

Evaluación de la actividad antimicrobiana de tres chalconas sintéticas frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*

Rodríguez Pérez Betsabé¹, Luna Mora Ricardo Alfredo², Cruz Sánchez Tonatiuh Alejandro¹, Penieres Carrillo José Guillermo²

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54714. México.

² Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1. Laboratorio de Química Orgánica, Av. 1o de Mayo S/N, Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54740 México.

*Autor para correspondencia: berope380@hotmail.com

Recibido:

12/mayo/2018

Aceptado:

01/agosto/2018

Palabras clave:

Chalconas, actividad antimicrobiana

Keywords:

chalcones, antimicrobial activity

RESUMEN

Las chalconas son compuestos distribuidos en la naturaleza y son precursores biosintéticos de los flavonoides. Su estructura química presenta un anillo aromático en cada extremo de una cadena de tres átomos de carbono con un sistema carbonílico α,β -insaturado, en donde los anillos pueden estar sustituidos o no por grupos hidroxilo o metoxilo, regularmente. Autores reportan la relación de las actividades biológicas con las características estructurales mencionadas o con modificaciones de ellas.

En el presente trabajo se sintetizaron tres chalconas para evaluar su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* por el método de difusión en agar. Las chalconas con sustituyentes inhibieron el crecimiento de los tres microorganismos y, únicamente, la chalcona sin sustituyentes, presentó efecto fungicida. El efecto antimicrobiano de las chalconas se correlaciona con los patrones de sustitución de los anillos aromáticos.

ABSTRACT

Chalcones are compounds that are distributed in nature and are flavonoid biosynthetic precursors. Its chemical structure presents an aromatic ring at each end of a chain of three carbon atoms with a α,β -unsaturated carbonyl system, where the rings may be substituted or not by hydroxyl or methoxyl groups, regularly. Authors report the relationship of biological activities with the structural characteristics mentioned or with modifications of them.

In the present work three chalcones were synthesized to evaluate their antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* by the agar diffusion method. The chalcones with substituents inhibited the growth of the three microorganisms and, only, the chalcone without substituents, presented a fungicidal effect. The antimicrobial effect of the chalcones is correlated with the substitution patterns of the aromatic rings.

Introducción

Las chalconas son metabolitos secundarios ampliamente distribuidas en la naturaleza (frutas, verduras, especias, té y alimentos a base de soya) y son precursores en la biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides (Mora, 2011; Blanco et al., 2016; Sapra et al., 2016).

Su estructura química presenta un anillo aromático en cada extremo de una cadena de 3 átomos de carbono con sistema carbonílico α,β -insaturado (1,3-difenil-2E-propen-1-ona) (figura 1) (Blanco et al., 2016). Tanto el sistema carbonílico así como la presencia y posiciones de los sus sustituyentes químicos, determinan el amplio rango de su actividad biológica: antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiviral, anticancerígena, antiinflamatoria, entre otras. Se consideran compuestos con importantes potencialidades terapéuticas (Singh y Kumar, 2014; Mahapatra y Bharti, 2016; Díaz et al., 2016; Blanco et al., 2016).

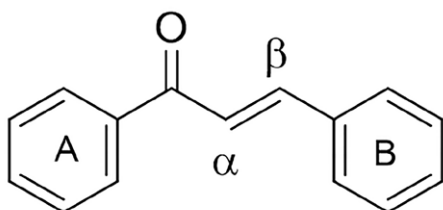


Figura 1. Estructura química de una chalcona

Estos compuestos se pueden obtener en el laboratorio a partir de síntesis química, mediante la condensación de Claisen-Schmidt (Velarde y González, 1995) entre la acetofenona o derivados de ella, con un aldehído aromático, mediante catálisis ácida o básica, seguido de una deshidratación para producirlas (figura 2) (Chetana, et al., 2009).

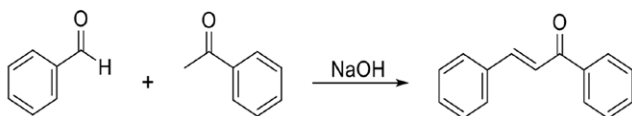


Figura 2. Síntesis general de chalconas.

En la actualidad, debido a la creciente resistencia de los microorganismos frente a los antibióticos comerciales, la obtención de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana continúa siendo objeto de numerosas investigaciones, motivo por el cual se consideran a las chalconas como compuestos que presentan importantes potencialidades terapéuticas (Mahapatra y Bharti, 2016).

