

***MINTHOSTACHYS MOLLIS* GRISEB. Y *LEPECHINIA MEYENII*
(WALP.) EPLING. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SUS EXTRACTOS.
DETERMINACIONES PRELIMINARES DE SUS FLAVONOIDES
MAYORITARIOS**

Bravo, M.O.¹; Hernández, N.E.²; Tereschuk, M.L.²; Romero, C.A.¹ y Abdala L.R.²

¹Cátedra de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Catamarca. Maestro Quiroga 55 (4700) San Fdo. del Valle de Catamarca. e-mail:mariaobravo@hotmail.com

²Cátedra de Química Orgánica y Biológica. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205 (4000) San Miguel de Tucumán.

***MINTHOSTACHYS MOLLIS* GRISEB. AND *LEPECHINIA MEYENII*
(WALP.) EPLING. EXTRACTS ANTIMICROBIAN ACTIVITY.
PRELIMINARY DETERMINATION OF MAJORITY FLAVONOIDS.**

SUMMARY

Minthostachys mollis Griseb. and *Lepechinia meyenii* (Walp.)Epling. Belong to the Lamiaceae family. The samples analyzed were collected in Ambato and Ancastí, Catamarca province, in December 2000 and February 2001. The objective of this work is to study the main flavonoids present in both species and the antimicrobial activity of the extracts so as to justify their use in popular medicine. Total extract was obtained from the aerial parts and successive extractions with different polarity dissolving agents were accomplished in order to carry out chemical, chromatographic and microbiological trials. Preliminary flavonoid determinations are: In *L. meyenii*: a) flavonols 3' – 4' dihydroxylized and 4' OH monohydroxylized in the B ring, glycosided in C7 and positive characterization of 6 – OH flavonols; and b) flavone cirsimaritin. In *M. mollis*: a) flavonols 3' – 4' dihydroxylized in the B ring, glycosided in C3 and in less proportion in C7; and b) low proportion of flavone diosmetin. Antimicrobial activity: *M. mollis* inhibited the growth of both *E. coli* and *S. Aureus*. *E. coli* proved to be the most sensitive. *L. meyenii* showed low activity except for the fraction of ethyl acetate, which inhibited the growth of both *E. coli* and standard antibiotic.

KEY WORDS: *Minthostachys*, *Lepechinia*, Flavonoids, Antimicrobial

RESUMEN

Minthostachys mollis Griseb. y *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling. pertenecen a la familia Lamiaceae. Los ejemplares analizados fueron recolectados en los Departamentos Ambato y Ancasti de la Provincia de Catamarca durante los meses de diciembre de 2000 y febrero de 2001. El objetivo del presente trabajo es estudiar los flavonoides mayoritarios presentes en ambas especies y la actividad antimicrobiana de sus extractos para justificar su uso en medicina popular. De las partes aéreas se obtuvo el extracto total y se sometió a extracciones sucesivas con solventes de distinta polaridad para proceder a realizar ensayos: a) químicos b) cromatográficos y c) microbiológicos. Las determinaciones preliminares de los flavonoides presentan en: ***L. meyenii***: a) flavonoles 3'-4' dihidroxilados y 4'-OH monohidroxilados en el anillo B, glicosilados en C₇ y caracterización positiva de 6-OH flavonoles y b) la flavona cirsimaritina; en ***M. mollis*** : a) flavonoles 3'-4' dihidroxilados en el anillo B, glicosilados en C₃ y en menor proporción en C₇ y b) la flavona diosmetina en baja proporción. Actividad antimicrobiana: *M. mollis* inhibió el crecimiento tanto de *E. coli* como de *S. aureus*. La más sensible resultó *E. coli*. *L. meyenii* mostró una baja actividad excepto la fracción de acetato de etilo, que inhibió el crecimiento de *E. coli* tanto como el antibiótico patrón.

PALABRAS CLAVES: *Minthostachys*, *Lepechinia*, Flavonoides, Antimicrobiano

INTRODUCCIÓN

Minthostachys mollis y *Lepechinia meyenii* pertenecen a la familia Lamiaceae que comprende aproximadamente 230 géneros y 3.500 especies en regiones cálidas y templadas de ambos hemisferios. La mayoría de las especies conocidas son hierbas, frecuentemente con tallos fuertes, aunque algunos géneros tienden a ser arbustos y otros, los menos, árboles o lianas (Watson et al 1999; Metcalfe.& Chalk 1972).

Las especies estudiadas se encuentran en el Distrito Chaqueño Serrano de la Provincia Fitogeográfica del Chaco. Los tipos de vegetación predominante son los bosques serranos y las sabanas o estepas serranas, ubicadas generalmente a mayor altura que los bosques. Las especies características son el "horco-quebracho" o "quebracho de la sierra" (*Schinopsis marginata*), el "molle de beber" (*Lithraea molleoides*), "coco" (*Fagara coco*), "piquillín" (*Condalia*

microphylla), “tusca” (*Acacia aroma*), “espinillo” (*Prosopis torquata*), “toronjil” (*Minthostachys mollis*), muchos otros arbustos y hierbas. Sobre los 1500m. de altura se encuentran sabanas o estepas gramíneas, unas veces formadas exclusivamente por especies herbáceas, otras por árboles o grupos de arbolitos aislados y al pasar a mayor altitud solo existen pastos duros, hierbas aromáticas como: “chachacoma” (*Senecio nutans*), “carqueja” (*Baccharis sp.*) y “salvia de la puna” (*Lepechinia meyenii*). (De Aparicio, Difrieri, 1958).

El objetivo del trabajo es estudiar los flavonoides mayoritarios presentes en ambas especies y la actividad antimicrobiana de sus extractos para justificar el uso que se le da en medicina popular.

ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LOS GÉNEROS *LEPECHINIA* Y *MINTHOSTACHYS*

Las hojas de *Minthostachys mollis* se utilizan en la medicina folklórica como estimulante, carminativa y digestiva y para impartir una fragancia mentolada en diversas infusiones locales. El análisis de los aceites esenciales de plantas provenientes de diferentes áreas fitogeográficas de Argentina arroja una composición extremadamente variable de una población a otra, por lo que se plantea la existencia de varios quimiotipos en la especie. (Zygadlo, et al. 1995).

En México, un grupo étnico (Purépacha) usaba especies del género *Lepechinia* para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Avila Acevedo, et al. 1993.)

El extracto metanólico de *Lepechinia bullata* mostró actividad citotóxica en cultivo de células KB (carcinoma nasofaríngeo) y sobre células de la línea p-388 (leucemia linfocítica murina). (Jonathan, et al. 1989).

ANTECEDENTES EN FLAVONOIDES

Género *Lepechinia*

- *L. caulescens*: Salvigenina; cirsimaritina (h) .(Delgado, 1992).
- *L. meyenii*. 5,7,3'-trihidroxi-4-metoxiflavona (diosmetina) (Romero, et al. 1997)

Género *Minthostachys*

- *M. spicata*. Quercetina-3-O-glucósido (= hirsutrina); 3', 4'- diacetilhirsutrina; poncirina (=isosakuranetina); chrisoeriol; diosmetina (p.a.). (Senatore, et. al. 1995).
- *M. spicata*. Quercetina-3-O-glucósido (= hirsutrina); 3', 4'- diacetilhirsutrina; poncirina (=isosakuranetina- 7-O-rutinósido) (p.a.). (Senatore, et. al. 1995).
- *M. mollis* (Kth). Gris., “peperina”, leucoantocianidinas (hojas y flores). (Senatore, et al. 1995).

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Recolección del material vegetal

Se abordó el estudio de dos especies de la familia Lamiaceae, recolectadas en departamentos pertenecientes a la Región Centro de la Provincia de Catamarca que a su vez se encuentra en el territorio fitogeográfico conocido como Provincia Chaqueña (Navarro, 1999).

Lepechinia meyenii (Walp). Epl. recolectada en el mes de febrero en la localidad Las Piedras Blancas. Departamento Ambato.

Exsicata Loc. Río Vallecito. Dpto. Andalgalá. Prov. de Catamarca.

Leg. Rohmeder. Det. T. Meyer. N° 78852 (LIL).

Minthostachys verticillada. Griseb. recolectada en el mes de diciembre en la Cuesta del Portezuelo- Departamento Valle Viejo, y en período de floración.

Exsicata. Bolivia Región Andina Unduavis Noryungas.

Leg. Otto Buchtien N° 37720 (LIL).

2.- Preparación de extractos vegetales

Se pesaron 6,0g de partes aéreas que se secaron en corriente de aire, y se extrajeron hasta agotamiento por maceración a temperatura ambiente, con EtOH al 80% y al 50% sucesivamente. Los extractos combinados se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio y los residuos se retomaron con 6 ml de EtOH 80%. El extracto total fue clarificado de contaminantes de baja polaridad como grasas, terpenos, clorofila, xantofilas, etc., con hexano. Se separó una parte (extracto total) y el resto se sometió a extracciones sucesivas con solventes de distinta polaridad: acetato de etilo, cloroformo y agua para proceder a realizar ensayos: a) químicos, b) cromatográficos y c) microbiológicos.

a) Reacciones químicas: (Robinson, 1967)

a) A 1 ml de extracto se agregaron 2 gotas de Na (OH) concentrado. Los resultados se cotejaron con las siguientes referencia:

CUADRO N° 1: Reacción química con Na (OH).

Colores	Compuestos
Púrpura-Azul	Antocianinas
Amarillo	Flavonas, flavonoles y santonas
Naranja-Rojo	Flavanonas
Rojo-Púrpura	Chalconas y auronas
Naranja-Marrón	Flavonoles

a. 2) A 1 ml de extracto se agregaron 2 gotas de HCl concentrado. Los resultados se compararon con las siguientes referencias :

CUADRO N° 2 : Reacción química con HCl.

Colores	Compuestos
Rojo*	Auronas o Chalconas
Magenta#	Flavanonas
Naranja#	Flavonas
Rojo#	Flavonoles

•Si no se observa cambio de color, se añaden virutas de Mg.

Después del agregado de virutas de Mg.

a. 3) Los flavonoles con 6-OH brindan un color verde con el agregado de solución saturada de Cl_2Sr en metanol al 1% (Morita, 1977). Mientras las manchas con similares características de color y R_f , vaporizadas en el papel con solución de acetato de sodio dan un color azul, si corresponden a compuestos hidroxilados en posición C_8 (Harborne, 1975).

b) Separación cromatográfica (Mabry et al., 1970).

b.1) Obtención de perfiles

En 8 hojas enteras (56 cm x 47 cm) de papel Whatman 3 MM se sembraron 2 ml del extracto de cada especie y se sometieron a separación cromatográfica descendente, bidimensional usando TBA (alcohol butílico terciario - ácido acético - agua, 3:1:1) en 1° fase y AcOH 15% (ácido acético al 15%) en 2° fase.

Se revelaron bajo luz U.V. en ausencia y presencia de NH_3 , para observar el color de las manchas, ubicar su posición, y proceder a calcular los respectivos R_f . También se analizó la reacción con NA (ácido difenil etanol amino bórico - metanol, 1:99) comparando los resultados con las siguientes referencias:

CUADRO N° 3: Reacciones de coloración de flavonas y flavonoles 3-O-sustituídos.

Posiciones	U.V.	U.V./ NH_3	U.V./NA
4', 7-OH	Oscuro	Verde	Amarillo*
4' -OH, 7-OR	Oscuro	Amar. Verdoso	Amarillo*
3', 4', 7-OH	Oscuro	Amar. Oscuro	Naranja
3', 4' - OH, 7-OR	Oscuro	Amar. Brillante	Naranja
4' -OR	Oscuro	Oscuro	Oscuro

*Después de un día, se torna rosa a la luz visible (Mc Cormick, 1982)

b 2) Separación de las agliconas.

