

METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA TABEBUIA SERRATIFOLIA

Myriam Pacheco T., Olga Lock de Ugaz

1. INTRODUCCION

Trabajos de investigación efectuados en plantas de la familia Bignonaceae y particularmente en especies de *Tabebuia*, han mostrado contenido de monoterpenos, flavonoides, lignanos, derivados de ácido benzoico y cinámico, y especialmente quinonas, algunas de las cuales tienen particular importancia por la actividad antitumoral encontrada en ellas [1]. La más notable es el lapachol, prenilnaftoquinona que en los últimos años ha recobrado interés en su estudio debido a su comprobada actividad antimalárica, antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, analgésica y especialmente por su actividad antitumoral [1-4]; debido a ello, se intensificaron las investigaciones en especies de *Tabebuia* logrando encontrar otras quinonas con actividad biológica [5-8].

La mayoría de investigaciones en especies de *Tabebuia* se orientaban a la madera, pues se asumía que los componentes de la corteza y la madera eran los mismos; sin embargo, Girard y col. [9] compararon las naftoquinonas presentes en la corteza y madera de la *Tabebuia rosea*, encontrando que los componentes de ambas partes eran diferentes.

En el presente trabajo de investigación se aislaron metabolitos secundarios presentes en la corteza y en la madera de la especie *Tabebuia serratifolia* procedente del departamento de San Martín, conocida por los pobladores de la zona como “chontaquiro amarillo”, cuya infusión es bebida por las personas que sufren del corazón, tuberculosis de la piel y cáncer [10], contribuyendo así al estudio de especies que habitan en nuestra amazonía y que son usadas en medicina popular. Los compuestos aislados, y caracterizados mediante técnicas espectroscópicas fueron: dos derivados del ácido benzoico, β -sitosterol, lapachol y dehidrolapachona.

No pudo determinarse la estructura de otros cinco compuestos —dos de naturaleza esteroidal y tres quinónicos— al haberse obtenido sólo pequeñas cantidades de ellos.

El trabajo fue complementado con ensayos biológicos empleando larvas de *Artemia salina*.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 *Estudio Químico*

Se investigaron independientemente la corteza y la madera empleando, en cada caso, diferentes métodos de extracción, separación y purificación.

2.1.1 *Corteza*

- **Extracción**

Se maceraron en etanol 4,50 kg de corteza durante 7 días, y se sometió el marco a dos extracciones sucesivas con etanol a 50°C durante 20 horas cada vez. Los extractos etanólicos reunidos fueron sometidos a partición con diclorometano y agua. La fracción de diclorometano fue fraccionada nuevamente con hexano y metanol al 90%, obteniendo finalmente 10,60 g de extracto metanólico y 6,80 g de extracto hexánico.

- **Separación**

Extracto metanólico. Con este extracto se corrió una *CC

* Las CC fueron empacadas con silicagel 60 (70-230 mesh, Merck).

empleando silicagel y mezcla de diclorometano y metanol de polaridad creciente. Las fracciones similares fueron reunidas formando 4 grupos, G-1 a G-4.

Extracto hexánico. Fue sometido a separación en CC empleando silicagel y hexano, e incrementando paulatinamente la polaridad con diclorometano y metanol.

Las fracciones comunes fueron reunidas formando cuatro grupos, G-5 a G-8.

- **Purificación**

Cada uno de los grupos formados fue purificado empleando diversas técnicas cromatográficas, logrando aislar, entre otros, los siguientes compuestos:

- De G-2 se aisló el compuesto MP2.
- De G-3 fueron aislados los compuestos MP2 y MP3.
- De G-4 se obtuvo el compuesto MP6.