La síntesis de nuevos compuestos con posible actividad biológica es un gran reto de la investigación en química orgánica y medicinal y es de gran impacto debido a las posibilidades de desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades.

El objetivo de este trabajo fue sintetizar y evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de tres chalconas, a través del método de difusión en agar (Método de Kirby-Bauer) frente a la bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC B-1005), la bacteria Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 8739) y el hongo levaduriforme (*Candida albicans* ATCC 14065).

Metodología

Síntesis de chalconas

Se realizó la reacción de condensación de Claisen-Schmidt entre el benzaldehído, o derivados, y la acetofenona, o derivados, a una concentración de 0.01 M, respectivamente.

La mezcla se colocó en un matraz bola de 250 mL de fondo redondo equipado con un agitador magnético. Posteriormente, se agregaron gota a gota sobre la mezcla de reacción, 10 mL de una solución de NaOH (0.1 M) por un lapso de 30 minutos manteniendo la temperatura de reacción entre 20 °C y 25 °C utilizando un baño de hielo. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante por 5 horas y posteriormente se neutralizó con HCl 0.1 N y se dejó enfriar hasta la formación de un precipitado.

El precipitado fue filtrado y se dejó secar a temperatura ambiente. El producto principal fue purificado utilizando cromatografía en columna (sílica gel y hexano:acetato de etilo (8:2)) para la obtención de las chalconas puras.

Se calculó el rendimiento de los compuestos obtenidos y su punto de fusión (Chetana et al., 2009; Hormaza, et al., 2009).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Los microorganismos evaluados fueron la bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC B-1005), la bacteria Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 8739) y el hongo levaduriforme (*Candida albicans* ATCC 14065).

Se sembraron las bacterias en caldo Mueller-Hinton (MH) y la levadura en caldo Dextrosa Sabouraud y se incubaron a 37 °C por 24 horas para bacterias y para la levadura por 35 °C por 48 horas.

Se ajustó la densidad del inóculo al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland, $(1-2) \times 10^8$ UFC/mL para bacterias y $(1-5) \times 10^6$ UFC/mL para levaduras. Se ajustó la turbidez espectrofotométricamente entre 0.08 – 0.12 nm a 625 nm (CLSI/M44-A2, 2009; CLSI/M26-A, 2009; Londoño, 2010).

Se emplearon discos estériles de papel filtro Whatman No. 5 de 6 mm de diámetro, impregnados con 10 μ L del compuesto a evaluar (6 mg/disco) previamente disueltas en etanol, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Como testigo negativo se utilizaron discos impregnados con etanol 10 % y como testigos positivos para bacterias, se utilizó un sistema de Multidiscos® combinado BIORAD, conformado por 12 antibióticos y como antifúngico se utilizó un disco impregnado con 50 mg de ketoconazol (Conazol Laboratorios LIOMONT).

A partir del inóculo del tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland, se realizó un sembrado masivo sobre las placas de agar Mueller-Hinton suplementado con 2 % de glucosa y 0.5 μ g/mL de azul de metileno, se colocaron los discos impregnados con las muestras y un disco del testigo negativo.

Los ensayos se realizaron por triplicado. Se incubaron por 24 horas a 37 °C y se midieron los halos de inhibición. En el caso de la levadura se reincubaron las placas y se midió nuevamente el diámetro de los halos a las 48 horas. Los resultados se expresaron como el promedio del diámetro de los halos de inhibición para cada tratamiento (CLSI/M44-A2, 2009; Londoño, 2010)

Los datos obtenidos en la pruebas de la actividad antimicrobiana fueron comparados estadísticamente por el método de ANOVA, apoyados en el Programa Estadístico GraphPad Prism 7.04, empleando un nivel de significancia de ($p < 0.05$).

Resultados y discusión

Síntesis de chalconas

Se obtuvieron tres nuevas chalconas, el compuesto denominado PLRC-1 (1,3-Difenilprop-2E-en-1-ona) y otros dos compuestos denominados PLRC-2 (1-(3,4-Dihidroxifenil)-4-(2,4,6-trihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona) y PLRC-3 (1-(3,4-Dihidroxifenil)-4-(2,4-dihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona) (figura 3), obteniendo rendimientos entre 70 y 96 % (tabla 1).