Los compuestos con características de glicosilación, fueron sometidos a hidrólisis controlada por espacio de 4hs, con HCl 2N a una temperatura de 100°C para asegurar el desprendimiento total de azúcares, conociendo que los azúcares unidos en posición C_3 se liberan en un tiempo de aproximadamente 2hs y los ligados en posición C_7 lo hacen recién a las 4hs. Posteriormente previo lavado del HCl, se sometieron a extracción con acetato de etilo para

separar las agliconas y el resto acuoso que contenía los azúcares no fue estudiado reservándolo para un estudio posterior, ya que se trata de una determinación preliminar.

b.3) Identificación de las agliconas

La solución de agliconas fue sembrada en placas de celulosa, realizando una co-cromatografía con testigos puros en los casos que se contó con ellos, y se corrió en 5 sistemas de solventes: TBA (ter butanol-ac. acético-agua 3:1:1), BAW (n butanol -ac. acético-agua, 12:3:25), AcOH 15% (ac. acético-agua 15:85), Fenol (fenol-agua 4:1), Forestal (ac. acético-ac. clorhídrico-agua, 30:3:10)

c) Ensayos microbiológicos:

c.1) Cepas bacterianas

Gramnegativos: *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Grampositivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

c.2) Cultivo de cepas:

Las cepas usadas se sometieron a dos pasajes para su activación, se incubaron en estufa de cultivo a 37°C por 24 horas. La densidad óptica fue determinada a 600 nm (Metrolab 325 BD, Argentina). Los cultivos fueron frenados cuando alcanzaron rangos de Densidad Óptica a 600nm (DO₆₀₀) entre 0.8 y 1.0 (equivalente a 10⁸ UFC: unidades formadoras de colonias), posteriormente diluidos hasta DO₆₀₀ = 0.1 y usados para medir actividad antimicrobiana.

c.3) Detección de la actividad antimicrobiana:

Se sembraron 3 ml de agar 0.6% que contenían 30µl de cultivo de cada microorganismo en sendas cajas de Petri sobre una base de agar Müeller-Hinton (comercial) de concentración 2%.

Paso seguido a la inoculación de los microorganismos, se realizaron en el medio agarizado perforaciones de 3 mm de diámetro, que se sembraron con 20 µl de los extractos obtenidos de las distintas especies vegetales. Se incubaron por 18 horas en estufa de cultivo a 37°C y se detectó la actividad antimicrobiana por la técnica de dilución en agar (Tereschuck, *et al.* 1997).

La prueba de los extractos de cada especie vegetal con los microorganismos se realizó por triplicado para promediar y disminuir el índice de error.

Los halos de inhibición de crecimiento informados, fueron producto del promedio de tres mediciones y se consideró como límite mínimo para una actividad antimicrobiana positiva, un halo de 2 mm (Pérez, 1991). La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se calculó en base a la curva de calibración con el antibiótico patrón (cloramfenicol).

Los resultados se expresaron correlacionados con el antibiótico patrón. Se siguió la técnica descrita por Perez *et al* (1990).

RESULTADOS

a) Reacciones químicas : (Robinson, 1967)

CUADRO N°4: Resultado de las reacciones químicas en extractos de *Lepechinia meyenii*.

Reactivos	Extractos de <i>Lepechinia meyenii</i>			
	Total	Cloroformo	Acetato de etilo	Agua
NaOH	Naranja	rojo oscuro	amarillo oscuro	amarillo claro
HCl	Rojizo	naranja rojizo	Naranja	naranja claro

CUADRO N°5: Resultado de las reacciones químicas en extractos de *Minthostachys mollis*.

Reactivos	Extractos de <i>Minthostachys mollis</i>			
	Total	Cloroformo	Acetato de etilo	Agua
NaOH	Naranja	marrón oscuro	Rojizo	Rojizo
HCl	Rojo	Rojo	Rojizo	Rojizo

Por el agregado de gotas de solución de Cl_2Sr sólo el extracto de acetato de etilo perteneciente a *L.meyenii* viró al color verdoso.

b) Separación cromatográfica

Los perfiles cromatográficos obtenidos se diagraman a continuación

Lepechinia meyenii

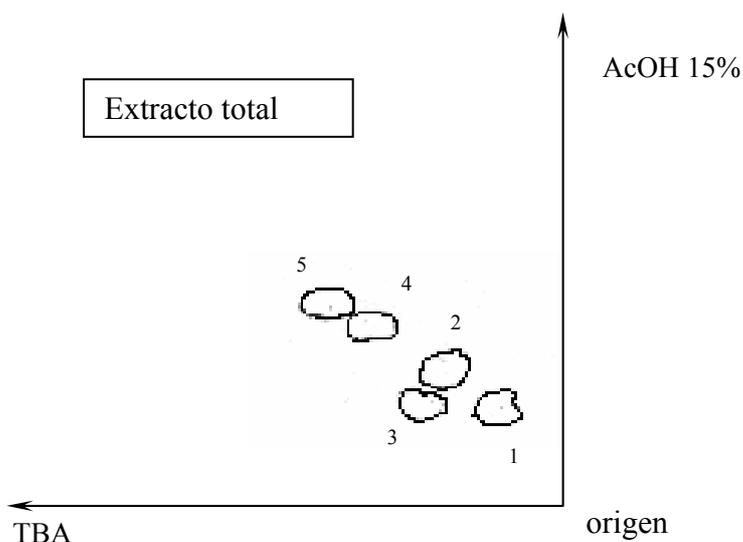


FIGURA N°1: Perfiles cromatográficos de *Lepechinia meyenii* en extracto total.

CUADRO N°6: Datos cromatográficos de *Lepechinia meyenii*. Extracto total.