2.1.2 Madera

Se maceró 1 kg de madera en 4L de NaOH al 10% durante 24 horas, y se reextrajo el marco con otra solución igual. Se reunieron y filtraron los extractos y se les adicionó 160 mL de solución de HCl 6N, obteniendo un precipitado y una solución. El precipitado fue lavado exhaustivamente con etanol obteniendo 980 mg de extracto etanólico. La solución fue extraída sucesivamente con éter etílico y acetato de etilo, logrando finalmente 712 mg de extracto de acetato de etilo.

- **Separación**

El extracto etanólico fue cromatografiado en CC y eluido con diclorometano y mezclas de diclorometano-metanol de polaridad creciente. De otro lado, se reunieron los extractos etéreo y de acetato de etilo, y se corrió una CC de similares características a la anterior. Las fracciones comunes de ambas columnas fueron reunidas formando cuatro grupos, G-9 a G-12.

- **Purificación**

Cada grupo fue sometido a purificaciones empleando diversas técnicas cromatográficas, logrando aislar finalmente los com-

puestos MP9 y MP10 del extracto G-9; sin embargo, al cabo de algunos días MP10 sufría transformación dando lugar al compuesto MP9.

2.2 Estudio Biológico

Se efectuó un bioensayo simple, empleando larvas de *Artemia salina* [11] el cual determinó la dosis letal media (LC50) de extractos y compuestos activos en un medio salino.

Este bioensayo puede ser empleado en la detección de constituyentes de la planta que tengan actividad biológica; los compuestos activos así identificados, podrían ser sujetos a bioensayos más elaborados para actividades farmacológicas más específicas.

Las muestras fueron preparadas disolviendo el extracto en el solvente en el cual era soluble, haciendo diluciones hasta obtener concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Por otro lado se incubaron las larvas de *Artemia salina* con aquéllas que eclosionaron; se determinó la LC50 a las 24 horas empleando el extracto en cada una de las diluciones señaladas en agua salina.

Los resultados de LC50 ($\mu\text{g/mL}$) obtenidos fueron, para el extracto etanólico 1000, acuoso 795, diclorometano 39, hexánico 42 y metanólico 528. Para el extracto etéreo de la madera fue 405 $\mu\text{g/mL}$.

3. RESULTADOS: DATOS FISICOS Y ESPECTRALES DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

3.1 Compuesto MP2 (100 mg).- Agujas incoloras. P.F. 142-144°C (diclorometano), revela con tricloruro férrico, UV λ máx (EtOH) 218; 258; 290 nm; λ máx (EtOH/NaOH) 210; 212; 214; 215; 249; 283; 325 nm. IR (νKBr) 2950 (banda amplia); 1670; 1590 cm^{-1} ; ^{13}C -RMN(CDCl_3) 56,05; 110,30; 112, 30; 121, 70; 124, 57; 148, 50; 153, 70; 171, 76 ppm. ^1H -RMN (CDCl_3) 3,95 (3H, s); 6,90 (1H, d); 7,60 (1H, d); 7,80 (1H, d) ppm.

3.2 Compuesto MP3 (70 mg).- Agujas incoloras. P.F. 146-148°C (diclorometano), revela con tricloruro férrico. UV λ máx (EtOH) 218; 260;

291 nm; λ máx (EtOH/NaOH) 210; 212; 285; 296 nm. IR (ν KBr) 3490; 2960 (banda amplia); 1675; 1600 cm^{-1} . ^{13}C -RMN (CDCl_3) 56; 112; 114; 123; 154; 158; 170 ppm. ^1H -RMN (CD_3OD) 3,90 (3H, s); 6,90 (1H, dd); 7,60 (1H, m).

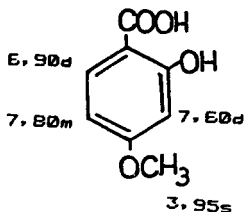
3.3 Compuesto MP6 (120 mg).- Agujas incoloras brillantes. P.F. 130-132°C (metanol). Revela con ácido sulfúrico, tricloruro de antimonio-ácido acético y Liebermann-Burchard, produciendo en todos los casos color rojo después de calentamiento.