Actividad antimicrobiana

Teniendo en cuenta las posibles potencialidades bioactivas de las chalconas sintetizadas, fue evaluada la actividad antimicrobiana. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2, observando los halos de inhibición de los testigos positivos y negativos para los microorganismos. El efecto de las chalconas no está relacionado con el etanol al 70 % utilizado como disolvente, ya que éste no afectó el crecimiento de ninguna bacteria y hongos (tabla 1).

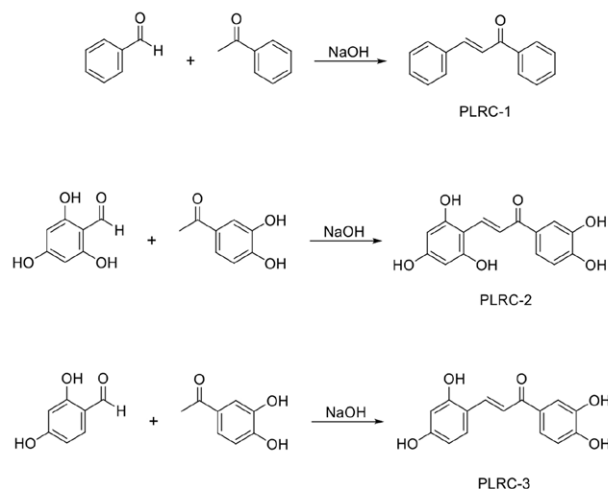


Figura 3. Síntesis general de chalconas PLRC 1-3.

Tabla 1. Especificaciones físicas y químicas de las chalconas sintetizadas.

	Chalcona PLRC-1	Chalcona PLRC-2	Chalcona PLRC-3
Aspecto	Cristales amarillos	Polvo café	Polvo rojo
Peso obtenido (g)	13.0	5.0	6.7
Rendimiento (%)	88	71	96
Punto de fusión (°C)	47	100	230

Tabla 2. Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los análogos de chalconas.

Halos de inhibición (mm) frente a cepas bacterianas		
Sustancias evaluadas	<i>S. aureus</i> ATCC B-1005	<i>E. coli</i> ATCC 8739
Amikacina (AK) 30 µg	10 ± 0.6	17 ± 0.6
Ampicilina (AM) 10 µg	0.0	0.0
Cefalotina (CF) 30 µg	0.0	0.0
Ceftriaxona (CRO) 30 µg	0.0	26 ± 0.5
Cloranfenicol (CL) 30 µg	11 ± 1.0	29 ± 1.0
Dicloxacilina (DC) 1 µg	8.0 ± 0.5	0.0
Enoxacina (ENX) 10 µg	0.0	0.0
Eritromicina (E) 15 µg	0.0	0.0
Gentamicina (GE) 10 µg	10 ± 0.6	13 ± 0.6
Netilmicina (NET) 30 µg	0.0	18 ± 0.5
Penicilina (PE) 10 U	0.0	0.0
Trimetoprim-Sulfametoxazol(SXT) 25 µg	0.0	30 ± 0.5
PLRC-1	0.0	0.0
PLRC-2	14.3 ± 0.6	12.3 ± 0.6
PLRC-3	9.7 ± 0.6	10.3 ± 0.6
Etanol	0.0	0.0
Halos de inhibición (mm) frente a cepa fúngica		
<i>C. albicans</i> ATCC 14053		
Ketoconazol	24 ± 0.5	
PLRC-1	12.0 ± 1.0	
PLRC-2	9.3 ± 1.5	
PLRC-3	11.3 ± 0.6	
Etanol	0.0	

Las chalconas con sustituyentes hidroxilo en los anillos A y B (PLRC-2 y PLRC-3) mostraron efecto bactericida frente a *S. aureus* y *E. coli*, como se muestra en la figura 4. Observando las diferencias significativas entre los efectos de los antibióticos y las chalconas (figura 4). Los resultados confirman lo reportado por Mora (2011), en cuanto a que las chalconas con diferentes sustituyentes químicos presentan actividad antimicrobiana frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus*.