Compuesto N°	UV	UV/NH ₃	NA	R _{fx100} (TBA/AcOH 15%)
1	Oscuro	Oscuro verdoso	Naranja	25/05
2	Oscuro	Amarillo	Naranja	34/15
3	Oscuro	Amarillo verd.	Naranja	37/7
4	Oscuro	Amarillo	Amarillo	49/22
5	Oscuro	Amarillo	Amarillo	55/24

L. meyenii

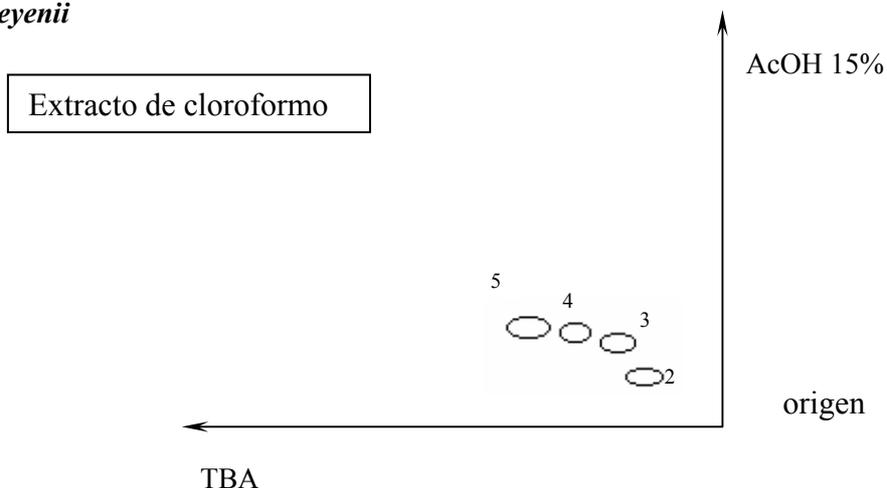


FIGURA N°2: Perfiles cromatográficos de *Lepechinia meyenii* en extracto de cloroformo.

CUADRO N°7: Datos cromatográficos de *Lepechinia meyenii*. Extracto de cloroformo.

Compuesto N°	UV	UV/NH ₃	NA	R _{fx100} (TBA/AcOH 15%)
2	Oscuro	Oscuro verd.	Naranja	32/10
3	Oscuro	Amarillo	Naranja	35/17
4	Oscuro	Amarillo	Amarillo	45/18
5	Oscuro	Amarillo	Amarillo	52/20

L. meyenii

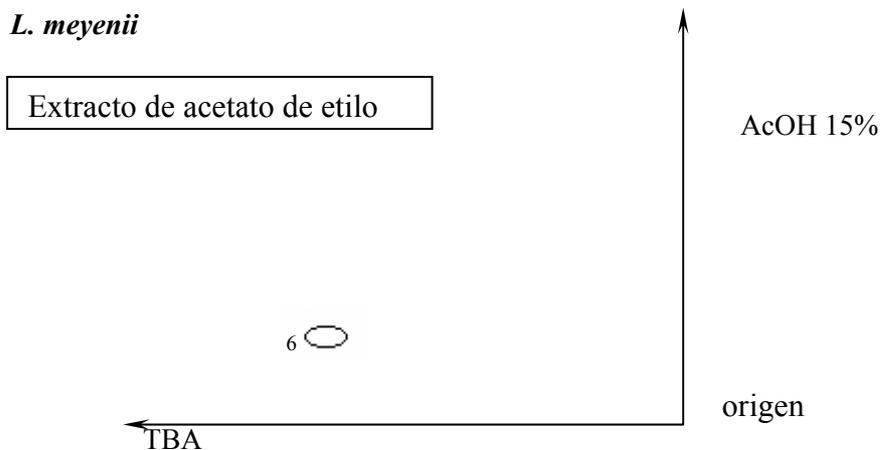


FIGURA N°3: Perfiles cromatográficos de *Lepechinia meyenii* en extracto de acetato de etilo.

CUADRO N°8: Datos cromatográficos de *Lepechinia meyenii*. Extracto de acetato de etilo.

Compuesto N°	UV	UV/NH ₃	NA	R _f x 100 (TBA/AcOH 15%)
6	Oscuro	Amarillo verde.	Amarillo	90/10

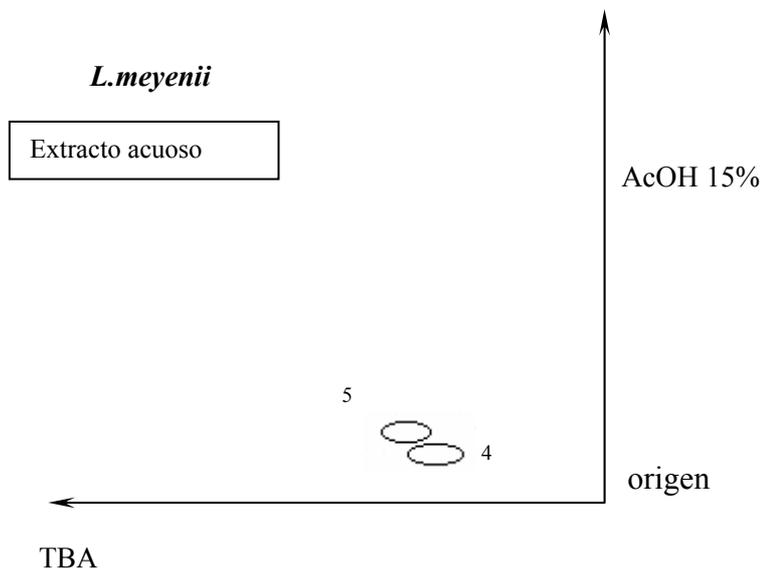


FIGURA N°4: Perfiles cromatográficos de *Lepechinia meyenii*. en extracto acuoso.

CUADRO N°9: Datos cromatográficos de *Lepechinia meyenii*. Extracto acuoso.