3.4 Compuesto MP9 (13 mg, 0,013 %).- Agujas anaranjadas. P.F. 116-118°C (diclorometano). Revela con azul de metileno reducido. UV λ máx (MeOH) 252; 280; 330; 440 nm. IR (ν KBr) 2980; 2860; 1725; 1675; 1642; 1590 cm^{-1} . ^{13}C -RMN (CDCl_3) 28,20 (2C); 79,00; 116,00; 117,46; 126,15 (2C); 130,48; 133,72 (2C); 152,00; 178,60; 182,10 ppm. ^1H -RMN (CDCl_3) 1,65 s; 5,75 d (J=10,5); 6,70 d (J=10, 5); 7,70 (J= 6, 5); 8,20 d (J= 6,5).

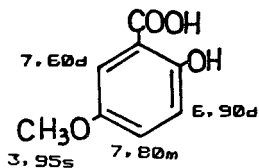
3.5 Compuesto MP10 (0,051g, 0,005%).- Agujas amarillas. P.F. 128-130°C (diclorometano). Revela con azul de metileno reducido. UV λ máx (MeOH) 252; 281; 331; 390 nm. λ máx (MeOH/NaOH) 252; 275; 335; 476 nm. λ máx (MeOH/NaOH/HCl) 252; 281; 332; 390 nm. IR (ν KBr) 3360; 2915; 2860; 1660; 1640; 1590 cm^{-1} .

4. DISCUSION

4.1 Compuesto MP2.- El espectro IR de MP2 es característico de un grupo carboxílico, los espectros ^{13}C -RMN y ^1H -RMN indican que se trataría de un compuesto aromático y que tendría un sustituyente metoxilo. El desplazamiento de señales en el UV ante el añadido de NaOH sugiere la presencia del grupo OH, además, el espectro ^{13}C -RMN indica que dos carbonos aromáticos están unidos a grupos atractores de electrones, uno de ellos unido al grupo metoxilo, y el otro estaría unido al grupo hidroxilo. Sin embargo, el espectro IR no muestra la señal del grupo OH; esto se debería a la formación de un enlace intramolecular entre el grupo C=O del ácido carboxílico y el OH fenólico, los que estarían en posición orto. Con estos datos, las estructuras propuestas corresponden a los ácidos 4-metoxisalicílico y 5-metoxisalicílico.

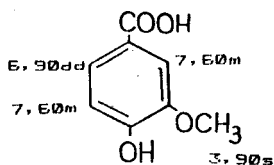


Acido 4-metoxisalicílico

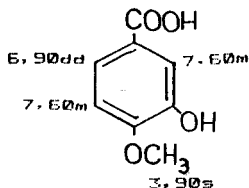


Acido 5-metoxisalicílico

4.2 Compuesto MP3.- El espectro IR es también característico de un ácido carboxílico, y a diferencia de MP2, se aprecia la vibración característica del grupo OH. Los espectros $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ sugieren que se trata de un compuesto aromático y que tendría 2 C unidos a grupos atractores de electrones, uno de ellos al grupo metoxílico. MP3 sería un isómero de MP2, en el que el grupo OH no estaría en posición orto respecto al grupo COOH. Las estructuras propuestas corresponden a los ácidos vainílico e isovainílico.

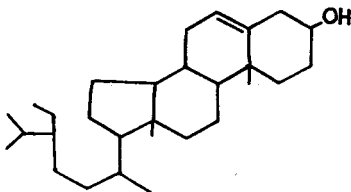


Acido vainílico



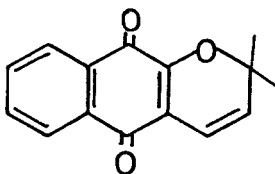
Acido isovainílico

4.3 Compuesto MP6.- Por el aspecto, solubilidad, punto de fusión y cromatografías comparativas, se determinó que MP6 era β -sitosterol, presente también en otras especies *Tabebuia*.