Al analizar los datos estadísticamente para *S. aureus* (figura 4-A) se observó que la bacteria presentó mayor sensibilidad frente a Ceftriaxona y a la chalcona PLRC-2. Respecto a la chalcona PLRC-3, no presentó

diferencia significativa con los antibióticos con halos de inhibición. Los resultados confirman lo reportado por Mora (2011), indicando que el número y posición de los sustituyentes hidroxilo están relacionados con la actividad antimicrobiana frente a aislamientos clínicos de *S. aureus*.

Para el caso de *E. coli* (figura 4-B) observamos que las chalconas inhibieron el crecimiento de la bacteria, pero con menor efecto que los antibióticos. Únicamente la chalcona PLRC-2 no tuvo diferencia significativa con el Cloranfenicol.

Desai y col., (2003) reportan la actividad de chalconas sintetizadas a partir de 2-aminopirimidina y sus derivados, frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que se han comparados en algunos estudios con antibióticos como la ampicilina, penicilina y tetraciclina.

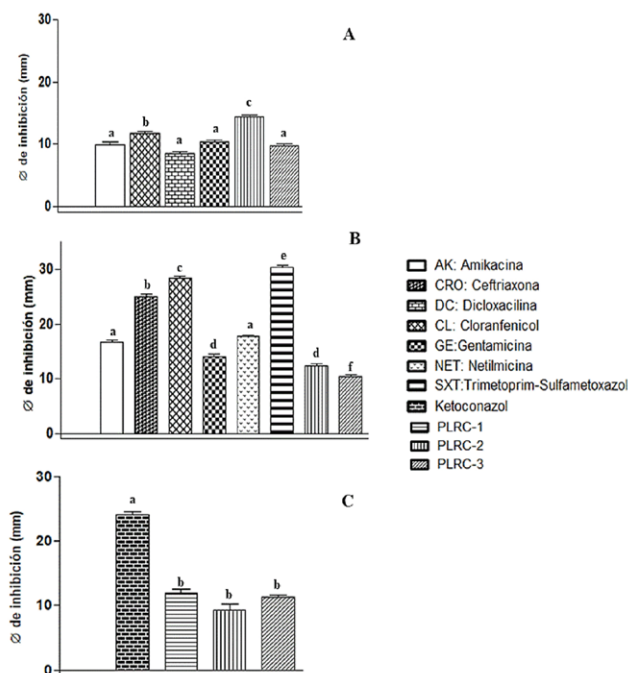


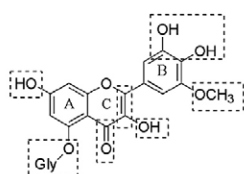
Figura 4. Efecto de inhibición de chalconas (PLRC-1 a PLRC-3) frente a **A:** *Staphylococcus aureus* (ATCC B-1005), **B:** *Escherichia coli* (ATCC 8739) y **C:** *Candida albicans* (ATCC 14053). Literales o letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05).

El efecto de inhibición de crecimiento de *C. albicans* se presentó en las tres chalconas, observando diferencia significativa con el antifúngico (figura 4-C).

Los halos de inhibición de crecimiento observados producidos por las chalconas contra *C. albicans*, no superaron el efecto del ketoconazol (figura 4-C), indicando la poca sensibilidad de la levadura ante ellas. La acción antifúngica se ha atribuido en gran medida a

la reactividad de la cetona, como aceptor en la reacción de Michael se une a los grupos tiol de ciertas proteínas. Probablemente de esa manera, la mayoría de las chalconas inhiben la biosíntesis de la pared celular de la levadura y despliegan así su potencial antifúngico (Guerrero, 2016).

Otras investigaciones manifiestan que el grupo carbonilo α,β -insaturado del núcleo de las chalconas y de los flavonoides, la posición y cantidad de los grupos hidroxilo u de otros sustituyentes químicos que presentan los anillos aromáticos (figura 5), son factores que influyen en el aumento de las potencialidades farmacológicas de estos compuestos (Boumendjel, et al., 2008; Zhang, et al., 2012; Karthikeyana, et al., 2015; Díaz et al., 2016).



Group	Activity	Anti-vial/ Bacterial	Anti-cancer	Anti-neuro- -pathology	Cardio -protective	Anti -inflammatory	Anti -diabetic	Anti -oxidant
Catechol		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Number of -OH		↓	↑	↑	-	↑	↑	↓
O-Me		↓	↑	↑	↑	-	↓	↑
C ₂ =C ₁		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
3-OH		↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑
4-Carbonyl		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Glycosylation		↑	↓	↓	↓	↓	↑	↓

Figura 5. Resumen de la relación de actividad de estructura de flavonoides (Modificado de Wang, et al., 2018).