Compuesto N°	UV	UV/NH ₃	NA	R _f x 100 (TBA/AcOH 15%)
4	Oscuro	Amarillo	Naranja	30/13
5	Oscuro	Amarillo	Naranja	33/16

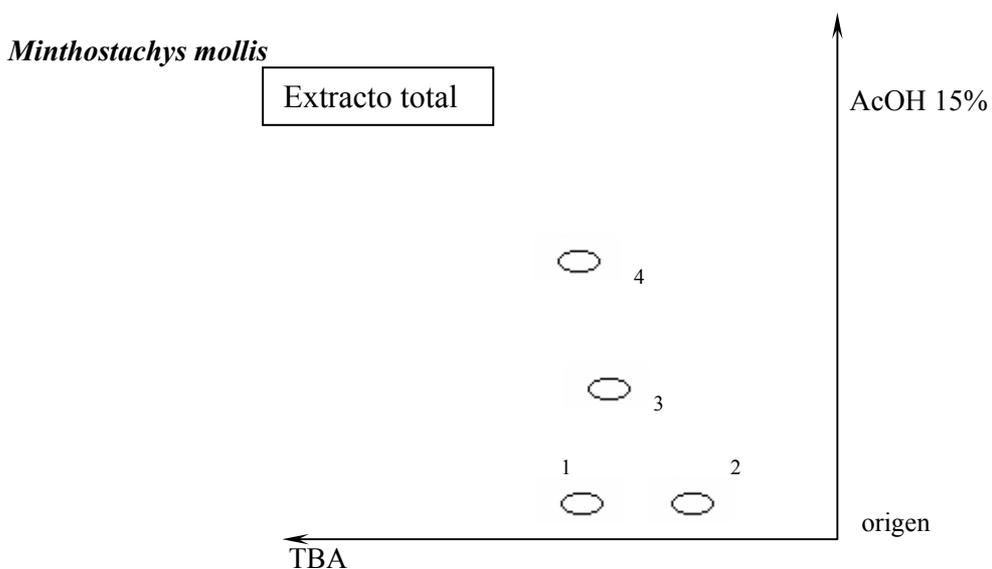


FIGURA N°5: Perfiles cromatográficos de *Minthostachys mollis* en extracto total.

CUADRO N°10: Datos cromatográficos de *Minthostachys mollis*. Extracto total.

Compuesto N°	UV	UV/NH ₃	NA	R _f x 100(TBA/AcOH15%)
1	Amarillo oscuro	Amarillo oscuro	Naranja	57/0.3
2	Oscuro	Amarillo	Naranja	32/0.9
3	Oscuro	Amarillo verdoso	Naranja	56/36
4	Oscuro	Verde oscuro	Naranja	62/57

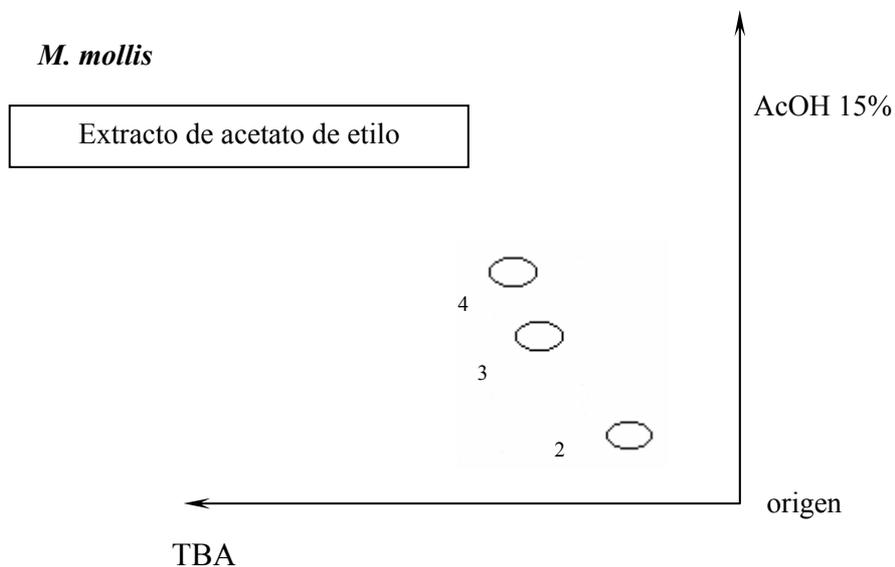


FIGURA N°6: Perfiles cromatográficos de *Minthostachys mollis* en extracto de acetato de etilo.

CUADRON°11: Datos cromatográficos de *Minthostachys mollis*. Extracto de acetato de etilo.

Compuesto N°	UV	UV/NH ₃	NA	R _f x 100 (TBA/AcOH 15%)
2	Oscuro	Amarillo	Naranja	30/10
3	Oscuro	Amarillo verdoso	Naranja	58/40
4	Oscuro	Amarillo verdoso	Naranja	59/55

