad frente al reactivo de Shinoda¹⁰ conjuntamente con los datos de su espectro en el ultravioleta indicaron la presencia de un flavonoide. Sus desplazamientos salinos en el ultravioleta^{7, 9} y espectro de masa⁷ demostraron que se trataba de *genkwanina* (rendimiento 250 mg/100 g de material vegetal), recientemente aislada por Giordano de ejemplares de la misma especie procedentes de la Provincia de San Luis¹¹.

Utilizando nuevamente la cromatografía preparativa en capa se aisló otra sustancia con menor actividad antibacteriana pero que también daba positiva la reacción de Shinoda. Sus desplazamientos en el ultravioleta con diferentes reactivos y co-cromatografía con una muestra auténtica demostró que se trataba de *apigenina* (rendimiento 150 mg/100 g de material vegetal), recientemente aislada de *B. articulata*⁸.

En vista de los resultados hallados se decidió investigar una especie del mismo género que poseía las mismas cualidades aparentes en función del uso popular: *B. notoserghila*. Utilizando las mismas técnicas se aislaron efectivamente ambas sustancias (rendimiento: genkwanina 100 mg, apigenina 90 mg; en ambos casos por 100 g de muestra desecada). Restaba solamente confirmar en forma inequívoca la presencia de estas sustancias en los cocimientos preparados a partir de ambas especies, lo que fue logrado por medio de la técnica descriptiva más arriba.

Por otra parte fueron confirmadas las actividades antibacterianas de la genkwanina y de la apigenina en forma pura. Para ello se utilizaron las técnicas

de impregnación en discos. La genkwanina demostró actividad sobre las tres especies microbianas hasta una concentración mínima de 380 µg por disco, mientras que la apigenina se mostró activa solamente sobre *B. subtilis* y *M. luteus* a concentraciones mayores de 750 µg por disco. Como comentario marginal debe destacarse que otro flavonoide, la 5-hidroxi,7,4'-dimetoxiflavona, aislado anteriormente por nosotros de *B. crispera*¹, también posee actividad antimicrobiana¹².

De acuerdo con la actividad y rendimiento de los flavonoides aislados en esta ocasión, debería reconocerse a la genkwanina como la principal sustancia responsable de la justificación del uso popular de estas especies para la curación y tratamiento de heridas e infecciones microbianas locales. Pero además debe señalarse que durante el curso de la investigación se observaron por bioautografía otras manchas menores que no pudieron ser aisladas debido a su bajo rendimiento y a su aparente inestabilidad química. Todo lo señalado, unido a la presencia de apigenina y de 5-hidroxi,7,4'-dimetoxiflavona (en el caso de *B. crispera*), hace que todas las sustancias mencionadas pudieran contribuir sinérgicamente a la actividad biológica de los cocimientos u otros extractos crudos.

AGRADECIMIENTOS: Agradecemos efusivamente a las siguientes personas: Dr. S. B. Sorarú y Prof. Dr. L. Ariza Espínar por la colección e identificación del material vegetal; Sra. Silvia Debenedetti por su apoyo en la identificación de los flavonoides; Srta. M. Beggs por su ayuda técnica; E. Wilson por su colaboración en la cromatografía de alta resolución. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por su apoyo económico parcial (subsidio n° 9396).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bandoni, A. L., J. E. Medina, R. V. D. Rondina y J. D. Coussio (1978) *Planta Medica* 34: 328:31
2. *Farmacopea Nacional Argentina* (1966), 5a. ed., p. 183
3. *ibid* (1978), 6a. ed., p. 213
4. Gutkind, G. O., V. Martino, N. Graña, J. D. Coussio y R. A. de Torres (1982) *Fitoterapia* 52: 213-8
5. Bandoni, A. L., M. E. Mendiondo, R. V. D. Rondina y J. D. Coussio (1972) *Lloydia* 35: 69-80
6. Paccard, E. (1905) "*Plantas medicinales de las Repúblicas Oriental y Argentina*", Carneiro y Ramos, Montevideo, pág. 20
7. Sakakibara, M., D. Di Feo, Jr., N. Nakatani, B. Timmermann y T. J. Mabry (1976) *Phytochem* 15: 727-31
8. Stapel, G. y H. G. Menssen (1977) *Planta Medica* 32A: 20
9. Mabry, T. J., K. R. Markhan y M. B. Thomas (1970) "*The Systematic Identification of Flavonoids*", Springer - Verlag, New York
10. Shinoda, J. (1928) *J. Pharm. Soc. Japan* 48: 214-8
11. Giordano, O. S. (1981) "*Resúmenes Primera Reunión Argentina de Química de Productos Naturales*", San Luis
12. Odebiyi, O. O. (1982) *Planta Medica* 45: 138