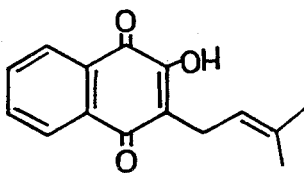
β -sitosterol

4.4 Compuesto MP9.- Revela con azul de metileno reducido, por lo que se trataría de una estructura quinónica; esto se confirma con el espectro IR que presenta absorciones características del grupo carbonilo de quinonas a 1675 y 1642 cm^{-1} y el alargamiento C=C de compuestos aromáticos a 1590 cm^{-1} . Los espectros UV, ^{13}C -RMNy ^1H -RMN indican que MP9 sería la dehidrolapachona, lo que fue confirmado con los valores reportados para este compuesto [12, 13].



Dehidrolapachona

4.5 Compuesto MP10.- Revela con azul de metileno reducido y presenta en el IR vibraciones de alargamiento C=O a 1660 y 1640 cm^{-1} , por lo que se trataría de una quinona. El IR muestra la presencia del grupo OH (3360 cm^{-1}), y del gem-dimetil (1355 y 1345 cm^{-1}). Analizando los espectros UV, IR y características de MP10, se encontró que eran idénticos a los del lapachol [12, 13]. Sin embargo, MP10 no era estable pues sufría transformación originando el compuesto MP9.



Lapachol

Agradecimientos.- A la Dra. Hilda Jurupe de la UNMSM por los ensayos de Artemia salina; al Sr. José Schunke por la recolección e identificación de la muestra botánica.

BIBLIOGRAFIA

1. Oliveira, A.; Raslan, D.; Miraglia, M. do Carmo, M.; Mesquita, A.; Zani, C.; Ferreira, D.; Maia, J. (1990) Estructura química e actividade biológica de Bignoniáceas Brasileiras. *Química Nova* **13**, 302-307.
2. Ferreira de S, C.; Concalves de L, O.; Leoncio D'A, I. (1968) Observacoes sobre as propiedades antitumorais e toxicologicas do extracto de liber de alguns componentes do cerno de Pau D'arco (Tabebuia avellaneda) *Rev. do Inst. de Antiobiot.* Recife. **8**, 89-94.
3. Osa, s.; Sekino, T.; (1969). Toxicidade e actividade anto-inflamatoria de Tabebuia avellaneda e Lorentz e Griesebach ("IPEROXO") *Rev. Fac. Farm. Bioquim.* S. Paulo **7**, 47-53.
4. Rao, M., Kingston D. (1982) Plant Anticancer Agents. XII. Isolation and structure elucidation of new citotoxic quinones from Tabebuia cassinoides. *J. Nat. Prod.* **45**, 60-604.
5. Zani, C.; Oliveira, A. (1991) Furanonaphtoquinones from Tabebuia ochracea. *Phytochem.* **27**, 2397-2381.
6. Sharma, P.; Khanna, R.; Rohatgi, B.; Thomson, R. (1988). Tecomaquinone-III: A new quinone from Tabebuia pentaphylla. *Phytochem.* **27**, 632-633.
7. Manners, G. D.; Jurd, L.; Wong, R.; Palmer, K.; (1975) Constituents of Tabebuia guayacan. The structure of guayacananin *Tetrahedron* **31**, 3019-3024.
8. Manners, G.; Jurd, L.; Wong, R.; Palmer, K. (1975) Guayin: an unusual oxalactone dibenzoxanthone from Tabebuia guayacan *J. C. S. Chem. Comm.* 387-388.
9. Girard, M.; Kindack, D.; Dawson, B.A.; Ethier, J. C. Awans, D. (1988). Naphtoquinone constituents of Tabebuia spp *J. Nat. Prod.* **51**, 1023.
10. Schunke, J. Comunicación personal.
11. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica.* **45**, 31-34.
12. Pouchert, Ch. J., (1975). **The Aldrich Library of Infrared spectra.** Aldrich Chemical Company.