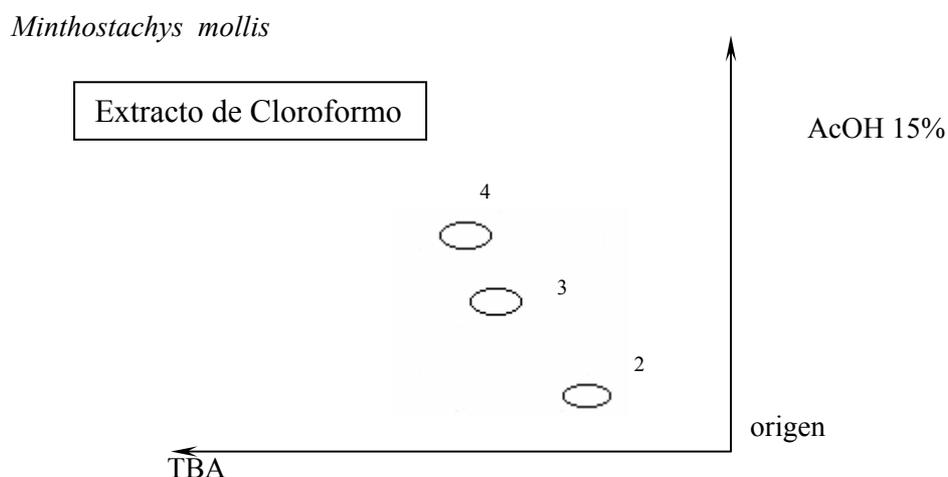
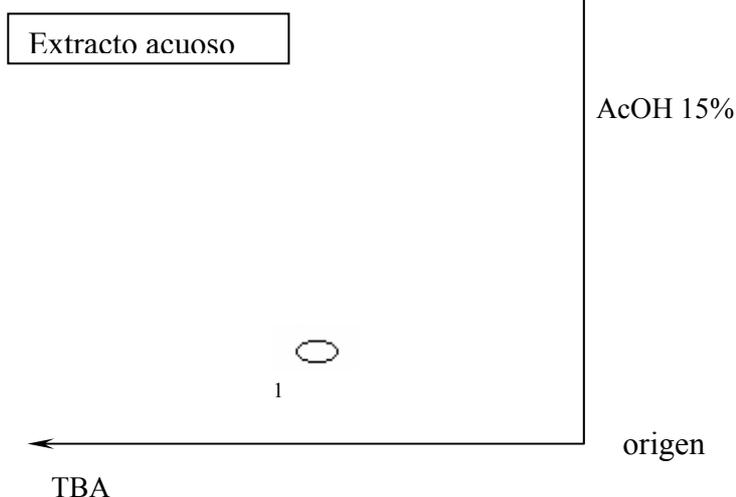


FIGURA N°7: Perfiles cromatográficos de *Minthostachys mollis* en extracto de cloroformo.

CUADRO N°12: Datos cromatográficos de *Minthostachys mollis*. Extracto de cloroformo.

Compuesto N°	UV	UV/NH ₃	NA	R _f x 100 (TBA/AcOH 15%)
2	Oscuro	Amarillo	Naranja	29/10
3	Oscuro	Am. verdoso	Naranja	54/38
4	Oscuro	Am. verdoso	Naranja	60/56

Minthostachys mollis**FIGURA N°8:** Perfiles cromatográficos de *Minthostachys mollis* en extracto de acuoso.**CUADRO N°13:** Datos cromatográficos de *Minthostachys mollis*. Extracto acuoso.

Compuesto N°	UV	UV/NH ₃	NA	R _f x 100 (TBA/AcOH 15%)
5	Oscuro	Verde oscuro	Oscuro	84/10

Análisis microbiológico

Los resultados de la actividad antimicrobiana obtenidos de extractos totales y fracciones, de las dos especies, se muestran a continuación: (Cuadros 14 y 15)

Halos de inhibición del extracto etanólico y fracciones de *M. mollis* (100 mg/ ml) frente a *E. coli* y *S. aureus*. También se observan los resultados del Cm a una concentración de 5 mg/ml.

CUADRO N°14: Resultados de los ensayos microbiológicos de *Minthostachys mollis*.

Microorganismos	Halos de inhibición del extracto total y fracciones de <i>Minthostachys mollis</i> (mm)					
	Total	Hexano	CHCl ₃	AcOEt	Agua	Cm
<i>Escherichia coli</i>	6.7	24.66	15.83	25.55	4.44	15.83
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.4	4.00	23.3	-	-	30.33

Halos de inhibición del extracto etanólico y fracciones de *L. meyenni* (100 mg/ml) frente a *E. coli* y *S. aureus*. También se observan los resultados del Cm a una concentración de 5 mg/ml.

CUADRO N°15: Resultados de los ensayos microbiológicos de *Lepechinia meyenni*.

Microorganismos	Halos de inhibición del extracto total y fracciones de <i>Lepechinia meyenni</i> (mm)					
	Total	Hexano	CHCl ₃	AcOEt	Agua	Cm
<i>Escherichia coli</i>	7.00	-	-	24.3	-	22.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.3	8.33	8.00	-	-	30.0

DISCUSIÓN

Análisis microbiológico

M. mollis

El microorganismo Gram negativo *Escherichia coli*, se mostró sensible frente a todos los extractos ensayados. Mientras la fracción de cloroformo presentó la misma inhibición que el cloramfenicol, las de acetato de etilo y hexano, mostraron mayor sensibilidad. El extracto total y el acuoso, no presentaron resultados relevantes.

S. aureus, como modelo de bacterias Gram positivas, sólo mostró sensibilidad frente al extracto total y a las fracciones de cloroformo, y hexano, observándose siempre menor inhibición que con el testigo; sin embargo la fracción de cloroformo mostró resultados relevantes comparados a los obtenidos con el antibiótico patrón.

En el presente estudio ambas bacterias son inhibidas, aunque con distinta intensidad, por el extracto total y las fracciones de hexano y cloroformo de *M. mollis*. Dada la baja polaridad de los últimos solventes la actividad se debió a los aceites esenciales arrastrados en los mismos.

Esta situación se plantea por los antecedentes sobre la actividad antimicrobiana de flavonoles di-hidroxilados en el anillo B y glicosilados en posición C₇, con resultados similares a los obtenidos frente a *E. coli* (Primo et al., 1999).

La variación de los resultados entre la especie estudiada por otros investigadores y el presente trabajo, se debe a los diferentes quimiotipos obtenidos de distintos lugares de recolección, lo que afecta el contenido de metabolitos secundarios tanto cuali como cuantitativamente (Zygadlo et al., 1995).

Lepechinia meyenii

E. coli, mostró sensibilidad frente al extracto total y a la fracción acetato de etilo, aunque los resultados con el primero no son relevantes, no ocurre lo mismo con el acetato de etilo que mostró una actividad similar al cloramfenicol.

S. aureus, mostró sensibilidad a las concentraciones ensayadas de extracto total y fracciones de hexano y cloroformo, no puede considerarse como activa si correlacionamos estos con los obtenidos frente al cloramfenicol.