Conclusiones

Se obtuvieron tres chalconas evaluadas frente a cepas de bacterias grampositivas (*S. aureus*), gramnegativas (*E. coli*) y un hongo levaduriforme (*C. albicans*).

El efecto inhibitorio de las chalconas sobre los microorganismos patógenos evaluados puede correlacionarse con los patrones de sustitución de los anillos aromáticos.

Con base en los resultados, será importante evaluar otras estructuras de chalconas con el fin de encontrar sistemas con valores de los halos de inhibición equivalentes o mayores a los controles positivos empleados.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido de los siguientes proyectos: UNAM-DGAPA, PAPIIT IT 200915, PAPIIT IN217118, FESC:PIAPIC 1632, PIAPIC 1618 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT), Número de beca: 511917.

Referencias

Blanco, M., Dip, A., Torres, E., Peña, D., Vogel, C., Bullaín, M. y Fajardo, L. (2016). Actividad antibacteriana *in vitro* de nuevas chalconas halogenadas. *Química Viva*, 15 (2): 17-28.

Boumendjel, A., Boccard, J., Carrupt, P., Nicolle, E., Blanc, M., Geze A., Choisnard, L., Wouessidjewe, D. Matera, E. y Dumontet, C. (2008). Antimitotic and antiproliferative activities of chalcones: Forward structure-activity relationship. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51: 2307-2317.

Chetana, B. P., Mahajan, S. K., Suvarna, A. K. (2009). Chalcone: A Versatile Molecule. *J. Pharm. Sci. & Res.*, 1(3): 11-22.

CLSI/M26-A, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Recuperado el 26 de febrero del 2018, de

https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf

CLSI/M44-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Recuperado el 26 de febrero de 2018, de https://clsi.org/media/1634/m44a2_sample.pdf.

Desai, J. y Desai, R. (2003). Synthesis and antibacterial activity of chalcona and 2-aminopyrimidine and their related compound. *Asian Journal of Chemistry*, 15(2):650-654.

Díaz, T.C., Graña, E., Reigosa, M. J., Sánchez, M. A. (2016). Biological activities and novel applications of chalcones. *Planta Daninha*, 34 (3): 607-616.

Guerrero V., L. (2016). Estudio de la reactividad de chalconas como precursores en la síntesis de nuevos compuestos pirazolínicos, betalactámicos y tiazolidínicos fusionados. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Hormaza, A., Arbeláez, O., Valencia, N. (2009). Síntesis y caracterización espectroscópica de una serie de chalconas. *Scientia et Technica*, XV (43): 316-320.

Karthikeyana C. H., Narayana N., Ramasamy S., Vanamc, U., Manivannan E., Karunagarani D., Trivedi, P. (2015). Advances in chalcones with anticancer activities. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 10: 1-19.

Londoño O. A., Ávila A. J., Canales M. M., Hernández D., C., Serrano R., Flores O. C., Durán D. A., Penieres C. J., García T. C., Cruz S. T. (2010). Antibacterial comparative study extracts of Mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 1250 - 1254.

Mahapatra, D. y Bharti, S. 2016. Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. *Life Sciences*. 148:154-172.

Mora A. (2011). Modo de acción de la chalcona 1-(4-metilfenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como inhibidor de β -lactamasa: estudio cinético y caracterización inicial mediante espectrometría de masas. Tesis de Maestría, Universidad de Antioquía, Colombia.

Sapra, S., Sharma, K., Bhalla, Y. y Dhar, L. 2016. Chalconoid Derived Heterocycles as Potent Bioactive Molecules: A Review. *Journal of Chemical Sciences*. 7:129.

Singh P. A., Kumar V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European journal of Medicinal Chemistry*, 85: 758-777.

Velarde E., González A. (1995). Reacción de Claisen-Schmidt para la obtención de chalconas. *Revista de Química*, IX (2): 137-143.

Wang, T., Li, Q. y Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13:12-23.

Zhang H., Liu J., Sun, J., Yang X., Zhao, T. T., Lu X., Gong H., Zhu H. (2012). Design, synthesis and biological evaluation of novel chalcone derivatives as antitubulin agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 20:3212-3218.