Estudios de la actividad antimicrobiana de extractos acuosos de *L. caulescens* confirman su actividad positiva frente a cepas Gram negativas como *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* (Avila et al, 1993), y en lo que a flavonoides se refiere, existen antecedentes de actividad antimicrobiana de flavonoles 3' 4' di-hidroxilados y glicosilados en C₇, similares a los detectados en *L. meyenii*.

Aunque el extracto clorofórmico muestra un contenido similar al del extracto total, la ausencia de actividad antimicrobiana frente a *E. coli* se debe a la escasa concentración de los mismos como consecuencia de la baja polaridad del solvente.

No se encontraron antecedentes de la actividad antimicrobiana de la cirsimaritina, único flavonoide encontrado en la fracción de acetato de etilo, que se mostró activa frente a *E. coli*.

Reacciones químicas

Coincidentemente la variación de colores observados por la adición de solución de NaOH y HCl al: extracto total, extracto de cloroformo y extracto de acetato de etilo pertenecientes a *L. meyenii* y a *M. mollis* revelan que en los mismos están presentes los flavonoides. La comparación de los colores observados en estos extractos con los presentados en los cuadros 1 y 2, nos orienta a flavonas y/o flavonoles. También en ambas especies no hubo variación de color con los reactivos mencionados frente al extracto acuoso, debido a la escasa concentración de flavonoides contenidos en los mismos.

Análisis cromatográfico

L.meyenii

Compuesto N°1: por los bajos valores de R_f en ambos solventes de corrida se trata de un flavonoide 6-OH, ya que dio positiva la reacción con el añadido de solución de SrCl₂, característica para la detección cualitativa de este tipo de compuestos. Por otro lado los colores obtenidos con el añadido de solución de NaOH y de HCl coinciden con los informados por la

bibliografía, corroborando que se trata de un compuesto con un grupo hidroxilo en la posición C₃.

Compuestos N° 2 y 3: Los colores oscuros observados bajo luz ultravioleta que viran al amarillo por acción del NH₃ responden a estructuras C₇ glicosiladas. Si bien el compuesto N°2 no brindó un color amarillo neto, la consideración de su R_f y el color brindado por el añadido del reactivo NA indica derivados glicosilados en la mencionada posición, de compuestos 3'-4' dihidroxilado en el anillo B. Después de una hidrólisis controlada por espacio de 4hs. se confirmó la aglicona por co-cromatografía con testigo puro concluyendo que se trata de la quercetina.

Compuestos N° 4 y 5: Al igual que en los compuestos N°2 y 3 la variación del color oscuro observado bajo luz U.V. que vira a amarillo en presencia de vapores de NH₃ orienta a derivados 7-O-glicosilados. No obstante la diferencia con los anteriores se manifiesta en los valores de R_f, que al ser mayores indican menor cantidad de hidroxilos en el anillo B en la aglicona lo que se confirma con el añadido del reactivo NA que brinda color amarillo, típico de derivados con carbonos 4'-OH y 7-OR. Nuevamente una hidrólisis por espacio de 4hs liberó la aglicona que se confirmó como kaempferol por co-cromatografía en 5 sistemas de solventes con testigo puro.

Compuesto N° 6: Presente sólo en el extracto de acetato de etilo, presenta coloración y R_f que coinciden con los datos de la cirsimarina, flavona 6,7-di Me, 4'-OH; de la que existen antecedentes de su presencia en *L. Caulescens*. (Delgado, et al. 1992).

M. mollis

Compuesto N° 1: El color naranja obtenido con el agregado de NA sugiere un sistema orto dihidroxilado en el anillo B. Comparando los valores de R_f con el cuadro (N°10) se trata de un flavonol. La co-cromatografía del compuesto con la quercetina en los cinco sistemas de solventes usados, confirma que se trata del mismo flavonol.

Compuesto N° 2: El color oscuro visualizado bajo luz ultravioleta y el cambio del mismo al amarillo por acción del NH₃ responde a estructuras C₇ sustituida. La consideración de su R_f y el color brindado por el añadido del reactivo NA indica derivados 3'-4' dihidroxilado en el anillo B, glicosilados en la citada ubicación,. Una hidrólisis controlada liberó recién a las 4hs la aglicona, cuya identidad se confirmó por co-cromatografía con testigo puro concluyendo que se trata de la quercetina.

Compuestos N° 3 y 4: Los compuestos con la posición 3-0-sustituidos presentan color oscuro observados bajo luz ultravioleta y viran al amarillo-verdoso por acción del NH₃. Estos dos compuestos responden a esas características. Si se considera el valor de sus respectivos R_f y el color brindado por el añadido del reactivo NA son compuestos 3'-4' dihidroxilado en el anillo

B, sustituidos en la mencionada posición. Después de una hidrólisis por espacio de 2 hs. se confirmó la aglicona quercetina, por co-cromatografía con testigo puro .

Compuesto N° 5: En escasa concentración, solo se detectó en el extracto acuoso. Las características de los compuestos metoxilados en posición C₄' en cuanto a valor de R_f, color observado frente al reactivo NA y bajo luz U.V. en ausencia y presencia de amoníaco, coinciden con este compuesto, por lo que conociendo los antecedentes de la presencia de diosmetina en otras *spp.* de la familia, se trata de la misma aglicona.

CONCLUSIONES

La determinación preliminar del contenido de flavonoides mayoritarios en ambas especies revela que en:

L. meyenii a) contiene flavonoides. b) se trata de flavonoles 3'-4' dihidroxilados y 4'-OH mono hidroxilado en el anillo B, cuyos glúcidos están unidos en la posición C₇. c) los antecedentes encontrados describen sólo presencia de flavonas polimetoxiladas en el género, en esta oportunidad se detectó una de ellas, la cirsimaritina. d) la reacción de caracterización para la detección de flavonoles 6-OH el resultados fue positivo, no se encontró antecedentes sobre la presencia de los mismos en el género *Lepechinia*, si hay antecedentes en el género *Scutellaria*.

M. mollis a) contiene flavonoides b) la mayoría de los detectados responden a estructuras de flavonoles 3'-4' dihidroxilados en el anillo B, glicosilados en posición C₃. Los antecedentes de flavonoides del género informan ya sobre este tipo de derivados en otras especies aunque también lo hacen sobre derivados glicosilados de la misma aglicona, pero en posición C₇, detectados en menor proporción en esta oportunidad. c) en lo que a flavonas se refiere, se detectó y en escasa concentración , una sola de ellas, la diosmetina.

Actividad antimicrobiana

M. mollis

Ambas bacterias fueron inhibidas en distintos grados por los extractos de esta especie, mostrando *E.coli* casi siempre mayor sensibilidad respecto a *S. aureus*.

La actividad de los mismos se debe a la presencia de flavonoides tanto en el extracto total como en las fracciones de cloroformo, acetato de etilo y agua.

L. meyenii

Frente a ambos microorganismos el extracto total y las fracciones obtenidas con los diferentes solventes, mostraron baja actividad, excepto la fracción de acetato de etilo que

mostró una acción inhibitoria cercana a la del cloramfenicol frente a *E. coli.*, a la concentración ensayada.

BIBLIOGRAFÍA

- **AVILA ACEVEDO, J.G; MUÑOZ LÓPEZ, J.L.; MARTÍNEZ CORTEZ, G.** (1993). In Vitro antimicrobial activity of varius plants extracts used by Purepecha against some Enterobacteriaceae. *International Journal of Farmacognosy.* 31(1): 61-64.
- **BENNET, J. V., BRODIE, J. L., KIRBY, W. M: M.** (1966). Simplified achúrate meted for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl. Microbid.,* 14,2170-177.
- **DE APARICIO, F., DIFRIERI, H. A. et al.** (1958). La Argentina. Suma de geografía. Tomo III. 1º Edic. *Ed. Peuser.* :133-141.
- **DELGADO, G.** (1992). Abietanoid acid from *L. Caulescens.* *Phytochemistry.* 31,9:3159.
- **HARBORNE, J. B.** (1982). The Flavonoids. Advances in Research since 1975. *Chapmand and Hall.* (Eds). London. : 1060.
- **IONATHAN, L. T., CHE, CH. T., PEZZUTO, J. M., FARNSWORTH, N. R.** (1989). *Journal of Natural Products .* 52,751-575.
- **MABRY T.J., MARKHAN, K.R.; THOMAS, M.B.** (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer Verlag, New York, : 11.
- **MC CORMICK, S. P.** (1982). Flavonoids Chemistry of *Plassiflora* subgenus *Plectostmma.* Doctor of Philosophy. Dissertation. The University of Texas at Austin.
- **METCALFE, C. R., CHALK, L.,** (1972). Anatomy of the dicotyledons. Vol II.. *Edic. Oxford at the Claredon Press.* England. : 1.041- 1.053
- **MORITA.** (1977). Determinación de flavonoides 6-OH. *Phytochemistry.* vol. 16, :1618.
- **NAVARRO, H.E.** (1994). Catamarca. Hacia un estudio integral de su geografía. III Ed. :11-16. *Imprenta Diartegraf-Offset.*
- **PEREZ,C., PAULI, M., BAZERQUE, P.** (1990). An antibiotic assay by the agar-well diffusion method. *Acta Biol.Med.Exp.* 15,:113-115.
- **PEREZ,C., PAULI, M., BAZERQUE, P.** (1991). Deteccion and antimicrobial activity in cultures of microorganisms . *Acta Physiol. Pharm .Latinoam.* :121-123.
- **PRIMO.V.; M. OLIVA; S. ZANÓN; M. MATTEA; J. DAGUERO; M. DEMO; RAMOS Y M. GROSSO.**(1999) *Resúmenes del I Congreso de la Región Central de Plantas Medicinales y Aromáticas. IV Encuentro Nacional de Plantas Medicinales.* Córdoba – Argentina.
- **ROBINSON, T.** (1967). The Organic Constituents of Higger Plants. Their Chemistry and Interrelationnshipe. Third Edition. Departament of Biochemistry University of Massachusetts. *Cordus Press. P.O. Box 587.*

- **ROMERO, C. A.** (1991). Estudio fitoquímico de *Lepechinia meyenii* (Walp) Epling. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Catamarca. :6-9.
- **ROMERO, C. A., JORRATTI DE JIMENEZ, M., GIORDANO, O. S., TONN, C. E.** (1997). *Revista de Ciencia y Técnica*. UNCa. Vol. IV N°:8- Año 5-1999. ISSN N°0328.
- **SENATORE, F.** (1995). Flavonoid glicosides from *Mythostachys verticillata*."peperita".Flav. Frag. J. 10: 43.
- **SENATORE, F. et. al** (1995). Flavonoid glicosides from *Mythostachys spicata*.(Lamiaceae). Biochem. Syst. Ecol 23 (5):571.
- **TERESCHUCK, M. L., QUARENGHI DE RIERA, M. V. , CASTRO, G. R., ABDALA, L. R.** (1997). Antimicrobial activity of flavonoides from leaves of *Tagetes minuta*. *J. of Ethnopharmacology* 56 (3), : 227-232.
- **WATSON, L., DALLWITZ, M. J.** (1999). The families of flowering plants. : 1-5. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>.
- **ZULUAGA** (1999). Catálogo de las Plantas Vasculares de la Argentina. *Ed.* : 773.
- **ZYGADLO, J. A.** et. al. (1995). Essencial oil variability in the composición of *Minthostachys verticillata*. Biochem. Syst. Ecol. 29(4):319.
- **ZYGADLO, J. A., MAESTRI, D.M., LAMANUE, A. L. y GROSSO, N. R.** (1995). Un nuevo quimiotipo en *Minthostachys verticillata*. Epling. Resúmenes del IV Congreso Italo-Latinoamericano de Ednomedicina. Quito. Ecuador.